

**Etablierung und Anwendung unterschiedlicher  
kolorimetrischer Detektionsmethoden zur  
Aktivitätsbestimmung von Modulatoren der ABC-Transporter  
ABCB1, ABCC1 und ABCG2**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Katja Stefan**

aus

Omsk, Russland

Bonn 2020

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Wiese
2. Gutachter: Prof. Dr. Christa E. Müller
3. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Jaehde
4. Gutachter: Prof. Dr. Arne Lützen

Tag der Promotion: 22.10.2020

Erscheinungsjahr: 2020

Man merkt nie, was schon getan wurde,  
man sieht immer nur, was noch zu tun bleibt.

*Marie Curie*



*Für Nola.*



# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	vii
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Das Phänomen der Multidrug Resistenz (Multidrug Resistance) .....	1
1.2. Die Familie der ATP-Binding-Cassette-(ABC)-Transportproteine .....	2
1.2.1. P-Glykoprotein (P-gp) / ABCB1 .....	4
1.2.1.1. Aufbau von ABCB1 .....	4
1.2.1.2. Substrate und Modulatoren von ABCB1 .....	7
1.2.2. Multidrug Resistance associated Protein 1 (MRP1) / ABCC1 .....	11
1.2.2.1. Aufbau von ABCC1 .....	12
1.2.2.2. Substrate und Modulatoren von ABCC1 .....	13
1.2.3. Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) / ABCG2 .....	18
1.2.3.1. Aufbau von ABCG2 .....	18
1.2.3.2. Substrate und Modulatoren von ABCG2 .....	20
<b>2. Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>23</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
3.1. Chemikalien und Pufferlösungen .....	25
3.1.1. Chemikalien für die biologische Testung .....	25
3.1.2. Pufferlösungen für die biologische Testung .....	26
3.2. Zelllinien .....	27

3.2.1. A2780 und A2780 adr Zellen.....	27
3.2.2. H69 und H69 AR Zellen .....	28
3.2.3. 2008 und 2008 MRP1 Zellen .....	28
3.2.4. MDCK II, MDCK II BCRP und MDCK II MRP1 Zellen .....	29
3.2.5. MCF-7 und MCF-7 MX Zellen .....	29
3.2.6. Sf9-Insektenzellen.....	30
3.3. Zellkultur.....	30
3.3.1. Zellkultur von Krebszellen.....	30
3.3.2. Zellkultur von Insektenzellen.....	31
3.3.3. Inkulturnahme von Zellen .....	31
3.3.4. Kryokonservierung von Zellen .....	32
3.3.5. Zellzahlbestimmung.....	32
3.4. Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie .....	34
3.4.1. Prinzip der Durchflusszytometrie .....	34
3.4.1.1. Datenanalyse .....	36
3.4.2. Daunorubicin Akkumulationsassay .....	37
3.4.2.1. Durchführung .....	38
3.4.3. Pheophorbid A Akkumulationsassay .....	38
3.4.3.1. Durchführung .....	40
3.5. Weitere kolorimetrische Methoden.....	41
3.5.1. Calcein AM Akkumulationsassay .....	41
3.5.1.1. Durchführung .....	42
3.5.2. MTT-basierter Vitalitäts-Assay .....	43
3.5.2.1. Durchführung .....	44
3.6. Molekularbiologische Methoden .....	45
3.6.1. Infektion von Insektenzellen mit dem Baculovirus .....	45
3.6.1.1. Durchführung der Infektion .....	46
3.6.2. Virusamplifikation .....	46
3.6.3. Herstellung einer Membranpräparation .....	47
3.6.3.1. Durchführung mit Insektenzellen.....	48
3.6.3.2. Durchführung mit Krebszellen.....	49
3.6.4. Proteinbestimmung mittels BCA-Assay .....	50



3.6.4.1. Durchführung .....	51
3.7. Bestimmung der ATPase Aktivität .....	52
3.7.1. Herstellung der ATP-Stammlösung .....	53
3.7.1.1. Durchführung .....	53
3.7.2. ATPase Assay .....	55
3.7.2.1. Durchführung .....	55
3.7.2.2. Detektion mit Ascorbinsäure.....	57
3.7.3. Datenanalyse .....	58
3.7.4. Übertragung auf 96er Mikrotiterplatten.....	59
3.7.4.1. Detektion mit Malachitgrün .....	59
3.7.4.2. Detektion mit Kristallviolett.....	60
3.7.4.3. Detektion mit Chinaldin Rot .....	61
3.8. Mathematische und statistische Methoden.....	63
3.8.1. Grundlagen der Enzymkinetik .....	63
3.8.1.1. Charakterisierung von Modulatoren.....	63
3.8.1.2. Auswertemethoden.....	68
3.8.2. Regression.....	69
3.8.2.1. Lineare Regression .....	69
3.8.2.2. Nicht-lineare Regression .....	70
3.8.3. Berechnung der maximalen Inhibition.....	70
3.8.4. Statistische Kennzahlen .....	71
3.8.4.1. Mittelwert .....	71
3.8.4.2. Standardabweichung .....	71
3.8.4.3. Einstichproben- <i>t</i> -Test.....	72
3.9. Chemikalien und Reagenzien.....	72
3.10. Materialien für das Arbeiten mit Zellen.....	75
3.11. Geräte .....	76
<b>4. Purine, Pyrrolo- und Indolopyrimidine als Modulatoren des Transportproteins ABCC1.....</b>	<b>79</b>
4.1. Pyrrolopyrimidine – neue Inhibitoren des ABCC1 Transporters .....	79
4.1.1. Funktionelle Untersuchungen der Pyrrolopyrimidine an ABCC1 .....	80

4.1.2. Untersuchung der Inhibition von ABCB1 und ABCG2 .....	86
4.1.3. Untersuchung der zellulären Toxizität ausgewählter Pyrrolopyrimidine ....	89
4.1.4. Sensitivierung ABCC1-überexprimierender Zellen durch Pyrrolopyrimidine.....	90
4.1.5. Zusammenfassung der Ergebnisse .....	92
4.2. Pyrrolopyrimidine und Purine – neue Aktivatoren des Transportproteins ABCC1 .....	93
4.2.1. Berechnung der Strömungsrate und des Aktivierungsfaktors von ABCC1 .....	93
4.2.2. Funktionelle Untersuchungen der Pyrrolopyrimidine an ABCC1 .....	97
4.2.3. Untersuchung des Bindungsverhaltens .....	101
4.2.4. Untersuchung der Aktivierung der ABCC1 ATPase .....	102
4.2.5. Untersuchung der Aktivierung und Inhibition an ABCB1 und ABCG2 ...	103
4.2.6. Untersuchung der zellulären Toxizität der Pyrrolopyrimidine und Purine.....	105
4.2.6. Zusammenfassung der Ergebnisse .....	107
4.3. Pyrrolo- und Indolopyrimidine – neue Breitspektrum-inhibitoren der ABC- Transporter ABCB1, ABCC1 und ABCG2 .....	109
4.3.1. Funktionelle Untersuchungen der Pyrrolo- und Indolopyrimidine an ABCB1, ABCC1 und ABCG2 .....	109
4.3.2. Untersuchung des Bindungsverhaltens .....	126
4.3.3. Untersuchung der zellulären Toxizität des Breitspektrum-Inhibitors 452.	128
4.3.4. Sensitivierung der ABC-Transporter-überexprimierenden Zellen durch Verbindung 452 .....	131
4.3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse .....	135
<b>5. Chinazolin-Chalkone - Dimerisierung bekannter Strukturen zu neuartigen Inhibitoren des Transportproteins ABCG2.....</b>	<b>137</b>
5.1. Untersuchung von heterodimeren Inhibitoren .....	138
5.1.1. Funktionelle Untersuchungen von Chinazolin-Chalkonen an ABCG2 .....	138
5.1.2. Untersuchung des Bindungsverhaltens .....	142
5.1.3. Untersuchungen der Inhibition von ABCB1 und ABCC1.....	142
5.1.4. Untersuchung der ATPase Aktivität von ABCG2 .....	145

5.1.5. Untersuchung der Verbindung 511 auf ihre Akkumulation in ABCG2 exprimierenden Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie und - spektroskopie .....	147
5.1.6. Untersuchung der zellulären Toxizität der Chinazolin-Chalkone.....	151
5.1.7. Sensitivierung der ABCG2-überexprimierenden Zellen durch Chinazolin-Chalkone .....	154
5.1.8 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	156
5.2. Zusätzliche Erkenntnisse durch Ausweiten des Substitutionsmusters.....	159
5.2.1. Funktionelle Untersuchungen von Chinazolin-Chalkonen an ABCG2 .....	159
5.2.2. Untersuchung der Inhibition an ABCB1 und ABCC1 .....	162
5.2.3. Untersuchung der zellulären Toxizität der Verbindung 530.....	163
5.2.4. Zusammenfassung der Ergebnisse .....	164
<b>6. ATPase Assay - Anwendung zur Untersuchung von Modulatoren an den Transportproteinen ABCC1 und ABCG2 sowie Modifizierung und Etablierung einer neuen Detektionsmethode.....</b>	<b>167</b>
6.1. Anwendung des ATPase Assays zur Untersuchung von Modulatoren an ABCC1 und ABCG2 Transportproteinen .....	168
6.1.1. Untersuchungen an ABCC1 – Effekt von Glutathion und Analoga in Kombination mit ABCC1 Modulatoren .....	168
6.1.1.1. Bestimmung der optimalen GSH, NEM-GS und GSSG Konzentration zur Stimulierung der ABCC1 ATPase .....	169
6.1.1.2. Analyse der ABCC1 ATPase mit Kreuzkombinationen von GSH, NEM-GS und GSSG .....	172
6.1.1.3. Kombination von GSH, NEM-GS und GSSG mit bekannten Modulatoren des Transportproteins ABCC1 .....	174
6.1.1.4. Kinetische Auswertung von Pramlukast und Pyrrolopyrimidin Derivat 446 nach Lineweaver-Burk zur Bestimmung des Hemm- bzw. Aktivierungstyps.....	182
6.1.2. Untersuchungen an ABCG2 – Effekt von Tetrahydro- $\beta$ -carbolin Derivaten in Kombination mit Quercetin .....	185
6.1.3. Untersuchungen an ABCG2 – Einfluss von Methoxygruppen der Acryloylphenylcarboxamide auf die ATPase Aktivität.....	190

6.2. Modifizierung und Etablierung einer neuen Detektionsmethode .....	193
6.2.1. Überführung des ATPase Assays von Röhrchen auf eine 96er Mikrotiterplatte und Vergleich unterschiedlicher Detektionsmethoden....	193
6.2.2. Etablierung des Vanadat-sensitiven ATPase Assays mit Chinaldin Rot als Detektionsreagenz auf einer 96er Mikrotiterplatte.....	201
6.2.3. Bestätigung durch Vergleich mit bereits vorhandenen Ergebnissen.....	211
<b>7. Zusammenfassung.....</b>	<b>215</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>219</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>233</b>
<b>Publikationen.....</b>	<b>239</b>

## Abkürzungsverzeichnis

---

ABC	ATP-binding cassette
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ABCB1	Gennomenklatur für P-gp
ABCC1	Gennomenklatur für MRP1
ABCG2	Gennomenklatur für BCRP
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein, ABCG2
BSA	Bovines Serumalbumin
Calcein AM	Calcein Acetoxymethylester
CsA	Ciclosporin A
CHO-Zellen	chinese hamster ovary cells
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNR	Daunorubicin
DTT	Dithiothreitol
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FCS	Forward Side Scatter
FKS	Fetales Kälberserum
FTC	Fumitremorgin C
GFP	Green Fluorescence Protein
GSH	Reduziertes Glutathion
GSSG	Oxidiertes Glutathion

---

---

HTS	High-Throughput-Screening
KHP	Krebs-HEPES-Puffer
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
MDR	Multidrug Resistance (Multiple Arzneimittelresistenz)
MRP1	Multidrug Resistance associated Protein 1, ABCC1
NBD	Nukleotid-Bindungsdomäne
NEM-GS	<i>N</i> -Ethylmaleimid Glutathion
PBS	Phosphate-Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
P-gp	P-Glykoprotein, ABCB1
Pheo A	Pheophorbid A
Pi	Anorganisches Phosphat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RT	Raumtemperatur
SAR	Structure-activity relationships (Struktur-Wirkungsbeziehungen)
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SSC	Side Scatter
TMD	Transmembranäre Domäne
wt	Wildtyp

---

# 1. ● Einleitung

## 1.1. Das Phänomen der Multidrug Resistenz (Multidrug Resistance)

Nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehören Krebserkrankungen zu den häufigsten Todesursachen [1]. Laut der amerikanischen Krebsgesellschaft (ASCO) steigt die Zahl der Erkrankungen ungebremst und nur etwa 65 % der Krebspatienten sind nach fünf Jahren noch am Leben [2]. Neben der operativen Entfernung oder Bestrahlung des malignen Gewebes sind Chemotherapeutika die Mittel der Wahl bei der Bekämpfung von bösartigen Tumoren [3]. Eine Vielzahl verschiedener Zytostatika sind in den letzten Jahren entwickelt worden, die die unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus beeinflussen. Dazu zählen Alkylanzien (z. B. Cyclophosphamid) oder Interkalatoren (z. B. Doxorubicin), Topoisomerase I- (z. B. Topotecan) und II-Hemmer (z. B. Etoposid), Antimetabolite (z. B. 5-Fluoruracil), Mitose-Inhibitoren (z. B. Vincristin) oder Tyrosinkinaseinhibitoren (z. B. Gefitinib). Zur Behandlung von Tumoren werden zumeist Kombinationen unterschiedlicher Zytostatika verabreicht [1,3,4]. Die Therapie wird allerdings durch die Entwicklung der Multidrug Resistenz (MDR) von Krebszellen behindert, die ein bedeutendes Problem darstellt. Dieses Phänomen wurde zum ersten Mal 1970 von Biedler und Riehm beobachtet [5] und kann als ein Zustand verstanden werden, bei dem sich eine Resistenz von Krebszellen gegenüber strukturell unterschiedlichen Zytostatika mit

verschiedenen Wirkmechanismen entwickelt [6]. Man unterscheidet zwischen der intrinsischen und der erworbenen Multidrug Resistenz. In den meisten Fällen führt die Behandlung von Tumoren durch Chemotherapeutika zur Selektion primär resistenter Tumorzellen, bei denen eine Verringerung der intrazellulären Zytostatikakonzentration beobachtet wird, was zum Versagen der Chemotherapie führt [4]. Unterschiedlichste Mechanismen können die Multidrug Resistenz herbeiführen, wie z. B. verringerter Einstrom und damit reduzierte intrazelluläre Zytostatikaaufnahme, Veränderung des Zellzyklus<sup>4</sup> und damit eine gestörte Apoptose, Wirkstoffinaktivierung und Wirkortveränderung, sowie gesteigerter energieabhängiger Efflux [7-9]. Auf dem letztgenannten Mechanismus liegt der Fokus dieser Arbeit. Die erhöhte Expression von ABC-Transportern führt zum aktiven Efflux von zytotoxisch wirkenden Arzneimitteln. Die verringerte intrazelluläre Konzentration wiederum sichert das Überleben der Krebszellen. Die Transportproteine ABCB1, ABCC1 und ABCG2 wurden in vielen resistenten Tumorgeweben überexprimiert und sind seit Jahren im Fokus wissenschaftlicher Arbeiten [10].

## **1.2. Die Familie der ATP-Binding-Cassette-(ABC)-Transportproteine**

Die Superfamilie der ABC-Transporter (Adenosintriphosphat-Binding-Cassette-Transportproteine) bildet eine der größten membranären Proteinfamilien, die sowohl in prokaryontischen (z. B. Archaeen, Bakterien) als auch in eukaryontischen Zellen (z. B. Pilze, Pflanzen, humane Parasite, Wirbeltiere) vorkommen [11]. Dabei beteiligen sich diese an einer Vielzahl unterschiedlicher zellulärer Prozesse. Im Gegensatz zu den Prokaryonten, bei denen sowohl Influx- als Effluxtransporter vorkommen, findet man bei den Eukaryonten nur Effluxpumpen, welche die bei der Hydrolyse von ATP (Adenosintriphosphat) zu ADP (Adenosindiphosphat) und  $P_i$  (Phosphat) freiwerdende Energie nutzen, um strukturell unterschiedliche Substanzen gegen einen Konzentrationsgradienten aus dem Zellinneren in den Extrazellulärraum zu transportieren [12]. Diese ATPase-Domäne setzt sich dabei aus mehreren charakteristischen Aminosäuresequenzen zusammen, die aus typischen Motiven, wie „Walker A“ und „Walker B“ aufgebaut ist, die über die sogenannte spezifische ABC-Signatur „C-Schleife“ verbunden sind [13,14]. Auch die Q-Schleife spielt eine zentrale Rolle bei der



Kopplung von ATP-Hydrolyse und Transport von Substraten [15]. Je nach Sequenzhomologie und Struktur der Nukleotid-Bindungsdomäne (NBD) erfolgt die Einteilung der Proteine in der Familie der ABC-Transporter [16,17]. Die bis dato 48 identifizierten humanen ABC-Transportproteine werden in sieben Untergruppen (ABCA bis ABCG) eingeteilt [16,18]. Tabelle 1.1 zeigt die Einteilung der Superfamilie ABC in ihre Subfamilien sowie die Bezeichnung der Gene und beispielhaft die durch Mutation dieser Gene verursachende humane Erbkrankheiten.

**Tabelle 1.1:** Einteilung der ABC-Transportproteine und humane Erbkrankheiten aufgrund ihrer Dysfunktion nach Annilo *et al.* [19], Choi [20], Dean *et al.* [16] und Linton [13].

Subfamilie	Gen-Nomenklatur	Erkrankung
ABCA	ABCA1 – ABCA10, ABCA12 und ABCA13	Tangier-Krankheit, Atherosklerose, Morbus Alzheimer (ABCA1) Stargardt Krankheit, Altersbedingte Makuladegeneration, Retinis Pigmentosa (ABCA4)
ABCB	ABCB1 – ABCB11	Immundefizienz, Morbus Behçet (ABCB3) Cholestasen (PFIC3 – Progressive familiäre intrahepatische Cholestasis; ABCB4)
ABCC	ABCC1 – ABCC12	Dubin-Johnson-Syndrom (ABCC2) Mukoviszidose (ABCC7)
ABCD	ABCD1 – ABCD4	Adrenoleukodystrophie (ABCD1) Hepato- und Splenomagelie (ABCD3)
ABCE	ABCE1	nicht bekannt
ABCF	ABCF1 – ABCF3	nicht bekannt
ABCG	ABCG1 – ABCG2, ABCG4 – ABCG5, ABCG8	Sitosterinämie (ABCG5/8)

Die wesentliche Aufgabe von ABC-Transportern besteht darin, den gesamten Organismus vor Substanzen mit potenziell toxischem Charakter zu schützen [21,22]. Dabei können diese die Pharmakokinetik von Arzneimitteln in erheblichem Maße beeinflussen und damit

einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln haben [23]. Aufgrund dieser Steuerung der Zellfunktion muss bei Gabe von Arzneimitteln in Abhängigkeit vom Wirkort immer mit Wechselwirkungen mit ABC-Transportern gerechnet werden. Neben der Expression in Geweben mit Barrierefunktion (Darm, Leber, Niere, Blut-Hirn-Schranke) sind ABC-Transportproteine insbesondere in Krebszellen überexprimiert. Erniedrigte intrazelluläre Konzentrationen an Zytostatika führen infolgedessen zum Versagen von Chemotherapien.

Im Folgenden werden die humanen ABC-Transportproteine ABCB1, ABCC1 und ABCG2, die insbesondere für ihre Beteiligung an der Multidrug Resistenz bekannt sind, im Hinblick auf ihren Aufbau, ihre Verteilung und physiologischen Rolle im Körper, sowie ihre Substrate und Modulatoren näher erläutert.

### **1.2.1. P-Glykoprotein (P-gp) / ABCB1**

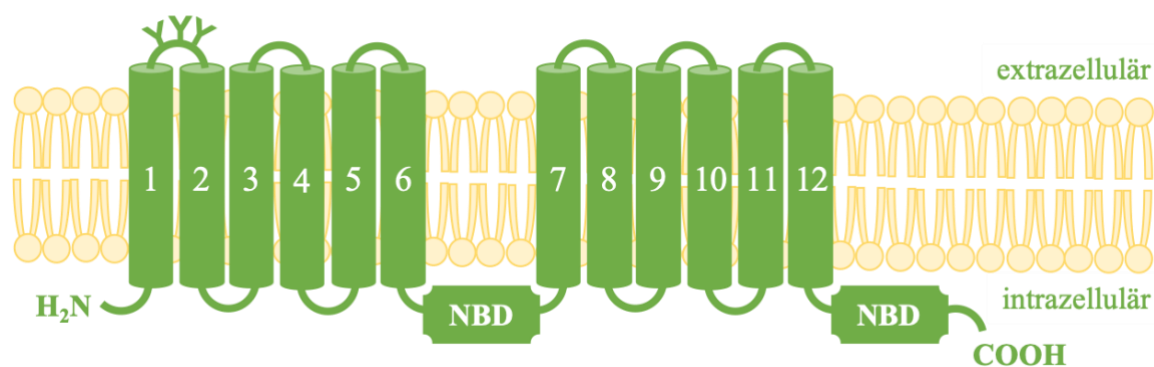
Das P-Glykoprotein (P-gp) ist das erste Protein der ABC-Unterklasse B (ABCB1) und ist auch unter der Bezeichnung MDR1 (Multidrug Resistenz Protein 1) bekannt. Entdeckt wurde es 1976 von Juliano und Ling in Colchicin-selektierten Zellen aus chinesischen Hamsteroovarien (CHO) als die Nagertier-Isoform [24,25]. Die herabgesetzte Permeabilität der Plasmamembran gegenüber den eingesetzten zytotoxischen Substanzen wird durch P-gp (P für Permeabilität) verursacht und ist der Grund für die Namensgebung durch die genannten Autoren. Die humane Form des Transportproteins wurde nur kurze Zeit später in Vinblastin-resistenten leukämischen Lymphoblasten entdeckt [26,27].

Zu finden ist ABCB1 in verschiedenen Zellen mit Eliminierungsfunktion, wie z. B. Epithelzellen des Darms und des proximalen Tubulus der Niere, den Canaliculi der Leber und den Epithelien der Plazenta, sowie an der Blut-Hirn-Schranke. Die Verteilung im Gewebe stützt die Annahme, dass die Expression von ABCB1 einen Schutzmechanismus gegenüber potentiell toxischen Xenobiotika darstellt [28-31].

#### **1.2.1.1. Aufbau von ABCB1**

Das humane Transportprotein ABCB1 besteht aus 1280 Aminosäuren und ist ein primär aktiver Effluxtransporter mit einem Molekulargewicht von ca. 170 kDa. Der Aufbau von

ABCB1 entspricht der für eukaryotische ABC-Transporter typischen Topologie, bestehend aus zwei homologen Hälften. Diese setzen sich wiederum aus sechs transmembranären  $\alpha$ -Helices und je einer Nukleotid-Bindungsdomäne (ATP-Bindungsstelle) zusammen, die über einen Linker miteinander verknüpft sind [29,32,33]. Die Hydrolyse von ATP liefert dabei die benötigte Energie für den Transport von Substraten [34]. Wie Abbildung 1.1 veranschaulicht, befinden sich sowohl das *N*- als auch das *C*-terminale Ende auf der Innenseite der Zytoplasmamembran. Außerdem weisen die ersten beiden transmembranären Domänen im extrazellulären Loop drei Asparaginsäuren auf, an denen das Protein *N*-glykolisiert ist, daher die Bezeichnung „Glykoprotein“. Mutationsstudien zufolge, besitzt die *N*-Glykolisierung jedoch keinen Einfluss auf die Funktion des Proteins, sondern ist mit für die korrekte Verankerung des Proteins innerhalb der Plasmamembran verantwortlich [29,35].



**Abbildung 1.1:** Topologiemodell von ABCB1.

Diverse Homologiemodelle wurden erstellt, die allerdings anfangs nur auf der Struktur bakterieller Transporter basierten. Die Entwicklung solcher Modelle hilft dabei potentielle Bindungsstellen sowohl für Substrate als auch Modulatoren zu entdecken [36-39]. Kristallstrukturen mit angemessener Auflösung helfen, besagte Modelle zu generieren. Im Jahre 2009 wurde das erste Mal eine hochauflösende Kristallstruktur des in der Maus vorkommenden ABCB1 veröffentlicht. Dabei beträgt die Sequenzhomologie und damit die Übereinstimmung des murinen mit dem humanen Transporter 87 % [40]. Hiermit konnten viele der bereits gewonnenen Erkenntnisse aus biochemischen Untersuchungen bestätigt werden.

Dennoch herrscht trotz der Datenlage Unklarheit in Bezug auf die Art und Weise, wie Substrate mit dem Transporter interagieren. Der Transportzyklus des Proteins wurde anhand verschiedener Modelle beschrieben und lässt sich ebenfalls auf andere ABC-Transporter wie ABCC1 und ABCG2 übertragen [41,42]. Nachfolgend wird das meistbewährte Transportmodell kurz vorgestellt.

Das ATP-Switch-Modell von Higgins und Linton beschreibt einen hypothetischen Transportzyklus für ABC-Transporter. Dieses setzt voraus, dass Substrate durch passive Diffusion vom Extrazellulärraum in den Intermembranraum gelangen und von dort mit dem ABC-Transporter interagieren. Dabei schleust ABCB1 das Substrat unter Energieaufwand wieder in den Extrazellulärraum [13,43]. Im Grundzustand befindet sich das Protein in einer offenen Konformation, in Form eines „open dimers“ mit geringer Affinität zu ATP. Der Start des Zyklus geht dabei mit einer Bindung des Substrats einher, welches mit hoher Affinität an seine Bindungsstelle innerhalb der TMDs bindet („high affinity site“), was wiederum die Affinität der NBDs gegenüber ATP erhöht. Im nächsten Schritt bindet je ein ATP an jede NBD. Die dadurch ausgelöste Konformationsänderung der NBDs zeigt sich durch ein geschlossenes NBD-Dimer („closed dimer“). Hierdurch verändert sich ebenfalls die Anordnung der TMDs, wodurch die Affinität des Substrats zum Transporter sinkt und es in den Extrazellulärraum abdiffundiert („low affinity site“). Die Hydrolyse des ATPs zu ADP und Phosphat führt zur Rückkehr in den Ausgangszustand mit hoher Substrataffinität. Von diesem ausgehend kann ein neuer Transportzyklus ablaufen.

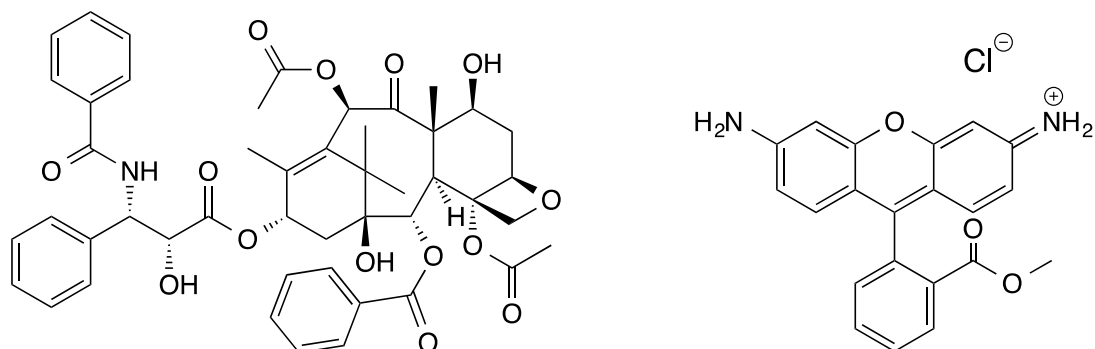
Weiterer Gegenstand der Forschung sind die möglichen Substrat-Bindungsstellen. Ihre Lage und Struktur, sowie die Anzahl der Bindungsstellen wurden in vielen Publikationen erforscht und diskutiert. Einigkeit herrscht dabei in Bezug auf die Existenz mehrerer Bindungsstellen, sowie deren Lokalisation innerhalb der TMDs. Auch die Beteiligung bestimmter Aminosäuren aus fast allen TMDs (1, 4-7, 9-12) an der Bindung von Substraten und Modulatoren wurde in mehreren Photoaffinitäts-Markierungs- und Mutations-Studien nachgewiesen [44-49]. Dahingegen ist die Anzahl der Bindungsstellen, deren Verteilung, sowie die Spezifität für verschiedene Liganden umstritten. Einerseits wurde eine große Bindungstasche mit mehreren benachbarten oder sich überlappenden Bindungsregionen postuliert [47,49-51]. Dabei soll die gleichzeitige Bindung von mehr als einem Substrat sowie die Anpassung der Bindungstasche an das jeweils gebundene Molekül möglich sein („substrate-induced fit“) [52,53]. Andererseits gibt es auch Studien, die die Existenz von räumlich getrennten Bindungsstellen nahelegen. Shapiro und Ling konnten mithilfe der

Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 123 (R-site) und Hoechst 33342 (H-site) zeigen, dass mindestens zwei Bindungsstellen existieren. Der Studie zufolge kooperieren diese zudem positiv miteinander [54,55]. Neben Rhodamin 123 binden auch Anthrazykline, wie Daunorubicin und Doxorubicin an die R-site. Neben Hoechst 33342 besitzen auch Quercetin und Colchicin eine Affinität zur H-site. Die Arbeitsgruppe erweiterte in späteren Studien ihre Aussage um die Existenz mindestens einer weiteren Bindungsstelle, an welcher Prazosin und Progesteron binden sollen. Zudem soll diese Bindungstasche allosterische Eigenschaften haben, welche bei einer Bindung der genannten Moleküle zur Stimulation der Transportaktivität der H- und R-site führen soll [56]. Eine weitere Arbeitsgruppe um Martin et al. identifizierte mithilfe von Radioligandbindungsstudien mindestens vier Bindungsstellen, die negativ kooperativ miteinander interagieren sollen. Diese Arbeiten stimmen lediglich bei der Existenz der Bindungstasche der H-site überein, während die R-site nicht gefunden wurde. Die anderen drei Bindungsstellen wurden mit dem Transport von Vinblastin, Paclitaxel und Elacridar identifiziert und entsprechend bezeichnet [57]. Weiteren Studien postulierten bis zu sieben Bindungsstellen [58].

#### **1.2.1.2. Substrate und Modulatoren von ABCB1**

Eine große Bandbreite von Verbindungen interagiert mit dem Transportprotein ABCB1. Diese stammen aus den unterschiedlichsten Strukturklassen und lassen sich oft in vielen klassischen Arzneimitteln wiederfinden. Die Literatur unterscheidet dabei zwischen Substraten und Modulatoren. Nicht jede Verbindung lässt sich eindeutig zuordnen. In Abhängigkeit von den untersuchten Faktoren, wie z. B. Transportaktivität durch Messung der Hydrolyse von ATP, unterscheidet sich diese Einteilung [59-61].

ABCB1 besitzt eine außerordentlich breite Substratspezifität. In der Regel werden die Verbindungen durch das Protein aktiv transportiert und sind vorwiegend hydrophobe, leicht basische Verbindungen, die bei physiologischem pH-Wert protoniert vorliegen. Außerdem haben die Substanzen ein Molekulargewicht zwischen 200 und 1900 Da [29]. Tabelle 1.2 und Abbildung 1.2 zeigen eine Auswahl der Verbindungen, zu denen Zytostatika, Fluoreszenzfarbstoffe und zahlreiche Arzneimittel gehören.



**Abbildung 1.2:** Strukturen von Paclitaxel (links) und Rhodamin 123 (rechts).

**Tabelle 1.2:** Auswahl von Substraten von ABCB1 nach Schinkel *et al.* [29], Sarkadi *et al.* [31] und Eckford *et al.* [32].

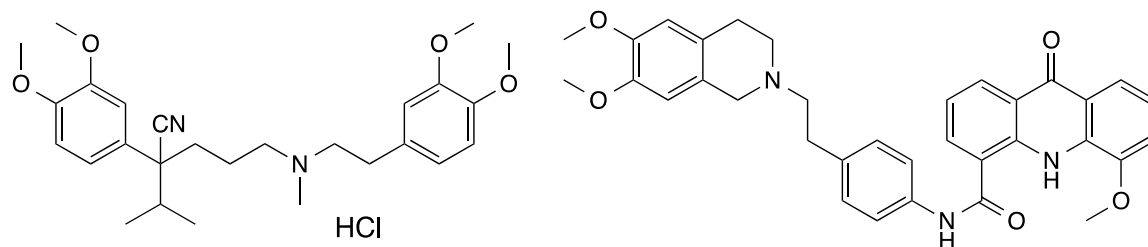
Arzneimittelklasse		Beispiele	
Zytostatika	Anthrazykline	Daunorubicin, Doxorubicin	
	Anthracene	Mitoxantron	
	Mitosehemmerstoffe	Colchicin, Taxane, <i>Vinca</i> -Alkaloide	
	Podophyllotoxine	Etoposid, Teniposid	
	Tyrosinkinaseinhibitoren	Erlotinib, Gefinitib, Imatinib	
	Sonstige	Actinomycin D, Gramicidin, Mitomycin	
Fluoreszenzfarbstoffe		Calcein-AM, Hoechst 33342 und 33258, Rhodamin 123, Tetramethylrosamin	
	Arzneistoffe	Antibiotika	Erythromycin, Valinomycin
		Antihypertensiva	Propranolol, Reserpin
Calciumkanalblocker		Diltiazem, Nifedipin, Verapamil	
Cholesterinsenker		Lovastatin, Simvastatin	
Herzglykoside		Digoxin	
Immunsuppressiva		Ciclosporin A, Tacrolimus	
Opioide		Loperamid	
Proteasehemmer		Nelfinavir, Ritonavir, Saquinavir	
Steroide		Aldosteron, Dexamethason, Progesteron	

Auch Modulatoren von ABCB1 weisen ein großes chemisches und strukturelles Spektrum auf. Der inhibitorische Effekt der Verbindungen kann durch verschiedene Funktionen ausgelöst werden. Durch eigenen Transport (im Sinne eines kompetitiv interagierenden Substrates wie z. B. Ciclosporin A), allosterische Inhibition (z. B. Laniquidar), oder durch einen Eingriff in die NBDs und der damit verbundenen ATPase Aktivität (z. B. Steroide) kann der Transportprozess verlangsamt bzw. unterbunden werden [62].

Im Jahre 1981 wurde von Tsuruo *et al.* der Calciumkanalblocker Verapamil (Abbildung 1.3) als erster ABCB1-Modulator entdeckt. In verschiedenen Krebszelllinien war Verapamil in der Lage, die ABCB1-vermittelte Resistenz *in vitro* aufzuheben [63]. Daraufhin wurden in den nächsten Jahren weitere zahlreiche Verbindungen als ABCB1 Inhibitoren identifiziert. Diese sogenannte „erste Generation“ schließt dabei Arzneistoffe aus verschiedenen Wirkstoffklassen, wie Immunsuppressiva, Antihistaminika, Neuroleptika und Antimalariamittel ein [7,64]. Tabelle 1.3 bietet eine Übersicht ausgewählter ABCB1 Inhibitoren.

**Tabelle 1.3:** Auswahl von Inhibitoren von ABCB1 nach Sharom [65] und Shukla et al. [64].

Klasse	Beispiele
1. Generation	Chinidin/Chinin
	Ciclosporin A
	Diltiazem
	Nifedipin
	Verapamil
2. Generation	Dex-Niguldipin
	Dex-Verapamil
	PSC 833 (Valspodar)
3. Generation	MS 209 (Dofequidar)
	GF120918 (Elacridar)
	R101933 (Laniquidar)
	XR9576 (Tariquidar)
	LY335979 (Zosusquidar)



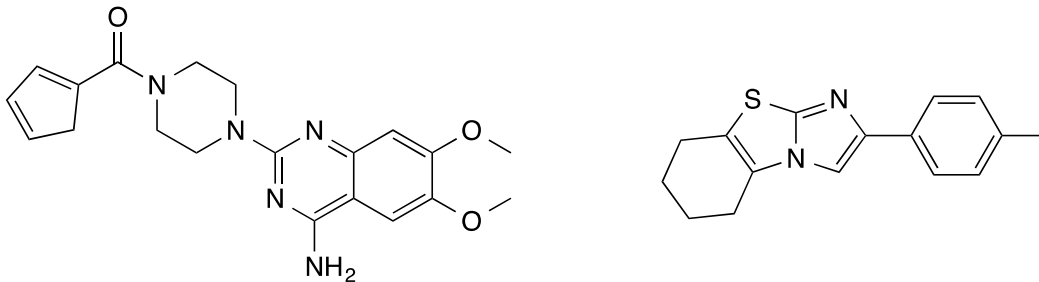
**Abbildung 1.3:** Strukturen von Verapamil (links) und Elacridar (rechts).

Hohe Konzentrationen von 1. Generation Inhibitoren wie Verapamil waren notwendig um ABCB1 wirksam zu inhibieren, daher war die eigentliche pharmakologische Hauptwirkung dosislimitierend [66-68]. Durch Weiterentwicklung und strukturelle Modifizierung gelang es die ursprüngliche Wirkung zu verringern und die Affinität zu ABCB1 zu steigern. Innerhalb der zweiten Generation sind Vertreter wie das Ciclosporin A Analogon Valspodar (PSC 833) oder das R-Enantiomer von Verapamil, Dex-Verapamil, entwickelt worden [69]. Bedauerlicherweise wiesen die Substanzen in klinischen Studien Effekte auf, die zu schwerwiegenden Nebenwirkungen führten [7]. Aus diesem Grund wurden Substanzen der dritten Generation entwickelt, die gezielt mit hoher Affinität und Selektivität mit dem ABCB1 Transportprotein interagierten, sowie eine geringe Toxizität besaßen. Generiert wurden die neuartigen Substanzen mittels kombinatorischer Chemie und Struktur-Wirkungsbeziehungen. Hierzu zählen Vertreter wie Elacridar (GF120918; Abbildung 1.3) und Tariquidar (XR9576), die bereits in hohen nanomolaren Konzentrationen wirksam sind [70,71]. Der Einsatz dieser Verbindungen scheiterte auch diesmal in klinischen Studien. Leider konnte trotz vielversprechender *in vitro* Ergebnisse kein positiver Nutzen festgestellt werden [7,64]. So ist bis heute kein Modulator als Arzneimittel zur Behandlung der MDR in der Chemotherapie zugelassen.

Neben den geschilderten Inhibitoren von ABCB1 wurde in verschiedenen Studien von Aktivator berichtet, die die Untersuchung der Interaktion der möglichen Bindungsstellen interessant machen. Solche Substanzen sind in der Lage, den ABCB1-vermittelten Transport zu stimulieren. So wurde durch Prazosin (Abbildung 1.4) und Progesteron verursachte stimulierende Effekte auf den ABCB1-vermittelten Transport berichtet [54,55]. Aber auch Verbindungen wie Erlotinib (Tyrosinkinaseinhibitor) [72], (-)-Epicathechin [73], das Imidazothiazol Derivat QB102 (Abbildung 1.4) [74] sowie andere Benzimidazol- und Benzothiazol Derivate [75], als auch Flavonoide [76-78] und Verbindungen, die zunächst als Inhibitoren klassifiziert worden waren [79], aktivierten die Transportfunktion



bestimmter Substrate von ABCB1. Auf welche Art und Weise dieser Mechanismus abläuft ist allerdings noch nicht bekannt. Es wird vermutet, dass eine allosterische Interaktion der Bindungsstellen zugrunde liegt.



**Abbildung 1.4:** Struktur von Prazosin (links) und QB102 (rechts).

### 1.2.2. Multidrug Resistance associated Protein 1 (MRP1) / ABCC1

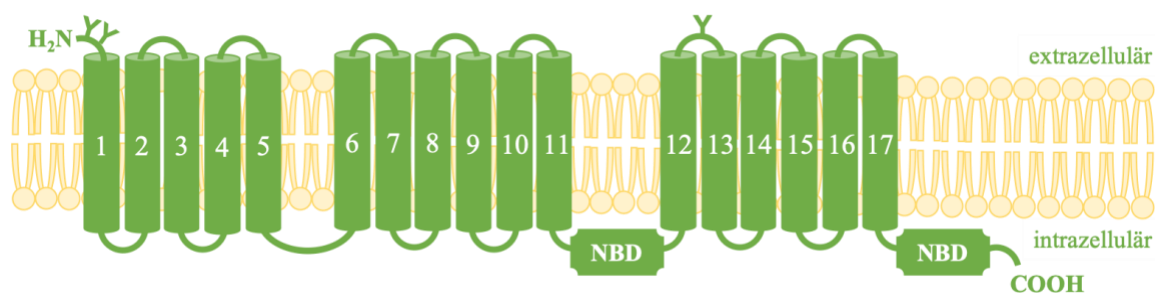
Das Multidrug Resistance associated Protein 1 (MRP1) wurde im Jahre 1992 von Cole *et al.* entdeckt [80]. Nach kontinuierlicher Behandlung mit Doxorubicin wies die kleinzellige Bronchialkarzinomzelllinie NCI-H69 eine Resistenz auf, die nicht auf ABCB1 zurückzuführen war. Die Überexpression von ABCC1 wurde identifiziert und dieses als das erste Protein in die Unterklasse C der ABC-Transporterfamilie einsortiert. Trotz vieler Überschneidungen beim Resistenzprofil ähneln sich ABCB1 und ABCC1 nur zu ca. 15-20 % [81-83].

ABCC1 wird in einer Vielzahl von Organen exprimiert und ist z. B. in Lunge, Niere, Plazenta, Blut-Hirn-Schranke, Hautepithelien und Skelettmuskulatur zu finden [8,84,85]. Im Gegensatz zu ABCB1 und ABCG2 wird dieser Transporter zumeist auf der basolateralen Seite polarisierter Epithelzellen exprimiert. Außerdem transportiert ABCC1 nicht nur Xenobiotika, sondern auch ihre konjugierten Metabolite, bevorzugt Glukuronid-, Glutathion- und Sulfat-Konjugate, um so die toxischen Konzentrationen möglichst gering zu halten [84,86,87]. Im Zusammenhang mit vielen Tumorerkrankungen wie Lungenkarzinomen [88,89] (insbesondere nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom [90]), akuter lymphatischer Leukämie (ALM), oder Darm- und Brustkrebs [8,91-93] wurde die Überexpression von ABCC1 nachgewiesen. Die besondere Schutzfunktion des ABCC1-Proteins wird durch den aktiven Transport von Leukotrien C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) oder der oxidierten Form des Glutathions (GSSG) deutlich, welcher die Zelle vor oxidativem Stress oder dem

Zelltod schützt. Damit ist ABCC1 vermutlich in der Regulation des zellulären Notstands beteiligt [90].

### 1.2.2.1. Aufbau von ABCC1

ABCC1 setzt sich aus 1531 Aminosäuren zusammen und hat im glykosylierten Zustand ein Molekulargewicht von ca. 190 kDa. Im Gegensatz zu ABCB1 besitzt ABCC1 drei transmembranäre Domänen, wobei die sogenannte TMD0 aus fünf transmembranären  $\alpha$ -Helices zusammengesetzt ist. Hierdurch befindet sich der *N*-Terminus des Proteins extrazellulär [8]. Die zusätzliche Domäne hat allerdings keinen Einfluss auf die Transportfunktion von ABCC1. Sie soll jedoch für den richtigen Einbau in die Zellmembran von Bedeutung sein [94]. Der restliche Aufbau entspricht dem eines eukaryotischen ABC-Transporters, und ist in Abbildung 1.5 dargestellt.



**Abbildung 1.5:** Topologiemodell von ABCC1.

Um die Funktionen des Proteins genauer aufklären zu können, wird an einer Kristallstruktur des humanen ABCC1 geforscht, welche bis heute laut der Protein Datenbank (protein database; pdb) unbekannt ist.

Wie schon bei ABCB1 näher erläutert, ist der Transportzyklus nicht eindeutig geklärt. Jedoch gibt es Modelle, die diesen erklären könnten. Das bereits beschriebene ATP-Switch-Modell von Higgins und Linton [43] lässt sich ebenfalls auf das ABCC1 Protein übertragen und wurde von Deeley *et al.* im Jahre 2005 am Beispiel von LTC<sub>4</sub> modifiziert und angepasst [42]. So wurden strukturelle Merkmale und Eigenheiten der ABCC Familie mehr in das Modell integriert. Die TMD0 inklusive des Linkers zur TMD1 wurde als Bindungsregion miteinbezogen und die Bindung des Substrats mit und ohne Glutathion (GSH) beschrieben. Der Transport selbst verläuft analog zu ABCB1: das Substrat bindet

an die Bindungstasche und verursacht eine Konformationsänderung, die wiederum die Affinität von ATP zu NBD1 erhöht; durch die Bindung des ersten ATPs wird die Bindung des zweiten ATP-Moleküls an die NBD2 eingeleitet und die Dimer Struktur gebildet, wobei für die Dimerisierung der Einsatz der TMD0 vermutet wird [95]; die endgültige Konformations- und Positionsänderung der NBDs überträgt sich auf die TMDs und führt zum Affinitätsverlust für das Substrat; erst nach der Hydrolyse der ATP-Moleküle wechselt das Protein von der „low affinity site“ zur „high affinity site“ und ermöglicht damit einen erneuten Zyklusbeginn.

Der Kotransport von Glutathion und Analoga lässt auf mindestens zwei Bindungsstellen schließen. Genauere Informationen diesbezüglich gibt es leider nicht [96], auch wenn Studien zufolge, einige Aminosäuren für die Bindung und den Transport von Endo- und Xenobiotika elementar wichtig sind [97,98]. Unterschiedlichen Arbeitsgruppen zufolge binden GSH und seine Analoga, wie z. B. GSSG und LTC<sub>4</sub>, an dieselbe Stelle [99-102]. Die Berichte belegten, dass die Substanzen nacheinander transportiert worden sein müssen, da diese den gegenseitigen Efflux blockierten und damit kompetitiv interagierten.

#### **1.2.2.2. Substrate und Modulatoren von ABCC1**

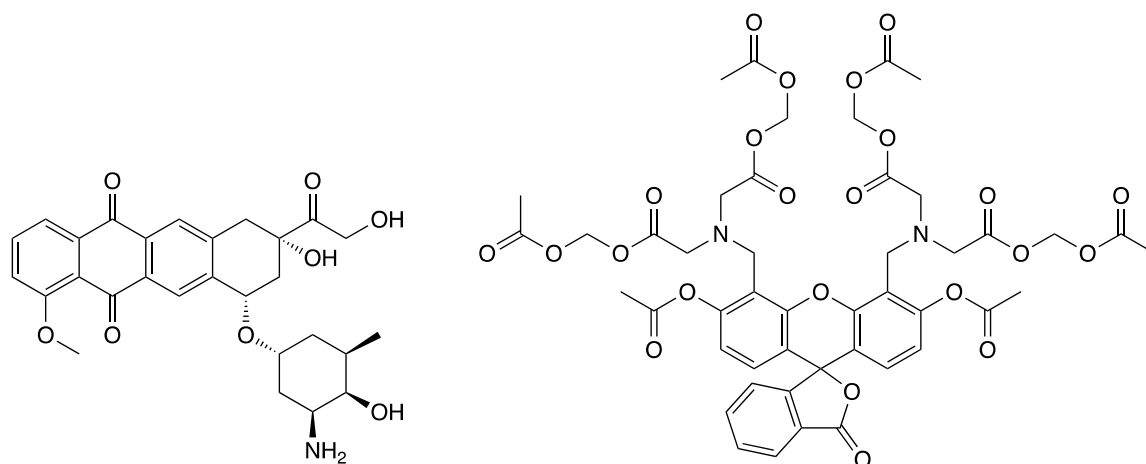
Die Strukturdiversität von ABCC1 Substraten wird durch die polymorphe Bindungstasche innerhalb der transmembranären Domänen erklärt [8]. Die Einteilung nach Substraten und Modulatoren verläuft auch bei diesem ABC-Transporter nicht strikt. So ist die Wirkung oft konzentrationsabhängig.

Viele Zytostatika, sowohl hydrophile als auch hydrophobe, werden von ABCC1 erkannt und transportiert. Die reduzierte Konzentration innerhalb der Zelle führt zur Resistenzentwicklung. Im speziellen Fall von ABCC1 werden weitere, insbesondere hydrophobe und kationische Verbindungen in Gegenwart von Glutathion transportiert [103]. Entweder werden die Verbindungen vorher über die Glutathion-S-Transferase an Glutathion gebunden oder der Efflux erfolgt durch einen Kotransport. Aufgrund der Tatsache, dass GSH in lebenden Zellen in millimolaren Konzentrationen vorkommt, ist das Spektrum an Substraten dementsprechend nochmals erweitert. Viele Studien belegen, dass sowohl Vincristin als auch Etoposid hervorragende ABCC1 Substrate sind. Aber auch Anthrazykline, wie Doxorubicin (Abbildung 1.6) und Daunorubicin, oder Mitoxantron,

Flutamid und Methotrexat werden transportiert [104]. Tabelle 1.4 gibt eine Auswahl von ABCC1 Substraten wieder.

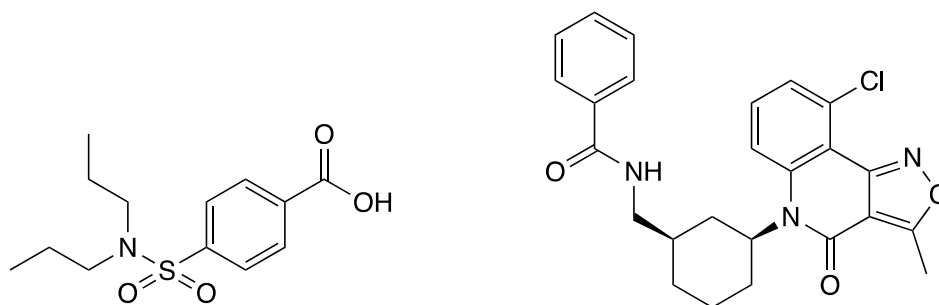
**Tabelle 1.4:** Auswahl an Substraten von ABCC1 nach Bakos *et al.* [105] und Cole [90].

Transportform	Klasse	Beispiele
ungebunden/ endogen	körpereigene Botenstoffe	Bilirubin, GSH (Glutathion), LPI (Lysophosphatidylinositol), SIP (Sphingosin-1-phosphat)
	Vitamine	Folsäure, Vitamin B12
ungebunden/ exogen	Antibiotika	Ciprofloxacin, Grepafloxacin
	Cholesterinsenker	Atorvastatin, Rosuvastatin
	Fluoreszenzfarbstoffe	BCECF-AM, Calcein AM, Methotrexat Flutamid
Konjugate/ endogen	körpereigene Botenstoffe	Leukotrien C <sub>4</sub> (LTC <sub>4</sub> ), oxidiertes Glutathion (GSSG), Prostaglandin A <sub>2</sub> und J <sub>2</sub>
Konjugate/ exogen	Diuretikum	Ethacrynsäure (GSH gekoppelt)
	Mykotoxine	Aflatoxin B (GSH gekoppelt)
	Metalle	Antimon, Arsen (GSH gekoppelt)
	Zytostatika	Cyclophosphamid
GSH-Kotransport	Zytostatika	Alkylanzien (Chlorambucil, Melphalan) Anthrazykline (Daunorubicin, Doxorubicin, Epirubicin), Etoposid, Mitoxantron, Vinca Alkaloide (Vinblastin, Vincristin)
GSH Stimulatoren	Calciumkanalblocker	Verapamil
	Flavonoide	Apigenin
	HIV-Proteasehemmer	Indinavir, Nelfinavir



**Abbildung 1.6:** Strukturen von Doxorubicin (links) und Calcein AM (rechts).

Viele der bereits bekannten ABCB1 Inhibitoren wurden an ABCC1 getestet und einige Vertreter mit signifikanter Potenz und Effizienz entdeckt [83,106]. So wurden einige Verbindungen als Dualinhibitoren, wie z. B. Verapamil [107], Ciclosporin A [108] oder Dofequidar (MS-209) [109] neu klassifiziert. Als unspezifischer Inhibitor von ABCC1, der neben ABCB1 auch ABCG2 hemmt, wurde Biricodar (VX-710) beschrieben [110]. Selektive Inhibitoren von ABCC1 wurden bis heute nicht viele beschrieben. Die bekanntesten Vertreter sind der Leukotrien-Rezeptorantagonist MK-571 (Verlukast) und der Peptid-Leukotrien-Rezeptorantagonist ONO-1078 (Pranlukast). Weitere Arzneimittel sind ebenfalls ABCC1 Inhibitoren. Dazu zählen z. B. das Urikosurikum Probenecid (Abbildung 1.7) [111] und das Analgetikum Indometacin [112,113], welche beide selektive ABCC1 Inhibitoren sind, sowie der Chemosensibilisator Valspodar (PSC-833), ein Derivat von Ciclosporin A und daher ein ABCB1 und ABCC1 Inhibitor [114]. Aber auch natürliche Verbindungen, wie Agosterol A [115,116] oder bestimmte Flavonoide [117,118] sind als Inhibitoren des Transportproteins gefunden worden. Die potentesten Verbindungen, von Raloxifen abgewandelte Pyrrolo- und Indolopyrimidine wurden von Wang *et al.* beschrieben [119,120]. Eine Übersicht über ausgewählte ABCC1 Inhibitoren ist in Tabelle 1.5 dargestellt.



**Abbildung 1.7:** Strukturen von Probenecid (links) und LY465803 (rechts).

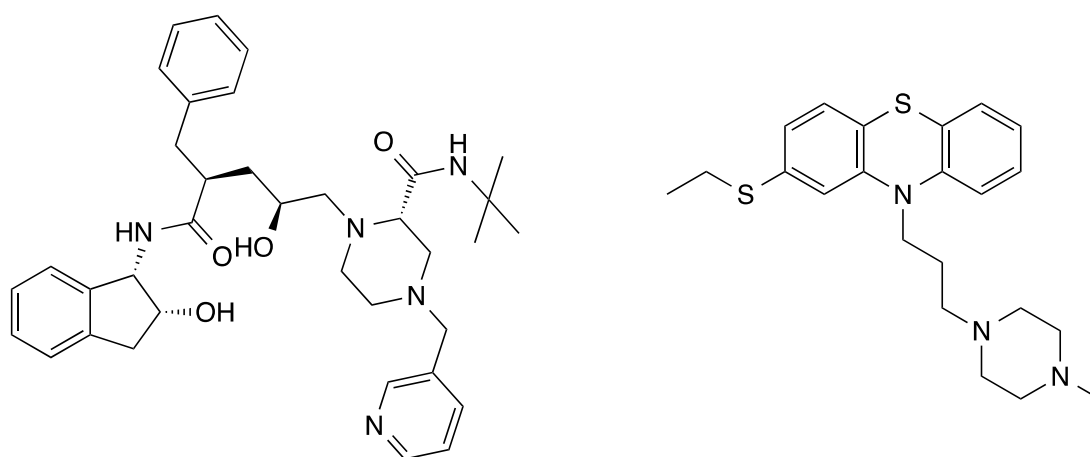
**Tabelle 1.5:** Auswahl von Inhibitoren von ABCC1 nach Stefan und Wiese [121].

Einteilung		Beispiele
Arzneimittel	Analgetika	Indometacin, Sulindac
	Antibiotika	Ciprofloxacin, Rifampicin
	Calciumkanalblocker	Nifedipin, Verapamil
	Calmodulin Antagonisten	Ciclosporin A, Tacrolimus
	Chelatbildner	Tiopronin
	Diuretika	Furosemid
	HIV-Therapeutika	Indinavir, Ritonavir
	Leukotrien-Rezeptorantagonisten	MK-571, ONO-1078, Montelukast
	Tyrosinkinaseinhibitor	Imatinib, Lapatinib
	Urikosurika	Benzbromaron, Probenecid
	Natürliche Verbindungen	Flavonoide
Chalkone		Phloretin
Lignane		Schisandrin A und B
Makrolide		Bafilomycin A, Oligomycin
Synthetische Verbindungen		LY117018, trizyklische Oxazole (z. B. LY465803), Indolo- und Pyrrolopyrimidine, Thiazole

Bis heute sind mit keiner der genannten Substanzen klinischen Studien durchgeführt worden und aufgrund der fehlgeschlagenen Studien mit ABCB1 Inhibitoren auch keine

geplant. Dennoch wird weiterhin geforscht um die Funktionalität des Transportproteins unter anderem mit Hilfe von präklinischen Studien zu erschließen.

Hierbei sind auch Aktivatoren von großem Wert und können zum Verständnis des Transportzyklus‘ beitragen. Zwar ist ihr Nutzen im Hinblick auf die Krebstherapie und der damit verbundenen Multidrug Resistenz stark eingeschränkt (z. B. Verapamil-vermittelte GSH-Extrusion), so wurde jedoch die Steigerung der Efflux-Funktion von ABC-Transportern, insbesondere die von ABCC1, als eine Behandlungsmethode für Alzheimer Erkrankungen erkannt [122,123]. Der stimulierte Transport von ABCC1 ist oftmals mit gesteigertem GSH-Efflux verbunden [124,125]. So wurde in Studien gezeigt, dass Verapamil, ein ABCB1 Inhibitor und ABCB1 ATPase Aktivator [126], zwar in hohen Konzentrationen ABCC1 hemmte, jedoch in nanomolaren Konzentrationen die Transportgeschwindigkeit steigerte [127,128]. Dieser Effekt führte zur verminderten intrazellulären GSH-Konzentration und anschließendem Zelltod [99]. Weitere Verbindungen wie Dithian-Derivate von Verapamil [129], sowie die Proteaseinhibitoren Indinavir (Abbildung 1.8) und Nelfinavir [130] und einige Flavonoide [131] und Xanthone [132], stimulierten ebenfalls den ABCC1-vermittelten Transport von GSH. Ein stimulierter Transport von exogenen Substraten, wie z. B. Zytostatika oder Fluoreszenzfarbstoffe, wurde hingegen nur von wenigen Arbeitsgruppen beobachtet. So stellten Weselowska *et al.* fest, dass Phenothiazin-Maleate sowie Phenothiazine (z. B. Thiethylperazin; Abbildung 1.8) den Efflux der Fluoreszenzfarbstoffe BCPCF-AM bzw. BCECF-AM stimulierten [133,134] steigerten. Eine weitere Studie zeigte, dass das Flavonoid Genistein einen gesteigerten MRP1-vermittelten Transport von Rhodamin 123 bewirkte [135].



**Abbildung 1.8:** Struktur von Indinavir (links) und Thiethylperazin (rechts).

### 1.2.3. Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) / ABCG2

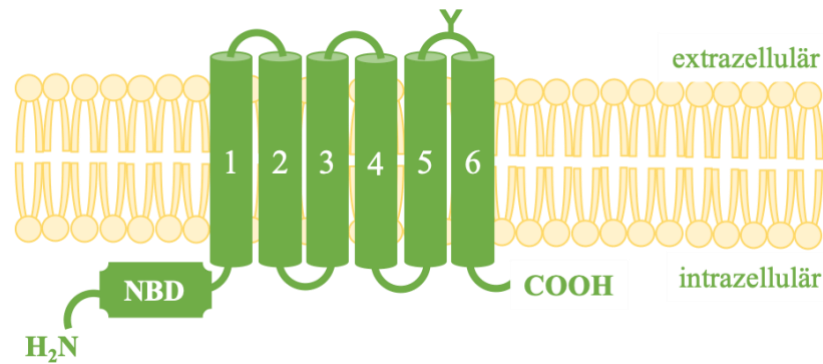
Das Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) wurde im Jahre 1998 parallel von drei Arbeitsgruppen entdeckt. Die erste Veröffentlichung von der Arbeitsgruppe um Doyle *et al.* beschrieb die Überexpression in Doxorubicin resistenten Zellen der namensgebenden humanen Brustkrebszelllinie MCF-7/AdrVp [136]. Daneben wurde es auch als Plazenta spezifischer ABC-Transporter (ABCP) [137] oder als Mitoxantron resistentes Protein (MXR) [138] bezeichnet.

Wie bereits die beschriebenen ABC-Transporter ABCB1 und ABCC1 wird auch ABCG2 in solchen Geweben exprimiert, die eine physiologische Barrierefunktion besitzen. So ist die Expression des Transporters in Plazenta, Blut-Hirn-Schranke, Leber, Niere, Brustdrüsen und im Darm besonders hoch, da hier ein Schutz gegen potenziell toxische Xenobiotika vonnöten ist [139]. Auch wenn das Substratspektrum von ABCG2 nicht so breit ausfällt wie das der anderen besprochenen Transporter, so leistet er dennoch einen gewichtigen Anteil zur Multidrug Resistenz in der Chemotherapie, insbesondere bei Brust-, Lungen- oder Ovarialkrebs [140].

#### 1.2.3.1. Aufbau von ABCG2

ABCG2 setzt sich aus 655 Aminosäuren zusammen und hat ein Molekulargewicht von etwa 72 kDa. Das besondere Merkmal des Transporters ist der Aufbau aus nur einer transmembranären Domäne mit sechs  $\alpha$ -Helices, wie in Abbildung 1.9 dargestellt. Dementsprechend ist das Protein mit nur einer N-terminalen Nukleotid-Bindungsdomäne sowie nur einer C-terminalen transmembranären Domäne ausgestattet. Der sogenannte Halbtransporter muss, um seine Funktion als Transporter ausführen zu können, mindestens dimerisieren, wobei Studien zufolge auch eine Tetramerisierung und Polymerisation von bis zu 12 Transportern diskutiert wird [141,142].





**Abbildung 1.9:** Topologiemodell von ABCG2.

Erst kürzlich wurde die Kristallstruktur des humanen Transportproteins ABCG2 mithilfe der Kryoelektronenmikroskopie (Kryo-EM) aufgeklärt [143]. Dieselbe Arbeitsgruppe veröffentlichte außerdem den Komplex mit der Verbindung MZ29, einem Derivat des Standardinhibitors Ko143 [144]. Ausführliche Diskussionen über die Ergebnisse von Mutagenesestudien eröffnen damit neue Interpretationsmöglichkeiten des therapeutisch relevanten Transporters ABCG2 und der mit ihm verbundenen Krankheiten [145].

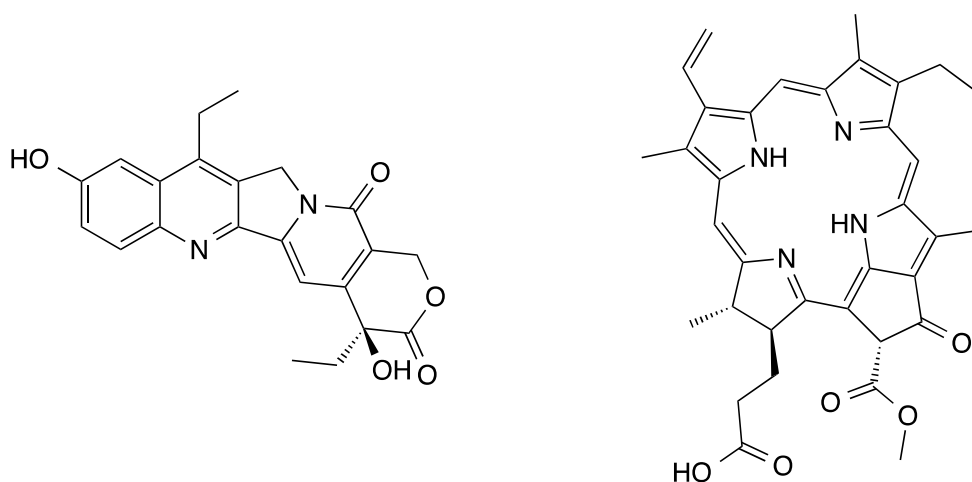
Der exakte Transportmechanismus ist zwar ungeklärt, aber Modelle helfen, diesen zu veranschaulichen und zu verstehen. Wie bereits für ABCB1 und ABCC1 beschrieben, wird das ATP-Switch-Modell am häufigsten gebraucht. Im Fall von ABCG2 geht das Modell vereinfacht von der Bildung eines Homodimers aus und wurde 2008 von McDevitt *et al.* auf das Transportprotein übertragen [41]. Der Ablauf des Zyklus‘ ist für ABCB1 in Kapitel 1.2.1.1. näher erläutert.

Die aktuelle Forschung beschäftigt sich unter anderem mit der Anzahl und der Lokalisation von Bindungsstellen des ABCG2 Transporters. Dennoch sind bis jetzt nur wenige Studien zu diesem Thema veröffentlicht worden. Clark *et al.* verwies auf mehrere Bindungsstellen, die sich gegenseitig beeinflussen sollen [146]. Mithilfe einer Mutante, der ABCG2-Isoform R482G und dem resultierenden größeren Substratspektrum wurden drei solcher Bindungstaschen identifiziert, wobei eine von Rhodamin 123, eine weitere von Daunorubicin, Doxorubicin oder Prazosin, und die letzte von Mitoxantron bzw. Hoechst 33342 belegt wurden. Andere Arbeitsgruppen hingegen vermuteten eine große Bindungstasche, in der mehrere Moleküle gleichzeitig an verschiedene Stellen binden könnten [147,148]. Auch Giri *et al.* [149] und Hazai *et al.* [150] stützten diese Hypothese.

### 1.2.3.2. Substrate und Modulatoren von ABCG2

Das Transportprotein ABCG2 ist in der Lage mit strukturell unterschiedlichen Substanzen zu interagieren. Viele der Verbindungen sind bereits durch die Proteine ABCB1 und ABCC1 bekannt, sodass Überlappungen der Spektren der Substrate als auch Modulatoren vorliegen.

So zählen zu den Substraten von ABCG2 eine Reihe von Zytostatika wie z. B. Mitoxantron, Irinotecan (und sein aktiver Metabolit SN-38; Abbildung 1.10) oder Methotrexat. Auch unterschiedliche Arzneimittelklassen zählen zu den Substraten sowie bekannte Fluoreszenzfarbstoffe. Tabelle 1.6 gibt eine Übersicht einiger ABCG2 Substrate. Das Substratspektrum von ABCG2 hat insoweit eine Besonderheit, dass Studien zufolge eine Mutation von Arginin an Position 482 das Substratspektrum erweitert. So wird durch eine Punktmutation die basische Aminosäure Arginin durch die neutralen Aminosäuren Threonin (R482T) oder Glycin (R482G) ausgetauscht. Die beschriebene Mutation tauchte aber bis jetzt nicht im humanen Gewebe auf und wurde nur in selektierten Zelllinien gefunden, sodass die R482 Variante als Wildtyp bezeichnet wird [151]. Die Mutanten sind in der Lage, Anthrazykline (wie Doxorubicin und Daunorubicin) oder Rhodamin 123 zu transportieren [152,153]. Der Transport von z. B. Hoechst 33342 oder Pheophorbid A (Abbildung 1.10), ein spezifisches Substrat von ABCG2, bleibt von den Mutationen unberührt. Lediglich die Funktion Methotrexat zu transportieren, geht verloren, was an Position 482 liegen muss [154,155].



**Abbildung 1.10:** Struktur von SN-38 (links) und Pheophorbid A (rechts).

**Tabelle 1.6:** Auswahl von Substraten von ABCG2 nach Robey *et al.* [156] und Basseville *et al.* [157].

Arzneimittelklasse		Beispiele
Zytostatika	Anthrazykline	Daunorubicin*, Doxorubicin*, Epirubicin*
	Anthrachinone	Bisantren*, Mitoxantron
	Antimetabolite	Methotrexat
	Camptothecine	Irinotecan, SN-38, Topotecan, 9-Aminocamptothecin
	Epipodophyllotoxine	Etoposid*, Teniposid
	Tyrosinkinasehemmer	Imantinib, Erlotinib, Nilotinib
Fluoreszenzfarbstoffe		BCECF-AM, BODIPY-Prazosin, Hoechst 33342, Pheophorbid A, Rhodamin 123*
Sonstige	Antibiotika	Ciprofloxacin, Erythromycin, Ofloxacin
	Antiöstrogene	Tamoxifen
	Calciumkanalblocker	Dipyridamol, Nifedipin, Nitrendipin
	HMG-CoA	Cerivastatin, Pitavastatin,
	Reduktasehemmer	Rosuvastatin
	Virustatika	Abacavir, Lamivudin, Zidovudin

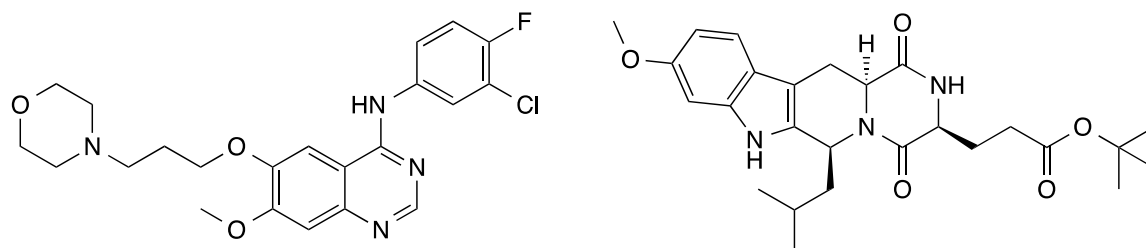
\* Substrate der ABCG2 Mutanten R482T und R482G

Die Entwicklung von potenten, selektiven und nicht toxischen Inhibitoren des ABCG2 Transportproteins ist eine Möglichkeit die Multidrug Resistenz zu überwinden. Es wurden viele der bereits bekannten Inhibitoren von ABCB1 und ABCC1 an ABCG2 getestet und strukturell modifiziert. So stellten sich z. B. Ciclosporin A, Elacridar und Tariquidar ebenfalls als Inhibitoren des hier vorgestellten Proteins heraus. Als einer der ersten hochpotenten und selektiven Verbindungen wurde Fumitremorgin C (FTC) entdeckt [158,159]. Die von *Aspergillus fumigatus* produzierte Substanz ist in hohem Maße neurotoxisch und damit für den Einsatz in der Krebstherapie ungeeignet [160]. Basierend auf der Struktur des FTC wurde daraufhin der nicht toxische Inhibitor Ko143 (Abbildung 1.11) entwickelt [161]. Natürlich vorkommende Flavonoide sowie ihre Derivate sind

ebenfalls bekannte Inhibitoren von ABCG2 [162-165]. Auch die biochemischen Vorläufer, die Chalkone und ihre Derivate, stellten sich als selektive Inhibitoren des ABCG2 Transporters heraus. So inhibieren Chalkone im niedrigen mikromolaren Bereich und überwinden damit *in vitro* die Multidrug Resistenz [166]. Die Klasse der Chinazoline, wie der Tyrosinkinaseinhibitor Gefitinib sowie die strukturverwandten Derivate erwiesen sich überdies als noch potentere Inhibitoren des ABCG2 Transportproteins. Dabei sind IC<sub>50</sub>-Werte im hohen nanomolaren Bereich keine Seltenheit [167-169]. Die hier chronologisch vorgestellten Beispiele von Inhibitoren von ABCG2 wurden nach Ahmed-Belkacem *et al.* in vier Gruppen eingeteilt und sind in Tabelle 1.7, mit weiteren Beispielen ergänzt, aufgelistet.

**Tabelle 1.7:** Auswahl von Inhibitoren von ABCG2 nach Ahmed-Belkacem *et al.* [170].

Einteilung	Beispiele
Breitspektrum-inhibitoren	Biricodar, Ciclosporin A, Elacridar, Nicardipin, Reserpin, Tariquidar
Spezifische Inhibitoren	Fumitremorgin C, Ko143, Ko132, Novobiocin
Flavonoide und Derivate	Biochanin A, 6-Phenylchrysin, Techtchrysin
Tyrosinkinaseinhibitoren	Gefitinib, Imatinib



**Abbildung 1.11:** Strukturen von Gefitinib (links) und Ko143 (rechts).

Im Hinblick auf sogenannte Aktivatoren des ABCG2 Transportproteins gibt es im Gegensatz zu ABCB1 und ABCC1 keine Studien, die über stimulierende Substanzen berichteten. Lediglich ATPase Aktivatoren von ABCG2 [171-174], als auch Verbindungen, die die Expression von ABCG2 steigern [175], wurden beschrieben.

## 2. Zielsetzung der Arbeit

Die Multidrug Resistenz (MDR) von Krebszellen führt zum Versagen von Chemotherapien und stellt damit ein bedeutendes Problem bei der Behandlung von malignen Tumoren dar. Die Überexpression von ABC-Transportproteinen, insbesondere ABCB1, ABCC1 und ABCG2 spielt eine wichtige Rolle beim MDR Phänotyp. Desweiteren haben diese Transportproteine aufgrund ihrer breiten Substraterkennung einen Einfluss auf die physiologischen Barrieren und die Verteilung von Arzneistoffen im gesamten Organismus. Funktionelle Untersuchungen der Interaktionen von Modulatoren und verschiedener Substrate von ABC-Transportern können zum besseren Verständnis ihrer Funktionsweise dieser beitragen. Die Beeinflussung der Transportfunktion und die Entwicklung neuer Ansätze soll zur Aufhebung bzw. Abschwächung der Multidrug Resistenz führen.

Die hier vorliegende Arbeit hat drei wesentliche Schwerpunkte:

1. Charakterisierung modulierender Eigenschaften von im Arbeitskreis synthetisierten Verbindungen der Klassen der Purine, Pyrrolo- und Indolopyrimidine, sowie der Chinazolin-Chalkone auf den ABCB1-, ABCC1- und ABCG2-vermittelten Transport unter Verwendung bestehender und neu etablierter Testsysteme. Neben Bestimmung von Aktivitätswerten und der Ableitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen im Hinblick auf die Inhibierung und Aktivierung der genannten Transportproteine standen ebenso die Selektivität, Toxizität und der

Wirkmechanismus genannter Verbindungsklassen, sowie deren Fähigkeit, Multidrug Resistenz aufzuheben, im Fokus der Untersuchungen.

2. Untersuchung ausgewählter Modulatoren der Klassen der Pyrrolopyrimidine, Chinazolin-Chalkone, Tetrahydro- $\beta$ -carboline, sowie Acryloylphenylcarboxylate im Hinblick auf die Inhibierung und Aktivierung der ABCC1 und ABCG2 ATPasen unter Anwendung eines im Arbeitskreis neu etablierten ATPase Assays.
3. Etablierung und Validierung neuer Detektionsreagenzien zur Anwendung des ATPase Assays auf einer 96er Mikrotiterplatte als überlegene Methode zur ATPase Aktivitätsbestimmung.

# 3. ● **Material und Methoden**

## **3.1. Chemikalien und Pufferlösungen**

### **3.1.1. Chemikalien für die biologische Testung**

Die in dieser Arbeit verwendete Chemikalien sind in Kapitel 3.9 unter Nennung der Bezugsquelle aufgelistet. Der Einsatz zur Herstellung von Lösungen ist in entsprechenden Tabellen unter Angabe der Einwaage und der resultierenden Konzentration angegeben.

Im Arbeitskreis synthetisierte Substanzen sowie im Handel erhältliche Standards, welche in Bezug auf ihre Aktivität an ABC-Transportern zur biologischen Evaluierung vorgesehen waren, wurden in Dimethylsulfoxid gelöst. Dabei betrug die Aufbewahrungskonzentration der Substanzen mindestens 10 mmol/l. Die einem Versuch vorausgehende notwendige Verdünnungsreihe zur Herstellung gewünschter Konzentrationen wurde entweder im Krebs-HEPES-Puffer oder im Indikator-freien Nährmedium hergestellt. Substanzen, die sich nicht in Lösung bringen ließen und von der Testung ausgenommen werden mussten, wurden als solche markiert.

### 3.1.2. Pufferlösungen für die biologische Testung

Die Verwendung vom Krebs-HEPES-Puffer (KHP) eignete sich besonders für das Arbeiten mit Zellen. Dieser interagiert nicht bei Fluoreszenzmessungen und stellte sicher, dass die Zellen während der Inkubationszeit und Versuchsdauer überlebten. Um möglichst wenig Störfaktoren zu haben, wurde die Verdünnungsreihe der Substanzen ebenfalls in Krebs-HEPES-Puffer hergestellt.

Aufgrund des enormen Verbrauchs an KHP wurden für die Herstellung des Puffers zunächst 500 ml einer 5-fach konzentrierten Lösung angefertigt. In Tabelle 3.1 sind die notwendigen Chemikalien und ihre Einwaage aufgelistet.

**Tabelle 3.1:** Herstellung des Krebs-HEPES-Puffers (KHP).

<b>KHP-Stammlösung (5-fach)</b>			pH 7,4
17,330 g	Natriumchlorid		50,0 mmol/l
0,876 g	Kaliumchlorid		593 mmol/l
0,408 g	Kaliumdihydrogenphosphat		23,5 mmol/l
0,882 g	Natriumhydrogencarbonat		6,00 mmol/l
5,796 g	D-Glucose Monohydrat		21,0 mmol/l
5,958 g	HEPES		58,5 mmol/l
ad 500,0 ml	MilliQ Wasser		
<b>Calciumchlorid-Lösung 1 mol/l</b>			
1,470 g	Calciumchlorid Dihydrat		1 mol/l
ad 10,0 ml	MilliQ Wasser		
<b>Magnesiumsulfat-Lösung 1 mol/l</b>			
2,465 g	Magnesiumsulfat Heptahydrat		1 mol/l
ad 10,0 ml	MilliQ Wasser		
<b>KHP (1-fach)</b>			pH 7,4
100,0 ml	KHP-Stammlösung		
650 µl	Calciumchlorid-Lösung 1 M		1,3 mmol/l
600 µl	Magnesiumsulfat-Lösung 1 M		1,2 mmol/l
ad 500,0 ml	MilliQ Wasser		



Zur Herstellung wurden die genannten Feststoffe eingewogen und in etwa 400 ml MilliQ Wasser gelöst. Im Anschluss erfolgte eine pH-Wert-Einstellung mit NaOH oder HCl auf 7,4 und die Hinzugabe des fehlenden Wasservolumens. Hieraus wurden 100 ml Aliquots abgefüllt und bei  $-20\text{ °C}$  bis zur Verwendung eingefroren.

Zur Herstellung einer 1-fach konzentrierten Lösung wurde ein Aliquot der 5-fach konzentrierten KHP-Lösung aufgetaut und in einen 500 ml Messkolben überführt. Der Zugabe von  $650\text{ }\mu\text{l}$  einer  $1\text{ mol/l}$  Calciumchlorid- sowie  $600\text{ }\mu\text{l}$  einer  $1\text{ mol/l}$  Magnesiumsulfat-Lösung folgte das Auffüllen des Messkolbens auf 500 ml mit MilliQ Wasser. Hieraus wurden wiederum 50 ml Aliquots durch Sterilfiltration erstellt und bis zur Verwendung ebenfalls bei  $-20\text{ °C}$  eingefroren, welche für Zellversuche erneut aufgetaut werden konnten.

## **3.2. Zelllinien**

Die Kultivierung aller unten vorgestellten Zelllinien fand in Gewebekulturflaschen verschiedener Größen, wenn nicht anders vermerkt, statt. Steriles Arbeiten konnte unter aseptischen Bedingungen unter einer speziellen Werkbank mit laminarem Luftstrom unter Verwendung von Desinfektionsmittel für die Werkbank sowie Bereitstellung aller Materialien für das Arbeiten mit Zellen nach Dampfsterilisation ( $121\text{ °C}$ , 20 min) durchgeführt werden. Die Nährmedien wurden zu Beginn bei RT oder im Wasserbad auf  $37\text{ °C}$  angewärmt und die Zellen nach dem Bearbeitungsschritt im Inkubator entweder bei  $27\text{ °C}$  ohne  $\text{CO}_2$ -Begasung oder bei  $37\text{ °C}$  mit 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert.

### **3.2.1. A2780 und A2780 adr Zellen**

Die humane Ovarialkarzinomzelllinie A2780 wurde im Jahre 1984 aus dem Tumor einer unbehandelten Patientin gewonnen [176]. Durch kontinuierliche Zugabe des Zytostatikums Doxorubicin zu der sensitiven Zelllinie A2780 konnte die resistente Zelllinie A2780 adr erzeugt werden, welche durch eine Überexpression von ABCB1 gekennzeichnet ist. Beide Zelllinien wurden von der European Collection of Cell Culture (ECACC, Salisbury, UK, A2780 No. 93112519, A2780 adr No. 93112520) bezogen und in RPMI 1640 Nährmedium

unter Zusatz von 10 % FKS sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Alle zehn Passagen musste der Resistenzgrad der A2780 adr Zellen durch Zugabe von Doxorubicin (500 nmol/l) in das Nährmedium aufrecht erhalten werden.

### **3.2.2. H69 und H69 AR Zellen**

Die humane Zelllinie H69 wurde im Jahre 1987 aus dem Pleuraerguss eines 55-jährigen kaukasischen Mannes mit einem kleinzelligen Bronchialkarzinom gewonnen. Durch kontinuierliche Zugabe des Zytostatikums Doxorubicin zu der sensitiven Zelllinie H69 konnte die resistente Zelllinie H69 AR erzeugt werden, welche sich durch die Überexpression von ABCC1 auszeichnete [104]. Beide Zelllinien wurden von der American Type Culture Collection (ATCC<sup>®</sup>, H69 HTB-119<sup>™</sup>, H69 AR CRL-11351<sup>™</sup>) bezogen und in RPMI 1640 Nährmedium unter Zusatz von 20 % FKS sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Im Gegensatz zu den adhärent wachsenden resistenten Zellen, bildete die sensitive Zelllinie eine Suspension im Nährmedium. Alle zehn Passagen musste der Resistenzgrad der H69 AR Zellen durch Zugabe von Doxorubicin (200 nmol/l) in das Nährmedium aufrecht erhalten werden.

### **3.2.3. 2008 und 2008 MRP1 Zellen**

Die Ovarialkarzinomzelllinie 2008 wurde im Jahre 1972 aus dem Tumor einer unbehandelten Patientin isoliert [177]. Die retrovirale Transfektion mit humaner ABCC1 cDNA führte zur ABCC1-überexprimierenden Variante 2008 MRP1 [178,179]. Beide Zelllinien waren ein Geschenk von Prof. Dr. P. Borst (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande). Die Kultivierung der Zellen fand im RPMI 1640 Nährmedium unter Zusatz von 10 % FKS sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin statt.

### 3.2.4. MDCK II, MDCK II BCRP und MDCK II MRP1 Zellen

Die Zelllinie MDCK (Madin Darby Canine Kidney) stammte aus der Niere eines erwachsenen, weiblichen Cocker Spaniels und ist nach ihren Entdeckern S. H. Madin und N. B. Darby (1958) benannt [180]. Die MDCK II Zelllinie ist ein Subklon der heterogenen Parentalzelllinie MDCK und entstand aus einer späteren Passage mit leicht veränderten Eigenschaften [181,182]. Die ABCG2- bzw. ABCC1 überexprimierende Variante wurde durch retrovirale Transfektion des genannten Subklons mit humaner ABCG2 (Wildtyp R482) bzw. ABCC1 cDNA erzeugt. Beide resistente Zelllinien enthalten zusätzlich ein Reporterogen, das grün fluoreszierende Protein (GFP), welches mit humaner ABCG2 bzw. ABCC1 cDNA verknüpft ist. Hierbei konnte die GFP-Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{ext.}} = 475 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 509 \text{ nm}$ ) mit der relativen Transportprotein Expression korreliert und kontrolliert werden. Alle drei Zelllinien waren ein Geschenk von Prof. Dr. A. Schinkel (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande). Die Kultivierung der Zellen fand im D-MEM Nährmedium mit 10 % FKS sowie 100 U/ml Penicillin, 100  $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin und 2 mmol/l L-Glutamin statt.

### 3.2.5. MCF-7 und MCF-7 MX Zellen

Die humane Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wurde im Jahre 1970 aus dem Brustgewebe einer 69-jährigen kaukasischen Frau isoliert [183]. Eine ABCG2-überexprimierende Variante (MCF-7 MX) konnte durch kontinuierliche Zugabe des Zytostatikums Mitoxantron zur sensitiven Zelllinie MCF-7 erzeugt werden. Beide Zelllinien waren ein Geschenk von Prof. Dr. E. Schneider (Wadsworth Center, Albany, NY, USA) [184,185]. Die Kultivierung der Zellen fand im RPMI 1640 Nährmedium unter Zusatz von 20% FKS sowie 100 U/ml Penicillin und 100  $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin statt. Alle zehn Passagen musste der Resistenzgrad der MCF-7 MX Zellen durch Zugabe von Mitoxantron (100 nmol/l) in das Nährmedium aufrecht erhalten werden.

### 3.2.6. Sf9-Insektenzellen

Die Sf9-Zellen gehören zu einer immortalisierten Insektenzelllinie aus Ovarial-Zellen von *Spodoptera frugiperda*, einer Nachtfalterart, welche sich hervorragend zur Produktion von rekombinanten Proteinen mit Zuhilfenahme eines Baculovirus Expressionssystems eignet [186]. Die Insektenzellen lassen sich dabei problemlos adhärenent als auch in Suspension in serum-freien Medium kultivieren. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. C. Hrycyna (Purdue University, Indiana, USA) zur Verfügung gestellt und das Spodopan Nährmedium unter Zusatz von 0,5 % Antibiotic-Antimycotic 100X sowohl für die Kultivierung als auch Infektion der Sf9-Zellen verwendet. Im Gegensatz zu den humanen Zelllinien fand die Kultivierung bei 27 °C und ohne CO<sub>2</sub>-Begasung statt.

## 3.3. Zellkultur

### 3.3.1. Zellkultur von Krebszellen

Die einzelnen Nährmedien sind zellspezifisch und wurden wie in Kapitel 3.2 beschrieben durch weitere Bestandteile ergänzt. Das verwendete Medium musste alle zwei bis drei Tage erneuert werden, wobei die Häufigkeit von der Konfluenz der Zellen abhing. Einige der Medien enthielten Farbindikatoren, die zur Beurteilung des Zustandes der Zellen hilfreich waren, da der Verbrauch der Nährstoffe nicht mit der Dichte des Zellrasens, sondern mit der metabolischen Aktivität der Zellen korreliert. Eine Subkultivierung fand ab der Konfluenz von 80 % statt. Zuerst wurde das verbrauchte Nährmedium mithilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) gewaschen. So konnten tote Zellen und Reste des Nährmediums entfernt werden. Der Ablösevorgang startete nach Zugabe von 3-5 ml Trypsin-EDTA-Lösung, worin die Zellen in der Kulturflasche für einige Minuten im Inkubator bei 37 °C belassen wurden. Hierdurch lösten sich die Zell-Zell-Verbindungen, sowie die Zell-Matrix-Verbindungen, womit sich die Zellen von der Kulturunterlage ablösten. Inaktivierung von Trypsin, welches prinzipiell zellschädigend ist, konnte durch Zugabe von Nährmedium erreicht werden, sodass die Zellen nicht weiter beeinträchtigt wurden. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon überführt und bei 266 × g und 4 °C für 4 min zentrifugiert, im Anschluss der Überstand

abgesaugt, und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Die Vereinzelung der Zellen diente dazu mögliches Inselwachstum der Zellen zu verhindern. Die Produktion von Schaum sollte allerdings so gering wie möglich ausfallen um eine eventuelle Bakterienbesiedlung zu verhindern. Die gewünschte Menge an Zellen wurde in die vorgesehene Kulturflasche überführt und mit ausreichend frischem Nährmedium aufgefüllt, und bis zur nächsten Bearbeitung im Inkubator bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> gelagert.

### **3.3.2. Zellkultur von Insektenzellen**

Die Sf9-Insektenzellen konnten sowohl adhärent als auch in Suspension in serum-freien Medium bei 27 °C kultiviert werden. Das Passagieren der Zellen, die adhärent gewachsen sind, erreichte man mit dem sogenannten Shake-off-Verfahren (Abklopfen der Zellen). Da die Zellen relativ lose gebunden sind und somit keine Verdauungsenzyme für den Ablösevorgang benötigt werden, konnten diese durch leichtes Abklopfen an die Unterseite der Kulturflasche sowie durch Spülen mit Medium in Suspension gebracht und anschließend zentrifugiert werden. Bei in Suspension wachsenden Zellen wurde die Subkultivierung durch einfaches Verdünnen des Mediums durchgeführt. Für das Zählen der Zellen konnte das Volumen direkt aus der Suspensionsflasche entnommen, und im Anschluss mit CASY<sup>®</sup>ton verdünnt und vermessen werden (wie in Kapitel 3.3.5 näher beschrieben). Die vor dem Gebrauch autoklavierte Suspensionsflasche war eine 250 ml Erlenmeyerkolbenflasche mit Schraubverschluss, welche für bis zu maximal 100 ml Zellsuspension Platz bot. Die Aussaatdichte wurden auf 300.000 Zellen/ml festgesetzt und die Zelldichte sollte die Grenze von 2.000.000 Zellen/ml nicht überschreiten. Die Homogenisierung der Zellen innerhalb der Suspension konnte durch einen Orbital-Schüttler bei 150 rpm und 27 °C erreicht werden.

### **3.3.3. Inkulturnahme von Zellen**

Eine Zellkultur begann durch Auftauen eingefrorener Zellen. Eine mit 25 ml frischem, vorgewärmten Nährmedium gefüllte T175-Gewebekulturflasche stand bereit, worin das tiefgefrorene, kryokonservierte Aliquot der Zellen nach Auftauen in einem warmen

Wasserbad überführt wurde. Für eine effektive Adhäsion der Zellen am Flaschenboden fand eine zellspezifische Lagerung im Inkubator statt. Es folgte ein Wechsel des Nährmediums nach wenigen Stunden um das beim Einfrieren zugesetzte DMSO zu entfernen, das die Zellen im aufgetauten Einfriermedium schädigen konnte.

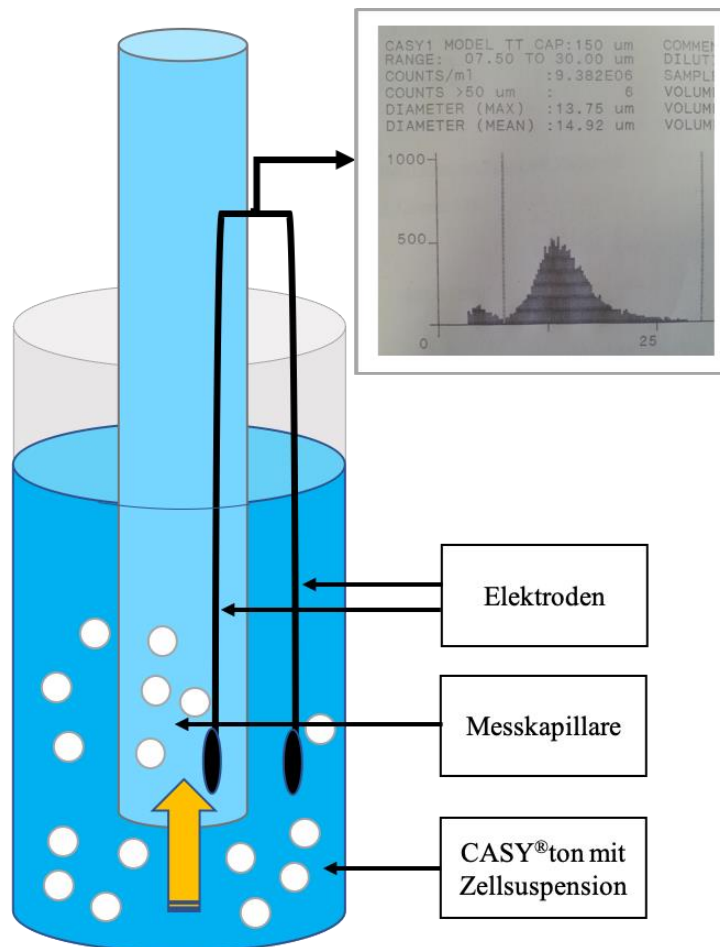
### **3.3.4. Kryokonservierung von Zellen**

War die Zellrasendichte einer Gewebekulturflasche zu 80-90 % erreicht, konnten die Zellen, wie in Kapiteln 3.3.1 und 3.3.2 beschrieben, geerntet, zentrifugiert, das Zellpellet mit 3,6 ml frischem Nährmedium versetzt und eine homogene Zellsuspension erzeugt werden. In mit 100 µl DMSO vorpipetiertem Kryoröhrchen wurden jeweils 900 µl der Zellsuspension gegeben. DMSO war in diesem Fall ein Frostschutzmittel und verhinderte beim Einfriervorgang die Bildung von Eiskristallen, die die Zellmembran schädigen könnten. Die Lagerung der Kryoröhrchen erfolgte zunächst einen Tag bei -80 °C und anschließend in flüssigem Stickstoff.

### **3.3.5. Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit dem Casy<sup>®</sup>1 Modell TT (Cell Counter + Analyser System) der Firma Schärfe System. Diese Technologie kombinierte ein bewährtes Messprinzip aus Widerstandsmessung, dem Coulter Counter mit einer Signalauswertung, der Pulsflächenanalyse. Für die Messung wurden 20 µl der vorbereiteten Zellsuspension zu 10 ml der steril filtrierte Casy<sup>®</sup>ton-Elektrolytlösung in ein vorgesehenes Tube gegeben und die Suspension durch Schwenken homogenisiert. Anschließend erfolgte die automatisierte Vermessung, bei der die Zellsuspension mithilfe einer Pumpe mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Messpore in einer Messkapillare definierter Geometrie gesaugt wurde. Während der Messung herrschte in der Kapillare ein konstanter Widerstand (Vergleichswert). Bei Passage durch die Kapillare verdrängten einzelne Zellen entsprechend ihres Volumens eine bestimmte Menge der Casy<sup>®</sup>ton-Lösung und induzierten einen elektrischen Impuls. Da die intakten Zellen im Gegensatz zur Elektrolytlösung keine leitenden Eigenschaften besitzen und als Isolatoren betrachtet werden können, führten

diese infolgedessen zur Widerstandserhöhung, die proportional zur Fläche der Zellen war. Die Anzahl der dabei gemessenen Signale entsprach der Zellzahl. Handelte es sich jedoch um tote Zellen, deren Zellmembran nicht mehr als elektrische Barriere diente, wurden diese nur noch als Zellkerne detektiert. Eine untere Messgrenze von 8  $\mu\text{m}$  legte den Unterschied zwischen Zelltrümmern und lebenden Zellen fest. Zellagglomerate hingegen, die durch unzureichende Vereinzelung der Zellen zustande kamen, konnten ebenfalls von der Messung durch Festsetzen einer Obergrenze von 40  $\mu\text{m}$  ausgeschlossen werden.



**Abbildung 3.1:** Schematischer Aufbau einer Zellzahlbestimmung mit dem Casy<sup>®</sup>1 Modell TT (Cell Counter + Analyser System) der Firma Schärfe System GmbH.

## 3.4. Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie

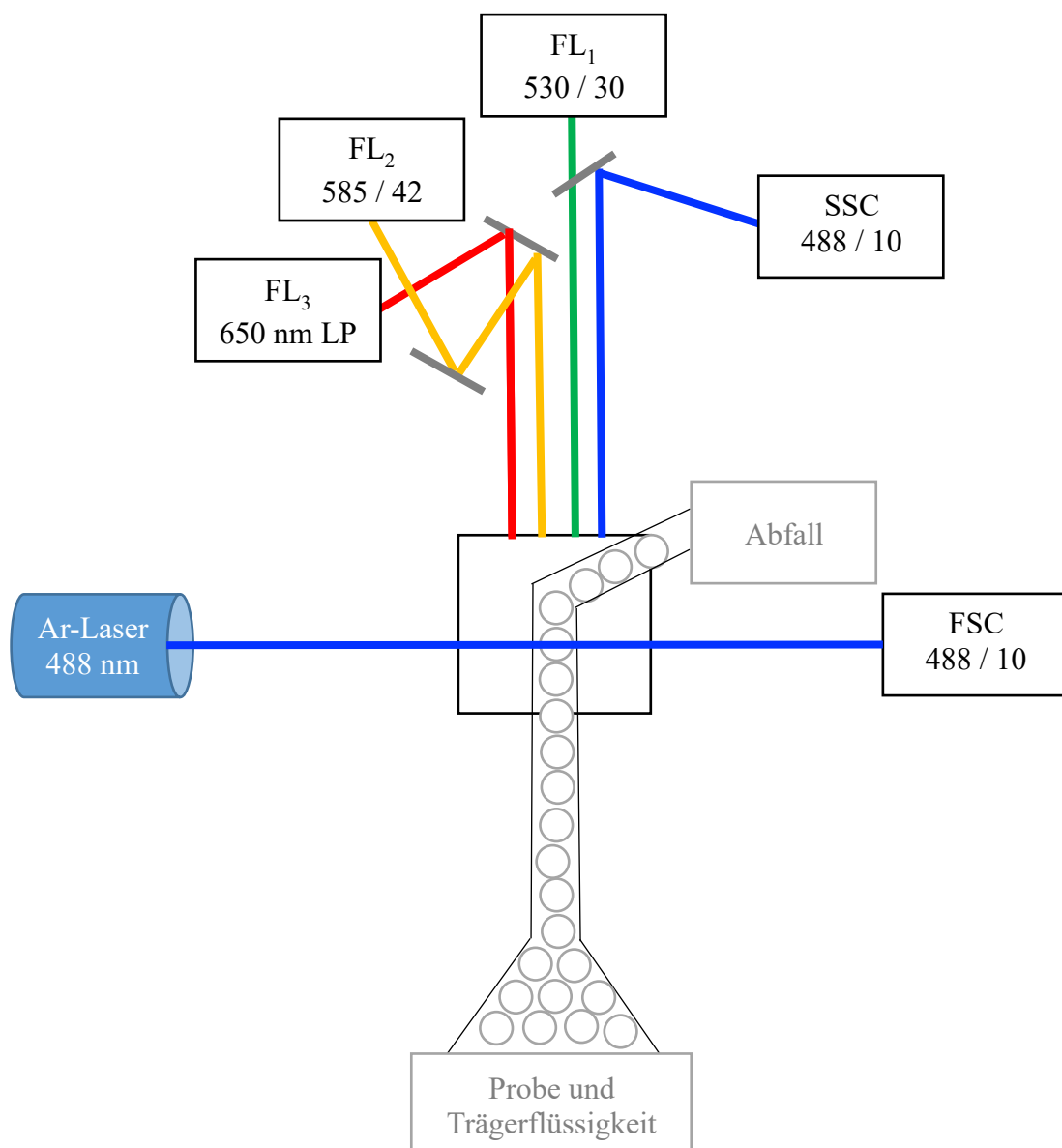
### 3.4.1. Prinzip der Durchflusszytometrie

Die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, das die Analyse von Zellen durch Lichtstreuung und Fluoreszenz ermöglicht. Die Eigenschaften der Zellen werden aufgrund ihrer Form, Struktur und Färbung abgeleitet. Das im Zusammenhang mit dieser Arbeit verwendete Messgerät wird als FACS® (fluorescence-activated cell-sorting) bezeichnet und ist eine geschützte Handelsmarke der Firma Becton Dickinson.

Der Aufbau eines Durchflusszytometers lässt sich in drei wesentliche funktionelle Einheiten unterteilen: einem Flüssigkeitssystem, einem optischen System und einem signalverarbeitenden System. Das Flüssigkeitssystem enthält zwei Leitungen, welche die Aufgabe besitzen, die Probe am Laserstrahl vorbeizuführen. Dies geschieht unter Zuhilfenahme der hydrodynamischen Fokussierung. Hierbei wird die Zellsuspension durch eine Kanüle in eine schnell in die gleiche Richtung fließende Trägerflüssigkeit (Hüllstrom) geleitet und hierdurch in kleine Tröpfchen geteilt, sodass nicht mehr als eine Zelle hineinpasst (Vereinzelung). Beim Messvorgang gelangt die Probe mit Überdruck in den Messbereich, wird dort beschleunigt und an der querschnittsverringerten Messküvette verjüngt, sodass die Messung von suspendierten Einzelzellen erfolgt. Diese passieren in einem hohen Tempo wie an einer Perlenkette angeordnet einen rechtwinklig zum Probenfluss angeordneten Laserstrahl. Das optische System wird in eine Anregungs- und eine Detektionseinheit unterteilt. Zur Anregung wird ein Argonlaser mit einer Exzitationswellenlänge von 488 nm verwendet, dessen Strahlverformung zu einem horizontal-elliptischen Durchmesser von 20\*60 µm mit ausreichender Signalintensität und Auflösung führt. Die an die Messung anschließende Detektionseinheit liefert verschiedene Parameter, die bei der Charakterisierung von Zellen berücksichtigt werden können. Diese erfasst das Vorwärtsstreulicht (FSC, Forward Angle Light Scatter), das Seitwärtsstreulicht (SSC, Side Scatter) und die Fluoreszenz. So kann die Zellgröße, resultierend aus der Lichtbeugung, die entlang des einfallenden Lichtes gemessen wird und proportional zur Zelloberfläche ist, ermittelt werden. Bei einer intrazellulären Brechung und Reflexion, die in einem 90° Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gemessen wird, wird die Zellkomplexität oder – granularität bestimmt. Ebenfalls orthogonal zur Anregungsrichtung durch den Argonlaser wird die emittierte zelluläre Fluoreszenz in den unterschiedlichen Kanälen



(FL1, FL2 und FL3) detektiert. Das signalverarbeitende System wandelt diese optischen Signale in elektrische um. Als Detektoren kommen Photodioden für FSC und Photoröhren (PMT, Photomultiplier Tubes) für SSC und Fluoreszenz zum Einsatz. Die Detektion der Fluoreszenz in den Kanälen FL1 (530/30 nm) und FL2 (585/42 nm) findet im Rahmen eines sogenannten Band-pass Filters statt. Dieser Filter lässt das Licht nur in einem definierten Wellenlängenbereich passieren. Am Beispiel von FL1 erklärt, wird das Licht in der Bandbreite  $530 \pm 15$  nm, also zwischen den Wellenlängen 515 nm und 545 nm detektiert. Im Kanal FL3 ( $>670$  nm) wird die Fluoreszenz oberhalb dieser Wellenlänge (Long-pass Filter) gemessen.



**Abbildung 3.2:** Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers

Die Messung einer Probe erfolgt immer in allen Bereichen, sodass die Einstellungen für alle Kanäle vorgenommen werden. Die Verstärkereinstellungen können linear oder logarithmisch sein (Lin oder Log). Bei FSC und SSC dagegen wird eine lineare Verstärkung genutzt, um die Streuung und die Fluoreszenz Parameter nur in einem sehr engen Bereich zu verstärken. Abhängig von den fluoreszierenden Eigenschaften der eingesetzten Substanzen findet die Detektion kanalübergreifend statt. Um Ergebnisse nicht zu verfälschen müssen daher Kompensationen vorgenommen werden.

### **3.4.1.1. Datenanalyse**

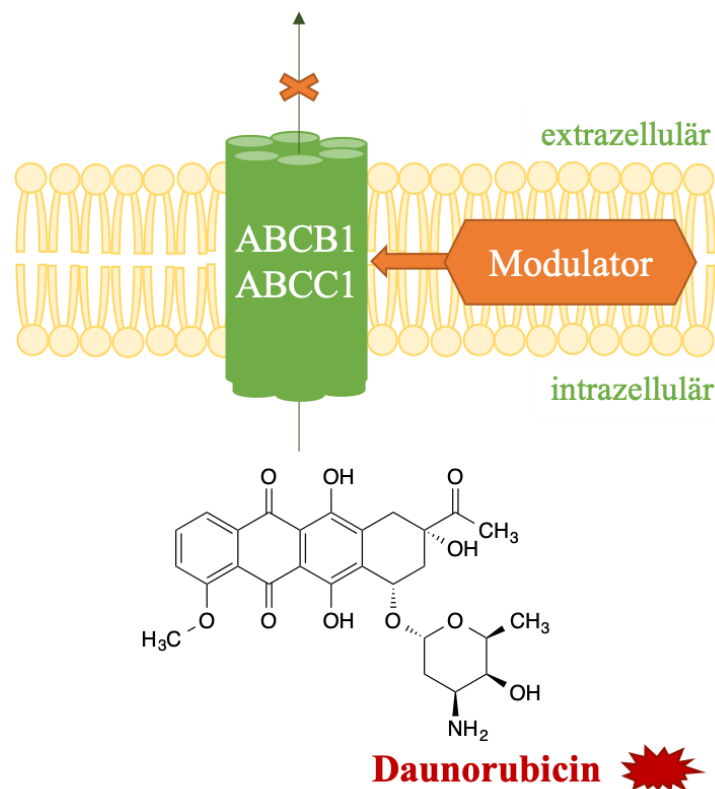
Unter Verwendung der Software Cell Quest Pro<sup>®</sup> 5.2.1 (BD Biosciences, San Jose, USA) können während und nach der Messung die ermittelten Werte in Form von Histogrammen oder Dotplots (Punktwolkendarstellungen) begutachtet werden. Zur Visualisierung von einzelnen Zellen werden Dotplots bevorzugt, da gleich zwei Parameter zur Charakterisierung der Zellen betrachtet werden können. Bei der Auftragung der Parameter FSC gegen SSC können lebende Einzelzellen selektiert und zur weiteren Auswertung herangezogen werden. Durch eine Eingrenzung auf die Hauptpopulation werden unerwünschte Zellagglomerate und tote Zellen ausgeschlossen. Bei der Analyse der einzelnen Proben kann so auch eine mögliche Toxizität der Substanzen auf die Zellen beobachtet und infolge die Ergebnisse kritischer beurteilt werden. Abschließende Auswertung der Fluoreszenzen erfolgt über Histogramme. Anhand der Häufigkeitsverteilung wird der zugehörige Mittelwert im jeweiligen Fluoreszenzkanal zu jeder Probe ermittelt.

Im Fall der MDCK Zelllinie, die abhängig von der Transfektion sowohl den Transporter ABCG2 als auch ABCC1 exprimieren kann, besteht eine weitere Möglichkeit der selektiven Auswertung. Die oben genannten ABC-Transporter werden mit dem GFP gemeinsam exprimiert und sind daher als solche erkennbar. Bei einer Auftragung FSC gegen FL1 in einem Dotplot können diejenigen Zellen ausgewählt werden, die durch das GFP bei einer Wellenlänge von 530 nm fluoreszieren. Durch setzen dieses „Gates“ wird die Region mit den resistenten Zellen ausgewählt und nur diese Population zur weiteren Auswertung genutzt.

### 3.4.2. Daunorubicin Akkumulationsassay

Das Zytostatikum Daunorubicin (DNR) ist ein natürliches Aminoglycosid und Antibiotikum aus der Gruppe der Anthrazykline und wird häufig in der Chemotherapie von akuten Leukämien und malignen Tumoren eingesetzt. Zur Charakterisierung der ABC-Transporter hat sich Daunorubicin als ein ubiquitäres Substrat herausgestellt, das sowohl durch ABCB1, als auch von ABCC1 und ABCG2 transportiert wird, wobei letzterer nur als Mutante den Transport ausführen kann.

Aufgrund der spektralen Eigenschaften kann Daunorubicin durch Einstrahlung von Licht der Wellenlänge 488 nm zur Fluoreszenz angeregt und mithilfe des Durchflusszytometers das emittierte Licht detektiert werden. Auf zellulärer Ebene erfolgt die passive Diffusion von Daunorubicin durch die Membran in ungeladener Form und wird durch die schwache Basizität erleichtert. In resistenten Tumorzellen wird es durch die Transporter wieder aktiv aus der Zelle transportiert. In Anwesenheit eines Modulators unterschiedlicher Konzentration wird der Transport beeinflusst, sodass Differenzen der Fluoreszenzintensität zu Modulator freiem Medium messbar sind. Diese werden auf Dosis-Wirkungskurven übertragen und dienen zur Identifizierung und Charakterisierung von Modulatoren.



**Abbildung 3.3:** Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des Daunorubicin Assays.

### 3.4.2.1. Durchführung

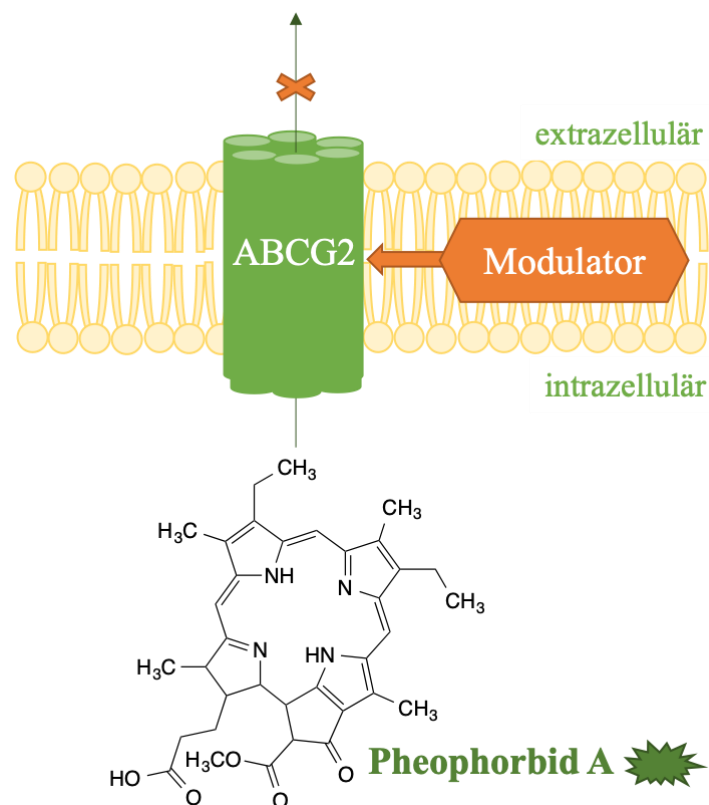
Im Gegensatz zu den anderen Assays wurde aufgrund der langen Inkubationszeit der Zellen mit Daunorubicin bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes die Verdünnungen der Testsubstanzen als auch die Zellsuspension nicht in KHP, sondern in farblosem Medium (ohne Phenolrot) hergestellt. Von den zehnfachkonzentrierten Verdünnungen wurden 20 µl in die dafür vorgesehenen Wells der 96er Mikrotiterplatte pipettiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie in Kapitel 3.3.1. beschrieben und die Zellsuspension wurde nach Ermittlung der gewünschten Zellzahl (6 Mio. pro Platte) mittels CASY®1 Modell TT in ein 50 ml Falcon überführt. Dieses wurde mit farblosem Medium auf 18 ml aufgefüllt und homogenisiert. Mit Hilfe einer Ausplattierschale und einer Transferpipette wurden 160 µl der Zellsuspension in jedes Well der 96er Mikrotiterplatte gegeben. Nach einer kurzen Inkubation von 15 min wurde die Daunorubicin-Lösung hinzupipettiert. Dafür wurden 3 ml einer 30 µmol/l Lösung frisch hergestellt. Die Endkonzentration der Daunorubicin-Lösung in der Platte betrug anschließend 3 µmol/l. Vor Licht geschützt folgte eine Inkubation über 3 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Im Anschluss mussten die Zellen in den Wells resuspendiert werden, da sich die Zellen nach solch einer langen Inkubationsphase am Boden anheften und die Messung unmöglich machen. Aus diesem Grund wurde mithilfe einer elektrischen Transferpipette und ihrer möglichen Einstellung Pip&Mix die Zellen durch auf- und abpipettieren vom Boden gelöst und homogenisiert. Bei der Messung wurde die intrazelluläre Fluoreszenz der Zellen bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm am Durchflusszytometer ermittelt. Die Fluoreszenz konnte sowohl aus dem FL2 als auch aus dem in dieser Arbeit bevorzugten FL3-Kanal ausgewertet werden.

### 3.4.3. Pheophorbid A Akkumulationsassay

Der Fluoreszenzfarbstoff Pheophorbid A (Pheo A) gehört chemisch zur Gruppe der Porphyrine und stellt ein Zwischenprodukt im Chlorophyll-Abbau der Pflanzen dar. Die Struktur des Porphyrinderivats setzt sich aus vier Pyrrol-Ringen zusammen, die durch vier Methingruppen zyklisch miteinander verknüpft sind. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* haben mehrere Studien gezeigt, dass Pheophorbid A sich als selektives Substrat des ABC-

Transporters ABCG2 erwies. ABCB1 und ABCC1 sind nicht in der Lage diese Substanz zu transportieren.

Die fluoreszierenden Eigenschaften (Exzitationsmaximum 395 nm, Emissionsmaximum 670 nm) von Pheophorbid A lassen sich insbesondere in durchflusszytometrischen Untersuchungen hervorragend nutzen. Die Charakterisierung des Transportproteins ABCG2 mit Pheophorbid A erfolgt wie in Abbildung 3.4 dargestellt. Das Substrat diffundiert durch die Zellmembran und reichert sich in der Zelle an. In Zellen, die eine erhöhte Expression von ABCG2 aufweisen, wird der Farbstoff aktiv aus dieser heraus transportiert, sodass die intrazelluläre Konzentration des Farbstoffs abnimmt. Wird ein Inhibitor eingesetzt, wird Transport konzentrationsabhängig gehemmt. Infolgedessen stellt sich nach einer gewissen Inkubationszeit ein Gleichgewicht zwischen Ein- und Ausstrom ein, das abhängig von der Modulatorkonzentration für einen Fluoreszenzanstieg in der Zelle sorgt. Die intrazelluläre Fluoreszenz im Steady-State kann mittels Durchflusszytometrie am FACS<sup>®</sup>-Calibur ermittelt werden.



**Abbildung 3.4:** Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des Pheophorbid A Assays.

### **3.4.3.1. Durchführung**

Die Durchführung des Pheophorbid A Akkumulationsassays erfolgte auf einer klaren 96er Mikrotiterplatte wie in der Literatur beschrieben [167,187,188]. Zunächst einmal wurde eine zehnfachkonzentrierte Verdünnungsreihe der zu testenden Modulatoren und des Standards in KHP erstellt und jeweils 20 µl der Lösungen in die vorgesehenen Wells pipettiert.

Für den Versuch wurden je Mikrotiterplatte 4,5 Mio. Zellen benötigt, die wie in Kapitel 3.3.1. bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert und abgelöst wurden. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet in 5 ml frischem Medium resuspendiert und 20 µl der Zellsuspension für die Zellzahlermittlung entnommen. Das errechnete Volumen, das für den Versuch notwendig war, wurde in ein Eppendorf-Cap überführt und zentrifugiert. Es folgte dreimaliges Waschen des Zellpellets, indem sich einer Resuspension der Zellen in 1 ml frischen KHP eine Zentrifugation (short spin, bis ca.  $7840 \times g$ ) anschloss. In einem 50 ml Falcon wurden 17 ml KHP vorgelegt und die Zellsuspension hinzugefügt. Als nächstes wurden die 18 ml der homogenisierten Zellsuspension in eine Ausplattierschale überführt und mit einer Transferpipette 160 µl in jedes Well der 96er Mikrotiterplatte pipettiert. Es folgte eine Präinkubationsphase von 20 min bei 37 °C. In der Zwischenzeit wurde die Pheophorbid A-Lösung vorbereitet, indem 15 µl einer 1 mmol/l Stammlösung mit 2985 µl KHP verdünnt wurden. Anschließend wurden jeweils 20 µl der hergestellten Lösung in jedes Well pipettiert, sodass die Endkonzentration 0,5 µmol/l betrug. Da das Pheophorbid A ein lichtempfindliches Substrat ist, wurde die Mikrotiterplatte in Aluminiumfolie gewickelt und bis zum Erreichen des Steady-States für 2 Stunden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gelagert. Vor der Messung mussten die Zellen homogenisiert werden. Hierfür wurde die Pip&Mix-Funktion der Transferpipette genutzt. Anschließend erfolgte die Messung der Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm im Kanal FL3 (> 670 nm) am FACS® Calibur.

### 3.5. Weitere kolorimetrische Methoden

#### 3.5.1. Calcein AM Akkumulationsassay

Calcein ist ein Fluorescein-Derivat und wird im Assay als die veresterte Form Calcein AM (Cal AM, Acetoxymethylester) eingesetzt. Die nicht planare aromatische Verbindung findet insbesondere aufgrund seiner vielen Carboxylatgruppen Verwendung in der Komplexometrie und der Zellbiologie. Bei der Untersuchung von Resistenzen von Zellen, begründet auf der Expression der ABC-Transporter, ABCB1 und ABCC1, wurde Calcein AM als ein Substrat dieser entdeckt.

Die nicht fluoreszierende Vorstufe Calcein AM kann aufgrund der lipophilen Eigenschaften leicht durch die Zellmembran diffundieren. Durch intrazelluläre unspezifische Esterasen werden die Ester enzymatisch gespalten und das fluoreszierende Calcein freigesetzt. Aufgrund der deprotonierten Carboxylgruppen und der daraus resultierenden Hydrophilie kann das Molekül die Zellmembran nicht mehr überwinden und akkumuliert in der Zelle. Die grüne Fluoreszenz des Calcein-Anions entsteht durch die Anregung bei einer Wellenlänge von 494 nm und wird bei der Wellenlänge 517 nm emittiert. Das Calcein-Anion wird von ABCB1 nicht als Substrat erkannt, während es durch ABCC1 transportiert werden kann. Dabei stellt es jedoch ein viel schlechteres Substrat als das Calcein AM dar, mit einer deutlich geringen Affinität zum Transporter (ca. 5000fach). Ist eine Zelle durch Expression von ABCB1 oder ABCC1 gekennzeichnet, wird Calcein AM als Substrat erkannt und aktiv aus der Zelle heraustransportiert. Die Umwandlung von Calcein AM zu seinem Anion findet dabei in einem deutlich geringeren Maße statt. Ein Inhibitor kann die Aktivität des Transporters hemmen und so einen Fluoreszenzanstieg in der Zelle vermitteln. Die Intensität der Fluoreszenz korreliert dabei mit der Konzentration des Modulators. Die Umwandlung ist dabei an wichtige Faktoren geknüpft, zum einen an die Geschwindigkeit der passiven Diffusion von Calcein AM sowie den aktiven Export durch das Transportprotein und zum anderen an die Esterhydrolyse zum Calcein. Die Geschwindigkeit der Hydrolyse und der damit in Zusammenhang stehende intrazelluläre Anstieg der Fluoreszenz wird am besten durch die Michaelis-Menten Kinetik beschrieben und folgt einer Kinetik erster Ordnung. Der lineare Anstieg zu Beginn und die daraus resultierende Steigung ist proportional zur Zunahme der intrazellulären Konzentration des

Calceins. Liegt ein Modulator vor, so steigt die intrazelluläre Fluoreszenz konzentrationsabhängig an.

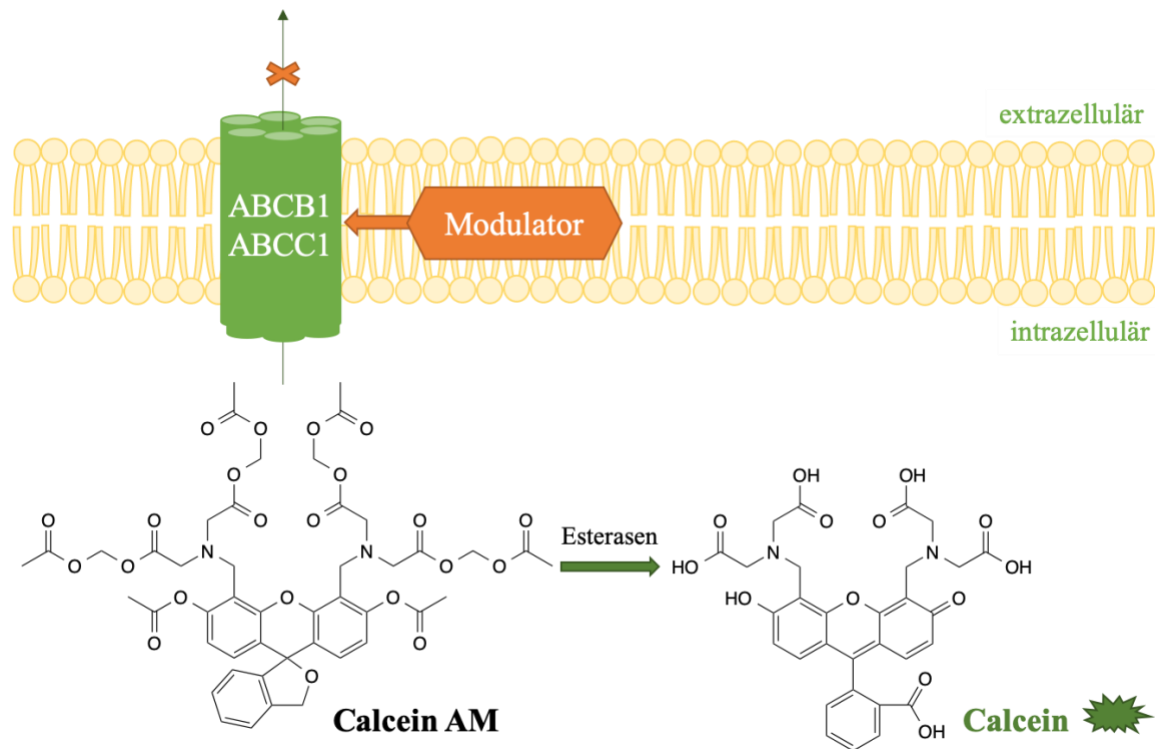


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des Calcein AM Assays.

### 3.5.1.1. Durchführung

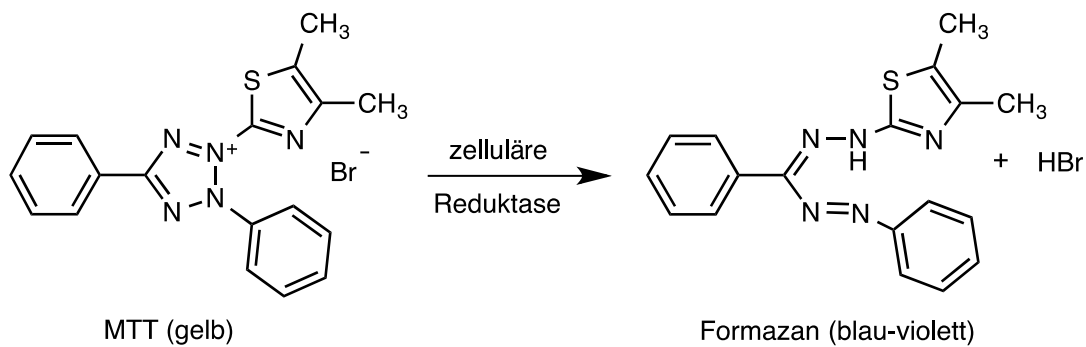
Für den Versuch wurde zunächst eine zehnfachkonzentrierte Verdünnungsreihe der Testsubstanzen sowie des geeigneten Standards in KHP hergestellt. 20 µl der jeweiligen Substanz wurden in die vorgesehenen Wells einer 96er Mikrotiterplatte mit flachem Boden pipettiert. Im nächsten Schritt folgte die Zellkultur, mit Absaugen des Mediums, die Waschschrte mit PBS und die Trypsinierung mit einem Trypsin/EDTA-Gemisch für den Ablösevorgang der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche. Nach dem Überführen in ein 50 ml Falcon und der Zentrifugation der Zellsuspension wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und gezählt. Abhängig von der Zelllinie wurde die für den Assay gewünschte Zellzahl entnommen und das Zellpellet in drei Waschschrten mit 1 ml KHP von Verunreinigungen und Resten des Nährmediums befreit. In einem 50 ml Falcon wurden 17 ml KHP vorgelegt und mit 1 ml der vorbereiteten Zellsuspension homogenisiert. Mit einer Multikanalpipette wurden 160 µl dieser Zellsuspension in jedes Well pipettiert



und die 96er Mikrotiterplatte für 20 min bei 37 °C in den Inkubator gestellt. Währenddessen wurde die Calcein AM Lösung vorbereitet, indem 10 µl einer 1 mmol/l Stammlösung Calcein AM mit 3190 µl KHP auf eine Konzentration von 3,125 µmol/l verdünnt wurden. Nach dem Ende der Inkubationsphase wurden mithilfe der Multikanalpipette 20 µl der hergestellten Calcein AM Lösung in jedes Well pipettiert (Endkonzentration 0,3125 µmol/l). Anschließend wurde die Platte zügig in einen auf 37 °C temperierten Microplate Reader gestellt und die intrazelluläre Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{ex.}} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 520 \text{ nm}$ ) über einen Zeitraum von 60 Minuten in Abständen von einer Minute gemessen. Die ermittelten Fluoreszenzwerte wurden anschließend mit GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.0 bearbeitet. Hierfür wurden die Werte gegen die zugehörige Zeit aufgetragen und mithilfe der linearen Regression die Steigung im linearen Abschnitt der Fluoreszenz-Zeit-Kurve ermittelt. Die berechneten Steigungen konnten wiederum gegen die logarithmischen Konzentrationen der zugehörigen Modulatoren aufgetragen werden. Daraus wurden Konzentrations-Effektkurven generiert, die einen charakteristischen Wert, den IC<sub>50</sub> (halbmaximale inhibitorische Konzentration), zur Beschreibung der Wirkstärke lieferten.

### 3.5.2. MTT-basierter Vitalitäts-Assay

Der MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid)-basierte Vitalitäts-Assay wurde angewandt um die Zellvitalität unter bestimmten Bedingungen zu evaluieren. Aufgrund von Toxizität von Arzneistoffen, insbesondere im Hinblick auf Zytostatika, ist es unabdingbar die Zelltoxizität in verschiedenen Zelllinien zu untersuchen. In diesem *in vitro* ablaufenden Versuch wird das gelbe, wasserlösliche Tetrazoliumsalz von lebenden Zellen zu schwerlöslichem Formazan umgewandelt, das sich durch seine blauviolette Farbe erkenntlich macht. Bei der Reaktion handelt es sich um eine Reduktion, die mithilfe von mitochondrialen Dehydrogenasen abläuft. Das wasserunlösliche Formazan bildet Kristalle, die unter einem Mikroskop sichtbar sind. Nach Auflösung in DMSO und Messung der Absorption korreliert die Intensität der Farbe mit der Vitalität der Zellen. Die Anwendung des MTT-basierten Vitalitäts-Assays war zum einen wichtig um die Toxizität der Modulatoren in verwendeten Zelllinien zu untersuchen. Zum anderen aber auch um die Fähigkeit eines Modulators zu evaluieren, die resistenten Zellen in Anwesenheit eines bekannten Zytostatikums zu sensitivieren.



**Abbildung 3.6:** Reaktionsschema des MTT-basierten Vitalitäts-Assays. Die Reduktion des gelben, wasserlöslichen MTTs in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan.

### 3.5.2.1. Durchführung

Die Arbeiten an Tag eins des MTT-basierten Vitalitäts-Assays erfolgten ausschließlich unter aseptischen Bedingungen an einer Werkbank mit laminarem Luftstrom. Auf diese Weise wurde die Kontamination mit Keimen und Staub vermieden, sodass die Zellen während der Inkubationszeit von 72 Stunden nicht durch äußere Einflüsse belastet wurde. Alle Verdünnungen der zu testenden Substanzen wurden im Nährmedium und in einer zehnfachen Konzentration hergestellt. In jedes Well der einzeln verpackten, sterilen Mikrotiterplatten wurden 20  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Verdünnung einer Substanz vorgelegt. Außerdem wurden bestimmte Wells mit DMSO als Negativkontrolle bzw. Absterbekontrolle und mit purem Nährmedium als Positivkontrolle bzw. Wachstumskontrolle versehen. Die Zellkultur erfolgte wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben und wurde sowohl für die sensitive als auch die resistente Zelllinie durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Wachstumskinetik der verschiedenen Zelllinien und der nötigen Konfluenz der Wells von maximal 95 % nach 72 Stunden Inkubation wurde die zur Aussaat stehende Zellzahl angepasst. Für die Zelllinie MDCK wurden 3000 Zellen/Well, für A2780 8000 Zellen/Well und für H69 20000 Zellen/Well benötigt und auf die entsprechende Well- und Plattenanzahl hochgerechnet. Die Zellen wurden anschließend mit einer Multikanalpipette in einem Volumen von 180  $\mu\text{l}$  pro Well ausgesät.

Bei der Untersuchung des Sensitivierungsgrades in Anwesenheit eines Zytostatikums wurde abhängig von der Zelllinie die gleiche Zellzahl gewählt, jedoch in einem Volumen von 160  $\mu\text{l}$  Nährmedium/Well aufgenommen und verteilt. Daraufhin wurde die

zehnfachkonzentrierte Verdünnung des Zytostakums, im Fall von ABCC1 Daunorubicin und im Fall von ABCG2, der aktive Metabolit von Irinotecan, SN-38, hergestellt und 20 µl in die Platte pipettiert.

Zuerst wurden die Zwischenräume der Wells und anschließend der Rand der Platte mit PBS befüllt, um einer Verdunstung des Mediums und damit einer eventuellen Verfälschung der Ergebnisse entgegenzuwirken. Die Inkubation der Platten erfolgte unter regulären Zellkulturbedingungen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

Am dritten Tag wurde eine Stunde vor dem Ende der Inkubationszeit die MTT-Lösung hergestellt. Hierfür wurde das MTT in einer Konzentration von 5 mg/ml in PBS im Ultraschallbad gelöst und 40 µl dieser Lösung in jedes Well pipettiert. Nach einer weiteren Stunde Inkubation wurde die Platte aus dem Inkubator genommen und das gesamte Medium der Wells durch Ausklopfen geleert. Durch Zugabe von 100 µl DMSO pro Well wurde das schwerlösliche Formazan gelöst und die Absorption bei 570 nm in einem Multiskan EX (Thermo Scientific) vermessen. Zusätzlich wurde bei 690 nm die Hintergrundabsorption ermittelt und von den Absorptionen des Farbstoffes abgezogen.

Die Ermittlung der GI<sub>50</sub>-Werte erfolgte durch Auftragung der korrigierten Absorptionen gegen den dekadischen Logarithmus der Modulatorkonzentration und durch Generierung von sigmoidalen Konzentrations-Effektcurven unter Verwendung von GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.0.

### **3.6. Molekularbiologische Methoden**

#### **3.6.1. Infektion von Insektenzellen mit dem Baculovirus**

Für eine erfolgreiche Infektion der Zellen, sowie eine Expression und anschließende Isolierung des humanen ABC-Transporters ABCG2 wird in der Literatur insbesondere die Insektenzelllinie Sf9 bevorzugt [189-191] (Kapitel 3.2.6). Diese ist ein geeigneter Wirt für die Expression von rekombinanten Proteinen aus dem Baculovirus Expressionssystem. Der rekombinante Baculovirus ist ein *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) und enthält die cDNA des humanen ABCG2 Gens (G482 Variante). AcNPV ist ein isolierter Virus der Familie der Baculoviridae und in der Lage die Genexpression des

Wirtes herunter- und gleichzeitig die Produktion der rekombinanten mRNA sowie des Proteins hochzufahren. Dabei enthält die resultierende Membranpräparation über 2-4 % der Gesamtproteinmenge das ABCG2 Protein. Der dabei verwendete Vektor pAcUW21-L/ABCG2 wurde freundlicherweise von Dr. Csilla Özvegy-Laczka vom Institut für Hämatologie und Immunologie der Universität Budapest (Ungarn) zur Verfügung gestellt. Für die Erzeugung des Baculovirus' wurde das BaculoGold Transfection Kit (PharMingen) verwendet.

### **3.6.1.1. Durchführung der Infektion**

Bei der Infektion mit dem Baculovirus wurden die Insektenzellen adhärent kultiviert, um eine hohe Produktion des Proteins zu gewährleisten. Von der Suspensionskultur wurden 30 Mio. Zellen gezählt und in eine große Kulturflasche transferiert. In der Zeit von 10-15 min konnten sich die Insektenzellen an den Flaschenboden anheften. Anschließend wurde das Medium bis auf 5 ml entfernt und 3 ml des rekombinanten Virus' hinzugefügt. Nun erfolgte mit der konzentrierten Viruslösung eine Vorinkubation der Sf9-Zellen für eine Stunde im Inkubator bei 27 °C. Danach wurden jeder Flasche 15 ml Nährmedium zugesetzt und nun für 3 Tage bei 27 °C ohne CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert.

Unter dem Mikroskop konnte das Fortschreiten der Infektion beobachtet werden. Die Zellen schwellen an und lösen sich vom Boden. Der Inhalt der Flasche wurde in ein 50 ml Falcon überführt und für 4 min bei 266 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand abschließend verworfen und das Zellpellet bis zur Herstellung der Membranpräparation bei -80 °C gelagert.

### **3.6.2. Virusamplifikation**

Die Vervielfältigung der Virusstammlösung wurde in einem Zeitraum von sieben bis zehn Tagen durchgeführt. Hierfür wurden 15 Mio. Sf9 Zellen in einer 175 cm<sup>2</sup> Flasche in 20 ml Nährmedium ausgesät und 500 µl Virusstammlösung hinzugegeben. Nach der Vervielfältigung über einen vorgegebenen Zeitraum von 7 bis 10 Tagen im Inkubator bei

27 °C ohne CO<sub>2</sub>-Begasung wurde der Überstand, der dann den Virus enthält, gesammelt und bei 4 °C gelagert.

### 3.6.3. Herstellung einer Membranpräparation

ABC-Transporter sind membranständige Proteine, die Substrate aktiv über die Zellmembran transportieren. In isolierten Zellmembranen kann die Funktion der Transporter näher untersucht werden. Die Komplexität der Zelle an sich tritt dabei in den Hintergrund, sowie ihre möglichen Störfaktoren. Die Herstellung einer Membranpräparation dient somit zur Abtrennung von anderen Zellbestandteilen und der anschließenden Gewinnung der Membran. Die groben Schritte einer Membranpräparation umfassen eine mechanische Zerstörung der Zelle und die darauffolgende differentielle Zentrifugation der Zellbestandteile.

Eine Membranpräparation kann von unterschiedlichen Zellen erstellt werden, sodass die Methoden abhängig vom Zelltyp geringfügig abweichend angepasst werden. In dieser Arbeit erfolgte die Herstellung einer Membranpräparation zum einen direkt aus den vorliegenden ABC-Transporter exprimierenden Krebszellen, zum anderen aber auch aus Insektenzellen, die jedoch eine vorausgehende Infektion und Transfektion mit dem jeweiligen Transporter einschließen.

Besondere Behandlung erhalten die Insektenzellen Sf9 aufgrund ihres geringen Cholesterolanteils in der Membran im Vergleich zu den Mammalia-Zellen [191]. *Telbisz et al.* haben nämlich gezeigt, dass Cholesterol in den Membranen von Zellen die Aktivität des ABC-Transporters ABCG2 reguliert [190,193,194]. Somit hat ein Zusatz von Cholesterol zu den isolierten Membranen der Sf9 Zellen den Vorteil, dass die stimulierte ATPase Aktivität durch Substrate, sowie die Umsatzmenge des Transporters gesteigert wird. Der beobachtete Effekt bezieht sich auf die Aktivität des ABCG2-Transporters und ist in diesem Zusammenhang signifikant selektiv und reversibel. Das bedeutet, dass ein Abbau des Cholesterols wiederum zur Reduzierung der Transporteraktivität führt.

### **3.6.3.1. Durchführung mit Insektenzellen**

Nach erfolgreicher Infektion und Transfektion wurden die Sf9 Insektenzellen vom Flaschenboden gelöst und für 5 min bei  $266 \times g$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Alle darauffolgenden Arbeitsschritte sind auf Eis durchgeführt worden. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 5 ml frisch hergestelltem Waschpuffer-P resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen zum zweiten Mal gewaschen und zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde PMSF zum TME-Puffer gegeben und die im Verlauf genutzten Röhrchen und Gläser mit diesem Puffer gespült. Die Zellen wurden in 4 ml frisch hergestelltem TMEP-Puffer resuspendiert und anschließend gepottert. Dafür wurden die Zellen in einen vorgekühlten 7 ml Dounce Hand-Homogenisator überführt und mechanisch durch Scherkräfte zerstört. Bei der Verwendung solch eines Homogenisators bleiben die Zellorganellen erhalten. Somit kann keine genomische DNA aus den Zellkernen in die Membransuspension gelangen, was zur Erhöhung der Viskosität führen kann. Der Aufschluss erfolgte durch wiederholte Hübe für eine Zeit von 10 min. Dabei ist es wichtig möglichst wenige Luft einschließen zu verursachen und somit den Kolben nur innerhalb der Zellsuspension im Zylinder zu bewegen. Die zerstörten Zellen wurden nun in ein 50 ml Falcon überführt und bei  $266 \times g$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde diesmal in gekühlte Ultrazentrifugengläser überführt und das Zellpellet in 4 ml TMEP-Puffer resuspendiert und erneut für 10 min gepottert. Der Überstand in den Ultrazentrifugengläsern wurde als nächstes für eine halbe Stunde mit einem Cholesterol-Cyclodextrin-Komplex (Cyclolab, Budapest) mit einer Konzentration von 2,5 mg/ml beladen. Anschließend erfolgte nach dem Austarieren eine Ultrazentrifugation für 60 min mit  $200.000 \times g$  bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  (Rotor: Type 70 Ti). Die gewonnene Membranfraktion wurde in 2 ml des TMEP-Puffers resuspendiert und für einige Minuten für eine gleichmäßige Suspension gepottert, abschließend aliquotiert und bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren.

**Tabelle 3.2:** Pufferlösungen für die Membranpräparation mit Insektenzellen. Der pH-Wert von 7,0 wurde mit 1 mol/l Salzsäure eingestellt.

<b>Waschpuffer</b>			pH 7,0
54,81 g	D-Mannitol		300 mmol/l
6,055 g	Tris		50 mmol/l
ad 1000 ml			MilliQ Wasser
<b>Waschpuffer-P</b>			
50 ml	Waschpuffer		
25 µl	PMSF		100 mg/ml
<b>TME-Puffer</b>			pH 7,0
6,055 g	Tris		50 mmol/l
9,135 g	D-Mannitol		50 mmol/l
20 ml	EGTA-Tris		2 mmol/l
ad 1000 ml			MilliQ Wasser
<b>TMEP-Puffer</b>			
50 ml	TME-Puffer		
200 µl	Aprotinin		2 mg/ml
50 µl	Leupeptin		10 mg/ml
1 ml	DTT		0,1 mol/l
25 µl	PMSF		100 mg/ml

### 3.6.3.2. Durchführung mit Krebszellen

Im Gegensatz zur gewohnten Kultivierung wurden die Krebszellen nicht in T-Flaschen, sondern in Kulturschalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80-90 % wachsen gelassen. Diese hatten den Vorteil, dass das anschließende Abschaben der Zellen vom Boden unkompliziert war und keine Rückstände vom Zellrasen verloren gingen. Hierfür wurden pro Schale 2,4 ml Homogenisationsspuffer hinzugegeben und die Zellen abgekratzt. Nach Überführung der Zellsuspension in ein 50 ml Falcon wurde diese auf Eis gelagert. Dieser Prozess wurde erneut durchgeführt um den gesamten Zellrasen aufzufangen. Die Zellsuspension wurde daraufhin im Falcon zweimal an einem Polytron® Dispergierer (Kinematica) zerkleinert (langsames Hochfahren, 12 Sekunden halten und langsames

Herunterfahren). Die Reinigung des Polytrons erfolgte dreimal mit 70 %igen Isopropanol und 3-mal mit destilliertem Wasser. Die zerkleinerte Zellsuspension wurde hiernach in ein Ultrazentrifugenglas überführt und mit dem bereits verwendeten Homogenisationsspuffer austariert. Die Zentrifuge wurde mit dem JA 25,50 Rotor ausgestattet und auf  $40.000 \times g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingestellt. Nach 10-minütiger Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet im Aufbewahrungspuffer resuspendiert und erneut bei gleichen Parametern zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch ein weiteres Mal wiederholt. Zum Schluss wurde die fertige Zellsuspension in Caps aliquotiert und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur Verwendung eingefroren.

**Tabelle 3.3:** Pufferlösungen für die Membranpräparation mit Krebszellen. Der pH-Wert von 7,0 wurde mit 0,1 N Natronlauge eingestellt.

<b>HEPES-Stammlösung</b>		pH 7,0
17,353 g	HEPES Na-Salz	200 mmol/l
31,773 g	HEPES freie Säure	50 mmol/l
ad 1000 ml	MilliQ Wasser	
<b>Homogenisationspuffer</b>		
50,0 ml	HEPES-Stammlösung	200 mmol/l
50,0 ml	Na <sub>2</sub> -EDTA	100 mmol/l
ad 400,0 ml	MilliQ Wasser	
<b>Aufbewahrungspuffer</b>		
50,0 ml	HEPES-Stammlösung	200 mmol/l
0,5 ml	Na <sub>2</sub> -EDTA	100 mmol/l
ad 500,0 ml	MilliQ Wasser	

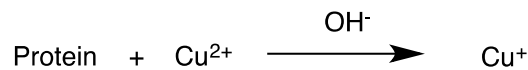
#### 3.6.4. Proteinbestimmung mittels BCA-Assay

Die quantitative Bestimmung von Proteinen ( $20\text{-}2000\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) einer Membranpräparation wurde kolorimetrisch mittels BCA-Assay durchgeführt. Die Methode beruht auf zwei Reaktionen. Zum einen die temperaturabhängige Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{+}$  durch die Peptidbindungen des Proteins in einem alkalischen Milieu (Biuretreaktion) (Abbildung 3.7). Die umgesetzte Menge an  $\text{Cu}^{2+}$  ist dementsprechend proportional zur Menge an

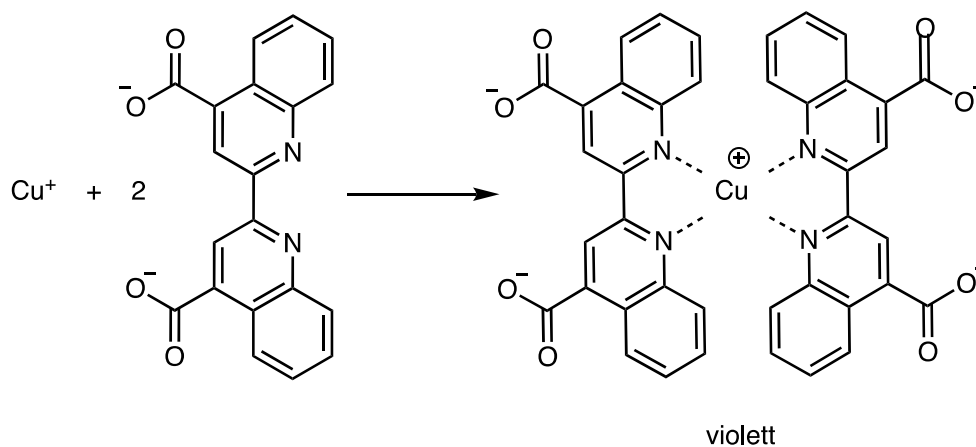


Protein in der Lösung. Im nächsten Schritt reagiert jedes  $\text{Cu}^+$ -Ion mit zwei Molekülen der Bicinchoninsäure zu einem violettgefärbten Chelatkomplex, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch ausgewertet werden kann (Abbildung 3.7). Die Bildung des wasserlöslichen Komplexes wird indirekt durch Anwesenheit von Aminosäuren wie Cystein, Cystin, Tyrosin und Tryptophan in Proteinen beeinflusst. Insbesondere bei höheren Temperaturen (bis 60 °C) verhelfen diese Peptidbindungen die Empfindlichkeit des Assays zu steigern. Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgt mit dem Einsatz einer Standardsubstanz, hier BSA (Bovines Serumalbumin), mit der eine Kalibriergerade erstellt wird und die Werte des unbekanntes Proteins abgelesen werden können.

Reaktion 1:



Reaktion 2:



**Abbildung 3.7:** Reaktion zur BCA-Assay-basierten Proteinbestimmung. Reaktion 1: quantitative Reduktion der zweiwertigen Kupferionen zu einwertigen Kupferionen durch das Protein. Reaktion 2: Reaktion der entstandenen einwertigen Kupferionen mit der Bicinchoninsäure zu einem violetten Farbstoff, welcher bei 562 nm photometrisch erfasst werden kann.

### 3.6.4.1. Durchführung

Die Proteinbestimmung erfolgte auf einer 96er-Mikrotiterplatte mit flachem Boden und wurde mit Hilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) durchgeführt.

Die Standards S1-S6 der Kalibriergeraden mit einem Konzentrationsbereich von 50-400 µg/ml, sowie die Qualitätskontrollen Q1-Q3 (150-350 µg/ml) wurden mit 2 mg/ml BSA (bovines Serumalbumin) hergestellt und immer mitvermessen. Die Herstellung der Verdünnungen der Proben wurde so organisiert, dass eine Dreifachbestimmung auf einer Platte möglich war. 20 µl der zu vermessenden Probe wurde in jedes Well pipettiert. Anschließend wurde das Reagenz des Protein-Assay Kits angefertigt und die Berechnung des notwendigen Volumens mit folgender Formel berechnet:

$$3 * ((S1; S6) + (Q1; Q3) + X \text{ Proben}) * 200 \mu\text{l} \frac{\text{Reagenz}}{\text{Well}} = \mu\text{l Reagenz A} \quad \text{Gleichung 3.1}$$

Das herzustellende Reagenz ist eine alkalische Lösung mit einem pH-Wert von 11,25 und besteht aus zwei Komponenten. Das Reagenz A enthält unter anderem die für die abzulaufende Reaktion wichtige Bicinchoninsäure, wohingegen das Reagenz B das zu reduzierende Kupfer, als Kupfersulfat enthält. Das Verhältnis zwischen BCA-Reagenz A und BCA-Reagenz B liegt bei 50 Anteilen zu 1 Anteil (50:1, Reagenz A:B). Die beiden Reagenzien wurden gut durchmischt und je 200 µl in jedes Well pipettiert. Anschließend wurde die Platte in einem Trockenschrank bei 60 °C für 60 min gelagert. Nach der Inkubation wurde die Platte kurz bei Raumtemperatur abgekühlt und im Anschluss im Platten-Reader bei 570 nm vermessen. Die Ermittlung der Proteinkonzentration (mg/ml) erfolgte mithilfe der Kalibriergeraden und der Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor.

### **3.7. Bestimmung der ATPase Aktivität**

Die Bestimmung der ATPase Aktivität, die der Herstellung einer Membranpräparation vorausgeht, wird genutzt, um auf indirektem Wege die Stimulation oder Inhibition durch Substrate und Inhibitoren von ABC-Transportern zu untersuchen. Die Energie für den aktiven Efflux ist an die Hydrolyse von ATP gekoppelt, bei der anorganisches Phosphat (Pi) gebildet wird. Anschließend kann das Phosphat mit Ammoniummolybdat in saurem Milieu zu einem Heterokomplex umgesetzt werden, der wiederum mit verschiedenen Farbstoffen kolorimetrisch bestimmbare Komplexe bilden kann. Die gemessene Menge an Phosphat ist dabei proportional zur Aktivität des Transporters. Allerdings ist das entstandene anorganische Phosphat nicht zwangsläufig der Aktivität der ABC-Transporter

zuzuordnen, sodass ein Natriumorthovanadat-sensitiver ATPase Assay durchgeführt wurde. Natriumorthovanadat ist in der Lage ABC-Transporter zu inhibieren, sodass die nicht-sensitive ATPase Aktivität bestimmt und vom gemessenen Gesamteffekt abgezogen werden kann.

Die Empfindlichkeit des Versuchs wird insbesondere durch die Zugabe eines Farbstoffes zum Phosphomolybdat-Komplex bestimmt. In der Literatur werden unter anderem bei den Reaktionen zwischen dem Heterokomplex mit Ascorbinsäure, Malachitgrün, Chinaldin Rot und Kristallviolett sichtbare Unterschiede in der Empfindlichkeit beschrieben [195]. In dieser Arbeit wurden diese vier verschiedenen kolorimetrischen Methoden angewandt und beurteilt. Bei der Entscheidung unter anderem im Hinblick auf die praktische Umsetzung wurde jedoch nicht nur Wert auf die Empfindlichkeit, sondern auch auf Aspekte wie Farbstabilität und niedrige Eigenabsorptionswerte gelegt.

### **3.7.1. Herstellung der ATP-Stammlösung**

Adenosintriphosphat (ATP) ist das Triphosphat des Nucleosids Adenosin und ein wichtiger Energieträger für Prozesse in Zellen. Die Energie wird benötigt um chemische, osmotische oder mechanische Arbeit zu leisten. Bei der Arbeit mit einer Membranpräparation muss das ATP stets hinzugefügt werden, um die Funktion der ABC-Transporter untersuchen zu können. Die umgesetzte Menge von ATP zu ADP und anorganischem Phosphat gibt Aufschluss über die Leistung des Transporters in An- bzw. Abwesenheit von Modulatoren.

#### **3.7.1.1. Durchführung**

Alle Schritte bei der Herstellung der ATP-Stammlösung sind in der Kühlkammer (4 °C) durchgeführt worden; alle Reagenzien und Lösungen wurden am Vortag im Kühlschrank auf Temperatur gebracht. Die komplette Menge ATP aus dem gelieferten 5 g-Gebinde wurden in circa 10 ml MilliQ Wasser gelöst. Aufgrund der niedrigen Temperatur benötigt der Auflösungsprozess etwas länger. Nach Entstehung einer klaren Lösung musste der pH-Wert eingestellt werden. Hier ist es insbesondere wichtig darauf zu achten, nicht überzutitrieren, da das ATP spätestens ab einem pH-Wert von 7,5 zu hydrolysieren beginnt

und die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung verfälscht. So wurde der pH-Wert mit einer 10 mol/l Natriumhydroxid-Lösung eingestellt und über ein pH-Meter kontrolliert. Die pH-Elektrode sollte erst kurz vor der Messung in die Kühlkammer gebracht und frisch kalibriert werden, da die 3 molare Kaliumchlorid-Lösung, in der die Elektrode lagert, ausfällt, dadurch möglicherweise das Diaphragma der Elektrode verstopft und damit die Messung unmöglich macht. Nach erfolgreicher pH-Wert Einstellung wurde das Volumen in ein 50 ml Falcon überführt und auf Eis gestellt.

**Tabelle 3.4:** Herstellung der ATP-Stammlösung. Der pH-Wert von 7,5 wurde mit 10 mol/l NaOH-Lösung eingestellt.

ATP-Stammlösung	pH 7,5
5 g ATP	400 mmol/l
10 ml MilliQ Wasser	

Im nächsten Schritt wurde die Konzentration der ATP-Lösung photometrisch bestimmt. Hierfür war eine Verdünnung der Lösung notwendig, die bei 1:15 000 gewählt worden ist. So wurde zunächst eine 1:100 Verdünnung hergestellt, die wiederum anschließend erneut 1:150 verdünnt wird. Die Verdünnungsschritte fanden alle mit MilliQ Wasser statt und erfolgten in vierfacher Ausführung. Das MilliQ Wasser dient bei der Messung als Referenz und sollte dabei Raumtemperatur besitzen um ein Beschlagen der Quarzküvette zu vermeiden. Die Vermessung der Absorption fand bei 259 nm und mittels angeschalteter Deuteriumlampe statt. Aus den vier gemessenen Werten wurde ein Mittelwert gebildet und in die vom Lambert Beer'schen Gesetz abgeleitete Gleichung eingesetzt:

$$c \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right] = \frac{A}{\varepsilon \left[ \frac{\text{l}}{\text{mmol}} \right]} * 150 * 100 \quad \text{Gleichung 3.2}$$

c Konzentration

A Absorption

$\varepsilon$  molarer Extinktionskoeffizient (15,4 l/mmol für ATP)

Bei der Berechnung der Konzentration sollte diese hierbei keinen größeren Wert als 400 mmol/l ergeben, da sonst bei Rückrechnung die Einwaage des ATPs nicht mehr

übereinstimmen kann. Dadurch würde es zu einem hohen Messfehler kommen, der sich ebenfalls auf spätere Messungen auswirken kann. Wenn nötig, findet ein weiterer Verdünnungsschritt statt, mit einer erneuten Vermessung und Berechnung. Bei gewünschter Konzentration wird die ATP-Stammlösung zuletzt aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### **3.7.2. ATPase Assay**

Der ATPase Assay wurde durch eine Kollaboration mit dem Institut für Hämatologie und Immunologie der Universität Budapest (Ungarn) in Zusammenarbeit mit Dr. Csilla Özvegy-Laczka erlernt und anschließend intern etabliert.

#### **3.7.2.1. Durchführung**

Zur Vorbereitung wurden alle Stammlösungen für den ATPase Assay hergestellt und je nach Anforderung bei 4 °C oder -20 °C aufbewahrt. Die Durchführung des Versuchs erfolgte zunächst auf Eis. Die Pufferlösung wurde wie in Tabelle 3.5 angegeben hergestellt und 129 µl pro Röhrchen vorgelegt. Die Herstellung der gewünschten Verdünnung der zu testenden, in DMSO gelösten Modulatoren erfolgte 150-fach konzentriert. Um die Ergebnisse im Anschluss auswerten, zuordnen und beurteilen zu können, wurden fünf Referenzen mitgemessen. Zum einen mit Natriumorthovanadat um die Sensitivität des Assays sicherzustellen, zum anderen reines DMSO. Da DMSO laut Literatur einen aktivierenden Effekt auf die ATPase ausübt, musste dessen Gehalt auf 1 % begrenzt werden. Um bessere Vergleiche ziehen zu können, wurden desweiteren Röhrchen mit je einem bekannten Aktivator und Inhibitor vorbereitet. Um den Verlauf des Versuchs zu evaluieren, wurde ein weiteres Röhrchen mit 100 µl SDS (5 %) beschickt, sodass bei zu hohen Werten der Assay als nicht gültig bewertet und eine Fehleranalyse durchgeführt werden konnte. Im nächsten Schritt wurde die Membranpräparation mit der Pufferlösung so verdünnt, dass die Konzentration des Proteins 1 mg/ml (ABCG2) bzw. 2 mg/ml (ABCC1) betrug. Außerdem wurde eine 50 mmol/l MgATP-Lösung hergestellt, indem die ATP-Lösung mit der Pufferlösung verdünnt und gleiche Anteile Magnesiumchlorid-Lösung hinzugefügt wurden.

Die Konzentration der Magnesiumchlorid-Lösung wurde immer der Konzentration der ATP-Lösung angepasst, sodass bei größeren Versuchsansätzen das benötigte Volumen nur einmal berechnet werden musste.

**Tabelle 3.5:** Stammlösungen für den ATPase Assay. Der pH-Wert von 7,0 wurde mit 1,7 mol/l Tris eingestellt.

<b>Tris</b>		
20,587 g	Tris	1,7 mol/l
ad 100 ml	MilliQ Wasser	
<b>MOPS-Tris</b>		
		pH 7,0
2,09 g	MOPS	0,1 mol/l
ad 100 ml	MilliQ Wasser	
<b>EGTA-Tris</b>		
		pH 7,0
3,804 g	EGTA	0,1 mol/l
ad 100 ml	MilliQ Wasser	
<b>Kaliumchlorid</b>		
7,46 g	Kaliumchlorid	1 mol/l
ad 100 ml	MilliQ Wasser	
<b>Natriumazid</b>		
0,6501 g	Natriumazid	0,1 mol/l
ad 100 ml	MilliQ Wasser	
<b>DTT</b>		
0,3086 g	DTT	0,1 mol/l
ad 20 ml	MilliQ Wasser	
<b>Oubain</b>		
0,0073 g	Oubain	1 mmol/l
ad 1,0 ml	MilliQ Wasser	
<b>SDS-Lösung</b>		
1,0 g	Natriumdodecylsulfat	5,0 % (m/V)
20 ml	MilliQ Wasser	

Zu den mit Referenz-Substanzen sowie mit zu testenden Substanzen beschickte Röhrchen wurden nun 10  $\mu\text{g}$  einer 1 mg/ml bzw. 2 mg/ml Membranpräparation hinzugefügt und eine Vorinkubation von 5 min im Wasserbad bei 37  $^{\circ}\text{C}$  unter gleichm Bigem Schwenken durchgeführt. Da es sich um einen zeitabhängigen und sensiblen Reaktionsablauf handelt, wurden die Proben im 5 Sekunden-Takt bearbeitet. Nach Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  einer 50 mmol/l MgATP-Lösung wurde die Enzymreaktion in einem finalen Volumen von 150  $\mu\text{l}$  endgültig gestartet und 20 (ABCG2) bzw. 60 (ABCC1) Minuten bei 37  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Der Stopp der Reaktion erfolgte ebenfalls im 5 Sekunden-Takt unter Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  einer SDS-Lösung (5 %) und einem kurzen Vortexschritt. Zusätzlich zu den Proben wurde eine Kalibriergerade mit  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  im Bereich von 0-100 nmol Pi in einem Ansatz von 150  $\mu\text{l}$  hergestellt und ebenfalls mit 100  $\mu\text{l}$  einer 5 %-igen SDS-Lösung versetzt. Nun konnte die kolorimetrische Detektion bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

**Tabelle 3.6:** Pufferlösung für den ATPase Assay.

Assay Mix		
3750 $\mu\text{l}$	MOPS-Tris	40 mmol/l
50 $\mu\text{l}$	EGTA-Tris	0,5 mmol/l
500 $\mu\text{l}$	Kaliumchlorid	50 mmol/l
500 $\mu\text{l}$	Natriumazid	5 mmol/l
200 $\mu\text{l}$	DTT	2 mmol/l
1000 $\mu\text{l}$	Oubain	1 mmol/l
3750 $\mu\text{l}$	MilliQ Wasser	

### 3.7.2.2. Detektion mit Ascorbinsäure

Die Detektionsreagenzien wurden zunächst zeitunabhängig jedem Röhrchen hinzugegeben. Beginnend mit 300  $\mu\text{l}$  Pi-Reagenz und 750  $\mu\text{l}$  Essigsäure (20 %) erfolgte als letzter Schritt die Zugabe der frisch hergestellten Ascorbinsäure-Lösung (1 %) wieder in regelm Ben Zeitabständen von einer Minute. Somit wurde ein ausreichendes Messfenster gewährleistet. Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur bildete sich in den phosphathaltigen

Proben ein blauer Farbkomplex, dessen Absorption am UV-Photometer (Ultrospec 4000, Amersham Biosciences) bei einer Wellenlänge von 880 nm vermessen wurde.

**Tabelle 3.7:** Lösungen für die kolorimetrische Analyse des Phosphats mit Ascorbinsäure im ATPase Assay.

<b>Pi-Reagenz</b>		
35 ml	Schwefelsäure, konzentriert	2,5 mol/l
5 g	Ammoniummolybdat Tetrahydrat	1,0 % (m/V)
0,07 g	Kaliumantimonyltartrat	0,014 % (m/V)
ad 500 ml	MilliQ Wasser	
<b>Essigsäure</b>		
20 ml	Essigsäure, konzentriert	20,0 % (m/V)
ad 100 ml	MilliQ Wasser	
<b>Ascorbinsäure-Lösung</b>		
0,1 g	Ascorbinsäure	1,0 % (m/V)
ad 10 ml	MilliQ Wasser	

### 3.7.3. Datenanalyse

Die gemessenen Absorptionswerte der Kalibriergeraden wurden gegen die zugehörigen Phosphat-Konzentrationen aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt. Die aus dieser Gleichung hervorgehende Steigung wurde genutzt um die Phosphat-Konzentration aus den Absorptionswerten der getesteten Referenzen und Modulatoren zu berechnen. Da es sich um ein Natriumorthovanadat-sensitiven ATPase Assay handelt, wurde der für Natriumorthovanadat ermittelte Wert von allen anderen subtrahiert. Nun wurden die korrigierten Phosphatwerte in [nmol] noch auf die Inkubationszeit von 20 bzw. 60 min und die eingesetzte Proteinmenge 0,01 bzw. 0,02 mg bezogen, um die spezifische Aktivität in [nmol Pi/min/mg] zu erhalten. Anhand der basalen Aktivität (gemessen durch DMSO) sowie der aktivierten und inhibierten Effekte der jeweiligen Referenzen konnten die Proben beurteilt werden.



### 3.7.4. Übertragung auf 96er Mikrotiterplatten

Zwar wurde die Versuchsdurchführung des ATPase Assays in Röhren und dessen kolorimetrische Detektion mit Ascorbinsäure im Arbeitskreis erfolgreich etabliert, jedoch stellte sich dieser aufgrund der relativ aufwendigen Handhabung und der geringen Empfindlichkeit nicht als die beste Option dar. Nach Literaturrecherchen wurden drei weitere kolorimetrische Methoden ausgewählt und damit verbunden eine Übertragung von Röhren auf eine 96er Mikrotiterplatte evaluiert. Ausgehend von der relativen Sensitivität der Farbstoffe wurden, angefangen mit der höchsten, Malachitgrün, daraufhin Kristallviolett und zum Schluss Chinaldin Rot als kolorimetrische Detektionsmethoden untersucht.

Da das Volumen eines Wells einer 96er Mikrotiterplatte auf 300 µl beschränkt ist, musste das gesamte Reaktionsvolumen angepasst werden. Dieses wurde einfachheitshalber auf 240 µl finales Volumen gewählt, denn so war das Volumen groß genug um mit einer Multikanalpipette arbeiten zu können und gleichzeitig nicht zu groß um an den Rand der Wells heranzureichen.

#### 3.7.4.1. Detektion mit Malachitgrün

Das Volumen für die Inkubation mit der Membranpräparation, sowie den Substanzen und dem MgATP konnte bei der Bestimmung mit Malachitgrün vergleichbar mit Röhren bei 150 µl bleiben. Die Vorbereitung des Assays wurde ausschließlich auf Eis und die Herstellung aller Verdünnungen mithilfe der Pufferlösung durchgeführt. Mit einer Multikanalpipette wurden 129 µl Pufferlösung in die vorgesehenen Wells pipettiert, sowie 1 µl einer 150fach konzentrierten Verdünnung der gewünschten Substanz in DMSO. Auch hier war es wichtig eine Kalibriergerade im Bereich von 0-100 nmol Phosphat zu erstellen, sowie Referenzen (Aktivator und Inhibitor der ATPase), als auch eine Natriumorthovanadat- und DMSO-Kontrolle zur Bestimmung der Sensitivität und Basalaktivität zu verwenden. Nach Zugabe von 10 µl Membranpräparation und 10 µl einer MgATP-Lösung (50 mmol/l) wurde die Enzymreaktion gestartet. Die Platte inkubierte auf einem Schüttler bei 37 °C für 20 min (ABCG2) bzw. 60 min (ABCC1). Die Reaktion wurde beendet und die Bildung des zu detektierenden Farbkomplexes gestartet, indem 38,4 µl einer Malachitgrün-Lösung und 51,6 µl einer Ammoniummolybdat-Lösung in jedes Well

pipettiert wurden. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur verfärbten sich die phosphathaltigen Wells grün und die Wells mit der Kontrolle wurden gelb. Die Absorptionswerte der Farbkomplexe wurden mithilfe des Plattenphotometers Multiskan EX (Thermo Scientific) bei einer Wellenlänge von 620 nm vermessen.

**Tabelle 3.8:** Lösungen für die kolorimetrische Analyse des Phosphats mit Malachitgrün im ATPase Assay.

<b>Ammoniummolybdat-Lösung</b>			
3,46 g	Ammoniumheptamolybdat		28 mmol/l
11,7 ml	Schwefelsäure, konzentriert		2,1 mol/l
ad 100 ml	MilliQ Wasser		
<b>Malachitgrün-Lösung</b>			
357 mg	Polyvinylalkohol, PVA		0,35 % (m/V)
35,2 mg	Malachitgrün		0,76 mmol/l
ad 100 ml	MilliQ Wasser		

#### 3.7.4.2. Detektion mit Kristallviolett

Bei Kristallviolett lag das Inkubationsvolumen bei 50 µl, das finale Volumen dabei wie festgelegt bei 240 µl. Da der DMSO Gehalt nicht höher als 1% liegen durfte, wurde eine 5fach konzentrierte Verdünnungsreihe mit der Pufferlösung hergestellt. Das heißt, dass eine Substanz in einer 100fachen Konzentration der gewünschten Konzentration zunächst einmal in DMSO hergestellt wird. Danach mit der Pufferlösung 1:20 in einem Eppendorf Cap verdünnt wurde und davon 10 µl in ein Well pipettiert wurden. Die anschließende Verdünnung von 1:5 fand im Well statt. Weitere 20 µl Pufferlösung wurden in jedes Well außer in die Wells der Kalibriergeraden, pipettiert und 10 µl Membranpräparation hinzugefügt. Mit Zugabe von 10 µl MgATP mit einer finalen Konzentration von 3,3 mmol/l wurde die Enzymreaktion gestartet. Nach einer Inkubationsphase von 20 min (ABCG2) bzw. 60 min (ABCC1) auf einem Schüttler bei 37 °C wurde die Reaktion gestoppt und die Bildung des Farbkomplexes gestartet. Hierzu wurden in jedes Well 30 µl einer Polyvinylalkohol-Lösung (1 %), 60 µl einer Natriummolybdat-Lösung (0,1 mol/l), 40 µl einer Cristal Violet-Lösung (0,76 mmol/l) und anschließend 60 µl der Salpetersäure (1,96

mol/l) pipettiert. Dabei verfärbten sich die phosphathaltigen Proben violett und die Wells, die zur Kontrolle und zur Bestimmung der Hintergrundabsorption dienten, grün. Die Intensität der jeweiligen Farbe und die daraus resultierende Absorption wurde nach einer Inkubationszeit von 40 min am Plattenphotometer Multiskan EX (Thermo Scientific) vermessen und anschließend ausgewertet.

**Tabelle 3.9:** Lösungen für die kolorimetrische Analyse des Phosphats mit Kristallviolett im ATPase Assay.

<b>Polyvinylalkohol-Lösung</b>		
0,5 g	Polyvinylalkohol	1,0 % (m/V)
ad 50 ml	MilliQ Wasser	
<b>Natriummolybdat-Lösung</b>		
12,359 g	Natriummolybdat	0,1 mol/l
ad 100 ml	MilliQ Wasser	
<b>Kristallviolett-Lösung</b>		
31,0 mg	Kristallviolett	0,76 mmol/l
0,35 g	Polyvinylalkohol	1,25 mol/l
ad 100 ml	MilliQ Wasser	
<b>Salpetersäure</b>		
12,5 ml	Salpetersäure, konzentriert	1,96 mol/l
ad 100 ml	MilliQ Wasser	

### 3.7.4.3. Detektion mit Chinaldin Rot

Nach der Herstellung der Pufferlösung wurden die Verdünnungen der zu testenden Substanzen vorbereitet. Hierzu wurde zunächst eine 100-fache Verdünnung der gewünschten Konzentration in DMSO hergestellt und anschließend 1:25 mit der Pufferlösung verdünnt. Der letzte 1:4 Verdünnungsschritt erfolgte innerhalb der Mikrotiterplatte. Das bedeutet, dass 20 µl der Substanz in ein Well pipettiert wurden, das zum Schluss ein Gesamtkubationsvolumen von 80 µl beinhaltete. Weitere 40 µl der Pufferlösung wurden hinzupipettiert und im Folgenden 10 µl der Membranpräparation

mithilfe einer Multikanalpipette zugefügt. Die Enzymreaktion wurde gestartet, indem abschließend 10 µl einer 25 mmol/l MgATP-Lösung in jedes Well gegeben wurden.

**Tabelle 3.10:** Lösungen für die kolorimetrische Analyse des Phosphats mit Chinaldin Rot im ATPase Assay.

<b>Stopp-Reagenz</b>		
1,7 ml	Schwefelsäure, konzentriert	0,3 mol/l
ad 100 ml	MilliQ Wasser	
<b>Chinaldin Rot-Lösung</b>		
10 mg	Chinaldin Rot	0,1 mg/ml
0,14 g	Polyvinylalkohol	0,14 % (m/V)
ad 100 ml	MilliQ Wasser	
<b>Ammoniummolybdat-Lösung</b>		
0,865 g	Ammoniumheptamolybdat	7,0 mmol/l
6,95 ml	Schwefelsäure, konzentriert	1,25 mol/l
ad 100 ml	MilliQ Wasser	

Die Inkubation auf einem Schüttler bei 37 °C dauerte 20 min (ABCG2) bzw. 60 min (ABCC1) und wurde durch Zugabe von 16 µl Stopp-Reagenz beendet. Die Bildung des Farbkomplexes wurde gestartet, indem 96 µl der Chinaldin Rot-Lösung und 48 µl Ammoniummolybdat-Lösung jedem Well zugefügt wurden. Parallel zu den Substanzen wurde auf jeder Mikrotiterplatte auch die Kalibriergerade im Bereich von 0-100 nmol Phosphat aufgenommen. Die phosphathaltigen Proben verfärbten sich rot, wobei die Kontrolle, die nur Pufferlösung enthält, farblos blieb. Die Absorptionen wurden nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur bei einer Wellenlänge von 570 nm aufgenommen, anschließend ausgewertet und beurteilt.

## 3.8. Mathematische und statistische Methoden

### 3.8.1. Grundlagen der Enzymkinetik

Der Transport von Substraten gegen einen Konzentrationsgradienten erfordert Energie, die im Falle der ABC-Transporter auf der Bindung und Hydrolyse von ATP an den NBDs basiert. Die dabei ablaufende enzymatische Reaktion folgt der klassischen Michaelis-Menten-Kinetik, die den Zusammenhang zwischen der Substratkonzentration und der Reaktionsgeschwindigkeit beschreibt:

$$\frac{v}{v_{max}} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Gleichung 3.3}$$

[S]	Substratkonzentration
$v_{max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
$v$	Reaktionsgeschwindigkeit
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante

Dieser Ansatz erlaubt eine quantitative Beschreibung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit einer Enzymreaktion von der Konzentration des umzusetzenden Substrats sowie weiterer Parameter. Im Falle sehr hoher Substratkonzentrationen kann die Umsatzgeschwindigkeit nicht weiter gesteigert werden und es wird ein Wert  $v_{max}$  erreicht. Dieses Phänomen wird in der Enzymkinetik durch eine hyperbole Kurve beschrieben. Die Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v = \frac{1}{2} v_{max}$  erreicht wird, bezeichnet man als Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$ . Sie gibt Hinweise auf die Affinität des Substrates. Dabei entsprechen geringe Werte dieser Konstante für eine hohe Affinität.

#### 3.8.1.1. Charakterisierung von Modulatoren

Modulatoren sind in der Lage die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion entweder zu steigern oder aber herabzusetzen. Hierfür verändern sie die Eigenschaften der Enzyme,

in diesem Fall der ABC-Transportproteine. Dabei unterteilt man die Inhibitoren in: (i) kompetitive, (ii) nicht-kompetitive und (iii) unkompetitive Inhibitoren. Neben Inhibitoren lassen sich auch Aktivatoren durch enzymkinetische Modelle beschreiben. Auf den für diese Arbeit relevanten Fall der (iv) nicht-essentiellen Aktivierung wird ebenfalls eingegangen.

### Kompetitive Inhibition

Die kompetitive Inhibition ist durch die Konkurrenzreaktion zwischen Substrat und Inhibitor, zumeist aufgrund enger Strukturanalogie, charakterisiert. Es kann entweder nur ein Enzym-Inhibitor-Komplex oder ein Enzym-Substrat-Komplex gebildet werden, eine gleichzeitige Bindung ist ausgeschlossen. Unter Einbeziehung der Affinität des Inhibitors verändert sich die Gleichung 3.3 folgend:

$$\frac{v}{v_{max}} = \frac{[S]}{K_m * \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad \text{Gleichung 3.4}$$

[I] Inhibitorkonzentration

$K_i$  Affinitätskonstante des Inhibitors

Die relative Reaktionsgeschwindigkeit in Anwesenheit eines Inhibitors lässt sich mithilfe der Gleichungen 3.3 und 3.4 berechnen. Dabei stellt das Verhältnis der An- und Abwesenheit des Inhibitors die relative Reaktionsgeschwindigkeit dar.

$$a = \frac{K_m + [S]}{K_m * \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad \text{Gleichung 3.5}$$

$a$  relative Reaktionsgeschwindigkeit

Charakteristisch für die kompetitive Inhibition ist, dass das Enzym nur bei ausreichend hoher Inhibitorkonzentration gehemmt wird. Nimmt nämlich die Konzentration des Inhibitors ab und des Substrates zu, wird wieder letzteres wieder vom Enzym umgesetzt. Demnach gibt es keinen Einfluss auf die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{max}$ . Durch

die Inhibition wird nur die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  erhöht, da in Anwesenheit eines kompetitiven Inhibitors eine höhere Substratkonzentration notwendig ist, um die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen [196].

### Nicht-kompetitive Inhibition

Bei einer nicht-kompetitiven Inhibition hat weder der Inhibitor einen Einfluss auf die Bindung des Substrats noch das Substrat auf die des Inhibitors. Dies ist durch das Vorliegen unterschiedlicher Bindungsstellen möglich. Die Interaktion lässt sich durch folgende Gleichung beschreiben:

$$\frac{v}{v_{max}} = \frac{[S]}{K_m * \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S] * \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \text{Gleichung 3.6}$$

Zur Berechnung der relativen Reaktionsgeschwindigkeit wird die Gleichung 3.3 miteinbezogen:

$$a = \frac{K_m + [S]}{K_m + [S] * \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} = \frac{K_i}{K_i + [I]} \quad \text{Gleichung 3.7}$$

Aus Gleichung 3.7 geht hervor, dass die Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{max}$  herabgesetzt wird, jedoch die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  unverändert bleibt [196].

### Unkompetitive Inhibition

Der seltene Fall einer unkompetitiven Inhibition beschreibt die ausschließliche Bindung des Inhibitors an einen Enzym-Substrat-Komplex, nicht jedoch an das freie Enzym. Dieser Mechanismus liegt dann vor, wenn die Bindungsstelle für den Inhibitor erst bei Wechselwirkung des Substrats mit dem Enzym gebildet wird. Demzufolge findet auch hier keine Verdrängung des Inhibitors durch das Substrat statt. Folgende Gleichung beschreibt die unkompetitive Inhibition:

$$\frac{v}{v_{max}} = \frac{[S]}{K_m + [S] * \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \text{Gleichung 3.8}$$

Wie bereits vorher beschrieben, ergibt sich die relative Reaktionsgeschwindigkeit aus Gleichung 3.3 und 3.8:

$$a = \frac{K_m + [S]}{K_m + [S] * \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \text{Gleichung 3.9}$$

Unkompetitive Inhibitoren senken sowohl die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{max}$  als auch die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$ . Denn wenn der Inhibitor den Enzym-Substrat-Komplex besetzt, steht dieser nicht zum Beitrag einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit zur Verfügung. Umgekehrt gilt auch, dass bei höheren Substratkonzentrationen der Inhibitor nicht vom Enzym verdrängt wird, sondern vermehrt bindet [196].

### Nicht-essentielle Aktivierung

Theoretisch steigern Aktivatoren die Reaktionsgeschwindigkeit, während sie sowohl an das freie Enzym als auch an den Enzym-Substrat-Komplex binden können. Dabei basiert die Enzymaktivierung auf einem Modell des Interaktionstyps, bei dem die Reaktion bzw. der Transport auch in Abwesenheit des Aktivators ablaufen kann. Das Verhalten des nicht-essentiellen Aktivators ähnelt dabei dem Mischtyp eines kompetitiven und nicht-kompetitiven Inhibitors. Gleichung 3.10 beschreibt die nicht-essentielle Aktivierung unter Berücksichtigung der Faktoren, dass ein Aktivator sowohl die Affinität zum Substrat als auch die Bildung des Produktes beeinflusst:

$$\frac{v}{v_{max}} = \frac{[S]}{K_m * \frac{\left(1 + \frac{[A]}{K_A}\right)}{\left(1 + \frac{\beta * [A]}{\alpha * K_A}\right)} + [S] * \frac{\left(1 + \frac{[A]}{\alpha * K_A}\right)}{\left(1 + \frac{\beta * [A]}{\alpha * K_A}\right)}} \quad \text{Gleichung 3.10}$$

[A] Aktivatorkonzentration



- $K_A$  Affinitätskonstante des Aktivators
- $\alpha, \beta$  Faktoren, die den Einfluss des Aktivators auf die Substratbindung und die Bildung des Produkts berücksichtigen
- $v_{max}$  maximale Reaktionsgeschwindigkeit einer nicht-aktivierten Reaktion. In Anwesenheit eines Aktivators entspricht die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $\beta * v_{max}$

Bei jeder Aktivatorkonzentration gilt:

$$v_{max_{app}} = \frac{v_{max} * \left(1 + \frac{\beta * [A]}{\alpha * K_A}\right)}{1 + \frac{[A]}{\alpha * K_A}} \quad \text{Gleichung 3.11}$$

sowie

$$K_{m_{app}} = K_m * \frac{1 + \frac{[A]}{K_A}}{1 + \frac{[A]}{\alpha * K_A}} \quad \text{Gleichung 3.12}$$

$v_{max_{app}}$  apparente maximale Reaktionsgeschwindigkeit

$K_{m_{app}}$  apparente Michaelis-Menten-Konstante

Die apparenten Werte der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{max_{app}}$  als auch der Michaelis-Menten Konstante  $K_{m_{app}}$  werden wie in Gleichungen 3.11 und 3.12 beschrieben durch die Affinitätskonstante  $K_A$  und die Faktoren  $\alpha$  und  $\beta$  beeinflusst. Dabei nähert sich mit steigender Aktivatorkonzentration  $K_{m_{app}}$  dem Wert von  $\alpha K_m$  an, während sich  $v_{max_{app}}$  dem Wert von  $\beta v_{max}$  annähert.

Unter den Bedingungen, dass sowohl  $\alpha < 1$  als auch  $\beta < 1$  sind und gleichzeitig  $\alpha > \beta$  würde der Aktivator die Substrataffinität zum Transporter zwar erhöhen, jedoch die Reaktionsgeschwindigkeit, die durch die Bildung des Produkts beschrieben ist, reduzieren. Im umgekehrten Fall,  $\alpha > 1$  und  $\beta > 1$ , sowie  $\alpha < \beta$ , wird die Affinität zum Substrat herabgesetzt und der Transport beschleunigt [196].

### 3.8.1.2. Auswertemethoden

Aufgrund der zentralen Bedeutung der Michaelis-Menten-Gleichung für die Enzymkinetik sind Auswertung und Art der Darstellung der Konstanten, wie die Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{max}$  und die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  sehr wichtig. Im Folgenden werden zwei in dieser Arbeit verwendete Verfahren näher erläutert.

#### Lineweaver-Burk

Das Linearisierungsverfahren nach Lineweaver-Burk ist eine doppelt-reziproke Darstellung, bei der  $1/v$  als Funktion von  $1/[S]$  aufgetragen wird. Dabei werden die Konstanten  $v_{max}$  und  $K_m$  direkt aus dem Ordinaten- bzw. Abzissenschnittpunkt der Geraden ermittelt. Die Lineweaver-Burk-Gleichung erhält man, wenn man von der Michaelis-Menten-Gleichung den Kehrwert bildet:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad \text{Gleichung 3.13}$$

Bei der Auftragung der reziproken Reaktionsgeschwindigkeit gegen die reziproke Substratkonzentration entsteht eine Gerade mit der Steigung  $K_m/v_{max}$ , die die x-Achse bei  $-1/K_m$  und die y-Achse bei  $1/v_{max}$  schneidet. Bei den unterschiedlichen Interaktionstypen spiegelt sich dies wie folgt wider: (i) kompetitive Inhibition: gemeinsamer Ordinatenchnittpunkt aller Geraden bei  $1/v$ ; (ii) nicht-kompetitive Inhibition: gemeinsamer Abzissenschnittpunkt aller Geraden bei  $-1/K_m$ ; (iii) unkompetitive Inhibition: Geraden verlaufen parallel; (iv) nicht-essentielle Aktivierung: gemeinsamer Schnittpunkt aller Geraden im zweiten Quadranten mit dem wichtigen Unterschied, dass sich die Geraden mit ansteigender Aktivatorkonzentration von oben nach unten abzeichnen.

#### Cornish-Bowden

Die direkt-lineare Auftragung nach Cornish-Bowden ist eine weitere Methode zur einfachen graphischen Bestimmung der enzymkinetischen Parameter. Dabei lassen sich diese direkt aus der Sättigungshyperbel herleiten. Die Michaelis-Menten-Gleichung wird

so umgeformt, dass auf den Achsen  $[S]$  als Abszisse und  $v$  als Ordinate aufgetragen werden:

$$v_{max} = \frac{v}{[S]} * K_m + v \quad \text{Gleichung 3.14}$$

Die graphische Auswertung erfolgt unter Verbindung der zusammengehörenden Punkte, ( $[S]$ -Wert oder  $v$ -Wert), die durch eine Gerade in eine Beziehung gesetzt werden. Demzufolge gibt es für mehrere unterschiedliche Substratkonzentrationen eine charakteristische Geradenschar mit einem Schnittpunkt. Dieser Punkt, an dem sich die Geraden dieser Familie kreuzen, ergibt die Werte für  $v_{max}$  und  $K_m$ . Wie bereits bei den unterschiedlichen Interaktionstypen beschrieben, werden diese durch Veränderung der Konstanten charakterisiert: (i) kompetitive Inhibition:  $v_{max}$  bleibt gleich und  $K_m$  steigt; (ii) nicht-kompetitive Inhibition:  $v_{max}$  sinkt und  $K_m$  bleibt gleich; (iii) unkompetitive Inhibition:  $v_{max}$  und  $K_m$  sinken; (iv) nicht-essentielle Aktivierung:  $v_{max}$  steigt und  $K_m$  sinkt.

### 3.8.2. Regression

Die Regressionsanalyse ermöglicht die statistische Auswertung zwischen einer abhängigen und einer oder mehreren unabhängigen Variablen. So können quantitative Zusammenhänge beschrieben und Werte von Variablen prognostiziert werden. Im Folgenden werden, die in dieser Arbeit verwendete lineare Regression als auch die nicht-lineare Regression von Konzentrations-Effektkurven näher erläutert.

#### 3.8.2.1. Lineare Regression

Die Auswertung des linearen Modells beschreibt die lineare Regression und erfolgte wie in Gleichung 3.15 beschrieben:

$$y = a * x + b \quad \text{Gleichung 3.15}$$

*a* Steigung

*b* y-Achsenabschnitt

### 3.8.2.2. Nicht-lineare Regression

Die Auswertung von Konzentrations-Effektkurven erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism® mit der nicht-linearen Regressionsanalyse unter Verwendung der 4-Parameter-logistischen-Gleichung (Gleichung 3.16).

$$y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10^{(\log(EC_{50}) - \log(c)) * n_H}} \quad \text{Gleichung 3.16}$$

*Bottom* ermittelter Messwert ohne Anwesenheit eines Modulators

*Top* ermittelter maximaler Messwert in Anwesenheit eines Modulators

*EC<sub>50</sub>* die halbmaximale Effektkonzentration eines Modulators; im Fall eines Inhibitors spricht man von einer halbmaximalen InhibitorKonzentration (IC<sub>50</sub>); bei Aktivatoren von einer halbmaximalen AktivatorKonzentration (AC<sub>50</sub>); bei zytotoxischen Untersuchungen von der halbmaximalen Wachstumsinhibition (GI<sub>50</sub>)

*c* Konzentration eines Modulators

*n<sub>H</sub>* Hillkoeffizient; beschreibt die Steigung im Wendepunkt der sigmoiden Kurve; bei *n<sub>H</sub>* = 1: Annahme, dass die Reaktion zwischen Transportprotein und Modulator 1:1 stattfindet; hier wird die Regressionsanalyse durch die 3-Parameter-logistische-Gleichung beschrieben

### 3.8.3. Berechnung der maximalen Inhibition

Die maximale Inhibition *I<sub>max</sub>* einer Konzentrations-Effektkurve wurde im Vergleich zum verwendeten Standardmodulator betrachtet und berechnete sich wie folgt:

$$I_{max} = \frac{(Top_{Modulator} - Bottom_{Modulator})}{(Top_{Standard} - Bottom_{Standard})} * 100 \quad \text{Gleichung 3.17}$$

### 3.8.4. Statistische Kennzahlen

Sowohl in Tabellen als auch Graphiken wurden die angegebenen Werte durch den arithmetischen Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung repräsentiert. Bei statistischer Auswertung von Messwerten wurde der Einstichproben-*t*-Test durchgeführt und so die Signifikanz der Ergebnisse charakterisiert.

#### 3.8.4.1. Mittelwert

Die Berechnung des Mittelwertes ( $\bar{x}$ ) erfolgte wie in Gleichung 3.18 dargestellt:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \text{Gleichung 3.18}$$

$x_i$  Messwert

$n$  Anzahl der Messwerte

#### 3.8.4.2. Standardabweichung

Als Maß der Streuung und somit die Präzision einer Messung wurde die Standardabweichung ( $\sqrt{Stdabw^2}$ ) angegeben und mit folgender Formel berechnet:

$$\sqrt{Stdabw^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{Gleichung 3.19}$$

### 3.8.4.3. Einstichproben-*t*-Test

Anhand des Einstichproben-*t*-Testes wurde überprüft, ob der Mittelwert der gemessenen Probe mit dem hypothetischen Mittelwert sich statistisch signifikant unterscheiden.

$$t = \frac{\overline{x_{Probe}} - \overline{x_{hypothetisch}}}{SD} \quad \text{Gleichung 3.20}$$

Mithilfe der genannten Gleichung generierte GraphPad Prism<sup>®</sup> einen sogenannten P-Wert (Signifikanzwert). Die resultierende Signifikanz wurde mit unterschiedlicher Anzahl an Sternchen angegeben; \*:  $P \leq 0,05$ ; \*\*:  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $P \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $P \leq 0,0001$ .

## 3.9. Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 3.11:** Informationen zu den verwendeten Chemikalien und Reagenzien.

<b>Substanz/Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)2,5-diphenyl-2 <i>H</i> -tetrazoliumbromid (MTT)	Carl Roth GmbH & Co KG
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth GmbH & Co KG
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure Natriumsalz (HEPES-Na)	Carl Roth GmbH & Co KG
3-( <i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Amiodaron Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ammoniummolybdat Tetrahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L(+)-Ascorbinsäure	Applichem GmbH
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.
Bovines Serumalbumin (BSA)	Applichem GmbH
Calcein AM	Calbiochem

<b>Substanz/Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KGaA
Ciclosporin A	Tocris Bioscience
Kristallviolett	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Daunorubicin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dikaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dinatriumethylenediamintetraacetat Dihydrat (Na <sub>2</sub> -EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KgaA
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Applichem GmbH
Dithiothreitol (DTT)	Applichem GmbH
Doxorubicin	Merck KgaA
Essigsäure 100 %	Carl Roth GmbH & Co KG
Ethylen-bis-(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure (EGTA)	Applichem GmbH
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
N-Ethylmaleimid	Alfa Aesar
Glutathion, oxidiert (GSSG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Glutathion, reduziert (GSH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Glycerol	Applichem GmbH
Glycin	Grüssing GmbH
Hoechst 33342 Trihydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Indometacin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Kaliumantimonyltartrat Trihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Kaliumchlorid	Merck KgaA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KgaA
Kaliumhydrogencarbonat	Grüssing GmbH
Ko143	Tocris Bioscience
Leupeptin Hemisulfat	Applichem GmbH
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co KG
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck KgaA
Malachitgrün	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

<b>Substanz/Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
D-Mannitol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Methotrexat	Fluka
Mitoxantron	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem GmbH
Natriumazid	Janssen Chimica
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumchlorid	Merck KgaA
Natriumhydrogencarbonat	Merck KgaA
Natriumhydroxid	Acros Organics
Natriumhydroxid-Lösung 1 mol/l	Riedel de Haën
Natriummolybdat	Carl Roth GmbH & Co KG
Natriumorthovanadat	Carl Roth GmbH & Co KG
Oubain Octahydrat	Fluka
Pepstatin A	Applichem GmbH
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Pheophorbid A	Frontier Scientific Inc.
Phosphatbinder	Tripod
Polyvinylalkohol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Pranlukast Hemihydrat, ONO-1078	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Prazosin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Protein Standard 200 mg/ml BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Quercetin Dihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Chinaldin Rot	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Rhodamin 123	Acros Organics
Salpetersäure 65 %	Carl Roth GmbH & Co KG
Schwefelsäure 95-97 %	Grüssing GmbH
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Applichem GmbH
Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan (Tris)	Applichem GmbH
Triton-X-100	Carl Roth GmbH & Co KG
Verapamil	Sigma-Aldrich Chemie GmbH



### 3.10. Materialien für das Arbeiten mit Zellen

**Tabelle 3.12:** Informationen zu den verwendeten Verbrauchsmaterialien und Kits.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
96er Mikrotiterplate, F-bottom, klar	Greiner Bio-one
96er Mikrotiterplate, U-bottom, klar	Greiner Bio-one
96er Mikrotiterplate, F-bottom, schwarz	Greiner Bio-one
Antibiotic-Antimycotic (100X)	Pan Biotech GmbH
Ausplattierschalen	VWR International GmbH
CASY <sup>®</sup> ton-Lösung	Innovatis AG
Dulbeccos Modified Eagles Medium (D-MEM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Einmalküvetten PMMA (1,5 ml halbmikro)	Brand GmbH & Co KG
FACS Clean	Becton Dickinson
FACS Flow	Becton Dickinson
FACS Rinse	Becton Dickinson
FACS Teströhrchen	Becton Dickinson
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Geneticin Sulfat (G418)	GIBCO
Gewebekulturflasche 25 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-one
Gewebekulturflasche 75 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-one
Gewebekulturflasche 175 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-one
Gewebekulturplatte 6 well	Greiner Bio-one
Gewebekulturplatte 24 well	Greiner Bio-one
D-Glucose-Monohydrat	Merck KgaA
L-Glutamin-Lösung 200 mmol/l	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Kryo-Röhrchen	Sarstedt
Membranfilter, Whatman <sup>™</sup> 0,2 µm	GE Healthcare
Pasteurpipetten	Thermo Fisher Scientific
Penicillin (1000 U/ml) Streptomycin (10 mg/ml)- Lösung	Pan Biotech GmbH
Petrischalen (90 x 14 mm)	VWR International GmbH
Pipettenspitzen 5 ml	Brand GmbH & Co KG

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Pipettenspitzen 10 µl	Starlab GmbH
Pipettenspitzen 200 µl, gelb	Starlab GmbH
Pipettenspitzen 1000 µl, blau	Starlab GmbH
PP-Röhrchen 15 ml	Greiner Bio-one
PP-Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-one
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße 2,0 ml	Axygen scientific
RPMI 1640 Medium	Pan Biotech GmbH
RPMI 1640 Medium, ohne Phenolrot	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt
Serologische Pipette 25 ml	Sarstedt
Spodopan Insektenmedium	Pan Biotech GmbH
Spritzen 20 ml	Erwin Busch GmbH
Trypsin (0,05 %) / EDTA (0,02 %)-Lösung	Pan Biotech GmbH

### 3.11. Geräte

**Tabelle 3.13:** Informationen zu den verwendeten Geräten und deren Zubehör.

<b>Gerät bzw. Zubehör</b>	<b>Hersteller</b>
Accu-Jet Pro	Brand GmbH & Co KG
Autoklav VX-95	System GmbH
Avanti J-25 Zentrifuge	Beckman Coulter
Dounce Hand-Homogenisator 7 ml	Wheaton
Ex Multiscan Mikroplatten Photometer	Thermo Fisher Scientific
FACScalibur	BD Biosciences
Fluostar Optima Mikroplatten Reader	BMG-Labtech
Fluostar Polarstar Mikroplatten Reader	BMG-Labtech
Inkubator	Münchener Medizin Mechanik GmbH
Laborzentrifuge Avanti J-25	Beckman Coulter

---

<b>Gerät bzw. Zubehör</b>	<b>Hersteller</b>
LS 55 Luminescence Spectrometer	Perkin Elmer
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG
Multikanalpipette	Eppendorf
pH-Kalomel-Elektrode (für pH-Meter)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
pH-Meter	Beckman Coulter
Polytron® Dispergierer	Kinematica
Thermostat plus	Eppendorf
Tischzentrifuge 5451R	Eppendorf
Ultrazentrifuge Optima LE-80K	Beckman Coulter
Ultrazentrifugengläser (für Type 45 Ti)	Beckman Coulter
Ultrazentrifugengläser (für Type 70 Ti)	Beckman Coulter
UV-Photometer Ultrospec 4000	Amersham Biosciences
Vortexschüttler Vortex	Scientific Industries
Wasseraufbereitungsanlage Elix	Millipore
Wasseraufbereitungsanlage MilliQ	Millipore
Wasserbad Julabo TW 12	Julabo GmbH
Werkbank laminar air flow	Bio-Flow Technik GmbH
Zellzählgerät CASY 1 Modell TT	Innovatis AG
Zentrifugengläser (für JA-25.50)	Nalge Nunc International
Zentrifugengläser (für JLA-10.500)	Beckman Coulter

---



# 4. ● Purine, Pyrrolo- und Indolopyrimidine als Modulatoren des Transportproteins ABCC1

Modulatoren beeinflussen die Funktion des ABC-Transporter-vermittelten Efflux, welcher verstärkt (aktiviert) oder gehemmt (inhibiert) werden kann. Als Referenz dient die Transportdifferenz zur basalen Aktivität, die in lebenden Zellen immer vorherrscht. Bei den in diesem Projekt vorgestellten Substanzklassen der Purine, Pyrrolo- und Indolopyrimidine wurden strukturabhängige Merkmale gefunden, die sowohl zur Inhibition als auch Aktivierung des Transportproteins ABCC1 führten. Aber auch die funktionelle Untersuchung der ebenfalls bei der MDR beteiligten Transporter ABCB1 und ABCG2 wurde mit diesen Verbindungen durchgeführt und festgestellte Effekte mit strukturellen Merkmalen in Verbindung gebracht.

## 4.1. Pyrrolopyrimidine – neue Inhibitoren des ABCC1 Transporters

Wang et al. [119,120] entdeckten bereits 2004 Pyrrolo- und Indolopyrimidine als die aktivsten Inhibitoren des Transportproteins ABCC1, die bis dato beschrieben wurden. In Zusammenarbeit mit Dr. Sven Marcel Stefan wurden Derivate der Strukturklasse der

Pyrrolopyrimidine mit neuen Substitutionsmustern synthetisiert und biologisch evaluiert. Auf der Suche nach neuen Inhibitoren des Transportproteins ABCC1 standen dabei die funktionellen Aspekte wie Aktivität, Selektivität und Toxizität im Vordergrund.

#### **4.1.1. Funktionelle Untersuchungen der Pyrrolopyrimidine an ABCC1**

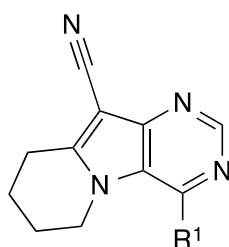
Um den Einfluss unterschiedlicher Substituenten am Pyrrolopyrimidin-Grundgerüst zu untersuchen, wurden die Derivate in Abhängigkeit von ihrer Struktur in entsprechende Unterklassen eingeteilt. Die erhaltenen Ergebnisse aus zwei etablierten Akkumulationsassays, Daunorubicin und Calcein AM, wurden verglichen und bewertet. In dieser Arbeit werden nur die Ergebnisse des Daunorubicin Assays vorgestellt. Die Korrelation der Ergebnisse beider Assays wurde in der Dissertation von Dr. Sven Marcel Stefan [197] und in der Publikation Schmitt et al. [198] veranschaulicht.

Zuerst wurde der Effekt des aliphatischen Linkers zwischen der Piperazin-Teilstruktur in Position 4 und dem terminalen Phenylring auf die inhibitorische Wirksamkeit an ABCC1 ermittelt. Die Verbindung 401 stellte die Ausgangsstruktur dar, welche eine Phenethylgruppe enthält. Diese wurde bereits von Wang et al. [119] beschrieben und die inhibitorische Aktivität in Bezug auf ABCC1 im Daunorubicin Assay mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0,197 µmol/l ermittelt. Damit ist die Substanz 401 ein potenter Inhibitor des Transportproteins ABCC1 im Vergleich zu den anfänglichen Inhibitoren wie Indometacin und Ciclosporin A.

Die Verkürzung des Phenethylrestes (401) zu einem Benzyl- (402), Diphenylmethyl- (403) und Phenylrest (404) führte zu einer Reduzierung der Aktivität um jeweils das Dreifache (Tabelle 4.1). Damit fand der Ethylenlinker eine bessere Akzeptanz im Gegensatz zu den verkürzten Linkern. Abbildung 4.1 stellt durch eine Auftragung des berechneten Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (log P) gegen die Aktivität der Verbindungen die bestehende Korrelation dar und verdeutlicht die Annahme, dass eine hohe Lipophilie der Pyrrolopyrimidine für die ABCC1 Inhibition von Vorteil ist. Die Verbindung 403 ist aufgrund ihrer anspruchsvollen Stereochemie dabei ein Ausreißer, denn diese zeigte trotz hoher Lipophilie einen IC<sub>50</sub>-Wert von 1,07 µmol/l im Daunorubicin Assay und damit einen 1,7-fach schlechteren Wert als das Benzylpiperazinyl-Derivat 402. Anscheinend wurde der sterisch umfangreiche Diphenylmethylrest zwar erkannt, jedoch konnte dieser nicht wie

erwartet mehr zur inhibitorischen Aktivität beitragen. Dennoch spielte die Lipophilie des Restes in Position 4 eine große Rolle, denn der Vergleich der Verbindungen 405 (Methylpiperazinyl-Teilstruktur) und 406 (Piperazinyl-Teilstruktur) zeigt, dass ein aromatisches Ringsystem für eine effektive Inhibition von ABCC1 vonnöten ist. Abbildung 4.2 veranschaulicht die Verschiebung der Konzentrations-Effektkurven zwischen den Verbindung 401, 405 und 406.

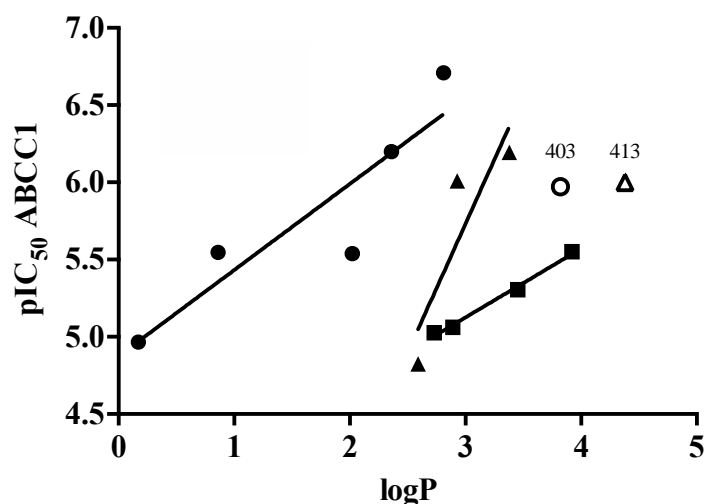
**Tabelle 4.1:** Untersuchung der ABCC1-inhibierenden Eigenschaften der kondensierten Cyclohexylpyrrolopyrimidine, die in Position 4 variiert wurden, bestehend aus Gruppe 1 (Piperazin-Analoga) und 2 (Amino-Analoga). Die Substanzen wurden mittels Daunorubicin Assay an H69 AR Zellen vermessen. Aufgeführt sind der Mittelwert und die Standardabweichung der in mindestens drei unabhängigen Experimenten ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte.



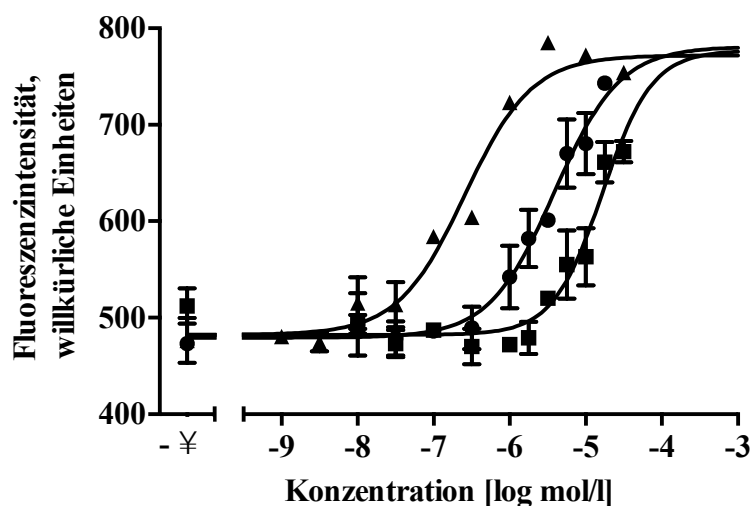
Substanz	R <sup>1</sup>		Daunorubicin IC <sub>50</sub> ± SD [μmol/l]
401	Phenylethylpiperazinyl	Piperazin-Analoga	0,197 ± 0,025
402	Benzylpiperazinyl		0,636 ± 0,057
403	Diphenylmethylpiperazinyl		1,07 ± 0,06
404	Phenylpiperazinyl		2,90 ± 0,12
405	4-Methylpiperazinyl		2,87 ± 0,33
406	Piperazinyl		10,8 ± 0,4
407	Phenylpropylamino	Amino-Analoga	2,84 ± 0,32
408	Phenylethylamino		4,98 ± 0,47
409	Benzylamino		8,80 ± 1,33
410	Anilino		9,41 ± 0,61

Innerhalb der zweiten Gruppe wurde Substanz 408 bereits von Wang et al. publiziert [119]. Hier ist der Piperazinlinker durch eine Aminogruppe ersetzt worden. Diese strukturelle

Veränderung führte zu einer Verringerung der inhibitorischen Aktivität gegenüber ABCC1. Es konnte ebenfalls eine Korrelation zwischen Lipophilie und Aktivität deutlich erkannt werden (Abbildung 4.1). Die Verkleinerung des aliphatischen Linkers führte zu einer geringeren Lipophilie und damit zum Absinken der inhibitorischen Aktivität gegenüber ABCC1 (Tabelle 4.1).



**Abbildung 4.1:** Korrelation zwischen den pIC<sub>50</sub>-Werten aus dem Daunorubicin Assay und den berechneten Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (log P) der getesteten Verbindungen der Pyrrolopyrimidine der Gruppen 1 bis 3. Gruppe 1 (gefüllte Kreise), Gruppe 2 (gefüllte Quadrate) und Gruppe 3 (gefüllte Dreiecke). Die Verbindungen 401 (leerer Kreis) und 413 (leeres Dreieck) wurden bei der linearen Regression ausgelassen.

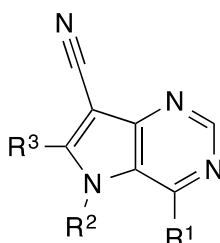


**Abbildung 4.2:** Vergleich der Konzentrations-Effektkurven der Verbindungen 401 (gefüllte Dreiecke), 405 (gefüllte Kreise) und 406 (gefüllte Quadrate) erhalten aus dem Daunorubicin Assay mit H69 AR Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt in Duplikaten.



In Gruppe 3 wurde in Abhängigkeit der variierten Seitenkette in Position 4 der bestehende Cyclohexylring durch einen Cycloheptylring in Positionen 5 und 6 ersetzt und die inhibitorische Aktivität bestimmt (Tabelle 4.2). Dabei fiel auf, dass der Cycloheptyl-Rest der Verbindungen 411, 412, 413 und 414 einen vergleichbaren Effekt hatte wie der Cyclohexyl-Rest (401, 402, 403 und 404), jedoch die Aktivität vermindert wurde. Dennoch waren die Verbindungen potent, insbesondere Substanz 411 wies einen guten IC<sub>50</sub>-Wert von 0,643 µmol/l auf.

**Tabelle 4.2:** Untersuchung der ABCC1-inhibierenden Eigenschaften der Pyrrolopyrimidine, die in Positionen 5 und 6 variiert wurden, bestehend aus Gruppen 3 (Cycloheptyl-Derivate) und 4 (1-Pyrrolyl-Alkyl-Derivate). Die Substanzen wurden mittels Daunorubicin Assay in H69 AR Zellen vermessen. Aufgeführt sind der Mittelwert und die Standardabweichung der in mindestens drei unabhängigen Experimenten ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte.



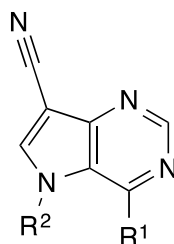
Substanz	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>		Daunorubicin IC <sub>50</sub> ± SD [µmol/l]
411	Phenylethylpiperazinyl	Cycloheptyl		Cycloheptyl- Derivate	0,634 ± 0,064
412	Benzylpiperazinyl	Cycloheptyl			0,981 ± 0,072
413	Diphenylmethylpiperazinyl	Cycloheptyl			1,01 ± 0,06
414	Phenylpiperazinyl	Cycloheptyl			15,1 ± 1,9
415	Phenylethylpiperazinyl	Methyl	H	1-Pyrrolyl-Alkyl- Derivate	0,700 ± 0,099
416	Phenylethylpiperazinyl	Ethyl	H		0,789 ± 0,093
417	Phenylethylpiperazinyl	Propyl	H		0,418 ± 0,027
418	Phenylethylpiperazinyl	Isopropyl	H		1,24 ± 0,13
419	Phenylethylpiperazinyl	Cyclopropyl	H		0,200 ± 0,025

In der vierten Gruppe war das cyclische Ringsystem gegen einen aliphatischen Rest in Position 5 ausgetauscht. Der Phenylethylpiperazinyl-Rest in Position 4 aus der ersten Gruppe erwies sich als am potentesten und wurde beibehalten. Diese Inhibitoren zeigten alle gute bis sehr gute inhibitorische Aktivitäten in Bezug auf ABCC1. Dabei war die Verbindung 419 hochpotent und im gleichen nanomolaren Bereich wirksam wie die Standardverbindung 401. Innerhalb dieser Gruppe war keine Korrelation zwischen log P und der Aktivität erkennbar.

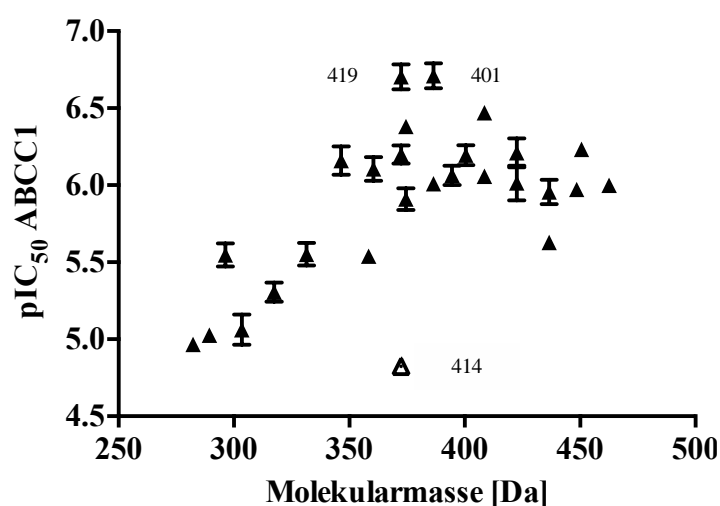
Die Gruppe 5 vereinte die Verbindungen, die große Reste in Position 5 enthielten. Hierbei handelte es sich um aliphatische Reste, die am Ende der Kette zusätzlich einen Benzenring trugen. In Position 4 wurde nur zwischen Phenylethylpiperazinyl und Benzylpiperazinyl variiert. Die beste Verbindung dieser Gruppe war Substanz 420 mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0,340 µmol/l. Wie in der vierten Gruppe, waren alle Substanzen hochpotente Inhibitoren des Transporters ABCC1 im niedrigen mikromolaren bzw. hohen nanomolaren Konzentrationsbereich (Tabelle 4.3). Auch hier wurde keine Korrelation zwischen log P und den Aktivitätsdaten des Daunorubicin Assays gefunden.

Eine Korrelation konnte bei der Auftragung des Molekulargewichts der untersuchten Verbindungen gegen ihre ABCC1 Aktivität beobachtet werden (Abbildung 4.3). Pyrrolopyrimidine mit hydrophoben Resten und damit höheren Verteilungskoeffizienten wurden bis zu einem Molekulargewicht von etwa 400 Da bevorzugt. Ein Anstieg darüber hinaus führt nicht zu aktiveren Substanzen und die inhibitorische Aktivität stagniert bei circa 1 µmol/l.

**Tabelle 4.3:** Untersuchung der ABCC1-inhibierenden Eigenschaften der Pyrrolopyrimidine, die in Position 5 mit aliphatisch-aromatischen Resten variiert wurden (Gruppe 5). Die Substanzen wurden mittels Daunorubicin Assay in H69 AR Zellen vermessen. Aufgeführt sind der Mittelwert und die Standardabweichung der in mindestens drei unabhängigen Experimenten ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte.



Substanz	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Daunorubicin IC <sub>50</sub> ± SD [μmol/l]
420	Phenylethylpiperazinyl	Phenyl	0,340 ± 0,008
421	Benzylpiperazinyl	Phenyl	0,866 ± 0,084
422	Phenylethylpiperazinyl	Benzyl	0,623 ± 0,091
423	Benzylpiperazinyl	Benzyl	0,876 ± 0,027
424	Phenylethylpiperazinyl	Phenylethyl	1,12 ± 0,14
425	Benzylpiperazinyl	Phenylethyl	0,983 ± 0,171
426	Phenylethylpiperazinyl	Phenylpropyl	0,586 ± 0,030
427	Benzylpiperazinyl	Phenylpropyl	2,36 ± 0,10



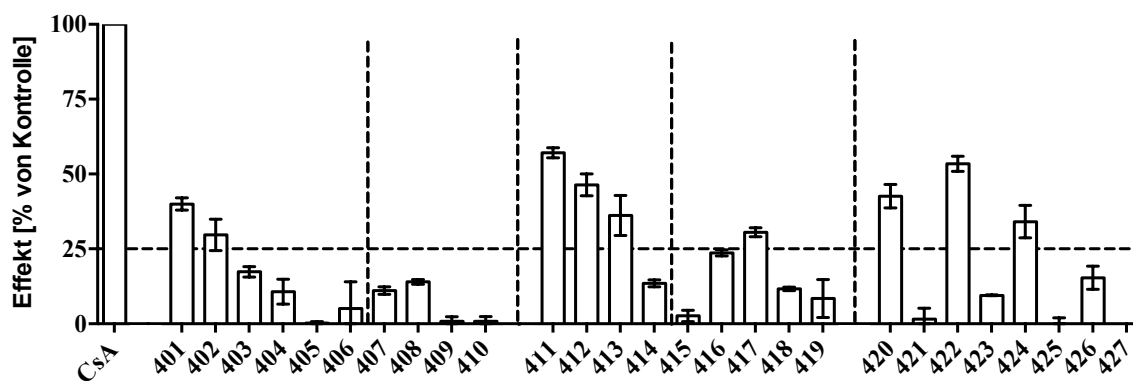
**Abbildung 4.3:** Korrelation zwischen Molekulargewicht der Verbindungen und Aktivitäten gegenüber ABCC1 erhalten aus dem Daunorubicin Assay mit H69 AR Zellen.

## 4.1.2. Untersuchung der Inhibition von ABCB1 und ABCG2

Aufgrund der strukturellen und funktionellen Verwandtschaft der Transporter ABCB1 und ABCC1 [83] wurden die untersuchten Pyrrolopyrimidine auch auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber ABCB1 geprüft. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 4.4 sowie in Abbildung 4.4 veranschaulicht. Es zeigte sich, dass alle Verbindungen schwache Inhibitoren von ABCB1 waren.

**Tabelle 4.4:** Inhibitorische Aktivität der potentesten Pyrrolopyrimidine gegenüber ABCB1 im Calcein AM Assay. Getestet wurden die Substanzen, die im Screening bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  ein Inhibitionslevel von mindestens 25 % aufzeigten. Die berechneten  $\text{IC}_{50}$ -Werte wurden aus Konzentrations-Effektkurven generiert. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Substanz	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Calcein AM $\text{IC}_{50} \pm \text{SD} [\mu\text{mol/l}]$
401	Phenylethylpiperazinyl	Cyclohexyl		$18,8 \pm 3,7$
402	Benzylpiperazinyl	Cyclohexyl		$32,3 \pm 5,4$
411	Phenylethylpiperazinyl	Cycloheptyl		$19,2 \pm 2,5$
412	Benzylpiperazinyl	Cycloheptyl		$21,7 \pm 2,6$
413	Diphenylmethylpiperazinyl	Cycloheptyl		$28,6 \pm 6,8$
417	Phenylethylpiperazinyl	Propyl	H	$41,9 \pm 17,3$
420	Phenylethylpiperazinyl	Phenyl	H	$6,82 \pm 0,50$
422	Phenylethylpiperazinyl	Benzyl	H	$10,6 \pm 1,1$
424	Phenylethylpiperazinyl	Phenylethyl	H	$32,5 \pm 4,8$

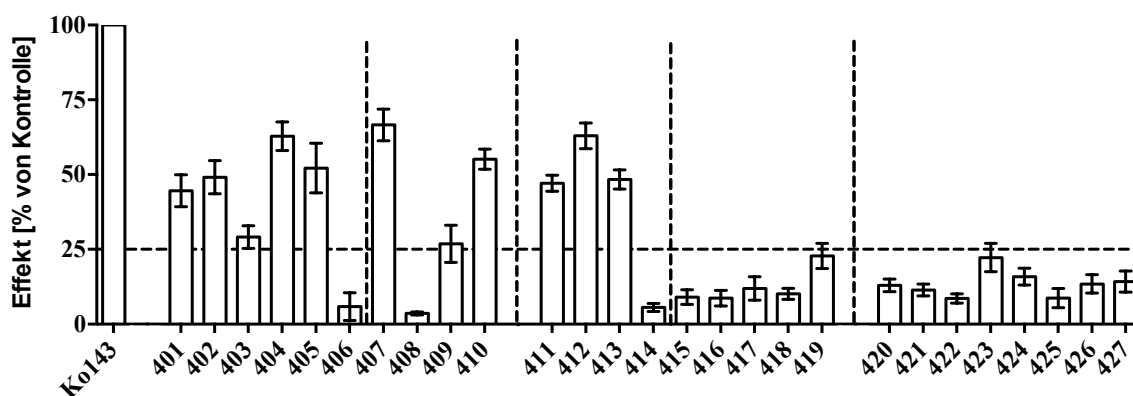


**Abbildung 4.4:** Prozentuale Effekte der Pyrrolopyrimidine bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  auf die Akkumulation von Calcein AM in ABCB1-überexprimierenden A2780 adr Zellen. Die gemessenen Werte wurden auf den Standardinhibitor Cyclosporin A (CsA; 10  $\mu\text{mol/l}$ ) normalisiert. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten.

Des Weiteren wurden die Substanzen auf ihre Aktivität gegenüber ABCG2 und damit die Selektivität für ABCC1 überprüft. Abbildung 4.5 veranschaulicht die gefundenen Ergebnisse. Die meisten Verbindungen aus den Gruppen 1-3 zeigten bei 10  $\mu\text{mol/l}$  im Vergleich zu 10  $\mu\text{mol/l}$  des Standard ABCG2 Inhibitors Ko143 eine maximale Inhibition von über 25 % und wurden aufgrund dessen durch Konzentrations-Effektcurven näher charakterisiert. Tabelle 4.5 gibt die berechneten  $\text{IC}_{50}$ -Werte wieder. Hieraus konnte man schließen, dass die Aktivität gegenüber ABCG2 nicht durch die Verkürzung der Seitenkette in Position 4 beeinflusst wurde (Gruppe 1). Nur die Verbindung 403 wies aufgrund des umfangreichen Diphenylmethylpiperazinyl-Substituenten eine schwächere Potenz auf. Analog zur ersten Gruppe verhielten sich auch die Substanzen aus der dritten Gruppe, die in Positionen 5 und 6 einen Cycloheptyl-Ring tragen, auch wenn die Verbindung 414 im Gegensatz zur analogen Cyclohexyl-Verbindung 404 keine Aktivität zeigte. Substanz 405 mit einer 4-Methylpiperazinyl Substitution in Position 4 fiel durch gute Aktivität gegenüber ABCG2 mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 4,25  $\mu\text{mol/l}$  auf. Entgegen der Erwartung und der strukturellen Ähnlichkeit erwies sich die Verbindung 406 mit einem unsubstituierten Piperazinyl-Rest als inaktiv. Der Austausch des Piperazins durch einen Aminoalkyl-Rest hat bis auf die inaktive Verbindung 408 die Aktivität am Transporter ABCG2 nicht beeinflusst. Die Verbindungen der restlichen Gruppen 4 und 5 zeigten keine ABCG2 Inhibition.

**Tabelle 4.5:** Inhibitorische Aktivität der potentesten Pyrrolopyrimidine gegenüber ABCG2 im Pheophorbid A Assay. Getestet wurden die Substanzen, die im Screening bei 10 µmol/l ein Inhibitionslevel von mindestens 25 % zeigten. Die berechneten IC<sub>50</sub>-Werte wurden aus Konzentrations-Effektcurven generiert. Angegeben ist der Mittelwert ± SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung.

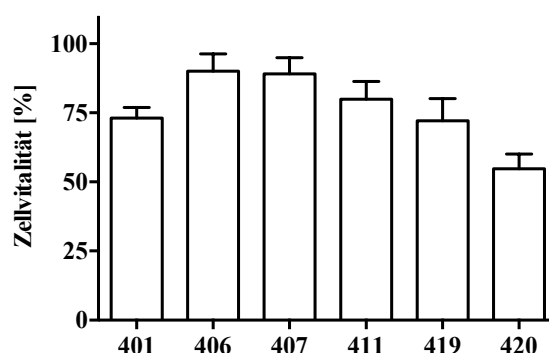
Substanz	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Pheophorbid A IC <sub>50</sub> ± SD [µmol/l]
401	Phenylethylpiperazinyl	Cyclohexyl		8,19 ± 1,72
402	Benzylpiperazinyl	Cyclohexyl		8,24 ± 1,69
403	Diphenylmethylpiperazinyl	Cyclohexyl		14,3 ± 1,4
404	Phenylpiperazinyl	Cyclohexyl		5,91 ± 1,28
405	4-Methylpiperazinyl	Cyclohexyl		4,25 ± 0,42
407	Phenylpropylamino	Cyclohexyl		6,07 ± 0,99
409	Benzylamino	Cyclohexyl		15,8 ± 2,7
410	Anilino	Cyclohexyl		7,68 ± 0,92
411	Phenylethylpiperazinyl	Cycloheptyl		9,94 ± 0,91
412	Benzylpiperazinyl	Cycloheptyl		4,68 ± 0,57
413	Diphenylmethylpiperazinyl	Cycloheptyl		8,71 ± 0,56



**Abbildung 4.5:** Prozentuale Effekte der Pyrrolopyrimidine bei einer Konzentration von 10 µmol/l auf die Akkumulation von Pheophorbid A in ABCG2-überexprimierenden MDCK II BCRP Zellen. Die gemessenen Werte wurden auf den Standardinhibitor Ko143 (10 µmol/l) normalisiert. Gezeigt sind Mittelwert ± SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten durchgeführt als Duplikate.

### 4.1.3. Untersuchung der zellulären Toxizität ausgewählter Pyrrolopyrimidine

Um die zelluläre Toxizität der Substanzen zu evaluieren, wurden aus jeder Gruppe Repräsentanten gewählt und ihre Toxizität mithilfe des MTT-basierten Vitalitäts-Assays mit H69 AR Zellen untersucht. Abbildung 4.6 zeigt, dass fast alle Verbindungen bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  nur einen geringen toxischen Effekt auf die untersuchte Zelllinie ausübten. Lediglich die Verbindung 420 aus der fünften Gruppe reduzierte die Zellvitalität auf nur noch etwa 55 % nach 72 Stunden Exposition. Die dazugehörigen  $\text{GI}_{50}$ -Werte sind in Tabelle 4.6 dargestellt.



**Abbildung 4.6:** Balkendiagramm, welches den Einfluss ausgewählter Pyrrolopyrimidine (10  $\mu\text{mol/l}$ ) auf die Vitalität von H69 AR Zellen veranschaulicht. Die Bestimmung wurde mit einem MTT-basierten Vitalitäts-Assay durchgeführt. Die Absorptionen wurden auf reines Zellmedium (100 %) und 10 % DMSO (0 %) normiert. Die Experimente wurden in drei unabhängigen Versuchen als Duplikate durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD.

**Tabelle 4.6:** Berechnete  $\text{GI}_{50}$ -Werte ausgewählter Pyrrolopyrimidine aus Konzentrations-Effektkurven bestimmt mit einem MTT-basierten Vitalitäts-Assay mit H69 AR Zellen. Die Experimente wurden in Duplikaten und in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD.

Substanz	$\text{GI}_{50} \pm \text{SD} [\mu\text{mol/l}]$	Zellvitalität $\pm$ SD [%] (bei 10 $\mu\text{mol/l}$ )
401	39,9 $\pm$ 18,6	73,1 $\pm$ 3,9
406	60,6 $\pm$ 21,2	90,1 $\pm$ 6,3
407	132 $\pm$ 45	89,1 $\pm$ 5,8
411	79,8 $\pm$ 6,5	79,8 $\pm$ 6,5
419	36,0 $\pm$ 5,4	72,1 $\pm$ 8,1
420	23,6 $\pm$ 10,8	54,7 $\pm$ 5,4

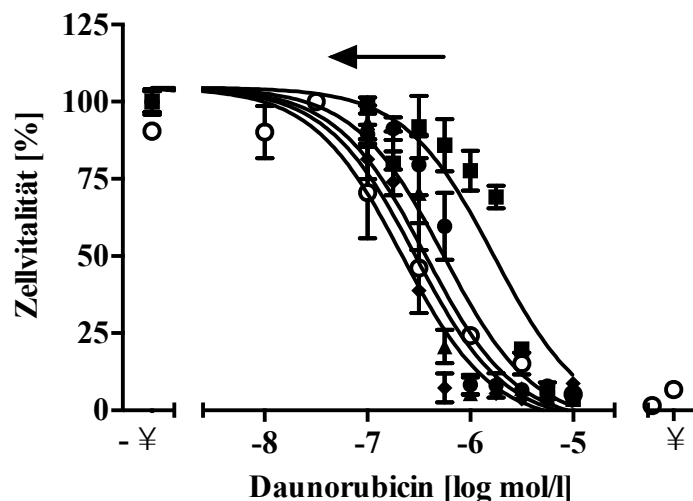
#### 4.1.4. Sensitivierung ABCC1-überexprimierender Zellen durch Pyrrolopyrimidine

Die Substanzen wurden des Weiteren auf ihre Fähigkeit, ABCC1-überexprimierende Zellen gegenüber dem Zytostatikum Daunorubicin zu sensitivieren, analysiert. Hierfür wurden aus verschiedenen Gruppen der Pyrrolopyrimidine potente und weniger potente Vertreter zur Untersuchung in einem ebenfalls MTT-basierten Vitalitäts-Assay ausgewählt. Wie in Tabelle 4.7 zu erkennen ist, waren alle Substanzen in der Lage, H69 AR Zellen gegenüber Daunorubicin zu sensitivieren. Dabei stellte sich die Verbindung 420 als die effektivste Substanz heraus. Unter Einbeziehung der zellulären Toxizität (Abbildung 4.6) dieser Substanz sollte der Effekt jedoch mit Vorsicht betrachtet werden. Im Gegensatz dazu war die Substanz 419 nicht nur nicht toxisch, sondern konnte zudem die Toxizität von Daunorubicin in den H69 AR Zellen um das 10-fache steigern, wie in Abbildung 4.7 veranschaulicht.

**Tabelle 4.7:** Berechnete  $GI_{50}$ -Werte ausgewählter Pyrrolopyrimidine bei einer Konzentration von 1, 5 und 10  $\mu\text{mol/l}$  in Anwesenheit von Daunorubicin bestimmt mit einem MTT-basierten Vitalitäts-Assay in H69 AR Zellen. Die Experimente wurden in drei unabhängigen Versuchen als Duplikate durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD.

Substanz	H69 AR	1 $\mu\text{mol/l}$	5 $\mu\text{mol/l}$	10 $\mu\text{mol/l}$	H69
		$GI_{50} \pm SD [\mu\text{mol/l}]$			
401		$0,934 \pm 0,417$	$0,636 \pm 0,227$	$0,375 \pm 0,125$	
405	$2,83 \pm 0,35$	$2,94 \pm 0,69$	$2,48 \pm 0,52$	$1,83 \pm 0,42$	$0,361 \pm 0,038$
407		$2,41 \pm 0,81$	$0,751 \pm 0,097$	$0,450 \pm 0,072$	
419		$0,827 \pm 0,229$	$0,588 \pm 0,203$	$0,395 \pm 0,118$	
420		$0,782 \pm 0,310$	$0,535 \pm 0,215$	$0,389 \pm 0,138$	

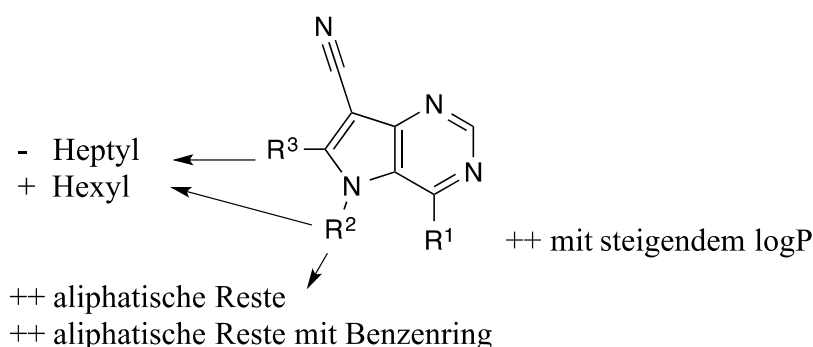




**Abbildung 4.7:** Repräsentative Verschiebung der Konzentrations-Effektkurven von zytotoxischem Daunorubicin vermittelt durch Zugabe von Verbindung 419. Der Pfeil symbolisiert die konzentrationsabhängige Sensitivierung von H69 AR Zellen gegenüber Daunorubicin. Die Substanz wurde bei Konzentrationen von 1  $\mu\text{mol/l}$  (gefüllte Kreise), 5  $\mu\text{mol/l}$  (gefüllte Dreiecke) und 10  $\mu\text{mol/l}$  (gefüllte Rauten) untersucht. ABCC1-überexprimierende Zellen ohne Inhibitor sind mit gefüllten Quadraten und die sensitive Zelllinie H69 ohne Inhibitor ist mit leeren Kreisen gekennzeichnet. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt als Doppelbestimmung.

#### 4.1.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im vorgestellten Projekt wurden die Struktur-Wirkungsbeziehungen von Pyrrolopyrimidinen in Positionen 4, 5 und 6 untersucht. Lange Phenylalkyl-Reste, die sich in Position 4 des Piperazins befinden, wurden gegenüber verkürzten Kettenresten bevorzugt. Der Austausch durch eine Aminogruppe führte zu einer verringerten Aktivität. Die Vergrößerung der aliphatischen Seitenkette in Position 5 steigerte in erheblichem Maße die inhibitorische Aktivität gegenüber ABCC1, wie im Beispiel der Verbindung 419 gezeigt werden konnte. Auch große aromatische Reste hatten in dieser Position einen positiven Effekt in Bezug auf die Inhibition.



**Abbildung 4.8:** Struktur-Wirkungsbeziehungen der Pyrrolopyrimidine hinsichtlich der inhibitorischen Aktivität gegenüber ABCC1; ++ sehr positiver Effekt, + positiver Effekt, - negativer Effekt auf die Aktivität.

Außerdem wurde die Selektivität in Bezug auf ABCC1 gegenüber ABCB1 und ABCG2 untersucht. Insbesondere die kleineren Moleküle dieser Substanzklasse, wie z.B. Verbindung 404, 405 oder 407 waren gute Repräsentanten der dualen Inhibition der Transporter ABCC1 und ABCG2. Diese Art von Dualinhibitoren ist bis heute unterrepräsentiert in der Literatur. Im Fall des Transporters ABCB1 erwiesen sich die Pyrrolopyrimidine nur als schwache Inhibitoren.

Bis auf die fünfte Gruppe dieser Substanzklasse zeigten alle anderen Verbindungen keine intrinsische Toxizität. Durch Zugabe der Inhibitoren konnte zudem eine verringerte Resistenz gegenüber Daunorubicin in H69 AR Zellen festgestellt werden, wobei vor allem Verbindung 419 sehr wirksam war.

## 4.2. Pyrrolopyrimidine und Purine – neue Aktivatoren des Transportproteins ABCC1

Die Bekämpfung der ABC-Transportprotein-vermittelten Multidrug Resistenz steht zuallererst in Verbindung mit der Inhibition dieser Proteine. Die Forschung konzentriert sich in diesem Feld auf die Synthese unterschiedlicher Strukturklassen und die funktionellen Untersuchungen der gefundenen Inhibitoren. Aktivatoren von ABC-Transportern sind kaum beschrieben. Dabei kann dies zum Verständnis des ABC-Transportproteins, in diesem Falle ABCC1, im Hinblick auf seine Funktion und dessen Mechanismus beitragen. Wie und wo werden Substanzen erkannt und gebunden? Wie verläuft der Transport? Was steckt hinter dem Schlüssel-Schloss-Prinzip? Viele Fragen hinsichtlich der Interaktion zwischen Substanz und Protein sind noch immer unzureichend geklärt.

Bei der funktionellen Analyse der Substanzklassen Pyrrolopyrimidine und Purine sind bei Akkumulationsversuchen mit ABCC1-überexprimierenden Krebszellen aktivierende Effekte aufgetreten, die gemeinsam mit Dr. Sven Marcel Stefan im Detail untersucht worden sind.

### 4.2.1. Berechnung der Strömungsrate und des Aktivierungsfaktors von ABCC1

Die nachfolgenden Berechnungen setzen eine Kinetik 1. Ordnung voraus, die sowohl für den aktiven Transport, als auch die passive Diffusion gilt und vom Resistenzfaktor der ABCC1-überexprimierenden Zellen abhängt [199].

Die Ein- bzw. Ausstromgeschwindigkeit eines Substrates, z. B. eines Fluoreszenzfarbstoffs oder Zytostatikums, kann als Produkt aus dessen Konzentration und der Geschwindigkeitskonstante beschrieben werden:

$$v = k * c \quad \text{Gleichung 4.1}$$

$v$  Transportgeschwindigkeit

$c$  Substratkonzentration

$k$  Geschwindigkeitskonstante

Unter Gleichgewichtsbedingungen ist der Einstrom äquivalent zum Ausstrom:

$$v_{(p,out)} = v_{(p,in)} + v_{(a,in)} \quad \text{Gleichung 4.2}$$

$p, out$  passive Diffusion von außerhalb der Zelle nach innen

$p, in$  passive Diffusion von innerhalb der Zelle nach außen

$a, in$  aktiver Transport von innerhalb der Zellen nach außen, verursacht durch ein Transportprotein

Aus der Vereinigung der Gleichungen 4.1 und 4.2 ergibt sich:

$$k_p * c_{out} = (k_p + k_a) * c_{in} \quad \text{Gleichung 4.3}$$

Nach Umformung der Gleichung ergibt sich die relative Strömungsrate ( $k_a/k_p$ ) eines aktiven Transports im Verhältnis zur passiven Diffusion:

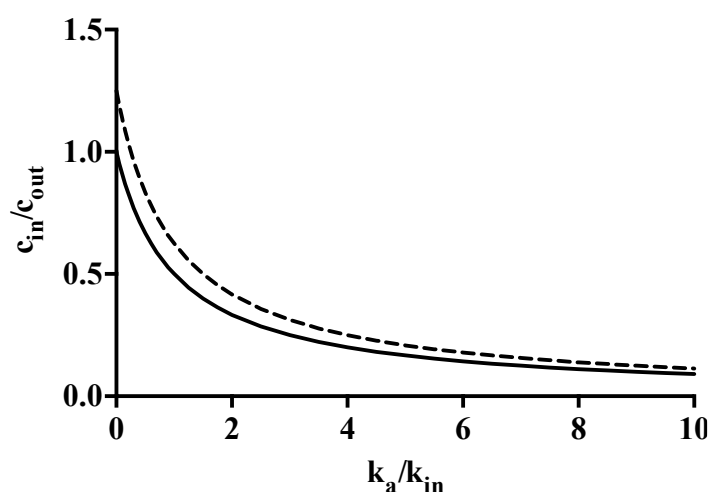
$$\frac{k_a + k_p}{k_p} = \frac{c_{out}}{c_{in}} \rightarrow \frac{k_a}{k_p} = \frac{c_{out}}{c_{in}} - 1$$

oder

$$\frac{c_{in}}{c_{out}} = \frac{k_p}{k_a + k_p} \rightarrow \frac{c_{in}}{c_{out}} = \frac{k_{in}}{k_a + k_p}$$

Wie sich der Effekt des steigenden aktiven Transports im Verhältnis zur passiven Diffusion in der intrazellulären Konzentration widerspiegelt, ist in Abbildung 4.9 dargestellt. Das abgebildete Verhältnis ist bereits durch Untersuchungen verschiedener Anthrazykline mit unterschiedlicher Lipophilie und passiver Diffusionsgeschwindigkeit untermauert worden [199]. Hierbei waren die Zellen gegenüber lipophileren Verbindungen mit einem höheren Diffusionskoeffizienten weniger resistent. Der hyperbolische Kurvenverlauf zeigt eindeutig, dass der geringe aktive Transport zu Beginn des Verlaufs einen großen Effekt auf die intrazelluläre Konzentration im Sinne einer Senkung bis zu einer Strömungsrate von etwa zwei ausübt. Die aktive Transportgeschwindigkeit bezogen

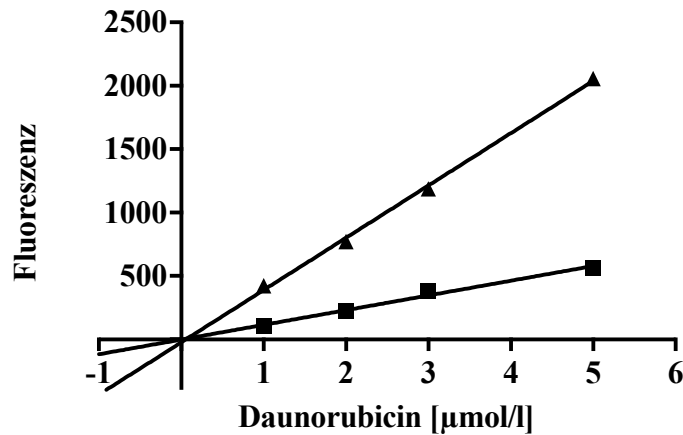
auf die weitere Abnahme der intrazellulären Konzentration der Substanz müsste nun stark ansteigen, damit eine erkennbare weitere Abnahme der intrazellulären Konzentration einträte. Eine unendlich aktive Transportgeschwindigkeit wäre notwendig um die intrazelluläre Konzentration auf null herabzusenken, was unmöglich ist. Unter Einbezug des seltenen Falles einer aktiven Aufnahme der Substanz gilt der gleiche hyperbolische Kurvenverlauf zwischen aktivem Efflux und intrazellulärer Konzentration, wobei das initiale Konzentrationsverhältnis außen zu innen größer Eins ist (Abbildung 4.9).



**Abbildung 4.9:** Verhältnis zwischen Abnahme der intrazellulären Konzentration und aktivem Efflux mit Einbezug der passiven Diffusion. Die durchgehende Linie repräsentiert nur den Fall des passiven Influx. Die unterbrochene Linie wurde unter der Annahme eines aktiven Imports, dessen Geschwindigkeit ein Viertel der Geschwindigkeit der passiven Diffusion entspricht, berechnet.

Im Fall der Fluoreszenzexperimente kann die Fluoreszenzintensität als Surrogat für die Konzentration angenommen werden, wie es in Akumulationsassays zur Charakterisierung von Inhibitoren angewandt wird. Dabei korreliert die Fluoreszenzintensität linear mit der Substratkonzentration, wenn keine weiteren Effekte wie Quenching auftreten. Die vorgestellten Verbindungen sind auf solche Interaktionen untersucht worden und zeigten keinen Einfluss auf die Fluoreszenz des verwendeten Zytostatikums Daunorubicin. Des Weiteren ist ein linearer Zusammenhang zwischen der extrazellulären Substanzkonzentration und der gemessenen Fluoreszenz, sowohl für den aktivierten als auch inhibierten Transporter, ermittelt worden (Abbildung 4.10). Der lineare Zusammenhang impliziert damit, dass andere Effekte, die die Fluoreszenzintensität verändern können, wie z. B. Quenching durch Protein- oder DNS-Bindung im Falle von Daunorubicin, proportional zur eingesetzten Konzentration sind und nicht unter

Versuchsbedingungen gesättigt vorliegen. Folglich haben solche Effekte keinen Einfluss auf den linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Fluoreszenzintensität.



**Abbildung 4.10:** Linearer Zusammenhang zwischen den Fluoreszenzwerten von Substanz 401 (maximale Inhibition bei 10 μmol/l, gefüllte Dreiecke) und Verbindung 428 (maximale Aktivierung bei 10 nmol/l, gefüllte Quadrate) bei verschiedenen Konzentrationen des Zytostatikums Daunorubicin unter Verwendung von MDCK II MRP1 Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

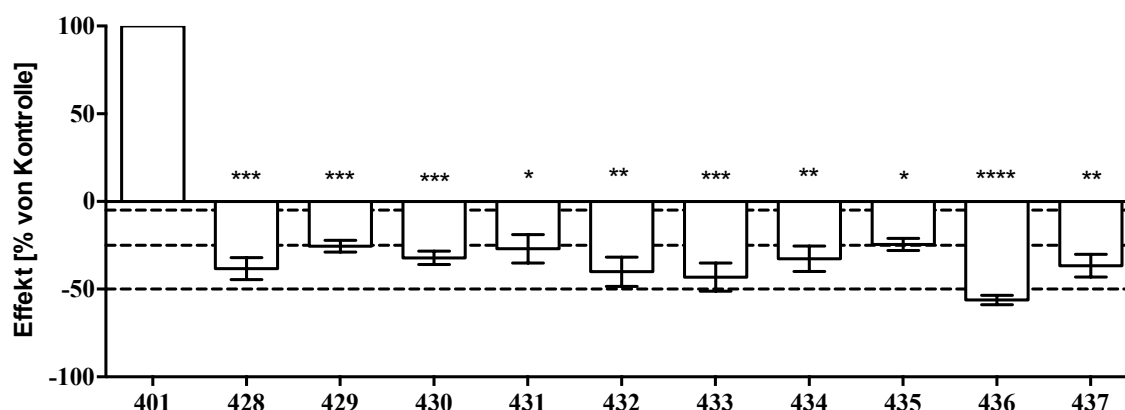
Hieraus ergibt sich, dass die maximale Fluoreszenz bei absoluter Inhibition des Transporters proportional zu  $c_{out}$  und dementsprechend die Fluoreszenz bei voller Aktivierung des Transporters proportional zu  $c_{in}$  ist. Diese beiden Konzentrationen entsprechen jeweils dem „Top“ und „Bottom“ einer kalkulierten Konzentrations-Effektcurve. Um die gemessenen Daten miteinander vergleichen zu können, wurde der Aktivierungsfaktor als die Strömungsrate in Anwesenheit eines Aktivators geteilt durch die Strömungsrate der Kontrolle, (in Abwesenheit einer Substanz) definiert.

$$\text{Aktivierungsfaktor} = \frac{\text{Strömungsrate (Aktivator)}}{\text{Strömungsrate (Kontrolle)}}$$

Der Aktivierungsfaktor gibt den x-fachen Anstieg (oder Abnahme) der Transportgeschwindigkeit wieder und macht damit unterschiedliche Datensätze vergleichbar.

#### 4.2.2. Funktionelle Untersuchungen der Pyrrolopyrimidine an ABCC1

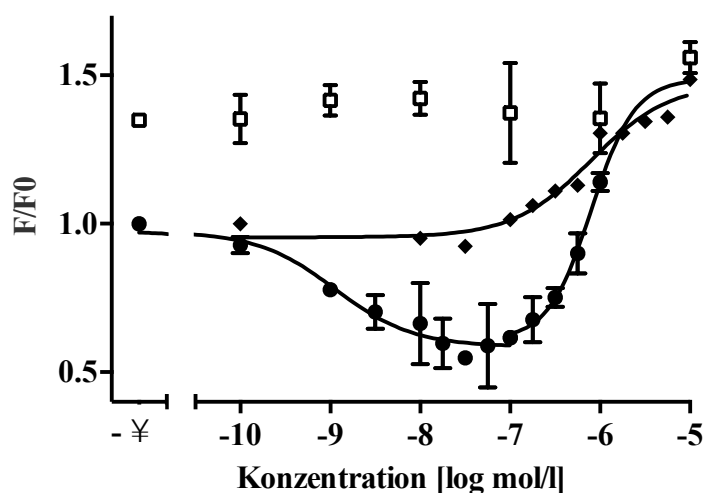
Die Substanzklasse der Pyrrolopyrimidine wurde sowohl in der Literatur als auch in dieser Arbeit mit potenten Inhibitoren von ABCC1 in Verbindung gebracht. Unter anderem wurde auch die Korrelation ihrer Effektivität mit den physikochemischen Eigenschaften, wie dem Molekulargewicht und der Lipophilie beschrieben [198]. Bei der Untersuchung dieser Substanzklasse hat sich gezeigt, dass kleine Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht den Transport von Daunorubicin durch ABCC1 im niedrigen nanomolaren Konzentrationsbereich steigerten. Nach einem Screening der Substanzbibliothek werden nun in dieser Arbeit die potentesten Aktivator der Pyrrolopyrimidine und Purine im niedrigen nanomolaren Konzentrationsbereich mit keiner oder mäßiger inhibitorischer Aktivität in niedrigen mikromolaren Konzentrationen vorgestellt. Die Etablierung der Verbindung 401 als Standardinhibitor wurde von Dr. Sven Marcel Schmitt durchgeführt.



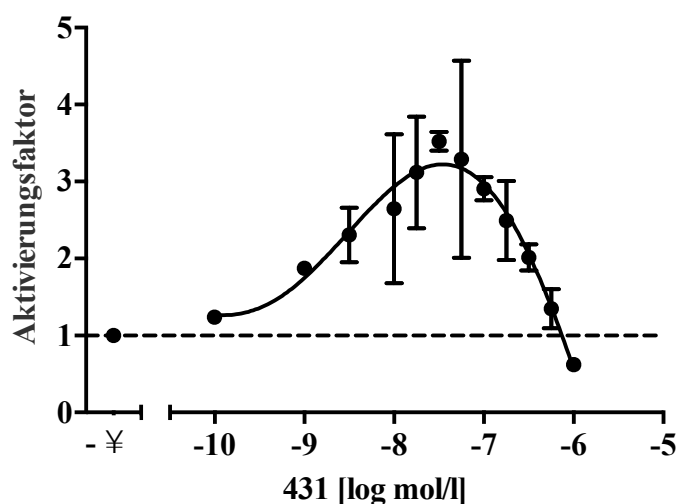
**Abbildung 4.11:** Aktivierung des Daunorubicin Transports durch ABCC1 durch die aufgeführten Substanzen bei einer Konzentration von 10 nmol/l. Die basale Transportgeschwindigkeit wurde definiert als der Fluoreszenzanstieg ohne Zugabe der Pyrrolopyrimidine bzw. Purine (0 %). Volle Inhibition durch den Standardinhibitor 401 repräsentiert 100 %. Unterbrochene Linien kennzeichnen die 5 %, 25 % und 50 % Effektgrenzen. Verwendet wurde der Daunorubicin Assay und die MDCK II MRP1 Zelllinie. Die Experimente wurden in drei unabhängigen Versuchen als Duplikate durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde durch einen einfachen t-Test ermittelt und entspricht \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ .

Die Pyrrolopyrimidine-Derivate 428, 429, 430, 431, 432 und 433 beschleunigten den Transport von Daunorubicin, wie in Abbildung 4.11 zu sehen. Dabei wurden die Substanzen untereinander bei 10 nmol/l verglichen, da die genannte Konzentration sich bei

den meisten Vertretern als die mit der maximalen Aktivierung herausgestellt hatte. Eine repräsentative Konzentrations-Effektkurve der Verbindung 431 ist im Vergleich zum Standard 401 in Abbildung 4.12 dargestellt. Abbildung 4.13 verdeutlicht zusätzlich die Konzentrationsabhängigkeit des Aktivierungsfaktors von ABCC1. Die Berechnung des Aktivierungsfaktors der genannten Derivate resultierte hier in einem Anstieg von 68-98 % im Vergleich zu der basalen Pumpgeschwindigkeit im Daunorubicin Akkumulationsassay (siehe Tabelle 4.8).



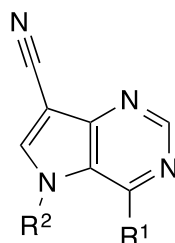
**Abbildung 4.12:** Konzentrations-Effektkurve der Verbindung 431 (gefüllte Kreise) im Vergleich zu 401 (gefüllte Rauten) im Daunorubicin Assay unter Verwendung der MDCK II MRP1 Zelllinie sowie der sensitiven Zelllinie MDCK II (leere Quadrate). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis einer Messung in Duplikaten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.



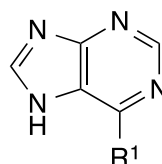
**Abbildung 4.13:** Berechneter Kurvenverlauf des konzentrationsabhängigen Aktivierungsfaktors der Verbindung 431 aus dem repräsentativen Ergebnis gezeigt in Abbildung 4.12.



**Tabelle 4.8:** Aktivitäten der untersuchten Pyrrolopyrimidine und Purine. Zur Bestimmung des Aktivierungseffektes sowie der Inhibition wurde die Messung mit dem Daunorubicin Akkumulationsassay durchgeführt unter Verwendung der MDCK II MRP1 Zelllinie. Die Experimente wurden in Duplikaten und in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD.



428 - 433



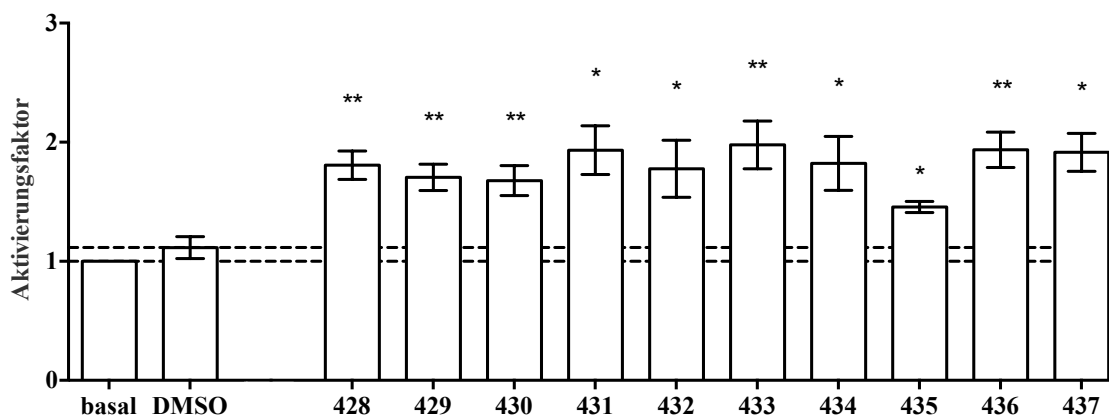
434 - 437

Substanz	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Akt.faktor	Daunorubicin
			bei 10 nmol/l % $\pm$ SD	IC <sub>50</sub> $\pm$ SD [ $\mu$ mol/l]
428	Benzylamino	Methyl	181 $\pm$ 14	17,1 $\pm$ 4,4
429	Benzylamino	Phenyl	171 $\pm$ 14	4,02 $\pm$ 0,81
430	Benzylamino	Benzyl	168 $\pm$ 16	7,43 $\pm$ 1,76
431	Phenylpropylamino	Benzyl	193 $\pm$ 27	0,790 $\pm$ 0,141
432	Phenylethylamino	Phenylethyl	178 $\pm$ 35	1,47 $\pm$ 0,45
433	Phenylpropylamino	Phenylethyl	198 $\pm$ 25	0,827 $\pm$ 0,104
434	Phenylethylpiperazinyl	H	182 $\pm$ 29	20,0 $\pm$ 0,8
435	Benzylpiperazinyl	H	146 $\pm$ 8	23,9 $\pm$ 9,7
436	Diphenylmethylpiperazinyl	H	194 $\pm$ 18	18,5 $\pm$ 6,6
437	Phenylpiperazinyl	H	192 $\pm$ 23	32,5 $\pm$ 14,7

Innerhalb der Reihe der Pyrrolopyrimidine ließ sich eine Tendenz im Zusammenhang mit dem Molekulargewicht erkennen. So hatten die Derivate mit einem Molekulargewicht kleiner als 350 Da (428, 429 und 430) keine oder nur eine schwache inhibitorische Aktivität gegenüber ABCC1, während Derivate mit einem höheren Molekulargewicht (431, 432 und 433) eine moderate bis gute Hemmwirkung besaßen (Tabelle 4.8).

Neben Pyrrolopyrimidinen wurde auch die Substanzklasse der Purine auf ihre aktivatorischen Fähigkeiten hin untersucht und einige Derivate gefunden, die ebenfalls den Daunorubicin Efflux stimulierten (Abbildung 4.11 und 4.14). Dabei wurde der ABCC1

induzierte Efflux von Daunorubicin um 46-94 % erhöht (Tabelle 4.8). Im Vergleich zu den Pyrrolopyrimidinen waren die untersuchten Purine sehr schwache Inhibitoren von ABCC1. Offensichtlich hebt die Purin-Struktur die inhibitorische Wirkung der Verbindungen beinahe vollständig auf.

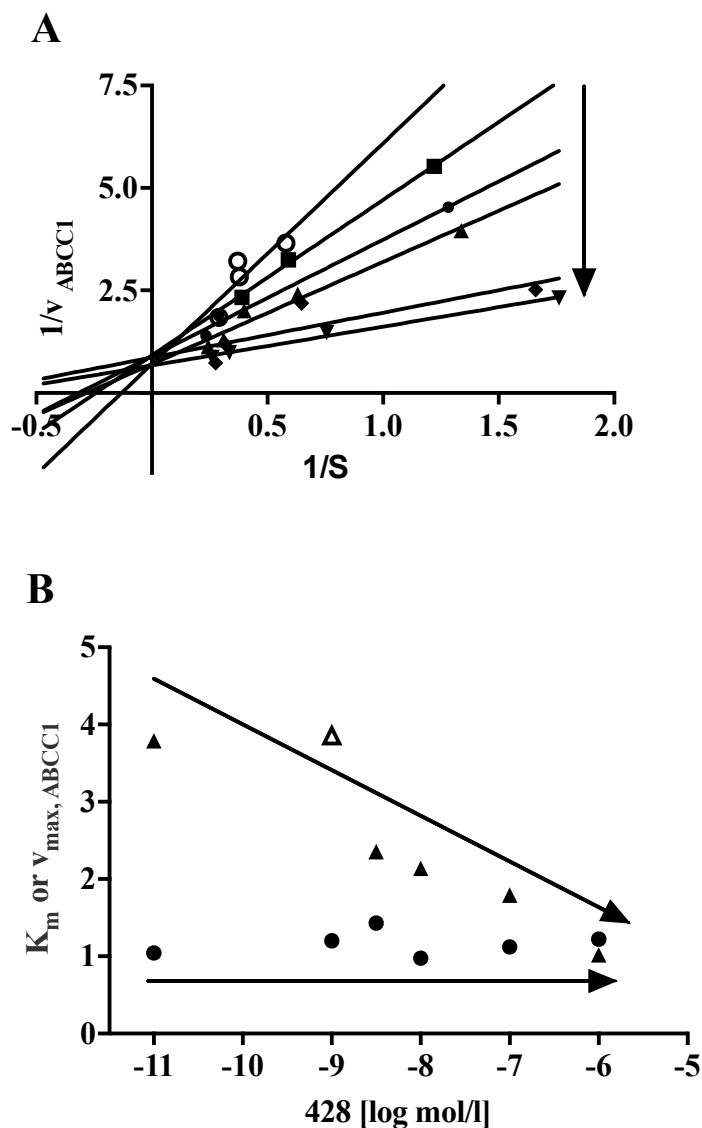


**Abbildung 4.14:** Einfluss der Pyrrolopyrimidine und Purine (10 nmol/l) auf den Transport von ABCC1. Die berechneten Effekte sind im Vergleich zur basalen Aktivität, sowie der Aktivität einer DMSO-haltigen Probe, die dieselbe Konzentration hatte wie in allen anderen Proben vorhanden (1  $\mu$ mol/l), dargestellt. Unter Verwendung des Daunorubicin Assays und der MDCK II MRP1 Zelllinie wurden die Experimente in drei unabhängigen Versuchen als Duplikate durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde durch einen einfachen t-Test ermittelt und entspricht: \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; der hypothetische Wert für DMSO liegt bei 1,115.

Die hier durch den Daunorubicin Akkumulationsassay erhobenen Ergebnisse konnten in der Veröffentlichung [198] und der Dissertation von Dr. Sven Marcel Stefan [197] mit einem weiteren Akkumulationsassay unter Verwendung des ABCC1 Substrats Calcein AM in H69 AR Zellen bestätigt werden. Da die gefundenen Effekte vergleichbar waren, wurde ein substrat- oder zellspezifischer Effekt als Auslöser der beobachteten Aktivierung des Transporters durch Pyrrolopyrimidine und Purine ausgeschlossen. Auch die Untersuchung der sensitiven Zelllinien H69 und MDCK II zeigte keine spezifischen Effekte auf die Zellen. In Abbildung 4.12 ist die Akkumulation von Daunorubicin unter Nutzung von MDCK II Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration der Verbindung 431 gezeigt. Da keine Änderung der intrazellulären Konzentration dieses Zytostatikums beobachtet wurde, kann der Schluss gezogen werden, dass die hier vorgestellten Derivate der Pyrrolopyrimidine und Purine nicht mit der Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes bzw. Zytostatikums durch Membranfluidität oder Änderungen der Membranbeständigkeit oder anderen Membran-assoziierten Effekten interagieren.

### 4.2.3. Untersuchung des Bindungsverhaltens

Desweiteren wurden enzymkinetische Studien durchgeführt, um den Typ der Aktivierung zu bestimmen. In Abbildungen 4.15 A und B sind sowohl ein Lineweaver-Burk Plot als auch die Auswertung nach Cornish-Bowden dargestellt.

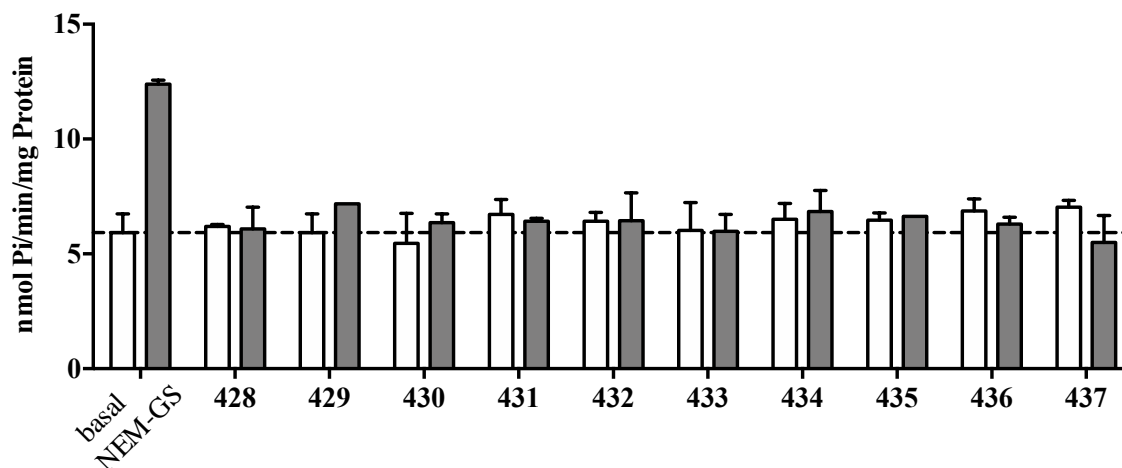


**Abbildung 4.15:** Kinetische Analyse der Daten bezüglich Aktivierung erhalten aus dem Daunorubicin Assay mit MDCK II MRP1 Zellen. (A) Lineweaver-Burk-Diagramm für den ABCC1 Aktivator 428 bei verschiedenen Konzentrationen in Verbindung mit dem ABCC1 Substrat Daunorubicin. Eingesetzte Aktivatorkonzentrationen: 0 nmol/l (leere Kreise), 1,0 nmol/l (gefüllte Rauten), 3,2 nmol/l (leere Dreiecke), 10 nmol/l (gefüllte Kreise), 100 nmol/l (leere Quadrate) und 0,1  $\mu$ mol/l (gefüllte Dreiecke). (B) Cornish-Bowden-Diagramm für den ABCC1 Aktivator 428;  $K_m$  (gefüllte Dreiecke),  $v_{max}$  (gefüllte Kreise) und Ausreißer (leeres Dreieck). Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse einer Messung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten durchgeführt als Duplikate.

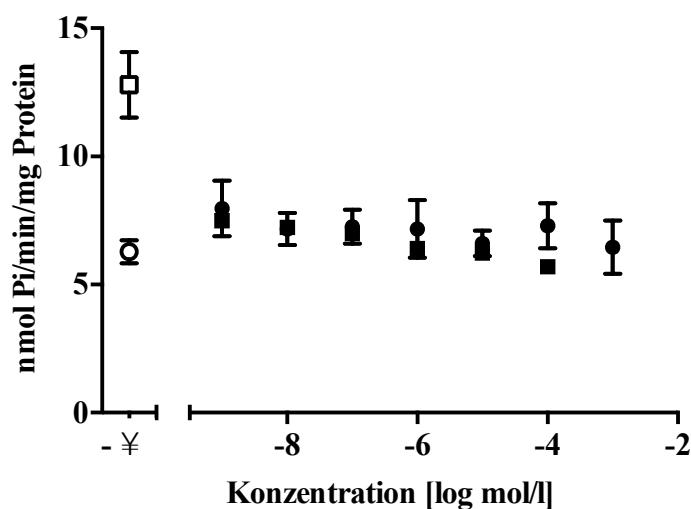
Im ersteren ist ein Schnittpunkt auf der y-Achse sowie eine durch den beschleunigten Transport abnehmende Steigung der Geraden zu verzeichnen. Im zweiten Diagramm bleibt  $v_{\max}$  konstant während  $K_m$  sinkt. Beide Methoden beschreiben einen kompetitiven Interaktionstyp, was an einer gesteigerten Affinität des Substrats zu erkennen ist. Das gefundene Ergebnis entspricht in der Literatur einem sogenannten non-essential Aktivator [196] und wird unter andern auch als schein kompetitiv bezeichnet. Dabei findet die Interaktion mittels einer allosterischen Aktivierung statt [200]. In der Theorie bedeutet dies, dass der Aktivator an dieselbe Bindungsstelle wie das Substrat binden müsste, was unmöglich ist. Eine allosterische Aktivierung beschreibt diesen Fall dann korrekt, wenn von einem sehr starken Anstieg der Affinität des Substrates, verursacht durch den Aktivator, ausgegangen wird. Allerdings handelt es sich hierbei nicht um ein Enzym, sondern ein Transporter, bei dem die Lage und Anzahl der möglichen Bindungen innerhalb der Bindungstasche nicht geklärt sind. Auch ist unklar, wie viele Faktoren beim Transportprozess beteiligt sind, sodass die beschriebenen vereinfachten enzymatischen Gleichungen nur zur Orientierung dienen und mit der Interpretation der Ergebnisse gewissenhaft umgegangen werden sollte.

#### **4.2.4. Untersuchung der Aktivierung der ABCC1 ATPase**

Um den Aktivierungscharakter der vorgestellten Substanzen näher zu charakterisieren, wurden diese im ABCC1 ATPase Assay untersucht. Hierfür wurden die Verbindungen bei Konzentrationen von 10 nmol/l und 1  $\mu$ mol/l getestet. Wie in Abbildung 4.16 zu erkennen ist, zeigten weder die Derivate der Pyrrolopyrimidine noch die der Purine aktivatorische Eigenschaften. Dieses Ergebnis wurde so nicht erwartet, bestätigt demzufolge aber, dass der Verbrauch von ATP nur indirekt mit dem Transport von Substraten, wie bereits auch in anderen Studien festgestellt wurde [188], gekoppelt ist.



**Abbildung 4.16:** Effekte der Pyrrolopyrimidine und Purine bei einer Konzentration von 10 nmol/l (graue Balken) und 1 µmol/l (weiße Balken) im ABCC1 ATPase Assay. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung.

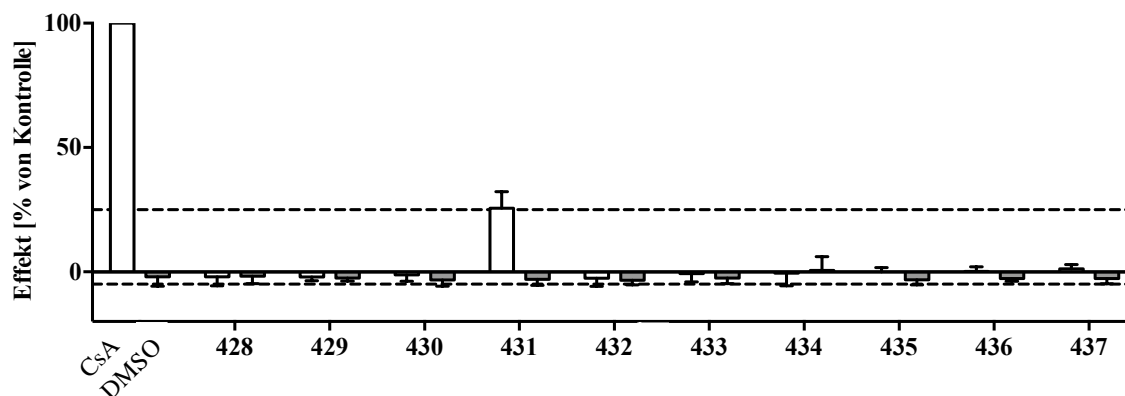


**Abbildung 4.17:** Konzentrations-Effektkurven von Verbindungen 428 (gefüllte Kreise) und 436 (gefüllte Quadrate). Kontrollwerte sind dargestellt durch Dimethylsulfoxid (leerer Kreis) für die Basalaktivität und NEM-GS (10 mmol/l; leeres Quadrat) als Positivkontrolle. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung.

#### 4.2.5. Untersuchung der Aktivierung und Inhibition an ABCB1 und ABCG2

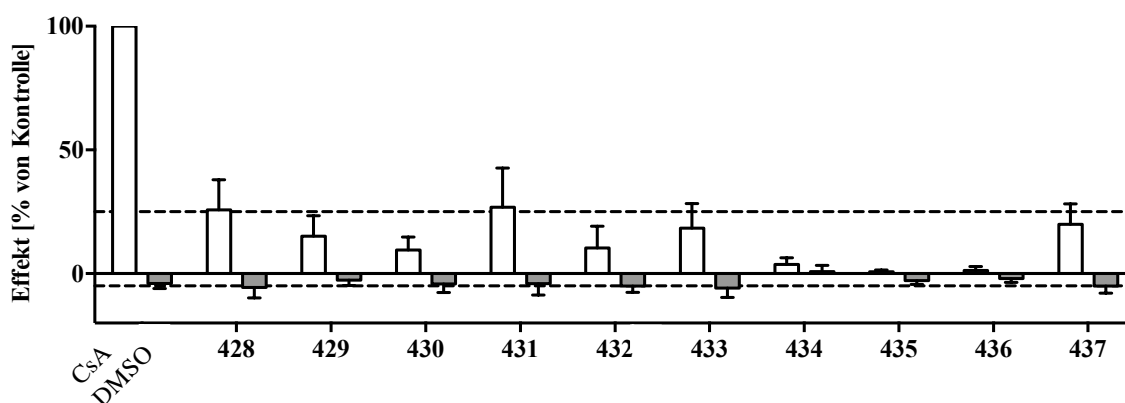
Um eine Selektivität oder Breitspektruminteraktion der untersuchten Pyrrolopyrimidine und Purine festzustellen, wurden die Verbindungen an den Transportern ABCB1 und ABCG2 hinsichtlich ihrer aktivatorischen, sowie inhibitorischen Fähigkeiten evaluiert. Wie Abbildung 4.18 dargestellt, waren weder aktivatorische noch inhibitorische Effekte

bei 10 nmol/l bzw. 10  $\mu\text{mol/l}$  im Vergleich zum Standardinhibitor Ciclosporin A (ABCB1) zu erkennen. Eine Ausnahme bildet Verbindung 431, welche eine moderate inhibitorische Potenz mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 1,40  $\mu\text{mol/l}$  gegenüber ABCB1 besaß (Tabelle 4.9).



**Abbildung 4.18:** Prozentuale Effekte der Pyrrolopyrimidine und Purine bei einer Konzentration von 10 nmol/l (graue Balken) und 10  $\mu\text{mol/l}$  (weiße Balken) auf die Akkumulation des Substrates Calcein AM in ABCB1-überexprimierenden A2780 adr Zellen. Die gemessenen Werte wurden auf den Standardinhibitor Ciclosporin A (CsA; 10  $\mu\text{mol/l}$ ) normalisiert. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Das Transportprotein ABCG2 wurde von den meisten Derivaten weder inhibiert noch aktiviert. Als Ausnahmen könnten Substanzen 428 und 431 angesehen werden, welche einen schwachen inhibitorischen Effekt gegenüber ABCG2 ( $\text{IC}_{50}$ -Werte  $\sim$  20  $\mu\text{mol/l}$ ) ausübten (Abbildung 4.19 und Tabelle 4.9).



**Abbildung 4.19:** Prozentuale Effekte der Pyrrolopyrimidine und Purine bei einer Konzentration von 10 nmol/l (graue Balken) und 10  $\mu\text{mol/l}$  (weiße Balken) auf die Akkumulation des Substrates Pheophorbid A in ABCG2-überexprimierenden MDCK II BCRP Zellen. Die gemessenen Werte wurden auf den Standardinhibitor Ko143 (10  $\mu\text{mol/l}$ ) normalisiert. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

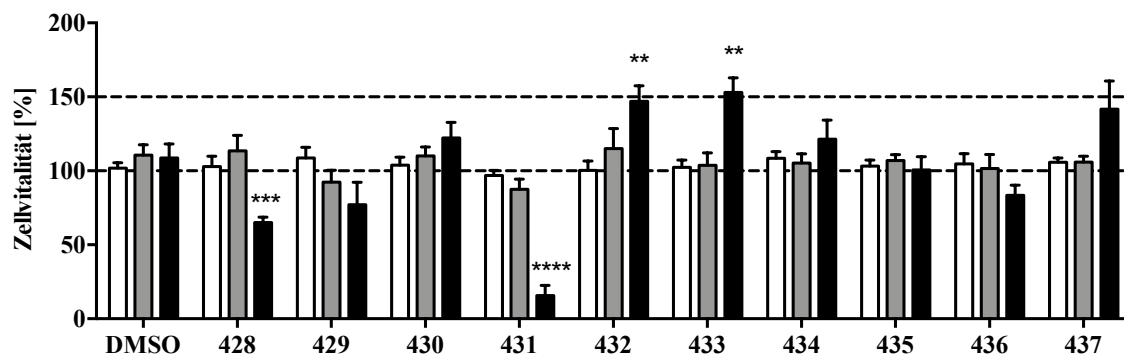
**Tabelle 4.9:** Inhibitorische Aktivität der potentesten Pyrrolopyrimidine und Purine gegenüber ABCB1 und ABCG2 im Calcein AM bzw. Pheophorbid A Assay. Getestet wurden die Substanzen, die im Screening bei 10  $\mu\text{mol/l}$  ein Inhibitionslevel von mindestens 25 % aufzeigten. Die berechneten  $\text{IC}_{50}$ -Werte wurden aus Konzentrations-Effektcurven generiert. Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten; k.a.: keine Aktivität.

Substanz	$\text{R}^1$	$\text{R}^2$	ABCB1	ABCG2
			Calcein AM $\text{IC}_{50} \pm \text{SD} [\mu\text{mol/l}]$	Pheophorbid A $\text{IC}_{50} \pm \text{SD} [\mu\text{mol/l}]$
428	Benzylamino	Methyl	k.a.	$20,6 \pm 1,4$
431	Phenylpropylamino	Benzyl	$14,0 \pm 0,3$	$20,4 \pm 1,6$

Damit sind die hier vorgestellten und untersuchten Derivate der Pyrrolopyrimidine und Purine selektive Aktivatoren des Transporters ABCC1.

#### 4.2.6. Untersuchung der zellulären Toxizität der Pyrrolopyrimidine und Purine

Um spezifische Effekte der Verbindungen auszuschließen, wurden MTT-basierte Vitalitäts-Assays durchgeführt um die intrinsische Toxizität zu bestimmen. Bis auf die Verbindung 431 ( $\text{GI}_{50}$ -Wert =  $31,8 \mu\text{mol/l}$ ; MDCK II MRP1 Zellen) waren die übrigen Substanzen nicht toxisch (siehe Abbildung 4.20). Auch auf andere Zelllinien, wie die sensitive Zelllinie MDCK II sowie die ABCB1- und ABCG2-überexprimierenden A2780 adr und MDCK II BCRP Zellen hatten die Aktivatoren keinen toxischen Einfluss. Tabelle 4.10 fasst die  $\text{GI}_{50}$ -Werte aller Derivate in verschiedenen selektierten bzw. transfizierten Zelllinien zusammen. Bei Konzentrationen zwischen  $1 \mu\text{mol/l}$  und  $10 \mu\text{mol/l}$  waren alle Verbindungen untoxisch und hatten somit keinen Einfluss auf das Zellwachstum und die Vitalität der Zellen. Lediglich 428 und 431 senkten die Zellvitalität bei einer Konzentration von  $100 \mu\text{mol/l}$ , die 10fach höher ist, als die im Akkumulationsassay verwendete. Diesem Ergebnis entgegenstehend vermochten die Substanzen 430, 432, 433, 434 und 437 bei steigender Konzentration die Zellvitalität sogar zu steigern. Dieser Effekt war bei den Verbindungen 432 und 433 ( $100 \mu\text{mol/l}$ ) besonders ausgeprägt.



**Abbildung 4.20:** Effekte der Pyrrolopyrimidine und Purine bei einer Konzentration von 1 µmol/l (weiße Balken), 10 µmol/l (graue Balken) und 100 µmol/l (schwarze Balken) auf die zelluläre Vitalität in ABCC1-überexprimierenden MDCK II MRP1 Zellen. Die Referenz DMSO (10 %) repräsentiert den Lösungsmittelanteil wie in den untersuchten Proben bei 1 µmol/l, 10 µmol/l und 100 µmol/l vorhanden. Die Bestimmung wurde mit einem MTT-basierten Vitalitäts-Assay durchgeführt. Die Absorptionen wurden durch Definition der Kontrollen, Nährmedium (100 %) und 10 % DMSO (0 %) bestimmt. Die Experimente wurden in drei unabhängigen Versuchen als Duplikate durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert ± SD. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde durch einen einfachen t-Test ermittelt und entspricht \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ .

**Tabelle 4.10:** Berechnete GI<sub>50</sub>-Werte ausgewählter Pyrrolopyrimidine und Purine für ABCC1-, ABCB1- und ABCG2-überexprimierenden Zelllinien sowie deren unselektierten/untrasfizierten Varianten. Die Ergebnisse wurden aus einem MTT-basierten Vitalitäts-Assay in Duplikaten und in drei unabhängigen Versuchen erhalten. Gezeigt sind Mittelwert ± SD.

Substanz	MDCK II MRP1	MDCK II	A2780 adr	MDCK II BCRP
	GI <sub>50</sub> ± SD	GI <sub>50</sub> ± SD	GI <sub>50</sub> ± SD	GI <sub>50</sub> ± SD
	[µmol/l]	[µmol/l]	[µmol/l]	[µmol/l]
428	> 100	> 100	85,5 ± 21,2	82,8 ± 11,0
429	> 100	69,8 ± 25,1	74,2 ± 36,5	37,4 ± 14,8
430	> 100	> 100	85,3 ± 9,0	> 100
431	31,8 ± 3,0	29,7 ± 2,1	32,8 ± 8,6	18,5 ± 6,6
432	> 100	> 100	66,1 ± 8,7	> 100
433	> 100	> 100	> 100	> 100
434	> 100	> 100	79,4 ± 14,3	> 100
435	> 100	> 100	63,7 ± 5,6	85,6 ± 20,4
436	> 100	> 100	61,5 ± 18,5	79,6 ± 28,9
437	> 100	> 100	36,8 ± 1,1	> 100



Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die Derivate der Pyrrolopyrimidine und Purine bis auf die wenigen Ausnahmen während der Inkubationszeit von 72 Stunden keinen Einfluss auf die Membranbeständigkeit ausübten und in begrenztem Umfang sogar in der Lage waren, die Zellvitalität zu steigern.

#### **4.2.6. Zusammenfassung der Ergebnisse**

Allgemein sind Aktivatoren von ABC-Transportern nur wenig erforscht und es gibt in der Literatur nur wenige Daten zu Substanzen, die den Transporter-induzierten Efflux von Xenobiotika aktivieren [54,55,72-75,201-203]. Aufgrund der geringen Datenlage sollten die hier dargelegten Ergebnisse helfen, Effluxtransporter besser zu verstehen und die Zusammenhänge zwischen ihrer Aktivität und Funktion näher zu beleuchten [133,135].

Während Pyrrolopyrimidine mit hoher Lipophilie und Molekulargewicht bereits als potente und selektive Inhibitoren von ABCC1 bekannt sind [119,198], vermögen hingegen Derivate mit geringerem Molekulargewicht den ABCC1-induzierten Transport von bekannten Substraten, wie Daunorubicin und Calcein AM zu stimulieren. Die Purin-Analoga waren ebenfalls als Aktivatoren effektiv, wobei die Transportgeschwindigkeit in gleichem Ausmaß wie bei Pyrrolopyrimidinen gesteigert wurde. Aufgrund keiner nennenswerter Effekte an der sensitiven Zelllinie, konnte die überwiegend extrazelluläre Verteilung des Substrates allein durch die Transportgeschwindigkeit des ABCC1 erklärt werden. Das Muster der Substitution in Positionen 4 oder 5 hatte dabei keinen Einfluss auf den aktivatorischen Effekt. Bei den Pyrrolopyrimidinen konnten, wie schon zuvor beschrieben [198], anhand des Molekulargewichtes Unterschiede in der inhibitorischen Aktivität festgestellt werden. So waren Derivate (428, 429 und 430) mit einem Molekulargewicht < 350 Da keine oder nur schwache Inhibitoren von ABCC1, wohingegen Substanzen (431, 432 und 433) mit einem Molekulargewicht > 350 Da moderate bis gute ABCC1 Inhibition zeigten. Hervorzuheben ist die Verbindung 431, die nicht nur ein guter Aktivator des ABCC1-Transporters war, sondern auch alle hier untersuchten Transporter ABCB1, ABCC1 und ABCG2 im niedrigen ein- bis zweistelligen mikromolaren Bereich inhibierte. Damit ist diese Substanz ein guter Repräsentant von Breitspektrum-inhibitoren. Demgegenüber wiesen die ebenfalls untersuchten Purin-

Analoga keine inhibitorische Aktivität gegenüber ABCC1 oder den beiden anderen Transportern auf.

Bis auf die Verbindung 431, die sich durch eine geringe toxische Wirkung auf die untersuchten Zelllinien auszeichnete, wurde keine zelluläre Toxizität für die anderen Derivate festgestellt. Dies bestätigt die Annahme, dass die extrazelluläre Verteilung der Fluoreszenzfarbstoffe durch die Aktivierung des ABCC1-Transporters begründet war und nicht womöglich auf spezifischen Effekten an der Zellbarriere basierte.

Zusammenfassend bieten die Derivate der Pyrrolopyrimidine sowie die Analoga der Purine einen Ansatz zum Verständnis der ablaufenden Mechanismen der Transportprozesse, wie Erkennung des Substrats, sowie dessen Bindung, Transport und Freisetzung. Auch bietet die Betrachtung der Beziehung zwischen der ATP-Hydrolyse und die damit einhergehende Änderung der Konformation für den Transport eine neue Sicht zur Funktion des Transportproteins ABCC1.

### **4.3. Pyrrolo- und Indolopyrimidine – neue Breitspektruminhibitoren der ABC-Transporter ABCB1, ABCC1 und ABCG2**

In der Literatur sind nur wenige Berichte bezüglich Breitspektruminhibitoren der ABC-Transporter ABCB1, ABCC1 und ABCG2 zu finden [110,167,198,204-209]. Die Forschung konzentrierte sich bis heute hauptsächlich auf selektive Inhibitoren, die als Ziel nur einen der genannten Transporter haben. Die Datenlage in Bezug auf Dualinhibitoren ist weniger dünn, insbesondere in Bezug auf ABCB1 und ABCC1 [108,109,114,119,120,198,210-217] sowie ABCB1 und ABCG2 [163,164,166,169,171,187,218-226]. Im Gegensatz hierzu sind kaum duale ABCC1 / ABCG2 Inhibitoren bekannt [198,227-229]. Die gleichzeitige Co-Expression von zwei oder mehreren ABC-Transportproteinen innerhalb einer Krebszelle führt trotz Inhibition eines einzigen Transports weiterhin zur Multidrug Resistenz und damit zu einer erfolglosen Chemotherapie [230]. Die Hemmung der drei bekannten und wichtigen ABC-Transporter schließt eventuell die vorhandene Lücke bei Versagen von Therapien trotz Einsatz selektiver ABC-Transporter Inhibitoren, die die Expression eines anderen Transporters steigern kann [231,232].

Die in diesem Kapitel beschriebenen Pyrrolo- und Indolopyrimidine wurde von Dr. Sven Marcel Stefan synthetisiert und im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit funktionell untersucht.

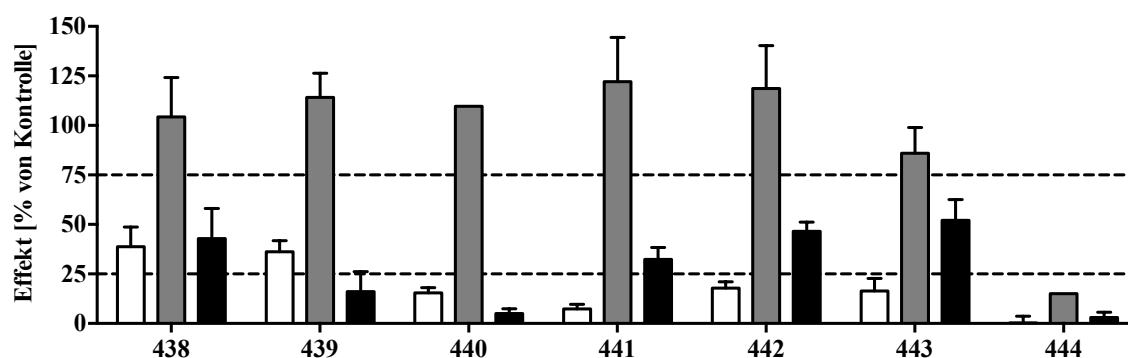
#### **4.3.1. Funktionelle Untersuchungen der Pyrrolo- und Indolopyrimidine an ABCB1, ABCC1 und ABCG2**

Die untersuchten Verbindungen der Pyrrolo- und Indolopyrimidine wurden nach struktureller Verwandtschaft in vier Gruppen eingeteilt:

- I. 7,8-zyklisierte Pyrrolopyrimidine, die einen Stickstoff im heterozyklischen Rest in Position 4 tragen
- II. Pyrrolopyrimidine mit einem (2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)piperazin-1-yl-Rest in Position 4 und aliphatischen oder aliphatisch-aromatischen Variationen in Position 5

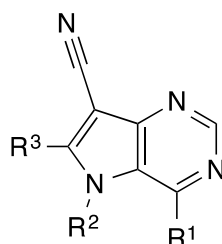
- III. 7,8-zyklisierte Pyrrolopyrimidine, die einen Sauerstoff im heterozyklischen Rest in Positionen 4 oder 5 tragen
- IV. Indolopyrimidine mit Variationen in Position 4

In Abbildung 4.21 sind die Screening-Ergebnisse der Gruppe I vorgestellt. Verbindung 438 wurde bereits von Wang et al. [119] vorgestellt, sowie auch der etablierte ABCC1 Standard Inhibitor 401 [198]. Erstgenannte war die Ausgangsstruktur für die Synthesen von Dr. Stefan.



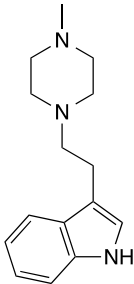
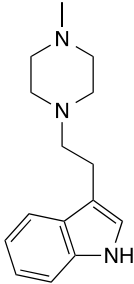
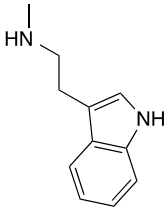
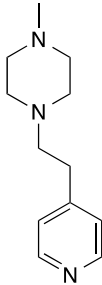
**Abbildung 4.19:** Prozentuale Effekte der Pyrrolopyrimidine aus Gruppe I bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  hinsichtlich der Akkumulation des Substrates Calcein AM in ABCB1-überexprimierenden A2780 adr Zellen (weiße Balken), Daunorubicin in ABCC1-überexprimierenden H69 AR Zellen (graue Balken) und Pheophorbid A in ABCG2-überexprimierenden MDCK II BCRP Zellen (schwarze Balken). Die gemessenen Werte wurden bei ABCB1 auf den Standardinhibitor Ciclosporin A (10  $\mu\text{mol/l}$ ), bei ABCC1 auf den Standardinhibitor 401 (10  $\mu\text{mol/l}$ ) und bei ABCG2 auf den Standardinhibitor Ko143 (10  $\mu\text{mol/l}$ ) normalisiert. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

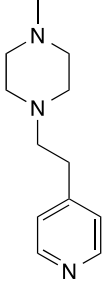
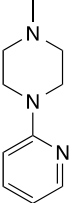
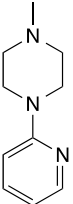
**Tabelle 4.11:** Aktivitäten der untersuchten Pyrrolopyrimidine aus der Gruppe I gegenüber ABCB1 im Calcein AM Akkumulationsassay unter Verwendung der A2780 adr Zelllinie. n.b. nicht bestimmbar, aufgrund von Löslichkeitsproblemen. Die Experimente wurden in Duplikaten und in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD.



Substanz	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	ABCB1 Calcein AM IC <sub>50</sub> $\pm$ SD [ $\mu$ mol/l]
438	4-(2-(1 <i>H</i> -indole-3-yl)ethyl)piperazin-1-yl	Cyclohexyl		5,62 $\pm$ 1,05
439	4-(2-(1 <i>H</i> -indole-3-yl)ethyl)piperazin-1-yl	Cycloheptyl		1,71 $\pm$ 0,40
444	4-(pyridin-2-yl) piperazin-1-yl	Cycloheptyl		n.b.

**Tabelle 4.12:** Aktivitäten der untersuchten Pyrrolopyrimidine aus der Gruppe I an ABCC1 im Daunorubicin Akkumulationsassay unter Verwendung der H69 AR Zelllinie. n.b. nicht bestimmbar, aufgrund von Löslichkeitsproblemen. Die Experimente wurden in Duplikaten und in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD.

Substanz	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	ABCC1 Daunorubicin IC <sub>50</sub> $\pm$ SD [ $\mu$ mol/l]
438	4-(2-(1 <i>H</i> -indole-3-yl)ethyl)piperazin-1-yl	Cyclohexyl		0,344 $\pm$ 0,066
				
439	4-(2-(1 <i>H</i> -indole-3-yl)ethyl)piperazin-1-yl	Cycloheptyl		0,289 $\pm$ 0,021
				
440	(2-(1 <i>H</i> -indole-3-yl)ethyl)amino	Cyclohexyl		0,957 $\pm$ 0,050
				
441	4-(2-(pyridin-4-yl)ethyl)piperazin-1-yl	Cyclohexyl		0,652 $\pm$ 0,089
				

Substanz	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	ABCC1 Daunorubicin IC <sub>50</sub> ± SD [μmol/l]
442	4-(2-(pyridin-4-yl)ethyl)piperazin-1-yl	Cycloheptyl		1,14 ± 0,22
				
443	4-(pyridin-2-yl) piperazin-1-yl	Cyclohexyl		1,02 ± 0,04
				
444	4-(pyridin-2-yl) piperazin-1-yl	Cycloheptyl		n.b.
				

**Tabelle 4.13:** Aktivitäten der untersuchten Pyrrolopyrimidine aus der Gruppe I an ABCG2 im Pheophorbid A Akkumulationsassay unter Verwendung der MDCK II BCRP Zelllinie. n.b. nicht bestimmbar, aufgrund von Löslichkeitsproblemen. Die Experimente wurden in Duplikaten und in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert ± SD.

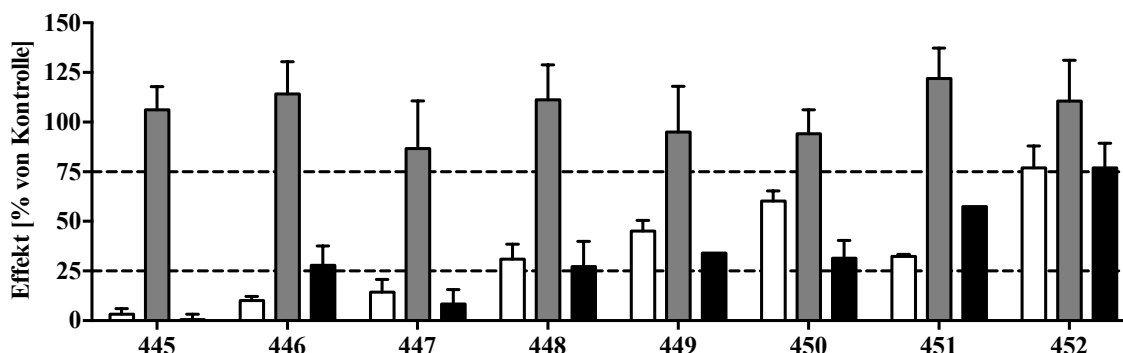
Substanz	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	ABCG2 Pheophorbid A IC <sub>50</sub> ± SD [μmol/l]
438	4-(2-(1 <i>H</i> -indole-3-yl)ethyl)piperazin-1-yl	Cyclohexyl		3,41 ± 0,75
441	4-(2-(pyridin-4-yl)ethyl)piperazin-1-yl	Cyclohexyl		27,8 ± 12,3
442	4-(2-(pyridin-4-yl)ethyl)piperazin-1-yl	Cycloheptyl		12,4 ± 1,3
443	4-(pyridin-2-yl) piperazin-1-yl	Cyclohexyl		4,86 ± 0,32
444	4-(pyridin-2-yl) piperazin-1-yl	Cycloheptyl		n.b.

Wie in Abbildung 4.21 sowie in Tabellen 4.11, 4.12 und 4.13 zu sehen, hemmte die Substanz 438 ABCB1 und ABCC1 mit  $IC_{50}$ -Werten von  $IC_{50} = 5,52 \mu\text{mol/l}$  (ABCB1) und  $IC_{50} = 0,344 \mu\text{mol/l}$  (ABCC1). Diese ermittelten Werte waren denen aus der Arbeit von Wang et al. sehr ähnlich ( $IC_{50(\text{ABCB1})} = 5,82 \mu\text{mol/l}$ ;  $IC_{50(\text{ABCC1})} = 0,6 \mu\text{mol/l}$ ). Zusätzlich wurde durch die Messung der Inhibition von ABCG2 eine inhibitorische Aktivität mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $3,41 \mu\text{mol/l}$  festgestellt. Damit ist diese Verbindung ein guter Dreifachinhibitor. Die Einführung des Cycloheptylringes beruht auf dem Erkenntnis des vorigen Projekts, dass die Steigerung des Molekulargewichtes die Aktivität in Bezug auf die Inhibition von ABCB1 und ABCC1 steigert [198]. Die hieraus resultierende Verbindung 439 belegte diese These mit niedrigeren  $IC_{50}$ -Werten für ABCB1 ( $IC_{50} = 1,71 \mu\text{mol/l}$ ) und ABCC1 ( $IC_{50} = 0,289 \mu\text{mol/l}$ ). Im Fall des Transportproteins ABCG2 ist die Aktivität hingegen erloschen und die Verbindung damit ein potenter ABCB1/ABCC1 Dualinhibitor. Die Entfernung der Piperazin-Partialstruktur (Substanz 440), führte zu einem selektiven ABCC1 Inhibitor im submikromolaren Bereich ( $IC_{50} = 0,957 \mu\text{mol/l}$ ).

Eine Pyridin-Partialstruktur mit Alkyllinker ist in der Literatur mit einem positiven Effekt auf eine ABCB1 und ABCC1 Inhibition beschrieben. So sind Verbindungen wie NIK-250 oder Biricodar (VX-710) Vertreter, die gute inhibitorische Aktivität im Falle der oben genannten Transportproteine zeigten [110,205,206,212,213]. Innerhalb dieses Projekts sind die Substanzen 441 und 442 entsprechende Pyridin-Analoga zu den Verbindungen 438 und 439. Diese erwiesen sich als duale ABCC1 und ABCG2 Inhibitoren (441;  $IC_{50(\text{ABCC1})} = 0,652 \mu\text{mol/l}$ ;  $IC_{50(\text{ABCG2})} = 27,8 \mu\text{mol/l}$ ; 442;  $IC_{50(\text{ABCC1})} = 1,14 \mu\text{mol/l}$ ;  $IC_{50(\text{ABCG2})} = 12,4 \mu\text{mol/l}$ ). Zu beachten ist jedoch, dass diese Vertreter eine vergleichsweise schwache ABCG2 Inhibition mit  $IC_{50}$ -Werten im zweistelligen mikromolaren Bereich zeigten. Höhere Lipophilie wirkte sich positiv aus, da der Cycloheptylring, wie in Substanz 442 vorhanden, im Vergleich zum Cyclohexylring (441) bevorzugt war. Die Entfernung des Ethylenlinkers zwischen dem stickstoffhaltigen Heterozyklus und der Piperazin-Partialstruktur (443) führte zu einem guten Dualinhibitor für die Transportproteine ABCC1 ( $IC_{50} = 1,02 \mu\text{mol/l}$ ) und ABCG2 ( $IC_{50} = 4,86 \mu\text{mol/l}$ ). Die Verbindung 444 war als lipophileres Derivat gedacht, konnte jedoch aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht vermessen werden. Ein zu erwartendes Ergebnis für diese Substanz wäre durch die aus vorigen Projekten bekannte Korrelation zwischen Aktivität und Lipophilie ein potenter Dualinhibitor von ABCC1 und ABCG2 gewesen [198].



Die Verbindungen der Gruppe II der Pyrrolopyrimidine, die alle einen (2-(1*H*-indole-3-yl)ethyl)piperazin-1-yl-Rest in Position 4 aufwiesen, trugen in Position 5 aliphatische oder aliphatisch-aromatische Substituenten. Abbildung 4.22 gibt eine Übersicht der relativen Inhibition der Transporter ABCB1, ABCC1 und ABCG2. Die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte der Substanzen, deren Inhibition bei mindestens 25 % im Vergleich zum jeweiligen Standard lag, sind in Tabellen 4.14 (ABCB1), 4.15 (ABCC1) und 4.16 (ABCG2) dargestellt.

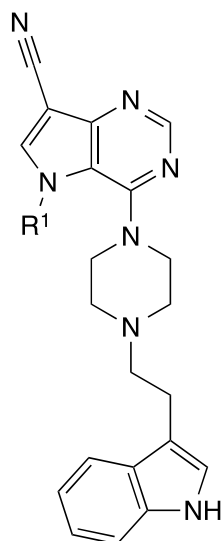


**Abbildung 4.22:** Prozentuale Effekte der Pyrrolopyrimidine aus Gruppe II bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  in Bezug auf die Akkumulation des Substrates Calcein AM in ABCB1-überexprimierenden A2780 adr Zellen (weiße Balken), Daunorubicin in ABCC1-überexprimierenden H69 AR Zellen (graue Balken) und Pheophorbid A in ABCG2-überexprimierenden MDCK II BCRP Zellen (schwarze Balken). Die gemessenen Werte wurden bei ABCB1 auf den Standardinhibitor Ciclosporin A (10  $\mu\text{mol/l}$ ), bei ABCC1 auf den Standardinhibitor 401 (10  $\mu\text{mol/l}$ ) und bei ABCG2 auf den Standardinhibitor Ko143 (10  $\mu\text{mol/l}$ ) normalisiert. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Im Fall von ABCC1 hatte das Substitutionsmuster keinen größeren Effekt auf die Hemmwirkung. Alle Derivate waren gute Inhibitoren mit IC<sub>50</sub>-Werten im Bereich von 0,3  $\mu\text{mol/l}$  bis 0,5  $\mu\text{mol/l}$ . Interessante Struktur-Wirkungsbeziehungen konnten hingegen für die Transportproteine ABCB1 und ABCG2 beobachtet werden. So übte die Länge der Seitenkette in Position 5 einen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität aus. Die Substanz 445 mit einem Methylrest in Position 5 zeigte bei ABCB1 und ABCG2 keine Aktivität im Vergleich zum Phenylpropylrest der Substanz 452. Auch hier spielte die gesteigerte Lipophilie offensichtlich eine erhebliche Rolle. Die Substanz 449 besaß keine Affinität gegenüber ABCG2 und war dennoch ein guter Inhibitor von ABCB1 (IC<sub>50</sub> = 1,28  $\mu\text{mol/l}$ ) und ABCC1 (IC<sub>50</sub> = 0,328  $\mu\text{mol/l}$ ). Im Gegensatz dazu zeigten die Substanzen 450, 451 und 452 gute inhibitorische Potenzen gegenüber allen ABC-Transportern. Dabei besaß die Verbindung 450 Aktivitäten, die sich bei den getesteten Transportproteinen um Faktor 10 unterschieden (IC<sub>50,(ABCB1)</sub> = 4,48  $\mu\text{mol/l}$ ; IC<sub>50,(ABCC1)</sub> = 0,405  $\mu\text{mol/l}$ ; IC<sub>50,(ABCG2)</sub> = 4,07

$\mu\text{mol/l}$ ). Die Verbindungen 451 und 452 hingegen waren beide bei allen Transportern im niedrigen mikromolaren Bereich aktiv. Aufgrund der Tatsache, dass die Verbindung 451 bei der Testung für ABCB1 im Calcein AM Akkumulationsassay keine 100 % oder zumindest die festgelegte 75 %-Grenze nicht erreichte, wofür es leider auch keine adäquate Erklärung gibt, wurde sie auch nicht weitergehend untersucht. Die Substanz 452 stellte sich als hervorragender Dreifachinhibitor heraus. Denn sie erfüllte nicht nur die notwendigen Kriterien der prozentualen Akkumulation des jeweiligen Substrates, sondern zeigte im Hinblick auf ihre Aktivität eine sehr gute Potenz im niedrigen mikromolaren Bereich ( $\text{IC}_{50,\text{ABCB1}} = 1,46 \mu\text{mol/l}$ ;  $\text{IC}_{50,\text{ABCC1}} = 0,501 \mu\text{mol/l}$ ;  $\text{IC}_{50,\text{ABCG2}} = 1,69 \mu\text{mol/l}$ ) und wurde somit für weitere Untersuchungen ausgewählt.

**Tabelle 4.14:** Aktivitäten der untersuchten Pyrrolopyrimidine aus der Gruppe II an ABCB1 im Calcein AM Akkumulationsassay unter Verwendung der A2780 adr Zelllinie. Die Experimente wurden in Duplikaten und in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD.



Substanz	R <sup>1</sup>	ABCB1
		Calcein AM IC <sub>50</sub> $\pm$ SD [ $\mu\text{mol/l}$ ]
448	Cyclopropyl	3,85 $\pm$ 0,95
449	Phenyl	1,28 $\pm$ 0,35
450	Benzyl	4,48 $\pm$ 0,62
451	Phenethyl	1,64 $\pm$ 0,11
452	Phenylpropyl	1,46 $\pm$ 0,28

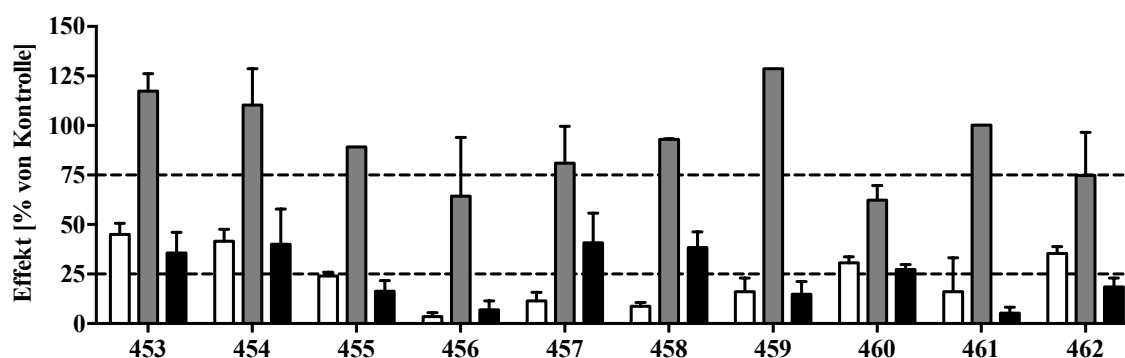
**Tabelle 4.15:** Aktivitäten der untersuchten Pyrrolopyrimidine aus der Gruppe II gegenüber ABCC1 im Daunorubicin Akkumulationsassay unter Verwendung der H69 AR Zelllinie. Die Experimente wurden in Duplikaten und in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD.

<b>Substanz</b>	<b>R<sup>1</sup></b>	<b>ABCC1 Daunorubicin IC<sub>50</sub> <math>\pm</math> SD [<math>\mu</math>mol/l]</b>
445	Methyl	0,337 $\pm$ 0,054
446	Ethyl	0,855 $\pm$ 0,212
447	Propyl	0,468 $\pm$ 0,032
448	Cyclopropyl	0,316 $\pm$ 0,033
449	Phenyl	0,328 $\pm$ 0,056
450	Benzyl	0,405 $\pm$ 0,086
451	Phenethyl	0,524 $\pm$ 0,034
452	Phenylpropyl	0,501 $\pm$ 0,084

**Tabelle 4.16:** Aktivitäten der untersuchten Pyrrolopyrimidine aus der Gruppe II gegenüber ABCG2 im Pheophorbid A Akkumulationsassay unter Verwendung der MDCK II BCRP Zelllinie. Die Experimente wurden in Duplikaten und in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD.

<b>Substanz</b>	<b>R<sup>1</sup></b>	<b>ABCG2 Pheophorbid A IC<sub>50</sub> <math>\pm</math> SD [<math>\mu</math>mol/l]</b>
446	Ethyl	13,8 $\pm$ 3,4
448	Cyclopropyl	18,9 $\pm$ 5,4
450	Benzyl	4,07 $\pm$ 0,98
451	Phenethyl	1,39 $\pm$ 0,25
452	Phenylpropyl	1,69 $\pm$ 0,21

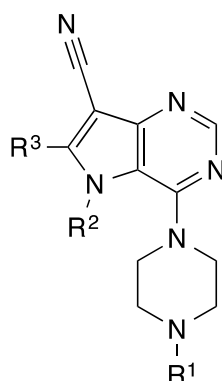
In der dritten Gruppe befanden sich die Derivate der Pyrrolopyrimidine, die Sauerstoff enthaltene Substituenten oder Heterozyklen in ihrer Struktur aufwiesen. Denn viele bekannte ABCB1 Inhibitoren enthalten Sauerstoff [163,215,220,221,226], insbesondere in Form von Methoxygruppen, wie z. B. Verapamil. Aber auch eine Piperonyl-Partialstruktur wurde im Zusammenhang mit der Inhibition von ABCB1 berichtet [204,222-224]. In Abbildung 4.23 sind die prozentualen inhibitorischen Effekte aller getesteten ABC-Transporter dargestellt.



**Abbildung 4.23:** Prozentuale Effekte der Pyrrolopyrimidine aus Gruppe III bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  in Bezug auf die Akkumulation des Substrates Calcein AM in ABCB1-überexprimierenden A2780 adr Zellen (weiße Balken), Daunorubicin in ABCC1-überexprimierenden H69 AR Zellen (graue Balken) und Pheophorbid A in ABCG2-überexprimierenden MDCK II BCRP Zellen (schwarze Balken). Die gemessenen Werte wurden bei ABCB1 auf den Standardinhibitor Ciclosporin A (10  $\mu\text{mol/l}$ ), bei ABCC1 auf den Standardinhibitor 401 (10  $\mu\text{mol/l}$ ) und bei ABCG2 auf den Standardinhibitor Ko143 (10  $\mu\text{mol/l}$ ) normalisiert. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Substanzen, wie Verbindungen 453, 454, 455 und 456, die einen Piperonyl-Rest trugen, erwiesen sich als gute ABCC1 Inhibitoren, jedoch schwach im Hinblick auf ABCB1 und ABCG2 Inhibition. Eine Furoyl-Teilstruktur in Kombination mit einem Cyclohexyl- oder Cycloheptylring in Positionen 5 und 6 (457 und 458) führten zu Dualinhibitoren von ABCC1 und ABCG2, jedoch mit eher schlechter Aktivität gegenüber dem letztgenannten. Die Derivatisierung in Position 5 mit 2-Methoxyphenyl (459 und 460) oder mit 4-Ethoxyphenyl (461 und 462) führte nur bei Verbindung 460 zu einem Dreifachinhibitor, mit sehr schwachen Aktivitäten gegenüber ABCB1 und ABCG2. Zusammenfassend zeigten die sauerstoffenthaltenden Derivate nicht die erwarteten Ergebnisse in Bezug auf ABCB1, auch wenn Substanzen, wie Verbindung 462, das Potenzial hatten sowohl ABCB1 ( $\text{IC}_{50} = 7,29 \mu\text{mol/l}$ ) als auch ABCC1 ( $\text{IC}_{50} = 0,859 \mu\text{mol/l}$ ) dual zu inhibieren.

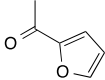
**Tabelle 4.17:** Aktivitäten der untersuchten Pyrrolopyrimidine aus der Gruppe III gegenüber ABCB1 im Calcein AM Akkumulationsassay unter Verwendung der A2780 adr Zelllinie. Die Experimente wurden in Duplikaten und in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD.



Substanz	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	ABCB1
				Calcein AM IC <sub>50</sub> $\pm$ SD [ $\mu$ mol/l]
453	Piperonyl 	Cyclohexyl		13,9 $\pm$ 3,7
454	Piperonyl	Cycloheptyl		5,71 $\pm$ 1,52
460	Benzyl	2-Methoxyphenyl	H	19,1 $\pm$ 1,9
462	Benzyl	4-Ethoxyphenyl	H	7,29 $\pm$ 1,15

**Tabelle 4.18:** Aktivitäten der untersuchten Pyrrolopyrimidine aus der Gruppe III gegenüber ABCC1 im Daunorubicin Akkumulationsassay unter Verwendung der H69 AR Zelllinie. Die Experimente wurden in Duplikaten und in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD.

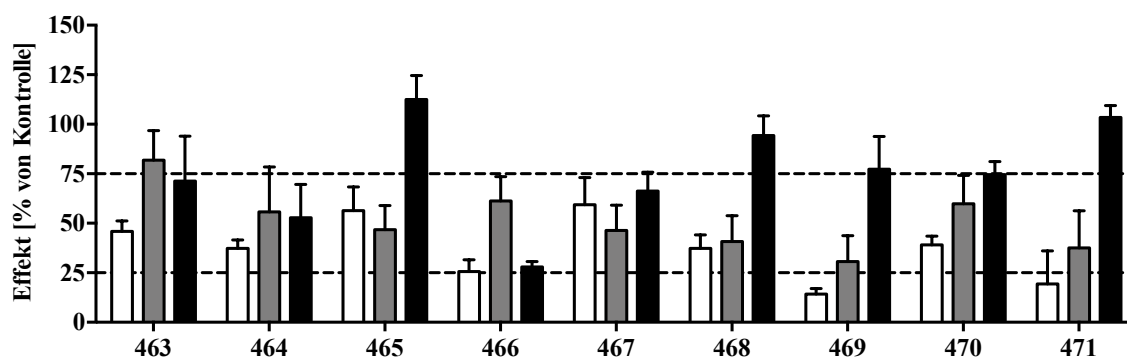
Substanz	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	ABCC1
				Daunorubicin IC <sub>50</sub> $\pm$ SD [ $\mu$ mol/l]
453	Piperonyl 	Cyclohexyl		0,322 $\pm$ 0,112
454	Piperonyl	Cycloheptyl		1,02 $\pm$ 0,14
455	Piperonyl	Phenyl	H	0,751 $\pm$ 0,443

Substanz	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	ABCC1 Daunorubicin IC <sub>50</sub> ± SD [µmol/l]
456	Piperonyl	Phenethyl	H	1,80 ± 0,39
457	2-Furoyl 	Cyclohexyl		0,883 ± 0,164
458	2-Furoyl	Cycloheptyl		1,01 ± 0,11
459	Phenethyl	2-Methoxyphenyl	H	0,683 ± 0,067
460	Benzyl	2-Methoxyphenyl	H	0,327 ± 0,072
461	Phenethyl	4-Ethoxyphenyl	H	1,32 ± 0,27
462	Benzyl	4-Ethoxyphenyl	H	0,859 ± 0,167

**Tabelle 4.19:** Aktivitäten der untersuchten Pyrrolopyrimidine aus der Gruppe III gegenüber ABCG2 im Pheophorbid A Akkumulationsassay unter Verwendung der MDCK II BCRP Zelllinie. Die Experimente wurden in Duplikaten und in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert ± SD.

Substanz	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	ABCG2 Pheophorbid A IC <sub>50</sub> ± SD [µmol/l]
453	Piperonyl	Cyclohexyl		15,0 ± 4,7
454	Piperonyl	Cycloheptyl		24,7 ± 9,4
457	2-Furoyl	Cyclohexyl		29,6 ± 3,6
458	2-Furoyl	Cycloheptyl		13,0 ± 2,6
460	Benzyl	2-Methoxyphenyl	H	38,5 ± 9,4

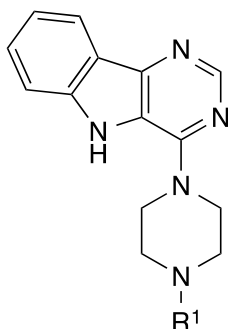
Bei der letzten untersuchten Gruppe handelte es sich um die Klasse der Indolopyrimidine, die in Position 4 unterschiedlich substituiert waren. Die Substanzklasse wurde bereits von Wang et al. [120] als vielversprechend in Bezug auf ABCB1 Inhibition beschrieben. Überdies wies sie Ähnlichkeit zu bekannten ABCG2 Inhibitoren auf [221]. Die Wahl der Substituenten orientierte sich an bereits bestehenden Daten [198,209] und Substituenten, die bekannt sind mit ABCB1 zu interagieren. Abbildung 4.22 fasst die Ergebnisse zusammen. Zur besseren Übersicht wurde die vierte Gruppe in drei Unterkategorien eingeteilt: (a) Indolopyrimidine mit einer heterozyklischen und stickstoffbasierten Seitenkette (463, 464 und 465); (b) Indolopyrimidine mit aliphatisch-aromatischen Variationen in Position 4 (466, 467, 468 und 469); (c) Indolopyrimidine mit einer heterozyklischen und sauerstoffenthaltenden Seitenkette (470 und 471).



**Abbildung 4.24:** Prozentuale Effekte der Pyrrolopyrimidine aus Gruppe IV bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  in Bezug auf die Akkumulation des Substrates Calcein AM in ABCB1-überexprimierenden A2780 adr Zellen (weiße Balken), Daunorubicin in ABCC1-überexprimierenden H69 AR Zellen (graue Balken) und Pheophorbid A in ABCG2-überexprimierenden MDCK II BCRP Zellen (schwarze Balken). Die gemessenen Werte wurden bei ABCB1 auf den Standardinhibitor Ciclosporin A (10  $\mu\text{mol/l}$ ), bei ABCC1 auf den Standardinhibitor 401 (10  $\mu\text{mol/l}$ ) und bei ABCG2 auf den Standardinhibitor Ko143 (10  $\mu\text{mol/l}$ ) normalisiert. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Allgemein stach in dieser Gruppe die Affinität zu ABCG2 hervor. Andererseits befand sich das Inhibitionsmaximum für ABCB1 und ABCC1 bei lediglich 30-60 %. In der ersten Unterkategorie ließ sich erkennen, dass in Bezug der Inhibition des Transportproteins ABCB1 eine Pyridyl Partialstruktur (464) gegenüber Indolyl Partialstruktur (463) bevorzugt wurde. Im Gegensatz hierzu sank die inhibitorische Aktivität an ABCB1 und ABCG2. Durch die Entfernung der Alkylkette (465), entstand ein guter Dreifachinhibitor mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten von 5,00  $\mu\text{mol/l}$  (ABCB1), 0,495  $\mu\text{mol/l}$  (ABCC1) und 1,81  $\mu\text{mol/l}$  (ABCG2). Diese Tendenz spiegelte sich auch in der zweiten Unterkategorie wider.

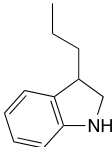
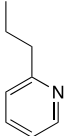

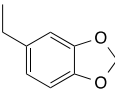
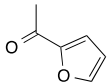
**Tabelle 4.20:** Aktivitäten der untersuchten Pyrrolopyrimidine aus der Gruppe IV gegenüber ABCB1 im Calcein AM Akkumulationsassay unter Verwendung der A2780 adr Zelllinie. Die Experimente wurden in drei unabhängigen Versuchen als Duplikate durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD.



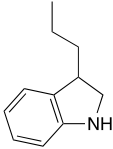
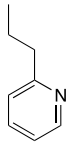
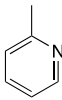
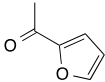
Substanz	R <sup>1</sup>	ABCB1 Calcein AM IC <sub>50</sub> $\pm$ SD [ $\mu$ mol/l]
463	2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl	3,50 $\pm$ 1,02
464	2-(Pyridin-2-yl)ethyl	10,7 $\pm$ 2,31
465	Pyridin-2-yl	5,00 $\pm$ 1,20
466	Phenethyl	1,11 $\pm$ 0,09
467	Benzyl	9,49 $\pm$ 1,74
468	Diphenylmethyl	2,33 $\pm$ 0,47
470	Piperonyl	3,92 $\pm$ 0,64



**Tabelle 4.21:** Aktivitäten der untersuchten Pyrrolopyrimidine aus der Gruppe IV gegenüber ABCC1 im Daunorubicin Akkumulationsassay unter Verwendung der H69 AR Zelllinie. Die Experimente wurden in Duplikaten und in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD.

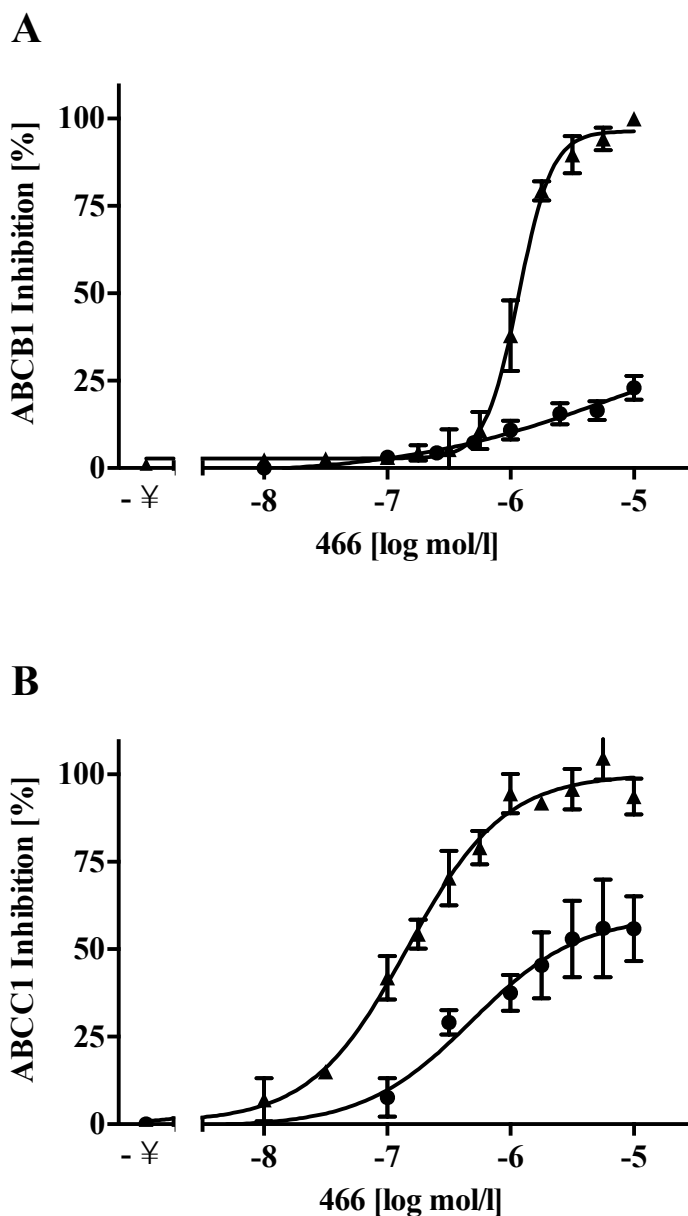
Substanz	R <sup>1</sup>	ABCC1 Daunorubicin IC <sub>50</sub> $\pm$ SD [ $\mu$ mol/l]
463	2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl 	0,921 $\pm$ 0,033
464	2-(Pyridin-2-yl)ethyl 	0,345 $\pm$ 0,031
465	Pyridin-2-yl 	0,495 $\pm$ 0,109
466	Phenethyl	0,405 $\pm$ 0,056
467	Benzyl	0,363 $\pm$ 0,042
468	Diphenylmethyl	0,409 $\pm$ 0,092
469	Phenyl	0,146 $\pm$ 0,011
470	Piperonyl 	0,717 $\pm$ 0,082
471	Furanoyl 	0,169 $\pm$ 0,013

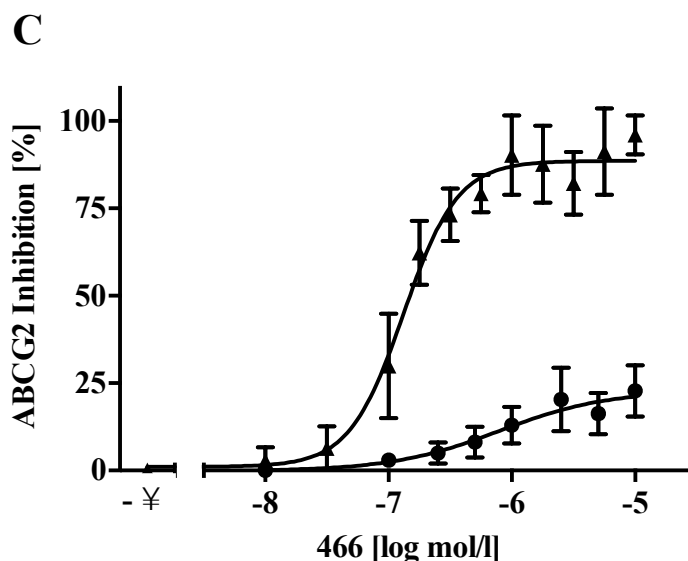
**Tabelle 4.22:** Aktivitäten der untersuchten Pyrrolopyrimidine aus der Gruppe IV gegenüber ABCG2 im Pheophorbid A Akkumulationsassay unter Verwendung der MDCK II BCRP Zelllinie. Die Experimente wurden in Duplikaten und in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD.

Substanz	R <sup>1</sup>	ABCG2 Pheophorbid A IC <sub>50</sub> $\pm$ SD [ $\mu$ mol/l]
463	2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethyl 	6,21 $\pm$ 0,80
464	2-(Pyridin-2-yl)ethyl 	11,6 $\pm$ 1,9
465	Pyridin-2-yl 	1,81 $\pm$ 0,31
466	Phenethyl	0,839 $\pm$ 0,145
467	Benzyl	6,08 $\pm$ 1,02
468	Diphenylmethyl	1,38 $\pm$ 0,32
469	Phenyl	1,10 $\pm$ 0,21
470	Piperonyl	7,93 $\pm$ 1,59
471	Furanyl 	6,06 $\pm$ 0,79

Während die inhibitorische Aktivität gegenüber ABCC1 bei den Substanzen 466 bis 469 sank, stieg diese im Falle von ABCG2. Die Verbindung 466 repräsentierte hier den besten Vertreter der Inhibitoren für die Transporter ABCB1 (IC<sub>50</sub> = 1,11  $\mu$ mol/l), ABCC1 (IC<sub>50</sub> = 0,405  $\mu$ mol/l) und ABCG2 (IC<sub>50</sub> = 0,839  $\mu$ mol/l). Allerdings besaß die genannte Substanz,

wie bereits erwähnt, ein verringertes Inhibitionsmaximum von 26 % für ABCB1, 61 % für ABCC1 und 28 % für ABCG2. Abbildungen 4.25 A bis C veranschaulichen anhand von Konzentrations-Effektkurven die unterschiedlichen Maxima der Verbindung 466 im Vergleich zum Standardinhibitor des jeweiligen Transporters. Die Ursache für unterschiedliche Fluoreszenzlevel ist bis heute nicht geklärt und stellt ein interessantes Untersuchungsfeld dar.





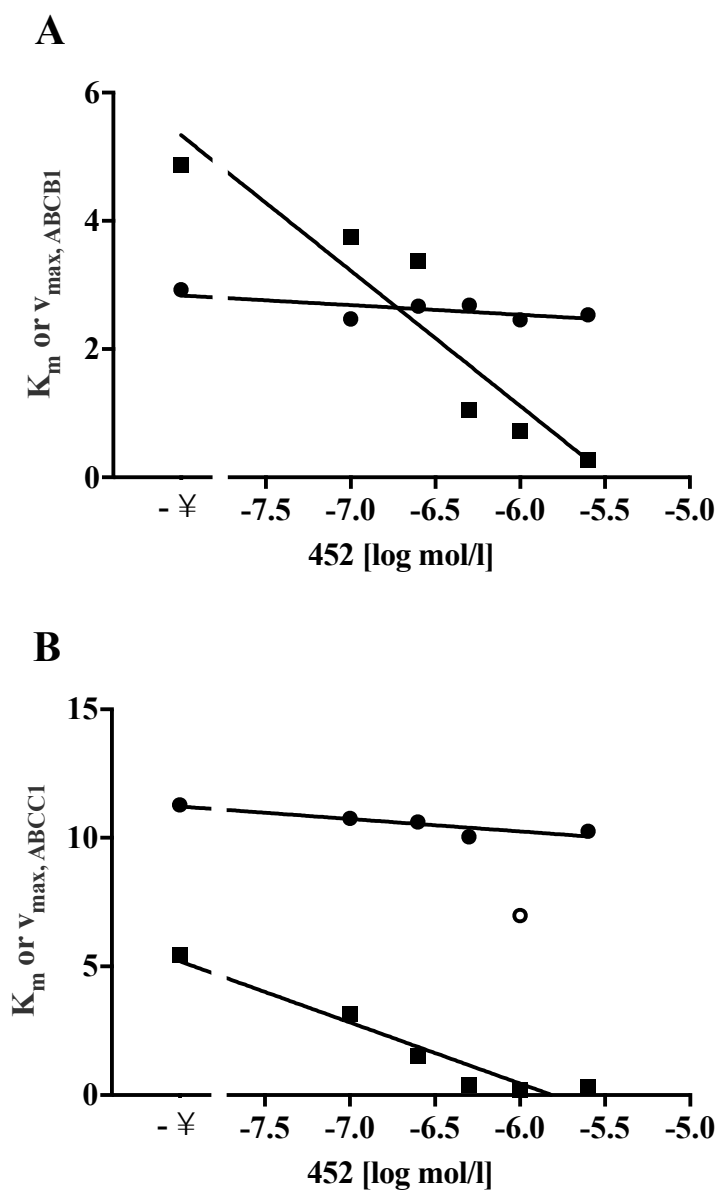
**Abbildung 4.25:** Konzentrations-Effektkurven in Prozent der Verbindung 466 (gefüllte Kreise) im Vergleich zum jeweiligen Standard 100 % (gefüllte Dreiecke). (A): für ABCB1 vermessen in dem Calcein AM Assay unter Verwendung von A2780 adr Zellen und dem Standardinhibitor Ciclosporin A (10  $\mu\text{mol/l}$ ); (B): für ABCC1 vermessen in dem Daunorubicin Assay unter Verwendung von H69 AR Zellen und dem Standardinhibitor 401 (10  $\mu\text{mol/l}$ ); (C): für ABCG2 vermessen in dem Pheophorbid A Assay unter Verwendung von MDCK II BCRP Zellen und dem Standardinhibitor Ko143 (10  $\mu\text{mol/l}$ ). Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis einer Messung in Duplikaten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

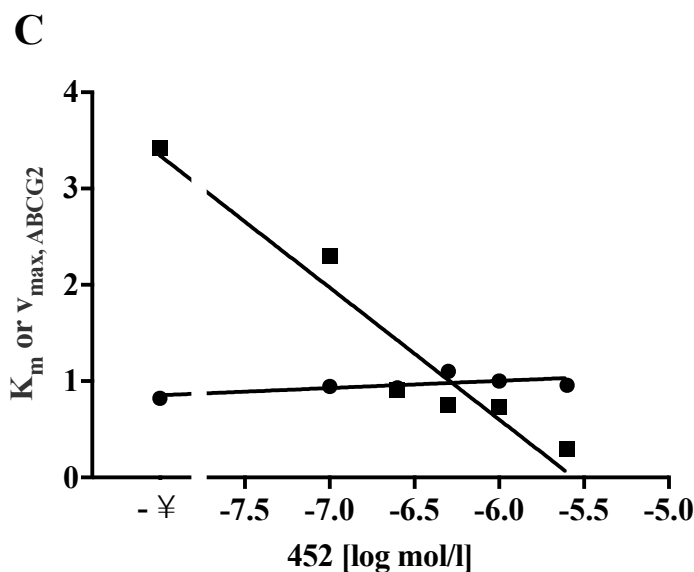
Die Verbindung 469 war ein guter Repräsentant von Dualinhibitoren der Transporter ABCC1 ( $\text{IC}_{50} = 0,146 \mu\text{mol/l}$ ) und ABCG2 ( $\text{IC}_{50} = 1,10 \mu\text{mol/l}$ ), auch wenn sich die  $\text{IC}_{50}$ -Werte um den Faktor 10 unterschieden. In der letzten Unterkategorie von Gruppe IV war die Verbindung 470 ein moderater Dreifachinhibitor im mikromolaren Konzentrationsbereich. Die Substanz 471 wiederum stellte ein seltenes Beispiel eines Zweifachinhibitors der Transporter ABCC1 und ABCG2 mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten von  $0,169 \mu\text{mol/l}$  (ABCC1) und  $6,06 \mu\text{mol/l}$  (ABCG2) dar.

#### 4.3.2. Untersuchung des Bindungsverhaltens

Als repräsentative Verbindung und Inhibitor aller untersuchten ABC-Transporter wurde die Substanz 452 für kinetische Studien ausgewählt und der Typ der Inhibition mithilfe des Auswerteverfahrens nach Cornish-Bowden untersucht. In Abbildungen 4.26 A bis C kann in den drei Fällen der Transportproteine ABCB1, ABCC1 und ABCG2 eine nicht-

kompetitive Inhibition anhand der reduzierten Transportgeschwindigkeit ( $v_{\max}$ ) und der gleichbleibenden Affinität ( $K_m$ ) festgestellt werden. Zusammenfassend handelt es sich bei der Verbindung 452 der Pyrrolopyrimidine um einen nicht-kompetitiven Inhibitor des ABCB1-vermittelten Transports von Calcein AM, ABCC1-vermittelten Transports von Daunorubicin und ABCG2-vermittelten Transports von Pheophorbid A.

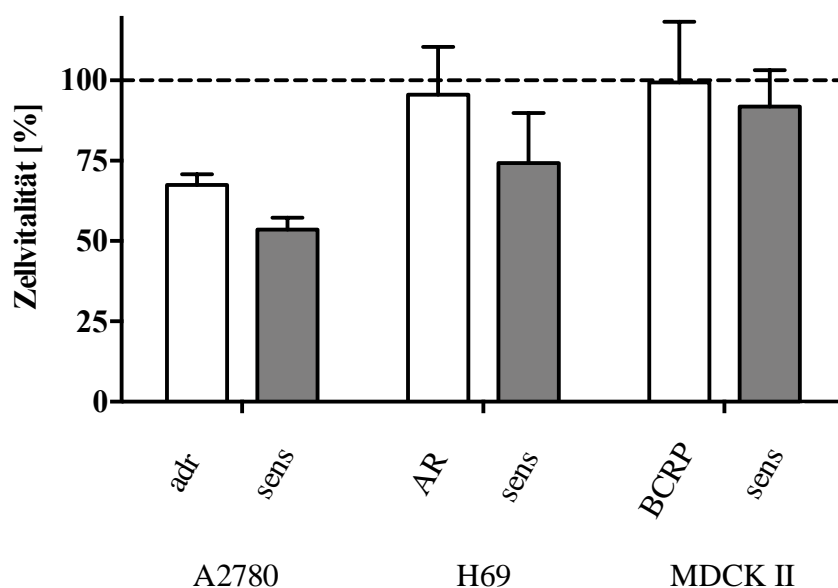




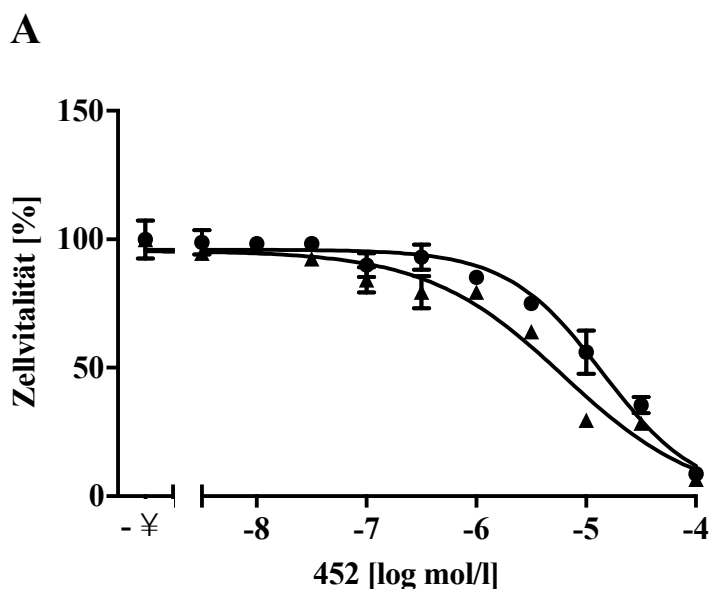
**Abbildung 4.26:** Kinetische Auswertung nach Cornish-Bowden von Verbindung 452 (0,1, 0,25, 0,5, 1,0 und 2,5  $\mu\text{mol/l}$ );  $K_m$  (gefüllte Kreise) und  $v_{max}$  (gefüllte Quadrate), Ausreißer (leerer Kreis). (A): ABCB1-vermittelter Transport von Calcein AM (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 und 0,6  $\mu\text{mol/l}$ ). (B): ABCC1-vermittelter Transport von Daunorubicin (1, 2, 3, 4, 5 bzw. 6  $\mu\text{mol/l}$ ). (C): ABCG2-vermittelter Transport von Pheophorbid A (0,2, 0,4, 0,5, 0,75, 1,0 bzw. 1,5  $\mu\text{mol/l}$ ). Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis einer Messung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

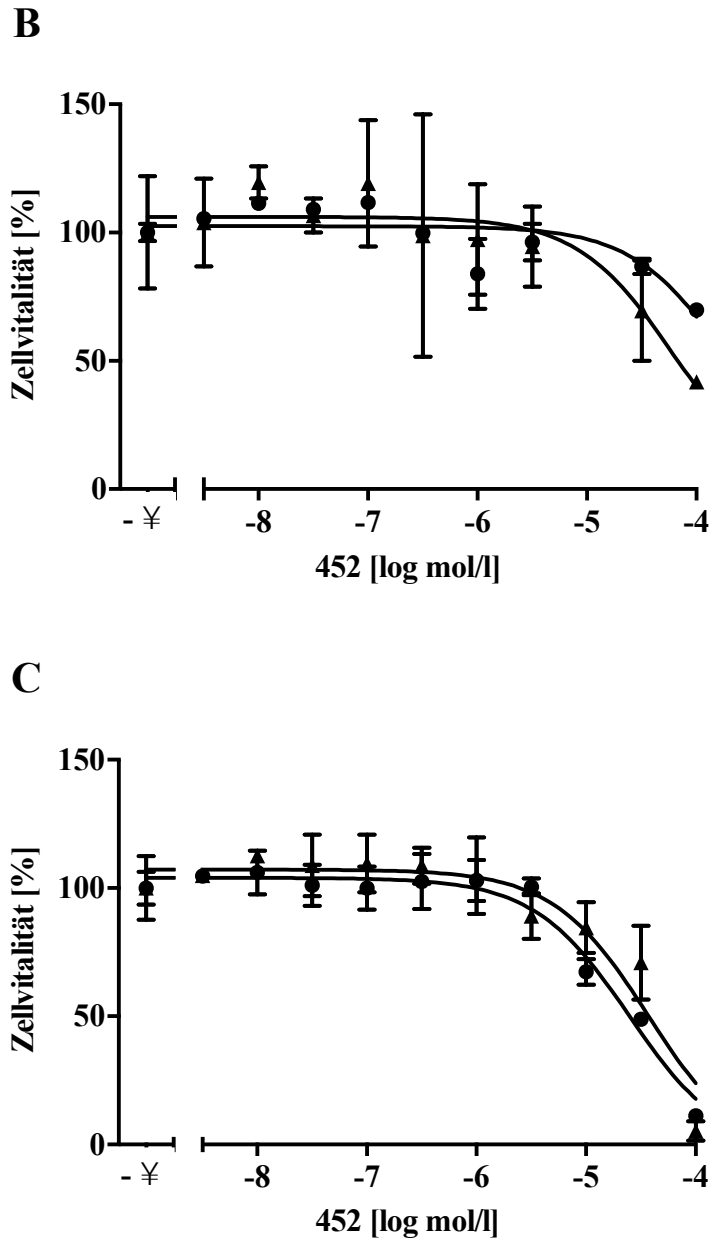
#### 4.3.3. Untersuchung der zellulären Toxizität des Breitspektrum-Inhibitors 452

Die Verbindung 452 hat sich als ein sehr guter Inhibitor aller untersuchten Transportproteine ABCB1, ABCC1 und ABCG2 herauskristallisiert. Auch die Inhibitionsmaxima waren im Vergleich zum jeweiligen Standard vergleichbar ( $\geq 75\%$ ), sodass sie auf ihre zelluläre Toxizität hin untersucht wurde. In Abbildung 4.27 ist der toxische Effekt bei Einsatz von 10  $\mu\text{mol/l}$  dargestellt. Die Substanz hatte hierbei weder einen toxischen Effekt auf die H69 AR (ABCC1), MDCK II BCRP (ABCG2) noch auf die korrespondierenden sensitiven Zelllinien. Dahingegen war ein marginaler Effekt bei A2780 adr (ABCB1) und A2780 Zellen zu beobachten. In Tabelle 4.23 sind die  $GI_{50}$ -Werte der jeweiligen Zelllinien zusammengefasst. Die aus den Konzentrations-Effektkurven (Abbildungen 4.28 A bis C) ermittelten  $GI_{50}$ -Werte befanden sich im Durchschnitt im niedrigen bis mittleren zweistelligen mikromolaren Konzentrationsbereich. Anhand der Berechnung der therapeutischen Rate (Tabelle 4.23) ließ sich erkennen, dass die Substanz mindestens 9-fach potenter als toxisch war.



**Abbildung 4.27:** Balkendiagramm des toxischen Effekts der Verbindung 452 bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  in den Zelllinien A2780 adr (ABCB1), H69 AR (ABCC1) und MDCK II BCRP (ABCG2) (weiße Balken) sowie die korrespondierenden sensitiven Zelllinien (graue Balken). Die Bestimmung wurde mit einem MTT-basierten Vitalitäts-Assay durchgeführt. Die Absorptionwerte wurden auf pures Nährmedium (100 %) und 10 % DMSO (0 %) normalisiert. Die Experimente wurden in Duplikaten und in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD.





**Abbildung 4.28:** Konzentrations-Effektcurven der Verbindung 452 ermittelt im MTT-basierten Vitalitäts-Assay. (A): unter Verwendung A2780 adr (gefüllte Kreise) und A2780 (gefüllte Dreiecke) Zellen; (B): unter Verwendung von H69 AR (gefüllte Kreise) und H69 (gefüllte Dreiecke) Zellen; (C): unter Verwendung von MDCK II BCRP (gefüllte Kreise) und MDCK II (gefüllte Dreiecke) Zellen; Inkubationszeit: 72 Stunden. Die Absorptionswerte wurden normalisiert auf pures Nährmedium (100 %) und 10 % DMSO (0 %). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis in Duplikaten aus drei unabhängigen Versuchen.



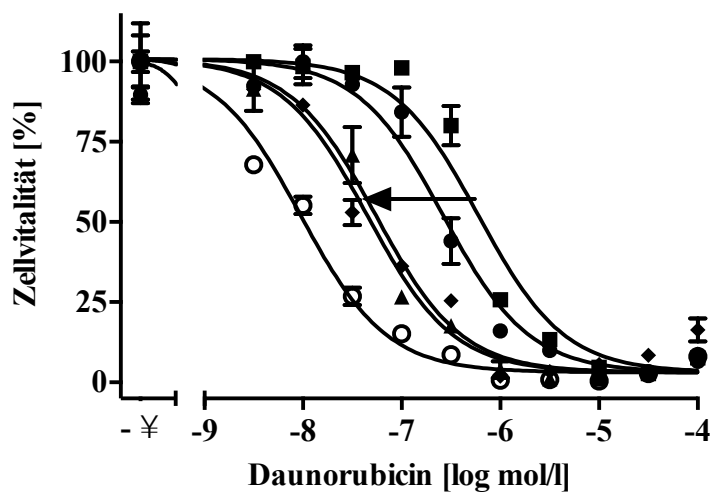
**Tabelle 4.23:** Berechnete  $GI_{50}$ -Werte der Verbindung 452 für ABCC1-, ABCB1- bzw. ABCG2-überexprimierende sowie korrespondierende sensitive Zelllinien bestimmt mit einem MTT-basierten Vitalitäts-Assay. Die Experimente wurden in Duplikaten und in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD. Bestimmung der therapeutischen Rate =  $GI_{50}$  (Substanz 452 in resistenter Zelllinie) geteilt durch  $IC_{50}$  (Substanz 452 in resistenter Zelllinie). Zugehörige  $IC_{50}$ -Werte sind in Tabellen 4.14, 4.15 und 4.16 zu entnehmen.

Zelllinie	$GI_{50} \pm SD$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Therapeutische Rate
<b>A2780 adr</b>	13,7 $\pm$ 0,6	9,4
<b>A2780</b>	6,36 $\pm$ 0,23	
<b>H69 AR</b>	152 $\pm$ 42	303
<b>H69</b>	55,4 $\pm$ 10,3	
<b>MDCK II BCRP</b>	23,2 $\pm$ 2,0	14
<b>MDCK II</b>	37,2 $\pm$ 0,1	

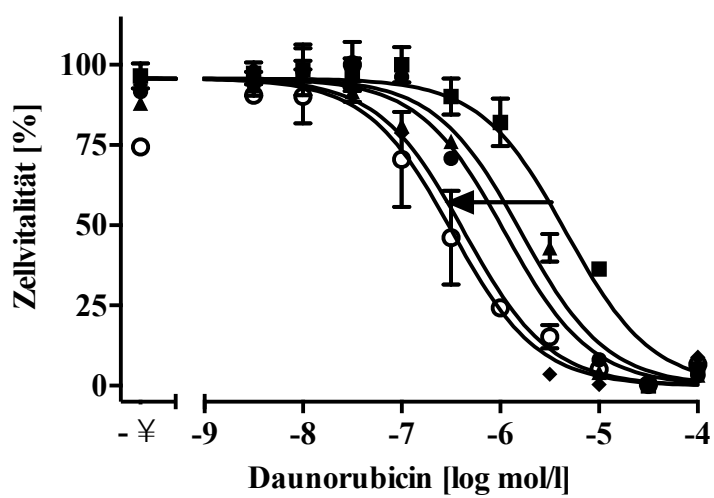
#### 4.3.4. Sensitivierung der ABC-Transporter-überexprimierenden Zellen durch Verbindung 452

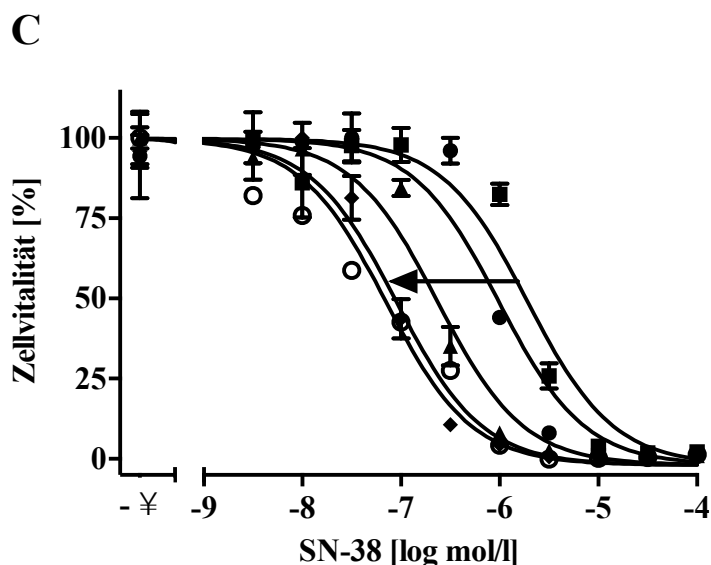
In Abbildungen 4.29 A bis C sind die Konzentrations-Effektkurven der ABCB1-überexprimierenden Zellen A2780 adr mit Daunorubicin (A), ABCC1-überexprimierenden Zellen H69 AR mit Daunorubicin (B) und ABCG2-überexprimierenden Zellen MDCK II BCRP mit SN-38 (C) im Vergleich zu der jeweils korrespondierenden sensitiven Zelllinie (A2780 (A), H69 (B) und MDCK II (C)) dargestellt. Nach Zugabe der Verbindung 452 in den Konzentrationen 0,1  $\mu\text{mol/l}$ , 1,0  $\mu\text{mol/l}$  und 10  $\mu\text{mol/l}$  ließ sich aufgrund der Sensitivierung der Zellen gegenüber dem eingesetzten Zytostatikum eine Verschiebung der Kurven zur sensitiven Zelllinie hin beobachten. Im Fall von ABCC1 und ABCG2 erfolgte eine vollständige Sensitivierung bei 10  $\mu\text{mol/l}$ . Im Unterschied dazu fand die Verschiebung bei ABCB1 nur partiell statt. Dies ließ sich durch die Spannweite der  $GI_{50}$ -Werte für resistente und sensitive Zellen erklären. So unterschieden sich diese im Falle von A2780 (adr) Zellen um den Faktor 50, während in Bezug auf H69 (AR) Zellen lediglich ein 10-facher Unterschied zu beobachten war. Tabelle 4.24 verdeutlicht dieses Ergebnis anhand berechneter  $GI_{50}$ -Werte in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration der untersuchten Substanz 452.

**A**



**B**





**Abbildung 4.29:** Verschiebung der Konzentrations-Effektkurven bei Einsatz von zytotoxischem Daunorubicin (A und B) und SN-38 (C) in Verbindung mit Substanz 452. Pfeile symbolisieren die konzentrationsabhängige Sensitivierung der A2780 adr Zellen gegenüber Daunorubicin (A), H69 AR Zellen gegenüber Daunorubicin (B) und MDCK II BCRP gegenüber SN-38 (C). Die Substanz wurde in Konzentrationen von 0,1  $\mu\text{mol/l}$  (gefüllte Kreise), 1,0  $\mu\text{mol/l}$  (gefüllte Dreiecke) und 10  $\mu\text{mol/l}$  (gefüllte Rauten) untersucht; resistente Zelllinien: gefüllte Quadrate; sensitive Zelllinien: leere Kreise. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten, als Doppelbestimmung durchgeführt.

**Tabelle 4.24:** Berechnete  $GI_{50}$ -Werte der Substanz 452 bei einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{mol/l}$ , 1,0  $\mu\text{mol/l}$  und 10  $\mu\text{mol/l}$  in Anwesenheit von Daunorubicin bei ABCB1 und ABCC1 sowie SN-38 bei ABCG2 bestimmt mit einem MTT-basierten Vitalitäts-Assay in den korrespondierenden A2780 adr, H69 AR und MDCK II BCRP Zelllinien. Die Experimente wurden in Duplikaten und in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD.

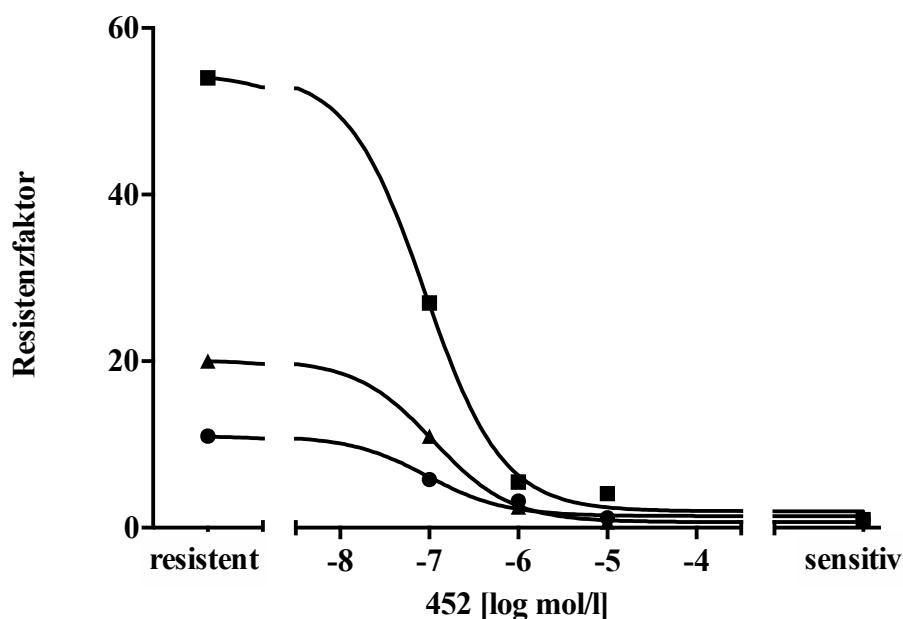
$GI_{50} \pm SD$ [ $\mu\text{mol/l}$ ] bei	ABCB1	ABCC1	ABCG2
<b>resistente Zelllinie</b>	0,575 $\pm$ 0,014	3,84 $\pm$ 1,28	1,71 $\pm$ 0,61
<b>0,1 <math>\mu\text{mol/l}</math> 452</b>	0,286 $\pm$ 0,010	2,10 $\pm$ 0,62	0,916 $\pm$ 0,116
<b>1,0 <math>\mu\text{mol/l}</math> 452</b>	0,058 $\pm$ 0,003	1,17 $\pm$ 0,01	0,211 $\pm$ 0,017
<b>10 <math>\mu\text{mol/l}</math> 452</b>	0,044 $\pm$ 0,004	0,445 $\pm$ 0,007	0,061 $\pm$ 0,004
<b>sensitive Zelllinie</b>	0,010 $\pm$ 0,002	0,361 $\pm$ 0,033	0,086 $\pm$ 0,009

Um weitere Rückschlüsse in Bezug auf die Sensitivierung von resistenten Zelllinien unter Einsatz der ausgewählten Substanz der Pyrrolopyrimidine ziehen zu können, wurde mithilfe der GI<sub>50</sub>-Werte der Substanz 452 ein Resistenzfaktor berechnet (Tabelle 4.25). Dieser beschreibt das Verhältnis zwischen dem GI<sub>50</sub>-Wert der Verbindung in resistenter und sensitiver Zelllinie.

**Tabelle 4.25:** Berechneter Resistenzfaktor der Substanz 452 bei einer Konzentration von 0,1 µmol/l, 1,0 µmol/l und 10 µmol/l in Anwesenheit von Daunorubicin bei ABCB1 und ABCC1 sowie SN-38 bei ABCG2 bestimmt mit einem MTT-basierten Vitalitäts-Assay in den korrespondierenden A2780 adr, H69 AR und MDCK II BCRP Zelllinien. Berechnung des Resistenzfaktors = GI<sub>50</sub> (Substanz 452 in resistenter Zelllinie) geteilt durch GI<sub>50</sub> (Substanz 452 in sensitiver Zelllinie). Zugehörige GI<sub>50</sub>-Werte sind in Tabelle 4.24 zu entnehmen.

<b>Resistenzfaktor</b>	<b>ABCB1</b>	<b>ABCC1</b>	<b>ABCG2</b>
<b>resistente Zelllinie</b>	54	11	20
<b>0,1 µmol/l 452</b>	27	5,8	11
<b>1,0 µmol/l 452</b>	5,5	3,2	2,5
<b>10 µmol/l 452</b>	4,1	1,2	0,7
<b>sensitive Zelllinie</b>	1	1	1

Anschließend wurden die berechneten Resistenzfaktoren gegen die eingesetzte Konzentration der Verbindung 452 aufgetragen. Um die Kurve sinnvoll auswerten zu können, wurden außerdem die Resistenzfaktoren der jeweiligen resistenten und sensitiven Zelllinien als höchster bzw. niedrigster Wert mit einbezogen. In Abbildung 4.30 sind die drei jeweiligen den Transportern zugehörigen Kurven dargestellt. Die resultierende EC<sub>50</sub>-Werte lagen bei 0,095 µmol/l (ABCB1), 0,111 µmol/l (ABCC1) und 0,106 µmol/l (ABCG2). Damit waren nur submikromolare Konzentrationen notwendig um die Resistenz der getesteten Zelllinie um die Hälfte zu reduzieren. Dreifachinhibitoren mit solcher Effektivität sind bis heute nicht beschrieben worden.



**Abbildung 4.30:** Auftragung der Resistenzfaktoren aus Tabelle 4.25 gegen die eingesetzten Konzentrationen der Substanz 452 bei ABCB1 (gefüllte Quadrate), bei ABCC1 (gefüllte Kreise) und ABCG2 (gefüllte Dreiecke).

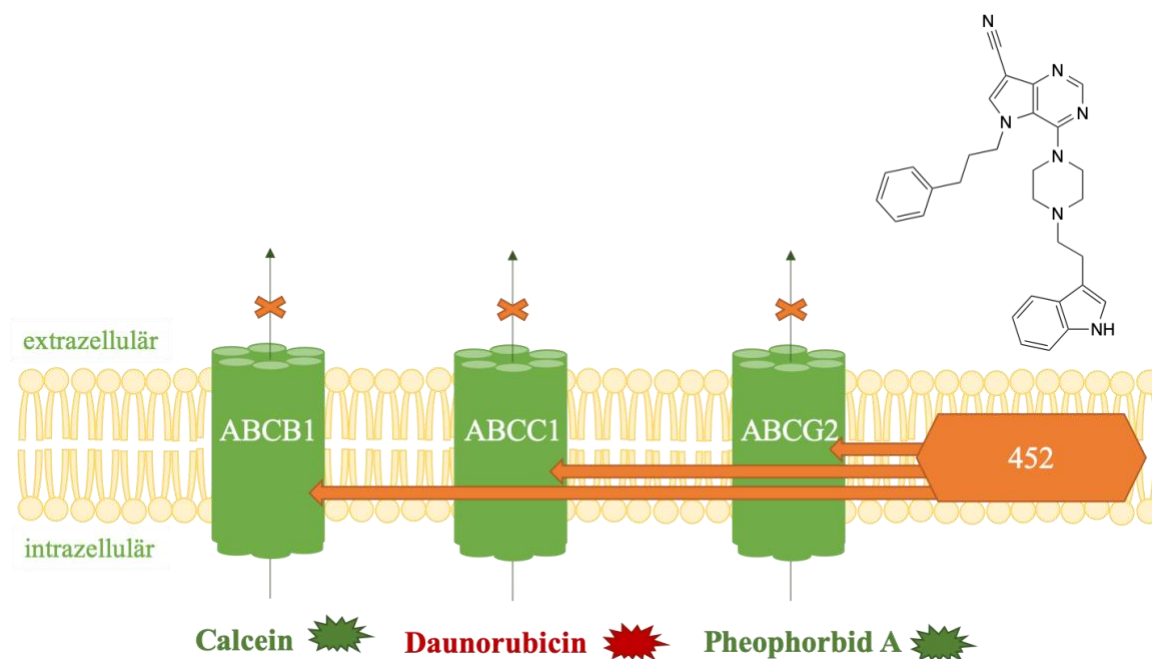
#### 4.3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Dieses Projekt diente zur Entdeckung neuer und potenter Inhibitoren der ABC-Transporter ABCB1, ABCC1 und ABCG2. Die Literatur in Bezug auf Inhibitoren ist im Großen und Ganzen auf selektive sowie Dualinhibitoren ausgelegt. Die Substanzklasse der Pyrrolo- und Indolopyrimidine bietet hier Breitspektrum-inhibitoren, die nur begrenzt beschrieben und untersucht worden sind [162,167,171,208,233-237].

Die Untersuchung der Substanzen ergab nicht nur gute Dualinhibitoren der Transportproteine ABCB1/ABCC1 (439, 449, 462) und ABCC1/ABCG2 (443, 469, 471), sondern auch einen Inhibitor, Verbindung 452, als hochpotenten und effizienten Modulator aller untersuchten Transportproteine. Unter Verwendung der Substrate Calcein AM (ABCB1), Daunorubicin (ABCC1) und Pheophorbid A (ABCG2) zeigte die Verbindung 452 im Vergleich zu den anderen getesteten Substanzen Inhibitionsmaxima von über 75 %, gemessen im Vergleich zum jeweiligen Standardinhibitor (ABCB1: Ciclosporin A; ABCC1: 401; ABCG2: Ko143). Die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte befanden sich für ABCB1 und ABCG2 im niedrigen einstelligen mikromolaren und für ABCC1 sogar im hohen nanomolaren Konzentrationsbereich. Die Sensitivierung der Zelllinien gegenüber den

eingesetzten Zytostatika Daunorubicin (ABCB1 und ABCC1) und SN-38 (ABCG2) erfolgte unter Einsatz des Inhibitors 452 vollständig bei den Transportproteinen ABCC1 und ABCG2, sowie partiell bei ABCB1. Hier konnte gezeigt werden, dass in Bezug auf alle drei Transporter Konzentrationen um 100 nmol/l ausreichend waren um die Resistenz der Zelllinien um die Hälfte zu reduzieren [238,239]. Kinetische Studien ergaben nach Auswertung mit Cornish-Bowden eine nicht-kompetitive Inhibition für den ABCB1-vermittelten Transport von Calcein AM, für den ABCC1-vermittelten Transport von Daunorubicin sowie für ABCG2-vermittelten Transport von Pheophorbid A.

Zusammenfassend war die Substanz 452 in den Zelllinien A2780 adr, H69 AR und MDCK II BCRP mindestens 9-fach potenter als toxisch und fähig die eben genannten Zellen signifikant bei submikromolaren Konzentration zu sensitivieren, sodass die Verbindung 452 bzw. ihre Struktur sie zu einem guten Kandidaten für *in vivo* Studien und anschließende Forschung im Bereich der Chemotherapie macht.



**Abbildung 4.31:** Graphische Darstellung der Inhibition des ABC-Transportprotein-vermittelten Transport von Calcein (ABCB1), Daunorubicin (ABCC1) und Pheophorbid A (ABCG2) durch das Pyrrolopyrimidin 452.

# **5. Chinazolin-Chalkone - Dimerisierung bekannter Strukturen zu neuartigen Inhibitoren des Transportproteins ABCG2**

Kombinationen von bestehenden Substanzklassen zu Homo- bzw. Heterodimeren sind in der Literatur beschrieben und dienten aufgrund beschriebener Erfolge und Vorteile in Hinblick auf die Inhibition von ABC-Transportproteinen für dieses Projekt als Anregung. So hat die Arbeitsgruppe von Winter et al. 2014 eine Serie von Chalkonen, die mit Chinoxolin substituiert wurden, untersucht [240]. Die biologische Evaluierung erfolgte mithilfe des Mitoxantron Efflux-Assays und brachte Inhibitoren mit  $IC_{50}$ -Werten im niedrigen mikromolaren Bereich hervor. Folglich führte die Kombination von zwei Partialstrukturen bekannter ABCG2 Inhibitoren zu potenteren Verbindungen. Im Falle von ABCB1 zeigte das Beispiel verlinkter Homodimere den Vorteil einer Kombination von Substrukturen in Bezug auf das inhibitorische Potenzial [241-243]. Nicht nur ein Anstieg, sondern darüber hinaus ein Aufweisen einer inhibitorischen Aktivität. Ein Beispiel stellt das Galantamin Dimer Gal-2 dar, welche den Efflux von ABCB1 mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 0,8  $\mu\text{mol/l}$  inhibiert, wohingegen das Monomer keinerlei Inhibition bis zur untersuchten Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  aufwies [244].

## 5.1. Untersuchung von heterodimeren Inhibitoren

Die Strukturklasse der Chinazoline als auch die der Chalkone haben beide potente Inhibitoren von ABCG2 hervorgebracht und stellen in der Literatur bekannte Vertreter dar [166-169,171-174,208,245]. Die Kombination dieser vielversprechenden Inhibitoren des ABCG2 Transporters zu einer neuen Klasse von heterodimeren Substanzen ermöglicht es von den positiven Effekten beider Strukturen in Bezug auf die inhibitorische Aktivität zu profitieren.

Von Dr. Stefanie Kraege wurden hierfür 22 unterschiedlichen Derivate der Chinazolin-Chalkone synthetisiert, die zuvor in Zusammenarbeit mit Dr. Kapil Juvale ausgearbeitet wurden. Anschließend fand die eingehende biologische Untersuchung statt.

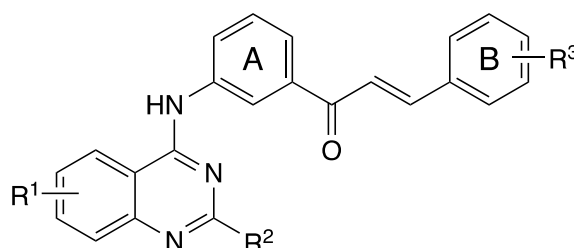
### 5.1.1. Funktionelle Untersuchungen von Chinazolin-Chalkonen an ABCG2

Die erste Serie der Chinazolin-Chalkone beinhaltete ein Substitutionsmuster, das ausschließlich Methoxygruppen vorsah. Die Entscheidung, zunächst einmal diese Struktur-Wirkungsbeziehungen zu analysieren, wurde durch Ergebnisse aus der Literatur begründet [166,167,246]. Die Untersuchung der gewählten Strukturklassen ergab, dass sowohl für die Chinazoline, als auch für die Chalkone die Methoxy-Substitution bezüglich der Aktivität gegenüber ABCG2 immer einen positiven Effekt hatte.

Das erste Set an Chinazolin-Chalkonen trugen einen *meta*-Acryloylphenylrest an Ring A des Chalkons und die Verbindungen zeigten einen inhibitorischen Effekt gegenüber ABCG2 im Bereich von 0,2  $\mu\text{mol/l}$  bis 1,7  $\mu\text{mol/l}$ . Zwischen den ersten vier Verbindungen (501, 502, 503 und 504) gab es keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Effekts der Methoxysubstitution in Positionen 6 und 7 der an Position 2 unsubstituierten Chinazolin-Teilstruktur. Lediglich die Kombination aus 6,7-Dimethoxy und 4-Methoxy am Chalkongerüst führte zu einer Steigerung der Aktivität und zeichnete die Verbindung 504 ( $\text{IC}_{50} = 0,324 \mu\text{mol/l}$ ) als potentesten Vertreter aus. In beiden Fällen wurden die inhibitorischen Aktivitäten durch die 3,4-Dimethoxysubstitution am Ring B herabgesetzt. Diese Erkenntnis wurde durch frühere Arbeiten an 4-Phenylsubstituierten Chinazolinen gestützt, die zumeist einen negativen Effekt in Verbindung mit weiteren Methoxygruppen am Chinazolingerüst zeigten [167].



**Tabelle 5.1:** Untersuchung der ABCG2-inhibierenden Eigenschaften der Chinazolin-Chalkone, die einen *meta*-Acryloylphenylrest an Ring A des Chalkons tragen. Die Substanzen wurden mittels Pheophorbid A Assays in MDCK II BCRP Zellen getestet. Aufgeführt sind Mittelwert  $\pm$  SD der in mindestens drei unabhängigen Experimenten ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte. Als Standardinhibitor wurde Ko143 verwendet.

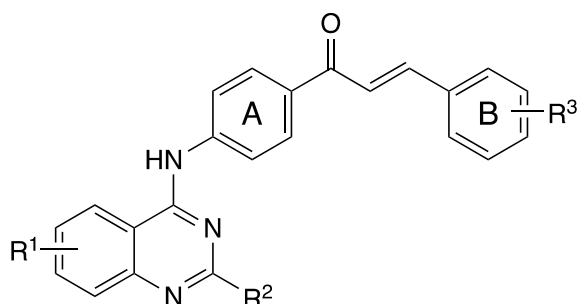


Substanz	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Pheophorbid A IC <sub>50</sub> $\pm$ SD [ $\mu$ mol/l]
501	H	H	3,4-OCH <sub>3</sub>	1,30 $\pm$ 0,12
502	H	H	4-OCH <sub>3</sub>	0,886 $\pm$ 0,243
503	6,7-OCH <sub>3</sub>	H	3,4-OCH <sub>3</sub>	1,71 $\pm$ 0,07
504	6,7-OCH <sub>3</sub>	H	4-OCH <sub>3</sub>	0,324 $\pm$ 0,021
505	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	3,4-OCH <sub>3</sub>	0,461 $\pm$ 0,031
506	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	4-OCH <sub>3</sub>	0,970 $\pm$ 0,171
507	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	3-OCH <sub>3</sub>	0,681 $\pm$ 0,045
508	H	3,4-OCH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	3,4-OCH <sub>3</sub>	0,604 $\pm$ 0,041
509	H	3,4-OCH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	4-OCH <sub>3</sub>	0,208 $\pm$ 0,020
510	H	3,4-OCH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	3-OCH <sub>3</sub>	0,306 $\pm$ 0,049
<b>Ko143</b>				0,276 $\pm$ 0,040

Weitere Struktur-Wirkungsbeziehungen waren in Bezug auf eine weitere Substitution an Position 2 erkennbar (505, 506 und 507): ein Phenylring in dieser Position in Kombination mit einer 3,4-Dimethoxysubstitution brachte die potentesten Verbindungen hervor, während *meta*- und *para*-methoxy-substituierte Derivate weniger aktiv waren. Die zusätzliche Methoxysubstitution am 2-Phenylring des Chinazolins (508, 509 und 510) führte zu äquivalenten Ergebnissen im Vergleich zu den an Position 2 unsubstituierten Chinazolin-Chalkone, woraus man schließen kann, dass die 4-Methoxysubstitution gegenüber der 3,4-Dimethoxysubstitution bevorzugt wurde. Im Fall der Chinazolin-

Chalkone bewirkte die Substitution in Position 2 des Chinazolingerüsts einen positiven Effekt in Bezug auf die inhibitorische Aktivität gegenüber ABCG2, auch wenn dieser nicht so stark ausgeprägt war wie für die 2-Phenylsubstituierten Chinazoline ohne Chalkonteilstruktur [167].

**Tabelle 5.2:** Untersuchung der ABCG2-inhibierenden Eigenschaften der Chinazolin-Chalkone, die einen *para*-Acryloylphenylrest an Ring A des Chalkons tragen. Die Substanzen wurden mittels Pheophorbid A Assays in MDCK II BCRP Zellen getestet. Aufgeführt sind Mittelwert  $\pm$  SD der in mindestens drei unabhängigen Experimenten ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte. Als Standardinhibitor wurde Ko143 verwendet.



Substanz	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Pheophorbid A IC <sub>50</sub> $\pm$ SD [ $\mu$ mol/l]
511	H	H	3,4-OCH <sub>3</sub>	0,840 $\pm$ 0,158
512	H	H	3-OCH <sub>3</sub>	0,680 $\pm$ 0,038
513	6,7-OCH <sub>3</sub>	H	3,4-OCH <sub>3</sub>	1,23 $\pm$ 0,17
514	6,7-OCH <sub>3</sub>	H	3-OCH <sub>3</sub>	0,394 $\pm$ 0,012
515	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	3,4-OCH <sub>3</sub>	0,291 $\pm$ 0,092
516	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	3-OCH <sub>3</sub>	0,883 $\pm$ 0,093
517	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	4-OCH <sub>3</sub>	3,55 $\pm$ 0,19
518	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	0,918 $\pm$ 0,133
519	H	3,4-OCH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	3,4-OCH <sub>3</sub>	0,190 $\pm$ 0,021
520	H	3,4-OCH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	3-OCH <sub>3</sub>	0,357 $\pm$ 0,058
521	H	3,4-OCH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	4-OCH <sub>3</sub>	3,13 $\pm$ 0,30
522	H	3,4-OCH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	H	1,09 $\pm$ 0,13
<b>Ko143</b>				0,276 $\pm$ 0,040

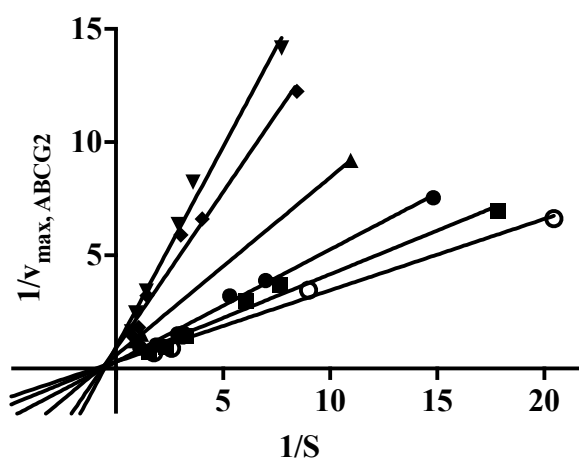
Weitere Derivate der Chinazolin-Chalkone, die in der Grundstruktur einen *para*-Acryloylphenylrest am Ring A des Chalkons tragen, wurden hinsichtlich ihrer Struktur-Wirkungsbeziehungen analysiert. Auch hier wurden zunächst die in Position 2 unsubstituierten Substanzen (511, 512, 513 und 514) näher untersucht. Die in Position 3 monosubstituierten Derivate waren im direkten Vergleich ebenfalls potenter als die 3,4-Disubstituierten. Unter Einbeziehung der unterschiedlichen Reste am Ring A des Chalkons ließ sich eine Tendenz einer geringfügigen Steigerung der Aktivität erkennen, die für den *para*-Acryloylrest gegenüber den *meta*-Acryloylrest spricht. So war Verbindung 511 (*para*;  $IC_{50} = 0,840 \mu\text{mol/l}$ ) ein potenterer Inhibitor als 501 (*meta*;  $IC_{50} = 1,30 \mu\text{mol/l}$ ) und Verbindung 513 (*para*;  $IC_{50} = 1,23 \mu\text{mol/l}$ ) aktiver gegenüber ABCG2 als 503 (*meta*;  $IC_{50} = 1,71 \mu\text{mol/l}$ ). Bei den in Position 2 des Chinazolins unsubstituierten Derivaten stellten sich Verbindungen 504 (*meta*) und 514 (*para*), beide mit 6,7-Dimethoxysubstitution und einer Einfachsubstitution am Ring B des Chalkons, als die mit der höchsten inhibitorischen Aktivität heraus.

Bei Betrachtung der *para*-Chinazolin-Chalkone, die einen Phenylrest in Position 2 des Chinazolins trugen (515, 516, 517 und 518), zeigte sich das gleiche Aktivitätsmuster wie für die *meta*-Acryloyl-Derivate (505, 506 und 507). Dabei kristallisierte sich wieder ein 3,4-Dimethoxyderivat (515) als Verbindung mit der höchsten Aktivität heraus ( $IC_{50} = 0,291 \mu\text{mol/l}$ ), wohingegen das Derivat 517 (4-Methoxy;  $IC_{50} = 3,55 \mu\text{mol/l}$ ) sich als deutlich weniger potent erwies. Wie bereits für die *meta*-Acryloyl-Derivate gezeigt, war die 3,4-Dimethoxysubstitution des Phenylrings an Position 2 des Chinazolins auch bei den *para*-Acryloyl-Derivaten aktivitätssteigernd. Innerhalb dieser Gruppe war die Verbindung 519 mit einem  $IC_{50}$  von nur  $0,190 \mu\text{mol/l}$  der potenteste Vertreter. Aber auch die Verbindung 520 ( $IC_{50} = 0,357 \mu\text{mol/l}$ ) war annähernd so potent wie der Standardinhibitor Ko143 ( $IC_{50} = 0,276 \mu\text{mol/l}$ ). Interessanterweise lieferten die Substanzen 518 und 522 mit unsubstituiertem Ring B des Chalkons in Bezug auf das Substitutionsmuster am 2-Phenylrest des Chinazolins vergleichbare Aktivitätswerte (518:  $IC_{50} = 0,918 \mu\text{mol/l}$ ; 522:  $IC_{50} = 1,09 \mu\text{mol/l}$ ). Damit zeigte sich die Relevanz der Methoxysubstitution am Chalkongerüst.

Zusammenfassend lassen sich im Vergleich aller Derivate der Chinazolin-Chalkone folgende Schlussfolgerungen ziehen; (1) zum einen haben sich die *para*-Acryloyl-Derivate im Gegensatz zu *meta*-Acryloyl-Derivaten als potentere Inhibitoren erwiesen und (2) zum anderen ist die Anwesenheit einer 2-Phenylsubstitution am Chinazolingerüst für eine Steigerung der inhibitorischen Aktivität gegenüber ABCG2 vorteilhaft.

### 5.1.2. Untersuchung des Bindungsverhaltens

Zur Untersuchung der Inhibitionsart der Chinazolin-Chalkone wurden kinetische Studien durchgeführt. Hierfür wurde die potenteste Verbindung (519) ausgewählt und der Inhibitionstyp mit dem ABCG2 Substrat Pheophorbid A bestimmt. Ein Lineweaver-Burk-Diagramm (Abbildung 5.1) veranschaulicht die Veränderung der Maximalgeschwindigkeit bei unterschiedlichen Pheophorbid A Konzentrationen unter Einfluss des Inhibitors. Die Geraden treffen sich an einem gemeinsamen Punkt auf der x-Achse und identifizieren damit ein nicht-kompetitiven Inhibitor des ABCG2-vermittelten Transports von Pheophorbid A. Hierbei ist  $v_{\max}$  herabgesetzt und die Michaeliskonstante  $K_m$  unverändert. Damit besitzen der Inhibitor 519 und das Substrat Pheophorbid A unterschiedliche Bindungsstellen und beeinflussen sich nicht gegenseitig.

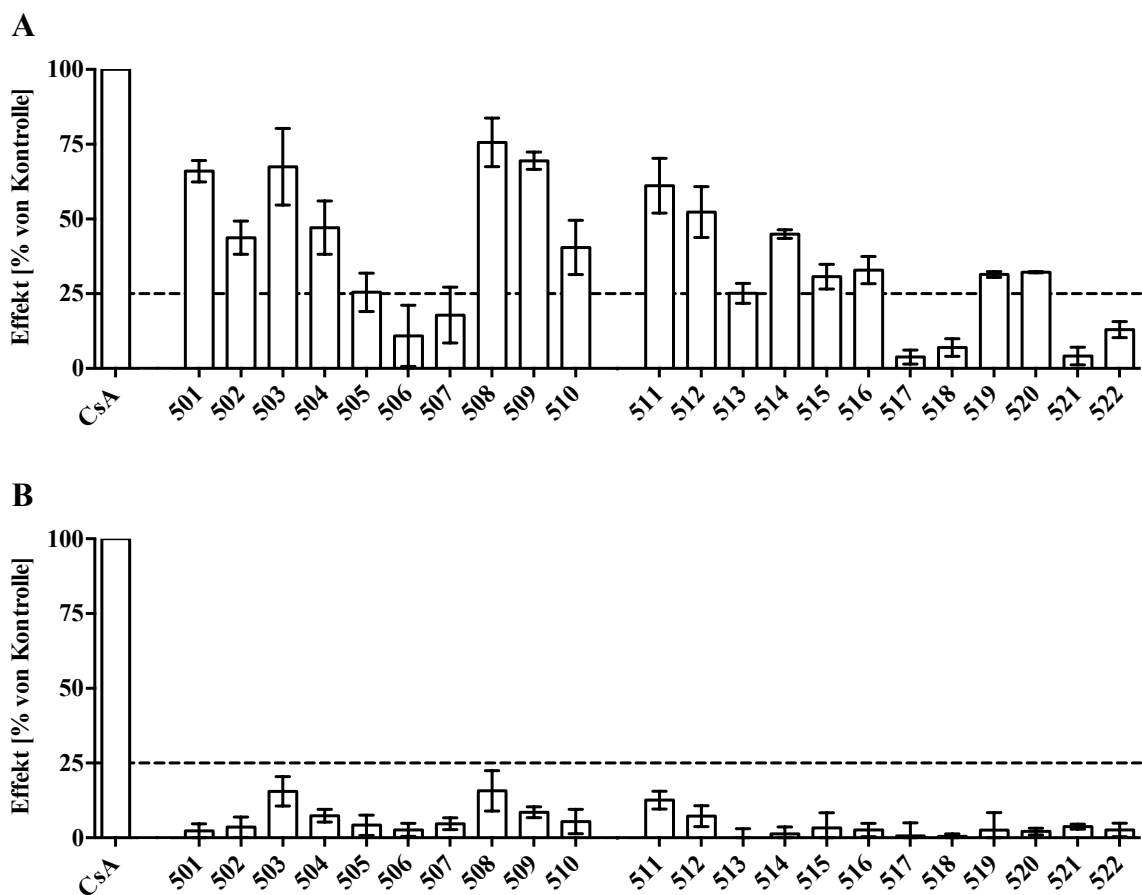


**Abbildung 5.1:** Lineweaver-Burk-Diagramm von Verbindung 519 in Kombination mit dem ABCG2 Substrat Pheophorbid A. Eingesetzte Inhibitorkonzentrationen: 0,000  $\mu\text{mol/l}$  (leere Kreise), 0,031  $\mu\text{mol/l}$  (gefüllte Quadrate), 0,100  $\mu\text{mol/l}$  (gefüllte Kreise), 0,180  $\mu\text{mol/l}$  (gefüllte nach oben gerichtete Dreiecke), 0,310  $\mu\text{mol/l}$  (gefüllte Rauten) und 0,560  $\mu\text{mol/l}$  nach unten gerichtete Dreiecke). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Messungen.

### 5.1.3. Untersuchungen der Inhibition von ABCB1 und ABCC1

Alle synthetisierten Verbindungen wurden zusätzlich auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber den ABC-Transportern ABCB1 und ABCC1 untersucht. Hierfür wurde ein Screening bei einer festgesetzten Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  der Chinazolin-Chalkone im Calcein AM Akkumulationsassay durchgeführt. Außerdem wurden die Zelllinien

A2780 adr (ABCB1) und H69 AR (ABCC1), sowie der Standardinhibitor Ciclosporin A (10  $\mu\text{mol/l}$ ) für beide Transporter verwendet. In Abbildung 5.2 werden die Ergebnisse anhand der Akkumulation des Substrates Calcein AM in einem Balkendiagramm veranschaulicht. Aus diesen ließen sich eindeutige Rückschlüsse auf die höhere Affinität der 22 Chinazolin-Chalkone hinsichtlich ABCB1 im Gegensatz zu ABCC1 ziehen. Wie erwartet, zeigten die Verbindungen mit einer Dimethoxy-Substitution eine relativ hohe inhibitorische Aktivität gegenüber ABCB1. Im Vergleich zwischen den *para*-Acryloyl-Derivaten und *meta*-Acryloyl-Derivaten inhibierten die letztgenannten ABCB1 mit einer höheren Affinität.



**Abbildung 5.2:** Prozentuale Effekte der Chinazolin-Chalkone bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  auf die Akkumulation des Substrates Calcein AM in (A) ABCB1- und (B) ABCC1-überexprimierenden A2780 adr bzw. H69 AR Zellen. Die gemessenen Werte wurden auf den Standardinhibitor Ciclosporin A (CsA; 10  $\mu\text{mol/l}$ ) normalisiert und sind als Mittelwert  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Für die Derivate, die bei einer Konzentration von 10 µmol/l mindestens 25 % Inhibition des jeweiligen Transporters im Vergleich zum Standardinhibitor aufwiesen, wurden zusätzlich Konzentrations-Effektcurven generiert und aus diesen anschließend die IC<sub>50</sub>-Werte ermittelt, die in Tabelle 5.3 aufgeführt sind.

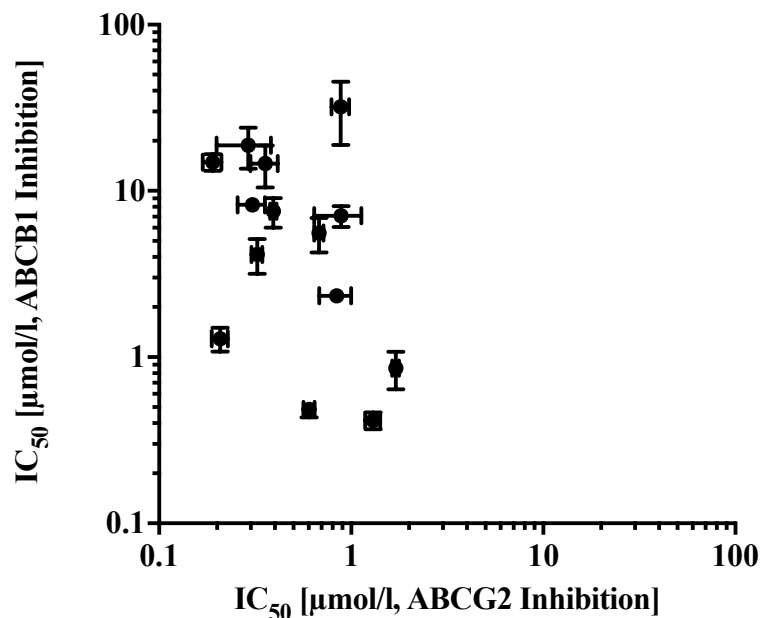
**Tabelle 5.3:** Inhibitorische Aktivität der potenten Chinazolin-Chalkone gegenüber ABCB1 im Calcein AM Akkumulationsassay. Ciclosporin A wurde als Standardinhibitor verwendet und diente als Vergleichssubstanz. Die maximale Inhibition in Prozent, abgeleitet vom erreichten Fluoreszenzplateau, wurde ebenfalls mit Zuhilfenahme von Ciclosporin A (10 µmol/l; 100 %) berechnet. Angegeben sind Mittelwert ± SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. n.b. = nicht bestimmbar. Wenn kein Fluoreszenzplateau bei einer Konzentration von 10 µmol/l erreicht wurde, wurden die entsprechenden IC<sub>50</sub>-Werte durch Fixierung der Kurve auf den Maximal-Effektwert von 10 µmol/l Ciclosporin A bestimmt.

<b>Substanz</b>	<b>Calcein AM Assay IC<sub>50</sub> ± SD [µmol/l]</b>	<b>Maximale Inhibition ± SD [%] bei 10 µmol/l</b>
<b>501</b>	0,416 ± 0,049	66 ± 4
<b>502</b>	7,08 ± 1,02	n.b.
<b>503</b>	0,859 ± 0,219	68 ± 13
<b>504</b>	4,15 ± 0,97	n.b.
<b>508</b>	0,484 ± 0,051	76 ± 8
<b>509</b>	1,29 ± 0,21	70 ± 3
<b>510</b>	8,24 ± 0,07	n.b.
<b>511</b>	2,34 ± 0,14	61 ± 9
<b>512</b>	5,57 ± 1,31	n.b.
<b>514</b>	7,55 ± 1,52	n.b.
<b>515</b>	18,8 ± 5,2	n.b.
<b>516</b>	32,1 ± 13,2	n.b.
<b>519</b>	14,9 ± 1,7	n.b.
<b>520</b>	14,6 ± 4,1	n.b.
<b>Ciclosporin A</b>	1,41 ± 0,06	100

Insbesondere drei Vertreter bestachen durch ihre ansehnliche Inhibitoraktivität (501: IC<sub>50</sub> = 0,416 µmol/l; 503: IC<sub>50</sub> = 0,859 µmol/l; 508: IC<sub>50</sub> = 0,484 µmol/l) und den damit höheren Affinitäten gegenüber ABCB1 als ABCG2. Aufgrund dieser Tatsache sind die genannten

Verbindungen der Chinazolin-Chalkone nennenswerte Dualinhibitoren. Interessanterweise wurde das Fluoreszenzmaximum von Ciclosporin A von keiner der generierten Konzentrations-Effektkurven erreicht, was für eine mögliche partielle Inhibition von ABCB1 spricht.

Vergleicht man nun die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte von ABCB1 und ABCG2 (Abbildung 5.3), besteht keine Korrelation in Bezug auf die Inhibition zwischen den beiden Transportern. Der potenteste Inhibitor (519) zeigt bei den Untersuchungen eine nur sehr schwache Inhibition des ABCB1-Transporters und keine von ABCG2. Demzufolge kann dieser als ein relativ selektiver ABCG2-Inhibitor (78-fach potenter im Vergleich zu ABCB1) klassifiziert werden.

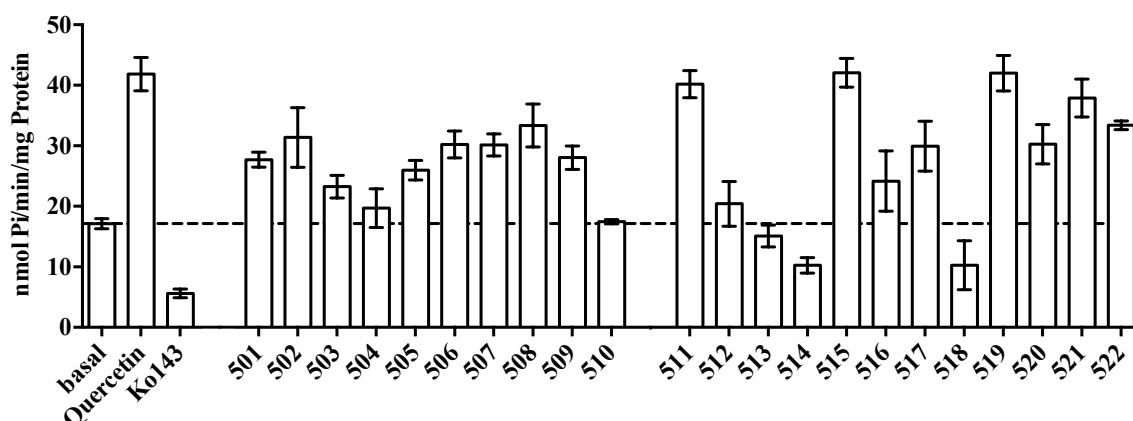


**Abbildung 5.3:** Scatterplot der ermittelten  $IC_{50}$ -Werte aus dem Calcein AM Assay (ABCB1 Inhibition) und dem Pheophorbid A Assay (ABCG2 Inhibition). Jeder Punkt mit dazugehörigen Fehlerbalken entspricht dem Mittelwert  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Experimenten.

#### 5.1.4. Untersuchung der ATPase Aktivität von ABCG2

Um die Interaktionen zwischen Chinazolin-Chalkonen und dem ABC-Transporter ABCG2 besser zu verstehen, wurden die Verbindungen hinsichtlich ihrer Effekte auf die ATPase Aktivität untersucht. Bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  wurde die Aktivität der ATPase aller Derivate zunächst einmal im Vergleich zu den Standardsubstanzen bestimmt. Die

Basalaktivität wurde durch DMSO charakterisiert, Aktivierung durch 1  $\mu\text{mol/l}$  Quercetin festgelegt und die Inhibition der ATPase durch 1  $\mu\text{mol/l}$  Ko143 definiert. In Abbildung 5.4 ist deutlich zu erkennen, dass die meisten Vertreter der Chinazolin-Chalkone eine aktivierende Wirkung auf die ATPase ausübten. Darüber hinaus aktivierten die Verbindungen 511, 515 und 519 die ATPase im gleichen Maße wie Quercetin. Die genannten Substanzen enthielten alle einen *para*-Acryloylrest an Ring A und eine 3,4-Dimethoxysubstitution an Ring B des Chalkongerüsts. Aufgrund der Ergebnisse verhielten sich die Chinazolin-Chalkone als ATPase Aktivatoren und könnten damit Substrate sein. Derivate wie 503, 504, 513 und 514, die eine 6,7-Dimethoxysubstitution an der Chinazolin-Teilstruktur trugen, fielen durch nicht nennenswerte Effekte auf die ATPase Aktivität auf.

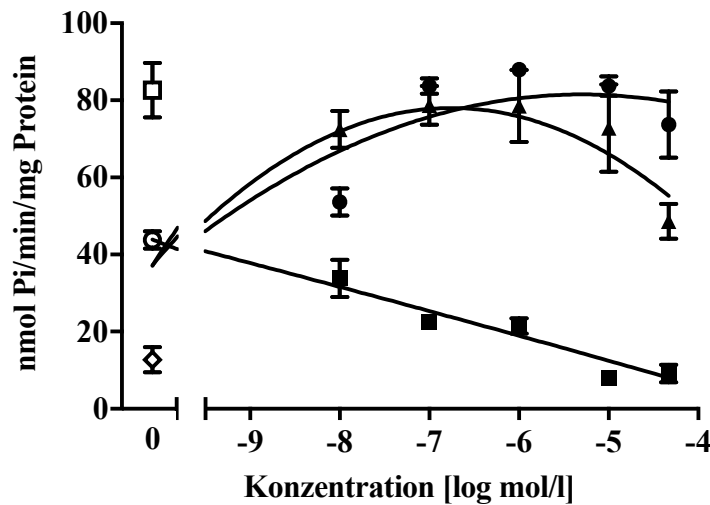


**Abbildung 5.4:** Effekte der Chinazolin-Chalkone auf die Vanadat-sensitive ATPase Aktivität in isolierten ABCG2-enhaltenden Sf9-Membranen bei einer festgesetzten Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$ . Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Experimenten.

Eine weitere Charakterisierung ausgewählter Chinazolin-Chalkone erfolgte durch die Aufnahme von Konzentrations-Effektkurven (Abbildung 5.5). Die Kurvenverläufe der Verbindung 514 als inhibierende Substanz, sowie Verbindungen 511 und 519 als aktivierende Substanzen der ATPase Aktivität, wurden analysiert. Substanz 519 besaß einen ansteigenden Ast bis zu einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$ , im weiteren Verlauf sank die ATPase Aktivität jedoch bei höheren Konzentrationen wieder ab. Im Gegensatz dazu



verhielt sich die Verbindung 514 bis zu einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  inhibierend auf die ATPase Aktivität. Bei höheren Konzentrationen wurde dieser Effekt weiter verstärkt.



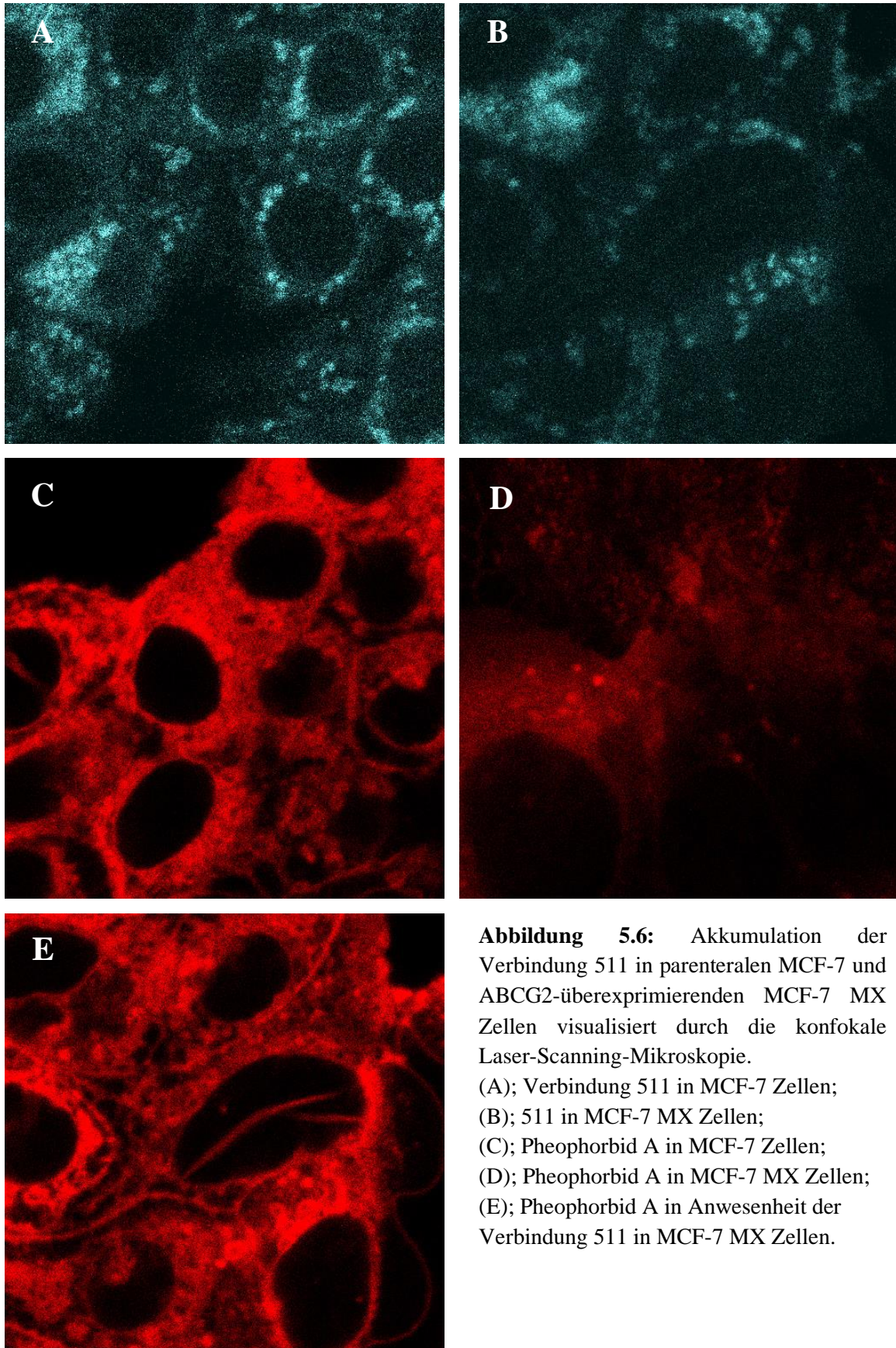
**Abbildung 5.5:** Vergleich der Effekte ausgewählter Chinazolin-Chalkone auf die Vanadat-sensitive ATPase in isolierten ABCG2-enhaltenden Sf9-Membranen. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse der Verbindungen 511 (gefüllte Kreise), 514 (gefüllte Quadrate) und 519 (gefüllte Dreiecke) aus drei unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung. Kontrollwerte sind dargestellt durch Dimethylsulfoxid (leerer Kreis) für die Basalaktivität, Quercetin (1  $\mu\text{mol/l}$ ; leeres Quadrat) als aktivierender Effekt und Ko143 (1  $\mu\text{mol/l}$ ; leere Raute) als inhibierender Effekt.

### 5.1.5. Untersuchung der Verbindung 511 auf ihre Akkumulation in ABCG2 exprimierenden Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie und -spektroskopie

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse aus dem Vanadat-sensitiven ATPase Assay, dass Chinazolin-Chalkone die ATPase annähernd wie die Standardsubstanz Quercetin stimulierten, war die Schlussfolgerung naheliegend, dass diese womöglich durch ABCG2 transportiert wurden.

Mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie konnte diese Annahme geprüft werden. Unter den ATPase-stimulierenden Substanzen hat die Verbindung 511 moderate, fluoreszierende Eigenschaften bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm gezeigt und wurde damit für die Untersuchung ausgewählt. Angesichts der Tatsache, dass das GFP (green fluorescence protein), welches an die cDNA der ABCG2-transfizierten MDCK II Zellen gekoppelt ist, bei den gleichen Wellenlängen angeregt wird und damit die Messung nachhaltig stört,

wurden die Studien mit parenteralen MCF-7 und ABCG2-überexprimierenden MCF-7 MX Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit der Verbindung 511 (10  $\mu\text{mol/l}$ ) für zwei Stunden inkubiert, anschließend gewaschen und nach 30 min die zelluläre Fluoreszenz mithilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Nikon A1 R), unter Mitwirkung von Dr. Thomas Ross visualisiert. Abbildungen 5.6 A und B veranschaulichen die Ergebnisse. Die untersuchte Verbindung zeigte keinen Unterschied in der Intensität der Fluoreszenz zwischen den parenteralen MCF-7 und der ABCG2-überexprimierenden MCF-7 MX Zelllinien. Damit wurde der Nachweis erbracht, dass kein aktiver Efflux der Substanz durch den Transporter ABCG2 stattfindet. Die gefundenen Ergebnisse wurden durch weitere Experimente bekräftigt. So ließ sich eine Akkumulation des Substrates Pheophorbid A bei Anwesenheit der Verbindung 511 in der Zelllinie MCF-7 MX beobachten. Der gemessene Fluoreszenzanstieg war unter anderem mit dem der parenteralen Zelllinie MCF-7 vergleichbar. Abbildungen 5.6 C bis D beweisen, dass Chinazolin-Chalkone den Pheophorbid A Transport inhibieren und dabei nicht selbst transportiert werden.



**Abbildung 5.6:** Akkumulation der Verbindung 511 in parenteralen MCF-7 und ABCG2-überexprimierenden MCF-7 MX Zellen visualisiert durch die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.

(A); Verbindung 511 in MCF-7 Zellen;

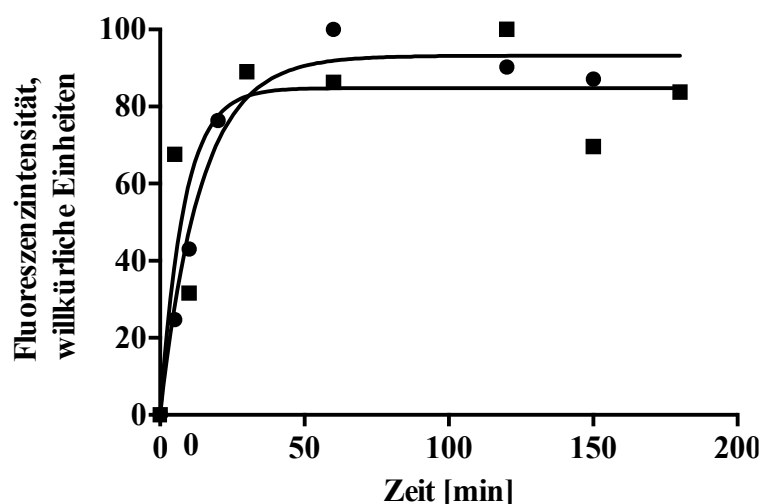
(B); 511 in MCF-7 MX Zellen;

(C); Pheophorbid A in MCF-7 Zellen;

(D); Pheophorbid A in MCF-7 MX Zellen;

(E); Pheophorbid A in Anwesenheit der Verbindung 511 in MCF-7 MX Zellen.

Weitere kinetische Studien wurden außerdem mithilfe der Fluoreszenzspektroskopie unternommen. Verbindung 511 (10  $\mu\text{mol/l}$ ) wurde für unterschiedliche Zeitintervalle mit den parenteralen MCF-7 sowie den MCF-7 MX Zellen inkubiert. Anschließend wurde nach einem Waschschrift in einem Fluorimeter (PerkinElmer LS 55 Luminescence Spectrometer) vermessen und die intrazelluläre Fluoreszenz bestimmt. Im Vergleich der zeitabhängigen Bestimmung beider Zelllinien zeigte sich keine Differenz. Wie in Abbildung 5.7 zu sehen, erfolgte der intrazelluläre Anstieg innerhalb der ersten Minuten unter Erreichen eines Plateaus nach ungefähr 60 Minuten.

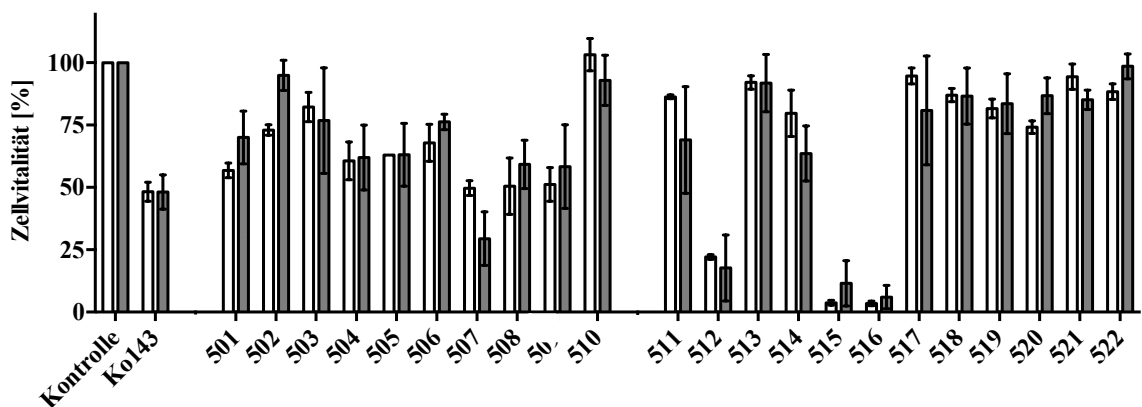


**Abbildung 5.7:** Intensität der intrazellulären Fluoreszenz der Verbindung 511 gemessen in regelmäßigen Zeitintervallen in parenteralen MCF-7 (gefüllte Quadrate) und MCF-7 MX (gefüllte Kreise) Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

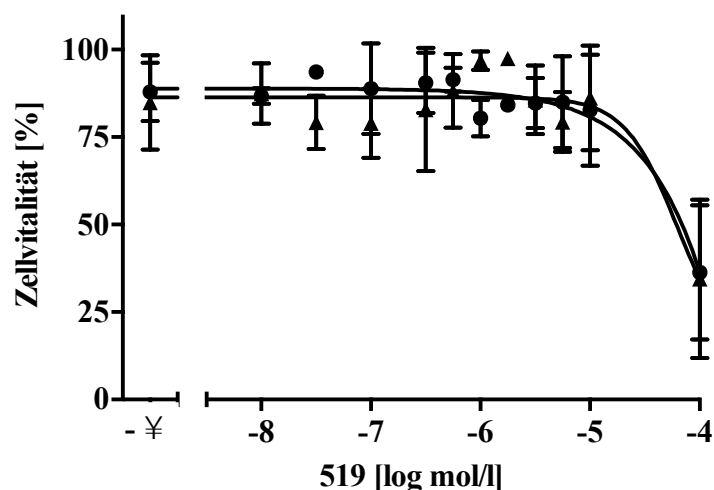
Beide Resultate, sowohl die aus der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie als auch die der Fluoreszenzspektroskopie, widerlegten die Annahme, dass Chinazolin-Chalkone von ABCG2 transportiert werden. Es stellte sich so dar, dass die Stimulation der ATPase Aktivität nicht in direkter Verbindung zum Transport durch ABCG2 steht und damit nicht zwangsläufig ein Substrat vorliegen muss.

### 5.1.6. Untersuchung der zellulären Toxizität der Chinazolin-Chalkone

Um zellspezifische Effekte auszuschließen und die therapeutische Rate bestimmen zu können, wurden alle synthetisierten Derivate der Chinazolin-Chalkone auf ihre Toxizität in MCDK II und MDCK II BCRP Zellen untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit der jeweiligen Substanz bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  über 72 Stunden inkubiert. Die Vitalität der Zellen konnte anschließend mit einem kolorimetrischen MTT-basierten Vitalitäts-Assay bestimmt werden. Wie in Abbildung 5.8 zu erkennen ist, besaßen die Substanzen nur geringe toxische Effekte. Lediglich Substanzen 512 und 515, sowie 516 und 507 zeigten eine hohe Toxizität, die jedoch nicht durch die chemische Struktur der Verbindungen zu erklären war. Für die potenteste Verbindung aller getesteten Chinazolin-Chalkone (519) wurde außerdem eine Konzentrations-Effektkurve aufgenommen. Das Ergebnis stimmte mit dem Screening überein und zeigte keine erwähnenswerte Toxizität mit einem  $\text{GI}_{50}$ -Wert von über 93  $\mu\text{mol/l}$  (Abbildung 5.9). Nach Ermittlung der  $\text{GI}_{50}$ - und  $\text{IC}_{50}$ -Werte konnte das Verhältnis dieser gebildet und somit die therapeutische Rate berechnet werden (Tabelle 5.4). Unter den untersuchten Verbindungen besaß die Substanz 519 den höchsten therapeutischen Index und wäre damit für weitere *in vivo* Untersuchungen von Interesse. Im Vergleich dazu hatte der Standardinhibitor Ko143 aufgrund seiner Toxizität eine 10fach niedrigere therapeutische Rate.



**Abbildung 5.8:** Einfluss der Chinazolin-Chalkone (10  $\mu\text{mol/l}$ ) auf die Zellvitalität von MDCK II (graue Balken) und MDCK II BCRP (weiße Balken) Zellen. Die Bestimmung wurde mit einem MTT-basierten Vitalitäts-Assay durchgeführt. Die dabei erhaltenen Absorptionswerte wurden auf pures Nährmedium (100 %) und 10 % DMSO (0 %) normalisiert. Die Experimente wurden in Duplikaten und in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD.



**Abbildung 5.9:** Konzentrations-Effektkurve der Verbindung 519 ermittelt in einem MTT-basierten Vitalitäts-Assay unter Verwendung von MDCK II (gefüllte Dreiecke) und MDCK II BCRP (gefüllte Kreise) Zellen nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden. Der ermittelte  $GI_{50}$ -Wert beträgt  $93 \mu\text{mol/l}$  in der resistenten und  $132 \mu\text{mol/l}$  in der sensitiven Zelllinie. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

**Tabelle 5.4:** Therapeutische Rate ausgewählter Verbindungen. Berechnet wurde diese aus dem  $IC_{50}$ -Wert (Pheophobid A Assay; Tabelle 5.1 und 5.2) und dem  $GI_{50}$ -Wert (MTT-basierter Vitalitäts-Assay).

Substanz	Pheophobid A	MTT-Assay		Therapeutische Rate
	$IC_{50} [\mu\text{mol/l}]$	$GI_{50} [\mu\text{mol/l}]$	$GI_{50} [\mu\text{mol/l}]$	
	MDCK II BCRP	MDCK II BCRP	MDCK II	
<b>501</b>	1,30	5,14	3,42	4
<b>503</b>	1,71	11,5	6,14	7
<b>504</b>	0,324	12,7	16,9	40
<b>508</b>	0,604	10,9	12,6	18
<b>509</b>	0,208	13,1	10,3	62
<b>510</b>	0,306	84,7	65,5	273
<b>515</b>	0,291	4,80	3,46	17
<b>519</b>	0,190	92,9	132	489
<b>Ko143</b>	0,246	11,1	10,9	46

Des Weiteren wurden Verbindungen ausgewählt, die gegenüber ABCB1 gute, inhibitorische Aktivität gezeigt hatten und es wurde ebenfalls ihre Toxizität, diesmal in parenteralen A2780 sowie A2780 adr Zellen, bestimmt (Tabelle 5.5). Im Vergleich zu den MDCK II Zellen waren die Substanzen für die A2780 Zellen toxischer. Ein zusätzlicher Vergleich der pGI<sub>50</sub>-Werte ergab eine Korrelation zwischen den untersuchten Zelllinien (Tabelle 5.6).

**Tabelle 5.5:** Therapeutische Rate ausgewählter Verbindungen. Berechnet wurde dieser aus dem IC<sub>50</sub>-Wert (Calcein AM Assay; Tabelle 5.3) und dem GI<sub>50</sub>-Wert (MTT-basierter Vitalitäts-Assay).

Substanz	Calcein AM Assay	MTT Assay	MTT Assay	Therapeutische
	IC <sub>50</sub> [μmol/l]	GI <sub>50</sub> [μmol/l]	GI <sub>50</sub> [μmol/l]	Rate
	A2780 adr	A2780 adr	A2780	GI <sub>50,adr</sub> /IC <sub>50</sub>
<b>501</b>	0,416	0,696	0,654	2
<b>503</b>	0,859	1,50	1,35	2
<b>508</b>	0,484	1,71	1,98	4
<b>509</b>	1,29	3,25	4,39	3
<b>Ciclosporin A</b>	1,41	8,63	8,94	6

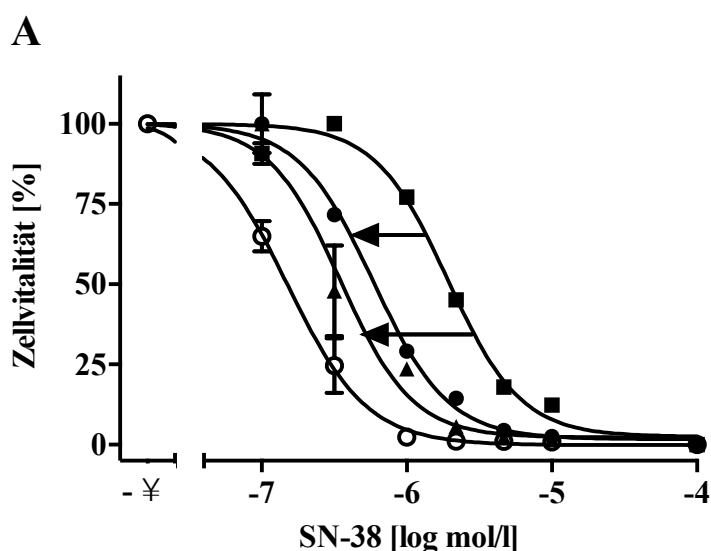
**Tabelle 5.6:** Korrelationskoeffizienten der pGI<sub>50</sub>-Werte bestimmt in den vier untersuchten Zelllinien.

	MDCK II Wildtyp	MDCK II BCRP	A2780	A2780 adr
<b>MDCK II Wildtyp</b>	1			
<b>MDCK II BCRP</b>	0,970	1		
<b>A2780</b>	0,846	0,866	1	
<b>A2780 adr</b>	0,832	0,918	0,991	1

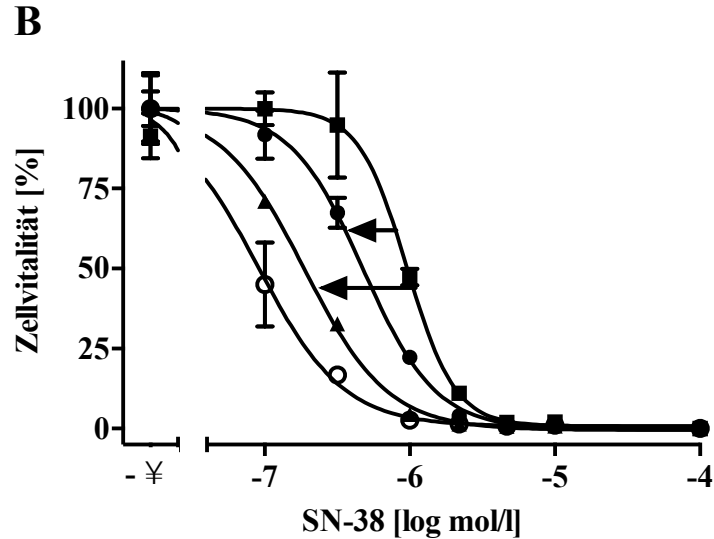
Die Zytotoxizität der Verbindungen in Wildtyp-Zellen als auch in ABC-Transporter-überexprimierenden Zellen unterschied sich nur minimal, sodass rückschließend die Substanzen als keine oder nur ganz schwachen Substrate von ABCG2 und ABCB1 bezeichnet werden können. Diese Ergebnisse korrelierten somit auch mit denen der lasermikroskopischen und flurimetrischen Untersuchungen.

### 5.1.7. Sensitivierung der ABCG2-überexprimierenden Zellen durch Chinazolin-Chalkone

Die Untersuchung der Substanzen, im Hinblick auf ihre Fähigkeit ABCG2-überexprimierende Zellen gegenüber Zytostatika zu sensitivieren, wurde unter Verwendung von SN-38, dem aktiven Metaboliten des Zytostatikums Irinotecan, durchgeführt. Für den besseren Vergleich wurde unter anderem auch die Effizienz der Standardsubstanz Ko143 kontrolliert. Die Verbindung 519, welche sich als die potenteste der Serie herausgestellt hatte, als auch Ko143, wurden mit Konzentrationen von 0,01  $\mu\text{mol/l}$  und 0,1  $\mu\text{mol/l}$  eingesetzt. Abbildungen 5.10 A und B stellen die Verschiebung der Konzentrations-Effektkurven des ABCG2 Substrates SN-38 in Anwesenheit der untersuchten Substanzen dar. Diese spiegelten die konzentrationsabhängige, sinkende Vitalität der ABCG2-überexprimierenden Zellen auf die Ebene der Wildtyp Zelllinie wider. Selbst im nanomolaren Bereich besaßen sowohl die Verbindung 519 als auch Ko143 die Fähigkeit, die Zellen, die das Transportprotein ABCG2 überexprimieren, zu sensitivieren. Durch die Inhibition von ABCG2 wurde der Export des Zytostatikums SN-38 minimiert, sodass dessen Wirksamkeit erhöht wurde und sich die Sensitivität der MDCK II BCRP Zelllinie gegenüber diesem Zytostatikum der der Wildtypzelllinie MDCK II annäherte.



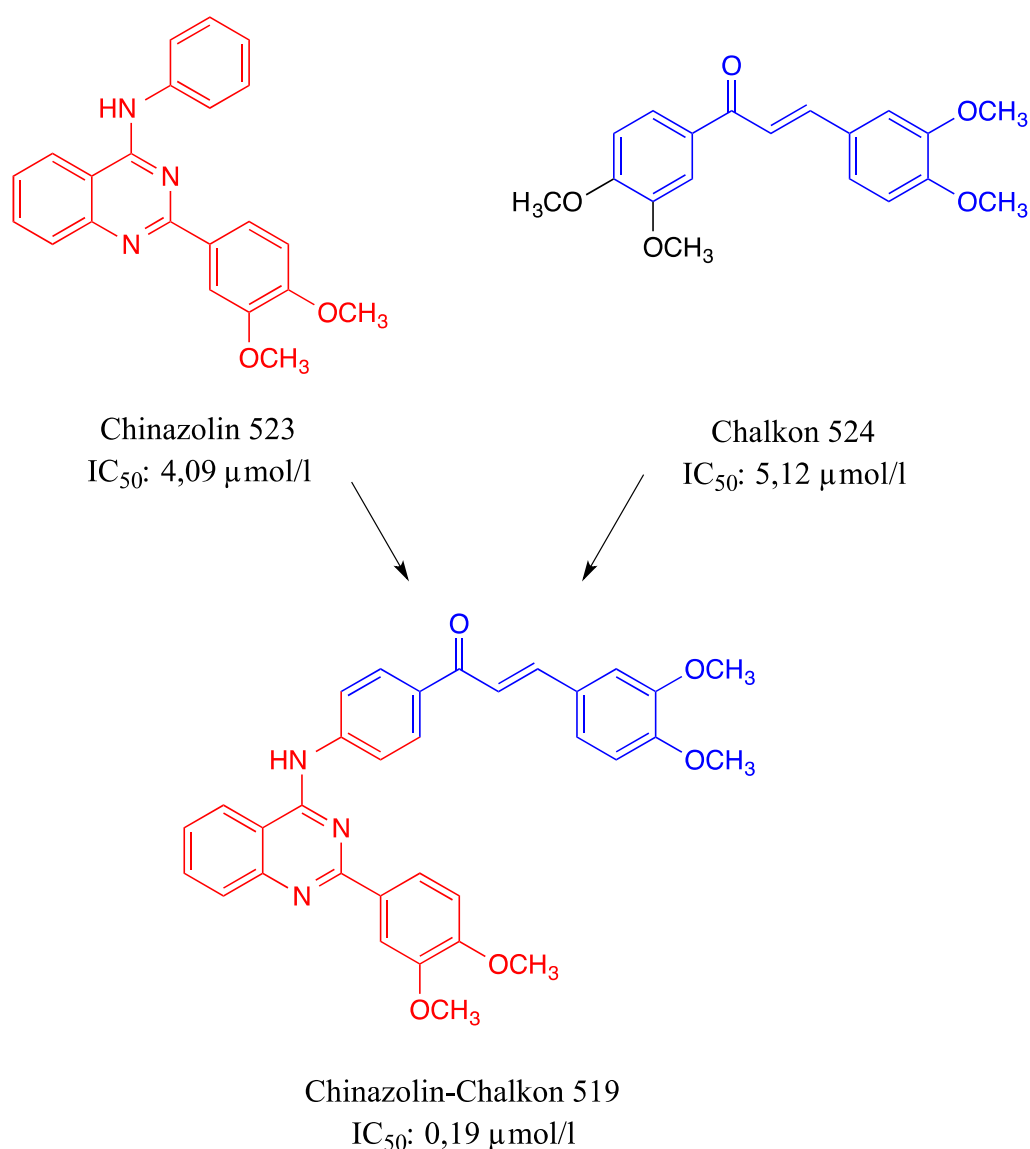




**Abbildung 5.10:** Repräsentative Verschiebung der Konzentrations-Effektkurven von zytotoxischem SN-38 als Effekt dessen Zytotoxizitätssteigerung in Verbindung mit 519 (A) und Ko143 (B). Pfeile symbolisieren die konzentrationsabhängige Sensitivierung der MDCK II BCRP Zellen. Beide Substanzen wurden in Konzentrationen von 0,01  $\mu\text{mol/l}$  (gefüllte Kreise) und 0,1  $\mu\text{mol/l}$  (gefüllte Dreiecke) untersucht. ABCG2-überexprimierende Zellen ohne Inhibitor (gefüllte Quadrate) sind deutlich resistenter als die Wildtyp-Zellen (leere Kreise). Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung.

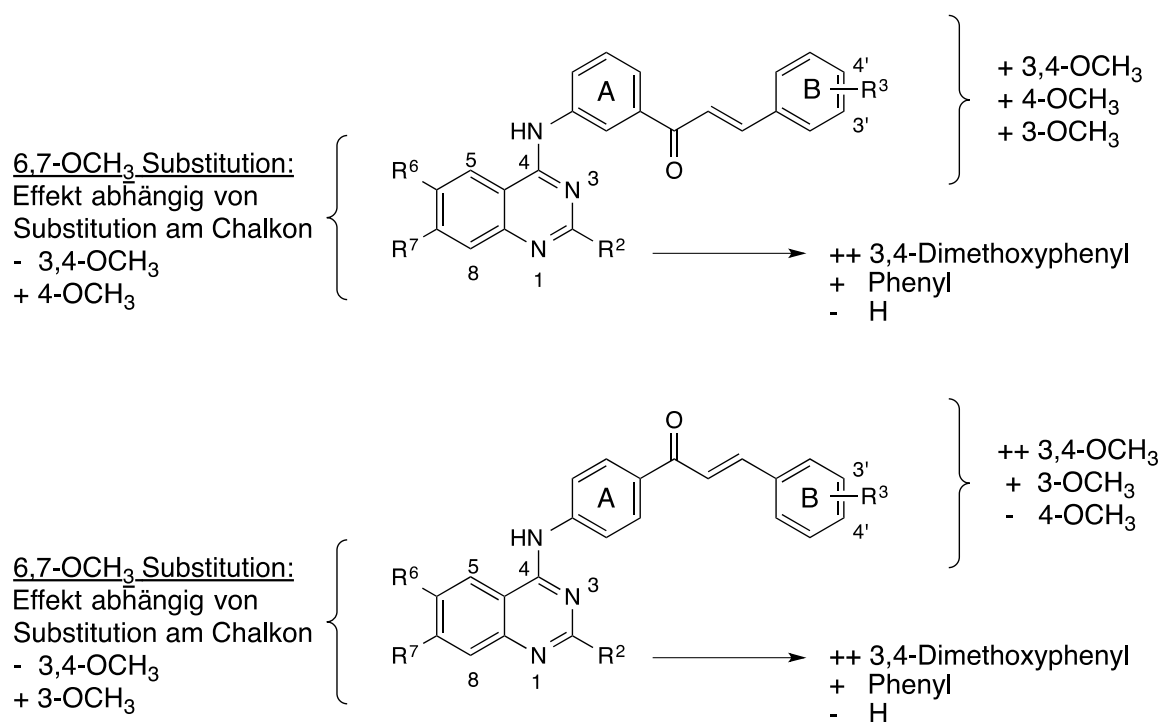
### 5.1.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Kombination der Chinazolin- und Chalkon-Partialgerüste führte zu einer neuartigen heterodimeren Strukturklasse von ABCG2 Inhibitoren mit  $IC_{50}$ -Werten im submikromolaren Konzentrationsbereich. Im Vergleich zu den einzeln Ausgangs-Partialstrukturen, Chinazolin Derivat 523 ( $IC_{50} = 4,09 \mu\text{mol/l}$ ) [167] und das Chalkon Derivat 524 ( $IC_{50} = 5,12 \mu\text{mol/l}$ ) [246], besaß die beste heterodimere Verbindung 519 einen  $IC_{50}$ -Wert von  $0,19 \mu\text{mol/l}$  und war damit circa 25-fach potenter im Hinblick auf die ABCG2 Inhibition.



**Abbildung 5.11:** Darstellung der strukturellen Kombination des Chinazolins 523 und des Chalkons 524 zu einem Chinazolin-Chalkon 519.

Wie bereits für Chinazoline gezeigt [167,171,172], war ein 2-Phenylring in Kombination mit zwei Methoxygruppen von Vorteil und führte zu einer Steigerung der inhibitorischen Aktivität. Eine graphische Darstellung der Struktur-Wirkungsbeziehungen der Chinazolin-Chalkone hinsichtlich der inhibitorischen Aktivität gegenüber ABCG2 ist in der Abbildung 5.12 gegeben.



**Abbildung 5.12:** Struktur-Wirkungsbeziehungen der Chinazolin-Chalkone hinsichtlich der inhibitorischen Aktivität gegenüber ABCG2; ++ sehr positiver Effekt, + positiver Effekt, - negativer Effekt auf die Aktivität.

Ein Großteil der Verbindungen zeigte nur geringe Inhibition von ABCB1 und keine gegenüber ABCC1. Allerdings hatten drei der Verbindungen (501, 503 und 508) höhere inhibitorische Aktivitäten gegenüber ABCB1 als bei ABCG2. Eine Besonderheit stellte die Verbindung 508 dar, die sich als äquipotenter Dualinhibitor von ABCB1 und ABCG2 herausstellte (ABCB1: IC<sub>50</sub> = 0,484 µmol/l; ABCG2: IC<sub>50</sub> = 0,604 µmol/l). Aufgrund der erhöhten Toxizität der genannten Verbindungen ist ihr Einsatz als Dualinhibitoren im therapeutischen Bereich bedauerlicherweise limitiert.

Bei Untersuchungen zur Stimulierung der ABCG2 ATPase wurden die meisten Verbindungen der Chinazolin-Chalkone als Aktivatoren identifiziert und könnten damit Substrate von ABCG2 sein. Um dies auszuschließen, wurden weitere Untersuchungen

bezüglich des möglichen Transports durch ABCG2 durchgeführt. Beide Experimente, sowohl die Laser-Scanning-Mikroskopie als auch die Fluoreszenzspektroskopie, widerlegten diese Annahme.

Für den weiteren Einsatz der Verbindungen, insbesondere im therapeutischen Bereich, sind nicht-toxische Substanzen von Bedeutung, die die Effluxfunktion der ABC-Transporter inhibieren und so die Wirksamkeit der Zytostatika steigern. Die vorgestellten Verbindungen zeigten größtenteils eine geringe Toxizität und die potenteste Verbindung 519 besaß einen GI<sub>50</sub>-Wert von 93 µmol/l. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass diese Verbindung, wie auch Ko143, die Resistenz gegenüber dem untersuchten Zytostatikum SN-38 aufhob. Diese Ergebnisse machten die Substanz für weitere Untersuchungen sowohl *in vitro* als auch insbesondere *in vivo* interessant. In der Gesamtheit waren Chinazolin-Chalkone hochpotente, (partial)selektive heterodimere Verbindungen von geringer Toxizität, die die Multidrug Resistenz überwandern.

## 5.2. Zusätzliche Erkenntnisse durch Ausweiten des Substitutionsmusters

Die Ergebnisse der ersten Serie stellten dar, dass die Dimerisierung von heterogenen Strukturklassen zu (partial)selektiven, untoxischen und potenten Inhibitoren von ABCG2 führt. Um die Struktur-Wirkungsbeziehungen tiefergehend zu analysieren, wurde das Substitutionsmuster weiter ausgebaut und neben Methoxygruppen weitere Substituenten untersucht. Dieses aufbauende Projekt wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Stefanie Kraege, die für die gesamte Synthese der 12 neuen Derivate verantwortlich war, durchgeführt.

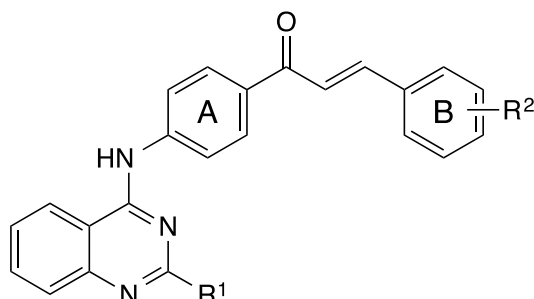
### 5.2.1. Funktionelle Untersuchungen von Chinazolin-Chalkonen an ABCG2

Das Substitutionsmuster orientierte sich auch in der zweiten Serie der Chinazolin-Chalkone an den bereits gewonnenen Erkenntnissen der einzelnen Strukturklassen. So haben Nitro- und Cyanoverbindungen als auch die Substitution mit Halogenen eine positive Auswirkung auf die inhibitorische Aktivität der Substanzen an ABCG2 [166,167,171-174,208,245].

Für die Untersuchung anderer Substituenten wurde als Verknüpfung zwischen dem Chinazolin und dem Chalkon der *para*-Acryloylphenylrest an Ring A des Chalkons gewählt, da aus dieser Gruppe die potenteste Verbindung der zuvor beschriebenen Serie stammte, sowie eine Tendenz zu potenteren Inhibitoren bestand.

Bei den ersten Substanzen, die in Position 2 des Chinazolins einen unsubstituierten Phenylrest trugen, wurden am Ring B des Chalkons in Position 3 bzw. 4 unterschiedliche Substituenten untersucht. In der Literatur werden in Bezug auf Chinazoline am Anilinorest in Position 4 Reste wie Nitro und Cyano als aktivitätssteigernd beschrieben [166,167,171-174,208,245]. Daher wurde zunächst eine Nitrosubstitution in Position 3 (525,  $IC_{50} = 2,57 \mu\text{mol/l}$ ) bzw. 4 (526,  $IC_{50} = 1,46 \mu\text{mol/l}$ ) evaluiert, wobei Position 4 eindeutig bevorzugt wurde. Der Effekt dieser Substitution in dieser Position erwies sich als antiproportional zu den Substitutionen mit Methoxygruppen aus der ersten Serie. Daher wurden weitere Reste wie Cyano, Chloro und Trifluoromethyl erwogen. Dabei kristallisierte sich die Cyano-Substitution als aktivste Verbindung gegenüber ABCG2 heraus (527:  $IC_{50}$ -Wert von  $1,18 \mu\text{mol/l}$ ). Dieselbe Substanz 527 hatte mit 68 % das höchste Inhibitionsmaximum im Vergleich zum Standardinhibitor Ko143 (Abbildung 5.12), während im Allgemeinen die Inhibitionsmaxima der hier untersuchten Substanzen im Durchschnitt bei nur 50 % lagen.

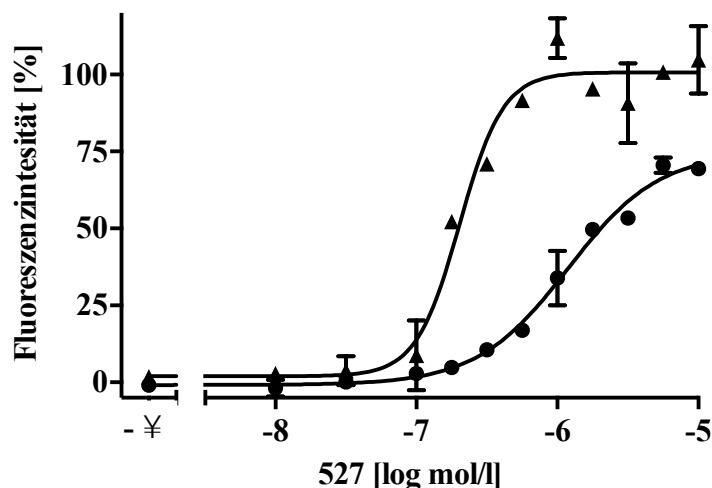
**Tabelle 5.7:** Untersuchung der ABCG2-inhibierenden Eigenschaften der Chinazolin-Chalkone, die einen *para*-Acryloylphenylrest am Ring A des Chalkons tragen. Die Substanzen wurden mittels Pheophorbid A Assays an MDCK II BCRP Zellen untersucht. Aufgeführt sind Mittelwert  $\pm$  SD der in mindestens drei unabhängigen Experimenten ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte. Als Standardinhibitor wurde Ko143 (10  $\mu$ mol/l) verwendet.



Substanz	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Pheophorbid A	Maximale Inhibition
			IC <sub>50</sub> $\pm$ SD [ $\mu$ mol/l]	% $\pm$ SD bei 10 $\mu$ mol/l
<b>525</b>	Phenyl	3-NO <sub>2</sub>	2,57 $\pm$ 0,52	40 $\pm$ 9
<b>526</b>	Phenyl	4-NO <sub>2</sub>	1,46 $\pm$ 0,07	46 $\pm$ 16
<b>527</b>	Phenyl	4-CN	1,18 $\pm$ 0,19	68 $\pm$ 3
<b>528</b>	Phenyl	4-Cl	2,88 $\pm$ 0,51	38 $\pm$ 3
<b>529</b>	Phenyl	4-CF <sub>3</sub>	2,24 $\pm$ 0,23	38 $\pm$ 10
<b>530</b>	3-NO <sub>2</sub> -Phenyl	3,4-OCH <sub>3</sub>	0,495 $\pm$ 0,050	71 $\pm$ 1
<b>531</b>	3-NO <sub>2</sub> -Phenyl	4-OCH <sub>3</sub>	0,738 $\pm$ 0,115	63 $\pm$ 4
<b>532</b>	3-NO <sub>2</sub> -Phenyl	3-OCH <sub>3</sub>	1,52 $\pm$ 0,10	49 $\pm$ 19
<b>533</b>	3-NO <sub>2</sub> -Phenyl	H	2,09 $\pm$ 0,22	38 $\pm$ 16
<b>534</b>	3-CN-Phenyl	3,4-OCH <sub>3</sub>	0,996 $\pm$ 0,125	76 $\pm$ 13
<b>535</b>	4-CN-Phenyl	4-OCH <sub>3</sub>	0,997 $\pm$ 0,186	64 $\pm$ 13
<b>536</b>	2-Pyridyl	3,4-OCH <sub>3</sub>	2,25 $\pm$ 0,22	47 $\pm$ 9
<b>Ko143</b>			0,276 $\pm$ 0,040	100

Die geringe Maximalinhibition ist erst bei dem angewandten Substitutionsmuster aufgefallen. Einen plausiblen Grund für die partielle Inhibition gibt es bis heute nicht. Aufgrund der mäßigen Aktivitätswerte im Bereich von über 1  $\mu$ mol/l wurde von weiteren Derivaten, wie z. B. mit 3,4-Dimethoxyphenyl in Position 2 des Chinazolins abgesehen

und der Fokus auf die Veränderung der Substitution am Ring B des Chalkons in Positionen 3 und 4 gelegt. Im Fall von ABCG2 hatte sich die Anwesenheit von Methoxygruppen in der untersuchten Position in Bezug auf die Aktivität als ein wesentlicher Bestandteil erwiesen.



**Abbildung 5.12:** Konzentrations-Effektkurve der Verbindung 527 (gefüllte Kreise) im Vergleich zum Standardinhibitor Ko143 (100 %; gefüllte Dreiecke), vermessen in den ABCG2-überexprimierenden MDCK II BCRP Zellen im Pheophorbid A Assay. Veranschaulicht ist ein repräsentatives Ergebnis einer Messung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten.

Weitere Derivate mit einem 3-Nitrophenylrest in Position 2 des Chinazolin-Teilgerüsts wurden synthetisiert und dessen Effekt in Abhängigkeit von der Substitution des Chalkons am Ring B untersucht. Je weniger Methoxygruppen am Ring B vorhanden waren, desto niedriger war die Aktivität ( $530 > 531 > 532 > 533$ ). Auch hier wurde die Substitution in Position 4 (531,  $IC_{50} = 0,738 \mu\text{mol/l}$ ) gegenüber Position 3 (532,  $IC_{50} = 1,52 \mu\text{mol/l}$ ) bevorzugt. Die Substanz 530 erwies sich als die beste Verbindung der untersuchten Derivate. Mit einem  $IC_{50}$  von  $0,495 \mu\text{mol/l}$  und einem Inhibitionsmaximum von über 70 % war die Verbindung 530 der potenteste Inhibitor von ABCG2 und wurde für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Die Substanzen 534 und 535 besaßen anstatt einer Nitrogruppe am Phenylring des Chinazolins eine Cyanogruppe. Diese Veränderung erwies sich jedoch im direkten Vergleich zu 530 (Nitro) und 534 (Cyano) als Nachteil, da die Aktivität um eine halbe log-Einheit sank. Auch die Substitution in Position 4 des Phenylrings veränderte nicht die deutlich schlechtere Aktivität gegenüber ABCG2 ( $IC_{50}: \sim 1 \mu\text{mol/l}$ ).

Zuletzt wurde ein Pyridylrest in Position 2 untersucht, um ein heterozyklisches System mit einem nicht-substituierten Phenylring zu vergleichen. Verbindung 515 ( $IC_{50} = 0,291 \mu\text{mol/l}$ ) wurde bereits in der ersten Serie der Chinazolin-Chalkone untersucht. Diese war im Vergleich um eine knappe log-Einheit potenter als die korrespondierende Verbindung 536 ( $IC_{50} = 2,25 \mu\text{mol/l}$ ). Auch das Inhibitionsmaximum war bei dieser Verbindung auf 47 % herabgesetzt. Die Synthese von weiteren Derivaten mit einem heterozyklischen Ring in Position 2 war damit nicht erfolgsversprechend und wurde aus diesem Grund nicht weitergeführt.

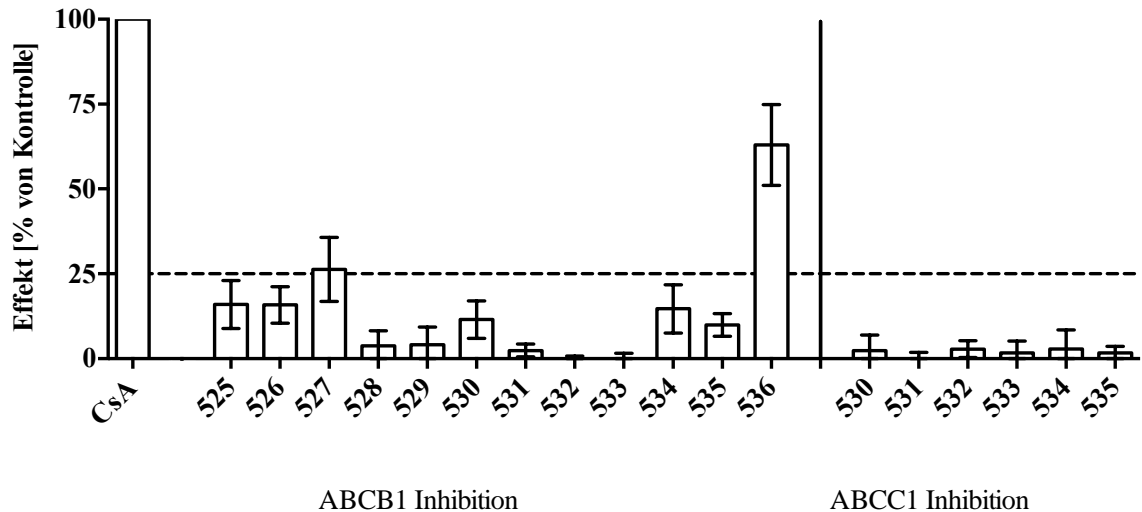
Trotz negativer Ergebnisse im Vergleich zur ersten Serie waren die Erkenntnisse in Bezug auf die Struktur-Wirkungsbeziehungen sehr hilfreich. Die Analyse der vorgestellten Derivate hatte gezeigt, dass das Substitutionsmuster mit Methoxygruppen an Ring B des Chalkons unverzichtbar für die inhibitorische Aktivität gegenüber ABCG2 war und sich ein Phenylring bzw. 3,4-Dimethoxyphenylring in Position 2 des Chinazolins aktivitätssteigernd auswirkte.

### **5.2.2. Untersuchung der Inhibition an ABCB1 und ABCC1**

Um die Selektivität der neuen Derivate zu ermitteln, wurden die Substanzen ( $10 \mu\text{mol/l}$ ) einem Screening gegen ABCB1 und ABCC1 unterzogen. Die erhaltenen Inhibitionsmaxima wurden auf den Standardinhibitor, Ciclosporin A ( $10 \mu\text{mol/l}$ ; im Falle beider Transporter) normalisiert. Die Untersuchungen wurden für beide Transportproteine mit dem Calcein AM Assay unter Verwendung der A2780 adr (ABCB1) und H69 AR (ABCC1) Zelllinien durchgeführt.

Abbildung 5.13 veranschaulicht die Screening-Ergebnisse. In beiden Fällen waren die untersuchten Verbindungen bis auf einen Vertreter (536) selektiv und wiesen keine Effekte über der festgelegten Grenze von 25 % auf. Die Verbindung 536 hatte an ABCB1 einen signifikanten Effekt mit einem ermittelten  $IC_{50}$ -Wert von  $1,50 \mu\text{mol/l}$ . Damit stellte die Verbindung einen Dualinhibitor der Transportproteine ABCB1 und ABCG2 dar, wobei die inhibitorische Potenz gegenüber ABCG2 weniger ausgeprägt, aber dennoch vergleichbar war.

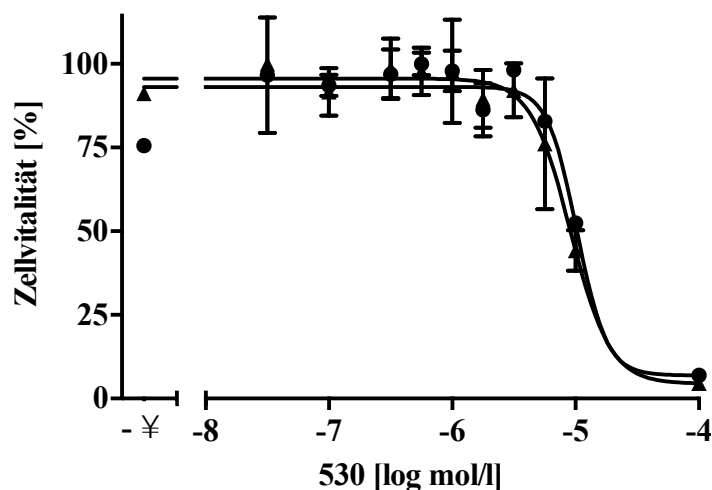




**Abbildung 5.13:** Prozentuale Effekte der Chinazolin-Chalkone der zweiten Serie bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  auf die Akkumulation des Substrates Calcein AM in ABCB1- (links) bzw. ABCC1- (rechts) überexprimierenden A2780 adr bzw. H69 AR Zellen. Die gemessenen Werte wurden auf den Standardinhibitor Ciclosporin A (Cs A; 10  $\mu\text{mol/l}$ ) normalisiert. Angegeben werden Mittelwert  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

### 5.2.3. Untersuchung der zellulären Toxizität der Verbindung 530

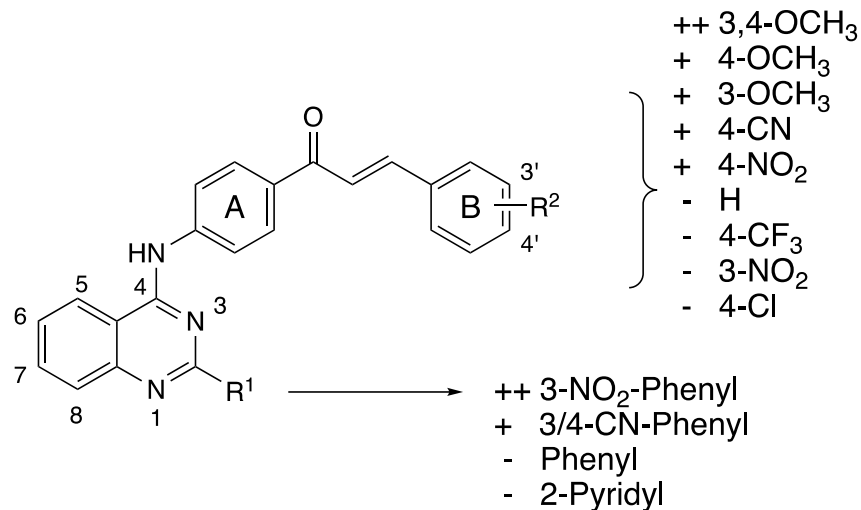
Als Repräsentant dieser Serie wurde die Verbindung 530 erwählt, da sie nicht nur einen potenten, sondern auch selektiven Inhibitor des Transportproteins ABCG2 darstellte. Mithilfe des MTT-basierten Vitalitäts-Assays und unter der Verwendung der MDCK II BCRP sowie MDCK II Zelllinien wurde eine Konzentrations-Effektkurve bis zu 100  $\mu\text{mol/l}$  generiert, welche in Abbildung 5.14 zu sehen ist. Die Verbindung 530 besaß einen  $\text{GI}_{50}$ -Wert von 10,5  $\mu\text{mol/l}$  und wirkte damit deutlich toxischer auf die Zellen als die Derivate aus der ersten Serie der Chinazolin-Chalkone. Für weitere *in vivo* Versuche waren andere Derivate besser geeignet, da die therapeutische Rate mit 21,2 weit unterhalb der bereits ermittelten Werte der ersten Serie lag.



**Abbildung 5.14:** Repräsentative Konzentrations-Effektkurve der Verbindung 530 aus dem MTT-basierten Vitalitäts-Assay unter Verwendung von MDCK II (gefüllte Dreiecke) und MDCK II BCRP (gefüllte Kreise) Zellen nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden mit Doppelbestimmung. Der ermittelte GI<sub>50</sub>-Wert betrug 10,5 µmol/l.

#### 5.2.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Eine zweite Serie der Chinazolin-Chalkone mit erweitertem Substitutionsmuster, welches im Vergleich zur ersten Serie nicht nur Methoxygruppen beinhaltete, wurde auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber ABCG2 untersucht. Die Struktur-Wirkungsbeziehungen der Derivate zeigten, dass Methoxygruppen am Ring B des Chalkons für die inhibitorische Aktivität essentiell waren und der Austausch zu einer Verminderung der IC<sub>50</sub>-Werte als auch einem Absenken des Inhibitionsmaximums nach sich führte. Die Inhibition von ABCG2 war am besten durch die Substitution in Position 2 des Chinazolingerüsts durch entweder einen unsubstituierten Phenylring oder einen 3,4-Dimethoxyphenylring umgesetzt. Dieser Zusammenhang lieferte die Erkenntnis, dass die Chinazolin-Chalkone nicht direkt mit den Chinazolinen und ihren in der Literatur beschriebenen Derivaten verglichen werden können [166,167,171-174,208,245].



**Abbildung 5.15:** Struktur-Wirkungsbeziehungen der Chinazolin-Chalkone der zweiten Serie hinsichtlich der inhibitorischen Aktivität gegenüber ABCG2. ++ sehr positiver Effekt, + positiver Effekt, - negativer Effekt auf die Aktivität.

Des Weiteren wurde die Selektivität durch Testung der synthetisierten Derivate auf ihre Potenz gegenüber ABCB1 und ABCC1 untersucht. Bis auf einen Vertreter waren alle Substanzen selektiv. Nur die Verbindung, 536, hat sich als ein Dualinhibitor der Transportproteine ABCB1 und ABCG2 herausgestellt.

Aufgrund der ermittelten Toxizität und den im Vergleich zur ersten Serie eher mäßigen IC<sub>50</sub>-Werten ist die Untersuchung bzw. der Einsatz der Substanzen aus der zweiten Serie der Chinazolin-Chalkone in *in vitro*, ebenso wie in *in vivo* Studien begrenzt. Trotz der im Vergleich zur ersten Serie unterlegenen IC<sub>50</sub>- bzw. GI<sub>50</sub>-Werte konnten dennoch neue Erkenntnisse bezüglich der Struktur-Wirkungsbeziehungen gewonnen werden.



# **6. ATPase Assay - Anwendung zur Untersuchung von Modulatoren an den Transportproteinen ABCC1 und ABCG2 sowie Modifizierung und Etablierung einer neuen Detektionsmethode**

In Kooperation mit dem Research Centre for Natural Sciences der Hungarian Academy of Sciences in Budapest, Ungarn, wurde unter Einweisung von Dr. Csilla Özvegy-Laczka ein Natriumorthovanadat-sensitiver ATPase Assay mit Ascorbinsäure als Detektionsmittel erlernt [189] und die Durchführung anhand des Patents „ABCG2 Transporter Assay“ von B. Sarkadi und A. Telbisz innerhalb des Arbeitskreises angewandt [191]. Untern anderem wurde die Herstellung der Membranpräparation und die vorausgehende Infektion der Insektenzellen vermittelt. Überdies wurde ein rekombinanter Baculovirus, der die humane Wildtyp ABCG2 DNS enthielt erfolgreich bei der Infektion angewandt und nach Durchführung der Amplifikation in größeren Mengen aufbewahrt. Für Versuche mit dem Transportprotein ABCC1 wurde die Membranpräparation aus H69 AR Zellen hergestellt.

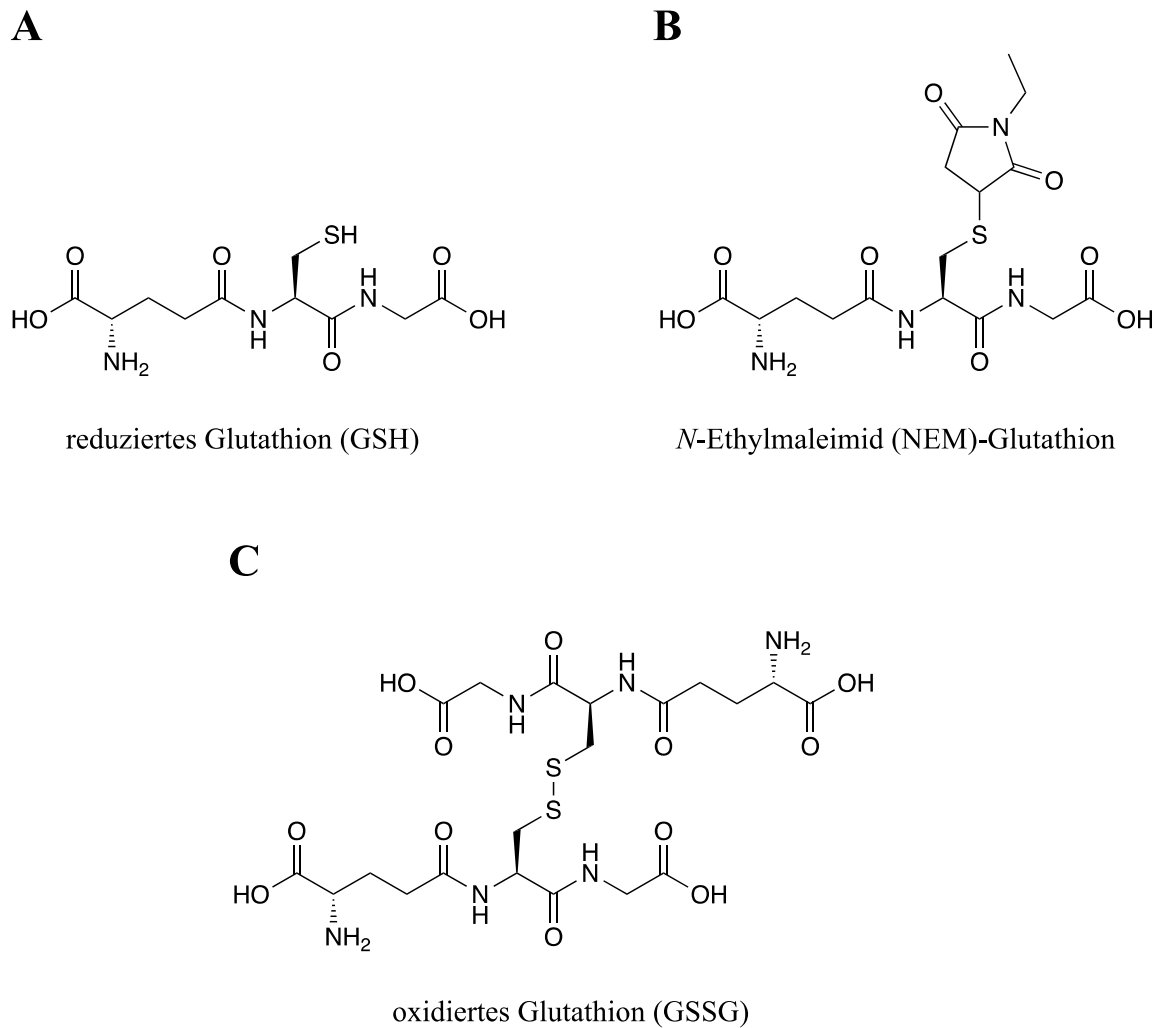
## **6.1. Anwendung des ATPase Assays zur Untersuchung von Modulatoren an ABCC1 und ABCG2 Transportproteinen**

Im folgenden Abschnitt werden die breite Anwendung und die Möglichkeiten der Auswertung der ATPase Assays vorgestellt. Im ersten Unterkapitel wird zunächst der Effekt von Glutathion und seinen Analoga in Kombination mit ABCC1 Modulatoren auf das ABCC1 Transportprotein untersucht. In zwei weiteren Unterkapiteln werden die Untersuchungen von ABCG2 Modulatoren, den Tetrahydro- $\beta$ -carbolinen sowie den Acryloylphenylcarboxamiden, an der ABCG2 ATPase diskutiert.

### **6.1.1. Untersuchungen an ABCC1 – Effekt von Glutathion und Analoga in Kombination mit ABCC1 Modulatoren**

Der ABCC1 vermittelte Efflux von Xenobiotika steht im Zusammenhang mit dem Kotransport von reduziertem Glutathion (GSH) bzw. der vorläufigen Kopplung dieses an ein Zytostatikum [124,247]. Weitere GSH-Analoga wurden als Substrate des ABCC1 Transportproteins identifiziert, wie z. B. das intrinsische Substrat oxidiertes Glutathion (GSSG), oder das xenobiotische Substrat *N*-Ethylmaleimid-Glutathion (NEM-GS) [100,248,249]. Der aktive Transport dieser Substrate findet in Zellen nach außen heraus, und in inside-out-Membranvesikeln entsprechend nach innen unter Verbrauch von ATP statt. Das Zusammenspiel zwischen der Energiequelle ATP und den Substraten ist bis heute noch weitestgehend ungeklärt.

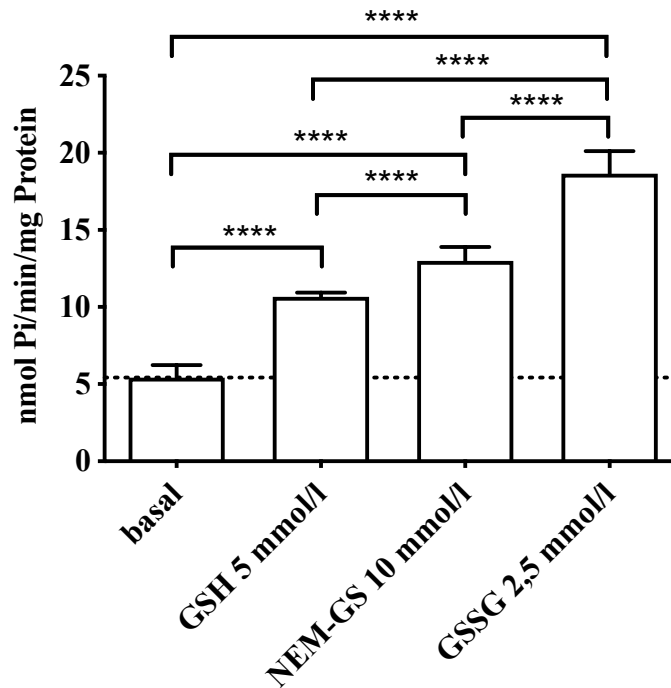
Die nachfolgenden beschriebenen ATPase-Versuche an ABCC1 sollen den Effekt von Glutathion und seinen Analoga, auch in Kombination mit bekannten ABCC1 Modulatoren näher beleuchten.



**Abbildung 6.1:** Strukturformeln von reduziertem Glutathion (A), *N*-Ethylmaleimid-Glutathion (B) und oxidiertem Glutathion (C).

#### 6.1.1.1. Bestimmung der optimalen GSH, NEM-GS und GSSG Konzentration zur Stimulierung der ABCC1 ATPase

Laut Literatur wird in ATPase Assays mit ABCC1 NEM-GS als Standardstimulator eingesetzt [247,250,251]. Desweiteren liegt das Stimulationsmaximum von GSH und NEM-GS laut Literatur bei einer Konzentration von 5 mmol/l bzw. 10 mmol/l. GSSG wurde aufgrund fehlender Literaturwerte folglich bei halber GSH Konzentration (2,5 mmol/l) untersucht.



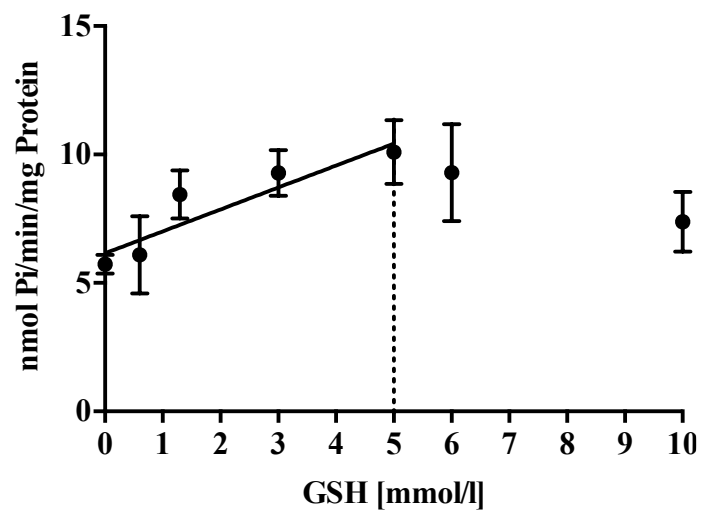
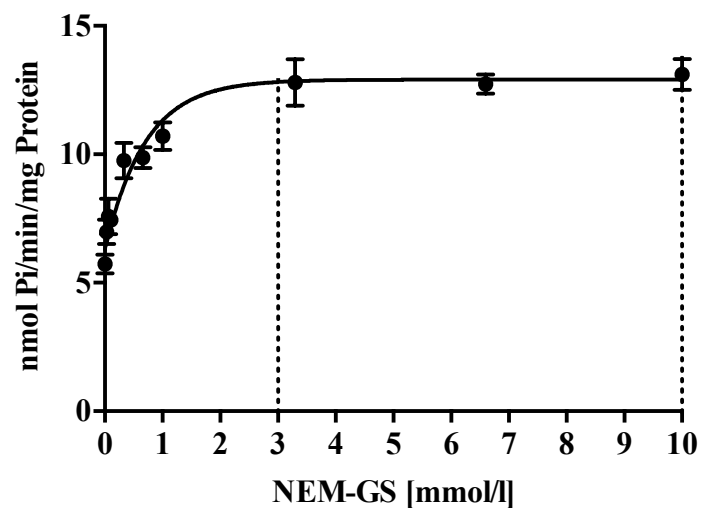
**Abbildung 6.2:** Vergleich der ABCC1 ATPase Aktivatoren GSH, NEM-GS und GSSG bei den dazugehörigen Konzentrationen 5 mmol/l, 10 mmol/l und 2,5 mmol/l. Gepunktete Linie deutet die Basalaktivität an. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen durchgeführt als Duplikate. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde durch einen einfachen t-Test ermittelt und entspricht \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ .

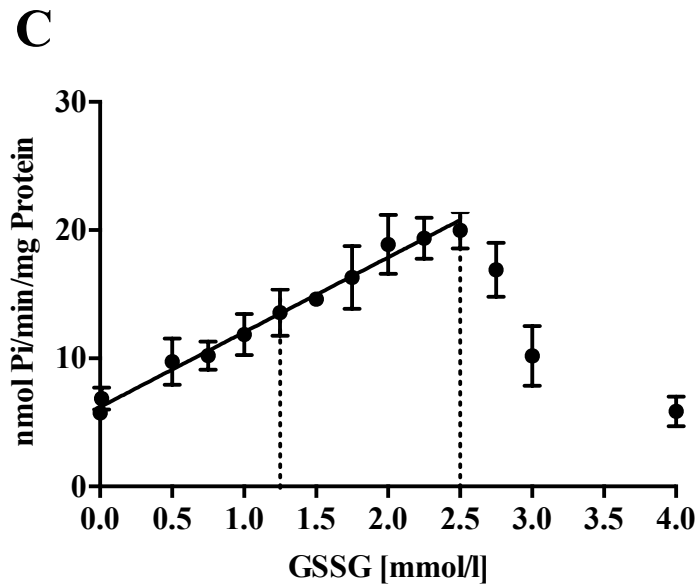
Der Vergleich der erhaltenen Werte bezog sich dabei immer auf die Basalaktivität des membranständigen ABCC1 Transportproteins. So wirkte sich die GSH Stimulation doppelt so stark auf die Aktivität des Transporters aus und somit auf die gemessene Menge an umgesetztem Phosphat. Die Aktivierung durch NEM-GS war stärker, allerdings mit circa 2,4-facher Stimulation nicht deutlich ausgeprägter. Wie in Abbildung 6.2 veranschaulicht, stimulierte GSSG die ABCC1 ATPase offenbar deutlich stärker (ca. 3,4-fach). Damit wurde ein sichtbar besserer ABCC1 ATPase Aktivator gefunden als die bis dato in der Literatur beschriebenen [252,253]. Um die maximalen Konzentrationen der Aktivierung zu verifizieren, wurden die hier untersuchten Stimulatoren der ABCC1 ATPase bei verschiedenen Konzentrationen vermessen.

Anhand des Kurvenverlaufs waren im Falle von GSH und GSSG Anstiege sowie Abfälle der ATPase Aktivierung zu verzeichnen. Der Abfall war hierbei nicht unbedingt nur mit Stimulierungsverlust bei höheren Konzentrationen zu beschreiben, sondern auch durch eine mögliche Inkompatibilität mit dem Assay. Auftretende Löslichkeitsprobleme und dabei mitgemessenen Partikel beeinflussten die Ergebnisse negativ. Interessanterweise



entsprachen zwar 10 mmol/l NEM-GS dem Maximum, dieser Wert ist allerdings auch bereits bei 3,0 mmol/l erreicht, sodass NEM-GS eine Sättigung ab dieser Konzentration im Kurvenverlauf beschrieb. Für weitere Versuche wurde dennoch weiterhin die Konzentration von 10 mmol/l beibehalten, da der Effekt sich gleich und so Vergleiche mit der Literatur vorgenommen werden konnten. Das Maximum von GSSG lag bei 2,5 mmol/l und damit überraschenderweise bei der zuvor zufällig gewählten Konzentration.

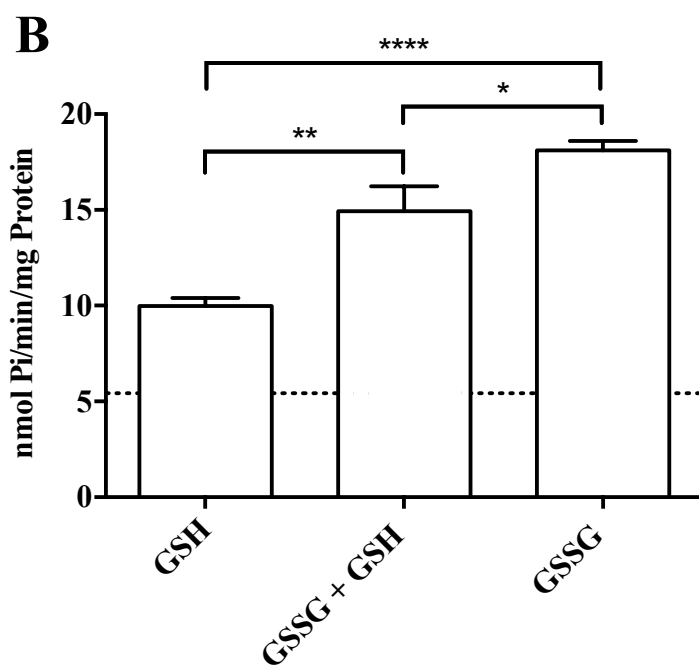
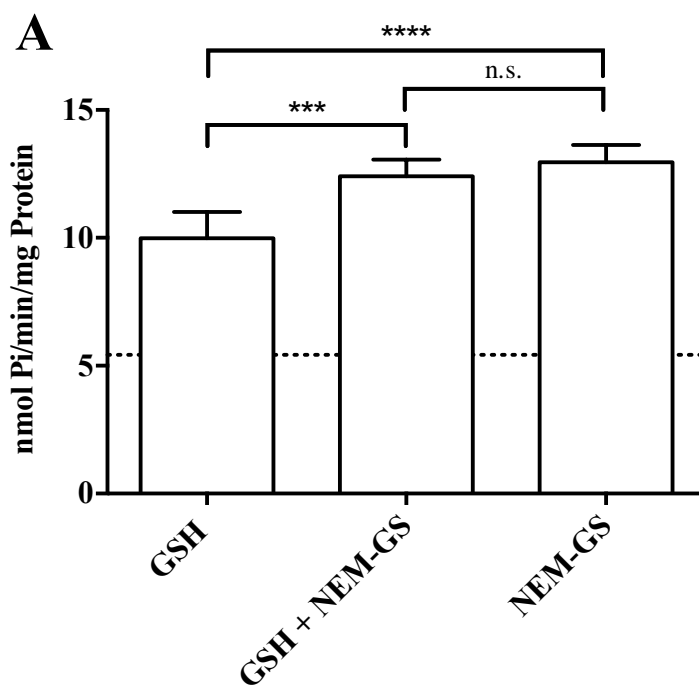
**A****B**

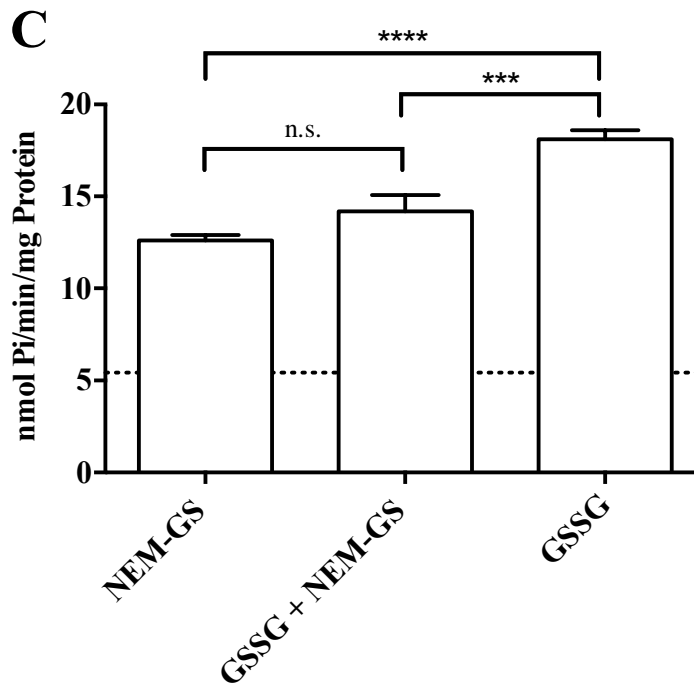


**Abbildung 6.3:** Konzentrationsabhängiger Verlauf der ABCC1 ATPase Aktivierung durch GSH (A), NEM-GS (B) und GSSG (C). Die Basalaktivität entspricht dem Punkt auf dem y-Achsenabschnitt und geht aus der Messung mit 1 % DMSO hervor. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen durchgeführt als Duplikate. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD.

#### 6.1.1.2. Analyse der ABCC1 ATPase mit Kreuzkombinationen von GSH, NEM-GS und GSSG

Mithilfe von Kreuzkombinationen mit GSH, NEM-GS und GSSG bei oben genannten Konzentrationen sollte bestimmt werden, ob die gewählten Substanzen auch die gleiche Bindungsstelle haben. Abbildung 6.4 A-C veranschaulicht die Effekte von GSH und NEM-GS (A), GSH und GSSG (B), NEM-GS und GSSG (C). Auch wenn die Ergebnisse, in Bezug auf einen Einstichproben-t-Test, nicht signifikant ( $p \geq 0,05$ ) ausfielen, so konnte eine Tendenz zur Mittelung der Effektwerte in allen Fällen erkannt werden. Aufgrund der Tatsache, dass die untersuchten Substanzen sich antagonistisch verhalten, kann von der gleichen Bindungsstelle ausgegangen werden. Auch die Literatur bestätigt die gefundenen Ergebnisse [101,254,255].





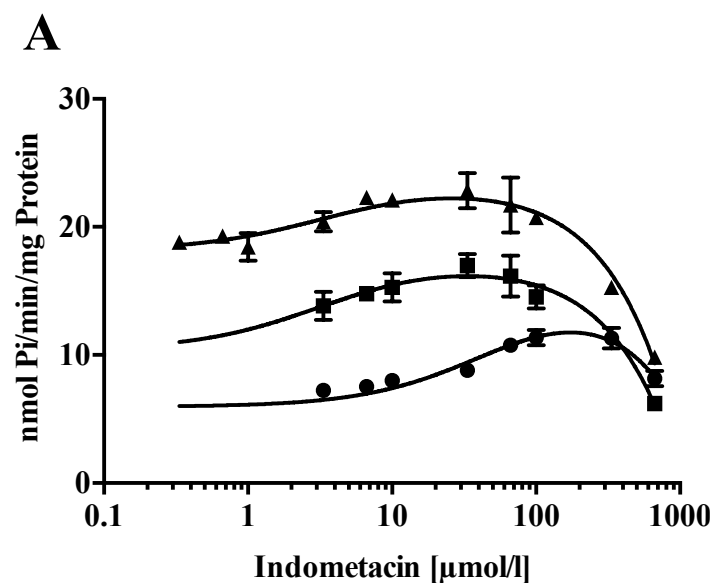
**Abbildung 6.4:** Kreuzkombinationen von GSH und Analoga. (A) 5 mmol/l GSH und 10 mmol/l NEM-GS, (B) 5 mmol/l GSH und 2,5 mmol/l GSSG und (C) 10 mmol/l NEM-GS und 2,5 mmol/l GSSG. Gepunktete Linie deutet die Basalaktivität an. Dargestellt sind die Ergebnisse in Duplikaten aus drei unabhängigen Versuchen. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde durch einen einfachen t-Test ermittelt und entspricht \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ .

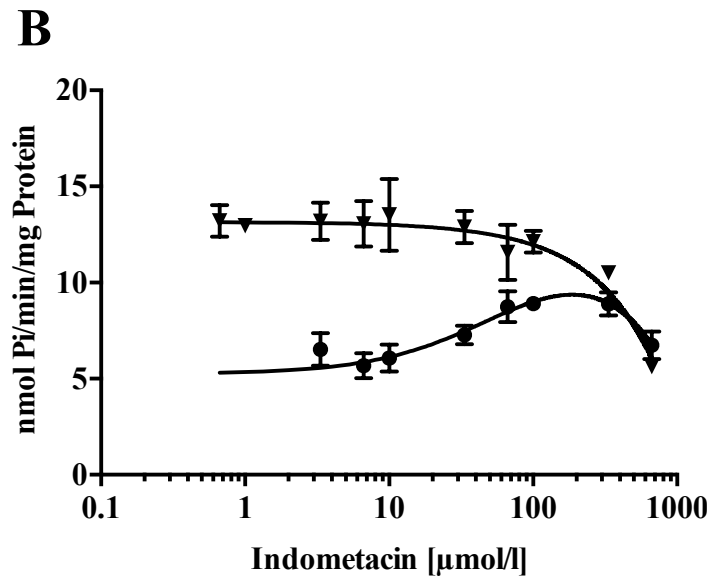
### 6.1.1.3. Kombination von GSH, NEM-GS und GSSG mit bekannten Modulatoren des Transportproteins ABCC1

Die Arbeit von Bakos et al. [251] hatte sich mit dem Effekt von Stimulatoren der ABCC1 ATPase auseinandergesetzt und insbesondere die Kombination von GSH mit Indometacin näher untersucht. Dieses Experiment wurde von uns wiederholt, um die unterschiedlichen Membranpräparationen miteinander zu vergleichen. Wie in Abbildung 6.5 A zu sehen ist, zeigte Indometacin allein als auch in Kombination mit GSH (5 mmol/l) vergleichbare Effekte und Kurvenverläufe. Dabei stimulierte Indometacin die ATPase Aktivität bis zu einer Konzentration von 100  $\mu$ mol/l bevor diese inhibiert wurde. Diese Stimulation entsprach der von GSH allein. Wie erwartet kam ein additiver Effekt in Kombination mit GSH zustande. Dies bedeutete, dass der Effekt der Aktivierung von Indometacin und GSH zu einer gesteigerten Stimulation der ABCC1 ATPase führte. So stimulierte Indometacin

allein die ATPase um das 2,3-fache, in Kombination mit GSH bereits um das 3,5-fache im Vergleich zur Basalaktivität. Ausgehend von der GSH Aktivierung betrug die zusätzliche Stimulation etwa das 1,7-fache. Dieser Effekt wurde zusätzlich mit GSSG bei einer Konzentration von 2,5 mmol/l untersucht. Hier wurde ein noch stärker ausgeprägter Effekt beobachtet (4,7-fache Steigerung, 1,3-fache Steigerung ausgehend von GSSG). Erstaunlicherweise war eine Verschiebung des Anstiegs innerhalb der gemessenen Kurven zu beobachten. Bei Berechnung der  $K_m$ -Werte wurde diese Erkenntnis deutlich, denn dieser sinkt in Gegenwart von GSH oder GSSG von 54  $\mu\text{mol/l}$  auf 3,5  $\mu\text{mol/l}$ . Die Konzentrations-Effektkurven zeigten in Kombinationsversuchen eine linksgerichtete Verschiebung was einer Stimulation durch GSH bzw. GSSG bei niedrigeren Indometacin Konzentrationen entsprach. Hieraus offenbarte sich die Tatsache, dass je aktiver die ABCC1 ATPase ist, eine umso geringere Konzentration von Indometacin benötigt wurde um diese additiv zu aktivieren. Diese Erkenntnis wiederum lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Affinität von Indometacin zum ABCC1 Transportprotein bei stimulierter ATPase Aktivität steigt.

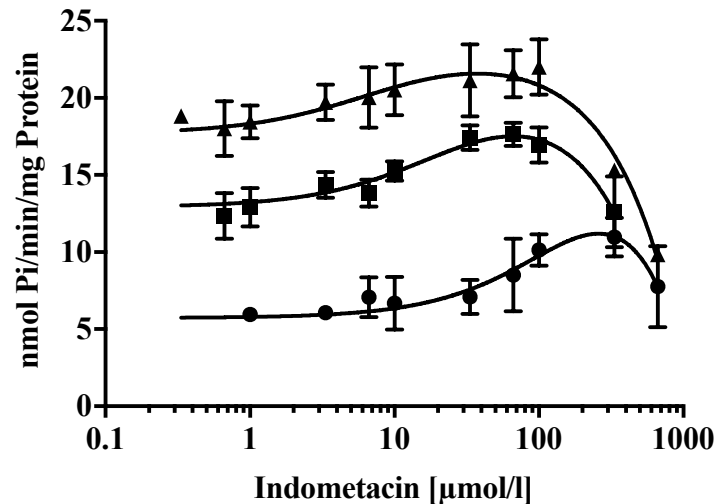
Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit GSH und GSSG ist keine Stimulation bei Kombination von Indometacin mit NEM-GS aufgetreten (Abbildung 6.5 B). Auch der stimulierende Effekt von Indometacin selbst wird anscheinend durch NEM-GS unterdrückt. Lediglich der Abfall der Kurve findet überlappend statt.





**Abbildung 6.5:** (A) Konzentrationsabhängiger Verlauf der ABCC1 ATPase Aktivierung mit Indometacin (gefüllte Kreise), sowie Indometacin in Kombination mit GSH 5 mmol/l (gefüllte Quadrate) oder GSSG 2,5 mmol/l (gefüllte Dreiecke). (B) Konzentrationsabhängiger Verlauf der ABCC1 ATPase mit Indometacin (gefüllte Kreise) und in Kombination mit NEM-GS 10 mmol/l (gefüllte nach unten gerichtete Dreiecke). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen durchgeführt als Duplikate.

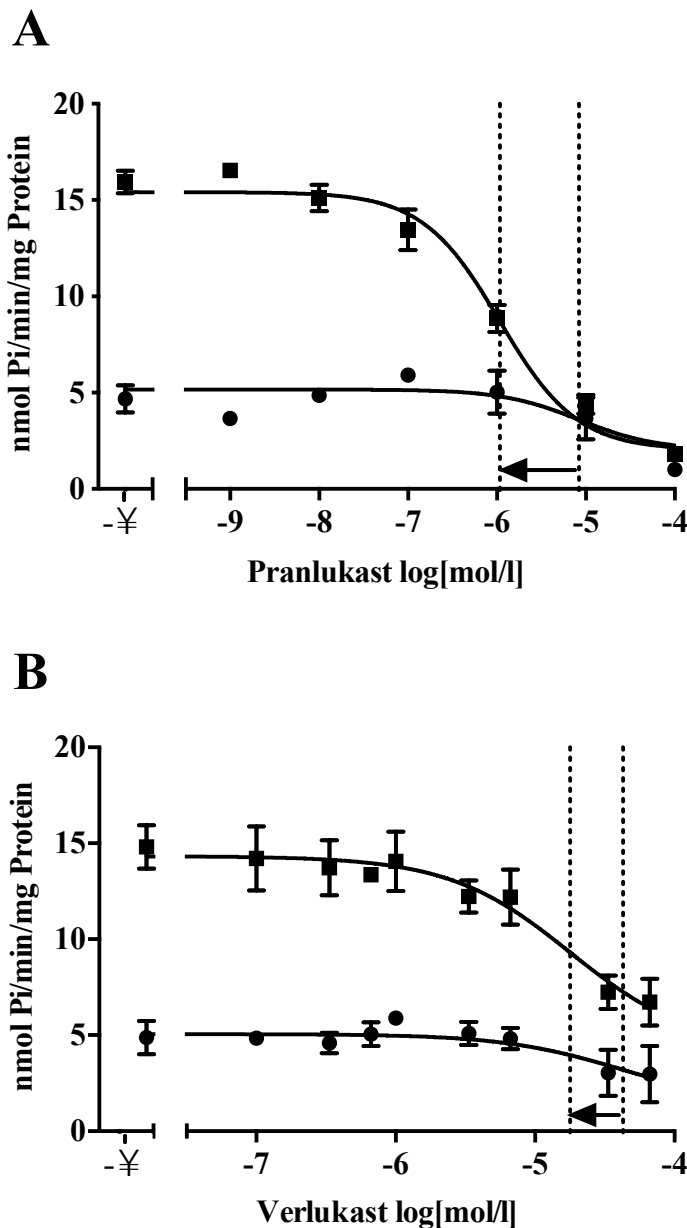
Weitere Versuche sollten diese Beobachtung untermauern, sodass Konzentrations-Effektcurven von Indometacin, alleine sowie in Kombination mit GSSG bei Konzentrationen von 1,25 mmol/l und 2,5 mmol/l aufgenommen wurden. Abbildung 6.6 zeigt das Ergebnis die Aktivierung der ABCC1 ATPase. Es war eindeutig zu erkennen, dass eine stimulierte ABCC1 ATPase Aktivität durch geringere Konzentrationen an Indometacin gesteigert werden konnte. So lag der EC<sub>50</sub>-Wert von Indometacin alleine bei 66 µmol/l und sinkt bereits in Kombination mit 1,25 mmol/l GSSG auf 13 µmol/l und damit um circa das 5-fache. Bei weiterer Steigerung der GSSG Konzentration auf 2,5 mmol/l fiel der EC<sub>50</sub>-Wert um das 20-fache und lag schließlich nur noch bei 3,6 µmol/l.



**Abbildung 6.6:** Konzentrationsabhängiger Verlauf der ABCC1 ATPase Aktivierung mit Indometacin (gefüllte Kreise), sowie Indometacin in Kombination mit GSSG 1,25 mmol/l (gefüllte Quadrate) oder GSSG 2,5 mmol/l (gefüllte Dreiecke). Die Basalaktivität entspricht der Messung mit 1 % DMSO. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis in Duplikaten aus drei unabhängigen Versuchen.

Nach Evaluierung der Ergebnisse mit Indometacin wurden weitere bekannte ABCC1 Inhibitoren zur näheren Untersuchung herangezogen. Aufgrund knappen Bestands an ABCC1 Membranpräparation stammen die weiter aufgeführten Ergebnisse zum Teil nur noch entweder aus drei unabhängigen Versuchen durchgeführt als Einfachmessung oder aus zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt als Duplikate. Zunächst wurden Pranlukast (ONO-1078) und Verlukast (MK571) ausgewählt. Die Ergebnisse dieser ABCC1 Inhibitoren sind in Abbildung 6.7 A und B dargestellt. Im Falle dieser Leukotrien Antagonisten wurde keine Stimulation, weder alleine noch in Kombination mit GSSG, beobachtet. Sowohl Verlukast als auch Pranlukast inhibierten die ABCC1 ATPase. Mit Pranlukast hatte sich ein ATPase Inhibitor offenbart, der die Basalaktivität als auch die durch GSSG stimulierte ABCC1 ATPase fast gänzlich aufhebt. So wurde die maximal aktivierte ABCC1 ATPase durch die niedrigste Konzentration an Pranlukast bereits gehemmt. Diese Beobachtung wurde durch die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte von Pranlukast untermauert. Bei keinem Einsatz von Stimulatoren betrug die halbmaximale Inhibitionskonzentration von Pranlukast  $8,4 \mu\text{mol/l}$ , bei einer Stimulation durch  $2,5 \text{ mmol/l}$  GSSG der ATPase sank der Wert auf  $1,1 \mu\text{mol/l}$  und somit um das 7,6-fache im Vergleich zur Inhibition der Basalaktivität. Die Untersuchungen an Verlukast untermauerten die gezeigten Ergebnisse von Pranlukast. Auch hier trat die Inhibition in Kombination mit  $2,5$

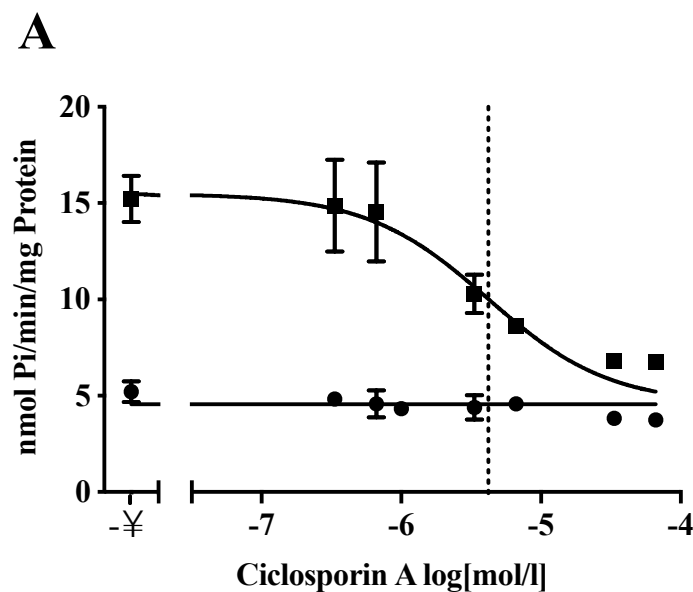
mmol/l GSSG früher ein, wenn auch nicht so ausgeprägt. Der IC<sub>50</sub>-Wert fiel von 42,7 µmol/l alleine auf 17,8 µmol/l in Kombination mit GSSG und damit um das 2,4-fache.

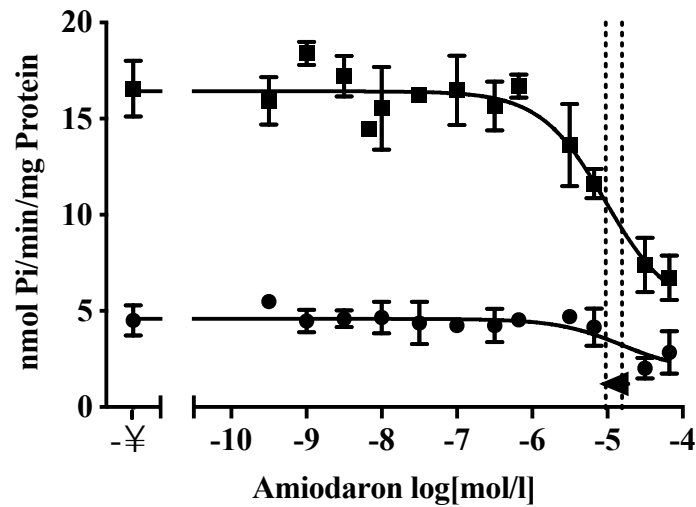


**Abbildung 6.7:** (A) Konzentrationsabhängiger Verlauf der ABCC1 ATPase Inhibition mit Pralukast (ONO-1078; gefüllte Kreise) sowie Pralukast in Kombination mit GSSG 1,25 mmol/l (gefüllte Quadrate) oder GSSG 2,5 mmol/l (gefüllte Quadrate). (B) Konzentrationsabhängiger Verlauf der ABCC1 ATPase Inhibition von Verlukast (MK571; gefüllte Kreise), sowie Verlukast in Kombination mit GSSG 2,5 mmol/l (gefüllte Quadrate). Die Basalaktivität entspricht der Messung mit 1 % DMSO. Vertikale gepunktete Linien symbolisieren die pIC<sub>50</sub>-Werte der jeweiligen Kurve. Gezeigt sind Mittelwert ± SD aus zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt als Duplikate (A) bzw. aus drei unabhängigen Versuchen durchgeführt als Duplikate (B).



Weitere bekannte Modulatoren von ABCC1, wie Ciclosporin A und Amiodaron, wurden ebenfalls untersucht. Die Ergebnisse entsprachen denen der zuvor untersuchten Leukotrien Antagonisten. Es konnte keine Aktivierung der ABCC1 ATPase weder alleine noch in Kombination mit 2,5 mmol/l GSSG beobachtet werden. In den Abbildungen 6.8 A und B ist die gesteigerte Inhibition in Kombination mit GSSG gezeigt. So wurde die ABCC1 ATPase durch Amiodaron mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 15,5  $\mu\text{mol/l}$  in Gegenwart von GSSG mit 9,5  $\mu\text{mol/l}$  minimal potenter gehemmt. Im Falle von Ciclosporin A wurde kein ATPase Effekt allein beobachtet, allerdings in Kombination mit GSSG ein  $IC_{50}$ -Wert von 4,2  $\mu\text{mol/l}$  bestimmt.

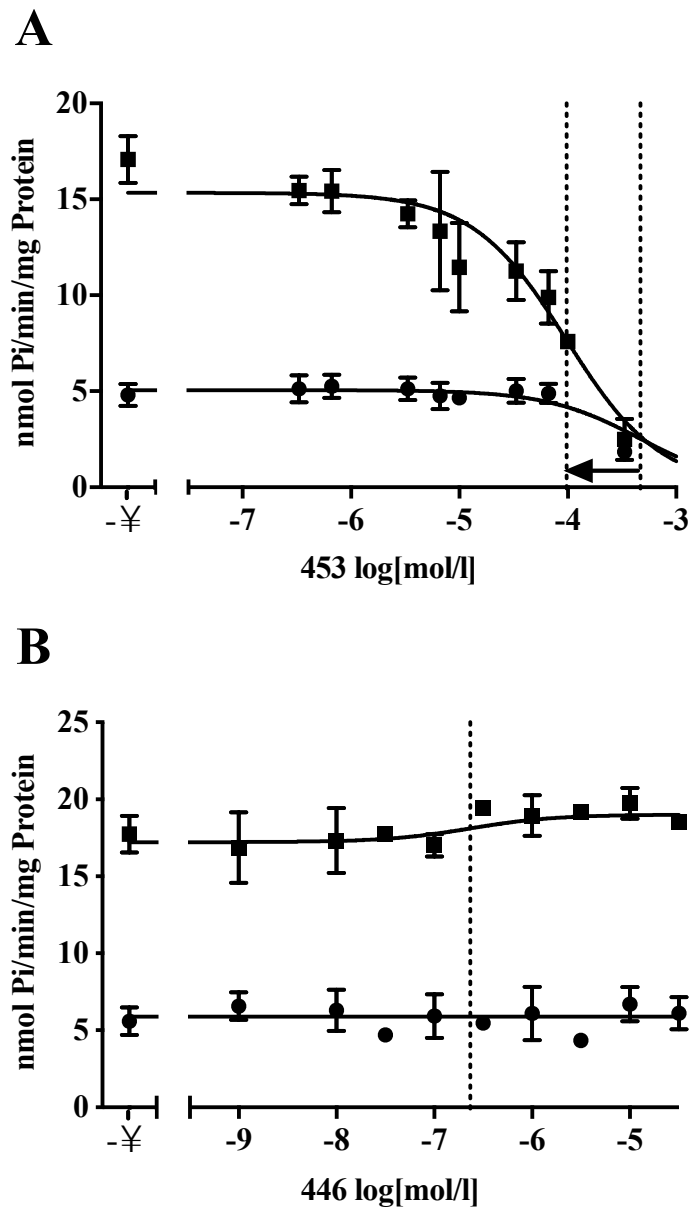


**B**

**Abbildung 6.8:** (A) Konzentrationsabhängiger Verlauf der ABCC1 ATPase Inhibition mit Ciclosporin A (gefüllte Kreise), sowie Ciclosporin A in Kombination mit GSSG 2,5 mmol/l (gefüllte Quadrate). (B) Konzentrationsabhängiger Verlauf der ABCC1 ATPase Inhibition von Amiodaron (gefüllte Kreise), sowie Amiodaron in Kombination mit GSSG 2,5 mmol/l (gefüllte Quadrate). Die Basalaktivität entspricht der Messung mit 1 % DMSO. Vertikale gepunktete Linien symbolisieren die  $pIC_{50}$ -Werte der jeweiligen Kurve. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen durchgeführt als Einfachmessung (A) bzw. zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt als Duplikate (B).

Im Arbeitskreis designte, synthetisierte und biologisch evaluierte Pyrrolopyrimidine [198,209,234] wurden aufgrund ihrer inhibierenden Eigenschaften an ABCC1 ausgewählt und ebenfalls im ABCC1 ATPase Assay untersucht. Hierzu wurden zwei Derivate - der ABCC1 Standardinhibitor 453 (Tabelle 4.17) und Verbindung 446 (Tabelle 4.14/15) herangezogen. Wie bereits bei Verlukast, Pranlukast, Ciclosporin A und Amiodaron gezeigt, gehörte das Pyrrolopyrimidin Derivat 453 zu den Modulatoren, die ausschließlich einen inhibitorischen Charakter aufwiesen. So hemmte dieser Inhibitor die ABCC1 ATPase mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 465  $\mu$ mol/l alleine, und mit 97  $\mu$ mol/l in Kombination mit 2,5 mmol/l GSSG (4,8-fach potenter). Im Falle der Substanz 446, einem weiteren Pyrrolopyrimidin, ähnelte der gemessene Effekt dem von Indometacin, mit dem Unterschied, dass die Verbindung allein bis zu einer Konzentration von 10  $\mu$ mol/l keinen Einfluss auf die Basalaktivität der ABCC1 ATPase ausübte. Erst durch die gesteigerte Stimulation mittels GSSG konnte eine Tendenz im Hinblick auf einen Aktivierungseffekt

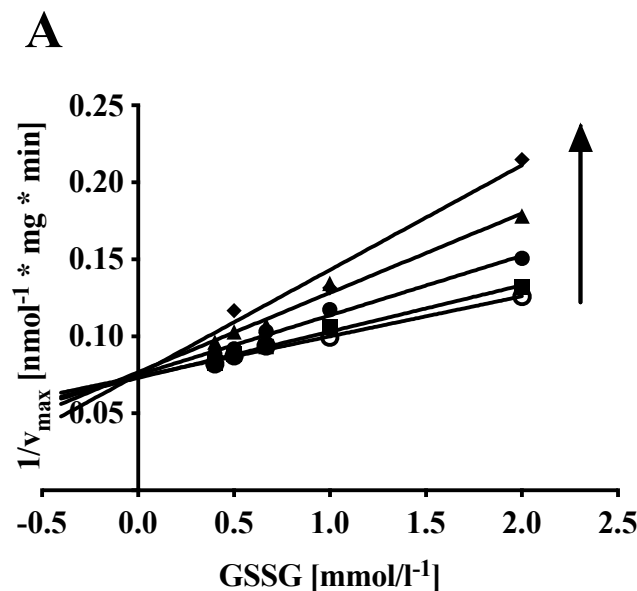
sichtbar gemacht werden. In Anwesenheit von 2,5 mmol/l GSSG betrug die halbmaximale Aktivierungskonzentration 0,0233  $\mu\text{mol/l}$ .

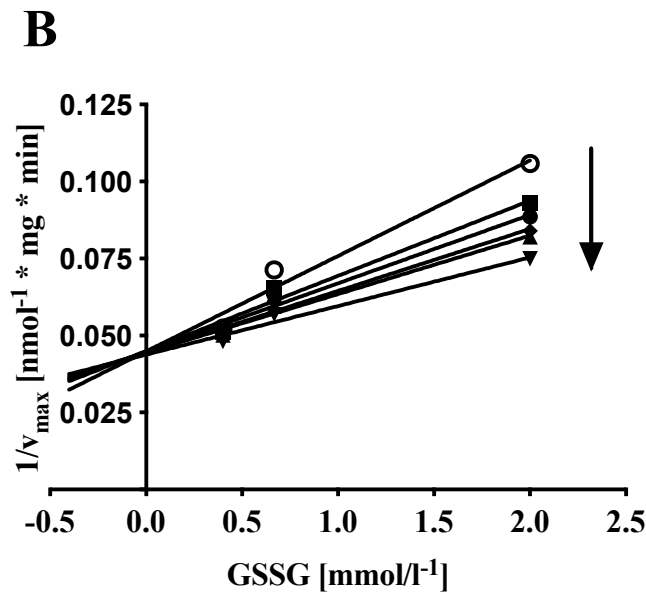


**Abbildung 6.10:** (A) Konzentrationsabhängiger Verlauf der ABCC1 ATPase Inhibition mit Substanz 453 (gefüllte Kreise), sowie mit Substanz 453 in Kombination mit GSSG 2,5 mmol/l (gefüllte Quadrate). (B) Konzentrationsabhängiger Verlauf der ABCC1 ATPase Aktivierung mit Substanz 446 (gefüllte Kreise), sowie Substanz 446 in Kombination mit GSSG 2,5 mmol/l (gefüllte Quadrate). Die Basalaktivität entspricht einer Messung mit 1 % DMSO. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Versuchen durchgeführt in Duplikaten (A) bzw. zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt als Duplikate (B).

#### 6.1.1.4. Kinetische Auswertung von Pranlukast und Pyrrolopyrimidin Derivat 446 nach Lineweaver-Burk zur Bestimmung des Hemm- bzw. Aktivierungstyps

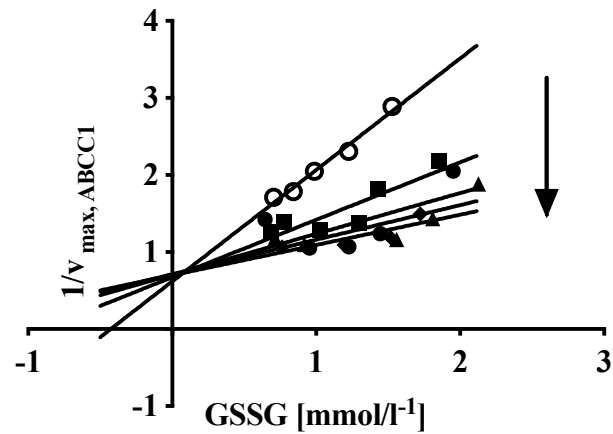
Aufgrund der Schlussfolgerung, dass die Affinität der Modulatoren zum ABCC1 Transportprotein in Gegenwart von GSSG und damit aktivierter ATPase steigt, sollten die gefundenen Effekte mithilfe kinetischer Studien charakterisiert werden. Nach der Auswahl wurde der Hemmtyp mit Pranlukast und der Aktivierungstyp mit Verbindung 446 bestimmt. Lineweaver-Burk Auftragungen zeigen in den Abbildungen 6.11 A und B die gefundenen Ergebnisse. In beiden Fällen beschreibt der Schnittpunkt auf dem y-Achsenabschnitt, dass die Maximalgeschwindigkeit des Transportproteins, hier die ATPase Aktivität, konstant bleibt. Im Gegensatz dazu steigt die Affinitätskonstante  $K_m$  bei einer Inhibition im Beispiel von Pranlukast und sinkt bei einer Aktivierung, wie bei Substanz 446. Damit entspricht die Bindung bei Pranlukast einer kompetitiven Inhibition und schließt sich den bereits bestehenden Literaturdaten für das Analogon Verlukast (MK-571) und GSH an [256]. Die Verbindung 446 wird aufgrund des aktivierenden Effekts nach Segel's „Enzyme Kinetics“ als ein nicht-essentieller Aktivator beschrieben [196].





**Abbildung 6.11:** Kinetische Studien zur Bestimmung des Hemm- bzw. Aktivierungstyps. (A) Lineweaver-Burk-Diagramm für den ABCC1 ATPase Inhibitor Pranlukast bei verschiedenen Konzentrationen in Verbindung mit dem ABCC1 ATPase Stimulator GSSG. Eingesetzte Modulatorkonzentrationen: 0  $\mu\text{mol/l}$  (leere Kreise), 0,1  $\mu\text{mol/l}$  (gefüllte Quadrate), 0,316  $\mu\text{mol/l}$  (gefüllte Kreise), 1  $\mu\text{mol/l}$  (gefüllte nach oben gerichtete Dreiecke), 3,16  $\mu\text{mol/l}$  (gefüllte Rauten). (B) Lineweaver-Burk-Diagramm für den ABCC1 ATPase Aktivator 446 bei verschiedenen Konzentrationen in Verbindung mit dem ABCC1 ATPase Stimulator GSSG. Eingesetzte Modulatorkonzentrationen: 0  $\mu\text{mol/l}$  (leere Kreise), 0,001  $\mu\text{mol/l}$  (gefüllte Quadrate), 0,01  $\mu\text{mol/l}$  (gefüllte Kreise), 0,1  $\mu\text{mol/l}$  (gefüllte nach oben gerichtete Dreiecke), 1,0  $\mu\text{mol/l}$  (gefüllte Rauten) und 10  $\mu\text{mol/l}$  (gefüllte nach unten gerichtete Dreiecke). Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse einer Messung in Duplikaten aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die Klassifizierung des Derivats 446 als einen nicht-essentiellen Aktivator warf die Frage auf, ob dieses Ergebnis auch funktionell, also im Zusammenspiel mit einem Substrat wiedergegeben werden kann. Unter Zuhilfenahme der ABCC1 überexprimierenden H69 AR Zelllinie und des Substrats Calcein AM wurden von Dr. Sven Marcel Stefan weitere kinetische Experimente durchgeführt. Abbildung 6.12 zeigt das repräsentative Ergebnis dieser Analyse. Auch hier befindet sich der Schnittpunkt auf dem y-Achsenabschnitt und verweist damit auf einen kompetitiven Bindungstyp. Der nach unten gerichtete Pfeil zeigt, dass die  $K_m$ -Werte sinken und es sich hiermit um eine Aktivierung im Sinne von Segels beschriebenem nicht-essentiellen Aktivator handelte.

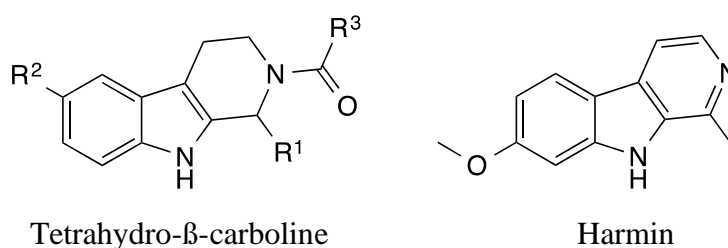


**Abbildung 6.12:** Kinetische Studien zur Bestimmung des Aktivierungstyps. Lineweaver-Burk-Diagramm für den Aktivator 466 bei verschiedenen Konzentrationen in Verbindung mit dem ABCC1 Substrat Calcein AM. Eingesetzte Modulatorkonzentrationen: 0  $\mu\text{mol/l}$  (leere Kreise), 0,01  $\mu\text{mol/l}$  (gefüllte Quadrate), 0,0178  $\mu\text{mol/l}$  (gefüllte Kreise), 0,316  $\mu\text{mol/l}$  (gefüllte nach oben gerichtete Dreiecke), 0,0562  $\mu\text{mol/l}$  (gefüllte Rauten). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis einer Messung in Duplikaten aus drei unabhängigen Experimenten.

### 6.1.2. Untersuchungen an ABCG2 – Effekt von Tetrahydro- $\beta$ -carbolin Derivaten in Kombination mit Quercetin

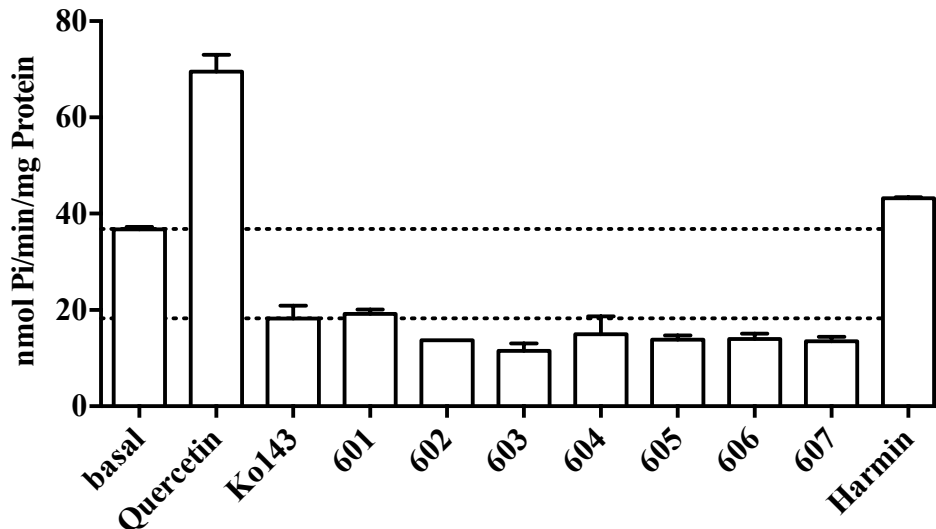
Ein bekannter Vertreter von ABCG2 Inhibition sowohl in funktionalen als auch in ATPase Assays ist Ko143. Bei dieser Substanz handelt es sich um eine Verbindung mit einer Tetrahydro- $\beta$ -carbolin Partialstruktur. Weitere Vertreter wurden von Dr. Anna Spindler synthetisiert und funktionell untersucht [221,257]. Nach dem Erstellen der Struktur-Wirkungsbeziehungen wurden potente Verbindungen ausgewählt und im Vanadat-sensitiven ATPase Assay analysiert. In Tabelle 6.1 sind die vermessenen Vertreter mit Strukturformeln dargestellt. Die Aktivitätswerte des Hoechst 33342 Assays dienen zur Einordnung im Vergleich zu Ko143.

**Tabelle 6.1:** Übersicht über die Struktur der getesteten Tetrahydro- $\beta$ -carboline und Harmin. Angegebene  $IC_{50}$ -Werte wurden von Dr. Anna Spindler mit dem Hoechst 33342 Akkumulationsassay unter Verwendung von MDCK II BCRP Zellen bestimmt und dienen zum Vergleich [221,257]. n.a. Messung im Testsystem nicht anwendbar. Die Experimente wurden in Duplikaten und in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD.



Substanz	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Hoechst 33342 IC <sub>50</sub> $\pm$ SD [ $\mu$ mol/l]
601	Phenyl	H	Phenyl	2,78 $\pm$ 0,15
602	4-Br-Phenyl	H	Phenyl	0,687 $\pm$ 0,127
603	4-Cl-Phenyl	H	Phenyl	0,741 $\pm$ 0,123
604	3,4-Cl-Phenyl	H	Phenyl	0,328 $\pm$ 0,055
605	3,4-Cl-Phenyl	H	4-Methoxyphenyl	0,233 $\pm$ 0,044
606	3,4-Cl-Phenyl	H	3-Methoxyphenyl	0,238 $\pm$ 0,044
607	3,4-Cl-Phenyl	OCH <sub>3</sub>	Phenyl	0,382 $\pm$ 0,077
<b>Harmin</b>				n.a.
<b>Ko143</b>				0,221 $\pm$ 0,024

Abbildung 6.13 veranschaulicht die Inhibitionslevel der Tetrahydro- $\beta$ -carboline im Vergleich zur basalen und Quercetin stimulierten Aktivität sowie der Inhibition durch Ko143. Alle Substanzen wurden bei 1  $\mu\text{mol/l}$  vermessen und zeigten ein ähnliches Inhibitionspotenzial wie Ko143. Die Ausnahme bildet das Alkaloid Harmin, welches keine Modulation der ABCG2 ATPase zeigte.

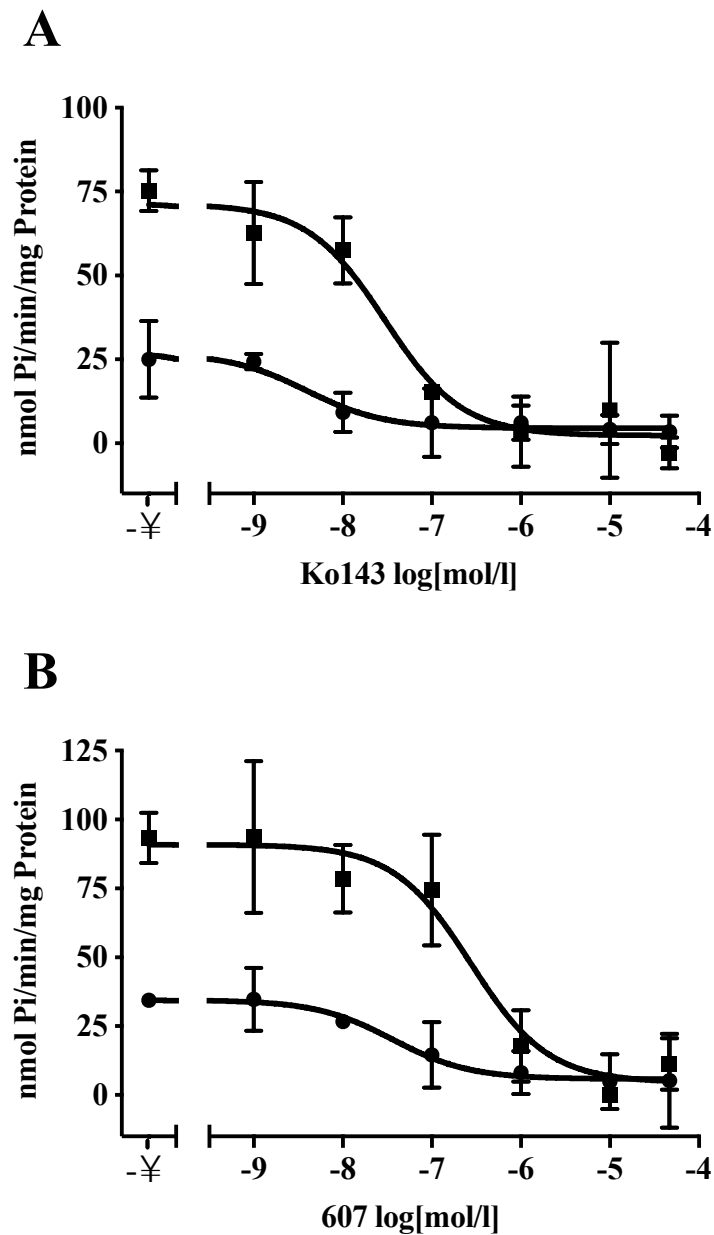


**Abbildung 6.13:** Vergleich des Einflusses ausgewählter Tetrahydro- $\beta$ -carboline bei 1  $\mu\text{mol/l}$  auf die ABCG2 ATPase Aktivität im Vergleich zur Basalaktivität (obere gestrichelte Linie) sowie zur durch Quercetin stimulierten ATPase Aktivität. Als Standardinhibitor wurde Ko143 verwendet (untere gestrichelte Linie). Die Experimente wurden in drei unabhängigen Versuchen als Duplikate durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD.

Um die Ein-Punkt-Messung zu präzisieren, wurden von den Verbindungen Konzentrations-Effektkurven erstellt. Desweiteren wurde analysiert, ob eine Quercetin stimulierte ATPase ebenfalls inhibiert wird. In Abbildung 6.14 A und B sind sowohl Ko143 als auch das Derivat 607 dargestellt. Tabelle 6.2 zeigt die ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Werte. Überdies wurde ein Verschiebungsfaktor berechnet. Auffällig ist, dass die  $\text{IC}_{50}$ -Werte der besonders potenten Verbindungen, wie 604, 605, 606 und 607, ungefähr eine logarithmische Einheit über dem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von Ko143 liegen. Trotz ähnlicher Inhibitionslevel bei 1  $\mu\text{mol/l}$  im ABCG2 ATPase Assay und inhibitorischer Aktivität im Hoechst 33342 Assay besitzt Ko143 eine stärkere Potenz die ABCG2 ATPase bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen zu hemmen. Der Verschiebungsfaktor, der sich durch die Division der Quercetin stimulierten ATPase Aktivität durch die basale Aktivität berechnet, ist bei jeder vermessenen Substanz annähernd gleich und liegt im Durchschnitt bei 9. Diese Tatsache



erlaubt die Schlussfolgerung, dass es sich bei der Interaktion mit Quercetin um eine kompetitive Interaktion handelt.

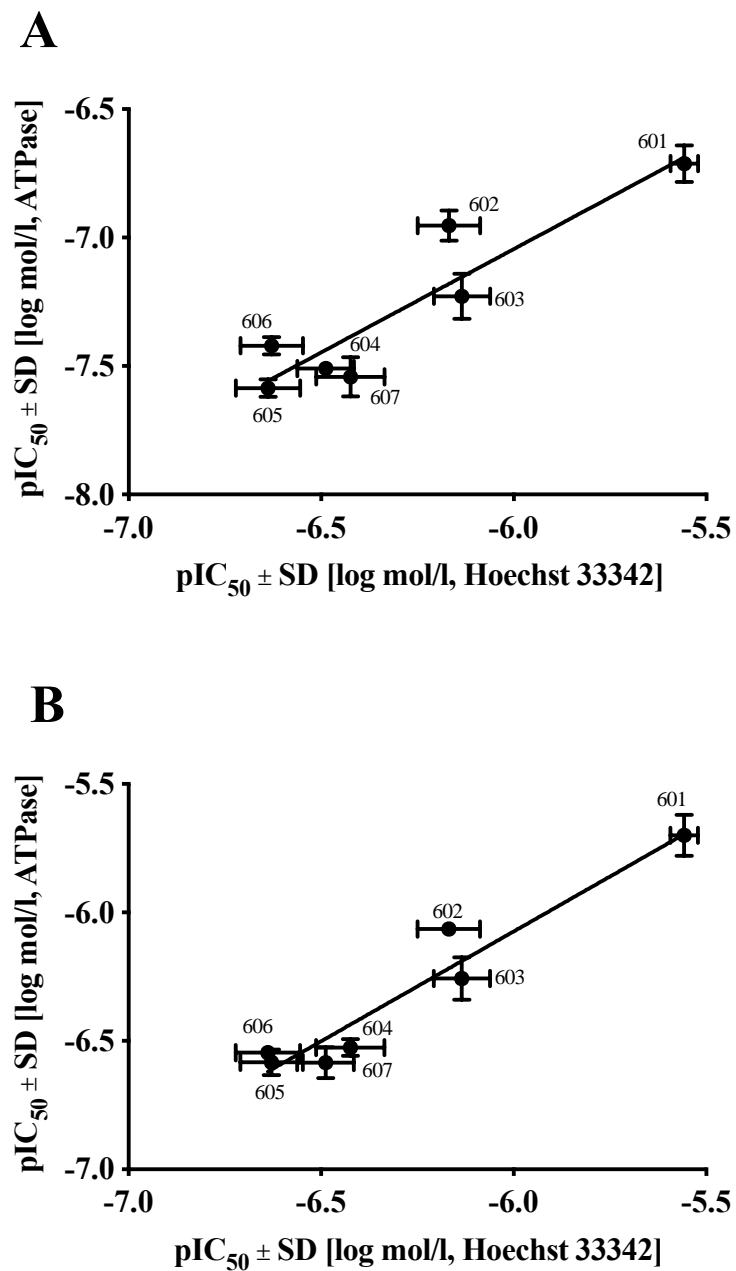


**Abbildung 6.14:** Konzentrations-Effektkurven von Ko143 (A) und des ausgewählten Tetrahydro- $\beta$ -carbolins 607 (B). Die ATPase wurde durch 1  $\mu$ mol/l Quercetin stimuliert (gefüllte Quadrate); die basale Aktivität wird durch gefüllte Kreise dargestellt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt in Duplikaten.

**Tabelle 6.2:** Übersicht über die Inhibition der basalen als auch der Quercetin-stimulierten ABCG2 ATPase durch Tetrahydro- $\beta$ -carboline. Zum Vergleich dienen die Werte des Standards Ko143. Der Verschiebungsfaktor berechnet sich durch Division der  $IC_{50}$ -Werte der Quercetin stimulierten ATPase Aktivität durch die der basalen Aktivität. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt in Duplikaten.

<b>Substanz</b>	<b>Basale Aktivität</b>	<b>Quercetin stimulierte Aktivität</b>	<b>Verschiebungsfaktor</b>
	<b><math>IC_{50} \pm SD</math> [<math>\mu\text{mol/l}</math>]</b>	<b><math>IC_{50} \pm SD</math> [<math>\mu\text{mol/l}</math>]</b>	
<b>Ko143</b>	0,00389 $\pm$ 0,00026	0,0281 $\pm$ 0,0015	7,2
<b>601</b>	0,196 $\pm$ 0,032	2,02 $\pm$ 0,37	10,3
<b>602</b>	0,112 $\pm$ 0,015	0,863 $\pm$ 0,028	7,7
<b>603</b>	0,0601 $\pm$ 0,0117	0,560 $\pm$ 0,106	9,3
<b>604</b>	0,0312 $\pm$ 0,0017	0,262 $\pm$ 0,036	8,4
<b>605</b>	0,0259 $\pm$ 0,0020	0,285 $\pm$ 0,004	11,0
<b>606</b>	0,0376 $\pm$ 0,0031	0,262 $\pm$ 0,030	7,0
<b>607</b>	0,0287 $\pm$ 0,0053	0,299 $\pm$ 0,023	10,4

Eine Korrelation der ermittelten  $IC_{50}$ -Werte aus dem Hoechst 33342 Assay und den  $IC_{50}$ -Werten aus dem ATPase Assay sowohl aus der basalen Inhibition als auch der Quercetin stimulierten Inhibition gemacht, ist in Abbildungen 6.15 A und B veranschaulicht. Mit einem  $R^2$ -Wert von 0,84 bei der basalen Inhibition und von 0,93 bei der Quercetin-stimulierten Inhibition sprechen die Daten für eine Verwicklung des Bindungsverhaltens der Verbindungen und der Inhibition der ATPase Aktivität.

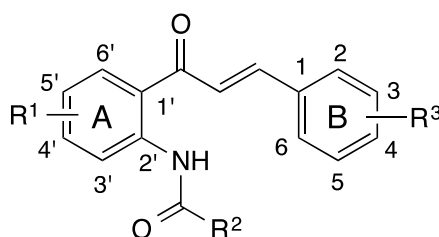


**Abbildung 6.15:** Korrelation der pIC<sub>50</sub>-Werte aus dem Hoechst 33342 Assay und den pIC<sub>50</sub>-Werten aus dem ATPase Assay. (A) Korrelation mit der basalen Inhibition ( $R^2 = 0,84$ ). (B) Korrelation mit der Quercetin stimulierten Inhibition ( $R^2 = 0,93$ ). Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD.

### 6.1.3. Untersuchungen an ABCG2 – Einfluss von Methoxygruppen der Acryloylphenylcarboxamide auf die ATPase Aktivität

Der Vanadat-sensitive ATPase Assay sollte auch bei der Charakterisierung der Acryloylphenylcarboxamide [225,226,258] Anwendung finden. In Abhängigkeit ihrer Struktur wurden 11 Derivate bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  evaluiert. In Tabelle 6.3 sind die zu vergleichenden Substanzen mit Strukturformeln vorgestellt. Die Aktivitätswerte des Hoechst 33342 Assays dienen zur Einordnung.

**Tabelle 6.3:** Übersicht über die Struktur der getesteten Acryloylphenylcarboxamide. Angegebene  $\text{IC}_{50}$ -Werte wurden von Dr. Stefanie Kraege mit Hoechst 33342 an MDCK II BCRP Zellen bestimmt und dienen zur Veranschaulichung. Die Experimente wurden in drei unabhängigen Versuchen als Duplikate durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD.

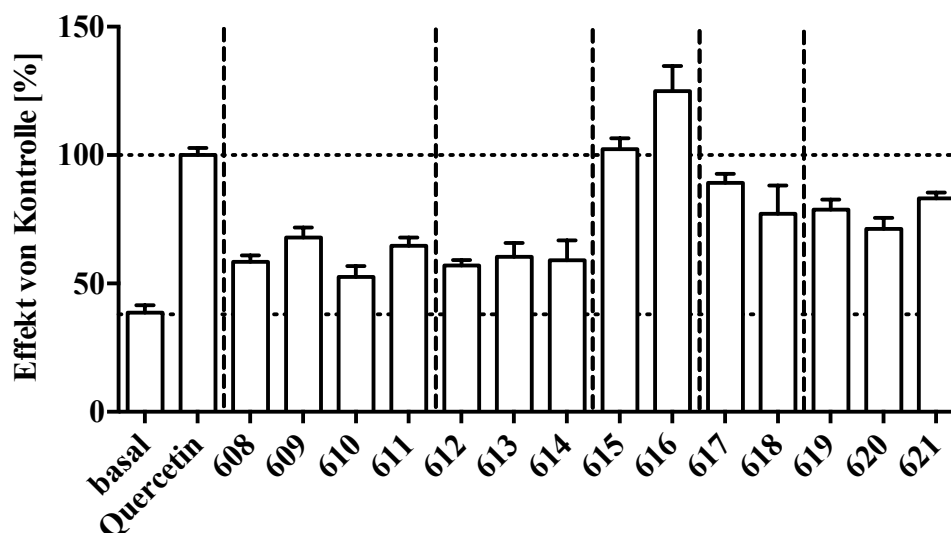


Substanz	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Hoechst 33342 IC <sub>50</sub> $\pm$ SD [ $\mu\text{mol/l}$ ]
<b>608</b>	H	Phenyl	3,4-OCH <sub>3</sub>	0,436 $\pm$ 0,052
<b>609</b>	H	3-Chlorophenyl	3,4-OCH <sub>3</sub>	0,500 $\pm$ 0,009
<b>610</b>	H	3-Quinolinyl	3,4-OCH <sub>3</sub>	0,573 $\pm$ 0,046
<b>611</b>	H	2-Thienyl	3,4-OCH <sub>3</sub>	0,501 $\pm$ 0,050
<b>612</b>	4'-OCH <sub>3</sub>	Phenyl	3,4-OCH <sub>3</sub>	0,219 $\pm$ 0,033
<b>613</b>	4'-OCH <sub>3</sub>	2-Methoxyphenyl	3,4-OCH <sub>3</sub>	0,285 $\pm$ 0,033
<b>614</b>	4'-OCH <sub>3</sub>	2-Thienyl	3,4-OCH <sub>3</sub>	0,320 $\pm$ 0,032
<b>615</b>	4'-OCH <sub>3</sub>	Phenyl	3,5-OCH <sub>3</sub>	0,292 $\pm$ 0,030
<b>616</b>	4'-OCH <sub>3</sub>	2-Thienyl	3,5-OCH <sub>3</sub>	0,268 $\pm$ 0,058 <sup>a</sup>
<b>617</b>	4',5'-OCH <sub>3</sub>	Phenyl	3,4-OCH <sub>3</sub>	0,754 $\pm$ 0,105
<b>618</b>	4',5'-OCH <sub>3</sub>	2-Methoxyphenyl	3,4-OCH <sub>3</sub>	0,832 $\pm$ 0,111

Substanz	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Hoechst 33342 IC <sub>50</sub> ± SD [µmol/l]
<b>619</b>	4',6'-OCH <sub>3</sub>	Phenyl	3,4-OCH <sub>3</sub>	0,739 ± 0,149
<b>620</b>	4',6'-OCH <sub>3</sub>	2-Methoxyphenyl	3,4-OCH <sub>3</sub>	0,814 ± 0,074
<b>621</b>	4',6'-OCH <sub>3</sub>	2-Thienyl	3,4-OCH <sub>3</sub>	2,34 ± 0,37 <sup>a</sup>

[a] Maximale Inhibition erreicht bei 60-70 % im Vergleich zu Ko143.

Bei der Untersuchung wurde die aus Sf9 Zellen hergestellte Membranpräparation verwendet – erzeugt durch Infektion mit einem ABCG2 cDNS tragenden Baculovirus. Wie im Balkendiagramm in Abbildung 6.16 zu sehen ist, bewirkten alle getesteten Verbindungen eine Stimulation der ABCG2 ATPase. Im Vergleich zur Basalaktivität fielen jedoch Unterschiede in Abhängigkeit vom Substitutionsmusters auf. So stimulierten die ersten beiden Gruppen mit einer 3,4-Dimethoxysubstitution an Ring B (608-614) die ABCG2 ATPase, jedoch nur etwa zur Hälfte der Quercetin Aktivierung. Auch die 4-Methoxysubstitution der zweiten Gruppe an Ring A (612-614) steigerte nicht die Aktivität.



**Abbildung 6.16:** Effekt ausgewählter Acryloylphenylcarboximide bei 1 µmol/l auf die ABCG2 ATPase, im Vergleich zur basalen sowie zur Quercetin-stimulierten Aktivität. Die Experimente wurden in Duplikaten und in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Gezeigt sind normalisierte Mittelwerte ± SD.

Im Vergleich hierzu bewirkte die 3,5-Dimethoxysubstitution an Ring B (615, 616) eine enorme Steigerung der Stimulation. Diese überstieg das Stimulationsmaximum, das durch den Standard Quercetin gekennzeichnet ist. In der vierten Gruppe waren Derivate mit einer 3,4-Dimethoxysubstitution an Ring A (617, 618) im Vergleich zur keiner bzw. einer Einfachsubstitution aktiver und erreichten annähernd die Aktivierung des Standards. Auch die Derivate der fünften Gruppe zeigten, dass die Substitution an Ring A, ob mit 4',5'-Dimethoxy- oder 4',6'-Dimethoxysubstitution (619-621) keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Stimulation der ABCG2 ATPase macht.

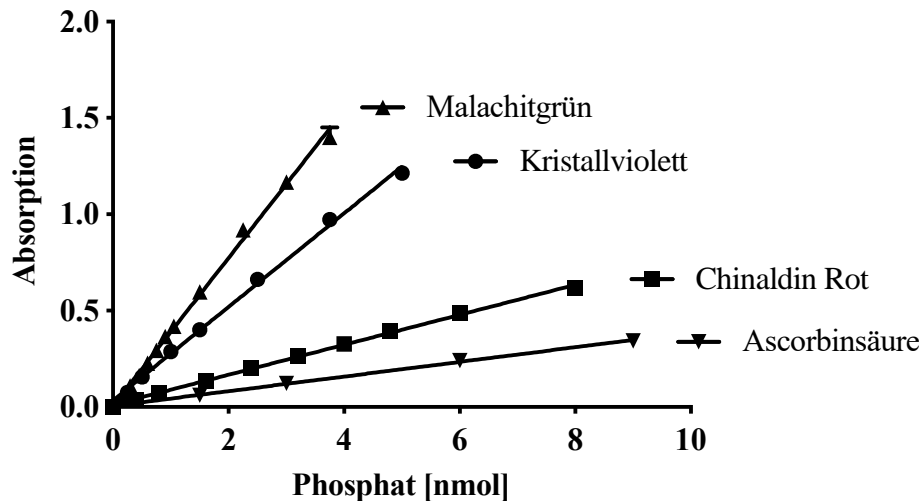
Die Ergebnisse zeigten damit, dass die Stimulation der ABCG2 ATPase in diesem Beispiel durch Anwesenheit und Position der Methoxygruppen beeinflusst wurde. Wie bereits bei in Kapitel 5 vorgestellten Chinazolin-Chalkonen gezeigt, war der stimulierende Effekt der ABCG2 ATPase nicht mit dem Transport der Verbindung gleichzusetzen [188]. Untersuchungen der Zelltoxizität in sensitiven und ABCG2 exprimierenden Zellen zeigten keine Unterschiede, sodass die Schlussfolgerung gezogen werden kann, dass kein Transport der Substanzen stattfindet und die Acryloylphenylcarboxamide als ABCG2 Inhibitoren klassifiziert werden können [225,226].

## 6.2. Modifizierung und Etablierung einer neuen Detektionsmethode

### 6.2.1. Überführung des ATPase Assays von Röhren auf eine 96er Mikrotiterplatte und Vergleich unterschiedlicher Detektionsmethoden

Die Vermessung der Proben beim ATPase Assay in Röhren war im Arbeitskreis etabliert und wurde erfolgreich angewandt. Jedoch war bei aufwendigeren Versuchsaufbauten wie Kreuzkombinationen von Modulatoren die begrenzte Probenanzahl hinderlich. Außerdem erwies sich die Bearbeitung jeder einzelnen Probe als unpraktisch und zeitintensiv. Bei der Detektionsmethode mit Ascorbinsäure in Röhren wurde jedes einzelne Röhren mindestens 5-mal bearbeitet. Aufgrund erfolgreicher Anwendung der 96er Mikrotiterplatten bei anderen farbbasierten Assays sollte dies auch für den ATPase Assay realisiert werden. Hierdurch wurde auch das Probenvolumen reduziert. Zur Validierung wurden die Ergebnisse mit denen aus Röhrenmessungen verglichen. Im gleichen Zug wurden weitere Detektionsmittel untersucht. Nach Literaturrecherche wurden hierfür neben Ascorbinsäure Malachitgrün, Kristallviolett und Chinaldin Rot untersucht [195,259-262]. Bei der Auswahl wurde die Sensitivität der Farbstoffe sowie die praktische Umsetzung berücksichtigt.

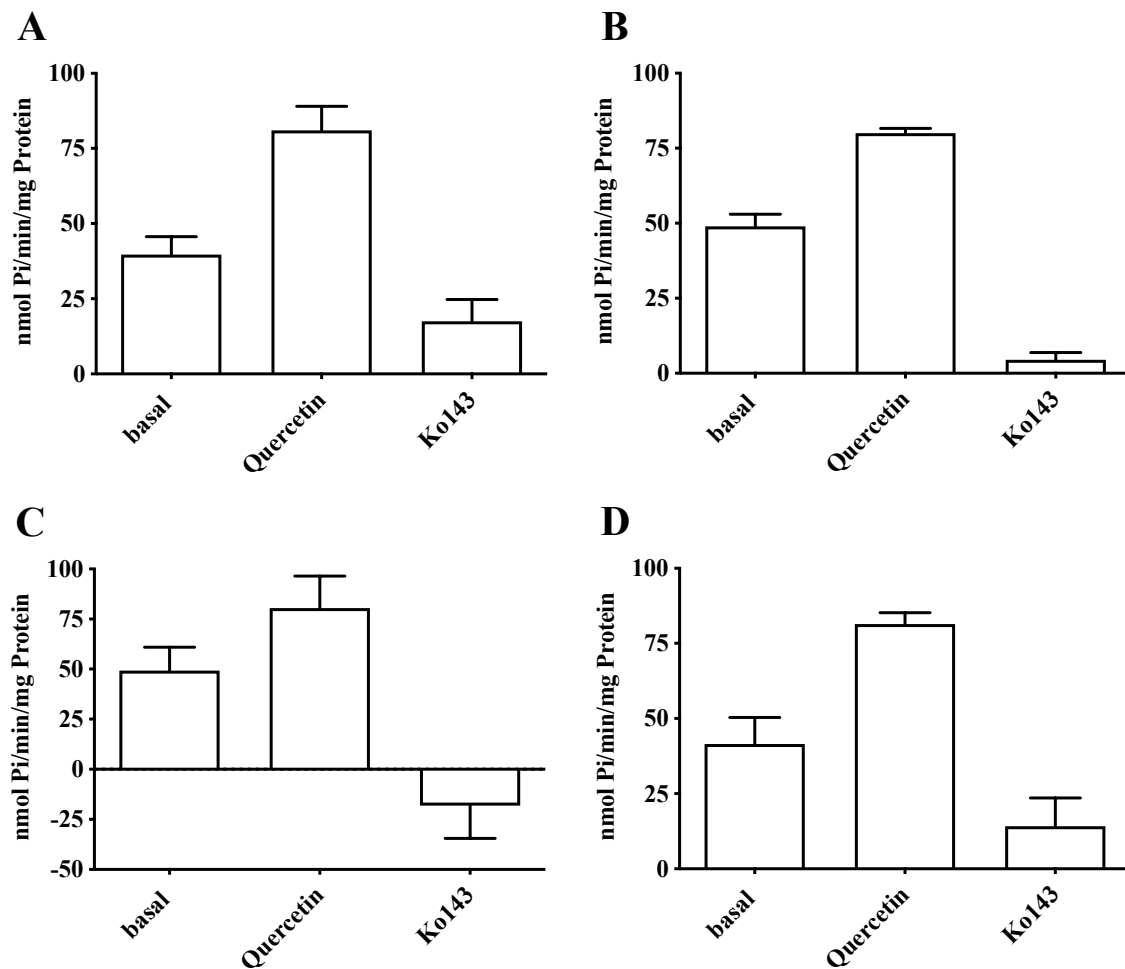
Abbildung 6.17 veranschaulicht den Vergleich der unterschiedlichen Farbstoffe bei der Detektion von anorganischem Phosphat. Die Sensitivität der Messmethode, durchgeführt mit dem Standard Kaliumdihydrogenphosphat, differierte insbesondere beim Vergleich von Malachitgrün und Ascorbinsäure. Bildet man den Quotienten aus den Steigungen der Kalibriergeraden erkennt man den Sensitivitätsunterschied, der bei Ascorbinsäure und Malachitgrün 10-fach, bei Ascorbinsäure und Kristallviolett 6,4-fach und bei Ascorbinsäure und Chinaldin Rot 2-fach ist. Im Vergleich zu der Detektionsmethode mit Ascorbinsäure sinkt mit sensitiveren Farbstoffen das Detektionslimit, sodass Differenzen in Effekten deutlicher erkannt werden können.



**Abbildung 6.17:** Vergleich unterschiedlicher Detektionsmethoden von Phosphat. Für die Messungen wurde der Standard Kaliumdihydrogenphosphat verwendet. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt in Duplikaten.

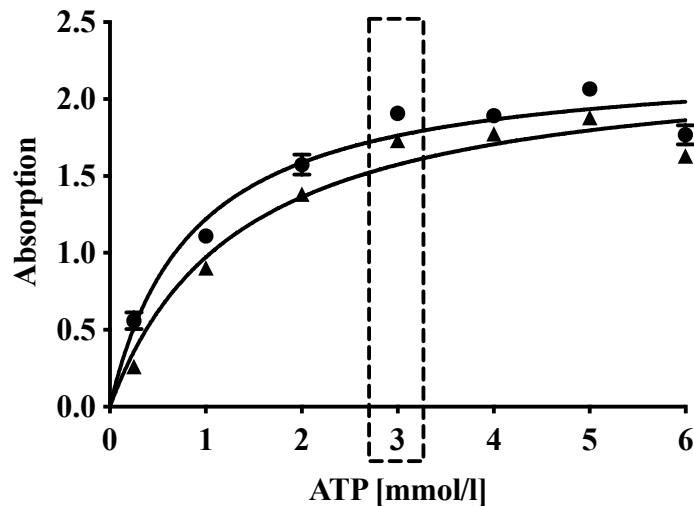
Weitere Versuche wurden mit einer ABCG2 enthaltenden Membranpräparation im Vanadat-sensitiven ATPase Assay unter Verwendung des bekannten Standardaktivators Quercetin und dem Standardinhibitor Ko143 durchgeführt. Abbildungen 6.18 A bis D zeigen die Ergebnisse aus dem ATPase Assay mit unterschiedlichen Detektionsmethoden. Zunächst fällt auf, dass die Ergebnisse der sensitiveren Detektionsmethoden Malachitgrün und Kristallviolett überraschen. Denn die Stimulation der ATPase Aktivität durch Quercetin ist deutlich geringer als bei der Detektion mit Ascorbinsäure oder Chinaldin Rot. Dahingegen ist die Inhibition der ATPase Aktivität durch Ko143 ausgeprägter. Bei Kristallviolett führt es sogar dazu, dass die berechneten Werte von Ko143 in den negativen Bereich fallen. Dieser Effekt kann nur durch die versuchsbedingten Gegebenheiten und den damit verbundenen Fehlern erklärt werden.





**Abbildung 6.18:** Messung der ABCG2 ATPase Aktivität mit unterschiedlichen Detektionsmethoden. (A): Ascorbinsäure; (B): Malachitgrün; (C): Kristallviolett; (D): Chinaldin Rot. Vermessen wurde jeweils die basale sowie die durch Quercetin stimulierte und die durch Ko143 inhibierte Aktivität. Die Kalibriergerade zur Berechnung der Phosphatmenge wurde mit Kaliumdihydrogenphosphat erstellt. Die Experimente wurden in drei unabhängigen Versuchen in Duplikaten durchgeführt.

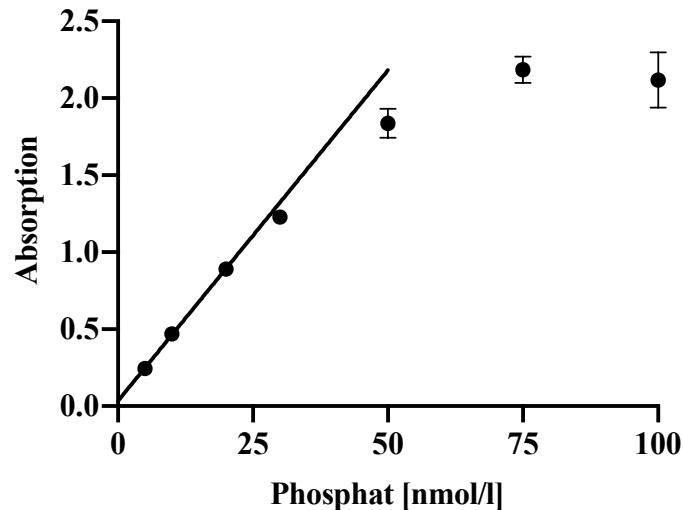
Die oben genannte Problematik wurde bereits visuell und instrumentell beobachtet. Die Farbintensivität war zu hoch und die gemessenen Absorptionswerte lagen über 1. Der Verdacht, dass es an gewissen Bestandteilen des Assay Mix‘, der Membranpräparation, oder der ATP-Lösung liegen könnte, sollte durch weitere Versuche mit Malachitgrün evaluiert werden. So wurden Messungen mit Malachitgrün als Detektionsmittel mit variierender ATP-Konzentration bzw. mit und ohne Membranpräparation durchgeführt. In Abbildung 6.19 sind die Rohdaten solch einer Messung dargestellt.



**Abbildung 6.19:** Gemessene Absorptionen im Vanadat-sensitiven ATPase Assay, detektiert mit Malachitgrün für unterschiedliche ATP Konzentrationen. Mit 1 mg/ml ABCG2 enthaltende Membranpräparation (gefüllte Kreise) und ohne Membranpräparation (gefüllte Dreiecke). Markiert ist die Verwendung von 3 mmol/l ATP als übliche Standardkonzentration. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt in Duplikaten.

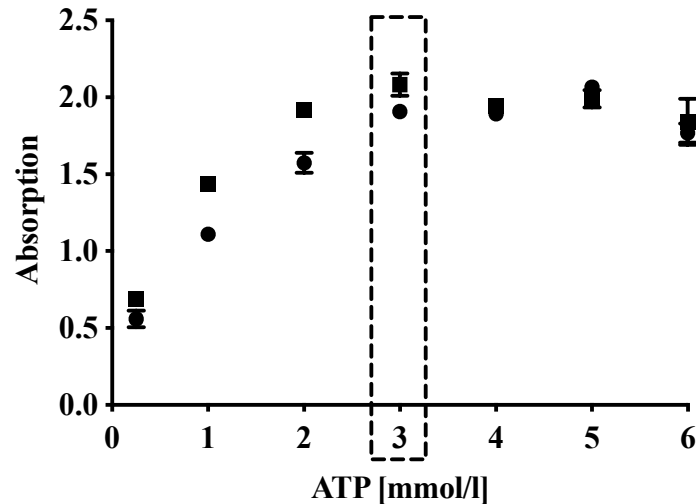
Auffällig ist die geringe Differenz zwischen Zugabe und Nichtzugabe von Membranpräparation unabhängig von der gewählten ATP-Konzentration. So können die hohe Farbintensität und die daraus resultierenden hohen Absorptionswerte eindeutig der verwendeten ATP-Lösung zugeschrieben werden. Bei der Verwendung von der üblicherweise vorgeschriebenen ATP-Konzentration von 3 mmol/l liegt der Absorptionswert über 1,5 und damit über dem präzise messbaren Bereich. Außerdem lässt sich gut erkennen, dass die Absorptionswerte mit steigender ATP-Konzentration nur geringfügig zunehmen. Dies kann einerseits durch eine Sättigung der Membranpräparation, andererseits durch das Erreichen der oberen Messgrenze des verwendeten Plattenphotometers erklärt werden. Da es sich bei dem ATPase Assay um einen Vanadat-sensitiven Assay handelt, stellen die Absorptionswerte von Vanadat die Geringsten innerhalb weiterer vermessener Verbindungen dar. Aufgrund der genannten Tatsachen sind die gemessenen Werte, wie in Abbildung 6.19 dargestellt, nur begrenzt auswertbar. Die Messwerte besitzen alle eine Absorption über 1 und sind damit deutlich außerhalb des präzise messbaren Bereichs und daher mit Vorsicht zu betrachten. Der gestauchte Messbereich im verwendeten ATPase Assay macht den Vorteil der hohen Sensitivität dieser Detektionsmethode mit Malachitgrün zunichte. Anhand der gezeigten Kalibriergeraden, detektiert mit Malachitgrün (Abbildung 6.20), verdeutlicht sich die

Problematik. Die im Assay gemessenen Absorptionswerte liegen nicht im linearen Teil der Geraden, was eine Auswertung unter den gegebenen Assaybedingungen unmöglich macht. Die herstellungs-, und hydrolysebedingt vorhandene Phosphatkonzentration beansprucht bereits vollkommen den auswertbaren Bereich.



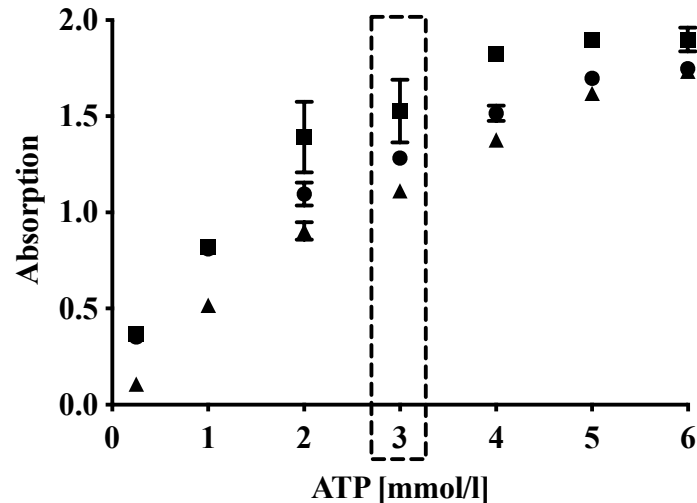
**Abbildung 6.20:** Kalibriergerade von Kaliumdihydrogenphosphat, detektiert mit Malachitgrün. Regressionsgerade kennzeichnet den linearen Bereich der Geraden.

Bei Auftragung der Rohdaten von Vanadat und Quercetin in einer Graphik (Abbildung 6.21) wird ersichtlich, dass der Gedanke, weniger ATP einzusetzen, verworfen werden muss. Zwar sind bei Konzentrationen von 1 mmol/l und 2 mmol/l ATP Differenzen der Messwerte zu erkennen. Dennoch liegen die Absorptionen insgesamt immer noch über 1 und demnach nicht im präzise messbaren Bereich nach Lambert-Beer. Eine  $K_m$ -Wert Bestimmung von ATP macht bei dieser Methode wenig Sinn, da das Erreichens der oberen Messgrenze die angestrebte Sättigung der Membranpräparation überlagert. Überdies sind ATP-Konzentrationen unter 1 mmol/l zu gering um Differenzen messen zu können.



**Abbildung 6.21:** Gemessene Absorptionen von Vanadat inhibierter (gefüllte Kreise) und Quercetin stimulierter ATPase (gefüllte Quadrate) mit dem Plattenphotometer Multiskan EX (Thermo Scientific). Auftragung unterschiedlich eingesetzter ATP Konzentrationen gegen die gemessene Absorption. Verwendet wurde 1 mg/ml ABCG2 enthaltende Membranpräparation. Markiert ist die Verwendung von 3 mmol/l ATP als Standardkonzentration. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt in Duplikaten.

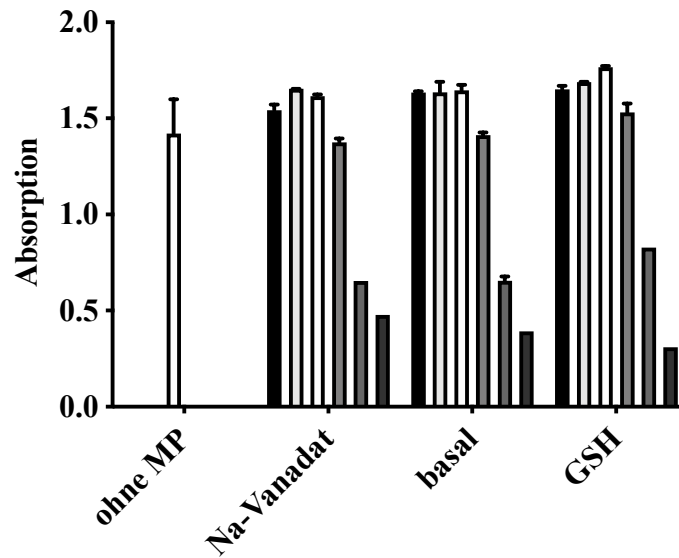
Um eine Lösung des gefundenen Problems herbeizuführen, wurde zunächst die Herstellung einer neuen ATP-Lösung vorgenommen. Dass ein gewisser Zerfall von ATP zu ADP und Phosphat schon bei der Herstellung einer ATP-Lösung auftritt, ist bekannt und kann nicht verhindert werden. Abbildung 6.22 zeigt Daten einer neu hergestellten ATP-Lösung mit und ohne Zusatz einer Membranpräparation. Zwar fallen die Absorptionswerte insgesamt etwas niedriger aus, sind aber dennoch zu hoch. So liegt die Absorption der Probe mit Quercetin bereits bei über 1,5. Somit konnte durch die Herstellung einer neuen ATP-Lösung die Messung zwar etwas optimiert werden, leider aber nicht hinreichend. So muss die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Messungen enorm von der Charge der hergestellten ATP-Lösung abhängen.



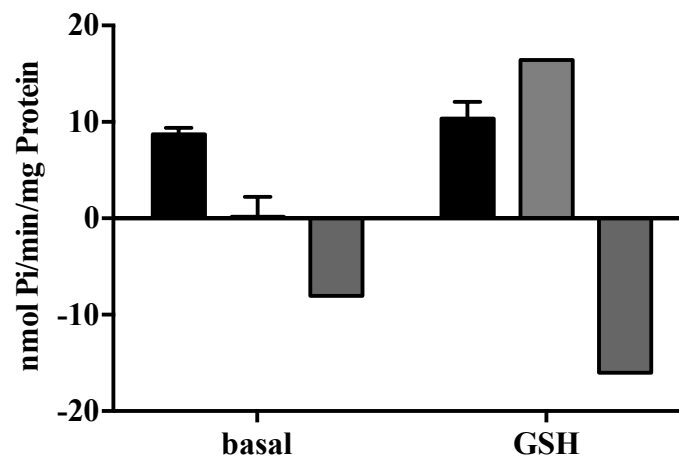
**Abbildung 6.22:** Auftragung unterschiedlich eingesetzter ATP Konzentrationen gegen die gemessene Absorption. Messdaten nach Herstellung einer neuen ATP-Stammlösung. Gemessene Absorptionen von Vanadat inhibierter (gefüllte Kreise) und Quercetin stimulierter ATPase Aktivität (gefüllte Quadrate) mit 1 mg/ml ABCG2 Membranpräparation sowie Vanadat inhibierter ATPase (gefüllte Dreiecke) ohne Zusatz von Membranpräparation. Markiert ist die Verwendung von 3 mmol/l ATP als übliche Standardkonzentration. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt in Duplikaten.

Weiterhin wurde versucht, das in der ATP-Lösung bereits entstandene Phosphat zu entfernen, um die bestehende Problematik zu lösen. Hierzu wurde ein Phosphatbinder auf Lanthanbasis zur ATP-Lösung zugegeben. Da die Konzentration des Phosphatbinders unbekannt war, wurde dieser in unterschiedlichen Verhältnissen zur ATP-Lösung gegeben und die Auswirkung im ABCC1 ATPase Assay analysiert. Abbildung 6.23 gibt die gemessenen Absorptionen wieder. Ein Absinken der Absorptionen ist erst ab einem Verhältnis von 1:3 (Phosphatbinder : ATP-Lösung) zu verzeichnen. Deutliche Auswirkungen gibt es erst bei Zugabe von äquivalenten Volumina beider Lösungen, wodurch die Absorptionen unter 1 sinken. Was zunächst vielversprechend wirkte, wurde durch den Abzug der Natriumorthovanadat-Werte und Berechnung der Phosphatmenge relativiert. Abbildung 6.24 verdeutlicht das Problem. Im Falle eines Verhältnisses von 2:1 fallen die berechneten Werte (nach besagtem Abzug der Vanadat-Werte) sogar in den negativen Bereich. Dieser Effekt könnte durch die Bildung (schwerlöslicher) Lanthanverbindungen (Lanthanphosphat oder Lanthanvanadat) erklärt werden. Bei einem Verhältnis von 1:1 ist zwar eine deutliche Differenz zwischen der basalen und der durch GSH-stimulierten ATPase Aktivität zu sehen, jedoch liegt der basale

Wert dem Nullpunkt sehr nahe. Demzufolge könnte keine Inhibition der Aktivität gemessen bzw. sinnvoll ausgewertet werden.



**Abbildung 6.23:** Gemessene Absorptionswerte im ABCC1 ATPase Assay. Anorganisches Phosphat wurde mit Malachitgrün detektiert. Vermessen wurde jeweils die basale sowie die durch GSH stimulierte als auch die durch Natriumorthovanadat inhibierte ATPase Aktivität. Ohne Zugabe des Phosphatbinders (schwarze Balken) sowie den Verhältnissen 1:10, 1:5, 1:3, 1:1 und 2:1 (graue Balken) zur ATP-Lösung (3 mmol/l). Zum Vergleich die Absorption von 3 mmol/l ATP-Lösung (weißer Balken) ohne Zugabe einer Membranpräparation. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt in Duplikaten.



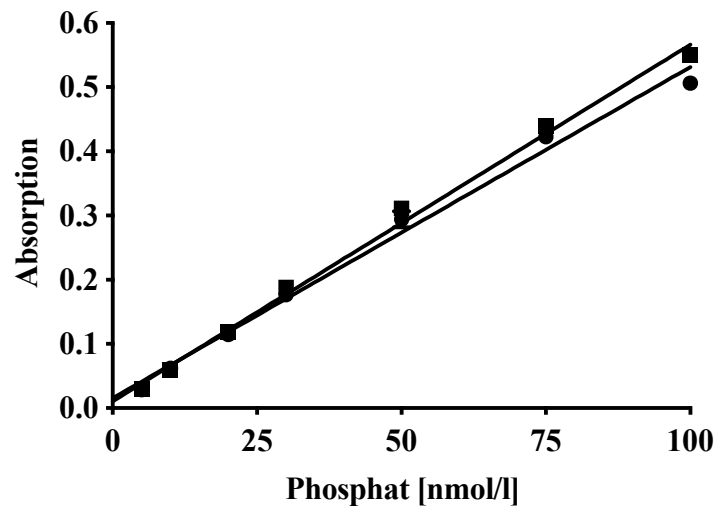
**Abbildung 6.24:** Berechnete Phosphatmenge aus Abbildung 6.22 im ABCC1 ATPase Assay nach Abzug der Natriumorthovanadat-Werte. Anorganisches Phosphat wurde mit Malachitgrün detektiert. Ohne Zugabe des Phosphatbinders (schwarze Balken) und im Verhältnis zur ATP-Lösung (Endkonzentration 3 mmol/l) 1:1 (graue Balken) und 2:1 (dunkelgraue Balken). Die Kalibriergerade zur Berechnung der Phosphatmenge wurde mit Kaliumdihydrogenphosphat durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt in Duplikaten.

Die genannten Lösungsansätze waren leider erfolglos, sodass die Vermessung mit Malachitgrün und ebenso mit Kristallviolett als Detektionsreagenzien von anorganischem Phosphat im Vanadat-sensitiven ATPase Assay verworfen werden musste. Im Gegensatz dazu hatte Chinaldin Rot bessere Erfolgsaussichten. Vorteilhaft gegenüber der Detektion mit Ascorbinsäure war die praktische Umsetzung. So mussten die Proben nach der Inkubationszeit mit nur drei Reagenzien bearbeitet werden, im Vergleich zu Ascorbinsäure, wo vier Schritte notwendig waren. Zwar scheint dies vorerst nicht viel mehr zu sein, aber die Ascorbinsäure musste für jede Detektion frisch hergestellt werden. Die Einwaage und die exakte Herstellung einer 1 %-Lösung ist praktisch sehr aufwendig. Trotz der nur 2-fach höheren Sensitivität im ATPase Assay wurde für die Untersuchung und Messung des Vanadat-sensitiven ATPase Assays die Detektionsmethode mit Chinaldin Rot gewählt und anschließend auf einer 96er Mikrotiterplatte etabliert.

### **6.2.2. Etablierung des Vanadat-sensitiven ATPase Assays mit Chinaldin Rot als Detektionsreagenz auf einer 96er Mikrotiterplatte**

Nach Berechnung und Reduzierung des Messvolumens von Röhrchen auf ein Well einer Mikrotiterplatte wurde die Methode validiert und Optimierungsversuche vorgenommen. Mit der neuen Detektionsmethode sollten anschließend Modulatoren der ABC-Transportproteine ABCC1 und ABCG2 untersucht werden.

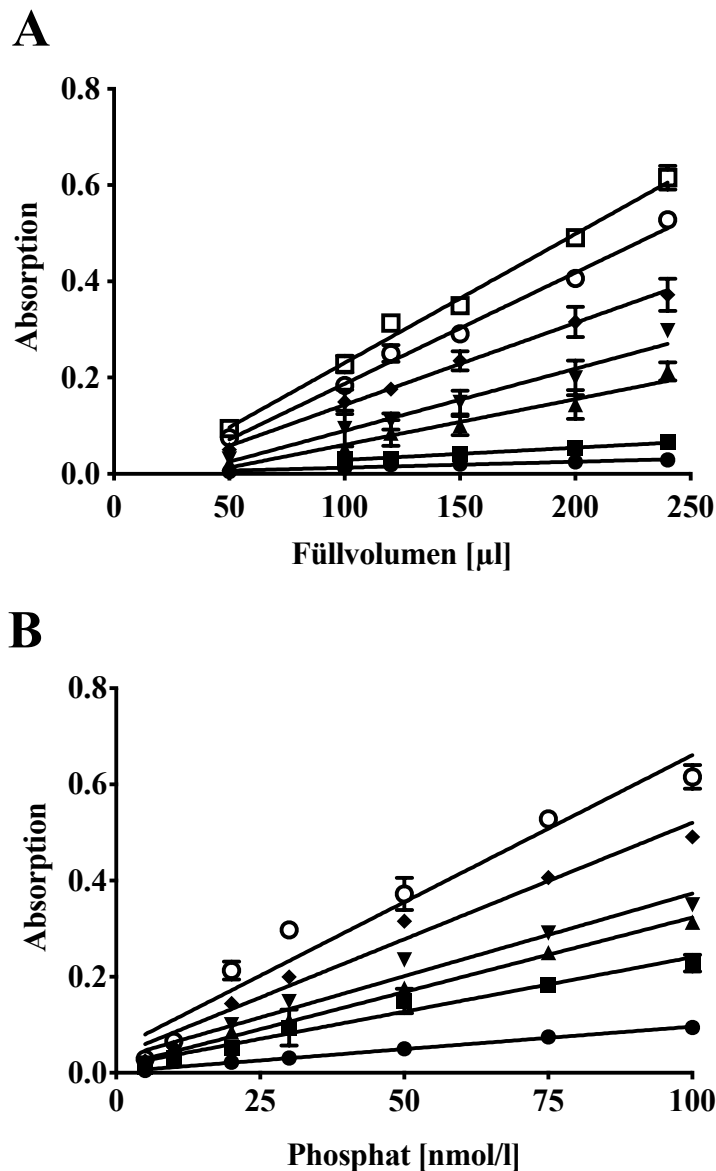
Die Herstellung der Reagenzien erfolgte in größerem Maßstab, sodass nicht jeden Tag neu eingewogen werden musste und mehrere Platten gleichzeitig präpariert werden konnten. Die Überprüfung, wie lang die hergestellten Lösungen im Kühlschrank aufbewahrt werden konnten, wurde mit einer Kalibriergeraden durchgeführt. Frisch hergestellte und bereits zwei Wochen lang gelagerte Lösungen wurden für den Versuch verwendet. In der Abbildung 6.25 ist zu erkennen, dass sich die Messpunkte der unterschiedlichen Phosphatmengen nahezu überlagern. Aus diesen Versuchen kann man schlussfolgern, dass Lösungen für den Nachweis von Phosphat mit Chinaldin Rot mindestens zwei Wochen lang verwendet bzw. im Kühlschrank gelagert werden können.



**Abbildung 6.25:** Vergleich frisch hergestellter (gefüllte Kreise) und 2 Wochen alter (gefüllte Quadrate) Reagenzien, welche in der Chinaldin Rot Detektionsmethode verwendet werden. Kaliumdihydrogenphosphat wurde als Standard für die Kalibriergerade verwendet. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt in Duplikaten.

Die Vermessung der Mikrotiterplatte am Spektrometer ermöglicht die gleichzeitige Vermessung aller Proben und ist daher sehr praktisch und zeiteffizient. Die gemessenen Absorptionswerte werden in einer Excel-Tabelle gespeichert und können anschließend direkt weiter ausgewertet werden. Die Linearität der Absorptionswerte als Funktion der Phosphatkonzentration und der Füllhöhe der Wells wurde überprüft. Unter Verwendung unterschiedlicher Phosphatmengen, sowie unterschiedlicher Füllhöhe der Wells. Bei Auftragung des Füllvolumens gegen die Absorptionswerte sollten die vermessenen Phosphatmengen jeweils eine Gerade ergeben. In Abbildung 6.26 A und B ist jeweils eine Beispielmessung dargestellt und zeigt die geforderte Linearität der Messungen des Spektrometers.

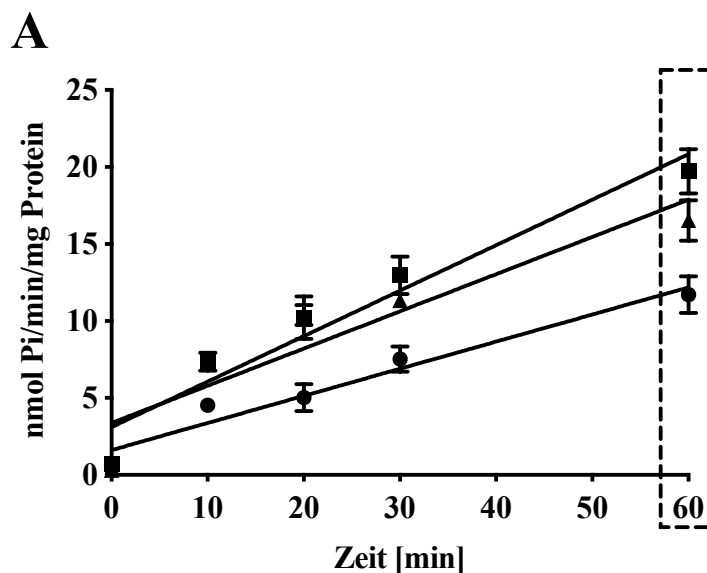


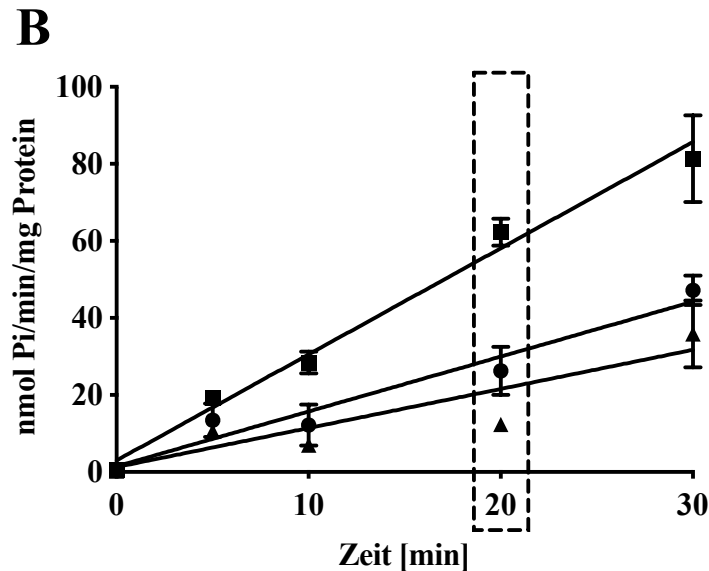


**Abbildung 6.26:** Linearität der Absorptionswerte abhängig vom Füllvolumen (A) bzw. der Phosphatkonzentration (B). Zur Generierung der Kalibriergeraden wurde Kaliumdihydrogenphosphat als Standard verwendet. (A) Geraden entsprechen der eingesetzten Phosphatkonzentration: 5 nmol/l (gefüllte Kreise), 10 nmol/l (gefüllte Quadrate), 20 nmol/l (gefüllte nach oben gerichtete Dreiecke), 30 nmol/l (gefüllte nach unten gerichtete Dreiecke), 50 nmol/l (gefüllte Rauten), 75 nmol/l (leere Kreise) und 100 nmol/l (leere Quadrate). (B) Geraden entsprechen der verwendeten Füllvolumina: 50 ml (gefüllte Kreise), 100 ml (gefüllte Quadrate), 120 ml (gefüllte nach oben gerichtete Dreiecke), 150 ml (gefüllte nach unten gerichtete Dreiecke), 200 ml (gefüllte Rauten) und 240 ml (leere Kreise). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt in Duplikaten.

Die nachfolgenden Versuche wurden mit Standardsubstanzen und unter Einsatz von Membranpräparationen welche ABCC1 bzw. ABCG2 enthalten und mit einer ATP-Lösung durchgeführt. Der ATPase Assay mit dem Detektionsreagenz Chinaldin Rot sollte für nachfolgende Messungen optimiert und die verwendeten Einstellungen aus dem ATPase Assay mit dem Detektionsreagenz Ascorbinsäure überprüft werden.

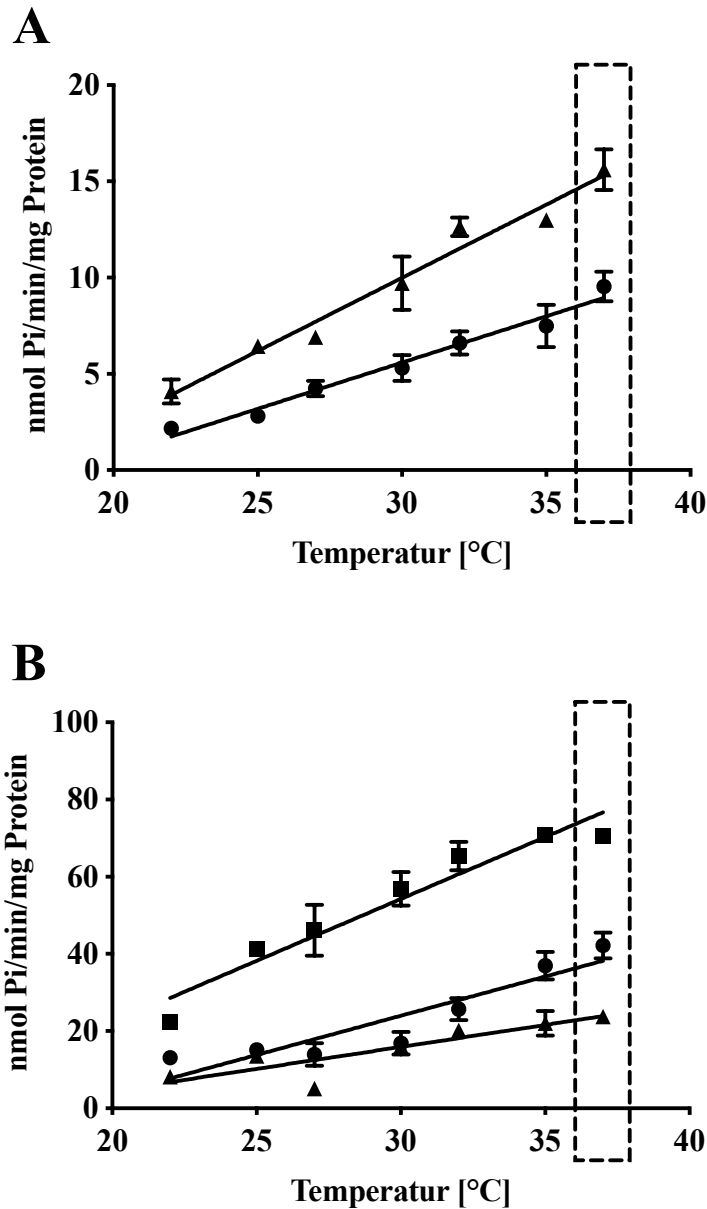
Die ermittelten notwendigen Inkubationszeiten der ABCC1 bzw. ABCG2 ATPase Assays betragen 60 bzw. 20 Minuten. Bei den Variationen der Inkubationszeiten sollte die Differenz der basalen und der stimulierten ATPase Aktivitäten möglichst ausgeprägt und konstant sein und gleichzeitig der praktische Teil und damit der zeitliche Aufwand kurzgehalten werden. Abbildungen 6.27 A und B zeigen die Ergebnisse für die beiden Transportproteine. Sowohl für ABCC1 als auch ABCG2 sind die bereits etablierten Inkubationszeiten sinnvoll und sollten beibehalten werden. Eine zu kurze Inkubation verursacht zu geringe Differenzen zwischen basaler und stimulierter Aktivität, was wiederum bei anschließender Datenverarbeitung zu Fehlern führt. Eine ausgedehnte Inkubationszeit in Bezug auf die Versuchsdauer wäre nur bei deutlich besseren Ergebnissen angemessen.





**Abbildung 6.27:** Optimierung der Inkubationszeit. (A) Unter Verwendung von einer ABCC1-haltigen Membranpräparation mit basaler (gefüllte Kreise), NEM-GS- (gefüllte Quadrate) und GSH- (gefüllte Dreiecke) stimulierter ATPase Aktivität. (B) Verwendung einer ABCG2-haltigen Membranpräparation mit basaler (gefüllte Kreise), Quercetin-stimulierter (gefüllte Quadrate) und Ko143-inhibierter (gefüllte Dreiecke) Aktivität. Mit ABCC1 (A) wurden Inkubationszeiten von 10, 20, 30 und 60 Minuten sowie eine unmittelbare Messung (0 Minuten) untersucht. Mit ABCG2 (B) wurden Inkubationszeiten von 5, 10, 20 und 30 Minuten sowie eine unmittelbare Messung (0 Minuten) getestet. Die Experimente wurden in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Gezeigt ist jeweils ein Mittelwert  $\pm$  SD aller Messungen.

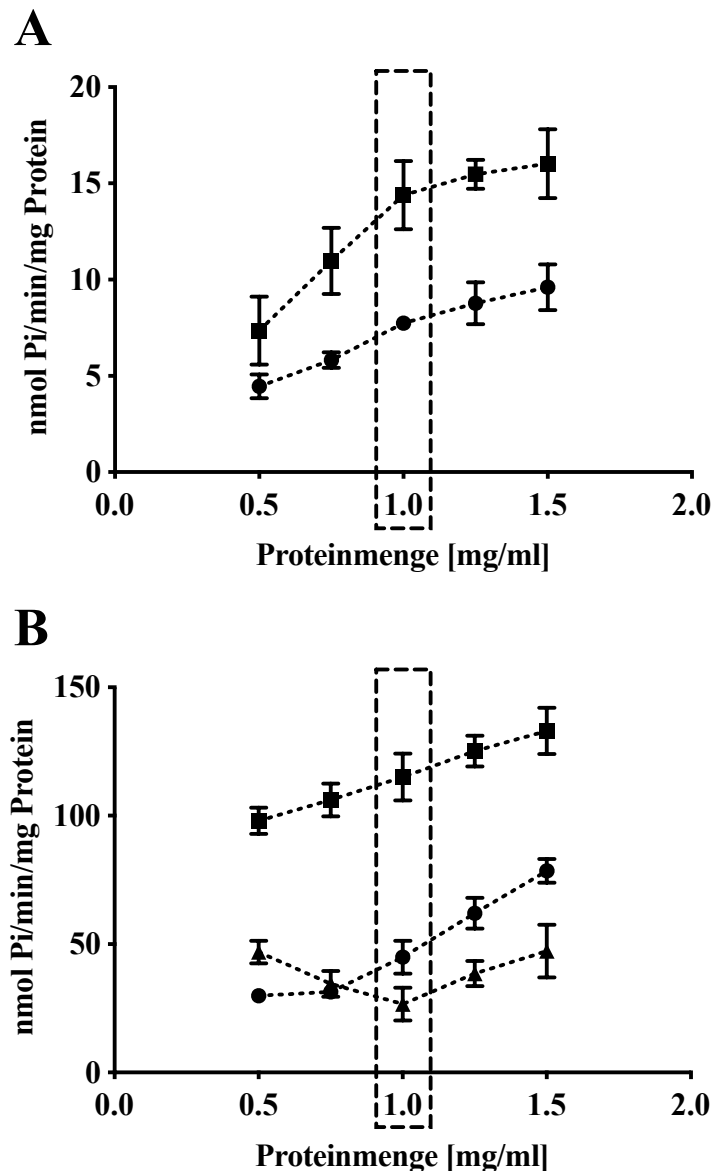
Die Inkubation erfolgte nach Versuchsprotokoll immer bei 37 °C. Durch Steigerung von Raumtemperatur (22 °C) bis zur vorgeschriebenen Versuchstemperatur in 2 bzw. 3 °C Schritten wurde der Effekt auf die entstehende Phosphatmenge ebenfalls evaluiert. Abbildungen 6.28 A und B zeigen den jeweiligen Einfluss der Inkubationstemperatur auf die ATPasen von ABCC1 (A) und ABCG2 (B). Bei höheren Temperaturen wurde mehr Phosphat gebildet und dementsprechend mit Chinaldin Rot detektiert. Die Differenzen zwischen basaler und stimulierter bzw. inhibierter ATPase Aktivität blieben nachweislich gleich.



**Abbildung 6.28:** Einfluss der Inkubationstemperatur auf die entstehende Phosphatmenge bei (A) ABCC1 und (B) ABCG2. Gezeigt ist die basale (gefüllte Kreise), sowie die durch GSH (A) bzw. Quercetin (B) stimulierte (gefüllte Quadrate) und durch Ko143 (B) inhibierte (gefüllte Dreiecke) ATPase Aktivität. Die Experimente wurden in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Gezeigt ist ein Mittelwert  $\pm$  SD aller Messungen.

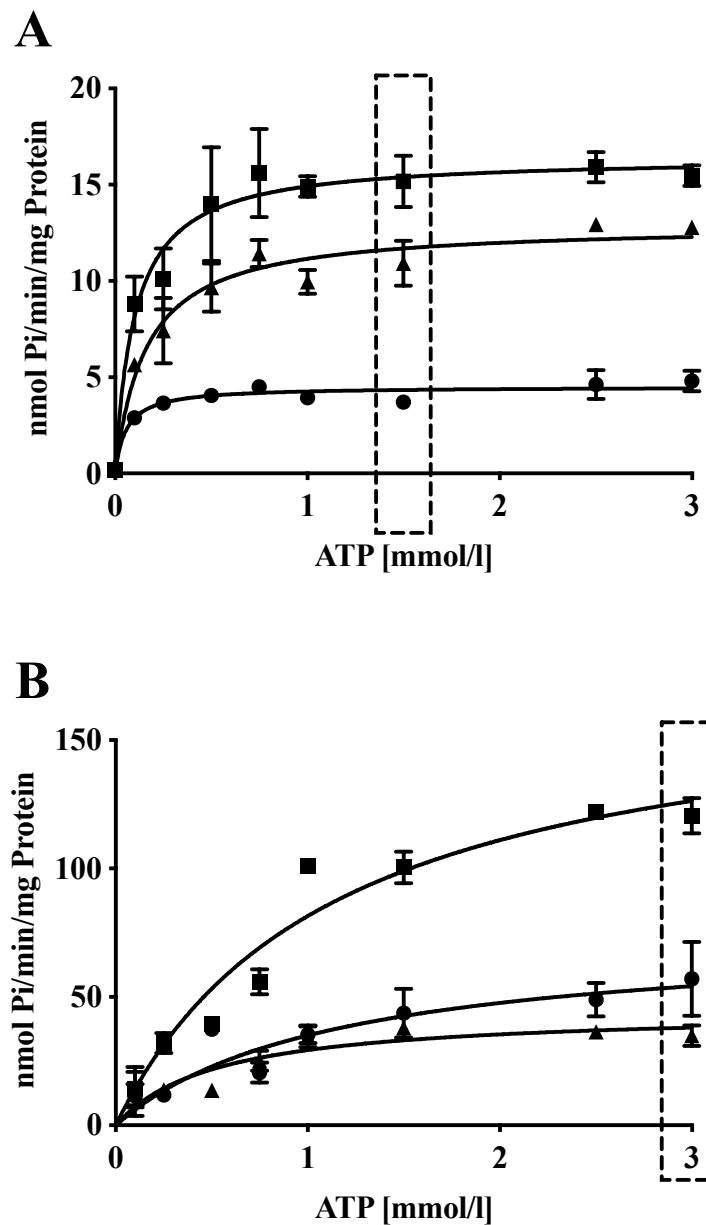
Im nächsten Schritt wurde die standardmäßig eingesetzte Proteinmenge von 1 mg/ml variiert. Sowohl für ABCC1 als auch für ABCG2 wurden die Konzentrationen 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1,0 mg/ml, 1,25 mg/ml und 1,5 mg/ml untersucht. Die Abbildungen 6.29 A und B veranschaulichen die erhaltenen Ergebnisse mit Blick auf die basale (ABCC1 und ABCG2), stimulierte (ABCC1 und ABCG2) und inhibierte (ABCG2) ATPase Aktivität. Mit ansteigender Proteinmenge steigt folgerichtig auch die ermittelte Phosphatmenge.

Sowohl für ABCC1 als auch für ABCG2 ist die bereits angewandte Proteinmenge am sinnvollsten. Bei dieser Konzentration ist die Differenz der stimulierten bzw. inhibierten ATPase Aktivität zur Basalen am größten ausgeprägt und kann durch den Einsatz höherer Mengen nicht gesteigert werden. Überdies werden so Ressourcen sinnvoll eingespart. Die gezeigten Ergebnisse gelten allerdings nur für die im Versuch verwendeten Membranpräparationen und müssen bei Verwendung neu hergestellter Membranpräparationen erneut evaluiert werden.

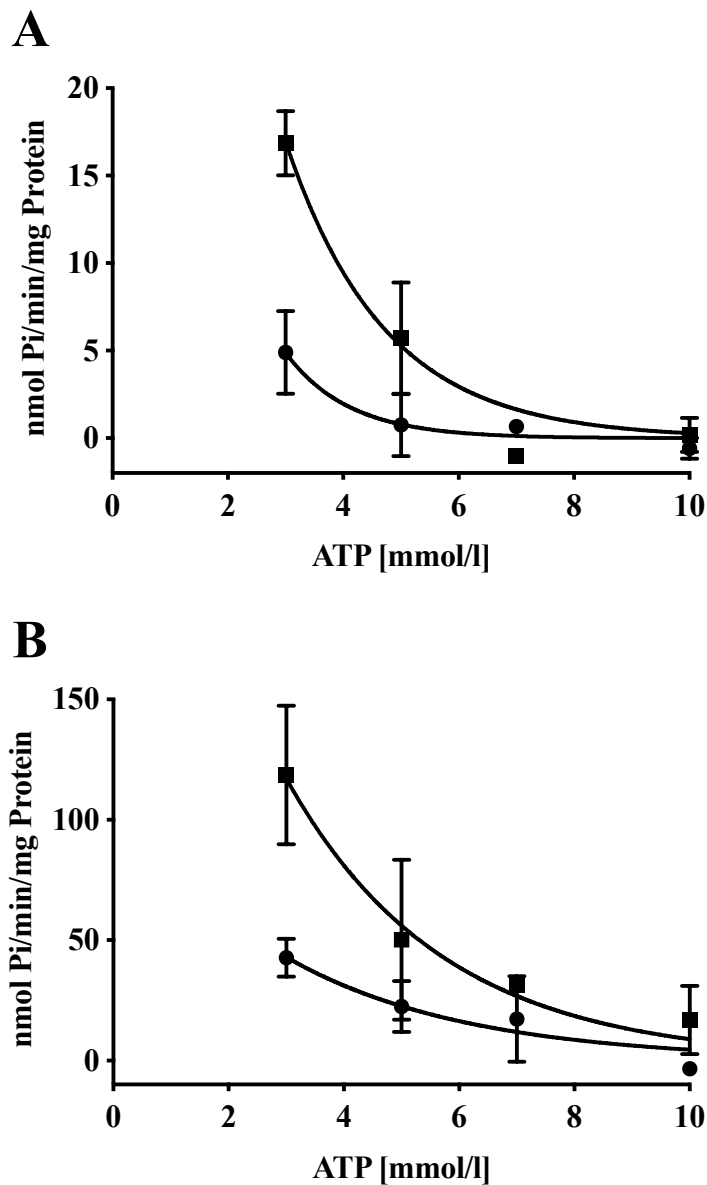


**Abbildung 6.29:** Variation der Proteinmengen und daraus resultierende Effekte auf die entstehenden Phosphatmengen bei (A) ABCC1 und (B) ABCG2. Gezeigt ist die basale (gefüllte Kreise), sowie die durch NEM-GS (A) bzw. Quercetin (B) stimulierte (gefüllte Quadrate) und durch Ko143 (B) inhibierte (gefüllte Dreiecke) Aktivität. Die Experimente wurden in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Gezeigt ist ein Mittelwert  $\pm$  SD aller Messungen.

Darauffolgend wurde die standardmäßig eingesetzte ATP Konzentration von 3 mmol/l unter Ermittlung des  $K_m$ -Wertes evaluiert. Abbildung 6.30 A zeigt den Kurvenverlauf der basalen, sowie der durch 5 mmol/l GSH bzw. 2,5 mmol/l GSSG stimulierten ABCC1 ATPase Aktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten ATP Konzentration. Der  $K_m$ -Wert liegt in diesem Fall bei circa 0,3 mmol/l, und die Sättigung der Kurve ist bereits unterhalb von 1 mmol/l ATP erreicht. Für den Versuch selbst sollte die verwendete ATP-Konzentration ungefähr fünfmal dem  $K_m$ -Wert entsprechen, um eine (nahezu) vollständige Sättigung zu erreichen. Im Falle der ABCC1 ATPase läge dieser Wert damit bei 1,5 mmol/l. Das bedeutet, dass im ABCC1 ATPase Assay die verwendete ATP-Konzentration von 3 mmol/l auf 1,5 mmol/l reduziert werden kann und damit Ressourcen eingespart werden können. Abbildung 6.30 B veranschaulicht das Ergebnis der  $K_m$ -Wert-Bestimmung im ABCG2 ATPase Assay. Die Sättigung erfolgt bei deutlich höheren ATP Konzentrationen, sodass der  $K_m$ -Wert von ATP bei circa 1 mmol/l liegt. Entsprechend der Faustregel, die fünffache Konzentration einzusetzen, müsste die ATP-Konzentration im ABCG2 ATPase assay 5 mmol/l betragen. Der Einsatz von mehr als 3 mmol/l ATP ruft jedoch einen ungünstigen Effekt hervor. Wie in Abbildung 6.31 A und B zu sehen ist, bewirken sowohl im ABCC1 als auch im ABCG2 ATPase Assay solch hohe ATP-Konzentrationen einen Abfall der Absorptionswerte, wodurch diese selbst unter die Absorptionswerte von Natriumorthovanadat fallen. Dies verursacht nach Datenverarbeitung negative Werte. Visuell wurde beobachtet, dass die Lösung in den entsprechenden Wells der Mikrotiterplatte trüb wurde, was den beobachteten Effekt begründet. Leider konnte nicht geklärt werden, warum genau dieser Effekt eingetreten ist und ob tatsächlich diese ATP-Konzentrationen zu einer Übersättigung des Assay-Mix führen. Somit bleibt nur der Schluss, die bereits standardmäßig eingesetzte ATP-Konzentration von 3 mmol/l im ABCG2 ATPase Assay beizubehalten.



**Abbildung 6.30:** Bestimmung des  $K_m$ -Wertes von eingesetztem ATP bei (A) ABCC1 und (B) ABCG2. Gezeigt ist die basale (gefüllte Kreise), sowie die durch (A) GSSG (gefüllte Quadrate) und GSH (gefüllte Dreiecke) bzw. (B) Quercetin stimulierte (gefüllte Quadrate) und durch Ko143 inhibierte (gefüllte Dreiecke) ATPase Aktivität. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt in Duplikaten.



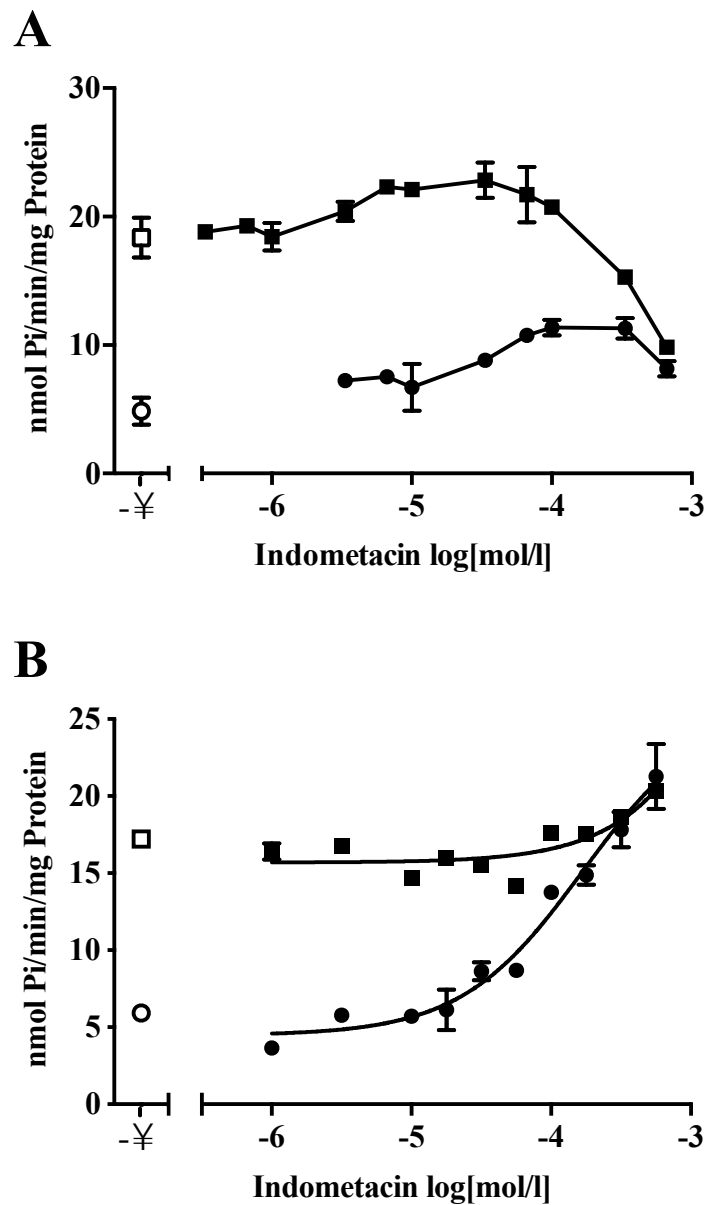
**Abbildung 6.31:** Nachteiliger Effekt zu hoher ATP-Konzentrationen bei (A) ABCC1 und (B) ABCG2. Gezeigt ist die basale (gefüllte Kreise), sowie die durch GSSG (A) bzw. Quercetin (B) stimulierte ATPase Aktivität (gefüllte Quadrate). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt in Duplikaten.



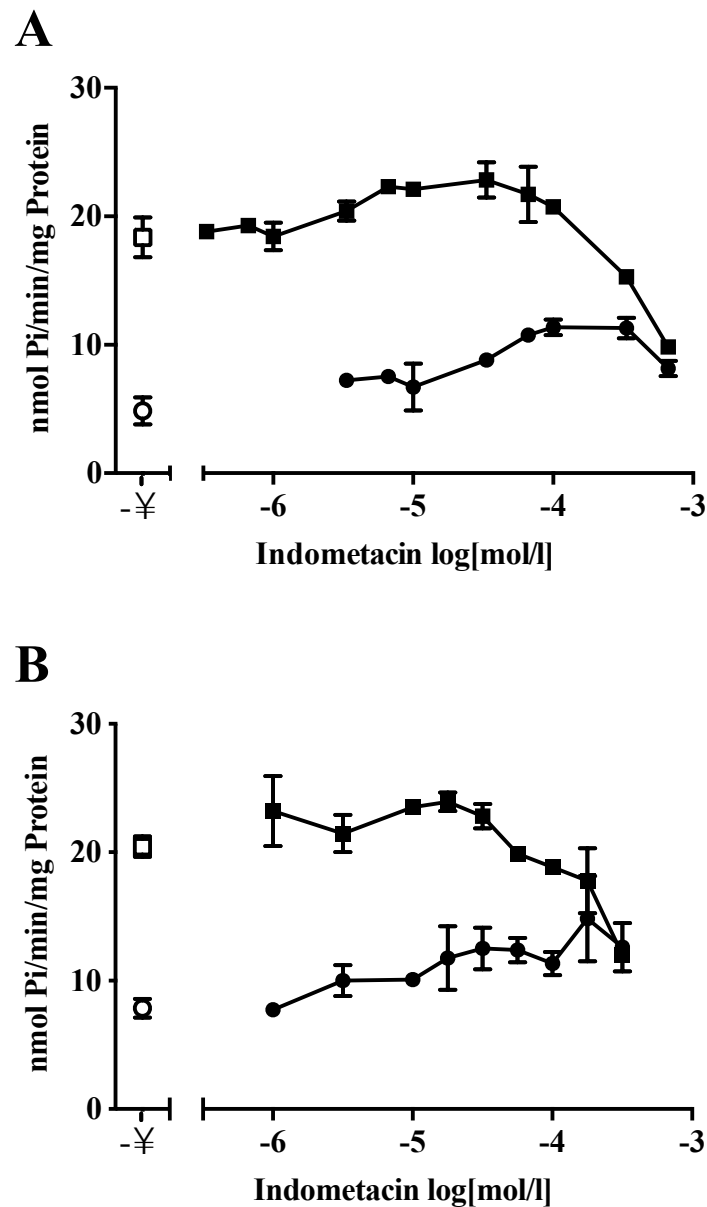
### **6.2.3. Bestätigung durch Vergleich mit bereits vorhandenen Ergebnissen**

Zum Abschluss sollen die Ergebnisse bereits untersuchter Modulatoren von ABCC1 und ABCG2 mit den Ergebnissen, die mit der neuen Detektionsmethode erhalten wurden, verglichen werden.

Im Fall des Transportproteins ABCC1 wurde eine Konzentrations-Effektkurve von Indometacin allein und in Kombination mit GSSG (2,5 mmol/l) aufgenommen. Wie in den Abbildungen 6.32 A und B dargestellt, sind die Ergebnisse zunächst widersprüchlich, da beide Kurven zunächst auf unerklärliche Weise ansteigen. Die Vermessung der Standards (basale bzw. GSSG- (2,5 mmol/l) stimulierte Aktivität) funktionieren hierbei einwandfrei. Um eine mögliche Assayinkompatibilität auszuschließen, wurde die Platte erneut vermessen, mit dem Unterschied, dass die Verdünnungsreihen von Indometacin alleine sowie Indometacin in Kombination mit 2,5 mmol/l GSSG jeweils mit und ohne Zugabe von 100 mmol/l Natriumorthovanadat vermessen wurden. Nach Subtraktion der Werte, welche mit den Vanadat-enthaltenen Verdünnungsreihen erhalten wurden, können neue Kurvenverläufe in Abbildungen 6.33 A und B dargestellt werden, welche einen Vergleich der Detektionsmethoden Ascorbinsäure und Chinaldin Rot des ABCC1 ATPase Assays zulassen.



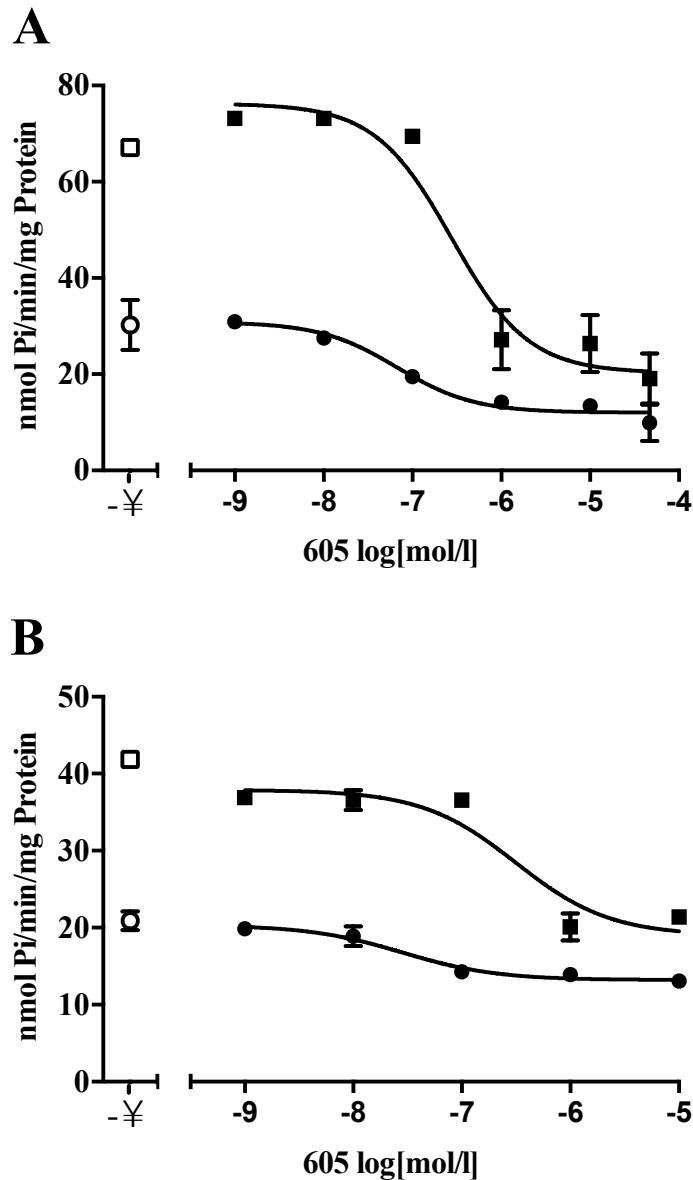
**Abbildung 6.32:** Kurvenverlauf von Indometacin allein (gefüllte Kreise) und in Kombination mit GSSG 2,5 mmol/l (gefüllte Quadrate). (A) Phosphatmenge detektiert mit Ascorbinsäure. (B) Phosphatmenge detektiert mit Chinaldin Rot. Basale (leerer Kreis), sowie durch GSSG 2,5 mmol/l (leeres Quadrat) stimulierte ABCC1 ATPase Aktivität. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt in Duplikaten.



**Abbildung 6.33:** Kurvenverlauf von Indometacin allein (gefüllte Kreise) und in Kombination mit GSSG 2,5 mmol/l (gefüllte Quadrate) nach Subtraktion der Werte, welche durch die Vermessung der Verdünnungsreihen mit Vanadat erhalten wurden. (A) Phosphatmenge detektiert mit Ascorbinsäure. (B) Phosphatmenge detektiert mit Chinaldin Rot. Basale (leerer Kreis), sowie durch GSSG 2,5 mmol/l (leeres Quadrat) stimulierte ABCG1 ATPase Aktivität. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt in Duplikaten.

Auch ausgewählte Modulatoren des Transportproteins ABCG2 wurden zum Vergleich der Detektionsmethoden Ascorbinsäure und Chinaldin Rot erneut getestet. Die Messwerte der basalen, wie auch der Quercetin-stimulierten oder Ko143-inhibierten ABCG2 ATPase Aktivität sind mit den in Abbildungen 6.18 A bis D dargestellten Messungen vergleichbar. In den Abbildungen 6.33 A und B ist exemplarisch die Verbindung 605 veranschaulicht,

einmal mit Bestimmung durch Ascorbinsäure (6.33 A) und einmal mit Phosphatbestimmung durch Chinaldin Rot (6.33 B). Beide Darstellungen weisen ähnliche  $EC_{50}$ -Werte der Verbindung 605 auf und sind ohne weiteres vergleichbar.



**Abbildung 6.34:** Kurvenverlauf von Substanz 605 allein (gefüllte Kreise) und in Kombination mit Quercetin 1  $\mu\text{mol/l}$  (gefüllte Quadrate). (A) Phosphatmenge detektiert mit Ascorbinsäure. (B) Phosphatmenge detektiert mit Chinaldin Rot. Basale (leerer Kreis), sowie durch Quercetin 1  $\mu\text{mol/l}$  (leeres Quadrat) stimulierte ABCG2 ATPase Aktivität. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt in Duplikaten.

Damit wurde der Beweis zur Anwendbarkeit der Phosphatdetektion mit Chinaldin Rot im Natriumorthovanadat-sensitiven ATPase Assay sowohl unter Anwendung einer Membranpräparation mit dem Transportprotein ABCC1 als auch ABCG2 erbracht.

# 7. ● Zusammenfassung

Die Überexpression von ABC-Transportproteinen führt zu einer Resistenz gegenüber einem großen Spektrum zytotoxischer Substanzen. ABCB1, ABCC1 und ABCG2 sind die wichtigsten Vertreter, die in hohem Maße zur reduzierten Arzneimittelretention in verschiedenen malignen Tumoren beitragen und damit in der sogenannten Multidrug Resistenz involviert sind. Diese membranständigen Effluxpumpen nutzen die durch ATP-Hydrolyse freiwerdende Energie um Substanzen entgegen des Konzentrationsgradienten aus der Zelle zu transportieren. Das Versagen vieler Chemotherapien ist die Folge und damit ein wichtiger Fokus in der Krebsforschung.

In dieser Arbeit wurden in verschiedenen Projekten mit unterschiedlichen Messmethoden die Interaktionen von bekannten und neuen Modulatoren mit den ABC-Transportproteinen ABCB1, ABCC1 und ABCG2 charakterisiert.

Im ersten Projekt wurde die Substanzklasse der Purine, Pyrrolo- und Indolopyrimidine näher untersucht. Die Hemmwirkung der Derivate gegenüber ABCC1 und der Einfluss der Substituenten in Position 4, 5 und 6, insbesondere im Hinblick ihrer Größe und Länge wurde unter Verwendung des neu etablierten Daunorubicin Akkumulationsassays bestimmt. Der Vergleich zeigte, dass lange Phenylalkylketten in Position 4 gegenüber den kürzeren bevorzugt wurden und die Vergrößerung der aliphatischen Seitekette in Position

5 ebenfalls zu einer Aktivitätssteigerung führte. Bei der Untersuchung der Selektivität wurde die Inhibition von ABCB1 und ABCG2 in überexprimierenden Zellen durch die Verbindungen mit den Substraten Calcein AM bzw. Pheophorbid A vermessen. Insbesondere Pyrrolopyrimidine mit geringem Molekulargewicht stellten sich als gute ABCG2 und ABCC1 Dualinhibitoren heraus. Bis auf wenige Ausnahme wurde die Zellvitalität durch die getesteten Verbindungen nicht beeinflusst. Auch konnten ausgewählte Verbindungen die Resistenz von H69 AR Zellen gegenüber Daunorubicin aufheben und dadurch die Ergebnisse aus dem Daunorubicin Akkumulationsassay verifizieren.

Bei den untersuchten Purinen und Pyrrolopyrimidinen bewirkten Derivate mit kleinem Molekulargewicht stimulierende Effekte auf den Transport des ABCC1-Substrates Daunorubicin. Dabei fand die Steigerung der Transportgeschwindigkeit bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich der Verbindungen statt. Auch Vitalitäts-Assays unterstützten die gefundenen Ergebnisse, da die Vitalität der untersuchten Zellen zunahm. Auch wenn bei diesem Effekt zunächst nicht die Bekämpfung der Multidrug Resistenz im Vordergrund steht, so ist dieser Beitrag zur Aufklärung des Transportmechanismus der ABC-Proteine von hoher Bedeutung.

Die selektive Inhibition eines der untersuchten ABC-Transportproteine steht zumeist an erster Stelle und die Literatur bietet nur wenige Studien zu Breitspektruminhibitoren. Innerhalb der Substanzklasse der Pyrrolo- und Indolopyrimidine, die bekannte ABCC1 Inhibitoren hervorbrachten, wurden Derivate gefunden, die sich sowohl als gute Dualinhibitoren von ABCB1/ABCC1 bzw. ABCG2/ABCC1 als auch hochpotente und effiziente Dreifachinhibitoren im einstelligen mikromolaren Konzentrationsbereich herausstellten. Die Effizienz, des potentesten Vertreters, die Multidrug Resistenz zu überwinden, wurde von ABCC1 und ABCG2 vollständig und von ABCB1 partiell, bereits bei submikromolaren Konzentrationen, gezeigt. Die nicht-kompetitive Inhibition für ABCB1, ABCC1 und ABCG2 und die Tatsache, dass der untersuchte Vertreter mindestens 9-mal potenter als toxisch war, macht das synthetisierte Pyrrolopyrimidin-Derivat zu einem guten Kandidaten für *in vivo* Studien.

Im zweiten Projekt wurden zwei bekannte und bereits erfolgreiche Substanzklassen der ABCG2 Inhibitoren zu heterodimeren Verbindungen der Chinazolin-Chalkone detailliert analysiert. Dabei stellte sich die Verknüpfung als ein Vorteil heraus. Die beste Verbindung zeigte im Vergleich zu den Einzelverbindungen ein etwa 25-fach höheres

Inhibitions Potenzial gegenüber ABCG2. Bei der Untersuchung ihres Einflusses auf die ATPase Aktivität zeigten die Chinazolin-Chalkone stimulierende Effekte. Die mögliche Hypothese des Eigentransports der Verbindungen wurde daraufhin mit Fluoreszenzspektrometrie und Laser-Scanning-Mikroskopie widerlegt. Weiterhin wiesen die untersuchten Derivate eine geringe Toxizität auf und waren überdies in der Lage die Multidrug Resistenz zu überwinden.

Die Erweiterung des Substitutionsmusters im Hinblick auf bereits bekannte effiziente Substituenten der Chinazoline sowie der Chalkone führte zur Erkenntnis neuer Struktur-Wirkungsbeziehungen. Die Derivate der im ersten Teilprojekt synthetisierten Verbindungen mit Methoxysubstitutionen stellten dennoch die potentesten Inhibitoren in der Reihe der Chinazolin-Chalkone dar.

Das dritte Projekt konzentrierte sich auf die Untersuchung der stimulierenden und inhibierenden Effekte auf die ABCC1 und ABCG2 ATPasen. Zunächst wurde der Einfluss intrinsischer ABCC1 Substrate, insbesondere oxidiertem Glutathion (GSSG), auf die Stimulation der ABCC1 ATPase durch Modulatoren bestimmt. Der synergistische Effekt konnte mit einer Vielzahl bekannter und im Arbeitskreis neu synthetisierter Verbindungen belegt werden. Die Untersuchung des Interaktionstyps in Bezug auf die Inhibition der ATPase durch GSSG und Pranlukast sowie die Stimulation der ATPase durch GSSG und einem Pyrrolopyrimidin-Derivat erwies sich als kompetitiv. Im Fall der stimulierenden Pyrrolopyrimidin-Verbindung kann die Interaktion als nicht-essentielle Aktivierung beschrieben werden. Der allosterische Mechanismus setzt voraus, dass GSSG vermutlich an die gleiche Bindungsstelle wie GSH bindet und die Affinität von Pranlukast bzw. dem Pyrrolopyrimidin-Derivat erhöht.

Desweiteren wurde der Effekt von im Arbeitskreis synthetisierten Derivaten der Tetrahydro- $\beta$ -carboline und der Acryloylphenylcarboxylate auf die ABCG2 ATPase untersucht. Im Fall der Tetrahydro- $\beta$ -carboline wurde der inhibierende Effekt auf die basale sowie die Quercetin-stimulierte ATPase-Aktivität bestimmt und der Verschiebungsfaktor im Vergleich zu Ko143 berechnet. Der konstante Faktor ließ auf eine kompetitive Interaktion der untersuchten Verbindungen mit Quercetin schließen.

Die aktivierenden Effekte auf die ABCG2 ATPase durch Acryloylphenylcarboxylate wurden durch die Anzahl und Position der Methoxygruppen im Substitutionsmuster bestimmt. So stimulierten z. B. 3,5-Dimethoxygruppen im Vergleich zu 3,4-

Dimethoxygruppen nicht nur stärker, sondern auch über den Standardaktivator Quercetin hinaus.

Nach Aneignung und erfolgreicher Etablierung wurde der Natriumorthovanadat sensitive ATPase Assay im Arbeitskreis erfolgreich angewandt. Die begrenzte Probenanzahl und der intensive Zeitaufwand beim Bearbeiten führte zu einer Umstellung auf eine 96er Mikrotiterplatte. Im gleichen Zug wurden weitere Detektionsmittel von anorganischem Phosphat evaluiert und in Bezug auf ihre Sensitivität und der praktischen Umsetzung verglichen. Hierbei stellte sich Chinaldin Rot als das Reagenz der Wahl heraus. Die anschließende Etablierung der Phosphatdetektion mit Chinaldin Rot wurde erfolgreich mit ABCC1 und ABCG2 enthaltenen Membranpräparationen durchgeführt und verifiziert.



## Literaturverzeichnis

1. Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Menzel, S.; Ruth, P. *Mutschler Arzneimittelwirkungen*, 10th ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, 2013.
2. Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J. Clin.* **2015**, *65*, 5-29.
3. Lüllmann, H.; Mohr, K.; Hein, L. *Pharmakologie und Toxikologie. Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen*, 18th ed.; Theime Verlag, 2016.
4. Bellamy, W. T.; Dalton, W. S.; Dorr, R. T. The clinical Relevance of multidrug resistance. *Cancer Invest.* **1990**, *8*, 547-562.
5. Biedler, J. L.; Riehm, H. Cellular resistance to actinomycin D in chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res.* **1970**, *30*, 1174-1184.
6. Krishna, R.; Mayer, L. D. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, *11*, 265-283.
7. Szakacz, G.; Paterson, J. K.; Ludwig, J. A.; Booth-Genthe, C.; Gottesman, M. M. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 219-234.
8. Gottesman, M. M.; Fojo, T.; Bates, S. E. Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 48-58.
9. Holohan, C.; Van Schaeybroeck, S.; Longley, D. B.; Johnston, P. G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 714-726.
10. Adamska, A.; Falasca, M. ATP-binding cassette transporters in progression and clinical outcome of pancreatic cancer: What is the way forward? *World. J. Gastroenterol.* **2018**, *24*, 3222-3238.
11. Allikmets, R.; Gerrard, B.; Hutchinson, A.; Dean, M. Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database. *Hum. Mol. Genet.* **1996**, *5*, 1649-1655.
12. Gottesman, M. M.; Pastan, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 385-427.
13. Linton, K. J. Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda)* **2007**, *22*, 122-130.
14. Seeger, M. A.; van Veen, H. W. Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1794*, 725-737.
15. Zolnerciks, J. K.; Akkaya, B. G.; Snippe, M.; Chiba, P.; Seelig, A.; Linton, K. J. The Q loop of the human multidrug resistance transporter ABCB1 are necessary to couple drug binding to the ATP catalytic cycle. *FASEB J.* **2014**, *28*, 4335-4346.
16. Dean, M.; Rzhetsky, A.; Allikmets, R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Genome Res.* **2001**, *11*, 1156-1166.
17. Dassa, E. Phylogenetic and Functional Classification of ABC (ATP-binding Cassette) Systems. In *In ABC Proteins: From Bacteria to Man*, 1st ed.; Academic Press: San Diego, California, 2003; pp 3-35.
18. George, A. M. *ABC Transporters - 40 Years on.*; Springer, 2016.
19. Annilo, T.; Chen, Z.; Shulenin, S.; Costatino, J.; Thomas, H. L.; Stefanov, S.; Dean, M. Evolution of the vertebrate ABC gene family. *Genomics* **2006**, *88*, 1-11.

20. Choi, C. H. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int.* **2005**, *5*, 30-43.
21. 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.
22. Russel, F. G. M.; Masereeuw, R.; van Aubel, R. A. M. H. Molecular aspects of renal anionic drug transport. *Annu. Rev. Physiol.* **2002**, *64*, 563-594.
23. Fromm, M. F. Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans. *Eur. J. Clin. Invest.* **2003**, *33*, 6-9.
24. Ling, V.; Thompson, L. Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. *J. Cell. Physiol.* **1974**, *83*, 103-116.
25. Juliano, R. L.; Ling, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. biophys. Acta* **1976**, *455*, 152-162.
26. Beck, W. T.; Müller, T. J.; Tanzer, L. R. Altered surface membrane glycoproteins in vinca alkaloid resistant human leukemic lymphoblasts. *Cancer Res.* **1979**, *39*, 2070-2076.
27. Ling, V. Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1997**, *40*, 3-8.
28. Ambudkar, S. V.; Dey, S.; Hrycyna, C. A.; Ramachandra, M.; Pastan, I.; Gottesman, M. M. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 48-58.
29. 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.
30. 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.
31. Sarkadi, B.; Homolya, L.; Szakács, G.; Váradi, A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoprotection defense system. *Phys. Rev.* **2006**, *86*, 1179-1236.
32. Eckford, P. D.; Sharom, F. J. ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2089-3011.
33. 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*, 205-217.
34. Schinkel, A. H. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin. Cancer Biol.* **1997**, *17*, 2287-2289.
35. Gripar, 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.
36. Stenham, D. R.; Campbell, J. D.; Sansom, M. S. P.; Higgins, C. F.; Kerr, I. D.; Linton, K. J. An atomic detail model for the human ATP binding cassette transporter P-glycoprotein derived from disulfide cross-linking and homology modeling. *FASEB J.* **2003**, *17*, 2287-2289.
37. O'Mara, M. L.; Tieleman, D. P. P-glycoprotein models of the apo and ATP-bound states based on homology with Sav1866 and MalK. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 4217-4222.
38. 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.
39. Becker, J.-P.; Depret, G.; Van Bambeke, F.; Tulkens, P. M.; Prévost, M. Molecular models of human P-glycoprotein in two different catalytic states. *BMC Struct. Biol.* **2009**, *9*, 3.
40. 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*, 1718-1722.
41. 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 ABCG? *FEBS J.* **2008**, *275*, 4354-4362.
42. 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.
43. Higgins, C. F.; Linton, K. J. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 918-926.

44. Loo, T. W.; Clarke, D. M. Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux. *J. Membr. Biol.* **2005**, *173*, 203-214.
45. 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**, *339*, 351-359.
46. 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*, 537-545.
47. 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.
48. 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.
49. Crowley, E.; Callaghan, R. Multidrug efflux pumps: drug binding-gates or cavity? *FEBS J.* **2010**, *277*, 530-539.
50. Higgins, C. F. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* **2007**, *446*, 749-757.
51. 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.
52. 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.
53. 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*, 13603-13606.
54. Shapiro, A. B.; Ling, V. Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *250*, 130-137.
55. 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*, 841-850.
56. 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*, 841-850.
57. 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*, 624-632.
58. Safa, A. R. Identification and characterization of the binding sites of P-glycoprotein for the multidrug resistance-related drugs and modulators. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2004**, *4*, 1-17.
59. Werle, M.; Takeuchi, H.; Bernkop-Schnürch, A. New generation efflux pump inhibitors. *Exp. Rev. Clin. Pharmacol.* **2008**, *1*, 429-440.
60. Palmeira, A.; Sousa, E.; Vasconcelos, M. H.; Pinto, M. M. Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 1946-2025.
61. Wang, R. B.; Kuo, C. L.; Lien, L. L.; Lien, E. L. Structure-activity relationship: analyses of p-glycoprotein substrates and inhibitors. *J. Clin. Pharm. Ther.* **2003**, *28*, 203-228.
62. Sharom, F. J. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays. Biochem.* **2011**, *50*, 161-178.
63. Tsuruo, T.; Iida, H.; Tsukagoshi, S.; Sakurai, Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.* **1981**, *41*, 1967-1972.
64. 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*, 205-223.
65. Sharom, F. J. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* **2008**, *9*, 105-127.
66. Dalton, W. S.; Grogan, T. M.; Meltzer, P. S.; Scheper, R. J.; Durie, B. G.; Taylor, C. W.; Miller, T. P.; Salmon, S. E. Drug-resistance in multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma: detection of P-

- glycoprotein and potential circumvention by addition of verapamil to chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* **1989**, *7*, 415-424.
67. Ozols, R. F.; Cunnion, R. E.; Klecker, R. W. J.; Hamilton, T. C.; Ostchega, Y.; Parrillo, J. E.; Young, R. C. Verapamil and adriamycin in the treatment of drug-resistant ovarian cancer patients. *J. Clin. Oncol.* **1987**, *5*, 641-647.
  68. Ozols, R. F. Pharmacologic reversal of drug resistance in ovarian cancer. *Semin. Oncol.* **1985**, *12*, 7-11.
  69. Krishna, R.; Mayer, L. D. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, *11*, 265-283.
  70. 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*, 403-411.
  71. Hyafil, F.; Vergely, C.; Du, V. P.; Grand-Perret, T. In vitro and in vivo reversal of multidrug resistance by GF120918, an acridonecarboxamide derivative. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 4595-4602.
  72. Nogushi, K.; Kawahara, H.; Kaji, A.; Katayama, K.; Mitsuhashi, J.; Sugimoto, Y. Substrate-dependent bidirectional modulation of P-glycoprotein-mediated drug resistance by erlotinib. *Cancer Sci.* **2009**, *9*, 1701-1707.
  73. Wang, E. J.; Barecki-Roach, M.; Johnson, W. W. Evaluation of P-glycoprotein function by a catechin in green tea. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **2002**, *297*, 412-418.
  74. 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.* **2001**, *98*, 14078-14083.
  75. Sterz, K.; Möllmann, L.; Jacobs, A.; Baumert, D.; Wiese, M. Activators of P-glycoprotein: structure-activity relationships and investigation of their mode of action. *Chem. Med. Chem.* **2009**, *11*, 1897-1911.
  76. Phang, J. M.; Poore, C. M.; Lopacxnska, J.; Yeh, G. C. Flavonol-stimulated efflux of 7,14-dimethylbenz(a)anthracene in multidrug-resistant breast cancer cells. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 5977-5981.
  77. Critchfield, J. W.; Welsh, C. J.; Phang, J. M.; Yeh, G. C. Modulation of adriamycin accumulation and efflux by flavonoids in HTC-15 colon cells. Activation of P-glycoprotein as putative mechanism. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 1437-1445.
  78. Shapiro, A. B.; Ling, V. Effect of quercetin on Hoechst 33342 transport by purified and reconstituted P-glycoprotein. *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *53*, 587-596.
  79. Jodoin, J.; Demeule, M.; Beliveau, R. Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein by green tea polyphenols. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1542*, 149-159.
  80. Cole, S.; Bhardwaj, G.; Gerlach, J.; Mackie, J.; Grant, C.; Almquist, K.; Stewart, A.; Kurz, E.; Duncan, A.; Deeley, R. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **1992**, *258*, 1650-1654.
  81. Chang, X. B. A molecular understanding of ATP-dependent solute transport by multidrug resistance-associated protein MRP1. *Cancer Metastasis Rev.* **2007**, *26*, 15-37.
  82. Haimeur, A.; Conseil, G.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr. Drug Metab.* **2004**, *5*, 21-53.
  83. Boumendjel, C.; Baubichon-Cortay, H.; Trompier, D.; Perrotton, T.; di Pietro, A. Anticancer multidrug resistance mediated by MRP1: recent advances in the discovery of reversal agents. *Med. Res. Rev.* **2005**, *25*, 453-472.
  84. Flens, M.; Zaman, G.; Van der Valk, P.; Izquierdo, M.; Schroeijers, A.; Scheffer, G.; Van Der Groep, P.; De Haas, M.; Meijer, C.; Scheper, R. Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *Am. J. Pathol.* **1996**, *148*, 1237-1247.
  85. Kunicka, T.; Soucek, P. Importance of ABCC1 for cancer therapy and prognosis. *Drug. Metab. Rev.* **2014**, *46*, 325-342.
  86. Roundhill, E. A.; Burchill, S. A. Detection and characterization of multi-drug resistance protein 1 (MRP-1) in human mitochondria. *Br. J. Cancer* **2012**, *106*, 1224-1233.
  87. Rajagopal, A.; Simon, S. M. Subcellular localization and activity of multidrug resistance proteins. *Mol. Biol. Cell.* **2003**, *14*, 3389-3399.

88. Young, L. C.; Campling, B. G.; Voskoglou-Nomikos, T.; Cole, S. P. C.; Deeley, R. G.; Gerlach, J. H. Expression of multidrug resistance protein-related genes in lung cancer: Correlation with drug response. *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 673-680.
89. Young, L. C.; Campling, B. G.; Cole, S. P. C.; Deeley, R. G.; Gerlach, J. H. Multidrug resistance proteins MRP3, MRP1, and MRP2 in lung cancer: Correlation of protein levels with drug response and messenger RNA levels. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 1798-1804.
90. Cole, S. P. C. Targeting multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1): Past, and future. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2014**, *54*, 95-117.
91. Nooter, K.; Westerman, A. M.; Flens, M. J.; Zaman, G. J. R.; Scheper, R. J.; van Wingerden, K. E.; Burger, H.; Oostrum, R.; Boersma, T.; Sonnenveld, P.; Gratama, J. W.; Kok, T.; Eggermont, A. M. M.; Bosman, F. T.; Stoter, G. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in human cancers. *Clin. Cancer Res.* **1995**, *1*, 1301-1310.
92. Kruh, G. D.; Gaughan, K. T.; Godwin, A.; Chan, A. Expression pattern of MRP in human tissues and adult solid tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **1995**, *87*, 1256-1260.
93. Lu, J. F.; Pokharel, D.; Bebawy, M. MRP1 and its role in anticancer drug resistance. *Drug Metab. Rev.* **2015**, *47*, 406-419.
94. Westlake, C. J.; Cole, S. P. C.; Deeley, R. G. Role of the NH<sub>2</sub>-terminal membrane spanning domain of multidrug resistance protein1/ABCC1 in protein processing and trafficking. *Mol. Biol. Cell.* **2005**, *16*, 2483-2492.
95. Yang, Y.; Mo, W.; Zhang, J. T. Role of transmembrane segment 5 and extracellular loop 3 in the homodimerization of human ABCC1. *Biochemistry* **2010**, *49*, 10854-10861.
96. Information, N. C. f. B. Pubchem BioAssay Database, AID = 799, 2007. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/799> (accessed June 04, 2019).
97. Gao, M.; Yamazaki, M.; Loe, D. W.; Westlake, C. J.; Grant, C. E. G.; Cole, S. P. C.; Deeley, R. G. Multidrug resistance protein. Identification of regions required for active transport of leukotriene C<sub>4</sub>. *J. Biol. Chem.* **1998**, *17*, 10733-10740.
98. Conseil, G.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. C. Role of two adjacent cytoplasmic tyrosine residues in MRP1 (ABCC1) transport activity and sensitivity to sulfonylureas. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *69*, 451-461.
99. Trompler, D.; Chang, X. B.; Barattin, R.; Du Moulinet d'Hardemare, A.; Di Pietro, A.; Baubichon-Cortay, H. Verapamil and its derivative trigger apoptosis through glutathione extrusion by multidrug resistance protein MRP1. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 4950-4956.
100. Loe, D. W.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. C. Characterization of vincristine transport by the Mr 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 5130-5136.
101. Loe, D. W.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. C. Verapamil stimulates glutathione transport by the 190-kDa Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1). *J. Pharm. Exp. Ther.* **2000**, *293*, 530-538.
102. Heijn, M.; Hooijberg, J. H.; Scheffer, G. L.; Szabo, G.; Westerhoff, H. V.; Lankelma, J. Anthracyclines modulate multidrug resistance protein (MRP1) mediated organic anion transport. *biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1326*, 12-22.
103. Cole, S. P. C.; Deeley, R. G. Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, *27*, 438-446.
104. Mirski, S. E.; Gerlach, J. H.; Cole, S. P. Multidrug resistance in a human small cell lung cancer cell line selected in adriamycin. *Cancer Res.* **1987**, *47*, 2594-2598.
105. Bakos, E.; Homolya, L. Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP/ABCC1). *Pflugers Arch.* **2007**, *453*, 621-641.
106. Zhou, S. F.; Wang, L. L.; Di, Y. M.; Xue, C. C.; Duan, W.; Li, C. G.; Li, Y. Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 1981-2039.
107. Cole, S. P. C.; Downes, H. F.; Slovak, M. L. Effect of calcium antagonists on the chemosensitivity of two multidrug resistant human tumor cell lines which do not overexpress P-glycoprotein. *Br. J. Cancer* **1989**, *59*, 42-46.
108. Twentyman, P. R.; Fox, N. E.; White, D. J. G. Cyclosporin A and its analogues as modifiers of Adriamycin and vincristine resistance in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Br. J. Cancer* **1987**, *56*, 55-57.

109. Narasaki, F.; Oka, M.; Fukuda, M.; Nakano, R.; Ikeda, K.; Takatani, H.; Terashi, K.; Soda, H.; Yano, O.; Nakamura, T.; Doyle, L. A.; Tsuruo, T.; Kohno, S. A novel quinolone derivative, MS-209, overcomes drug resistance of human lung cancer cells expressing the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1997**, *40*, 425-432.
110. Minderman, H.; O'Loughlin, K. L.; Pendyala, L.; Baer, M. R. VX-710 (biricodar) increases drug retention and enhances chemosensitivity in resistant cells overexpressing P-glycoprotein, multidrug resistance protein, and breast cancer resistance protein. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 1826-1834.
111. Gollapudi, S.; Kim, C. H.; Tran, B.-N.; Sangha, S.; Gupta, S. Probenid reverses multidrug resistance in multidrug resistance-associated protein-overexpressing HL60/Tax and P388/ADR cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1997**, *40*, 150-158.
112. 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.
113. Benyahia, B.; Huguet S.; Declèves, X.; Mokhtari, K.; Crinière, E.; Bernaudin, J. F.; Scherrmn, J. M.; Delattre, Y. F. Multidrug resistance-associated protein MRP1 expression in human gliomas: chemosensitization to vincristine and etoposide by indomethacin in human glioma cell lines overexpressing MRP1. *J. Neuro-Oncol.* **2004**, *66*, 65-70.
114. Barrant, M. A.; Rhodes, T.; Center, M. S.; Twentyman, P. R. Chemosensitisation and Drug Accumulation Effects of Cyclosporin A, PSC-833 and Verapamil in Human MDR Large Cell Lung Cancer Cells Expressing a 190k Membrane Protein Distinct from P-glycoprotein. *Eur. J. Cancer* **1993**, *29A*, 408-415.
115. Aoki, S.; Yoshioka, Y.; Miyamoto, Y.; Higuchi, K.; Setiawan, A.; Murakami, N.; Chen, Z.-S.; Sumizawa, T.; Akiyama, S.-I.; Kobayashi, M. Agosterol A, a novel polyhydroxylated sterol acetate reversing multidrug resistance from a Marine sponge of *Sponge* sp.. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6303-6306.
116. Chen, Z.-S.; Aoki, S.; Komatsu, M.; Ueda, K.; Sumizawa, T.; Furukawa, T.; Okumura, H.; Ren, X.-Q.; Belinsky, M. G.; Lee, K.; Kruh, G. D.; Kobayashi, M.; Akiyama, S.-I. Reversal of drug resistance mediated by multidrug resistance protein (MRP1) 1 by dual effects of agosterol A on MRP1 function. *Int. J. Cancer* **2001**, *93*, 107-113.
117. Versantvoort, C. H. M.; Schuurhuis, G. J.; Pinedo, H. M.; Eekman, C. A.; Kuiper, C. M.; Lankelma, J.; Broxterman, H. J. Genistein modulates the decreased drug accumulation in non-P-glycoprotein mediated multidrug resistant tumour cells. *Br. J. Cancer* **1993**, *68*, 939-946.
118. Versantvoort, C. H. M.; Broxterman, H. J.; Lankelma, J.; Feller, N.; Pinedo, H. M. Competitive inhibition by genistein and ATP dependence of daunorubicin transport in intact MRP overexpressing human small cell lung cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 1129-1136.
119. Wang, S.; Folkes, A.; Chuckoree, I.; Cockcroft, X.; Sohal, S.; Miller, W.; Milton, J.; Wren, S. P.; Vicker, N.; Depledge, P.; Scott, J.; Smith, L.; Jones, H.; Mistry, P.; Faint, R.; Thompson, D.; Cocks, S. Studies on pyrrolopyrimidines as selective inhibitors of multidrug-resistance-associated protein in multidrug resistance. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1329-1338.
120. Wang, S.; Wan, N. C.; Harrison, J.; Miller, W.; Chuckowree, I.; Sohal, S.; Hancox, T. C.; Baker, S.; Folkes, A.; Wilson, F.; Thompson, D.; Cocks, S.; Farmer, H.; Boyce, A.; Freathy, C.; Broadbridge, J.; Scott, J.; Depledge, P.; Faint, R.; Mistry, P.; Charl. Design and synthesis of new templates derived from pyrrolopyrimidine as selective multidrug-resistance-associated protein inhibitors in multidrug resistance. *J. Med. Chem* **2004**, *47*, 1339-1350.
121. Stefan, S. M.; Wiese, M. Small-molecule inhibitors of multidrug resistance-associated protein 1 and related processes: A historic approach and recent advances. *Med. Res. Rev.* **2019**, *39*, 176-264.
122. Pahnke, J.; Wolkenhauer, O.; Krohn, M.; Walker, L. C. Clinico-pathologic function of cerebral ABC transporters - implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **2008**, *5*, 396-405.
123. Krohn, M.; Lange, C.; Hofrichter, ; Scheffler, K.; Steffen, J.; Schumacher, T.; Brüning, T.; Plath, A. S.; Alfen, F.; Schmidt, A.; Winter, F.; Rateitschak, K.; Wree, A.; Gsponer, J.; Walker, L. C.; Pahnke, J. Cerebral amyloid-beta proteostasis is regulated by the membrane transport protein ABCB1 in mice. *J. Clin. Invest.* **2011**, *121*, 3924-3931.
124. Barnouin, K.; Leier, I.; Jedlitschky, G.; Portier-Manzanedo, A.; König, J.; Lehmann, W.-D.; Keppler, D. Multidrug resistance protein-mediated transport of chlorambucil and melphalan conjugated to glutathione. *Br. J. Cancer* **1998**, *77*, 201-209.

125. Rappa, G.; Lorico, A.; Flavell, R. A.; Sartorelli, A. C. Evidence that multidrug resistance protein (MRP) functions as a co-transporter of glutathione and natural product toxins. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 5232-5237.
126. Loo, W. T.; Clarke, D. M. Defining the drug-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein using a methanethiosulfonate analog of verapamil, MTS-verapamil. *J. Biol. Chem.* **2001**, *18*, 14972-14979.
127. Cullen, K. V.; Davey, R. A.; Davey, M. W. Verapamil-stimulated glutathione transport by the multidrug resistance-associated protein (MRP1) in leukemia cells. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *62*, 417-424.
128. Perrotton, T.; Trompier, D.; Chang, X.-B.; Die PiertoqA.; Baubichon-Cortay, H. (R)-and (S)-verapamil differentially modulate the multidrug-resistant protein MRP1. *J. Biol. Chem.* **2007**, *43*, 31542-31548.
129. Loe, D. W.; Oleschuk, C.-J.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. C. Structure-activity studies of verapamil analogs that modulate transport of leukotriene C4 and reduced glutathione by multidrug resistance protein MRP1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *275*, 795-803.
130. Brandmann, M.; Tulpule, K.; Schmidt, M. M.; Dringen, R. The antiretroviral protease inhibitors indinavir and nelfinavir stimulate MRP1-mediated GSH export from cultured brain astrocytes. *J. Neurochem.* **2012**, *120*, 78-92.
131. Lorendeau, D.; Dury, I.; Genoux-Bastide, E.; Lecerf-Schmidt, F.; Simoes-Pires, C.; Carrupt, P.-A.; Terreux, R.; Magnard, S.; Di Pietro, A.; Boumendjel, A.; Baubichon-Cortay, H. Collateral sensitivity of resistant MRP1-overexpressing cells to flavonoids and derivatives through GSH efflux. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *90*, 235-245.
132. Genoux-Bastide, E.; Lorendeau, D.; Nicolle, E.; Yahiaoui, S.; Magnard, S.; Di Pietro, A.; Baubichon-Cortay, H.; Boumendjel, A. Identification of xanthenes as selective killers of cancer cells overexpressing the ABC transporter MRP1. *Chem. Med. Chem.* **2011**, *6*, 1478-1484.
133. Wesolowska, O.; Mosiadz, D.; Motohashi, N.; Kawase, M.; Michalak, K. Phenothiazine maleates stimulate MRP1 transport activity in human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1720*, 52-58.
134. Weselowska, O.; Molnar, J.; Ocsovszki, I.; Michalak, K. Differential effect of phenothazines on MRP1 and P-glycoprotein activity. *In Vivo* **2009**, *23*, 943-947.
135. Versantvoort, C. H. M.; Rhodes, T.; Twentyman, P. R. Acceleration of MRP1-associated efflux of rhodamine 123 by genistein and related compounds. *Br. J. Cancer* **1996**, *74*, 1949-1954.
136. Doyle, L.; Yang, W.; Abruzzo, L.; Krogmann, T.; Gao, Y.; Rishi, A.; Ross, D. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 15665-15670.
137. 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.
138. 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.
139. Horsey, A. J.; Cox, M. H.; Sarwat, S.; Kerr, I. D. The multidrug transporter ABCG2: still more questions than answers. *Biochem. Soc. Trans.* **2016**, *44*, 824-830.
140. Diestra, J. E.; Scheffer, G. L.; Catala, I.; Maliepaard, M.; Schellens, J. H.; Scheper, R. J.; Germa-Lluch, J. R.; Izquierdo, M. A. Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material. *J. Pathol.* **2002**, *198*, 213-219.
141. 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.
142. McDevitt, C. A.; Collins, R. F.; Conway, M.; Modok, S.; Storm, J.; Ker, I. D.; Ford, R. C.; Callaghan, R. Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2. *Structure* **2006**, *14*, 1623-1632.
143. Taylor, N. M. I.; Mnolaridis, I.; Jackson, S. M.; Kowal, J.; Stahlberg, H.; Locher, K. P. Structure of the Human Multidrug Transporter ABCG2. *Nature* **2017**, *546*, 504-509.
144. Jackson, S. M.; Manolaridis, I.; Kowal, J.; Zechner, M.; Taylor, N. M. I.; Bause, M.; Bauer, S.; Bartholomaeus, R.; Bernhardt, G.; Koenig, B.; Buschauer, A.; Stahlberg, H.; Altmann, K.-H.; Locher,

- K. P. Structural Basis of Small-Molecule Inhibition of Human Multidrug Transporter ABCG2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2018**, *25*, 333-340.
145. Khunweeraphong, N.; Stockner, T.; Kuchler, K. The structure of the human ABC Transporter ABCG2 reveals a novel mechanism for drug extrusion. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 13767.
146. Clark, R.; Kerr, I. D.; Callaghan, R. Multiple drugbinding sites on the R482G isoform of the ABCG2 transporter. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *149*, 506-515.
147. Matsson, P.; Englund, G.; Ahlin, G.; Bergström, C. A. S.; Norinder, U.; Artursson, P. A global drug inhibition pattern for the human ATP-binding cassette transporter breast cancer resistance protein (ABCG2). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *323*, 19-30.
148. Takenaka, K.; Morgan, J. A.; Scheffer, G. L.; Adachi, M.; Stewart, C. F.; Sun, D.; Leggas, M.; Ejendal, K. F.; Hrycyna, C. A.; Schuetz, J. D. Substrate overlap between Mrp4 and Abcg2/Bcrp affects purine analogues drug cytotoxicity and tissue distribution. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 6965-6972.
149. Giri, N.; Agarwal, S.; Shaik, N.; Pan, G.; Chen, Y.; Elmquist, W. F. Substrate-dependent breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2)-mediated interactions: consideration of multiple binding sites in in vitro assay design. *Drug Metab. Dispos.* **2009**, *37*, 560-570.
150. Hazai, E.; Bikadi, Z. Homology modeling of breast cancer resistance protein (ABCG2). *J. Struct. Biol.* **2008**, *162*, 63-74.
151. Cervenak, J.; Andrikovics, H.; Özvegy-Laczka, C.; Tordai, A.; Nemet, K.; Varadi, A.; Sarkadi, B. The role of the human ABCG2 multidrug transporter and its variants in cancer therapy and toxicology. *Cancer Lett.* **2006**, *234*, 62-72.
152. Honjo, Y.; Hrycyna, C. A.; Yan, Q. W.; Medina-Perez, W. Y.; Robey, R. W.; van de, L. 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.
153. Robey, R. W.; Honjo, Y.; Morisaki, K.; Nedjem, T. A.; Runge, S.; Risbood, M.; Poruchynsky, M. S.; Bates, S. E. Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity. *Br. J. Cancer* **2003**, *89*, 1971-1978.
154. 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.
155. Volk, E. L.; Schneider, E. Wild-type breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is a methotrexate polyglutamate transporter. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 5538-5543.
156. Robey, R. W.; To, K. K.; Polgar, O.; Dohse, M.; Fetsch, P.; Dean, M.; Bates, S. E. ABCG2: a perspective. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 3-13.
157. Basseville, A.; Hall, M. D.; Chau, C. H.; Robey, R. W.; Gottesman, M.; Figg, W. D.; Bates, S. E. The ABCG2 multidrug transporter. In ABC transporters - 40 Years on. George, A. M. . E., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Schweiz, 2016; pp 195-226.
158. Rabindran, S.; Ross, D.; Doyle, L.; Yang, W.; Greenberger, L. Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 47-50.
159. Rabindran, S.; He, H.; Singh, M.; Brown, E.; Collins, K.; Annable, T.; Greenberger, L. Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by Fumitremorgin C. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 5850-5858.
160. Nishiyama, M.; Kuga, T. Central effects of the neurotropic mycotoxin fumitremorgin A in the rabbit (1): effects on the spinal cord. *Jpn. J. Pharmacol.* **1989**, *50*, 167-173.
161. van Loevezijn, A.; Allen, J. D.; Schinkel, A. H.; Koomena, G.-J. Inhibition of BCRP-mediated drug efflux by fumitremorgin-type indolyl diketopiperazines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 29-32.
162. Juvale, K.; Stefan, K.; Wiese, M. Synthesis and biological evaluation of flavones and benzoflavones as inhibitors of BCRP/ABCG2. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *67*, 115-126.
163. Pick, A.; Müller, H.; Mayer, R.; Haensch, B.; Pajeva, I. K.; Weigt, M.; Boenisch, H.; Müller, C. E.; Wiese, M. Structure-activity relationships of flavonoids as inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP). *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2090-2102.
164. Singh, M. S.; Juvale, K.; Wiese, M.; Lamprecht, A. Evaluation of dual P-gp-BCRP inhibitors as nanoparticle formulation. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *77*, 1-8.
165. Gallus, J.; Juvale, K.; Wiese, M. Characterization of 3-Methoxy flavones for their interaction with ABCG2 as suggested by ATPase activity. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1838*, 2929-2938.



166. Juvale, K.; Pape, V. F.; Wiese, M. Investigations of chalcones and benzochalcones as inhibitors of breast cancer resistance protein. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 346-355.
167. Juvale, K.; Gallus, J.; Wiese, M. Investigation of quianazolines as inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 7858-7873.
168. Pick, A.; Wiese, M. Tyrosine kinase inhibitors influence ABCG2 expression in EGFR-positive MDCK BCRP cells via the PI3K/Akt signaling pathway. *Chem. Med. Chem.* **2012**, *7*, 650-662.
169. Juvale, K.; Wiese, M. 4-Substituted-2-phenylquinazolines as inhibitors of BCRP. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 6766-6769.
170. Ahmed-Belkacem, A.; Pozza, A.; Macalou, S.; Perez-Victoria, J. M.; Boumendjel, A.; Di Pietro, A. Inhibitors of cancer cell multidrug resistance mediated by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Anticancer Drugs* **2006**, *17*, 239-243.
171. Krapf, M. K.; Gallus, J.; Wiese, M. Synthesis and Biological Evaluation of 4-Anilino-2-pyridylquinazolines and -pyrimidines as Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2). *J. Med. Chem.* **2017**, *139*, 587-611.
172. Krapf, M. K.; Gallus, J.; Namasivayam, V.; Wiese, M. 2,4,6-Substituted Quinazolines with Extraordinary Inhibitory Potency toward ABCG2. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 7952-7976.
173. Krapf, M. K.; Gallus, J.; Wiese, M. 4-Anilino-2-pyridylquinazolines and -pyrimidines as Highly Potent and Nontoxic Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2). *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 4474-4495.
174. Krapf, M. K.; Gallus, J.; Vahdati, S.; Wiese, M. New Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) Containing a 2,4-Disubstituted Pyridopyrimidine Scaffold. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 3389-3408.
175. Lemmen, J.; Tozakidis, I. E. P.; Galla, H. J. Pregnane X receptor upregulates ABC-transporter Abcg2 and Abcb1 at the blood-brain barrier. *Brain Res.* **2013**, *1491*, 1-13.
176. 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. *Semin. Oncol.* **1984**, *11*, 285-298.
177. DiSaia, P. J.; Sinkovics, J. G.; Rutledge, F. N.; Smith, J. P. Cell-mediated immunity to human malignant cells. A brief review and further studies with two gynecologic tumors. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1972**, *114*, 979-989.
178. Evers, R.; Kool, M.; van Deemter, L.; Janssen, H.; Calafat, J.; Oomen, L. C.; Paulusma, C. C.; Oude Elferink, R. P.; Baas, F.; Schinkel, A. H.; Borst, P. Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA. *J. Clin. Invest.* **1998**, *101*, 1310-1319.
179. Bakos, E.; Evers, R.; Szakacs, G.; Tusnady, G. E.; Welker, E.; Szabo, K.; de Haas, M.; van Deemter, L.; Borst, P.; Varadi, A.; Sarkadi, B. Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32167-32175.
180. Madin, S. H.; Darby, N. B. J. Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1958**, *98*, 574-576.
181. 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.
182. 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.
183. Soule, H. D.; Vazquez, J.; Long, A.; Albert, S.; Brennan, M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **1973**, *51*, 1409-1416.
184. 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.
185. 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.
186. Vaughn, J. L.; Goodwin, R. H.; Tompkins, G. J.; McCawley, P. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera grugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* **1977**, *13*, 213-217.

187. 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.
188. Kraege, S.; Stefan, K.; Juvale, K.; Ross, T.; Willmes, T.; Wiese, M. The combination of quinazoline and chalcone moieties leads to novel potent heterodimeric modulators of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *117*, 212-229.
189. Özvegy, C.; Litman, T.; Szakacs, G.; Nagy, Z.; Bates, S.; Varadi, A.; Sarkadi, B. Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochem. Res. Commun.* **2001**, *285*, 111-117.
190. Telbisz, A.; Müller, M.; Özvegy-Laczka, C.; Homolya, L.; Szente, L.; Varadi, A.; Sarkadi, B. Membrane cholesterol selectivity modulates the activity of the human ABCG2 multidrug transporter. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 2698-2713.
191. Sarkadi, B.; Telbisz, A. ABCG2 transporter assay. WO 2013/128217 A1, September 6, 2013.
192. Marheineke, K.; Grunewald, S.; Christie, W.; Reilander, H. Lipid composition of *Spodoptera frugiperda* (Sf9) and *Trichoplusia in* (Tn) insect cells used for baculovirus infection. *FEBS Lett.* **1998**, *441*, 49-52.
193. Gimpl, G.; Klein, U.; Reilander, H.; Fahrenholz, F. Expression of the human oxytocin receptor in baculovirus-infected insect cells: high-affinity binding is induced by a cholesterol-cyclodextrin complex. *Biochemistry* **1995**, *35*, 13794-13801.
194. Burger, K.; Gimpl, G.; Fahrenholz, F. Regulation of receptor function by cholesterol. *Cell Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 1577-1592.
195. Cogan, E. B.; Birrell, G. B.; Griffith, O. H. A Robotics-Based Automated Assay for Inorganic and Organic Phosphates. *Anal. Biochem.* **1999**, *271*, 29-35.
196. Segel, I. H. *Enzyme Kinetics*; John Wiley & Sons: New York, 1993.
197. Schmitt, S. M. Purines and 9-deazapurines as Modulators of Multidrug Resistance-associated Protein 1 (MRP1/ABCC1)-mediated Transport. PhD Thesis: Bonn, 2017.
198. Schmitt, S. M.; Stefan, K.; Wiese, M. Pyrrolopyrimidine Derivatives as Novel Inhibitors of Multidrug Resistance-Associated Protein 1 (MRP1/ABCC1). *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 3018-3033.
199. Garnier-Suillerot, C.; Marbeuf-Gueye, M.; Salerno, C.; Loetchutin, I.; Fokt, M.; Krawczyk, T.; Krowalczyk, W.; Priebe, W. Analysis of drug transport kinetics in multidrug-resistant cells: implications for drug action. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 51-64.
200. Matthews, J. C. *Fundamentals of Receptor, Enzyme, and Transport Kinetics*; CRC Press, 1993.
201. Sharom, F. J.; Yu, X.; Di Diodato, G.; Chu, J. W. K. Synthetic hydrophobic peptides are substrates for P-glycoprotein and stimulate drug transport. *Biochem. J.* **1996**, *320*, 421-428.
202. Berginc, K.; Zakelj, S.; Ursic, D.; Kristi, A. Aged garlic extracts stimulates P-glycoprotein and multidrug resistance associated protein 2 mediated effluxes. *Biol. Pharm. Bull.* **2009**, *32*, 694-699.
203. Contino, M.; Cantore, M.; Capparelli, E.; Perrone, M. G.; Niso, M.; Inglese, C.; Berardi, F.; Leopoldo, M.; Perrone, R.; Colabufo, N. A. A benzopyrane derivative as a P-glycoprotein stimulator: a potent agent to decrease beta-amyloid accumulation in Alzheimer's Disease. *Chem. Med. Chem.* **2012**, *7*, 391-395.
204. Li, S.; Lei, Y.; Jia, Y.; Li, N.; Wink, M.; Ma, Y. Piperine, a piperidine alkaloid from *Piper nigrum* re-sensitizes P-gp, MRP1 and BCRP dependent multidrug resistant cancer cells. *Phytomedicine* **2011**, *19*, 83-87.
205. Rowinski, E. K.; Smith, L.; Wang, Y.-M.; Chaturvedi, P.; Villalona, M.; Campbell, E.; Aylesworth, C.; Echardt, S. G.; Hammond, L.; Kraynak, M.; Drengler, R.; Stephenson, J.; Jr., H.; M.W.; Von Hoff, D. D. Phase I and Pharmacokinetic Study of Paclitaxel in Combination With Biricodar, a Novel Agent That Reverses Multidrug Resistance Conferred by Overexpression of Both, MDR1 and MRP1. *J. Clin. Oncol.* **1998**, *9*, 2964-2976.
206. Peck, R. A.; Hewett, J.; Harding, M. W.; Wang, Y.-M.; Chaturvedi, P. R.; Bhatnagar, A.; Ziessman, H.; Atkins, F. Phase I and Pharmacokinetic Study of the Novel MDR1 and MRP1 Inhibitor Biricodar Administered Alone and in Combination With Doxorubicin. *J. Clin. Oncol.* **2001**, *12*, 3130-3141.
207. Weidner, L. D.; Zoghbi, S. S.; Lu, S.; Shukla, S.; Ambudkar, S. V.; Pike, V. W.; Mulder, J.; Gottesmann, M. M.; Innis, R. B.; Hall, M. D. The Inhibitor Ko143 Is Not Specific for ABCG2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2015**, *354*, 384-393.

208. Krapf, M.; Wiese, M. Synthesis and Biological Evaluation of 4-Anilino-quinazolines and -quinolines as inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2). *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 5449-5461.
209. Schmitt, S. M.; Stefan, K.; Wiese, M. Pyrrolopyrimidine derivatives and purine analogs as novel activators of Multidrug Resistance-associated Protein 1 (MRP1, ABCC1). *Biochim. Biophys. Acta* **2017**, *1859*, 69-79.
210. Tsuruo, T.; Iida, H.; Tsukagoshi, S.; Sakurai, Y. Overcoming of Vincristine Resistance in P388 Leukemia in Vivo and in Vitro through Enhanced Cytotoxicity of Vincristine and Vinblastine by Verapamil. *Cancer Res.* **1981**, *41*, 1967-1972.
211. Slovak, M. L.; Hoeltge, G. A.; Dalton, W. S.; Trent, J. M. Pharmacological and Biological Evidence for Differing Mechanisms of Doxorubicin Resistance in Two Human Tumor Cell Lines. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 2793-2797.
212. Cornwell, M. M.; Pastan, I.; Gottesmann, M. M. Certain Calcium Channel Blockers Bind Specifically to Multidrug-resistant Human KB Carcinoma Membrane Vesicles and Inhibit Drug Binding to P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 2166-2170.
213. Abe, T.; Koike, K.; Ohga, T.; Kubo, T.; Wada, M.; Kohno, K.; Hidaka, K.; Kuwano, M. Chemosensitisation of spontaneous multidrug resistance by a 1,4-dihydropyridine analog and verapamil in human glioma cell lines overexpressing MRP1 or MDR1. *Br. J. Cancer* **1995**, *72*, 418-423.
214. Sato, W.; Fukuzawa, N.; Nakanashi, O.; Baba, M. S. T.; Yano, O.; Naito, M.; Tsuruo, T. Relationship between multidrug resistant gene expression and multidrug resistant-reversing effect of MS-209 in various tumor cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1995**, *36*, 361-367.
215. Norman, B. H.; Gruber, J. M.; Hollinshead, S. P.; Wilson, J. W.; Starling, J. J.; Law, K. L.; Self, T. D.; Tabas, L. B.; Williams, D. C.; Paul, D. C.; Wagner, M. M.; Dantzig, A. H. Tricyclic isoxazoles are novel inhibitors of the multidrug resistance protein (MRP1). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 883-886.
216. Dantzig, A. H.; Shepard, R. L.; Pratt, S. E.; Tabas, L. B.; Lander, P. A.; Ma, L.; Paul, D. C.; Williams, D. C.; Peng, S.-B.; Slapak, C. A.; Godinot, N.; III., P.; W.L. Evaluation of the binding of the tricyclic isoxazole photoaffinity label LY475776 to multidrug resistance associated protein 1 (MRP1) orthologs and several ATP-binding cassette (ABC) drug transporters. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67*, 1111-1121.
217. Wang, S.; Ryder, H.; Pretswell, I.; Depledge, P.; Milton, J.; Hancox, T. C.; Dale, I.; Dangerfield, W.; Charlton, P.; Faint, R.; Dodd, R.; Hassan, S. Studies on Quinazolinones as dual inhibitors of Pgp and MRP1 in multidrug resistance. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 571-574.
218. Maliepaard, M.; van Gastelen, M. A.; Tohgo, A.; Hausheer, F. H.; van Waardenburg, R. C. A. M.; de Jong, L. A.; Pluim, D.; Bijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. Circumvention of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP)-mediated Resistance to Camptothecins in Vitro Using Non-Substrate Drugs or the BCRP Inhibitor GF120918. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 935-941.
219. 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.
220. Köhler, S. C.; Wiese, M. HM30181 Derivatives as Novel Potent and Selective Inhibitors of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2). *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 3910-3921.
221. Spindler, A.; Stefan, K.; Wiese, M. Synthesis and Investigation of Tetrahydro- $\beta$ -carboline Derivatives as Inhibitors of the Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2). *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 6121-6135.
222. Gu, X.; Ren, Z.; Tang, X.; Peng, H.; Ma, Y.; Lai, Y.; Peng, S.; Zhang, Y. Synthesis and biological evaluation of bifendate-chalcone hybrids as a new class of potential P-glycoprotein inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 2540-2548.
223. Gu, X.; Ren, Z.; Peng, H.; Peng, S.; Zhang, Y. Bifendate-chalcone hybrids: A new class of potential dual inhibitors of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2014**, *455*, 318-322.
224. Gu, X.; Tang, X.; Zhao, Q.; Peng, H.; Peng, S.; Zhang, Y. Discovery of alkoxy biphenyl derivatives bearing dibenzo[c,e]azepine scaffold as potential dual inhibitors of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 3419-3421.
225. Kraege, S.; Köhler, S. C.; Wiese, M. Acryloylphenylcarboxamides: A New Class of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) Modulators. *Chem. Med. Chem.* **2016**, *11*, 2422-2435.

226. Kraege, S.; Stefan, K.; Köhler, S. C.; Wiese, M. Optimization of Acryloylphenylcarboxamides as Inhibitors of ABCG2 and Comparison with Acryloylphenylcarboxylates. *Chem. Med. Chem.* **2016**, *11*, 2547-2558.
227. Häcker, H.-G.; Leyers, S.; Wiendlocha, J.; Gütschow, M.; Wiese, M. Aromativ 2-(Thio)ureidocarboxylic Acids As a New Family of Modulators of Multidrug Resistance-Associated Protein 1: Synthesis, Biological Evaluation, and Structure-Activity Relationships. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4586-4595.
228. Chow, L. M. C.; Chan, T. H.; Chan, K. F.; Wong, I. L. K.; Law, M. C. Alkyne-, azide- and triazole-containing flavonoids as modulators for multidrug resistance in cancers. WO 2013127361 A1, September 6, 2013.
229. Wiese, M. BCRP/ABCG2 inhibitors: a patent review (2009 – present). *Expert Opin.* **2015**, *25*, 1-9.
230. Leonard, G. D.; Fojo, T.; Bates, S. E. The Role of ABC Transporters in Clinical Practice. *Oncologist.* **2003**, *8*, 411-424.
231. Schumacher, T.; Krohn, M.; Hofrichter, J.; Lange, C.; Stenzel, J.; Steffen, J.; Dunkelmann, K.; Fröhlich, C.; Uecker, A.; Platz, A.-S.; Sommer, A.; Brüning, T.; Heinze, H.-J.; Pahnke, J. ABC Transporters B1, C1, and G2 Differentially Regulate Neurogeneration in Mice. *PLoS One* **2012**, *7*, e35613.
232. Bernstein, H.-G.; Hölzl, G.; Dobrowolny, H.; Hildebrand, J.; Trübner, K.; Krohn, M.; Bogerts, B.; Pahnke, J. Vascular and Extravascular Distribution of the ATP-binding Cassette Transporters ABCB1 and ABCC1 in Aged Human Brain and Pituitary. *Mech. Ageing Dev.* **2014**, *141-142*, 12-21.
233. Krauze, A.; Grinberga, S.; Krasnova, L.; Adlere, I.; Sokolova, E.; Domracheva, I.; Shestakova, I.; Andzans, Z.; Duburs, G. Thieno[2,3-b]pyridines--a new class of multidrug resistance (MDR) modulators. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 5860-5870.
234. Stefan, K.; Schmitt, S. M.; Wiese, M. 9-Deazapurines as broad-spectrum inhibitors of the ABC transport proteins P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein 1, and breast cancer resistance protein. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 8758-8780.
235. Pick, A.; Klinkhammer, W.; Wiese, M. Specific inhibitors of the breast cancer resistance protein (BCRP). *Chem. Med. Chem.* **2010**, *5*, 1498-1505.
236. Colabufo, N. A.; Pagliarulo, V.; Berardi, F.; Contino, M.; Inglese, C.; Niso, M.; Ancona, P.; Albo, G.; Pagliarulo, A.; Perrone, R. Bicalutamide failure in prostate cancer treatment: involvement of Multi Drug Resistance proteins. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *601*, 38-42.
237. Colabufo, N. A.; Berardi, F.; Perrone, M. G.; Cantone, M.; Contino, M.; Inglese, C.; Niso, M.; Perrone, R. Multi-drug-resistance-reverting agents: 2-aryloxazole and 2-arylthiazole derivatives as potent BCRP or MRP1 inhibitors. *Chem. Med. Chem.* **2009**, *4*, 188-195.
238. Dai, C. L.; Liang, Y. S.; Wang, Y. S.; Tiwari, A. K.; Yan, Y. Y.; Wang, F.; Chen, Z. S.; Tong, X. Z.; Fu, L.-W. Sensitization of ABCG2-overexpressing Cells to Conventional Chemotherapeutic Agent Sunitinib was Associated with Inhibiting the Function of ABCG2. *Cancer Lett.* **2009**, *279*, 74-83.
239. Silbermann, K.; Stefan, S. M.; Elshawadfy, R.; Namasivayam, V.; Wiese, M. Identification of Thienopyrimidine Scaffold as Inhibitor of the Transport Protein ABCC1 (MRP1) and Related Transporters Using Combined Virtual Screening Approach. *J. Med. Chem* **2019**, under Review.
240. Winter, E.; Gozzi, G. J.; Chiaradia-Delatorre, L. D.; Daflon-Yunes, N.; Terreux, R.; Gauthier, C.; Mascarello, A.; Leal, P. C.; Cadena, S. M.; Yunes, R. A.; Nunes, R. J.; Creczynski-Pasa, T. B.; Di Pietro, A. Quinoxaline-substituted chalcones as new inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2: polyspecificity at B-ring position. *Drug Des. Devel. Ther.* **2014**, *8*, 609-619.
241. Pires, M. M.; Emmert, D.; Hrycyna, C. A. Inhibition of P-Glycoprotein-mediated paclitaxel resistance by reversibly linked quinine homodimers. *Mol. Pharmacol.* **2009**, *75*, 92-100.
242. Chan, K.-F.; Zhao, Y.; Burkett, I. L. K.; Wong, L. M. C.; Chow, T. H. Flavonoid dimers as bivalent modulators for P-Glycoprotein-Based multidrug resistance: synthetic Apigenin homodimers linked with defined-length poly(ethyleneglycol) spacers increase drug retention and enhance chemosensitivity in resistant cancer cells. *J. Med. Chem.* **2006**, *55*, 6742-6759.
243. Chan, K.-F.; Wong, I. L. K.; Kan, J. W. Y.; Yan, C. W. S.; Chow, L. M. C.; Chan, T. H. Amine linked flavonoid dimers as modulators for P-Glycoprotein-based multidrug resistance: structure-activity relationship and mechanism of modulation. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1999-2014.

244. Namanja, H. A.; Emmert, E.; Pires, M. M.; Hrycyna, C. A.; Chmielewski, J. Inhibition of human P-Glycoprotein transport and substrate binding using galantamine dimer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *388*, 672-676.
245. Krapf, M. K.; Gallus, J.; Spindler, A.; Wiese, M. Synthesis and biological evaluation of quinazoline derivatives - A SAR study of novel inhibitors of ABCG2. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *161*, 506-525.
246. Stefan, K. Untersuchung von Chalkonen und Flavonoiden als BCRP-Inhibitoren. Master Thesis: Bonn, 2011.
247. Jedlitschky, G.; Leier, I.; Buchholz, U.; Barnouin, K.; Kurz, G.; Keppler, D. Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 988-994.
248. Rappa, G.; Lorico, A.; Flavell, R. A.; Sartorelli, A. C. Evidence that the multidrug resistance protein (MRP) functions as a co-transporter of glutathione and natural product toxins. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 5232-5237.
249. Morrow, C. S.; Peklak-Scott, C.; Bishwokarma, B.; Kute, T. E.; Smitherman, P. K.; Townsend, A. J. Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1) mediated resistance to mitoxantrone via glutathione-dependent drug efflux. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *69*, 1499-1505.
250. Leier, I.; Jedlitschky, G.; Buchholz, U.; Center, M.; Cole, S. P. C.; Deeley, R. G.; Keppler, D. ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Biochem. J.* **1996**, *314*, 433-437.
251. Bakos, E.; Evers, R.; Sinko, E.; Varadi, A.; Borst, P.; Sarkadi, B. Interactions of the human multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 with organic anions. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *57*, 760-768.
252. Mao, Q.; Leslie, E. M.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. C. ATPase activity of purified and reconstituted multidrug resistance protein MRP1 from drug-selected H69AR cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1461*, 69-82.
253. Chang, X. B.; Hou, Y. X.; Riordan, J. R. ATPase activity of purified multidrug resistance-associated protein. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 30962-30968.
254. Qian, Y. M.; Song, W. C.; Cui, H.; Cole, S. P. C.; Deeley, R. G. Glutathione stimulates sulfated estrogen transport by multidrug resistance protein 1. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 6404-6411.
255. Qian, Y. M.; Grant, C. E.; Westlake, C. J.; Zhang, D. W.; Lander, P. A.; Shepard, R. L.; Dantzig, A. H.; Cole, S. P. C.; Deeley, R. G. Photolabeling of human and murine multidrug resistance protein 1 with the high affinity inhibitor [125I]LY475776 and azidophenacyl-[32S]Glutathione. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 35225-35231.
256. Pulaski, L.; Jedlitschky, G.; Leier, I.; Buchholz, U.; Keppler, D. Identification of the multidrug-resistance protein (MRP) as the glutathione-S-conjugate export pump of erythrocytes. *Eur. J. Biochem.*, **1996**, *644-648*.
257. Spindler, A. Synthese und Untersuchung neuer ABCG2 Inhibitoren. PhD Thesis: Bonn, 2017.
258. Kraege, S. Design, Synthese und Biologische Testung neuartiger Chalkon-Derivate als ABCG2 Inhibitoren. PhD Thesis: Bonn, 2017.
259. Van Veldhoven, P. P.; Mannaerts, G. P. Inorganic and organic phosphate measurements in the nanomolar range. *Anal. Biochem.* **1987**, *161*, 45-48.
260. Burns, D. T.; Chimpalee, D.; Chimpalee, N.; Ittipornkul, S. Flow-injection spectrophotometric determination of phosphate using crystal violet. *Anal. Chim. Acta* **1991**, *254*, 197-200.
261. Soyenkoff, B. A micromethod of phosphate determination. *J. Biol. Chem.* **1947**, *168*, 447-457.
262. Soyenkoff, B. C. An improved micromethod of phosphate determination. *J. Biol. Chem.* **1952**, *198*, 221-227.



## Anhang

**Tabelle A.1:** Nummerierungsverzeichnis der Purine, Pyrrolo- und Indolopyrimidine in dieser Arbeit, im Labor des Arbeitskreises Wiese, in der Arbeit von Dr. Sven Marcel Stefan und der dazugehörigen Publikationen.

<b>Substanznummer</b>	<b>Labor AK Wiese</b>	<b>Dissertation Dr. Sven Marcel Stefan</b>	<b>Publikationen</b>
401	SMS-A-50	74	12 <sup>a</sup>
402	SMS-A-53	75	13 <sup>a</sup>
403	SMS-A-51	76	14 <sup>a</sup>
404	SMS-A-52	77	15 <sup>a</sup>
405	SMS-A-123	78	16 <sup>a</sup>
406	SMS-A-7	79	17 <sup>a</sup>
407	SMS-A-694	80	18 <sup>a</sup>
408	SMS-A-652	81	19 <sup>a</sup>
409	SMS-A-604	82	20 <sup>a</sup>
410	SMS-A-556	83	21 <sup>a</sup>
411	SMS-A-64	84	22 <sup>a</sup>
412	SMS-A-67	85	23 <sup>a</sup>
413	SMS-A-65	86	24 <sup>a</sup>
414	SMS-A-66	87	25 <sup>a</sup>
415	SMS-A-340	88	26 <sup>a</sup>
416	SMS-A-478	89	27 <sup>a</sup>
417	SMS-A-485	90	28 <sup>a</sup>

<b>Substanznummer</b>	<b>Labor AK Wiese</b>	<b>Dissertation</b>	<b>Publikationen</b>
		<b>Dr. Sven Marcel Stefan</b>	
418	SMS-A-492	91	29 <sup>a</sup>
419	SMS-A-499	92	30 <sup>a</sup>
420	SMS-A-308	93	31 <sup>a</sup>
421	SMS-A-311	94	32 <sup>a</sup>
422	SMS-A-316	95	33 <sup>a</sup>
423	SMS-A-319	96	34 <sup>a</sup>
424	SMS-A-324	97	35 <sup>a</sup>
425	SMS-A-327	98	36 <sup>a</sup>
426	SMS-A-332	99	37 <sup>a</sup>
427	SMS-A-335	100	38 <sup>a</sup>
428	SMS-A-715	101	6 <sup>b</sup>
429	SMS-A-700	102	7 <sup>b</sup>
430	SMS-A-705	103	8 <sup>b</sup>
431	SMS-A-707	104	9 <sup>b</sup>
432	SMS-A-711	105	10 <sup>b</sup>
433	SMS-A-712	106	11 <sup>b</sup>
434	SMS-H-3	107	12 <sup>b</sup>
435	SMS-H-6	108	13 <sup>b</sup>
436	SMS-H-4	109	14 <sup>b</sup>
437	SMS-H-5	110	15 <sup>b</sup>
438	SMS-A-9	111	41 <sup>c</sup>
439	SMS-A-35	112	42 <sup>c</sup>
440	SMS-A-695	113	43 <sup>c</sup>
441	SMS-A-129	114	44 <sup>c</sup>
442	SMS-A-130	115	45 <sup>c</sup>
443	SMS-A-158	116	46 <sup>c</sup>
444	SMS-A-160	117	47 <sup>c</sup>
445	SMS-A-339	118	48 <sup>c</sup>
446	SMS-A-477	119	49 <sup>c</sup>
447	SMS-A-484	120	50 <sup>c</sup>
448	SMS-A-498	121	51 <sup>c</sup>



Substanznummer	Labor AK Wiese	Dissertation Dr. Sven Marcel Stefan	Publikationen
449	SMS-A-307	122	52 <sup>c</sup>
450	SMS-A-315	123	53 <sup>c</sup>
451	SMS-A-323	124	54 <sup>c</sup>
452	SMS-A-331	125	55 <sup>c</sup>
453	SMS-A-54	126	56 <sup>c</sup>
454	SMS-A-68	127	57 <sup>c</sup>
455	SMS-A-703	128	58 <sup>c</sup>
456	SMS-A-713	129	59 <sup>c</sup>
457	SMS-A-127	130	60 <sup>c</sup>
458	SMS-A-128	131	61 <sup>c</sup>
459	SMS-A-436	132	62 <sup>c</sup>
460	SMS-A-439	133	63 <sup>c</sup>
461	SMS-A-412	134	64 <sup>c</sup>
462	SMS-A-415	135	65 <sup>c</sup>
463	SMS-A-136	140	66 <sup>c</sup>
464	SMS-A-143	141	67 <sup>c</sup>
465	SMS-A-177	142	68 <sup>c</sup>
466	SMS-A-137	136	69 <sup>c</sup>
467	SMS-A-140	137	70 <sup>c</sup>
468	SMS-A-138	138	71 <sup>c</sup>
469	SMS-A-139	139	72 <sup>c</sup>
470	SMS-A-141	143	73 <sup>c</sup>
471	SMS-A-142	144	74 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Schmitt, S. M.; Stefan, K.; Wiese, M. Pyrrolopyrimidine Derivatives as Novel Inhibitors of Multidrug Resistance-Associated Protein 1 (MRP1/ABCC1). *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 3018-3033.

<sup>b</sup> Schmitt, S. M.; Stefan, K.; Wiese, M. Pyrrolopyrimidine derivatives and purine analogs as novel activators of Multidrug Resistance-associated Protein 1 (MRP1, ABCC1). *Biochim. Biophys. Acta* **2017**, *1859*, 69-79.

<sup>c</sup> Stefan, K.; Schmitt, S. M.; Wiese, M. 9-Deazapurines as broad-spectrum inhibitors of the ABC transport proteins P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein 1, and breast cancer resistance protein. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 8758-8780.

**Tabelle A.2:** Nummerierungsverzeichnis der Chinazolin-Chalkone in dieser Arbeit, im Labor des Arbeitskreises Wiese, in der Arbeit von Dr. Stefanie Kraege bzw. Dr. Kapil Juvale und der dazugehörigen Publikationen.

Substanznummer	Labor AK Wiese	Dissertationen	Publikationen
		Dr. Stefanie Kraege	Dr. Kapil Juvale
501	KCJ-231/STK-B1	187	17 <sup>d</sup>
502	KCJ-232/STK-B2	188	18 <sup>d</sup>
503	KCJ-225	189	19 <sup>d</sup>
504	KCJ-226	190	20 <sup>d</sup>
505	STK-B6	191	21 <sup>d</sup>
506	STK-B7	193	22 <sup>d</sup>
507	STK-B14	192	23 <sup>d</sup>
508	KCJ-239/STK-B10	194	24 <sup>d</sup>
509	KCJ-240/STK-B11	195	25 <sup>d</sup>
510	STK-B44	196	26 <sup>d</sup>
511	KCJ-233/STK-B3	197	27 <sup>d</sup>
512	KCJ-234/STK-B4	198	28 <sup>d</sup>
513	KCJ-228/STK-B15	199	29 <sup>d</sup>
514	KCJ-229/STK-B5	200	30 <sup>d</sup>
515	KCJ-241/STK-B8	201	31 <sup>d</sup>
516	STK-B9	202	32 <sup>d</sup>
517	STK-B25	203	33 <sup>d</sup>
518	STK-B24	204	34 <sup>d</sup>
519	STK-B12	205	35 <sup>d</sup>
520	STK-B13	206	36 <sup>d</sup>
521	STK-B26	207	37 <sup>d</sup>
522	STK-B43	208	38 <sup>d</sup>
523	KCJ-116	116	27 <sup>e</sup>
524	KCJ-88	31	28 <sup>f</sup>
525	STK-B16	209	-
526	STK-B17	210	-
527	STK-B19	211	-

Substanznummer	Labor AK Wiese	Dissertationen Dr. Stefanie Kraege Dr. Kapil Juvale	Publikationen
528	STK-B22	212	-
529	STK-B23	213	-
530	STK-B33	214	-
531	STK-B34	215	-
532	STK-B35	216	-
533	STK-B36	217	-
534	STK-B37	218	-
535	STK-B42	219	-
536	STK-B45	220	-

<sup>d</sup> Kraege, S.; Stefan, K.; Juvale, K.; Ross, T.; Willmes, T.; Wiese, M. The combination of quinazoline and chalcone moieties leads to novel potent heterodimeric modulators of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *117*, 212-229.

<sup>e</sup> Juvale, K.; Gallus, J.; Wiese, M. Investigation of quianazolines as inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 7858-7873.

<sup>f</sup> Juvale, K.; Pape, V. F.; Wiese, M. Investigations of chalcones and benzochalcones as inhibitors of breast cancer resistance protein. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 346-355.

**Tabelle A.3:** Nummerierungsverzeichnis der Tetrahydro- $\beta$ -carboline und der Acryloylphenylcarboxamide in dieser Arbeit, im Labor des Arbeitskreises Wiese, in der Arbeit von Dr. Anna Spindler bzw. Dr. Stefanie Kraege und der dazugehörigen Publikationen.

Substanznummer	Labor AK Wiese	Dissertation	Publikationen
		<b>Dr. Anna Spindler</b>	
		<b>Dr. Stefanie Kraege</b>	
601	ASP-212	78	22 <sup>g</sup>
602	ASP-240	91	35 <sup>g</sup>
603	ASP-232	94	38 <sup>g</sup>
604	ASP-234	95	39 <sup>g</sup>
605	ASP-245	107	51 <sup>g</sup>
606	ASP-251	108	52 <sup>g</sup>
607	ASP-248	110	53 <sup>g</sup>
608	STK-171	114	7a <sup>h</sup> /26 <sup>i</sup>
609	STK-175	113	8a <sup>h</sup> /27 <sup>i</sup>
610	STK-178	120	15a <sup>h</sup> /33 <sup>i</sup>
611	STK-188	124	16a <sup>h</sup> /37 <sup>i</sup>
612	STK-191	129	7 <sup>h</sup>
613	STK-195	133	11 <sup>h</sup>
614	STK-198	138	16 <sup>h</sup>
615	STK-201	141	19 <sup>h</sup>
616	STK-204	144	22 <sup>h</sup>
617	STK-218	146	24 <sup>h</sup>
618	STK-219	147	26 <sup>h</sup>
619	STK-223	149	-
620	STK-224	150	-
621	STK-225	151	-

<sup>g</sup> Spindler, A.; Stefan, K.; Wiese, M. Synthesis and Investigation of Tetrahydro- $\beta$ -carboline Derivatives as Inhibitors of the Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2). *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 6121-6135.

<sup>h</sup> Kraege, S.; Stefan, K.; Köhler, S. C.; Wiese, M. Optimization of Acryloylphenylcarboxamides as Inhibitors of ABCG2 and Comparison with Acryloylphenylcarboxylates. *Chem. Med. Chem.* **2016**, *11*, 2547-2558.

<sup>i</sup> Kraege, S.; Köhler, S. C.; Wiese, M. Acryloylphenylcarboxamides: A New Class of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) Modulators. *Chem. Med. Chem.* **2016**, *11*, 2422-2435.

## Publikationen

### Wissenschaftliche Originalarbeiten

Juvale, K.; **Stefan, K.**; Wiese, M. Synthesis and biological evaluation of flavones and benzoflavones as inhibitors of BCRP/ABCG2. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *67*, 115-126.

Schmitt, S. M.\*; **Stefan, K.\***; Wiese, M. Pyrrolopyrimidine Derivatives as Novel Inhibitors of Multidrug Resistance-Associated Protein 1 (MRP1/ABCC1). *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 3018-3033.

Kraege, S.\*; **Stefan, K.\***; Juvale, K.; Ross, T.; Willmes, T.; Wiese, M. The combination of quinazoline and chalcone moieties leads to novel potent heterodimeric modulators of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *117*, 212-229.

Spindler, A.; **Stefan, K.**; Wiese, M. Synthesis and Investigation of Tetrahydro- $\beta$ -carboline Derivatives as Inhibitors of the Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2). *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 6121-6135.

Kraege, S.; **Stefan, K.**; Köhler, S. C.; Wiese, M. Optimization of Acryloylphenylcarboxamides as Inhibitors of ABCG2 and Comparison with Acryloylphenylcarboxylates. *Chem. Med. Chem.* **2016**, *11*, 2547-2558.

Schmitt, S. M.\*; **Stefan, K.\***; Wiese, M. Pyrrolopyrimidine derivatives and purine analogs as novel activators of Multidrug Resistance-associated Protein 1 (MRP1, ABCC1). *Biochim. Biophys. Acta* **2017**, *1859*, 69-79.

**Stefan, K.\***; Schmitt, S. M.\*; Wiese, M. 9-Deazapurines as broad-spectrum inhibitors of the ABC transport proteins P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein 1, and breast cancer resistance protein. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 8758-8780.

---

\* geteilte Erstautorenschaft

## Kongressbeiträge

**Stefan, K.;** Kraege, S.; Juvale, K.; Wiese, M. The combination of quinazoline and chalcone moieties leads to novel potent inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2). *5<sup>th</sup> FEBS Special Meeting: ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases*, Innsbruck (Österreich), März **2014**. (Poster und Vortrag)

Kraege, S.; **Stefan, K.;** Wiese, M. The advancement of substituted quinazoline-chalcones as potent, selective and nontoxic inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2). *7<sup>th</sup> SFB35 Symposium: Transmembrane Transporters in Health and Disease*, Wien (Österreich), September **2014**. (Poster)

**Stefan, K.;** Schmitt, S. M.; Wiese, M. Characterization of Inhibitors of Multidrug-resistance Associated Protein 1 (MRP1) for Their Influence on ATP-dependent Transport of Glutathione (GSH/GSSG). *Gordon Research Conference (GRC): Multi-Drug Efflux Systems – A Paradigm Shift from Fundamental Mechanisms to Practical Applications*, Lucca (Italien), April/Mai **2015**. (Poster)

Schmitt, S. M.; **Stefan, K.;** Wiese, M. Pyrrolopyrimidine-derivatives and Analogues as Novel Modulators of Multidrug Resistance-associated Protein 1 (MRP1). *AAPS Annual Meeting and Exposition*, Orlando (Florida, Vereinigte Staaten von Amerika), Oktober **2015**. (Poster)

**Stefan, K.;** Schmitt, S. M.; Wiese, M. Pyrrolopyrimidine Derivatives as Novel Inhibitors of Multidrug Resistance-associated Protein 1 (MRP1, ABCC1). *6<sup>th</sup> Special Meeting: ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases*, Innsbruck (Österreich), März **2016**. (Poster)

**Stefan, K.** *TransportDEMENTIA*<sup>3</sup>, Svolvaer (Norwegen), September **2017**. (Teilnahme)

Schmitt, S. M.; **Stefan, K.;** Wiese, M. Pyrrolopyrimidine Derivatives and Analogs as Activators of Multidrug Resistance-associated Protein 1 (MRP, ABCC1). *6<sup>th</sup> Special Meeting: ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases*, Innsbruck (Österreich), März **2016**. (Poster)