

Funktionelle Untersuchungen des ABC-Transporters P-Glykoprotein

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Henrik Müller

aus Aachen

Bonn 2007



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

1. Referent: Prof. Dr. Michael Wiese
2. Referent: Prof. Dr. Matthias Kassack

Tag der Promotion: 07.11.2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr 2007

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität unter Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Wiese angefertigt.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Wiese für die Überlassung des sehr interessanten Themas. Viele Anregungen sowie konstruktive Kritik haben zum Gelingen dieser Arbeit entscheidend beigetragen. Die mir gewährten Freiräume und das mir entgegengebrachte Vertrauen habe ich sehr zu schätzen gewusst.

Herrn Prof. Dr. M. Kassack danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates. Mein Dank gilt ihm auch für den guten und konstruktiven Gedankenaustausch während meiner Promotion.

Herrn Prof. Dr. K.-J. Steffens und Herrn Prof. Dr. H. Bönisch möchte ich für die Mitwirkung in der Prüfungskommission herzlich danken.

Herrn Dr. M. Weigt, Herrn C. Globisch, Herrn Dr. W. Klinkammer und Frau A. Jacobs danke ich besonders für ihre Hilfsbereitschaft, stete Unterstützung und erfolgreiche Zusammenarbeit. Sie haben zum Erfolg dieser Arbeit wesentlich beigetragen.

Frau Prof. Dr. I. Pajeva danke ich für zahlreiche Diskussionsbeiträge und Anregungen.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Bendas, Frau J. Fritzsche und Frau A. Glahn für die gute Zusammenarbeit.

Der DFG danke ich für die Förderung im Rahmen des Graduiertenkollegs 804 „Analysis of cell functions by combinatorial chemistry and biochemistry“.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	5
1.1 Das Phänomen der Multidrug Resistenz (Multidrug Resistance).....	5
1.2 ABC-Transportproteine.....	7
1.3 P-Glykoprotein.....	11
1.4 Bedeutung von P-Glykoprotein.....	15
1.5 Substrate und Modulatoren.....	18
1.6 P-gp Modulatoren.....	19
1.6.1 P-gp Modulatoren der ersten Generation.....	19
1.6.2 P-gp Modulatoren der zweiten Generation.....	21
1.6.3 P-gp Modulatoren der dritten Generation.....	22
1.7 Funktionsweise von P-gp.....	25
1.8 Der Transportzyklus von P-gp.....	26
1.9 Bindungsstellen von P-Glykoprotein.....	32
1.10 Struktur-Wirkungsbeziehungen und Pharmakophormodelle.....	37
1.11 MRP1 (Multidrug Resistance associated Protein) und BCRP.....	40
1.12 Aufgaben- und Problemstellung.....	44
2 Material und Methoden	45
2.1 Zellkultur.....	45
2.2 Inkulturnahme von Zellen (Revitalisieren von Zellen).....	46
2.3 Kryokonservierung der Zellen (Lagerung der Zellen).....	46
2.4 Behandlung der Zellen mit Zytostatika.....	47
2.5 Zelllinien	47
2.5.1 Sensitive Zelllinie A2780 und resistente Zelllinie A2780 Adr.....	47
2.5.2 Sensitive Zelllinie MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) und resistente Zelllinie MDCK-MDR1 sowie MDCK-MRP1	48
2.5.3 Sensitive Zelllinie MCF-7 und resistente Zelllinie MCF-7 Adr.....	48
2.5.4 Zelllinie MCF-7 MX.....	48
2.6 Materialien für das Arbeiten mit Zellen.....	49
2.7 Chemikalien.....	50
2.8 Geräte.....	52

2.9	Pufferlösungen und Antikörper.....	52
2.9.1	Herstellung von 500 ml 5fach konzentrierter (5X)-Lösung des Krebs-Hepes-Puffers (KHP).....	52
2.9.2	Herstellung des PBS-Puffers	53
2.9.3	Antikörper-Labeling von P-gp.....	54
2.9.4	Antikörper-basierte Markierung von BCRP.....	54
2.10	Zellzahlbestimmung mittels CASY® 1 Model TT.....	54
2.11	MTT Assay.....	55
2.11.1	Bestimmung der Hemmwirkung von Zytostatika.....	55
2.11.2	Bestimmung der Hemmwirkung von Zytostatika in Gegenwart von P-gp Modulatoren.....	57
2.11.3	Theoretischer Hintergrund zum MTT Assay.....	58
2.12	Der ATP Assay	59
2.12.1	Theoretischer Hintergrund zum ATP Assay.....	60
2.13	Calcein AM Assay.....	61
2.13.1	Kombinationsexperimente.....	65
2.13.2	Theoretischer Hintergrund zum Calcein AM Assay.....	66
2.13.3	BCECF AM Assay.....	68
2.14	Hoechst Assay.....	68
2.14.1	Theoretischer Hintergrund zum Hoechst Assay.....	70
2.15	Simultanassay – Calcein AM und Hoechst Assay in Kombination.....	72
2.16	FACS Vinblastin-Bodipy® Assay.....	74
2.17	Calcein-Cobalt Assay, Untersuchung von MRP1.....	75
2.17.1	Theoretischer Hintergrund zum Calcein-Cobalt Assay.....	75
2.18	BCRP-Hoechst Assay	77
2.19	Funktionsweise eines Durchflusszytometers.....	77
2.19.1	Markierung von P-gp durch den Antikörper MRK-16.....	79
2.19.2	Antikörper-basierte Markierung von BCRP.....	80
2.20	Calcein-AM und Hoechst 33342 als Fluoreszenzmarker von A2780 Adr Zellen...	81
2.21	Resistenzfaktor.....	82
2.22	Analyse von Konzentrations-Effektkurven: Hillgleichung und 4-Parameter-logistische Gleichung.....	83

2.22.1	F-Test.....	84
2.22.2	Normalisierung der Daten.....	85
2.23	Allosterie.....	85
2.23.1	Analyse über die Dose Ratio-Werte.....	88
2.23.2	Quantifizierung der Allosterie nach Lazareno et al.....	88
2.24	Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis).....	91
3	Ergebnisse und Diskussion.....	93
3.1	Etablierung von A2780 Adr Zellen zur Untersuchung von P-gp.....	93
3.2	Analyse von ausgewählten Verbindungen mit Hilfe des MTT Assays.....	105
3.3	Der Calcein AM Assay – Etablierung und Weiterentwicklung an A2780 Adr Zellen.....	117
3.3.1	Bedeutung von KHP für die Durchführung des Assays.....	118
3.3.2	Schema der 96er-Mikrotiterplatte.....	120
3.3.3	Fluoreszenz-Zeit-Verlauf	121
3.3.4	Vergleich von A2780 und A2780 Adr Zellen im Calcein AM Assay.....	123
3.3.5	Beeinflussen andere ABC-Transporter wie MRP1 oder BCRP die mit Hilfe des Calcein AM Assays generierten Ergebnisse in A2780 Adr Zellen?.....	125
3.3.6	Einfluß der Temperatur auf den Calcein AM Assay.....	129
3.3.7	Bedeutung des Gainwertes - Verstärkung der Fluoreszenz.....	131
3.4	Untersuchungen von P-gp Substraten und Modulatoren der ersten Generation mit Hilfe des Calcein AM Assays.....	133
3.5	Funktionelle und 3D-QSAR Untersuchungen von Phenothiazinen.....	139
3.6	Untersuchung von Modulatoren der dritten Generation mit Hilfe des Calcein AM Assays.....	163
3.6.1	Free-Wilson-Analyse für zehn klassische Tariquidar-Analoga.....	167
3.7	Vergleich der Zelllinien A2780 Adr und MDCK-MDR1.....	170
3.8	Entwicklung und Anwendung eines neuartigen Hoechst Assays.....	172
3.9	Untersuchung von kleinen WK-Modulatoren mit Hilfe des Calcein AM und Hoechst Assays.....	183
3.9.1	Free-Wilson-Analysen von zwölf kleinen WK-Modulatoren.....	188
3.9.2	Inhibitoren mit einer veränderten Carbonsäureamidfunktion.....	193
3.9.3	3D-QSAR-Untersuchungen der WK-Modulatoren	194

3.10	Untersuchung der Aktivierung von P-gp	203
3.11	Allosterie und P-gp.....	214
3.12	Vergleich der funktionellen Transport-basierten Assays.....	230
4	Zusammenfassung	257
5	Anhang	261
5.1	Funktioneller Assay zur Bestimmung der MRP1-Aktivität.....	261
5.2	Funktioneller Assay zur Bestimmung der BCRP-Aktivität.....	264
5.3	Simultanassay – Calcein AM und Hoechst Assay in Kombination.....	269
5.4	Herleitungen verschiedener Gleichungen.....	272
5.4.1	Die Hill-Gleichung.....	272
5.4.2	Von der Hill-Gleichung zur 4-Parameter logistischen Gleichung.....	274
6	Literaturverzeichnis	275
7	Veröffentlichungen	294
8	Lebenslauf	296
9	Verfassererklärung	298

1 Einleitung

1.1 Das Phänomen der Multidrug Resistenz (Multidrug Resistance)

Krebserkrankungen gehören in den Industrieländern nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen.¹ Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes war im Jahr 2004 in Deutschland jeder vierte Todesfall krebsbedingt. In den Vereinigten Staaten von Amerika erkranken, wie aus den Angaben der American Cancer Society (ACS) hervorgeht, jedes Jahr etwa 1,5 Millionen Menschen an Krebs, etwa ein Drittel der Erkrankten sterben. Die Zahl der Krebserkrankungen nimmt stetig zu, maligne Erkrankungen stellen deshalb ein Gesundheitsproblem von zunehmender Bedeutung dar. Bei der Bekämpfung bösartiger Tumore kommen neben der operativen Entfernung des malignen Gewebes, Bestrahlungsbehandlungen und Chemotherapeutika zum Einsatz.^{2,3}

Die Entwicklung der Multidrug Resistenz (MDR) von Krebszellen stellt eines der bedeutendsten Probleme bei der Behandlung von Tumoren mit Chemotherapeutika dar. Dieses Phänomen kann als ein Zustand verstanden werden, bei dem sich die Resistenz von Krebszellen gegen eine Vielzahl strukturell völlig verschiedener Zytostatika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen richtet.⁴ Es existieren zwei grundlegende Formen der Multidrug Resistenz:

1. intrinsische MDR
2. erworbene MDR

Eine intrinsische MDR liegt dann vor, wenn ein Tumor schon a priori eine Mehrfachresistenz aufweist. Tumore im Bereich des Gastrointestinaltraktes, der Leber oder der Niere können eine solche intrinsische MDR aufweisen.

Die erworbene MDR entsteht als Konsequenz der Behandlung von Tumoren mit Zytostatika. Ursache für die erworbene MDR kann die während der Therapie auftretende Selektion primär resistenter Tumorzellen durch die im Rahmen der Therapie eingesetzten Zytostatika sein.⁶ Daneben können Spotanmutationen zur Resistenzausbildung von Krebszellen führen. Bei der erworbenen MDR unterscheidet man *zelluläre* und *nicht zelluläre Resistenzmechanismen*.

Die *nicht zellulären Resistenzmechanismen* entstehen als Folge des *in vivo* Tumorwachs-

tums. Solide Tumoren können beispielsweise eine verringerte Vaskularisierung aufweisen. Diese bedingt, dass Zytostatika die Tumorzellen nicht mehr erreichen und so ihren Effekt nur teilweise oder gar nicht mehr ausüben können. In einem nur wenig vaskularisierten Tumor sind ruhende, sich nicht-teilende Krebszellen vorhanden. Diese sind gegen Zytostatika resistent, die gegen das Zellwachstum gerichtet sind.⁴

Die *zellulären Resistenzmechanismen* können in zwei Kategorien gegliedert werden: Nicht-Transport-basierte und Transport-basierte Mechanismen.⁴

Ein wichtiges Charakteristikum der Nicht-Transport-basierten Resistenzmechanismen besteht darin, dass diese zu keiner Veränderung der intrazellulären Zytostatikakonzentration führen. Im Folgenden sollen die wichtigsten Nicht-Transport-basierten Resistenzmechanismen kurz erläutert werden:

Zelluläre Nicht-Transport-basierte Resistenzmechanismen:

Die *Glutathion-S-Transferase (GST)* stellt ein Enzymsystem dar, das bei Entgiftungsreaktionen eine entscheidende Rolle spielt. Dieses Enzymsystem schützt die Zelle vor einer Beschädigung durch z.B. freie Radikale und reaktive Epoxide. Die Kopplung der im Glutathion enthaltenen Thiolgruppe an Zytostatika führt zu deren Inaktivierung. Das entstehende Konjugat ist weniger aktiv, besitzt eine höhere Wasserlöslichkeit und kann beispielsweise über Multidrug Resistance-associated Proteine (MRPs) aus der Krebszelle ausgeschleust werden. Eine Überexpression von Schlüsselenzymen wie der Glutathion-S-Transferase wurde in Chlorambucil, Melphalan und Cyclophosphamid resistenten Zelllinien beobachtet.⁴

In eukaryontischen Zellen existieren zwei verschiedene Arten von *Topoisomerasen*. DNA-Topoisomerasen vom Typ I (Topoisomerase I & III) verursachen energieunabhängig Einzelstrangbrüche, während DNA-Topoisomerasen vom Typ II (Topoisomerase IV & Gyrase) ATP-abhängig einen Doppelstrangbruch induzieren. Die beiden Enzymtypen sind für die Topologie der DNA verantwortlich, die während der Replikation und Transkription erheblichen Veränderungen ausgesetzt ist. Zytostatika wie Doxorubicin oder Etoposid interagieren mit der Topoisomerase II, Camptothecin-Analoga treten mit der Topoisomerase I in Wechselwirkung. Mutationen der Topoisomerase II oder ihre verringerte Expression sind mit einer Resistenz gegenüber Doxorubicin bzw. Etoposid verbunden.⁵

Zytostatika induzieren den programmierten Zelltod oder Apoptose. *Veränderungen in der*

Apoptose über Onko- oder Tumorsuppressorgene wie ras, c-mac, p53, bcl-2, bax können zu einer MDR führen.^{6,7}

Zelluläre Transport-basierte Resistenzmechanismen:

Das wesentliche Charakteristikum der Transport-basierten Resistenzmechanismen besteht in einer Verringerung der intrazellulären Zytostatikakonzentration. Eine solche Herabsetzung der intrazellulären Zytostatikakonzentration kann über verschiedene Transportproteine hervorgerufen werden wie: P-Glykoprotein (P-gp), Multidrug Resistance-associated Protein (MRP), Breast cancer resistance protein (BCRP), Lung Resistance-related Protein (LRP).

Die Transportproteine P-gp, BCRP und MRPs, die zur letztgenannten Form der Multidrug Resistenz gehören, sind Vertreter der sogenannten ABC („ATP Binding Cassette“) Transportproteine.

1.2 ABC-Transportproteine

Die Superfamilie der ABC-Transporter stellt eine der größten Proteinfamilien dar, die sowohl in Eukaryonten als auch in Prokaryonten bekannt ist. Verglichen mit der Anzahl an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, von denen im menschlichen Organismus etwa 800 existieren,⁸ scheinen die 49 humanen ABC-Transporter auf den ersten Blick von geringerer Bedeutung. Den ABC-Transportern kommt aber eine Schlüsselfunktion bei der zellulären Elimination von endogenen sowie exogenen körperschädigenden Substanzen zu. Die über die Transportergene kodierten Membranproteine, die als zelluläre Effluxpumpen fungieren, kontrollieren die Konzentration intrazellulär potentiell schädigender Verbindungen. Eine der Hauptfunktionen der ABC-Transporter besteht also im Schutz des Gesamtorganismus vor Substanzen mit potentiell toxischem Charakter durch einen aktiven Transport aus dem Zellinnern in den Extrazellulärraum.⁶ ABC-Transporter können in beachtlichen Maße die Pharmakokinetik von Arzneimitteln (ADME = Absorption, Distribution, Metabolisierung, Elimination) beeinflussen und somit entscheidend die Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln verändern.⁹ Die Kenntnis über eine Interaktion von Arzneimitteln mit ABC Transportern ist deshalb von außerordentlichem Interesse. Gerade die Tatsache, dass die Zahl der von

ABC-Transportern erkannten Verbindungen sehr groß ist, stellt bei jeder Neuentwicklung eines Arzneimittels die Frage, ob dieses mit ABC-Transportern in Wechselwirkung tritt, oder nicht.

ABC-Transportproteine können die unterschiedlichsten Substanzklassen, wie z.B. Phospholipide, Polysaccharide, Steroide, Ionen, Aminosäuren, Gallensalze oder Peptide entgegen dem Konzentrationsgradienten durch Membranen transportieren. Der gezielte Transport von Zellbestandteilen bedingt, dass ABC-Transportern eine Steuerung der Zellfunktion zugesprochen werden kann.

Tabelle 1.1: Humane Erbkrankheiten, deren Ursache auf einen genetischen Defekt von ABC-Genen zurückgeht.^{10,11,12}

Transporter/Gen	Krankheit
ABC1 (ABCA1)	Tangier Krankheit
ABCR (ABCA4)	Retinitis Pigmentosa Stargard Krankheit (STGD) Altersbedingte Makuladegeneration (AMD)
ABC7 (ABCB7)	Sideroplastische Anämie und Ataxie
ALD (ABCD1)	Adrenoleukodystrophie
BSEP (ABCB11)	Progressive interhepatische Cholestasis (ICP)
CFTR (ABCC7)	Cystische Fibrose (Mucoviszidose)
MRP2 (ABCC2)	Dubin-Johnson-Syndrom (DJS)
MRP6 (ABCC6)	Pseudoxanthoma elasticum
PGY3 (ABCB4)	Progressive familiäre intrahepatische Cholestasis (PFIC3)
SUR1(ABCC8)	Familiäre persistente Hyperinsulinämie des Kindesalters
TAP2 (ABCB3)	Immundefizienz
White3/4 (ABCG5/ABCG6)	Sisterolämie

Genetische Defekte einiger Transporter führen zur Ausbildung humaner Erbkrankheiten. Einige dieser humanen Erbkrankheiten sowie deren korrespondierende ABC-Gene sind in Tabelle 1.1 aufgeführt.^{10,11,12}

Die primär in dieser Arbeit erwähnten ABC-Transportproteine sind in der Zellmembran lokalisiert. Sie sind auf der Webseite <http://www.nutrigene.4tcom/humanabc.htm> beschrieben.

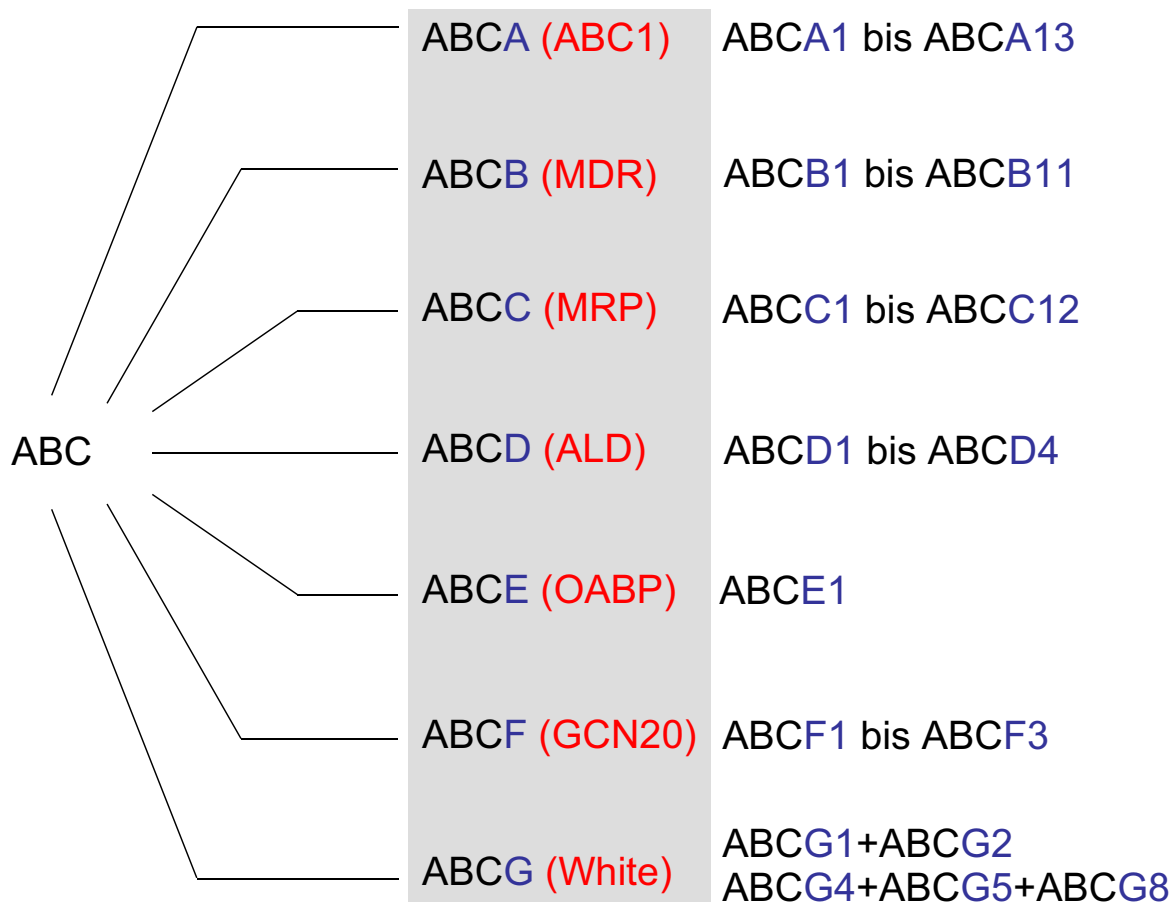


Abb. 1.1: Die ABC-Transportfamilie, alte Bezeichnungen der einzelnen ABC-Subfamilien (rot hervorgehoben), Gen-Nomenklatur der einzelnen Transportproteine einer Subfamilie.

Die ABC-Transportproteine werden in sieben unterschiedliche Subfamilien untergliedert, die alphabetisch nummeriert werden: ABCA bis ABCG. Die alten Bezeichnungen der sieben Subfamilien sind in Abb. 1.1 wiedergegeben und rot hervorgehoben (ABC1 bis White). Neben den Familiennamen ist die Gen-Nomenklatur für die einzelnen Transportproteine einer Familie aufgeführt.

Eine Gemeinsamkeit aller ABC-Transporter besteht darin, dass die notwendige Energie für den Efflux der Verbindungen aus der Zelle durch die Hydrolyse von ATP bereitgestellt wird.¹³

Der allgemeine Aufbau eines ABC-Transportproteins umfasst ein transmembranäres Segment und eine Nukleotidbindungsstelle. Das transmembranäre Segment beinhaltet in der Regel sechs α -Helices, die Nukleotidbindungsstelle ist im Zytoplasma lokalisiert.

Die in Abb. 1.2 dargestellten ABC-Transportproteine können ausgehend von ihrem Topo-

logiemodell in vier verschiedene Klassen unterteilt werden.^{14,15}

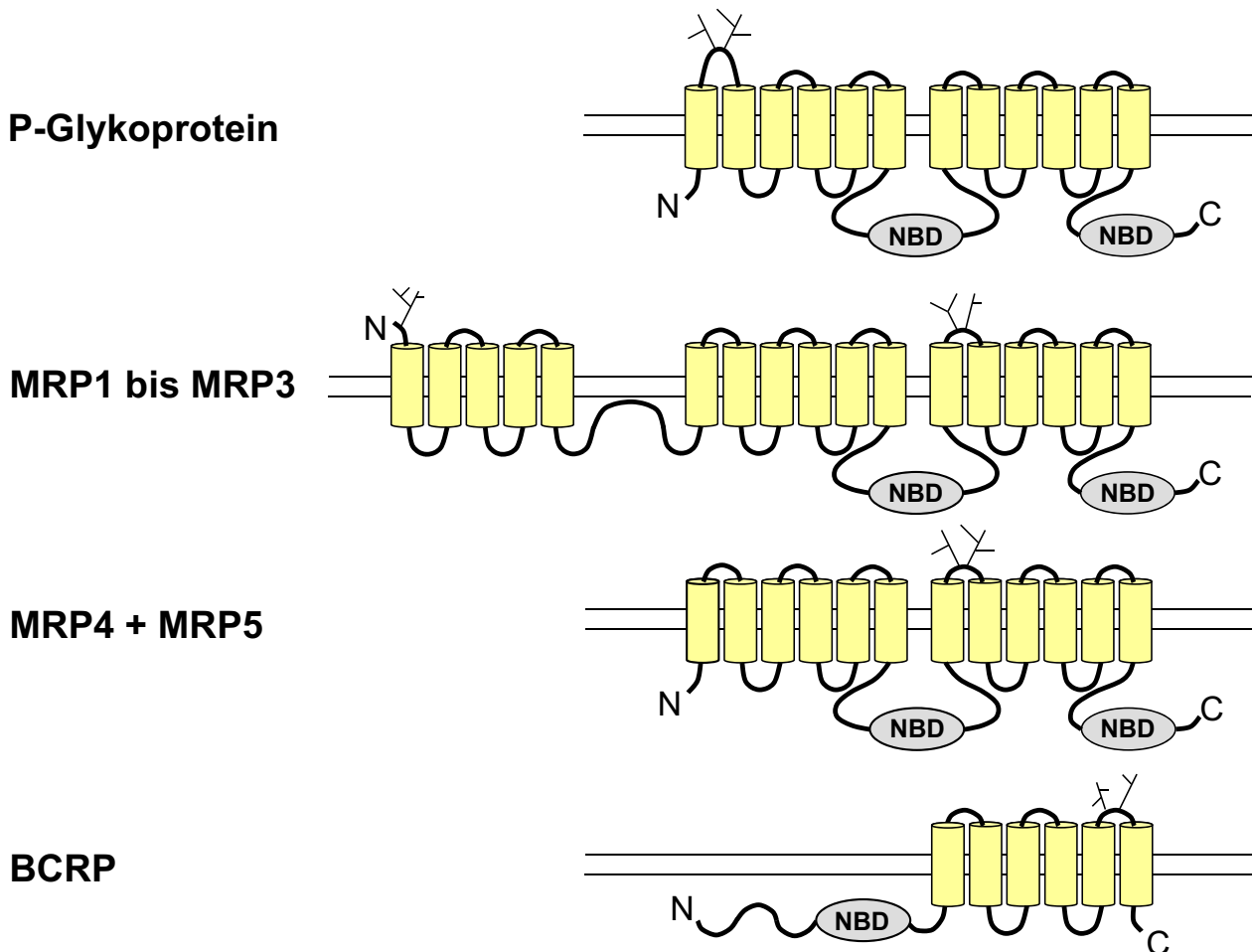


Abb. 1.2: Topologiemodelle für verschiedene Transportproteine: P-gp, MRP1-3, MRP4-5 und BCRP. Die transmembranären Domänen sind gelb hervorgehoben, die Nukleotidbindungsstellen sind grau gefärbt.^{14,15}

Die transmembranären Domänen sind gelb hervorgehoben, die Nukleotidbindungsstellen sind in grauer Farbe wiedergegeben. P-Glykoprotein besteht aus zwei sehr ähnlichen Hälften, jede dieser Hälften beinhaltet sechs transmembranäre Helices und eine ATP Bindungsstelle. Die erste extrazelluläre Schleife ist N-glykosyliert. MRP4 und MRP5 – zwei Vertreter der MRP Familie - besitzen einen nahezu identischen Aufbau wie P-gp, nur ist hier nicht die erste, sondern die vierte extrazelluläre Schleife glykosyliert. MRP1 bis MRP3 haben einen ähnlichen Aufbau wie MRP4 und MRP5, jedoch ist das N-terminale Ende um fünf transmembranäre Segmente erweitert. Das N-terminale Ende von MRP1 bis 3 ist im Gegensatz zu allen anderen hier dargestellten Transportproteinen auf der extrazellulären

Seite lokalisiert. BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) stellt einen Halbtransporter dar, der nur eine ATP Bindungsstelle sowie sechs transmembranäre Helices umfasst. Die eigentliche Transportfunktion erreicht BCRP in Analogie zu anderen Halbtransportern wie LmrA und MsbA erst als sogenanntes Homodimer. Die N-Glykosylierung ist ohne Einfluss auf die Transportfunktion.^{6,14,15,16}

P-gp ist vornehmlich in den Endothelzellen im Körper anzutreffen, dort ist es im apikalen Teil der Zellmembran lokalisiert. P-gp Substrate werden deshalb von der basolateralen zur apikalen Seite von Endothelzellen transportiert. Abb. 1.3 veranschaulicht, in welche Richtung die einzelnen Transportproteine ihre Pumpaktivität in Nierenepithelzellen entwickeln. Die Transportrichtung von MRP1, MRP3, MRP5 und MRP6 (apikal nach basolateral) ist der Transportrichtung von P-gp, MRP2, MRP4 und BCRP (basolateral nach apikal) entgegengesetzt. Die sogenannten tight junctions sind in rot wiedergegeben.¹⁴

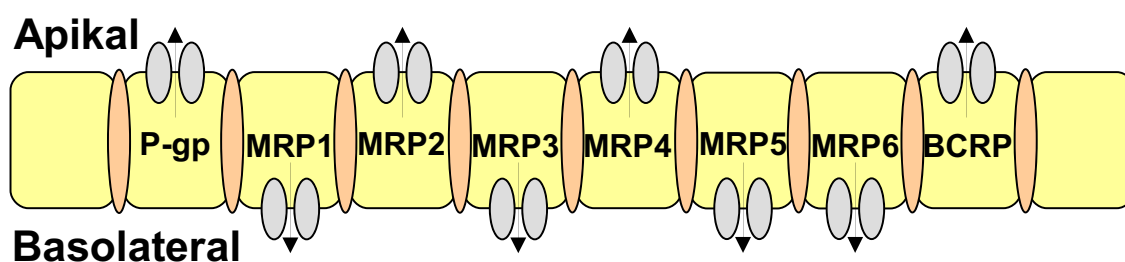


Abb. 1.3: Einige ABC-Transportproteine und deren Transportrichtung am Beispiel von Nierenepithelzellen. Man beachte, dass die Transportrichtung von MRP4 in Prostatakarzinomzellen nach basolateral gerichtet ist.¹⁴

1.3 P-Glykoprotein

Im Fokus dieser Arbeit steht der ABC-Transporter P-Glykoprotein. Die folgenden Kapitel sollen einen genauen, ausführlichen Überblick über diesen ABC-Transporter vermitteln.

P-gp (ABCB1) wurde im Jahr 1976 von Juliano und Ling¹⁷ in einem resistenten Tumor der Ovarien chinesischer Hamster nachgewiesen und kann als der am besten untersuchte ABC-Transporter angesehen werden.¹⁹ P-gp weist ein Molekulargewicht von ca. 170 kDa auf, die nicht glykosylierte Form besitzt ein Molekulargewicht von 130 kDa. Das Protein enthält insgesamt 1280 Aminosäuren.^{14,15,16} Die beiden aus sechs transmembranären Helices und je einer Nukleotidbindungsstelle bestehenden Hälften beinhalten jeweils 590 Ami-

nosäuren, die über eine Linkerregion mit 60 Aminosäuren miteinander verknüpft sind. Jede transmembranäre Helix beinhaltet 21 Aminosäuren, die in der Membran lokalisiert sind. Dieser Teil des Proteins ist von entscheidendem Interesse, da für die Bindung der Substrate bzw. Modulatoren verantwortlich ist. Die beiden hydrophilen, im Cytoplasma lokalisierten Nukleotidbindungsstellen machen den größten Teil des Proteins aus (As 351 bis As 712 und As 994 bis 1280).^{19,20} In Abb. 1.4 ist ein Topologiemodell von P-gp zu erkennen, gelb hervorgehoben sind die NBDs, die Primärsequenz der innerhalb der Plasmamembran lokalisierten Aminosäuren und deren Position innerhalb der Gesamtprimärsequenz ist angegeben.^{16,18,19,20}

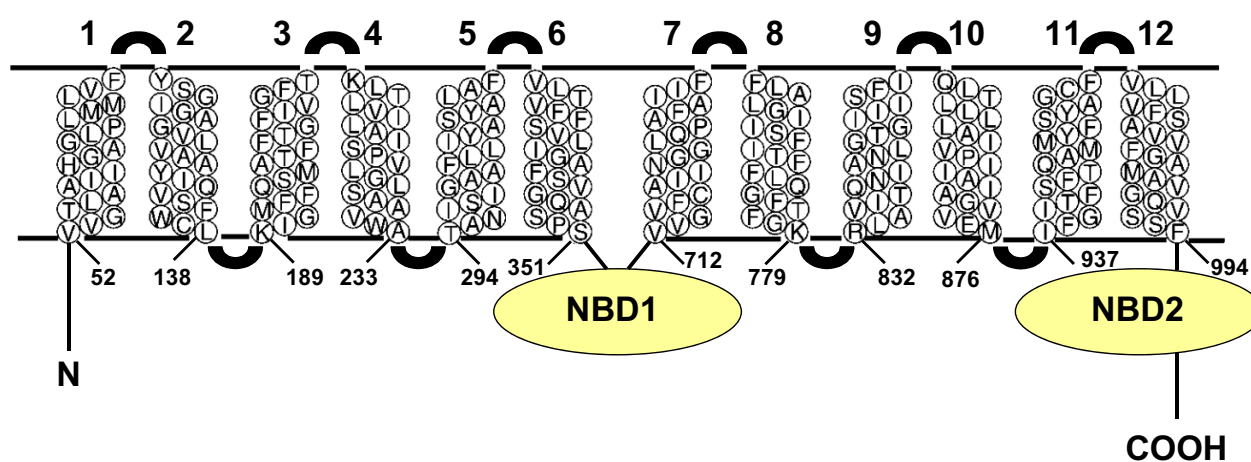


Abb. 1.4: Topologiemodell von P-gp, gelb hervorgehoben sind die NBDs, darüberhinaus ist die Primärsequenz der innerhalb der Plasmamembran lokalisierten Aminosäuren und deren Position innerhalb der Gesamtprimärsequenz aufgeführt.²⁰

Die beiden Hälften von P-gp weisen eine Sequenzhomologie von 43% zueinander auf. Zur humanen MDR-Familie gehören zwei MDR-Gene: ABCB1 und ABCB2. Entsprechende Gene kommen nicht nur im Menschen vor, sondern auch in anderen Organismen. Dabei ist die Sequenzhomologie der einzelnen Spezies, die in Tabelle 1.2 enthalten sind, bemerkenswert. Bei einem Vergleich der Aminosäuresequenz des Menschen und der Maus ergibt sich eine Homologie von annähernd 80%. Tabelle 1.2 gibt für die einzelnen Organismen nur die Gene an, die das Phänomen der MDR vermitteln.^{134,21}

Tabelle 1.2: Verschiedene Spezies und dazugehörige MDR-Gene, die MDR vermitteln.^{12,21}

Spezies	MDR-vermittelnde Gene	
Mensch	MDR1	
Ratte	mdr1a	mdr1b
Hamster	pgp1	pgp2
Maus	mdr1a	mdr1b

P-gp ist in der Lage eine Vielzahl von Verbindungen, die den unterschiedlichsten Strukturklassen angehören, zu erkennen und zu transportieren. Einige Verbindungen, die einheitlich in der Literatur als P-gp Substrate bezeichnet werden, sind in Tabelle 1.3 aufgeführt. Dabei sind Zytostatika, die P-gp Substrate sind, nicht enthalten, diese werden in Kap. 1.4 behandelt (s. Tabelle 1.4).

Tabelle 1.3: P-gp Substrate, die den unterschiedlichsten Arzneistoff- und Strukturklassen angehören. Zusammenstellung der Tabelle nach Varma et al.²², Hoffmann et al.¹⁵, Schinkel et al.¹⁴

Arzneistoffklasse/Substanzgruppe	Vertreter
Analgetika	Morphin, Methadon
Antibiotika	Erythromycin, Valinomycin
Antidiarrhoika	Loperamid
Antiemetika	Ondansetron, Domperidon
Fluoreszenzmarker	Calcein-AM, BCECF-AM, Rhodamin 123, Hoechst 33342, Hoechst 33258, Fura-2, Fluoro-2
Herzglykoside	Digoxin
H ₂ -Rezeptorantagonisten	Cimetidin
HIV-Protease-Inhibitoren	Saquinavir, Ritonavir, Nelfinavir
Insektizide	Ivermectin

Eine strukturelle Gemeinsamkeit der transportierten Verbindungen ist nicht gegeben, es kann lediglich hervorgehoben werden, dass die mit P-gp interagierenden Substanzen ein Molekulargewicht zwischen 200 Da und 1900 Da besitzen sollten.¹⁴ Die meisten der Substanzen enthalten aromatische Strukturelemente, aber genauso werden nicht-aromatische, lineare oder zyklisierte Verbindungen von P-gp erkannt. Meist sind die Verbindungen neutral oder besitzen basische Eigenschaften. Gemeinsam ist den Strukturen le-

diglich ein amphipathischer Charakter. Diese Eigenschaft steht in Zusammenhang mit dem Konformationswandel, den P-gp während des Transportes eines Substrates durchläuft. Die Substratbindungsstelle bzw. Bindungsregion ist auf der Innenseite der Plasmamembran innerhalb der transmembranären Domänen lokalisiert, für eine Interaktion mit der Substratbindungsstelle sind gewisse hydrophobe Eigenschaften notwendig. Durch den Konformationswandel wird die Substratbindungsstelle zum Extrazellulärraum hin exponiert, für eine Dissoziation von der Substratbindungsstelle sind hydrophile Eigenschaften von Vorteil.^{14,15,18,25,26}

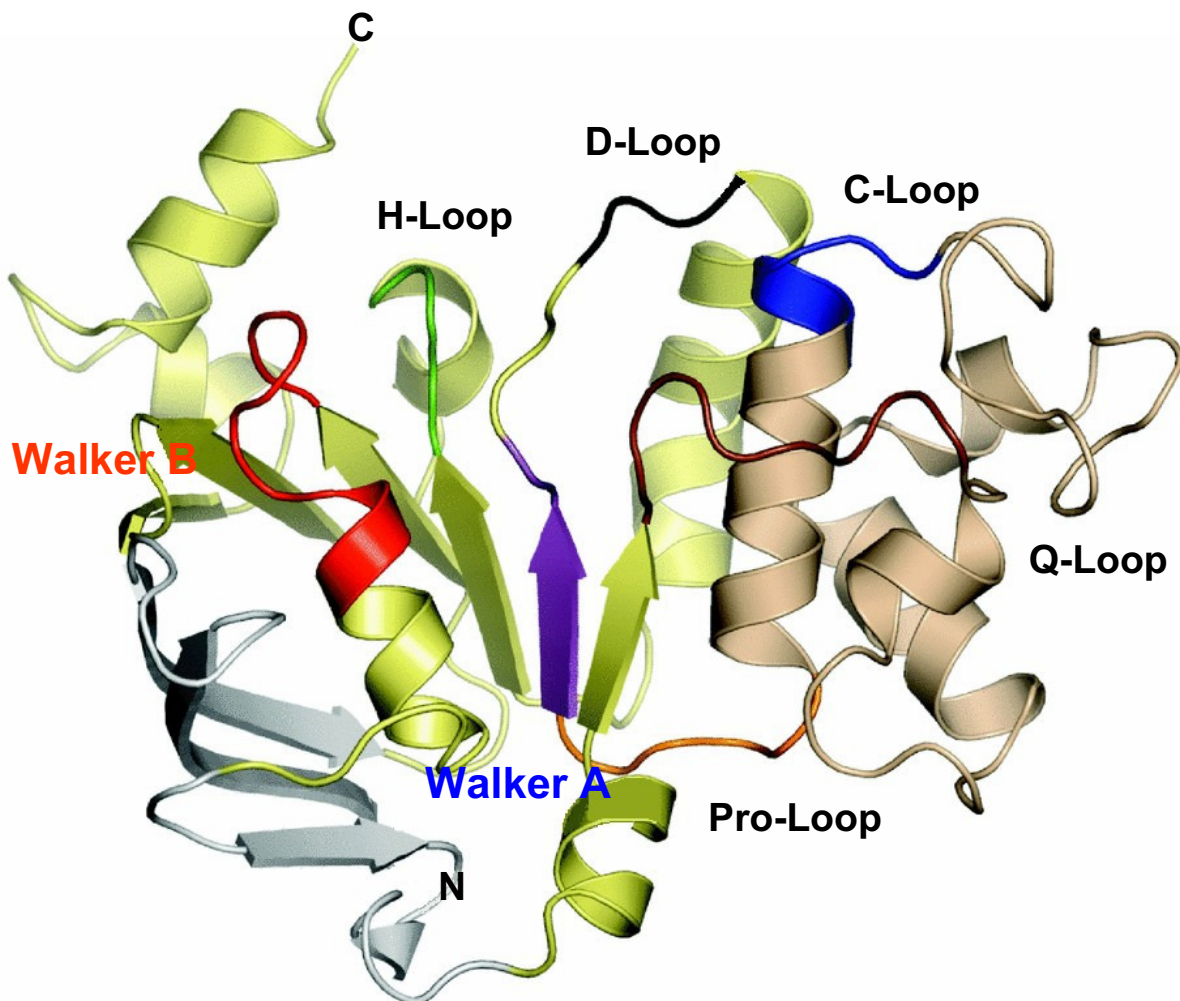


Abb. 1.5: Modell einer Nukleotidbindungsstelle der ABC-Transporterfamilie.^{23,24}

Ein wesentliches Charakteristikum aller ABC-Transporter stellen die Nukleotidbindungsstellen dar, die durch ATP-Bindung und Hydrolyse den Transport der Substrate gewährleisten. Die Nukleotidbindungsstellen sind im Gegensatz zu den transmembranären Be-

reichen hochkonserviert. Jede NBD umfasst etwa 250 Aminosäuren. Die NBDs stellen die Energie für die Konformationsänderung des Proteins und den Transport des Substrates zur Verfügung. Aus den Kristallstrukturen einiger isolierter Nukleotidbindungsstellen konnten in der Vergangenheit wesentliche Informationen gewonnen werden. Eine NBD besteht aus zwei Domänen bzw. Regionen: (i) Eine sogenannte RecA-Unterdomäne: Diese ist aus zwei β -Faltblättern und sechs α -Helices aufgebaut. (ii) Eine helikale Unterdomäne, die drei bis vier α -Helices umfasst und für ABC-Transporter spezifisch ist, da sie in anderen ATPasen nicht vorkommt. Jede NBD enthält mehrere charakteristische Motive, von denen die bedeutendsten das Walker-A-, das Walker-B-Motiv sowie die sogenannte ABC-Signatur (C-loop) sind. Walker-A- und Walker-B-Motive sind entscheidend für die Bindung der Phosphatgruppen des ATP (Lysin aus Walker A) und die Koordination von Mg^{2+} über H_2O in die NBD (Asparaginsäure aus Walker B). Das Walker-A-Motiv weist die Sequenz GX_4GKS/T auf. X steht hier für eine beliebige Aminosäure. Das Walker-B-Motiv zeichnet sich durch vier hydrophobe Aminosäuren aus. Walker-A- und Walker-B-Motive kommen auch in anderen ATP- und GTP-bindenden Molekülen vor. Zwischen der Walker-A- und Walker-B-Sequenz befindet sich die sogenannte C-Schleife (ABC-Signatur), die für ABC-Transporter charakteristisch ist (Konsensussequenz: LSGQQ). Die sogenannte Q-Schleife bildet Wasserstoffbrücken aus und interagiert mit Mg^{2+} und H_2O . Die Flexibilität der Q-Schleife soll eine bedeutende Funktion bei der Kopplung von ATP-Hydrolyse und Transport besitzen. Die sich an das Walker-B-Motiv anschließende Aminosäure Glutaminsäure kann als katalytische Basis der ATP-Hydrolyse angesehen werden. Eine Mutation dieser Aminosäure führt zum Verlust der ATPase-Aktivität. Die D-Schleife befindet sich C-terminal vom Walker-B-Motiv (Konsensussequenz: SALD). Weitere Motive verfügen nur über einen konservierten Rest (Q,P,H,G). Diese Motive sind dennoch charakteristisch für die NBDs von ABC-Transportproteinen. Eine bedeutende Eigenschaft der NBDs besteht auch in ihrer Fähigkeit dimerisieren zu können, die für die Funktion wichtig ist.^{23,24}

1.4 Bedeutung von P-Glykoprotein

P-Glykoprotein besitzt eine herausragende Bedeutung als Resistenzmechanismus von Tumorzellen. Tumorzellen, die mit Zytostatika behandelt werden, versuchen durch eine gesteigerte „Expression“ (Ausbildung) von Transportproteinen die Zytostatika aus den Krebs-

zellen herauszuschleusen. Die Zytostatika, die von P-gp als Substrate erkannt werden, gehören den unterschiedlichsten Strukturklassen an. Einige Zytostatika, die auch P-gp Substrate darstellen, sind in der nachfolgenden Tabelle 1.4 zusammengestellt.

Tabelle 1.4: Zytostatika, die P-gp Substrate darstellen, nach Wiese et al.²⁵ und Litman et al.²⁶

Zytostatikaklasse	Beispiele/Vertreter
Alkylantien	Mitomycin
DNA Interkalatoren	
Anthrazykline/Anthrachinone	Daunorubicin, Doxorubicin, Mitoxantron
Actinomycine	Dactinomycin
Mitosehemmstoffe	
Podophyllotoxine	Etoposid, Teniposid
Colchicumalkaloide	Colchicin
Taxole	Paclitaxel, Docetaxel
Vincaalkaloide	Vinblastin, Vincristin, Vindesin
Topoisomerasehemmer	Topotecan, Irinotecan
Peptidantibiotika	Gramicidin

Eine Expression von ABCB1 ist aber nicht nur in Tumorzellen feststellbar, sondern auch in verschiedenen Zellen mit Eliminationsfunktion, wie die nachfolgende Tabelle 1.5 verdeutlicht. Aufgrund dieser Tatsache wird angenommen, dass die physiologische Funktion von P-gp hauptsächlich in einem körpereigenen Schutzmechanismus gegenüber Xenobiotika liegt.^{14,15,16}

P-gp ist ein essentieller Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke und kann so die Penetration von Verbindungen in das Gehirn limitieren. Loperamid, das zur Behandlung der Diarrhoe eingesetzt wird, weist beispielsweise keine zentralen Nebenwirkungen auf, weil es als P-gp Substrat die Blut-Hirn-Schranke nicht oder nur geringfügig überwinden kann.²⁷ Zentrale Nebenwirkungen treten aber dann auf, wenn Modulatoren, wie etwa Chinidin, in Kombination mit Loperamid eingesetzt werden, die P-gp inhibieren und so eine Überwindung der Blut-Hirn-Schranke ermöglichen.⁹ Verbindungen wie Digoxin, Vincristin, Paclitaxel, Vinblastin oder Doxorubicin können sich im Gehirn von *mdr1a(-/-)*-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (mit *mdr1*) in vielfach höherer Konzentration anreichern.²⁸ In der Plazenta ist P-gp in den Syncytioblasten lokalisiert. Hier hat P-gp die Aufgabe den Übertritt von Xe-

nobiotika aus dem Blut der Mutter in das Blut des Fetus zu verhindern. Neben P-gp spielen auch BCRP und MRP2 in der Plazenta eine wichtige Rolle. ABCB1 wird auch in den Epithelzellen des Intestinums exprimiert und nimmt so Einfluss auf die Absorption von oral verabreichten Verbindungen und damit auf deren Bioverfügbarkeit.

Tabelle 1.5: Vorkommen von P-gp im menschlichen Körper.

Organ	Zelltypus und Lokalisation
Niere	Epithelzellen des proximalen Tubulus (apikal/luminal)
Leber	Hepatozyten (kanalikuläre Membran)
Plazenta	Syncytioblasten (apikal)
Gehirn	Endothelzellen der kleinen Blutkapillaren (luminal)
Testis	Endothelzellen der Blutgefäße (luminal)
Darm	Epithelzellen (apikal)
Pankreas	Epithelzellen (apikal)
Knochenmark	CD34 ⁺ Stammzellen
Leukozyten	CD4 ⁺ , CD14 ⁺ , CD15 ⁺ , CD19 ⁺ , CD56 ⁺ Zellen

Wird der Beta-Blocker Talinolol, der auch ein P-gp Substrat darstellt, in Kombination mit Erythromycin verabreicht, erhöht sich die intestinale Absorption und damit Bioverfügbarkeit von Talinolol. Protonenpumpenhemmer wie Omeprazol können die intestinale Aufnahme von Digoxin steigern.²⁹ In der Leber und Niere ist P-gp an den Eliminationsvorgängen beteiligt. Betrachtet man das pharmakokinetische Verhalten von HIV-Protease-Inhibitoren nach oraler Gabe, so resultiert eine Verringerung der Bioverfügbarkeit, da diese Substanzen von P-gp transportiert werden. HIV-Protease-Inhibitoren stellen aber auch Substrate von Cytochrom P450 3A4 dar. Bemerkenswert ist dabei, dass es eine Verknüpfung von Cytochrom P450 3A4 und P-gp geben soll.³⁰ P-gp hat also nicht nur eine Bedeutung als Resistenzmechanismus von Tumorzellen, sondern kann über seine physiologische Funktion die Pharmakokinetik (ADME = Absorption, Distribution, Metabolisierung und Elimination) von Verbindungen verändern. In dem Positionspapier „Kriterien zur Beurteilung von Arzneimittelinnovationen“ hebt die DPhG (Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft) hervor, dass Arzneimittel als innovativ zu beurteilen sind, wenn sie nicht mit P-gp interagieren.

Die Bedeutung von P-gp ist in vielen Bereichen noch nicht aufgeklärt. Neue Studien zei-

gen, dass der Efflux von Amyloid-beta-Peptid über P-gp vermittelt aus dem Gehirn erfolgen und über P-gp Modulatoren inhibiert werden kann.³¹

Zu den weiteren physiologischen Funktionen, die noch Gegenstand aktueller Diskussion sind, in die P-gp involviert ist, gehören: (i) eine Beeinflussung des Lipidstoffwechsels³², (ii) der Transport von Cytokinen, (iii) die Apoptose³³, (iv) die T-Zell-Aktivierung.³⁴

1.5 Substrate und Modulatoren

Zur Unterscheidung von Substraten und Modulatoren existieren in der Literatur unterschiedliche Lösungsansätze. Die Klassifizierung von Substraten und Modulatoren nach Polli et al. basiert auf drei funktionellen Testsystemen: Dem ATPase Assay, dem Monolayer-Transportassay an Caco-2 Zellen und dem Calcein AM Assay.³⁵ Beim ATPase Assay wird die durch eine Substanz hervorgerufene Stimulation der ATPase-Aktivität des P-Glykoproteins bestimmt. Beim Monolayer-Transport-Assay wird das Verhältnis der beiden Transportrichtungen basolateral → apikal und apikal → basolateral ermittelt. Ein verstärkter Transport von basolateral nach apikal wird durch P-gp vermittelt. Eine Substanz, die keine Substrateigenschaften aufweist, zeigt in allen drei Assays keine Aktivität. Eine Verbindung, die nur eine Erhöhung der Calcein-Akkumulation hervorruft, kann als Inhibitor eingestuft werden. Ein wichtiges Merkmal eines solchen Inhibitors ist die Tatsache, dass dieser im Gegensatz zum Substrat nicht transportiert wird.

Tabelle 1.6: Kriterien zur Unterscheidung von Substraten und Modulatoren nach Polli et al.³⁵

Klassifizierung	Monolayer Transport	ATPase Assay	Calcein AM Assay
Eindeutiges Substrat	+	+	+
Transportiertes Substrat	+		
Nicht-transportiertes Substrat	-	+	+
Kein Substrat	-	-	-
Inhibitor	-	-	+
Kein Inhibitor	-	-	-

Eine Substanz, die im Monolayer-Transport-Assay von basolateral nach apikal eine deutlich geringere Diffusionsgeschwindigkeit besitzt, kann als eindeutiges, transportiertes Substrat angesehen werden. Verbindungen, die eine Stimulation der ATPase-Aktivität bewir-

ken, aber im Monolayer-Transport-Assay keine Abhängigkeit der Diffusionsgeschwindigkeit von der Transportrichtung aufweisen, werden als nichttransportierte Substrate verstanden (vergl. Tabelle 1.6).

Eytan et al. stellten fest, dass ein wesentliches Kriterium zur Unterscheidung von Substraten und Modulatoren darauf beruht, wie schnell diese ins Gleichgewicht mit P-gp kommen.³⁶ Substrate und Modulatoren gelangen über passive Diffusion in die Zelle, P-gp vermindert den Einstrom dieser über aktiven Efflux. Modulatoren besitzen eine hohe Diffusionsgeschwindigkeit, der über P-gp vermittelte Efflux fällt kaum ins Gewicht, weil die Modulatoren mit hoher Geschwindigkeit wieder schnell in die Membran aufgenommen werden. Substrate dagegen besitzen eine wesentliche geringere Diffusionsgeschwindigkeit, der über P-gp vermittelte Efflux macht sich stärker bemerkbar.

Bei der Behandlung von Tumoren mit Zytostatika bezieht sich der Begriff des Substrates auf Zytostatika, welche die Expression des ABCB1-Gens verstärken und damit eine P-gp vermittelte Resistenz induzieren. Bei den Modulatoren handelt es sich um Verbindungen, die eine solche Resistenz wieder aufheben. Dabei bleibt die eigentliche Expression des ABCB1-Gens unbeeinflusst. Der Modulator verdrängt das Substrat aus dessen Bindung gegenüber P-gp und gewährleistet, dass die intrazelluläre Konzentration des Zytostatikums wieder ansteigt.

1.6 P-gp Modulatoren

1.6.1 P-gp Modulatoren der ersten Generation

Im Jahr 1981 wurde von Tsuru et al. die Entdeckung gemacht, dass der Calcium-Kanal-Blocker Verapamil in der Lage ist, die Akkumulation des Zytostatikums Vincristin in einer ABCB1 überexprimierenden Zelllinie zu erhöhen und damit die Multidrug-Resistenz aufzuheben.³⁷ In den folgenden Jahren konnten weitere Calcium-Kanal-Blocker als P-gp Inhibitoren identifiziert werden: Nicardipin,³⁸ Nifedipin,³⁸ Bepridil,³⁹ Diltiazem.³⁸ Neben den Calcium-Kanal-Blockern konnten zahlreiche weitere Verbindungen als P-gp Inhibitoren charakterisiert werden, von denen einige in Tabelle 1.7 aufgeführt sind.

Tabelle 1.7: Modulatoren, die den verschiedensten Arzneistoffklassen angehören, nach Varma et al.²² und Wiese und Pajeva.²⁵

Arzneistoffklasse	Beispiel
Antiarrhythmika	Amiodaron, Chinidin
Antibiotika	Erythromycin
Antidepressiva	Imipramin, Desipramin
Antidiarrhoika	Loperamid
Antiestrogene	Tamoxifen, Toremifen
Antihistaminika	Terfenadin, Diphenhydramin
Antimykotika	Ketoconazol, Itraconazol
Antimalariamittel	Chinin, Chloroquin,
Beta-Blocker	Metoprolol, Propranolol
Calcium-Kanal-Blocker	Verapamil, Diltiazem, Nifedipin
HIV-Proteaseinhibitoren	Saquinavir, Indinavir
Immunsuppressiva	Cyclosporin A
Neuroleptika	Chlorpromazin, Trifluoperazin
Steroidhormone	Progesteron, Testosteron
Vasodilatoren	Dipyridamol

Dabei gehören die Modulatoren der ersten Generation (wie auch die Substrate) den verschiedensten Arzneistoff- und Strukturklassen an. Wie ausgeprägt die strukturelle Vielfalt der Modulatoren ist, kann der Abb. 1.6 entnommen werden, in der die Strukturformeln einiger Verbindungen wiedergegeben sind.

Eine Gemeinsamkeit der Modulatoren der ersten Generation ist ihre geringe Affinität gegenüber P-gp. Für einen therapeutischen Einsatz dieser Verbindungen als P-gp Inhibitoren wären somit *in vivo* zu hohe Dosen notwendig. Hohe Dosen bedingen, dass die eigentliche, pharmakologische Eigenwirkung dieser Substanzen immer mehr in den Vordergrund tritt und eine Intoxikation des Patienten in Kauf genommen wird.⁴ Therapielimitierende, toxische Nebenwirkungen von Modulatoren sind durch verschiedene Studien belegt: Ovarialkarzinompatienten mit Multidrug-Resistenz, die mit Doxorubicin in Kombination mit Verapamil behandelt wurden, litten unter stark ausgeprägten kardiotoxischen Nebenwirkungen.⁴⁰ Die Verwendung des Modulators und Calmodulin-Inhibitors Trifluoperazin war mit dem Auftreten von extrapyramidalen Nebenwirkungen und Neutropenie verbunden.^{4,41} Der Einsatz von Cyclosporin A als P-gp Modulator wurde durch Nebenwirkungen

wie Nephrotoxizität und Immunsuppression limitiert.⁴²

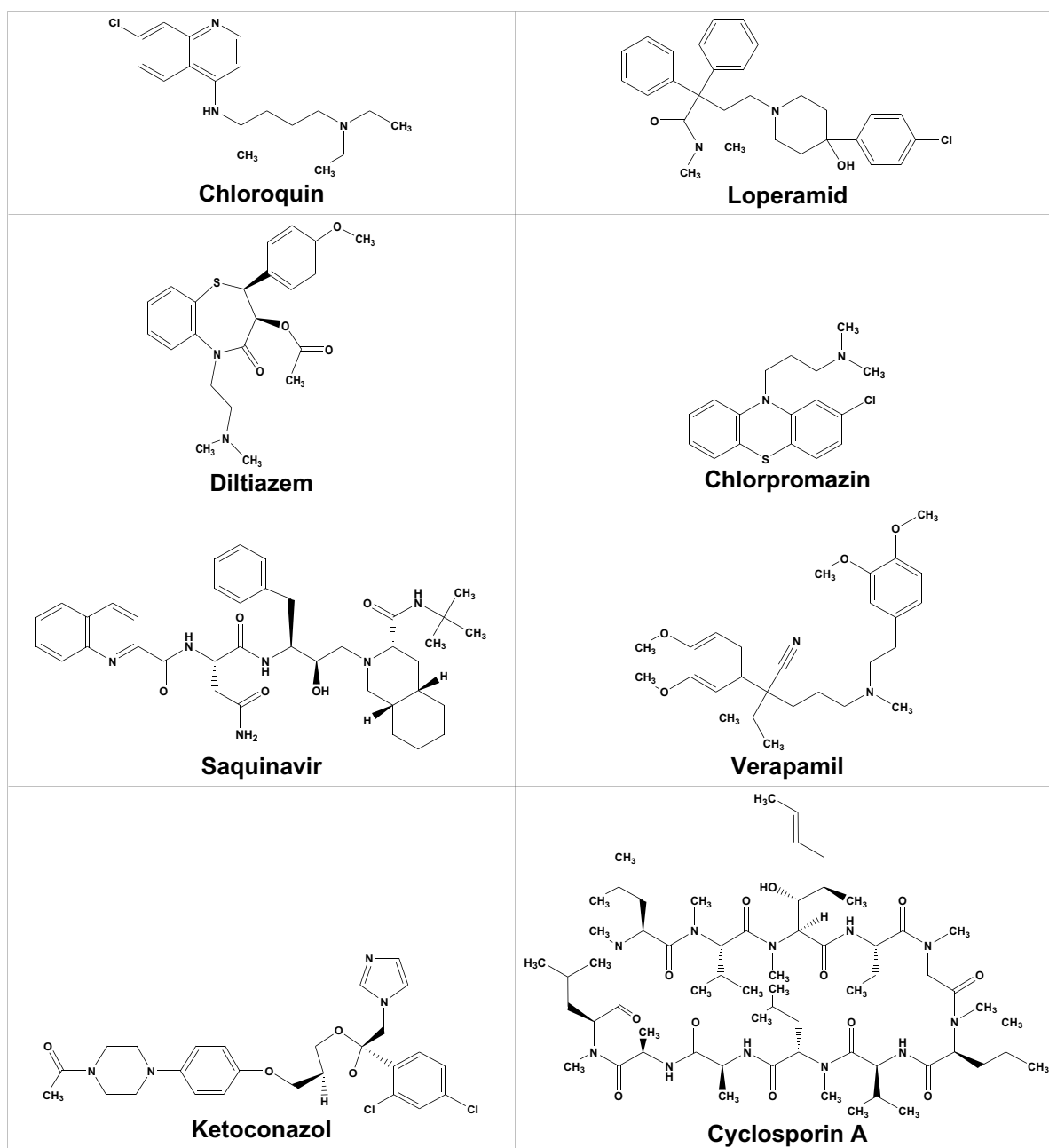


Abb. 1.6: Strukturformeln einiger Modulatoren der ersten Generation.

1.6.2 P-gp Modulatoren der zweiten Generation

Hintergrund für die Weiterentwicklung der Modulatoren der ersten Generation waren die erläuterten, den therapeutischen Einsatz limitierenden toxischen Nebenwirkungen. Die

Modulatoren der zweiten Generation leiten sich von den Modulatoren der ersten Generation ab. Sie weisen aber im Gegensatz zu diesen eine wesentlich geringere Toxizität und häufig höhere Affinität gegenüber P-gp auf. Die folgende Tabelle 1.8 beinhaltet einige Modulatoren der zweiten Generation und gibt an, auf welche Modulatoren der ersten Generation diese zurückgehen.^{4,43}

Tabelle 1.8: Beispiele für Modulatoren der zweiten Generation und deren korrespondierende Analoga der ersten Generation.

Modulatoren der zweiten Generation	Analogon der ersten Generation
Dexverapamil	Verapamil
Valspodar (PSC 833)	Cyclosporin A
Dexniguldipin	Nifedipin
Roll-2933	Tiapamil
trans-Flupentixol	Flupentixol, Trifluoperazin

Das von Cyclosporin A abgeleitete PSC 833 (Valspodar) inhibiert im Vergleich zu Cyclosporin A P-gp etwa um den Faktor 10 stärker,⁴³ was in *in vitro*-Studien mit verschiedenen Zelllinien dokumentiert werden konnte.⁴⁴ Neben der ausgeprägten Affinität konnte für PSC 833 eine höhere Spezifität zu P-gp nachgewiesen werden, die mit der Abnahme der immunsuppressiven Nebenwirkungen einhergeht. Valspodar interagiert aber nicht nur mit P-gp, sondern stellt ebenfalls ein Substrat von Cytochrom P450 3A4 dar.⁴³ Zytostatika wie Etoposid, Paclitaxel oder Vinblastin werden über Cytochrom P450 3A4 metabolisiert. Valspodar nimmt somit Einfluss auf die pharmakokinetischen Eigenschaften dieser Substanzen und kann eine unvorhersehbare Veränderung der Plasmakonzentration der Zytostatika hervorrufen, die mit einer massiven, lebensbedrohlichen Intoxikation des Patienten verbunden sein kann.

1.6.3 P-gp Modulatoren der dritten Generation

Die Modulatoren der dritten Generation leiten sich im Gegensatz zu den Modulatoren der ersten oder der zweiten Generation nicht von bestehenden, bekannten Arzneistoffklassen ab. Diese Modulatoren stellen neuartige Verbindungen dar, die bereits im mittleren und

hohen nanomolaren Konzentrationsbereich P-gp effektiv inhibieren. Einige der Modulatoren der dritten Generation sind in Abb. 1.7 zusammengestellt. Die Modulatoren der dritten Generation wurden mit Hilfe von Struktur-Wirkungsbeziehungen und kombinatorischer Chemie entwickelt. Im Fokus stand dabei neben einer hohen Affinität zu P-gp auch der Wunsch, die mit den Modulatoren der zweiten Generation verbundene therapielimitierende Nebenwirkung, die Beeinflussung der Pharmakokinetik der Zytostatika, zu überwinden.

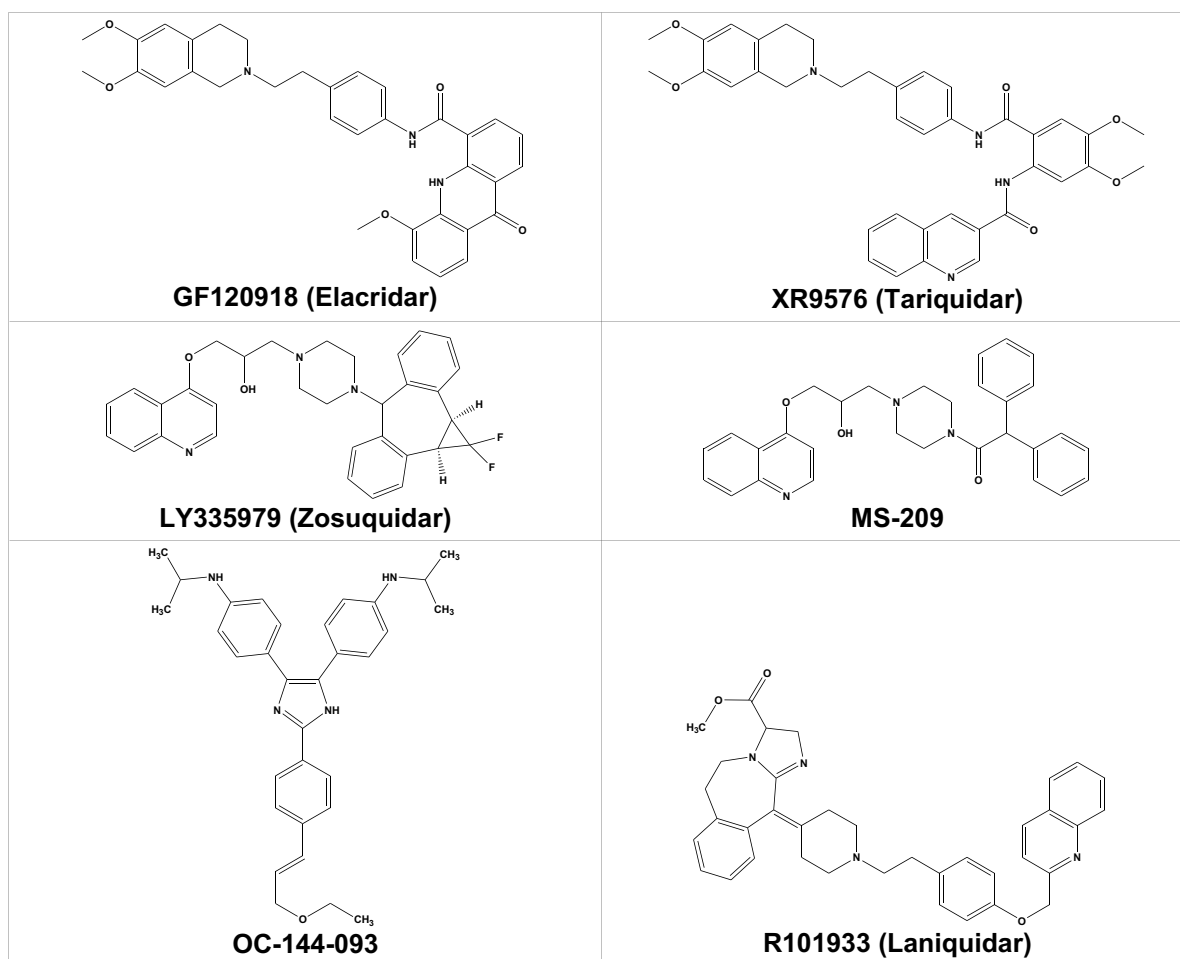


Abb. 1.7: Beispiele für Modulatoren der dritten Generation.

Das Anthranilsäurederivat XR9576 (Tariquidar) besitzt eine geringe Affinität gegenüber Cytochrom P450 3A4, so dass die Metabolisierung von beispielsweise Paclitaxel ungehindert erfolgen kann und die Plasmaspiegel unbeeinflusst bleiben. Ausgeprägte Affinität bei gleichzeitiger geringer Toxizität tragen dazu bei, dass die Verbindung Tariquidar als einer der vielversprechendsten Modulatoren angesehen werden kann. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass XR9576 mit mehreren Bindungsstellen von P-gp interagieren soll. Die durch

Tariquidar vermittelte Inhibition ist langandauernd; Studien zeigten, dass 48 h nach der Entfernung von XR9576 die Inhibition von P-gp noch feststellbar war.⁴⁵ GF120918 (Elacridar) stellt ein zyklisiertes Anthranilsäurederivat dar. Auch Elacridar weist eine hohe Affinität zu P-gp auf und ist wie Tariquidar in der Lage, BCRP zu inhibieren.^{46,43} Im Gegensatz zu Tariquidar und Elacridar besitzt LY335979 (Zosuquidar), das ein Difluorocyclopropyldibenzosuberanderivat darstellt, nicht nur eine hohe Affinität zu P-gp, sondern auch eine ausgeprägte Selektivität; andere Transporter wie BCRP oder MRP1 werden durch LY335979 nicht gehemmt.⁴⁷ Es konnte von Mistry et al. gezeigt werden, dass die pharmakokinetischen Eigenschaften von Docetaxel, Etoposid, Paclitaxel durch Zosuquidar nicht verändert werden.⁴⁸

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde kein Modulator als Arzneimittel zur Behandlung einer Multidrug Resistenz im Rahmen einer Tumorthherapie mit Zytostatika zugelassen. Betrachtet man abgeschlossene klinische Phase III Studien, bei denen Modulatoren in Kombination mit Zytostatika eingesetzt wurden, so ist die Gesamtlage ernüchternd. Trotz einer Vielzahl klinischer Phase III Studien mit Modulatoren, deren Beginn bis in das Jahr 1992 zurückreichen, konnte nur für zwei Modulatoren ein therapeutischer Nutzen festgestellt bzw. belegt werden. Bei diesen Verbindungen handelt es sich lediglich um Vertreter der Modulatoren der ersten Generation:

- Cyclosporin A, das bei Patienten mit AML (Akuter Myeloischer Leukämie), die als Zytostatika Cytarabin und Daunorubicin erhielten, eingesetzt wurde (1998).⁴⁹
- Chinin, das im Rahmen der Behandlung von Patienten mit AML in Kombination mit den Zytostatika Idarubicin, Mitoxantron und Cytarabin angewendet wurde (1999).⁵⁰

Beide Studien, bei denen die Mortalitätsrate signifikant abnahm, dokumentieren, dass Modulatoren zur Aufhebung einer Multidrug Resistenz erfolgreich eingesetzt werden können. Eine wesentliche Voraussetzung, die bei der Beurteilung des therapeutischen Nutzens eines Modulators erfüllt werden muss, besteht darin, dass nur solche Patienten in die Studie einbezogen werden, deren Tumore ABCB1 überexprimieren. Beispielsweise wurde Tariquidar im Jahr 2002 bei Krebspatienten im Rahmen einer klinischen Studie verabreicht, ohne zu wissen, ob deren Tumore ABCB1 tatsächlich überexprimieren.⁵¹ Klinische Studien mit den prominenten und vielversprechenden Modulatoren der 3. Generation Tariquidar und Zosuquidar dauern noch an (bzw. wurden wieder aufgenommen). Erst die Ergebnisse

dieser sowie weiterer Studien lassen ein Gesamturteil über den Nutzen der Modulatoren zur Überwindung einer im Rahmen einer Tumorthherapie auftretenden MDR zu.

In der folgenden Tabelle sind einige weitere Strategien zur Aufhebung bzw. Umgehung einer Multidrug Resistenz aufgeführt, die aber im Rahmen dieser Arbeit nicht behandelt werden:

Tabelle 1.9: Weitere Strategien zur Aufhebung bzw. Umgehung einer Multidrug Resistenz.

(1) Einkapselung von Zytostatika in Liposomen oder Nanopartikel:

Liposomales Doxorubicin wird gegenüber nichtliposomalen Doxorubicin stärker in Tumorzellen aufgenommen.^{52,53}

Die Anwendung von pegyliertem, liposomalen Doxorubicin in Kombination mit Valspodar besitzt eine bessere Verträglichkeit als die Kombination aus freiem Doxorubicin und Valspodar.^{54,55}

(2) P-gp Antikörper wie MRK16, UIC2^{56,57}

(3) Antisense-Strategien gegen die MDR1 mRNA:

Antisensoligonukleotide, siRNA, Ribozyme

Fehlende Effektivität und Spezifität führten dazu, dass diese Verfahren bisher nicht in klinische Studien einbezogen wurden.¹⁹

(4) Transkriptionsregulatoren:

Verminderung der Expression von ABCB1 durch Beeinflussung von Genen, die die Überexpression von ABCB1 regulieren können (möglicherweise: Ecteinascidin).^{58,59}

(5) Zytostatika, die nicht oder nur schlecht von P-gp erkannt werden:

Epothilone, Taxane der zweiten Generation.^{60,61}

1.7 Funktionsweise von P-gp

Zur Funktionsweise von P-gp existieren verschiedene generelle Modelle, von denen die wichtigsten hier kurz vorgestellt werden. Im Fokus dieser Modelle liegt dabei die transportierte Verbindung, die aus der Phospholipidmembran herausgeschleust wird. Die Bedeutung von ATP für den Transport der Substanzen, der Konformationswandel der transmembranären Domänen etc. sind in diese Modelle nicht einbezogen, diese werden erst im folgenden Abschnitt „Transportzyklus von P-gp“ behandelt. Am weitesten verbreitet sind drei Modelle: Das Poren-Modell, das Hydrophobic Vacuum Cleaner-Modell und das Flippase-Modell.^{22,25}

Im sogenannten Poren-Modell werden Substrate im Zytoplasma gebunden und über einen

Kanal aus der Zelle heraustransportiert.

Das prominenteste und favorisierte Modell ist das des „Hydrophobic Vacuum-Cleaner“ ("hydrophober Staubsauger"): Die beiden homologen Hälften des P-Glykoproteins bilden einen Kanal. Über diesen Kanal können die Substanzen (in neutraler Form), während sie durch die Plasmamembran diffundieren, herausgeschleust werden, noch bevor sie das Zytoplasma erreicht haben.⁶²

Das von Higgins et al. entwickelte Flippase-Modell geht davon aus, dass P-gp als eine Flippase funktioniert. Im Flippase-Modell befördert der Transporter den Stoff von der inneren zur äußeren Seite der Phospholipid-Doppelschicht, von wo dieser dann in den Extrazellulärraum entlassen wird.⁶³

1.8 Der Transportzyklus von P-gp

P-Glykoprotein transportiert strukturell sehr unterschiedliche Verbindungen aus der Zellmembran in den Extrazellulärraum. Dabei wird ein komplexer Transportzyklus durchlaufen, der den energieabhängigen Efflux der Substrate gewährleistet.

Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte der Transportzyklus in seiner Gesamtheit nicht aufgeklärt werden. Verschiedene in der Literatur beschriebene Modelle werden im Folgenden kurz vorgestellt:

Das von Higgins und Linton entwickelte sogenannte ATP-Switch-Modell beschreibt einen allgemeinen Transportzyklus für ABC-Transporter (Abb. 1.8).⁶⁴

Im basalen Zustand befinden sich die beiden Nukleotidbindungsstellen in einer offenen Dimerkonfiguration mit einer geringen Affinität zu ATP. Die Substratbindungsstelle ist in Übereinstimmung mit dem HVC-Modell in der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert.

Der eigentliche Transportzyklus beginnt, indem das Substrat an seine Bindungsstelle mit hoher Affinität („high affinity site“) bindet. Durch die Bindung des Substrates steigt die Affinität der NBDs zu ATP und die zur Ausbildung der geschlossenen Dimerform notwendige Aktivierungsenergie nimmt ab.

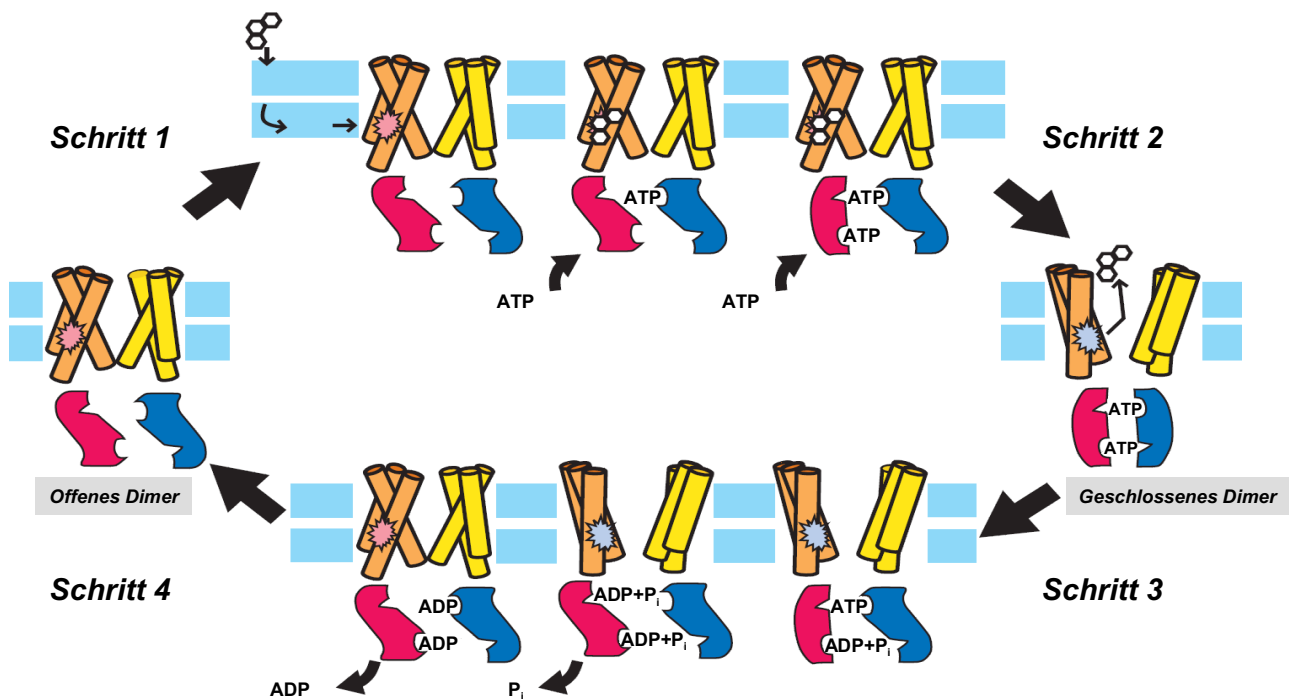


Abb. 1.8: ATP-Switch Modell nach Higgins et al.⁶⁴

Durch die Anlagerung von zwei ATP-Molekülen wird die geschlossene Dimerform erreicht, die eine Konformationsänderung der transmembranären Domänen initiiert. Über die Konformationsänderung vermittelt, wird die Substratbindungsstelle zur extrazellulären Seite exponiert („low affinity site“), das Substrat verliert die Affinität zu seiner Bindungsstelle und kann abdiffundieren. Die sich anschließende Hydrolyse eines ATP-Moleküls führt zur Ausbildung eines Übergangszustandes. Nach der Hydrolyse des zweiten ATP-Moleküls, erfolgt die sequentielle Freisetzung von P_i und ADP, wodurch die Reorientierung und Rotation der transmembranären Domänen erreicht wird, die dem Grundzustand, der basalen Konformation, entsprechen. Die Einnahme des basalen Zustandes ist Voraussetzung für einen neuen Transportzyklus. Der zentrale Kern dieses Modells ist der Übergang (Switch) der beiden möglichen Konformationen der Nukleotidbindungsstellen (offene und geschlossene Dimerform).

Im Vergleich zum sogenannten ATP-Switch-Modell stellt beim Modell von Ambudkar et al. (vergl. Abb. 1.9) nicht das Substrat die Ursache für den Konformationswandel dar, sondern die Hydrolyse von ATP.^{65,66} Im ersten Schritt des Transportzyklus bindet das Substrat an die innerhalb der Plasmamembran gelegene Substratbindungsstelle, und ein Molekül ATP lagert sich an die Nukleotidbindungsstelle an.

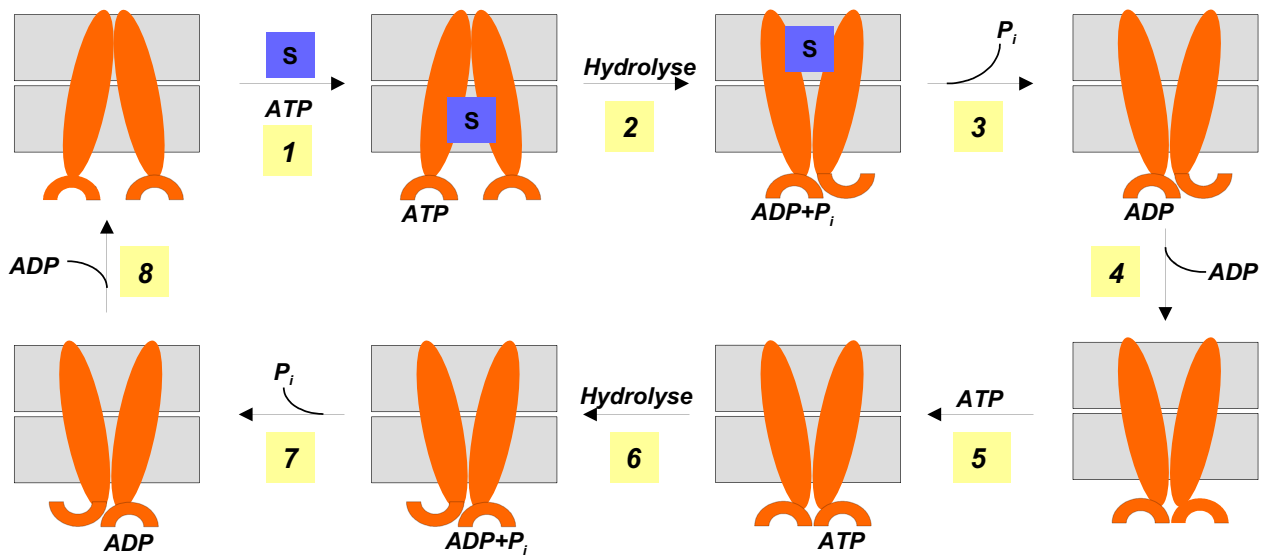


Abb. 1.9: Modell zum Transportzyklus von P-gp nach Ambudkar et al.^{65,66}

Eine gegenseitige Beeinflussung der Bindung des Substrates und des ATP-Moleküls wird nicht propagiert. Die Hydrolyse von ATP bewirkt einen Konformationswandel, der die Substratbindungsstelle zum Extrazellulärraum exponiert. Das Substrat verliert seine Affinität zur Substratbindungsstelle und diffundiert ab. Die Hydrolyse des ATP-Moleküls bewirkt, dass kein weiteres ATP-Molekül sich an die zweite Nucleotidbindungsstelle binden kann. P-gp verbleibt in der low-affinity-Konformation, so dass sich auch kein weiteres Substrat an das Protein anlagern kann. Die sequentielle Freisetzung von P_i und ADP ermöglicht es, dass ein weiteres ATP-Molekül gebunden werden kann, das anschließend hydrolysiert wird. Erst nach der Freisetzung von P_i und ADP kann P-gp wieder in seinen Grundzustand zurückkehren. Die Substratbindungsstelle nimmt durch Reorganisation und Rotation der TMDs die high-affinity-Konformation wieder ein, so dass ein neuer Transportzyklus möglich wird.

Im Vergleich zum ATP-Switch-Modell wird im von Ambudkar et al. entwickelten Modell ein Molekül ATP für den Transport des Substrates und ein Molekül ATP zur Wiederherstellung der basalen Konformation pro Transportzyklus verbraucht. Im ATP-Switch-Modell werden zwar für einen Transportzyklus ebenfalls zwei Moleküle ATP verbraucht, beide Moleküle ATP werden jedoch erst nach dem Transport des Substrates hydrolysiert.

Das von Al-Shawi et al. entwickelte Modell, das in Abb. 1.10 zu erkennen ist, kann in zwei

Teile untergliedert werden: die basale P-gp Aktivität (dieser Bereich ist gelb hervorgehoben) und der Substrat-induzierte Transportzyklus (grau unterlegt).⁶⁷

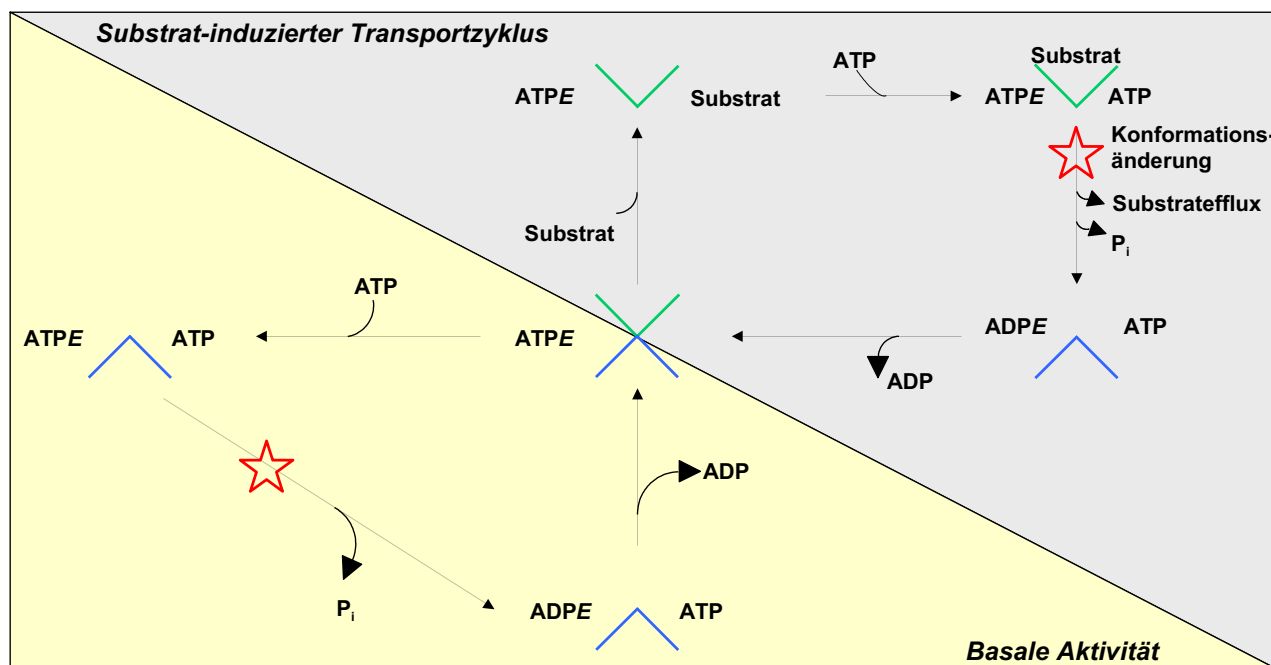


Abb. 1.10: Der Transportzyklus von P-gp nach Al-Shawi et al.⁶⁷

Im Grundzustand dieses Modells hat P-gp ein ATP-Molekül gebunden (ATPE), dieser Zustand ist Ausgangspunkt für beide Zyklen. Ist kein Substrat vorhanden (gelbes Dreieck), bindet ein zweites ATP-Molekül an P-gp, das zuerst gebundene ATP-Molekül wird anschließend hydrolysiert, die sequentielle Freisetzung von P_i und ADP folgt. P-gp kehrt in den zentralen Grundzustand zurück. Das Durchlaufen dieses Zyklus erklärt die basale P-gp Aktivität, die in die beiden Modelle von Higgins et al. und Ambudkar et al. nicht einbezogen wurde. Kommt es in dem von Al-Shawi et al. postulierten Modell, zur Anlagerung eines Substrates an die Substratbindungsstelle (graues Dreieck), wird der Substrat-induzierte Transportzyklus durchlaufen. Die zweite, noch unbesetzte Nukleotidbindungsstelle wird von einem ATP-Molekül besetzt und bewirkt die Hydrolyse des ersten ATP-Moleküls und eine Konformationsänderung des Proteins. Dabei wird das Substrat in das Innere des Proteins transportiert. Der Konformationswandel hat zu Folge, dass die Affinität des Substrates zu seiner Bindungsstelle abnimmt und dieses abdiffundieren kann. Nach der Freisetzung von P_i und ADP kehrt das Protein in den Grundzustand zurück.

Einen umfassenden Überblick über den Transportzyklus von P-gp vermittelt das von Callaghan et al. entwickelte Modell.⁶⁸ Eine Kurzzusammenfassung des eigentlich viel komplexeren Modells ist in Abb. 1.11 wiedergegeben.

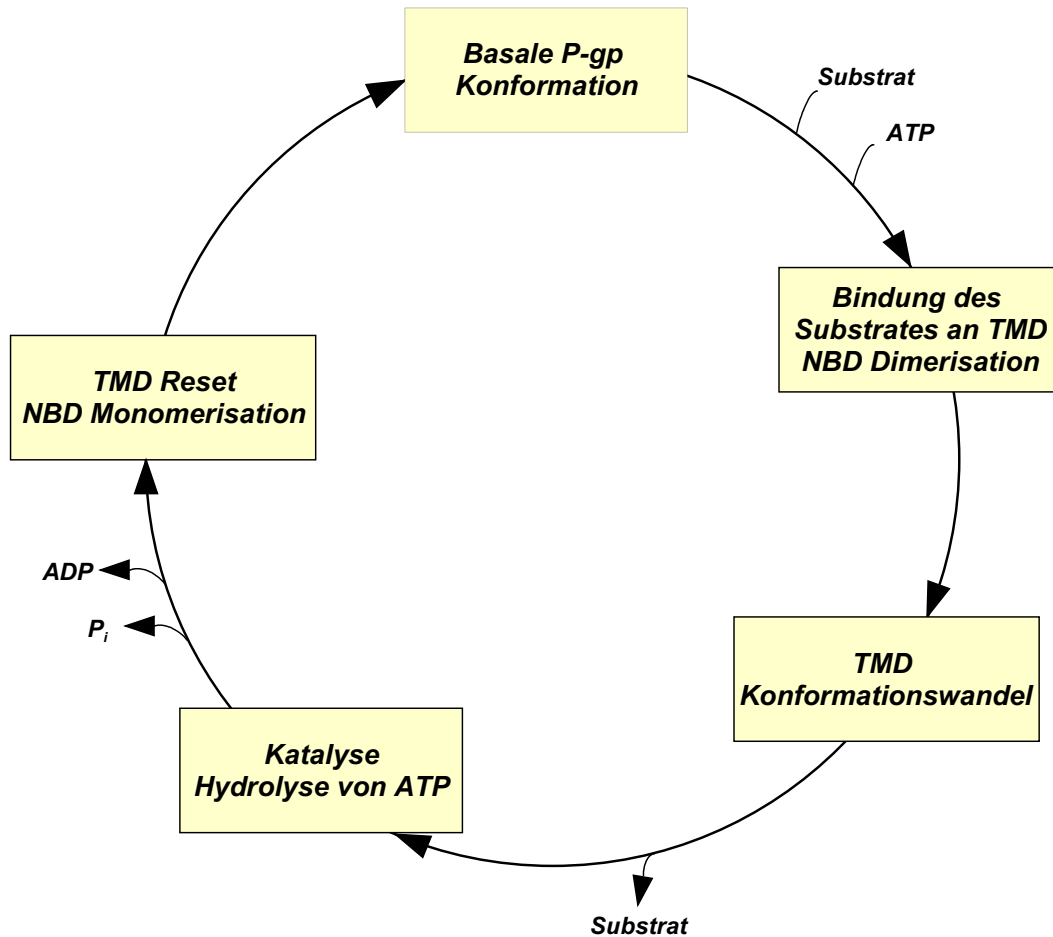


Abb. 1.11: Der Transportzyklus von P-gp nach Callaghan et al.⁶⁸, das wesentlich komplexere Modell ist in Form eines Kreisschematas vereinfacht dargestellt.

Das Modell umfasst vier wesentliche Bestandteile: (1) Das sogenannte „Loading“ beinhaltet neben dem Binden des Substrates an P-gp und der ATP-Bindung den Übergang der NBDs von der offenen in die geschlossene Dimerform. (2) Der Wechsel von der high-affinity- in die low-affinity-site-Konformation. (3) Energienutzung. (4) Zurücksetzen von P-gp in die basale Konformation.

Im Detail werden die einzelnen Schritte dieses Modells auf Basis von Literaturdaten näher erläutert:

- Für P-gp existiert eine basale Konformation. In diesem Grundzustand befindet sich

die Substratbindungsstelle in der sogenannten high-affinity-Konformation.

- Der Übergang von der offenen in die geschlossene Dimerform (Sandwich-Form) der NBDs kann auch in Abwesenheit eines Substrates erfolgen und erklärt somit die basale ATPase Aktivität. Die basale Aktivität ist in Proteoliposomen mit P-gp messbar. Mögliche natürliche Substrate kommen somit als Ursache der natürlichen ATPase Aktivität nicht in Frage.⁶⁷
- Interagiert ein Substrat mit P-gp, so bindet dieses an die sogenannte high-affinity-Bindungsstelle. Daran schließt sich die Anlagerung eines ATP-Moleküls an, und die NBDs gehen von der offenen in die geschlossene Dimerform über.
- Unklar bleibt, ob ein oder zwei Moleküle ATP pro transportiertem Substrat notwendig sind.
- Nach dem sogenannten Loading beginnen die Prozesse der Neuorientierung der Bindungsstelle (Konformationswandel) sowie der Substratfreisetzung.
- Der Konformationswandel wird nicht durch die Hydrolyse von ATP initiiert, da dieser auch in Gegenwart nicht hydrolysierbarer ATP-Analoga erfolgen kann.
- Allein die Bindung von ATP löst den Konformationswandel in Form einer allosterischen Kommunikation zwischen den NBDs und TMDs aus. Folgende experimentelle Befunde belegen dies: (i) Kryo-Elektronenmikroskopische Untersuchungen in An- und Abwesenheit von ATP zeigen das Vorliegen unterschiedlicher Konformationen.^{69,70,71} (ii) Radioligandbindungsstudien in Gegenwart nicht-hydrolysierbarer ATP-Analoga führen zu einer Abnahme der Affinität von Vinblastin. Dies kann durch den Wechsel von der high-affinity- in die low-affinity-Konformation erklärt werden.^{72,73} (iii) In indirekter Form wird der Konformationswandel durch Labeling-Experimente mit MIANS (2-(4-maleimidoanilino)naphthalen-6-sulfonsäure) belegt. P-gp Substrate verringern die Fluoreszenz von MIANS, das mit den zwei Cysteinen in den NBDs reagiert.⁷⁴
- Offen bleibt die Frage, ob die NBDs während des Konformationswandels in der geschlossenen oder offenen Dimerform vorliegen.
- Die Energie für den Konformationswandel geht aus dem sogenannten Loading hervor.
- Der Konformationswandel bewirkt, dass das Substrat an die sogenannte low-affinity-site bindet. Die Substratbindungsstelle wird durch den Konformationswandel zum

Extrazellulärraum hin exponiert. Durch die herabgesetzte Affinität des Substrates erfolgt die Dissoziation von der low-affinity-site rasch.

- Gegenstand aktueller Diskussionen ist die Frage, ob die high-affinity-Konformation nach der ATP-Hydrolyse sofort wieder eingenommen wird. In Gegenwart von Vanadat konnte durch Radioligandbindungsstudien gezeigt werden, dass Vinblastin in diesem Zustand nur eine geringe Affinität zu P-gp besitzt.⁷³ Dies spricht für das Vorliegen der low-affinity-Konformation auch nach der ATP-Hydrolyse.
- Nach der Dissoziation des Substrates von der low-affinity-site wird zuerst P_i und erst dann ADP freigesetzt. Aus der Freisetzung von P_i soll die notwendige Energie für den Switch der low-affinity in die high-affinity-Konformation hervorgehen. Damit wird der Grundzustand - die basale Konformation - wieder eingenommen.

1.9 Bindungsstellen von P-Glykoprotein

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist die genaue Zahl und Spezifität der Bindungsstellen von P-Glykoprotein nicht geklärt. Für eine umfassende Charakterisierung von Verbindungen, die als Substrate oder Modulatoren mit P-gp interagieren, steht die Frage im Vordergrund, ob diese an der gleichen Bindungsstelle, an überlappenden oder an verschiedenen Bindungsstellen des Proteins binden. Die Kenntnis über die Bindungsstellen und deren mögliche gegenseitige Beeinflussung kann die Suche nach geeigneten, potenten Inhibitoren vereinfachen.

Im Jahr 1997 erbrachten Shapiro und Ling einen Hinweis auf das Vorliegen mehrerer Bindungsstellen, die sich gegenseitig positiv kooperativ beeinflussen sollten. Die Autoren stellten fest, dass Rhodamin 123 den Transport von Hoechst 33342 stimuliert und umgekehrt Hoechst 33342 eine Intensivierung des Rhodamin 123-Effluxes bedingt. Auf diesen Beobachtungen basierend wurden zwei Bindungsstellen für P-gp definiert: Die sogenannte R (Rhodamin 123)- und H (Hoechst 33342)-Seite.⁷⁵ Die Strukturformeln von Rhodamin 123 und Hoechst 33342 sind in Abb. 1.12 aufgeführt.

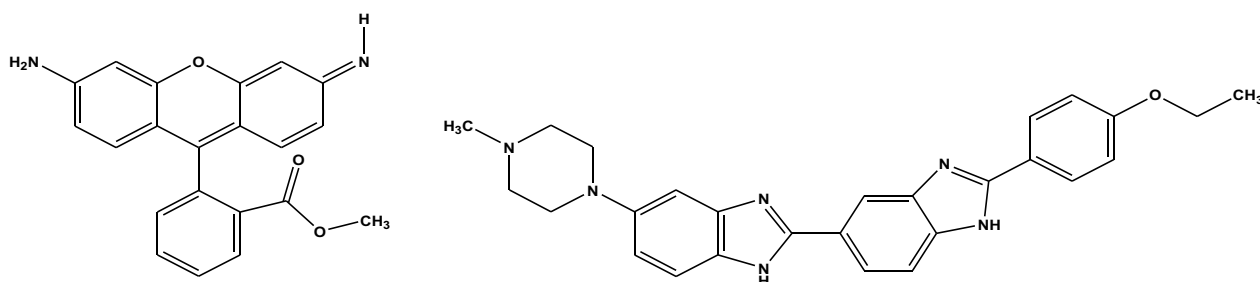


Abb. 1.12: Strukturformeln von Rhodamin 123 (links) und Hoechst 33342 (rechts).

Für die Verbindungen Colchicin und Quercetin wurde eine Kompetition mit der H-Seite beobachtet, Anthrazykline wie Daunorubicin oder Doxorubicin konnten als weitere Liganden der R-Seite klassifiziert werden. 1999 machten *Shapiro und Ling* in einer weiteren Arbeit auf die Existenz einer dritten Bindungsstelle aufmerksam. Prazosin und Progesteron (Abb. 1.13) stimulierten sowohl den Rhodamin 123 als auch den Hoechst 33342 Transport aus P-gp-reichen Membranvesikeln chinesischer Hamsterovariarkarzinomzellen. Für Prazosin und Progesteron wurde deshalb eine weitere Bindungsstelle mit allosterischen Eigenschaften definiert. Dieser Bindungsstelle wurde im Gegensatz zur R- und H-Seite keine Transportfunktion, sondern eine ausschließlich regulatorische Funktion zugesprochen.⁷⁶

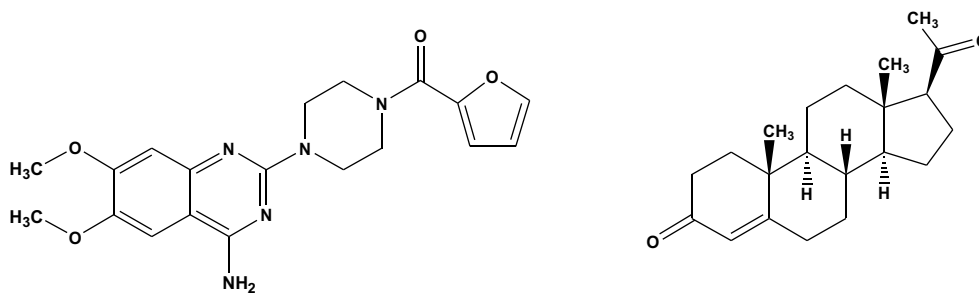


Abb. 1.13: Strukturformeln von Prazosin (links) und Progesteron (rechts).

Im Fokus der Untersuchungen von Shapiro und Ling lag die Analyse der Transportfunktion von P-gp mit Hilfe fluorimetrischer Methoden, aus denen die Existenz von Bindungsstellen abgeleitet wurde. *Martin et al.* propagierten basierend auf Radioligand-Bindungsstudien die Existenz von vier verschiedenen Bindungsstellen.⁷⁷ Eine dieser vier Bindungsstellen wurde in Analogie zu Shapiro und Ling als Hoechst Bindungsstelle bezeichnet, die neben Hoechst auch Modulatoren der 3. Generation wie die sogenannten XR (Xenova)-Verbin-

dungen bindet und sowohl Transport- als auch regulatorische Eigenschaften aufweist. Zwei weitere Bindungsstellen - die sogenannte Vinblastin und Paclitaxel-Bindungsstelle - besitzen Transporteigenschaften, die vierte Bindungsstelle wurde für die Verbindungen GF120918 und Nicardipin definiert. Bemerkenswert ist, dass im Gegensatz zu den Resultaten von Shapiro und Ling, Martin et al. eine negative Kooperativität der Bindungsstellen untereinander postulierten. Für Rhodamin 123 konnte keine eigenständige Bindungsstelle nachgewiesen werden. Zur Identifikation potentieller Bindungsstellen können neben Radioligand-Bindungsstudien auch Photoaffinitäts-Labeling-Untersuchungen eingesetzt werden. Im Gegensatz zu den bisherigen Methoden bietet das Photoaffinitätslabeling die Möglichkeit genauere Kenntnisse über die Lokalisierung der Bindungsstellen zu gewinnen. Das gelabelte Protein kann einem proteolytischen oder chemischen Abbau unterzogen werden, die Peptide werden anschließend massenspektroskopisch analysiert. Die Bindungsregionen von photoaktivierbaren Verbindungen können auf diese Weise ermittelt werden. Nach Peer et al. und Safa et al. konnten auf der Basis einer Vielzahl photoaktivierbarer Substrate und Modulatoren die TM Helices 4,5,6 (TMD1) sowie die TM Helices 7,8,11,12 (TMD2) markiert werden.^{78,79} In Photolabelingstudien konnte festgestellt werden, dass Colchicin das Labeling von P-gp mittels [¹²⁵I]NASV (gelabeltes Vinblastin) nicht inhibieren kann und auch die Bindung von Iodomycin (gelabeltes Daunorubicin) an P-gp durch Colchicin nur wenig verringert wird. Diese Untersuchungen deuten in Analogie zu Shapiro und Ling sowie Martin et al. auf die Existenz einer zweiten Bindungsstelle, der H-Seite hin, mit der auch Colchicin in Wechselwirkung tritt. In einer von Safa et al. 2004 publizierten Übersichtsarbeit wurden neben dieser Bindungsstelle weitere sechs Bindungsstellen propagiert: eine Paclitaxel-Seite, eine Bindungsstelle für Vinblastin, Verapamil und Cyclosporin A, eine Bindungsstelle für Calcium-Kanalblocker vom Dihydropyridintyp, eine Bindungsstelle für Mergosterolacetat, Bepridil und Prenylamin mit positiv allosterischen Eigenschaften gegenüber Azidopin, eine Bindungsstelle für cis-Flupentixol und eine Bindungsstelle für Prazosinartige Verbindungen.⁷⁸

Eine herausragende Bedeutung kommt den von Loo und Clarke gewonnenen Erkenntnissen zu, die hier kurz erläutert werden sollen. Im Fokus der Untersuchungen von Loo und Clarke stand die Identifizierung der Aminosäuren, die für die Bindung der mit P-gp interagierenden Verbindungen verantwortlich sind bzw. die Bindungstasche ausmachen. Die sieben endogen im P-gp enthaltenen Cystein-Aminosäuren (Positionen: 137, 431, 717,

956, 1077, 1125, 1227) wurden entfernt und gegen Alanin ausgetauscht, ohne die Funktion von P-gp zu beeinträchtigen. Eine Bibliothek mit insgesamt 252 Einzelcysteinmutanten konnte systematisch generiert werden; dabei betreffen die Mutationen die Aminosäuren der TM Helices. Die Einzel-Cystein-Mutanten wurden mit thiolreaktiven Substraten wie Dibromobiman oder Methanethiosulfonat-Verapamil (MTS-Verapamil) oder MTS-Rhodamin versetzt. Anschließend wurde die thiolreaktive Verbindung entfernt und die ATPase Aktivität nach Zugabe eines nicht-thiolreaktiven Substrates untersucht und mit der ATPase Aktivität einer Einzelcysteinmutante verglichen, die nicht mit einer thiolreaktiven Substanz gelabelt wurde. Daneben wurden die Einzel-Cystein-Mutanten mit Substraten ohne thiolreaktive Funktion inkubiert, so dass eine sich anschließende Interaktion mit einem thiolreaktiven Substrat möglicherweise verhindert wurde. Die Ergebnisse dieser Studien belegen, dass Aminosäuren der TM Helices 4,5,6 (TMD1) und 9,10,11,12 (TMD2) an der Bindung von Substanzen, die mit P-gp interagieren, beteiligt sind.

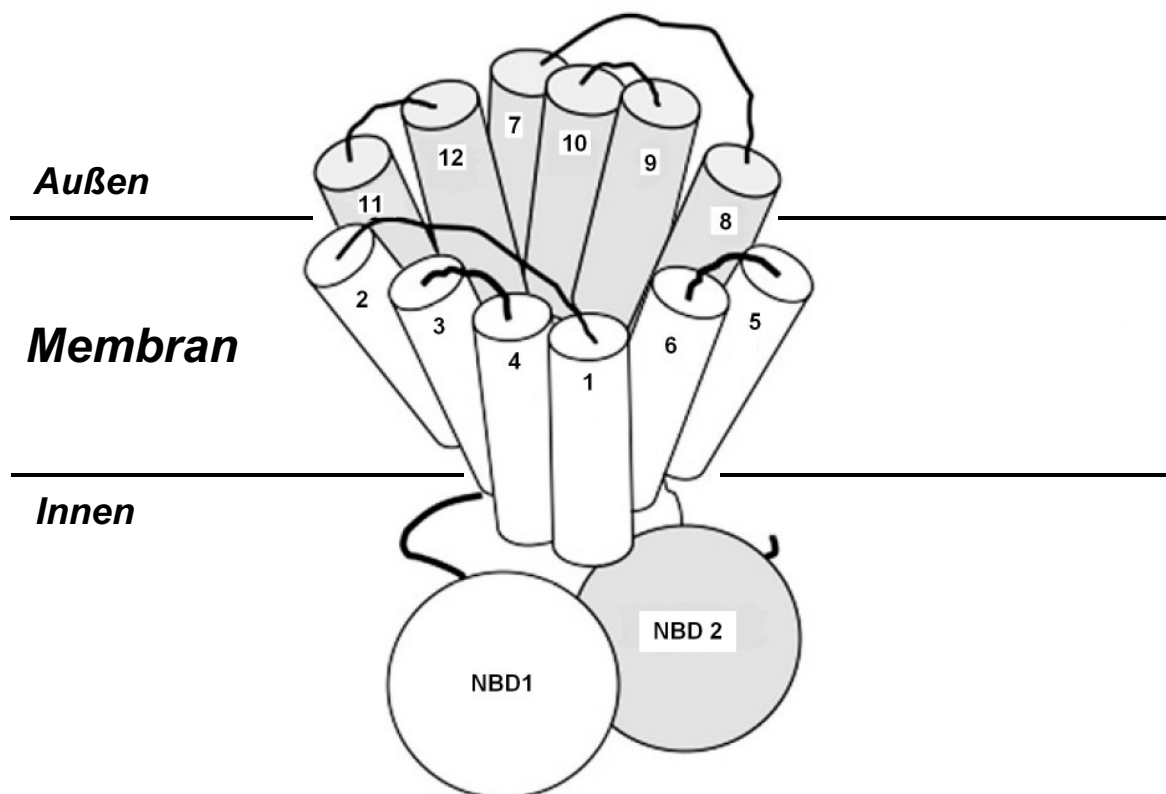


Abb. 1.14: Trichterförmige Gestalt von P-gp nach Loo und Clarke.⁸⁴ Der Trichter verjüngt sich zum Cytoplasma hin und weist im Extrazellulärraum eine Breite von etwa 50 Å auf. Die beiden einzelnen TMDs und ihre zugehörigen NBDs sind grau bzw. farblos dargestellt.

Neueste Studien weisen darauf hin, dass ebenfalls Aminosäuren aus der TM Helix1 sowie 7 für die Interaktion mit Substraten bzw. Modulatoren verantwortlich sind.⁸⁵ Die Bindungstasche ist genau am sogenannten Interface (Berührungspunkt) der beiden transmembranären Hälften lokalisiert.

In Übereinstimmung mit Loo und Clarke stellten Pleban et al. durch Photolabelingexperimente fest, dass sich die Bindungstasche (beteiligt: TM Helices 3+11 sowie 5+8) am Interface der beiden TMDs befindet.⁸⁰ Diese Bindungstasche zeichnet sich durch eine Multispezifität aus. Crosslinking-Untersuchungen mit Doppelcysteinmutanten ermöglichten es, ein Bild über die Anordnung der TM Helices zu gewinnen. Im Gegensatz zu den von Martin et al. sowie Shapiro et al. postulierten Modellen mit mehreren, spezifischen Bindungsstellen weisen Loo und Clarke auf die Existenz einer großen Bindungstasche bzw. Bindungsregion hin (Abb.1.12).^{20,81,82,83,84,85}

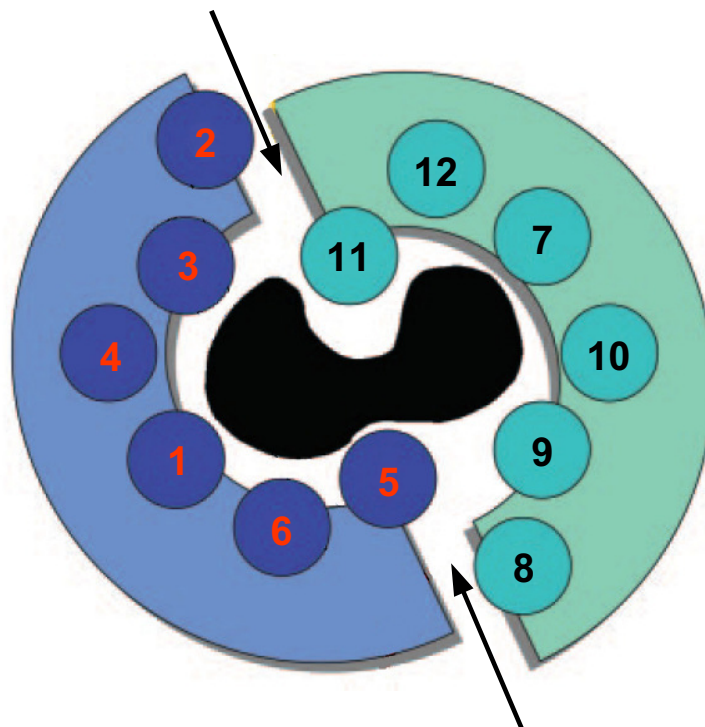


Abb. 1.15: Schematische Darstellung von P-gp, wobei P-gp in der Aufsicht gezeigt wird, modifiziert nach Pleban et al.⁸⁰ Nach Pajeva et al.¹⁰¹ ist die sogenannte R-Seite auf den TM Helices 6 und 12, die H-Seite auf den TM Helices 5 und 11 lokalisiert.

Substrate sind in der Lage das Crosslinkingmuster zu verändern. Diese Beobachtung wird

mit dem sogenannten Phänomen des „Substrate-induced Fit“ erklärt.⁸⁶ Darunter versteht man – allgemein gesprochen –, dass Liganden in der Lage sind, ihre eigene Bindungsstelle zu induzieren. Eine wichtige Voraussetzung ist hierbei, dass sich das Protein durch eine gewisse Flexibilität auszeichnet.

In einer großen Bindungsregion, wie sie in Abb. 1.15 dargestellt ist, können die Substrate die Interaktionen zu bestimmten Aminosäuren geradezu auswählen. Die Crosslinkingstudien trugen neben den elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Rosenberg et al.^{69,70,71} dazu bei, eine genauere Vorstellung über die 3D-Struktur von P-gp zu erlangen. P-gp hat eine trichterförmige Gestalt, der Trichter ist zum Extrazellulärraum hin geöffnet und weist dort eine maximale Breite von 50 Å auf. In der Mitte besitzt dieser eine Breite von 9-25 Å, der Trichter verjüngt sich zum cytoplasmatischen Ende hin.^{66,81} Die elektronenkristallographischen Untersuchungen von P-gp, die von Rosenberg et al. durchgeführt wurden, bestätigen eindrucksvoll den trichterförmigen Aufbau von P-gp.^{69,70,71} Einige der von Loo und Clarke generierten Einzelcysteinmutanten – die Mutationen wurden innerhalb der TM Helices 2,5,8,11 durchgeführt – zeichneten sich dadurch aus, dass sie mit thiolreaktiven Verbindungen trotz einer Vorinkubation mit nicht thiolreaktiven Substanzen reagieren. Aus diesen Beobachtungen schlossen Loo und Clarke, dass diese Bereiche nicht zur Bindungstasche gehören können und aufgrund der möglichen Crosslinks zwischen den TM Helices 5 und 8 sowie 2 und 11 als Portale für den Eintritt von Substraten und Modulatoren in die Bindungstasche fungieren. Gelangt eine Verbindung in die Bindungstasche, werden die Portale geschlossen.⁸⁷

1.10 Struktur-Wirkungsbeziehungen und Pharmakophormodelle

Viele der SAR- und QSAR-Analysen, die auf der Basis der biologischen Aktivitätswerte von Modulatoren generiert wurden, besitzen den entscheidenden Nachteil, dass nur strukturell ähnliche Verbindungen mit Hilfe dieser Methoden analysiert wurden. Eine Vorhersage der biologischen Aktivität von anderen Verbindungen, die sich strukturell unterscheiden, ist nicht möglich. Gerade aber P-gp zeichnet sich eben durch die Erkennung völlig verschiedener Verbindungen aus.

Die in Tabelle 1.10 zusammengestellten Ergebnisse einiger QSARs zeigen, dass Hydrophobizität, Wasserstoffbrückendonator- und vor allem Wasserstoffbrückenakzeptoreigen-

schaften die Aktivität von Inhibitoren maßgeblich beeinflussen. Ekins et al. entwickelten vier verschiedene Pharmakophormodelle für strukturell unterschiedliche P-gp Inhibitoren, die mit verschiedenen P-gp Substraten analysiert wurden (Calcein AM, Vinblastin, Digoxin). Alle Pharmakophormodelle weisen hydrophobe Zentren auf, zwei der Pharmakophormodelle enthalten Wasserstoffbrückenakzeptor- und ein weiteres Wasserstoffbrückendonorpunkte.⁸⁸

Tabelle 1.10: Ergebnisse einiger SAR- und QSAR-Analysen für P-gp Modulatoren.

Autoren	Ergebnisse/Schlussfolgerung
1989 Pearce et al. ⁸⁹	Reserpin-Derivate: Aromatische Ringsysteme und Basizität fördern die inhibitorische Wirkung dieser Verbindungen.
1996 Chiba et al. ⁹⁰	Propafenon-Derivate: Über einen Carbonylsauerstoff soll eine mögliche Wasserstoffbrückenbindung zu P-gp gebildet werden.
1997 Pajeva und Wiese ⁹¹	Phenothiazine und strukturell verwandte Verbindungen: Die räumliche Verteilung hydrophober Zentren als Schlüssel für die anti-MDR-Aktivität.
1998 Seelig ⁹²	Multiple Wasserstoffbrückendonorpunkte
1998 Pajeva und Wiese ⁹³	Propafenon-Derivate zeigen mit zunehmender Hydrophobie eine gesteigerte anti-MDR Aktivität.
1999 Ecker et al. ⁹⁴	Propafenon-Derivate: Wasserstoffbrückenakzeptoreigenschaften und Basizität führen zu einer verbesserten Inhibition von P-gp.
2000 Osterberg und Norinder ⁹⁵	Strukturell verschiedene Substanzen: Moleküloberfläche, Polarisierbarkeit, und die Fähigkeit Wasserstoffbrücken auszubilden bewirken eine Steigerung der Affinität.

Im Jahr 2002 wurde von Pajeva und Wiese basierend auf publizierten Radioligandbindungsdaten^{96,97,98,99} ein Pharmakophormodell für die Verapamil-Bindungsstelle von P-gp erstellt. Dieses Pharmakophormodell besteht aus zwei hydrophoben Zentren (H₁ und H₂), drei Wasserstoffbrückenakzeptorpunkten (A₁, A₂ und A_D) sowie einem Wasserstoffbrückendonorpunkt (D_A) (Abb. 1.16).¹⁰⁰ Aus den Bezeichnungen D_A und A_D geht hervor, dass diese Bereiche sowohl Wasserstoffbrückendonor- als auch Wasserstoffbrückenakzeptoreigenschaften besitzen können.

Eine Erklärung für die Interaktion strukturell so unterschiedlicher Verbindungen mit P-gp besteht darin, dass von der Verapamil-Bindungsstelle mehrere hydrophobe Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen zu P-gp gebildet werden und die Verbin-

dungen in differierenden Modi mit P-gp in Wechselwirkung treten können. Die Bindungsaffinität von Substanzen, die mit P-gp interagieren, wird um so größer, je mehr Pharmakophorpunkte simultan besetzt werden.¹⁰⁰

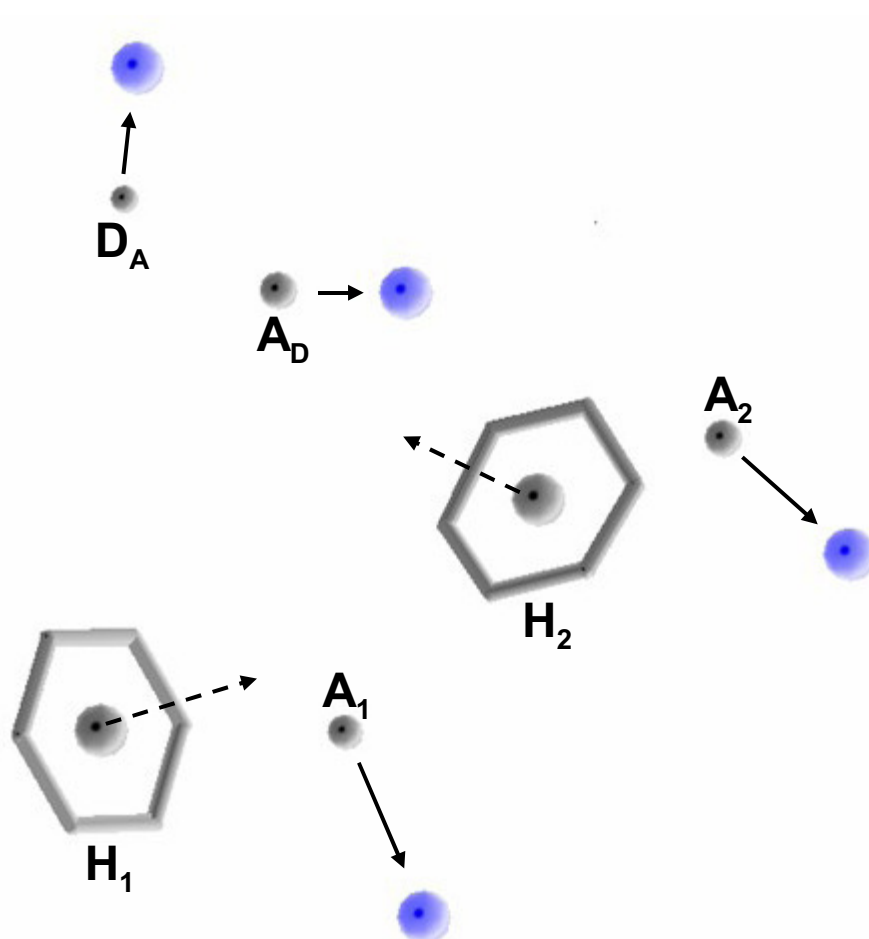


Abb. 1.16: Pharmakophormodell der Verapamil-Bindungsstelle nach Pajeva und Wiese (2002). H_1 und H_2 entsprechen den hydrophoben Zentren. A_1 , A_2 und A_D stellen Wasserstoffbrückenakzeptorpunkte dar, bei D_A handelt es sich um einen Wasserstoffbrückendonorpunkt. A_D und D_A können sowohl Wasserstoffbrückendonor- als auch Wasserstoffbrückenakzeptorpunkte sein.¹⁰⁰

Ein weiteres Pharmakophormodell wurde von Pajeva et al. 2004 für die Hoechst Bindungsstelle erstellt (Abb. 1.17).¹⁰¹ Das Pharmakophormodell beinhaltet drei hydrophobe Zentren (H_1 , H_2 , H_3), einen Wasserstoffbrückenakzeptor (A_2) und einen Wasserstoffbrückendonorpunkt (D_2). DS (Donor Site) und AS (Acceptor Site) sind die korrespondierenden Wasserstoffbrückendonor bzw. Wasserstoffbrückenakzeptorpunkte von P-gp.¹⁰¹

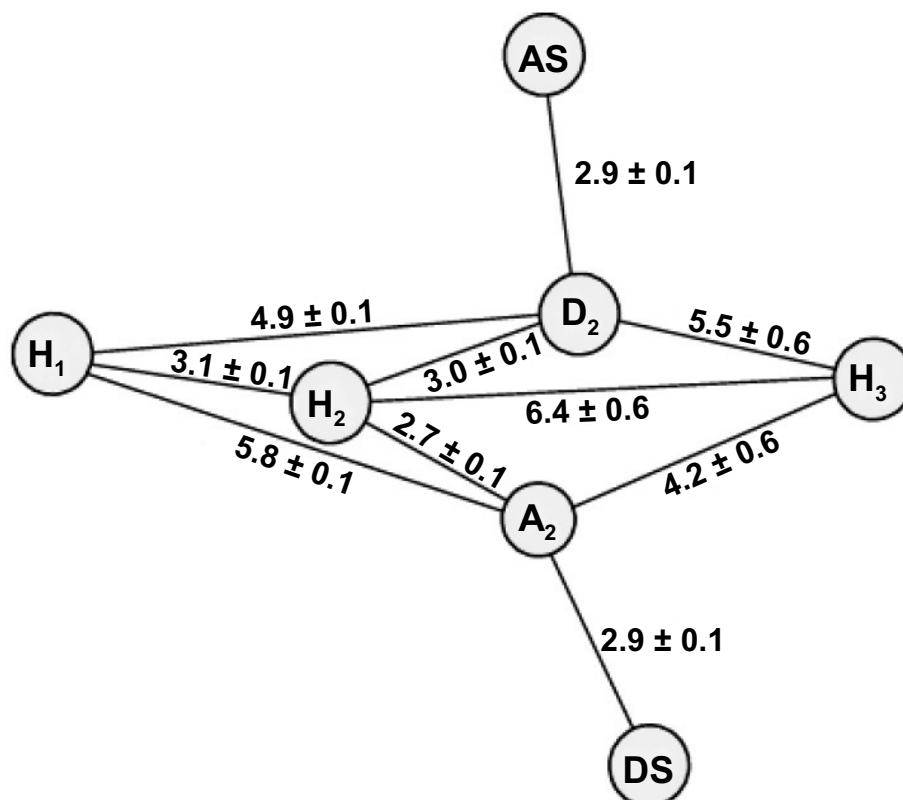


Abb. 1.17: Pharmakophormodell für die Hoechst Bindungsstelle nach Pajeva et al. (2004). H_1 , H_2 und H_3 stellen die hydrophoben Zentren dar, mit D_2 und A_2 sind die Wasserstoffbrückenakzeptor bzw. Wasserstoffbrückendonorpunkte gekennzeichnet. DS und AS stellen die korrespondierenden Wasserstoffbrückendonor bzw. Wasserstoffbrückenakzeptorpunkte von P-gp dar. Zusätzlich sind die Entfernungen in Å angegeben.¹⁰¹

Neben P-gp wurden in dieser Arbeit ebenfalls die ABC Transporter MRP1 und BCRP untersucht. Beide Transporter wurden aber nicht in dem Maße wie P-gp analysiert, so dass sie an dieser Stelle nicht genauso ausführlich behandelt werden können.

1.11 MRP1 (Multidrug Resistance associated Protein) und BCRP

MRP1 (Multidrug Resistance associated Protein) wurde im Jahr 1992 in der Zelllinie H69 AR (Human small lung carcinoma cell line), einer Doxorubicin-resistenten Zelllinie des kleinzelligen Lungenkarzinoms, entdeckt. MRP1 (ABCC1) weist im glykosylierten Zustand ein Molekulargewicht von 190 kDa auf und umfasst 1531 As.¹⁰² Dieses Protein enthält im

Gegensatz zu P-gp nicht zwei, sondern drei Membran-Segmente. Das zusätzliche Membran-Segment verfügt nur über 5 transmembranäre Helices, während die beiden anderen Segmente sechs transmembranäre Helices und jeweils eine Nukleotidbindungsstelle besitzen. Der zweiten Nukleotidbindungsstelle schließt sich das intrazellulär lokalisierte C-terminale Ende an, das N-terminale Ende ist glykosyliert und im Extrazellulärraum zu finden. Die beiden aus je sechs α -Helices bestehenden, homologen Membran-Segmente sind für die Funktion des Proteins entscheidend. Das erste Membransegment dient der Verankerung des Proteins an der Zelloberfläche. P-gp und MRP1 weisen nur eine Sequenzhomologie von 15% zueinander auf.^{103,104,105}

ABCC1 wird nicht nur in Tumorzellen überexprimiert, sondern kommt wie P-gp auch in verschiedenen Organen bzw. Barrieren vor: Lunge, Niere, Leber, Gastrointestinaltrakt sowie in der Blut-Hirn-Schranke und der Plazenta. Analog zu P-gp wird MRP1 eine bedeutende physiologische Funktion beim Schutz des humanen Organismus vor Xenobiotika zugesprochen.^{103,106}

In Übereinstimmung mit P-gp besitzt MRP1 die Fähigkeit eine große Zahl strukturell verschiedener Verbindungen zu erkennen. Einige MRP1 Substrate sind in Tabelle 1.11 enthalten.

Tabelle 1.11: Beispiele für MRP1-Substrate

Verbindung	Referenz
Bilirubin	107
Leukotriene C4, D4, E4	108,109,110
Glutathiondisulfid	111
17- β -Estradiolglucuronid	109
Etoposidglucuronid	109
Glibenclamid	112
Fluorescein	113
Lonafarnib (SCH66336)	114
Lipophile Flavonoide	115
Methotrexat	116
Indometacin und Derivate	117,118
Aflatoxin	106
Etoposid + reduziertes Glutathion	119
Vincristin + reduziertes Glutathion	110,120,121
Daunorubicin + reduziertes Glutathion	121

MRP1 transportiert im Gegensatz zu P-gp auch anionische Verbindungen. Eine besondere Bedeutung für den MRP1-vermittelten Transport von Substanzen kommt Glutathion zu. Beispielsweise stellen Vincaalkaloide und Anthrazykline per se keine MRP1-Substrate dar, sie liegen unter physiologischen Bedingungen in neutraler bzw. kationischer Form vor. Die MRP1-abhängige Resistenz gegenüber Vincaalkaloiden, Anthrazyklinen ist an Glutathion gebunden, da der Efflux dieser Verbindungen nur über einen Cotransport mit Glutathion erfolgt. Neben dem Cotransport werden auch Substrate über die Glutathion-S-Transferase direkt an Glutathion gebunden (sogenannte Glutathion-Konjugate). Beispiele hierfür sind Leukotriene. Die besondere Rolle von Glutathion für den MRP1-vermittelten Transport wird deutlich, wenn man die Glutathion-Synthese durch DL-buthionin-sulfoximin (BSO) inhibiert. Neben den Glutathion-konjugierten Substraten werden ebenso Sulfat- oder Glucuronid-konjugierte Substrate von MRP1 transportiert (vergl. Tabelle 1.11).¹⁰⁵

Die MRP1 Inhibitoren können in die folgenden Klassen untergliedert werden (Tabelle 1.12):

Tabelle 1.12: Unterteilung der MRP1 Inhibitoren in verschiedene Klassen und Beispiele, modifiziert nach Haimeur et al.¹⁰³

A) Unspezifische Inhibitoren organischer Anionentransporter:

Probenecid, Sulfinpyrazon, Indometacin

B) P-gp und MRP1 Modulatoren:

Verapamil, Cyclosporin A, RU486

C) Spezifische MRP1 Modulatoren:

MK571, ONO-1078

D) Glutathion-abhängige MRP1 Modulatoren:

LY475776, LY402913

Die erste Klasse beinhaltet Verbindungen, die unspezifisch organische Anionen-Transporter blockieren. Zur zweiten Klasse gehören Substanzen, die nicht nur die Funktion von MRP1, sondern auch von P-gp inhibieren können und deshalb auch als eher unspezifisch wirkende Modulatoren charakterisiert werden können. Die dritte Klasse zeichnet sich dadurch aus, dass diese Verbindungen mit hoher Spezifität MRP1 blockieren. Vertreter diese Klasse sind der Leukotrien D4 (LTD4)-Rezeptor-Antagonist MK571 sowie der Peptid-Leukotrien-Rezeptor-Antagonist ONO-1078. Zur vierten Klasse gehören die Verbindungen LY475776 und LY402913, die Glutathion-abhängig MRP1 inhibieren. Diese Substanzen –

es handelt sich hierbei um trizyklische Isoxazole – zeichnen sich durch eine hohe Spezifität und Affinität zu MRP1 aus. LY475776 kann als der potenteste MRP1 Modulator angesehen werden ($IC_{50} = 50 \text{ nmol/l}$).¹⁰³

Das Breast Cancer Resistance Protein (BCRP), das ein Molekulargewicht von 72 kDa besitzt, ist ein Vertreter der G-Unterfamilie der ABC-Transporterfamilie. Nach der HUGO-Nomenklatur wird das Gen mit ABCG2 bezeichnet. BCRP wurde im Jahr 1998 von Doyle et al. in einer Doxorubicin-resistenten MCF-7 Zelllinie, die auch gleichzeitig mit Verapamil behandelt wurde, entdeckt.¹²² Der Name BCRP ist eigentlich irreführend, da eine Überexpression des ABCG2 Gens weder an eine Mammakarzinomzelllinie gebunden sein muss, noch auf Krebszellen beschränkt ist. BCRP ist im menschlichen Körper in der Leber, der Niere, dem Darm, in der Lunge sowie in der Blut-Hirn-Schranke und Plazenta lokalisiert.¹⁰⁶ Gerade die Tatsache, dass ABCG2 in hohem Maße in der Plazenta exprimiert wird, spiegelt sich auch in einer weiteren Bezeichnung wieder: ABCP (P = Plazenta). Wie P-gp und MRP1 soll die physiologische Funktion von BCRP in einem Schutz des menschlichen Organismus vor Xenobiotika liegen. Analog zu P-gp und MRP1 kann BCRP die Pharmakokinetik vieler Arzneistoffe beeinflussen.¹⁴

BCRP besteht aus 655 AAs und beinhaltet nur ein Membran-Segment mit sechs α -Helices, wobei die Nukleotidbindungsstelle am N-terminalen Ende lokalisiert ist. BCRP stellt im Vergleich zu P-gp oder MRP1 einen Halbtransporter dar, der erst nach Dimerisierung seine Funktion erlangt.^{14,123,124,125}

BCRP ist in der Lage, sowohl hydrophobe positiv geladene als auch hydrophobe negativ geladene Verbindungen zu erkennen.

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass trotz der geringen Sequenzhomologie von P-gp, MRP1 und BCRP viele Substrate von allen drei ABC-Transportern erkannt werden.¹⁴ Allerdings scheint das Spektrum der von BCRP transportierten Verbindungen enger zu sein. Beispielsweise sind die folgenden Verbindungen keine BCRP Substrate: Vincaalkaloide (Vincristin, Vinblastin) Taxane (Paclitaxel) oder Podophyllotoxine (Etoposid).¹²²

Eventuell wird BCRP im Vergleich zu P-gp oder MRP1 nur eine weniger stark ausgeprägte Substraterkennung zugesprochen, weil viele Verbindungen noch nicht hinsichtlich einer Interaktion mit BCRP untersucht wurden.

1.12 Aufgaben- und Problemstellung

Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht die Intention, potentielle Bindungsstellen von P-gp mit Hilfe funktioneller Assays zu untersuchen und einen Einblick zu gewinnen, wie sich die möglichen Bindungsstellen gegenseitig beeinflussen. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen zu einem besseren Verständnis der Funktionsweise von P-gp beitragen. Eine bessere Vorstellung über die Beeinflussung der P-gp Funktion erleichtert die Entwicklung einer effektiven Strategie zur Aufhebung bzw. Abschwächung einer Multidrug Resistenz.

Im Folgenden sollen kurz einige Aufgaben, Kernpunkte und Fragestellungen dieser Arbeit zusammengefasst werden:

- Etablierung und Weiterentwicklung des Calcein AM Assays, der zur Untersuchung bekannter sowie neuer im Arbeitskreis synthetisierter Verbindungen eingesetzt werden soll. 2D- und 3D-QSAR Methoden dienen zur Erstellung von Modellen, die einen Einblick in den Zusammenhang zwischen Struktur und Wirkung ermöglichen.
- Der Einsatz von Substanzkombinationen im Calcein AM Assay ist mit der Frage verbunden, ob möglicherweise allosterische Effekte zum Vorschein kommen.
- Der aktivierende Einfluss von Liganden der H-Seite wurde bisher in P-gp enthaltenen Liposomen nachgewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit soll geklärt werden, ob diese Aktivierung auch in ganzen Zellen nachweisbar ist. Darüberhinaus stellt sich die Frage, ob die Aktivierung von P-gp durch die Gegenwart verschiedener Modulatoren beeinflusst werden kann.
- Ein weiteres Ziel war die Entwicklung eines funktionellen Assays, mit dessen Hilfe die H-Seite spezifisch charakterisiert werden kann. Auch in diesem Assay sollen erneut bekannte Verbindungen sowie im Arbeitskreis synthetisierte Modulatoren untersucht werden. Die mit Hilfe von 2D- und 3D-QSAR-Verfahren generierten Modelle haben die Aufgabe, das Verständnis über den Zusammenhang zwischen Struktur und Wirkung zu verbessern und die Entwicklung neuer, potenterer Verbindungen zu erleichtern.
- Die Ergebnisse, die in beiden Assays erhalten wurden, sollen hinsichtlich einer möglichen Spezifität der Liganden zu den einzelnen Bindungsstellen verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden unter aseptischen Bedingungen an einer Werkbank mit laminarem Luftstrom kultiviert. Das eingesetzte Nährmedium wurde in einem Wasserbad bei 37°C 15 min erwärmt, bevor die Zellen kultiviert wurden. Die Zusammensetzung der einzelnen Nährmedien ist zelllinienspezifisch und im Kapitel 2.5 aufgeführt. Die Zellen wuchsen in T175-Gewebekulturflaschen (175 cm² Fläche) oder in T75-Gewebekulturschalen (75 cm² Fläche) bei 37°C unter 5% CO₂-Atmosphäre und einer relativen Luftfeuchte von 96%. Das Nährmedium wurde im Abstand von 1-3 Tagen gewechselt; wie häufig die Erneuerung des Nährmediums vorgenommen werden musste, hing dabei von der Dichte des Zellrasens (Konfluenz) ab. Für eine T75-Gewebekulturflasche wurden 10-15 ml und für eine T175-Gewebekulturflasche 20-30 ml Nährmedium verwendet. Verbrauchtes Medium wurde unter Zuhilfenahme einer Wasserstrahlpumpe entfernt. Als visueller Marker für eine notwendige Erneuerung des Nährmediums diente der im Medium vorhandene Indikator Phenolrot. Durch die Vermehrung der Zellen bedingt, wechselt der Indikator seine Farbe von rot nach gelb. Die Gelbfärbung ist dabei auf die während des Zitronensäurezyklus entstehenden Säuren und die damit verbundene Erniedrigung des pH-Wertes zurückzuführen.

Erlangte der Zellrasen eine Konfluenz von 90%, wurden die Zellen von der Oberfläche der Gewebekulturschale abgelöst. Für das Ablösen der Zellen wurde das Nährmedium entfernt. Anschließend wurde der Zellrasen in Abhängigkeit von der Größe der Gewebekulturschale mit 2 ml (T75) bzw. 3 ml (T175) eines Trypsin-EDTA-Gemisches benetzt, dann wurde dieses abgesaugt und das Trypsin-EDTA-Gemisch erneut hinzugefügt. Anschließend wurden die Gewebekulturflaschen für 3-5 min den Inkubator eingebracht, um die optimale Temperatur für die Trypsineinwirkung zu gewährleisten. Nach dieser Zeit waren die Zellen abgelöst. Leichtes Schlagen an die Längsseite der Gewebekulturflasche gegen den Handballen, das den Ablösevorgang fördern sollte, wurde möglichst vermieden, da es die Zellen mechanischem Stress aussetzt. Durch die Zugabe von 8 ml (T75) bzw. 7 ml (T175) Nährmedium wurde das Gesamtvolumen auf 10 ml ergänzt, die Zellsuspension wurde in

ein 50 ml-PP-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 266 g für 4 min bei 10°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, 10 ml Nährmedium hinzugefügt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren das Zellpellet resuspendiert. In eine neue Gewebekulturflasche wurden 10 ml (T75) bzw. 20 ml (T175) vorgelegt und die entsprechende gewünschte Menge der Zellsuspension hinzugefügt.

Die auszusäende Zellzahl wurde immer so festgelegt, dass bis zu einer erneuten Passagierung wenigstens 3 Tage vergingen.

MDCK-, MDCK-MRP1 bzw. MDCK-MDR1 Zellen mussten einer längeren Trypsinierung von wenigstens 10 min unterzogen werden. Die Zellen wurden höchstens bis zu einer 90%-Konfluenz kultiviert, um ein relativ rasches Ablösen zu ermöglichen.

Auch bei diesen Zellen wurde das Ablösen der Zellen nicht durch mechanische Prozesse wie etwa das „Abschlagen“ unterstützt, da dieses die Vitalität der Zellen verschlechtert.

2.2 Inkulturnahme von Zellen (Revitalisieren von Zellen)

Die Zellen wurden in Kultur genommen, indem ein in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenes, kryokonserviertes Aliquot der Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut wurde. Nach dem Auftauen wurden die Zellen unter der Sterilwerkbank sofort in eine mit 10-15 ml des entsprechenden Nährmediums gefüllte T75-Gewebekulturflasche überführt. Die Zellen wurden dann in den Inkubator bei 37°C und einem Atmosphärengehalt von 5% CO₂ eingebracht. Das Nährmedium wurde 24 h nach der Inkulturnahme abgesaugt und durch neues Nährmedium ersetzt.

2.3 Kryokonservierung der Zellen (Lagerung der Zellen)

Die Zellen einer konfluenten T75- oder T175-Gewebekulturflasche wurden, wie bereits beschrieben, geerntet. Nach der Gewinnung der Zellpellets wurden 1,8 ml (für T75) bzw. 2,7 ml (T175) Nährmedium hinzugefügt und durch Auf- und Abpipettieren eine homogene Zellsuspension erzeugt. Jeweils 900 µl der Zellsuspension wurden in ein Kryoröhrchen gegeben und zu diesem 100 µl DMSO hinzugefügt. DMSO soll die Bildung von Kristallen beim Einfrieren verhindern, die die Zellen schädigen können. Das Einfrieren der Zellsus-

pensionen erfolgte zunächst bei -80°C , dann wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff (Stickstofftank) gelagert.^{126,127}

2.4 Behandlung der Zellen mit Zytostatika

Das Arbeiten mit Zelllinien, die mit Zytostatika behandelt wurden, fand in einem speziell abgetrennten Bereich, dem sogenannten Zytostatikalarbor (Arbeitskreis Prof. U. Jaehde), statt. Arbeiten mit Zytostatika wurden in einer Werkbank mit Personenschutz durchgeführt. Gewebekulturflaschen oder Mikrotiterplatten, die Zytostatika enthielten, wurden in einen eigens dafür vorgesehenen Inkubator unter den gewohnten Bedingungen platziert. Weitere bei der Arbeit mit Zytostatika zu beachtende Vorschriften werden an dieser Stelle nicht erwähnt. Sie können den entsprechenden Literaturquellen entnommen werden.^{128,129}

2.5 Zelllinien

2.5.1 Sensitive Zelllinie A2780 und resistente Zelllinie A2780 Adr

Die Zelllinien A2780 und A2780 Adr wurden über die European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, Wiltshire, UK) bezogen. Die Zelllinie A2780 (ECACC No. 93112519) stammt aus einem humanen, epithelialen Ovarialkarzinom. Die Zelllinie A2780 Adr (ECACC No. 93112520) wurde aus der sensitiven Zelllinie A2780 durch kontinuierliche Zugabe des Zytostatikums Doxorubicin erzeugt. Die A2780 Adr Zellen wurden zu Beginn dieser Arbeit vermehrt und in zahlreichen Kryovials (s. Kapitel 2.3) konserviert. Zur Aufrechterhaltung der Resistenz konnten die A2780 Adr Zellen mit 100 nmol/l Doxorubicin behandelt werden. Dabei handelt es sich um die Endkonzentration, die der IC_{50} des Zytostatikums Doxorubicin an A2780 Zellen entspricht. Bei deutlichem Absinken des Resistenzgrades konnten die A2780 Adr Zellen aus den eingefrorenen Kryovials erneut ausgefroren werden. Die Passagierung der Zellen wurde bis zur Passage 45 begrenzt. Die Zelllinien A2780 und A2780 Adr wurden bei 37°C und $5\% \text{ CO}_2$ im Medium RPMI-1640 kultiviert,

dem 10% FKS (Fetales Kälberserum) und 1% P/S (Penicillin/Streptomycin) zugesetzt wurden.

2.5.2 Sensitive Zelllinie MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) und resistente Zelllinie MDCK-MDR1 sowie MDCK-MRP1

Die aus der Niere von Hunden gewonnene Zelllinie MDCK (ECACC No. 84121903) wurde in folgendem Nährmedium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert: D-MEM mit 10% FKS und 1% P/S.

Die Zelllinie MDCK-MDR1, die durch retrovirale Transfektion mit humaner MDR1-cDNA gewonnen wurde und P-Glykoprotein exprimiert, wurde wie die sensitive Linie MDCK behandelt. 200 µg/ml G-418 (Geneticindisulfat) wurde zur Aufrechterhaltung der Resistenz sowohl bei der Zelllinie MDCK-MDR1 als auch der Zelllinie MDCK-MRP1 eingesetzt. Diese beiden Zelllinien wurden dankenswerterweise von Prof. Dr. P. Borst (Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt.

2.5.3 Sensitive Zelllinie MCF-7 und resistente Zelllinie MCF-7 Adr

Die humane Mammakarzinomzelllinie MCF-7 (ECACC No. 86012803) und die gegen Adriamycin resistente Zelllinie MCF-7 Adr wurden in D-MEM mit 10% FKS und 1% P/S bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zelllinie MCF-7 Adr wurde freundlicherweise von Frau Dr. Martina Heim (Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt.

2.5.4 Zelllinie MCF-7 MX

Die Zelllinie MCF-7 MX geht ursprünglich auf die Zelllinie MCF-7 zurück. Dabei deutet die Abkürzung MX darauf hin, dass die Zelllinie MCF-7 durch kontinuierliche Zugabe des Zytostatikums Mitoxantron gegen dieses resistent gemacht wurden. Diese Zellen wurden dem Arbeitskreis netterweise von Herrn Dr. E. Schneider (Wadsworth Center, Albany, NY, USA) überlassen. Sie wurden in RPMI-1640 Medium mit einem Zusatz von 20% FKS und

1% P/S kultiviert. Die im Vergleich zu den anderen Zelllinien doppelte Menge FKS hat die Funktion das Zellwachstum zu beschleunigen. Zur Aufrechterhaltung der Resistenz wurde den Zellen im Abstand von 5 Passagierungsschritten Mitoxantron in einer finalen Konzentration von 100 nmol/l (entspricht der IC₅₀ von Mitoxantron an MCF-7 Zellen) hinzugefügt.

2.6 Materialien für das Arbeiten mit Zellen

Materialien	Hersteller/Firma	Artikelnummer
1.5 Natural Flat Cap Microcentrifuge Tubes	Starlab	S1615-5500
1.5 Amber Flat Cap Microcentrifuge Tubes	Starlab	S15-5507
5 ml Polystyrene Round-bottom Tube, 12 x 75 mm, steril	Becton Dickinson	352054
1000 – 5000 µl Bulk, Natural Pipette Tips	Starlab	I1009-5000
CASY [®] ton Lösung	Schärfe System	43001
Cellstar [®] Gewebekulturplatte, 96 wells, flacher Boden, steril	Greiner bio-one	655180
Cellstar [®] PP-Test tubes, 15 ml, steril	Greiner bio-one	188271
Cellstar [®] PP-Test tubes, 50 ml, steril	Greiner bio-one	227261
Cellstar [®] Tissue Culture Flasks, 250 ml, 75 cm ² , steril, filter cap	Greiner bio-one	658175
Cellstar [®] Tissue Culture Flasks, 550 ml, 175 cm ² , steril, filter cap	Greiner bio-one	660175
FACSafe [™]	Becton Dickinson	340345
FACSFLOW [™]	Becton Dickinson	342003
FACSRinse [™]	Becton Dickinson	340346
Fetales Rinderserum	Sigma	F 7524
L-Glutamine 200 mM	Sigma	G 7513
Micro-Assay-Platte, Kaminform, 96well, 127, 8/86/15, schwarz, transparenter Boden	Greiner bio-one	655096
Nährmedium D-MEM (Zusätze: 4500 mg/L Glucose, Gluta-MAX [™] 1, Pyruvate)	Gibco	31966-021
Nährmedium Minimum Essential Medium Eagle	Sigma	M 5650
Nährmedium RPMI-1640	Sigma	R 8758
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma	P 0781
PS Micoplatte 96 well, nicht steril, flache Form, weiß, transparenter Boden	Greiner bio-one	655098

PS Microplatte 96 well, nicht steril, flache Form	Greiner bio-one	655101
TipOne 1 – 200 µl Yellow Pipette Tips	Starlab	S1111-0006
TipOne 101 – 1000 µl Natural, Graduated Pipette Tips	Starlab	S1111-2020
Trypsin-EDTA-Lösung (1X)	Sigma	T 3924

2.7 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller/Firma	Artikelnummer
Adenosintriphosphat	Molecular Probes	A-6608
Amiodaron-HCl	Sigma	A 8423
2-Propanol	Merck	68715
BCECF-AM	A.G. Scientific, Inc	B-1097
Beta-Estradiol	Sigma	E 8875
Betamethason-21-phosphat	Sigma	B 7652
bovines Albumin	Sigma	A 7906
Calcein-AM	Calbiochem	206700
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck	1.02382.0500
Chlorpromazin	Sigma	C 8138
Chlorprothixen	Sigma	C 1671
4-Chlortestosteron-17-acetat	Sigma	C 7919
Chinin-HCl	Synopharm	1200040-0005
Cis-Flupentixol	Sigma	F 114
Cisplatin	Sigma	P 4394
Colchicin	Acros Organics	64-86-8
Cyclosporin A	Fluka	30024
Daunorubicin	Sigma	D 0134
D-Glucosemonohydrat	Merck, Microbiology	1.08342.1000
DEPC	Sigma	D 5758
Dexamethason-21-phosphat	Sigma	D 1159
Diltiazem	Sigma	D 2521
Dimethylsulfoxid	Fluka	41640
Diphenhydramin-HCl	Sigma	D 3630
Dithiothreitol	Molecular Probes	A-660
Docetaxel	Rhône-Poulenc-Rorer	P183/8T361
Doxorubicin	Merck	24786
Onkodox® 50 mg / 25 ml	Onkoworks GmbH	3748041
Etoposid	Beragena	99B0B-B
Fluoresceindiacetat (FDA)	Sigma	F 7378
Fluphenazin-HCl	Sigma	F 4765
FITC anti-human P-Glycoprotein (MDR)	PharMingen Becton	557002
Mouse IgG _{2b}	Dickinson	
Haloperidol	Sigma	H 1512
HEPES	Sigma	H 3375

2 Material und Methoden

Hoechst 33342	Sigma	B 2261
Hoechst 33258	Acros	22989 5000
Hydrocortison	Sigma	H 3160
Imatinib	Geschenk der Merlin-Apotheke, Bonn	
Indometacin	Sigma	I 7378
Irinotecan	Sigma	I 1406
Kaliumchlorid	Merck	1.04936.0500
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	1.04873
Ketoconazol	Sigma	K 1003
Luciferase	Molecular Probes	A-6608
Luciferin	Molecular Probes	A-6608
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck	1.05886.0500
Methanol	Merck	1.06009.2511
Mitoxantron	Sigma	M 6545
MTT	Acros Organics	298-93-1
MTT	Sigma	M 2128
Natriumazid	Janssen-Chimica	19.038.26
Natriumchlorid	Merck	1.06404.1000
Natriumorthovanadat	Acros Organics	205330500
Natriumhydrogenphosphat	Merck	1.06329
Nicardipin	Sigma	N 7510
Novobiocin	Sigma	N 1628
Oxaliplatin	Tanaka Kikinzoku K.K.	L099T007
Prazosin	Sigma	P 7791
Prednisolondihydrogenphosphatdinatrium	Synopharm	700258-0001
Prednisolon-21-hemisuccinat	Sigma	P 4153
Probenecid	Sigma	P 8761
Progesteron	Sigma	P 01030
Promethazin-HCl	Sigma	P 4651
2-Propanol	Merck	68715
Quercetin	Sigma	Q 0125-106
QB102 (Pifithrin- α)	Sigma	P 4236
Rhodamin 123	Sigma	R 8004-25
Reserpin	Sigma	R 0875
Rutin	Sigma	R 84082
Salzsäure 37%	Merck	59415
Sulfinpyrazon	Sigma	S 9509
Tamoxifen	Sigma	T 5648
Terfenadin	Sigma	T 9652
Testosteronacetat	Sigma	T 1625
Trifluperazin-HCl	Fluka	91665
Triton-X-100	Sigma	T 9284
Verapamil-HCl	Synopharm	700577-0002
Verapamil-HCl	Sigma	V 4629
Vinblastin Bodipy [®]	Molecular Probes	V 12390
Vinblastin 10 HEXAL [®] Inj.-Lösung.	Hexal	1403792

2.8 Geräte

Gerät	Firma	Seriennummer
Accu-Jet	Brand	0441938
CASY® 1 Modell TT	Schärfe System	SC1 TT
CO ₂ Water Jacketed Incubator	Forma Scientific	3121
FACSCALIBUR	Becton Dickinson	E3231
Axiovert 200 (manuell)	Zeiss	3819001929
FLUOstar optima	BMG Lab Technologies	413-1164
FLUOstar	BMG Lab Technologies	403-0344
Kühlkammer KF830	Viessmann	04021157
Luminescence Spectrometer	Perkin Elmer	LS55
LUMIstar	BMG Lab Technologies	402-0346
Microfuge® Lite Centrifuge	Beckmann	367122
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss	660197
MS1 Minishaker	IKA®	03.011187
NOVOstar	BMG Lab Technologies	700-0021
POLARstar galaxy	BMG Lab Technologies	403-0639
RH basic Magnetrührer	IKA®	03.061661
Sartorius MC1	Sartorius AG Mechatronik	Analytic AC 210P
Sartorius R160P	Sartorius AG Mechatronik	YDO-01
Scaltec SBA31	Scaltec Instruments	70104523
Zentrifuge	Eppendorf AG	5417C
Zentrifuge Avanti™ J-25	Beckmann	JHY97G3

2.9 Pufferlösungen und Antikörper

2.9.1 Herstellung von 500 ml 5fach konzentrierter (5X)-Lösung des Krebs-Hepes-Puffers (KHP)

Inhaltsstoffe des Krebs-Hepes-Puffers mit Summenformel. Molekulargewicht und Einwaagen:

Chemische Bezeichnung	Summenformel	Molekulargewicht [g/mol]	Einwaage [g]
Natriumchlorid	NaCl	58,4	17,330
Kaliumchlorid	KCl	74,6	0,876
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	136,1	0,408
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	84,0	0,882
D-Glucosemonohydrat	C ₆ H ₁₂ O ₆ *H ₂ O	198,2	5,796
HEPES (freie Säure)	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	238,3	5,958

Die entsprechenden Mengen der oben aufgeführten Substanzen wurden in einen 500 ml-Messkolben gegeben, dann wurde mit destilliertem Wasser bis zu einem Volumen von etwa 450 ml aufgefüllt und der pH-Wert mit 1 mol/l NaOH-Lösung auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde mit destilliertem Wasser auf 500,0 ml aufgefüllt. Von den 500,0 ml wurden Aliquots von je 100,0 ml abgefüllt und bei -20°C tiefgefroren.

Zur Herstellung von 1fach konzentrierter (1X)-Lösung wurde ein Aliquot aufgetaut, dieses in einen 500ml-Messkolben gegeben und mit 650 µl einer 1mol/l Calciumchlorid-Lösung (1,47 g Calciumchlorid-dihydrat in 10 ml dest. Wasser gelöst) versetzt. Danach wurden etwa 400 ml destilliertes Wasser in den Messkolben pipettiert. Anschließend wurden 600 µl einer 1 mol/l Magnesiumsulfat-heptahydrat-Lösung (2,465 g Magnesiumsulfat-heptahydrat in 10 ml dest. Wasser gelöst) hinzugefügt und der Messkolben mit dest. Wasser auf 500,0 ml aufgefüllt. Die 500 ml konnten beliebig aliquotiert werden und wurden bei -20°C gelagert.

2.9.2 Herstellung des PBS-Puffers

Inhaltsstoffe des PBS-Puffers (Phosphate buffered saline = Phosphat-gepufferte Salzlösung) mit Summenformel, Molekulargewicht und Einwaagen:

Chemische Bezeichnung	Summenformel	Molekulargewicht [g/mol]	Einwaage [g]
Natriumchlorid	NaCl	58,4	8,0
Kaliumchlorid	KCl	74,6	0,2
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	136,1	0,2
Dinatriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄	141,9	1,44

Die entsprechenden Mengen wurden in ein Glasgefäß gegeben und mit destilliertem Wasser auf 1000,0 ml aufgefüllt. Anschließend wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde bei 121°C und 2 bar Druck 20 min autoklaviert. Sie wurde danach im Kühlschrank gelagert.

2.9.3 Antikörper-Labeling von P-gp

Waschpuffer: PBS mit 0,5% BSA (**B**ovines **S**erumalbumin)

Anfärbepuffer: PBS mit 0,5% BSA + 0,1% NaN₃

Verwendeter Antikörper: FITC anti-human P-Glycoprotein (MDR) Mouse IgG_{2b} (BD, Biosciences, San Diego, CA, USA)

2.9.4 Antikörper-basierte Markierung von BCRP

Primärantikörper: Primary anti-human BCRP monoclonal BXP-21 antibody (Abcam Inc, Cambridge, MA, USA)

Sekundärantikörper: Fluorescein-labeled sheep anti-mouse Ig antibody (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)

2.10 Zellzahlbestimmung mittels CASY® 1 Model TT

Für die Zellzahlbestimmung wurden von 10 ml Zellsuspension (s. Kapitel 2.1) 20 µl entnommen und in 10 ml sterilfiltrierte CASY®ton-Lösung überführt, mit dieser gemischt und anschließend vermessen. Die CASY®ton-Lösung dient als schwacher Elektrolyt. Die Zellsuspension wird mit konstanter Geschwindigkeit durch eine Kapillare definierten Durchmessers (150 µm) und definierter Länge transportiert. Die Messung erfolgt mit Hilfe von zwei Platinelektroden, über die eine Spannung an die Kapillare angelegt wird. Unter der hier herrschenden Bedingung eines konstanten Stromflusses sind Spannung und Widerstand zueinander proportional. Die Zellen, die im Gegensatz zur reinen Elektrolytlösung keine leitenden Eigenschaften besitzen, verdrängen den Elektrolyten. Bei Durchtritt einer Zelle durch die Kapillare kommt es zu einer Verringerung des Querschnitts, und somit zu einer Widerstandserhöhung, die proportional zur Fläche der Zellen ist.

Die Anzahl der gemessenen Signale entspricht der Zellzahl. Das Gerät gibt ebenso den mittleren und den am häufigsten vorkommenden Zelldurchmesser an, der für jede Zelllinie charakteristisch ist und Rückschlüsse auf die Vitalität der Zellen zulässt. Für den eigentlichen Messbereich wurde die untere Messgrenze auf 10 µm und die obere Messgrenze

auf 40 μm festgelegt. So werden Zelltrümmer (kleiner als 10 μm) von der Messung ausgeschlossen. Partikel mit einem Durchmesser größer als 40 μm deuten auf Zellagglomerate hin, die durch eine unzureichende Vereinzelnung der Zellen zustande kommen.

2.11 MTT Assay

2.11.1 Bestimmung der Hemmwirkung von Zytostatika

Die unterschiedlichen Zelllinien (A2780, A2780 Adr) wurden in T75 oder T175 Gewebekulturflaschen bis zur nahezu vollständigen Konfluenz, wie in Kap. 2.1 beschrieben, kultiviert. Nach der Entfernung des alten Nährmediums wurden die Zellen geerntet (vergl. Kap. 2.1). Anschließend wurde das Nährmedium vorsichtig entfernt, ohne das entstandene Zellpellet abzusaugen oder zu beschädigen. Nach Zugabe von 10 ml frischen Nährmediums und Homogenisieren der Zellsuspension durch Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen analog zu dem in Kap. 2.10 beschriebenen Verfahren gezählt.

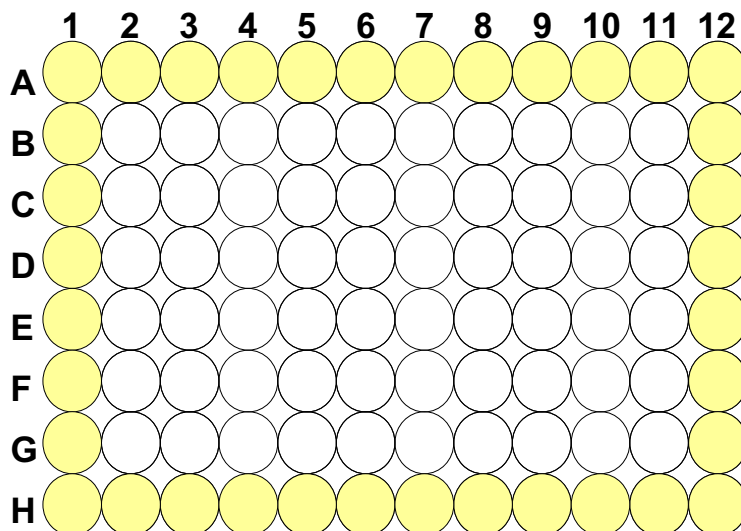


Abb. 2.1: Schema einer 96er-Mikrotiterplatte, wie sie für den MTT Assay verwendet wurde. Die Wells sind gelb hervorgehoben, die nur mit Puffer, aber nicht mit Zellen versehen wurden. Die farblosen Vertiefungen der Mikrotiterplatte enthalten Zellen.

Die Zellsuspension wurde auf eine Dichte von 220000 Zellen/ml eingestellt. Die 96er-

Mikrotiterplatte wurde so mit Hilfe einer Multikanalpipette beschickt, dass 20000 Zellen in einem Volumen von 90 μl in jedem Well enthalten waren. Die 96er-Mikrotiterplatte wurde daraufhin im Inkubator für wenigstens 3 h bei 37°C und 5% CO_2 belassen. Die Zellen konnten sich auf diese Weise am Boden anheften. Nach dieser Zeit, die höchstens 10 h dauerte, wurden die Zellen mit der gewünschten Zytostatikakonzentration versetzt, so dass ein Endvolumen von 100 μl in jedem einzelnen Well resultierte. Dabei wurden mindestens drei Wells mit identischen Zytostatikakonzentrationen versehen. Als Kontroll- bzw. Nullwert diente das Lösungsmittel des Zytostatikums. Zusätzlich wurde auf jeder Platte als Vergleich KHP 1x untersucht. Die außen lokalisierten Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden nur mit KHP 1x befüllt, so dass ein Endvolumen von 100 μl wie in allen anderen Vertiefungen der Mikrotiterplatte resultierte.

Diese Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind in Abb. 2.1 gelb hervorgehoben und wurden wegen der dort stärker ausgeprägten Verdunstung nicht in die Messung einbezogen. Nach der Inkubationsphase von 72 h wurde die Mikrotiterplatte mit der MTT-Lösung (100 mg MTT in 20 ml PBS, unter Lichtschutz aufzubewahren) versetzt, wobei in jedes Well 20 μl dieser Lösung mit einer Multistep-Pipette gegeben wurden. Danach wurde die Mikrotiterplatte im Inkubator (5% CO_2 , 37°C) für mindestens 60 und höchstens 90 min belassen. Die Formazanbildung, die im Mikroskop beobachtet bzw. kontrolliert wurde, beendete man durch die Zugabe eines 2-Propanol/HCl-Gemisches (50 ml 2-Propanol und 165 μl Salzsäure 37%). Dazu wurde mit Hilfe des Pumpsystems des POLARstar Microplatereaders in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte 150 μl dieser Lösung gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde dann für mehrere Stunden bei 8°C im Kühlschrank gelagert, um die vollständige Solubilisation der Formazankristalle zu gewährleisten. Zur Bestimmung der Absorption wurde die Platte dann mit Hilfe des POLARstar Microplatereaders bei den zwei Wellenlängen von 595 nm (Absorptionsmaximum des Formazans) und 690 nm (Hintergrundabsorption) vermessen. Die einzelnen Testparameter des POLARstar Microplatereaders wurden wie folgt definiert:

Anzahl der Zyklen:	1
Anzahl der Lichtblitze:	20 s ⁻¹
Intervallzeit zwischen zwei Reihen:	1,0 s
Vermessung der Mikrotiterplatte:	horizontal
Required Value:	80%
Gain 595:	-
Gain 690:	-
Scan-Modus:	Plate

Die Vermessung der Platte erfolgte im Plate-Modus. Dieser Modus kommt dann zur Anwendung, wenn das aufzunehmende Messsignal über einen langen Zeitraum konstant bleibt. Der „Required value“ wurde auf 80% fixiert, dieser Wert wird immer dann hoch gewählt, wenn die Messsignale während der Messung nicht ansteigen, sondern abfallen.

Datenanalyse:

Die bei 690 nm ermittelte Hintergrundabsorption wurde von der bei 595 nm gemessenen Absorption des Formazans subtrahiert. Diese um die Hintergrundabsorption bereinigten Absorptionswerte wurden für die Auswertung in GRAPHPAD PRISM[®] 3.0 verwendet. Die Absorptionswerte (Ordinate) wurden gegen die entsprechenden logarithmierten Zytostatikakonzentrationen auf der Abszisse aufgetragen. Anschließend wurde eine nichtlineare Regression unter Anwendung der 4-Parameter-logistischen Gleichung durchgeführt und eine Konzentrations-Effektcurve generiert.

2.11.2 Bestimmung der Hemmwirkung von Zytostatika in Gegenwart von P-gp Modulatoren

Neben der in Kap. 2.11 beschriebenen Methode zur Durchführung des MTT Assays wurden Zytostatika in Kombination mit P-gp Modulatoren untersucht. Dazu brachte man A2780 Adr Zellen in 96er-Mikrotiterplatten ein, so dass ein Endvolumen von 80 µl in jeder Vertiefung der Platte resultierte (220000 Zellen/ml). Danach wurden die Zellen für mindestens 3 und höchstens 12 h im Inkubator bei einem Luft-CO₂-Verhältnis von 95:5 gelagert. Nach dieser Zeit wurden die Modulatoren in den gewünschten Konzentrationen zu den

Zellen gegeben. Das Volumen pro Well betrug nun 90 μ l. Die Mikrotiterplatte wurde in vier Bereiche untergliedert. Drei dieser Bereiche wurden mit ausgewählten Konzentrationen des Modulators versehen. Ein vierter Bereich wurde lediglich mit KHP 1x versetzt (Kontrolle). Nach der Zugabe der Modulatoren bzw. des Puffers wurde die Mikrotiterplatte unter den üblichen Bedingungen im Inkubator platziert und nach einer Zeit von wenigstens 2 und höchstens 6 h mit den entsprechenden Zytostatikakonzentrationen versetzt und anschließend für 72 h im Inkubator gelagert. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten analog zu der bereits in Kap. 2.11.1 beschriebenen Vorgehensweise.

2.11.3 Theoretischer Hintergrund zum MTT Assay

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) kann zur Bestimmung der Zytotoxizität von Verbindungen eingesetzt werden.

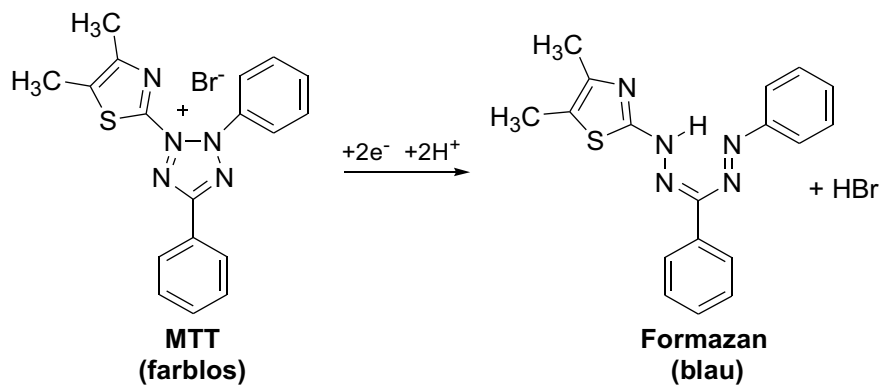


Abb. 2.2: Schema des MTT Assays, Umsetzung des farblosen MTT zum blau gefärbten Formazan.

MTT wird über mitochondriale Dehydrogenasen zum blau-magenta-gefärbten Formazan umgewandelt, wie Abb. 2.2 verdeutlicht. Bei einer Schädigung der Zellen ist die Reduktion von MTT zu Formazan herabgesetzt. Daher ist die gemessene Absorption proportional zur Zellvitalität.^{130,131}

2.12 Der ATP Assay

Die Zellen (A2780, A2780 Adr) wurden analog zum MTT Assay in weiße 96er-Mikrotiterplatten mit klarem Boden überführt, so dass sich eine Konfluenz von 20% in den einzelnen Wells ergab. In jedem Well der 96er-Mikrotiterplatte befanden sich somit etwa 20000 Zellen. Nach einer Wartezeit von wenigstens 3 Stunden waren die Zellen angeheftet. Danach erfolgte die Zugabe der Zytostatikalösung in den entsprechenden Konzentrationen. Die 96er-Mikrotiterplatte mit einem Endvolumen von 100 µl pro Well wurde anschließend in einen für Zytostatika vorgesehenen Inkubator eingebracht und bei einem Luft/CO₂-Verhältnis von 95:5 bei einer Temperatur von 37°C für eine Dauer von 72 h belassen.

Nach der Inkubationsphase von 72 Stunden wurden die Zellen mit Hilfe der in Tabelle 2.1 angegebenen Lösung lysiert. In jedes Well der Mikrotiterplatte wurde 10 µl des Lysereagens mit Hilfe einer Multikanalpipette gegeben.

Tabelle 2.1: Reagenz zur Lyse der Zellen, um ATP aus den Zellen freizusetzen.

Bestandteil	Masse [g]
Tricin	0,717
DTT	0,077
EDTA	0,292
Triton® X-100	25
H ₂ O	Ad 500,0

Die 96er-Mikrotiterplatten wurden dann für die Dauer von 15 min im Inkubator platziert. Nach dieser Zeit wurde die Mikrotiterplatte in den auf 28°C temperierten LUMIstar Microplatereader eingebracht.

Tabelle 2.2: Standardreaktionsgemisch zur Durchführung des ATP Assays.

Bestandteil	Volumen [ml]
H ₂ O (dest.)	3,9
20x Reaktionspuffer	0,5
DTT (0,1 mmol/l)	0,1
Luciferin (10 mmol/l)	0,5
Luciferase (10 mmol/l)	0,0025

Dann wurde mit Hilfe des Pumpensystems des Microplatereaders 75 µl eines Standardreaktionsgemisches zu den einzelnen Wells pipettiert. Das Standardreaktionsgemisch, das unter Lichtschutz aufbewahrt werden musste, enthielt die in Tabelle 2.2 angegebenen Komponenten. Die Test-Parameter des LUMIstar Microplatereaders wurden wie folgt festgelegt:

Anzahl der Zyklen:	150
Messzeit pro Zyklus:	0,10 s
Gesamtmesszeit pro Well:	15 s
Anzahl der Lichtblitze:	10 s ⁻¹
Intervallzeit zwischen zwei Reihen:	0,5 s
Vermessung der Mikrotiterplatte:	horizontal
Required Value:	20%
Gain:	255
Scan-Modus:	Well
Injektionsvolumen pro Well:	75 µl

2.12.1 Theoretischer Hintergrund zum ATP Assay

ATP stellt die bedeutendste Speicherform chemischer Energie in Zellen dar. Die bei der Spaltung von ATP freiwerdende Energie kann für endergone Prozesse wie Biosynthesen, Bewegungs- und Transportvorgänge genutzt werden.

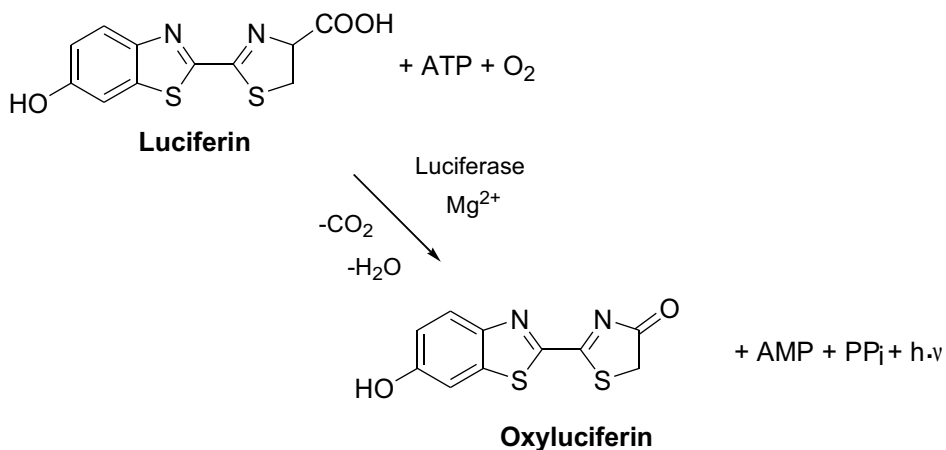


Abb. 2.3: Prinzip des ATP Assays: Umwandlung von Luciferin in Oxyluciferin in Gegenwart von ATP, Sauerstoff und Magnesium-Ionen. Entstehung von Pyrophosphat und einem Lichtquant.

Der ATP Assay basiert auf der Umwandlung von Luciferin in Oxiluciferin durch das Enzym Luciferase in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen, Sauerstoff und ATP (s. Abb. 2.3). Bei der Reaktion wird ein Lichtquant freigesetzt. Das durch die Lumineszenz emittierte Licht ist proportional zur ATP-Menge.^{131,132,133}

2.13 Calcein AM Assay

Die unterschiedlichen Zelllinien (A2780 Adr, A2780, MDCK-MDR1, MDCK) wurden bis zu einer nahezu vollständigen Konfluenz kultiviert und geerntet. Die Zellsuspension wurde auf eine Dichte von 300000 Zellen/ml eingestellt. Die gewünschte Zellmenge wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Zellen wurden zentrifugiert (10600 g, Shortspin) und das Nährmedium vorsichtig entfernt, ohne das entstandene Zellpellet abzusaugen oder zu beschädigen. Die Zellen wurden dann mit je 1 ml KHP dreimal hintereinander gewaschen, nach jedem Waschschrift wurde erneut zentrifugiert (10600 g, Shortspin). Nach dem letzten Waschschrift wurde das Zellpellet durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren in 1 ml KHP gleichmäßig suspendiert. In eine Ausplattierschale wurde für jeweils eine 96er-Mikrotiterplatte 9 ml KHP vorgelegt und in diese die Zellsuspension vorsichtig überführt. In der Pipettierschale befanden sich nun 3 Millionen Zellen in einem Volumen von 10 ml. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Multikanalpipette durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren erneut gleichmäßig verteilt. Pro Well wurden 90 μ l der Zellsuspension (entsprechend 27000 Zellen/Vertiefung) mit Hilfe der Transferpipette in die Mikrotiterplatte nach dem in Abb. 2.4 dargestellten Schema eingebracht.

Die ungefärbten Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden mit der Zellsuspension versehen, die gelb gefärbten Wells wurden nur mit Puffer versetzt (s. Abb. 2.4). Danach erfolgte die Zugabe der Testsubstanzen. Dabei wurden 10 μ l einer Modulatorkonzentration in jeweils drei Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Pro Modulatorkonzentration wurde je ein Well ohne Zellen und zwei Wells mit Zellen beschickt.

In jeder Vertiefung der 96er-Mikrotiterplatte resultierte ein Endvolumen von 100 μ l. Die Mikrotiterplatte wurde dann für 30 min bei 37°C und einem Luft-CO₂-Verhältnis von 95:5 im Inkubator gelagert. Der Microplate-Reader – für die Durchführung dieses Assays konnten der POLARstar, FLUOstar, FLUOstar OPTIMA und NOVOstar Microplatereader verwendet werden – wurde auf 37°C temperiert.

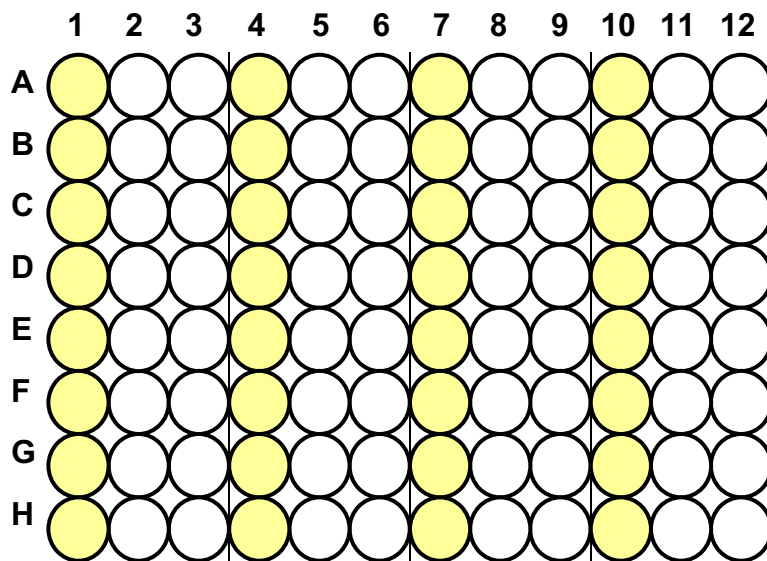


Abb. 2.4: Schema einer 96er-Mikrotiterplatte, wie sie im Calcein AM Assay eingesetzt wurde. Die gelb dargestellten Vertiefungen der Mikrotiterplatte enthielten nur Puffer und Modulatoren. Die farblosen Wells waren dagegen mit Zellen versehen.

Nach der Inkubationsdauer von 30 min erfolgte die Zugabe der Calcein AM-Lösung. Die Lösung bestand aus einem Gemisch von 3995 μl KHP und 5 μl der 1 mmol/l Calcein AM-Stammlösung (lichtgeschützt aufzubewahren). Diese Lösung wurde in eine Pipettierschale gegeben. Mit Hilfe einer Multikanalpipette wurden jeweils 33 μl der Lösung in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte überführt (Endkonzentration von Calcein AM pro Well 0,31 $\mu\text{mol/l}$). Anschließend wurde die Fluoreszenz über einen Zeitraum von 2760 Sekunden bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm (Bandbreite ± 6 nm) und einer Emissionswellenlänge von 520 nm (Bandbreite $\pm 17,5$ nm) im Abstand von 120 Sekunden gemessen. Die Vermessung der Fluoreszenz erfolgte im sogenannten „Plate-Modus“.

Der Plate-Modus kommt dann zur Anwendung, wenn das Messsignal nur langsam an Intensität gewinnt bzw. verliert. Der Well-Modus wird dagegen dann bevorzugt, wenn die Intensität des Messsignals sehr schnell ansteigt bzw. abfällt. Im Well-Modus wird die Gesamtkinetik bezogen auf ein einzelnes Well aufgenommen. Erst nach Beendigung dieser wird mit der Aufnahme des Messsignals im nächsten Well begonnen. Im Plate-Modus werden in jedem Messzyklus alle Wells einmal vermessen.

Der Well-Modus wird z.B. beim Calciumassay für die Aufnahme der Fluoreszenzkinetik gewählt (vergl. auch ATP Assay, Kap. 2.12).¹³⁴

Ein weiterer wichtiger Parameter ist der sogenannte Required value. Der Required value berücksichtigt, wie die Fluoreszenz sich im Verlauf einer Messung ändert. Dabei wird die Fluoreszenz zu Beginn einer Messung ins Verhältnis zur Fluoreszenz zum Ende einer Messung gesetzt. Für einen ausgeprägten Anstieg der Fluoreszenz muss der Required value möglichst niedrig gewählt werden. Den dritten wichtigen Parameter stellt der sogenannte Gain dar. Dieser bestimmt die elektronische Verstärkung des Fluoreszenzsignals. Für die Vergleichbarkeit von Messungen muss der Gain-Wert bei einem definierten Wert belassen werden.

Die Test-Parameter des POLARstar Microplatereaders wurden wie folgt festgelegt:

Anzahl der Zyklen:	23
Anzahl der Lichtblitze:	10 s ⁻¹
Intervallzeit zwischen zwei Reihen:	0,5 s
Vermessung der Mikrotiterplatte:	horizontal
Required Value:	20%
Gain:	37
Scan-Modus:	Plate

Datenanalyse:

Nach der Aufnahme aller Fluoreszenzwerte wurden die Daten im Programm Microsoft Excel als txt-Datei abgespeichert. Diese Daten wurden in das eigens für diesen Assay entwickelte Programm FILFIT transferiert. Zur Durchführung dieses Programms wurde vor der eigentlichen Analyse der Daten eine weitere Datei erzeugt, die sogenannte Def. (Definitions)-Datei, die alle wichtigen Angaben des Versuchs umfasst. Zu diesen Angaben gehören: (i) Die Methode, (ii) Zeit, (iii) Anzahl der zu untersuchenden Verbindungen, (iv) Konzentrationen der eingesetzten Verbindungen.

Im Folgenden werden die einzelnen Parameter erläutert:

Die Methode, normalerweise wird das Verfahren „1 2“ definiert, bezieht sich auf das Schema der 96er-Mikrotiterplatte. Eine Konzentration einer zu untersuchenden Verbindung wird untergliedert in ein ohne Zellen versehenes Well – daher die Angabe 1 – und zwei mit Zellen versetzte Wells – somit erklärt sich die Angabe 2. Die Fluoreszenz von Well „1“ wird von den Fluoreszenzwerten der beiden folgenden Wells subtrahiert. Die Methode kann in

Abhängigkeit von der Anzahl der der Replikate pro Testkonzentration beliebig geändert werden, muss aber innerhalb des Experiments gleich bleiben.

Die Zeitangabe in s legt fest, welcher Zeitraum später für die lineare Regression benutzt werden soll. Auf der Basis der Zeitangabe wird mit Hilfe dieses Programms die Hintergrundfluoreszenz, die für jede Modulatorkonzentration in dem Well ohne Zellen ermittelt wurde, von den mit Zellen versetzten Wells der gleichen Testsubstanzkonzentration für den definierten Zeitraum subtrahiert. Für gewöhnlich wird innerhalb des Programms filfit für die Zeit die Angabe „0 2760“ festgelegt. Auch dieser Parameter kann beliebig verändert werden.

Neben der Methode „1 2“ und der Zeit muss die Anzahl der Testsubstanzen aufgeführt werden. (In der Regel werden auf einer 96er-Mikrotiterplatte 3 Substanzen untersucht. So muss bei der Angabe innerhalb des Programms filfit eine „3“ unter Anzahl der Substanzen definiert werden.) Für jede Substanz wird eine neue Datei erzeugt. Diese Dateien enthalten die subtrahierten Fluoreszenzwerte.

Eine Konzentration eines verwendeten Modulators bezieht sich auf drei Wells, somit können auf einer 96er-Mikrotiterplatte unter der Methode „1 2“ insgesamt 32 Konzentrationen vermessen werden. Diese Konzentrationen werden von oben nach unten in logarithmierter Form angegeben. Dabei bezieht sich die Angabe „null“ auf den Puffer- bzw. Kontrollwert. Die Zahlenwerte, die hinter den Namen der eingesetzten Testverbindungen stehen, definieren welche der aufgeführten logarithmierten Konzentrationsangaben (Endkonzentrationen!) zu welcher Testverbindung gehören. Die definierten Konzentrationen werden beim Transfer der subtrahierten Fluoreszenzwerte nach GraphPad Prism® 3.0 mitübertragen.

Datenanalyse:

Die berechneten Werte aus dem Programm filfit wurden in das Programm GRAPHPAD PRISM® 3.0 importiert. Für jede Modulatorkonzentration wurde für die Fluoreszenzkinetik eine lineare Regression durchgeführt. Die so erhaltenen Steigungen der Fluoreszenz-Zeitkurven wurden gegen die jeweilige logarithmierte Konzentration der Testsubstanz aufgetragen. Dann wurde basierend auf der 4-Parameter-logistischen Gleichung eine Konzentrations-Effektkurve generiert.

2.13.1 Kombinationsexperimente

Bei der Durchführung eines Kombinationsexperimentes wurden zwei Testsubstanzen gleichzeitig verwendet. Die Zellen wurden, wie im Kap. 2.13. beschrieben, vorbereitet. Nach der gleichmäßigen Verteilung der in einer Ausplattierschale befindlichen Zellsuspension mit 3 Millionen Zellen in 10 ml Puffer, wurde mit Hilfe einer Transferpipette 80 μl Zellsuspension in jedes Well einer 96er-Mikrotiterplatte pipettiert. Danach wurden 10 μl der ersten Testsubstanzlösung und 10 μl der zweiten Testsubstanzlösung in der entsprechenden Konzentration zu jedem Well hinzugefügt, so dass sich ein Endvolumen von 100 μl ergab. Die nachfolgende in Abb. 2.5 dargestellte schematische Darstellung einer 96er-Mikrotiterplatte dient der Verdeutlichung des Pipettierschemas.

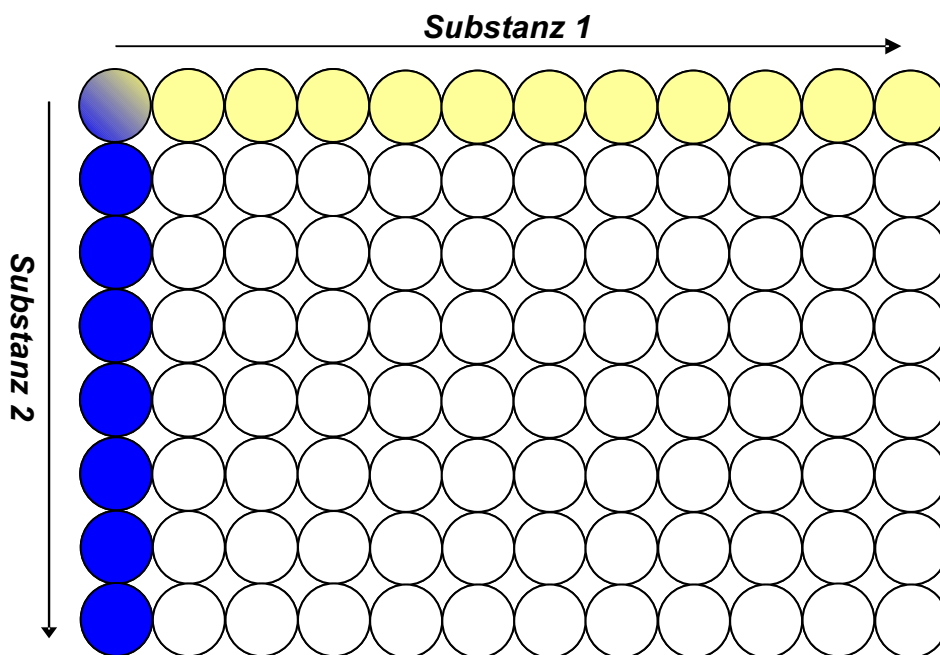


Abb. 2.5: Schema einer 96er-Mikrotiterplatte, wie sie für Kombinationsexperimente eingesetzt wurde.

Die Zugabe des ersten Modulators erfolgte in vertikaler Richtung, der zweite Modulator wurde in horizontaler Richtung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Der Teil der Mikrotiterplatte, der nur mit einem Modulator versehen ist, ist farbig hervorgehoben. Hier wird anstelle des zweiten Inhibitors nur KHP eingesetzt. Das in zwei Farben hervorgehobene Well der 96er-Mikrotiterplatte bezieht sich auf den Nullwert beider Testsubstanzen

und enthält KHP anstelle der Modulatoren.

Wie im Kapitel 2.13 erläutert, wurde die 96er-Mikrotiterplatte für 30 min in den Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ gestellt und nach Zugabe von Calcein AM die Fluoreszenz unmittelbar vermessen.

Die Anwendung des Programms flitit entfällt. Die erhaltenen Daten werden direkt in das Programm GRAPHPAD PRISM® 3.0 transferiert, nach Durchführung einer linearen Regression werden die Steigungen gegen die korrespondierende logarithmierte Konzentration aufgetragen und die Konzentrations-Effektkurven anschließend erstellt.

2.13.2 Theoretischer Hintergrund zum Calcein AM Assay

Der Calcein-acetoxy-methylester (Calcein AM, CAL-AM) ist ein nicht-fluoreszierendes Substrat von P-gp.^{136,137}

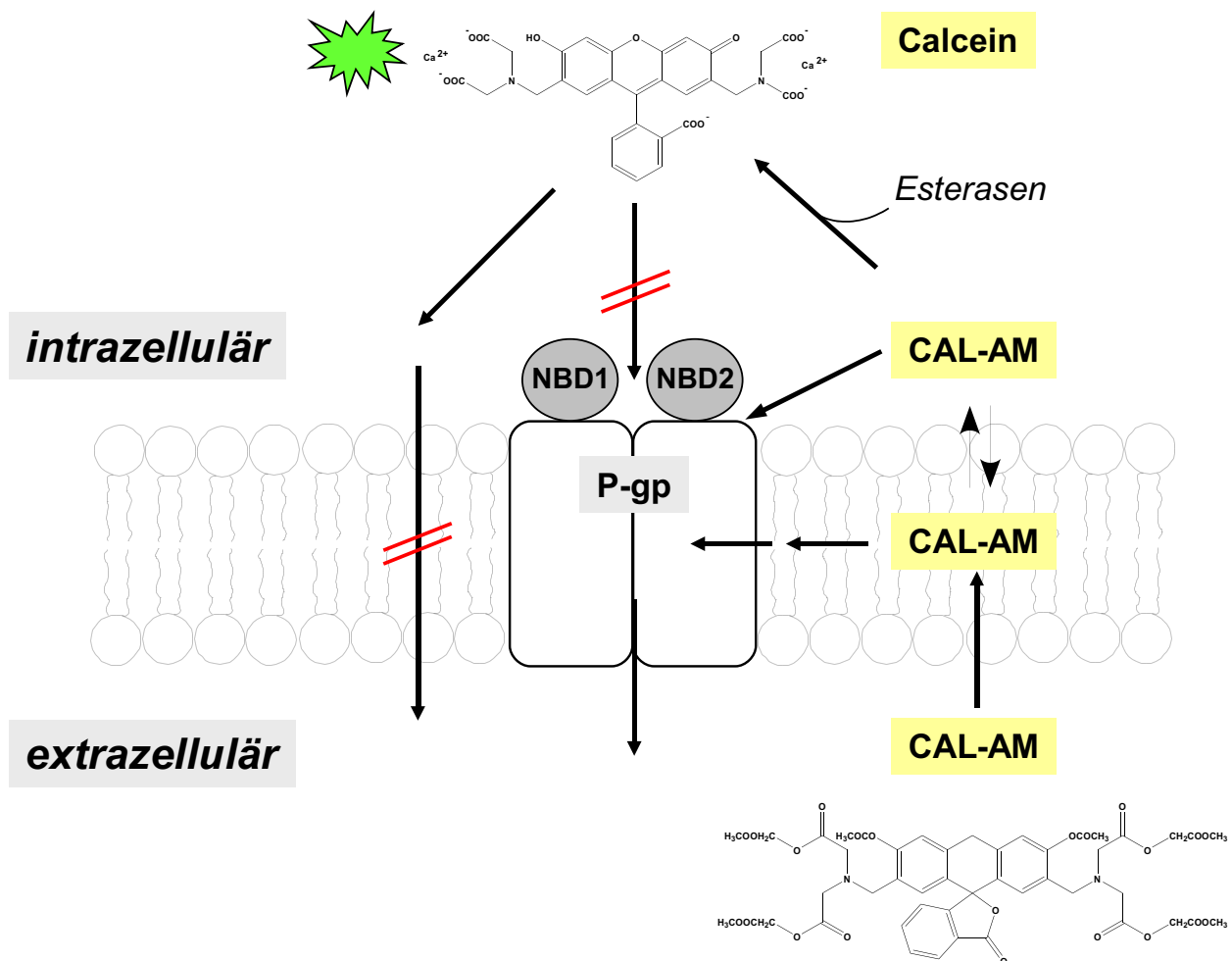


Abb. 2.6: Prinzip des Calcein AM Assays.

Dieser Ester kann aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften leicht Zellmembranen überwinden. Nach Diffusion in die Zelle wird der Ester durch intrazelluläre Esterasen in das fluoreszierende Calcein-Anion umgewandelt, das kein P-gp Substrat darstellt. Das Calcein-Anion trägt, wie in Abb. 2.6 zu erkennen ist, negative Ladungen, die diesem Molekül einen ausgeprägten hydrophilen Charakter verleihen, so dass das gebildete Calcein-Anion in der Zelle kumuliert.^{136,137} Eine Auswärtsdiffusion ist nicht mehr oder nur noch sehr langsam möglich, das fluoreszierende Anion kann bis zu 3 Tage in der Zelle verbleiben.¹³⁵

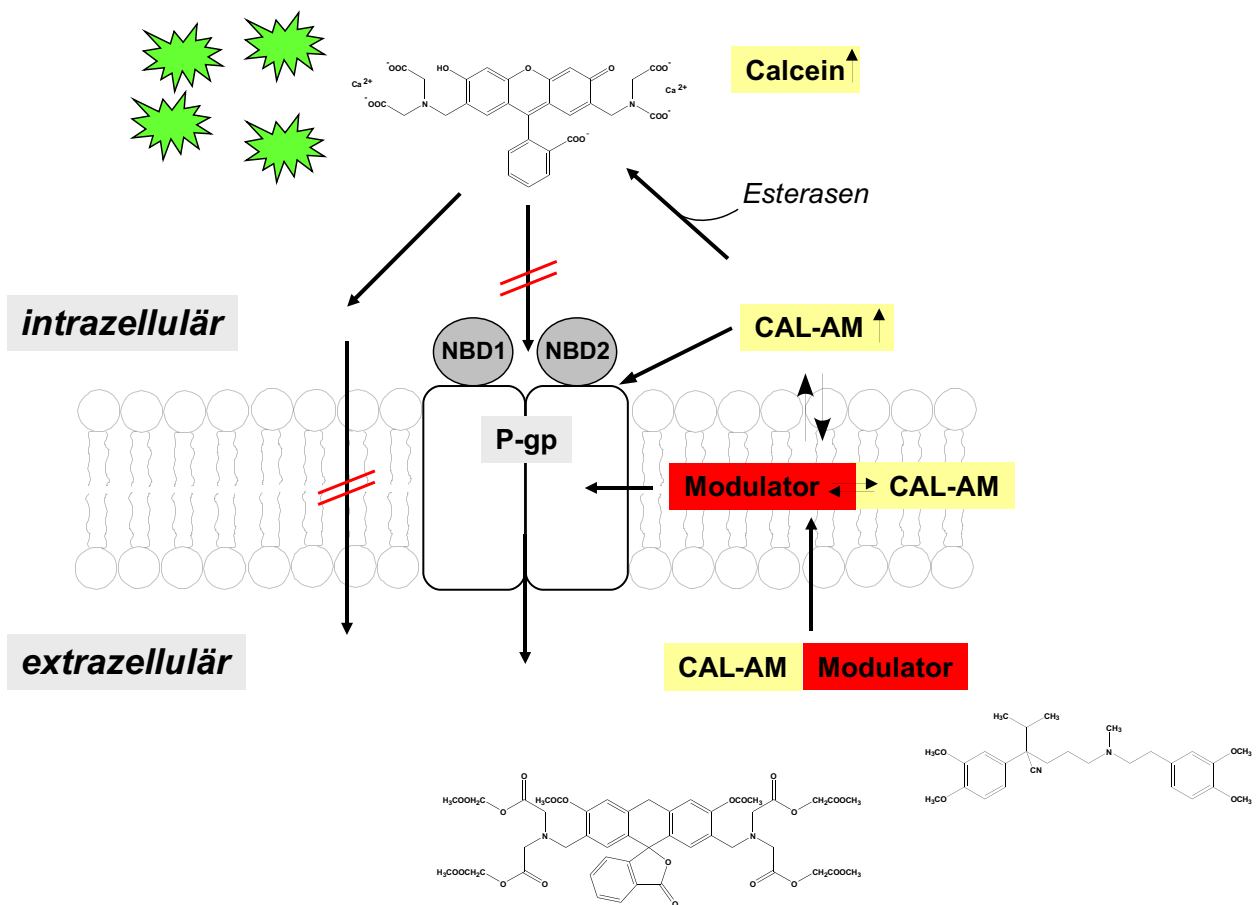


Abb. 2.7: Prinzip des Calcein AM Assays. Modulator und Calcein AM konkurrieren um die Bindung an P-gp und damit um den durch P-gp vermittelten Transport von Calcein AM. Mit zunehmender Konzentration und Affinität des Modulators zu P-gp steigt die intrazelluläre Konzentration von Calcein AM und des Calcein Anions an.

Bei hoher P-gp Aktivität wird Calcein AM „abgefangen“ (noch vor dessen Spaltung aus der Zelle geschleust). In Anwesenheit eines Modulators wie etwa Verapamil, konkurrieren Calcein AM und der Modulator um die Bindung an die Substratbindungsstelle, die auf der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert ist (s. Abb. 2.7). Der Modulator kann bei ausrei-

chender Affinität zur Substratbindungsstelle den Ester von dieser verdrängen, so dass dieser nun weiter in die Zelle diffundieren und zum fluoreszierenden Calcein umgesetzt werden kann. Die zunehmende Akkumulation von Calcein in der Zelle bedingt einen Anstieg der Fluoreszenz, wie Abb. 2.7 verdeutlicht.^{136,137,138,139} Für das Verständnis dieses Assays ist hervorzuheben, dass der Anstieg der Fluoreszenz des Calceinanions in der Zelle von mehreren Prozessen abhängig ist: (i) Die Diffusionsgeschwindigkeit des Esters in die Zelle, die durch den P-gp vermittelten Auswärtstransport verringert wird. (ii) Die Hydrolyse des Esters durch intrazelluläre Esterasen, die einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt. Die Konzentration des Modulators bzw. der zu untersuchenden Substanz bleibt während der Messung konstant, die Konzentration des Esters nimmt hingegen stetig ab. Aufgrund der Tatsache, dass nur einer der beiden Reaktionspartner seine Konzentration verändert, liegt eine Reaktionskinetik erster Ordnung vor, die einen exponentiellen Anstieg der Fluoreszenz verursacht. Zu Beginn der Fluoreszenzmessung ist die Konzentration des Esters noch so hoch, dass diese fast unverändert bleibt. Daher liegt eine Reaktionskinetik pseudonullter Ordnung vor, der Fluoreszenzanstieg ist zu Beginn daher linear. Erst durch die später stattfindende, signifikante Verringerung der Konzentration des Esters, geht der Fluoreszenzanstieg in eine Reaktionskinetik erster Ordnung über.¹⁴⁰

2.13.3 BCECF AM Assay

An dieser Stelle sei nur darauf hingewiesen, dass die Durchführung dieses Assays völlig analog zum Calcein AM Assay erfolgte. Deshalb wird auf eine ausführlichere Beschreibung verzichtet.

2.14 Hoechst Assay

Die unterschiedlichen Zelllinien (A2780, A2780 Adr, MDCK-MDR1, MDCK) wurden in Analogie zum Calcein AM Assay vorbereitet und nach dem in Abb. 2.4 gezeigten Schema in eine schwarze 96er-Mikrotiterplatte mit klarem Boden überführt. Für eine 96er-Mikrotiterplatte wurden wie beim Calcein AM Assay 3 Millionen Zellen eingesetzt und diese nach dem in Abb. 2.4 gezeigten Schema in die Platte überführt. Die Zellsuspension

wurde auf eine Dichte von 300000 Zellen/ml eingestellt, in jedes Well wurden 90 µl der Zellsuspension mit Hilfe einer Multikanalpipette gegeben. Nach der Beschickung der Mikrotiterplatte mit den Testsubstanzen wurde diese für 30 min bei 37°C und einem Luft-CO₂-Verhältnis von 95:5 im Inkubator gelagert. Während dieser Präinkubationsphase wurde der POLARSTAR Microplate-Reader auf 37°C temperiert und eine 30 µmol/l Hoechst-Lösung (Hoechst 33342) in steril filtriertem Aqua destillata hergestellt.

Nach Beendigung der Inkubationsphase erfolgte die Zugabe der 30 µmol/l Hoechst-Lösung in eine Ausplattierschale. 20 µl der Hoechst-Lösung wurden mit Hilfe einer Multikanalpipette in die Vertiefungen pipettiert, so dass in jedem Well eine Endkonzentration von 5 µM resultierte. Das Gesamtvolumen pro Well betrug 120 µl.

Danach wurde die Fluoreszenz im POLARstar Microplatereader aufgenommen. Vor der Messung wurde der "Required value" auf 20% und der "Gain-Wert" auf 37 festgelegt.

Die Messung wurde im "Plate Mode" ausgeführt.

Über einen Zeitraum von 2700 Sekunden wurde die Fluoreszenz von Hoechst bei einer Exzitationswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm alle 100 Sekunden gemessen. Die weiteren Testparameter des POLARstar Micorplatereaders wurden folgendermaßen festgelegt:

Anzahl der Zyklen:	mindestens 10
Zyklusdauer:	100 s
Anzahl der Lichtblitze:	10 s ⁻¹
Intervallzeit zwischen zwei Reihen:	0,5 s
Vermessung der Mikrotiterplatte:	horizontal
Required Value:	20%
Gain:	37
Scan-Modus:	Plate

Ausdrücklich sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass mit der Bezeichnung "Hoechst Assay" in dieser Arbeit immer die Verwendung des Substrates Hoechst 33342 und keines anderen Hoechst-Derivates für die Durchführung dieses Testsystems gemeint ist.

Datenanalyse:

Die gemessenen Fluoreszenzwerte wurden, wie in Kap. 2.13 beschrieben, analog zum Calcein AM Assay in das Programm FILFIT übertragen. Die Hintergrundfluoreszenz wurde mit Hilfe dieses Programms subtrahiert. Anschließend wurde der kleinste Fluoreszenzwert einer Fluoreszenz-Zeitkurve von allen anderen Fluoreszenzwerten abgezogen. Nach dieser Subtraktion wurden die neuen, bei Null beginnenden Fluoreszenz-Zeitkurven in das Programm GRAPHPAD PRISM® 3.0 transferiert. Basierend auf dem Modell einer einphasig verlaufenden, exponentiellen Assoziationskurve (one phase exponential association) wurde eine nichtlineare Regression durchgeführt. Für die Generierung einer sigmoidalen Konzentrations-Wirkungskurve wurden die erhaltenen Y_{\max} -Werte dieser Kurven und deren korrespondierende logarithmierte Modulator- bzw. Substratkonzentrationen verwendet. Außer dieser Variante wurden die initialen Anstiege der einzelnen Fluoreszenz-Zeit-Verläufe analysiert. Als Zeitraum wurde der Bereich zwischen 0 und 1000 s gewählt, weil hier eine Reaktionskinetik pseudonullter Ordnung vorlag. Die Anstiege wurden gegen die korrespondierenden logarithmierten Konzentrationen aufgetragen und die 4-Parameter-logistische Gleichung zur Analyse eingesetzt.

2.14.1 Theoretischer Hintergrund zum Hoechst Assay

Hoechst 33342 – ein Bisbenzimidazolderivat – kann sich in die kleine Furche der DNA, besonders innerhalb Adenin-Thymin-reicher Sequenzen einlagern.^{141,142,143}

Aufgrund dieser Eigenschaft und wegen der Eigenfluoreszenz dieser Verbindung (Exzitationsmaximum von 340 nm, Emissionsmaximum von 450 nm)¹³⁵ wird Hoechst 33342 häufig zur Markierung der DNA eingesetzt.¹⁴⁴ Die Bindung von Hoechst 33342 an die DNA ist dabei mit einer deutlichen Zunahme der Fluoreszenzintensität verbunden. Nach Shapiro und Ling bewirkt die Einlagerung von Hoechst 33342 in die DNA im Vergleich zum wässrigen Milieu eine Zunahme der Fluoreszenz um den Faktor 1500.¹⁴⁵ Auch der Eintritt von Hoechst 33342 in die Plasmamembran ist mit einer ausgeprägten, etwa 750fachen Erhöhung der Fluoreszenzintensität verbunden.^{145,146} Hoechst 33342 ist auch ein P-gp Substrat, das zur Namensgebung einer Bindungsstelle, der sogenannten Hoechst Bindungsstelle oder auch H-Seite, geführt hat.⁷⁵

Der Kernpunkt des Hoechst Assays ist die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität dieser Verbindung vom Milieu, in dem sich diese befindet.

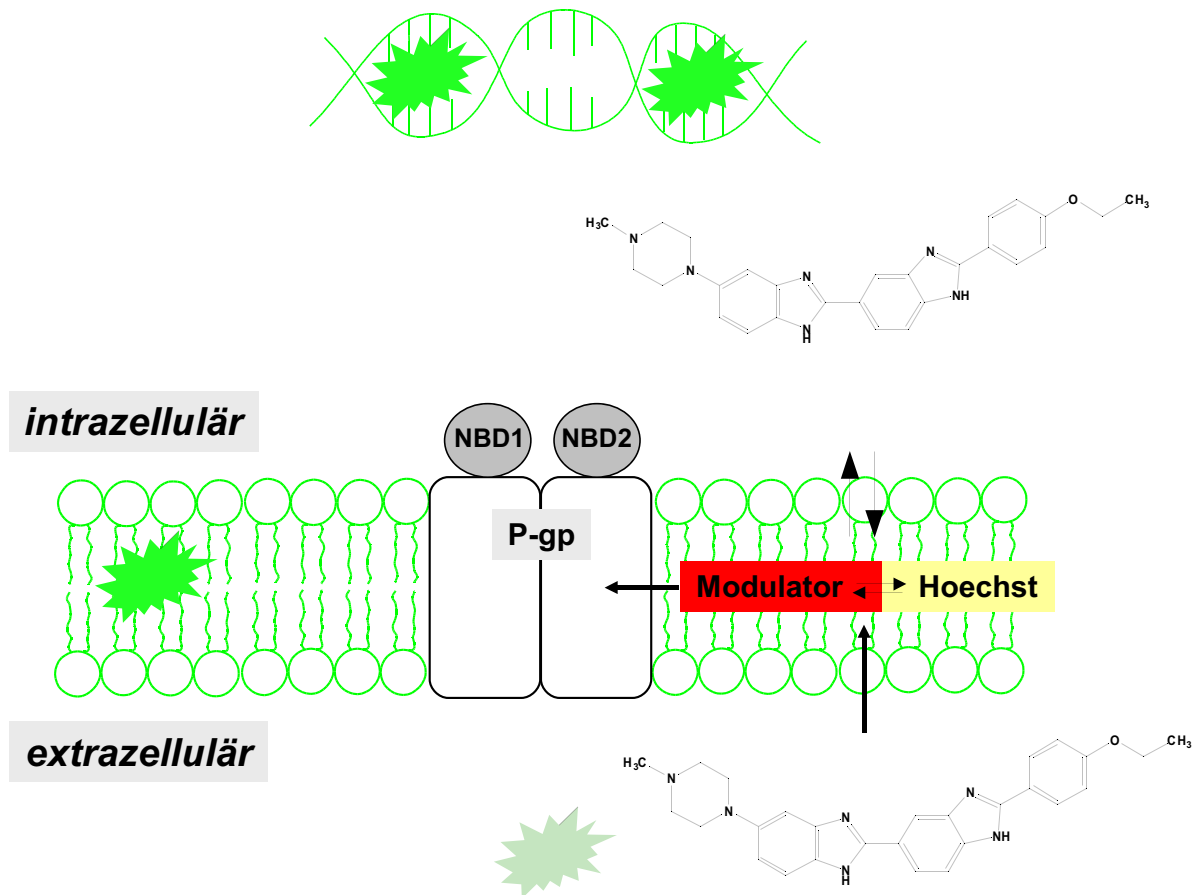


Abb. 2.8: Prinzip des Hoechst Assays.

Konkurrieren Modulatoren oder Substrate mit Hoechst 33342 um die Substratbindungsstelle, wird Hoechst 33342 mit zunehmender Konzentration dieser Substanzen von seiner Bindungsstelle verdrängt (vergl. Abb. 2.8). Der Efflux von Hoechst 33342 nimmt infolgedessen ab, so dass die zelluläre und intramembranäre Konzentration dieser Substanz ansteigt.

Obwohl die Gesamtkonzentration von Hoechst 33342 während des Assays konstant bleibt, führt die zunehmende Inhibition von P-gp zu einem nennenswerten Anstieg der Fluoreszenz.

Der Anstieg der Hoechst 33342-Fluoreszenz folgt einer Reaktionskinetik erster Ordnung und verläuft daher hyperbolisch.¹⁴⁰

2.15 Simultanassay – Calcein AM und Hoechst Assay in Kombination

Beim sogenannten Simultanassay wurden die beiden Testsysteme des Calcein AM und des Hoechst Assays miteinander kombiniert. Es wird gleichzeitig die Fluoreszenz des Calceinanions und von Hoechst 33342 aufgenommen. Dabei wurden die Zellen wie in Kap. 2.13 beschrieben geerntet, gewaschen, in eine Ausplattierschale überführt und in einem Gesamtvolumen von 10 ml KHP gleichmäßig verteilt. Die Zellsuspension wurde auf eine Dichte von 335000 Zellen pro 1 ml eingestellt. Für eine 96er-Mikrotiterplatte wurden in Analogie zur Vorgehensweise des Calcein AM und Hoechst Assays 3 Millionen Zellen verwendet. Die Zellen wurden nach dem in Abb. 2.4 illustrierten Schema in die 96er-Mikrotiterplatte mit Hilfe einer Multikanalpipette transferiert. Dabei wurde wie beim Hoechst Assay eine schwarze Mikrotiterplatte eingesetzt. Das Gesamtvolumen pro Well belief sich nach Zugabe der Testsubstanzen auf 100 µl.

Tabelle 2.3: Lösung, die die Verbindungen Calcein AM und Hoechst 33342 enthält (Simultanassay).

Bestandteil	Volumen
Hoechst 33342 (0,1 mmol/l)	805 µl
Calcein-AM (1 mmol/l)	5 µl
Aqua destillata (steril filtriert)	3190 µl

Die Mikrotiterplatte wurde dann für die Dauer von 30 min im Inkubator platziert, während dieser Zeit wurde der POLARstar Mikroplaterereader auf 37°C temperiert. Für die Durchführung des Simultanassays wurde nur dieser Microplaterereader verwendet, weil nur dieser über die notwendigen Absorptions- und Emissionsfilter verfügt. Die in Tabelle 2.3 aufgeführte Lösung wurde nach intensivem Mischen in einer Ausplattierschale vorgelegt (Endkonzentrationen von Calcein AM und Hoechst 33342 entsprechend der Einzelerperimente). In jedes Well der schwarzen 96er-Mikrotiterplatte wurden 33 µl dieser Lösung mit Hilfe einer Multikanalpipette gegeben. Die Fluoreszenz wurde in Intervallen von 180 s aufgenommen. Folgende Testparameter wurden definiert:

Anzahl der Zyklen:	mindestens 23
Zyklusdauer:	180 s
Anzahl der Lichtblitze:	10 s ⁻¹
Intervallzeit zwischen zwei Reihen:	0,5 s
Vermessung der Mikrotiterplatte:	horizontal
Required Value:	20%
Gain Hoechst 33342:	32
Gain Calcein AM:	37
Exzitationswellenlänge Hoechst 33342:	355 nm
Exzitationswellenlänge Calcein AM:	485 nm (Bandbreite ± 6 nm)
Emissionswellenlänge Hoechst 33342:	460 nm
Emissionswellenlänge Calcein AM:	520 nm (Bandbreite ± 17,5 nm)
Scan-Modus:	Plate

Datenanalyse:

Für die Analyse der gemessenen Fluoreszenzwerte wurden diese als txt-Datei unter dem Programm EXCEL abgespeichert und nach LINUX transferiert. Nach Erstellung der Def.Datei wurde das Programm FILDIV verwendet. Dieses eigens für den Simultanassay entwickelte Programm hat die Aufgabe Calcein- und Hoechst-Fluoreszenzwerte eines gemeinsamen Datenblattes zu trennen. Mit Hilfe des Befehls fildiv wurden die Calcein- und Hoechst-Fluoreszenzwerte des gemeinsamen Datenblattes in zwei neue einzelne Datenfiles umgewandelt, die jeweils nur noch Calcein- bzw. Hoechst-Fluoreszenzwerte enthielten. Dann wurde für die neuen Dateien jeweils ein Def.File erstellt, wobei anschließend mit Hilfe des Programms filfit die Hintergrundfluoreszenz subtrahiert wurde. Die Daten wurden nach GRAPHPAD PRISM® 3.0 transferiert und, wie bereits in Kap. 2.13 (Calcein AM Assay) und Kap. 2.14 (Hoechst Assay) beschrieben, analysiert.

2.16 FACS Vinblastin-Bodipy® Assay

Dieser Assay wurde nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

- Die Zellen wurden analog zu dem in Kap. 2.1 aufgeführten Verfahren von einer nahezu konfluenten T175-Gewebekulturflasche abgelöst und einer Zellzahlbestimmung (s. Kap. 2.10) unterworfen.
- Transfer der Zellsuspension in einen 15 ml Falcon. Für jede einzelne zu analysierende Konzentration einer Testsubstanz wurden 2 Millionen Zellen benötigt. Für jede Konzentration der zu untersuchenden Substanz wurden 2 Replikate definiert.
- Die Zellen wurden dreimal mit je 1 ml KHP gewaschen.
- Anschließend wurden 640 µl Zellsuspension mit 2 Millionen Zellen in ein FACS-Teströhrchen überführt (Zelldichte: 3,125 Millionen Zellen pro ml).
- Dann erfolgte die Zugabe von 80 µl der zu untersuchenden Substanz in der entsprechenden Konzentration in das FACS-Teströhrchen, das die Zellsuspension beinhaltete.
- Die Zellen wurden für die Dauer von 30 min bei 37°C und einem Luft-CO₂-Verhältnis von 95:5 inkubiert.
- Nach Beendigung der Inkubationsphase erfolgte die Zugabe von 80 µl des Fluoreszenzfarbstoffes Vinblastin-Bodipy® zu den Zellen. Das Gesamtvolumen in jedem FACS-Teströhrchen betrug 800 µl, die Endkonzentration des Fluoreszenzfarbstoffes 0,32 µmol/l.
- Die Zellsuspension wurde sorgfältig gemischt, die FACS-Teströhrchen mit Aluminiumfolie als Lichtschutz umhüllt, und diese für 40 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.
- Nach dieser Zeit wurde die Zellsuspension intensiv gemischt und mit Hilfe des Durchflusszytometers vermessen (*Messpunkt 1*).
- Nachdem alle Proben vermessen waren, wurden diese erneut einer weiteren Messung unterworfen (*Messpunkt 2*).

Es wurden folgende Geräteparameter definiert:

- Aufnahme der Messsignale für 10 s oder 10000 gezählte Ereignisse bei einer Span-

nung des Fotomultipliers von 550 Volt.

- Fluoreszenzmessung im Fluoreszenzkanal FL₁ bei einer Emissionswellenlänge von 530 nm (Bandbreite ± 15 nm).
- Detektion von Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC).

Für die Auswertung wurde das geometrische Mittel der Fluoreszenzwerte verwendet. Das geometrische Mittel der Fluoreszenz (Ordinate) wurde gegen die korrespondierende logarithmierte Konzentration der Testsubstanz (Abszisse) aufgetragen. Anschließend wurde eine auf der 4-Parameter-logistischen Gleichung basierende Konzentrations-Wirkungskurve mit Hilfe des Programms GRAPHPAD PRISM[®] 3.0 generiert.

2.17 Calcein-Cobalt Assay, Untersuchung von MRP1

Der Calcein-Cobalt Assay stellt eine Abwandlung des Calcein AM Assays dar. Alle wesentlichen Schritte erfolgen in Analogie zum Calcein AM Assay. Nach Überführung von 80 µl Zellsuspension (MDCK-MDR1, MDCK) nach dem in Abb. 2.4 gezeigten Schema schloss sich die Zugabe von 10 µl einer 0,1 µmol/l Cobalt-(II)-Lösung zu allen Wells der Mikrotiterplatte an. Danach wurden 10 µl der entsprechenden Konzentration der Testsubstanz in die dafür vorgesehenen Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Das Gesamtvolumen in jedem Well betrug danach 100 µl. Die Mikrotiterplatte wurde nun für 30 min bei 37°C unter 5% CO₂-Atmosphäre und einer relativen Feuchte von 96 % inkubiert. Nach dem Ende der Inkubationsphase wurde 33 µl einer 0,5 µmol/l Calcein AM-Lösung in die einzelnen Wells gegeben und die Fluoreszenz sofort in Abständen von 120 s bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm (Bandbreite ± 6 nm) und einer Emissionswellenlänge von 520 nm (Bandbreite ± 17,5 nm) aufgenommen. Die Messung erfolgte unter Anwendung der gleichen Testparameter, wie sie beim Calcein AM Assay ausgewählt wurden.

2.17.1 Theoretischer Hintergrund zum Calcein-Cobalt Assay

Ein zentraler Punkt dieses Assays ist die Tatsache, dass Co²⁺-Ionen die Fluoreszenz des Calcein-Anions quenchen bzw. löschen können. MRP1 ist in der Lage sowohl das Calcein

-Anion als auch Calcein AM aus der Zelle herauszuschleusen.

Cobaltionen verbleiben aufgrund ihrer Ladung weitestgehend ausserhalb der Zelle, so dass sie nur die Fluoreszenz des extrazellulären Calcein-Anions löschen können. Diffundiert nun der Ester durch die Membran, wird ein Teil des Esters über MRP1 vermittelt in den Extrazellulärraum transportiert.

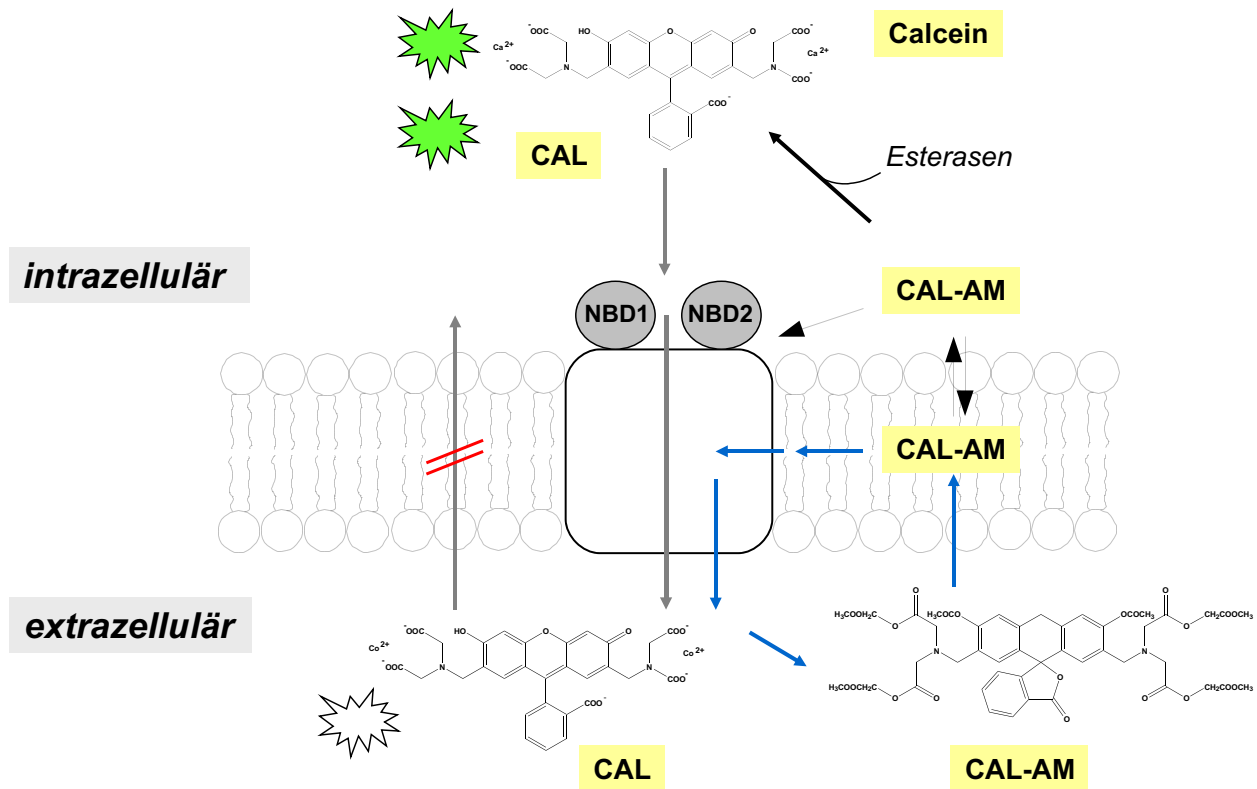


Abb. 2.9: Schematische Darstellung zum Calcein-Cobalt Assay.

Wenn der Ester in die Zelle gelangt ist, wird dieser durch endogene, unspezifische Esterasen zum fluoreszierenden Calcein-Anion umgewandelt. Das hydrophile, fluoreszierende Calcein-Anion wird über MRP1 in den Extrazellulärraum geschleust, wo dessen Fluoreszenz durch die Cobaltionen gequencht wird (vergl. Abb. 2.9).

Wird MRP1 durch Modulatoren oder Substrate inhibiert, wird der Efflux des Calcein Anions und von Calcein AM inhibiert, so dass die Fluoreszenz ansteigt.

Der Calcein-Cobalt Assay folgt einer Reaktionskinetik erster Ordnung. Die Abnahme der Konzentration des Esters ist zu Beginn des Assays so gering, dass eine lineare Zunahme der Fluoreszenz mit einer Reaktionskinetik pseudonullter Ordnung resultiert (vergl. Calcein AM Assay, Kap. 2.13).

2.18 BCRP-Hoechst Assay

Zur funktionellen Untersuchung von BCRP wurden die MCF-7 MX Zellen verwendet. Die Zellen wurden analog zu dem in Kap. 2.14 vorgestellten Hoechst Assay behandelt. Aus diesem Grund wird auf eine genaue Beschreibung an dieser Stelle verzichtet. Als Standardmodulator bzw. Vergleichssubstanz wurde Novobiocin eingesetzt. Die Hoechst 33342-Lösung (33 µl pro Wellenlänge) wurde pro Wellenlänge hinzugefügt) setzte sich wie folgt zusammen:

Bestandteil	Volumen
Hoechst 33342 (100 µmol/l)	320 µl
Aqua destillata	ad 4000 µl

Die Endkonzentration von Hoechst 33342 betrug in jedem Wellenlänge 2 µmol/l. Die Auswertung erfolgte ebenfalls wie in Kap. 2.14. Im Vergleich zum Hoechst Assay, der die Funktion von P-gp analysieren soll, wurde der Gainwert auf 30 fixiert. Alle weiteren Beschreibungen sind dem Kap. 2.14 zu entnehmen.

2.19 Funktionsweise eines Durchflusszytometers

Bei einem Durchflusszytometer handelt es sich um ein optisches Messsystem, das sowohl Fluoreszenz- als auch Streulichtsignale einzelner in einem Flüssigkeitsstrom lokalisierter Zellen analysiert. Ein Durchflusszytometer umfasst drei wesentliche Bestandteile:

- Flüssigkeitssystem
- Optisches System
- Signalverarbeitendes System

Das *Flüssigkeitssystem* enthält zwei Leitungen. Die erste dieser beiden Leitungen kann als Zuleitung verstanden werden. Über dieses Zuleitungssystem wird kontinuierlich die sogenannte Trägerflüssigkeit durch eine Messkammer transportiert. Der Weg der auch als Hüllstromflüssigkeit bezeichneten Trägerflüssigkeit beginnt in einem Vorratsbehälter und findet sein Ende in einem Abfallbehälter. Über eine zweite Leitung gelangen die in einem Probenröhrchen befindlichen Zellen in die Messkammer. Das Ende der zweiten Leitung ist

auf das Zentrum der Messkammer gerichtet. Dort wird der sich verengende Probenstrom von der Hüllstromflüssigkeit erfasst und einer Beschleunigung von bis zu 7 m/s unterworfen.

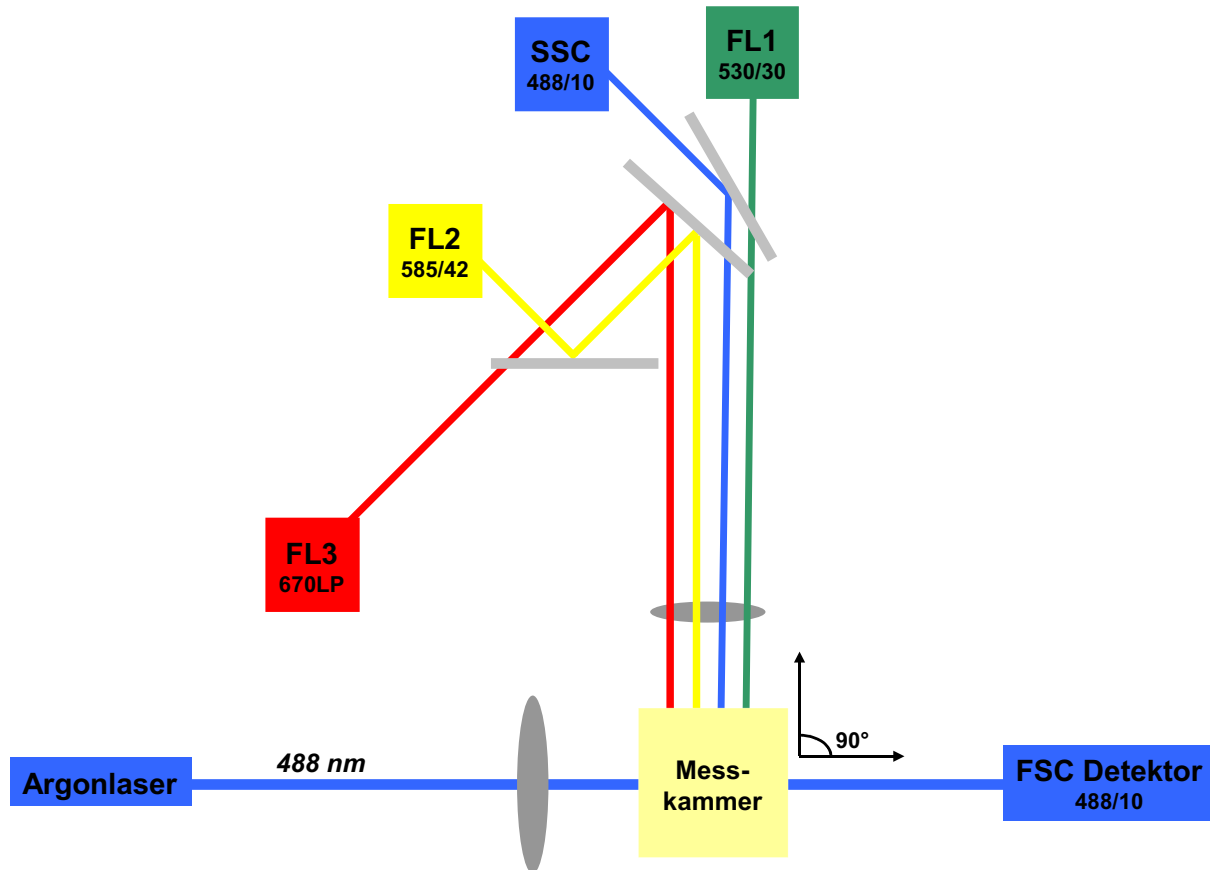


Abb. 2.10: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers.

Dieser Vorgang wird auch als Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung bezeichnet und garantiert, dass die Zellen einzeln, wie an einer Perlschnur aufgereihe Perlen, den Messpunkt passieren. Am Messpunkt trifft der gebündelte, von einem Argonlaser mit einer Exzitationswellenlänge von 488 nm stammende Lichtstrahl auf die separierten Zellen.

Das *optische System* gliedert sich in eine Anregungs- und eine Detektionseinheit. Die Anregungseinheit ermöglicht eine geeignete Strahlverformung, die zu einem Laserstrahl mit einem horizontal-elliptischen Durchmesser von $20 \times 60 \mu\text{m}$ mit ausreichender Signalintensität und Auflösung führt. Die Detektionseinheit erfasst:

- FSC (Forward Angle Light Scatter) = Vorwärtstreulicht, das axial zum anregenden Laserstrahl detektiert wird. Das Vorwärtstreulicht ist proportional zur Zelloberfläche.

- SSC (Side Scatter) = Seitwärtsstreulicht, das im 90°-Winkel gemessen wird. Das Seitwärtsstreulicht resultiert aus Lichtbrechung und Reflexion und ist proportional zur Zellgranularität bzw. Komplexität der Zelle.
- Fluoreszenz – diese wird wie das Seitwärtsstreulicht orthogonal zum anregenden Laserstrahl gemessen. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird in vier verschiedene Kanäle mit verschiedenen Wellenlängenbereichen aufgespalten: FL₁, FL₂, FL₃ und FL₄.

Das *signalverarbeitende System* dient der Konvertierung von optischen in elektrische Signale. Als Photodetektoren kommen hierbei Photodioden und Photoröhren (Photomultiplier tubes = PMT) zum Einsatz. Die Photodioden erzeugen elektrische Spannung und finden Anwendung zur Messung intensiver Messsignale, wie sie bei der Vorwärtslichtstreuung auftreten. Die Photoröhren verstärken die schwächeren Fluoreszenz- und Seitwärtsstreulichtsignale.¹⁴⁷

2.19.1 Markierung von P-gp durch den Antikörper MRK-16

Zur Markierung von P-gp mittels des Antikörpers MRK-16 wurden die Zelllinien (A2780, A2780 Adr, MCF-7, MCF-7 Adr, MCF-7 MX, MDCK und MDCK-MDR1), wie in Kap. 2.1 beschrieben, geerntet und einer Zellzahlbestimmung (s. Kap. 2.10) unterworfen. Für die Durchführung eines Antikörperversuchs wurden 1 Million Zellen der jeweiligen Zelllinie eingesetzt und diese in einen 15 ml-Falcon überführt. Die Zellen wurden anschließend mit 2 ml des auf 4°C gekühlten sogenannten Waschpuffers (Zusammensetzung s. Kap. 2.9.3) überschichtet und für die Dauer von 3 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde die überstehende Lösung vorsichtig abgenommen und mit 2 ml des sogenannten Anfärbepuffers (s. Kap. 2.9.3) versetzt, ohne aber das Zellpellet aufzulösen oder zu beschädigen. Nach erneuter Zentrifugation (4°C, 300 g, 3 min) und darauf folgender Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet in 100 µl 4°C kalten Anfärbepuffer resuspendiert. Zu der Zellsuspension wurden 20 µl des Antikörpers gegeben und durch behutsames Auf- und Abpipettieren die Homogenität der Lösung gewährleistet. Unmittelbar danach wurde der Falcon zum Schutz vor Lichteinstrahlung mit Aluminiumfolie umwickelt und für 40 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubationsphase wurde erneut zentrifu-

giert (4 °C, 300 g, 3 min), die überstehende Flüssigkeit entfernt und das Zellpellet mit 2 ml des Anfärbepuffers überschichtet. Wiederum wurde zentrifugiert. (4°C, 300 g, 3 min), der Überstand abgenommen, das unversehrte Zellpellet vorsichtig in 1000 µl Waschpuffer resuspendiert und die Lösung anschließend in ein FACS-Teströhrchen gegeben.

Die Zellen wurden dann unmittelbar mit Hilfe des Durchflusszytometers analysiert. Die Analyse der Zellen erfolgte bei einer Spannung von 550 Volt des Fotomultipliers. Die Fluoreszenz wurde für 10 s oder 10000 gezählte Zellen im Fluoreszenzkanal FL₁ bei einer Wellenlänge von 530 nm (Bandbreite ± 15 nm) gemessen. Die Durchflusszytometer-basierte Analyse der Zellen umfasste neben der Fluoreszenzbestimmung auch die Aufnahme des Vorwärts- (FSC) und des Seitwärtsstreulichtes (SSC). Für jede einzelne Zelllinie wurden mindestens vier unabhängige Experimente durchgeführt. Die Fluoreszenzwerte der Einzelexperimente wurden gemittelt und deren Standardabweichung berechnet. Die für die Generierung des Mittelwertes verwendeten Fluoreszenzwerte entsprechen dem geometrischen Mittel (bezogen auf ein Einzelexperiment).

2.19.2 Antikörper-basierte Markierung von BCRP

In Analogie zu Kap. 2.19.1 wurden die verschiedenen Zelllinien (A2780 Adr, A2780, MCF-7, MCF-7 MX) geerntet und jeweils 1 Million Zellen für die Durchführung einer ABCG2/BCRP-Expressionsstudie in 15 ml-Falcons überführt. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml PBS-Puffer gewaschen und diese bei 4°C für die Dauer von 3 min bei 186 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit Hilfe einer Pipette abgenommen oder behutsam abdekantiert und mit 1 ml einer 10%igen Formaldehyd-PBS-Lösung versetzt, wobei das Pellet nun resuspendiert wurde. Nach der 10 minütigen sogenannten Fixierungsphase wurde erneut zentrifugiert (186 g, 4°C, 3 min). Dann wurde die Lösung entfernt und das Zellpellet in 1 ml einer eiskalten 90%igen Methanollösung resuspendiert und die homogene Zellsuspension für 10 min im Kühlschrank belassen. Erneut wurde zentrifugiert (186 g, 4°C, 3 min) und die Zellen, ohne das Zellpellet aufzulösen, mit einer 0,01%igen Tween 20-PBS-Lösung gewaschen. Ein weiterer Zentrifugationsschritt folgte (186 g, 4 °C, 3 min). Die überstehende Flüssigkeit wurde abgenommen und durch 1 ml einer 10%igen BSA-Lösung in PBS ersetzt. Das Zellpellet wurde dabei aufgelöst und die Lösung durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Dann wurde für eine Stunde bei Raum-

temperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurde zentrifugiert (186 g, 4°C, 3 min). Ohne das Zellpellet zu resuspendieren, folgten drei Waschschr tte mit einer 0,01%igen Tween-20-PBS-Lösung. Nach dem letzten Waschschr tt und der sich anschließenden Zentrifugation (186 g, 4°C, 3 min) wurde der Überstand entfernt und die Zellen in 100 µl einer 1:100-Verdünnung (PBS-Lösung mit 2% BSA) des primären monoklonalen Antikörpers BXP-21 sorgfältig resuspendiert und 60 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubationsphase mit dem primären Antikörper wurde zentrifugiert (186 g, 4°C, 3 min) und zweimal mit 1 ml einer 0,01%igen Tween-20-PBS-Lösung gewaschen. Nach dem letzten Waschschr tt wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit einer 1:50-Verdünnung des sekundären Antikörpers (FITC-conjugated sheep anti-mouse antibody) und einer 0,01%igen Tween-20-PBS-Lösung versetzt und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Der 15 ml-Falcon wurde unmittelbar danach mit Aluminiumfolie zum Lichtschutz umwickelt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach dieser Zeit wurde zentrifugiert (186 g, 4°C, 3 min), zweimal 1 ml einer 0,01%igen Tween-20-Lösung (in PBS) gewaschen, dann mit 500 µl dieser Lösung versetzt und in ein FACS-Teströhrchen überführt. Die Analyse der Zellen erfolgte unter den bereits in Kap. 2.19.1 (P-gp Antikörper Markierung) aufgeführten Bedingungen, die Auswertung der Ergebnisse erfolgte analog. Die einzelnen Proben wurden bis zu ihrer Vermessung unter Lichtschutz auf Eis gelagert.

2.20 Calcein-AM und Hoechst 33342 als Fluoreszenzmarker von A2780 Adr Zellen

Wie in Kap. 2.13 bzw. Kap. 2.14 beschrieben, wurden zwei Proben mit je 3 Millionen Zellen der Zelllinie A2780 Adr vorbereitet; die Zellen wurden nach drei Waschschr tten mit KHP in zwei 15 ml-Falcons überführt und mit Calcein AM einerseits und Hoechst 33342 andererseits für die Dauer von 30 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Konzentration der beiden Farbstoffe war analog zu den im Calcein AM Assay (vergl. Kap. 2.13) und Hoechst Assay (vergl. Kap. 2.14) eingesetzten Konzentrationen. Nach Beendigung der Inkubationsphase wurden die beiden Proben im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Das fluoreszierende Calcein wurde mit Hilfe des FITC-Filters (Fluorescein-5-isothiocyanat) bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm detektiert. Für die Betrachtung der mit Hoechst 33342 versehenen Zellen wurde der DAPI-Filter (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-Filter) zusammen mit einer Exzitationswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm gewählt.

2.21 Resistenzfaktor

Der Resistenzfaktor, der auch als Resistenzgrad bezeichnet wird, beschreibt das Verhältnis des an resistenten Zellen ermittelten IC_{50} -Wertes einer Substanz X zu dem an der korrespondierenden sensitiven Zelllinie bestimmten IC_{50} -Wertes der gleichen Substanz X.

$$\text{Resistenzfaktor} = \frac{IC_{50}(\text{resistent})}{IC_{50}(\text{sensitiv})} \quad \text{Gleichung 2.1}$$

Um den Resistenzfaktor möglichst genau bestimmen zu können, wurden die IC_{50} -Werte der verschiedenen Zytostatika mindestens dreimal sowohl für die sensitive als auch für die resistente Zelllinie ermittelt. Die pIC_{50} -Werte wurden für die sensitive und für die resistente Zelllinie getrennt gemittelt und dann der Resistenzfaktor wie folgt bestimmt:

$$\text{Resistenzfaktor} = 10^{(\text{Mittelwert}_{pIC_{50}(\text{sensitiv})} - \text{Mittelwert}_{pIC_{50}(\text{resistent})})} \quad \text{Gleichung 2.2}$$

Der Gesamtfehler (Gesamtf.) des Resistenzfaktors ergibt sich nach der folgenden Formel:

$$\text{Gesamtfehler} = \sqrt{\left(s_{pIC_{50}(\text{resistent})}\right)^2 + \left(s_{pIC_{50}(\text{sensitiv})}\right)^2} \quad \text{Gleichung 2.3}$$

Die Berechnung des Gesamtfehlers des Resistenzfaktors erfolgt unter Einbeziehung des Fehlerfortpflanzungsgesetzes und setzt sich zusammen aus der Wurzel der Summe der quadrierten Standardabweichungen (Varianzen) der pIC_{50} -Werte der sensitiven und resistenten Zelllinie.¹⁴⁸

Für die Bestimmung der Standardabweichung des Resistenzfaktors¹⁴⁹ wird die folgende Formel verwendet:

$$\text{Standardabweichung des Resistenzfaktors} = \ln 10 \cdot \text{Resistenzfaktor} \cdot \text{Gesamtf.} \quad \text{Gl. 2.4}$$

In Gleichung 2.4 geht der Resistenzfaktor aus Gleichung 2.2 und der entsprechende Gesamtfehler aus Gleichung 2.3 ein.

2.22 Analyse von Konzentrations-Effektkurven: Hillgleichung und 4-Parameter-logistische Gleichung

Die Hill-Gleichung wurde von A.V. Hill im Jahr 1910 formuliert, um das Bindungsverhalten von Sauerstoff an Hämoglobin zu beschreiben. In diese Gleichung gehen ein: die Ligandkonzentration L , der Hillkoeffizient n_H , die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D , der Gesamteffekt E_{\max} und der über die Ligandkonzentration hervorgerufene Effekt E . Der Parameter r gibt die relative Rezeptorbesetzung wieder.

$$\Rightarrow r = \frac{E}{E_{\max}} = \frac{[L]^{n_H}}{[L]^{n_H} + K_D} \quad \text{Gleichung 2.5}$$

Die allgemeine Hill-Gleichung resultiert, wenn die obere Gleichung nach dem Effekt E hin aufgelöst wird:

$$E = \frac{[L]^{n_H} \cdot E_{\max}}{[L]^{n_H} + K_D} \quad \text{Gleichung 2.6}$$

Der in der allgemeinen Hill-Gleichung enthaltenen Hillkoeffizient entspricht nur dann der Zahl der Bindungsstellen, wenn eine ausgeprägte positive Kooperativität der gebundenen Liganden vorliegt. Die positive Kooperativität bedeutet bezogen auf Hämoglobin, dass die Bindung eines Sauerstoffmoleküls die Bindung des zweiten u.s.w. stark fördert. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der einzelnen Liganden sind in hohem Maße voneinander verschieden ($KD_1 \gg KD_2 \gg KD_3 \gg KD_4$), somit wird ein asymmetrisches Binden der einzelnen Liganden erst möglich. Der Hillkoeffizient beträgt für Hämoglobin aber nicht 4, sondern etwa 2.8 bis 3.2. Der Hillkoeffizient erreicht trotz der extrem positiven Kooperativität nicht den Wert 4, der der Anzahl der Bindungsstellen gleichkäme. Empirisch betrachtet erreicht der Wert des Hillkoeffizienten meist nicht die Zahl der Bindungsstellen.

Von der allgemeinen Hill-Gleichung ausgehend lässt sich die sogenannte 4-Parameter-logistische Gleichung ableiten (Kap. 5.4.1 und 5.4.2):

$$E = \frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{1 + 10^{n_H \cdot (\log C_{50} - \log L)}} + \text{Bottom} \quad \text{Gleichung 2.7}$$

Diese Gleichung beschreibt eine sigmoide Kurve. Die in dieser Gleichung enthaltenen vier

Parameter können wie folgt definiert werden:

- Bottomwert: Der Effekt, der in Abwesenheit eines Liganden bestimmt wird.
- Topwert: Der Maximaleffekt.
- Hillkoeffizient: Dieser gibt die Steigung im Wendepunkt der Kurve (IC_{50} bzw EC_{50} -Wert) an.
- IC_{50} bzw EC_{50} -Wert: die Ligandkonzentration L , bei der der halbmaximale Effekt erreicht wird.

Mit Hilfe der 4-Parameter-logistischen Gleichung wurden die Konzentrations-Effektkurven analysiert. Es muss hervorgehoben werden, dass es sich nicht um Dosis-Wirkungskurven handelt. Der Begriff Dosis steht in direktem Zusammenhang mit *in vivo* Experimenten, die aber in dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden. Zellexperimente, wie sie in dieser Arbeit realisiert wurden, stellen *in vitro* Untersuchungen dar, bei denen die eingesetzte Konzentration einer Substanz auch der Konzentration am Rezeptor entspricht und somit bekannt ist. Deshalb sollte im Rahmen von *in vitro* Untersuchungen auch nicht von Dosis-Wirkungskurven, sondern von Konzentrations-Effektkurven gesprochen werden. Häufig werden Konzentrations-Effektkurven aber auch als Konzentrations-Wirkungskurven bezeichnet. Eine Wirkung, im Sinne der Wirkung eines Arzneimittels, kann aber auch erst in einem entsprechenden *in vivo* Experiment festgestellt werden. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass der Begriff Konzentrations-Wirkungskurve dem Begriff Konzentrations-Effektkurve in dieser Arbeit gleichzusetzen ist.^{150,151,152,153}

2.22.1 F-Test

Der F-Test stellt eine statistische Methode dar, bei der die Summe der Abweichungsquadrate (ss) zweier Modelle miteinander verglichen wird. Die Entscheidung, welches Modell präferiert wird, erfolgt unter Einbeziehung der Anzahl der Variablen und der Freiheitsgrade. Eine Erhöhung der Anzahl der Variablen bedingt eine Verringerung der Abweichungsquadrate; dem Modell mit einer größeren Anzahl an Variablen wird nur dann der Vorzug gegeben, wenn in Konsequenz die Summe der Abweichungsquadrate überproportional reduziert wird. Vergleicht man eine auf der 4-Parameter-logistischen Gleichung basierende Konzentrations-Effektkurve mit einer Konzentrations-Wirkungskurve mit einem

fixierten Hillkoeffizienten, wird die Zahl der Freiheitsgrade für letztere um 1 gesenkt, dies findet im F-Test Berücksichtigung. Der F-Test wird nach der folgenden Formel bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% durchgeführt:

$$F = \frac{(ss_1 - ss_2)/(df_1 - df_2)}{ss_2/df_2} \quad \text{Gleichung 2.8}$$

ss_1 : Summe der Abweichungsquadrate für das einfachere Modell

ss_2 : Summe der Abweichungsquadrate für das komplexere Modell

df_1 : Anzahl der Freiheitsgrade des einfacheren Modells

df_2 : Anzahl der Freiheitsgrade des komplexeren Modells

Der auf diese Weise berechnete F-Wert wird mit einem tabellierten F-Wert verglichen. Übersteigt der berechnete F-Wert den tabellierten F-Wert, so wird die Nullhypothese, die keinen signifikanten Unterschied der Modelle voraussetzt, verworfen und die sogenannte Alternativhypothese angenommen. Somit ist das komplexere das statistisch bessere Modell.

2.22.2 Normalisierung der Daten

Hintergrund für die Normalisierung von Daten ist eine bessere Vergleichbarkeit unterschiedlicher Datensätze. Bei einer Normalisierung wird der kleinste Einzelwert eines Datensatz als 0% definiert, der größte Einzelwert wird auf 100% festgelegt. Nach Normalisierung der Daten kann nicht mehr festgestellt werden, ob Konzentrations-Effektkurven in ihren Bottom- und Top-Werten signifikant verschieden sind. Deshalb ist eine Normalisierung von Daten nur dann zulässig, wenn auch die auf Basis der Rohdaten generierten Konzentrations-Effektkurven nicht in ihren Bottom- und Topwerten differieren.

2.23 Allosterie

Im folgenden Kapitel soll ein kurzer Überblick über das Phänomen der Allosterie vermittelt werden, daneben werden die in der Arbeit zur Detektion und Quantifizierung der Allosterie

verwendeten Methoden erläutert.

Der Begriff Allosterie leitet sich aus dem Griechischen von *allo* (=anders) und *steros* (=Ort) ab. Eine allosterische Modulation liegt dann vor, wenn zwei Liganden an einer Zielstruktur gleichzeitig binden und diese sich in ihrer Affinität und/oder intrinsischen Aktivität gegenseitig beeinflussen. Mit anderen Worten gesprochen: die Besetzung der allosteren Bindungsstelle, die topologisch von der orthosterischen Bindungsstelle verschieden ist, beeinflusst das Bindungsverhalten des Orthosters an der orthosterischen Bindungsstelle und umgekehrt. Die Bindung eines Orthosters kann durch das Alloster auf drei unterschiedliche Arten beeinflusst werden:

- Förderung der Bindung des Orthosters durch das Alloster: Das dynamische Gleichgewicht, das Dissoziation und Assoziation des Orthosters zum Rezeptor umfasst, wird durch das Alloster so beeinflusst, dass die Dissoziation des Orthosters vom Rezeptor abnimmt (positive Kooperativität). Das Alloster weist eine höhere Affinität zum Orthoster-besetzten Rezeptor auf.
- Die Bindung des Orthosters an den Rezeptor wird durch das Alloster abgeschwächt, die Assoziation des Orthosters zum Rezeptor wird verringert (negative Kooperativität). Das Alloster präferiert die Bindung an den unbesetzten Rezeptor.
- Unter dem Phänomen der neutralen Kooperativität versteht man, dass Dissoziation und Assoziation des Orthosters im gleichen Maße durch das Alloster beeinflusst werden, es resultiert weder eine Hemmung noch eine Förderung der Bindung des Orthosters zum Rezeptor. Die Affinität des Allosters zum unbesetzten Rezeptor entspricht der Affinität des Allosters zum Orthoster-besetzten Rezeptor.

Ein verständliches, einfaches Beispiel zur Beschreibung allosterer Wechselwirkungen ist das von Ehlert entwickelte Modell, bei dem im Mittelpunkt die Ausbildung eines ternären Komplexes steht.^{154,155} Dieses Modell ist in Abb. 2.11 dargestellt. Im Schema entspricht L der Ligandkonzentration des Orthosters, A der Konzentration des Allosters, wobei R für die Rezeptorkonzentration steht. K_A und K_L stellen die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten für die Bindung des Allosters (K_A) bzw. die Bindung des Orthosters (K_L) an den Rezeptor dar. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A bzw. K_L beschreibt dabei die Affinität des Liganden (A oder L) zum freien Rezeptor. Es können zwei binäre Komplexe

RA und RL entstehen. Die beiden binären Komplexe stellen Übergangszustände dar, die bei der Ausbildung des ternären Komplexes LRA durchlaufen werden. Dabei ist im Gleichgewichtszustand die Änderung der Affinität des Orthosters L zum binären Komplex RA identisch zur Änderung der Affinität des Allosters A an den binären Komplex RL. Der Kooperativitätsfaktor α ist ein Maß dafür, wie Alloster und Orthoster gegenseitig ihre Bindungsaffinität beeinflussen. Nehmen die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_L bzw. K_A hervorgerufen durch das Alloster - kleinere Werte an, so spricht man von einer positiven Kooperativität; α nimmt dabei Zahlenwerte kleiner 1 an. Das Phänomen der negativen Kooperativität liegt dann vor, wenn α Werte größer 1 aufweist. Eine neutrale Kooperativität entspricht einem α -Wert von 0.

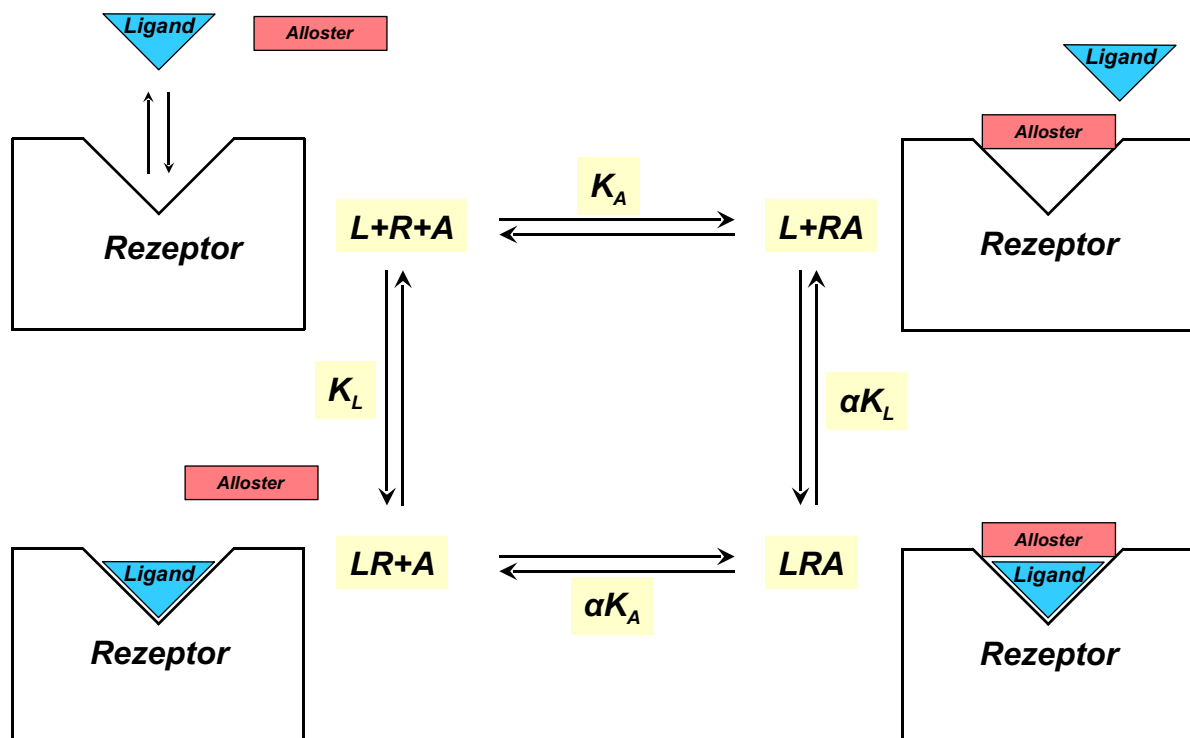


Abb. 2.11: Ternäres Modell zur Beschreibung allosterer Interaktionen.

Bei der Analyse der Allosterie stehen drei verschiedene Parameter im Vordergrund:

- Der *Modulierende Effekt* des Allosters auf die die Affinität des Orthoster-Rezeptor-Komplexes (Kooperativität)
- Änderungen der *Intrinsischen Aktivität* des Rezeptor-Orthoster-Komplexes.
- Die *Gleichgewichtsdissoziationskonstante* K_A des Allosters.

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Methoden zur Auswertung des allosteren Effektes eingesetzt:

2.23.1 Analyse über die Dose Ratio-Werte

Die Konzentrations-Effektkurven eines Modulators wurden in Abwesenheit und Gegenwart verschiedener Konzentrationen des Allostere aufgenommen. Die einzelnen Konzentrations-Wirkungskurven wurden zunächst auf der 4-Parameter-logistischen Gleichung basierend analysiert. Top-, Bottom-, pIC_{50} -Werte sowie die Hillkoeffizienten der einzelnen Kurven wurden miteinander verglichen. (Eine Veränderung des pIC_{50} -Wertes war für die Durchführung dieser Analyse erwünscht.) Hillkoeffizienten sowie Bottom- und Top-Werte der einzelnen Kurven sollten nicht signifikant voneinander verschieden sein. Lag kein signifikanter Unterschied vor, wurden die Konzentrations-Effektkurven einer neuen Analyse unterworfen, bei der die einzelnen Kurven mit gemeinsamen Bottom-, Top-Wert und Hillkoeffizienten generiert wurden. Die Dose Ratio-Werte wurden nach der folgenden Formel generiert:

$$\text{Dose Ratio} = \frac{IC_{50}(\text{Alloster} + \text{Verbindung})}{IC_{50}(\text{Verbindung})} \quad \text{Gleichung 2.9}$$

Die reziproken Dose-Ratio-Werte wurden anschließend gegen die korrespondierenden Konzentrationen des Allostere (Abszisse) aufgetragen und eine nichtlineare Regression basierend auf der 4-Parameter-logistischen Gleichung vorgenommen (sogenannter Potency Ratio Plot).

Der pEC_{50} -Wert der sigmoidal verlaufenden Konzentrations-Effektkurve entspricht der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_A des Allostere und gibt an, wie groß die Affinität des Allostere zum Rezeptor ist. Der maximale reziproke DR-Wert, der dem Top-Wert dieser Kurve gleichkommt, entspricht der intrinsischen Aktivität des Allostere bzw. dem Kooperativitätsfaktor.¹⁵⁶

2.23.2 Quantifizierung der Allosterie nach Lazareno et al.¹⁵⁷

Eine weitere Möglichkeit, das Phänomen der Allosterie zu analysieren, basiert auf dem

von Lazareno et al.¹⁵⁷ entwickelten Modell. Auch in dieses Modell werden drei Interaktionspartner einbezogen: Der Ligand L, das Alloster A und der Rezeptor R. Die Gesamtrezeptorpopulation setzt sich wie folgt zusammen:

$$R_t = [R] + [RL] + [RA] + [RAL] \quad \text{Gleichung 2.10}$$

Dabei ist für das Verständnis von entscheidender Bedeutung, dass der Alloster-besetzte Rezeptor RA keinen Effekt vermittelt. Effekt-verursachend sind nur RL und RAL. Daher wird der von RL und RAL ausgehende Effekt ins Verhältnis zur Gesamtrezeptorpopulation gesetzt:

$$\frac{E_{\text{Ligand}}}{R_t} = \frac{[RL] + [RAL]}{[R] + [RL] + [RA] + [RAL]} \quad \text{Gleichung 2.11}$$

Die obere Gleichung kann unter Einbeziehung der Gleichgewichtsassoziationskonstanten umgeformt werden zu:

$$\frac{E_{\text{Ligand}}}{R_t} = \frac{[L] \cdot K_L + \beta \cdot [L] \cdot [A] \cdot K_L \cdot K_A}{1 + [L] \cdot K_L + \beta \cdot [L] \cdot [A] \cdot K_L \cdot K_A + [A] \cdot K_A} \quad \text{Gleichung 2.12}$$

Diese Gleichung kann wie folgt vereinfacht werden:

$$\frac{E_{\text{Ligand}}}{R_t} = \frac{[L] \cdot K_L \cdot (1 + \beta \cdot [A] \cdot K_A)}{[L] \cdot K_L \cdot (1 + \beta \cdot [A] \cdot K_A) + [A] \cdot K_A + 1} \quad \text{Gleichung 2.13}$$

Für den Fall, dass der Ligand L in Abwesenheit des Allosters mit dem Rezeptor interagiert, gilt folgender Zusammenhang:

$$\frac{E_{\text{Ligand}}}{R_t} = \frac{[L] \cdot K_L}{1 + [L] \cdot K_L} \quad (\text{in Abwesenheit des Allosters A}) \quad \text{Gleichung 2.14}$$

In Anwesenheit des Allosters kann der Effekt des Liganden in Beziehung zur Gesamtrezeptorpopulation mit Hilfe der folgenden Gleichung ausgedrückt werden:

$$\frac{E_{\text{Ligand}}}{R_t} = \frac{[A] \cdot K_{LA}}{1 + [A] \cdot K_{LA}} \quad (\text{in Anwesenheit des Allosters A}) \quad \text{Gleichung 2.15}$$

K_{LA} ist äquivalent zu:

$$K_{LA} = \frac{K_L \cdot (1 + \beta \cdot [A] \cdot K_A)}{(1 + [A] \cdot K_A)} \quad \text{Gleichung 2.16}$$

Bezieht man K_{LA} aus Gleichung 2.16 in Gleichung 2.15 ein, so erhält man Gleichung 2.13. Wenn man nun in Gleichung 2.13 Zähler und Nenner durch $(1 + A \cdot K_A)$ dividiert, so ergibt sich folgendes Gleichungssystem:

$$\frac{E_{\text{Ligand}}}{R_t} = \frac{\frac{[L] \cdot K_L \cdot (1 + \beta \cdot [A] \cdot K_A)}{(1 + [A] \cdot K_A)}}{[L] \cdot K_L \cdot (1 + \beta \cdot [A] \cdot K_A) + [A] \cdot K_A + 1} \Leftrightarrow \frac{E_{\text{Ligand}}}{R_t} = \frac{\frac{[L] \cdot K_L \cdot (1 + \beta \cdot [A] \cdot K_A)}{(1 + [A] \cdot K_A)}}{[L] \cdot K_L \cdot (1 + \beta \cdot [A] \cdot K_A) + 1}$$

Dieses Gleichungssystem lässt sich vereinfachen, indem man Gleichung 2.16 in dieses einbindet:

$$\frac{E_{\text{Ligand}}}{R_t} = \frac{[L] \cdot \left(\frac{K_L \cdot (1 + \beta \cdot [A] \cdot K_A)}{(1 + [A] \cdot K_A)} \right)}{[L] \cdot \left(\frac{K_L \cdot (1 + \beta \cdot [A] \cdot K_A)}{(1 + [A] \cdot K_A)} \right) + 1} \Leftrightarrow \frac{E_{\text{Ligand}}}{R_t} = \frac{[L] \cdot K_{LA}}{[L] \cdot K_{LA} + 1}$$

Für den Fall, dass die Verbindung L in Abwesenheit des Allosters A und in Anwesenheit des Allosters A den identischen Effekt E verursacht, gilt:

$$[L] \cdot K_L = [L^*] \cdot K_{LA} \quad \text{Gleichung 2.17}$$

Dabei sind unterschiedliche Konzentrationen der Verbindung L notwendig. Der Parameter L^* deutet an, dass zur Erreichung des identischen Effektes wie in Abwesenheit des Allosters A eben größere (negative Kooperativität) oder niedrigere Konzentrationen (positive Kooperativität) der Substanz L aufgewendet werden müssen.

Diese Gleichung kann unter Einbeziehung der Formel für K_{LA} umgeformt werden zu:

$$\frac{[L^*]}{[L]} = \frac{K_L}{K_{LA}} \Leftrightarrow \frac{[L^*]}{[L]} = \frac{K_L}{K_L \left(\frac{1 + \beta \cdot [A] \cdot K_A}{1 + [A] \cdot K_A} \right)} \Leftrightarrow \frac{[L^*]}{[L]} = \frac{1 + [A] \cdot K_A}{1 + \beta \cdot [A] \cdot K_A}$$

Statt L und L^* können IC_{50} und IC_{50}^* verwendet werden, so dass folgende Gleichung resultiert:

$$IC_{50}^* = IC_{50} \cdot \frac{1 + [A] \cdot K_A}{1 + \beta \cdot [A] \cdot K_A} \quad \text{Gleichung 2.18}$$

Gleichung 2.18 kann in die 4-Parameter-logistische Gleichung einbezogen werden, daraus resultiert:

$$E = \frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{[L]} \cdot \frac{1 + [A] \cdot K_A}{1 + \beta \cdot [A] \cdot K_A} \right)^{n_H}} + \text{Bottom} \quad \text{Gleichung 2.19}$$

Dabei stellt β den Kooperativitätsfaktor dar. K_A ist die Gleichgewichtsassoziationskonstante des Allosters A. Nimmt β Werte an, die kleiner als 1 sind, so spricht man von einer negativen Kooperativität. Für den Fall, dass β größer als 1 wird, liegt eine positive Kooperativität vor.

Für die Auswertung der Allosterie mit Hilfe des Modells nach Lazareno et al. wurden die identischen Konzentrations-Effektkurven wie bei der Bestimmung der Dose-Ratio-Werte verwendet. Die Vorgehensweise war dabei zu Beginn ähnlich: Die Konzentrations-Effektkurven wurden zunächst alle getrennt analysiert (4-Parameter-logistische Gleichung), dann wurden diese wie oben bereits erwähnt nach Normierung miteinander verglichen (Bottom-, Topwert, Hillkoeffizient und pIC_{50} -Wert). Nachdem festgestellt wurde, dass die vier Parameter – ausgenommen der pIC_{50} -Wert – nicht signifikant voneinander verschieden waren, wurde die Analyse nach Lazareno et al. durchgeführt.¹⁵⁷

2.24 Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis)

Die Hauptkomponentenanalyse hat das Ziel, die in einer großen Anzahl an Variablen enthaltene Information zu komprimieren. Dabei werden aus den ursprünglichen Variablen neue Variablen konstruiert, die als sogenannte Hauptkomponenten (Principal components) bezeichnet werden. Diese Hauptkomponenten sind nicht miteinander korreliert und stehen in einer Darstellung als Vektoren orthogonal zueinander. Die Hauptkomponenten werden so ausgewählt, dass möglichst wenige der Hauptkomponenten ein Maximum der Varianz der ursprünglichen Variablen zu erklären.¹⁵⁸

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Etablierung von A2780 Adr Zellen zur Untersuchung von P-gp

Zu Beginn dieser Arbeit sollte nachgewiesen werden, dass P-gp in A2780 Adr Zellen in ausgeprägter Form vorhanden ist. Die Funktion von P-gp sollte über Resistenzfaktoren auf indirekte Weise gezeigt und die Kreuzresistenz als ein wesentliches Charakteristikum der MDR dargelegt werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Existenz anderer Transportproteine wie BCRP in A2780 Adr Zellen zu widerlegen. Dies war deshalb von Interesse, da andere Transportproteine die mit P-gp generierten Ergebnisse hätten beeinflussen können.

Der Resistenzfaktor stellt den Quotienten aus dem IC_{50} -Wert dar, der an der resistenten Zelllinie A2780 Adr ermittelt wurde, und dem korrespondierenden IC_{50} -Wert, der an sensitiven A2780 Zellen bestimmt wurde.

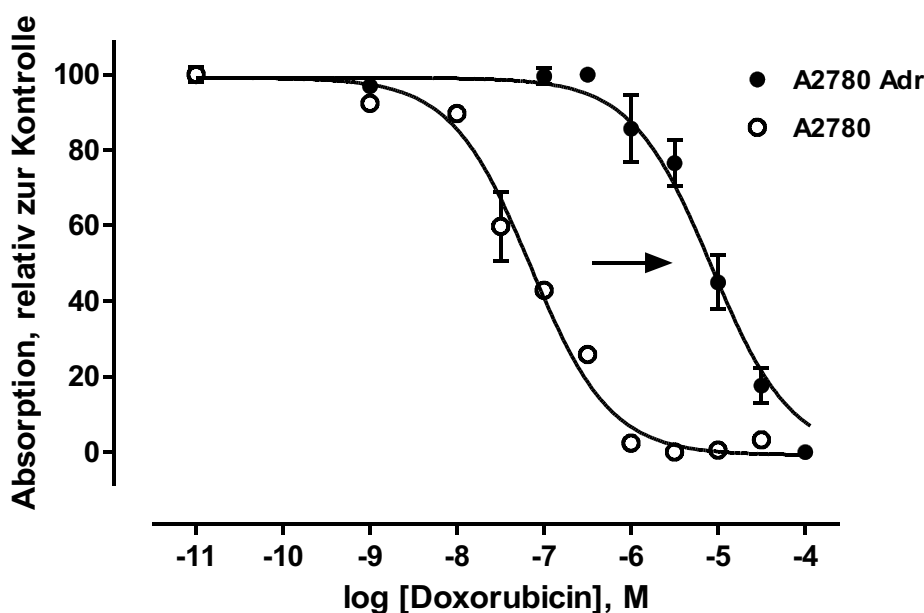


Abb. 3.1: Konzentrations-Effektkurven der sensitiven Zelllinie A2780 (nicht gefüllte Kreise) und der resistenten Zelllinie A2780 Adr (gefüllte Kreise) für das Zytostatikum Doxorubicin bestimmt mit Hilfe des MTT Assays; pIC_{50} (A2780) = $7,15 \pm 0,05$, pIC_{50} (A2780 Adr) = $5,08 \pm 0,04$.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die IC₅₀-Werte wurden mit dem in Kap 2.11 beschriebenen Verfahren des MTT Assays ermittelt.¹³¹ In Abb. 3.1 sind beispielhaft zwei Konzentrations-Effektkurven für das Zytostatikum Doxorubicin wiedergegeben. Die beiden Konzentrations-Wirkungskurven sind hinsichtlich ihrer Hillkoeffizienten nicht signifikant voneinander verschieden. Der gleichartige Verlauf (mittels F-Test nachgewiesen) deutet auf das Vorliegen eines gemeinsamen Wirkmechanismus hin. Der pIC₅₀-Wert für die resistente Zelllinie A2780 Adr beträgt $5,08 \pm 0,04$, der pIC₅₀-Wert für die sensitive Zelllinie liegt bei $7,15 \pm 0,05$. Somit resultiert ein Resistenzfaktor von etwa 117.

Neben Doxorubicin wurden weitere Zytostatika und die beiden P-gp Substrate Hoechst 33342 und Rhodamin 123 an den Zelllinien A2780 Adr und A2780 untersucht und Konzentrations-Effektkurven wie in Abb. 3.1 generiert. Aus den mittleren pIC₅₀-Werten wurden die Resistenzfaktoren berechnet, die in Tabelle 3.1 aufgeführt sind (zur Berechnung der Resistenzfaktoren vergl. Kap. 2.21).

Tabelle 3.1: pIC₅₀-Werte für Zytostatika und P-gp Substrate, die an A2780 und A2780 Adr Zellen mit Hilfe des MTT Assays bestimmt wurden. Zusätzlich ist der Resistenzfaktor und dessen Standardabweichung aufgeführt.

Zytostatikum / Substrat	A2780Adr pIC₅₀ ± SD	A2780 pIC₅₀ ± SD	Resistenzfaktor ± SD
Cisplatin	4,90 ± 0,12	5,29 ± 0,03	2,47 ± 0,72
Colchicin	6,43 ± 0,20	7,64 ± 0,04	16,28 ± 7,74
Daunorubicin	4,73 ± 0,14	6,93 ± 0,09	158,7 ± 60,6
Docetaxel	7,06 ± 0,04	8,31 ± 0,11	17,80 ± 5,01
Doxorubicin	4,91 ± 0,19	7,07 ± 0,10	142,5 ± 70,5
Hoechst 33342	4,42 ± 0,10	5,72 ± 0,05	20,14 ± 5,10
Oxaliplatin	5,71 ± 0,18	5,60 ± 0,09	0,76 ± 0,36
Rhodamin 123	3,91 ± 0,14	5,72 ± 0,02	63,68 ± 20,88
Vinblastin	5,55 ± 0,06	7,21 ± 0,13	45,96 ± 14,97

Ordnet man die Resistenzfaktoren der Verbindungen aus Tabelle 3.1 abfallend, so resultiert die folgende Reihenfolge: Daunorubicin ≥ Doxorubicin ≥ Rhodamin 123 ≥ Vinblastin > Hoechst 33342 ≥ Docetaxel ≥ Colchicin > Cisplatin > Oxaliplatin.

Die Resistenzfaktoren der Verbindungen Cisplatin und Oxaliplatin sind recht gering. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnten Sasaki et al. bei der Untersu-

chung des Zytostatikums Cisplatin an einer Doxorubicin-resistenten A2780 Zelllinie (Resistenzfaktor 62,5) gegenüber der korrespondierenden sensitiven Zelllinie A2780 lediglich einen Resistenzfaktor von 4,6 feststellen.¹⁵⁹ Die beiden Platin-Komplexe Cisplatin und Oxaliplatin werden von P-gp nicht erkannt.

Um diese Interpretation zu untermauern, wurden Konzentrations-Effektcurven für das Zytostatikum Cisplatin ohne und in Gegenwart von 10 µmol/l Verapamil bestimmt.

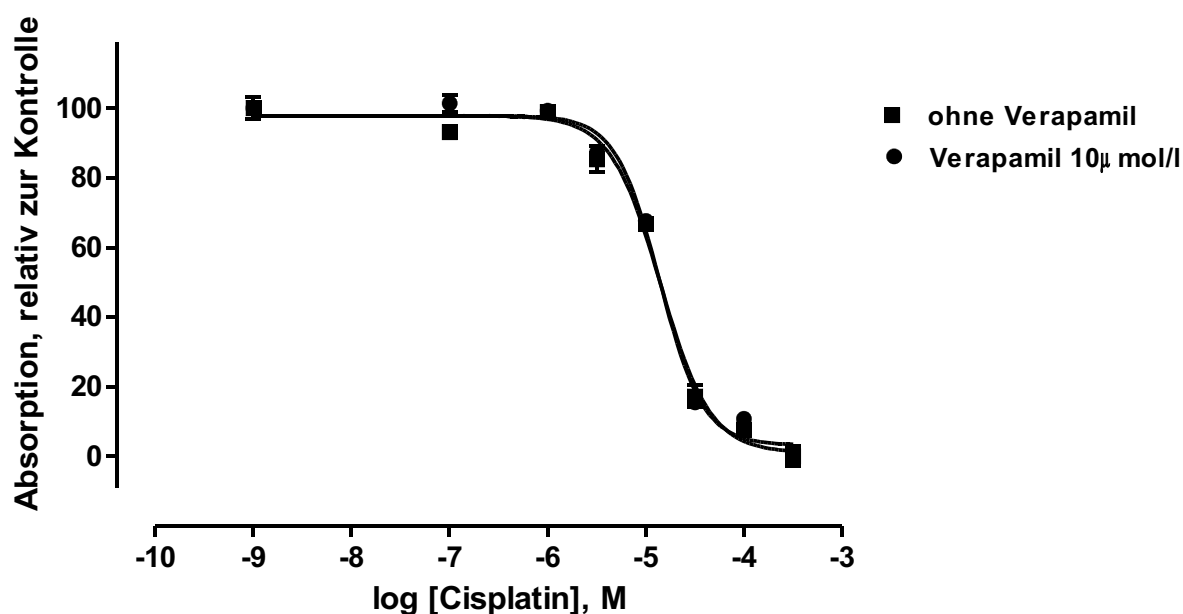


Abb. 3.2: Konzentrations-Effektcurven für Cisplatin an A2780 Adr Zellen in Abwesenheit von Verapamil (Quadrate) und Anwesenheit von 10 µmol/l Verapamil (Kreise): pIC_{50} (ohne Verapamil) = $4,85 \pm 0,03$, pIC_{50} (mit Verapamil) = $4,86 \pm 0,02$.

Wie Abb. 3.2 illustriert, unterscheiden sich die die beiden sigmoidal verlaufenden Kurven nicht in ihren pIC_{50} -Werten und Hillkoeffizienten. Der Zusatz des Modulators Verapamil, der in der eingesetzten Konzentration P-gp > 50% inhibiert (s. Tabelle 3.7), führt zu keiner Linksverschiebung der Konzentrations-Effektkurve von Cisplatin. Da Cisplatin kein P-gp Substrat darstellt, kann der zytotoxische Effekt auch nicht durch P-gp verringert werden. Der Effekt des Modulators ist ohne Einfluss.

Die beiden Zytostatika Doxorubicin und Daunorubicin besitzen jeweils hohe Resistenzfaktoren (s. Tabelle 3.1). In der nachfolgenden Tabelle 3.2 sind Literatur-basierte Resistenzfaktoren für Doxorubicin aufgeführt, die an dem Zelllinienpaar A2780/A2780 Adr generiert wurden. Diese Literaturstellen weisen auf den Zusammenhang zwischen dem hohem Resistenzfaktor für Doxorubicin und der Überexpression von ABCB1 in A2780 Adr Zellen hin.

Tabelle 3.2: Literatur-basierte Resistenzfaktoren von Doxorubicin für A2780 Adr/A2780 Zellen.

Referenz	Resistenzfaktor
de Jong et al. ¹⁶⁰	150,0
Bakker et al. ¹⁶¹	100,0
Mistry et al. ⁴⁸	71,3
Vredenburg et al. ¹⁶²	68,0
Sasaki et al. ¹⁵⁹	62,5
Manetta et al. ¹⁶³	494,0

Die beiden Anthracycline Daunorubicin und Doxorubicin unterscheiden sich strukturell nur durch einen einzigen Substituenten in Position 3 des 7,8,9,10-Tetrahydro-naphacen-5,12-dion-Grundgerüsts (Daunorubicin: Acetyl-; Doxorubicin: Hydroxyacetyl-). Sie besitzen deshalb nahezu übereinstimmende physikochemische Eigenschaften (berechneter logP-Wert (Doxorubicin) = $2,29 \pm 0,69$, berechneter logP-Wert (Daunorubicin) = $2,39 \pm 0,63$).

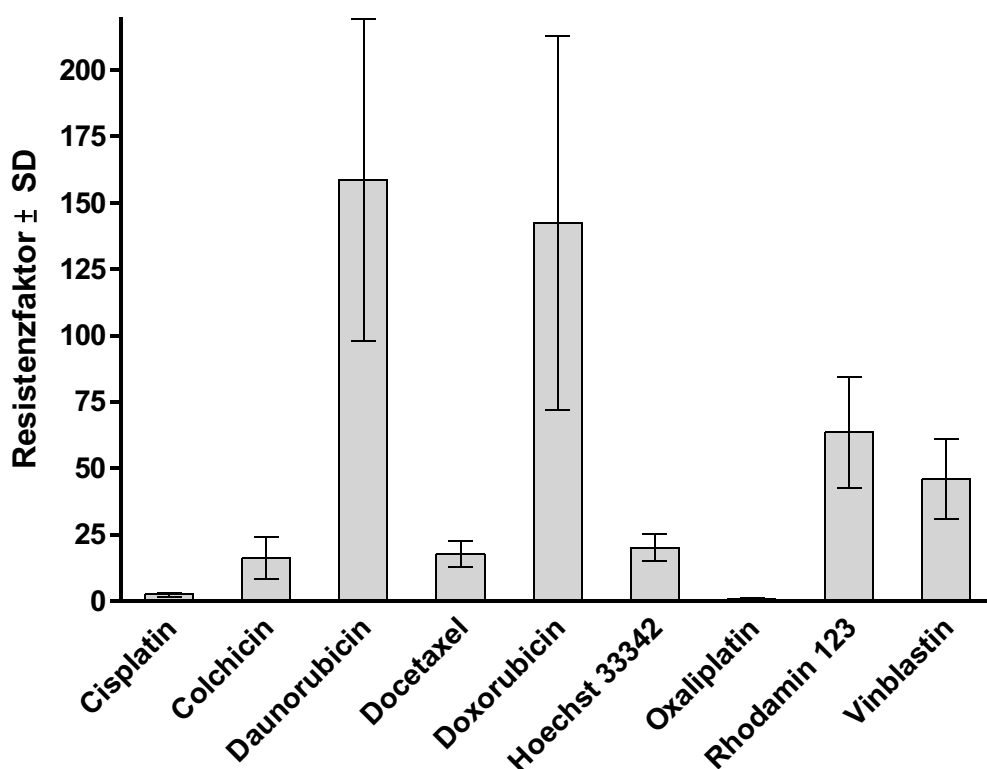


Abb. 3.3: Vergleich der Resistenzfaktoren für unterschiedliche Zytostatika und Substrate (MTT Assay, A2780 und A2780 Adr Zellen).

Das in Abb. 3.3 zu erkennende Balkendiagramm zeigt, dass der Resistenzfaktor der beiden Anthracyclinderivate im Vergleich zu allen anderen Verbindungen deutlich höher ausfällt. So liegt die Schlussfolgerung nahe, dass sowohl Doxorubicin als auch Daunorubicin die besten P-gp Substrate unter den untersuchten Substanzen darstellen. Der für Doxorubicin in dieser Arbeit bestimmte Resistenzfaktor ist vergleichbar mit den in Tabelle 3.2 enthaltenen, Literatur-basierten Resistenzfaktoren. Ausdrücklich sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass der hohe Resistenzfaktor einen Hinweis, aber keinen Nachweis für das Vorliegen einer ABCB1 vermittelten Resistenz darstellt.

Rhodamin 123, das den beiden Anthracyclinderivaten strukturell ähnlich ist, besitzt im Vergleich zu diesen einen um mehr als den Faktor 2 verringerten Resistenzfaktor.

Hoechst 33342 und Colchicin weisen nahezu identische Resistenzfaktoren auf. Nach Shapiro und Ling interagieren Hoechst 33342 und Colchicin mit der sogenannten H-Seite des Proteins, während die Anthracycline und Rhodamin 123 mit der sogenannten R-Seite in Wechselwirkung treten.⁷⁵

Vinblastin und Docetaxel, deren Resistenzfaktoren Tabelle 3.1 entnommen werden können, ergänzen die strukturelle Vielfalt der eingesetzten Verbindungen, für die Resistenzfaktoren im Rahmen dieser Arbeit bestimmt wurden. Das Phänomen der Kreuzresistenz wird offensichtlich.

Die unterschiedlichen Resistenzfaktoren der Verbindungen ermöglichen keine Schlussfolgerung, welche der Substanzen als bestes P-gp Substrat eingestuft werden kann. Die Höhe des Resistenzfaktors hängt nicht nur von der P-gp Aktivität ab, sondern wird ebenfalls vom Diffusionskoeffizienten der Verbindung beeinflusst.¹⁶⁴

Die in Tabelle 3.2 aufgeführten Resistenzfaktoren enthalten im Gegensatz zu den in dieser Arbeit generierten Resistenzfaktoren keine Fehlerangabe beispielsweise in Form der Standardabweichung (vergl. Tabelle 3.1). Ein Resistenzfaktor ohne Fehlerangabe besitzt einen geringeren „Informationsgehalt“ und kann nur als approximativ angesehen werden. Ob Resistenzfaktoren, die etwa mit Hilfe unterschiedlicher Assays oder an verschiedenen Zelllinien bestimmt wurden, wirklich signifikant voneinander verschieden sind, kann durch die Angabe des Resistenzfaktors unter Einbeziehung der Standardabweichung zuverlässiger beantwortet werden, weil die Fehler der gemittelten pIC_{50} -Werte nicht vernachlässigt werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Hemmwirkung von Zytostatika stellt der ATP Assay dar.¹³¹ In dieser Arbeit wurden mit Hilfe des ATP Assays vier verschiedene Zytostatika untersucht: Cisplatin, Docetaxel, Doxorubicin, Vinblastin.

Tabelle 3.3: Mittelwerte und Standardabweichungen der pIC_{50} -Werte für unterschiedliche Zytostatika, die an A2780 sowie A2780 Adr Zellen mit Hilfe des ATP Assays bestimmt wurden. Resistenzfaktoren mit Standardabweichungen.

Zytostatikum	A2780Adr $pIC_{50} \pm SD$	A2780 $pIC_{50} \pm SD$	Resistenzfaktor $\pm SD$
Cisplatin	4,77 \pm 0,10	4,54 \pm 0,07	0,59 \pm 0,16
Docetaxel	6,97 \pm 0,04	8,28 \pm 0,07	20,57 \pm 4,02
Doxorubicin	5,22 \pm 0,09	7,36 \pm 0,16	135,73 \pm 57,21
Vinblastin	5,55 \pm 0,17	7,36 \pm 0,03	64,90 \pm 26,27

Der Hintergrund für die Anwendung eines weiteren Testsystems bestand darin, die Ergebnisse, die mit Hilfe des MTT Assays ermittelt wurden, mit den Resultaten des ATP Assays zu vergleichen und zu bestätigen. Die Ergebnisse für den ATP Assay sind in Tabelle 3.3 angegeben. Der geringe Resistenzfaktor des Zytostatikums Cisplatin verdeutlicht erneut, dass es sich bei dieser Substanz um kein P-gp Substrat handelt. Ein statistischer paarweiser Vergleich wurde für die mit Hilfe der beiden Assays generierten Resistenzfaktoren für die vier unterschiedlichen Zytostatika durchgeführt. Dabei zeigt der quadrierte Korrelationskoeffizient von 0,97 für die Resistenzfaktoren, dass sowohl MTT als auch ATP Assay vergleichbare Ergebnisse liefern. (Die Steigung der Regressionsgeraden ist nicht signifikant verschieden von eins.)

Die in dieser Arbeit bestimmten Aktivitätswerte der vier verschiedenen Zytostatika, die an A2780 Zellen mit dem MTT und dem ATP Assay generiert wurden (vergl. Tabelle 3.1 und 3.3), konnten mittels einer Hauptkomponentenanalyse mit pIC_{50} -Werten aus der Literatur (s. Tabelle 3.4) verglichen werden.

Tabelle 3.4: Aus der Literatur entnommene pIC_{50} -Werte für vier Zytostatika, die mit Hilfe des MTT Assays an A2780 Zellen bestimmt wurden.

Zytostatikum	pIC_{50} - Wert
Cisplatin	5,00 ¹⁶⁵
Docetaxel	8,28 ¹⁶⁶
Doxorubicin	7,40 ¹⁶⁷
Vinblastin	6,34 ¹⁶⁸

Die erste Hauptkomponente erklärt mehr als 96% der Gesamtvarianz, die Faktorladungen der drei einzelnen Variablen sind größer als 0,96. Die Ergebnisse dieser HKA belegen die Vergleichbarkeit der im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des MTT und ATP Assays ermittelten Daten einerseits und ermöglichen andererseits die Schlussfolgerung, dass diese ebenfalls nicht von Literatur- Daten differieren.

Eine charakteristische Eigenschaft von MDR-Zellen besteht darin, dass sie gegen eine Vielzahl strukturell voneinander unabhängiger Verbindungen, wie sie in Tabelle 3.1 aufgeführt sind, gleichzeitig resistent sind. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die Kreuzresistenz als wesentliches Charakteristikum von P-Glykoprotein nachgewiesen werden konnte.

Neben der Kreuzresistenz gehört zu den wichtigsten charakteristischen Eigenschaften einer MDR eine Überexpression des ABCB1 Gens.

Die in Abb. 3.4 aufgeführten Zelllinien wurden hinsichtlich ihres ABCB1-Expressionsstatus mit Hilfe des Antikörpers MRK-16 untersucht (vergl. Kap.2.19.1).^{169,170,171} Dabei wurden die geometrischen Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten gemittelt und die dazugehörige Standardabweichung berechnet. Es fällt auf, dass der ABCB1-Expressionsstatus der Zelllinie A2780 Adr am größten ist. MCF-7 Adr und MDCK-MDR1 Zellen weisen einen nahezu gleichen P-gp- Gehalt auf, der aber im Vergleich zur Zelllinie A2780 Adr niedriger ist. Die Fluoreszenzwerte für die Zelllinien A2780, MCF-7 und MCF-7 MX unterscheiden sich nicht bzw. nur kaum von der unter identischen Bedingungen bestimmten Hintergrundfluoreszenz („Background“). Zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz wurden die Zellen ohne Antikörper inkubiert und vermessen.

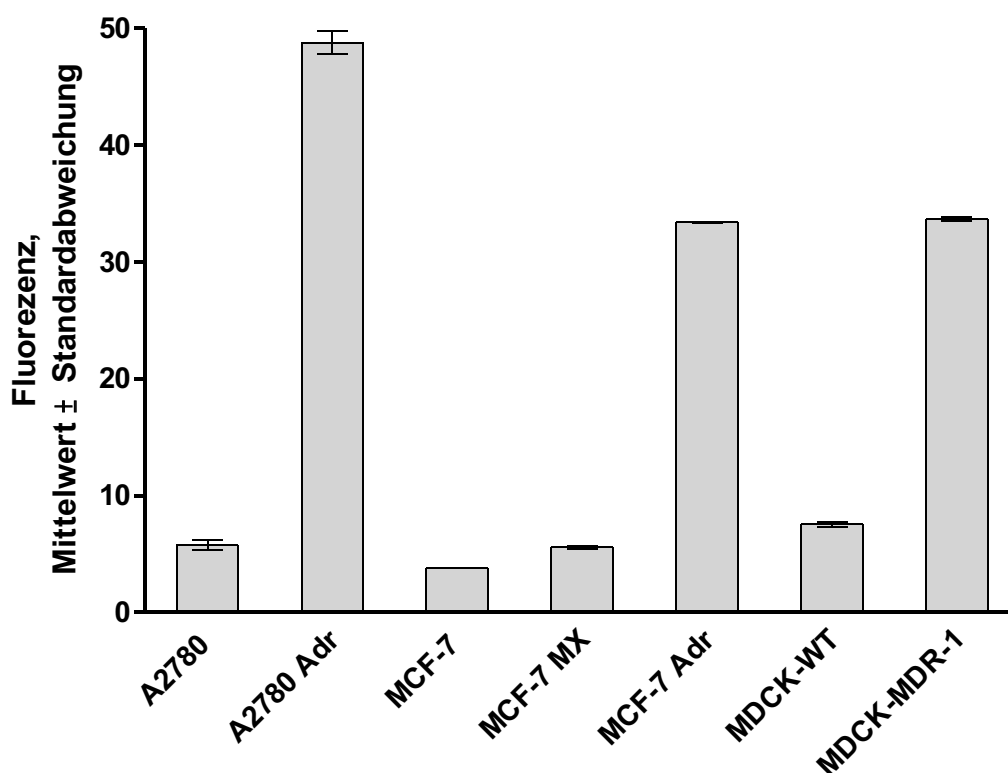


Abb. 3.4: Unterschiedliche Zelllinien, die mit Hilfe des Antikörpers MRK-16 markiert und mit Hilfe des Durchflusszytometers untersucht wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenz und deren Standardabweichungen, die aus den geometrischen Mittelwerten von mindestens drei unabhängigen Experimenten resultieren.

Im Balkendiagramm (s. Abb. 3.4) wird der ABCB1-Expressionsstatus der unterschiedlichen Zelllinien visualisiert. Der für die Bestimmung des P-gp Gehaltes der verschiedenen Zelllinien eingesetzte Antikörper MRK-16 ist FITC-gelabelt und kann deshalb als Primärantikörper eingesetzt werden. Dieser Antikörper bindet spezifisch an humanes P-gp, wobei das von MRK-16 erkannte Epitop auf der extrazellulären Domäne der vierten Schleife von P-gp lokalisiert ist. Andere Transportproteine, die möglicherweise in diesen Zelllinien hätten existieren können, konnten aufgrund der Spezifität der Bindung nicht erfasst werden.¹⁶⁹ (Zur Unterdrückung unspezifischer Bindungen wurde BSA zugesetzt, das mit den Zellen um unspezifische Bindung konkurriert. Da BSA-Antikörper-Konjugate in gelöster Form vorlagen, konnten sie innerhalb der Messung mit Hilfe des Durchflusszytometers nicht detektiert werden und deshalb die Messergebnisse nicht beeinflussen.)

Es konnte festgestellt werden, dass eine Verlängerung der Inkubationszeit mit dem Anti-

körper MRK-16 > 40 min nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Fluoreszenz beitrug. Durch die Verwendung eines Überschusses an MRK-16 wurde eine quantitative Markierung von P-gp gewährleistet.

Die beiden folgenden Abb. 3.5 und 3.6 zeigen A2780 Adr Zellen, die in Analogie zu den vorher dargestellten Durchflusszytometrie-basierten Experimenten zur Bestimmung des ABCB1 Expressionsstatus nach der in Kap.2.19.1 beschriebenen Methode mit dem Antikörper MRK-16 gelabelt wurden. Die Zellen wurden dabei durch den FITC-Filter im Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

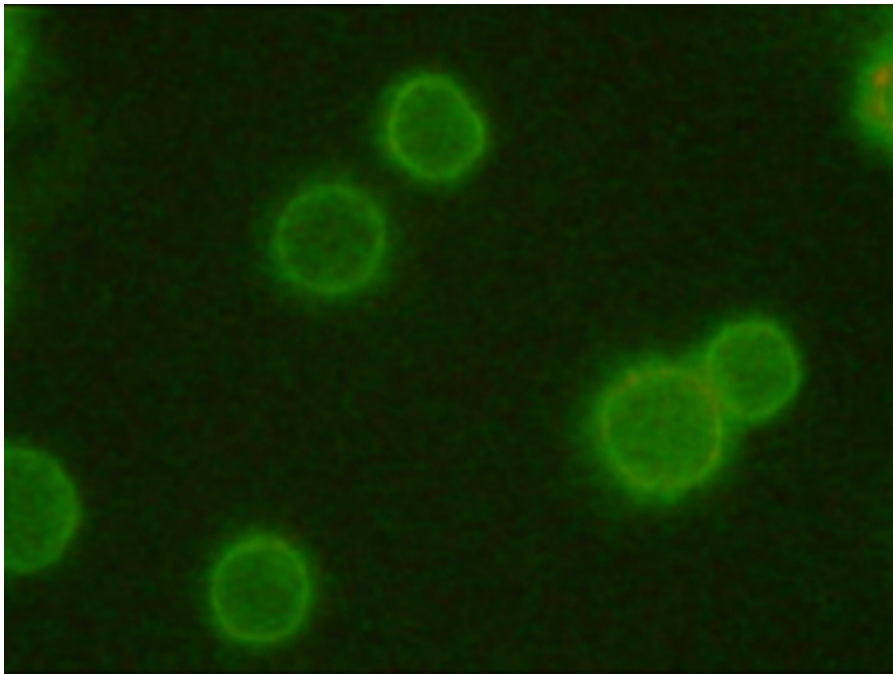


Abb. 3.5: A2780 Adr Zellen, die mit dem Antikörper MRK-16 markiert und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops mit FITC-Filter betrachtet wurden.

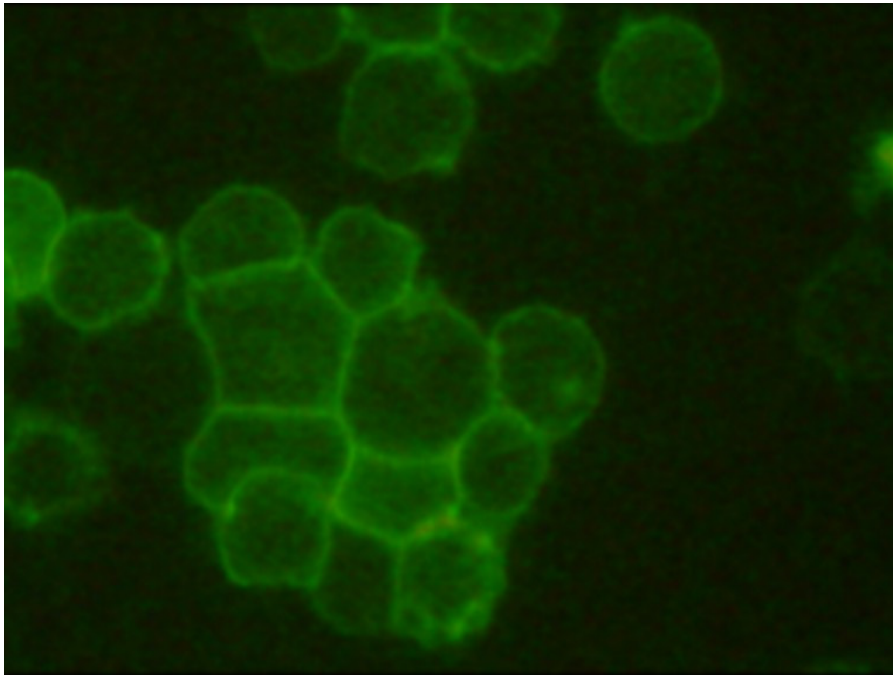


Abb. 3.6: A2780 Adr Zellen, die mit dem Antikörper MRK-16 markiert und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops mit FITC-Filter betrachtet wurden.

Die beiden Abbildungen zeigen deutlich die Anfärbung der Zellen durch den Primärantikörper MRK-16. Diese Anfärbung fällt besonders im Bereich der Zellmembran auf. Bei der Betrachtung der sensitiven Zelllinie A2780 konnte (unter gleichen Bedingungen) keine Anfärbung der Zellen beobachtet werden.

Die Zelllinien A2780, A2780 Adr, MCF-7 und MCF-7 MX wurden hinsichtlich der Fragestellung untersucht, ob diese möglicherweise auch ABCG2 überexprimieren. Dazu wurden die Zellen nach dem in Kap.2.19.2 beschriebenen Verfahren mit dem nicht fluoreszierenden Antikörper BXP21 gelabelt.

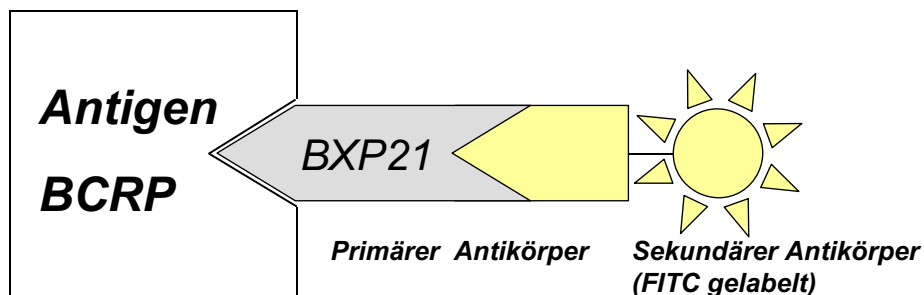


Abb. 3.7: Prinzip des BCRP-Antikörperversuchs.

BXP21 ist spezifisch für BCRP, bindet jedoch im Gegensatz zu MRK16 an ein intrazelluläres Epitop. Die Tatsache, dass BXP21 nicht selbst fluoresziert, macht die Verwendung eines FITC-gelabelten Sekundärantikörpers notwendig, der den Nachweis und die Quantifizierung des BCRP-Gehaltes der einzelnen Zelllinien ermöglicht.^{172,173,174} Die Ergebnisse sind in Abb. 3.8 in Form eines Balkendiagramms dargestellt. MCF-7 MX Zellen weisen den höchsten BCRP Gehalt auf. Dieses Ergebnis ist nicht verwunderlich, da diese Zelllinie, wie von Ross et al. beschrieben, ABCG2 überexprimiert.¹²² Die Fluoreszenzwerte der Zelllinien A2780, A2780 Adr und MCF-7 sind im Vergleich zu den MCF-7 MX Zellen etwa 4 bis 5fach geringer. Diese Fluoreszenzwerte sind jedoch recht hoch, wenn man sie mit den Fluoreszenzwerten vergleicht, die sich bei der Bestimmung des P-gp Gehaltes (vergl. Abb. 3.4) mittels des Primärantikörpers MRK-16 ergaben.

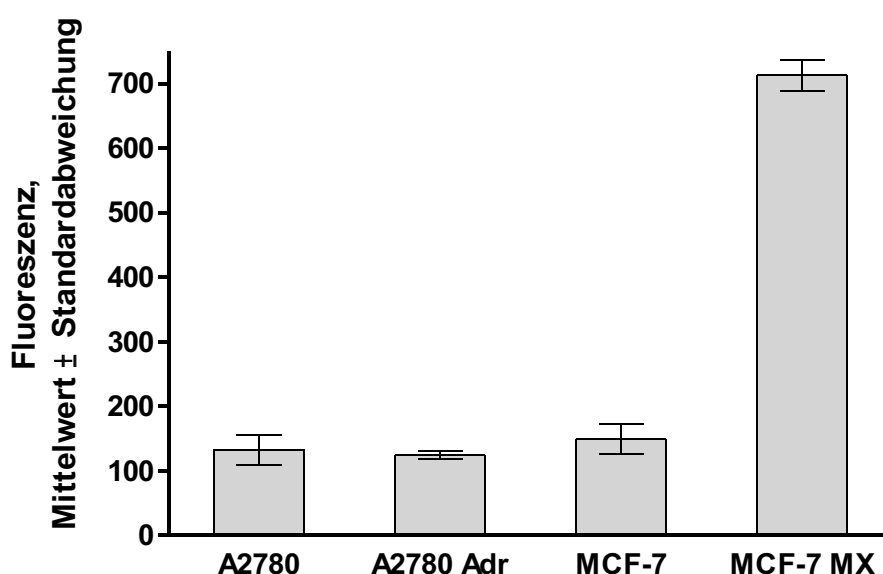


Abb. 3.8: Verschiedene Zelllinien, die mit Hilfe des Antikörpers BXP21 und eines FITC-gelabelten Sekundärantikörpers hinsichtlich ihres ABCG2-Expressionsstatus untersucht wurden.

Die hohen Fluoreszenzwerte der Zelllinien A2780, A2780 Adr und MCF-7 können mehrere Ursachen haben:

(i) Die Markierung von BCRP muss im Gegensatz zum Labeling von P-gp, das an einem extrazellulären Epitop stattfindet, an einem intrazellulären Epitop erfolgen. Gelöste Primär-

Sekundärantikörper-Komplexe, die nicht an BCRP gebunden haben, können aus dem intrazellulären Raum möglicherweise schlechter, eben nicht quantitativ entfernt werden und werden deshalb bei der Detektion der Zellen im Durchflusszytometer mit erfasst. Aus diesem Grund erscheint eine andere Methode zur Quantifizierung von BCRP wie das Western-Blotting möglicherweise sinnvoller.¹²⁷

(ii) Die Zelllinien A2780, A2780 Adr und MCF-7 weisen einen signifikanten, nennenswerten ABCG2-Gehalt auf.

Erst weitere, innerhalb dieser Arbeit durchgeführte funktionelle Untersuchungen belegen, dass die Zelllinien A2780, A2780 Adr und MCF-7 ABCG2 nicht überexprimieren.

Die bisherigen Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Zelllinie A2780 Adr ABCB1 überexprimiert. Die möglichst selektive Überexpression von ABCB1 kann als notwendige Voraussetzung für die im weiteren Verlauf dieser Arbeit vorgestellten funktionellen Studien angesehen werden, da erst durch sie die Gewissheit gewonnen wurde, P-gp selektiv zu untersuchen.

3.2 Analyse von ausgewählten Verbindungen mit Hilfe des MTT Assays

Ein wesentlicher Kernpunkt dieser Arbeit besteht darin potentielle Bindungsstellen von P-gp nachzuweisen und deren gegenseitige Interaktion auf funktioneller Ebene zu charakterisieren.

Wie bereits erwähnt, interagieren nach Shapiro und Ling Verbindungen wie Doxorubicin, Daunorubicin oder Rhodamin 123 mit der sogenannten R-Seite von P-gp, während Colchicin, Quercetin oder Hoechst 33342 mit der sogenannten H-Seite in Wechselwirkung treten.⁷⁵

Eine interessante Fragestellung ergibt sich aus der Vorstellung, wie bestimmte Substanzen (Modulatoren und Substrate) die Hemmwirkung der Zytostatika Doxorubicin und Colchicin beeinflussen. Die beiden Zytostatika Colchicin und Doxorubicin wurden deshalb ausgewählt, weil sie jeweils an eine der beiden potentiellen Transportbindungsstellen von P-gp spezifisch binden sollen. Werden nun Konzentrations-Effektkurven der beiden Zytostatika in Gegenwart von verschiedenen Modulator bzw. Substratkonzentrationen aufgenommen, so sind verschiedene Interaktionsformen denkbar:

- Der Effekt des Zytostatikums steigt an, da der Modulator mit ansteigender Konzentration P-gp in zunehmendem Maße inhibiert.
- Die Hemmwirkung des Zytostatikums nimmt weiter ab, da die untersuchte Verbindung (P-gp Substrat) eine Aktivierung von P-gp hervorruft.

In Abb. 3.9 sind die Konzentrations-Effektkurven für Doxorubicin in Gegenwart und Abwesenheit des Modulators WK-X-34 wiedergegeben. Vor der eigentlichen Normalisierung der Daten (vergl. Kap. 2.22.2) wurden die einzelnen Konzentrations-Effektkurven im Hinblick auf signifikante Unterschiede ihrer Bottom- und Topwerte sowie ihrer Hillkoeffizienten mit Hilfe eines F-Tests analysiert (nicht normierte Konzentrations-Effektkurven, hier nicht dargestellt). Bei Annahme eines identischen molekularen Wirkmechanismus sollte der F-Test eine Übereinstimmung dieser charakteristischen Parameter ergeben (Beibehaltung der Nullhypothese). Die einzelnen, normalisierten Konzentrations-Effektkurven wurden dann unter Festlegung gemeinsamer Bottom-, Topwerte sowie Hillkoeffizienten mit Hilfe der 4-

Parameter-logistischen Gleichung analysiert und die IC_{50} -Werte berechnet.

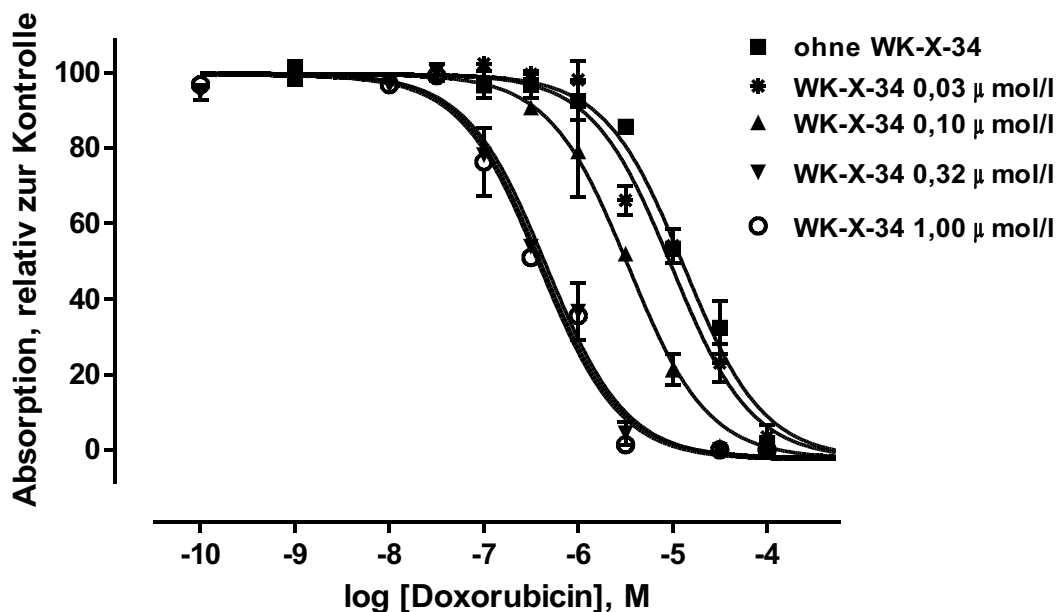


Abb. 3.9: Konzentrations-Effektkurven von Doxorubicin in Anwesenheit und Abwesenheit von WK-X-34 (bestimmt mit Hilfe des MTT Assays an A2780 Adr Zellen). Dargestellt ist ein typisches Experiment aus einer Serie von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Die in Gegenwart und Abwesenheit von Modulatoren (und Substraten, s. u.a. Hoechst 33342) aufgenommenen Konzentrations-Effektkurven eines Zytostatikums wurden in Anlehnung an ein von Garnier-Suillerot et al.¹⁶⁴ entwickeltes Modell analysiert.

Dieses Modell berücksichtigt verschiedene Parameter, welche die Konzentration eines Zytostatikums in einer ABCB1 überexprimierenden Zelle beeinflussen:

- Diffusion des Zytostatikums in die Zelle (k_{Diff}).
- Rückdiffusion des Zytostatikums aus der Zelle (k_{Diff}).
- P-gp Aktivität, die den Betrag der Diffusion in die Zelle verringert (k_{P-gp}).
- Ein aktiver Transport des Zytostatikums aus der Zelle, der nicht auf P-gp zurückzuführen ist, wird vernachlässigt (vergl. Abb. 3.10).
- Die Konzentration des P-gp Substrates ist kleiner als sein K_m -Wert, so dass die von P-gp aus der Zelle gepumpte Menge annähernd proportional zur intrazellulären Konzentration ist.

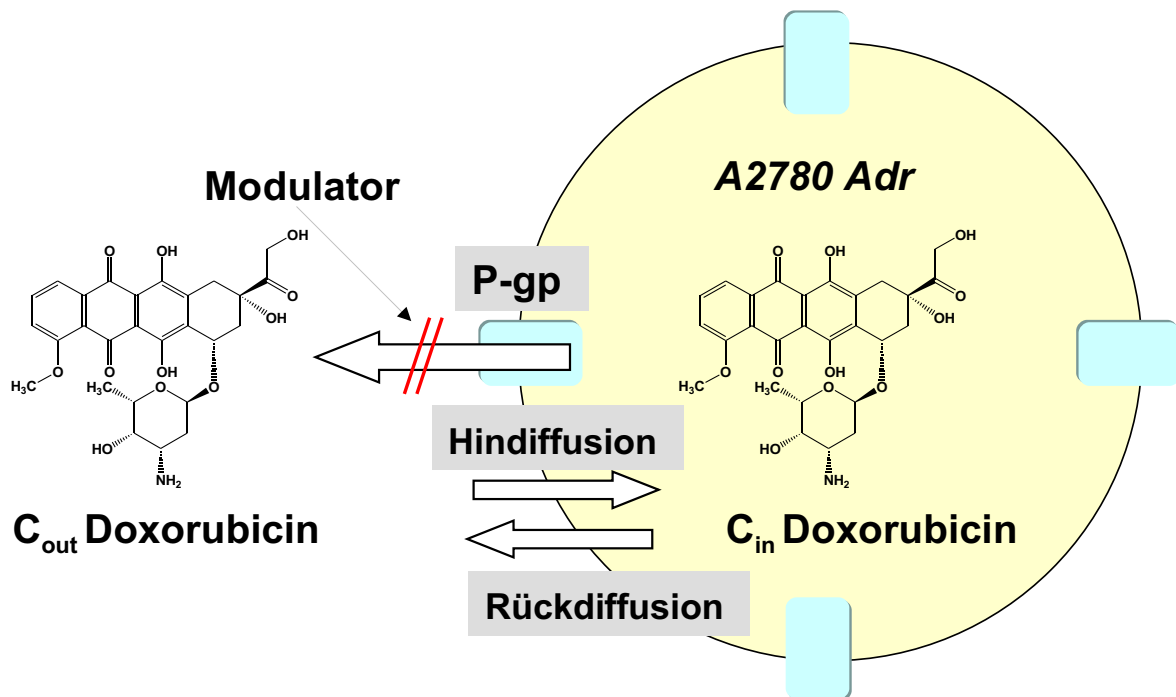


Abb. 3.10: Diffusion, Rückdiffusion und Transport durch P-gp als Einflussgrößen auf die intrazelluläre Konzentration des Zytostatikums Doxorubicin.

Im Gleichgewichtszustand entspricht die Influx- der Effluxgeschwindigkeit des Zytostatikums. Es kann das folgende Gleichungssystem formuliert werden:

$$C_{out} \cdot k_{Diff} = C_{in} \cdot k_{Diff} + C_{in} \cdot k_{P-gp} \quad \text{Gleichung 3.1}$$

Gleichung 3.1 kann wie folgt umgeformt werden:

$$C_{out} \cdot k_{Diff} = (k_{Diff} + k_{P-gp}) \cdot C_{in}$$

$$\Leftrightarrow C_{out} = \frac{(k_{Diff} + k_{P-gp}) \cdot C_{in}}{k_{Diff}} \Leftrightarrow \frac{C_{out}}{C_{in}} = \frac{(k_{Diff} + k_{P-gp})}{k_{Diff}}$$

Unter der Annahme, dass passive Hin- und Rückdiffusion gleich groß sind, lässt sich das obere Gleichungssystem vereinfachen. Das Verhältnis aus C_{out} zu C_{in} entspricht dem Resistenzfaktor (RF). Es resultiert Gleichung 3.2:

$$\frac{C_{out}}{C_{in}} = RF = 1 + \frac{k_{P-gp}}{k_{Diff}} \quad \text{Gleichung 3.2}$$

Aus dieser Formel geht hervor, dass der Resistenzfaktor ansteigt, wenn k_{Diff} abnimmt. Eine

Erhöhung von k_{P-gp} hat zur Folge, dass die Konzentration des Zytostatikums (Substrates) in der Zelle (C_{in}) abnimmt. Der Effekt des Zytostatikums kann mit Hilfe der 4-Parameter-logistischen Gleichung berechnet werden, indem C_{in} in diese Gleichung eingesetzt wird.

Abb. 3.11 verdeutlicht, wie k_{P-gp} den pIC_{50} -Wert eines fiktiven Zytostatikums (= P-gp Substrat, $pIC_{50} = 6,0$, $n_H = 1,0$) beeinflusst. Für die Simulation wurde ein Diffusionskoeffizient von 1 angenommen. Die parallele, durch steigende k_{P-gp} -Werte hervorgerufene Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effektkurve des Zytostatikums fällt um so geringer aus, je höher der Diffusionskoeffizient wird. Die Konzentration des Zytostatikums in der Zelle kann erhöht werden, wenn ein Modulator P-gp inhibiert (Kompetition des Substrates mit dem Modulator). In diesem Fall wird k_{P-gp} mit einem Faktor f multipliziert. Dieser Faktor f berücksichtigt den P-gp inhibierenden Effekt des Modulators. Für C_{in} gilt in Gegenwart eines Modulators:

$$C_{in} = C_{out} \cdot \frac{k_{Diff}}{(k_{Diff} + k_{P-gp} \cdot f)} \quad \text{Gleichung 3.3}$$

Für f können Werte zwischen 1 und 0 angenommen werden. Für den Fall, dass f den Wert 1 erreicht, bleibt P-gp ungehemmt.

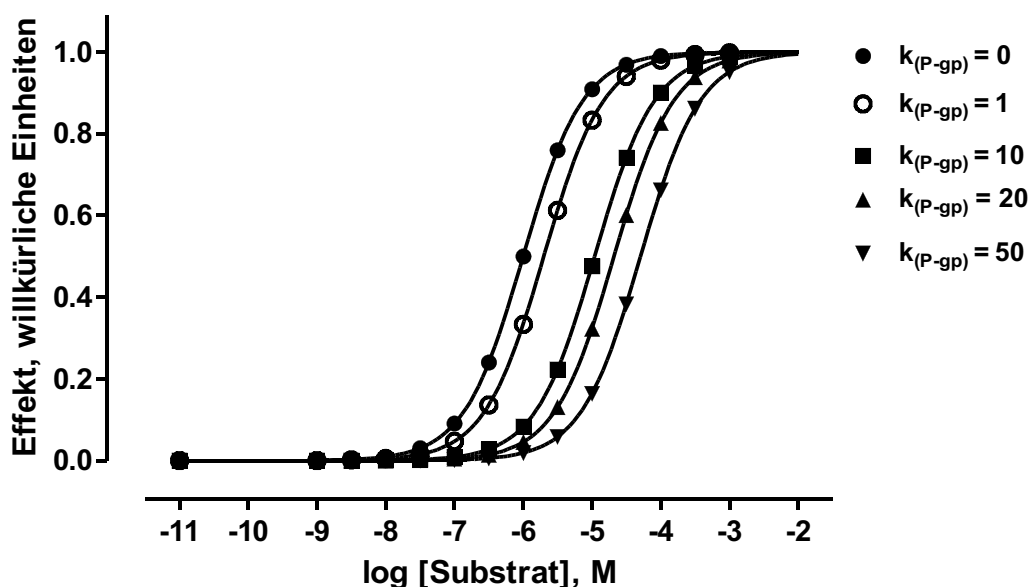


Abb. 3.11: Zusammenhang zwischen dem IC_{50} -Wert eines fiktiven Zytostatikums (= P-gp Substrat) und k_{P-gp} . Für das Zytostatikum wurde ein pIC_{50} -Wert von 6 ($n_H = 1$) und ein Diffusionskoeffizient von 1 angenommen.

Der Faktor f nimmt Werte kleiner 1 an und strebt gegen 0, wenn P-gp um so mehr durch den Modulator blockiert wird. Eine vollständige Inhibition von P-gp bewirkt, dass die Konzentration des Zytostatikums (Substrates) in der Zelle unabhängig von k_{P-gp} ist ($C_{in} = C_{out}$). Der Faktor f und der Effekt des Modulators stehen in folgendem Zusammenhang:

$$f = (1 - y_{Modulator}) = 1 - \left(\frac{1}{1 + 10^{((\log C_{50} - \log c_m) \cdot n_H)}} \right) \quad \text{Gleichung 3.4}$$

Vergleicht man den Effekt eines Zytostatikums ohne Modulator mit dem Effekt eines Zytostatikums in Anwesenheit eines Modulators, so resultiert das folgende Gleichungssystem:

$$\frac{(C_{out} \cdot k_{Diff})}{((k_{Diff} + k_{P-gp}) \cdot C_{in})} = \frac{(C_{out} \cdot k_{Diff})}{((k_{Diff} + k_{P-gp} \cdot f) \cdot C_{in}^*)} \Leftrightarrow \frac{C_{in}}{C_{in}^*} = \frac{(k_{Diff} + k_{P-gp} \cdot f)}{(k_{Diff} + k_{P-gp})}$$

C_{in}^* bezieht sich dabei auf die Konzentration eines Zytostatikums in der Zelle, die sich in Gegenwart eines Modulators ergibt. Im Gegensatz zu C_{in} nimmt C_{in}^* in Anwesenheit eines Modulators größere Werte an und ruft damit eine Erniedrigung des IC_{50} -Wertes des Zytostatikums hervor.

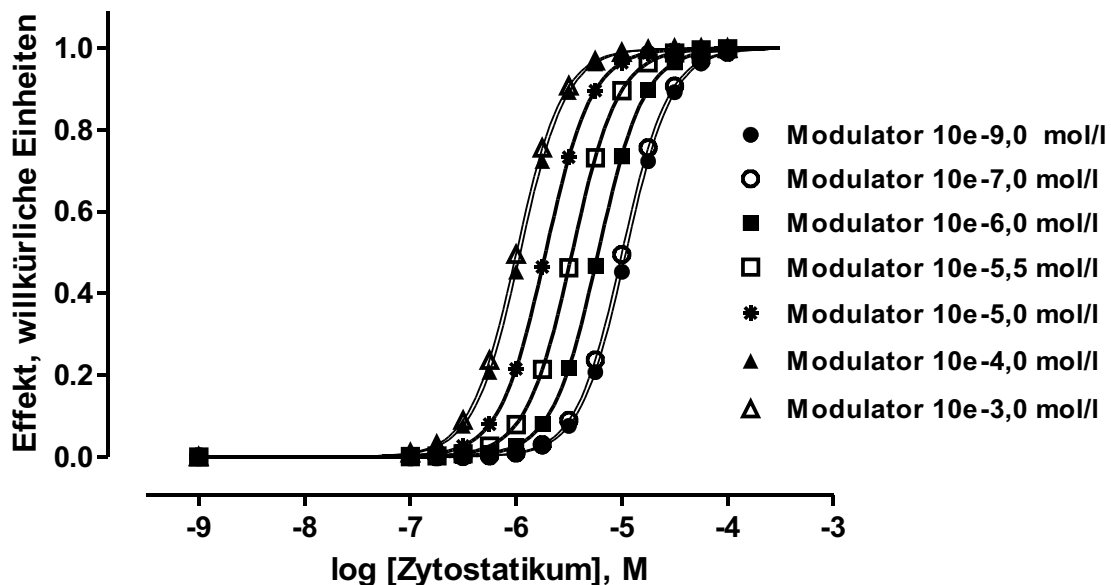


Abb. 3.12: Simulierte Konzentrations-Effektkurven eines fiktiven Zytostatikums ($pIC_{50} = 6$, $n_H = 1$) in Abwesenheit und Gegenwart eines fiktiven Modulators ($pIC_{50} = 6$, $n_H = 1$), basierend auf dem in Kap. 3.2 vorgestellten Modell.¹⁶⁴

In Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration des Modulators wird die Konzentra-

tions-Effektkurve des Zytostatikums parallel nach links verschoben. Die konzentrationsabhängige Linksverschiebung kann mit Hilfe des Dose Ratio-Wertes quantifiziert werden. In Abb. 3.12 sind simulierte Konzentrations-Effektkurven eines fiktiven Zytostatikums mit einem pIC_{50} -Wert von 6 ($n_H = 1$) bei einem Diffusionskoeffizienten von 1 und einem k_{P-gp} -Wert von 10 zu erkennen; zum Zytostatikum wurden ansteigende Konzentrationen eines fiktiven Modulators hinzugefügt.

Die IC_{50} -Werte, die aus den simulierten Konzentrations-Effektkurven resultierten, wurden für die Berechnung der Dose Ratio-Werte verwendet. Der Logarithmus der Dose Ratio-Werte wurde gegen die korrespondierende, logarithmierte Konzentration des fiktiven Modulators aufgetragen. Dabei wurden Simulationen für verschiedene k_{P-gp} -Werte durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 3.13 dargestellt. Der maximale log DR-Wert ist abhängig vom Verhältnis k_{P-gp} zu k_{Diff} . Der pIC_{50} -Wert des Modulators steigt mit abnehmender P-gp Aktivität an. Dies verdeutlicht auch, dass es von besonderer Bedeutung war, die Versuche unter gleichen Bedingungen, insbesondere einer identischen ABCB1-Expression der Zellen, durchzuführen.

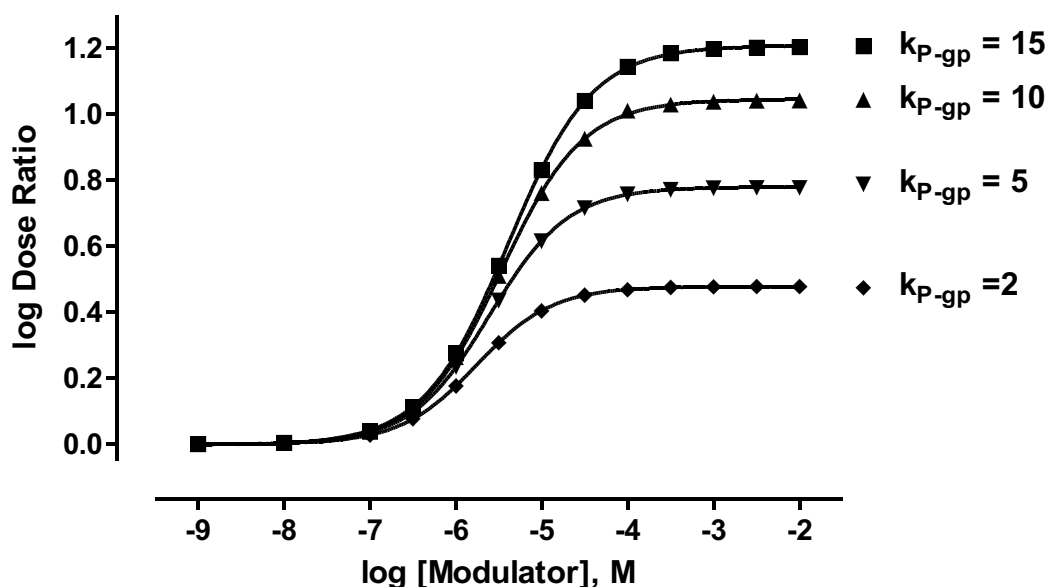


Abb. 3.13: \log Dose Ratio gegen $\log c$ (Modulator) für verschiedene k_{P-gp} -Werte. Die Daten basieren auf simulierten Konzentrations-Effektkurven, die mit Hilfe des in Kap. 3.2 vorgestellten Modells generiert wurden.

In Abb. 3.14 ist eine sigmoidale Kurve des Modulators WK-X-34 zu erkennen. Die log DR-Werte wurden gegen die korrespondierenden, logarithmierten Konzentrationen von WK-

X-34 aufgetragen. Ein klassischer Modulator ist nur in der Lage die Konzentrations-Effekt-kurve des Zytostatikums parallel nach links zu verschieben.

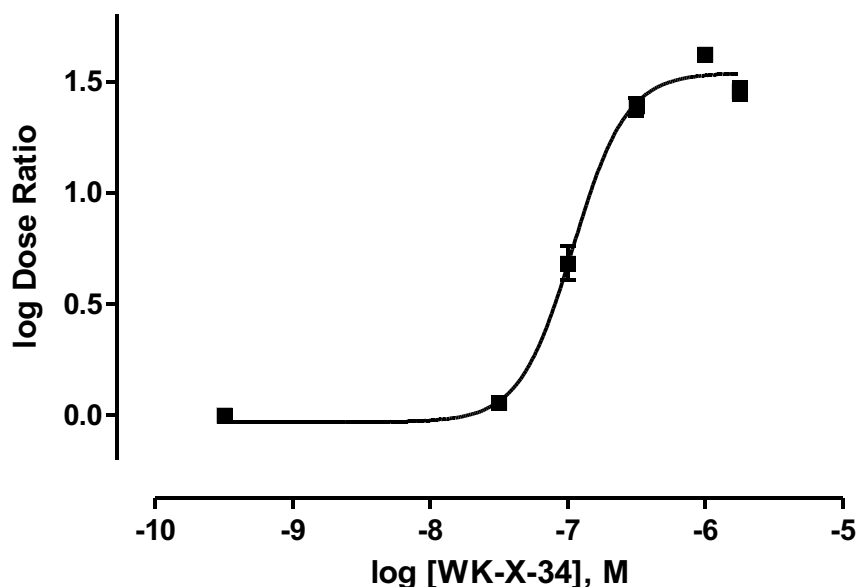


Abb. 3.14: $\log DR$ -Werte gegen $\log c$ (WK-X-34). Die Kurve wurde mit Hilfe der 4-Parameter-logistischen Gleichung ausgewertet: $pIC_{50} = 6,96 \pm 0,13$, $n_H = 2,23 \pm 0,45$.

Der kleinste $\log DR$ -Wert ist somit 0 (IC_{50} -Wert des Zytostatikums in Abwesenheit des Modulators) und legt das untere Plateau der in Abb. 3.14 dargestellten Kurve fest. Der auf Basis der 4-Parameter-logistischen Gleichung kalkulierte pIC_{50} -Wert von WK-X-34 beträgt $6,96 \pm 0,13$. Der Hillkoeffizient ist signifikant verschieden von 1 ($n_H = 2,23 \pm 0,45$). Die Ergebnisse, die mit Hilfe dieses Modells generiert wurden, sind in den beiden folgenden Tabelle 3.5 und 3.6 zusammengestellt.

Tabelle 3.5: pIC_{50} -Werte = Wendepunkte der $\log DR$ gegen $\log c$ (Modulator)-Kurven. Hillkoeffizienten und deren Standardabweichungen. Zytostatikum: Doxorubicin (MTT Assay, A2780 Adr Zellen).

Verbindung	pIC_{50}-Wert \pm SD	Hillslope \pm SD
Diltiazem	$4,90 \pm 0,14$	1,00 (fixiert)
Verapamil	$5,99 \pm 0,16$	1,00 (fixiert)
WK-X-34	$6,96 \pm 0,13$	$2,23 \pm 0,45$
WK-X-51	$6,88 \pm 0,06$	$1,80 \pm 0,41$
WK-X-66	$5,80 \pm 0,10$	1,00 (fixiert)
XR 9577	$6,88 \pm 0,12$	$1,79 \pm 0,34$

3 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3.6: pIC_{50} -Werte stellen die Wendepunkte der $\log DR$ gegen $\log c$ (Modulator/Substrat)-Kurven dar. Zusätzlich sind die Hillkoeffizienten und deren Standardabweichungen angegeben. Zytostatikum: Colchicin (MTT Assay, Zelllinie A2780 Adr).

Verbindung	pIC_{50} -Wert \pm SD	Hillslope \pm SD
Diltiazem	5,12 \pm 0,34	1,00 (fixiert)
Verapamil	6,07 \pm 0,27	1,00 (fixiert)
WK-X-34	7,00 \pm 0,13	1,67 \pm 0,31
WK-X-51	7,02 \pm 0,18	2,36 \pm 0,62
WK-X-66	5,56 \pm 0,20	1,00 (fixiert)
XR 9577	6,76 \pm 0,24	1,35 \pm 0,29

Ein Vergleich der pIC_{50} -Werte der sechs in Tabelle 3.5 und 3.6 angegebenen Verbindungen zeigt, dass eine ausgeprägte Korrelation trotz der Verwendung von zwei unterschiedlichen Zytostatika resultiert ($r^2 = 0,96$). Die Steigung der Regressionsgeraden beträgt $0,95 \pm 0,10$ (vergl. Abb. 3.15).

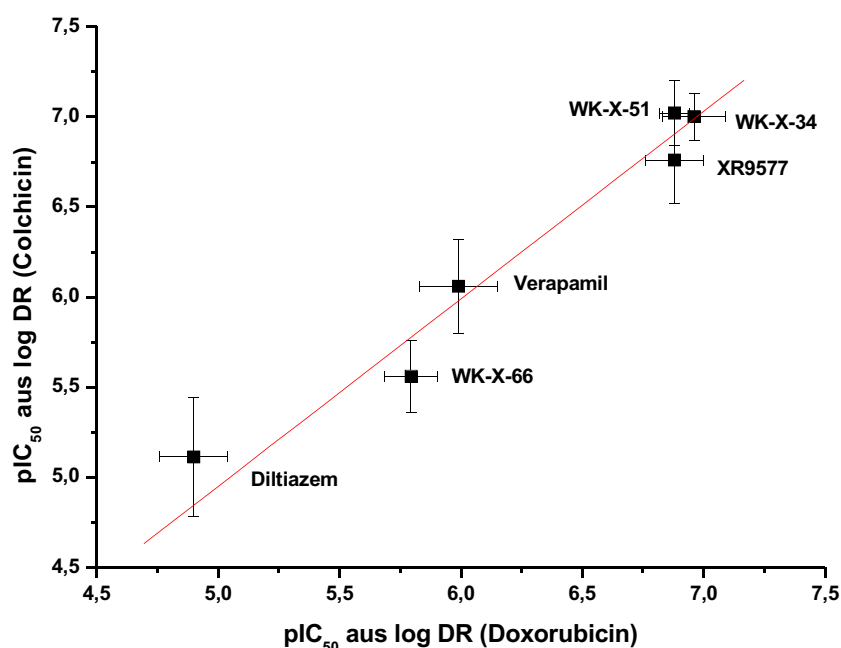


Abb. 3.15: pIC_{50} -Werte aus $\log DR$ gegen $\log c$ (Modulator)-Konkurven sechs verschiedener Substanzen, die gegenüber den Zytostatika Colchicin und Doxorubicin bestimmt wurden ($r^2 = 0,96$).

Diese Ergebnisse ermöglichen folgende Interpretationen:

- Die Modulatoren Diltiazem, Verapamil, WK-X-34, WK-X-51, WK-X-66 und XR9577 inhibieren die Funktion des Gesamtproteins; solange der Gesamteffekt gemessen wird, sind für die beiden Zytostatika Colchicin und Doxorubicin vergleichbare Ergebnisse zu erwarten. Die Inhibition ist also unabhängig vom eingesetzten Zytostatikum, obwohl die beiden Zytostatika Colchicin und Doxorubicin mit zwei verschiedenen Bindungsstellen interagieren.
- Der von 1,0 signifikant verschiedene Hillkoeffizient stellt einen Hinweis dar, dass XR9577, WK-X-34 und WK-X-51 mit beiden Substraten Colchicin und Doxorubicin in nicht-kompetitiver Form interagieren.

Die beiden Verbindungen QB102 und Hoechst 33342 waren nicht in der Lage, die Konzentrations-Effektkurve des Zytostatikums Doxorubicin parallel nach links zu verschieben. Beide Substanzen wurden bis zu einer Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ (Endkonzentration) untersucht. Höhere Konzentrationen konnten aus folgenden Gründen nicht eingesetzt werden: (i) Eigentoxizität von Hoechst 33342 (vergl. Kap. 3.1). (ii) Toxizität des Lösungsmittels DMSO, das zum Lösen der Verbindung QB102 notwendig war. (Man beachte in diesem Zusammenhang auch die 72 h Inkubationszeit, die für die Durchführung eines MTT Assays notwendig ist.) Rhodamin 123 konnte aufgrund der mit Doxorubicin interferierenden Exzitations- und Emissions-Spektren nicht untersucht werden. Nach Shapiro und Ling sowie Kondratov et al. handelt es sich bei den Verbindungen Hoechst 33342 und QB102 nicht um klassische P-gp Modulatoren, sondern um P-gp Aktivatoren.^{75,175} Beide Verbindungen sollten nicht zu einer Verringerung, sondern zu einer Erhöhung des IC_{50} -Wertes des Zytostatikums führen, da eine Steigerung der P-gp Aktivität eine Abnahme der Konzentration des Zytostatikums in der Zelle hervorruft. Für Hoechst 33342 konnte ein solches Phänomen nicht festgestellt werden. Ebenso konnte durch Hoechst 33342 aber auch keine signifikante parallele Linksverschiebung der Konzentrations-Effektkurve von Doxorubicin hervorgerufen werden.

In Abb. 3.9 sind zwei Konzentrations-Effektkurven des Zytostatikums Doxorubicin ohne und mit QB102 dargestellt. Für beide Konzentrations-Wirkungskurven konnte mit Hilfe eines F-Tests nachgewiesen werden, dass die Hillkoeffizienten der einzelnen Kurven nicht

differieren. Die geringe Erhöhung des IC_{50} -Wertes ist dagegen signifikant: pIC_{50} (ohne QB102) = $4,73 \pm 0,04$, pIC_{50} (10 $\mu\text{mol/l}$ QB102) = $4,44 \pm 0,03$. Aufgrund der Ergebnisse des MTT Assays kann QB102 als P-gp Aktivator klassifiziert werden.

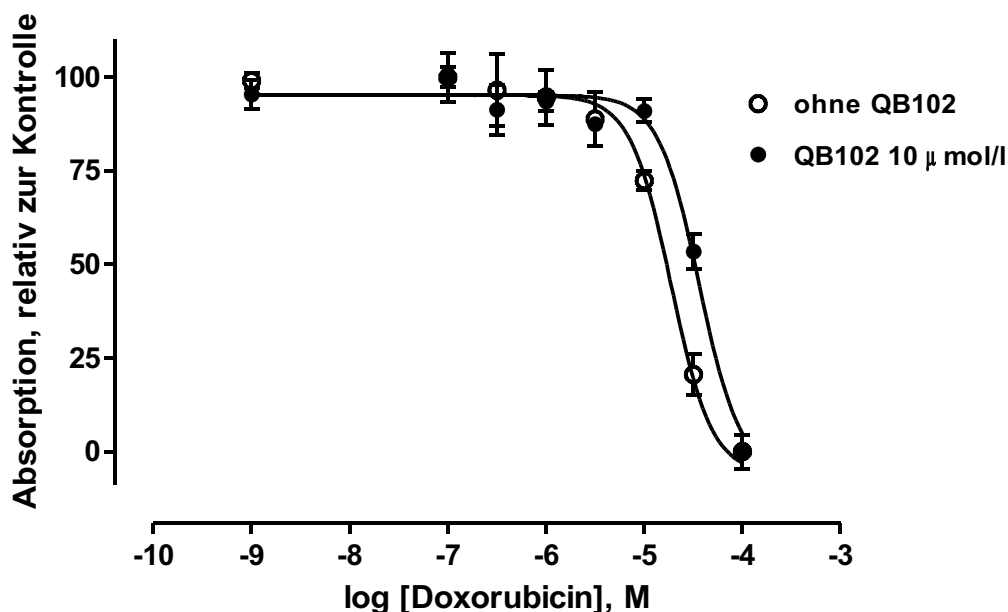


Abb. 3.16: Konzentrations-Effektkurven von Doxorubicin ohne QB102 (farblose Kreise) und mit QB102 (schwarze Kreise): pIC_{50} (ohne QB102) = $4,73 \pm 0,04$, pIC_{50} (10 $\mu\text{mol/l}$ QB102) = $4,44 \pm 0,03$. Der Hillkoeffizient beträgt für beide Kurven: $n_H = 2,09 \pm 0,35$ (MTT Assay, A2780 Adr Zellen, $n \geq 3$).

Im Vergleich zu Hoechst 33342 besitzt QB102 (im Sinne eines Aktivators) eine höhere Affinität zu P-gp. Die im Vergleich zu allen anderen Verbindungen stattfindende parallele Recht- statt Linksverschiebung unterstreicht auf funktioneller Ebene die Existenz einer weiteren Bindungsstelle.

Die Existenz der zweiten Bindungsstelle konnte durch die geringe, aber signifikante Rechtverschiebung der Konzentrations-Effektkurve von Doxorubicin durch QB102 belegt werden. Diese Erkenntnisse deuten auf funktioneller Ebene darauf hin, dass die beiden Bindungsstellen miteinander interagieren (positive Kooperativität). Die fehlende von Rhodamin 123 ausgehende Aktivierung des Transportes von Colchicin lässt die Schlussfolgerung zu, dass die positive Kooperativität sich nur in eine Richtung auswirkt. Nur eine Akti-

vierung des Transportes von Substraten der R-Seite durch an die H-Seite bindende Substrate ist möglich. Dieses Ergebnis stimmt folglich nur teilweise mit den Resultaten von Shapiro und Ling überein, die eine beidseitige, wechselseitige positive Kooperativität der beiden Bindungsstellen postulierten.⁷⁵

Wie bereits erläutert, wurden die Konzentrations-Effektkurven der Zytostatika Doxorubicin und Colchicin in Gegenwart verschiedener Modulator- oder Substratkonzentrationen aufgenommen. Diese Vorgehensweise ist verglichen mit der Methode zur Bestimmung der sogenannten MDR Ratio-Werte wesentlich aufwändiger. Für die Ermittlung der MDR Ratio- bzw. Fold Reversal-Werte wird nur eine definierte Konzentration der Testsubstanz eingesetzt. Die MDR Ratio-Werte werden berechnet, indem das Verhältnis aus dem IC_{50} -Wert des Zytostatikums ohne Modulator zum IC_{50} -Wert des Zytostatikums in Gegenwart einer bestimmten Modulatorkonzentration gebildet wird.²⁵

Welchen Vorteil bietet die Vorgehensweise dieser Arbeit zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität eines Modulators oder Substrates gegenüber dem traditionell eingesetzten Verfahren, bei dem nur eine einzige Konzentration der Testsubstanz untersucht wird? Die Beantwortung dieser Frage steht in direktem Zusammenhang mit den Nachteilen der MDR-Ratio-Werte, die im Folgenden kurz erläutert werden:

- Der MDR Ratio-Wert ist abhängig vom eingesetzten Zytostatikum, dessen Effekt in Gegenwart des Modulators verändert wird.
- Zwischen der eingesetzten Modulatorkonzentration und dem MDR Ratio-Wert besteht kein linearer Zusammenhang, solange der MDR Ratio-Wert nicht logarithmiert wird. Allerdings ist der lineare Zusammenhang zwischen dem log. MDR Ratio-Wert und der Modulatorkonzentration begrenzt. Geringe Modulatorkonzentration (IC_{10}) fallen aus diesem Bereich heraus.²⁵

Diese Nachteile werden durch die Vorgehensweise dieser Arbeit umgangen. Deshalb ist die in dieser Arbeit dargestellte Vorgehensweise besser.

Das in Anlehnung an Garnier-Suillerot entwickelte Modell¹⁶⁴ berücksichtigt die Besonderheiten des ABC Transporters P-gp. Mit Hilfe dieses Modells und generierter Simulationen

wird offensichtlich, dass sich die Konzentrations-Effektkurve eines Zytostatikums in Gegenwart eines Modulators nur begrenzt nach links verschieben lässt. Das Ausmaß der Verschiebung ist dabei abhängig von dem Verhältnis der P-gp Aktivität (bzw. ABCB1 Expression) zum Diffusionskoeffizienten des Zytostatikums und der Affinität des Modulators.

Ein bedeutender Nachteil des MTT Assays^{130,131} besteht darin, dass eine 72 h Inkubation der Zytostatika und Modulatoren notwendig ist, um die durch Modulatoren hervorgerufene Veränderung der Toxizität der Zytostatika erfassen zu können. Dabei muss der MTT Assay als „indirekter“ Assay verstanden werden. Erst über gewisse hintereinander geschaltete Reaktionen kann auf die Beeinflussung der P-gp Funktion durch Modulatoren und Substrate geschlossen werden, die durch die Reduktion von MTT zu Formazan visualisiert wird (vergl. Kap.2.11). Im Fokus weiterer Untersuchungen dieser Arbeit stand eine möglichst direkte, zeitnahe Messung der Beeinflussung der P-gp Funktion durch Modulatoren und Substrate. Die Interaktion der potentiellen Bindungsstellen könnte möglicherweise durch eine direkte Detektion der P-gp Funktion besser zum Vorschein kommen. Die mit Hilfe eines solchen Assays generierten Daten sollen mit den bisherigen Resultaten verglichen werden.

3.3 Der Calcein AM Assay – Etablierung und Weiterentwicklung an A2780 Adr Zellen

Der Calcein AM Assay stellt eine aus der Literatur bekannte funktionelle Methode zur Untersuchung von P-gp Modulatoren und Substraten dar.^{136,137} Calcein AM ist ein P-gp Substrat und stimmt nach Pajeva und Wiese mit den Pharmakophorpunkten von Rhodamin 123 überein, so dass eine Interaktion mit der R-Seite angenommen werden kann.¹⁰⁰ Substrate und Modulatoren führen zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Fluoreszenz von Calcein.

In dieser Arbeit wurde der Calcein AM Assay an A2780 Adr Zellen etabliert. Wie in der Literatur häufig beschrieben, wurden zunächst aufwändige Waschschrte in die Durchführung dieses Standard Assays miteinbezogen.^{136,137} Die Zellen wurden gerettet, mit KHP gewaschen, auf verschiedene Eppendorfgfäße verteilt, mit den Modulatoren 30 min inkubiert und anschließend für weitere 30 min mit Calcein AM versehen. Nach Beendigung der 30 min Inkubationszeit mit Calcein AM wurden die Zellen erneut gewaschen, bevor sie dann in eine Mikrotiterplatte überführt und vermessen wurden.

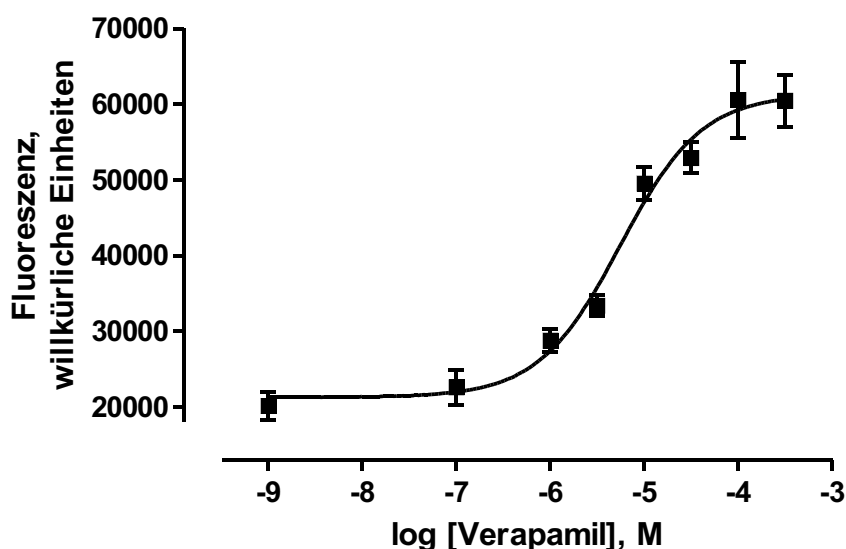


Abb. 3.17: Konzentrations-Effektkurve von Verapamil, die mit Hilfe des Standard Calcein AM Assays an A2780 Adr Zellen aufgenommen wurde: $pIC_{50} = 5,26 \pm 0,11$, $n_H = 1,00$ (fixiert).

In Abb. 3.17 ist eine Konzentrations-Effektkurve für Verapamil zu erkennen, die auf dem hier kurz erläuterten Standard Assay basiert ($pIC_{50} = 5,26 \pm 0,11$, $n_H = 1,00$). Der beschriebene Assay wurde im Rahmen dieser Arbeit modifiziert.¹³⁸ Die Durchführung des Calcein AM Assays wurde durch die Auslassung mehrerer Waschschriffe wesentlich erleichtert. Im Gegensatz zur vorher erläuterten Arbeitsweise wurden die Zellen direkt in eine Mikrotiterplatte eingebracht und dort mit Modulatoren inkubiert. Dann erfolgte die sofortige, kinetische Detektion der Calceinfluoreszenz nach Zugabe von Calcein AM (vergl. Kap. 2.13). Die Arbeitsdauer konnte deutlich verringert und so ein HTS-fähiger Assay entwickelt werden (HTS = **H**igh **T**hroughput **S**creening). Die kinetische Aufnahme der Calceinfluoreszenz bietet gegenüber einer Einzelmessung den Vorteil, dass sie eine direkte Detektion der P-gp Funktion ermöglicht, wenn man von der Umwandlung von Calcein AM in Calcein absieht.

Im Folgendem sollen einige wesentliche Erkenntnisse, die zur Vereinfachung des Calcein AM Assays beitragen, sowie einige wesentliche Kernpunkte dieses Assays vorgestellt werden.

3.3.1 Bedeutung von KHP für die Durchführung des Assays

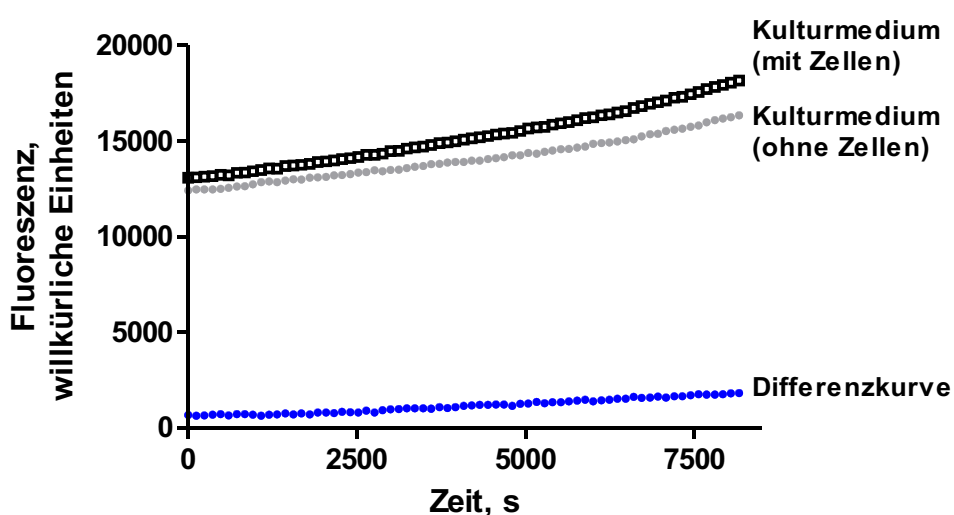


Abb. 3.18: Validierung des Calcein AM Assays: Fluoreszenz-Zeitkurve in RPMI-1640 Medium mit und ohne Zellen; blau hervorgehoben ist die Differenzkurve, die nach Abzug der Fluoreszenz der grauen Kurve (ohne Zellen) von der schwarzen Kurve (mit Zellen) resultiert.

Die Zellen wurden nach dem Ablösen und vor ihrer Überführung in die Mikrotiterplatten mit KHP gewaschen. Eine direkte Arbeitsweise im Kulturmedium war nicht möglich, da das im Kulturmedium vorhandene FKS unspezifische Esterasen enthielt, die in der Lage waren Calcein AM zu hydrolysieren. Abb. 3.18 zeigt drei verschiedene Fluoreszenz-Zeitkurven. Die in schwarz hervorgehobene Calcein-Fluoreszenz-Zeitkurve (nicht gefüllte Vierecke) bezieht sich auf A2780 Adr Zellen, die in ihrem Kulturmedium RPMI-1640 unter Zusatz von 10% FKS und 1% P/S vermessen wurden. Die korrespondierende graue Calcein-Fluoreszenz-Zeitkurve unterscheidet sich von der schwarzen nur dadurch, dass im Kulturmedium keine A2780 Adr Zellen anwesend waren. Die in blau zu erkennende dritte Kurve resultiert, wenn die graue Kurve ohne Zellen von der schwarzen Kurve mit Zellen subtrahiert wird. Der Anstieg der Differenzkurve fällt äußerst gering aus. Demnach wurde unter den hier beschriebenen Bedingungen viel Hintergrundfluoreszenz detektiert. Die hohe Hintergrundfluoreszenz gestaltet infolgedessen die Analyse der P-gp Funktion schwierig. Die nachfolgende Abb. 3.19 zeigt im Vergleich zu Abb. 3.18, dass die Fluoreszenz-Zeitverläufe in Gegenwart und Abwesenheit von A2780 Adr Zellen in Puffer wesentlich stärker differieren. Der Anstieg der Differenzkurve ist erkennbar ausgeprägt und die Hintergrundfluoreszenz gering. Ursache für den gering ausgeprägten Background ist das im Puffer fehlende FKS, das unspezifische Esterasen enthält.

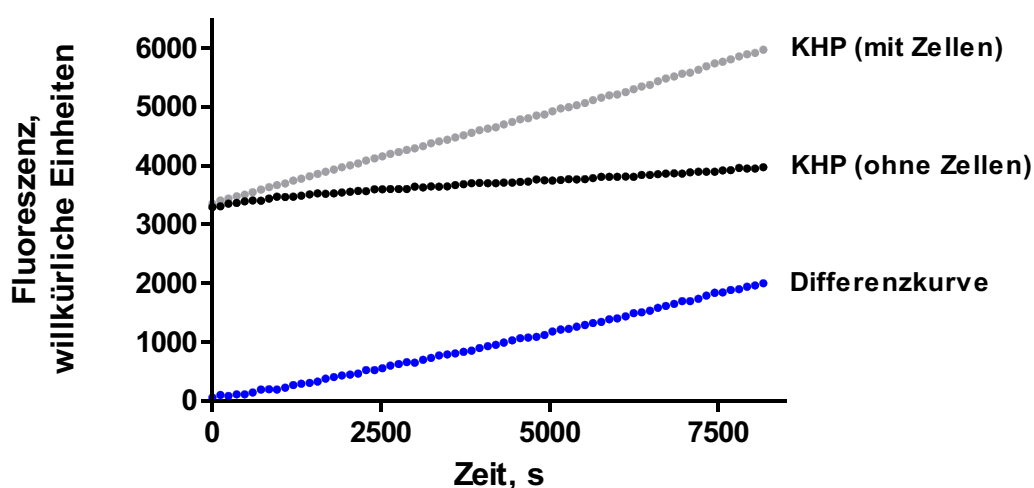


Abb. 3.19: Validierung des Calcein AM Assays: Fluoreszenz-Zeitkurve in KHP mit und ohne Zellen; blau dargestellt ist die Differenzkurve, die nach Abzug der Fluoreszenz der Kurve ohne Zellen (schwarze Symbole) von der Kurve mit Zellen (graue Symbole) resultiert.

Eine möglichst quantitative Entfernung des Kulturmediums vor der Zugabe von Calcein AM war essentiell und wurde durch das Waschen der Zellen mit KHP sowie das Ausplattieren der Zellen in KHP erreicht.

3.3.2 Schema der 96er-Mikrotiterplatte

In Abb. 3.20 ist ein Schema einer 96er-Mikrotiterplatte wiedergegeben, wie es bei der Durchführung des Calcein AM Assays eingesetzt wurde. Die gelb dargestellten Wells unterscheiden sich von den farblosen Vertiefungen der Mikrotiterplatte nur dadurch, dass sie keine Zellen enthielten.

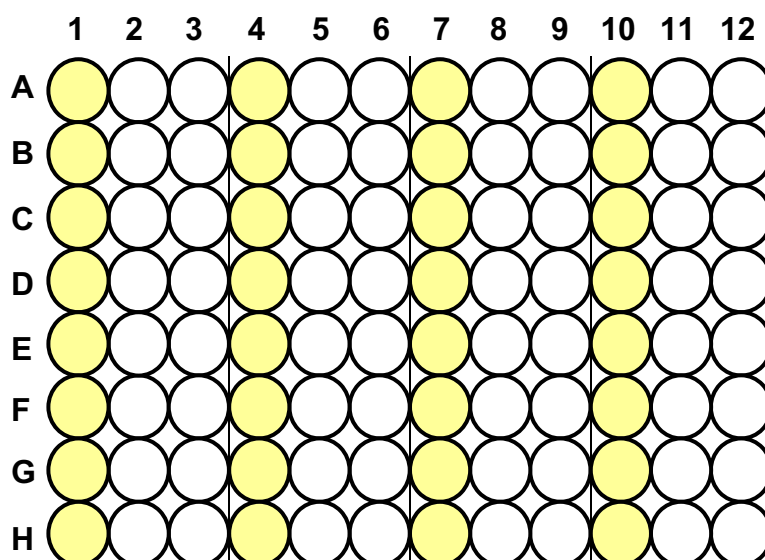


Abb. 3.20: Schema einer 96er-Mikrotiterplatte, wie sie für den Calcein AM Assay verwendet wurde: gelb dargestellt sind die Wells der Platte, die ohne Zellen versehen wurden, Wells mit Zellen sind farblos.

Wie in Kap. 2.13 erläutert, wurden drei Wells mit einer Konzentration der zu untersuchenden Substanz versehen. Die Fluoreszenz des ohne Zellen beschickten Wells wurde von den beiden korrespondierenden Wells mit Zellen subtrahiert. Diese Vorgehensweise war mit verschiedenen Vorteilen verbunden:

Substanzen können mit der Exzitations- bzw. Emissionswellenlänge von Calcein interferieren. Beispielsweise ist eine Untersuchung von Doxorubicin oder Mitoxantron mit Hilfe des Calcein AM Assays nicht möglich. Beide Verbindungen tragen zur Erhöhung der Fluores-

zenz bei, die nicht auf P-gp zurückzuführen ist. Die Hintergrundfluoreszenz steigt somit deutlich an, kann aber unter Anwendung der beschriebenen Vorgehensweise nicht als Inhibition des P-gp vermittelten Effluxes fehlgedeutet werden.

Calcein AM kann zu einem gewissen, wenn auch geringen, Anteil während der Messung hydrolytisch gespalten werden. Weiterhin werden Verdunstungseffekte, die zur Erhöhung der Konzentration und damit der Fluoreszenz beitragen, durch die Subtraktion eliminiert.

3.3.3 Fluoreszenz-Zeit-Verlauf

Die folgende Abb. 3.21 zeigt unterschiedliche Fluoreszenz-Zeitkurven, die in Gegenwart und Abwesenheit des Modulators Verapamil mit Hilfe des Calcein AM Assays bestimmt wurden.

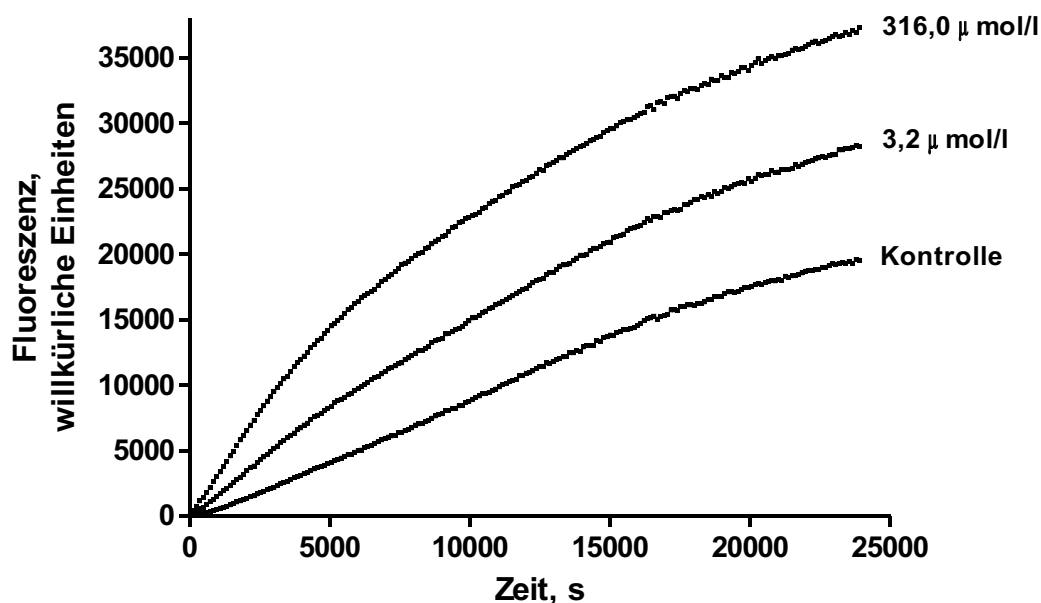


Abb. 3.21: Fluoreszenz-Zeitkurven in Gegenwart und Abwesenheit von Verapamil, die mit Hilfe des Calcein AM Assays an A2780 Adr Zellen bestimmt wurden. Dargestellt ist ein typisches Experiment aus einer Serie von wenigstens drei Versuchen.

Dabei können die Kurven in einen quasi linearen und einen nichtlinearen Bereich untergliedert werden. Zu Beginn des Assays nimmt die Konzentration von Calcein AM bezogen

3 Ergebnisse und Diskussion

auf die Gesamtkonzentration nur geringfügig ab, so dass eine Reaktionskinetik pseudo-nullter Ordnung resultiert. Erst ab etwa 3000 s macht sich für hohe Verapamilkonzentrationen, die eine vollständige Inhibition von P-gp hervorrufen, die Abnahme der Calcein AM Konzentration bemerkbar. Die Reaktionskinetik geht von pseudonullter Ordnung zu einer Reaktionskinetik erster Ordnung über. Aufgrund der Umsetzung von Calcein AM in Calcein in der Zelle, ist die intrazelluläre Calcein AM Konzentration immer wesentlich kleiner als die extrazelluläre Calcein AM Konzentration (Sinkbedingungen). Infolgedessen streben die Fluoreszenz-Zeitverläufe alle einem gemeinsamen Fluoreszenzmaximum entgegen, unabhängig davon, ob die A2780 Adr Zellen mit oder ohne Modulatoren versehen wurden. Infolgedessen war eine Auswertung der Fluoreszenz-Zeitkurven über die Plateau- oder k -Werte der exponentiellen Anstiege nicht möglich.

Eine lange Messzeit wurde auch deshalb nicht favorisiert, weil der abnehmende Habitus der Zellen die Ergebnisse negativ beeinflusst hätte und die lange Versuchszeit der Idee eines einfachen, schnellen, zuverlässigen Assays entgegenwirkt hätte.

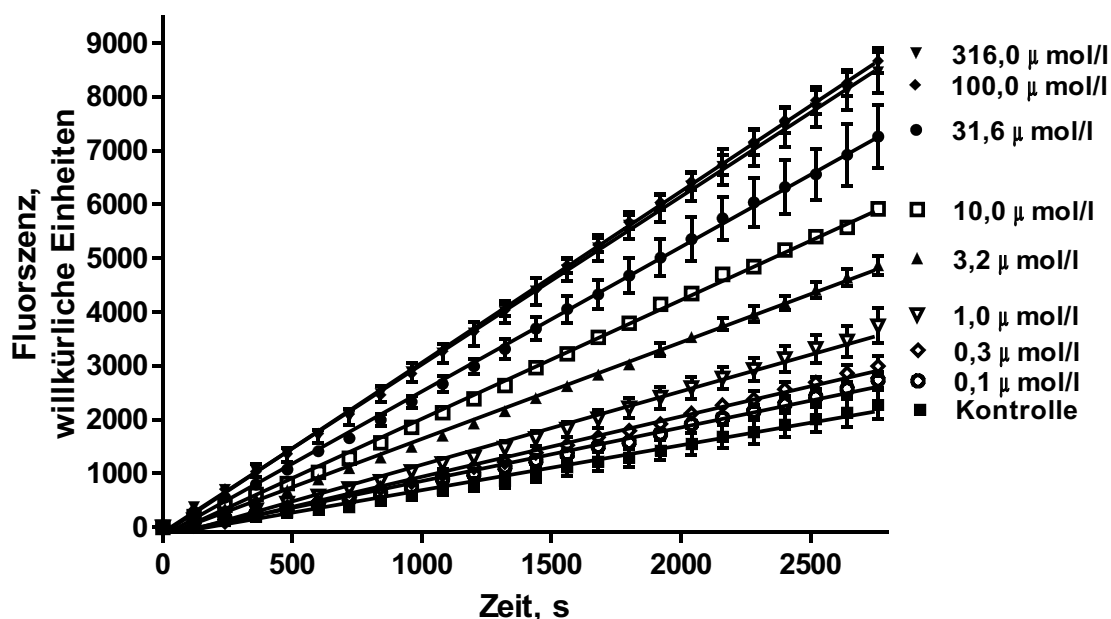


Abb. 3.22: Fluoreszenz-Zeitgeraden für verschiedene Konzentrationen des Modulators Verapamil an A2780 Adr Zellen, die mit Hilfe des Calcein AM Assays aufgenommen wurden.

Aus den erwähnten Gründen wurde der quasi lineare Bereich der Fluoreszenz-Zeitkurven für die Auswertung verwendet. In Abb. 3.22 ist die Fluoreszenz gegen die Zeit aufgetra-

gen. Die einzelnen Fluoreszenz-Zeitgeraden wurden für den Zeitraum von 0-2760 s über lineare Regression analysiert und die Steigungen der einzelnen Geraden ermittelt. Die auf diese Weise erhaltenen Anstiege wurden, wie in Abb. 3.23 zu erkennen, gegen die logarithmierten Konzentrationen des Modulators aufgetragen und auf der Basis der 4-Parameter-logistischen Gleichung analysiert.

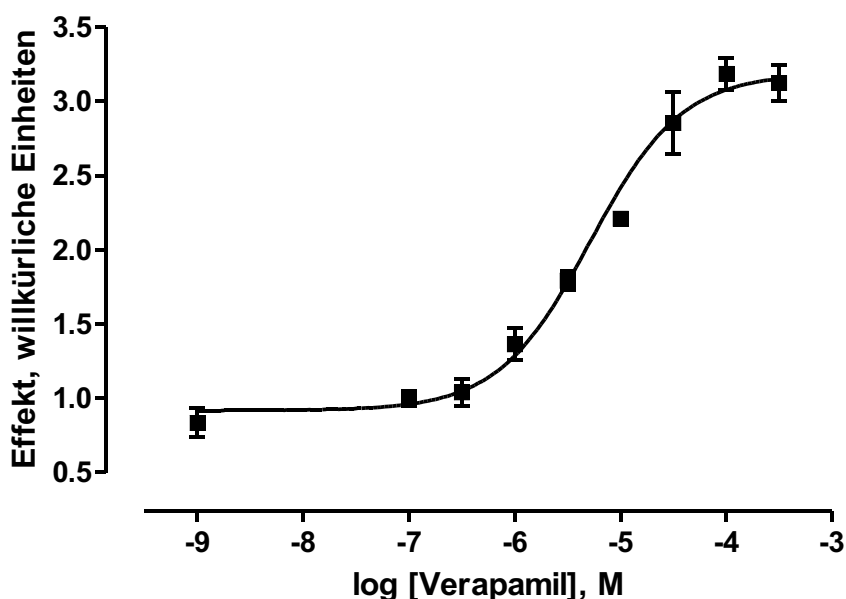


Abb. 3.23: Konzentrations-Wirkungskurve von Verapamil, die mit Hilfe des Calcein AM Assays an A2780 Adr Zellen bestimmt wurde: $pIC_{50} = 5,29 \pm 0,09$, $n_H = 1,00$ (fixiert). Beispiel für ein typisches Experiment aus einer Serie von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

3.3.4 Vergleich von A2780 und A2780 Adr Zellen im Calcein AM Assay

Die mit Hilfe des Antikörpers MRK-16 generierten, in Kap. 3.1 beschriebenen Ergebnisse zeigten, dass A2780 Adr Zellen im Gegensatz zu A2780 Zellen ABCB1 in ausgeprägtem Maße exprimieren, während der P-gp Gehalt der A2780 Zellen vernachlässigbar war. In der folgenden Abb. 3.24 ist eine Konzentrations-Effektkurve für den Modulator WK-X-34 (schwarze Symbole) wiedergegeben, die an A2780 Adr Zellen mit Hilfe des Calcein AM Assays aufgenommen wurde. Gleichzeitig wurden A2780 Zellen innerhalb des identischen Experiments mit ansteigenden Konzentrationen des Inhibitors WK-X-34 versetzt (graue

Symbole). Aus diesem Experiment konnten die folgenden Erkenntnisse gewonnen werden: (i) Das obere Plateau der Konzentrations-Effektkurve von WK-X-34 (A2780 Adr) ist vergleichbar mit dem maximalen Calceinfluoreszenzanstieg in A2780 Zellen. P-gp konnte demnach vollständig über den Modulator WK-X-34 unter Erreichen des Niveaus der sensitiven Zelllinie inhibiert werden. (ii) Der Inhibitor WK-X-34 führte zu keiner konzentrations-abhängigen Erhöhung der Fluoreszenzanstiege in A2780 Zellen, was in Übereinstimmung mit den MRK-16 basierten Experimenten (vergl. Kap 3.1) die fehlende bzw. vernachlässigbare ABCB1 Expression zeigt.

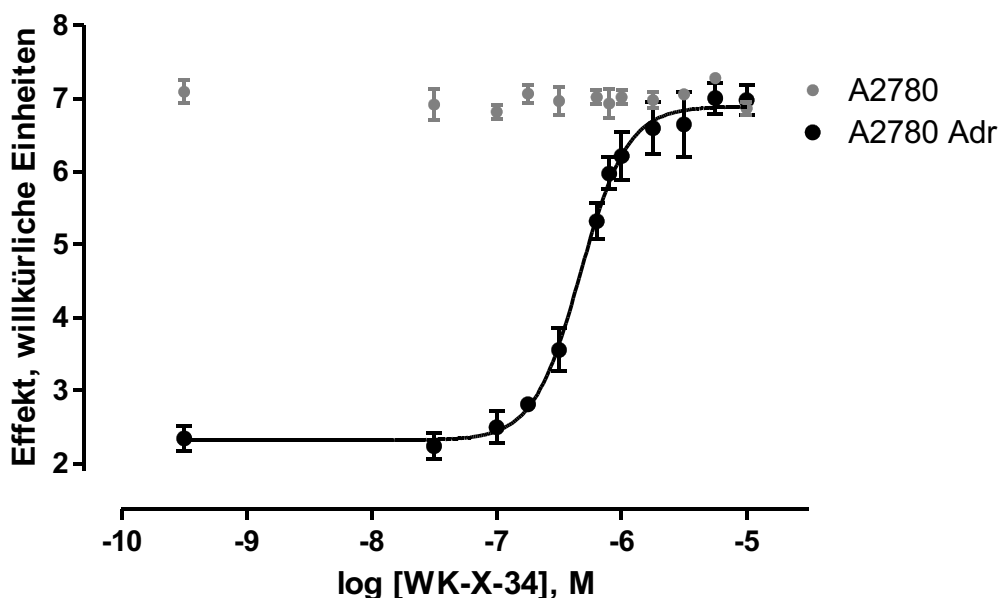


Abb. 3.24: Konzentrations-Effektkurve des Modulators WK-X-34 aufgenommen an A2780 Adr Zellen (schwarze Symbole) mit Hilfe des Calcein AM Assays. Graue Symbole beziehen sich auf A2780 Zellen.

Die einzelnen Schritte der Auswertung, wie die Subtraktion der „Background“-Fluoreszenzwerte und die Bestimmung der Steigung der einzelnen Fluoreszenz-Zeitgeraden wurden im Hinblick der Entwicklung eines HTS-fähigen Assays automatisiert und mit Hilfe des in Kap.2.13 beschriebenen Programms filfit realisiert, das gleichzeitig die Generierung der Konzentrations-Effektkurven ermöglichte.

In der folgenden Abb. 3.25 sind A2780 Adr Zellen zu erkennen, die einerseits mit dem Modulator Verapamil (100 $\mu\text{mol/l}$) vorinkubiert wurden (rechter Teil) und andererseits nicht mit

einem Modulator versehen wurden (linker Teil). Anschließend wurden beide Proben für 40 min mit Calcein AM versetzt. Nach der 40 min Inkubationsphase mit Calcein AM wurden die Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops betrachtet. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass die mit Modulator versehenen Zellen eine viel größere Fluoreszenzintensität aufweisen. Der Modulator Verapamil ruft in dieser Konzentration eine vollständige Hemmung von P-gp hervor. Dies verursacht eine verstärkte Akkumulation von Calcein AM und damit auch von Calcein, was die erhöhte Fluoreszenzintensität erklärt.

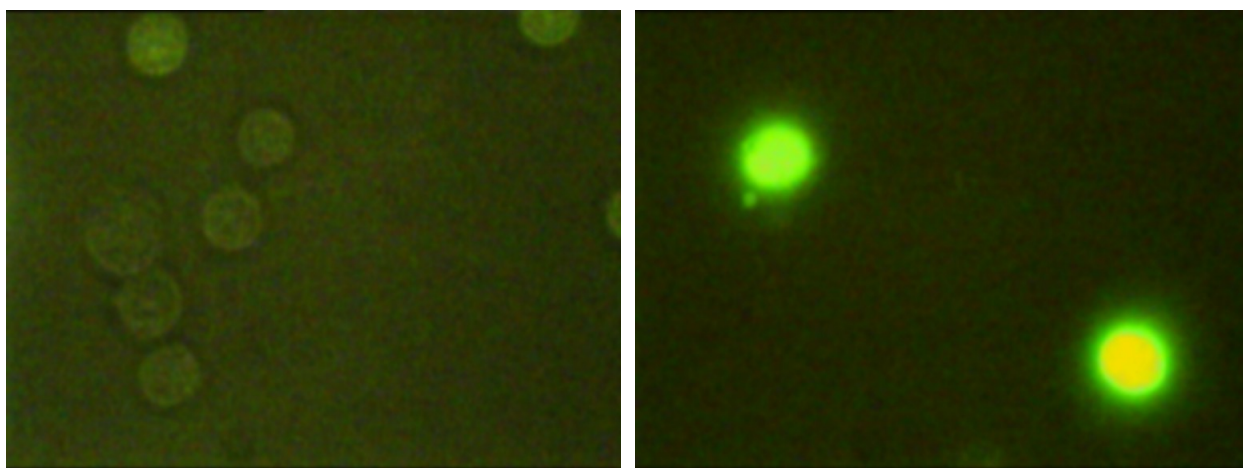


Abb. 3.25: A2780 Adr Zellen, die mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops mit FITC-Filter betrachtet wurden (links A2780 Adr Zellen ohne Verapamil, rechts A2780 Adr Zellen mit Verapamil (100 $\mu\text{mol/l}$)).

3.3.5 Beeinflussen andere ABC-Transporter wie MRP1 oder BCRP die mit Hilfe des Calcein AM Assays generierten Ergebnisse in A2780 Adr Zellen?

Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt war mit der Frage verbunden, ob das intrazellulär gebildete Calcein möglicherweise aktiv aus den resistenten Zellen herausgeschleust würde. Ein aktiver Efflux von Calcein hätte auf die Anwesenheit von MRP1 zurückgeführt werden können.^{137,176} Wird Calcein aus den Zellen in den Extrazellulärraum transportiert, ändert sich die gemessene Gesamtfluoreszenz nicht. Um eine mögliche Anwesenheit von MRP1 in A2780 Adr Zellen zu überprüfen, wurden Cobaltionen als extrazelluläre Quencher eingesetzt. In der folgenden Abb. 3.26 ist das Quenching der Calceinfluoreszenz durch Cobaltionen illustriert (Versuch ohne Zellen).

Aus der in Abb. 3.26 dargestellten Konzentrations-Wirkungskurve geht hervor, dass ab ei-

ner Konzentration von $> 0,3 \mu\text{mol/l Co}^{2+}$ die Calceinfluoreszenz signifikant verringert wird. Eine vollständige Löschung der Calceinfluoreszenz ist ab einer Co^{2+} -Konzentration von etwa $10 \mu\text{mol/l}$ erreicht.

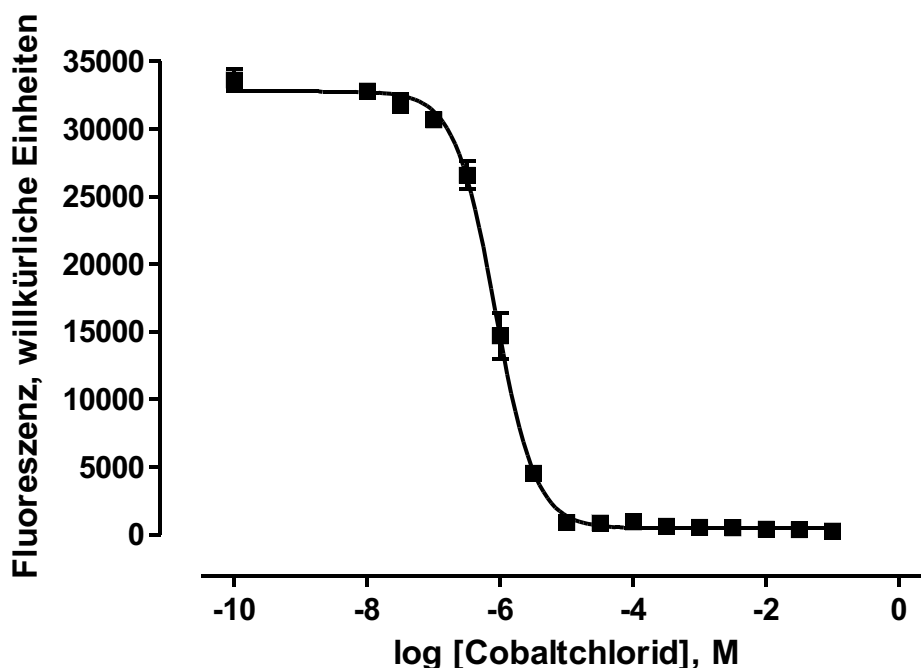


Abb. 3.26: Beeinflussung der Calceinfluoreszenz: Konzentrations-Effektkurve von Cobaltchlorid in KHP: $pIC_{50} = 6,08 \pm 0,02$, $n_H = 1,44 \pm 0,08$.

Aufgrund ihrer Ladung verbleiben Co^{2+} -Ionen vornehmlich im Extrazellulärraum. Bei der Durchführung dieses Experiments wurde die gleiche Calceinkonzentration verwendet, wie sie innerhalb des Calcein AM Assays an Calcein AM eingesetzt wurde (vergl. Kap.2.13).

In Abb. 3.27 ist der Vergleich von zwei Konzentrations-Effektkurven von Verapamil wiedergegeben, die in Gegenwart (gefüllte Kreise) und in Abwesenheit von $1 \mu\text{mol/l Co}^{2+}$ -Ionen (nicht gefüllte Kreise) aufgenommen wurden. Beide Konzentrations-Effektkurven unterscheiden sich nicht hinsichtlich ihrer Bottom-, Top- und pIC_{50} -Werte sowie ihrer Hillkoeffizienten. Aus diesem Ergebnis konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass kein aktiver Efflux von Calcein aus den Zellen erfolgte. Somit wurde auf funktioneller Ebene ein wichtiger Hinweis erbracht, dass MRP1 in den in dieser Arbeit untersuchten A2780 Adr Zellen nicht in nennenswerter Form vorhanden war.

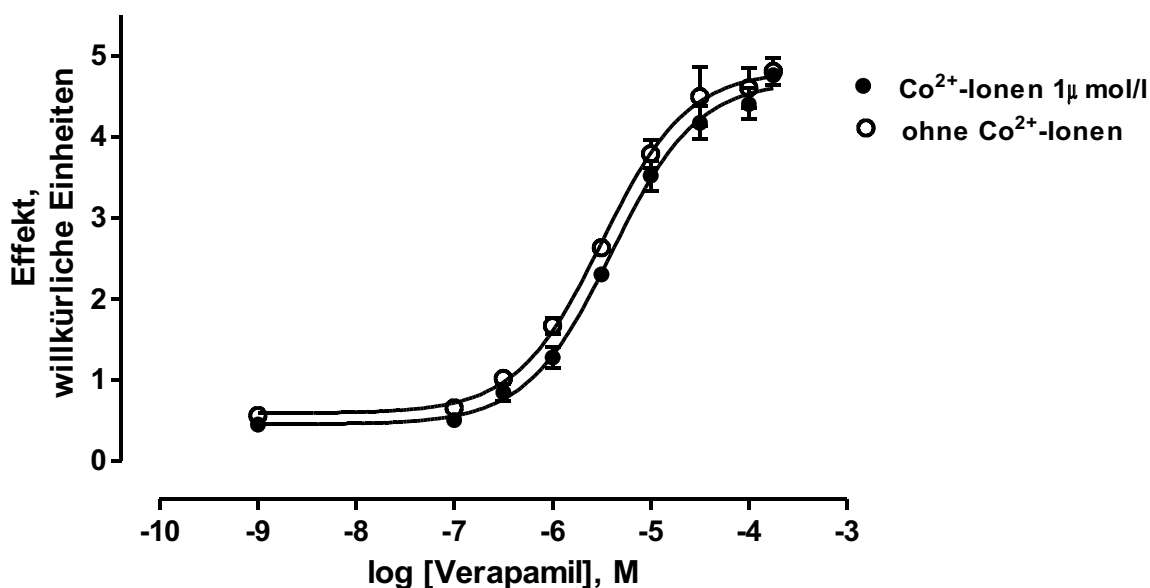


Abb. 3.27: Konzentrations-Effektkurven von Verapamil in Anwesenheit (gefüllte Symbole) und Abwesenheit von 1 µmol/l Co²⁺-Ionen (nicht gefüllte Symbole): $pIC_{50} = 5,40 \pm 0,10$, $pIC_{50} = 5,50 \pm 0,12$ (Calcein AM Assay, A2780 Adr Zellen). Der Hillkoeffizient wurde auf 1,0 fixiert.

Bei der Untersuchung der bekannten MRP1 Modulatoren Indometacin und Probenecid¹⁷⁷ mit Hilfe des Calcein AM Assays konnte bis zu einer Konzentration von 100 µmol/l kein nennenswerter Effekt festgestellt werden, wie Abb. 3.28 veranschaulicht.

In dieser Abb. sind die Fluoreszenz-Zeitgeraden der MRP1 Modulatoren Indometacin und Probenecid wiedergegeben. Diese differieren kaum von dem Fluoreszenz-Zeitverlauf, der sich auf Puffer (KHP) bezieht. Erwähnt sei, dass MRP1 in der Lage ist, sowohl Calcein als auch Calcein AM aus den Zellen herauszuschleusen. In diesem Experiment war eine Unterscheidung der extra- und intrazellulären Calcein-Fluoreszenz nicht möglich, da die Gesamtfluoreszenz detektiert wurde. In Gegenwart von MRP1 hätten die beiden MRP1-spezifischen Modulatoren Indometacin und Probenecid zu einer nennenswerten Erhöhung der Calcein-Fluoreszenz führen müssen, wenn man annimmt, dass die Modulatoren den Efflux von Calcein AM vermindern. Der fehlende Effekt dieser Modulatoren war ein weiterer Beleg dafür, dass MRP1 in den innerhalb dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten A2780 Adr Zellen keine nennenswerte Rolle spielte bzw. nicht vorhanden war.

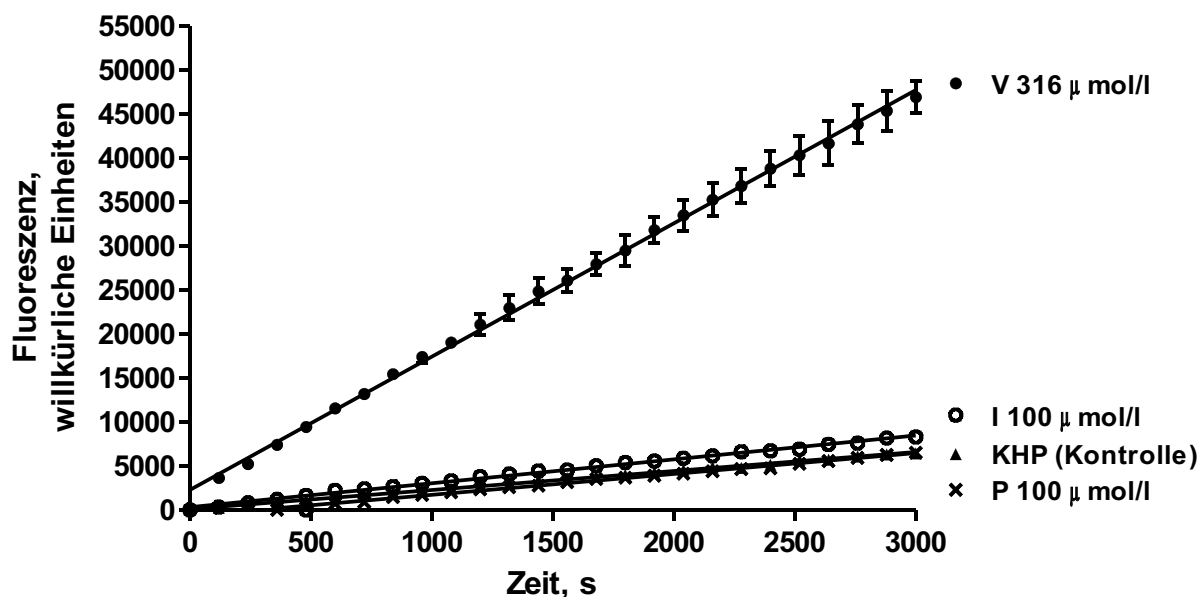


Abb. 3.28: Fluoreszenz-Zeitverläufe für A2780 Adr Zellen, die mit 100 µmol/l Indometacin (nicht gefüllte Kreise), 100 µmol/l Probenecid (Kreuze), 316 µmol/l Verapamil (gefüllte Kreise) und KHP (schwarze Dreiecke) versetzt wurden (Calcein AM Assay).

Zusätzlich konnte auch aus diesen Ergebnissen die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Probenecid und Indometacin keine (ausgeprägte) Affinität zu P-gp besitzen. Beide Verbindungen liegen unter physiologischen Bedingungen nahezu vollständig in deprotonierter Form vor (ACD-Berechnungen: Probenecid $pK_A = 3,69$, Indometacin $pK_A = 4,18$). Die Wechselwirkung von anionischen Verbindungen mit P-gp stünde im Widerspruch zu der allgemeinen Vorstellung, dass als Voraussetzung für die Interaktion mit P-gp lipophile bzw. kationisch amphiphile Eigenschaften notwendig sind.^{14,15}

Neben den beiden MRP1 Modulatoren wurde Novobiocin, ein aus der Literatur bekannter selektiver BCRP Modulator¹⁷⁸, bis zu einer Konzentration von 316 µmol/l mit Hilfe des Calcein AM Assays an A2780 Adr Zellen getestet (s. Abb. 3.29).

Anhand von Abb. 3.29 kann lediglich die Erkenntnis gewonnen werden, dass Novobiocin nicht mit P-gp zu interagieren vermag. Mit Hilfe dieses Experiments konnte aber nicht die Frage beantwortet werden, ob BCRP in A2780 Adr Zellen vorkommt. Wie spätere Ausführungen zeigen, stellt Calcein AM nämlich kein BCRP Substrat dar (vergl. Kap. 5.2).

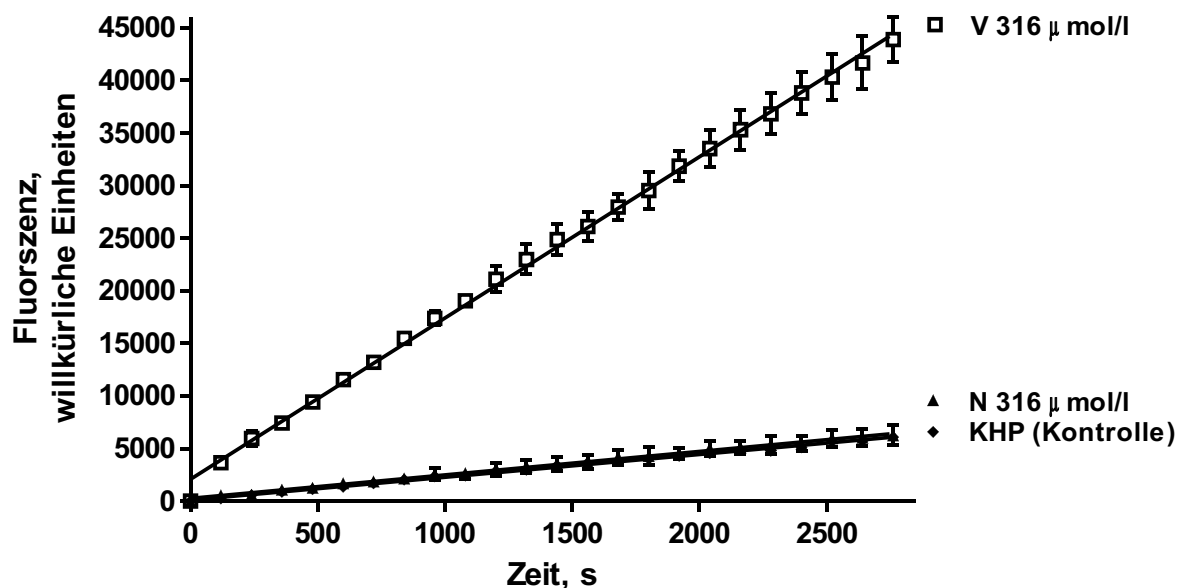


Abb. 3.29: Fluoreszenz-Zeitverläufe für die Zelllinie A2780 Adr. Die Zellen wurden mit $316 \mu\text{mol/l}$ Novobiocin (Dreiecke), $316 \mu\text{mol/l}$ Verapamil (Vierecke) und KHP (Rauten) versetzt (Calcein AM Assay).

3.3.6 Einfluß der Temperatur auf den Calcein AM Assay

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Experimente fanden unter physiologischen Bedingungen bei 37°C statt. Die folgende Abb. 3.30 zeigt einen Vergleich von zwei Konzentrations-Wirkungskurven von Verapamil, die bei 37°C und bei 26°C generiert wurden. Die bei 26°C aufgenommene Konzentrations-Effektcurve (gefüllte Symbole) ist gegenüber der bei 37°C (nicht gefüllte Symbole) ermittelten Konzentrations-Effektcurve parallel nach links verschoben (26°C : $\text{pIC}_{50} = 6,08 \pm 0,03$ / 37°C : $\text{pIC}_{50} = 5,37 \pm 0,08$), Der Hillkoeffizient wurde auf 1,0 fixiert. Bottom- und Topwerte sowie die Hillkoeffizienten der beiden sigmoidal verlaufenden Kurven differieren nicht. Die Ursache für die parallele Linksverschiebung der bei 26°C aufgenommenen Kurve könnte möglicherweise in einer veränderten Interaktion des Modulators mit P-gp begründet sein.

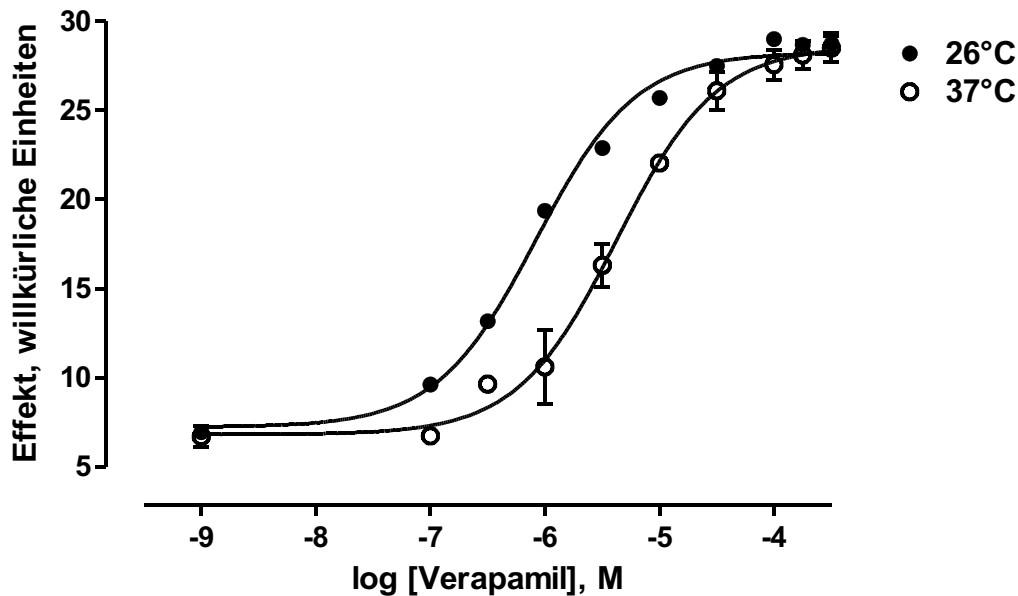


Abb. 3.30: Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurven von Verapamil bei 26°C ($pIC_{50} = 6,08 \pm 0,03$) und 37°C ($pIC_{50} = 5,37 \pm 0,08$), die mit dem Calcein AM Assay an A2780 Adr Zellen generiert wurden ($n_H = 1,0$).

Im Folgenden sind einige Parameter aufgeführt, die die Bedeutung einer temperaturkonstanten Messung veranschaulichen sollen:

- Die innerhalb des Calcein AM Assays stattfindende Umwandlung von Calcein AM zum fluoreszierendem Calcein erfolgt durch Esterasen, die als Enzyme ein Temperaturoptimum besitzen.
- P-gp besitzt ATPase-Aktivität und kann nach Stein et al. selbst als Enzym verstanden werden.¹⁷⁹ Die für den Transport von Substanzen notwendige Energie wird durch die Hydrolyse von ATP generiert.
- P-gp unterliegt während des Transportprozesses einer Konformationsänderung, die nach Al-Shawi et al. als ein Übergang von einer high-affinity- zu einer low-affinity-Konformation angesehen werden kann.⁶⁷ Die einzelnen transmembranären Domänen zeichnen sich dabei durch eine gewisse bzw. hohe Flexibilität aus, die auch durch das Phänomen des „Substrate-induced fit“ beschrieben werden kann.⁸⁶ Dabei wirkt eine Verringerung der Temperatur der Flexibilität der transmembranären Domänen entgegen und kann somit den Konformationswandel beeinflussen.

- Die Fluidität der Membran wird durch die Temperatur beeinflusst. Sie kann bei tieferen Temperaturen einen gelförmigen, flüssigkristallinen Zustand annehmen. Die Fluidität geht dabei verloren und kann einerseits die Flexibilität von P-gp herabsetzen, andererseits auch den Weg der Modulatoren in die Bindungstasche bzw. den Diffusionsprozess der Substanzen beeinflussen.²⁰⁶

Das in Abb. 3.30 dargestellte Experiment sowie die hier erläuterten, temperaturabhängigen Parameter machen deutlich, dass eine Veränderung/Absenkung der Temperatur die Ergebnisse massiv beeinflussen könnte. Deshalb wurden die Experimente bei einer definierten Temperatur durchgeführt.

3.3.7 Bedeutung des Gainwertes - Verstärkung der Fluoreszenz

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde der Gainwert (dieser Wert reguliert die Sensitivität des Photomultipliers) auf einen bestimmten Wert fixiert.

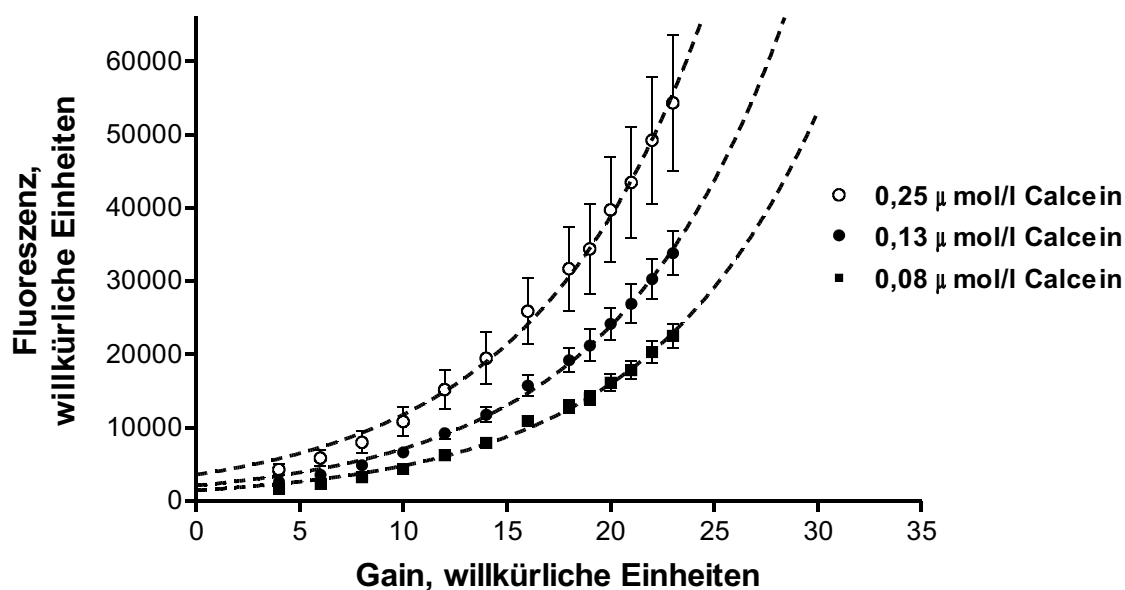


Abb. 3.31: Zusammenhang zwischen dem Gainwert und der Calceinfluoreszenz (Versuch ohne Zellen in KHP).

Wie Abb. 3.31 illustriert, bewirkt eine Erhöhung des Gainwertes eine exponentielle Zunahme der Fluoreszenzwerte. Aufgrund des nicht-linearen Zusammenhangs zwischen Fluoreszenz und Gainwert...

reszenz und Gainwert musste dieser Wert genau definiert und durfte dann nicht mehr verändert werden, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

3.4 Untersuchungen von P-gp Substraten und Modulatoren der ersten Generation mit Hilfe des Calcein AM Assays

Nach Abschluss der Etablierung und Weiterentwicklung des Calcein AM Assays konnte mit Hilfe dieses Testsystems eine Vielzahl von Verbindungen untersucht werden.

Tabelle 3.7: Verbindungen, die mit Hilfe des Calcein AM Assays untersucht wurden: Die gemittelten pIC_{50} -Werte und Hillkoeffizienten beziehen sich auf mindestens drei unabhängige Experimente. k.E.: kein Effekt bis 300 $\mu\text{mol/l}$. Der Hillkoeffizient wurde auf 1,00 fixiert, wenn mittels F-Test nachgewiesen werden konnte, dass die 3-Parameter logistisch Gleichung der 4-Parameter logistischen Gleichung vorzuziehen ist.

Verbindung	$pIC_{50} \pm SD$	$n_H \pm SD$
Chinin	4,92 \pm 0,26	0,70 \pm 0,12
Chlorpromazin	4,68 \pm 0,12	1,57 \pm 0,23
Chlorprothixen	4,95 \pm 0,10	1,77 \pm 0,62
cis-Flupentixol	5,41 \pm 0,14	1,74 \pm 0,25
Cisplatin	k.E.	-
Clozapin	4,54 \pm 0,18	1,63 \pm 0,49
Cyclosporin A	5,85 \pm 0,09	3,63 \pm 1,08
Diltiazem	4,37 \pm 0,24	1,00
Docetaxel	4,31 \pm 0,06	0,55 \pm 0,16
Etoposid	3,93 \pm 0,06	0,57 \pm 0,19
Fluphenazin	5,26 \pm 0,16	1,66 \pm 0,30
Gallopamil	5,27 \pm 0,18	0,72 \pm 0,16
Imatinib	5,18 \pm 0,27	1,00
Irinotecan	4,44 \pm 0,15	1,52 \pm 0,33
Ketoconazol	4,71 \pm 0,10	0,49 \pm 0,06
Nicardipin	5,32 \pm 0,13	2,44 \pm 0,25
Oxaliplatin	k.E.	-
Prazosin	3,98 \pm 0,24	1,54 \pm 0,30
Progesteron	4,22 \pm 0,21	1,30 \pm 0,16
Promethazin	4,67 \pm 0,31	1,16 \pm 0,11
Reserpin	5,49 \pm 0,19	1,88 \pm 0,32
Terfenadin	5,39 \pm 0,23	1,00
Trifluoperazin	5,20 \pm 0,11	1,71 \pm 0,29
Verapamil	5,27 \pm 0,22	1,00
Vinblastin	4,98 \pm 0,09	2,06 \pm 0,20

Tabelle 3.7 umfasst neben Modulatoren der 1. Generation auch P-gp Substrate wie Doce-taxel, Etoposid, Vinblastin und Verbindungen, die nicht mit P-gp interagieren. Cisplatin und Oxaliplatin führten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des MTT Assays (vergl. Kap. 3.1) zu keiner signifikanten Inhibition von P-gp. Beide Platinderivate interagieren demnach nicht mit P-gp. Wie Tabelle 3.7 verdeutlicht, werden die unterschiedlichsten Verbindungen von P-gp erkannt.

Tiberghien et al. untersuchten mit einem Standard Calcein AM Assay verschiedene Substanzen.¹³⁶ Unabhängig davon, ob man die von Tiberghien et al. bestimmten pIC_{50} -Werte oder die in dieser Arbeit (Tabelle 3.7) ermittelten Aktivitätsdaten verwendet, resultiert die gleiche Reihenfolge der biologischen Wirksamkeit für die folgenden Verbindungen: Etoposid < Vinblastin < Verapamil < Cyclosporin A.

Cyclosporin A ist unter den Substanzen von Tabelle 3.7 die potenteste Verbindung ($pIC_{50} = 5,85 \pm 0,09$). Eine Unterscheidung von Substraten wie Vinblastin oder Etoposid von P-gp Modulatoren ist mit Hilfe des Calcein AM Assays nicht möglich. Sowohl Modulatoren als auch Substrate führen zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Fluoreszenz. Für eine eindeutige Klassifizierung einer Substanz als P-gp Substrat müsste diese nach Polli et al. nicht nur im Calcein AM Assay eine Inhibition der P-gp Funktion hervorrufen, sondern gleichzeitig eine im ATPase Assay feststellbare signifikante Stimulation zeigen. Daneben müsste mit Hilfe eines weiteren Assays belegt werden, dass die Verbindung von P-gp transportiert wird.³⁵

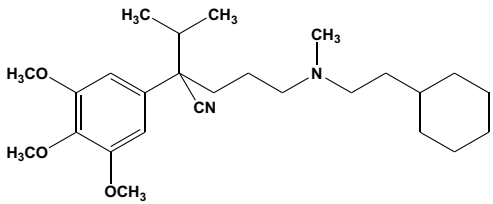
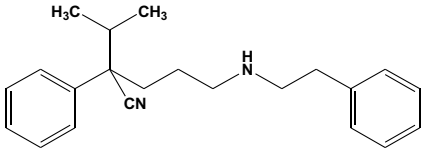
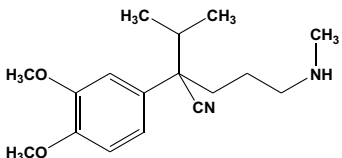
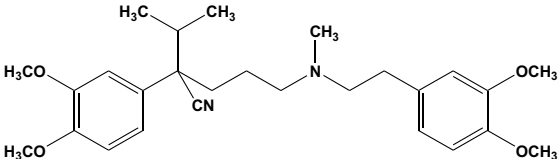
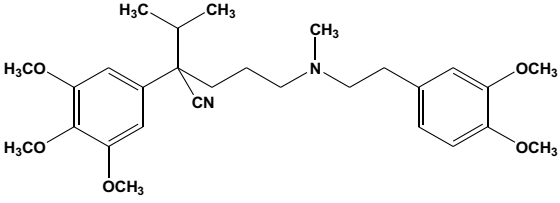
Vergleicht man die pIC_{50} -Werte der Phenothiazine Trifluoperazin bzw. Fluphenazin mit Chlorpromazin, so wird in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Ramu et al. offensichtlich, dass die Einführung eines zusätzlichen basischen Stickstoffs in Form des Piperazinrings zu einer signifikanten Verstärkung der Inhibition der P-gp Funktion führt.¹⁸⁰ Bei Betrachtung der pIC_{50} -Werte von Chlorpromazin ($4,68 \pm 0,16$) und Chlorprothixen ($4,95 \pm 0,10$) fällt auf, dass die im Chlorprothixenmolekül enthaltene Doppelbindung eine Erhöhung des pIC_{50} -Wertes (gegenüber Chlorpromazin) bewirkt. Die beiden Verbindungen Fluphenazin ($pIC_{50} = 5,26 \pm 0,16$) und cis-Flupentixol ($pIC_{50} = 5,41 \pm 0,14$) differieren ebenfalls nur durch die im Seitenkettenlinker lokalisierte Doppelbindung. Wiederum scheint die Doppelbindung zu einer besseren Inhibition von P-gp beizutragen, auch wenn aufgrund der Standardabweichungen der pIC_{50} -Werte der Unterschied statistisch nicht signifikant ist. Imatinib stellt einen Tyrosinkinaseinhibitor dar.¹⁸¹ Aufgrund des mit Hilfe des Calcein AM

3 Ergebnisse und Diskussion

Assays bestimmten pIC_{50} -Wertes ist es nicht möglich vorherzusagen, ob diese Verbindung mit den innerhalb der Plasmamembran lokalisierten Bindungsstellen in Wechselwirkung tritt oder (bzw. und) mit den NBDs interagiert.

Neben den in Tabelle 3.7 aufgeführten Substanzen wurden die in Tabelle 3.8 enthaltenen Verbindungen mit Hilfe des Calcein AM Assays analysiert. Diese Substanzen stellen Verapamil-Analoga dar.

Tabelle 3.8: Strukturen von Verapamil und Verapamil-Analoga. Die pIC_{50} -Werte und Hillkoeffizienten wurden mit Hilfe des Calcein AM Assays an A2780 Adr Zellen bestimmt ($n \geq 3$). Die $\log P$ -Werte wurden mittels ACD berechnet.

Substanz	$pIC_{50} \pm SD$	$n_H \pm SD$	$\log P \pm SD$
 <p>LU49667</p>	5,15 ± 0,06	1,00	5,92 ± 0,38
 <p>LU45336</p>	5,10 ± 0,05	1,00	4,55 ± 0,51
 <p>LU50476</p>	3,26 ± 0,09	1,00	2,26 ± 0,53
 <p>Verapamil</p>	5,27 ± 0,2	1,00	4,99 ± 0,42
 <p>Gallopamil</p>	5,29 ± 0,14	1,00	4,61 ± 0,44

Um einen besseren Eindruck über die strukturellen Charakteristika der Verapamil-Analoga zu gewinnen, sind die Strukturen von Verapamil und Gallopamil ebenfalls in Tabelle 3.8 abgebildet. Darüberhinaus sind die berechneten logP-Werte in Tabelle 3.8 zusammengestellt. Wie anhand des pIC₅₀-Wertes der Substanz LU50476 offensichtlich wird, ruft der Verlust einer der beiden Phenylreste eine deutlichen Verringerung der Aktivität hervor. LU50476 ist etwa um den Faktor 100 schlechter wirksam als Verapamil. Mehrere Ursachen könnten für die schlechtere Inhibition von P-gp in Frage kommen: (i) Verapamil besitzt einen berechneten logP-Wert von $4,91 \pm 0,42$, während der logP-Wert von LU50476 nur $2,26 \pm 0,53$ beträgt. Damit ist die Einlagerung von LU50476 in die Membran herabgesetzt. (ii) LU50476 ist viel kleiner, das Molekulargewicht beläuft sich nur noch auf 290,4 g/M (Verapamil: 454,6 g/M). LU50476 erfüllt damit weniger die in der Literatur beschriebenen Voraussetzungen für die Interaktion mit P-gp (Molekulargewicht größer 300).^{14,15} Die Substanz LU45336 besitzt im Vergleich zu Verapamil keine Methoxyfunktionen an den aromatischen Ringsystemen, außerdem fehlt die am Stickstoffatom lokalisierte Methylgruppe. Die strukturellen Änderungen bewirken nur eine geringe Abnahme der biologischen Aktivität. Bei der Substanz LU49667 wurde einer der beiden 3,4-Dimethoxyphenylringe gegen einen Cyclohexanring ausgetauscht. Auch diese strukturelle Abwandlung führt im Vergleich zu Verapamil nur zu einer geringfügigen Verringerung des pIC₅₀-Wertes.

Für die bisher untersuchten Verbindungen ist mit Ausnahme von Imatinib die Hemmung von P-gp durch eine direkte Interaktion mit den Bindungsstellen wahrscheinlich. *Natriumazid* und *Natriumorthovanadat* inhibieren hingegen P-gp nicht über eine Wechselwirkung mit den Bindungsstellen.

Die durch *Natriumazid* hervorgerufene Inhibition von P-gp kann als sehr unspezifischer Hemmmechanismus angesehen werden. Der eigentliche Angriffspunkt von Natriumazid ist nicht P-gp, sondern die ATP Produktion im Allgemeinen. Natriumazid hemmt den Elektronenfluss in der Atmungskette. Die durch NADH (Nicotinamidadenindinucleotid), FADH₂ (Flavinadenindinucleotid) und FMNH₂ (Flavinmononucleotid) angelieferten Reduktionsäquivalente können nicht mehr dazu genutzt werden, um aus ADP und freiem Phosphat ATP zu erzeugen.^{182,183} Damit steht in den Zellen nicht mehr der eigentliche Energieträger

ATP zur Verfügung, folglich kann auch P-gp seine ATP-abhängige Transportfunktion nicht mehr ausüben.

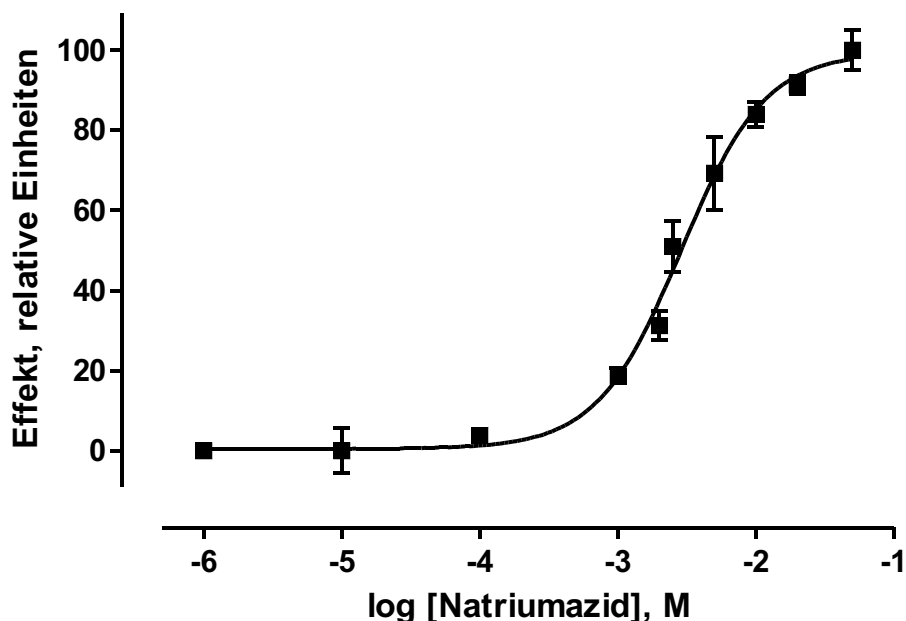


Abb. 3.32: Calcein AM Assay, A2780 Adr Zellen: Konzentrations-Wirkungskurve von Natriumazid: $pIC_{50} = 2,54 \pm 0,05$, $n_H = 1,43 \pm 0,24$.

Somit resultiert der in Abb. 3.32 zu erkennende, durch Natriumazid hervorgerufene, konzentrationsabhängige Anstieg der Calceinfluoreszenz. Abb. 3.32 stellt ein typisches Beispiel von drei unabhängigen Experimenten dar. Der mittlere pIC_{50} -Wert beträgt $2,48 \pm 0,15$ ($n_H = 1,51 \pm 0,31$).

Natriumorthovanadat lagert sich an das nach der Hydrolyse von ATP entstandene ADP an und hemmt so dessen Freisetzung. Damit bleibt ein Vanadat-gebundener Übergangszustand bestehen, der es P-gp nicht mehr erlaubt, in seinen Grundzustand zurückzukehren. Die Bindung von Vanadat an ADP ist nicht irreversibel, aber die Freisetzung von Vanadat aus dem ADP-Vanadat-Komplex heraus verläuft nur sehr langsam, wie Senior et al. herausfanden.^{184,185,186} Der Transportprozess kommt somit zum Erliegen. Die Hemmung der P-gp Funktion mittels Vanadat kann im Gegensatz zu Natriumazid als eher spezifisch angesehen werden. Das bedeutet aber nicht, dass dieser Inhibitionsweg nur in Gegenwart von P-gp zur Entfaltung kommt. Wie spätere Ausführungen zeigen, können auch andere ABC-Transportproteine wie BCRP in ihrer Funktion durch Natriumorthovanadat gehemmt werden.

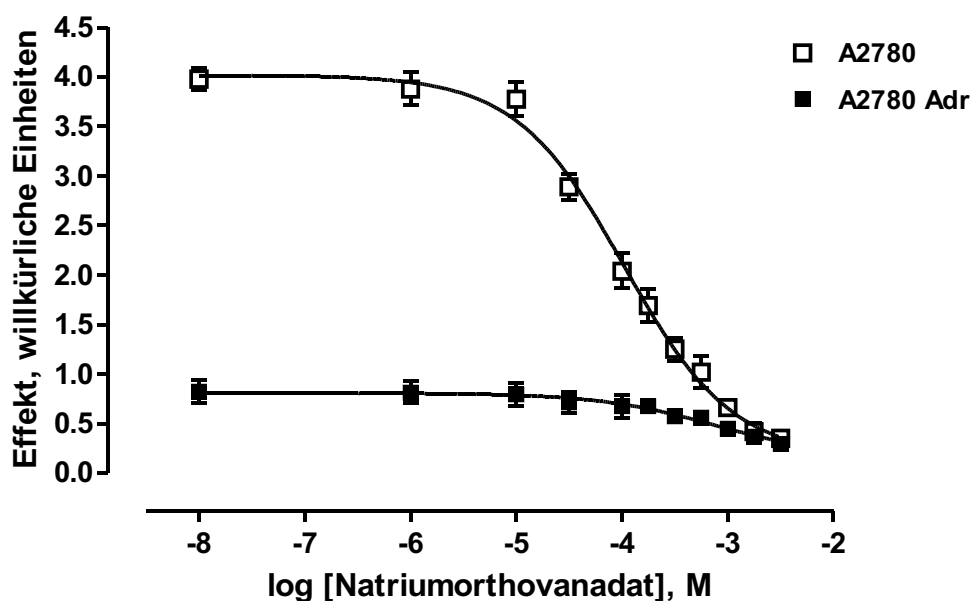


Abb. 3.33: Calcein AM Assay, Konzentrations-Effektkurve für A2780 Adr und A2780 Zellen für die Substanz Natriumorthovanadat: pIC_{50} (Adr) = $3,34 \pm 0,05$, $n_H = 1,00 \pm 0,11$, pIC_{50} (sens) = $4,05 \pm 0,02$, $n_H = 1,20 \pm 0,08$.

Natriumorthovanadat sollte in Analogie zu Natriumazid im Calcein AM Assay zu einer signifikanten Erhöhung der Calceinfloureszenz führen. In Abb. 3.33 ist aber zu erkennen, dass die Konzentrations-Effektkurven abfallen.

Die Ursache für die Abnahme der Fluoreszenz liegt in einer durch Natriumorthovanadat hervorgerufenen Löschung der Calceinfloureszenz, was durch entsprechende Kontrollexperimente nachgewiesen werden konnte (Calcein + ansteigende Konzentrationen Natriumorthovanadat). Da in A2780 Zellen (nicht gefüllte Vierecke) P-gp nicht vorkommt und Calcein deshalb schneller akkumulieren kann, wirkt sich die Fluoreszenzlöschung im Vergleich zu A2780 Adr Zellen (gefüllte Vierecke) stärker aus. Während die Top-Werte der beiden in Abb. 3.33 dargestellten Konzentrations-Effektkurven stark differieren (A2780: 4,0 / A2780 Adr: 0,81), sind die Bottom-Werte nahezu identisch (A2780: 0,2 / A2780 Adr: 0,16).

3.5 Funktionelle und 3D-QSAR Untersuchungen von Phenothiazinen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden u.a. 21 Phenothiazine mit Hilfe des Calcein AM Assays untersucht und deren pIC_{50} -Werte bestimmt. Diese Phenothiazine wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Matthias Schmidt (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie) zur Verfügung gestellt. Diese Verbindungen besitzen die beiden in Abb. 3.34 dargestellten Grundstrukturen. Dabei unterscheiden sich die beiden Grundstrukturen durch die Länge des Seitenkettenlinkers zwischen dem Phenothiazinringkörper und der Piperazinpartialstruktur. Während die links abgebildete Grundstruktur an vier Positionen variiert ist, besitzt die rechts in Abb. 3.34 wiedergegebene nur eine Position, die verschiedene Substituenten aufweist.

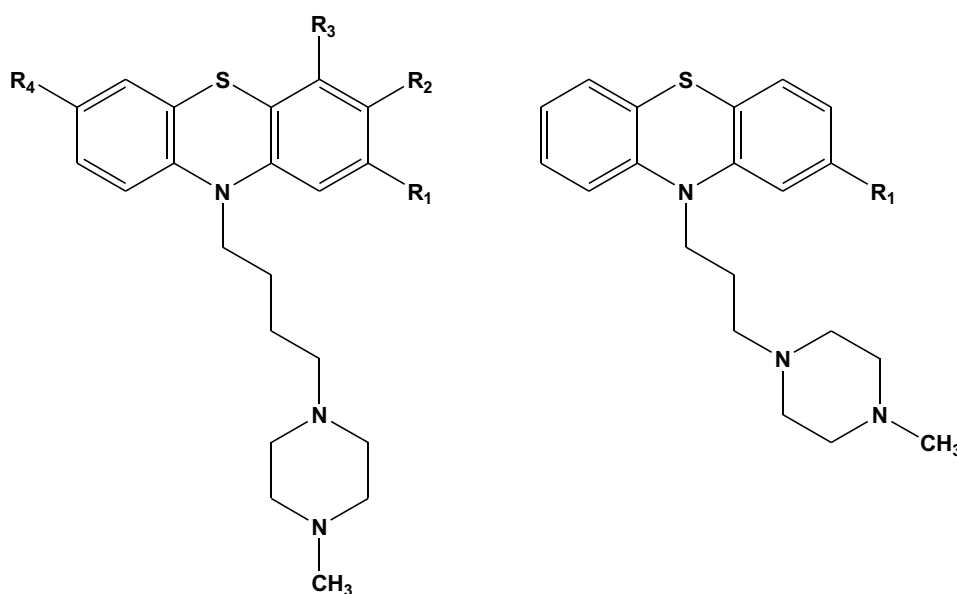


Abb. 3.34: Grundstrukturen der Phenothiazine, links ist die Variante mit C4- und rechts die Variante mit C3-Seitenkettenlinker dargestellt. Die Substituenten können in Position R_1 - R_4 angefügt sein.

Substanzen, die einen C3-Seitenkettenlinker besitzen, gehören zu den klassischen Phenothiazinen, die zur Behandlung der Schizophrenie eingesetzt werden. Eine Verlängerung der Seitenkette um ein C-Atom führt zu einer Verminderung der antipsychotischen Potenz. Die Einführung eines Piperazinringes, wie sie diesen Verbindungen gemeinsam ist, hat eine Steigerung der antipsychotischen Wirkung zu Folge. Phenothiazine besitzen im Vergleich zu den Butyrophenon-Derivaten wie Haloperidol eine weniger selektiv antagonis-

3 Ergebnisse und Diskussion

tische Wirkung an D₂-Rezeptoren.^{1,187} Die in der folgenden Tabelle 3.9 aufgeführten Modulatoren könnte man zum Teil als Modulatoren der zweiten Generation betrachten, da sie sich von einer bestehenden Strukturklasse ableiten.

Tabelle 3.9: Phenothiazine, deren strukturelle Charakteristika, pIC₅₀-Werte und Hillkoeffizienten. Die Verbindungen wurden an A2780 Adr Zellen mit Hilfe des Calcein AM Assays untersucht.

Substanz	C-Linker	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	pIC ₅₀ ± SD	n _H ± SD
H 1	4	-	CH ₃	-	-	4,31 ± 0,21	1,41 ± 0,27
H 2	4	-	C ₄ H ₉	-	-	4,73 ± 0,15	1,67 ± 0,23
H 3	4	SCH ₃	-	-	-	4,58 ± 0,07	1,54 ± 0,32
H 4	4	CF ₃	-	-	-	4,49 ± 0,06	1,39 ± 0,19
H 5	4	OCH ₃	-	-	-	4,29 ± 0,03	1,55 ± 0,27
H 6	4	-	OC ₄ H ₉	-	-	4,40 ± 0,04	1,37 ± 0,11
H 7	4	-	i-OC ₄ H ₉	-	-	4,44 ± 0,06	1,57 ± 0,32
H 8	4	-	phenyl	-	-	4,92 ± 0,04	1,58 ± 0,29
H 9	4	-	[c]-benz	[c]-benz	-	5,13 ± 0,23	1,64 ± 0,29
H 10	4	-	tert-butyl	-	tert-butyl	5,05 ± 0,13	1,61 ± 0,21
H 11	4	-	tert-butyl	-	-	4,49 ± 0,06	1,66 ± 0,13
H 12	4	COCH ₃	-	-	-	5,02 ± 0,16	1,44 ± 0,15
H 13	4	COC ₃ H ₇	-	-	-	5,39 ± 0,08	1,37 ± 0,23
H 14	4	COC ₂ H ₅	-	-	-	5,11 ± 0,20	1,55 ± 0,22
H 15	4	benzoyl	-	-	-	5,74 ± 0,11	1,72 ± 0,39
H 16	3	COCH ₃	-	-	-	5,34 ± 0,04	1,43 ± 0,28
H 17	3	COC ₃ H ₇	-	-	-	5,92 ± 0,26	1,61 ± 0,16
H 18	3	COC ₂ H ₅	-	-	-	5,63 ± 0,02	1,58 ± 0,16
H 19	3	benzoyl	-	-	-	6,15 ± 0,13	1,83 ± 0,52
H 20	3	CH ₃	-	-	-	5,32 ± 0,01	1,91 ± 0,32
H 21	3	CF ₃	-	-	-	5,21 ± 0,01	1,71 ± 0,29

Neben den strukturellen Parametern sind in der Tabelle 3.9 die Aktivitätswerte und Hillkoeffizienten der einzelnen Phenothiazine angegeben. Verbindung H 5 besitzt den geringsten pIC₅₀-Wert von 4,29 ± 0,03. Substanz H 19 inhibiert P-gp in wesentlich stärkerer Form, wie ihr pIC₅₀-Wert von 6,15 ± 0,13 dokumentiert.

In der folgenden Abb. 3.35 ist ein Vergleich von zwei Konzentration-Effektkurven der Substanzen H 3 und H 19 zu erkennen. Dabei ist ein deutlicher Unterschied der pIC_{50} -Werte feststellbar. Verbindung H 3 konnte nur bis zu einer Konzentration von 52 $\mu\text{mol/l}$ untersucht werden (limitierender Faktor: Toxizität des Lösungsmittels). Die höchste einsetzbare Konzentration führte aber nur zu einer etwa 80%igen Inhibition von P-gp. Das obere, maximale Plateau wurde innerhalb dieses Experiments durch H 19 definiert. Bei der Durchführung aller Phenothiazine-Experimente wurde ein interner Standard wie Verapamil eingesetzt, der eine vollständige Inhibition von P-gp hervorrief und mit dessen Hilfe das obere Plateau genau bestimmt werden konnte. Die Hillkoeffizienten der untersuchten Phenothiazine sind signifikant verschieden von 1, wie Tabelle 3.9 zu entnehmen ist. Die Hillkoeffizienten aller analysierten Phenothiazine sind näherungsweise identisch, was auf das Vorliegen eines gemeinsamen Wirkmechanismus hindeutet.

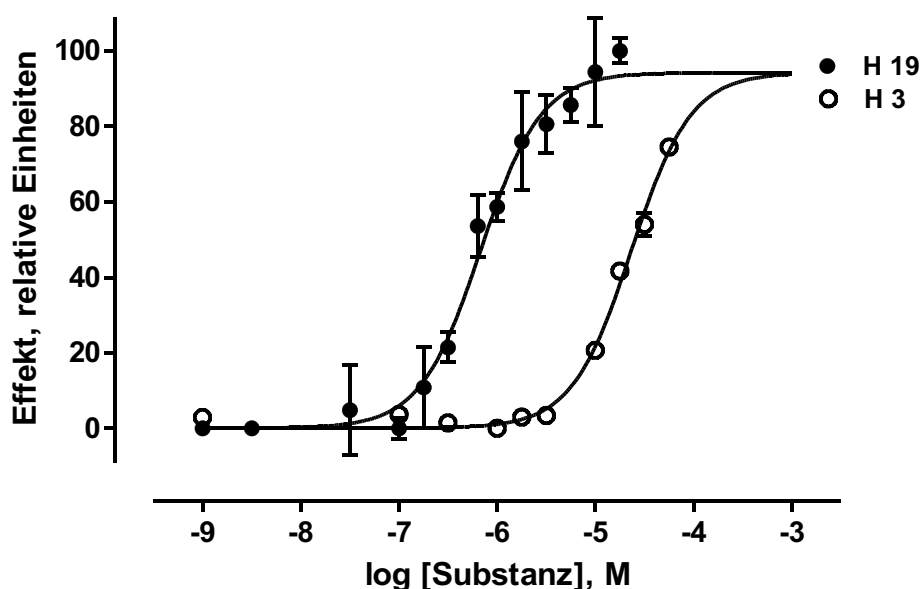


Abb. 3.35: Konzentrations-Effektkurven von H 3 und H 19, die mit Hilfe des Calcein AM Assays an A2780 Adr bestimmt wurden: H 19: $pIC_{50} = 6,17 \pm 0,05$, $n_H = 1,41 \pm 0,19$. H 3: $pIC_{50} = 4,63 \pm 0,01$, $n_H = 1,43 \pm 0,04$ (Beispiel für ein typisches Experiment von drei unabhängigen Experimenten).

Der deutliche, große Unterschied der pIC_{50} -Werte und die homogene Verteilung der Aktivitätswerte innerhalb des durch Verbindung H 5 und H 19 begrenzten Aktivitätsbereichs er-

möglichten eine Analyse mit Hilfe der 3D-QSAR Methoden CoMFA (**C**omparative **M**olecular **F**ield **A**nalysis) und CoMSIA (**C**omparative **M**olecular **S**imilarity **I**ndices **A**nalysis).¹⁸⁸

Im Folgenden sollen diesen beiden Verfahren kurz erläutert werden.

Bei der **CoMFA-Methode** werden die Moleküle in einem dreidimensionalen Gitter platziert. An den Schnittpunkten des Gitters sind sogenannte Sonden lokalisiert und die Wechselwirkungsenergien zwischen den Sonden und dem Molekül bestimmt. Die Wechselwirkungsenergie ist von der Art der Sonde abhängig, die Gesamtheit der Wechselwirkungsenergie wird als Feld bezeichnet.

Das Gitter weist in der Regel eine Maschenweite von 2 Å auf. Wird die Maschenweite vergrößert, verringert sich die Anzahl der Sonden und vermindert die Genauigkeit der Daten. Die zu bestimmende Wechselwirkungsenergie setzt sich unter Vernachlässigung des entropischen Anteils der Protein-Ligand-Bindungsenergie aus den beiden folgenden Parametern zusammen:

- Sterische Interaktionsenergie
- Elektrostatische Wechselwirkungsenergie

Die Entropie kann vernachlässigt werden, solange ähnliche Strukturen miteinander verglichen werden, da bei diesen der entropische Anteil etwa gleich groß ist. Die Bestimmung der *sterischen Felder* erfolgt in der Regel unter Einbeziehung eines sp³-hybridisierten C-Atoms als Sonde. Hierbei wird die van-der-Waals-Wechselwirkungsenergie zwischen den Sonden und den Atomen des Moleküls basierend auf dem Lennard-Jones-Potential berechnet. Das Lennard-Jones-Potential für den Gitterpunkt *j* ist wie folgt definiert:

$$E_{vdW} = \sum_{i=1}^n (A_{ij} \cdot r_{ij}^{-12} - C_{ij} \cdot r_{ij}^{-6}) \quad \text{Gleichung 3.5}$$

E_{vdW} gibt die Summe der van-der-Waals-Wechselwirkungsenergie an, r_{ij} steht für den Abstand zwischen der im Gitter platzierten Sonde *j* (bzw. Gitterpunkt *j*) und dem Atom *i* des Moleküls. A_{ij} und C_{ij} stellen Konstanten dar, die von den van-der-Waals-Radien der beteiligten Atome abhängen.

Betrachtet man den in Abb. 3.36 dargestellten Verlauf des Lennard-Jones-Potentials, wird deutlich, dass mit zunehmendem Abstand zwischen der Sonde und dem Interaktionspunkt die Wechselwirkungsenergie gegen 0 strebt. Positive Potentialwerte kommen einer Abstoßung der Teilchen gleich, negative Potentialwerte entsprechen der Anziehung der Teil-

chen. Die Annäherung der Teilchen führt dazu, dass das Potential ein Minimum erreicht. Dieses Energieminimum wird auf die gegenseitige Polarisierung der Teilchen zurückgeführt. Wird die Annäherung der Teilchen weiter fortgeführt, resultiert eine starke Abstoßung mit einer Vergrößerung des Potentials zu positiv unendlichen Werten. Der Feldbeitrag bei zu starker Annäherung der Teilchen muss durch den sogenannten „Cut-off“ (Grenzwert) limitiert werden.

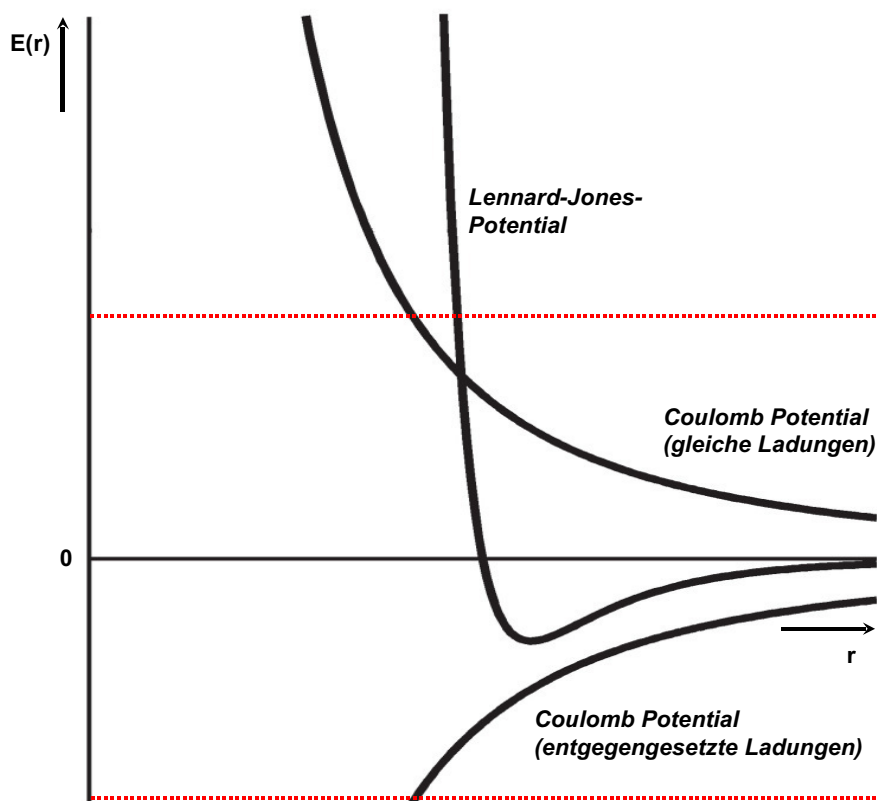


Abb. 3.36: CoMFA-Verfahren: Lennard-Jones- und Coulomb-Potential-Verlauf (Abb. modifiziert, in Anlehnung an Kubinyi et al.).¹⁹¹

Die *elektrostatische Wechselwirkungsenergie* kann mit Hilfe des Coulomb-Potentials E_C berechnet werden:

$$E_C = \sum_{i=1}^n \frac{q_i \cdot q_j}{D \cdot r_{ij}} \quad \text{Gleichung 3.6}$$

Die Ladung des Sondenatoms wird mit q_j angegeben, während q_i sich auf die Ladung eines Atoms i des Moleküls bezieht. Der Abstand zwischen den beiden geladenen Teilchen wird mit r_{ij} bezeichnet, D entspricht der Dielektrizitätskonstanten. Die Ladung der

Sonde beträgt üblicherweise +1 ($q_j = +1$). Damit ergeben sich für die Berechnung des Coulomb-Potentials zwei grundsätzliche Möglichkeiten: (i) Die Ladung eines Atoms des Moleküls ist positiv und damit stimmt das Vorzeichen mit der Ladung des Sondenatoms überein. Mit zunehmendem Abstand der Teilchen wird das Coulomb-Potential immer kleiner und nähert sich 0 an. Eine Verringerung des Abstands der Teilchen führt zu Potentialwerten, die ins positiv Unendliche streben. (ii) Die Ladung eines Atoms des Moleküls ist negativ und damit der Ladung der Sonde entgegengesetzt. Mit einer Vergrößerung des Abstandes der Teilchen werden die Potentialwerte größer und nähern sich 0 an. Bei einer Verringerung des Abstandes nehmen die Potentialwerte immer weiter ab und streben ins negativ Unendliche. Auch für die elektrostatischen Wechselwirkungskräfte wird durch die „Cut-offs“ der Feldbeitrag für sich stark abstoßende und extrem anziehende Teilchen limitiert. Vergleicht man die in Abb. 3.36 dargestellten Kurven, die das Lennard-Jones-Potential und das Coulomb-Potential beschreiben, so wird deutlich, dass die elektrostatischen Interaktionen aufgrund ihres flacheren, hyperbolischen Verlaufs im Unterschied zu den sterischen Wechselwirkungen auch Interaktionen mit weiter entfernten Teilchen zulassen.¹⁸⁹

Die **CoMSIA-Methode**, die von Klebe et al. bei der Firma BASF entwickelt wurde¹⁹⁰, betrachtet im Gegensatz zum CoMFA-Verfahren nicht die Unterschiede der Moleküle, sondern die relativen Ähnlichkeiten bzw. Gemeinsamkeiten der Verbindungen zueinander. In Analogie zur CoMFA-Methode werden die überlagerten Moleküle ebenfalls in einem dreidimensionalen Gitter platziert und deren Interaktion mit den an definierten Gitterpunkten fixierten Sonden ermittelt. In Abhängigkeit der eingesetzten Sonde werden verschiedene Moleküleigenschaften erfasst. Folgende Feldtypen stehen zur Verfügung: (1) Sterisch (s) (2) Elektrostatisch (e) (3) Hydrophob (h) (4) Wasserstoffbrückendonator (5) (e) Wasserstoffbrückenakzeptor (a). Die CoMSIA-Ähnlichkeitsindizes werden nach der folgenden Formel berechnet:

$$A_{F,k}^q = \sum_{i=1}^n w_{probe,k} w_{ik} e^{-ar^2_{iq}} \quad \text{Gleichung 3.7}$$

A steht für das Ähnlichkeitsmaß des Feldtyps F am Gitterpunkt q summiert über alle Atome i des Moleküls. Der Ausdruck $w_{probe,k}$ bezieht sich auf die Eigenschaften des Sonden-Atoms. Diese sind: Radius 1 Å, Hydrophobie +1, Ladung +1, WBB-Donor +1, WBB-Akzeptor +1 (WBB = **W**asserstoff**b**rücken**b**indungen). r_{iq} entspricht dem Abstand der Son-

de am Gitterpunkt q zum Atom i des Testmoleküls an. w_{ik} gibt den tatsächlichen Wert der Funktion k für das Atom i an. Fünf Funktionen k stehen zur Verfügung: WBB-Donor- und WBB-Akzeptor-Funktion, Sterische und Elektrostatische Wechselwirkungen, Hydrophobe Wechselwirkungen. α ist der sogenannte Abschwächungs- bzw. Dämpfungsfaktor. Je größer die Werte sind, die α annimmt, desto steiler wird die Gauß-Kurve (Abb. 3.37). Eine zu stark ausgeprägte Erhöhung der Steilheit der Gauß'schen Kurve führt dazu, dass der abstandsabhängige Effekt der molekularen Ähnlichkeit verloren geht.

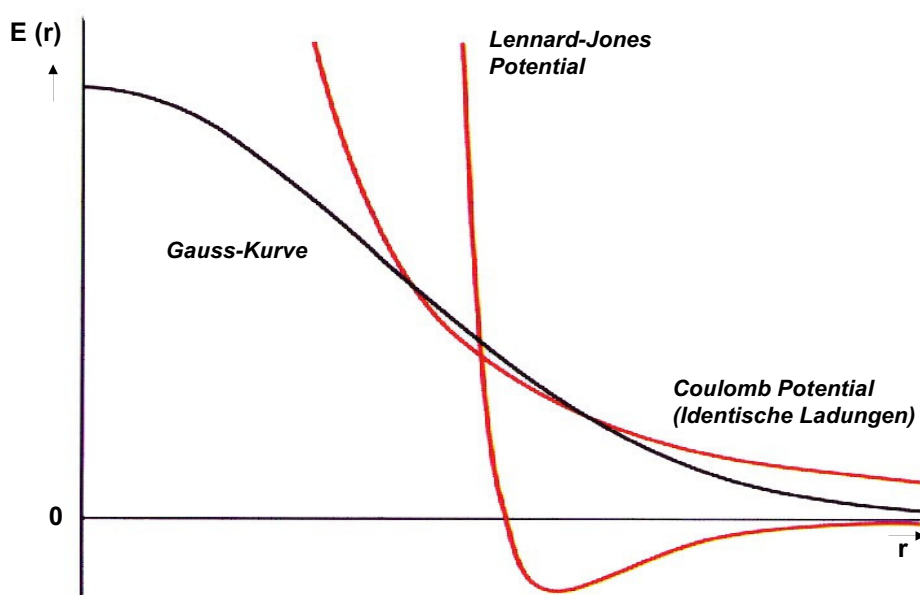


Abb. 3.37: Vergleich der Gauß'schen Abstandsfunktion der CoMSIA-Methode mit den Lennard-Jones- und Coulomb-Potentialen der CoMFA-Methode (rot) (Abb. modifiziert nach Kubinyi et al.).¹⁹¹

Vergleicht man die Gauß'sche Abstandsfunktion der CoMSIA-Methode mit dem Lennard-Jones- und dem Coulomb-Potential-Verlauf des CoMFA-Verfahrens, so wird offensichtlich, dass eine Verringerung des Abstands zwischen Sonde und Molekül bezogen auf die CoMSIA-Methode zu endlichen Energiewerten führt (Abb. 3.37). Grenzwerte (Cut-offs) sind nicht notwendig, da keine extremen Änderungen der Feldbeiträge wie bei der CoMFA zu erwarten sind. Interaktionen an oberflächennah gelegenen Gitterpunkten können auf diese Weise im Rahmen der CoMSIA-Methode miteinbezogen werden. Eine geringfügige Veränderung der Platzierung der Verbindung im Gitter bleibt ohne gravierenden Einfluss auf das Analyseergebnis.^{191,192}

Mit Hilfe der PLS-Analyse werden aus den biologischen Aktivitätsdaten (y-Variablen) und der Vielzahl der x-Variablen (unabhängige Variablen) sogenannte latente Variablen extrahiert. Diese latenten Variablen (Komponenten) sind voneinander unabhängig (stehen zueinander senkrecht). Sie erklären ein hohes Maß der Varianz aller x-Variablen, sind aber gleichzeitig mit den y-Variablen maximal korreliert.

Unterschiedliche **Validierungsmethoden** haben die Funktion die Signifikanz der erstellten Modelle zu prüfen:

Zu diesen Validierungsverfahren gehört die **Leave-One-Out-Methode (LOO-Methode)**. Eine Verbindung wird aus dem Datensatz entfernt und mit den übrigen Verbindungen wird ein Modell erstellt, mit dem der Aktivitätswert der eliminierten Substanz berechnet wird. Dieses Verfahren wird nacheinander auf alle Verbindungen des Datensatzes angewandt. Die Güte des Modells muss um so höher eingestuft werden, je besser die Verbindungen mit Hilfe der LOO-Methode vorhergesagt werden. Die LOO-Methode kann zu optimistische Ergebnisse liefern, wenn die ausgeschlossene Substanz zu einem Pool sehr ähnlicher Verbindungen gehört, die in ihren Deskriptor- und Aktivitätswerten nahezu übereinstimmen.

Die folgenden Parameter können zur Beurteilung der Güte des Modells eingesetzt werden: **Predictive Error Sum of Squares (PRESS)** gibt die Summe der Abweichungsquadrate zwischen den beobachteten (gemessenen) und den vorhergesagten Y-Werten an.

$$PRESS = \sum (Y_{beobachtet} - Y_{vorhergesagt})^2 \quad \text{Gleichung 3.8}$$

Die Standardabweichung der Vorhersage **Standard Deviation of Error of Prediction (SDEP)** schließt die Zahl der Substanzen n in die Berechnung mit ein.

$$SDEP = \sqrt{\frac{\sum (Y_{beobachtet} - Y_{vorhergesagt})^2}{n}} \quad \text{Gleichung 3.9}$$

In der nachfolgenden Gleichung wird neben der Anzahl der Substanzen n auch die Zahl der Komponenten c in die Standardabweichung der Vorhersage (SDEP) einbezogen und führt zur kreuzvalidierten Standardabweichung (**Standard deviation of Predictive Sum of Squares**) **S_{PRESS}**:

$$S_{PRESS} = \sqrt{\frac{\sum (Y_{beobachtet} - Y_{vorhergesagt})^2}{n - c - 1}} \quad \text{Gleichung 3.10}$$

Der q^2 -Wert, der quadrierte Korrelationskoeffizient der Vorhersage, ist ein Maß für die Vorhersagekraft eines Modells:

$$q^2 = 1 - \left[\frac{\sum (Y_{beobachtet} - Y_{vorhergesagt})^2}{\sum (Y_{beobachtet} - \bar{Y})^2} \right] \quad \text{Gleichung 3.11}$$

Der q^2 -Wert kann Werte zwischen $-\infty$ und $+1$ annehmen. Für den Fall, dass der q^2 den Wert 0 annimmt, bedeutet dies, dass die Vorhersage so gut wie der Mittelwert der biologischen Aktivitätsdaten ist. Die Vorhersagen der Aktivitätsdaten sind in diesem Fall nicht besser oder schlechter, als wenn gar kein Modell generiert würde. Nimmt der q^2 -Wert negative Werte an, ist das für die Vorhersage der biologischen Aktivitätsdaten zugrunde liegende Modell schlechter als eben gar kein Modell.

Der q^2 -Wert eines geeigneten Modells sollte Werte annehmen, die größer als 0 („Modell des Mittelwertes“) sind. Gute Modelle ergeben sich etwa ab q^2 -Werten von größer 0,4-0,5. Als Faustregel gilt, dass die Zahl der für die Beschreibung des Modells notwendigen Komponenten, etwa 10% der Anzahl der Verbindungen entsprechen sollte.¹⁹¹

Voraussetzung für die Korrelation der biologischen Daten mit den Eigenschaften der 3D-Strukturen ist eine räumliche Überlagerung der Moleküle. Im Idealfall sollte die Überlagerung der Verbindungen der gebundenen Konformation entsprechen. Für die Überlagerung der Phenothiazine wurde zunächst mit Hilfe des Programms SYBYL die 3D-Struktur des Grundgerüsts mit C4-Seitenkettenlinker generiert.¹⁹³ Diese wurde unter Verwendung des Kraftfeldes MMFF94s energieminiert und für alle Derivate als Aggregat beibehalten. Die Substituenten (R₁-R₄) wurden im Programm SYBYL angefügt und in gleicher Weise energieminiert (MMFF94s), ohne das bereits energetisch optimierte Grundgerüst zu verändern. Auf diese Weise wurde die 3D-Struktur aller Phenothiazine mit C4-Seitenkettenlinker erstellt.

Bei der Überlagerung der Phenothiazine musste beachtet werden, dass beispielsweise für den Benzoyl-Substituenten (R₁) und das PhenothiazinGrundgerüst der Verbindung H 19

ein Torsionswinkel resultiert. Die Torsionswinkel der Substituenten für die Phenothiazine mit C3-Seitenkettenlinker wurden an die Torsionswinkel der korrespondierenden Phenothiazine mit C4-Seitenkettenlinker angepasst.

In der folgenden Abb. 3.38 ist das Alignment aller Phenothiazine aus Tabelle 3.9 dargestellt. Drei Verbindungen aus der Überlagerung fallen besonders auf: H 9, H 10 und H 11. Die Substanz H 9 weist als einzige Substanz einen zusätzlichen Phenylring auf. Die Verbindungen H 10 und H 11 besitzen im Unterschied zu allen anderen Phenothiazinen an Position R₂ einen tert.-butyl-Rest.

Die für die Berechnung der CoMFA- und CoMSIA-Modelle notwendigen Partialladungen wurden mit dem Programm MOPAC nach der semiempirischen AM1-Methode bestimmt. Folgende Parameter wurden definiert: XYZ (Durchführung der Berechnung mit kartesischen Koordinaten), keine Geometrieoptimierung, normale Konvergenz, Nettoladung = 0, Zeitbegrenzung 3600 s, Singulett Zustand.¹⁹⁴

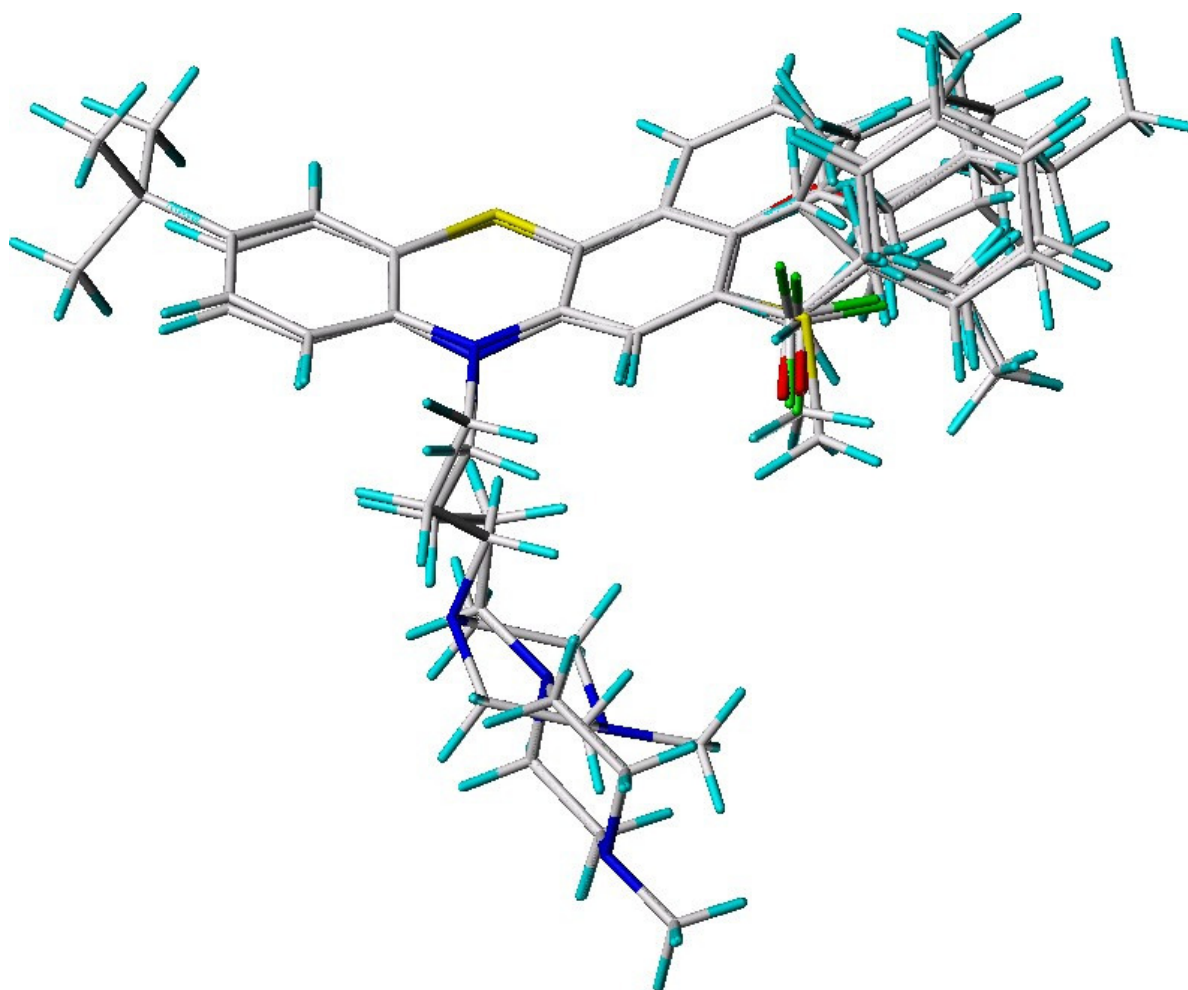


Abb. 3.38: Alignment der Phenothiazine mit C3 und C4 Seitenkettenlinker.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die CoMFA- und CoMSIA-Modelle wurden mit dem Programm SYBYL (Version 7.2) mit dem in Abb. 3.38 zu erkennenden Alignment generiert. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3.10 zusammengefasst. Bei Betrachtung der Resultate der CoMFA-Modelle fällt auf, dass das sogenannte „Both“-Feld (das kombinierte sterische und elektrostatische Feld) den höchsten q^2 -Wert von 0,711 bei 4 Komponenten liefert.

Tabelle 3.10: Ergebnisse der 3D-QSAR: CoMFA- und CoMSIA-Modelle für 21 Phenothiazine.

CoMFA-Modell(e)		Leave-one-out		No validation	
Felder	q^2	Komponenten	S_{Press}	r^2	STABW
Sterisches (S)	0,611	2	0,367	0,846	0,231
Elektrostatisches (E)	0,635	6	0,403	0,980	0,093
Both	0,711	4	0,335	0,974	0,101
HBond	0,620	2	0,363	0,774	0,280
CoMSIA-Modell(e)		Leave-one-out		No validation	
Felder	q^2	Komponenten	S_{Press}	r^2	STABW
Sterisches (S)	0,642	2	0,352	0,825	0,246
Elektrostatisches (E)	0,649	3	0,332	0,910	0,182
Hydrophobes (H)	0,759	3	0,297	0,905	0,186
Donor (D)	-	-	-	-	-
Akzeptor (A)	0,656	2	0,345	0,748	0,295
S + E	0,690	2	0,328	0,876	0,207
S + H	0,730	3	0,315	0,911	0,180
S + A	0,667	3	0,349	0,831	0,249
E + H	0,795	3	0,274	0,949	0,137
E + A	0,753	3	0,301	0,889	0,202
H + A	0,767	3	0,292	0,893	0,193
S + E + H	0,775	3	0,287	0,947	0,139
S + E + A	0,729	3	0,315	0,891	0,200
S + H + A	0,736	3	0,311	0,888	0,203
E + H + A	0,775	3	0,287	0,911	0,180
S + E + H + A	0,757	3	0,299	0,908	0,183

Die q^2 -Werte aller CoMFA-Modelle sind $> 0,61$, die optimale Anzahl der Komponenten va-

riert zwischen 2 und 6. Das auf dem elektrostatischen Feld basierende Modell sollte aufgrund der hohen Anzahl an Komponenten eher kritisch bewertet werden. Alle CoMFA-Modelle ermöglichen eine akzeptable, wenn auch noch nicht optimale Vorhersage der Aktivitätswerte der Phenothiazine. Die CoMSIA-Modelle sind aufgrund der in der Regel höheren q^2 -Werte den CoMFA-Modellen überlegen und deshalb diesen vorzuziehen. Der kleinste q^2 -Wert von 0,642 resultierte bei Verwendung des sterischen CoMSIA-Feldes. Die beste Vorhersage der Aktivitätswerte unter Einbeziehung nur eines der möglichen CoMSIA-Felder konnte durch das CoMSIA-Modell „Hydrophobic“ erbracht werden. Hydrophobe Eigenschaften stellen häufig eine Schlüsselfunktion dar, um P-gp verstärkt inhibieren zu können.^{88,91,94} Wasserstoffbrücken-Donorfunktionen wie OH- oder NH-Gruppen sind unter den analysierten Phenothiazinen nicht zu finden. Aus diesem Grund konnte kein auf dem CoMSIA-Donorfeld basierendes Modell erstellt werden.

Die besten Modelle resultierten, wenn man mehrere CoMSIA-Felder kombinierte: E + H, H + A, E + A, S + E + H und E + H + A. Die q^2 -Werte dieser Modelle sind größer als 0,72. Die beste Vorhersagekraft der Aktivitätswerte besitzt die Kombination aus hydrophobem und elektrostatischem Feld, ihr q^2 -Wert beträgt 0,795 bei 3 Komponenten und einem S_{PRESS} von 0,274.

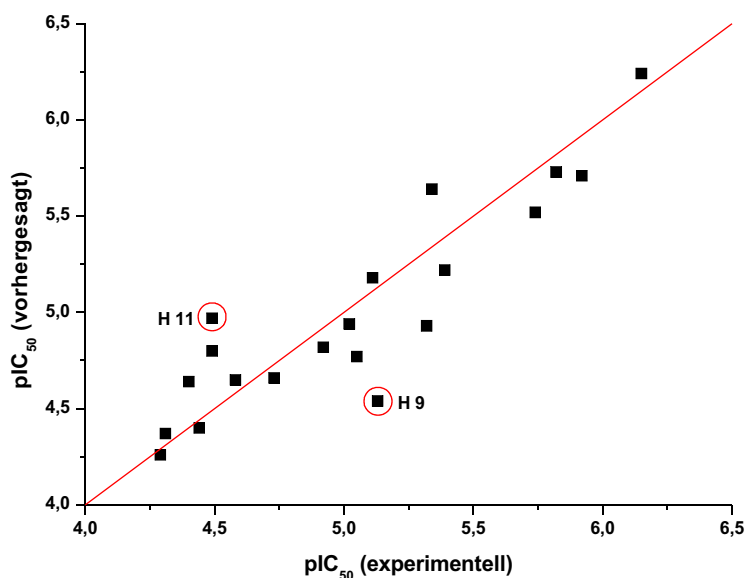


Abb. 3.39: Auftragung der gemessenen pIC_{50} -Werte der Phenothiazin-Derivate (Calcein AM Assay, A2780 Adr Zellen) gegen die mittels der CoMSIA-Feldkombination E + H vorhergesagten pIC_{50} -Werte.

3 Ergebnisse und Diskussion

In Abb. 3.39 sind die mit Hilfe des CoMSIA E + H-Modells vorhergesagten pIC_{50} -Werte gegen die experimentellen pIC_{50} -Werte aufgetragen. In Abb. 3.40 werden statt der vorhergesagten pIC_{50} -Werte die berechneten gegen die gemessenen Aktivitätswerte geplottet.

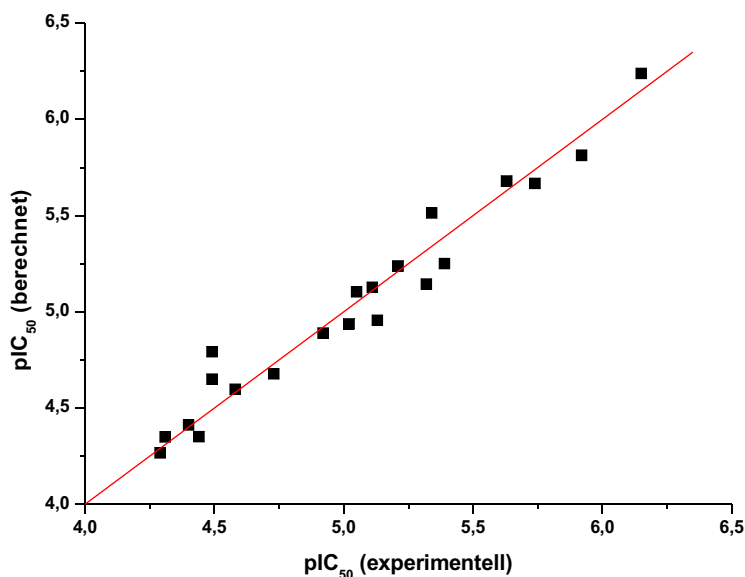


Abb. 3.40: Plot der mit Hilfe des Calcein AM Assays an A2780 Adr Zellen bestimmten pIC_{50} -Werte der Phenothiazin-Derivate gegen die mittels der CoMSIA-Feldkombination E + H berechneten pIC_{50} -Werte.

In Tabelle 3.11 sind die experimentellen und mit Hilfe des CoMSIA E + H-Feldes vorhergesagten pIC_{50} -Werte sowie die Residuen zusammengestellt. Bei Betrachtung dieser Werte fällt auf, dass die Verbindung H 9 (grau unterlegt) am schlechtesten vorhergesagt wird, es liegt eine Abweichung von 0,59 zwischen dem gemessenen und vorhergesagten pIC_{50} -Wert vor.

3 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3.11: Experimentelle und mit Hilfe des CoMSIA H+E-Modells vorhergesagte pIC_{50} -Werte für die Phenothiazin-Derivate. Die Verbindung H 9 (vorhergesagter und experimenteller pIC_{50} -Wert deutlich voneinander abweichend) ist grau unterlegt.

Verbindung	pIC_{50} (experimentell)	pIC_{50} (vorhergesagt)	Residuen
H 1	4,31	4,37	-0,06
H 2	4,73	4,66	+0,07
H 3	4,58	4,65	-0,07
H 4	4,49	4,80	-0,31
H 5	4,29	4,26	+0,03
H 6	4,40	4,64	-0,24
H 7	4,44	4,40	+0,04
H 8	4,92	4,82	+0,10
H 9	5,13	4,54	+0,59
H 10	5,05	4,77	+0,28
H 11	4,49	4,97	-0,48
H 12	5,02	4,94	+0,08
H 13	5,39	5,22	+0,17
H 14	5,11	5,18	-0,07
H 15	5,74	5,52	+0,22
H 16	5,34	5,64	-0,30
H 17	5,92	5,73	+0,19
H 18	5,63	5,71	-0,08
H 19	6,15	6,24	-0,09
H 20	5,32	4,93	+0,39
H 21	5,21	5,12	+0,09

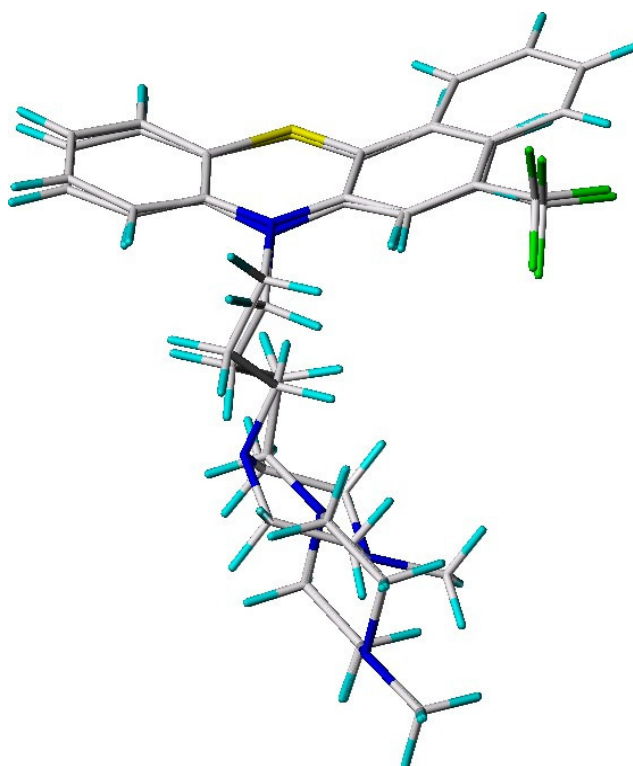


Abb. 3.41: Darstellung der beiden Phenothiazine H 21 und H 9, das einen annelierten Benzenring aufweist.

3 Ergebnisse und Diskussion

Verbindung H 9 stellt das einzige annelierte Phenothiazin-Derivat dar (vergl. Tabelle 3.9). Wird diese Verbindung bei der Leave-one-out-Methode ausgelassen, kann der Einfluß dieses Strukturmerkmals nicht vorhergesagt werden. Aus diesem Grund wurden unter Auslassung von Verbindung H 9 die zu Tabelle 3.10 analogen CoMFA- und CoMSIA-Modelle generiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.11 zusammengefasst. Dabei wurden die q^2 -Werte aller Modelle durch die Elimination der Substanz H 9 erhöht.

Tabelle 3.12: Ergebnisse der 3D-QSAR: CoMFA und CoMSIA für die Phenothiazin-Derivate, wobei im Vergleich zu Tabelle 3.10 Verbindung H 9 ausgelassen wurde.

CoMFA Modell(e)		Leave-one-out		No Validation	
Felder	q^2	Komponenten	S_{Press}	r^2	SD
Sterisches (S)	0,716	2	0,322	0,900	0,191
Elektrostatisches (E)	0,775	6	0,328	0,982	0,092
Both	0,764	2	0,294	0,916	0,175
HBond	0,664	2	0,351	0,808	0,265
CoMSIA Modell(e)		Leave-one-out		No Validation	
Felder	q^2	Komponenten	S_{Press}	r^2	SD
Sterisches	0,753	4	0,320	0,944	0,153
Elektrostatisches	0,812	6	0,300	0,975	0,110
Hydrophobes	0,824	3	0,261	0,937	0,156
Donor	-	-	-	-	-
Akzeptor	0,704	2	0,329	0,791	0,277
S + E	0,794	3	0,283	0,950	0,140
S + H	0,810	3	0,272	0,945	0,147
S + A	0,727	3	0,326	0,876	0,220
E + H	0,857	3	0,236	0,961	0,123
E + A	0,845	6	0,272	0,981	0,095
H + A	0,833	3	0,255	0,934	0,160
S + E + H	0,846	3	0,245	0,963	0,120
S + E + A	0,805	4	0,285	0,950	0,144
S + H + A	0,812	4	0,279	0,954	0,138
A + H + E	0,838	3	0,251	0,940	0,153
S + E + H + A	0,827	4	0,267	0,958	0,131

Die Ergebnisse belegen den negativen Einfluss der Verbindung H 9 auf die Vorhersagekraft der einzelnen Modelle. Diese Substanz trägt wegen ihrer strukturellen Sonderstellung auch nicht zur Vorhersage der Aktivitätswerte der anderen Phenothiazine bei.

Die besten Modelle wurden mit Hilfe von zwei verschiedenen Methoden validiert: (i) Leave-many-out¹⁹⁵ (ii) Scrambling- bzw. Verwürfelungstest.

Leave-many-out Methode:

Der Datensatz wurde in zwei bis fünf Gruppen unterteilt. Da die Gruppeneinteilung einen großen Einfluss auf die Vorhersagekraft haben kann, wurde jede Analyse häufig wiederholt. Für die besten Modelle wurden im Rahmen der Leave-many-out Methode 100 Wiederholungen jeder Analyse mit zufälliger Gruppeneinteilung durchgeführt. Die Ergebnisse für die gruppenweise Kreuzvalidierung sind in der folgenden Tabelle 3.13 enthalten.

Tabelle 3.13: Validierung der besten CoMSIA-Modelle mit Hilfe der LMO-Methode für 21 Phenothiazin-Derivate (21). Die gruppenweise Kreuzvalidierung (100 Wiederholungen, CF 2,0) wurde ebenfalls unter Ausschluss der Verbindung H 9 durchgeführt (20).

CoMSIA Felder	Gruppenzahl	q² (21)	STABW (21)	q² (20)	STABW (20)
E + H	5	0,767	0,046	0,847	0,027
E + H	4	0,756	0,054	0,824	0,043
E + H	3	0,747	0,060	0,815	0,053
E + H	2	0,703	0,091	0,777	0,071
E + A	5	0,732	0,040	0,825	0,033
E + A	4	0,728	0,040	0,817	0,035
E + A	3	0,720	0,049	0,809	0,040
E + A	2	0,671	0,098	0,779	0,060
H + A	5	0,748	0,041	0,818	0,029
H + A	4	0,738	0,049	0,811	0,035
H + A	3	0,731	0,048	0,797	0,046
H + A	2	0,682	0,114	0,768	0,067
S + E + H	5	0,749	0,046	0,823	0,037
S + E + H	4	0,748	0,048	0,817	0,043
S + E + H	3	0,716	0,064	0,796	0,047
S + E + H	2	0,675	0,114	0,774	0,073
E + H + A	5	0,759	0,038	0,819	0,036
E + H + A	4	0,752	0,044	0,814	0,040
E + H + A	3	0,739	0,054	0,806	0,048
E + H + A	2	0,695	0,080	0,769	0,085

In dieser sind die gemittelten q^2 -Werte und deren Standardabweichungen angegeben. Dabei beziehen sich die mittleren q^2 -Werte und deren Standardabweichungen einerseits auf alle 21 Phenothiazine. Andererseits wurde die Substanz H 9 ausgelassen und die Leave-many-out-Methode auf die restlichen 20 Phenothiazin-Derivate für die analogen CoMSIA-Feldkombinationen angewendet. Die Ergebnisse zeigen, dass die Verringerung der q^2 -Werte bis zu einer Gruppengröße von 3 noch eher gering ausfällt. Erst bei einer Entfernung von 50% der Verbindungen des Datensatzes und anschließender Vorhersage der Aktivitätswerte der ausgelassenen Substanzen, nimmt der q^2 -Wert stärker ab. Die Vorhersagekraft ist aber immer noch akzeptabel. Die gruppenweise Kreuzvalidierung ist der Leave-one-out Methode vorzuziehen. Das Leave-many-out-Verfahren kann zwar nicht eine Validierung mittels eines externen Datensatzes ersetzen, die in Tabelle 3.13 aufgeführten Ergebnisse heben aber die Stabilität der besten Modelle eindrucksvoll hervor.

Zur Validierung der Modelle wurde auch ein *Scrambling-* oder *Verwürfelungstest* durchgeführt. Die Aktivitätsdaten wurden zufalls-basiert gemischt und auf die Verbindungen verteilt. Dieser Vorgang wurde 50mal wiederholt. Dann wurden die q^2 -Werte mit Hilfe der LOO-Methode berechnet; in Tabelle 3.14 sind die gemittelten q^2 -Werte und deren Standardabweichungen angegeben.

Tabelle 3.14: Validierung der besten CoMSIA-Modelle mit Hilfe des Verwürfelungstests für 21 Phenothiazin-Derivate unter Einbeziehung und unter Ausschluss von Verbindung H 9. Mittelwerte und Standardabweichungen basieren auf 50 zufällig erstellten Datensätzen.

21 Verbindungen		
CoMSIA Felder	q^2	STABW
E + H	-0,295	0,261
E + A	-0,211	0,189
H + A	-0,207	0,189
S + E + H	-0,283	0,280
E + H + A	-0,221	0,202
20 Verbindungen		
CoMSIA Felder	q^2	STABW
E + H	-0,215	0,321
E + A	-0,209	0,183
H + A	-0,114	0,201
S + E + H	-0,260	0,265
E + H + A	-0,198	0,187

Dieses Verfahren sollte einen signifikanten Abfall des q^2 -Wertes hervorrufen. Alle in Tabelle 3.14 aufgeführten q^2 -Werte sind kleiner als 0, die Vorhersage ist demnach schlechter als, wenn der Mittelwert allen Verbindungen als Aktivitätswert zugeordnet würde. Die Annahme, dass zufallsbasierte Aktivitätswerte zur Generierung guter CoMSIA-Modelle geeignet sind, konnte somit widerlegt werden und die Validität der besten CoMSIA-Modelle belegt werden. Die CoMFA- und CoMSIA-Modelle ermöglichen es festzustellen, an welchen Positionen Feldbeiträge auftreten, die signifikant zur Aktivität der Verbindungen beitragen. Diese Beiträge können durch sogenannte Konturdiagramme (engl. Contour maps) visualisiert werden.

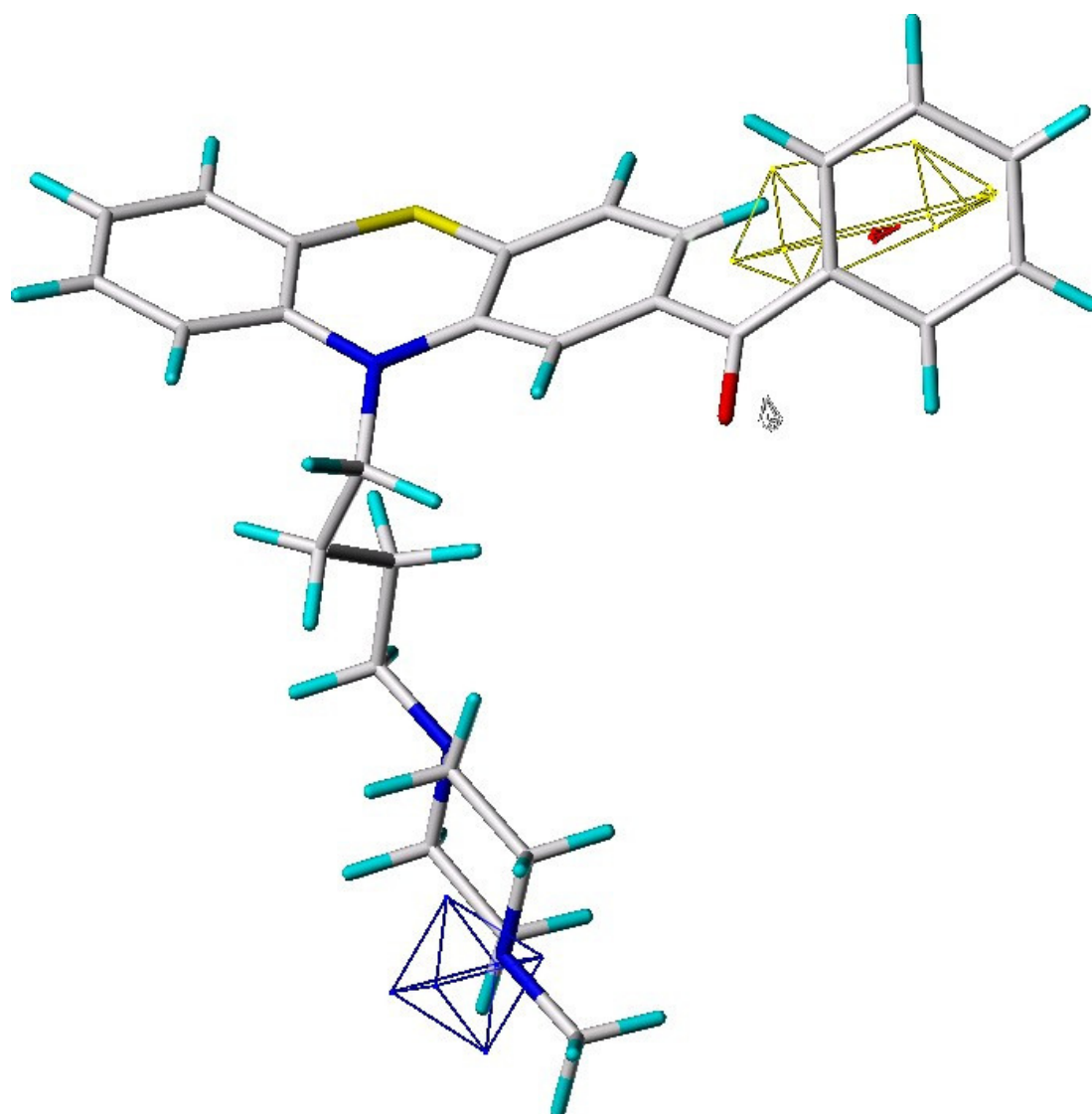


Abb. 3.42: Konturdiagramm des besten CoMSIA-Modells mit der Feldkombination E + H zusammen mit Substanz H 15.

Bereiche, die die Aktivität signifikant beeinflussen, können je nach Farbe auf eine Erhöhung oder Verringerung der biologischen Aktivität hinweisen. Konturdiagramme illustrieren, an welchen Stellen die Eigenschaften einer Struktur zu verändern sind, um eine Affinitätssteigerung zu erzielen. In Abb. 3.42 ist ein Konturdiagramm des besten CoMSIA-Modells mit der Feldkombination E + H zusammen mit dem Phenothiazin-Derivat H 15 wiedergegeben. Der gelb-orange Bereich, der in Nachbarschaft zum hydrophoben Phenylrest des in Position 2 lokalisierten Benzoyl-Substituenten zu finden ist, hebt hervor, dass hydrophobe Substituenten hier zur Verbesserung der biologischen Aktivität beitragen. Die Carbonylfunktion des Benzoylrestes von H 15 besitzt hydrophile Eigenschaften. Der positive Einfluss dieser Akzeptorfunktion auf die Inhibierbarkeit von P-gp wird durch den dort gelegenen grauen Bereich (Hydrophobes Feld unfavorisiert) offensichtlich. Die kleine rote Kontur ist in direkter Nähe zum Phenylring des Benzoyl-Substituenten von H 15 zu erkennen. Diese geht auf die erhöhte Elektronendichte des Phenyl-Substituenten zurück (Negative Partialladung begünstigt). Die blaue Kontur, die nahe dem methylierten Stickstoff des Piperazinringes von H 15 lokalisiert ist bzw. mit diesem zusammenfällt, veranschaulicht, dass dort eine positive Partialladung die biologische Aktivität erhöhen würde. Der Stickstoff ist aber negativ partial geladen. Bei Verbindung H 19 liegt die blaue Kontur nicht innerhalb des methylierten Piperazinstickstoffs, was in indirekter Form zeigt, dass die Phenothiazine mit C3-Seitenkettenlinker im Vergleich zu denen mit C4-Seitenkettenlinker P-gp stärker inhibieren.

Für einen Teil der 21 Phenothiazine konnte neben den vorgestellten 3D-QSAR Untersuchungen eine klassische 2D-QSAR in Form einer Free-Wilson-Analyse durchgeführt werden.

Die Free-Wilson-Analyse, die im Jahr 1964 entwickelt wurde, dient zur Struktur-Wirkungs-Analyse chemisch verwandter Verbindungen. Dieses Verfahren basiert auf der Annahme, dass die unsubstituierte Ausgangsverbindung, die als Strukturelement allen untersuchten Verbindungen gemeinsam ist, einen bestimmten Beitrag μ für die biologische Aktivität leistet. Die Einführung eines Substituenten bedingt eine Veränderung der biologischen Wirksamkeit. Der Beitrag des Substituenten zur biologischen Wirksamkeit ist additiv und konstant.

Die biologische Wirksamkeit einer Verbindung kann nach der folgenden Gleichung berechnet werden:

$$BA = \sum a_i X_i + \mu \quad \text{Gleichung 3.12}$$

Dabei gibt a_i den Beitrag des i -ten Substituenten zur biologischen Aktivität BA an; X_i steht für den i -ten Substituenten, der für den Fall, dass dieser vorhanden ist, den Wert 1 annimmt, und bei Fehlen dieses Strukturelements den Wert 0 aufweist. Zu Beginn der Free-Wilson-Methode wird eine Matrix erstellt. Diese Matrix enthält die Aktivitätsdaten der einzelnen Verbindungen, die mit den Strukturparametern (1 = Substituent vorhanden, 0 = Substituent nicht vorhanden) korreliert werden. Jeder Substituententyp sollte häufiger als einmal vorkommen (da, er sonst per se signifikant ist). Die Vorhersage der Aktivität unbekannter Verbindungen ist nur begrenzt möglich. Als unbekanntes Verbindungen kommen nur solche in Frage, die ein identisches Grundgerüst aufweisen und aus den innerhalb der Free-Wilson-Analyse verwendeten Substituenten aufgebaut sind.

Die Analyse der sogenannten Free-Wilson-Matrix erfolgt mit Hilfe der Multiplen Linearen Regression.^{196,197}

In die Free-Wilson-Analyse wurden nur die in Tabelle 3.15 aufgeführten Verbindungen einbezogen, da nur diese Substituenten aufweisen, die häufiger als einmal unter den Substanzen vertreten sind.

Tabelle 3.15: Free-Wilson-Matrix der Phenthoiazin-Derivate. Verbindung H 4 ist grau unterlegt, sie wurde als Referenz definiert.

Verbindung	pIC ₅₀	C3	CF ₃	Acetyl	Propionyl	Butyryl	Benzoyl
H 21	5,21	1	1	0	0	0	0
H 4	4,49	0	1	0	0	0	0
H 12	5,02	0	0	1	0	0	0
H 13	5,39	0	0	0	0	1	0
H 14	5,11	0	0	0	1	0	0
H 15	5,74	0	0	0	0	0	1
H 19	6,15	1	0	0	0	0	1
H 16	5,34	1	0	1	0	0	0
H 18	5,63	1	0	0	1	0	0
H 17	5,92	1	0	0	0	1	0

Die Substituenten der 10 Phenothiazine, die mit Hilfe der Free-Wilson-Analyse untersucht wurden, sind in Tabelle 3.15 angegeben: (a) CF₃ (b) Acetyl (c) Propionyl (d) Butyryl (e) Benzoyl. Die Free-Wilson-Matrix (Tabelle 3.15) wurde mit Hilfe einer multiplen linearen Regression analysiert und der Deskriptor für die Variable CF₃ eliminiert. Als Referenz wurde Verbindung H 4 definiert. Zunächst wurden alle unabhängigen Variablen, die den einzelnen verschiedenen Strukturparametern entsprechen, in die Gleichung einbezogen. Dann wurden die strukturellen Parameter mit dem kleinsten partiellen Korrelationskoeffizienten über die sogenannte Rückwärts-Methode bei einem Signifikanzniveau von 0,10 eliminiert.

Anhand der Regressionsgleichung (vergl. Tabelle 3.16) wird deutlich, dass Verbindungen mit einem C3-Seitenkettenlinker im Vergleich zu den Phenothiazinen mit C4-Seitenkette P-gp stärker inhibieren (vergl. Tabelle 3.16).

Tabelle 3.16: Free-Wilson-Analyse der Phenothiazine: Regressionskoeffizienten und deren Standardfehler.

Name	Koeffizient ± Standardfehler
Konstante	4,600 ± 0,082
Kettenlänge C3	0,500 ± 0,067
Acetyl	0,329 ± 0,106
Propionyl	0,521 ± 0,106
Butyryl	0,804 ± 0,106
Benzoyl	1,096 ± 0,106

Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Resultaten von Ford et al., die einen Anstieg der biologischen Wirksamkeit von Phenothiazinen mit C4-Seitenkettelinker gegenüber Verbindungen mit C2- oder C3-Seitenkettenlinker feststellten. Allerdings wurden die Aktivitätswerte der Phenothiazine von Ford et al. im Gegensatz zum Calcein AM Assay dieser Arbeit lediglich in indirekter Form bestimmt, indem mit Hilfe eines Zytotoxizitätsassays der Einfluss einer definierten Inhibitorkonzentration auf den IC₅₀-Wert des Zytostatikums ermittelt wurde (MDR Ratio). Außerdem differieren die MDR-Ratio-Werte dieser Verbindungen nur geringfügig: MDR-Ratio (Chlorpromazin) = 1,6 ± 0,3, MDR-Ratio (2-Chloro-10-[4-(dimethyl-amino)butyl]phenothiazin) = 2,0 ± 0,3.¹⁹⁸ Auf die mit den MDR-Ratio-Werten verbundenen grundsätzlichen Probleme wurde bereits in Kap. 3.2 eingegangen.

In Tabelle 3.17 sind die statistischen Kennzahlen der Multiplen Linearen Regression zusammengestellt.

Tabelle 3.17: Statistische Kennzahlen der Free-Wilson-Analyse für zehn Phenothiazine.

<i>F-Wert</i>	<i>R²</i>	<i>R</i>	<i>Korrigiertes R²</i>	<i>Standardfehler des Schätzers</i>
36,34	0,98	0,99	0,95	0,11

Bei Betrachtung der Regressionsgleichung wird offensichtlich, dass die Aktivität eines Phenothiazins um so deutlicher ansteigt, je ausgeprägter der lipophile Charakter des Substituenten mit Carbonylfunktion ausfällt.

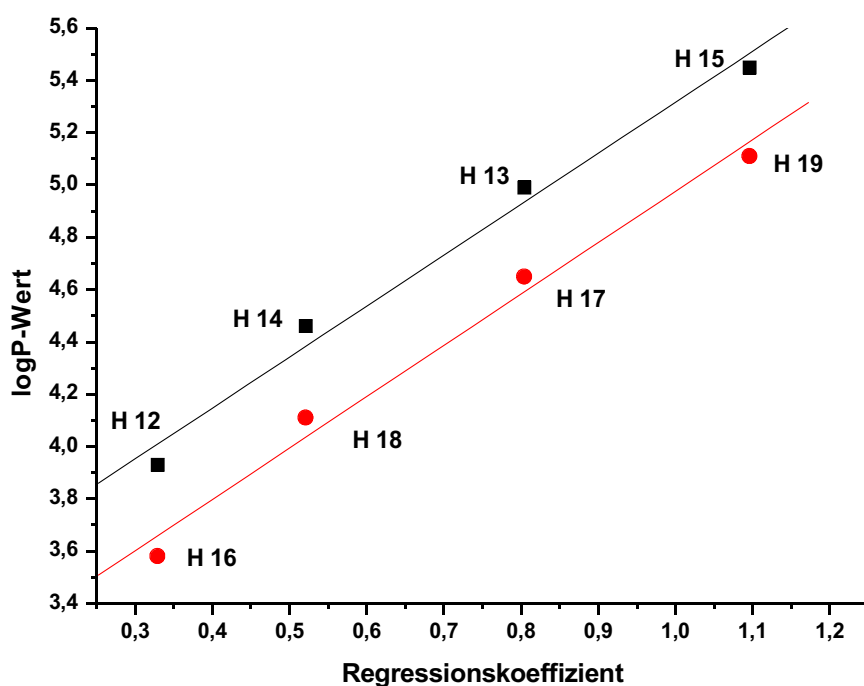


Abb. 3.43: Berechnete logP-Werte gegen die Regressionskoeffizienten der Free-Wilson-Analyse der Phenothiazine, $r^2 = 0,99$. Rot = Phenothiazine mit C3-Seitenkettenlinker, schwarz = Phenothiazine mit C4-Seitenkette.

Trägt man die berechneten logP-Werte gegen die Regressionskoeffizienten auf, ergibt sich ein fast perfekter linearer Zusammenhang mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,99 (Abb. 3.43). Der Zusammenhang zwischen biologischer Wirksamkeit und dem logP-Wert eines Phenothiazins gilt aber nur eingeschränkt. Die Verbindungen H 4 und H 21 mit CF₃-Substituent besitzen trotz ihrer hohen logP-Werte von $5,11 \pm 0,41$ und $5,46 \pm 0,40$ nur ver-

3 Ergebnisse und Diskussion

hältnismäßig geringe Aktivitätswerte. Im Gegensatz zu den Verbindungen H 4 und H 21 weisen die anderen Phenothiazine H 12 bis H 19 im Substituenten R₂ eine Carbonylfunktion auf, die H-Akzeptor-Eigenschaften besitzt. Dieses strukturelle Merkmal trägt zur Erhöhung der biologischen Wirksamkeit bei.

Tabelle 3.18: Mit Hilfe der Regressionsgleichung berechnete pIC₅₀-Werte, gemessene pIC₅₀-Werte und Residuen der 10 Phenothiazin-Derivate.

Verbindung	pIC ₅₀ (gemessen)	pIC ₅₀ (berechnet)	Residuen
H 4	4,49	4,60	-0,11
H 12	5,02	4,93	+0,09
H 13	5,39	5,40	-0,01
H 14	5,11	5,12	-0,01
H 15	5,74	5,70	+0,04
H 16	5,34	5,43	-0,09
H 17	5,92	5,90	+0,02
H 18	5,63	5,62	+0,01
H 19	6,15	6,20	-0,05
H 21	5,21	5,10	+0,11

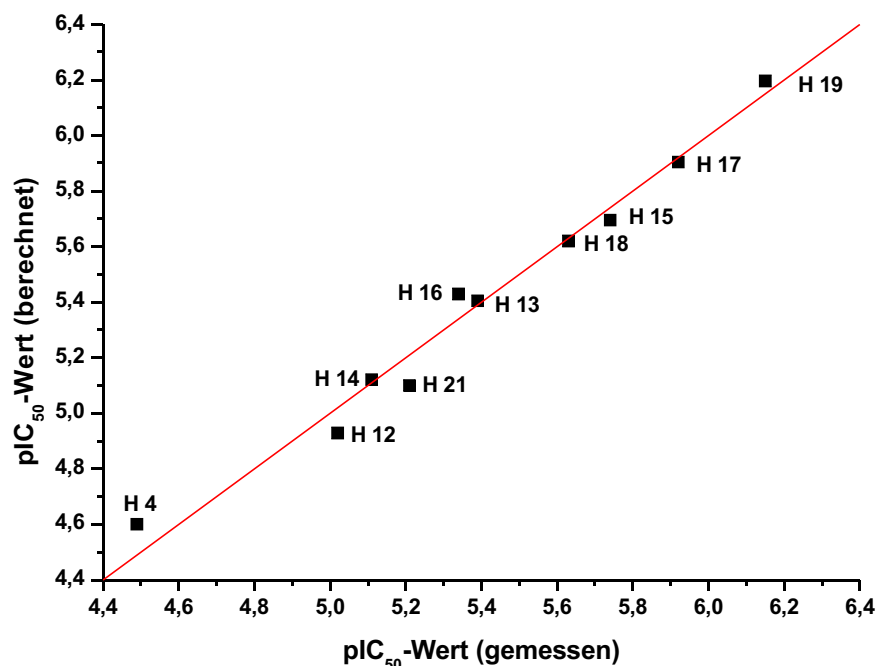


Abb. 3.44: Gemessene gegen berechnete pIC₅₀-Werte 10 verschiedener Phenothiazine (Free-Wilson-Analyse), r² = 0,98.

Dies zeigt, dass nicht nur die Lipophilie der Verbindungen eine entscheidende Rolle für die

Interaktion mit P-gp spielt. Lipophile Eigenschaften tragen vielmehr zu einer verbesserten Einlagerung der Substanzen in die Membran bei, von der dann eine Wechselwirkung mit P-gp möglich ist. Während die Akzeptorfunktion eine gezielte, spezifische Interaktion mit P-gp fördert, kann eine Erhöhung der lipophilen Eigenschaften als eher unspezifische, indirekte Förderung der Wechselwirkung mit P-gp verstanden werden. Auf die besondere Bedeutung der in Propafenon-Derivaten enthaltenen Akzeptorfunktion weisen Pleban und Ecker ebenfalls hin. Insgesamt kann damit Wasserbrückenakzeptoreigenschaften eine wichtige Rolle für die Wechselwirkung mit P-gp zugesprochen werden.¹⁹⁹ Ein wesentlicher Nachteil dieser 2D-QSAR-Methode besteht darin, dass Vorhersagen von unbekanntem Verbindungen nur möglich sind, falls diese die Substituenten besitzen, die in dieser Analyse vorkamen. Die Vorhersage von Phenothiazinen mit anderen Substituenten ist nicht möglich. In Abb. 3.44 sind die gemessenen pIC_{50} -Werte der zehn verschiedenen Phenothiazine gegen die mit Hilfe der Regressionsgleichung berechneten pIC_{50} -Werte aufgetragen. Das Bestimmtheitsmaß beträgt 0,98 ($R = 0,99$), die Steigung der Regressionsgeraden differiert nicht von 1. Die Vorhersage der pIC_{50} -Werte mit Hilfe der Regressionsgleichung ist nahezu perfekt.

3.6 Untersuchung von Modulatoren der dritten Generation mit Hilfe des Calcein AM Assays

Die Verbindung XR9576 (Tariquidar) wurde von der Firma Xenova aus einer Bibliothek von mehr als 150 Substanzen als der vielversprechendste Modulator ausgewählt (s. Abb. 3.45).

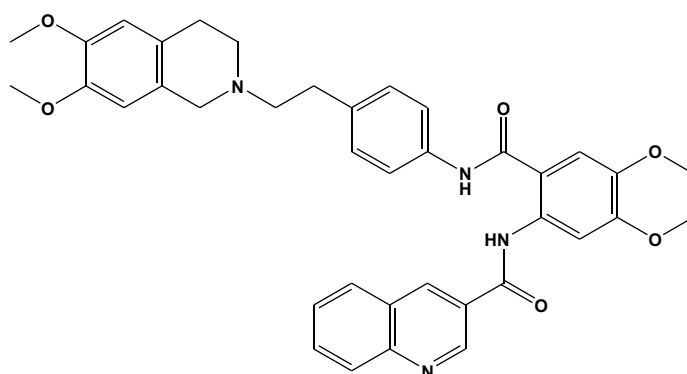


Abb. 3.45: Strukturformel von XR9576.

XR9576 war die Leitstruktur für die Synthese weiterer Tariquidar-Analoga, die als WK-Modulatoren bezeichnet werden. Die Modulatoren sind nach dem in Abb. 3.46 zu erkennenden Schema aufgebaut. Die Aminkomponente bezieht sich auf die 6,7-Dimethoxy-tetrahydroisochinolin-Partialstruktur von XR9576. Das tertiäre Stickstoffatom des Tetrahydroisochinolin-Heterozyklus bildet bei den Tariquidar-Analoga das basische Zentrum des Moleküls. An die Aminkomponente schließt sich der Ethylenphenylamin-linker an, der mit einer Anthranilsäure-Partialstruktur verknüpft ist.

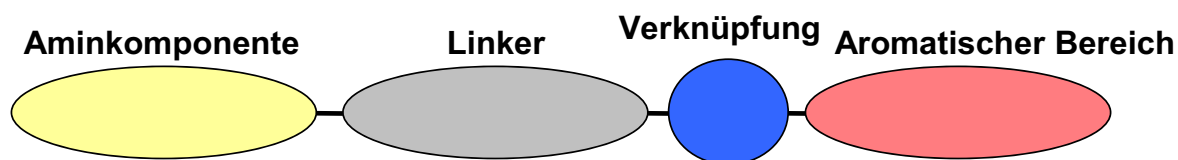


Abb. 3.46: Schematischer Aufbau der Tariquidar-Analoga bzw. der WK-Modulatoren.

Die WK-Modulatoren können in die sogenannten großen und kleinen Modulatoren unterteilt werden.

Die großen WK-Modulatoren besitzen in Übereinstimmung mit XR9576 alle eine zweite

3 Ergebnisse und Diskussion

Carbonsäureamidfunktion im sogenannten aromatischen Bereich (vergl. Abb. 3.46).

Tabelle 3.19: Strukturen, pIC_{50} -Werte und Hillkoeffizienten der XR-Analoga und WK-X-Modulatoren (Calcein AM Assay, A2780 Adr Zellen, $n \geq 3$), dB = direkte Bindung, Pos. = Position.

Verbindung	X	R ₁	R ₂	Pos.	$pIC_{50} \pm SD$	$n_H \pm SD$
Tariquidaranaloga						
XR9456	dB	OCH ₃	Phenyl	ortho	6,14 ± 0,23	2,24 ± 0,71
WK-X-19	dB	H	Phenyl	ortho	5,01 ± 0,10	3,25 ± 1,41
WK-X-23	dB	H	2-Nitrophenyl	ortho	4,81 ± 0,26	2,22 ± 0,85
XR9577	dB	H	3-Chinolinylyl	ortho	6,35 ± 0,27	2,59 ± 0,90
WK-X-25	dB	H	4-Toloyl	ortho	5,27 ± 0,26	3,19 ± 1,34
XR9504	dB	OCH ₃	4-Toloyl	ortho	6,16 ± 0,31	2,16 ± 0,84
XR9476	dB	OCH ₃	3-Chinolinylyl	ortho	6,32 ± 0,06	2,74 ± 1,13
WK-X-34	dB	OCH ₃	3,4-Dimethoxyphenyl	ortho	6,47 ± 0,18	2,89 ± 0,55
WK-X-36	dB	H	4-Nitrophenyl	ortho	5,85 ± 0,04	2,32 ± 0,62
WK-X-38	dB	H	3,4-Dimethoxyphenyl	ortho	6,31 ± 0,19	2,60 ± 0,73
WK-X-41	dB	H	4-Cyanophenyl	ortho	5,93 ± 0,09	2,77 ± 0,89
WK-X-75	dB	OCH ₃	4-Cyanophenyl	ortho	6,23 ± 0,20	3,15 ± 1,21
Variiert substituierte Aminobenzoesäure-Derivate						
WK-X-35	dB	OCH ₃	3-Chinolinylyl	para	5,90 ± 0,10	1,88 ± 0,56
WK-X-44	dB	H	3-Chinolinylyl	para	5,97 ± 0,25	2,76 ± 0,63
WK-X-49	dB	H	3-Chinolinylyl	meta	5,77 ± 0,07	2,10 ± 0,31
Harnstoff-Derivate						
WK-X-50	NH	H	3-Chinolinylyl	ortho	6,09 ± 0,18	3,60 ± 0,71
WK-X-78	NH	OCH ₃	3,4-Dimethoxyphenyl	ortho	5,00 ± 0,30	4,14 ± 2,28
WK-X-91	NH	OCH ₃	3,4-Dimethoxyphenyl	meta	5,48 ± 0,21	2,63 ± 0,51
WK-X-94	NH	OCH ₃	3,4-Dimethoxyphenyl	para	5,23 ± 0,21	2,23 ± 0,76
Aminophenyllessigsäure- und Aminophenoxyessigsäure-Derivate						
WK-X-72	CH ₂	OCH ₃	3-Chinolinylyl	ortho	6,20 ± 0,20	2,86 ± 0,80
WK-X-83	CH ₂ -O	OCH ₃	3-Chinolinylyl	ortho	6,23 ± 0,04	2,31 ± 0,30
WK-X-84	CH ₂ -O	OCH ₃	3,4-Dimethoxyphenyl	ortho	6,31 ± 0,06	3,31 ± 0,83
Anthranilamid mit Harnstoffpartialstruktur in R₂						
WK-X-92	dB	OCH ₃	NH-4-Nitrophenyl	ortho	6,07 ± 0,09	2,27 ± 0,59

Tabelle 3.19 enthält die Strukturen, pIC_{50} -Werte und Hillkoeffizienten der Tariquidar-Analoga bzw. WK-X- Modulatoren. WK-X-34 erwies sich unter diesen Verbindungen als potenteste Substanz im Calcein AM Assay. Um die Aktivitätswerte der in Tabelle 3.19 enthaltenen Verbindungen einordnen zu können, können sie mit den Modulatoren der ersten Generation Verapamil ($pIC_{50} = 5,27 \pm 0,22$) und Diltiazem ($pIC_{50} = 4,37 \pm 0,24$) verglichen werden. WK-X-34 inhibiert P-gp etwa 100mal stärker als Diltiazem und ist Verapamil etwa um den Faktor 16 überlegen. Aus den in Tabelle 3.19 angegebenen Ergebnissen konnten die folgenden Erkenntnisse gewonnen werden:

- Die Methoxygruppen, die am Tetrahydroisochinolinring in Position 6 und 7 lokalisiert sind (R_1), tragen in der Regel zu einer Verbesserung der Hemmwirkung gegenüber P-gp bei. Die Substanz WK-X-19 ($pIC_{50} = 5,01 \pm 0,10$), die in R_1 keine Methoxygruppen besitzt, ist etwa um das Zehnfache schlechter wirksam als ihr Analogon XR9456 ($pIC_{50} = 6,14 \pm 0,23$) mit Methoxygruppen. Die Aktivitätswerte der Substanzen WK-X-25 ($pIC_{50} = 5,27 \pm 0,26$) und XR9054 ($pIC_{50} = 6,16 \pm 0,31$) sowie der Verbindungen WK-X-41 ($pIC_{50} = 5,93 \pm 0,09$) und WK-X-75 ($pIC_{50} = 6,23 \pm 0,20$) verhalten sich analog, wenn auch der Unterschied geringer wird.
- Handelt es sich beim Substituenten R_2 um einen 3,4-Dimethoxyphenyl-Rest, nimmt die biologische Aktivität des Inhibitors im Vergleich zu einer Verbindung mit unsubstituiertem Phenylrest R_2 zu. WK-X-19 ($pIC_{50} = 5,01 \pm 0,10$) ist beispielsweise wesentlich weniger wirksam als WK-X-38 ($pIC_{50} = 6,31 \pm 0,19$).
- In para-Position des Phenylrestes R_2 lokalisierte elektronenziehende Substituenten (-I- und -M-Effekt der Cyano- bzw. Nitrogruppe), wie sie in den beiden Verbindungen WK-X-41 ($pIC_{50} = 5,93 \pm 0,09$) und WK-X-36 ($pIC_{50} = 5,85 \pm 0,04$) zu finden sind, rufen eine wesentlich stärkere Inhibition von P-gp hervor als WK-X-25 ($pIC_{50} = 5,27 \pm 0,26$), das über einen elektronenschiebenden Substituenten (Methylgruppe mit +I-Effekt) verfügt.
- Die in ortho-Position des Substituenten R_2 lokalisierte Nitrogruppe von WK-X-23 ($pIC_{50} = 4,81 \pm 0,26$) bewirkt gegenüber einer in para-Stellung gelegenen Nitrogruppe, wie sie beispielsweise in WK-X-36 ($pIC_{50} = 5,85 \pm 0,04$) vorhanden ist, eine Abnahme der biologischen Aktivität. Die verringerte Wirksamkeit könnte auf die Veränderung des Torsionswinkels zwischen Verknüpfung und Aromat zurückzuführen sein.

- WK-X-35, WK-X-44 und WK-X-49 sind variiert substituierte Aminobenzoessäurederivate. Die para- und meta-Variation bezieht sich auf die Position des zweiten Carbonsäureamid-Substituenten R_2 am Phenylring. Bisherige klassische Tariquidar-Analoga bzw. WK-Modulatoren können als ortho-Derivate bezeichnet werden (vergl. Tabelle 3.19). WK-X-44 und WK-X-49 stellen die para- bzw. meta-Analoga von XR9577 dar. Ein Vergleich der pIC_{50} -Werte dieser Verbindungen lässt die folgende Schlussfolgerung zu: ortho (XR9577, $pIC_{50} = 6,35 \pm 0,27$) \geq para (WK-X-44, $pIC_{50} = 5,97 \pm 0,25$) \geq meta (WK-X-49, $pIC_{50} = 5,77 \pm 0,07$). Das para-Derivat WK-X-35 ($pIC_{50} = 5,90 \pm 0,10$) ist in Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen ein schlechterer Inhibitor als das ortho-Analogon XR9476 ($pIC_{50} = 6,32 \pm 0,06$).
- Bei den Harnstoff-Derivaten wurde die Amidbindung im Verknüpfungsbereich (s. Abb. 3.46) durch eine Harnstoff-Partialstruktur ersetzt. Bei dem Vergleich der pIC_{50} -Werte der Verbindungen wird deutlich, dass WK-X-78 ($pIC_{50} = 5,00 \pm 0,30$), welches das Harnstoff-Analogon zu WK-X-34 ($pIC_{50} = 6,47 \pm 0,18$) darstellt, P-gp um etwa das Dreißigfache weniger inhibiert.
Die Verbindungen WK-X-91 ($pIC_{50} = 5,48 \pm 0,21$) und WK-X-94 ($pIC_{50} = 5,23 \pm 0,21$), die Variationen (meta, para) des Restes R_2 beinhalten, besitzen im Vergleich zu WK-X-34 eine wesentlich geringere biologische Aktivität. WK-X-50 erwies sich als das Harnstoff-Derivat mit dem höchsten pIC_{50} -Wert: $6,09 \pm 0,18$. Dessen inhibitorische Wirkung ist vergleichbar mit dem Carbonsäureamid-Analogon XR9577 ($pIC_{50} = 6,35 \pm 0,27$).
- Im Gegensatz zu den Verbindungen mit Harnstoff-Partialstruktur sind die Amino-phenylethylsäure- (WK-X-72) und Aminophenoxyessigsäure-Derivate (WK-X-83 und WK-X-84) ähnlich wirksam wie ihre Analoga XR9577 (zu WK-X-72 und WK-X-83) und WK-X-34 (zu WK-X-84). Die Substanzen besitzen wie die Harnstoff-Derivate eine verlängerte Verknüpfung zwischen der 4-Aminophenylethylamin-Partialstruktur und der hydrophoben Komponente.
- WK-X-92 nimmt eine Sonderstellung unter den Tariquidar-Analoga bzw. WK-Modulatoren ein, da es die einzige Verbindung darstellt, bei der die zweite Carbonsäureamid-Partialstruktur modifiziert und gegen eine Harnstoff-Partialstruktur ersetzt wurde. Der pIC_{50} -Wert von $6,07 \pm 0,09$ fällt im Vergleich zu den pIC_{50} -Werten der klassischen Tariquidar-Analoga nicht wesentlich geringer aus. Weitere Aussagen bzw.

Schlussfolgerungen sind aufgrund der Tatsache, dass nur eine dieser Verbindungen existiert, nicht möglich.

3.6.1 Free-Wilson-Analyse für zehn klassische Tariquidar-Analoga

Für 10 verschiedene klassische Tariquidar-Analoga wurde eine Free-Wilson-Analyse durchgeführt. Die folgende Tabelle 3.20 stellt die Free-Wilson-Matrix dar. Als Referenz wurde die Substanz WK-X-19 festgelegt.

Tabelle 3.20: Free-Wilson-Matrix für 10 klassische Tariquidar-Analoga (Calcein AM Assay, A2780 Adr Zellen). Die Referenz WK-X-19 ist grau unterlegt.

Substanz	pIC_{50}	$R_1 =$ Methoxy	$R_2 =$ 3-Chinolin	$R_2 =$ Phenyl	$R_2 =$ 4-Cyano- phenyl	$R_2 =$ 4-Methyl- phenyl	$R_2 =$ 3,4-Di- methoxy- phenyl
XR9456	6,14	1	0	1	0	0	0
WK-X-19	5,01	0	0	1	0	0	0
XR9577	6,35	0	1	0	0	0	0
WK-X-25	5,27	0	0	0	0	1	0
XR9504	6,16	1	0	0	0	1	0
XR9476	6,32	1	1	0	0	0	0
WK-X-34	6,47	1	0	0	0	0	1
WK-X-38	6,31	0	0	0	0	0	1
WK-X-41	5,93	0	0	0	1	0	0
WK-X-75	6,23	1	0	0	1	0	0

Die Analyse der Free-Wilson Matrix erfolgte mit Hilfe der multiplen linearen Regression, der Deskriptor für die Variable Phenyl wurde entfernt. Die Deskriptoren für die Variable 4-Methyl-phenyl sowie 4-Cyano-phenyl, die keinen signifikanten Beitrag für die Aktivität der Verbindungen leisteten, wurden über die sogenannte Rückwärtsmethode ausgeschlossen. Nach Ausschluss dieser Variablen resultierte die in Tabelle 3.21 angegebene Regressionsgleichung.

Tabelle 3.21: Free-Wilson-Analyse der Tariquidar-Analoga: Regressionskoeffizienten und deren Standardfehler.

Name	Regressionskoeffizient \pm Standardfehler
Konstante	5,545 \pm 0,184
Methoxy (R_1)	0,490 \pm 0,226
3-Chinolin (R_2)	0,545 \pm 0,291
3,4-Dimethoxyphenyl (R_2)	0,600 \pm 0,291

3 Ergebnisse und Diskussion

In Tabelle 3.22 sind die statistischen Kennzahlen der Free-Wilson-Analyse zusammengestellt.

Tabelle 3.22: Statistische Kennzahlen der Free-Wilson-Analyse der Tariquidar-Analoga bzw. der sogenannten großen WK-Modulatoren.

F-Wert	R²	R	Korrigiertes R²	Standardfehler des Schätzers
3,64	0,65	0,80	0,50	0,36

Tabelle 3.23: Gemessene, berechnete pIC₅₀-Werte und Residuen.

Verbindung	pIC₅₀ (gemessen)	pIC₅₀ (berechnet)	Residuen
XR9456	6,14	6,04	+0,10
WK-X-19	5,01	5,55	-0,54
XR9577	6,35	6,09	-0,26
WK-X-25	5,27	5,55	-0,28
XR9504	6,16	6,04	+0,12
XR9476	6,32	6,58	-0,26
WK-X-34	6,47	6,64	-0,17
WK-X-38	6,31	6,15	+0,16
WK-X-41	5,93	5,55	+0,38
WK-X-75	6,23	6,04	+0,19

Die in Tabelle 3.23 angegebenen pIC₅₀-Werte wurden mit Hilfe der Regressionsgleichung berechnet und die Residuen bestimmt. Vergleicht man die in Tabelle 3.23 aufgeführten berechneten und experimentellen pIC₅₀-Werte, so fällt auf, dass die Aktivitätswerte einiger Verbindungen nicht optimal berechnet werden. Mehrere Gründe für die relativ hohen Residuen sind möglich:

- Die Methoxygruppen in Position R₁ oder R₂ tragen zu einer verstärkten Inhibition von P-gp bei. Findet die Einführung der Methoxygruppen nur an R₁ oder R₂ statt, so steigt die biologische Aktivität deutlich an. Werden aber die Methoxygruppen in Position R₁ und R₂ gleichzeitig angefügt, so nimmt der experimentelle pIC₅₀-Wert im Vergleich zu einer Substanz, die diesen Substituenten nur an einer der beiden möglichen Positionen aufweist, nur geringfügig zu.
- Wie aus dem pIC₅₀-Wert von XR9577 hervorgeht, bewirkt die Einführung des Chinolin-Restes in R₂ eine Zunahme der biologischen Aktivität. Ein zusätzlicher positiver Beitrag der Methoxygruppen in R₁ zur biologischen Aktivität wird aber anhand

des pIC_{50} -Wertes von XR9476 nicht erkennbar. Der Aktivitätswert von XR9476 ist sogar geringfügig kleiner als der von XR9577.

Aus diesen Ausführungen wird offensichtlich, dass sich die Beiträge der drei verschiedenen Substituenten im Hinblick auf die experimentellen Aktivitätswerte nicht addieren. Dies steht aber im Gegensatz zur grundlegenden Annahme der Free-Wilson-Analyse^{196,197} und liefert die Erklärung dafür, warum die berechneten Aktivitätswerte einiger Verbindungen von den experimentellen stark abweichen.

3.7 Vergleich der Zelllinien A2780 Adr und MDCK-MDR1

Die P-gp inhibierende Wirkung verschiedener Verbindungen wurde nicht nur mit Hilfe des Calcein AM Assays an der Zelllinie A2780 Adr bestimmt, sondern auch an der Zelllinie MDCK-MDR1. Die Zelllinie MDCK-MDR1 wurde durch retrovirale Transfektion mit humaner ABCB1-cDNA gewonnen. Damit ist gewährleistet, dass diese Zelllinie P-gp in nennenswerter Form exprimiert. MDCK Zellen exprimieren hingegen kein P-gp. Dies geht aus der fehlenden Markierung dieser Zellen mit Hilfe des Antikörpers MRK-16 hervor (s. Abb. 3.4). Hintergrund für die Untersuchung von Substanzen an der Zelllinie MDCK-MDR1 war die Intention, durch einen Vergleich mit den Ergebnissen, die an A2780 Adr Zellen erhalten wurden, zu bekräftigen, dass die gemessenen Werte die Hemmung von P-gp wieder spiegeln. Bisherige Studien dieser Arbeit lassen nur die Schlussfolgerung zu, dass BCRP und MRP1 in A2780 Adr Zellen nicht überexprimiert sind. Die potentiellen Einflüsse aller weiteren ABC-Transportproteine auf die mit A2780 Adr Zellen ermittelten Resultate wurden aber bis zu diesem Zeitpunkt nicht überprüft. Die eleganteste und einfachste Methode weitere ABC-Transportproteine als Einflussgrößen auszuschließen, stellt ein Vergleich der pIC_{50} -Werte von Substanzen der beiden Zelllinien dar.²⁰⁰

Die in Tabelle 3.24 aufgeführten Substanzen zeichnen sich durch eine starke strukturelle Diversität aus. Durch die strukturelle Vielfalt sollte die Aussagekraft der Korrelation erhöht werden. Die pIC_{50} -Werte und Hillkoeffizienten dieser Substanzen sind in Tabelle 3.24 angegeben.

Tabelle 3.24: pIC_{50} -Werte und Hillkoeffizienten von unterschiedlichen Substanzen, die an MDCK-MDR1 Zellen mit Hilfe des Calcein AM Assays bestimmt wurden.

Verbindung	$pIC_{50} \pm SD$	$n_H \pm SD$
Cyclosporin A	5,37 \pm 0,11	2,71 \pm 0,36
Diltiazem	3,63 \pm 0,21	1,00
H 15	5,05 \pm 0,11	2,49 \pm 1,17
Imatinib	4,27 \pm 0,19	1,00
Verapamil	4,39 \pm 0,19	1,00
Vinblastin	4,00 \pm 0,34	1,50 \pm 0,19
WK-X-34	6,04 \pm 0,11	2,24 \pm 0,52
WK-X-50	5,45 \pm 0,10	2,05 \pm 0,69
XR9577	6,01 \pm 0,09	1,66 \pm 0,39

3 Ergebnisse und Diskussion

In Abb. 3.47 sind die pIC_{50} -Werte der Verbindungen, die an den beiden Zelllinien ermittelt wurden, gegeneinander aufgetragen. Das Bestimmtheitsmaß beträgt 0,97. Die ausgeprägte Korrelation hebt hervor, dass in beiden Zelllinien P-gp die dominante Rolle spielt und die Ergebnisse nicht durch andere ABC-Transportproteine beeinflusst werden.

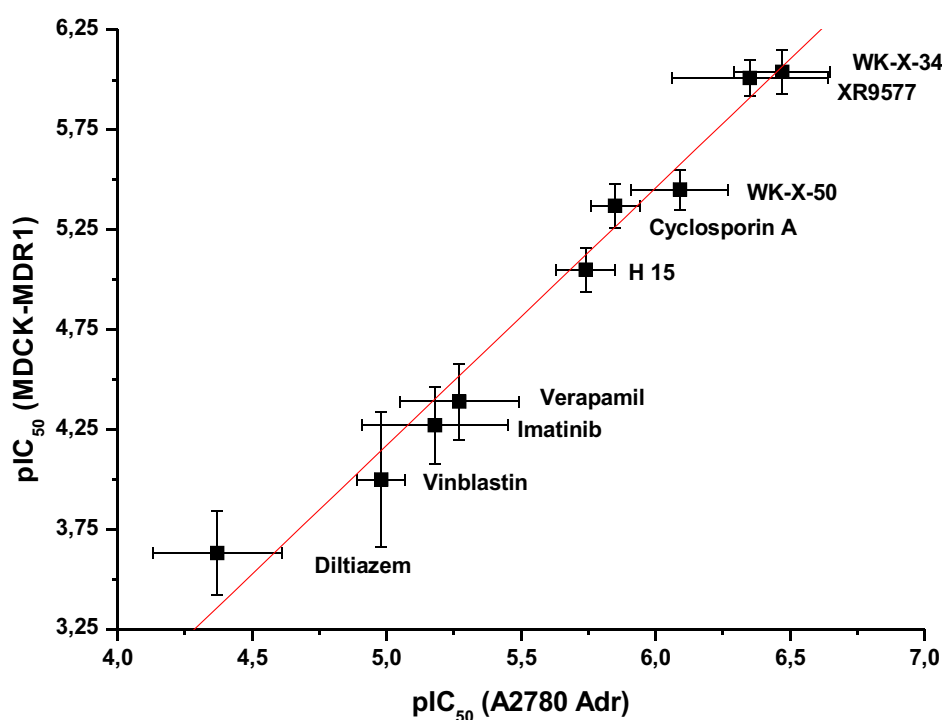


Abb. 3.47: pIC_{50} -Werte für verschiedene Substanzen in A2780 Adr und MDCK-MDR1 Zellen (Calcein AM Assay).

3.8 Entwicklung und Anwendung eines neuartigen Hoechst Assays

Die funktionelle Untersuchung von P-gp mittels Hoechst 33342 war einer der Kernpunkte dieser Arbeit, da für Hoechst 33342 eine eigene, spezifische Bindungsstelle postuliert wird: die H-Seite.^{75,77} Daher sollten Verbindungen untersucht werden, deren biologische Aktivität schon mit Hilfe des Calcein AM Assays bestimmt worden war und die Ergebnisse beider funktioneller Testsysteme verglichen werden. Gerade durch einen Vergleich der Ergebnisse sollte die Frage beantwortet werden können, ob Substanzen eine Präferenz zu einer der beiden potenziellen Bindungsstellen aufweisen.

Zu Beginn wurde der Hoechst Assay unter Anwendung mehrerer aufwändiger Waschschriffe durchgeführt. Im Folgenden sind einige Details dieser als Standard-Hoechst Assay bezeichneten Methode aufgeführt: Die Zellen wurden geerntet, 3mal mit KHP gewaschen und auf Eppendorfggefäße verteilt, die dann mit den gewünschten Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen inkubiert wurden. Danach erfolgte eine 20 minütige Inkubationsphase mit Hoechst 33342 (Endkonzentration 5 µmol/l), anschließend wurden die Zellen erneut 3mal mit KHP gewaschen, in 96er-Mikrotiterplatten überführt und die Fluoreszenz vermessen. Die zeitaufwändigen und komplexen Waschschriffe erfolgten unter der Annahme, dass extrazelluläre und zelluläre Fluoreszenzintensität von Hoechst 33342 nicht differieren. Die Erkenntnis, dass die Fluoreszenzintensität von Hoechst 33342 aber in hohem Maße davon abhängig ist, in welchem Milieu sich diese Substanz befindet, ermöglichte es diesen Assay zu vereinfachen.^{145,146} Die Zahl der Waschschriffe wurde erheblich reduziert. Auf diese Weise wurde ein neuer, anwendungsfreundlicher, HTS-fähiger Assay zur funktionellen Untersuchung von P-gp entwickelt. Dieser Assay soll zu einer erfolgreichen Charakterisierung der sogenannten H-Seite beitragen.

Abb. 3.48 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von A2780 Adr Zellen in Gegenwart von 5 µmol/l Hoechst 33342. Die Zellen wurden analog zur Durchführung des modifizierten Hoechst Assays mit Hoechst 33342 inkubiert, das extrazellulär lokalisierte Hoechst 33342 wurde nicht durch Waschen entfernt. Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme wird deutlich, wie ausgeprägt der Unterschied von extrazellulärer und zellulärer Fluoreszenzintensität von Hoechst 33342 ausfällt.

Aufgrund seines hohen logP-Wertes besitzt Hoechst 33342 ($\log P = 4,56 \pm 1,13$, berechnet mit ACD) eine hohe Tendenz sich in die Zellmembran einzulagern. Gerade diese Eigen-

schaft ist von besonderer Bedeutung, da das Volumen der Zellen nur etwa 0,05% des Gesamtvolumens ausmacht.

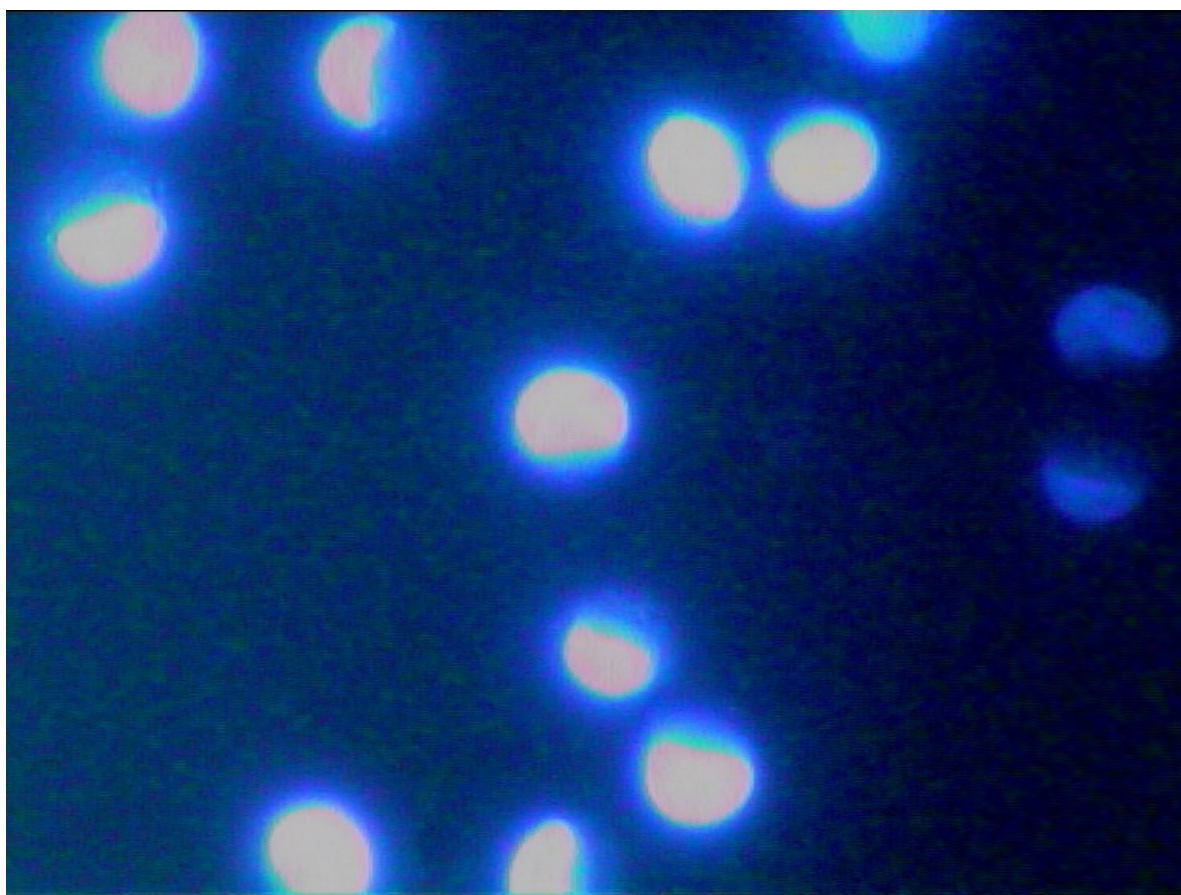


Abb. 3.48: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von A2780 Adr Zellen, die mit 5 µmol/l Hoechst 33342 inkubiert und vor der Aufnahme nicht gewaschen wurden.

Das berechnete Volumen von 0,05% resultiert unter der Annahme, dass die Zellen etwa einen Durchmesser von 15,7 µm aufweisen und eine kugelförmige Gestalt besitzen. Der Radius der Zellen wurde mit Hilfe des CASY® 1 Modell TT-Gerätes ermittelt. Die Berechnung bezieht sich auf 27000 Zellen pro Well einer 96er-Mikrotiterplatte.

Die hohe Tendenz von Hoechst 33342 sich in die Membran einzulagern, ist von besonderer Bedeutung. Wurde bei der Durchführung des Assays Hoechst 33342 gegen Hoechst 33258 ausgetauscht, so konnte trotz Präinkubation der A2780 Adr Zellen mit 3 µmol/l XR9577 keine Veränderung der Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle (A2780 Adr Zellen + KHP) festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung könnte die verringerte Affinität von Hoechst 333258 zur Membran sein. Diese Theorie kann durch einen Vergleich der berechneten logP-Werte der beiden Verbindungen untermauert werden: $\log P_{(\text{Hoechst } 33258)} = 3,49 \pm 1,13$, $\log P_{(\text{Hoechst } 33342)} = 4,56 \pm 1,13$.

In Abb. 3.49 ist eine Fluoreszenz-Zeitkurve für A2780 Adr Zellen wiedergegeben, die mit WK-X-34 in einer finalen Konzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ präinkubiert wurden (schwarze Vierecke). Nicht gefüllte Kreise kennzeichnen A2780 Zellen, die nicht mit einem Modulator versetzt wurden. Die farblosen Vierecke beschreiben den Fluoreszenz-Zeit-Verlauf von KHP ohne Zellen. Bei Betrachtung von Abb. 3.49 wird offensichtlich, dass sich die Fluoreszenz-Zeit-Verläufe für A2780 Adr Zellen in Gegenwart des Inhibitors WK-X-34 (schwarze Vierecke) und von A2780 Zellen ohne WK-X-34 (nicht gefüllte Kreise) nicht unterscheiden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die A2780 Adr Zellen mit einer P-gp vollständig inhibierenden Konzentration des Modulators WK-X-34 behandelt wurden.

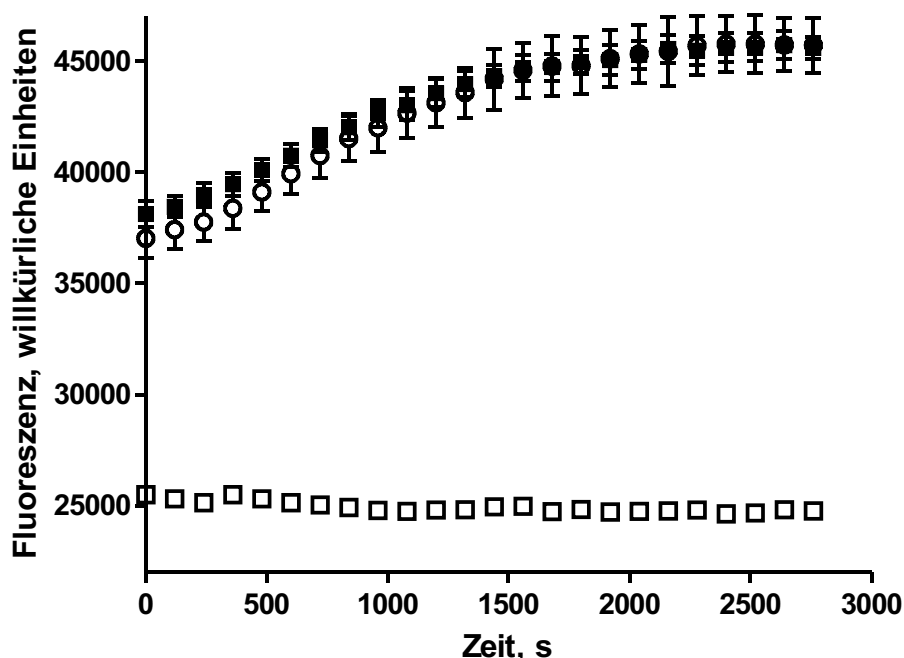


Abb. 3.49: Vergleich von verschiedenen Fluoreszenz-Zeitkurven von Hoechst 33342 (Endkonzentration 5 $\mu\text{mol/l}$): KHP ohne Zellen und ohne Modulator (nicht gefüllte Vierecke), A2780 Adr Zellen, präinkubiert mit 5 $\mu\text{mol/l}$ WK-X-34 (gefüllte Vierecke) und A2780 Zellen ohne Modulator (nicht gefüllte Kreise).

Bisherige Untersuchungen mit dem Calcein AM Assay belegen, dass die Konzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ des Modulators WK-X-34 eine nahezu vollständige Hemmung von P-gp hervorruft (vergl. Kap. 3.2 und 3.3). In Abb. 3.50 sind für verschiedene Konzentrationen des Modulators WK-X-34 die exponentiell verlaufenden Fluoreszenz-Zeitkurven dargestellt. Anhand der Abbildung wird offensichtlich, dass die Zunahme der Modulatorkonzentration

WK-X-34 mit einem höheren Anstieg der Fluoreszenz einhergeht. Die nach dem Modell einphasiger exponentieller Assoziation analysierten Fluoreszenz-Zeit-Verläufe haben nach etwa 2700 s ihre maximal mögliche Fluoreszenz erreicht. Für die Auswertung der dargestellten Fluoreszenz-Zeit-Verläufe wurden die sogenannten Y_{\max} -Werte herangezogen.

In Abb. 3.51 ist nur der vordere Abschnitt (0-1000 s) der in Abb. 3.50 dargestellten Fluoreszenz-Zeit-Verläufe dargestellt. Solange die extrazelluläre Konzentration von Hoechst 33342 noch nicht signifikant abgenommen hat, liegt eine Reaktionskinetik pseudonullter Ordnung vor, die erst später in eine Reaktionskinetik erster Ordnung übergeht.

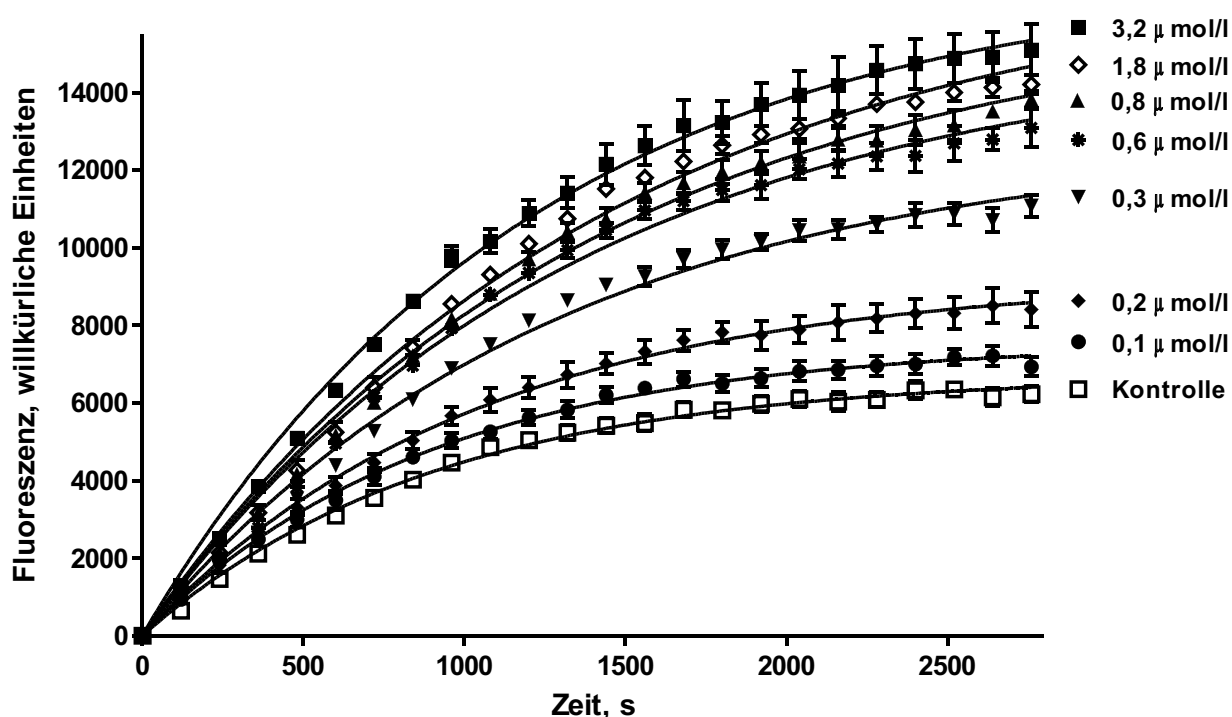


Abb. 3.50: Fluoreszenz-Zeitkurven für verschiedene Konzentrationen des Modulators WK-X-34, die mit Hilfe des neu entwickelten Hoechst Assays an A2780 Adr Zellen generiert wurden (0-2760 s). Die Fluoreszenz-Zeitkurven wurden nach dem Modell der einphasig exponentiellen Assoziation analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler eines typischen Experiments mit sechs Replikaten aus einer Serie vier unabhängiger Versuche.

Sowohl die Y_{\max} -Werte aus Abb. 3.50 als auch die Anstiege aus Abb. 3.51 können für die Generierung von Konzentrations-Wirkungskurven verwendet werden. Die folgende Abb. 3.52 enthält zwei Konzentrations-Effektcurven: Nicht gefüllte Kreissymbole beziehen sich auf die Y_{\max} -Werte der Fluoreszenz-Zeitkurven aus Abb. 3.50 (rote sigmoidale Kurve in Abb. 3.52). Schwarze Kreissymbole beschreiben die Konzentrations-Effektkurve, die auf

den linearen Anstiegen aus Abb. 3.51 basiert (schwarze sigmoidale Kurve in Abb. 3.52). Wie in Abb. 3.52 zu erkennen ist, unterscheiden sich die beiden Konzentrations-Wirkungskurven weder hinsichtlich ihrer pIC_{50} -Werte noch Hillkoeffizienten (Nachweis mittels F-test). (Top- und Bottomwerte sind aufgrund der Normalisierung der Daten nicht signifikant voneinander verschieden.) Beide Auswertungsverfahren – lineare Regression und einphasige exponentielle Assoziation – führen zum gleichen Ergebnis (vergl. pIC_{50} -Werte) und sind damit geeignet, die entsprechenden Aktivitätswerte zu ermitteln. Die Auswertung des quasi linearen Anstiegs wurde aufgrund der damit verbundenen kürzeren Messdauer präferiert.

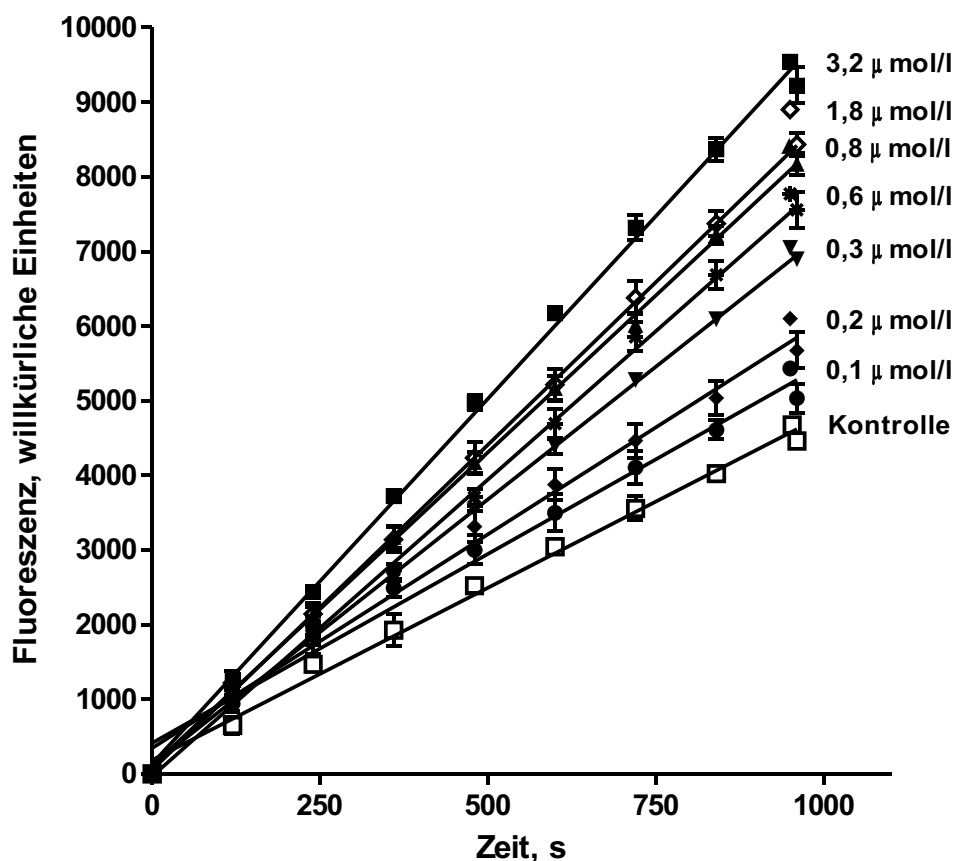


Abb. 3.51: Fluoreszenz-Zeit Kurven (quasi linearer Ausschnitt) für verschiedene Konzentrationen des Modulators WK-X-34 (neu entwickelter Hoechst Assay, A2780 Adr Zellen, 0-1000 s). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler eines typischen Experiments mit sechs Replikaten aus einer Serie vier unabhängiger Versuche.

Ein Vergleich des neuentwickelten Hoechst Assays mit der Standardmethode, die einige aufwändige Waschschrte beinhaltet, ist in Abb. 3.53 dargestellt.

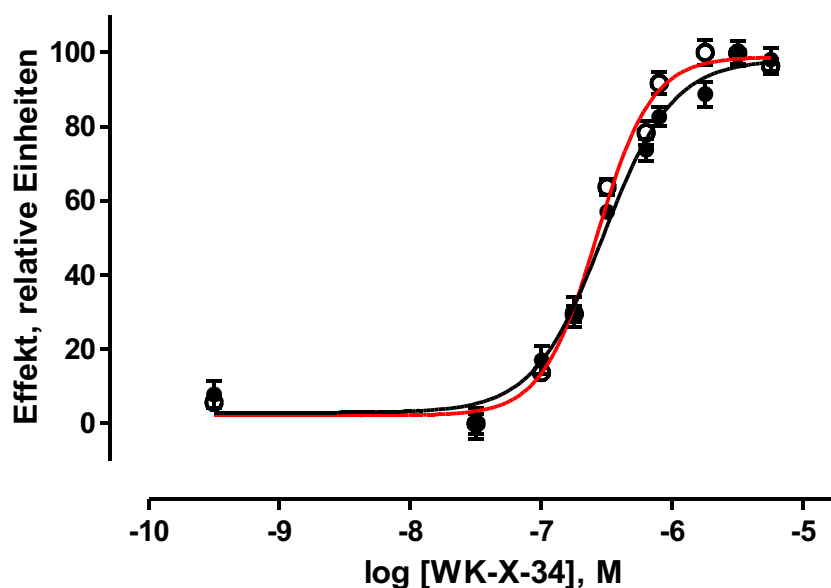


Abb. 3.52: Vergleich der Konzentrations-Effektkurven von WK-X-34 an A2780 Adr Zellen, modifizierter Hoechst Assay: lineare Regression (schwarze Kreise) und einphasige exponentielle Assoziation (nicht gefüllte Kreissymbole): pIC_{50} (lin.) = $6,53 \pm 0,04$, $n_H = 1,63 \pm 0,24$; pIC_{50} (exp.) = $6,58 \pm 0,04$, $n_H = 2,08 \pm 0,30$ ($n \geq 3$).

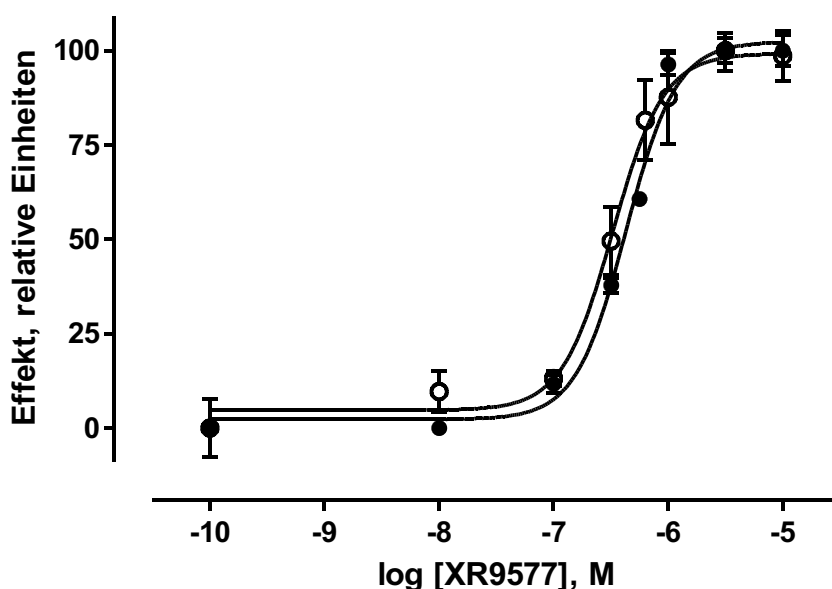


Abb. 3.53: Konzentrations-Effektkurven für XR9577 (A2780 Adr Zellen): Standard Hoechst Assay (nicht gefüllte Kreissymbole), modifizierter Hoechst Assay (schwarze Kreise). Standard Methode: $pIC_{50} = 6,36 \pm 0,07$, $n_H = 2,27 \pm 0,26$, modifizierte Variante: $pIC_{50} = 6,49 \pm 0,08$, $n_H = 1,96 \pm 0,53$.

Man erkennt, dass die Konzentrations-Effektkurven nicht differieren (schwarze Kreissymbole: neuartiger Hoechst Assay, nicht gefüllte Kreissymbole: Standard Hoechst Assay). Ein Vergleich dieser beiden Methoden für die Verbindungen XR9456 und Verapamil zeigte wiederum, dass die mit dem Standard-Hoechst-Assay und dem modifizierten Hoechst Assay bestimmten Ergebnisse nicht voneinander abweichen (Konzentrations-Effektkurven nicht dargestellt).

Die Tabelle 3.25 beinhaltet pIC_{50} -Werte und Hillkoeffizienten für Verbindungen, die mit Hilfe des neu entwickelten Hoechst Assays analysiert wurden.

Tabelle 3.25: Verbindungen, die mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten Hoechst Assays an A2780 Adr Zellen untersucht wurden: Gemittelte pIC_{50} -Werte und Hillkoeffizienten beziehen sich auf mindestens drei unabhängige Experimente.

Verbindung	$pIC_{50} \pm SD$	$n_H \pm SD$
Cyclosporin A	5,85 \pm 0,05	3,11 \pm 0,23
Diltiazem	4,24 \pm 0,16	1,00
H 12	5,04 \pm 0,10	1,49 \pm 0,10
H 15	5,70 \pm 0,18	2,84 \pm 0,95
Imatinib	4,88 \pm 0,16	1,00
Nicardipin	5,29 \pm 0,16	1,34 \pm 0,21
Progesteron	4,31 \pm 0,14	1,36 \pm 0,14
Reserpin	5,52 \pm 0,12	1,34 \pm 0,28
Verapamil	5,18 \pm 0,20	1,00
Vinblastin	5,00 \pm 0,02	2,61 \pm 0,62

Neben H 12 und H 15 sind in Tabelle 3.25 nur bekannte Substrate und Modulatoren enthalten. Von den aufgeführten Verbindungen ist Cyclosporin A der potenteste Inhibitor. Die biologische Aktivität von Cyclosporin A übertrifft die von Diltiazem um mehr als den Faktor 40. Verapamil hemmt P-gp in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Calcein AM Assays in geringerem Maße als Cyclosporin A, aber wesentlich stärker als Diltiazem. Imatinib, ein Tyrosinkinase-Inhibitor, kann aufgrund dieser Eigenschaft möglicherweise auch mit den Nukleotidbindungsstellen in Wechselwirkung treten. Genauso ist aber auch eine Interaktion mit den transmembranär lokalisierten Bindungsstellen von P-gp denkbar. Welcher dieser beiden potenziellen Mechanismen von Imatinib gegenüber P-gp zum Tragen kommt, kann mit Hilfe des Hoechst Assays in dieser Form nicht aufgeklärt werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

In Abb. 3.54 sind die pIC_{50} -Werte, die mit Hilfe des Hoechst Assays ermittelt wurden, gegen die pIC_{50} -Werte, die mit dem Calcein AM Assay bestimmt wurden, aufgetragen. Der quadrierte Korrelationskoeffizient von 0,96 unterstreicht, dass beide Testsysteme zu vergleichbaren Ergebnissen führen, obwohl Hoechst mit einer anderen von Calcein AM (bzw. Rhodamin 123) verschiedenen Bindungsstelle interagieren soll. Das 95%-Konfidenzintervall der Steigung der Regressionsgeraden schließt den Wert 1 ein.

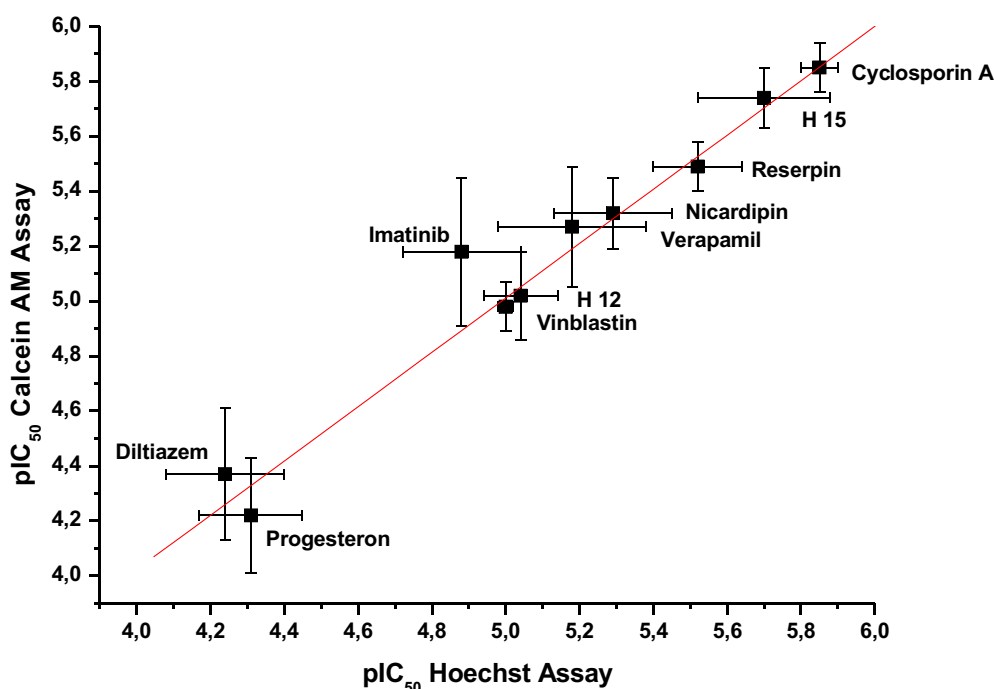


Abb. 3.54: pIC_{50} -Werte und Standardabweichungen von zehn verschiedenen Verbindungen, die mit Hilfe des Calcein AM Assays und des neuentwickelten Hoechst Assays an A2780 Adr Zellen bestimmt wurden. $r^2 = 0,96$.

Wie bereits in Kap. 3.2 beschrieben, interagiert Natriumorthovanadat mit ADP, fördert so die Stabilisierung des ADP-gebundenen Übergangszustandes von P-gp und unterbindet damit dessen ATP-abhängige Transportfunktion.^{184,185,186} Orthovanadat führt im Gegensatz zum Calcein AM Assay (vergl. Kap. 3.3) im Hoechst Assay zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Fluoreszenz, wie Abb. 3.55 illustriert.

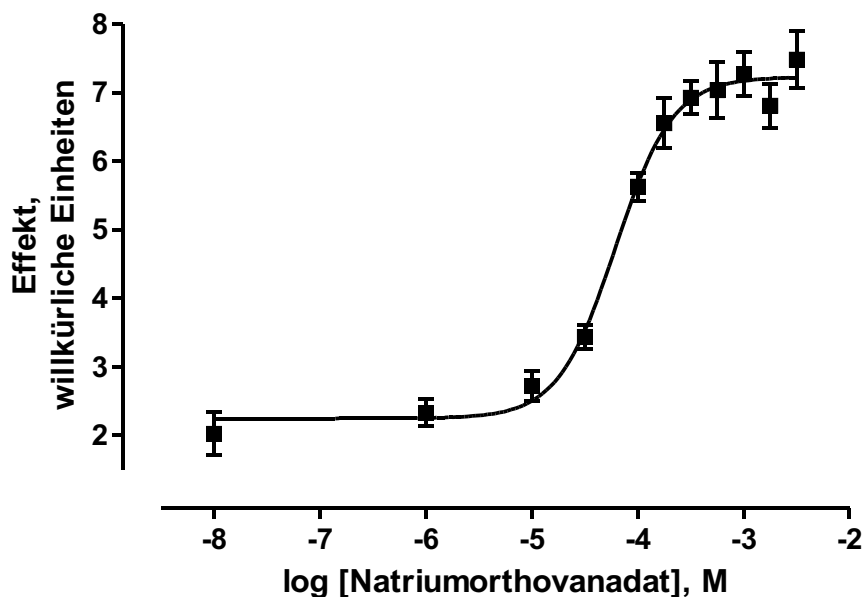


Abb. 3.55: Hoechst Assay, A2780 Adr Zellen: Konzentrations-Effektkurve für Natriumorthovanadat: $pIC_{50} = 4,21 \pm 0,05$, $n_H = 1,61 \pm 0,23$. Beispiel für ein typisches Experiment aus einer Serie von drei unabhängigen Einzelerperimenten.

Die direkte Messung der P-gp Funktion mit Hilfe von Hoechst 33342 ist der indirekten, auf der enzymatischen Umwandlung von Calcein AM zu Calcein basierenden Methode zur Detektion der P-gp Funktion vorzuziehen. Die enzymatische Umwandlung von Calcein AM zu Calcein entfällt und kann die Ergebnisse nicht beeinflussen. Außerdem wird die Hoechst Fluoreszenz durch Natriumorthovanadat nicht gequenchet, was durch entsprechende Kontrollexperimente nachgewiesen werden konnte.

Ein Vorteil des Hoechst Assays gegenüber dem Calcein AM Assay besteht in der Möglichkeit, einen besseren Einblick in den Zusammenhang zwischen der Temperatur und der P-gp- Funktion zu erlangen. Durch einen Vergleich von zwei Konzentrations-Effektkurven, die bei 26°C und 37°C (vergl. Abb. 3.30) mit Hilfe des Calcein AM Assays generiert wurden, konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse von der Temperatur beeinflusst werden. Für eine Klärung des Zusammenhangs zwischen Temperatur und P-gp-Funktion ist der Calcein AM Assay aber nur bedingt brauchbar, da die enzymatische Umsetzung von Calcein AM in Calcein ebenfalls temperaturabhängig ist.

Für die praktische Durchführung wurde der Microplatereader, der die Möglichkeit aufweist,

die Temperatur innerhalb des Gerätes anzuheben, in eine Kühlkammer mit einer Temperatur von 5°C platziert. Alle Arbeitsschritte fanden in der Kühlkammer statt. Nach der 30 minütigen Inkubationsphase der Zellen mit den Modulatorkonzentrationen, die ebenfalls innerhalb der Kühlkammer erfolgte, wurde Hoechst 33342 (Endkonzentration: 5 µmol/l) zu den Zellen gegeben und die sofortige Vermessung der Hoechst-Fluoreszenz vorgenommen. Erst jetzt wurde das Temperaturprogramm des Microplatereaders zur geräteinternen Anhebung der Temperatur auf 37°C gestartet. In Abb. 3.56 sind die Fluoreszenz-Zeit-Verläufe für A2780 Adr Zellen in Gegenwart (schwarze Vierecke) und Abwesenheit (nicht gefüllte Vierecke) von 300 µmol/l Verapamil zu erkennen. Subtrahiert man von der Fluoreszenz-Zeitkurve, die in Anwesenheit von Verapamil aufgenommen wurde, die untere Fluoreszenz-Zeitkurve, so resultiert der in rot hervorgehobene Fluoreszenz-Zeit-Verlauf. Anhand dieser Kurve wird deutlich, dass bis 1000 s (entspricht einer Temperatur von 22°C) sich die Anwesenheit des Modulators Verapamil gegenüber P-gp nicht bemerkbar machte (s. auch Abb. 3.57).

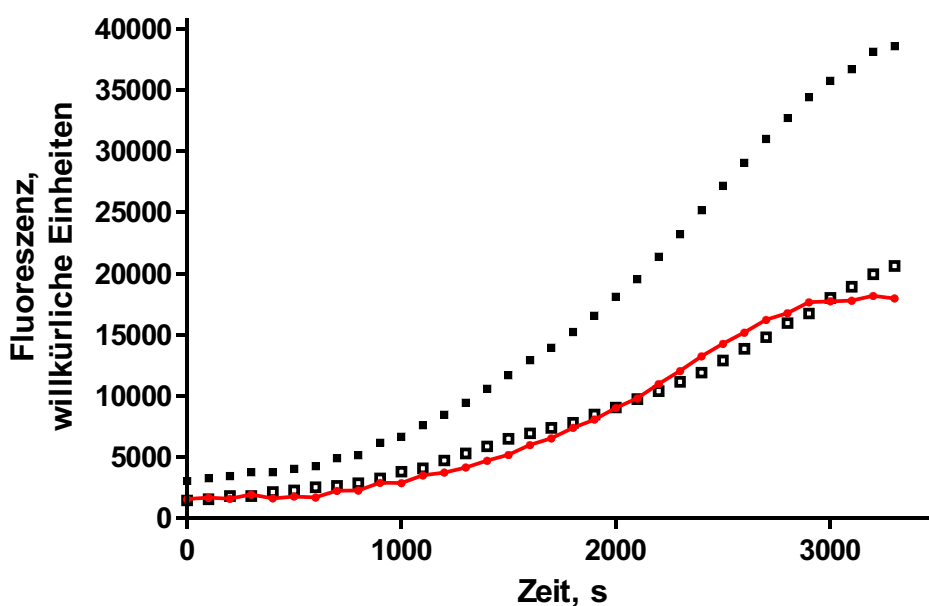


Abb. 3.56: Temperaturabhängigkeit der P-gp Funktion, Hoechst Assay, A2780 Adr Zellen. Schwarze Vierecke: A2780 Adr in Gegenwart von 300 µmol/l Verapamil, nicht gefüllte Vierecke: A2780 Adr Zellen ohne Verapamil. Rot: Differenzkurve.

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss beachtet werden, dass während der Messung nur die Temperatur im Gerät detektiert wurde, aber diese nicht genau mit der Temperatur in der Zellsuspension übereinstimmte. Die Temperatur innerhalb der Zellsuspension muss unterhalb der Temperatur im Gerät gelegen haben. Eine exakte Festlegung, ab welcher Temperatur P-gp seine Funktion vollständig erreicht hat, kann auf Basis dieser Daten nicht angegeben werden. Die Ergebnisse ermöglichen es aber, einen besseren Eindruck über die Temperaturabhängigkeit der P-gp Funktion zu erlangen.

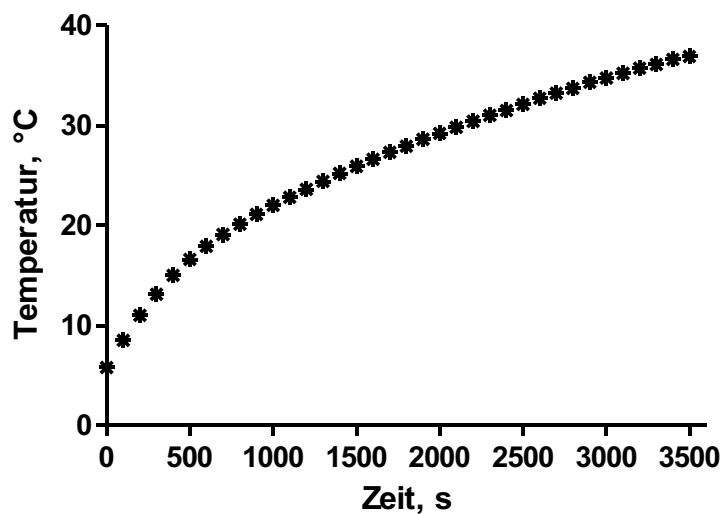
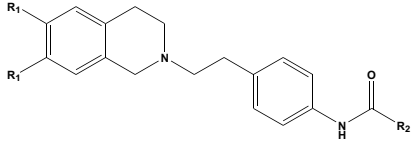


Abb. 3.57: Temperaturverlauf im Microplatereader während des in Abb. 3.58 dargestellten Experimentes.

3.9 Untersuchung von kleinen WK-Modulatoren mit Hilfe des Calcein AM und Hoechst Assays

Die biologischen Aktivitätswerte der sogenannten kleinen WK-X- und WK-Y-Modulatoren wurden mit Hilfe des Calcein AM und Hoechst Assays bestimmt.

Tabelle 3.26: Strukturen, pIC_{50} -Werte und Hillkoeffizienten der sogenannten kleinen WK-X- und WK-Y-Modulatoren (Calcein AM und Hoechst Assay, A2780 Adr Zellen, $n \geq 3$).

Substanz	R_1	R_2	$pIC_{50} \pm SD$ (CAL-AM)	$n_H \pm SD$ (CAL-AM)	$pIC_{50} \pm SD$ (Hoechst)	$n_H \pm SD$ (Hoechst)
						
WK-X-14	OCH ₃	2-Nitrophenyl	5,32 ± 0,10	1,00	5,26 ± 0,03	1,00
WK-X-15	H	2-Nitrophenyl	4,91 ± 0,11	1,50 ± 0,37	4,87 ± 0,02	1,00
WK-X-16	OCH ₃	2-Aminophenyl	5,04 ± 0,07	1,36 ± 0,22	4,95 ± 0,24	1,00
WK-X-17	H	2-Aminophenyl	5,03 ± 0,24	1,00	5,02 ± 0,04	1,00
WK-X-30	OCH ₃	4-Nitrophenyl	5,96 ± 0,14	1,46 ± 0,24	5,86 ± 0,06	1,54 ± 0,33
WK-X-31	H	4-Nitrophenyl	5,35 ± 0,13	2,02 ± 0,35	5,30 ± 0,16	1,75 ± 0,45
WK-X-33	OCH ₃	4-Aminophenyl	5,39 ± 0,19	1,00	5,15 ± 0,09	1,00
WK-X-37	H	4-Aminophenyl	4,69 ± 0,22	1,00	5,38 ± 0,32	1,00
WK-X-47	H	3-Aminophenyl	4,89 ± 0,09	2,07 ± 0,68	-	-
WK-X-51	OCH ₃	3-Chinolinylyl	6,19 ± 0,10	1,82 ± 0,40	6,84 ± 0,25	1,48 ± 0,27
WK-X-52	H	3-Chinolinylyl	6,28 ± 0,04	1,71 ± 0,47	6,38 ± 0,09	1,69 ± 0,38
WK-X-56	OCH ₃	3,4-Dimethoxyphenyl	5,38 ± 0,19	1,00	5,27 ± 0,25	1,00
WK-X-57	OCH ₃	4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl	5,21 ± 0,34	1,00	5,31 ± 0,14	1,00
WK-X-58	OCH ₃	4-Chinolinylyl	5,55 ± 0,33	1,00	5,65 ± 0,27	1,00
WK-X-66	OCH ₃	3,4-Methylenedioxyphenyl	5,71 ± 0,11	1,44 ± 0,22	5,85 ± 0,19	1,37 ± 0,16
WK-Y-1	OCH ₃	2-Bromphenyl	5,37 ± 0,24	2,43 ± 0,72	5,46 ± 0,54	1,98 ± 0,48
WK-Y-2	OCH ₃	3-Bromphenyl	5,64 ± 0,23	1,63 ± 0,39	5,49 ± 0,63	1,94 ± 0,52
WK-Y-3	OCH ₃	4-Bromphenyl	5,50 ± 0,22	2,05 ± 0,31	5,61 ± 0,37	1,37 ± 0,06
WK-Y-15	OCH ₃	Phenyl	5,32 ± 0,27	1,00	-	-
WK-Y-25	OCH ₃	1-Naphthyl	5,85 ± 0,12	1,54 ± 0,10	5,73 ± 0,18	1,00
WK-Y-26	OCH ₃	2-Naphthyl	6,11 ± 0,11	1,66 ± 0,29	6,11 ± 0,37	1,93 ± 0,33
WK-Y-27	OCH ₃	2-Chinoxalinylyl	6,31 ± 0,04	2,26 ± 0,63	6,68 ± 0,16	1,90 ± 0,53
WK-Y-28	OCH ₃	2-Chinolinylyl	6,07 ± 0,18	1,78 ± 0,49	6,11 ± 0,20	1,75 ± 0,48
WK-Y-29	OCH ₃	3-Pyridyl	5,38 ± 0,05	1,00	5,50 ± 0,23	1,00
WK-Y-30	OCH ₃	6-Chinolinylyl	6,14 ± 0,16	1,73 ± 0,48	6,13 ± 0,21	1,51 ± 0,33

3 Ergebnisse und Diskussion

In Tabelle 3.26 sind die Strukturen, die pIC_{50} -Werte und Hillkoeffizienten der WK-X- und WK-Y-Modulatoren angegeben. Diese Verbindungen können ebenfalls als Tariquidar-Analoga angesehen werden. In Übereinstimmung mit den sogenannten großen Tariquidar-Analoga besitzen diese eine Tetrahydroisochinolin-ethylenphenylamin-Partialstruktur, die über unterschiedliche funktionelle Gruppen mit dem hydrophoben Rest verbunden ist: (i) Carbonsäureamid, (ii) Harnstoff, (iii) Acetamid, (iv) Oxyacetamid bzw. Methylethercarbonsäureamid.

Im Gegensatz zu den großen Tariquidar-Analoga (vergl. Tabelle 3.19) besitzen die kleinen Inhibitoren immer nur eine Carbonsäureamidfunktion und keinen zweiten Substituenten dieser Art. In Tabelle 3.27 sind die Strukturen, Aktivitätswerte und Hillkoeffizienten von drei großen Tariquidar-Analoga aufgeführt. Die pIC_{50} -Werte dieser Verbindungen wurden mit dem Hoechst Assay bestimmt.

Tabelle 3.27: Strukturen von WK-X-34, XR9577 und XR9456. pIC_{50} -Werte und Hillkoeffizienten, die mittels des Hoechst Assays an A2780 Adr Zellen ermittelt wurden ($n \geq 3$).

Verbindung	X	R ₁	R ₂	Sub.	$pIC_{50} \pm SD$	$n_H \pm SD$
Tariquidaranaloga - Große Verbindungen						
XR9456	dB	OCH ₃	Phenyl	ortho	6,29 ± 0,06	1,89 ± 0,33
XR9577	dB	H	3-Chinolinylnyl	ortho	6,45 ± 0,07	1,89 ± 0,35
WK-X-34	dB	OCH ₃	3,4-Dimethoxyphenyl	ortho	6,48 ± 0,15	2,53 ± 0,47

Trägt man die 26 pIC_{50} -Werte der in Tabelle 3.26 und 3.27 angegebenen Modulatoren (23 kleine und 3 große Tariquidar-Analoga) des Hoechst Assays gegen die pIC_{50} -Werte des Calcein AM Assays auf (vergl. Tabelle 3.19 und 3.26), so resultiert eine gute Korrelation, wie Abb. 3.58 wiedergibt ($r^2 = 0,85$).

Diese Korrelation wird noch wesentlich ausgeprägter, wenn die Verbindungen WK-X-51, WK-X-37 und WK-Y-27, die in Abb. 3.58 hervorgehoben sind, ausgelassen werden. Das Bestimmtheitsmaß steigt dann von 0,85 auf 0,95 an. Das 95%-Konfidenzintervall der Steigung der Regressionsgeraden schließt den Wert 1 ein.

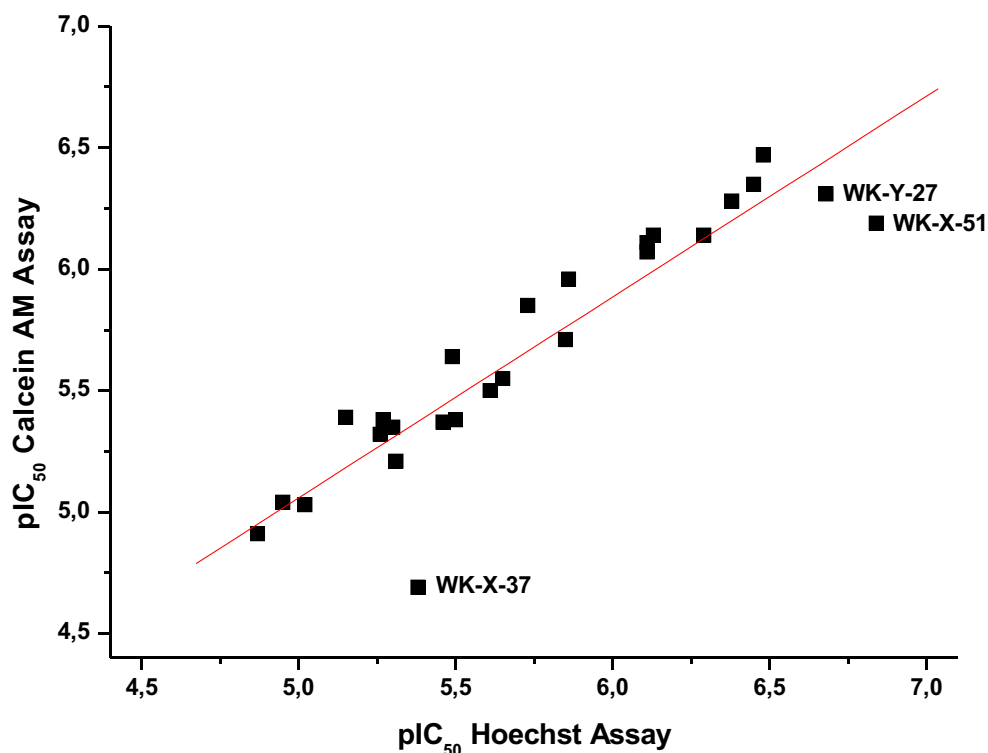


Abb. 3.58: Korrelation der pIC_{50} -Werte von 26 verschiedenen Modulatoren, die mit Hilfe des Calcein AM und des Hoechst Assays ermittelt wurden ($r^2 = 0,85$).

Aufgrund der in Tabelle 3.26 aufgeführten strukturellen Charakteristika und der biologischen Aktivitätswerte können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

- Eine in para-Position lokalisierte Nitrogruppe des Phenyl-Substituenten R_2 führt im Gegensatz zu einer Nitrogruppe in ortho-Position zu einer verstärkten Inhibition von P-gp. Dies ergibt sich aus dem Vergleich der mit Hilfe des Calcein AM Assays bestimmten pIC_{50} -Werte der ortho-Nitro-Derivate WK-X-14 ($pIC_{50} = 5,32 \pm 0,10$) und WK-X-15 ($pIC_{50} = 4,91 \pm 0,11$) mit den pIC_{50} -Werten der analogen para-Nitro-Derivate WK-X-30 ($pIC_{50} = 5,96 \pm 0,14$) und WK-X-31 ($pIC_{50} = 5,35 \pm 0,13$). Auch im Hoechst Assay sind die Modulatoren WK-X-30 ($pIC_{50} = 5,86 \pm 0,06$) und WK-X-31 ($pIC_{50} = 5,30 \pm 0,16$) gegenüber ihren 2-Nitrophenyl-Analoga WK-X-14 ($pIC_{50} = 5,26 \pm 0,03$) und WK-X-15 ($pIC_{50} = 4,87 \pm 0,02$) hinsichtlich ihrer Hemmwirkung überlegen.

- WK-X-33 und WK-X-37 besitzen in para-Position des Phenylrestes R₂ eine Aminofunktion. Die pIC₅₀-Werte von WK-X-33 (pIC₅₀ = 5,39 ± 0,19) und WK-X-37 (pIC₅₀ = 4,69 ± 0,22) sind im Calcein AM Assay deutlich kleiner als die pIC₅₀-Werte der korrespondierenden Nitro-Analoga WK-X-30 (pIC₅₀ = 5,96 ± 0,14) und WK-X-31 (pIC₅₀ = 5,35 ± 0,13). Auch im Hoechst Assay hemmt das para-Nitro-Derivat WK-X-30 verglichen mit seinem para-Amino-Analogen WK-X-33 (pIC₅₀ = 5,15 ± 0,09) P-gp in ausgeprägterem Maße. Ein para-Nitro-Substituent des Phenylrestes R₂ ist gegenüber einem para-Amino-Substituenten eher bevorzugt, wenn auch im Hoechst Assay für WK-X-31 und WK-X-37 vergleichbare pIC₅₀-Werte bestimmt wurden.
- Die Methoxygruppen in Position 6 und 7 des Tetrahydroisochinolinrings sind als Substituenten (R₁) erwünscht, da sie in den meisten Fällen zu einer verbesserten Hemmung von P-gp beitragen. Dies wird durch den Vergleich der pIC₅₀-Werte folgender Substanzen deutlich: (i) WK-X-14 (pIC₅₀ = 5,32 ± 0,10) und WK-X-15 (pIC₅₀ = 4,91 ± 0,11). (ii) WK-X-30 (pIC₅₀ = 5,96 ± 0,14) und WK-X-31 (pIC₅₀ = 5,35 ± 0,13). (iii) WK-X-33 (pIC₅₀ = 5,39 ± 0,19) und WK-X-37 (pIC₅₀ = 4,69 ± 0,22). Auch anhand der mit Hilfe des Hoechst Assays ermittelten Aktivitätswerte wird offensichtlich, dass die P-gp inhibitorische Wirkung in der Regel ansteigt, wenn der allen Verbindungen gemeinsame Tetrahydroisochinolinring in Position 6 und 7 Methoxygruppen aufweist. Dies zeigt sich, wenn man die Aktivitätswerte verschiedener Modulatoren mit und ohne Methoxygruppen vergleicht: WK-X-51 (pIC₅₀ = 6,84 ± 0,25) und WK-X-52 (pIC₅₀ = 6,38 ± 0,09); WK-X-14 (pIC₅₀ = 5,26 ± 0,03) und WK-X-15 (pIC₅₀ = 4,87 ± 0,02); WK-X-30 (pIC₅₀ = 5,86 ± 0,06) und WK-X-31 (pIC₅₀ = 5,30 ± 0,16).
- Bei Betrachtung der im Hoechst Assay erhaltenen Aktivitätswerte der Substanzen WK-X-51 (pIC₅₀ = 6,84 ± 0,25) und WK-X-58 (pIC₅₀ = 5,65 ± 0,27) fällt auf, dass durch die Veränderung der Richtung, in der sich der Substituent R₂ erstreckt, die Inhibition von P-gp in erheblichem Maße beeinflusst wird. WK-X-58 (4-Chinolin-Derivat) ist ein um mehr als den Faktor 10 schlechterer P-gp Inhibitor als WK-X-51. In Übereinstimmung mit WK-X-51 und WK-X-58 ist das 2-Naphthyl-Derivat WK-Y-26 (pIC₅₀ = 6,11 ± 0,37) potenter als das 1-Naphthyl-Analogen WK-Y-25 (pIC₅₀ = 5,73 ± 0,18). Allerdings fällt für die Naphthyl-Derivate der Unterschied der pIC₅₀-Werte geringer aus. Im Calcein AM Assay beeinflusst eine Veränderung der Orientierung des bicyklischen Ringsystems die biologische Aktivität geringer: WK-X-51 (pIC₅₀ =

$6,19 \pm 0,10$) > WK-X-58 ($pIC_{50} = 5,55 \pm 0,33$). Die pIC_{50} -Werte der Naphthyl-Analoga dieser Substanzen verhalten sich analog: Das 2-Naphthyl-Derivat WK-Y-26 ($pIC_{50} = 6,11 \pm 0,11$) ist potenter als das 1-Naphthyl-Derivat WK-Y-25 ($pIC_{50} = 5,85 \pm 0,12$).

- Die Erweiterung des aromatischen, hydrophoben Bereichs von einem Monozyklus (R_2), wie in der Verbindung WK-Y-15 ($pIC_{50} = 5,32 \pm 0,27$) in Form eines unsubstituierten Phenylrestes R_2 gegeben, in einen Bicyklus, der in der Substanz WK-Y-26 ($pIC_{50} = 6,11 \pm 0,11$) als Naphthyl-Substituent vorkommt, trägt zu einer effektiveren Hemmung von P-gp im Calcein AM Assay bei. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen besitzt das 3-Chinolin-Derivat WK-X-51 ($pIC_{50} = 6,19 \pm 0,10$) einen um etwa 0,7 log. Einheiten höheren pIC_{50} -Wert als das 3-Pyridin-Derivat WK-Y-29 ($pIC_{50} = 5,38 \pm 0,05$). Vergleicht man die pIC_{50} -Werte der beiden Verbindungen WK-Y-29 und WK-X-51, die mit Hilfe des Hoechst Assay bestimmt wurden, wird wiederum deutlich, dass die Erweiterung des monozyklischen zu einem bicyklischen Substituenten R_2 für eine stärkere Inhibition von P-gp von Vorteil ist.
- Die Einführung eines weiteren Stickstoffatoms in den 3-Chinolin-Substituenten R_2 , die zu einem Chinoxalin-Heterozyklus wie in WK-Y-27 ($pIC_{50} = 6,31 \pm 0,04$) führt, beeinflusst im Vergleich zu WK-X-51 ($pIC_{50} = 6,19 \pm 0,10$) die biologische Aktivität im Calcein AM Assay nicht. Die Veränderung der Position des Stickstoffatoms im Chinolin-Substituenten (WK-Y-28: 2-Chinolin-Derivat, WK-Y-30: 6-Chinolin-Derivat) ist in diesem Testsystem ohne nennenswerte Auswirkung auf die Höhe des pIC_{50} -Wertes.

Anhand der mittels des Hoechst Assays ermittelten pIC_{50} -Werte wird jedoch offensichtlich, dass die Position des Stickstoffatoms im bicyklischen, heterozyklischen Substituenten R_2 die Höhe des pIC_{50} -Wertes im Hoechst Assay beeinflusst. Das 2-Chinolin-Derivat WK-Y-28 ($pIC_{50} = 6,11 \pm 0,20$) sowie das 6-Chinolin-Derivat WK-Y-30 ($pIC_{50} = 6,13 \pm 0,21$) besitzen im Vergleich zu WK-X-51 wesentlich kleinere pIC_{50} -Werte. Die Einführung eines zweiten Stickstoffatoms in den 3-Chinolin-Substituenten lässt die Hemmwirkung des Modulators nicht weiter ansteigen. WK-Y-27 ($pIC_{50} = 6,68 \pm 0,16$), das in Position R_2 einen 2-Chinoxalin-Rest aufweist, besitzt einen nur unwesentlich kleineren pIC_{50} -Wert als WK-X-51. WK-Y-27 hemmt wie WK-X-51 P-gp im Hoechst Assay stärker als im Calcein AM Assay. Aus den Ergebnis-

sen geht hervor, dass WK-X-51, WK-Y-27 sowie WK-X-37 möglicherweise eine gewisse Präferenz zur Hoechst-Bindungsstelle aufweisen.

3.9.1 Free-Wilson-Analysen von zwölf kleinen WK-Modulatoren

Zwölf ausgewählte kleine WK-Modulatoren wurden mit Hilfe einer Free-Wilson-Analyse untersucht (vergl. Tabelle 3.28). Für die im Hoechst Assay und im Calcein AM Assay bestimmten pIC_{50} -Werte wurden zwei getrennte Free-Wilson-Analysen durchgeführt. Hintergrund für die Verwendung der pIC_{50} -Werte beider Assays war die Frage, ob die gleichen Strukturmerkmale die biologische Wirksamkeit in vergleichbarer Form beeinflussen. Als Referenz wurde für beide Analysen die Substanz WK-X-37 definiert. Diese Substanz ist in Tabelle 3.28 grau unterlegt. Die Deskriptoren für folgende Variablen, die ohne signifikanten Beitrag waren, wurden nach der sogenannten Rückwärtsmethode ausgeschlossen: (i) ortho-Amino, (ii) R_2 3,4-Dimethoxyphenyl, (iii) ortho-Nitrophenyl.

Tabelle 3.28: Free-Wilson-Matrix für kleine WK-Modulatoren, ph. = phenyl, C= Calcein AM Assay, H = Hoechst 33342 Assay. Die Referenz WK-X-37 für die FWA ist grau unterlegt.

Substanz	pIC_{50} (C)	pIC_{50} (H)	R_1 6,7-Di- methoxy	R_2 ortho- Nitroph.	R_2 ortho- Aminoph.	R_2 para- Nitroph.	R_2 para- Aminoph.	R_2 3,4-Dime- thoxyph.	R_2 3-Chino- lin
WK-X-14	5,32	5,26	1	1	0	0	0	0	0
WK-X-15	4,91	4,87	0	1	0	0	0	0	0
WK-X-16	5,04	4,95	1	0	1	0	0	0	0
WK-X-17	5,03	5,02	0	0	1	0	0	0	0
WK-X-30	5,96	5,86	1	0	0	1	0	0	0
WK-X-31	5,35	5,30	0	0	0	1	0	0	0
WK-X-33	5,39	5,15	1	0	0	0	1	0	0
WK-X-37	4,69	5,38	0	0	0	0	1	0	0
WK-X-51	6,19	6,84	1	0	0	0	0	0	1
WK-X-52	6,28	6,38	0	0	0	0	0	0	1
WK-X-56	5,38	5,27	1	0	0	0	0	1	0
WK-X-57	5,21	5,31	1	1	0	0	0	1	0

In Tabelle 3.29 sind die einzelnen Regressionskoeffizienten und deren Standardfehler angegeben, die bei Verwendung der pIC_{50} -Werte des Hoechst und des Calcein AM Assays

3 Ergebnisse und Diskussion

berechnet wurden. Tabelle 3.30 enthält die statistischen Kennzahlen der FWA. Aus diesen Parametern geht hervor, dass mit Hilfe der beiden Regressionsgleichungen die Aktivitätswerte der zwölf Verbindungen gut berechnet werden können.

Tabelle 3.29: Free-Wilson-Analyse von zwölf kleinen WK-Modulatoren: Regressionskoeffizienten und Standardfehler (C = Calcein AM Assay, H = Hoechst 33342 Assay).

	Regressionskoeffizient ± Standardfehler (C)	Regressionskoeffizient ± Standardfehler (H)
Konstante	4,905 ± 0,095	5,000 ± 0,105
(R₁) 6,7-Dimethoxy	+0,346 ± 0,110	+0,241 ± 0,121
(R₂) para-Nitroph.	+0,577 ± 0,148	+0,459 ± 0,163
(R₂) 3-Chinolin	+1,157 ± 0,148	+1,489 ± 0,163

Tabelle 3.30: Statistische Kennzahlen der Free-Wilson-Analyse für zwölf kleine WK-Modulatoren.

Assay	F-Wert	R²	R	Korrigiertes R²	Standardfehler des Schätzers
Calcein AM	23,82	0,90	0,95	0,86	0,19
Hoechst 33342	28,64	0,92	0,96	0,88	0,20

Vergleicht man die einzelnen Regressionskoeffizienten der in Tabelle 3.29 enthaltenen Regressionsgleichungen, so fällt auf, dass nur die Regressionskoeffizienten für den 3-Chinolin-Substituenten signifikant verschieden sind.

Tabelle 3.31: Zwölf kleine WK-X-Modulatoren, gemessene pIC₅₀-Werte (Calcein AM und Hoechst Assay, A2780 Adr Zellen), berechnete pIC₅₀-Werte (Free-Wilson-Analyse) und Residuen.

Substanz	C / pIC₅₀ (gemessen)	C / pIC₅₀ (berechnet)	C / Residuen	H / pIC₅₀ (gemessen)	H / pIC₅₀ (berechnet)	H / Residuen
WK-X-14	5,32	5,25	+0,07	5,26	5,24	+0,02
WK-X-15	4,91	4,91	0,00	4,87	5,00	-0,13
WK-X-16	5,04	5,25	-0,21	4,95	5,24	-0,29
WK-X-17	5,03	4,91	+0,12	5,02	5,00	+0,02
WK-X-30	5,96	5,83	+0,13	5,86	5,70	+0,16
WK-X-31	5,35	5,48	-0,13	5,30	5,46	-0,16
WK-X-33	5,39	5,25	+0,14	5,15	5,24	-0,09
WK-X-37	4,69	4,91	-0,22	5,38	5,00	+0,38
WK-X-51	6,19	6,41	-0,22	6,84	6,73	+0,11
WK-X-52	6,28	6,06	+0,22	6,38	6,49	-0,11
WK-X-56	5,38	5,25	+0,13	5,27	5,24	+0,03
WK-X-57	5,21	5,25	-0,04	5,31	5,24	+0,07

Die Koeffizienten für diesen Substituenten differieren, da für WK-X-51 im Hoechst Assay ein pIC_{50} -Wert von 6,84, aber im Calcein AM nur ein pIC_{50} -Wert von $6,19 \pm 0,10$ ermittelt wurde. Die Residuen und einzelnen berechneten pIC_{50} -Werte können Tabelle 3.31 entnommen werden. Berechnete und gemessene pIC_{50} -Werte stimmen gut (wenn auch nicht perfekt) miteinander überein.

In Abb. 3.59 sind die mit dem Calcein AM Assay bestimmten Aktivitätswerte gegen die unter Anwendung der Regressionsgleichung berechneten pIC_{50} -Werte aufgetragen.

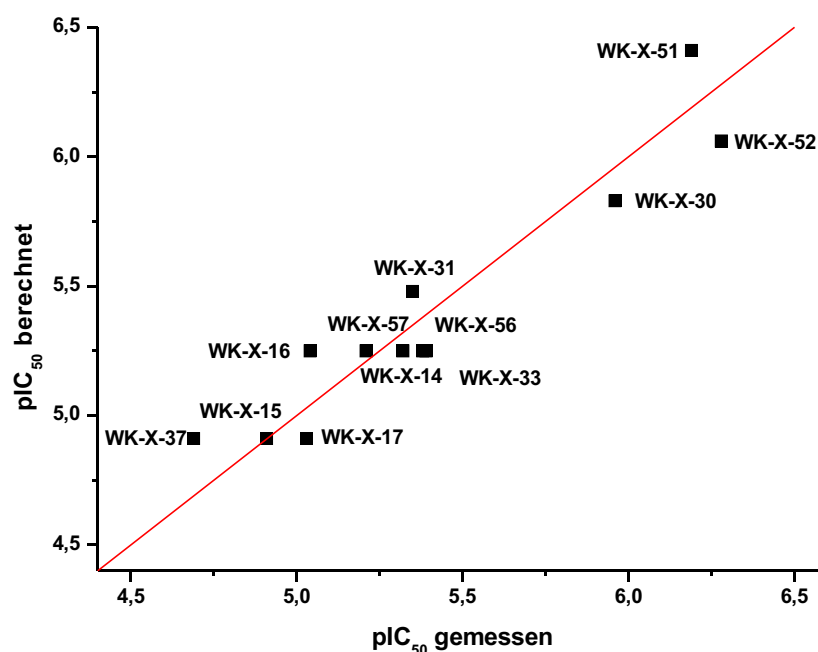


Abb. 3.59: Ergebnisse der FWA. Plot der gemessenen (Calcein AM Assay, A2780 Adr Zellen) gegen die berechneten pIC_{50} -Werte (vergl. Tabelle 3.31) von zwölf kleinen WK-X-Modulatoren, $r^2 = 0,90$.

In Abb. 3.61 ist ein Plot der mit Hilfe des Hoechst Assays ermittelten pIC_{50} -Werte gegen die auf Basis der Regressionsgleichung berechneten Aktivitätswerte wiedergegeben.

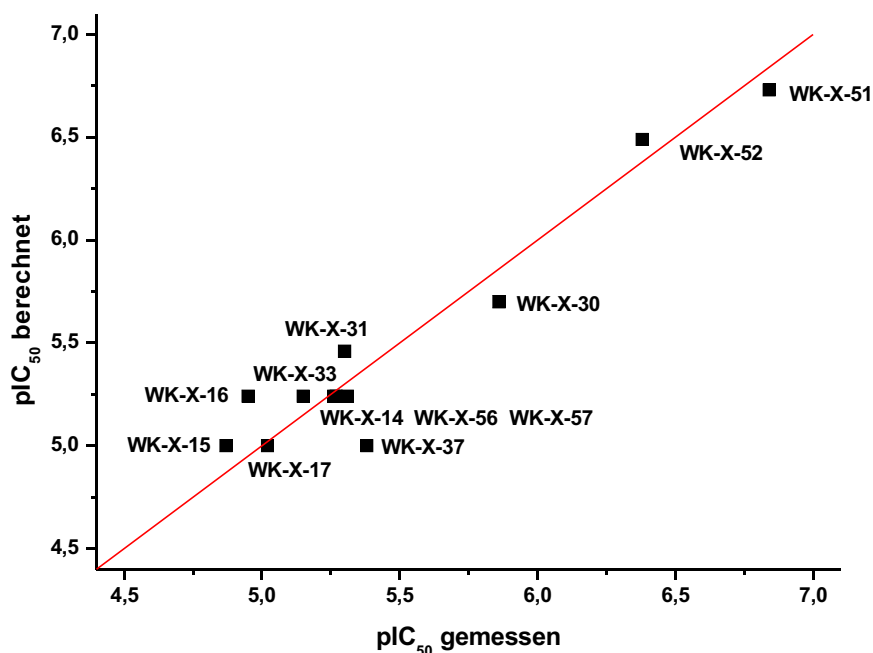


Abb. 3.60: Ergebnisse der FWA. Gemessene gegen berechnete pIC_{50} -Werte (vergl. Tabelle 3.31) für zwölf kleine WK-X-Modulatoren (Hoechst Assay, A2780 Adr Zellen, $n \geq 3$). $r^2 = 0,92$.

Anhand von Tabelle 3.31 wird offensichtlich, dass die Regressionsgleichung, die für die pIC_{50} -Werte im Calcein AM Assay erhalten wurde, für die folgenden vier Verbindungen die schlechteste Vorhersage der Aktivitätsdaten ergibt: WK-X-16, WK-X-37, WK-X-51 und WK-X-52. Wie die experimentellen pIC_{50} -Werte von WK-X-51 und WK-X-52 zeigen, sind die Methoxygruppen am Tetrahydroisochinolinring ohne positiven Beitrag für die biologische Aktivität. Der gemessene pIC_{50} -Wert von WK-X-51 (mit Methoxygruppen in R_1) ist sogar etwas kleiner als der von WK-X-52 (ohne Methoxygruppen in R_1). Dies steht im Gegensatz zu den Aktivitätswerten der meisten anderen Substanzen.

Auch der Aktivitätswert von WK-X-16 unterliegt analog zu den pIC_{50} -Werten von WK-X-51 und WK-X-52 wiederum der Diskrepanz, dass sich der positive Beitrag der Methoxygruppen im experimentellen pIC_{50} -Wert nicht widerspiegelt. Eine genauere Berechnung des pIC_{50} -Wertes von WK-X-37 war nicht möglich, da der Deskriptor für den para-Amino-Substituent eliminiert wurde.

Bei einem Vergleich der mit Hilfe des Hoechst Assays bestimmten pIC_{50} -Werte mit den berechneten pIC_{50} -Werten fällt auf, dass die Residuen für WK-X-16 und WK-X-37 am größten sind. Der mit dem Hoechst Assay ermittelte Aktivitätswert von WK-X-16 ist analog zum

Calcein AM Assay deutlich kleiner als der berechnete pIC_{50} -Wert, da der meist positive Beitrag der Methoxygruppen am Tetrahydroisochinolinring bei dieser Verbindung nicht gefunden wird. Der im Hoechst Assay erhaltene pIC_{50} -Wert von WK-X-37 ist verglichen mit dessen berechneten Aktivitätswert zu hoch. Obwohl WK-X-37 im Gegensatz zu WK-X-33 keine Methoxygruppen am Tetrahydroisochinolinring aufweist, ist dessen Hemmwirkung gegenüber P-gp größer als die von WK-X-33. Da der Aktivitätswert von WK-X-33 unter Einbeziehung der Regressionsgleichung recht genau berechnet werden kann, entfällt ein Einfluß des para-Amino-Substituenten auf die P-gp inhibitorische Wirkung. Damit kann der hohe experimentelle pIC_{50} -Wert von WK-X-37 auf der Basis der Regressionsgleichung nicht gut berechnet werden.

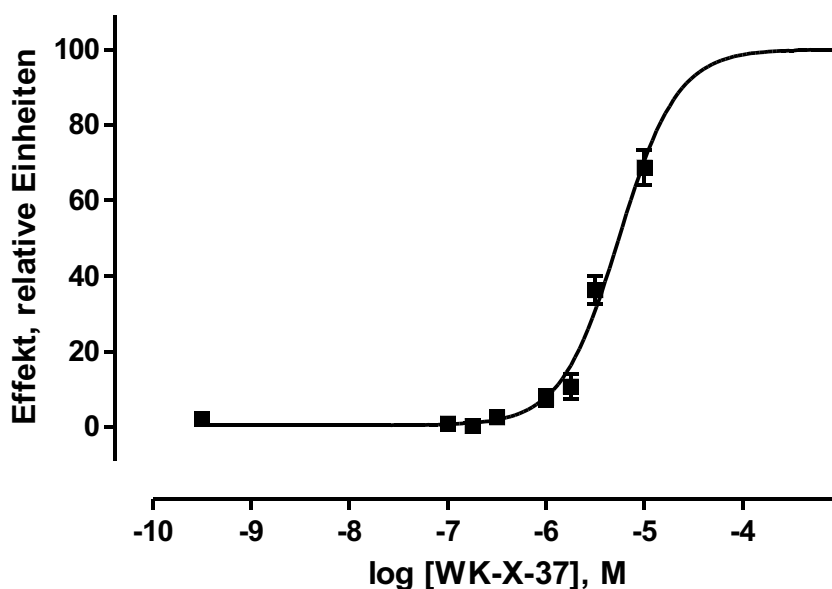


Abb. 3.61: Konzentrations-Effektkurve von WK-X-37 bestimmt mit Hilfe des Hoechst Assays an A2780 Adr Zellen. Beispiel für ein typisches Experiment aus einer Serie von drei unabhängigen Versuchen. $pIC_{50} = 5,26 \pm 0,04$, $n_H = 1,47 \pm 0,13$. Der Top-Wert wurde über Verapamil definiert.

Allgemein unterliegen die Aktivitätswerte der WK-Verbindungen mit eher kleinen pIC_{50} -Werten der Problematik, dass diese aufgrund ihrer geringen Löslichkeit nur bis zu einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ untersucht werden konnten. Die eingesetzten Konzentrationen solcher Substanzen reichten damit nicht aus, um P-gp vollständig zu inhibieren. Die Konzentrations-Effektkurven solcher Substanzen konnten nur durch die Fixierung des

Top-Wertes, der über einen Standard-Modulator wie Verapamil im gleichen Experiment bestimmt wurde, erstellt werden (vergl. Abb. 3.61). Deshalb war die Bestimmung solcher pIC_{50} -Werte ungenauer.

3.9.2 Inhibitoren mit einer veränderten Carbonsäureamidfunktion

Die Strukturen der kleinen WK-Modulatoren, die über eine veränderte Carbonsäureamidfunktion verfügen, sowie die pIC_{50} -Werte und Hillkoeffizienten sind in Tabelle 3.32 wiedergegeben. Unter den sogenannten kleinen Verbindungen ist WK-X-81, wie aus den Tabelle 3.26 und Tabelle 3.32 hervorgeht, die vielversprechendste Substanz im Calcein AM Assay ($pIC_{50} = 6,52 \pm 0,25$).

Tabelle 3.32: Strukturen, pIC_{50} -Werte und Hillkoeffizienten der kleinen WK-X-Modulatoren mit modifiziertem Verknüpfungsbereich zwischen der Tetrahydroisochinolin-ethylenphenylamin-Partialstruktur und dem substituierten Aromaten (Calcein AM Assay, A2780 Adr Zellen, $n \geq 3$).

Verbindung	X	R ₁	R ₂	$pIC_{50} \pm SD$	$n_H \pm SD$
WK-X-46	NH	H	2-Nitrophenyl	$5,71 \pm 0,18$	1,00
WK-X-48	NH	H	2-Aminophenyl	$4,62 \pm 0,10$	$2,07 \pm 0,58$
WK-X-64	CH ₂	OCH ₃	2-Nitrophenyl	$5,43 \pm 0,20$	$1,65 \pm 0,41$
WK-X-65	CH=CH	OCH ₃	4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl	$5,72 \pm 0,16$	$1,49 \pm 0,37$
WK-X-76	NH	OCH ₃	2-Aminophenyl	$4,50 \pm 0,11$	1,00
WK-X-81	CH ₂ O	OCH ₃	2-Nitrophenyl	$6,52 \pm 0,25$	$2,40 \pm 0,71$
WK-X-82	CH ₂ O	OCH ₃	2-Aminophenyl	$5,41 \pm 0,17$	$1,53 \pm 0,25$
WK-X-85	NH	OCH ₃	3-Nitrophenyl	$6,22 \pm 0,11$	$2,50 \pm 0,75$
WK-X-86	NH	OCH ₃	4-Nitrophenyl	$5,34 \pm 0,08$	$2,95 \pm 0,76$
WK-X-89	NH	OCH ₃	4-Aminophenyl	$4,57 \pm 0,12$	$1,63 \pm 0,38$
WK-X-96	CH=CH	OCH ₃	4-Chlorphenyl	$6,18 \pm 0,06$	$2,18 \pm 0,77$
WK-X-97	CH=CH	OCH ₃	Phenyl	$6,04 \pm 0,13$	$2,04 \pm 0,57$

WK-X-81 stellt einen Modulator dar, der im Verknüpfungsbereich zusätzlich zu der Car-

bonsäureamid-Partialstruktur über eine Methyletherfunktion verfügt. Somit wird der Abstand zwischen der Tetrahydroisochinolin-Ethylenphenylamin-Teilstruktur und dem sogenannten hydrophoben Bereich (s. Abb. 3.46) vergrößert. Wird die in WK-X-81 vorhandene Nitro- zur Aminofunktion reduziert, nimmt die Aktivität um etwa das Zehnfache ab (WK-X-82: $pIC_{50} = 5,41 \pm 0,17$). Bei WK-X-64 handelt es sich wie bei WK-X-81 um ein ortho-Nitroderivat, das im Gegensatz zu WK-X-81 nur eine Acetamidfunktion als Verknüpfungslinker besitzt. Der Verlust des Sauerstoffatoms (WK-X-64) ruft eine deutliche Verringerung des pIC_{50} -Wertes hervor: $5,43 \pm 0,20$. Diese Ergebnisse zeigen, wie sich die Verlängerung des Verknüpfungsankers, wie sie in WK-X-81 gegeben ist, auf die Hemmwirkung gegenüber P-gp auswirkt. Die pIC_{50} -Werte der Zimtsäurederivate WK-X-96 und WK-X-97 unterstreichen diese Erkenntnis (WK-X-96: $pIC_{50} = 6,18 \pm 0,06$, WK-X-97: $pIC_{50} = 6,04 \pm 0,13$). Diese Substanzen besitzen eine Acrylamidfunktion als Verknüpfungslinker.

In Analogie zu den Aktivitätswerten der Verbindungen WK-X-81 und WK-X-82 konnte für die korrespondierenden Harnstoff-Derivate WK-X-46 und WK-X-48 festgestellt werden, dass wiederum ein Substituent R_2 mit einer ortho-Nitrophenylfunktion einem Substituenten R_2 mit einer ortho-Aminophenylgruppe überlegen ist. Vergleicht man die pIC_{50} -Werte des meta-Nitro-Harnstoff-Derivates WK-X-85 mit dem analogen para-Nitro-Harnstoffderivat WK-X-86, so wird offensichtlich, dass ein meta-Nitrophenyl-Substituent zu einer wesentlich stärkeren Inhibition von P-gp beiträgt als das para-Nitro-Derivat. Ein Vergleich mit WK-X-46, das einen ortho-Nitrophenyl-Substituenten besitzt, ist nicht direkt möglich, da WK-X-46 im Gegensatz zu WK-X-85 und WK-X-86 in Position 6 und 7 des Tetrahydroisochinolinrings keine Methoxygruppen trägt.

3.9.3 3D-QSAR-Untersuchungen der WK-Modulatoren

3D-QSAR-Untersuchungen der Tariquidar-Analoga bzw. WK-Modulatoren tragen zu einem besseren Verständnis des Zusammenhangs zwischen den Strukturen dieser Verbindungen und ihrer biologischer Wirksamkeit bei.

Die in Tabelle 3.26 und 3.27 angegebenen 26 kleinen und großen von der Struktur des Tariquidars abgeleiteten Modulatoren wurden mit Hilfe der 3D-QSAR-Verfahren CoMSIA und CoMFA untersucht. An dieser Stelle werden einige Details, die für die Durchführung dieser Methoden notwendig waren, kurz erläutert:

- Die Grundstruktur N-{4-[2-(3,4-Dihydro-1*H*-isochinolin-2-yl)-ethyl]-phenyl}-carbon-säureamid ist allen 26 Verbindungen gemeinsam. Mit Hilfe des Programms SYBYL 7.0 wurde die 3D-Struktur generiert und unter Anwendung des Kraftfeldes MMFF94s energieminiert. Die Grundstruktur wurde als Aggregat definiert und für alle Verbindungen beibehalten. Die Strukturen aller 26 Modulatoren wurden hiervon ausgehend erstellt und nur die angefügten Substituenten energieminiert.
- Die Partialladungen, die für die Berechnung der CoMFA- und CoMSIA-Modelle notwendig waren, wurden mit dem Programm MOPAC auf Basis der semiempirischen AM1-Methode berechnet. Die verwendeten Parameter waren: (i) MMOK (Geometriekorrektur für Amidbindungen) (ii) XYZ – Berechnung im kartesischen Koordinatensystem (iii) Singulett-Zustand (iv) normale Konvergenzkriterien.
- Parameter für die Berechnung der CoMFA-Modelle: Sterisches und elektrostatisches Feld mit einem Grenzwert (cut-off) von 30 kcal/mol.
- Die Gitterbox besaß eine Standardmaschenweite von 2 Å; die Gitterbox war in jede Raumrichtung 4 Å größer als die größte Verbindung. Verwendete Standardsonde: sp³-hybridisiertes C-Atom mit einer Ladung von +1.
- Die CoMFA und CoMSIA-Kalkulationen erfolgten unter Einhaltung der Standardeinstellungen in SYBYL. Die PLS-Analysen wurden unter Festlegung einer Standardabweichung (Column Filtering) von 2,0 kcal/mol durchgeführt.

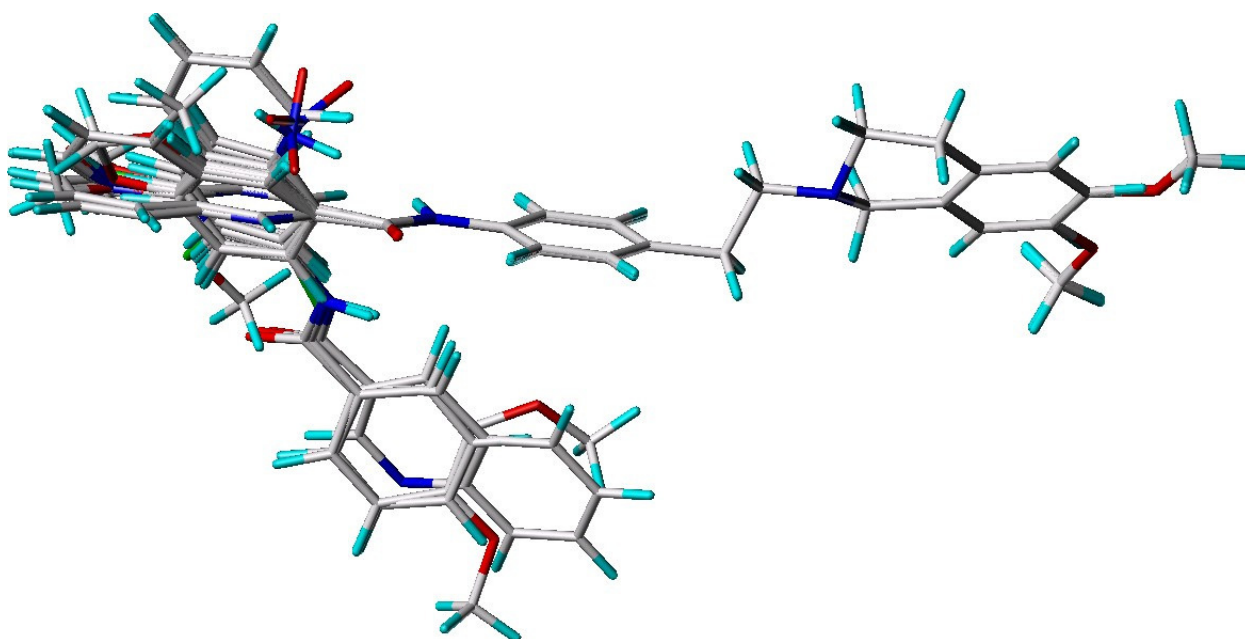


Abb. 3.62: Alignment der 23 kleinen WK-Modulatoren sowie für XR9577, XR9456 und WK-X-34.

3 Ergebnisse und Diskussion

In Abb. 3.62 ist das Alignment für die 23 kleinen WK-Modulatoren und 3 große Tariquidar-Analoga zu erkennen. Betrachtet man z.B. WK-X-51, so bestehen zwei Möglichkeiten zur Ausrichtung des 3-Chinolinrings in Relation zur Carbonylfunktion der Carbonsäureamidgruppe.

Tabelle 3.33: Zusammenstellung der statistischen Daten der CoMFA und CoMSIA Modelle für 23 kleine WK-Modulatoren und 3 große Tariquidar-Analoga XR9577, XR9456 und WK-X-34 basierend auf den pIC_{50} -Werten aus Tabelle 3.26 und 3.27.

CoMFA Modelle		Leave-one-out		No Validation	
Felder	q^2	Komponenten	S_{Press}	r^2	STABW
Sterisches (S)	0,580	2	0,384	0,854	0,226
Elektrostatisches (E)	0,618	3	0,359	0,840	0,232
S + E	0,712	2	0,311	0,849	0,225
H-Bond	0,593	4	0,387	0,895	0,197
CoMSIA Modell(e)		Leave-one-out		No Validation	
Felder	q^2	Komponenten	S_{Press}	r^2	STABW
Sterisches (S)	0,561	3	0,393	0,766	0,287
Elektrostatisches (E)	0,587	3	0,381	0,864	0,219
Hydrophobes (H)	0,531	1	0,389	0,703	0,310
Donor (D)	0,542	3	0,402	0,761	0,290
Akzeptor (A)	0,380	1	0,447	0,573	0,371
S + E	0,631	2	0,352	0,825	0,243
S + H	0,652	2	0,342	0,832	0,238
S + D	0,532	3	0,406	0,694	0,321
S + A	0,603	3	0,374	0,795	0,269
E + H	0,637	2	0,349	0,875	0,205
E + D	0,616	5	0,386	0,888	0,208
E + A	0,639	5	0,374	0,927	0,168
H + D	0,559	3	0,394	0,825	0,248
H + A	0,557	1	0,378	0,717	0,302
D + A	0,459	3	0,436	0,766	0,287
S + E + H	0,714	2	0,310	0,876	0,205
S + E + D	0,638	4	0,365	0,873	0,217
S + E + A	0,678	3	0,337	0,874	0,210
E + H + D	0,645	3	0,353	0,878	0,207
E + H + A	0,658	2	0,339	0,883	0,199
H + D + A	0,596	2	0,369	0,831	0,239
S+E+H+D	0,664	3	0,344	0,881	0,205
S+E+H+A	0,700	2	0,317	0,879	0,202
S+E+H+D+A	0,670	2	0,333	0,863	0,215

Das Stickstoffatom des 3-Chinolin-Substituenten kann sich in Richtung des Amid-Sauerstoffatoms (cis-Konformation) oder in Richtung des Amid-Stickstoffatoms (trans-Konformation) erstrecken. Welcher der beiden möglichen Konformationen favorisiert wird bzw. die biologisch aktive Konformation darstellt, kann nicht geklärt werden. Daher wurde für alle Verbindungen, die die Möglichkeit einer solchen cis- oder trans-Konformation besitzen, eine gemeinsame, nämlich die trans-Konformation, ausgewählt. Die beiden besten Modelle CoMFA S + E und CoMSIA S + E + H (s. Tabelle 3.33) wurden mit Hilfe verschiedener Methoden validiert. Die negativen mittleren q^2 -Werte, die bei dem Verwürfelungstest (vergl. Tabelle 3.34) erhalten wurden, dokumentieren, dass zufallsbasiert gemischte Aktivitätswerte nicht zu scheinbar validen CoMFA und CoMSIA Modellen führen.

Tabelle 3.34: Validierung der beiden besten Modelle CoMFA S + E und CoMSIA S + E + H mit Hilfe des Verwürfelungstests. Mittelwerte und Standardabweichungen basieren auf 50 zufällig generierten Datensätzen.

Felder	$q^2 \pm SD$
CoMFA S+E	-0,330 \pm 0,238
CoMSIA S+E+H	-0,351 \pm 0,261

Die Ergebnisse der gruppenweisen Kreuzvalidierung (s. Tabelle 3.35) zeigen, dass die beiden besten Feldkombinationen stabile und valide Modelle ergeben. Erst bei der Entfernung der Hälfte der Aktivitätswerte und damit der Hälfte der Information sinkt der q^2 -Wert deutlich ab, dieser beläuft sich aber immer noch auf $> 0,5$.

Tabelle 3.35: Validierung der besten CoMFA- und CoMSIA-Modelle mit Hilfe der LMO-Methode für 26 Modulatoren (100 Wiederholungen).

CoMFA S + E	
Gruppenzahl	$q^2 \pm SD$
5	0,667 \pm 0,073
4	0,654 \pm 0,081
3	0,613 \pm 0,111
2	0,505 \pm 0,188
CoMSIA S + E + H	
Gruppenzahl	$q^2 \pm SD$
5	0,677 \pm 0,052
4	0,669 \pm 0,065
3	0,641 \pm 0,096
2	0,559 \pm 0,152

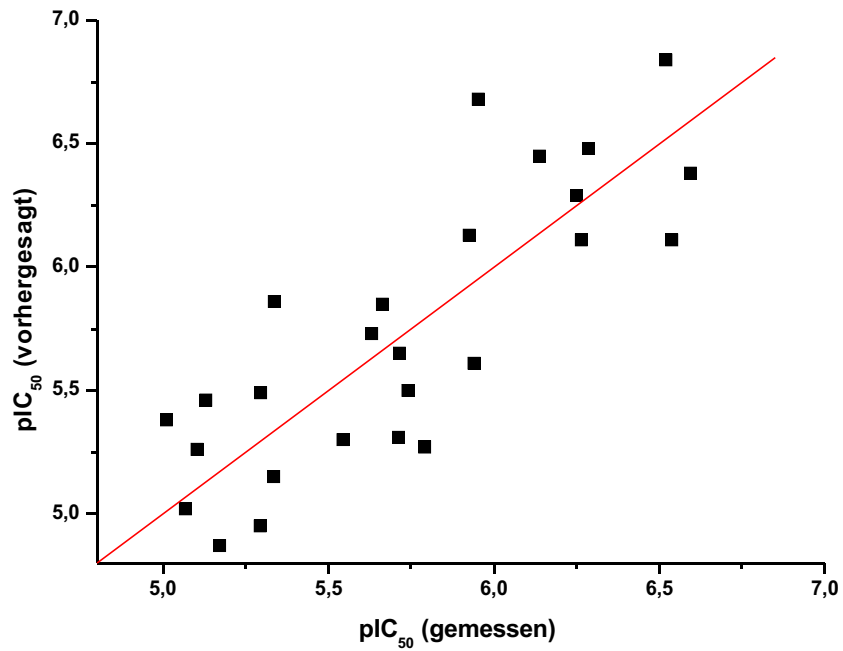


Abb. 3.63: Plot der experimentellen pIC_{50} -Werte aus dem Hoechst Assay gegen die auf Basis der CoMSIA-Feldkombination S + E + H vorhergesagten pIC_{50} -Werte.

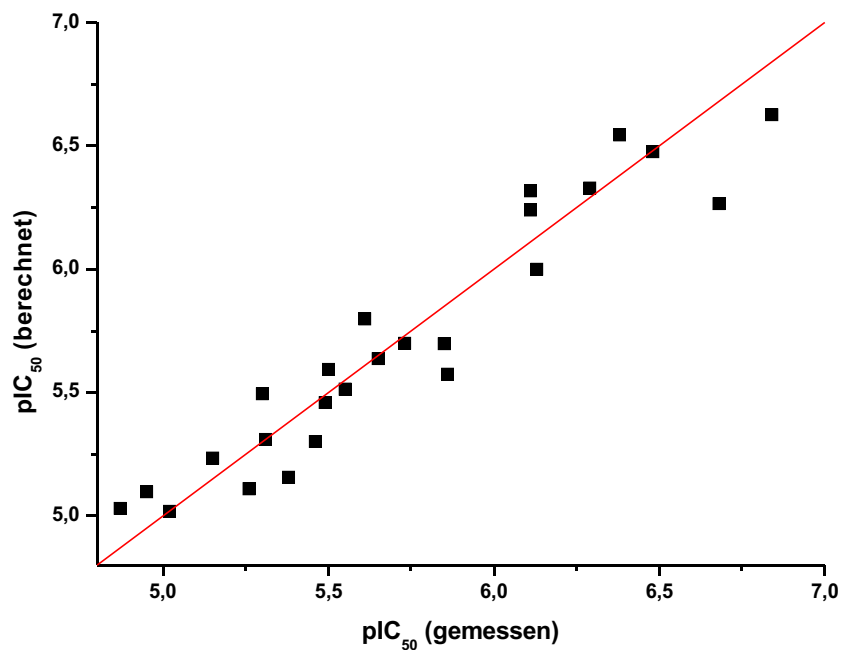


Abb. 3.64: Plot der experimentellen pIC_{50} -Werte aus dem Hoechst Assays gegen die auf Basis der CoMSIA-Feldkombination S + E + H berechneten pIC_{50} -Werte.

In Abb. 3.63 sind die mit Hilfe des Hoechst Assays ermittelten pIC_{50} -Werte gegen die auf Basis des besten Modells CoMSIA S + E + H vorhergesagten pIC_{50} -Werte aufgetragen. Abb. 3.64 enthält statt der vorhergesagten die berechneten Aktivitätswerte.

Die Konturdiagramme der sterischen, hydrophoben und elektrostatischen Felder wurden generiert, um zu veranschaulichen, wie die biologische Wirksamkeit von bestimmten strukturellen Charakteristika abhängig ist. Drei Substanzen wurden ausgewählt, um die Konturdiagramme hinsichtlich struktureller Charakteristika besser interpretieren zu können: WK-X-51, welches die potenteste Verbindung darstellt. WK-X-34, ein Vertreter der sogenannten großen Tariquidar-Analoga und WK-X-16, das eine geringere biologische Wirksamkeit besitzt.

Die orange-farbenen Bereiche zeigen einen positiven Beitrag des hydrophoben CoMSIA Feldes an. Wie aus Abb. 3.65 deutlich wird, spiegelt sich der positive Effekt eines 3-Chinolin-Substituenten im hydrophoben CoMSIA Feld wieder. Die orange-farbenen Konturen sind nur bei den Verbindungen mit bityklischen Substituenten R_2 besetzt. Eine Erweiterung eines monozyklischen Substituenten R_2 (vergl. WK-X-16) zu einem bityklischen Substituenten R_2 führt zu einer verbesserten Hemmung von P-gp.

Der in WK-X-51 (Abb. 3.65) vorhandene Stickstoff im 3-Chinolin-Substituenten ist hydrophil, was durch einen cyan-farbenen Bereich visualisiert wird. Ebenso ist die in den großen Tariquidar-Analoga vorkommende zweite Carbonsäureamidfunktion durch eine cyane Kontur indiziert (Abb. 3.66).

Die beispielsweise in WK-X-16 (Abb. 3.67) enthaltene Aminofunktion steht allerdings in cis-Konformation zur Carbonylgruppe und entspricht damit nicht dem Alignment der höhermolekularen Derivate, die als trans-Konformationsisomere angesehen werden können.

Grüne Bereiche weisen auf positive Beiträge des sterischen Feldes hin. Dabei stimmt, wie der in Abb. 3.65 abgebildeten Struktur von WK-X-51 entnommen werden kann, dieser Bereich etwa mit dem in orange-farbenen hydrophoben Feld überein. Dies könnte auch Ausdruck für eine Interkorrelation des hydrophoben und sterischen Feldes sein. Ein zweiter, grüner Bereich geht auf die großen Tariquidar-Analoga WK-X-34, XR9577 und XR9456 zurück. (vergl. Abb. 3.66). Dabei ist der positive Beitrag unabhängig von der Art des an dieser Stelle vorkommenden Substituenten: 3,4-Dimethoxyphenyl (WK-X-34) oder 3-Chinolinyl (XR9577) oder Phenyl (XR9456).

Das elektrostatische Feld zeigt Bereiche in blau an, wenn eine positive Partialladung die Hemmung von P-gp begünstigt. Rot-konturierte Bereiche indizieren den negativen Effekt einer positiven Partialladung. Die kleine blaue und rote Kontur könnten auf die in WK-X-30 und WK-X-31 vorhandene Nitrogruppe zurückzuführen sein. Das Stickstoffatom dieser funktionellen Gruppe trägt eine positive Partialladung, während die Sauerstoffatome negativ Partialladungen besitzen.

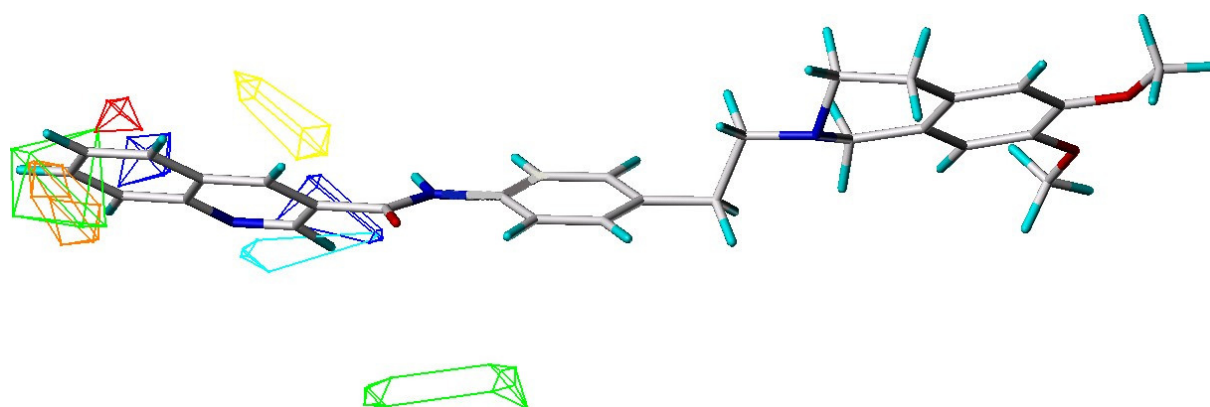


Abb. 3.65: Konturdiagramm der sterischen, elektrostatischen und hydrophoben Felder zusammen mit der Verbindung WK-X-51.

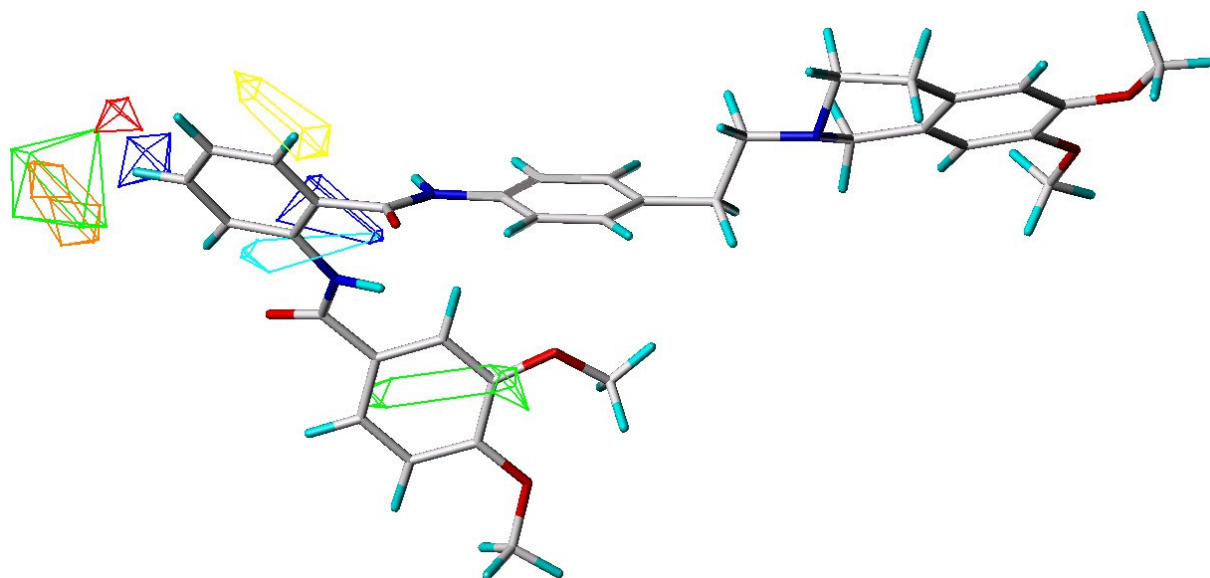


Abb. 3.66: Konturdiagramm der sterischen, elektrostatischen und hydrophoben Felder zusammen mit der Verbindung WK-X-34.

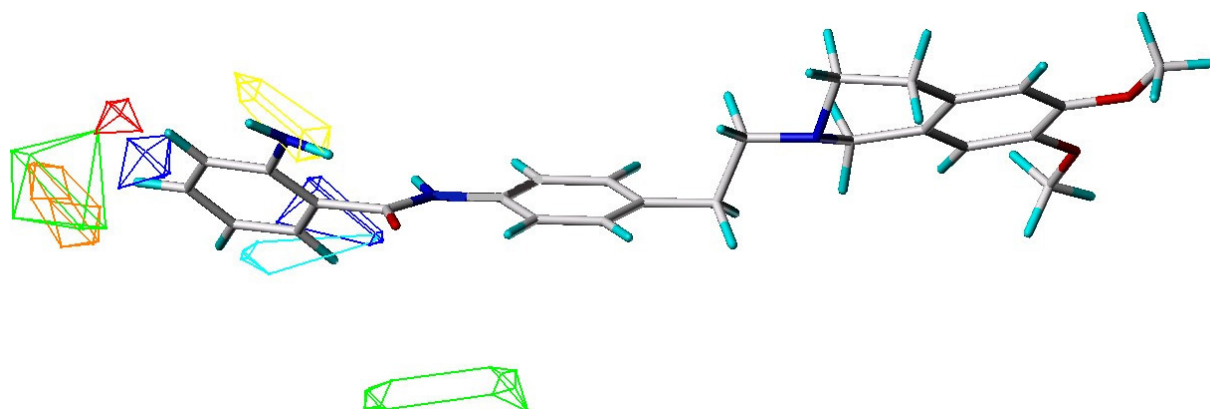


Abb. 3.67: Konturdiagramm der sterischen, elektrostatischen und hydrophoben Felder zusammen mit der Verbindung WK-X-16.

Tabelle 3.36: Zusammenstellung der statistischen Daten der CoMFA und CoMSIA Modelle für 23 kleine WK-Modulatoren und 3 große Tariquidar-Analoga XR9577, XR9456 und WK-X-34 basierend auf den pIC_{50} -Werten des Calcein AM Assays aus Tabelle 3.19 und 3.26.

CoMFA Modelle		Leave-one-out		No Validation	
Felder	q^2	Komponenten	S_{Press}	r^2	STABW
Sterisches (S)	0,575	3	0,352	0,837	0,218
Elektrostatisches (E)	0,627	3	0,282	0,923	0,150
S + E	0,659	3	0,308	0,842	0,210
H-Bond	0,560	4	0,366	0,880	0,192
CoMSIA Modelle		Leave-one-out		No Validation	
Felder	q^2	Komponenten	S_{Press}	r^2	STABW
Sterisches (S)	0,558	3	0,359	0,758	0,265
Elektrostatisches (E)	0,645	3	0,322	0,897	0,173
Hydrophobes (H)	0,447	1	0,384	0,662	0,300
Donor (D)	0,377	3	0,426	0,506	0,379
Akzeptor (A)	0,285	1	0,437	0,488	0,370
S + E	0,691	5	0,328	0,850	0,204
S + H	0,592	2	0,344	0,802	0,234
S + D	0,639	3	0,329	0,818	0,230
S + A	0,492	3	0,384	0,754	0,267
E + H	0,654	2	0,315	0,886	0,178
E + D	0,616	3	0,335	0,879	0,187
E + A	0,564	2	0,357	0,821	0,223
H + D	0,535	3	0,368	0,830	0,223
H + A	0,471	2	0,384	0,820	0,224

3 Ergebnisse und Diskussion

CoMSIA Modelle		Leave-one-out		No Validation	
D + A	0,428	1	0,390	0,662	0,300
S + E + H	0,692	2	0,293	0,889	0,175
S + E + D	0,660	3	0,323	0,873	0,192
S + E + A	0,582	2	0,341	0,822	0,222
E + H + D	0,624	2	0,338	0,861	0,197
E + H + A	0,662	2	0,320	0,889	0,176
H + D + A	0,596	2	0,369	0,831	0,239
S + H + D	0,619	2	0,347	0,790	0,242
S + H + A	0,591	3	0,345	0,896	0,174
S + E + H + D	0,656	2	0,316	0,851	0,204
S + E + H + A	0,690	3	0,300	0,929	0,144
S + E + H + D + A	0,642	2	0,316	0,861	0,197

Da die pIC_{50} -Werte in beiden Testsystemen hoch korreliert sind, ist es nicht verwunderlich, dass auf Basis der pIC_{50} -Werte des Calcein AM Assays die Generierung vergleichbarer CoMFA- und CoMSIA-Modelle möglich war (Tabelle 3.36).

3.10 Untersuchung der Aktivierung von P-gp

Hintergrund der bisherigen Experimente war das Ziel, mit Hilfe funktioneller Methoden die Interaktion von bestimmten Substanzen mit den einzelnen, postulierten Bindungsstellen von P-gp zu erfassen. Die Untersuchung der Aktivierung von P-gp hat die Aufgabe, das Zusammenspiel bzw. die gegenseitige Beeinflussung der Bindungsstellen zu analysieren. Mehrere Beispiele aus der Literatur weisen daraufhin, dass bestimmte Verbindungen wie beispielsweise Hoechst 33342, Colchicin, Quercetin und QB102 in der Lage sind, P-gp zu aktivieren.^{75,175} Eine solche Aktivierung führt dazu, dass der Efflux von Substraten der R-Seite stimuliert wird. Wie bereits erwähnt, konnten Shapiro und Ling für Rhodamin 123 und Hoechst 33342 eine gegenseitige Stimulation des P-gp vermittelten Transportes in Membranvesikeln nachweisen und daraus eine positive Kooperativität der beiden Bindungsstellen ableiten. Kondratov et al. zeigten für QB102 eine Aktivierung des Daunorubicin bzw. Rhodamin 123 Transportes. Gleichzeitig wurde durch die Untersuchung weiterer Substrate festgestellt, dass die durch QB102 hervorgerufene Aktivierung von P-gp nur gegenüber bestimmten Substraten sichtbar wird. Beispielsweise wurde für Verbindungen wie Vinblastin, Hoechst 33342 und Paclitaxel keine durch QB102 erzeugte Stimulation, sondern eine Inhibition von P-gp detektiert.¹⁷⁵ Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass QB102 einerseits mit der H-Seite interagiert, aber nur dann seine aktivierende Funktion entfalten kann, wenn es mit möglichst selektiven Substraten der R-Seite in Wechselwirkung tritt. Mehrere Beispiele aus der Literatur belegen also, dass P-gp durch gewisse Verbindungen aktiviert werden kann.

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe des Calcein AM Assays untersucht, ob der Efflux von Calcein AM durch gewisse Substanzen intensiviert werden kann. Ein wesentlicher Kernpunkt der im Folgenden dargestellten Ausführungen bestand darin, das Phänomen der positiven Kooperativität an ABCB1 überexprimierenden Zellen, also an intakten, vollständigen Zellen, erstmals zu belegen. Die positive Kooperativität der beiden Bindungsstellen wurde von Shapiro und Ling bisher lediglich in P-gp Membranvesikeln nachgewiesen.

Eine typische Konzentrations-Effektkurve, die mit Hilfe des Calcein AM Assays an A2780 Adr Zellen in Gegenwart eines Aktivators generiert wurde, ist in Abb. 3.68 zu erkennen. Ein Maß für die Aktivierung von P-gp ist der pEC_{50} -Wert; im Gegensatz zu den klassischen

Inhibitoren wird die Funktion von P-gp nicht gehemmt, sondern gefördert.

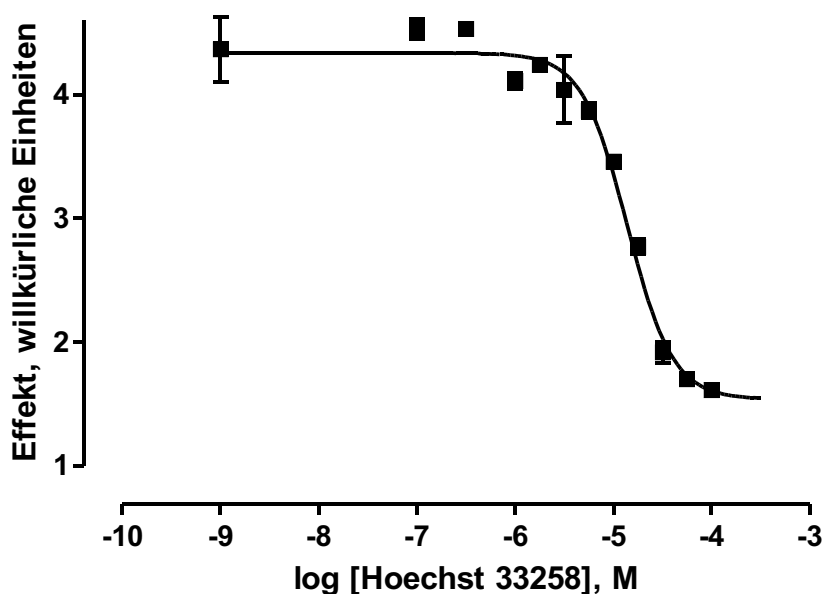


Abb. 3.68: Konzentrations-Effektkurve von Hoechst 33258 an A2780 Adr Zellen im Calcein AM Assay. Beispiel für ein typisches Experiment aus einer Serie von drei unabhängigen Experimenten. $pEC_{50} = 4,85 \pm 0,04$, $n_H = 1,89 \pm 0,20$. (Zum Vergleich: Der Effekt für 100 $\mu\text{mol/l}$ Verapamil, das eine vollständige Inhibition von P-gp hervorruft, liegt bei $10,12 \pm 0,34$).

Die Besetzung der H-Seite durch Hoechst 33258 bedingt, dass der Efflux von Calcein AM, welches die gleichen Pharmakophorpunkte wie Rhodamin 123 aufweist, verstärkt wird. Infolge der geringeren intrazellulären Konzentration von Calcein AM resultiert ein geringerer Anstieg der Calcein-Fluoreszenz.

Tabelle 3.37: pEC_{50} -Werte und Hillkoeffizienten mit Standardabweichungen verschiedener aktivierender Verbindungen, A2780 Adr Zellen, Calcein AM Assay. $n \geq 2$.

Verbindung	$pEC_{50} \pm SD$	$n_H \pm SD$
Hoechst 33342	$5,09 \pm 0,12$	$1,54 \pm 0,30$
Hoechst 33258	$4,72 \pm 0,09$	$1,78 \pm 0,50$
Quercetin	$5,22 \pm 0,35$	$1,95 \pm 0,56$
Rutin	$4,36 \pm 0,06$	$2,11 \pm 0,23$
QB102	$5,46 \pm 0,22$	$1,67 \pm 0,31$
Colchicin	$4,71 \pm 0,08$	$1,49 \pm 0,19$

Die von Shapiro und Ling propagierte Aktivierung von P-gp durch Hoechst und weitere Verbindungen, die mit dieser Bindungsstelle in Wechselwirkung treten, konnte erstmals an intakten Zellen belegt werden.

Bei der Betrachtung der pEC₅₀-Werte verschiedener Verbindungen fällt auf, dass diese erst in hohen Konzentrationen eine Aktivierung von P-gp hervorrufen (Tabelle 3.37). Die Aktivierung, die als allosterer Mechanismus aufgefasst werden kann, ist auf funktioneller Ebene nur schwach ausgeprägt. Man vergleiche in diesem Zusammenhang auch andere Literatur-bekanntete Beispiele, die eine Quantifizierung allosterer Mechanismen in Bezug auf P-gp thematisieren:

- Die von Shapiro und Ling gezeigte gegenseitige Stimulation des Rhodamin 123 und Hoechst 33342 Transports ist nur schwach, es konnte lediglich eine Steigerung der P-gp Aktivität durch Hoechst 33342 um den Faktor von ca. 3 festgestellt werden.⁷⁵
- LDS-751, das wie Daunrorubicin und Rhodamin 123 an die R-Seite von P-gp binden soll, verstärkt den Hoechst 33342 Transport aus ABCB1 überexprimierenden Membranvesikeln chinesischer Hamsterzellen nur um das 1,6fache.²⁰¹
- Lugo und Sharom konnten für LDS-751 und Rhodamin 123 negative Kooperativität belegen. Die Bindung von LDS-751 setzt die Bindung von Rhodamin 123 um den Faktor 5 herab, und umgekehrt.²⁰²
- Cis-Flupentixol kann den Hoechst 33342 Transport aktivieren, aber lediglich um ca. den Faktor 1,3.^{75,76}

Die hier vorgestellten Resultate stimmen mit den Beispielen aus der Literatur überein. Es wird deutlich, dass die Stärke der allosteren Interaktionen auf funktioneller Ebene eher gering ausgeprägt ist.

Die Aktivierung von P-gp durch Hoechst wurde in dieser Arbeit aber nicht durch eine Erhöhung des Rhodamin 123 Transportes, sondern durch eine Stimulation des Calcein AM Effluxes gezeigt. Vergleicht man die Strukturen von Calcein AM und Rhodamin 123, so fällt auf, dass Calcein AM im Gegensatz zu Rhodamin 123 über große, flexible Ankerstrukturen verfügt, die möglicherweise neben der Interaktion mit der R-Seite auch eine Interaktion mit der H-Seite zulassen könnten. Würde aber Calcein AM an die H-Seite binden, so müsste man keine Aktivierung, sondern eine Inhibition feststellen. Die durch Verbindungen wie Hoechst hervorgerufene Aktivierung von P-gp ist deshalb auch ein Indiz dafür, dass Calcein AM vornehmlich mit der R-Seite in Wechselwirkung tritt.

Abb. 3.69 dient zur Veranschaulichung des Prinzips der Aktivierung von P-gp. Die R- und H-Seite sind als einzelne, selektive Bindungsstellen dargestellt. Allerdings befinden sich die beiden Bindungsstellen nicht, wie man aus Abb. 3.69 interpretieren könnte, auf den beiden Hälften des Proteins, sondern sind zueinander benachbart (TM Helices 5 und 6 oder TM Helices 11 und 12).¹⁰¹ Anhand von Abb. 3.69 wird nicht nur das Phänomen der Aktivierung erklärt, sondern auch offensichtlich, dass Substrate wie Calcein AM und Hoechst 33258 sowohl über die Plasmamembran als auch aus dem Intrazellulärraum mit P-gp in Wechselwirkung treten können.

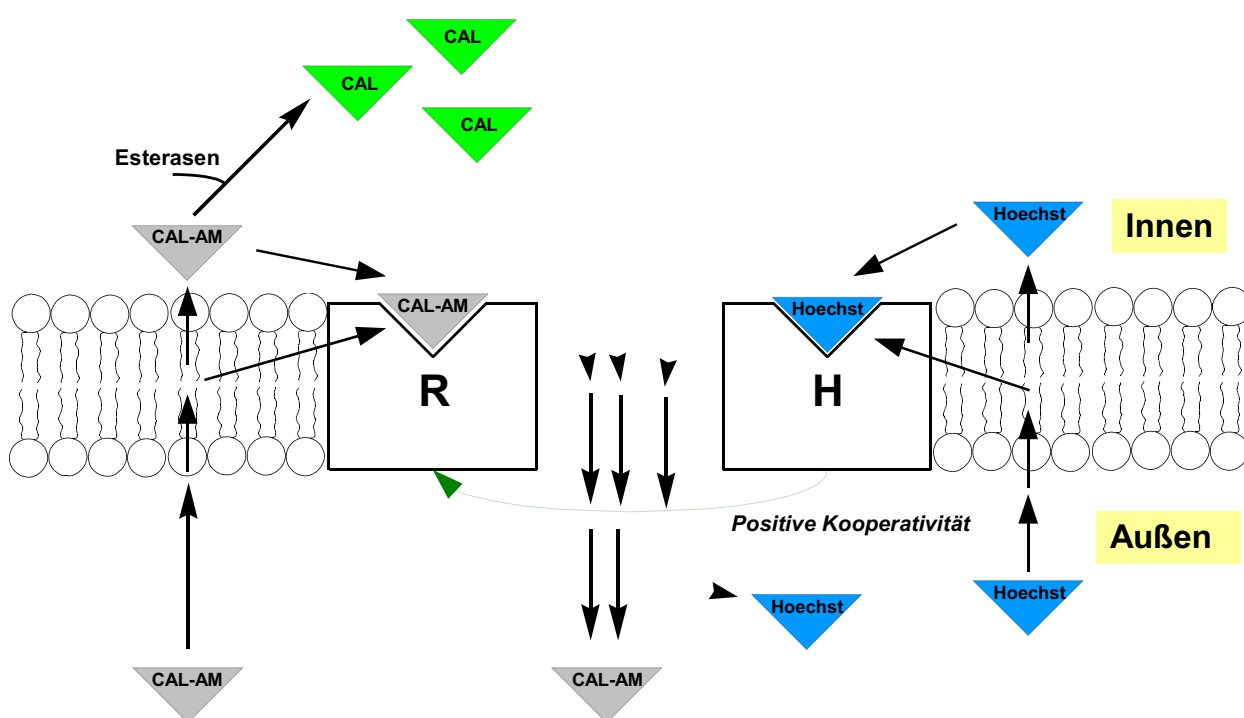


Abb. 3.69: Schema der Aktivierung des Calcein AM Effluxes durch Liganden der H-Seite wie Hoechst 33342 (Positive Kooperativität).

Eine interessante Thematik resultiert aus der Fragestellung, inwieweit die Gegenwart eines Modulators die Aktivierung von P-gp beeinflussen kann. Für die sogenannten XR-Modulatoren existieren widersprüchliche Aussagen aus der Literatur hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens an P-gp. Während von Martin et al. für XR9576 (Tariquidar) eine Interaktion mit der H-Seite postuliert wurde,⁷⁷ lassen die von Roe et al. durchgeführten Studien, die auf einem [³H]-Daunorubicin Assay basieren, die Schlussfolgerung zu, dass XR-Analoga an die R-Seite binden.⁴⁵ Unter der Voraussetzung, dass der Calcein AM und der Ho-

echst Assay die funktionelle Charakterisierung der R- und der H-Seite ermöglichen, kann aus den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit die Erkenntnis gewonnen werden, dass die XR-Derivate mit beiden Bindungsstellen interagieren. (Dabei wurde für die XR-Derivate keine Aktivierung des Calcein AM Transportes festgestellt).

Besonders interessant war die Frage, welchen Einfluss ein XR-Derivat auf die durch beispielsweise Hoechst 33342 hervorgerufene Aktivierung des Calcein AM Transportes auszuüben vermag.

Die beiden Abb. 3.70 und 3.71 zeigen Konzentrations-Wirkungskurven für die Modulatoren Verapamil und XR9456, die in Gegenwart und Abwesenheit von Hoechst 33258 aufgenommen wurden (rot: 10 $\mu\text{mol/l}$ Hoechst 33258, blau: 30 $\mu\text{mol/l}$ Hoechst 33258).

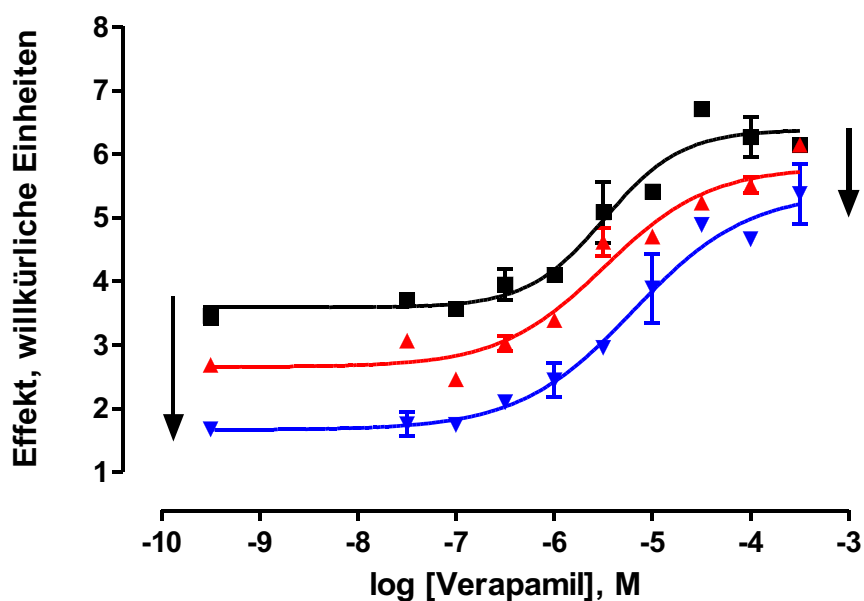


Abb. 3.70: Konzentrations-Effektcurven für den Modulator Verapamil im Calcein AM Assay bei Abwesenheit (schwarze Kurve) und Anwesenheit von Hoechst 33258 (rot: 10 $\mu\text{mol/l}$ Hoechst 33258, blau: 30 $\mu\text{mol/l}$ Hoechst 33258). (A2780 Adr Zellen, $n \geq 2$).

In den Abb. 3.70 und 3.71 unterscheiden sich die in Anwesenheit von Hoechst 33258 detektierten Kurven von den unter Ausschluss von Hoechst 33258 aufgenommen Kurven dadurch, dass sowohl Bottom- als auch Topwert signifikant durch den Aktivator verringert werden. Bei genauer Betrachtung der einzelnen Konzentrations-Wirkungskurven fällt aber

auf, dass die Verringerung des Topwertes gegenüber der Abnahme des Bottomwertes schwächer ausfällt.

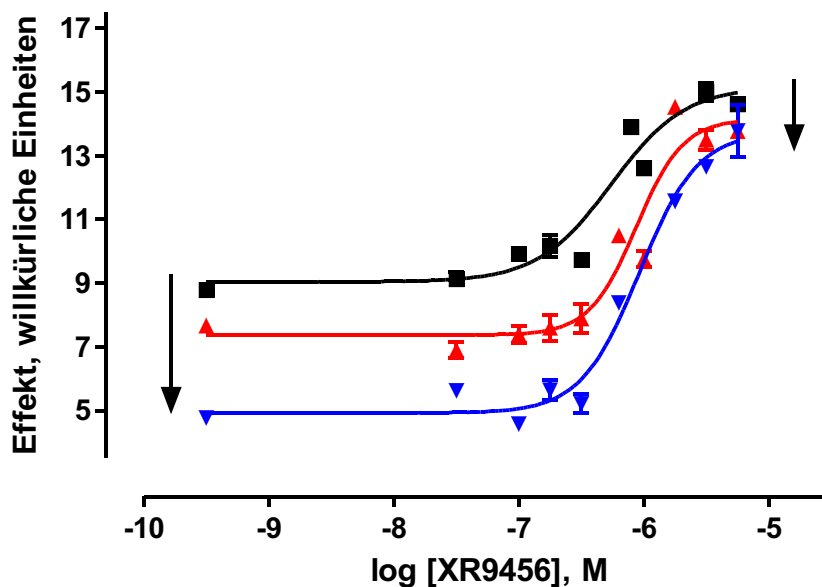


Abb. 3.71: Konzentrations-Effektcurven für den Modulator XR9456 im Calcein AM Assay bei Abwesenheit (schwarze Kurve) und Anwesenheit von Hoechst 33258 (rot: 10 µmol/l Hoechst 33258, blau: 30 µmol/l Hoechst 33258). (A2780 Adr Zellen, $n \geq 2$).

Zur genaueren Interpretation der Ergebnisse ist es notwendig, die einzelnen Reaktionsschritte des Calcein AM Assays zu betrachten:

- (i) Diffusion von Calcein AM in die Zelle (k_{Diff}).
- (ii) Rückdiffusion von Calcein AM aus der Zelle (k_{Diff}).
- (iii) Verringerung der intrazellulären Konzentration von Calcein AM durch P-gp ($k_{\text{P-gp}}$).
- (iv) Umsetzung von Calcein AM durch intrazelluläre Esterasen zu Calcein (k_e).

Da die Calcein AM Konzentration deutlich geringer als der K_m -Wert der Esterasen ist¹³⁷, gilt für die zeitabhängige Zunahme der intrazellulären Calcein-Konzentration (Cal):

$$\frac{d(\text{Cal})_{\text{in}}}{dt} = k_e \cdot (\text{Cal} - \text{AM})_{\text{in}} \quad \text{Gleichung 3.13}$$

Für den ersten, quasi-linearen Teil des Calcein-Fluoreszenz-Anstieges kann die äußere,

extrazelluläre Calcein AM Konzentration als konstant angesehen werden.

Unter „steady state“ Bedingungen ist die Influx-Geschwindigkeit gleich der Summe aus Efflux und Verbrauch des Calcein AM:

$$k_{Diff} \cdot (Cal - AM)_{out} = (Cal - AM)_{in} \cdot (k_{P-gp} + k_e + k_{Diff}) \quad \text{Gleichung 3.14}$$

Löst man diese Gleichung nach $(Cal-AM)_{in}$ auf, so resultiert:

$$(Cal - AM)_{in} = \frac{(Cal - AM)_{out} \cdot k_{Diff}}{(k_{P-gp} + k_e + k_{Diff})} \quad \text{Gleichung 3.15}$$

Unter Einbeziehung von Gleichung 3.15 kann Gleichung 3.13 wie folgt umgeformt werden:

$$(Cal)_{in} = k_e \cdot \frac{(Cal - AM)_{out} \cdot k_{Diff}}{(k_{P-gp} + k_e + k_{Diff})} \cdot t \quad \text{Gleichung 3.16}$$

Wird der Topwert einer Konzentrations-Effektcurve entsprechend einer vollständigen Inhibition von P-gp erreicht, ist k_{P-gp} gleich Null. Damit ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$(Cal)_{in} = \frac{(Cal - AM)_{out} \cdot k_{Diff}}{(k_e + k_{Diff})} = Top \quad \text{Gleichung 3.17}$$

Der Bottomwert einer Konzentrations-Effektcurve bezieht sich auf den Zustand, bei dem P-gp nicht gehemmt wird. k_{P-gp} muss deshalb in die Gleichung einbezogen werden:

$$(Cal)_{in} = \frac{(Cal - AM)_{out} \cdot k_{Diff}}{(k_e + k_{P-gp} + k_{Diff})} = Bottom \quad \text{Gleichung 3.18}$$

Setzt man die Top- und Bottomwerte der beschreibenden Gleichungen zueinander ins Verhältnis, kann das Gleichungssystem nach $k_{P-gp}/(k_e+k_{Diff})$ hin aufgelöst werden:

$$\frac{Top}{Bottom} = \frac{(k_e + k_{P-gp} + k_{Diff})}{(k_e + k_{Diff})} \Leftrightarrow 1 + \frac{k_{P-gp}}{(k_e + k_{Diff})}$$

$$\Leftrightarrow \frac{Top}{Bottom} - 1 = \frac{k_{P-gp}}{(k_e + k_{Diff})}$$

Der Quotient aus Top- und Bottomwert minus 1, ist proportional zum Verhältnis der Pumpleistung von P-gp (k_{P-gp}) und anderen Prozessen, welche die Pumpleistung vermin-

3 Ergebnisse und Diskussion

dem. Unter Vernachlässigung von k_e und $k_{\text{Rück}}$ wurde in der nachfolgenden Tabelle 3.38 $k_{\text{P-gp}}$ berechnet. Aus Tabelle 3.38 wird ersichtlich, dass $k_{\text{P-gp}}$ mit zunehmender Konzentration von Hoechst 33258 ansteigt.

Wenn man annimmt, dass die Modulatoren mit der R-Seite von P-gp interagieren, wird Calcein AM mit zunehmender Konzentration des Modulators (Verapamil oder XR9456) immer weiter von der R-Seite verdrängt. Demnach müsste in Gegenwart hoher Modulatorkonzentrationen die durch Hoechst hervorgerufene Aktivierung ausbleiben.

Tabelle 3.38: Aktivierung des Calcein AM Effluxes durch Hoechst 33258 in Gegenwart von XR9456 bzw. Verapamil. Die Berechnungen beziehen sich auf die Konzentrations-Wirkungskurven aus Abb. 3.70 und 3.71.

Verapamil und Hoechst 33258			
	0 $\mu\text{mol/l}$	10 $\mu\text{mol/l}$	30 $\mu\text{mol/l}$
Bottom	3,589	2,654	1,709
Top	6,381	5,794	4,966
$k_{\text{P-gp}}$	0,7779	1,4029	2,7337
$k_{\text{P-gp}}$ (zusätzlich)	0	0,6265	1,9558
Stimulation in %	0	80,54%	251,42%
Restaktivität	0	0,1013	0,2849
Restaktivität bezogen auf $k_{\text{P-gp}}$ (unstimuliert)	0	13,02%	36,62%
Restaktivität bezogen auf $k_{\text{P-gp}}$ (stimuliert)	0	7,21%	10,42%
XR9456 und Hoechst 33258			
	0 $\mu\text{mol/l}$	10 $\mu\text{mol/l}$	30 $\mu\text{mol/l}$
Bottom	9,116	7,367	4,995
Top	14,65	14,16	13,76
$k_{\text{P-gp}}$	0,6071	0,9886	1,9329
$k_{\text{P-gp}}$ (zusätzlich)	0	0,3815	1,3258
Stimulation in %	0	62,84%	218,39%
Restaktivität	0	0,0346	0,0647
Restaktivität bezogen auf $k_{\text{P-gp}}$ (unstimuliert)	0	5,70%	10,66%
Restaktivität bezogen auf $k_{\text{P-gp}}$ (stimuliert)	0	3,50%	3,35%

Bei genauerer Betrachtung der Konzentrations-Effektkurven fällt aber auf, dass der Topwert in Gegenwart von Hoechst 33258 zwar in geringerer Form, aber doch signifikant abnimmt (s. Abb. 3.70 und 3.71). In Anwesenheit von Hoechst 33258 ist demnach eine vollständige durch Verapamil hervorgerufene Inhibition von P-gp wie in Abwesenheit von Hoechst 33258 nicht mehr möglich. P-gp behält demnach in diesem Zustand einen Teil seiner Aktivität bei, was im Folgenden als Restaktivität bezeichnet wird. Die sogenannten Restaktivitätswerte resultieren, indem man den Topwert in Abwesenheit von Hoechst 33258 durch den Topwert in Gegenwart von Hoechst 33258 dividiert und 1 subtrahiert. Bei der Prozentualisierung der Restaktivitätswerte können diese auf k_{P-gp} für die unstimulierte oder stimulierte Form bezogen werden. Die prozentualisierten Restaktivitätswerte sind für den Modulator Verapamil größer als für den Inhibitor XR9456. Anders ausgedrückt wird in Gegenwart von XR9456 im Vergleich zu Verapamil mit zunehmender Konzentration des Modulators die Aktivierung stärker zurückgedrängt.

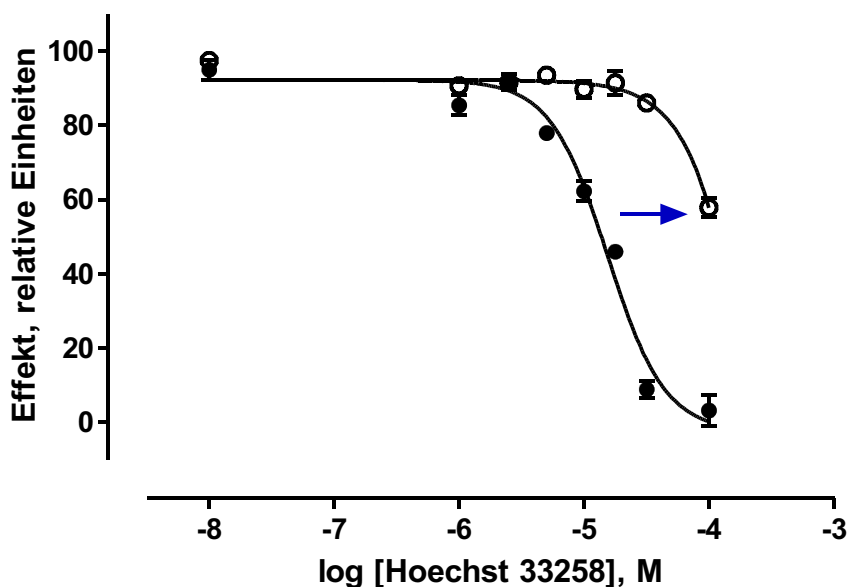


Abb. 3.72: Vergleich der Aktivierung von P-gp bzw. des Calcein AM Transportes durch Hoechst 33258 in Gegenwart von $3 \mu\text{mol/l}$ XR9456 (nicht gefüllte Kreissymbole) und in Abwesenheit von XR9456 (schwarze Kreissymbole).

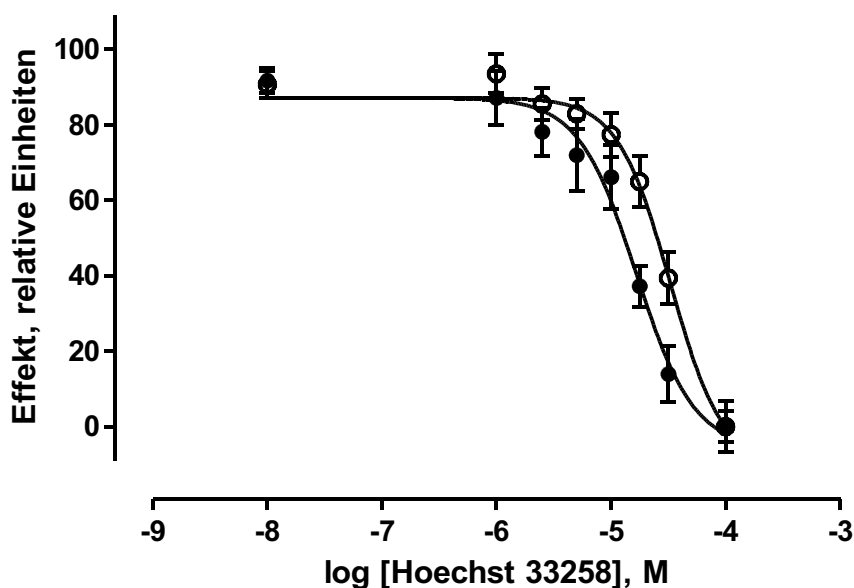


Abb. 3.73: Vergleich der Aktivierung von P-gp bzw. des Calcein AM Transportes durch Hoechst 33258 in Gegenwart von 100 µmol/l Verapamil (nicht gefüllte Kreissymbole) und in Abwesenheit von Verapamil (schwarze Kreissymbole).

Die geringen Restaktivitätswerte im Fall von XR9456 könnten auch damit erklärbar sein, dass der Modulator mit der H-Seite interagiert. Infolgedessen nimmt die Aktivierung ab. Die in Abb. 3.72 und Abb. 3.73 dargestellten Ergebnisse unterstützen diese Vermutung. Die Präinkubation der Zellen mit XR9456 führt dazu, dass der aktivierende Effekt von Hoechst 33258 sich verringert. Eine Präinkubation mit Verapamil ruft dagegen eine wesentlich schwächere Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effektkurve hervor. Diese Ergebnisse zeigen in ihrer Gesamtheit, dass XR9456 mit der H-Seite in Wechselwirkung tritt oder die Interaktion mit der H-Seite durch „sterische Hinderung“ herabsetzt. Letztere Theorie scheint eher zutreffend, da XR9456 selbst keinen aktivierenden Charakter auf den Calcein AM Transport besitzt, sondern diesen mit vergleichsweise hoher Affinität hemmt. Die bisherigen Ausführungen thematisieren die durch Hoechst hervorgerufene Stimulation des Transportes von Substraten der R-Seite. Aus den Arbeiten von Shapiro und Ling geht aber hervor, dass eine gegenseitige Stimulation der beiden Bindungsstellen, der R- und der H-Seite, zueinander bestehen soll.⁷⁵ Der Kernpunkt der weiteren Untersuchungen war daher die Stimulation des Hoechst 33342-Transportes durch Rhodamin 123.

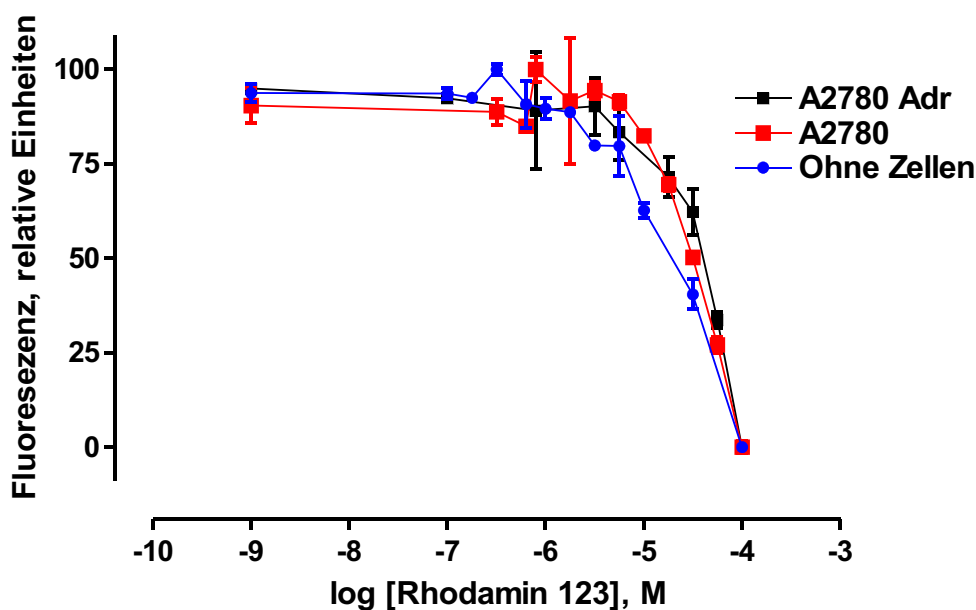


Abb. 3.74: Fluoreszenz von Hoechst 33342 in Abhängigkeit der Rhodamin 123-Konzentration. Beispiel für ein typisches Experiment aus einer Serie von drei unabhängigen Versuchen.

In dieser Arbeit konnte mittels des Hoechst Assays eine Aktivierung durch Rhodamin 123 nicht festgestellt werden. Abb. 3.74 zeigt, dass Rhodamin 123 die Intensität der Hoechst 33342 Fluoreszenz ab einer Konzentration von ca. 10 $\mu\text{mol/l}$ deutlich vermindert. Aus diesem Grund müssen auch die von Shapiro und Ling erhobenen Ergebnisse kritisch beurteilt werden. Es ist nicht auszuschließen, dass die von den Autoren gemessene Stimulation des Hoechst 33342 Transportes⁷⁵ ein Artefakt ist und auf eine Fluoreszenzlöschung zurückzuführen ist. An dieser Stelle sei auch erwähnt, dass Shapiro und Ling für die Verbindungen Quercetin und Colchicin eine Konkurrenz mit der H-Seite festgestellt haben. In dieser Arbeit konnte aber für beide Verbindungen ebenfalls eine deutliche Löschung der Hoechst 33342 Fluoreszenz gezeigt werden. Zweifelhaft ist auch die für Daunorubicin und Rhodamin 123 berichtete Konkurrenz, da beide Verbindungen überlappende Exzitations- und Emissionswellenlängen besitzen. Eine kritische Beurteilung der von Shapiro und Ling erhobenen Daten ist daher notwendig.

3.11 Allosterie und P-gp

Das in Abb. 3.81 dargestellte Modell umfasst zwei Bindungsstellen, denen jeweils Transporteigenschaften zugesprochen werden können. Mehrere Hinweise aus der Literatur deuten darauf hin, dass P-gp über eine weitere Bindungsstelle verfügt, die keine Transporteigenschaften besitzt, sondern eine regulatorische Funktion inne hat.^{76,77} Sowohl der Hoechst 33342 als auch der Rhodamin 123 Transport kann durch Verbindungen wie Progesteron oder Prazosin stimuliert werden, ohne dass diese Substanzen selbst transportiert werden. Aus den Ergebnissen von Shapiro und Ling geht hervor, dass Progesteron den Hoechst 33342 Efflux um den Faktor 2,5 aktiviert und der Rhodamin 123 Transport um das Dreifache gesteigert wird. Prazosin hemmt die Hoechst 33342 Akkumulation um den Faktor 2,5, der Rhodamin 123 Efflux wird um das Eineinhalbfache erhöht.⁷⁶ Wiederum wird deutlich, dass der auf Progesteron und Prazosin zurückzuführende allosterische Effekt eher schwach ausgeprägt ist. Die Ergebnisse von Shapiro und Ling wurden wie die früheren Arbeiten mit P-gp Membranvesikeln, aber nicht mit ganzen Zellen erhalten. In dieser Arbeit wurden Progesteron und Prazosin mit dem Calcein AM Assay untersucht (vergl. Kap.3.3). Beide Verbindungen führen erst in hohen Konzentrationen zu einer nennenswerten Inhibition von P-gp, wie ihre pIC_{50} -Werte dokumentieren: pIC_{50} (Progesteron) = $4,22 \pm 0,21$, pIC_{50} (Prazosin) = $3,98 \pm 0,24$. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Resultaten von Shapiro und Ling, da keine Aktivierung, sondern eine Hemmung von P-gp festgestellt werden konnte. Dieser Befund wird durch andere Publikationen bestätigt.

- Fröhlich et al. untersuchten verschiedene Steroide (u.a. Progesteron) mit Hilfe eines Calcein AM Assays an ABCB1 überexprimierenden Zellen. In Übereinstimmung mit den Resultaten dieser Arbeit wurde eine durch Progesteron hervorgerufene Herabsetzung des Calcein AM Transportes bestimmt.²⁰³
- Leonessa et al. stellten für Progesteron verwandte Derivate in ABCB1 überexprimierenden Zellen mit Hilfe eines Vinblastin bzw. Doxorubicin-basierten Akkumulationsassays eine Inhibition des Substrat-Transportes fest.²⁰⁴
- Hamilton et al. zeigten, dass Progesteron die Akkumulation von Rhodamin 123 in Calu-3 Zellen fördert.²⁰⁵
- Die durch Progesteron hervorgerufene Hemmung von P-gp wurde mit Hilfe von drei

verschiedenen Substraten (Rhodamin 123, LDS-751, Daunorubicin) von Wang et al. nachgewiesen (vergl. Tabelle 3.43).²²³ In Übereinstimmung mit den Daten dieser Arbeit zeigte Progesteron nur eine geringe Aktivität im Vergleich zu anderen Verbindungen (s. Abb. 3.75). Wie in Abb. 3.75 zu sehen ist, ist die Aktivität von Progesteron so gering, dass nur eine etwa 40%ige Hemmung von P-gp erreicht wurde. (Die maximale Hemmung wurde, wie bereits erläutert, durch den Standard-Modulator Verapamil bestimmt.)

Aus den hier vorgestellten Ergebnissen aus der Literatur und dieser Arbeit geht hervor, dass durch Progesteron der Efflux von P-gp Substraten gehemmt wird. Die durch Progesteron hervorgerufene Inhibition von P-gp ist dabei nicht vom eingesetzten Substrat abhängig. Auch in dem in dieser Arbeit entwickelten Hoechst Assay wurde ebenfalls keine Stimulation des Hoechst Transportes, sondern eine zum Calcein AM Assay vergleichbare Hemmung der P-gp Funktion erhalten (pIC_{50} (Progesteron/Hoechst Assay) = $4,31 \pm 0,14$).

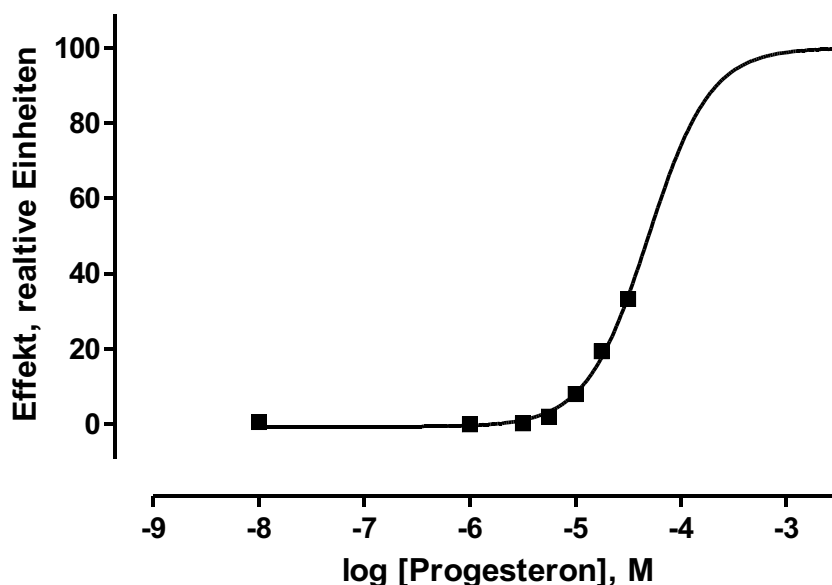


Abb. 3.75: Konzentrations-Effektkurve für Progesteron an A2780 Adr Zellen: $pIC_{50} = 4,31 \pm 0,06$, $n_H = 1,48 \pm 0,14$ (Calcein AM Assay). Beispiel für ein typisches Experiment aus einer Serie von vier unabhängigen Experimenten. Der Top-Wert der Kurve wurde auf die durch Verapamil maximal erreichbare Hemmung festgelegt.

Wie die nachfolgende Abb. 3.76 illustriert, bewirkt Progesteron keine Veränderung der

Calcein AM Akkumulation in A2780 Zellen. Diese Beobachtung war für die weiteren Experimente von großer Bedeutung. Cholesterin, das mit Progesteron strukturell verwandt ist, kann die Fluidität der Membran durch die Verstärkung der Beweglichkeit der Kohlenwasserstoffketten im Inneren der Membran erhöhen.²⁰⁶ Hätte Progesteron die Fluidität der Membran von A2780 Zellen beeinflusst, wäre es zu einer Änderung des Influx von Calcein AM gekommen.

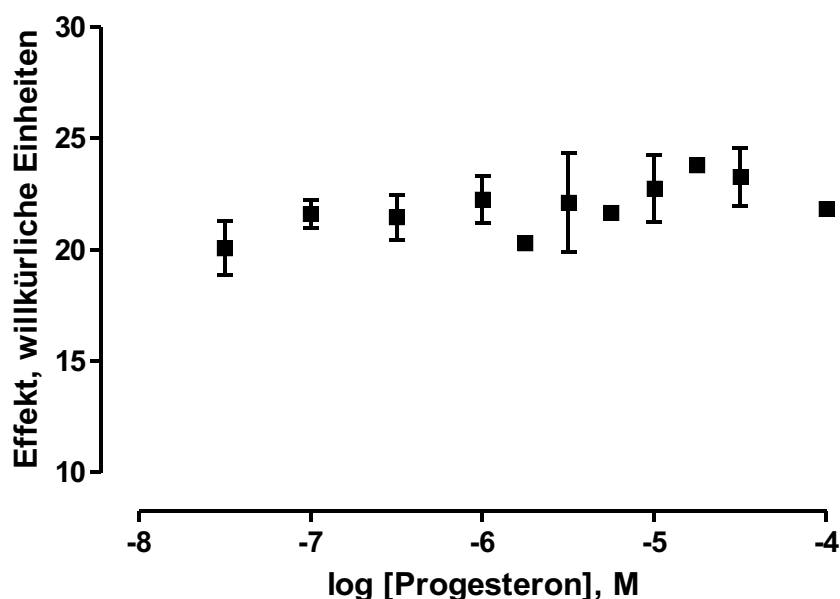


Abb. 3.76: Fehlende Beeinflussung der Calcein AM Akkumulation durch Progesteron in A2780 Zellen.

Die bisherigen Ergebnisse, die mit dem Calcein AM und Hoechst Assay ermittelt wurden, lassen eine Charakterisierung von Progesteron als Alloster nicht zu.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob der allosterische Effekt von Progesteron möglicherweise dann zum Vorschein kommt, wenn Progesteron in Kombination mit anderen Verbindungen mit Hilfe des Calcein AM Assays analysiert wird. Für die Durchführung solcher Kombinationsexperimente wurden Konzentrations-Wirkungskurven eines Modulators in Abwesenheit (Kontrolle) und in Gegenwart fixer Konzentrationen des potenziellen Allostere Progesteron aufgenommen (vergl. Kap. 2.13.1). Ein Beispiel für ein solches Experiment kann Abb. 3.77 entnommen werden. Bei der Betrachtung von Abb. 3.77 wird offensichtlich, dass durch ansteigende Konzentrationen von Progesteron die Konzentrations-Effektcurve von H 15 signifikant parallel nach links verschoben wird. Die

Hillkoeffizienten der Einzelkurven differieren nicht. Abb. 3.77 zeigt auch, dass die Bottom-Werte der einzelnen Konzentrations-Effektcurven mit zunehmender Progesteronkonzentration angehoben werden. Progesteron ist demnach nicht nur ein Alloster, sondern besetzt auch die Bindungsstelle des Orthosters. Der allosterische Effekt, der erst ab vergleichsweise hohen Konzentrationen von Progesteron (mittlerer mikromolarer Bereich) einsetzt, führt zu einer etwa 20fachen Steigerung der Aktivität von H 15. Für die Kombination von Progesteron und H 15 resultiert demnach ein überadditiver Effekt.

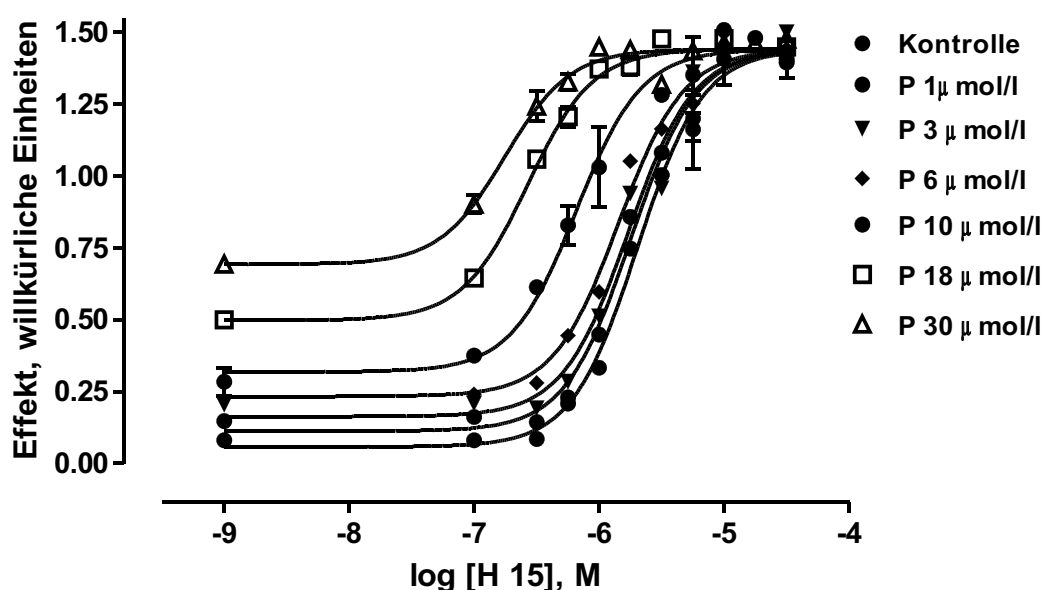


Abb. 3.77: Konzentrations-Effektcurven von H 15, die durch ansteigende Konzentrationen von Progesteron (P) bei gleichzeitiger Zunahme des Bottom-Wertes nach links verschoben werden (Calcein AM Assay, A2780 Adr Zellen). Beispiel für ein typisches Experiment aus einer Serie von 3 unabhängigen Versuchen.

Aufgrund der Interaktion von Progesteron mit der Orthoster-Bindungsstelle und des von Progesteron induzierten allosterischen Effektes könnte man diese Substanz als partiell allosterischen Liganden bezeichnen. Ein Beispiel für einen partiell allosterischen Liganden stellt AF-DX 384 dar. AF-DX 384 soll an freie M₂-Rezeptoren (muskarinische Acetylcholinrezeptoren) unter gleichzeitiger Nutzung der ortho- und allosterischen Bindungsstelle binden.²⁰⁷ In Abb. 3.78 sind die Konzentrations-Wirkungskurven aus Abb. 3.77 in normalisierter Form wiedergegeben. Durch die Normalisierung wird der Eigeneffekt von Progesteron allerdings unkenntlich gemacht.

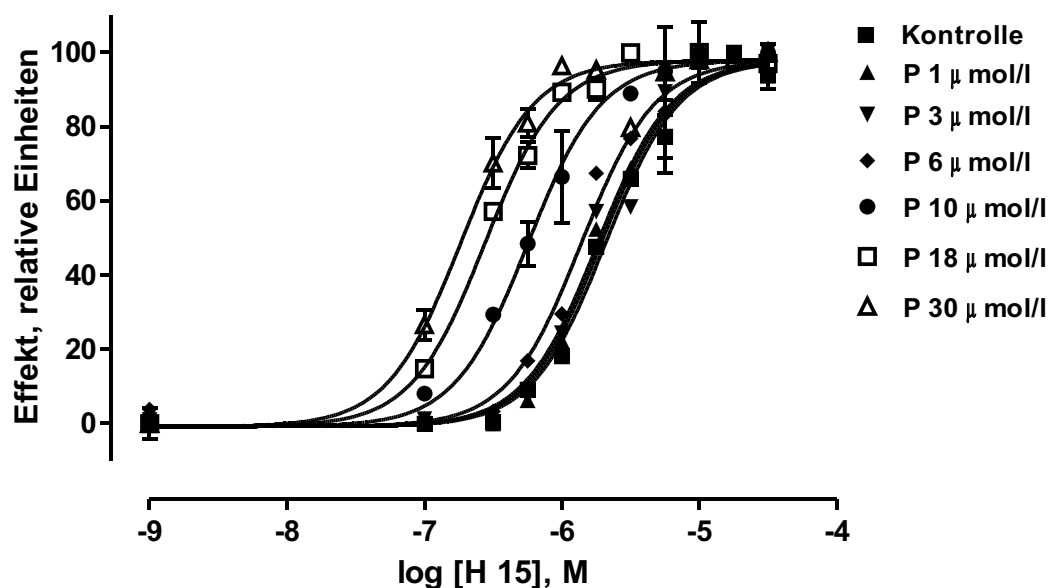


Abb. 3.78: Normalisierte Konzentrations-Effektkurven von H 15 aus Abb. 3.77, die durch ansteigende Konzentrationen von Progesteron (P) parallel nach links verschoben werden (Calcein AM Assay, A2780 Adr Zellen). Beispiel für ein typisches Experiment aus einer Serie von 3 unabhängigen Versuchen.

Die überadditive Wirkung der Kombination aus H 15 und Progesteron ist Ausdruck dafür, dass eine Interaktion mit mehr als einer Bindungsstelle stattfindet. Die genauere Betrachtung der in Abb. 3.77 dargestellten Konzentrations-Effektkurven führt zu der Erkenntnis, dass sich die Verschiebung der Orthoster-Kurve durch das Alloster einem Maximum annähert. Dieses besondere Kennzeichen eines Allosters steht im Gegensatz zur Verschiebung einer Agonistkurve durch einen Antagonisten, die sich quasi endlos fortsetzen kann. Anhand von Abb. 3.77 wird deshalb ein wichtiges Merkmal eines Allosters kenntlich gemacht: Die Sättigbarkeit des allosteren Effektes (Ceiling Effekt).^{154,155,156,157} Die Erhöhung der Konzentration des Allosters ruft ab einem bestimmten Punkt keine weitere Verschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve des Orthosters mehr hervor. Die maximale Verschiebung der Orthosterkurve ist ein Maß dafür, wie stark der allosterische Effekt gegenüber dem Orthoster zum Tragen kommt und wird auch als Kooperativitätsfaktor bezeichnet.

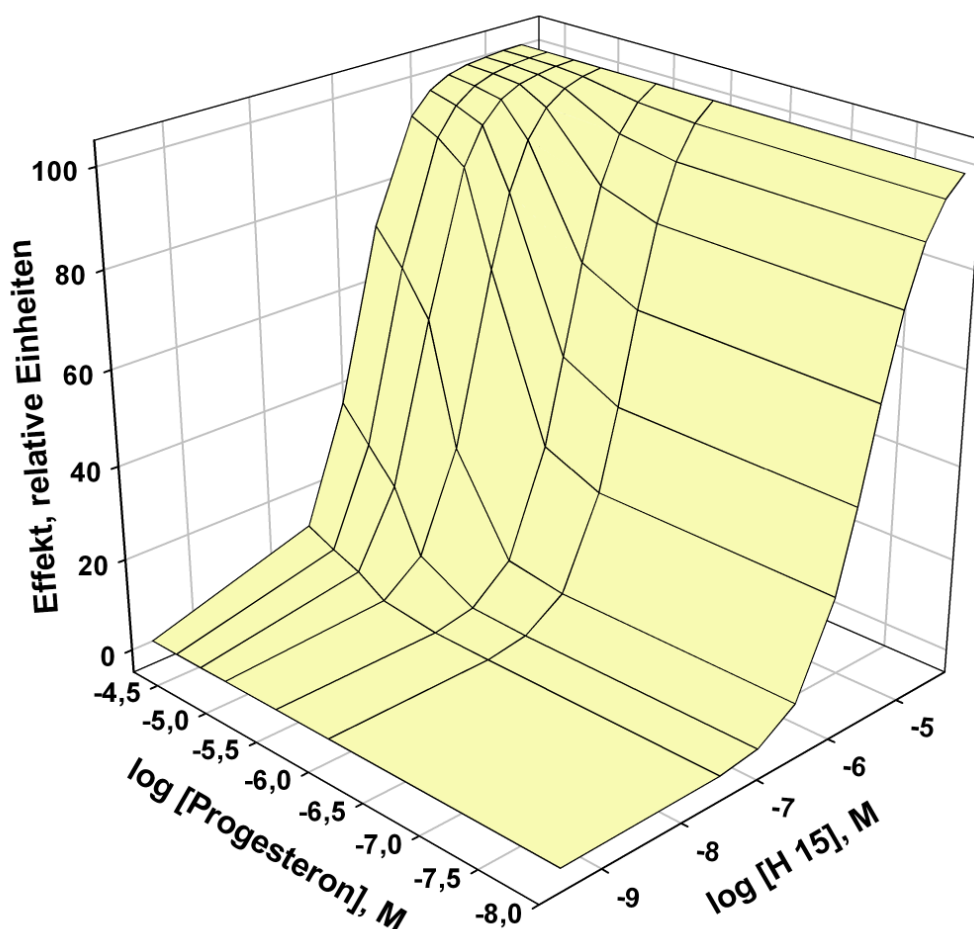


Abb. 3.79: 3D-Diagramm von H 15 und Progesteron auf Basis der Konzentrations-Effektkurven aus Abb. 3.78.

Abb. 3.79 zeigt ein 3D-Diagramm von H 15 und Progesteron. Zur Erstellung dieses 3D-Plots wurden die Konzentrations-Effektkurven aus Abb. 3.78 verwendet. Die hier dargestellten z-Werte wurden gemittelt.

Ein weiteres typisches Charakteristikum eines Allosters besteht darin, dass dessen Effizienz bzw. intrinsische Aktivität von der Art des eingesetzten Orthosters abhängig ist.^{199,154,155,141} Neben H 15 wurden deshalb noch weitere Verbindungen in Kombination mit dem Alloster Progesteron untersucht: Imatinib, Cyclosporin A, Verapamil, Nicardipin, XR9577, WK-X-51, WK-X-81, WK-X-66 und WK-Y-34. Der allosterische Effekt wurde mit Hilfe von zwei verschiedenen Methoden analysiert und quantifiziert: (1) Potency Ratio-Plot:¹⁵⁶

Wie Abb. 3.80 illustriert, werden beim Potency Ratio-Plot die reziproken Dose Ratio-Werte

gegen die korrespondierenden logarithmierten Konzentrationen des Allosters aufgetragen. Für den Fall, dass die Konzentration des Allosters gegen unendlich strebt, nähern sich die reziproken Dose Ratio-Werte einem Maximum an, welches dann dem Kooperativitätsfaktor entspricht. Dieses Verhalten wird anhand von Abb. 3.80 offensichtlich. Die in Abb. 3.80 dargestellten Potency Ratio-Plots sowie die in Tabelle 3.39 enthaltenen Kooperativitätsfaktoren machen deutlich, dass die intrinsische Aktivität des Allosters von der Art des Orthosters anhängig ist. Der Kooperativitätsfaktor α ist in allen Fällen größer als 1, deshalb liegt eine positiv kooperative Interaktion vor.

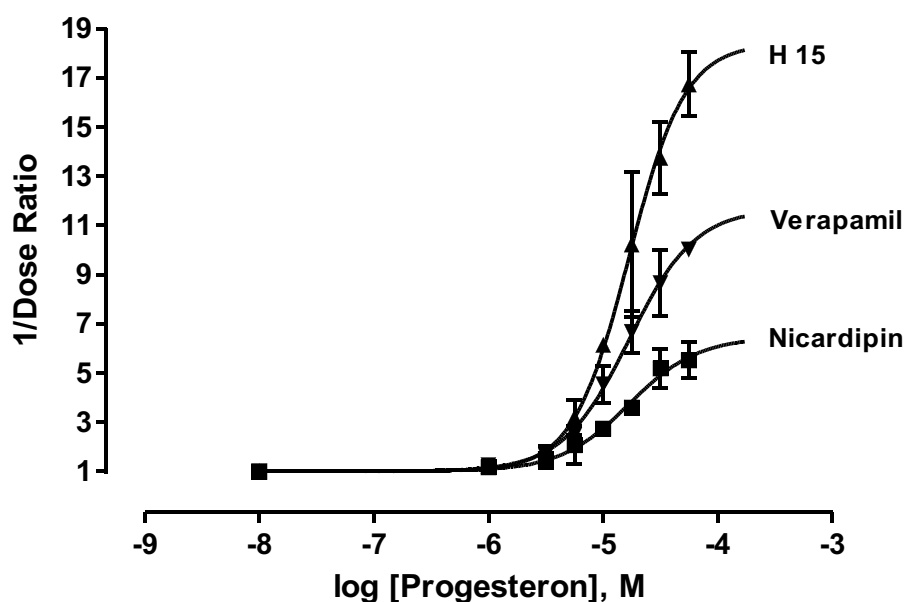


Abb. 3.80: Potency Ratio-Plots¹⁵⁶ für H 15, Verapamil und Nicardipin als Orthoster, Alloster Progesteron.

Der Wendepunkt der einzelnen in Abb. 3.80 dargestellten Kurven entspricht der Affinität des Allosters zu dessen Bindungsstelle ($pEC_{50} = 4,77 \pm 0,07$).

(2) Ein weiteres Verfahren zur Quantifizierung der Allosterie stellt die von Lazareno et al. entwickelte Gleichung dar.¹⁵⁷ Mit Hilfe des Programms GRAPHPAD PRISM[®] 3.0 konnten die Daten basierend auf diesem Modell analysiert werden. Bevor eine solche Analyse durchgeführt wurde, musste sichergestellt werden, dass die normalisierten Konzentrations-Ef-

fektkurven hinsichtlich ihrer Bottom- und Top-Werte sowie Hillkoeffizienten nicht signifikant voneinander verschieden waren (s. Kap.2.23.1). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.39 zusammengefasst. Für einen Vergleich der beiden Methoden zur Quantifizierung des allosteren Effektes wurden die maximalen reziproken Dose Ratio-Werte logarithmiert. Beide Verfahren korrelieren in akzeptabler Form ($r^2 = 0,95$) und sind daher beide geeignet. Dabei bestätigt auch das auf der Gleichung von Lazareno et al. basierende Verfahren¹⁵⁷ erneut, dass der allosterische Effekt von Progesteron von der Art des Orthosters abhängig ist, wie die verschiedenen Kooperativitätsfaktoren β in Tabelle 3.39 belegen.

Tabelle 3.39: Allosterer Effekt von Progesteron gegenüber verschiedenen Verbindungen. Quantifizierung nach Lazareno et al. ($\log \beta$ -Werte)¹⁵⁷ und durch die maximalen reziproken Dose Ratio-Werte¹⁵⁶, die logarithmiert wurden. k.a.E.: kein allosterer Effekt bis 50 $\mu\text{mol/l}$.

Verbindung	Kooperativitätsfaktor $\log [\beta]$	\log (Maximaler 1/Dose Ratio)
H 15	1,30 \pm 0,19	1,26
Imatinib	1,42 \pm 0,05	1,35
Verapamil	0,97 \pm 0,07	1,06
Nicardipin	0,60 \pm 0,10	0,81
WK-X-66	0,80 \pm 0,05	0,80
WK-Y-34	0,68 \pm 0,05	0,78
XR9577	k.a.E.	k.a.E.
WK-X-51	k.a.E.	k.a.E.
WK-X-81	k.a.E.	k.a.E.
Cyclosporin A	k.a.E.	k.a.E.

Bemerkenswerterweise kam in Gegenwart bestimmter Verbindungen (WK-X-81, WK-X-51, XR9577 und Cyclosporin A) der allosterische Effekt von Progesteron nicht zum Vorschein. Zwei Ursachen kommen in erster Linie in Frage:

- Diese Verbindungen stellen ebenfalls Allosterische dar, die Progesteron von der Bindungsstelle verdrängen können.
- Diese Substanzen besitzen selbst keine allosterischen Eigenschaften, verhindern aber die Interaktion von Progesteron mit dessen Bindungsstelle im Sinne einer sterischen Behinderung.

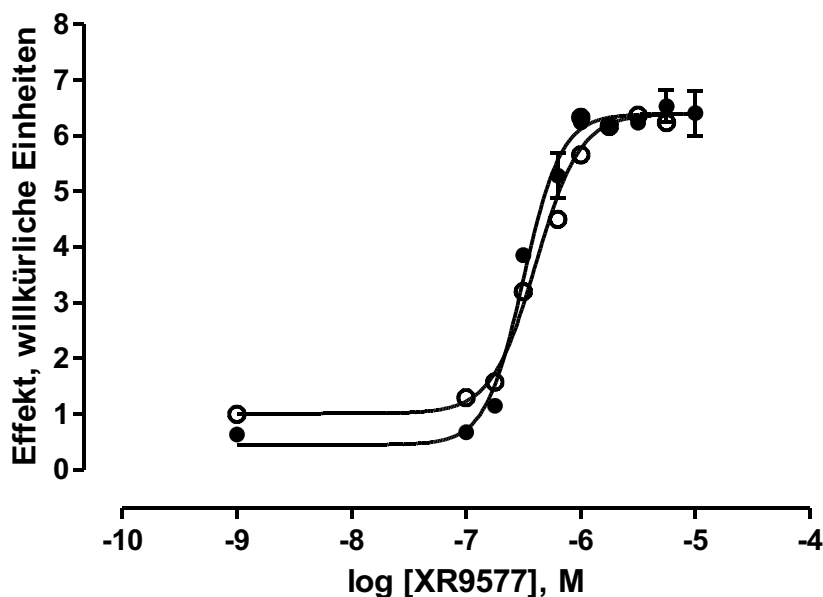


Abb. 3.81: Konzentrations-Wirkungskurve von XR9577 in Anwesenheit von $10 \mu\text{mol/l}$ Progesteron (gefüllte Kreissymbole) und in Abwesenheit von Progesteron (nicht gefüllte Kreissymbole): pIC_{50} (ohne Progesteron) = $6,42 \pm 0,07$; pIC_{50} ($10 \mu\text{mol/l}$ Progesteron) = $6,44 \pm 0,06$.

Neben Progesteron wurden weitere Steroide mit Hilfe des Calcein AM Assays im Hinblick auf allosterische Eigenschaften untersucht. Hintergrund dieser Experimente war die Intention, eine Vorstellung über den Zusammenhang zwischen der Struktur und dem allosterischen Wirkmechanismus zu erlangen. Dazu wurden Konzentrations-Wirkungskurven von Verapamil in Abwesenheit und Gegenwart verschiedener möglicher Allosterer mit einer Endkonzentration von $30 \mu\text{mol/l}$ aufgenommen. Das in Abb. 3.82 dargestellte Balkendiagramm zeigt, dass neben Progesteron, das als interner Standard fungierte, nur Testosteronacetat allosterische Eigenschaften zugesprochen werden können. Testosteron führte im Gegensatz zu Testosteronacetat zu keiner signifikanten parallelen Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve von Verapamil. Die Strukturen von Testosteronacetat und Testosteron unterscheiden sich nur dadurch, dass die in Position 17 des Steroidgrundgerüsts lokalisierte Hydroxygruppe mit Essigsäure verestert ist. Ob diese geringfügige strukturelle Modifikation die Affinität zur allosterischen Bindungsstelle so gravierend beeinflusst, scheint fraglich. Die $\log P$ -Werte der beiden Verbindungen differieren dagegen deutlicher (vergl. Tabelle 3.40). Eine wichtige Voraussetzung für die Interaktion mit P-gp - die Einlagerung in

die Membran^{14,15} - ist im Vergleich zu Testosteron im Falle des Testosteronacetats durch die etwa um den Faktor 10 gesteigerte Lipophilie besser erfüllt. Der für 11-Ketotestosteron berechnete logP-Wert ist verglichen mit Testosteron wesentlich niedriger.

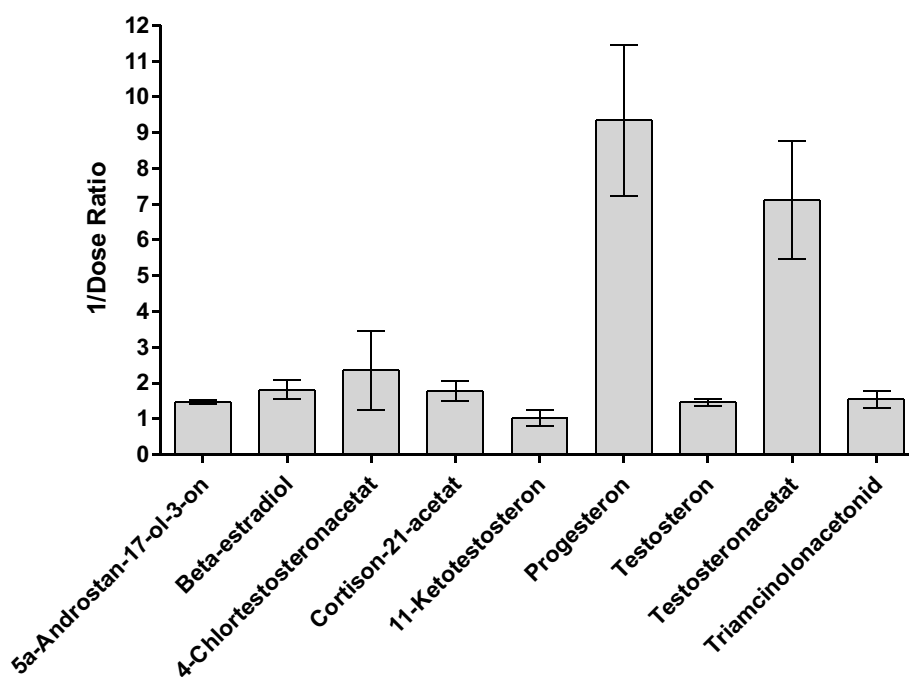


Abb. 3.82: Verschiedene Verbindungen, deren allosterische Wirkung gegenüber Verapamil bestimmt wurde. Calcein AM Assay, A2780 Adr Zellen, $n \geq 3$.

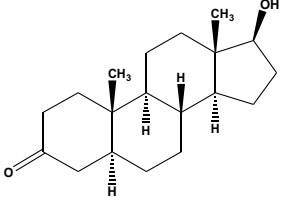
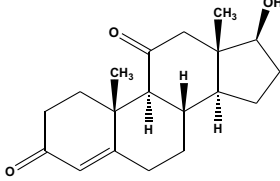
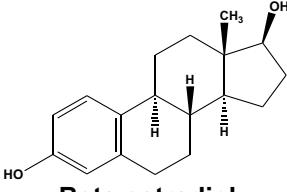
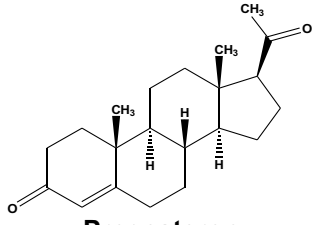
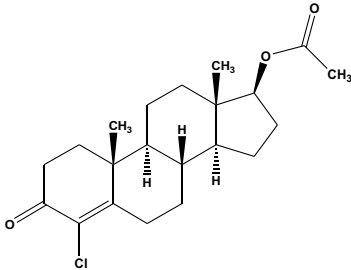
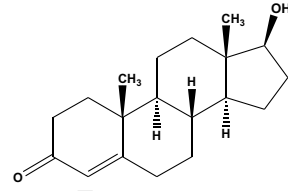
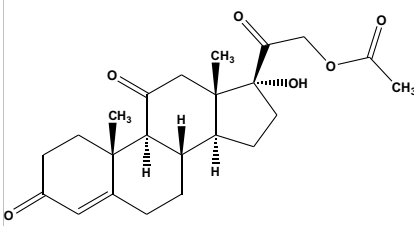
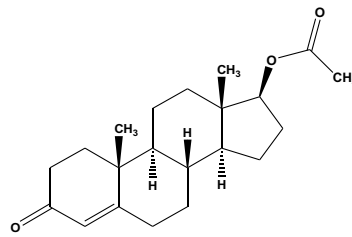
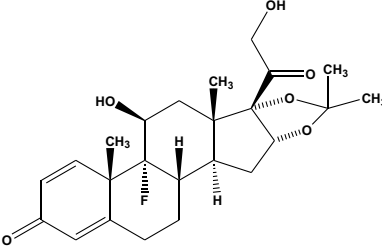
Demnach ist es nicht verwunderlich, dass für 11-Ketotestosteron ebenfalls keine allosterische Wirkung bestimmt werden konnte. Man betrachte in diesem Zusammenhang auch die logP-Werte der Verbindungen Cortison-21-acetat und Triamcinolonacetamid. Beide Steroide weichen strukturell von Testosteronacetat ab, deshalb ist eine genaue Erklärung für die fehlende allosterische Wirkung schwierig.

Die geringen logP-Werte könnten aber auch eine Ursache für die fehlende allosterische Wirkung dieser beiden Verbindungen sein. Bemerkenswerterweise konnte für 4-Chlor-testosteronacetat, das den höchsten berechneten logP-Wert von 4,56 besitzt, ein nur schwacher allosterischer Effekt festgestellt werden. Die Einführung des Chlor-Substituenten ist dabei ohne Einfluss auf die Ring A-Geometrie des Steroid-Grundgerüsts. Möglicherweise ist die Einführung eines Chlor-Substituenten mit einer Verringerung der Affinität zur allosterischen Bindungsstelle verbunden. Die geringe strukturelle Veränderung, die eine ausge-

3 Ergebnisse und Diskussion

prägte Herabsetzung der allosteren Wirkung hervorruft, könnte ein Hinweis darauf sein, dass die allosterische Bindungsstelle im Gegensatz zur R-Seite eine wesentlich höhere Spezifität aufweist.

Tabelle 3.40: Steroide mit Strukturformeln und Namen, deren berechnete logP- sowie 1/DR-Werte. 1/DR-Werte: Verschiebung der Verapamil-Konzentrations-Effektcurve in Anwesenheit von 30 µmol/l des Allosters.

Struktur/Name	Parameter	Struktur/Name	Parameter
 5α-Androstan-17β-ol-3-on	1/DR 1,46 ± 0,07	 11-Ketotestosteron	1/DR 1,02 ± 0,23
	logP 3,75 ± 0,33		logP 1,67 ± 0,39
 Beta-estradiol	1/DR 1,82 ± 0,26	 Progesteron	1/DR 9,34 ± 2,12
	logP 4,13 ± 0,25		logP 4,04 ± 0,28
 4-Chlortestosteronacetat	1/DR 2,36 ± 1,11	 Testosteron	1/DR 1,46 ± 0,10
	logP 4,56 ± 0,30		logP 3,48 ± 0,28
 Cortison-21-acetat	1/DR 1,78 ± 0,28	 Testosteronacetat	1/DR 7,12 ± 1,65
	logP 1,79 ± 0,52		logP 4,37 ± 0,29
 Triamcinolonacetamid	1/DR 1,54 ± 0,23		
	logP 2,60 ± 0,67		

Gerade deswegen scheint es sinnvoll, in Zukunft weitere Steroid-Analoga auf ihre allosterische Wirkung hin zu untersuchen, um eine bessere Vorstellung zu erlangen, welche strukturellen Elemente der Steroide zur allosterischen Wirkung beitragen.

Neben den Steroiden wurde das Thioxanthen-Derivat cis-Flupentixol auf mögliche allosterische Eigenschaften untersucht.

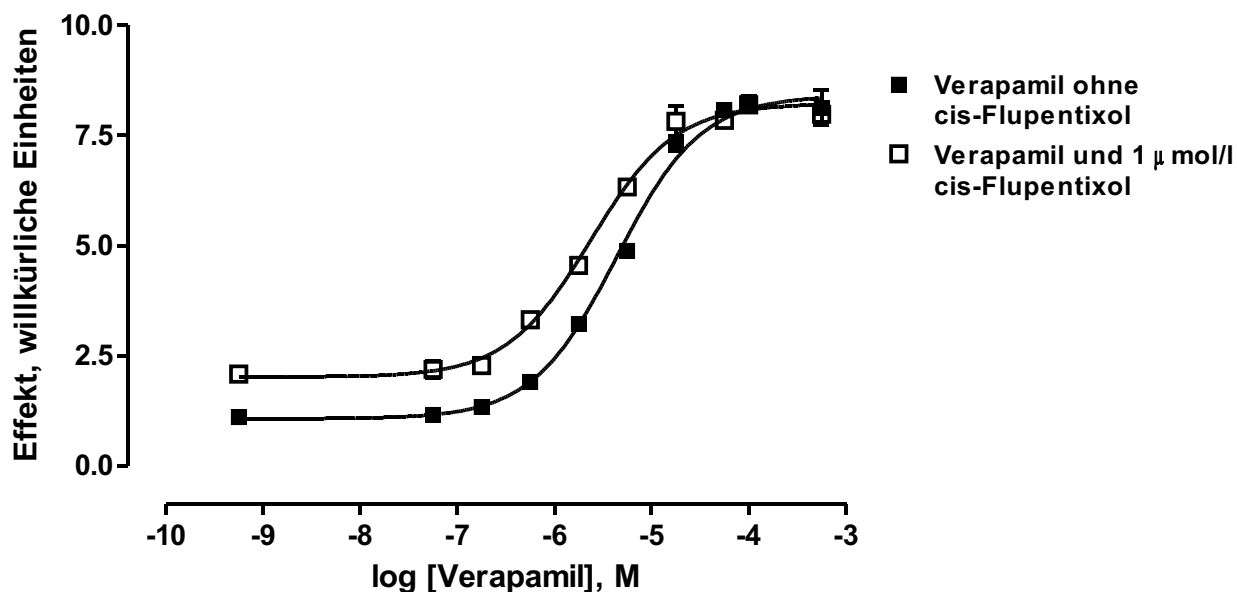


Abb. 3.83: Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurven für Verapamil in Abwesenheit und in Anwesenheit von 1 µmol/l cis-Flupentixol (Calcein AM Assay, A2780 Adr Zellen): pIC_{50} (Verapamil) = $5,30 \pm 0,06$, pIC_{50} (Verapamil und 1 µmol/l cis-Flupentixol) = $5,63 \pm 0,04$. Beispiel für ein typisches Experiment aus einer Serie von drei unabhängigen Versuchen.

Cis-Flupentixol kann nach Dey et al. als Alloster angesehen werden, weil dieses in Photolabeling-Experimenten die Bindung von [125 I]AAP (Iodoaralyazidoprazosin) zu P-gp um den Faktor 9 gegenüber dessen trans-Analogen erhöht.²⁰⁸ Aus Mutationsstudien geht hervor, dass das in TM Helix 12 lokalisierte Phenylalanin (F 983) für den allosteren Wirkmechanismus von cis-Flupentixol von entscheidender Bedeutung ist.^{209,210} In dieser Arbeit wurden Verapamil Konzentrations-Wirkungskurven in Abwesenheit und Gegenwart von cis-Flupentixol generiert. Im Gegensatz zu Progesteron führt cis-Flupentixol bereits in geringeren Konzentration zu einer signifikanten Linksverschiebung der Konzentrations-Effektcurve, wie Abb. 3.83 verdeutlicht. Außerdem bewirkt cis-Flupentixol selbst eine Inhibition des Cal-

cein AM Effluxes (vergl. Tabelle 3.7), was durch die Zunahme des Bottom-Wertes (s. Abb. 3.83) klar wird. Deshalb kann cis-Flupentixol in Übereinstimmung mit Progesteron eine Interaktion mit der Orthoster-Bindungsstelle zugesprochen werden. Trägt man die reziproken Verschiebungsfaktoren gegen die logarithmierte Konzentration des Allosters cis-Flupentixol auf, so resultiert der in Abb. 3.84 illustrierte Potency Ratio-Plot. Der K_D -Wert von cis-Flupentixol beträgt: $5,88 \pm 0,13$. Die Affinität von cis-Flupentixol zur allosteren Bindungsstelle ist im Vergleich zu Progesteron stärker; der Kooperativitätsfaktor bzw. der reziproke Dose Ratio-Wert ist aber wesentlich geringer (Maximaler 1/DR-Wert (cis-Flupentixol) = $3,91 \pm 0,22$), max. 1/DR-Wert (Progesteron) = $11,68 \pm 0,73$). Der in Abb. 3.85 dargestellte 3D-Plot veranschaulicht, wie sich die Anwesenheit von cis-Flupentixol auf die Verapamil-Konzentrations-Effektkurve auswirkt.

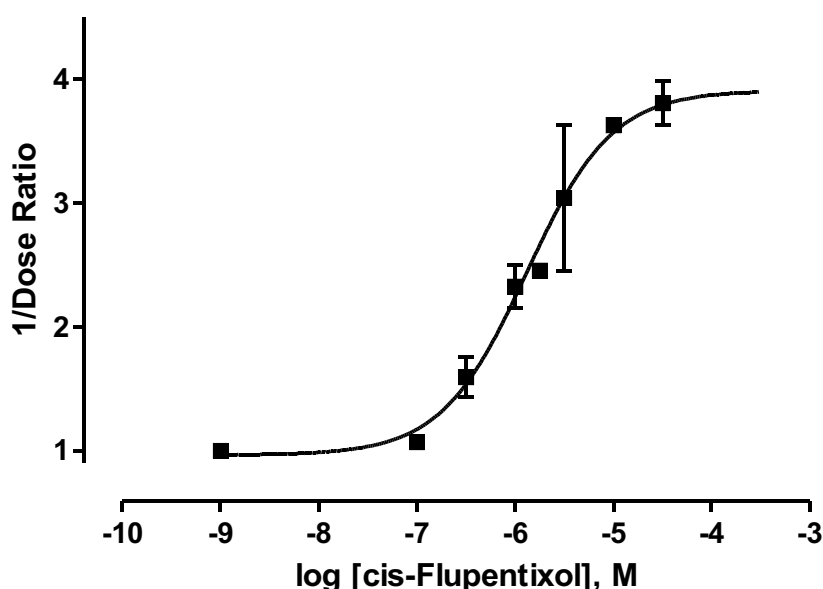


Abb. 3.84: Potency Ratio-Plot von cis-Flupentixol und Verapamil (Calcein AM Assay, A2780 Adr Zellen). $pEC_{50} = 5,88 \pm 0,13$, $n_H = 1,00$.

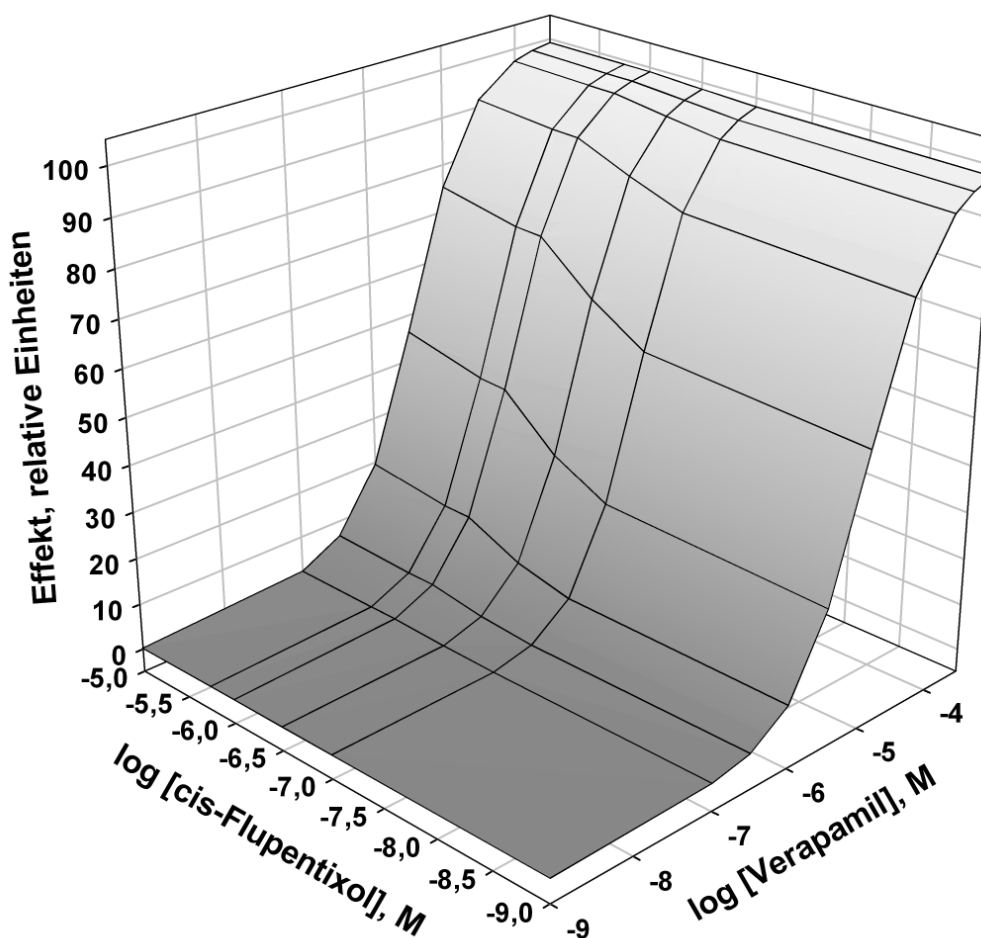


Abb. 3.85: 3D-Diagramm von Verapamil und cis-Flupentixol. Der Eigen-effekt von cis-Flupentixol ist wegen der Normalisierung der Konzentrations-Effekt-Kurven nicht zu erkennen.

Wie bereits erläutert, besteht ein wesentliches Charakteristikum eines Allosters darin, dass dessen Effekt vom verwendeten Orthoster abhängig ist.^{154,155,156,157} Aus diesem Grund wurden zwei weitere Verbindungen in Gegenwart von cis-Flupentixol analysiert: (1) H 15 stellt ein Phenothiazin-Derivat dar und ist deshalb mit cis-Flupentixol strukturell verwandt. H 15 interagiert in hohem Maße positiv kooperativ mit Progesteron. Bemerkenswerterweise konnte für H 15 keine signifikante Veränderung seiner biologischen Aktivität in Gegenwart von cis-Flupentixol festgestellt werden. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit beider Verbindungen ist dieses Resultat nicht verwunderlich (Interaktion mit der gleichen Bindungsstelle). Der fehlende allosterische Effekt von cis-Flupentixol in Gegenwart von H 15 könnte auch darauf hindeuten, dass Progesteron und cis-Flupentixol nicht mit der gleichen allosteren Bindungsstelle in Wechselwirkung treten. Demnach müsste für cis-Flupentixol ne-

ben Progesteron eine eigene Bindungsstelle definiert werden. (2) In Analogie zu den Kombinationsexperimenten mit Progesteron konnte für WK-X-34 ebenfalls keine signifikante Linksverschiebung durch ansteigende Konzentrationen von cis-Flupentixol beobachtet werden. Dies unterstreicht erneut, dass die XR-Verbindungen mit mehreren Bindungsstellen von P-gp interagieren.

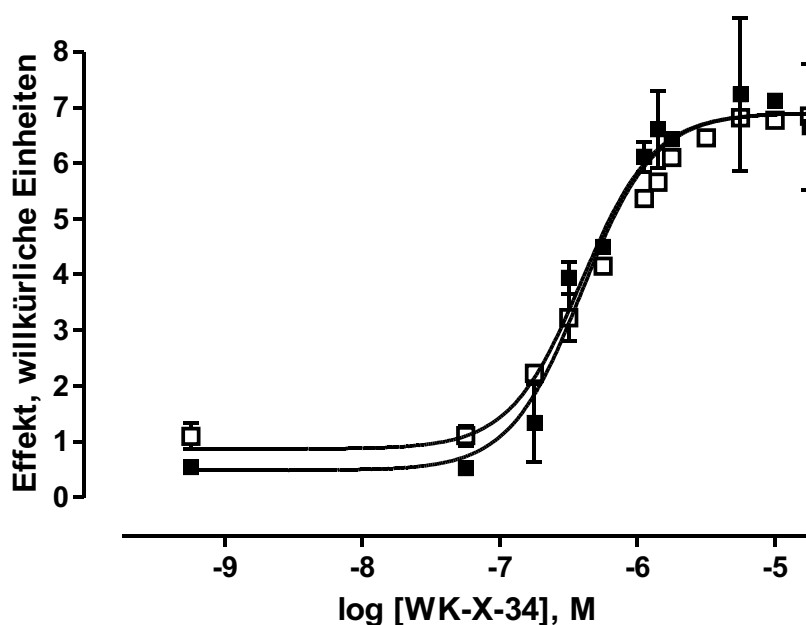


Abb. 3.86: Konzentrations-Wirkungskurven von WK-X-34 in Abwesenheit (gefüllte Vierecke) und in Anwesenheit von 1 $\mu\text{mol/l}$ cis-Flupentixol (nicht gefüllte Vierecke). pIC_{50} (WK-X-34) = $6,42 \pm 0,07$, $n_H=1,65$; pIC_{50} (WK-X-34 und 1 $\mu\text{mol/l}$ cis-Flupentixol) = $6,36 \pm 0,06$, $n_H = 1,66$.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zur Charakterisierung allosterer Wirkmechanismen wurden auf funktioneller Ebene generiert. Für eine vollständige Charakterisierung des allosteren Mechanismus könnten Radioligandbindungsstudien eine sinnvolle Ergänzung darstellen.^{77,211} Allerdings gestalten die geringen K_D -Werte potentieller Radioliganden die Durchführung solcher Assays schwierig und sind zugleich limitierender Faktor. Im Rahmen der häufig zur Trennung von gebundenen und nicht-gebundenen Radioliganden eingesetzten Filtrationsverfahren kann die geringe Affinität des markierten Liganden zu einem unerwünschten und unkalkulierbaren Verlust während des Trennschrittes führen. Ein weiteres Problem bei der Durchführung solcher Radioligandbindungsstudien resultiert aus der Tatsache, dass P-gp (wie auch viele andere ABC-Transporter) einem Konformationswandel

unterliegt. Nach Al-Shawi et al. existieren mindestens zwei Zustände: (1) Die high-affinity-Konformation, die bei der Interaktion der Substanz mit der (den) potenziellen Bindungsstelle(n) entscheidend ist. (2) Die low-affinity-Konformation wird eingenommen, wenn die Substanz zum Extrazellulärraum exponiert wird.⁶⁷ Welche dieser Konformationen beim Radioligandbindungsassay analysiert wird, ist nicht vorhersagbar. Eine weitere wichtige Möglichkeit zur Charakterisierung von allosteren Zusammenhängen stellen Mutagenesestudien dar.⁸¹ Diese dienen dazu, Rezeptorepitope der allosteren Bindungsstelle zu identifizieren, die für die Affinität von allosteren Modulatoren essentiell sind. Erwähnt seien in diesem Zusammenhang die von Voigtländer et al. durchgeführten Mutationsstudien muskarinischer Acetylcholin-Rezeptoren, die auf diese Weise essenzielle Epitope der allosteren Bindungsstellen feststellten.^{212,213} Anhaltspunkte für potentielle Bereiche innerhalb von P-gp, die mutiert werden könnten, ergeben sich aus den von Loo und Clarke gewonnenen Erkenntnissen. Sie stellten fest, dass in Gegenwart von Progesteron das Crosslinking nicht mehr nur zwischen den TM Helices 6 und 12 möglich ist, sondern neben TM Helix 6 und TM Helix 12 auch zwischen den TM Helices 6 und 11 erfolgt.²¹⁴ Aus dem veränderten Crosslinking leiteten Loo und Clarke einen von Progesteron ausgehenden Konformationswandel ab.

In zukünftige Mutagenesestudien sollte neben diesem Bereich ebenfalls das in TM Helix 12 lokalisierte Phenylalanin einbezogen werden, das für die allosterische Wirkung von cis-Flupentixol verantwortlich zu sein scheint. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente sollten anschließend mit den P-gp-Mutanten erneut realisiert werden. Darüberhinaus könnten die Resultate Einblick vermitteln, welche Aminosäuren die allosterische Bindungsstelle ausmachen und zu einem besseren Verständnis des allosteren Wirkprinzips beitragen.

3.12 Vergleich der funktionellen Transport-basierten Assays

Im bisherigen Verlauf dieser Arbeit wurden die beiden postulierten Bindungsstellen und deren wechselseitige Beeinflussung mit Hilfe des Calcein AM und des Hoechst Assays untersucht. Erstaunlicherweise konnte für 39 Verbindungen, die in beiden Assays untersucht worden waren, festgestellt werden, dass deren Aktivitätswerte in ausgeprägter Form korrelieren, wie Abb. 3.87 illustriert.

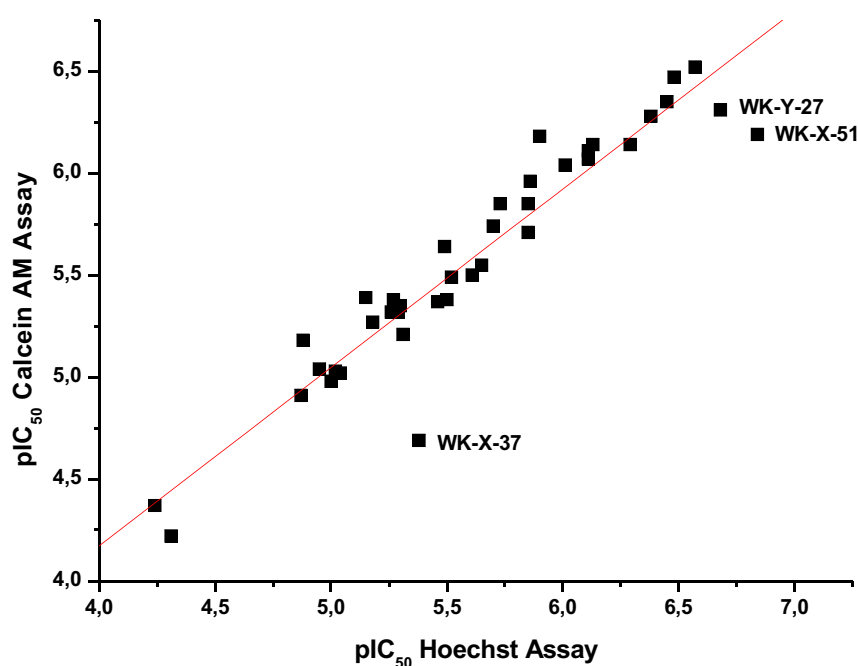


Abb. 3.87: pIC_{50} -Werte des Calcein AM Assays von 39 Verbindungen gegen die korrespondierenden pIC_{50} -Werte des Hoechst Assays (A2780 Adr, Mittelwerte), $r^2 = 0,90$.

Das Bestimmtheitsmaß r^2 steigt von 0,90 auf 0,96 an, wenn man die in Abb. 3.87 namentlich hervorgehobenen Substanzen von der Korrelation ausschließt. Diese Substanzen zeigen eine gewisse Präferenz zur H-Seite. Die deutliche Korrelation aller anderen Aktivitätswerte zueinander ist bemerkenswert, da beide Assays ursprünglich die Charakterisierung unterschiedlicher Bindungsstellen ermöglichen sollten. Man erinnere sich auch daran, dass bei der Untersuchung von Diltiazem, Verapamil, WK-X-66, WK-X-51, WK-X-34 und

XR9577 gegenüber Colchicin (H-Seite) und Doxorubicin (R-Seite) mittels des MTT Assays keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten (vergl. Kap. 3.2). Aufgrund der bisherigen Ergebnisse, eröffnete sich die Frage, ob möglicherweise alle funktionellen Assays zu vergleichbaren Resultaten führen, unabhängig davon, welches Substrat innerhalb des Testsystems eingesetzt wird. Gerade die Beantwortung dieser Frage ist von entscheidender Bedeutung und Interesse, um Grenzen und Möglichkeiten der funktionellen Assays zu erfassen. Dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere funktionelle, Transport-basierte Assays etabliert und verschiedene Substanzen vermessen. BCECF AM stellt ein P-gp Substrat dar, das strukturell nahe verwandt ist mit Rhodamin 123 und Calcein AM.^{215,216} Aufgrund der Struktur von BCECF AM ist eine Interaktion mit der R-Seite naheliegend. Neun unterschiedliche Substanzen wurden mit Hilfe des BCECF AM Assays an A2780 Adr Zellen untersucht (vergl. Kap. 2.13.3). Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 3.40 zusammengefasst.

Tabelle 3.41: BCECF AM Assay, A2780 Adr Zellen: gemittelte pIC_{50} -Werte und Hillkoeffizienten. $n \geq 2$.

Substanz	$pIC_{50} \pm SD$	$n_H \pm SD$
Cyclosporin A	5,88 \pm 0,06	2,92 \pm 0,99
Diltiazem	4,49 \pm 0,15	1,00
H 15	5,87 \pm 0,06	1,54 \pm 0,28
Verapamil	5,40 \pm 0,30	1,00
Vinblastin	4,90 \pm 0,25	2,15 \pm 0,31
WK-X-51	6,38 \pm 0,18	1,45 \pm 0,23
WK-X-34	6,20 \pm 0,12	2,52 \pm 0,51
WK-X-97	5,78 \pm 0,13	1,68 \pm 0,45
XR9577	6,25 \pm 0,17	1,72 \pm 0,48

Trägt man die pIC_{50} -Werte, die im BCECF AM Assay erhalten wurden, gegen die korrespondierenden Calcein AM Aktivitätsdaten auf, so resultiert die in Abb. 3.88 zu erkennende deutliche Korrelation (Bestimmtheitsmaß = 0,94). Die neun in Tabelle 3.41 enthaltenen Substanzen wurden ebenfalls mit dem Hoechst Assay analysiert. Abb. 3.89 illustriert, dass Hoechst und BCECF AM Assay ebenfalls zu vergleichbaren Ergebnissen führen (Bestimmtheitsmaß = 0,95). Die Steigung beider Regressionsgeraden ist nicht signifikant verschieden von 1,0.

3 Ergebnisse und Diskussion

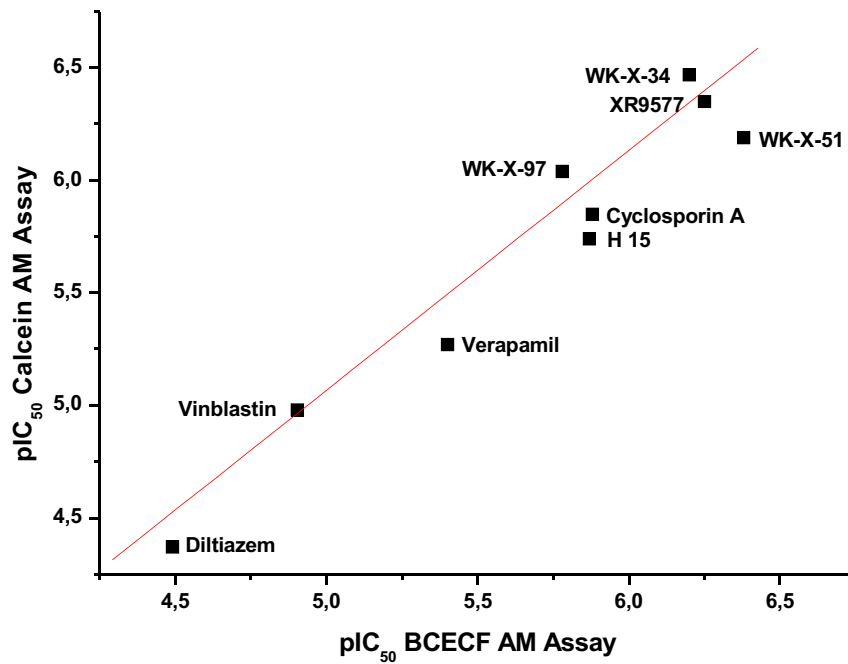


Abb. 3.88: pIC_{50} -Werte im BCECF AM Assay gegen pIC_{50} -Werte des Calcein AM Assays (A2780 Adr Zellen), $r^2 = 0,94$.

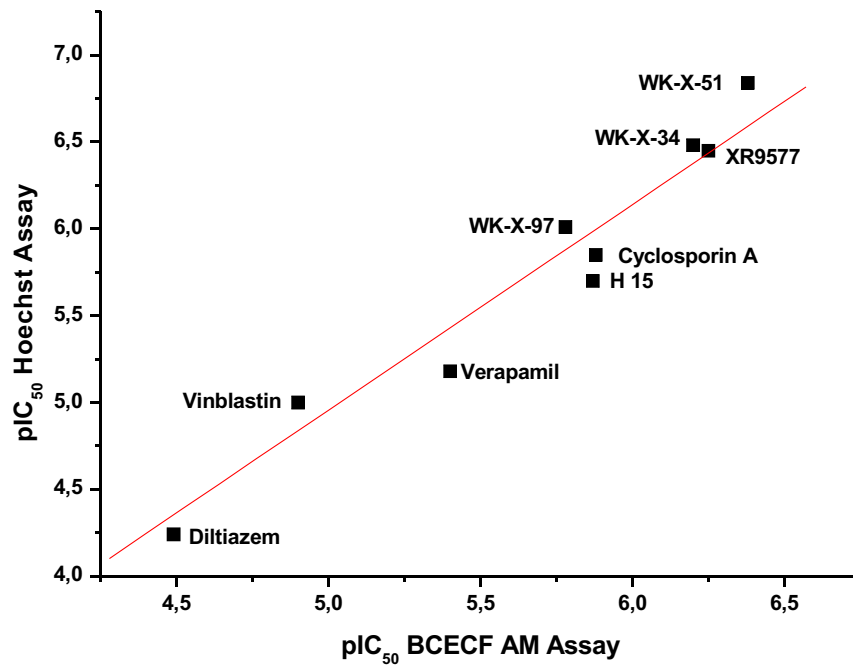


Abb. 3.89: pIC_{50} -Werte im BCECF AM Assay gegen pIC_{50} -Werte des Hoechst Assays (A2780 Adr Zellen), $r^2 = 0,95$.

Ein weiterer Assay (vergl. Kap. 2.16) basiert auf der Akkumulation von Vinblastin Bodipy[®] in A2780 Adr Zellen.²¹⁷ Die Akkumulation kann durch Inhibitoren konzentrationsabhängig erhöht werden. Tabelle 3.42 enthält die pIC_{50} -Werte von sechs Substanzen, die mit diesem Assay bestimmt wurden. Im Gegensatz zu den anderen funktionellen Assays wurde dieser nicht an einem Microplatereader, sondern an einem Durchflusszytometer durchgeführt (vergl. Kap. 2.16).

Tabelle 3.42: Ergebnisse des Vinblastin Bodipy[®] Assays: gemittelte pIC_{50} -Werte und Hillkoeffizienten, $n \geq 2$.

Substanz	$pIC_{50} \pm SD$	$n_H \pm SD$
Cyclosporin A	5,51 \pm 0,19	2,66 \pm 0,83
Diltiazem	3,82 \pm 0,20	1,00
Verapamil	4,67 \pm 0,28	1,00
Vinblastin	3,99 \pm 0,14	1,37 \pm 0,32
WK-X-34	6,05 \pm 0,09	2,33 \pm 0,31
XR9577	6,03 \pm 0,15	2,84 \pm 1,17

Die Aktivitätswerte, die auf dem Vinblastin Bodipy[®] Assay beruhen, wurden mit den anderen korrespondierenden Aktivitätswerten des Hoechst, Calcein AM und BCECF AM Assays mit Hilfe einer Hauptkomponentenanalyse untersucht. Für die erste Hauptkomponente ergeben sich folgende Kennwerte:

- Eigenwert = 3,956, erklärte Gesamtvarianz = 98,9%
- Faktorladungen: Calcein AM = 0,997, Hoechst = 0,994, BCECF AM = 0,996, Vinblastin Bodipy[®] = 0,991.

Die Ergebnisse der HKA (vier Substrate, sechs Substanzen) dokumentieren, dass trotz der strukturellen Diversität der Substrate vergleichbare Resultate erzielt werden konnten. Gerade auch deshalb ist diese Erkenntnis beachtlich, weil Vinblastin mit mehreren Bindungsstellen von P-gp interagieren soll.^{147,218} Möglicherweise kann aber Vinblastin Bodipy[®] nicht einfach mit Vinblastin gleichgesetzt werden, da der Bodipy[®]-Linker zu einer veränderten Interaktion mit P-gp beitragen könnte.

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die These, dass unabhängig vom eingesetzten Substrat für die meisten Substanzen vergleichbare Resultate erzielt werden. Im Folgenden werden zusätzlich Literatur-Daten einbezogen, um diese These zu prüfen.

3 Ergebnisse und Diskussion

Leonessa et al. untersuchten mit Hilfe eines [³H]Vinblastin und eines Doxorubicin Akkumulations Assays neben Cyclosporin A und Verapamil die Aktivität von Progesteron sowie von Progesteron-Analoga an ABCB1 überexprimierenden Zellen.²⁰⁴ Das Bestimmtheitsmaß beträgt für die sieben Verbindungen 0,97 (s. Abb. 3.90).

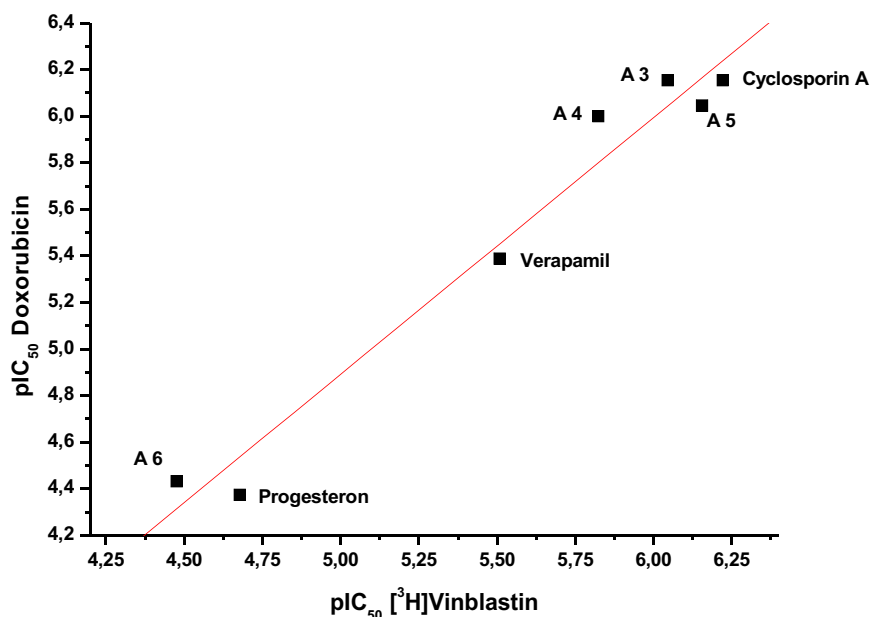


Abb. 3.90: Leonessa et al.²⁰⁴: [³H]Vinblastin pIC₅₀-Werte gegen Doxorubicin pIC₅₀-Werte, $r^2 = 0,97$.

Auch für Doxorubicin, dem eine Interaktion mit der R-Seite zugesprochen wird, und Vinblastin, das mit mehreren Bindungsstellen von P-gp in Wechselwirkung treten soll,^{218,193} kann eine Korrelation festgestellt werden.

In einer Studie von Ecker et al. wurden 12 Propafenon-Derivate mit einem Rhodamin 123 und Daunorubicin basierten Akkumulationsassay als P-gp Inhibitoren charakterisiert (Vincristin resistente, ABCB1 überexprimierende T-Lymphoblasten Zelllinie).⁹⁴ Die Korrelation ist anhand von Abb. 3.91 deutlich zu erkennen ($r^2 = 0,98$). Da für Rhodamin 123 und Daunorubicin eine gemeinsame Bindungsstelle diskutiert wird,⁷⁵ ist diese Korrelation eine logische Konsequenz.

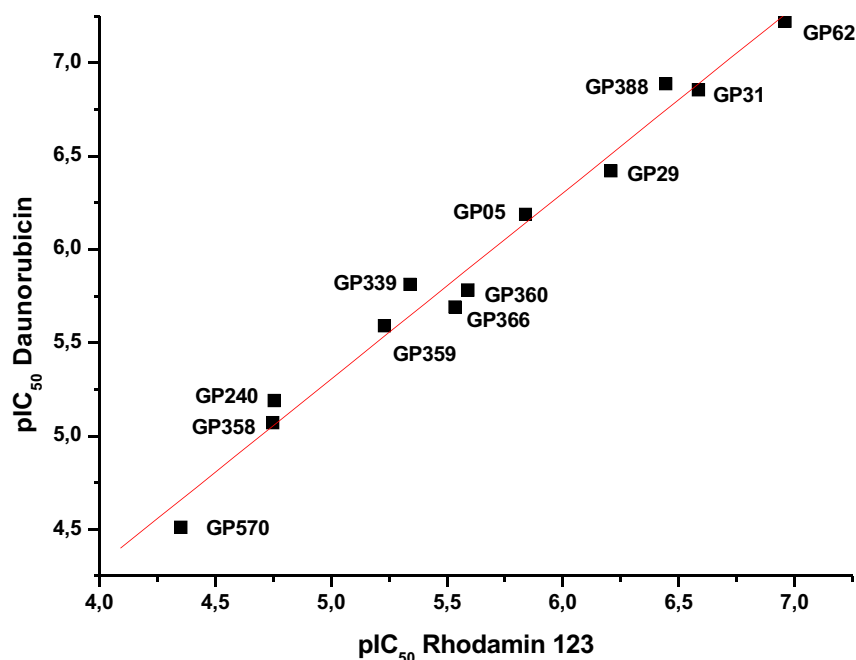


Abb. 3.91: pIC_{50} -Werte (Rhodamin 123) gegen pIC_{50} -Werte (Daunorubicin) für zwölf Propafenon-Derivate.⁹⁴ $r^2 = 0,98$.

Die inhibitorische Potenz von Dexniguldipin, B9203-16, SDZ PSC833, GF120918 wurde von Boer et al. mit drei unterschiedlichen Akkumulationsassays (Rhodamin 123, [³H]Vincristin, [³H]Daunorubicin) bestimmt.²¹⁹ Die Ergebnisse der HKA lassen die Schlussfolgerung zu, dass alle Testsysteme trotz der strukturell divergierenden Substrate zu vergleichbaren Ergebnissen führen. Für die erste Hauptkomponente ergaben sich folgende Kennwerte:

- Eigenwert: 2,82, erklärte Gesamtvarianz: 94,1%.
- Faktorladungen: Rhodamin 123 = 0,977, Daunorubicin = 0,987, Vincristin = 0,945.

Neben einem Rhodamin 123 Akkumulationsassay diente der MTT Assay dazu, die biologische Aktivität von 19 Propafenon-Derivaten als P-gp Inhibitoren zu bestimmen.²²⁰ Die in Abb. 3.92 zu erkennende Korrelation der beiden Testsysteme ($r^2 = 0,90$) ist deshalb bemerkenswert, weil der MTT Assay als eher unspezifische, „indirekte“ Methode zur Analyse der P-gp Funktion im Vergleich zu den bisher erwähnten Testsystemen angesehen werden kann.

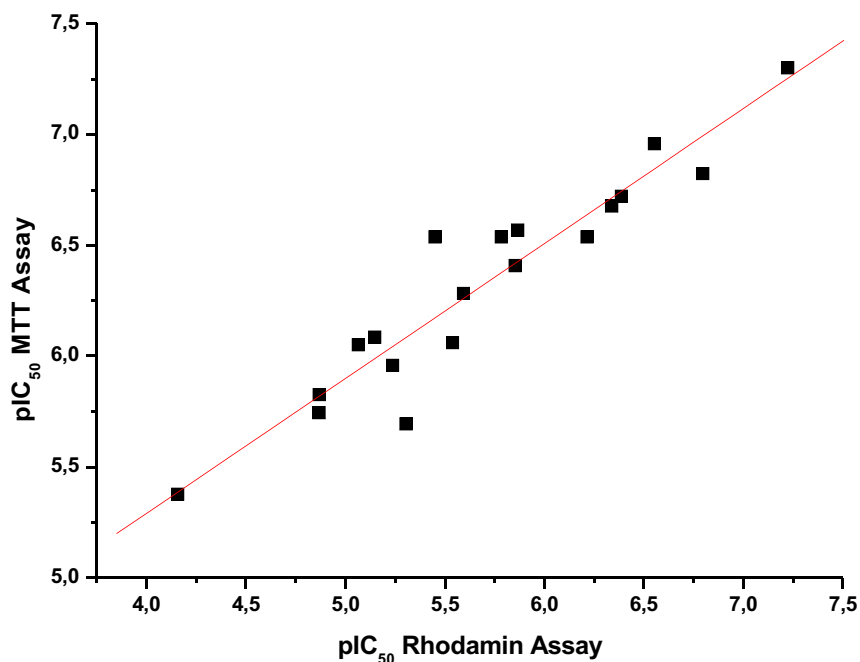


Abb. 3.92: pIC_{50} -Werte (Rhodamin 123) gegen pIC_{50} -Werte (MTT Assay) für 19 Propafenon-Derivate.²²⁰ $r^2 = 0,90$.

Lee et al. konnten die Inhibition der P-gp Funktion durch verschiedene HIV-Protease-Inhibitoren Ritonavir, Saquinavir, Indinavir neben Cyclosporin A mit verschiedenen Substraten (Daunorubicin, Rhodamin 123, Vinblastin Bodipy[®], Verapamil Bodipy[®], Prazosin Bodipy[®]) an ABCB1 überexprimierenden Zellen nachweisen.²²¹ Diese Daten wurden mittels einer HKA analysiert und lieferten die folgenden Kenngrößen für die erste HK:

- Erklärte Gesamtvarianz: 82,5%, Eigenwert: 4,12.
- Faktorladungen: Rhodamin 123 = 0,928, Daunorubicin = 0,848, Vinblastin Bodipy[®] = 0,946, Verapamil Bodipy[®] = 0,885, Prazosin Bodipy[®] = 0,930.

17 strukturell völlig verschiedene Verbindungen wurden von Ekins et al. in einem Calcein AM und Vinblastin Akkumulations Assay an ABCB1 überexprimierenden Zellen (LLC-PK1 mit humanem ABCB1) hinsichtlich ihrer P-gp inhibitorischen Wirkung getestet.⁸¹ Das Bestimmtheitsmaß für die beiden Testsysteme liegt bei 0,67 (s. Abb. 3.93).

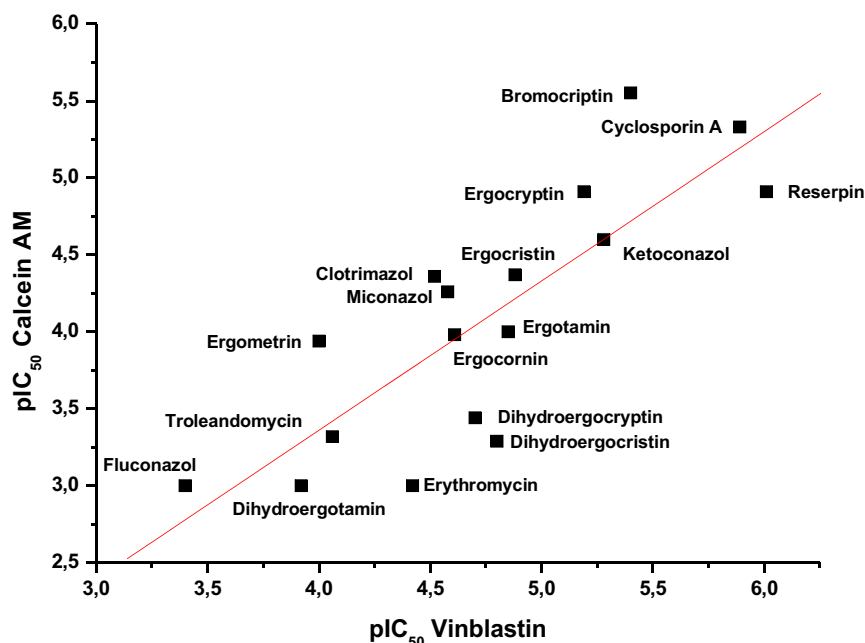


Abb. 3.93: pIC_{50} -Werte (Vinblastin) gegen pIC_{50} -Werte (Calcein AM) für 17 strukturell verschiedene Verbindungen.⁸⁸ $r^2 = 0,67$.

Tc-Sestamibi stellt ein weiteres, radioaktives P-gp Substrat dar. Die pIC_{50} -Werte von vier Substanzen Prazosin ($pIC_{50} = 3,52$), Verapamil ($pIC_{50} = 5,39$), Cyclosporin A ($pIC_{50} = 5,98$) und Vinblastin ($pIC_{50} = 4,89$) korrelieren mit den Aktivitätswerten des Calcein AM Assays ausgezeichnet ($r^2 = 0,995$).²²² Die Aussagekraft dieses Vergleichs ist aufgrund der zu geringen Substanzzahl eingeschränkt.

Die Aktivitätswerte der in Tabelle 3.43 enthaltenen Verbindungen wurden von Wang et al. mit Hilfe verschiedener funktioneller, Durchflusszytometrie-basierter Assays an einer ABCB1 überexprimierenden Zelllinie ermittelt.²²³

Um die Daten miteinander zu vergleichen, wurden verschiedene Hauptkomponentenanalysen durchgeführt. Zunächst wurden Hauptkomponentenanalysen unter ausschließlicher Einbeziehung der Daten von Wang et al. vollzogen. Die erste HKA beruht auf den pIC_{50} -Werten aller 24 in Tabelle 3.7 enthaltenen Verbindungen. Da die pIC_{50} -Werte für Chinidin stark voneinander abweichen, wurde zusätzlich eine zweite HKA unter Auslassung dieser Verbindung realisiert.

3 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3.43: Von Wang et al. publizierte pIC_{50} -Werte²²³, die mit Hilfe von drei funktionellen Testsystemen ermittelt wurden. Verbindungen, die auch im Rahmen dieser Arbeit mittels des Calcein AM Assays an A2780 Adr Zellen untersucht wurden, sind grau unterlegt. Sie sind mit einem blauen Stern versehen, wenn sie auch im Hoechst Assay vermessen wurden.

Verbindung	pIC_{50} (Daunorubicin)	pIC_{50} (LDS-751)	pIC_{50} (Rhodamin 123)
Carvedilol	5,34	5,22	5,18
Chinidin	4,73	6,00	4,47
Chinin	4,66	4,13	4,06
Clarithromycin	5,42	5,14	4,82
Clofazimin	6,22	5,96	6,00
Cyclosporin A*	5,85	5,74	5,77
Dipyridamol	4,64	4,63	4,46
Emetin	5,04	5,62	5,02
Felodipin	4,58	4,49	4,22
Fluphenazin	5,19	5,24	4,98
Ketoconazol	5,25	4,63	4,27
Lovastatin	4,58	4,49	3,94
Nicardipin*	5,49	5,25	4,59
N-Norgallopamil	5,44	5,31	5,07
Paclitaxel	4,27	4,27	4,15
Progesteron*	4,02	4,06	3,72
Reserpin*	6,30	5,68	5,41
Simvastatin	5,05	4,58	4,26
Tamoxifen	5,19	4,92	4,50
Terfenadin	5,74	5,60	5,57
Trifluoperazin	5,14	5,20	4,96
Troleandomycin	4,17	4,11	4,06
Verapamil*	5,38	5,33	5,19
Vinblastin*	4,75	4,70	4,53

Die dritte HKA bezieht sich auf die grau unterlegten 11 Substanzen, die auch in dieser Arbeit mit Hilfe des Calcein AM Assays vermessen wurden. Die vierte HKA basiert auf den Aktivitätswerten von sechs Substanzen, die auch mit dem Hoechst Assay dieser Arbeit bestimmt wurden. Die Namen dieser sechs Verbindungen sind mit einem blauen Stern gekennzeichnet. Die Ergebnisse (s. Gesamtvarianz, Eigenwert, Faktorladungen), die in Tabelle 3.44 zusammengestellt sind, heben deutlich hervor, dass die Daten von Wang et al. trotz der Verwendung unterschiedlicher Substrate gut miteinander korrelieren.

Tabelle 3.44: Ergebnisse unterschiedlicher HKA. D (Daunorubicin), L (LDS-751) und R (Rhodamin 123) nach Wang et al., C (Calcein AM), unter Verwendung von Daten aus dieser Arbeit, die in Tabelle 3.44 grau unterlegt sind. H (Hoechst 33342) bezieht sich auf die mit einem blauen Stern versehenen Substanzen aus Tabelle 3.44.

Assays	Erklärter Anteil der Gesamtvarianz (1.HK)	Eigenwert (1.HK)	Faktorladungen (1.HK)
D + L + R (24 Verbindungen)	89,46%	2,684	D = 0,941, L = 0,932, R = 0,964
D + L + R (23 Verbindungen, ohne Chinidin)	94,08%	2,822	D = 0,956, L = 0,981, R = 0,973
D + L + R (11 Verbindungen)	93,75%	2,813	D = 0,949, L = 0,986, R = 0,969
D + L + R (6 Verbindungen)	95,93%	2,878	D = 0,975, L = 0,995, R = 0,968
D + L + R + C (11 Verbindungen)	92,51%	3,701	D = 0,939, L = 0,980, R = 0,970, C = 0,957
D + L + R + H (6 Verbindungen)	95,53%	3,821	D = 0,967, L = 0,995, R = 0,969, H = 0,979
D + L + R + C + H (6 Verbindungen)	95,82%	4,791	D = 0,959, L = 0,994, R = 0,968, C = 0,988, H = 0,986

Auf der Basis weiterer Hauptkomponentenanalysen (Tabelle 3.44) kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten pIC_{50} -Werte mit den Aktivitätsdaten von Wang et al. unabhängig vom verwendeten Substrat gut korrelieren. Die Korrelation der Aktivitätswerte ist für Daunorubicin, LDS-751 und Rhodamin 123 nicht verwunderlich, da diese Substrate mit der gleichen Bindungsstelle interagieren sollen. Beachtlich ist aber die Tatsache, dass auch die mittels des Hoechst Assays generierten pIC_{50} -Werte mit den entsprechenden, mit Hilfe der anderen Substrate bestimmten Aktivitätswerten, korrelieren, obwohl Hoechst mit einer anderen, der sogenannten H-Seite, in Wechselwirkung treten soll.⁷⁵

Die bisher vorgestellten Ergebnisse aus der Literatur unterstreichen in Übereinstimmung mit den Resultaten dieser Arbeit die These, dass unabhängig vom verwendeten Substrat hoch korrelierte Aktivitätswerte erhalten werden. Diese beziehen sich auf Transport-ba-

sierte Testsysteme. Es stellt sich aber die Frage, ob die Transport-basierten Testsysteme mit dem ATPase Assay, einem weiteren funktionellen Testsystem, korrelieren. Im Folgenden werden einige Details des ATPase Assays erläutert:

Der ATPase Assay basiert auf der hydrolytischen Umsetzung von ATP zu ADP und P_i . Die freigesetzte Menge an P_i wird in Proben ermittelt, die einen definierten P-gp Gehalt aufweisen und die mit einer bestimmten Konzentration der zu untersuchenden Substanz inkubiert wurden. Die Detektion erfolgt in bestimmten Zeitabständen kolorimetrisch über einen Phosphomolybdatokomplex.^{67,224} Die Aktivität einer Substanz wird in Bezug zur Basalaktivität gesetzt (Basalaktivität = ATPase Aktivität von P-gp in Abwesenheit von Substraten oder Modulatoren). Im ATPase Assay werden drei charakteristische Kenngrößen bestimmt: (i) pK_m : Dieser Wert beschreibt die Affinität der untersuchten Substanz zu P-gp. Der pK_m -Wert entspricht der Affinität zur sogenannten „high-affinity-site“. (ii) v_{max} oder β oder der D-Wert wird in Bezug zur Basalaktivität von P-gp gesetzt und gibt die maximale Geschwindigkeit der P-gp ATPase Aktivität in Gegenwart der Substanz an. (iii) pK_i : Dieser Wert kann als die Affinität der untersuchten Verbindung zur sogenannten „low-affinity-site“ verstanden werden. Die „low-affinity-site“ entspricht der „high-affinity-site“, nachdem P-gp den Konformationswandel abgeschlossen hat und ist zum Extrazellulärraum exponiert.⁶⁷ Mit dem ATPase Assay können Substrate und Modulatoren nicht unterschieden werden. Ebenfalls kann mit Hilfe dieses Assays nicht entschieden werden, ob eine Verbindung transportiert wird, oder nicht. Progesteron wird beispielsweise von P-gp nicht transportiert, zeichnet sich aber durch eine starke Zunahme der ATP-Hydrolyse-Geschwindigkeit v_{max} aus. Xia et al. konnten für Hoechst 33342 keine Beeinflussung bzw. Stimulation der Basalaktivität von P-gp feststellen, obwohl Hoechst 33342 transportiert wird.²²⁵ Auch die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Hoechst 33342 transportiert wird, denn der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Hoechst Assay basiert auf dem Transport von Hoechst 33342. Ebenfalls lässt der mittels des MTT Assays bestimmte Resistenzfaktor für Hoechst 33342 (s. Kap. 3.1) auf den Transport von Hoechst 33342 durch P-gp schließen.

Es stellt sich die Frage, ob die in dieser Arbeit mit dem Calcein AM und Hoechst Assay bestimmten pIC_{50} -Werte mit den pK_m -Werten aus der Literatur vergleichbar sind. Ein Vergleich der von Xia et al. mit dem ATPase Assay charakterisierten Substanzen Progesteron, Cyclosporin A, Verapamil und Vinblastin (Tabelle 3.45) mit den pIC_{50} -Werten, die im Hoechst Assay dieser Arbeit erhalten wurden, führt lediglich zu einem Bestimmtheitsmaß

3 Ergebnisse und Diskussion

von 0,77.²²⁵ (Das 95%-Konfidenzintervall der Steigung der Korrelationsgeraden schließt den Wert 1 nicht ein.) Neben diesen vier Substanzen kann bei einem Vergleich mit den im Calcein AM Assay erhaltenen pIC_{50} -Werten (s. Tabelle 3.7) zusätzlich noch die Substanz Etoposid in die Korrelation einbezogen werden (s. Tabelle 3.45). Der quadrierte Korrelationskoeffizient beträgt nur 0,29. In Tabelle 3.45 sind weitere pK_m -Werte, die mittels des ATPase Assays generiert wurden, aufgeführt.

Tabelle 3.45: Der Literatur entnommene pK_m -Werte im ATPase Assay. Die pK_m -Werte sind grüner Farbe dargestellt, wenn die Verbindungen auch mit Hilfe des Calcein AM Assays charakterisiert wurden. pK_m -Werte sind mit einem blauen Stern versehen, wenn sie mittels des Hoechst Assays dieser Arbeit analysiert wurden. ^{225,226,227}

Substanz	pK_m (Litman et al.)²²⁷	pK_m (Gatlik-Landwojtowicz et al.)²²⁶	pK_m (Xia et al.)²²⁵
Chlorpromazin	4,91	5,24	-
Chinidin	5,30	-	-
cis-Flupentixol	-	5,53	-
Cyclosporin A	7,22*	7,70*	8,00*
Diltiazem	4,13*	5,46*	-
Dipyridamol	6,40	-	-
Etoposid	-	-	5,92
Fluphenazin	4,95	-	-
Imatininb	-	5,54*	-
Promethazin	4,63	-	-
Progesteron	4,76*	5,30*	4,31*
Reserpin	7,00*	6,52*	-
Tamoxifen	7,00	-	-
Terfenadin	5,66	-	-
Trifluoperazin	5,19	5,44	-
Verapamil	5,60*	6,30*	4,76*
Vinblastin	5,89*	-	5,80*

3 Ergebnisse und Diskussion

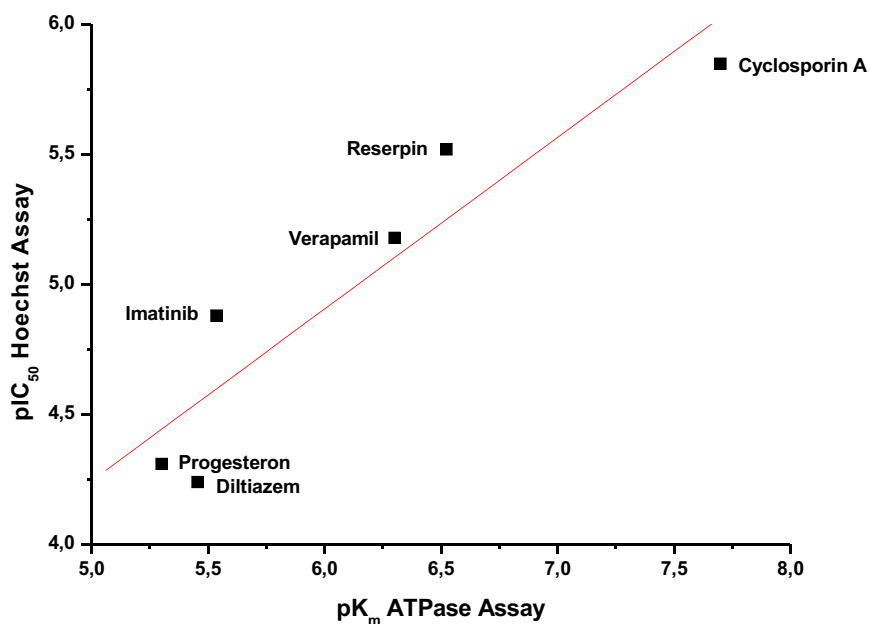


Abb. 3.94: pK_m -Werte (Gatlik-Landwojtowicz et al.²²⁶) von sechs verschiedenen Substanzen gegen pIC_{50} -Werte (Hoechst Assay, A2780 Adr Zellen, diese Arbeit), $r^2 = 0,86$.

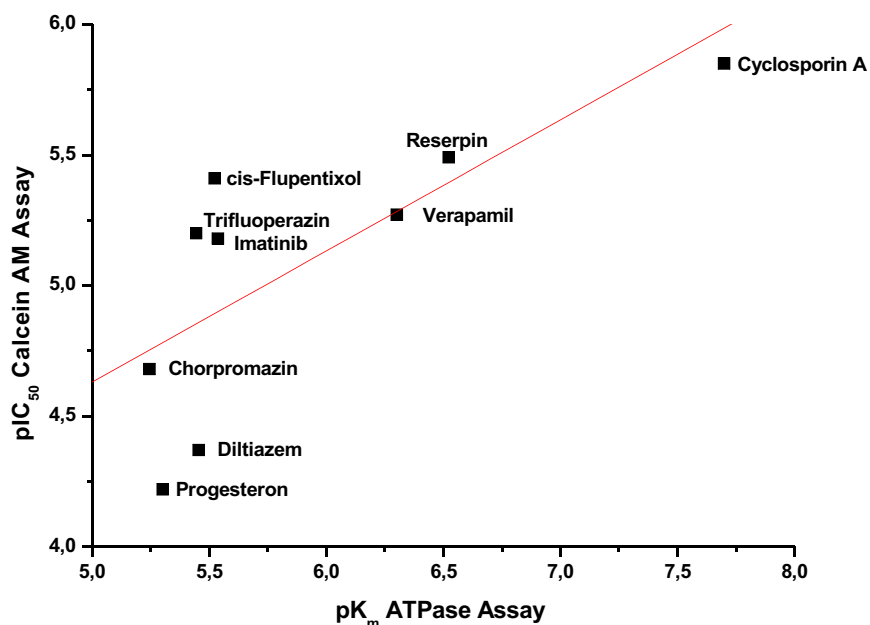


Abb. 3.95: pK_m -Werte (Gatlik-Landwojtowicz et al.²²⁶) von neun verschiedenen Substanzen gegen pIC_{50} -Werte (Calcein AM Assay, A2780 Adr Zellen, diese Arbeit), $r^2 = 0,55$.

In Abb. 3.94 und Abb. 3.95 sind die von Gatlik-Landwojtowicz et al. generierten pK_m -Werte gegen die pIC_{50} -Werte, die im Hoechst bzw. Calcein AM Assay erhalten wurden, aufgetragen.²²⁶

Die Korrelation der pIC_{50} -Werte des Hoechst Assays mit den pK_m -Werten für nur sechs Substanzen beträgt $r^2 = 0,86$. In eine zweite Korrelation mit den Calcein AM Assay-Daten gehen neun Verbindungen ein ($r^2 = 0,55$). Gerade bei der Betrachtung von Abb. 3.95 wird offensichtlich, dass die funktionellen, Transport-basierten Testsysteme nicht zum gleichen Ergebnis wie der ATPase Assay führen. Diese Erkenntnis bestätigt sich, wenn die von Litman et al. gemessenen pK_m -Werte mit den entsprechenden pIC_{50} -Werten aus dem Calcein AM Assay verglichen werden.²²⁷ Für die von Litman et al. bestimmten pK_m -Werte von 12 Verbindungen, die in Tabelle 3.45 grün unterlegt sind, resultiert ein Bestimmtheitsmaß von lediglich 0,50. Bei einem Vergleich der im Hoechst Assay erhaltenen Aktivitätswerte mit den von Litman et al. ermittelten pK_m -Werten, die in Tabelle 3.45 blau hervorgehoben sind, ergibt sich ein Bestimmtheitsmaß von 0,90. Dies könnte die obere Aussage abschwächen, beinhaltet aber den schwerwiegenden Nachteil, dass die Korrelation lediglich auf sechs Substanzen beruht.

Vergleicht man die von Wang et al.²²³ bestimmten pIC_{50} -Werte der drei unterschiedlichen Transport-basierten Assays Daunorubicin, LDS-751 und Rhodamin 123 mit den entsprechenden 10 pK_m -Werten, die von Litman et al.²²⁷ generiert wurden (alle grün unterlegten Verbindungen außer Chlorpromazin und Diltiazem) mittels HKA, so wird erneut die Annahme bestärkt, dass der ATPase Assay und funktionelle, Transport-basierte Testsysteme zu unterschiedlichen Resultaten führen.

Tabelle 3.46: Ergebnisse von zwei HKA für unterschiedliche Testsysteme. Diese basieren einerseits auf den pIC_{50} -Werten, die von Wang et al. bestimmt wurden,²²³ und andererseits auf den pK_m -Werten von Litman et al.²²⁷ (10 Verbindungen, vergl. Tabelle 3.45 ohne Chlorpromazin und cis-Flupentixol.)

Assays	Erklärte Gesamtvarianz (%)	Eigenwert	Faktorladungen
D + L + R	86,4%	2,59	D = 0,950, L = 0,877, R = 0,960
D + L + R + ATPase	72,3%	2,89	D = 0,966, L = 0,823, R = 0,940, ATPase = 0,590

Auffällig ist die Faktorladung des ATPase Assays, die besonders niedrig für die erste HK ausfällt. Wird eine zweite Hauptkomponente extrahiert und eine Varimax-Rotation durchgeführt, beträgt die Faktorladung des ATPase Assays für die 2. HK 0,97, während die Faktorladungen für die drei Transport-basierten Assays $< 0,4$ sind.

Die in Tabelle 3.47 dargestellten pK_m -Werte wurden im Rahmen der Dissertation von J. Sievers ermittelt.²²⁸ Die in Tabelle 3.47 grau unterlegten Verbindungen wurden auch mit dem Hoechst und Calcein AM Assay vermessen und die entsprechenden pIC_{50} - und pK_m -Werte mittels einer Hauptkomponentenanalyse verglichen. Die Faktorladung für den ATPase Assay liegt lediglich bei 0,459, während die beiden anderen Faktorladungen $\geq 0,957$ sind. Die durch die erste Hauptkomponente beschriebene Gesamtvarianz beträgt nur 68,7%, erst durch die Einbindung einer zweiten Hauptkomponente wird die Gesamtvarianz ausreichend erklärt (kumulativ: 98,0%). Auch in diesem Fall resultiert nach entsprechender Rotation eine Faktorladung von 0,992 für den ATPase Assay für die zweite Hauptkomponente, während die beiden anderen Variablen nur Faktorladungen $< 0,148$ besitzen.

Tabelle 3.47: pK_m -Werte von verschiedenen Substanzen, die im Rahmen der Dissertation von J. Sievers²²⁸ mit Hilfe des ATPase Assays ermittelt wurden. Grau unterlegt sind solche Substanzen, die sowohl im Calcein AM als auch im Hoechst Assay vermessen wurden.

Substanz	pK_m
WK-X-14	5,46
XR9577	5,09
WK-X-34	5,27
WK-X-44	5,82
WK-X-49	5,80
WK-X-50	5,32
WK-X-51	4,96
WK-X-52	5,19
WK-X-58	5,51
WK-X-82	4,84
WK-X-84	6,15
W-X-87	5,59
WK-Y-26	4,89
Verapamil	4,92
Imatinib	4,74
Nicardipin	5,77
Diltiazem	4,51

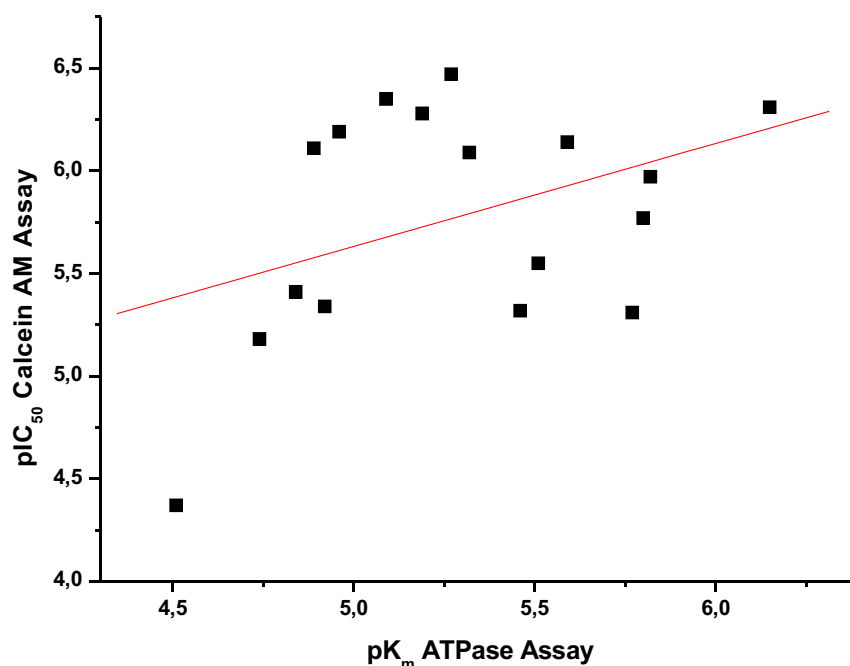


Abb. 3.96: Plot der pIC_{50} -Werte im Calcein AM Assay gegen pK_m -Werte im ATPase Assay (Dissertation Jürgen Sievers)²²⁸, $r^2 = 0,16$.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen in ihrer Gesamtheit, dass die mittels des ATPase Assays bestimmten pK_m -Werte nicht mit den pIC_{50} -Werten der Transport-basierten Assays korrelieren. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass der ATPase Assay im Gegensatz zu den anderen funktionellen Testsystemen keinen Kompetitionsassay darstellt. Es wird der direkte Einfluss einer Verbindung auf die Hydrolysegeschwindigkeit von ATP erfasst, während die anderen Testsysteme das Ziel verfolgen, die Beeinflussung des Transportes eines Substrates durch die zu analysierenden Verbindungen zu quantifizieren. Vergleichbare Ausgangsbedingungen wären erst dann gegeben, wenn im ATPase Assay zunächst eine Vollstimulation der Hydrolysegeschwindigkeit mittels eines bestimmten Substrates wie Calcein AM oder Hoechst 33342 erzeugt würde und die zu untersuchende Verbindung anschließend in ansteigenden Konzentrationen hinzugefügt würde. Somit wäre eine klassische Competition gewährleistet. Die unter diesen Bedingungen erhaltenen Ergebnisse könnten für einen Vergleich des ATPase Assays mit den in dieser Arbeit vorgestellten Transport-basierten Assays von entscheidender Bedeutung sein und wichtige Hinweise vermitteln, inwieweit diese Testsysteme wirklich differieren und ob sie zur Lösung ver-

schiedener Fragestellungen geeignet sind. Das Ergebnis eines Vergleichs des ATPase Assays unter Kompetitionsbedingungen und der Transport-basierten Assays ist auch im Hinblick auf andere ABC-Transporter wie BCRP oder der MRPs interessant.

Warum aber führen unterschiedliche Substrat-basierte Assays zu vergleichbaren Ergebnissen, obwohl die Substrate mit verschiedenen Bindungsstellen interagieren sollen?

Transportproteine wie P-gp können als Enzyme verstanden werden.¹⁷⁹ Aus enzymkinetischer Sicht sind drei verschiedene Interaktionsformen zwischen Substrat und Inhibitor möglich: (i) kompetitiv, (ii) nicht-kompetitiv, (iii) unkompetitiv.²²⁹ Von besonderem Interesse ist dabei, wie sich die Substratkonzentration auf den Zusammenhang zwischen IC_{50} und K_i -Wert auswirkt, wenn die drei oberen Fälle angenommen werden. Für eine Kompetition von Substrat und Inhibitor gilt folgender Zusammenhang:

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

$$\frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Für eine 50%ige Hemmung gilt:

$$0,5 \cdot \left(K_m \cdot \left(1 + \frac{IC_{50}}{K_i}\right) + [S] \right) = K_m + [S] \Leftrightarrow K_m \cdot \left(1 + \frac{IC_{50}}{K_i}\right) + [S] = 2 \cdot (K_m + [S])$$

$$\Leftrightarrow \left(1 + \frac{IC_{50}}{K_i}\right) = 2 + \frac{[S]}{K_m} \Leftrightarrow IC_{50} = \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right) \cdot K_i$$

Für einen kompetitiven Inhibitor sind IC_{50} und K_i -Wert annähernd gleich, wenn die eingesetzte Substratkonzentration unterhalb des K_m -Wertes liegt. Weder im Calcein AM noch im Hoechst Assay konnte selbst bei einer Steigerung der Substratkonzentration um den Faktor 5 bzw. bis 20 $\mu\text{mol/l}$ Anzeichen für eine Sättigung erreicht werden, was den Schluss zulässt, dass die eingesetzten Konzentrationen deutlich geringer als die jeweiligen K_m -Werte sein müssen. Selbst für den Fall, dass die Substratkonzentration dem K_m -Wert entspricht, unterscheiden sich pIC_{50} und K_i -Wert nur um 0,3 log-Einheiten.

Betrachtet man eine nicht-kompetitive Interaktion von Substrat und Modulator, so wird offensichtlich, dass der IC_{50} -Wert unabhängig von der Substratkonzentration ist:

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

Für die 50%ige Hemmung resultiert folgender Zusammenhang:

$$0,5 \cdot \left((K_m + [S]) \cdot \left(1 + \frac{IC_{50}}{K_i}\right) \right) = K_m + [S] \Leftrightarrow (K_m + [S]) \cdot \left(1 + \frac{IC_{50}}{K_i}\right) = 2 \cdot (K_m + [S])$$

$$\Leftrightarrow K_m \cdot \frac{IC_{50}}{K_i} + [S] \cdot \frac{IC_{50}}{K_i} = K_m + [S] \Leftrightarrow \frac{IC_{50}}{K_i} = 1 \Leftrightarrow IC_{50} = K_i$$

Aus diesen Ausführungen geht hervor, dass für ein Substrat-Modulator-Paar unabhängig von der Art der Interaktion - kompetitiv oder nicht-kompetitiv - ein ähnlicher IC_{50} -Wert zu erwarten ist, solange die verwendeten Substratkonzentrationen kleiner als K_m sind. Aufgrund der begrenzten Genauigkeit und Reproduzierbarkeit biologischer Daten sind die Unterschiede gering und können deshalb kaum zum Vorschein kommen.

Ein unkompetitiver Zusammenhang zwischen Substrat und Modulator kann wie folgt definiert werden:

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

Bei einer 50%igen Hemmung ergibt sich:

$$0,5 \cdot \left(K_m + [S] \cdot \left(1 + \frac{IC_{50}}{K_i}\right) \right) = K_m + [S] \Leftrightarrow K_m + [S] \cdot \left(1 + \frac{IC_{50}}{K_i}\right) = 2 \cdot (K_m + [S])$$

$$\Leftrightarrow [S] \cdot \frac{IC_{50}}{K_i} = K_m + [S] \Leftrightarrow \frac{IC_{50}}{K_i} = \frac{K_m + [S]}{[S]} \Leftrightarrow IC_{50} = \left(\frac{K_m}{[S]} + 1 \right) \cdot K_i$$

Wenn die Substratkonzentration deutlich kleiner als K_m ist, wird der IC_{50} - stark vom K_i -Wert differieren. Interagiert ein Modulator mit dem Substrat A kompetitiv und mit einem anderen

Substrat B nicht-kompetitiv, so wirkt sich der unterschiedliche Interaktionstyp nur wenig auf die berechneten IC_{50} -Werte aus. Lediglich eine unkompetitive Wechselwirkung mit einem der beiden Substrate würde dazu führen, dass die Verbindung aus der Korrelation herausfällt.

Die enzymkinetische Betrachtung liefert die Basis für die Erklärung der hohen Korrelationen der IC_{50} -Werte verschiedener funktioneller Assays.

Die dargestellte Betrachtung ist vereinfacht, da allosterische Effekte oder die simultane Bindung mehrerer Liganden nicht berücksichtigt werden, obwohl diese für P-gp in dieser Arbeit vorgestellt und quantifiziert wurden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen aber, dass allosterische Mechanismen nur schwach ausgeprägt sind und die Allostere selbst eine eher geringe Affinität zu P-gp aufweisen. Beispielsweise ist die im Hoechst Assay eingesetzte Konzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ unterhalb der Konzentration, die eine deutliche Aktivierung von P-gp verursacht. Auch die bereits an anderer Stelle vorgestellten Literatur-Daten belegen die eher gering ausgeprägten allosterischen Effekte. Die vereinfachte, enzymkinetische Betrachtung ist also möglich, da allosterische Effekte die Ergebnisse nur geringfügig beeinflussen sollten.

Eine Differenzierung verschiedener Interaktionsarten mit P-gp ist besser möglich, wenn die Messungen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen durchgeführt werden und diese entsprechend analysiert werden. Die Bestimmung des IC_{50} -Wertes einer Substanz bei nur einer Substratkonzentration erlaubt nicht, die Art der Interaktion zwischen Substrat und der untersuchten Verbindung zu bestimmen. Lediglich die Steigung der Konzentrations-Effektcurve kann als ein Hinweis angesehen werden, wie die untersuchte Substanz mit dem Substrat in Wechselwirkung tritt: (i) Ist der Hillkoeffizient signifikant größer als 1, kann dies auf die Existenz von mehr als einer Bindungsstelle hindeuten, die positiv kooperativ miteinander interagieren. (ii) Ist der Hillkoeffizient signifikant kleiner als 1, liegt das Phänomen der negativen Kooperativität vor.¹⁰²

Erst durch die Durchführung der Experimente bei verschiedenen Substratkonzentrationen können die Interaktionstypen ermittelt werden.

Für eine enzymkinetische Auswertung müssen die Fluoreszenzwerte so transformiert werden, dass sie zur Transportgeschwindigkeit proportional sind. Dies erreicht man, indem man die Fluoreszenzwerte in die folgende Formel einsetzt:

$$[S] \cdot \left(\frac{Top}{Fluoreszenzwert} - 1 \right) = \frac{k_{P-gp}}{(k_e + k_{Diff})} = k^*_{P-gp} \quad \text{Gleichung 3.19}$$

In dieses Gleichungssystem gehen die im Calcein AM Assay gemessenen Fluoreszenzwerte ein, die sich nach Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz ergeben. Außerdem wird die Substratkonzentration in die Formel miteinbezogen. Die P-gp Aktivität oder relative Effluxgeschwindigkeit k^*_{P-gp} wird um so kleiner, je stärker P-gp durch den Modulator inhibiert wird.

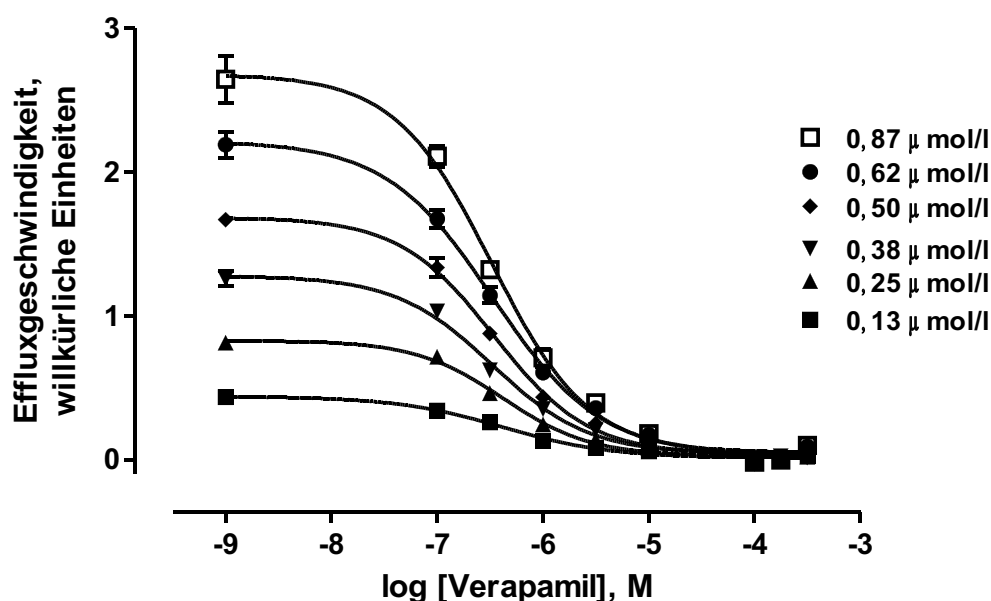


Abb. 3.97: Effluxgeschwindigkeit bzw. k^*_{P-gp} gegen die Modulatorkonzentration von Verapamil (Calcein AM Assay, A2780 Adr Zellen, $n > 2$).

In Abb. 3.97 sind verschiedene Konzentrations-Wirkungskurven des Modulators Verapamil zu erkennen, die bei verschiedenen Substratkonzentrationen aufgenommen wurden. Die Fluoreszenzwerte wurden in die obere Gleichung eingesetzt, die einzelnen k^*_{P-gp} -Werte bzw. Effluxgeschwindigkeiten bestimmt und gegen die logarithmierte Konzentration des Modulators aufgetragen. Zur Ermittlung des Interaktionstyps zwischen Substrat und Modulator müssen verschiedene Linearisierungsverfahren eingesetzt werden. (Der zugängliche Bereich der Substratkonzentrationen ist limitiert). Gebräuchlich sind die Auftragungen nach Lineweaver-Burk oder Hanes-Woolf. Bei dem Linearisierungsverfahren nach Lineweaver-Burk werden die reziproken k^*_{P-gp} -Werte ($1/v$ -Werte) gegen die reziproken Substratkonzentrationen (Abszisse) aufgetragen. Die Steigungen der Geraden werden für jede

InhibitorKonzentration mit linearer Regression ausgewertet. Bei einer Kompetition resultiert ein gemeinsamer Schnittpunkt aller Regressionsgeraden auf der Y-Achse. Dieser Schnittpunkt entspricht dem $1/v_{\max}$ -Wert. Die einzelnen Schnittpunkte mit der X-Achse im negativen Bereich entsprechen den $-1/K_m$ -Werten.

In Abb. 3.98 sind die Werte aus Abb. 3.97 in reziproker Form dargestellt. Wie zu erkennen ist, ergibt sich annähernd ein gemeinsamer Schnittpunkt der Geraden auf der Y-Achse und demnach eine kompetitive Interaktion.

Ein kompetitiver Inhibitor zeichnet sich dadurch aus, dass mit zunehmender InhibitorKonzentration der apparente K_m -Wert ansteigt, v_{\max} bleibt hingegen unverändert. Der K_m -Wert beträgt $1,0 \mu\text{mol/l}$ in Abwesenheit des Inhibitors und liegt damit oberhalb der eingesetzten Substratkonzentration (s. Abb. 3.98).

Besondere Bedeutung sollte man bei der Anwendung des Lineweaver-Burk-Diagramms eigentlich der Tatsache beimessen, dass P-gp verschiedene Bindungsstellen besitzt, die sich gegenseitig beeinflussen. Für ein allosteres Enzym mit zwei Bindungsstellen und hoher Kooperativität kann im Lineweaver-Burk-Diagramm $1/v$ gegen $1/S^2$ aufgetragen werden.²²⁹ S wird demnach mit der Zahl der Bindungsstellen potenziert. Eine Abwandlung des ursprünglichen Lineweaver-Burk-Diagramms ist aber nur dann sinnvoll, wenn für den $1/v$ gegen $1/S$ -Plot kein linearer Zusammenhang besteht. Ein nichtlinearer Zusammenhang ist aber in keinem der einfachen Lineweaver-Burk-Diagramme zu erkennen. Deshalb sollte eine Potenzierung von S nicht favorisiert werden. Außerdem ist die Zahl der Bindungsstellen immer noch Gegenstand aktueller Diskussion. Es wäre demnach fraglich, mit welchem Faktor S potenziert werden sollte.

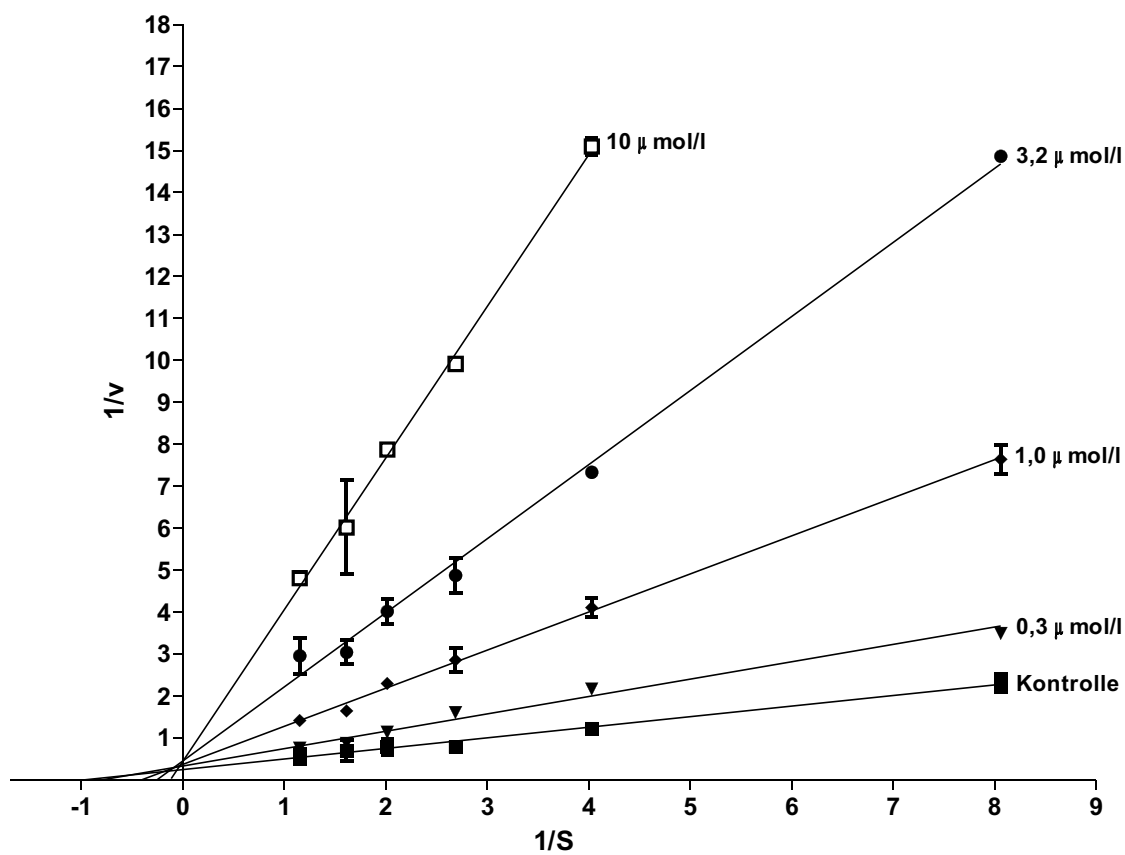


Abb. 3.98: Lineweaver-Burk-Diagramm für Verapamil und Calcein AM.

Die Lineweaver-Burk-Darstellung ist mit dem entscheidenden Nachteil verbunden, dass kleine Fehler in v bei kleinen S -Werten eine große Abweichung in $1/v$ verursachen. Bei großen S -Werten wirken sich Fehler in den $1/v$ -Werten weniger stark aus. Die Fehlergewichtung ist demnach nicht homogen. Ein besseres Linearisierungsverfahren stellt das sogenannte Hanes-Woolf-Diagramm dar.²²⁹ Im Hanes-Wolf-Diagramm wird S/v gegen S aufgetragen. Liegt eine kompetitive Interaktion von Substrat und Inhibitor vor, ändert sich v_{\max} nicht, da das Substrat in hohen Konzentrationen eine vollständige Verdrängung des Inhibitors vom Enzym bewirkt. In der Darstellung nach Hanes-Woolf ist diese Eigenschaft an den parallel zueinander verlaufenden Geraden mit gleicher Steigung $1/v_{\max}$ zu erkennen. Der $-K_m$ -Wert resultiert aus dem Schnittpunkt der Gerade für die ungehemmte Reaktion mit der X-Achse im negativen Bereich. Bei Betrachtung von Abb. 3.99 erkennt man, dass die einzelnen Geraden annähernd parallel zueinander verlaufen. Der K_m -Wert für die ungehemmte Enzymreaktion beträgt $0,90 \mu\text{mol/l}$. Aus Abb. 3.99 geht in Übereinstimmung mit dem in Abb. 3.98 dargestellten Lineweaver-Burk-Diagramm hervor, dass zwischen dem

Substrat Calcein AM und dem Modulator Verapamil der Interaktionstyp der Konkurrenz vorliegt. Um eine kompetitive Interaktion zwischen Calcein AM und Verapamil von einer partial kompetitiven Wechselwirkung zu unterscheiden, muss ein sogenannter Sekundärplot erstellt werden. Dazu werden die Steigung der Geraden aus Abb. 3.98 und Abb. 3.99 gegen die entsprechende InhibitorKonzentration aufgetragen. In beiden Sekundärplots resultierte ein nicht-linearer Zusammenhang (hyperbolischer Anstieg). Damit liegt für Verapamil und Calcein AM eine partial kompetitive Interaktion vor.²²⁹

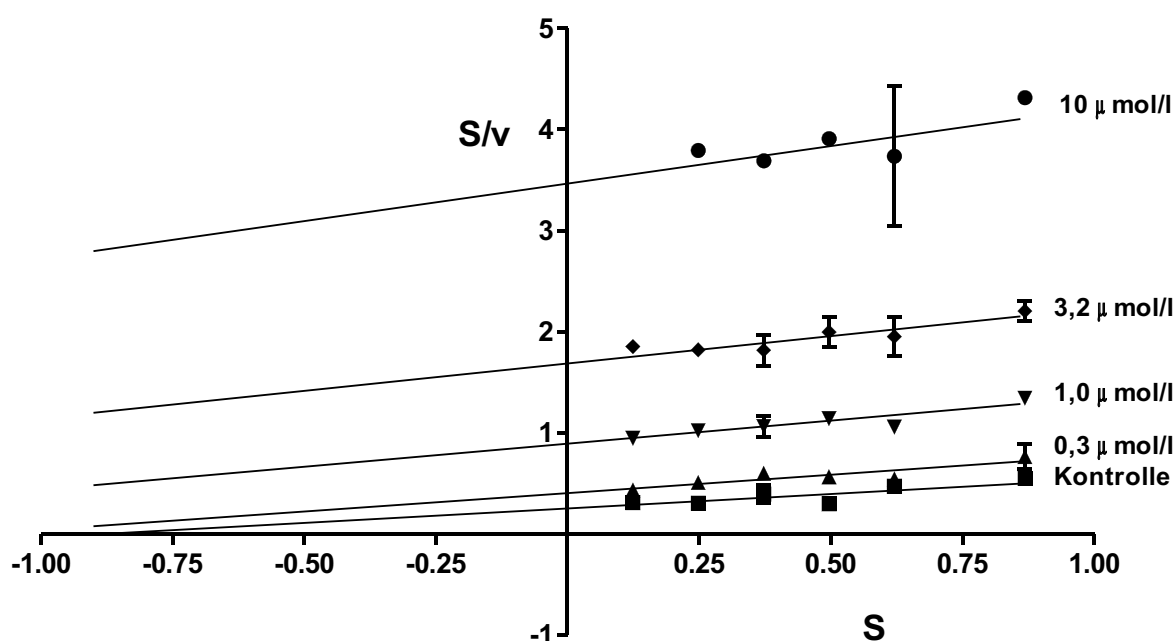


Abb. 3.99: Hanes-Woolf-Diagramm für Verapamil und Calcein AM.

Welcher Interaktionstyp ist aber zu erwarten, wenn man statt Verapamil XR9456 verwendet? Vergleicht man die Hillkoeffizienten von Verapamil ($n_H = 1,0$) und XR9456 ($n_H = 2,24 \pm 0,71$), so deutet der signifikant von 1 verschiedene Hillkoeffizient des Modulators XR9456 bereits darauf hin, dass diese Substanz mit Calcein AM in nicht-kompetitiver Form interagiert.¹⁵² Um die Interaktionsform zwischen Calcein AM und XR9456 nachweisen zu können, wurde XR9456 in Gegenwart verschiedener Substratkonzentrationen untersucht.

Wie das in Abb. 3.100 wiedergegebene Lineweaver-Burk-Diagramm veranschaulicht, liegt für die Interaktion von XR9456 und Calcein AM ein nicht-kompetitiver Zusammenhang vor.

3 Ergebnisse und Diskussion

Ein nicht-kompetitiver Inhibitor ist dadurch charakterisiert, dass er in der Lage ist, v_{\max} zu verringern, ohne K_m zu verändern. Im Gegensatz zu einer kompetitiven Inhibition nur von K_i bzw. IC_{50} abhängig, aber nicht von K_m oder S . Der berechnete K_m -Wert beträgt in diesem Fall $1,6 \mu\text{mol/l}$.

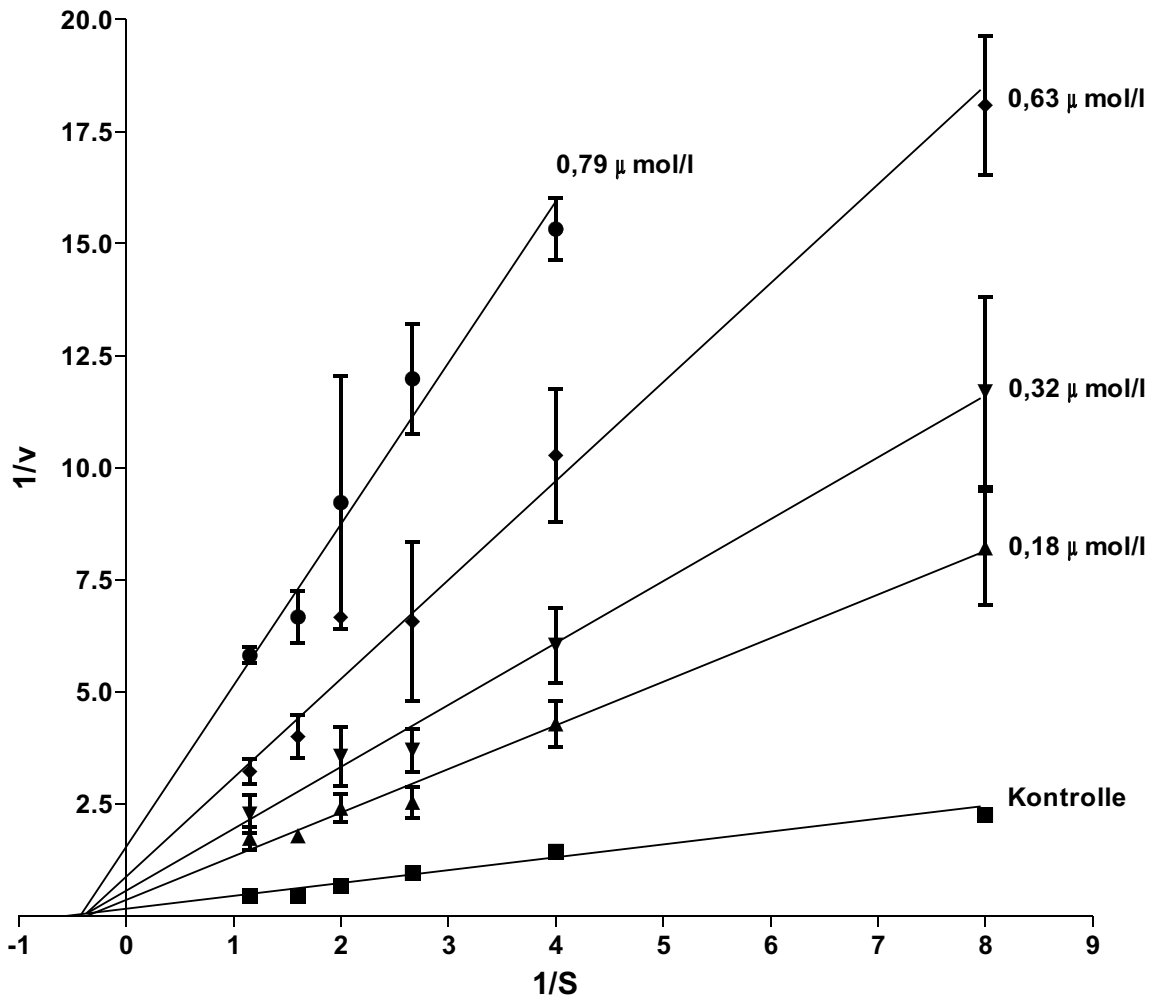


Abb. 3.100: Lineweaver-Burk-Diagramm für XR9456 und Calcein AM.

Wiederum liegt der K_m -Wert deutlich über der eingesetzten Konzentration, die bei der Durchführung des Calcein AM Assay eingesetzt wurde (vergl. Kap. 2.13). Die nicht-kompetitive Wechselwirkung zwischen Substrat und Modulator wird auch in dem in Abb. 3.101 dargestellten Hanes-Woolf-Diagramm offensichtlich. Der K_m -Wert, der als Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse resultiert, liegt bei $1,2 \mu\text{mol/l}$. Mit zunehmender Modulatorkonzentration wird die Steigung der einzelnen Geraden immer steiler, und v_{\max} nimmt immer

kleinere Werte an. Anhand dieser Ergebnisse kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass zwischen XR9456 und Calcein AM ein nicht-kompetitiver Zusammenhang vorliegt. Auch entsprechende Sekundärplots bestätigen dies, da lineare Zusammenhänge resultieren. (Zur Erstellung der Sekundärplots werden die Steigungen der Geraden aus Abb. 3.100, Abb. 3.101 und Abb. 3.102 gegen die eingesetzte Inhibitorkonzentration aufgetragen). Eine partial nicht-kompetitive Interaktion liegt also nicht vor.

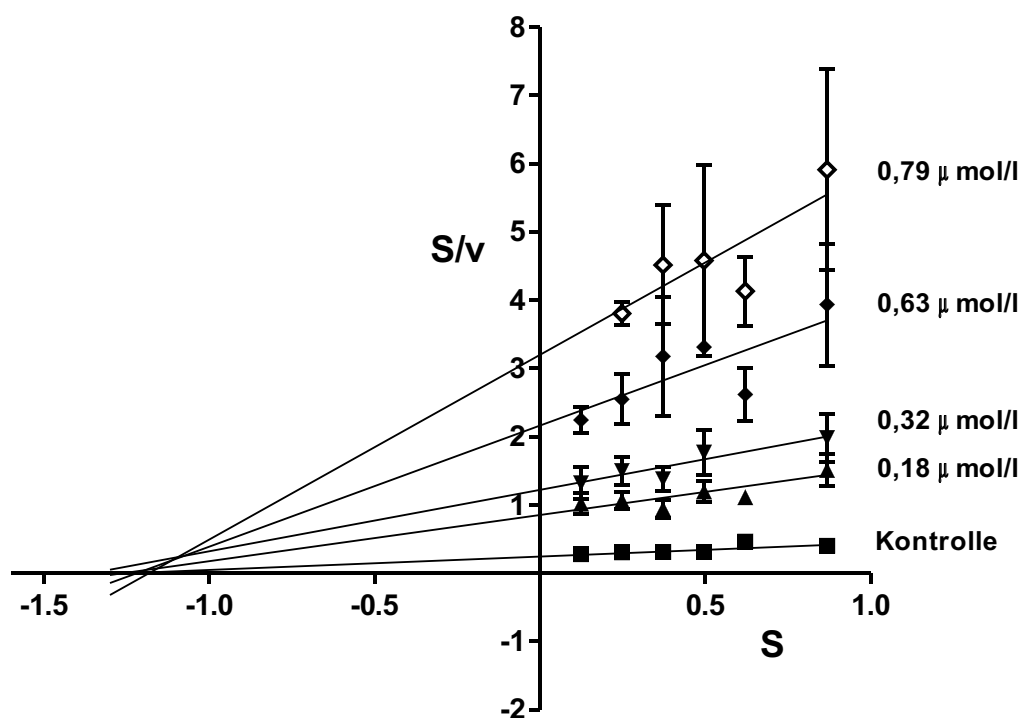


Abb. 3.101: Hanes-Woolf-Diagramm für XR9456 und Calcein AM.

Für XR9456 ist eine zusätzliche Wechselwirkung mit mehreren Bindungsstellen wahrscheinlich. Dies geht aus folgenden Beobachtungen hervor:

- XR9456 führt im Vergleich zu Verapamil zu einer stärkeren Verringerung der durch Hoechst 33258 hervorgerufenen Aktivierung von P-gp (vergl. Kap 3.10). Dies deutet auf eine Wechselwirkung mit der H-Seite hin.
- Untersucht man XR9456 in Gegenwart unterschiedlicher Substrat-Konzentrationen im Hoechst Assay, so wird eine nicht-kompetitive Interaktion festgestellt, wie dem in Abb. 3.102 wiedergegebenen Hanes-Woolf-Diagramm entnommen werden kann. Daraus kann auf eine Wechselwirkung mit einer anderen, von der H-Seite verschiedenen Bindungsstelle geschlossen werden.

- Da aber auch eine nicht-kompetitive Interaktion von Calcein AM und XR9456 gezeigt wurde, kann insgesamt für XR9456 weder eine spezifische Wechselwirkung mit der H- noch mit der R-Seite bestehen.
- Da allosterische Effekte von Progesteron und cis-Flupentixol in Gegenwart von XR-Verbindungen (vergl. Kap. 3.11) ausblieben, muss auch eine Interaktion mit anderen Bindungsstellen innerhalb von P-gp bestehen. Möglicherweise ist die im Vergleich zu Verapamil deutlich höhere biologische Aktivität der XR bzw. WK-Modulatoren auf eine Interaktion mit mehreren Bindungsstellen zurückzuführen.

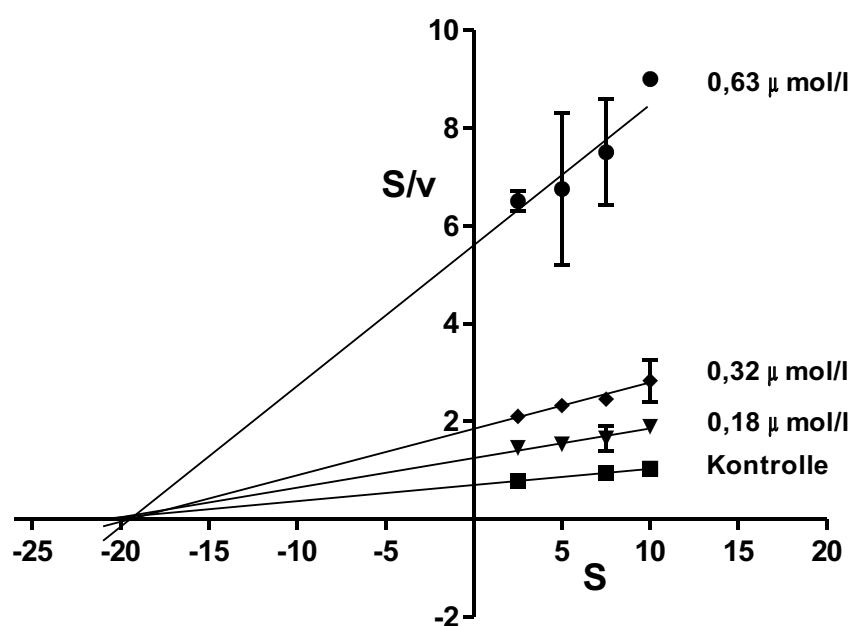


Abb. 3.102: Hanes-Woolf-Plot für XR9456 und Hoechst 33342 (Substratkonzentration in $\mu\text{mol/l}$). Der K_m -Wert beträgt $21,4 \mu\text{mol/l}$ und liegt damit oberhalb der verwendeten Hoechst-Konzentrationen im Hoechst Assay (vergl. Kap. 2.14).

Die Durchführung der Experimente mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen stellt eine geeignete Methode dar, um den Interaktionstyp zwischen Substrat und Modulator zu bestimmen. Um ein besseres Verständnis darüber zu erlangen, ob Substrate an die gleiche Bindungsstelle binden, müsste man diese Experimente mit bestimmten Inhibitoren gegenüber verschiedenen Substraten durchführen. Aufgrund der Ergebnisse zum Interaktionstyp könnten dann bestimmte Substrate hinsichtlich ihrer Bindungsstellen klassifiziert werden. Macht aber eine solche Vorgehensweise bei einem ABC-Transporter mit einer so unspezifischen Substraterkennung Sinn?

Diese Vorgehensweise ist sehr aufwändig, da sich P-gp durch eine breite Substraterken-

nung auszeichnet. Eine Ursache für die breite Substraterkennung ist das sogenannte Phänomen des „Substrate-induced-fit“-Mechanismus, das die gegenseitige Anpassung von Substrat und Rezeptor beschreibt.⁸⁶ Auf der Basis von Messungen mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen ist es nicht möglich, genauere Einblicke über die eigentlichen Bindungsepitope zu erlangen. Die Feststellung des Interaktionstyps lässt aber einen tieferen Einblick in den Wirkmechanismus des Modulators zu. Ein besseres Verständnis über den Wirkmechanismus des Modulators ist deshalb von Interesse, da es auch zur Entwicklung neuer, potenterer Modulatoren beitragen kann.

Die folgende Abb. 3.103 zeigt die verschiedenen Strategien, die zur funktionellen Untersuchung von P-gp im Hinblick auf potentielle Bindungsstellen angewandt wurden. Die grundsätzliche Vorgehensweise kann auch auf andere ABC-Transporter übertragen werden und stellt damit einen wertvollen Beitrag für die funktionelle Charakterisierung von ABC-Transportproteinen wie BCRP und den MRPs dar.

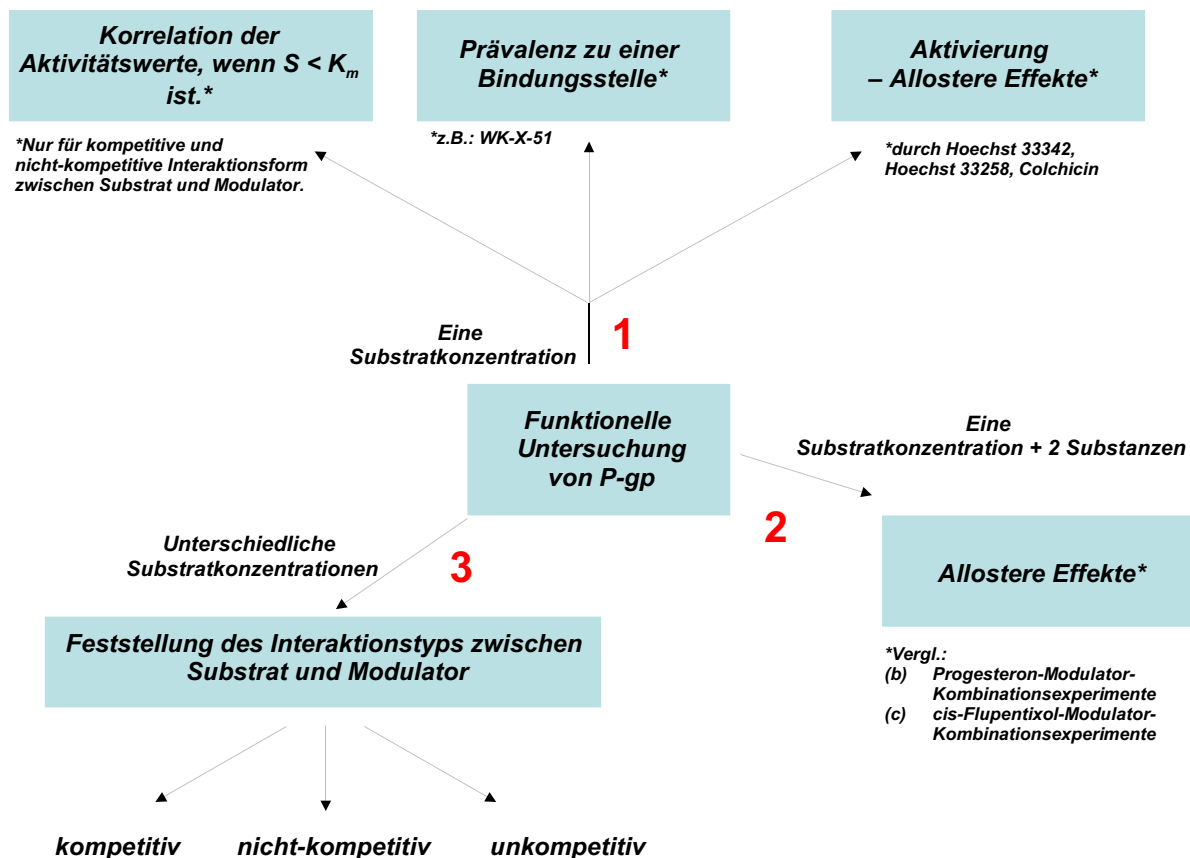


Abb. 3.103: Eingesetzte Möglichkeiten zur funktionellen Untersuchung von P-gp (1 = eine Substratkonzentration, 2 = eine Substratkonzentration + zwei Substanzen, 3 = Unterschiedliche Substratkonzentrationen).

4 Zusammenfassung

Genauere Erkenntnisse über die Zahl und die Spezifität der Bindungsstellen von P-Glykoprotein liegen bis zum heutigen Tag nicht vor. Für die Entwicklung von potenten Modulatoren, die eine möglichst selektive Inhibition der P-gp Funktion ermöglichen, ist es von Vorteil eine genauere Vorstellung über die Interaktion der Modulatoren mit den potentiellen Bindungsstellen zu erlangen.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Ansätze und Strategien gewählt, um die biologische Aktivität von bekannten und neuen Modulatoren zu bestimmen. Dazu wurde der aus der Literatur bekannte Calcein AM Assay modifiziert und zahlreiche Verbindungen mit diesem untersucht. Zu diesen Substanzen gehörten Phenothiazin-Derivate, die von einem Kooperationspartner aus Halle (Dr. Matthias Schmidt, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie) zur Verfügung gestellt wurden. 3D-QSAR-Verfahren (CoMFA und CoMSIA) dienten dazu, den Zusammenhang zwischen Struktur und Wirkung zu bestimmen. Verschiedene Modelle wurden generiert und validiert. Auf Basis dieser Modelle konnten die Aktivitätswerte der Verbindungen gut vorhergesagt werden. Gemeinsamkeit aller Modelle waren hydrophobe Eigenschaften, die für die Interaktion mit P-gp, wie in der Literatur beschrieben, in der Regel notwendig sind. Neben hydrophoben Charakteristika trugen Wasserstoffbrückenakzeptoreigenschaften zu einer Erhöhung der Hemmwirkung der Phenothiazin-Derivate bei.

In dieser Arbeit wurde ein weiterer Assay entwickelt, der die funktionelle Charakterisierung von Liganden der sogenannten H-Seite ermöglicht. Das als Hoechst Assay bezeichnete Testsystem wurde für die Untersuchung zahlreicher Substanzen eingesetzt. Für 26 Modulatoren der dritten Generation, die im Arbeitskreis synthetisiert worden waren, wurden 3D-Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet. Dabei konnten CoMFA- und CoMSIA-Modelle erstellt werden, die eine gute Vorhersage der biologischen Aktivitätswerte ermöglichten. Die LMO-Methode und der Scrambling-Verwürfelungstest wurden zur Validierung der besten Modelle verwendet; die Resultate unterstrichen die Stabilität und Validität dieser Modelle. Die Ergebnisse tragen insgesamt zu einem besseren Verständnis des Zusammenhangs zwischen der Struktur und der biologischen Wirksamkeit dieser Verbindungen bei. Erstmals konnte an ABCB1 überexprimierenden Zellen für gewisse Substanzen wie Hoechst 33342, Hoechst 33258 oder Quercetin eine Verstärkung des Calcein AM Effluxes

und damit eine positive Kooperativität belegt werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die an Membranvesikeln gewonnen wurden, konnte eine Aktivierung des Ausstroms von Hoechst 33342 durch Calcein AM oder Rhodamin 123 nicht gefunden werden. Demnach besteht in ABCB1 überexprimierenden Zellen eine einseitig ausgeprägte positive Kooperativität der Bindungsstellen. Darüberhinaus wurde festgestellt, dass in Gegenwart des Modulators XR9456 die durch Hoechst 33258 hervorgerufene Aktivierung stärker abnimmt als in Gegenwart von Verapamil. Dies zeigt, dass XR9456 die Interaktion von Hoechst 33258 mit dessen Bindungsstelle behindert.

Neben der Untersuchung der beiden Bindungsstellen mit Transportfunktion konnten Progesteron und einige Progesteron-Derivate als partielle Allosterie identifiziert werden. Dabei wurde der allosterische Effekt dieser Substanzen in Kombinationsexperimenten im Calcein AM Assay mit unterschiedlichen Methoden quantifiziert. Für Progesteron wurde aber auch eine Interaktion mit der Orthoster-Bindungsstelle nachgewiesen. Der allosterische Effekt von Progesteron wurde durch die Verbindung XR9577 unterdrückt, die selbst keine allosterischen Eigenschaften besitzt. Der in Gegenwart von XR9577 ausbleibende allosterische Effekt von Progesteron ist im Sinne einer sterischen Behinderung, die eine Interaktion mit der allosterischen Seite verhindert, interpretierbar. Aus weiteren Kombinationsexperimenten im Calcein AM Assay ging hervor, dass die Verbindung cis-Flupentixol ebenfalls allosterische Eigenschaften besitzt. In Übereinstimmung mit Progesteron wurde ebenfalls eine Wechselwirkung mit der Orthoster-Bindungsstelle festgestellt. Auch der allosterische Effekt dieser Substanz blieb in Gegenwart von XR9577 aus. Während die Kombination aus einem Phentiazin (H 15) und Progesteron eine deutliche Zunahme der Hemmwirkung ergab, konnte für die Kombination mit cis-Flupentixol kein überadditiver Effekt festgestellt werden. Damit liegt die Vermutung nahe, dass cis-Flupentixol mit einer von Progesteron verschiedenen Bindungsstelle interagiert. Insgesamt wurden auf funktioneller Ebene vier Bindungsstellen nachgewiesen: die R- und die H-Seite mit Transportfunktion sowie zwei allosterische Seiten, die als Progesteron- und cis-Flupentixol-Bindungsstellen bezeichnet werden können.

Bei einem Vergleich der Ergebnisse des Calcein AM und des Hoechst Assays konnte gezeigt werden, dass die Aktivitätswerte für 38 Verbindungen mit Ausnahme der drei Substanzen WK-X-51, WK-Y-27 und WK-X-37 in hohem Maße korrelieren. WK-X-51, WK-Y-27 und WK-X-37 kann aufgrund ihrer höheren inhibitorischen Potenz im Hoechst Assay eine gewisse Präferenz zur H-Seite zugesprochen werden. Auch unter Einbeziehung der

Aktivitätsdaten, die mit anderen Assays in dieser Arbeit generiert wurden (BCECF AM Assay, FACS Vinblastin-Bodipy[®] Assay), wurde eine hohe Korrelation der pIC_{50} -Werte gefunden. Durch die Anwendung enzymkinetischer Modelle konnten diese Resultate theoretisch begründet werden.

Die Identifizierung der Interaktionsform konnte durch die Bestimmung der Hemmwirkung bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen erreicht werden. Unter Anwendung der Linearisierungsverfahren nach Lineweaver-Burk und Hanes-Woolf wurde für Verapamil und Calcein AM eine kompetitive Interaktion nachgewiesen. Zwischen XR9456 und Calcein AM lag hingegen ein nicht-kompetitiver Interaktionstyp vor. Für XR9456 und Hoechst 33342 konnte ebenfalls eine nicht-kompetitive Wechselwirkung gezeigt werden. Diese Ergebnisse unterstreichen die Besonderheit der Verbindung XR9456 und ihrer Derivate als Substanzen mit multispezifischen Eigenschaften. Die hohe biologische Aktivität dieser Substanzen kann durch die Interaktion mit mehreren verschiedenen Bindungsstellen erklärt werden.

Die in dieser Arbeit entwickelte grundsätzliche Vorgehensweise zur funktionellen Untersuchung von P-gp lässt sich auch auf andere ABC-Transporter übertragen. Sie stellt daher nicht nur einen sinnvollen Beitrag für die funktionelle Analyse von P-gp dar, sondern kann in Zukunft für die Charakterisierung von BCRP oder den MRPs eingesetzt werden.

5 Anhang

5.1 Funktioneller Assay zur Bestimmung der MRP1-Aktivität

Calcein AM ist nicht nur ein Substrat von P-gp, sondern auch von MRP1. Neben Calcein AM wird auch das fluoreszierende Calcein-Anion von MRP1 erkannt und in den Extrazellulärraum transportiert. Zentraler Punkt des in dieser Arbeit entwickelten MRP1 Assays war die Präinkubation der Zellen mit Cobalt-Ionen, die ein extrazelluläres Quenching der Calcein-Fluoreszenz hervorrufen sollen. Von entscheidender Bedeutung für die erfolgreiche Realisierung dieses Assays war dabei, dass die Cobalt-Ionen im Extrazellulärraum möglichst quantitativ verbleiben. Anhand von Abb. 3.26 konnte die Erkenntnis gewonnen werden, dass ab einer Konzentration von $> 0,3 \mu\text{mol/l}$ Cobaltchlorid die Calcein-Fluoreszenz signifikant gelöscht wird. Das maximale Quenching der Calcein-Fluoreszenz resultierte ab einer Konzentration von etwa $10 \mu\text{mol/l}$ Cobaltchlorid. Im idealen Fall hätte eine Präinkubation mit $10 \mu\text{mol/l}$ Cobaltchlorid die vollständige Fluoreszenzlöschung im Extrazellulärraum gewährleistet.

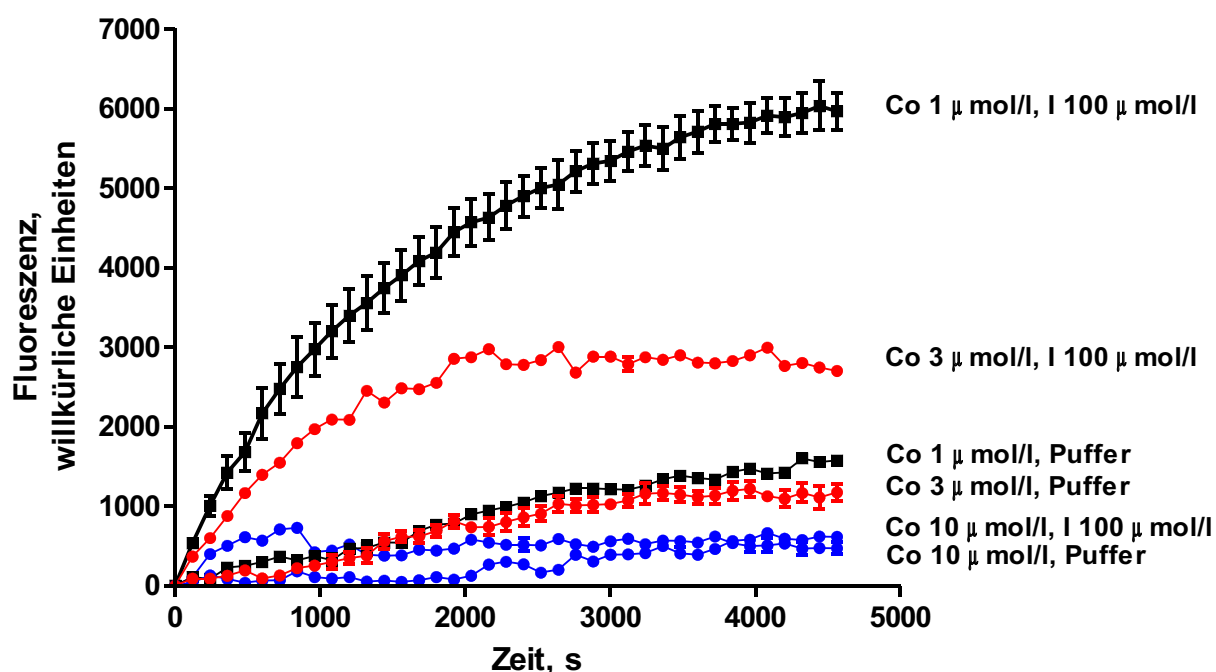


Abb. 5.1: Calcein-Cobalt Assay: MDCK-MRP1 Zellen, Präinkubation mit verschiedenen Cobaltchloridkonzentrationen in Gegenwart oder Abwesenheit von Indometacin. I = Indometacin, Puffer = KHP. Co = Cobaltchlorid.

Abb. 5.1 illustriert, dass die Präinkubation mit ansteigenden Cobaltkonzentrationen ($1 \mu\text{mol/l}$, $3 \mu\text{mol/l}$, $10 \mu\text{mol/l}$) in Abwesenheit von Indometacin zu einer Erniedrigung der Calcein Fluoreszenz führt. Man beachte aber, dass die Unterschiede der Fluoreszenz-Zeitkurven in Abwesenheit und Gegenwart von Indometacin ($100 \mu\text{mol/l}$) für die verschiedenen Cobaltkonzentrationen unterschiedlich stark ausfallen. Während die beiden Fluoreszenz-Zeitverläufe in Anwesenheit von $10 \mu\text{mol/l}$ Cobaltchlorid kaum differieren, unterscheiden sich die Fluoreszenz-Zeitverläufe in Gegenwart von $1 \mu\text{mol/l}$ Cobaltchlorid deutlich. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Cobalt-Ionen ab einer gewissen Konzentration in die Zelle gelangen und infolgedessen auch im Intrazellulärraum die Fluoreszenz löschen. Aufgrund dieser Tatsache wurden die Experimente bei einer Konzentration von $1 \mu\text{mol/l}$ Cobaltchlorid durchgeführt. Unter diesen Bedingungen wird das intrazelluläre Quenching weitestgehend vermieden.

In Abb. 5.2 sind die Fluoreszenz-Zeitverläufe (0-900 s) für unterschiedliche Indometacin-konzentrationen dargestellt. Die Fluoreszenzanstiege sind zu Beginn linear (Reaktionskinetik pseudonullter Ordnung).

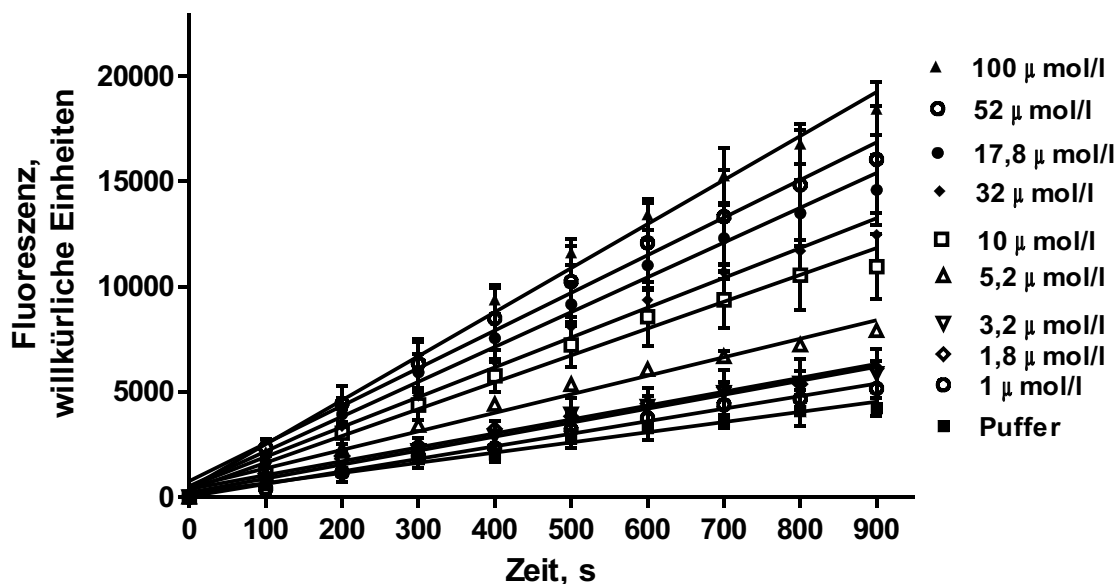


Abb. 5.2: MDCK-MRP1 Zellen, Calcein-Cobalt Assay: Fluoreszenz-Zeitanstiege für unterschiedliche Indometacin-konzentrationen. Beispiel für ein typisches Experiment aus einer Serie von drei unabhängigen Experimenten.

Trägt man die Steigungen der Regressionsgeraden aus Abb. 5.2 gegen die Indometacin-

konzentrationen auf, so resultiert die in Abb. 5.3 gezeigte Konzentrations-Effektkurve.

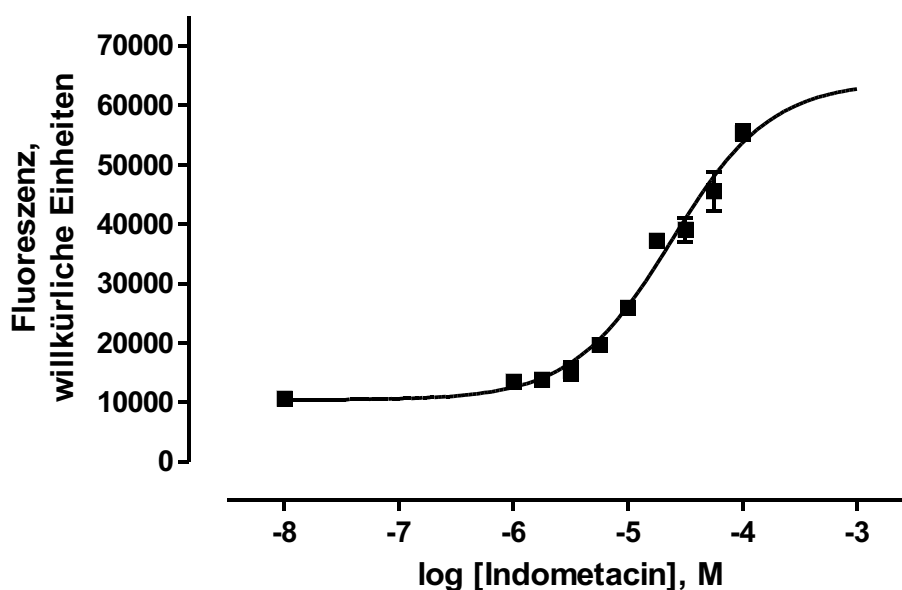


Abb. 5.3: Konzentrations-Wirkungskurve von Indometacin, die mittels des Calcein-Cobalt Assays an MDCK-MRP1 Zellen bestimmt wurde: $pIC_{50} = 4,62 \pm 0,08$, $n_H = 1,00$. Beispiel für ein typisches Experiment aus einer Serie von drei Versuchen. Der Top-Wert (vollständige Inhibition von MRP1) wurde mit Hilfe der Verbindung Verapamil ermittelt.

Tabelle 5.1: Verschiedene Substanzen, die mit Hilfe des Calcein-Cobalt Assays an MDCK-MRP1 Zellen untersucht wurden. n.d. - nicht detektierbar bis zu der maximal untersuchten Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$.

Substanz	$pIC_{50} \pm SD$
Indometacin	$4,55 \pm 0,19$
Verapamil	$4,57 \pm 0,10$
XR9456	n.d.
XR9577	n.d.
WK-X-34	n.d.
WK-X-51	n.d.
H 15	$4,67 \pm 0,03$

Bemerkenswerterweise konnte für die Tariquidaranaloga XR9456, XR9577 und WK-X-34 bis zu einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ keine Inhibition von MRP1 nachgewiesen werden (s. Tabelle 5.1). Diese Verbindungen besitzen demnach eine gewisse Präferenz für die Interaktion mit P-gp. Wenn man berücksichtigt, dass die Tariquidar-Analoga unter physiolo-

gischen Bedingungen teilweise protoniert vorliegen, scheint die fehlende Erkennung durch MRP1 nicht verwunderlich, da MRP1 vornehmlich keine kationischen Verbindungen zu transportieren vermag.¹⁰⁵ Allerdings interagiert Verapamil mit MRP1, obwohl es unter physiologischen Bedingungen in protonierter Form vorliegt.

5.2 Funktioneller Assay zur Bestimmung der BCRP-Aktivität

Hoechst 33342 stellt nicht nur ein Substrat von P-gp, sondern auch von BCRP dar.¹⁷⁸ Aufgrund dieser Tatsache kann Hoechst 33342 ebenfalls zur funktionellen Charakterisierung von BCRP verwendet werden. Dieser Transport-basierte Assay konnte in Analogie zu Kap. 3.8 ebenfalls ohne Waschschrte durchgeführt werden. In Abb. 5.4 sind Fluoreszenz-Zeitkurven zu erkennen, die mit MCF-7 MX Zellen in Abwesenheit und Gegenwart von Novobiocin (320 $\mu\text{mol/l}$) aufgenommen wurden. Zusätzlich ist der Fluoreszenz-Zeitverlauf abgebildet, der sich für MCF-7 Zellen in Puffer ergibt.

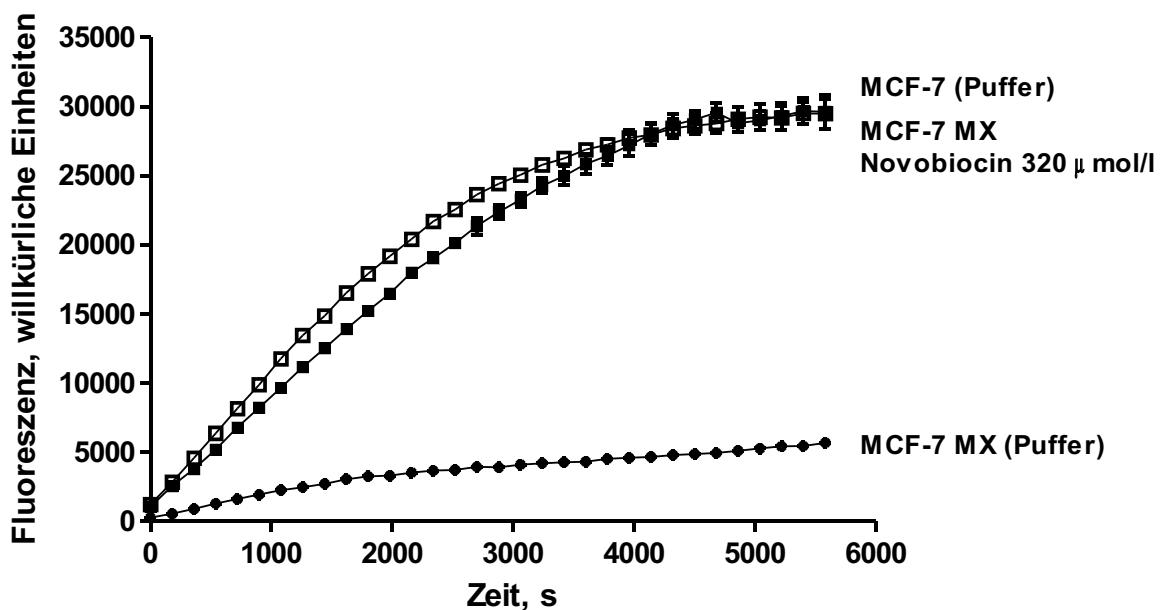


Abb. 5.4: Fluoreszenz-Zeitverläufe für MCF-7 (nicht gefüllte Vierecke), MCF-7 MX (Rauten) und MCF-7 MX Zellen in Gegenwart von 320 $\mu\text{mol/l}$ Novobiocin (gefüllte Vierecke).

Anhand von Abb. 5.4 wird offensichtlich, dass durch Zugabe des Modulators Novobiocin

BCRP vollständig inhibiert werden konnte. Die Fluoreszenz-Zeitverläufe von MCF-7 MX Zellen in Anwesenheit von Novobiocin und MCF-7 Zellen (Puffer) unterscheiden sich nur unwesentlich, sie erreichen beide nach etwa 5000 s den Sättigungsbereich, die Anstiege zu Beginn sind etwa gleich. Der Fluoreszenz-Zeitverlauf von MCF-7 MX Zellen, die mit Puffer präinkubiert wurden, ist deutlich flacher, die Fluoreszenz ist nach 5000 s um ein Vielfaches geringer. Die Präinkubation von MCF-7 Zellen mit Novobiocin (bis 320 $\mu\text{mol/l}$) ruft keine Veränderung der Fluoreszenz hervor (Daten nicht dargestellt). Die Ergebnisse zeigen in ihrer Gesamtheit auf funktioneller Ebene, dass MCF-7 MX im Gegensatz zu MCF-7 Zellen BCRP in ausgeprägter Form enthalten. Diese Resultate zeigen, dass das mittels Antikörper nachgewiesene BCRP (s. Kap. 3.1) auch seine Funktion auszuüben vermag. Durch die funktionellen Untersuchungen konnte eine ABCG2 Expression in MCF-7 Zellen weitestgehend ausgeschlossen werden. Die hohen in den BCRP-Antikörper-Experimenten erhaltenen Fluoreszenzwerte für MCF-7, aber auch A2780, A2780 Adr Zellen sind demnach auf einige der dort diskutierten Einflussgrößen, aber wohl kaum auf BCRP, zurückzuführen.

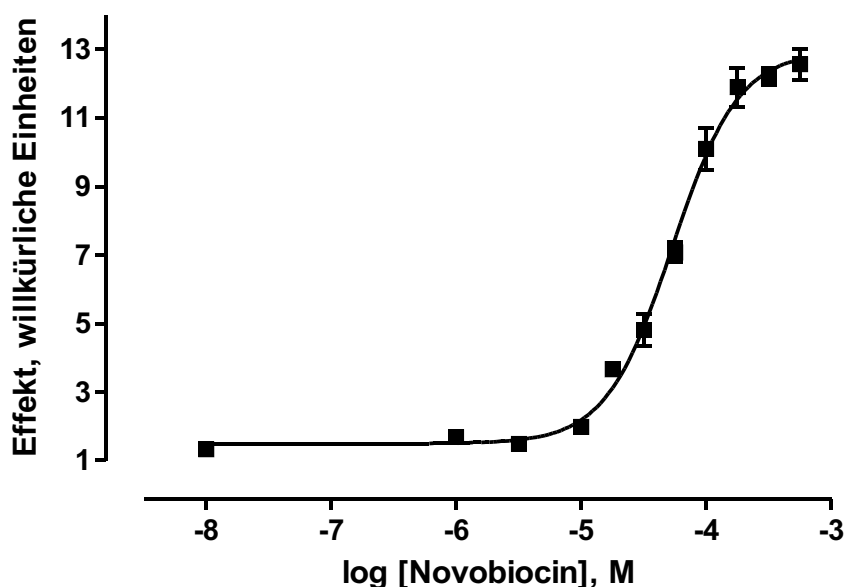


Abb. 5.5: Konzentrations-Wirkungskurve von Novobiocin im BCRP Hoechst Assay mit MCF-7 MX Zellen. $pIC_{50} = 4,27 \pm 0,06$, $n_H = 1,64 \pm 0,24$. Beispiel für ein typisches Experiment aus einer Serie von sechs unabhängigen Experimenten.

Abb. 5.5 zeigt eine Konzentrations-Wirkungskurve für den BCRP Modulator Novobiocin.

Der plC_{50} -Wert von $4,27 \pm 0,06$ ist verhältnismäßig niedrig, wenn man diesen mit den Aktivitätswerten der WK-X- und WK-Y- bzw. XR-Verbindungen gegenüber P-gp vergleicht. Da Novobiocin nicht in der Lage war, P-gp zu hemmen, zeichnet sich diese Substanz durch eine gewisse Selektivität, aber geringe Affinität zu BCRP aus.

Abb. 5.6 veranschaulicht, dass Calcein AM kein Substrat von BCRP ist. Die Anstiege der Fluoreszenz-Zeitverläufe, die in MCF-7 MX Zellen mit Puffer oder Novobiocin ($520 \mu\text{mol/l}$) präinkubiert wurden, sind nicht signifikant voneinander verschieden. Dieses Resultat zeigt, dass die durch unterschiedlichste Substanzen hervorgerufene verstärkte Akkumulation von Calcein AM in A2780 Adr Zellen nicht durch BCRP begründet sein kann.

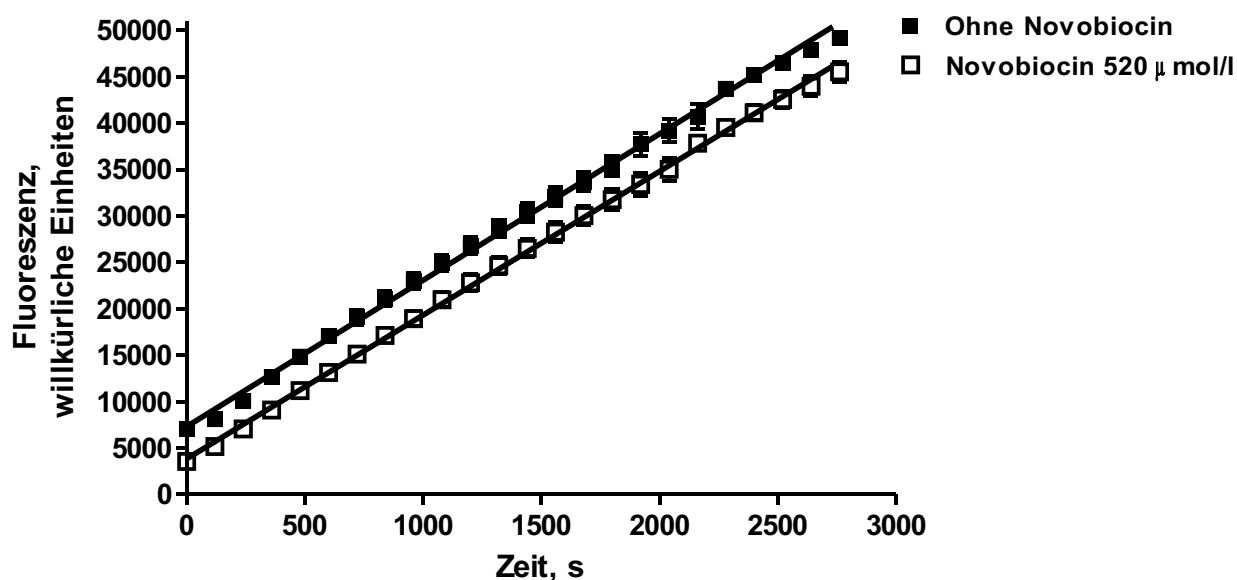


Abb. 5.6: Calcein AM Assay: Fluoreszenz-Zeitverläufe für MCF-7 MX Zellen in Abwesenheit (gefüllte Vierecke) und Gegenwart von Novobiocin (nicht gefüllte Vierecke).

In Analogie zu den Ergebnissen, die mit A2780 Adr Zellen bei der funktionellen Charakterisierung von P-gp erhalten wurden, führte Natriumorthovanadat ebenfalls zur Inhibition von BCRP. In Abb. 5.7 sind die Fluoreszenz-Zeitverläufe für unterschiedliche Natriumorthovanadatkonzentrationen zu erkennen und in Abb. 5.8 ist die resultierende Konzentrations-Effektkurve gezeigt.

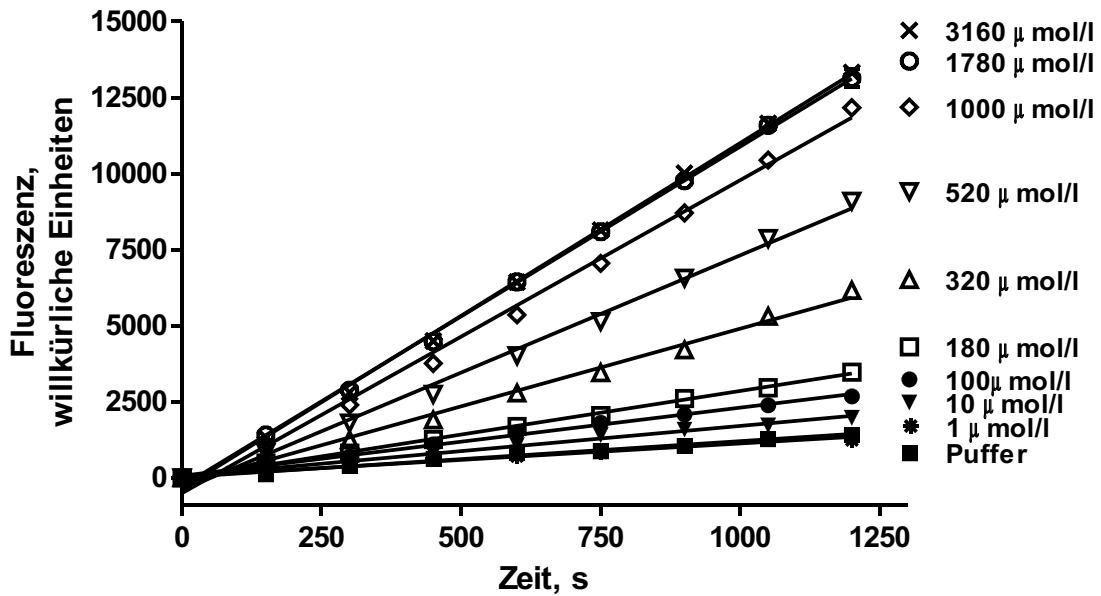


Abb. 5.7: Fluoreszenz-Zeitgeraden für unterschiedliche Konzentrationen von Natriumorthovanadat. MCF-7 MX Zellen, BCRP Hoechst Assay.

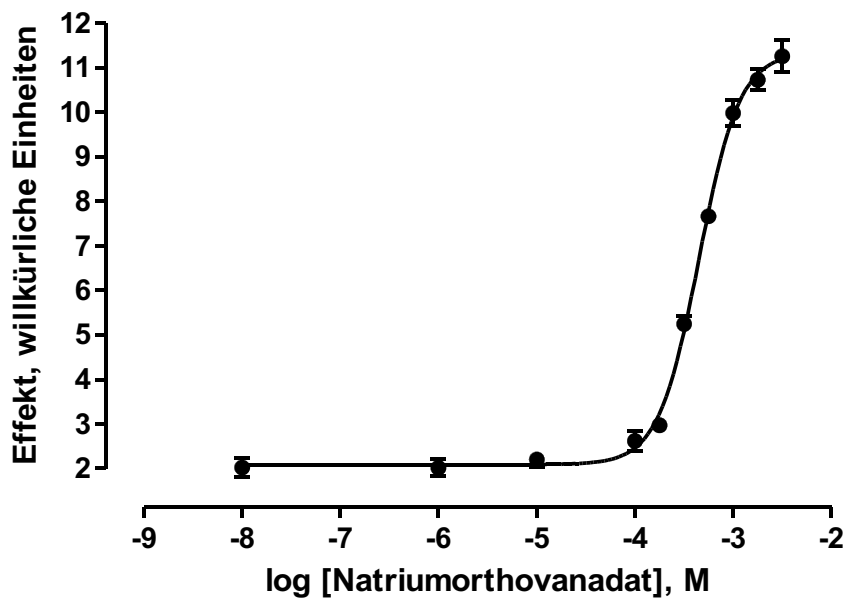


Abb. 5.8: Konzentrations-Effektkurve von Natriumorthovanadat, die mit Hilfe des BCRP Hoechst Assays bestimmt wurde. $pIC_{50} = 3,35 \pm 0,02$, $n_H = 2,11 \pm 0,14$.

In Abb. 5.9 sind die Konzentrations-Effektkurven für Novobioicin und WK-X-34 wiedergegeben. Es wird deutlich, dass der Modulator WK-X-34 im Vergleich zu Novobioicin BCRP

in viel ausgeprägterem Maße inhibiert. WK-X-34 stellt damit nicht nur einen potenten P-gp Modulator dar, sondern kann auch als wirksamer BCRP-Inhibitor angesehen werden. Die Aktivitätswerte einiger Verbindungen, die mit dem Hoechst BCRP Assay bestimmt wurden, können Tabelle. 5.2 entnommen werden.

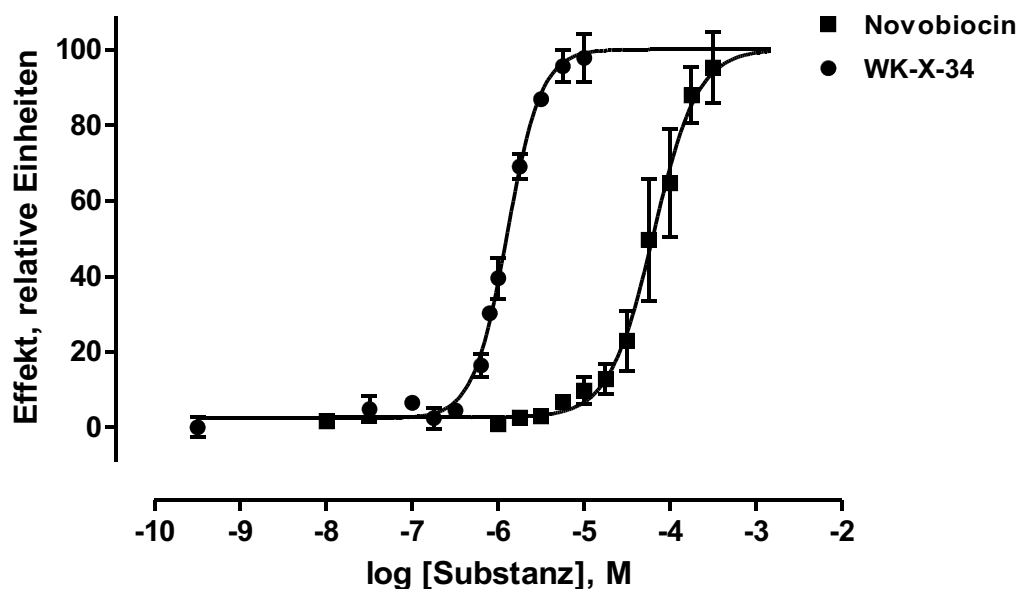


Abb. 5.9: Konzentrations-Effektkurven von WK-X-34 (Kreise) und Novobiocin (Vierecke), die mit Hilfe des BCRP Hoechst Assays an MCF-7 MX Zellen aufgenommen wurden. pIC_{50} (WK-X-34) = $5,90 \pm 0,06$, $n_H = 2,19 \pm 0,14$ / pIC_{50} (Novobiocin) = $4,19 \pm 0,06$, $n_H = 1,69 \pm 0,31$. Beispiel für ein typisches Experiment aus einer Serie von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Tabelle. 5.2: pIC_{50} -Werte und Hillkoeffizienten für verschiedene Substanzen, die mit Hilfe des BCRP Hoechst Assays untersucht wurden.

Substanz	$pIC_{50} \pm SD$	$n_H \pm SD$
Novobiocin	$4,07 \pm 0,30$	$1,90 \pm 0,45$
XR9577	$5,98 \pm 0,22$	$1,67 \pm 0,41$
WK-X-34	$5,85 \pm 0,16$	$2,12 \pm 0,37$
WK-X-50	$5,16 \pm 0,13$	$2,51 \pm 1,09$
Verapamil	$3,22 \pm 0,28$	1,00 (fixiert)

5.3 Simultanassay – Calcein AM und Hoechst Assay in Kombination

Aufgrund der ausreichend divergierenden Exzitations- und Emissionsmaxima der Verbindungen Calcein und Hoechst 33342 konnten die beiden in Kap. 3.3 und 3.8 vorgestellten Assays auch in Kombination durchgeführt werden. Dabei wurde, wie in Kap. 2.15 beschrieben, eine Lösung mit Calcein AM und Hoechst 33342 zu den Zellen hinzupipettiert und die Fluoreszenz von Calcein und Hoechst nacheinander vermessen.

Zur Etablierung dieses Simultanassays wurden A2780 Adr und A2780 Zellen in Gegenwart und Abwesenheit des Modulators WK-X-51 untersucht.

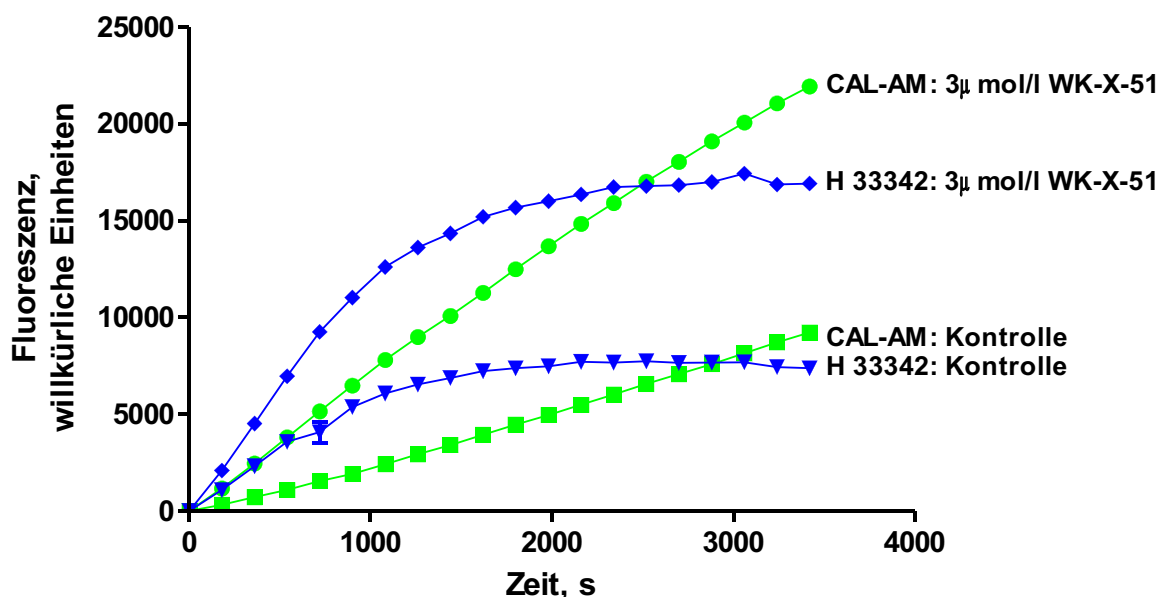


Abb. 5.10: Simultanassay mit A2780 Adr Zellen: Fluoreszenz-Zeitkurven in Gegenwart und Abwesenheit von 3 µmol/l WK-X-51 (blau = Hoechst 33342 Fluoreszenz, grün = Calcein Fluoreszenz).

Die eingesetzte Konzentration des Modulators WK-X-51 gewährleistete eine vollständige Hemmung von P-gp (vergl. Kap. 3.9).

Bei Betrachtung der Fluoreszenz-Zeit-Verläufe für A2780 Adr Zellen (vergl. Abb. 5.10) fällt zunächst auf, dass die Fluoreszenz-Kurve von Calcein im Gegensatz zu der von Hoechst 33342 über den gesamten dargestellten Zeitbereich linear ansteigt. Als Folge der mit Hilfe des Modulators WK-X-51 hervorgerufenen Inhibition von P-gp differieren die in blau wiedergegebenen Fluoreszenz-Zeitkurven deutlich in ihren bis 1000 s quasi linear verlau-

fenden Anstiegen. Ebenso unterscheiden sich die oberen Plateau-Werte der beiden Kurven in ausgeprägter Form. Die beiden in grün dargestellten Calcein-Fluoreszenz-Zeit-Anstiege weichen signifikant voneinander ab; wiederum führt die Präinkubation mit dem Modulator WK-X-51 im Vergleich zur Kontrolle (KHP) zu einer deutlichen Erhöhung des Calcein-Fluoreszenz-Anstieges.

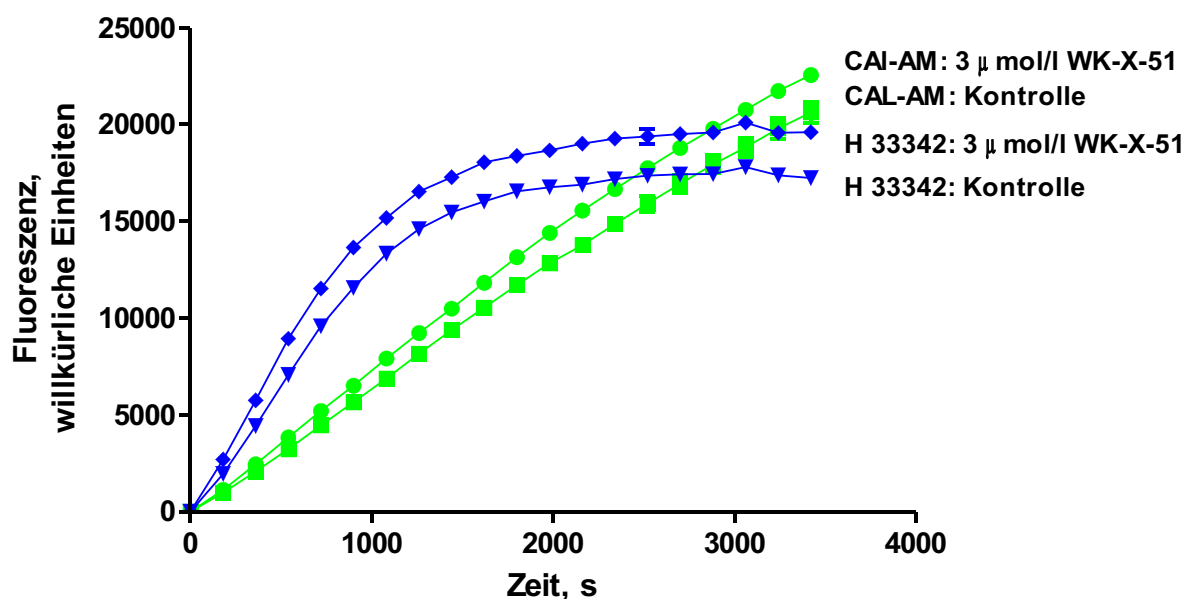


Abb. 5.11: Simultanassay mit A2780 Zellen: Fluoreszenz-Zeitkurven in Gegenwart und Abwesenheit von 3 µmol/l WK-X-51 (blau = Hoechst 33342 Fluoreszenz, grün = Calcein Fluoreszenz).

In Abb. 5.11 sind die Fluoreszenz-Zeit-Verläufe für A2780 Zellen zu erkennen. Die fehlende Expression von ABCB1 führt dazu, dass der Effekt des Modulators WK-X-51 ausbleibt. Die in blau dargestellten Fluoreszenz-Zeit-Verläufe unterscheiden sich nur geringfügig in ihren Anstiegen (bis 1000 s) und erreichen einen vergleichbar hohen Y_{\max} -Wert. Die in grün wiedergegebenen Calcein-Fluoreszenz-Zeit-Geraden besitzen eine nahezu identische Steigung.

In Tabelle 5.3 sind die pIC_{50} -Werte und Hillkoeffizienten einiger Substanzen aufgeführt, die mit Hilfe des Simultanassays bestimmt wurden. Der in Abb. 5.12 dargestellte Plot der pIC_{50} -Werte der sieben Verbindungen im Simultanassay zeigt für Calcein AM und Hoechst 33342 eine ausgeprägte Korrelation. Das Bestimmtheitsmaß beträgt 0,99. Die Steigung der Regressionsgerade ist nicht signifikant von eins verschieden ($m = 1,03 \pm 0,05$).

Tabelle 5.3: pIC_{50} -Werte und Hillkoeffizienten für verschiedene Substanzen, die mit Hilfe des sogenannten Simultanassays untersucht wurden.

Substanz	Calcein AM		Hoechst 33342	
	$pIC_{50} \pm SD$	$n_H \pm SD$	$pIC_{50} \pm SD$	$n_H \pm SD$
Cyclosporin A	$5,75 \pm 0,06$	$3,33 \pm 0,53$	$5,84 \pm 0,02$	$4,08 \pm 0,79$
Diltiazem	$4,55 \pm 0,11$	1,00	$4,67 \pm 0,18$	1,00
Verapamil	$5,39 \pm 0,09$	1,00	$5,33 \pm 0,12$	1,00
XR9577	$6,43 \pm 0,08$	$1,95 \pm 0,39$	$6,50 \pm 0,10$	$2,37 \pm 0,69$
WK-X-51	$6,92 \pm 0,11$	$1,77 \pm 0,25$	$7,06 \pm 0,10$	$2,33 \pm 0,60$
WK-X-66	$5,77 \pm 0,06$	$1,37 \pm 0,15$	$5,74 \pm 0,14$	$1,57 \pm 0,38$
WK-Y-26	$5,85 \pm 0,09$	$1,63 \pm 0,19$	$5,86 \pm 0,13$	$1,75 \pm 0,29$

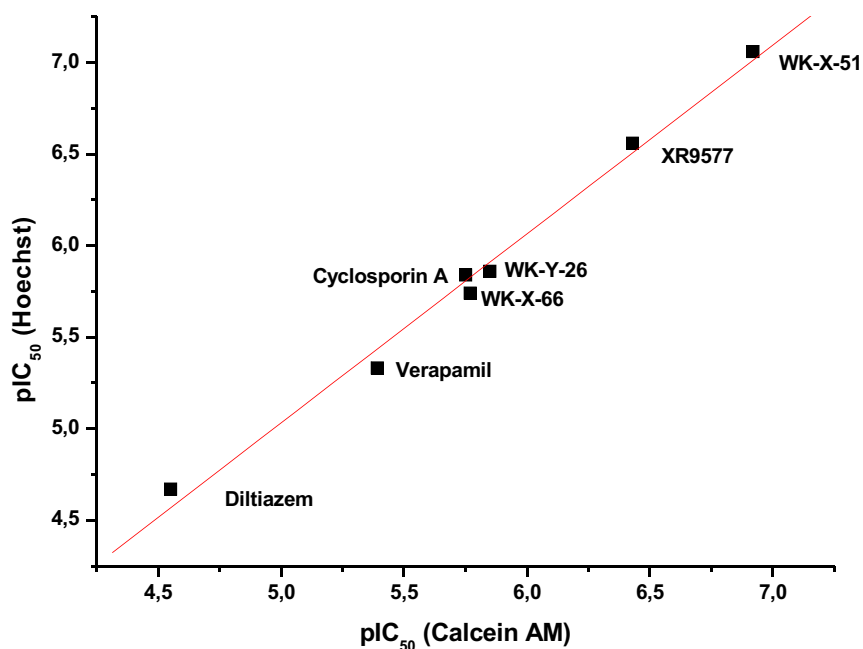


Abb. 5.12: Plot der pIC_{50} -Werte sieben verschiedener Substanzen im Simultanassay, $r^2 = 0,99$.

Von besonderem Interesse sind die pIC_{50} -Werte der Verbindung WK-X-51. Der für WK-X-51 im Simultanassay mit Calcein AM bestimmte pIC_{50} -Wert von $6,92 \pm 0,11$ (vergl. Tabelle 5.3) ist wesentlich größer als der im Calcein AM Assay ohne Hoechst 33342 ermittelte pIC_{50} -Wert von $6,19 \pm 0,10$ (Kap. 3.9). Der Anstieg des Aktivitätswertes von WK-X-51 könnte auf die durch Hoechst 33342 hervorgerufene Konformationsänderung von P-gp zu-

rückgeführt werden, die eine verstärkte Inhibition von P-gp durch WK-X-51 ermöglicht. Der im Simultanassay ermittelte Aktivitätswert von WK-X-51 ($7,06 \pm 0,10$) unterscheidet sich hingegen nicht von dem im Hoechst Assay erhaltenen pIC_{50} -Wert ($6,84 \pm 0,25$) (vergl. Tabelle 5.3).

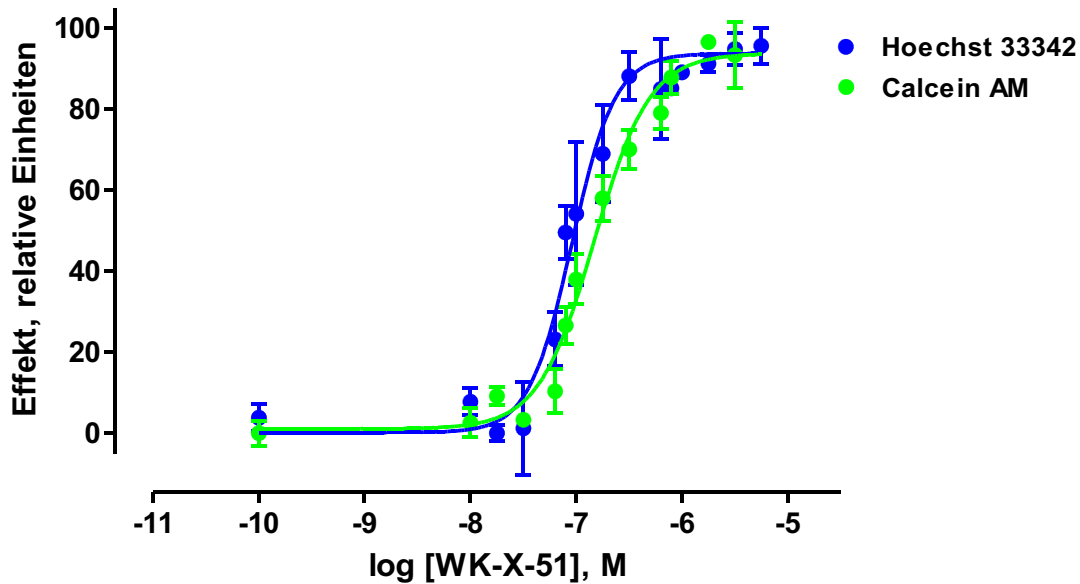


Abb. 5.13: Vergleich der Konzentrations-Effektkurven von WK-X-51 im Simultanassay. pIC_{50} (Hoechst) = $7,04 \pm 0,09$, $n_H = 2,13 \pm 0,37$ / pIC_{50} (Calcein AM) = $6,83 \pm 0,18$, $n_H = 1,67 \pm 0,27$. Beispiel für ein typisches Einzelexperiment aus einer Serie von drei unabhängigen Experimenten.

5.4 Herleitungen verschiedener Gleichungen

5.4.1 Die Hill-Gleichung

Die Interaktion eines Liganden L oder von n Liganden mit dem Rezeptor R gehorcht dem Massenwirkungsgesetz und wird vereinfacht durch die folgende Gleichung beschrieben:



k_{+1} : Assoziations-Geschwindigkeitskonstante

k_{-1} : Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante

Die Gesamtrezeptorpopulation setzt sich wie folgt zusammen:

$$R_{total} = [RL_n] + R_{frei} \quad \text{Gleichung 5.2}$$

Die Geschwindigkeit der Assoziation des Ligand-Rezeptor-Komplexes v_{hin} lautet:

$$v_{hin} = k_{+1} \cdot [R] \cdot [L]^n \quad \text{Gleichung 5.3}$$

Die Gleichung für die Geschwindigkeit der Dissoziation des RL_n -Komplexes $v_{rück}$ wird wie folgt definiert:

$$v_{rück} = k_{-1} \cdot [RL_n] \quad \text{Gleichung 5.4}$$

Im dynamischen, reversiblen Gleichgewicht sind die Werte für v_{hin} und $v_{rück}$ identisch. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D kann durch die folgende Gleichung beschrieben werden:

$$\frac{k_{-1}}{k_{+1}} = K_D = \frac{[R]_{frei} \cdot [L]^n}{[RL_n]} \quad \text{Gleichung 5.5}$$

Setzt man die Ligand-besetzten Rezeptormoleküle zur Gesamtrezeptorpopulation ins Verhältnis, so resultiert:

$$\frac{[RL_n]}{R_{total}} = \frac{[RL_n]}{[RL_n] + [R]_{frei}} \quad \text{Gleichung 5.6}$$

Löst man Gleichung 5.5 nach RL_n hin auf und setzt diese in Gleichung 5.6 ein, so ergibt sich das folgende Gleichungssystem:

$$\frac{[RL_n]}{R_{total}} = \frac{[RL_n]}{[RL_n] + [R]_{frei}} \Leftrightarrow \frac{[RL_n]}{R_{total}} = \frac{\frac{[R]_{frei} \cdot [L]^n}{K_D}}{[R]_{frei} + \frac{[R]_{frei} \cdot [L]^n}{K_D}}$$

Die Vereinfachung dieses Gleichungssystems erfolgt, indem R_{frei} ausgeklammert und anschließend weggekürzt wird:

$$\frac{[RL_n]}{R_{total}} = \frac{[R]_{frei} \cdot \left(\frac{[L]^n}{K_D} \right)}{[R]_{frei} \cdot \left(1 + \frac{[L]^n}{K_D} \right)} \Leftrightarrow \frac{[RL_n]}{R_{total}} = \frac{[L]^n}{[L]^n + K_D}$$

Löst man die letzte Gleichung nach RL_n hin auf, indem man sie mit R_{total} multipliziert, so resultiert die Hill-Gleichung (Gleichung 5.7).

$$[RL_n] = \frac{[L]^n \cdot R_{total}}{[L]^n + K_D} \quad \text{Gleichung 5.7}$$

5.4.2 Von der Hill-Gleichung zur 4-Parameter logistischen Gleichung

Statt RL_n und R_{total} werden E und E_{max} in die Hill-Gleichung (Gleichung 5.7) eingesetzt. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D wird mit EC_{50} gleichgesetzt.

$$E = \frac{E_{max} \cdot [L]^n}{[L]^n + K_D} \Leftrightarrow E = \frac{E_{max} \cdot 10^{n \cdot \log[L]}}{10^{n \cdot \log EC_{50}} + 10^{n \cdot \log[L]}}$$

Letztere Gleichung wird mit $10^{-n \cdot \log[L]}/10^{-n \cdot \log[L]}$ erweitert:

$$E = \frac{E_{max} \cdot 1}{(10^{n \cdot \log EC_{50}} + 10^{n \cdot \log[L]}) \cdot 10^{-n \cdot \log[L]}} \Leftrightarrow E = \frac{E_{max}}{(10^{(n \cdot \log EC_{50} - n \cdot \log[L])} + 10^{(n \cdot \log[L] - n \cdot \log[L])})}$$

Statt E_{max} kann (Top-Bottom) in die Gleichung eingebunden werden; bei zusätzlicher Angabe des Bottom-Wertes (gibt den Schnittpunkt mit der y-Achse an) resultiert die sogenannte 4-Parameter logistische Gleichung:

$$\Leftrightarrow E = \frac{Top - Bottom}{1 + 10^{n(\log EC_{50} - \log[L])}} + Bottom \quad \text{Gleichung 5.8}$$

6 Literaturverzeichnis

- 1 Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Schäfer-Korting, M. Arzneimittelwirkungen. 8., völlig neu bearb. und erw. Aufl.; Wissenschaftliche Verlags-Gesellschaft, Stuttgart, **2001**, 873-907.
- 2 Lüllmann, H.; Mohr, K.; Wehling, M. Pharmakologie und Toxikologie. 15., komplett überarbeitete Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2003**, 1-575.
- 3 Goodman Gilman, A. Pharmakologische Grundlagen der Arzneimitteltherapie; McGraw-Hill International Ltd, London, **1998**, 1181-1293.
- 4 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.
- 5 Drake, F. H.; Zimmerman, J. P.; McCabe, F. L.; Bartus, H. F.; Per, S. R.; Sullivan, D. M.; Ross, W. E.; Mattern, M. R.; Johnson, R. K.; Crooke, S. T.; Mirabelli, C. K. Purification of topoisomerase II from amsacrine-resistant P388 leukemia cells. *J. Biol. Chem.*, **1987**, *262*, 16739-16747.
- 6 Breier, A.; Barancik, M.; Sulova, Z.; Uhrík, B. P-glycoprotein - implications of metabolism of neoplastic cells and cancer therapy. *Curr. Cancer Drug Tar.*, **2005**, *5*, 457-468.
- 7 Stavrovskaya, A. A. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry-Moscow*, **2000**, *65*, 95-106.
- 8 Hill, S. J. G-protein-coupled receptors: past, present and future. *Br. J. Pharmacol.*, **2006**, *147*, 27-37.
- 9 Fromm, M. F. Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans. *Eur. J. Clin. Invest.*, **2003**, *33*, 6-9.
- 10 Choi, C. H. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int.*, **2005**, *5*, 30-43.
- 11 Dean, M.; Rzhetsky, A.; Allikmets, R. The human ATP-Binding Cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.*, **2001**, *11*, 1156-1166.
- 12 Annilo, T.; Chen, Z.; Shulenin, S.; Costantino, J.; Thomas, H. L.; Stefanov, S.; Dean, M. Evolution of the vertebrate ABC gene family. *Genomics*, **2006**, *88*, 1-11.
- 13 Gottesman, M. M.; Pastan, I. Biochemistry of Multidrug-Resistance Mediated by the Multidrug Transporter. *Annu. Rev. Biochem.*, **1993**, *62*, 385-427.

- 14 Schinkel, A. H.; Jonker, J. W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2003**, *55*, 3-29.
- 15 Hoffmann, U.; Kroemer, H. K. The ABC transporters MDR1 and MRP2: Multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance. *Drug Metab. Rev.*, **2004**, *36*, 669-701.
- 16 Teodori, E.; Dei, S.; Martelli, C.; Scapecchi, S.; Gualtieri, F. The functions and structure of ABC transporters: implications for the design of new inhibitors of Pgp and MRP1 to control multidrug resistance (MDR). *Curr. Drug. Targets*, **2006**, *7*, 893-909.
- 17 Juliano, R. L.; Ling, V. Surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese-hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta*, **1976**, *455*, 152-162.
- 18 Mizutani, T.; Hattori, A. New horizon of MDR1 (P-glycoprotein) study. *Drug Metab. Rev.*, **2005**, *37*, 489-510.
- 19 Nobili, S.; Landini, I.; Giglioni, B.; Mini, E. Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance. *Curr. Drug Targets*, **2006**, *7*, 861-879.
- 20 Loo, T. W.; Clarke, D. M. Identification of residues within the drug-binding domain of the human multidrug resistance P-glycoprotein by cysteine-scanning mutagenesis and reaction with dibromobimane. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 39272-39278.
- 21 Choudhuri, S.; Klaassen, C. D. Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int. J. Toxicol.*, **2006**, *25*, 231-259.
- 22 Varma, M. V. S.; Ashokraj, Y.; Dey, C. S.; Panchagnula, R. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacol. Res.*, **2003**, *48*, 347-359.
- 23 Beismann-Driemeyer, S.; Tampe, R. Function of the antigen transport complex TAP in cellular immunity. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 4014-4031.
- 24 Hanekop, N.; Zaitseva, J.; Jenewein, S.; Holland, I. B.; Schmitt, L. Molecular insights into the mechanism of ATP-hydrolysis by the NBD of the ABC-transporter HlyB. *FEBS Lett.*, **2006**, *580*, 1036-1041.
- 25 Wiese, M.; Pajeva, I. K. Structure-activity relationships of multidrug resistance reversers. *Curr. Med. Chem.*, **2001**, *8*, 685-713.
- 26 Litman, T.; Druley, T. E.; Stein, W. D.; Bates, S. E. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2001**, *58*, 931-959.

- 27 Dietrich, C. G.; Geier, A.; Elferink, R. P. J. O. ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut. *Gut*, **2003**, *52*, 1788-1795.
- 28 van Asperen, J.; Mayer, U.; van Tellingen, O.; Beijnen, J. H. The functional role of P-glycoprotein in the blood-brain barrier. *J. Pharm. Sci.*, **1997**, *86*, 881-884.
- 29 Balayssac, D.; Authier, N.; Cayre, A.; Coudore, F. Does inhibition of P-glycoprotein lead to drug-drug interactions? *Toxicol. Lett.*, **2005**, *156*, 319-329.
- 30 Huang, L. Y.; Wring, S.; Woolley, J. L.; Brouwer, K. R.; Serabjit-Singh, C.; Polli, J. W. Induction of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A by HIV protease inhibitors. *Drug Metab. Dispos.*, **2001**, *29*, 754-760.
- 31 Cirrito, J. R.; Deane, R.; Fagan, A. M.; Spinner, M. L.; Parsadanian, M.; Finn, M. B.; Jiang, H.; Prior, J. L.; Sagare, A.; Bales, K. R.; Paul, S. M.; Zlokovic, B. V.; Piwnicka-Worms, D.; Holtzman, D. M. P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model. *J. Clin. Invest.*, **2005**, *115*, 3285-3290.
- 32 Pohl, A.; Devaux, P. F.; Herrmann, A. Function of prokaryotic and eukaryotic ABC proteins in lipid transport. *BBA.-Mol. Cell Biol. L.*, **2005**, *1733*, 29-52.
- 33 Johnstone, R. W.; Ruefli, A. A.; Tainton, K. M.; Smyth, M. J. A role for P-glycoprotein in regulating cell death. *Leukemia Lymphoma*, **2000**, *38*, 1-11.
- 34 Frank, M. H.; Denton, M. D.; Alexander, S. I.; Khoury, S. J.; Sayegh, M. H.; Briscoe, D. Specific MDR1 P-glycoprotein blockade inhibits human alloimmune T cell activation in vitro. *J. Immunol.*, **2001**, *166*, 2451-2459.
- 35 Polli, J. W.; Wring, S. A.; Humphreys, J. E.; Huang, L. Y.; Morgan, J. B.; Webster, L. O.; Serabjit-Singh, C. S. Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2001**, *299*, 620-628.
- 36 Eytan, G. D.; Regev, R.; Oren, G.; Assaraf, Y. G. The role of passive transbilayer drug movement in multidrug resistance and its modulation. *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 12897-12902.
- 37 Tsuruo, T.; Iida, H.; Tsukagoshi, S.; Sakurai, Y. Enhancement of vinblastine-induced cyto-toxicity by lysolecithin and phosphatidylinositol. *Cancer Lett.*, **1981**, *13*, 133-137.
- 38 Tsuruo, T.; Iida, H.; Tsukagoshi, S.; Sakurai, Y. Potentiation of vincristine and Adriamycin effects in human hematopoietic tumor-cell lines by calcium-antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res.*, **1983**, *43*, 2267-2272.

- 39 Schuurhuis, G. J.; Broxterman, H. J.; van der Hoeven, J. J. M.; Pinedo, H. M.; Lankelema, J. Potentiation of doxorubicin cytotoxicity by the calcium antagonist bepridil in anthracycline-resistant and -sensitive cell lines. A comparison with verapamil. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **1987**, *20*, 285-290.
- 40 Ozols, R. F.; Cunnion, R. E.; Klecker, R. W.; 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.
- 41 Covelli, A. Modulation of multidrug resistance (MDR) in hematological malignancies. *Ann. Oncol.*, **1999**, *10*, 53-59.
- 42 Yahanda, A. M.; Adler, K. M.; Fisher, G. A.; Brophy, N. A.; Halsey, J.; Hardy, R. I.; Gosland, M. P.; Lum, B. L.; Sikic, B. I. Phase-I trial of etoposide with cyclosporine as a modulator of Multidrug Resistance. *J. Clin. Oncol.*, **1992**, *10*, 1624-1634.
- 43 Thomas H.; Coley H.M. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control.*, **2003**, *10*, 159-165.
- 44 te Boekhorst, P.A.; van Kappel, J.; Schoester, M. Reversal of typical multidrug resistance by cyclosporin and its non-immunosuppressive analogue SDZ PSC 833 in Chinese hamster ovary cells expressing the *mdr1* phenotype. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **1992**, *30*, 238-242.
- 45 Roe, M.; Folkes, A.; Ashworth, P.; Brumwell, J.; Chima, L.; Hunjan, S.; Pretswell, I.; Dangerfield, W.; Ryder, H.; Charlton, P. Reversal of P-glycoprotein mediated multidrug resistance by novel anthranilamide derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, *9*, 595-600.
- 46 Robey, R. W.; Steadman, K.; Polgar, O.; Morisaki, K.; Blayney, M.; Mistry, P.; Bates, S. E. Pheophorbide is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. *Cancer Res.*, **2004**, *64*, 1242-1246.
- 47 Dantzig, A. H.; Law, K. L.; Cao, J.; Starling, J. J. Reversal of multidrug resistance by the P-glycoprotein modulator, LY335979, from the bench to the clinic. *Curr. Med. Chem.*, **2001**, *8*, 39-50.
- 48 Mistry, P.; Stewart, A. J.; Dangerfield, W.; Okiji, S.; Liddle, C.; Bootle, D.; Plumb, J. A.; Templeton, D.; Charlton, P. In vitro and in vivo reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576. *Cancer Res.*, **2001**, *61*, 749-758.
- 49 List, A. F.; Kopecky, K. J.; Willman, C. L.; Head, D. R.; Persons, D. L.; Slovak, M. L.; Dorr, R.; Karanes, C.; Hynes, H. E.; Doroshow, J. H.; Shurafa, M.; Appelbaum, F. R. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood*, **2001**, *98*, 3212-3220.

- 50 Solary, E.; Drenou, B.; Campos, L.; de Cremoux, P.; Mugneret, F.; Moreau, P.; Liou, B.; Falkenrodt, A.; Witz, B.; Bernard, M.; Hunault-Berger, M.; Delain, M.; Fernandes, J.; Mounier, C.; Guilhot, F.; Garnache, F.; Berthou, C.; Kara-Slimane, F.; Harousseau, J. L. Quinine as a multidrug resistance inhibitor: a phase 3 multicentric randomized study in adult de novo acute myelogenous leukemia. *Blood*, **2003**, *102*, 1202-1210.
- 51 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.
- 52 Oudard, S.; Thierry, A.; Jorgensen, T. J.; Rahman, A. Sensitization of Multidrug-Resistant colon cancer-cells to doxorubicin encapsulated in liposomes. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **1991**, *28*, 259-265.
- 53 Rahman, A.; Husain, S. R.; Siddiqui, J.; Verma, M.; Agresti, M.; Center, M.; Safa, A. R.; Glazer, R. I. Liposome-mediated modulation of Multidrug Resistance in human HL-60 leukemia-cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, **1992**, *84*, 1909-1915.
- 54 Fracasso, P. M.; Blum, K. A.; Ma, M. K.; Tan, B. R.; Wright, L. P.; Goodner, S. A.; Fears, C. L.; Hou, W.; Arquette, M. A.; Picus, J.; Denes, A.; Mortimer, J. E.; Ratner, L.; Ivy, S. P.; Mcleod, H. L. Phase I study of pegylated liposomal doxorubicin and the multidrug-resistance modulator, valspodar. *Br. J. Cancer*, **2005**, *93*, 46-53.
- 55 Giaccone, G.; Linn, S. C.; Welink, J.; Catimel, G.; Stieltjes, H.; van der Vijgh, W. J. F.; Eeltink, C.; Vermorken, J. B.; Pinedo, H. M. A dose-finding and pharmacokinetic study of reversal of multidrug resistance with SDZ PSC 833 in combination with doxorubicin in patients with solid tumors. *Clin. Cancer Res.*, **1997**, *3*, 2005-2015.
- 56 Naito, M.; Watanabe, T.; Tsuge, H.; Koyama, T.; Oh-hara, T.; Tsuruo, T. Potentiation of the reversal activity of SDZ PSC833 on multi-drug resistance by an anti-P-glycoprotein monoclonal antibody MRK-16. *Int. J. Cancer*, **1996**, *67*, 435-440.
- 57 Mechetner, E. B.; Roninson, I. B. Efficient Inhibition of P-Glycoprotein-mediated Multidrug Resistance with a monoclonal-antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1992**, *89*, 5824-5828.
- 58 Jin, S.; Gorfajn, B.; Faircloth, G.; Scotto, K. W. Ecteinascidin 743, a transcription-targeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2000**, *97*, 6775-6779.
- 59 Synold, T. W.; Dussault, I.; Forman, B. M. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nature Medicine*, **2001**, *7*, 584-590.
- 60 Blagosklonny, M. V. Targeting cancer cells by exploiting their resistance. *Trends Mol. Med.*, **2003**, *9*, 307-312.

- 61 Gerth, K.; Bedorf, N.; Hofle, G.; Irschik, H.; Reichenbach, H. Epothilons A and B: Antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.*, **1996**, *49*, 560-563.
- 62 Varma, M. V. S.; Ashokraj, Y.; Dey, C. S.; Panchagnula, R. P-Glykoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacol. Res.*, **2003**, *48*, 347-359.
- 63 Higgins, C. F. Flip-flop - the transmembrane translocation of lipids. *Cell*, **1994**, *79*, 393-395.
- 64 Higgins, C. F.; Linton, K. J. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2004**, *11*, 918-926.
- 65 Sauna, Z. E.; Ambudkar, S. V. Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, *97*, 2515-2520.
- 66 Ambudkar, S. V.; Kim, I. W.; Sauna, Z. E. The power of the pump: mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2006**, *27*, 392-400.
- 67 Al-Shawi, M. K.; Polar, M. K.; Omote, H.; Figler, R. A. Transition state analysis of the coupling of drug transport to ATP hydrolysis by P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *52*, 52629-52640.
- 68 Callaghan, R.; Ford, R. C.; Kerr, I. D. The translocation mechanism of P-glycoprotein. *FEBS Lett.*, **2006**, *580*, 1056-1063.
- 69 Rosenberg, M. F.; Callaghan, R.; Ford, R. C.; Higgins, C. F. Structure of the multi-drug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 10685-10694.
- 70 Rosenberg, M. F.; Kamis, A. B.; Callaghan, R.; Higgins, C. F.; Ford, R. C. Three-dimensional structures of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein demonstrate major conformational changes in the transmembrane domains upon nucleotide binding. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 8294-8299.
- 71 Rosenberg, M. F.; Callaghan, R.; Modok, S.; Higgins, C. F.; Ford, R. C. Three-dimensional structure of P-glycoprotein: the transmembrane regions adopt an asymmetric configuration in the nucleotide-bound state. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 2857-2862.
- 72 Martin, C.; Berridge, G.; Mistry, P.; Higgins, C.; Charlton, P.; Callaghan, R. Drug binding sites on P-glycoprotein are altered by ATP binding prior to nucleotide hydrolysis. *Biochemistry*, **2000**, *39*, 11901-11906.
- 73 Martin, C.; Higgins, C. F.; Callaghan, R. The vinblastine binding site adopts high- and low-affinity conformations during a transport cycle of P-glycoprotein. *Biochemistry*,

2001, 40, 15733-15742.

- 74 Liu, R. H.; Sharom, F. J. Site-directed fluorescence labeling of P-glycoprotein on cysteine residues in the nucleotide binding domains. *Biochemistry*, **1996**, 35, 11865-11873.
- 75 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.
- 76 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.
- 77 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.
- 78 Safa, A. R. Identification and characterization of the binding sites of P-glycoprotein for multidrug resistance-related drugs and modulators. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, **2004**, 4, 1-17.
- 79 Peer, M.; Csaszar, E.; Vorlaufer, E.; Kopp, S.; Chiba, P. Photoaffinity labeling of P-glycoprotein. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2005**, 5, 165-172.
- 80 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.
- 81 Loo, T. W.; Clarke, D. M. Determining the dimensions of the drug-binding domain of human P-glycoprotein using thiol cross-linking compounds as molecular rulers. *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 36877-36880.
- 82 Loo, T. W.; Clarke, D. M. Cross-linking of human multidrug resistance P-glycoprotein by the substrate, Tris-(2-maleimidoethyl)amine, is altered by ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 31800-31805.
- 83 Loo, T. W.; 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**, 276, 14972-14979.
- 84 Loo, T. W.; Clarke, D. M. Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux. *J. Membrane Biol.*, **2005**, 206, 173-185.
- 85 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.

- 86 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.
- 87 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.
- 88 Ekins, S.; Kim, R. B.; Leake, B. F.; Dantzig, A. H.; Schuetz, E. G.; Lan, L. B.; Yasuda, K.; Shepard, R. L.; Winter, M. A.; Schuetz, J. D.; Wikkel, J. H.; Wrighton, S. A. Three-dimensional quantitative structure-activity relationships of inhibitors of P-glycoprotein. *Mol. Pharmacol.*, **2002**, *61*, 964-973.
- 89 Pearce, H. L.; Safa, A. R.; Bach, N. J.; Winter, M. A.; Cirtain, M. C.; Beck, W. T. Essential features of the P-Glycoprotein pharmacophore as defined by a series of reserpine analogs that modulate Multidrug Resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1989**, *86*, 5128-5132.
- 90 Chiba, P.; Ecker, G.; Schmid, D.; Drach, J.; Tell, B.; Goldenberg, S.; Gekeler, V. Structural requirements for activity of propafenone-type modulators in P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Mol. Pharmacol.*, **1996**, *49*, 1122-1130.
- 91 Pajeva, I. K.; Wiese, M. Molecular modeling of phenothiazines and related drugs as multidrug resistance modifiers: a comparative molecular field analysis study. *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 1815-1826.
- 92 Seelig, A. A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *Eur. J. Biochem.*, **1998**, *251*, 252-261.
- 93 Pajeva, I. K.; Wiese, M. A comparative molecular field analysis of propafenone-type modulators of cancer multidrug resistance. *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **1998**, *17*, 301-312.
- 94 Ecker, G.; Huber, M.; Schmid, D.; Chiba, P. The importance of a nitrogen atom in modulators of multidrug resistance. *Mol. Pharmacol.*, **1999**, *56*, 791-796.
- 95 Osterberg, T.; Norinder, U. Theoretical calculation and prediction of P-glycoprotein-interacting drugs using MolSurf parametrization and PLS statistics. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2000**, *10*, 295-303.
- 96 Doepenschmitt, S.; Spahn-Langguth, H.; Regardh, C. G.; Langguth, P. Radioligand-binding assay employing P-glycoprotein-overexpressing cells: Testing drug affinities to the secretory intestinal multidrug transporter. *Pharm. Res.*, **1998**, *15*, 1001-1006.
- 97 Doepenschmitt, S.; Spahn-Langguth, H.; Regardh, C. G.; Langguth, P. Role of P-glycoprotein-mediated secretion in absorptive drug permeability: An approach using passive membrane permeability and affinity to P-glycoprotein. *J. Pharm. Sci.*, **1999**,

88, 1067-1072.

- 98 Doeppenschmitt, S.; Langguth, P.; Regardh, C. G.; Andersson, T. B.; Hilgendorf, C.; Spahn-Langguth, H. Characterization of binding properties to human P-glycoprotein: Development of a [³H]verapamil radioligand-binding assay. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1999**, *288*, 348-357.
- 99 Neuhoff, S.; Langguth, P.; Dressler, C.; Andersson, T. B.; Regardh, C. G.; Spahn-Langguth, H. Affinities at the verapamil binding site of MDR1-encoded P-glycoprotein: drugs and analogs, stereoisomers and metabolites. *Int. J. Clin. Pharm. Ther.*, **2000**, *38*, 168-179.
- 100 Pajeva, I. K.; Wiese, M. Pharmacophore model of drugs involved in P-glycoprotein multidrug resistance: explanation of structural variety (hypothesis). *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 5671-5686.
- 101 Pajeva, I. K.; Globisch, C.; Wiese, M. Structure-function relationships of multidrug resistance P-glycoprotein. *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 2523-2533.
- 102 Borst, P.; Evers, R.; Kool, M.; Wijnholds, J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer Inst.*, **2000**, *92*, 1295-1302.
- 103 Haimeur, A.; Conseil, G.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. C. The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr. Drug Metab.*, **2004**, *5*, 21-53.
- 104 Homolya, L.; Varadi, A.; Sarkadi, B. Multidrug resistance-associated proteins: export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate. *Biofactors*, **2003**, *17*, 103-114.
- 105 Boumendjel, A.; Baubichon-Cortay, H.; Trompier, D.; Perrotton, T.; Di Pietro, A. Anti-cancer multidrug resistance mediated by MRP1: Recent advances in the discovery of reversal agents. *Med. Res. Rev.*, **2005**, *25*, 453-472.
- 106 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. Pharm.*, **2005**, *204*, 216-237.
- 107 Rigato, I.; Pascolo, L.; Ferneti, C.; Ostrow, D. J.; Tiribelli, C. Human MRP1 mediates ATP-dependent transport of unconjugated bilirubin (UCB). *Gastroenterology*, **2004**, *126*, A746-A747.
- 108 Leier, I.; Jedlitschky, G.; Buchholz, U.; Cole, S. P. C.; Deeley, R. G.; Keppler, D. The MRP gene encodes an Atp-Dependent Export Pump for Leukotriene C4, and structurally related conjugates. *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 27807-27810.
- 109 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.
- 110 Loe, D. W.; Almquist, K. C.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. C. Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 9675-9682.
- 111 Leier, I.; Jedlitschky, G.; Buchholz, U.; Center, M.; Cole, S. P.; Deeley, R. G.; Keppeler, D. ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Biochem. J.*, **1996**, *314*, 433-437.
- 112 Payen, L.; Delugin, L.; Courtois, A.; Trinquart, Y.; Guillouzo, A.; Fardel, O. The sulphonylurea glibenclamide inhibits multidrug resistance protein (MRP1) activity in human lung cancer cells. *Br. J. Pharmacol.*, **2001**, *132*, 778-784.
- 113 Sun, H.; Johnson, D. R.; Finch, R. A.; Sartorelli, A. C.; Miller, D. W.; Elmquist, W. F. Transport of fluorescein in MDCKII-MRP1-transfected cells and mrp1-knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **2001**, *284*, 863-869.
- 114 Wang, E. J.; Johnson, W. W. The farnesyl protein transferase inhibitor lonafarnib (SCH66336) is an inhibitor of multidrug resistance proteins 1 and 2. *Chemotherapy*, **2003**, *49*, 303-308.
- 115 Bobrowska-Hagerstrand, M.; Wrobel, A.; Mrowczynska, L.; Soderstrom, T.; Shirataki, Y.; Motohashi, N.; Molnar, J.; Michalak, K.; Hagerstrand, H. Flavonoids as inhibitors of MRP1-like efflux activity in human erythrocytes. A structure-activity relationship study. *Oncol. Res.*, **2003**, *13*, 463-469.
- 116 Hooijberg, J. H.; Broxterman, H. J.; Kool, M.; Assaraf, Y. G.; Peters, G. J.; Noordhuis, P.; Scheper, R. J.; Borst, P.; Pinedo, M. M.; Jansen, G. Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res.*, **1999**, *59*, 2532-2535.
- 117 Benyahia, B.; Huguet, S.; Decleves, X.; Mokhtari, K.; Criniere, E.; Bernaudin, J. F.; Scherrmann, J. M.; Delattre, J. Y. 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.
- 118 Rosenbaum, C.; Rohrs, S.; Muller, O.; Waldmann, H. Modulation of MRP-1-mediated multidrug resistance by indomethacin analogues. *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 1179-1187.
- 119 Leslie, E. M.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. C. Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicol.*, **2001**, *167*, 3-23.

- 120 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.
- 121 Renes, J.; de Vries, E. G. E.; Nienhuis, E. F.; Jansen, P. L. M.; Muller, M. ATP- and glutathione-dependent transport of chemotherapeutic drugs by the multidrug resistance protein MRP1. *Br. J. Pharmacol.*, **1999**, *126*, 681-688.
- 122 Doyle, L. A.; Yang, W. D.; Abruzzo, L. V.; Krogmann, T.; Gao, Y. M.; Rishi, A. K.; Ross, D. D. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1999**, *95*, 15665-15670.
- 123 Krishnamurthy, P.; Schuetz, J. D. Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annu Rev. Pharmacol.*, **2006**, *46*, 381-410.
- 124 Doyle, L. A.; Ross, D. D. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene*, **2003**, *22*, 7340-7358.
- 125 Staud, F.; Pavsek, P. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2005**, *37*, 720-725.
- 126 Lindl, T. Zell- und Gewebekultur. 5., überarb. und erw. Aufl., *Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg - Berlin*, **2002**, 1-316.
- 127 Gassen, H.G.; Schimpf, G.H. Gentechnische Methoden – Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 3.Aufl., *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin*, **2002**, 1-512.
- 128 <http://www.uniklinik-freiburg.de/uk/live/informationmaterial/zytodreal.pdf>
- 129 <http://www.gaa-m-l.bayern.de/downloads/zytostatika.pdf>
- 130 Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **1983**, *65*, 55-63.
- 131 Mueller, H.; Kassack, M. U.; Wiese, M. Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *J. Biomol. Screen.*, **2004**, *9*, 506-515.
- 132 Petty, R. D.; Sutherland, L. A.; Hunter, E. M.; Cree, I. A. Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. *J. Biolumin. Chemilumin.*, **1995**, *10*, 29-34.
- 133 Lundin, A., Haenson, M.; Persson, J.; Pousette, A. Estimation of biomass in growing cell lines by adenosin triphosphate assay. *Methods Enzymol.*, **1986**, *133*, 27-42.

- 134 Hoefgen, B. Etablierung eines funktionellen Calcium-Assays und seine Anwendung zum Screening potentieller Liganden an humanen, klonierten Dopamin-Rezeptoren. Dissertation, Bonn, **2002**.
- 135 Parish, C.R. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol. Cell. Biol.*, **1999**, 77, 4999-508.
- 136 Tiberghien, F.; Loo, F. Ranking of P-glycoprotein substrates and inhibitors by a calcein-AM fluorometry screening assay. *Anti-Cancer Drugs*, **1996**, 7, 568-578.
- 137 Essodaigui, M.; Broxterman, H. J.; Garnier-Suillerot, A. Kinetic analysis of calcein and calcein - Acetoxymethylester efflux mediated by the multidrug resistance protein and P-glycoprotein. *Biochemistry*, **1998**, 37, 2243-2250.
- 138 Mueller, H.; Klinkhammer, W.; Kassack, M. U.; Eckstein, N.; Wiese, M. Novel modulators to overcome P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumor cells. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **2004**, 42, 644-645.
- 139 Eneroth, A.; Astrom, E.; Hoogstraate, J.; Schrenk, D.; Conrad, S.; Kauffmann, H. M.; Gjellan, K. Evaluation of a vincristine resistant Caco-2 cell line for use in a calcein AM extrusion screening assay for P-glycoprotein interaction. *Eur J. Pharm. Sci.*, **2001**, 12, 205-214.
- 140 Martin, A. M.; Swabrick, J.; Cammarata, A.; Stricker H. Physikalische Pharmazie. 3. Auflage., *Wissenschaftliche Verlags-Gesellschaft, Stuttgart*, **1987**, 1-587.
- 141 Tawar, U.; Jain, A. K.; Dwarakanath, B. S.; Chandra, R.; Singh, Y.; Chaudhury, N. K.; Khaitan, D.; Tandon, V. Influence of phenyl ring disubstitution on bisbenzimidazole and terbenzimidazole cytotoxicity: synthesis and biological evaluation as radioprotectors. *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 3785-3792.
- 142 Tawar, U.; Jain, A. K.; Chandra, R.; Singh, Y.; Dwarakanath, B. S.; Chaudhury, N. K.; Good, L.; Tandon, V. Minor groove binding DNA ligands with expanded A/T sequence length recognition, selective binding to bent DNA regions and enhanced fluorescent properties. *Biochemistry*, **2003**, 42, 13339-13346.
- 143 Adhikary, A.; Buschmann, V.; Muller, C.; Sauer, M. Ensemble and single-molecule fluorescence spectroscopic study of the binding modes of the bis-benzimidazole derivative Hoechst 33258 with DNA. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, 31, 2178-2186.
- 144 Kiechle, F. L.; Zhang, X. B. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clin. Chim. Acta*, **2002**, 326, 27-45.
- 145 Shapiro, A. B.; Ling, V. Reconstitution of drug transport by purified P-Glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 16167-16175.

- 146 Shapiro, A. B.; Ling, V. Using purified P-Glycoprotein to understand Multidrug-Resistance. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **1995**, *27*, 7-13.
- 147 Raffael, A.; Nebe, T.; Valet, G. Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: Durchflusszytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. *Schattauer*, Stuttgart, **1994**, 1-48.
- 148 Rücker, G.; Neugebauer, M.; Willems, G. G. Instrumentelle Pharmazeutische Analytik. *Wissenschaftliche Verlags-Gesellschaft*, Stuttgart, 2001.
- 149 http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/geNorm_manual.pdf
- 150 Tallarida, R. J. Drug Synergism and Dose-Effect Data Analysis. *Chapman and Hall/CRC*, **2000**, 1-241.
- 151 Bassett, D. R. Scientific contributions of A. V. Hill: Exercise physiology pioneer. *J. Appl. Physiol.*, **2002**, *93*, 1567-1582.
- 152 Weiss, J. N. The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB J.*, **1997**, *11*, 835-841.
- 153 Barlow, R.; Blake, J. F. Hill coefficients and the logistic equation. *Trends Pharmacol. Sci.*, **1989**, *10*, 440-441.
- 154 Ehlert, F. J. Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. *Mol. Pharmacol.*, **1988**, *33*, 187-194.
- 155 Ehlert, F. J. Analysis of allosterism in functional assays. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, **2005**, *315*, 740-754.
- 156 Birdsall, N. J.; Lazareno, S. Allosterism at muscarinic receptors: ligands and mechanism. *Mini Rev. Med. Chem.*, **2005**, *5*, 523-543.
- 157 Lazareno, S.; Birdsall, N. J. M. Detection, quantitation, and verification of allosteric interactions of agents with labeled and unlabeled ligands at G-Protein-Coupled Receptors - interactions of strychnine and acetylcholine at Muscarinic Receptors. *Mol. Pharmacol.*, **1995**, *48*, 362-378.
- 158 Vitrai, J.; Czobor P.; Simon G.; Varga L.; Marosfi S. Beyond principal component analysis: canonical component analysis for data reduction in classification of EPs. *Int. J. Biomed. Comput.*, **1984**, *15*, 93-111.
- 159 Sasaki, H.; Takada, K.; Terashima, Y.; Ekimoto, H.; Takahashi, K.; Tsuruo, T.; Fukushima, M. Human ovarian-cancer cell-lines resistant to Cisplatin, Doxorubicin, and L-Phenylalanine mustard are Sensitive to delta-7-prostaglandin A1 and Delta-12-prostaglandin J2. *Gynecol. Oncol.*, **1991**, *41*, 36-40.

- 160 de Jong, M. C.; Slootstra, J. W.; Scheffer, G. L.; Schroeijers, A. B.; Puijk, W. C.; Dinkelberg, R.; Kool, M.; Broxterman, H. J.; Meloen, R. H.; Scheper, R. J. Peptide transport by the multidrug resistance protein MRP1. *Cancer Res.*, **2001**, *61*, 2552-2557.
- 161 Bakker, M.; Renes, J.; Groenhuijzen, A.; Visser, P.; Timmer-Bosscha, H.; Muller, M.; Groen, H. J. M.; Smit, E. F.; deVries, E. G. E. Mechanisms for high methoxymorpholino doxorubicin cytotoxicity in doxorubicin-resistant tumor cell lines. *Int. J. Cancer*, **1997**, *73*, 362-366.
- 162 Vredenburg, M. R.; Ojima, I.; Veith, J.; Pera, P.; Kee, K.; Cabral, F.; Sharma, A.; Kanter, P.; Greco, W. R.; Bernacki, R. J. Effects of orally active taxanes on P-glycoprotein modulation and colon and breast carcinoma drug resistance. *J. Natl. Cancer Inst.*, **2001**, *93*, 1234-1245.
- 163 Manetta, A.; Gamboa, G.; Nasser, A.; Podnos, Y. D.; Emma, D.; Dorion, G.; Rawlings, L.; Carpenter, P. M.; Bustamante, A.; Patel, J.; Rideout, D. Novel phosphonium salts display in vitro and in vivo cytotoxic activity against human ovarian cancer cell lines. *Gynecol. Oncol.*, **1996**, *60*, 203-212.
- 164 Garnier-Suillerot, A.; Marbeuf-Gueye, C.; Salerno, M.; Loetchutinat, C.; Fokt, I.; Krawczyk, M.; Kowalczyk, T.; Priebe, W. Analysis of drug transport kinetics in implications for drug action. *Curr. Med. Chem.*, **2001**, *8*, 51-64.
- 165 Townsend, D. M.; Shen, H. X.; Staros, A. L.; Gate, L.; Tew, K. D. Efficacy of a glutathione S-transferase pi-activated prodrug in platinum-resistant ovarian cancer. *Mol. Cancer Ther.*, **2002**, *1*, 1089-1095.
- 166 Battaglia, A.; Bernacki, R. J.; Bertucci, C.; Bombardelli, E.; Cimitan, S.; Ferlini, C.; Fontana, G.; Guerrini, A.; Riva, A. Synthesis and biological evaluation of 2'-methyl taxoids derived from baccatin III and 14 beta-OH-baccatin III 1,14-carbonate. *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 4822-4825.
- 167 Woolley, D. E.; Tetlow, L. C.; Adlam, D. J.; Gearey, D.; Eden, R. D.; Ward, T. H.; Allen, T. D. Electrochemical monitoring of anticancer compounds on the human ovarian carcinoma cell line A2780 and its adriamycin- and cisplatin-resistant variants. *Exp. Cell Res.*, **2002**, *273*, 65-72.
- 168 Horton, J. K.; Roy, G.; Piper, J. T.; Van Houten, B.; Awasthi, Y. C.; Mitra, S.; Alaoui-Jamali, M. A.; Boldogh, I.; Singhal, S. S. Characterization of a chlorambucil-resistant human ovarian carcinoma cell line overexpressing glutathione S-transferase mu. *Biochem. Pharmacol.*, **1999**, *58*, 693-702.
- 169 Okochi, E.; Iwahashi, T.; Tsuruo, T. Monoclonal antibodies specific for P-glycoprotein. *Leukemia*, **1997**, *11*, 1119-1123.

- 170 Aihara, M.; Aihara, Y.; Schmidtwolf, G.; Schmidtwolf, I.; Sikic, B. I.; Blume, K. G.; Chao, N. J. A combined approach for purging Multidrug-Resistant leukemic-cell Lines in bone-marrow using a monoclonal-antibody and chemotherapy. *Blood*, **1991**, *77*, 2079-2084.
- 171 Georges, E.; Tsuruo, T.; Ling, V. Topology of P-Glycoprotein as determined by epitope mapping of Mrk-16 monoclonal-antibody. *J. Biol. Chem.*; **1993**, *268*, 1792-1798.
- 172 Minderman, H.; Suvannasankha, A.; O'Loughlin, K. L.; Scheffer, G. L.; Scheper, R. J.; Robey, R. W.; Baer, M. R. Flow cytometric analysis of breast cancer resistance protein expression and function. *Cytometry*, **2002**, *48*, 59-65.
- 173 Raaijmakers, M. H. G. P.; de Grouw, E. P. L. M.; Heuver, L. H. H.; van der Reijden, B. A.; Jansen, J. H.; Scheper, R. J.; Scheffer, G. L.; de Witte, T. J. M.; Raymakers, R. A. P. Breast cancer resistance protein in drug resistance of primitive CD34+38-cells in acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.*, **2005**, *11*, 2436-2444.
- 174 Ifergan, I.; Shafran, A.; Jansen, G.; Hooijberg, J. H.; Scheffer, G. L.; Assaraf, Y. G. Folate deprivation results in the loss of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) expression - A role for BCRP in cellular folate homeostasis. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 25527-25534.
- 175 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. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, *98*, 14078-14083.
- 176 Prime-Chapman, H. M., Fearn, R. A.; Cooper, A. E., Moore, V.; Hirst, B. H. Differential Multidrug Resistance-Associated Protein 1 through 6 isoform expression and function in human intestinal epithelial Caco-2 Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2004**, *311*, 476-484.
- 177 Boumendjel, A.; Baubichon-Cortay, H.; Trompier, D.; Perrotton, T.; Di Pietro, A. Anti-cancer multidrug resistance mediated by MRP1: Recent advances in the discovery of reversal agents. *Med. Res. Rev.*, **2005**, *25*, 453-472.
- 178 Krishnamurthy, P.; Schuetz, J. D. Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annu. Rev. Pharmacol.*, **2006**, *46*, 381-410.
- 179 Stein, W. D. Kinetics of the P-glycoprotein, the multidrug transporter. *Exp. Physiol.*, **1998**, *83*, 221-232.
- 180 Ramu, A.; Ramu, N. Reversal of Multidrug Resistance by phenothiazines and structurally related-compounds. *Cancer Chemother. Pharm.*, **1992**, *30*, 165-173.
- 181 Druker, B. J. Imatinib - A viewpoint by John M. Goldman. *Drugs*, **2001**, *61*, 1775-1776.

- 182 Nordhorn, G.; Willenbrink, J. Inhibition of Respiratory Enzymes in Mitochondria of Green Leaves. *Planta*, **1972**, *103*, 147-154.
- 183 Berg, J. M.; Stryer, L.; Tymoczko, J. L. Biochemie. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin*, **2003**, 1-1127.
- 184 Senior, A. E.; Al-Shawi, M. K.; Urbatsch, I. L. The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Lett.*, **1995**, *377*, 285-289.
- 185 Plass, W. Phosphate and vanadate in biological systems: Chemical relatives or more? *Angew. Chem. Int. Edit.*, **1999**, *38*, 909-912.
- 186 Sauna, Z. E.; Ambudkar, S. V. Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, *97*, 2515-2520.
- 187 Feinberg, A. P.; Snyder, S. H. Phenothiazine drugs - Structure-Activity-Relationships explained by A conformation that mimics dopamine. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **1975**, *72*, 1899-1903.
- 188 Kubinyi, H. QSAR and 3D QSAR in drug design.1. methodology. *Drug Discov. Today*, **1997**, *2*, 457-467.
- 189 Cramer, R. D.; Patterson, D. E.; Bunce, J. D. Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 5959-5967.
- 190 Klebe, G.; Abraham, T. Comparative Molecular Similarity Index Analysis (CoMSIA) of drug molecules to correlate and predict their biological Activity. *J. Med. Chem.*, **1994**, *37*, 4130-4146.
- 191 Böhm, H. J.; Klebe, G.; Kubinyi, H. Wirkstoffdesign, der Weg zum Arzneimittel, *Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford*, **1996**, 1-599.
- 192 Kubinyi, H. 3D QSAR in Drug Design: Theory Methods and Applications, *Escom Science Publishers B.V., Leiden*, **1993**, 1-759.
- 193 SYBYL, Molecular Modelling Software, Tripos Inc., 1699 S. Hanley Road, St. Louis, MO 63944, USA.
- 194 MOPAC7, J.J.P. Steward, Fujitsu Limited, Tokyo, Japan.
- 195 Weigt, M. Entwicklung neuer QSAR-Methoden und deren Anwendung an Dopamin-rezeptorantagonisten. Dissertation, Bonn, **2006**.
- 196 Free, S. M.; Wilson, J. W. Mathematical Contribution to Structure-Activity Studies. *J. Med. Chem.*, **1964**, *7*, 395-399.

- 197 Silvermann, R. B. Medizinische Chemie für Organiker, Biochemiker und Pharmazeutische Chemiker, *VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim*, **1995**, 1-440.
- 198 Ford, J. M.; Prozialeck, W. C.; Hait, W. N. Structural features determining activity of Phenothiazines and related drugs for inhibition of cell-growth and reversal of Multidrug Resistance. *Mol. Pharmacol.*, **1989**, *35*, 105-115.
- 199 Pleban, K.; Ecker, G. F. Inhibitors of P-glycoprotein - Lead identification and optimization. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2005**, *5*, 153-163.
- 200 Ayesh, S.; Shao, Y. M.; Stein, W. D. Co-operative, competitive and non-competitive interactions between modulators of P-glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*, **1996**, *1316*, 8-18.
- 201 Shapiro, A. B.; Ling, V. Transport of LDS-751 from the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane by the rhodamine-123-selective site of P-glycoprotein. *Eur. J. Biochem.*, **1998**, *254*, 181-188.
- 202 Lugo, M. R.; Sharom, F. J. Interaction of LDS-751 and rhodamine 123 with P-glycoprotein: evidence for simultaneous binding of both drugs. *Biochemistry*, **2005**, *44*, 14020-14029.
- 203 Fröhlich, M.; Albermann, N.; Sauer, A.; Walter-Sack, I.; Haefeli, W. E.; Weiss, J. In vitro and ex vivo evidence for modulation of P-glycoprotein activity by progestins. *Biochem. Pharmacol.*, **2004**, *68*, 2409-2416.
- 204 Leonessa, F.; Kim, J. H.; Ghiorghis, A.; Kulawiec, R. J.; Hammer, C.; Talebian, A.; Clarke, R. C-7 analogues of progesterone as potent inhibitors of the P-glycoprotein efflux pump. *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 390-398.
- 205 Hamilton, K. O.; Yazdanian, M. A.; Audus, K. L. Modulation of P-glycoprotein activity in Calu-3 cells using steroids and beta-ligands. *Int. J. Pharm.*, **2001**, *228*, 171-179.
- 206 Karlson, P.; Donecke, D.; Koolman, J. Kurzlehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 14. neubearbeitete Aufl., *Georg Thieme Verlag, Stuttgart*, **1993**, 1-580.
- 207 Traenkle, C.; Andresen, I.; Lambrecht, G.; Mohr, K. M-2 receptor binding of the selective antagonist AF-DX 384: Possible involvement of the common allosteric site. *Mol. Pharmacol.*, **1998**, *53*, 304-312.
- 208 Dey, S.; Ramachandra, M.; Pastan, I.; Gottesman, M. M.; Ambudkar, S. V. Evidence for two nonidentical drug-interaction sites in the human P-glycoprotein. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 10594-10599.

- 209 Dey, S.; Hafkemeyer, P.; Pastan, I.; Gottesman, M. A single amino acid residue contributes to distinct Mechanisms of Inhibition of the human Multidrug Transporter by stereoisomers of the dopamine receptor antagonist flupentixol. *Biochemistry*, **1999**, *38*, 6630-6639.
- 210 Maki, N.; Hakemeyer, P.; Dey, S. Allosteric modulation of P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 18132-18139.
- 211 Bennet, J.P.; Yamamura, H.I. Neurotransmitter, hormone, or drug receptor binding methods. *Raven Press, New York*, **1985**, 61-89.
- 212 Voigtlander, U.; Jöhren, K.; Mohr, M.; Raasch, A.; Trankle, C.; Buller, S.; Ellis, J.; Holtje, H. D.; Mohr, K. Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: Identification of two amino acids in the muscarinic M-2 receptor that account entirely for the M-2/M-5 subtype selectivities of some structurally diverse allosteric ligands in N-methylscopolamine-occupied receptors. *Mol. Pharmacol.*, **2003**, *64*, 21-31.
- 213 Voigtlander, U.; Raasch, A.; Trankle, C.; Buller, S.; Ellis, J.; Mohr, K. The M-2/M-5 selectivity of caracurine V type allosteric modulators can be attributed to two specific amino acids. *N.-S. Arch. Pharmacol.*, **2003**, *367*, R26.
- 214 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.
- 215 Homolya, L.; Hollo, Z.; Germann, U. A.; Pastan, I.; Gottesman, M. M.; Sarkadi, B. Fluorescent cellular indicators are extruded by the Multidrug-Resistance Protein. *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 21493-21496.
- 216 McAleer, M. A.; Breen, M. A.; White, N. L.; Matthews, N. PABC11 (also known as MOAT-C and MRP5), a member of the ABC family of proteins, has anion transporter activity but does not confer multidrug resistance when overexpressed in human embryonic kidney 293 cells. *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 23541-23548.
- 217 Kimchi-Sarfaty, C.; Gripar, J. J.; Gottesman, M. M. Functional characterization of coding polymorphisms in the human MDR1 gene using a vaccinia virus expression system. *Mol. Pharmacol.*, **2002**, *62*, 1-6.
- 218 Shao, Y. M.; Ayes, S.; Stein, W. D. Mutually co-operative interactions between modulators of P-glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*, **1997**, *1360*, 30-38.
- 219 Boer, R.; Gekeler, V.; Ulrich, W. R.; Zimmermann, P.; Ise, W.; Schodl, A.; Haas, S. Modulation of P-glycoprotein mediated drug accumulation in multidrug resistant CCRF VCR-1000 cells by chemosensitisers. *Eur. J. Cancer*, **1996**, *32A*, 857-861.

- 220 Ecker, G.; Chiba, P.; Hitzler, M.; Schmid, D.; Visser, K.; Cordes, H. P.; Csollej, J.; Seydel, J. K.; Schaper, K. J. Structure-activity relationship studies on benzofuran analogs of propafenone-type modulators of tumor cell multidrug resistance. *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 4767-4774.
- 221 Lee, C. G. L.; Gottesman, M. M. HIV-1 protease inhibitors and the MDR1 multidrug transporter. *J. Clin. Invest.*, **1998**, *101*, 287-288.
- 222 Piwnicaworms, D.; Rao, V. V.; Kronauge, J. F.; Croop, J. M. Characterization of Multidrug-Resistance P-Glycoprotein transport function with an organotechnetium cation. *Biochemistry*, **1995**, *34*, 12210-12220.
- 223 Wang, E. J.; Casciano, C. N.; Clement, R. P.; Johnson, W. W. Active transport of fluorescent P-glycoprotein substrates: evaluation as markers and interaction with inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, **2001**, *289*, 580-585.
- 224 Urbatsch, I. L.; Sankaran, B.; Weber, J.; Senior, A. E. P-Glycoprotein is stably inhibited by vanadate-induced trapping of nucleotide at a single catalytic site. *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 19383-19390.
- 225 Xia, G. Q.; Xiao, G.; Liu, N.; Pimprale, S.; Fox, L.; Patten, C. J.; Crespi, C. L.; Miwa, G.; Gan, L. S. Comparison of species differences of P-glycoproteins in beagle dog, rhesus monkey, and human using ATPase activity assays. *Mol. Pharmacol.*, **2006**, *3*, 78-86.
- 226 Gatlik-Landwojtowicz, E.; Aanismaa, P.; Seelig, A. Quantification and characterization of P-glycoprotein-substrate interactions. *Biochemistry*, **2006**, *45*, 3020-3032.
- 227 Litman, T.; Zeuthen, T.; Skovsgaard, T.; Stein, W. D. Competitive, non-competitive and cooperative interactions between substrates of P-glycoprotein as measured by its ATPase activity. *Biochim. Biophys. Acta*, **1997**, *1361*, 169-176.
- 228 Sievers, J. G. Dissertation (in Arbeit).
- 229 Segel, I. H. Enzyme Kinetics, *John Wiley and Sons*, New York **1976**.

7 Veröffentlichungen

Wissenschaftliche Originalarbeiten

Müller, H.; Kassack, M. U.; Wiese M. Comparison of the usefulness of the MTT-, ATP-, and Calcein Assays to predict the potency of cytostatic agents in various human cancer cell lines. *J. Biomol. Screen.*, **2004**, 9, 506-15.

Müller, H.; Klinkhammer W.; Kassack, M. U.; Eckstein, N.; Wiese M. Novel modulators to overcome P-glycoprotein-mediated drug resistance in tumor cells. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **2004**, 42, 644-645.

Müller, H.; Klinkhammer, W.; Globisch, C.; Kassack, M. U.; Pajeva, I. K.; Wiese, M. New functional assay of P-glycoprotein activity using Hoechst 33342. *Bioorg. Med. Chem.*, **eingereicht**.

Abstrakta / Kongressbeiträge

Müller, H.; Wiese, M.; Kassack, M. U. Entwicklung von homogenen Microplatereader-basierten Assays zur Untersuchung der Hemmwirkung von Zytostatika gegenüber verschiedenen Krebszelllinien. *DPhG-Doktorandentagung*, Düsseldorf, **2003** (Poster).

Müller, H.; Eckstein, N.; Kassack M. U.; Wiese, M. Development of a microplate reader-based Calcein assay to assess the potency of P-glycoprotein modulators. *DPhG-Jahrestagung*, Würzburg, **2003** (Poster).

Müller, H.; Klinkhammer, W.; Schmidt, M.; Hamacher, A.; Eckstein, N.; Kassack, M. U.; Wiese, M. Neuartige Modulatoren zur Überwindung der P-glykoprotein vermittelten Resistenz von Tumoren, *CESAR-APOH Jahrestagung*, Rostock, **2004** (Vortrag).

Müller, H.; Klinkhammer, W.; Kassack M. U.; Eckstein, N.; Wiese, M. Modulators and

Substrates of P-glycoprotein. *DPhG-Jahrestagung*, Regensburg, **2004** (Vortrag).

Klinkhammer, W.; Müller, H.; Sievers, J.; Breitbach, K.; Wiese, M. New Tetrahydroisoquinoline-Derivatives as modulators of P-glycoprotein, *DPhG-Jahrestagung*, Regensburg, **2004** (Poster).

Jacobs, A.; Müller, H.; Klinkhammer, W.; Wiese, M. Characterization of the binding properties of a third-generation modulator of P-glycoprotein, *CESAR-APOH Jahrestagung*, Wien, **2005** (Poster).

Jacobs, A.; Müller, H.; Klinkhammer, W.; Wiese, M. The usefulness of modified Schild and Clark analyses in predicting the binding features of P-glycoprotein inhibitors. *FEBS Special Meeting*, Innsbruck, **2006** (Poster).

Müller, H.; Meyer, J.; Weigt, M.; Schmidt, M.; Tränkle, C.; Wiese, M. Evidence for an allosteric binding site in P-glycoprotein. *FEBS Special Meeting*, Innsbruck, **2006** (Poster).

8 Verfassererklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Bonn, den 4.4.2007

Henrik Müller