

Funktionelle Untersuchungen des ABC- Transporters Breast Cancer Resistance Protein (BCRP)

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Anne-Katrin Pick

aus Bonn

Bonn, Mai 2011

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

Im Rahmen des Graduiertenkollegs 677
„Struktur und molekulare Interaktion als Basis der Arzneimittelwirkung“

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Wiese
2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Jaehde

Tag der Promotion: 31.10.2011

Erscheinungsjahr: 2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	13
1.1	ATP-Binding-Cassette Transportproteine: Aufbau und physiologische Bedeutung.....	13
1.2	Multidrug Resistenz (MDR)	16
1.3	P-Glykoprotein.....	19
1.3.1	Aufbau.....	19
1.3.2	Substrate und Modulatoren	20
1.3.3	Bindungsstellen von P-gp	24
1.4	MRP1	26
1.4.1	Aufbau von MRP1	26
1.4.2	Substrate und Modulatoren von MRP1	27
1.5	BCRP	29
1.5.1	ABC-Transporter der Subfamilie G	29
1.5.2	Aufbau von BCRP	30
1.5.3	Gewebeverteilung und physiologische Funktion	34
1.5.4	Substrate und Modulatoren von BCRP	36
1.5.5	Funktionsweise und Transportzyklus von BCRP.....	43
1.5.6	Bindungsstellen von BCRP	45
1.6	Tyrosinkinasen als therapeutisches Target	48
2	Zielsetzung der Arbeit	54
3	Material und Methoden	56
3.1	Zellkultur.....	56
3.2	Inkulturnahme von Zellen	57
3.3	Kryokonservierung von Zellen.....	57
3.4	Behandlung der Zellen mit Zytostatika	58
3.5	Zelllinien	58
3.5.1	MCF-7 Wildtyp und MCF-7 MX	58
3.5.2	MDCK II (Madin-Darby Canine Kidney) Wildtyp und MDCK II BCRP .	59
3.5.3	A2780 Wildtyp und A2780 Adr	59
3.5.4	MDCK Wildtyp und MDCK MDR1	60

Inhaltsverzeichnis

3.5.5	2008 Wildtyp und 2008 MRP1	60
3.5.6	Cal-27 Zelllinie	60
3.6	Materialien für das Arbeiten mit Zellen	61
3.7	Chemikalien	62
3.8	Geräte	64
3.9	Pufferlösungen	65
3.9.1	Phosphatgepufferte-Kochsalzlösung pH 7,4 (PBS).....	65
3.9.2	Krebs-HEPES-Puffer pH 7,4 (KHP)	65
3.10	Bestimmung der Zellzahl mittels Casy Modell TT.....	66
3.11	ATP-Assay	68
3.11.1	Grundlagen zum ATP-Assay.....	68
3.11.2	Durchführung	69
3.11.3	Datenanalyse	70
3.12	Hoechst 33342-Assay	71
3.12.1	Grundlagen zum Hoechst 33342-Assay.....	71
3.12.2	Durchführung	72
3.12.3	Datenanalyse	74
3.12.4	Kombinationsassay mit zwei Modulatoren	75
3.13	Calcein AM-Assay	76
3.13.1	Grundlagen	76
3.13.2	Durchführung	77
3.13.3	Calcein-Cobalt-Assay zur Untersuchung von MRP1	78
3.13.4	Datenanalyse	79
3.14	Erweiterung des Calcein AM-Assays: Calcein-Toxizitätsassay zur Bestimmung der Zellvitalität von MDCK BCRP Zellen	79
3.14.1	Grundlagen	79
3.14.2	Durchführung	80
3.15	Pheophorbid A-Assay.....	82
3.15.1	Grundlagen	82
3.15.2	Funktionsweise eines Durchflusszytometers.....	83
3.15.3	Durchführung	85
3.15.4	Vorbereitung der Zellen für die Expressionsanalyse mit Tyrosin- kinaseinhibitoren (TKI).....	86
3.15.5	Datenanalyse	88

3.16	Markierung der Zellen mit Antikörpern	89
3.16.1	Markierung von BCRP mit dem Antikörper 5D3.....	89
3.16.2	Antikörper-basierte Markierung des Endothelin Growth Factor Receptor (EGFR).....	90
3.16.3	Antikörper-basierte Markierung von BCRP in mit TKI behandelten MDCK BCRP Zellen	90
3.16.4	Markierung von P-gp mit dem Antikörper MRK-16.....	91
3.17	Fluoreszenzmikroskopie.....	92
3.17.1	Grundlagen	92
3.17.2	Vorbereiten und Präparieren von MDCK BCRP Zellen mit dem Antikörper BXP-21 für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung.	93
3.18	Allgemeine Methoden der Datenanalyse.....	95
3.18.1	Analyse von Konzentrations-Effektkurven: 4-Parameter-logistische- Gleichung	95
3.18.2	Statistische Kennzahlen.....	95
3.18.3	Statistischer <i>F</i> -Test	96
3.18.4	Normalisierung der Daten	97
4	Ergebnisse und Diskussion	99
4.1	Charakterisierung der Zelllinien mittels Antikörperlabelling	99
4.2	Optimierung des Hoechst 33342-Assays	102
4.2.1	Etablierung des Hoechst 33342-Assays an BCRP exprimierenden Zellen und Bestimmung der optimalen Hoechst 33342 Konzentration	102
4.2.2	Einfluss der Mikrotiterplatten auf die Ausgangsfluoreszenz	111
4.3	Funktionelle Charakterisierung von BCRP in MCF-7 MX Zellen mittels Hoechst 33342-Assay	115
4.4	Untersuchung von WK-Verbindungen mittels Hoechst 33342-Assay in MCF-7 MX Zellen	119
4.4.1	Allgemeiner Aufbau der WK-Verbindungen	120
4.4.2	Biologische Aktivität an BCRP und P-gp.....	120
4.4.3	Free-Wilson Analyse ausgewählter WK-Verbindungen.....	124
4.4.4	3D-QSAR Untersuchungen der WK-Modulatoren	132
4.4.5	Zusammenfassung der Struktur-Wirkungsbeziehungen	148
4.5	Vergleich der Zelllinien MCF-7 MX und MDCK BCRP	150

4.6	Der Pheophorbid A-Assay – Entwicklung und Anwendung	155
4.6.1	Etablierung eines HTS-fähigen Pheophorbid A-Assays in BCRP exprimierenden MCF-7 MX Zellen.....	155
4.6.2	Erweiterte Anwendung des Pheophorbid A-Assays bei MDCK BCRP Zellen.....	161
4.7	Funktionelle Untersuchung ausgewählter WK-Verbindungen vom Harnstoff-Typ	164
4.7.1	Biologische Aktivität an den ABC-Transportern BCRP, P-gp und MRP1	165
4.7.2	Struktur-Wirkungsbeziehungen.....	168
4.8	Funktionelle Untersuchung von WK-Verbindungen mit Hydroxyphenyl- amid-Partialstruktur	173
4.8.1	Struktureller Aufbau der Verbindungen	173
4.8.2	Biologische Aktivität an BCRP, P-gp und MRP1	175
4.8.3	Bestimmung der Zelltoxizität mittels ATP-Assay	179
4.9	Charakterisierung des Bindungsverhaltens ausgewählter WK-X- Modulatoren mit BCRP.....	182
4.9.1	Theoretischer Hintergrund	182
4.9.2	Enzymkinetischer Auswertungsansatz zur Bestimmung des Interaktionstyps im Hoechst 33342- und im Pheophorbid A-Assay ...	185
4.9.3	Kombinationsexperimente zur Charakterisierung des allosterischen Bindungsverhaltens von Imatinib.....	194
4.10	Interaktion von Tyrosinkinaseinhibitoren mit BCRP.....	198
4.10.1	Bestimmung der Aktivitätswerte ausgewählter TKI an BCRP, P-gp und MRP1	199
4.10.2	Nachweis von EGFR in den verwendeten Zelllinien mittels spezifischem Antikörper	201
4.10.3	Sensitivierungsexperimente mittels Calcein-Toxizitätsassay	203
4.10.4	Beeinflussung des Expressionsstatus von BCRP durch Tyrosinkinase- inhibitoren.....	207
4.10.5	Untersuchung der Expressionsabnahme von BCRP auf funktioneller Ebene mittels Pheophorbid A-Assay	222

4.10.6	Enzymkinetischer Auswertungsansatz zur Bestimmung des Interaktionstyps der TKI im Hoechst 33342- und im Pheophorbid A-Assay.....	226
4.11	Modell über mögliche Bindungsstellen von BCRP	229
5	Zusammenfassung	234
6	Literaturverzeichnis	258
7	Veröffentlichungen	259
8	Verfassererklärung	261

1 Einleitung

1.1 ATP-Binding-Cassette Transportproteine: Aufbau und physiologische Bedeutung

Die Superfamilie der **ATP-Binding-Cassette** (ABC)-Transporter stellt eine der größten Proteinfamilien dar, die sowohl in Eukaryonten als auch in Prokaryonten vorkommt.¹ Während unter den Prokaryonten sowohl Influx- als auch Effluxtransporter zu finden sind, handelt es sich bei den Eukaryonten meist um membranständige Effluxpumpen, die die bei der Hydrolyse von **Adenosintriphosphat** (ATP) zu Adenosinphosphat (ADP) und Phosphat (P_i) freiwerdende Energie nutzen, um eine Vielzahl strukturell unterschiedlicher Substanzen aus dem Zellinneren in den Extrazellulärraum zu transportieren.² Bis heute sind 48 humane ABC-Transportproteine bekannt, die in sieben unterschiedliche Subfamilien untergliedert sind und alphabetisch nummeriert werden (ABCA bis ABCG). Tabelle 1.1 zeigt die Einteilung der Transporter in die sieben Subfamilien, die sich nach Ähnlichkeiten in der Genstruktur und der Sequenzhomologie der **Nukleotidbindungsdomänen** (NBD) richtet.^{3,4}

Tabelle 1.1: ABC-Transportfamilie und Gen-Nomenklatur der einzelnen Transportproteine einer Subfamilie.

	Subfamilie	Gen-Nomenklatur
ABC	ABCA	ABCA1 bis ABCA10 ABCA12+ABCA13
	ABCB	ABCB1 bis ABCB11
	ABCC	ABCC1 bis ABCC12
	ABCD	ABCD1 bis ABCD4
	ABCE	ABCE1
	ABCF	ABCF1 bis ABCF3
	ABCG	ABCG1+ABCG2 ABCG4+ABCG5+ABCG8

Der allgemeine Aufbau eines ABC-Transportproteins umfasst zwei homologe Hälften, die jeweils eine **transmembranäre Domäne** (TMD) mit meist je sechs α -Helices und eine **Nukleotidbindungsdomäne** (NBD) enthalten. Einige ABC-Transporter stellen sog. Halbtransporter dar, die sich zunächst zu einem Dimer

zusammenlagern müssen, um eine funktionsfähige Einheit zu bilden. Innerhalb der TMD, die am wenigsten konserviert sind, befindet sich die Substratbindungsstelle der Transporter. Die NBD stellt ein wesentliches Charakteristikum der ABC-Transporter dar, da sie durch ATP-Bindung und Hydrolyse den Transport der Verbindungen gewährleistet. Die NBD ist im Zytoplasma lokalisiert und beinhaltet verschiedene charakteristische, hoch konservierte Motive. Die bedeutendsten Motive sind das Walker A und das Walker B Motiv, die so genannte ABC-Signatur (C-Schleife) und die Q-Schleife. Abb. 1.1 zeigt das Modell einer Nukleotidbindungsstelle der ABC-Transportfamilie.

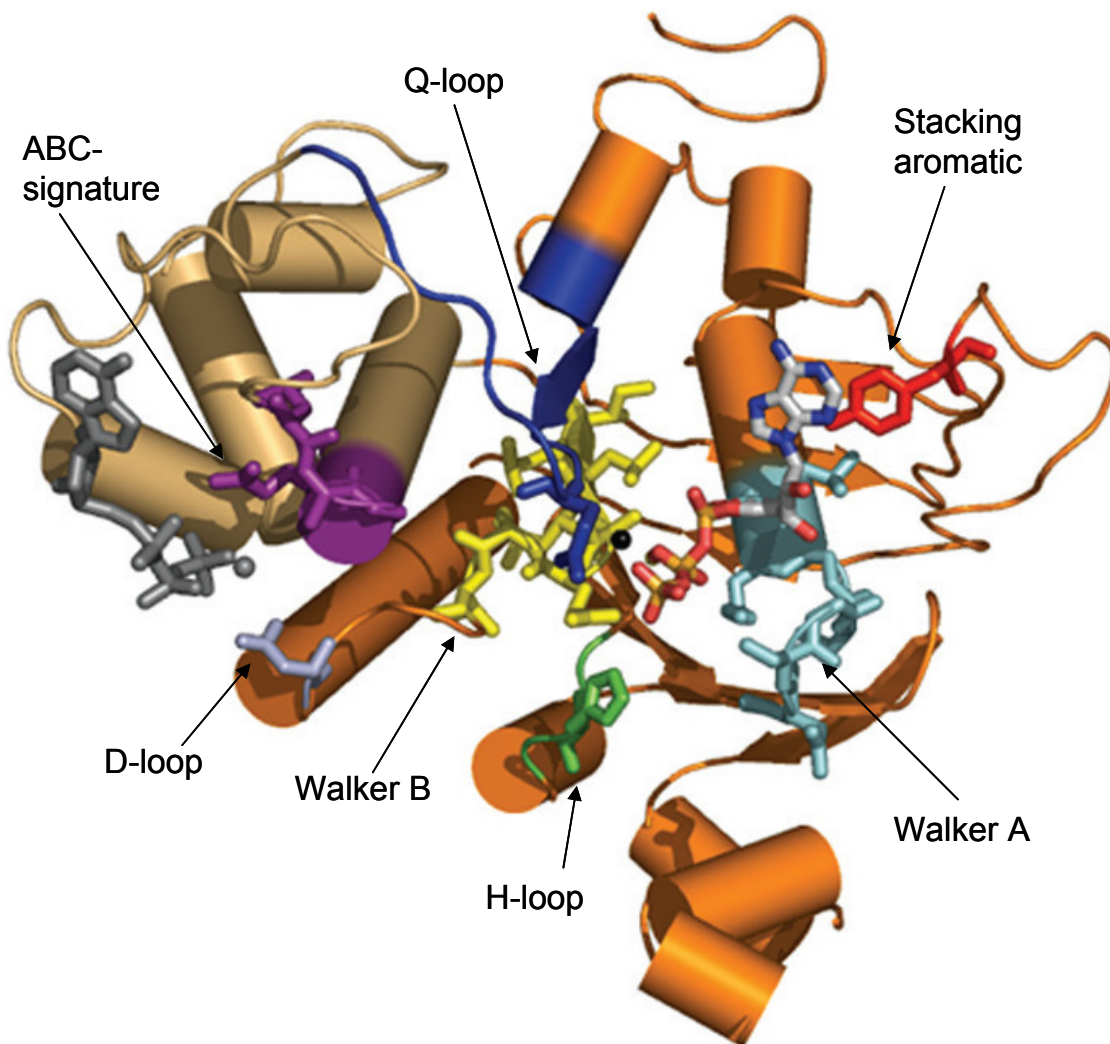


Abb. 1.1: Modell einer Nukleotidbindungsstelle der ABC-Transportfamilie.⁵

Walker A und Walker B Motive sind entscheidend für die Bindung der Phosphatgruppen des ATP und kommen auch in anderen ATP-bindenden Proteinen vor. Die ABC-Signatur (C-Schleife) ist dagegen für alle ABC-Transporter

charakteristisch. Auch die sog. Stacking aromatic site und die H-Schleife (His-loop) sind an der Bindung des ATP beteiligt. Die Q-Schleife (Q-loop) bildet Wasserstoffbrücken aus und soll über ein Wassermolekül das γ -Phosphat des ATP binden. Die Flexibilität der Q-Schleife besitzt eine bedeutende Funktion bei der Kopplung von ATP-Hydrolyse und Transport. Sie dient als Bindeglied zwischen der Ligandbindungsstelle innerhalb der TMD und der ATP-Bindungsstelle innerhalb der NBD und gewährleistet die Signaltransduktion bzw. den Energieaustausch zwischen den beiden Domänen.^{3,5}

ABC-Transporter werden vor allem in Geweben exprimiert, die wichtige pharmakologische Barriere-Funktionen besitzen. Dazu gehören Darm, Leber, Niere, Plazenta und Blut-Hirn-Schranke. Aufgrund der Gewebeverteilung und der funktionalen Eigenschaften wird den Transportern eine Schlüsselfunktion bei der Abwehr potentiell toxischer endogener sowie exogener Verbindungen, ähnlich des körpereigenen Immunsystems, zugesprochen.⁶ Dabei wird sowohl die Absorption der Stoffe im Darm verringert als auch die Ausscheidung über die Leber oder die Niere beschleunigt. Auch das Eindringen schädigender Substanzen in empfindliche Gewebe wie das Gehirn wird durch die Expression einiger Transporter in der Blut-Hirn-Schranke limitiert.

Auch die Pharmakokinetik von Arzneimitteln (ADME = Absorption, Distribution, Metabolisierung, Elimination) kann in beachtlichem Maße von Mitgliedern der ABC-Superfamilie beeinflusst werden und somit die Bioverfügbarkeit der Arzneimittel entscheidend verändern. So kann es bei der gleichzeitigen Einnahme mehrerer Wirkstoffe zu klinisch relevanten Interaktionen kommen, wenn einer oder mehrere der Substanzen mit den ABC-Proteinen interagieren. Das Ausmaß der Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffs wird unter anderem dadurch bestimmt, in welchem Maße er durch Aufnahmetransporter aus dem Darmlumen aufgenommen und durch Effluxtransporter aus den Enterozyten ins Darmlumen sezerniert wird. Eine Aktivierung von Effluxtransportern verringert demnach die Bioverfügbarkeit des Arzneistoffs, während eine Hemmung der Effluxtransporter die Bioverfügbarkeit des Arzneistoffs erhöht. Bedeutend werden diese Interaktionen vor allem dann, wenn Arzneimittel mit geringer therapeutischer Breite eingesetzt werden. Das Herzglykosid Digoxin beispielsweise unterliegt nur in unwesentlichem Maße einer Metabolisierung, ist aber als hoch affines Substrat für P-Glykoprotein (P-gp), ein Mitglied der ABCB Subfamilie, beschrieben. In klinischen Interaktionsstudien konnte gezeigt werden,

dass bei einer gleichzeitigen einmaligen oralen Gabe von dem Antibiotikum Clarithromycin, welches die Transportaktivität von P-gp hemmt, sowohl die maximalen Serumspiegel als auch die bioverfügbare Fraktion von Digoxin um etwa das Doppelte ansteigen.⁷ Umgekehrt wurden durch die gleichzeitige Gabe von Rifampicin, einem potenten Induktor von ABC-Proteinen, mit Digoxin dessen AUC-Werte sowie maximale Plasmaspiegel auf ungefähr die Hälfte reduziert.⁸

Als essentielle Bestandteile der Blut-Hirn-Schranke können ABC-Transporter die Penetration von Arzneistoffen in das Gehirn limitieren. Das Opioid-Derivat Loperamid, ein Mittel zur Behandlung der Diarrhoe, wird von P-gp als Substrat erkannt und vermag nicht mehr die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, folglich treten keine zentralen Nebenwirkungen auf.⁹ Zu zentralen Nebenwirkungen kommt es jedoch, wenn Modulatoren wie etwa Chinidin, die P-gp inhibieren, in Kombination mit Loperamid eingesetzt werden und so eine Überwindung der Blut-Hirn-Schranke ermöglichen.¹⁰

Daneben wird auch die Steuerung der Zellfunktion von den ABC-Transportern beeinflusst, indem sie diverse endogene Verbindungen wie Phospholipide, Zucker, Aminosäuren, Metallionen, Gallensalze oder Peptide erkennen und in den Extrazellulärraum transportieren. Ihre Bedeutung für den Organismus wird auch dadurch deutlich, dass die Pathogenese vieler Erbkrankheiten auf Mutationen in ABC-Transportern zurückzuführen ist. Von den 48 bekannten humanen Transportergenen konnten bisher 17 mit der Entstehung von Erbkrankheiten in Verbindung gebracht werden. Einige dieser humanen Erbkrankheiten sowie deren korrespondierenden ABC-Gene sind z.B. Tangier Krankheit (ABCA1), Stargardt Krankheit (ABCA4), Dubin-Johnson Syndrom (ABCC2), Pseudoxanthoma elasticum (ABCC6) und Cystische Fibrose (ABCC7/CFTR).^{11,3,12,13}

1.2 Multidrug Resistenz (MDR)

Trotz jahrzehntelanger Forschung, die darauf abzielt, Krebserkrankungen frühzeitig zu erkennen und effizient zu behandeln, sind Schätzungen zufolge lediglich 65% der Krebspatienten 5 Jahre nach Diagnose noch am Leben. Allein in den USA macht das mehr als eine halbe Millionen krebsbedingte Todesfälle pro Jahr aus.¹⁴ Die Mehrheit dieser Todesfälle geht auf die Entwicklung von Resistenzen der Krebszellen

gegenüber den eingesetzten Chemotherapeutika zurück. Die Entwicklung der **Multidrug Resistenz (MDR)** stellt eines der bedeutendsten Probleme bei der Behandlung von Tumoren mit Chemotherapeutika dar. Dabei richtet sich die Resistenz der Krebszellen gegen eine Vielzahl strukturell völlig verschiedener Zytostatika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen. Die Expression unterschiedlicher ABC-Transporter trägt wesentlich zu einer Verringerung der intrazellulären Zytostatikakonzentration und somit zu einem Versagen der Chemotherapie bei.¹⁵ Von den bis heute bekannten 48 humanen ABC-Transportern spielen die drei Transporter **P-Glykoprotein (P-gp, ABCB1)**, **Multidrug Resistance associated Protein 1 (MRP1, ABCC1)** und das **Breast Cancer Resistance Protein (BCRP, ABCG2)** eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der MDR.¹⁶

In der Forschung werden unterschiedliche Ansätze verfolgt, um die Entstehung einer Transporter-basierten MDR zu bekämpfen. In Abb. 1.2 sind drei mögliche Alternativen aufgeführt.¹⁷ Ein direkter, relativ später Ansatz auf Ebene der Zelloberfläche ist die Blockade der Transportproteine mit spezifischen, hoch affinen Modulatoren. Diese Art der Inhibition steht nach wie vor im Fokus der Wissenschaft, denn die meisten Substanzen, die bis heute entwickelt wurden, stellen direkte Hemmstoffe der ABC-Transporter dar. Aber auch alternative Strategien zur Umgehung der MDR rücken mehr und mehr in den Vordergrund.

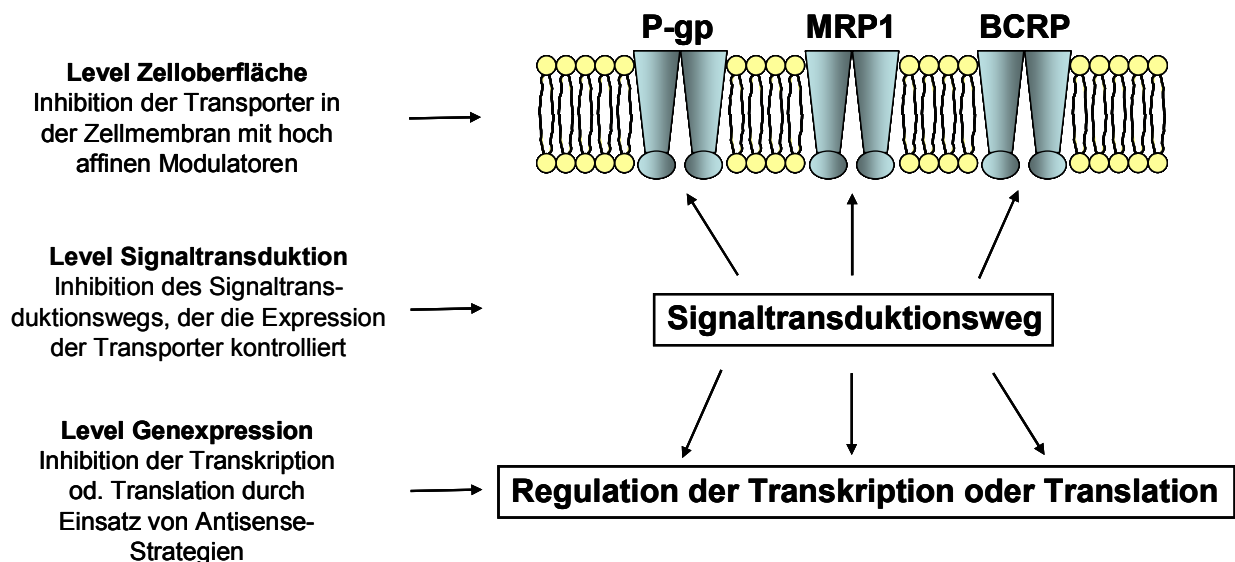


Abb. 1.2 Mögliche Strategien, um die ABC-Transporter vermittelte MDR zu umgehen (modifiziert nach Shukla et al.¹⁷).

Schon in den frühen neunziger Jahren fand man heraus, dass die Blockade bestimmter Signaltransduktionswege, die die Genregulation von P-gp beeinflussen, zu einer verminderten P-gp Expression führt. Studien haben gezeigt, dass Verbindungen wie Ecteinascidin 743, das natürlich vorkommende Flavon Sinensetin und auch Polyphenole zu einer erhöhten Aktivität von Chemotherapeutika führen, indem sie Einfluss auf bestimmte Signalkaskaden nehmen und so die P-gp Expression herunter regulieren.^{18,19,20} Auch von der Arbeitsgruppe um Ross et al. konnte demonstriert werden, dass der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib über die Inhibition des PI3K/Akt-Signaltransduktionsweges (**Phosphatidylinositol-3-Kinase**) die Expression von ABCG2 vermindert.²¹

Auch der Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden, Ribozymen oder auch small interfering RNA (siRNA) resultiert in einer Verringerung der Genprodukte (Gen-Knockdown) und hemmt die Expression der Transporter auf dem Level der Translation. Antisense-Oligonukleotide sind komplementär zur Ziel mRNA, hybridisieren mit dieser und verhindern so die Translation des Transportproteins. Auch Ribozyme, kleine RNA Moleküle, hybridisieren mit der mRNA zu Doppelsträngen und katalysieren deren Abbau.^{22,23,24} Obwohl Studien den Einsatz von Oligonukleotiden und Ribozymen erfolgreich demonstrieren, konnten die Versuche bislang nur in *in vitro* Modellen durchgeführt werden. Faktoren wie Spezifität der Oligonukleotide für die Ziel mRNA, die Empfindlichkeit gegenüber körpereigenen Nukleasen und die zelluläre Aufnahme mit Hilfe geeigneter Vektoren limitieren den Einsatz *in vivo*.²⁵

Die Erkenntnisse und Erfahrungen aus präklinischen und klinischen Studien haben gezeigt, dass die Entwicklung der MDR ein komplexer Vorgang ist, der aus einem Zusammenspiel multipler Ereignisse bei der Behandlung von Patienten mit Chemotherapeutika resultiert. Der effektivste Weg zur Bekämpfung der MDR bei Krebspatienten könnte aus einer Hemmung der Schlüssel-Signaltransduktionskaskaden bei gleichzeitiger Inhibition der entsprechenden Transportproteine mit hoch potenten Modulatoren bestehen.

Im Folgenden sollen die drei ABC-Transporter P-gp, MRP1 und BCRP, die hauptsächlich an der Entwicklung der MDR beteiligt sein sollen, näher vorgestellt werden.

1.3 P-Glykoprotein

1.3.1 Aufbau

P-gp, auch MDR1 (**M**ultidrug **R**esistance **P**rotein 1) oder ABCB1, ist wahrscheinlich der am besten untersuchte und charakterisierte ABC-Transporter. Entdeckt wurde P-gp 1976 von Juliano und Ling in einer Zelllinie aus chinesischen Hamsteroovarien, die resistent gegenüber Colchicin gezüchtet wurden.²⁶ Das "P" steht für "Permeability" – nach Juliano und Ling wurde die herabgesetzte Permeabilität der Plasmamembran gegenüber zytotoxischen Substanzen durch P-gp verursacht. P-gp besteht aus 1280 Aminosäuren und weist in der glykosilierten Form ein Molekulargewicht von ca. 170 kDa auf.^{27,28}

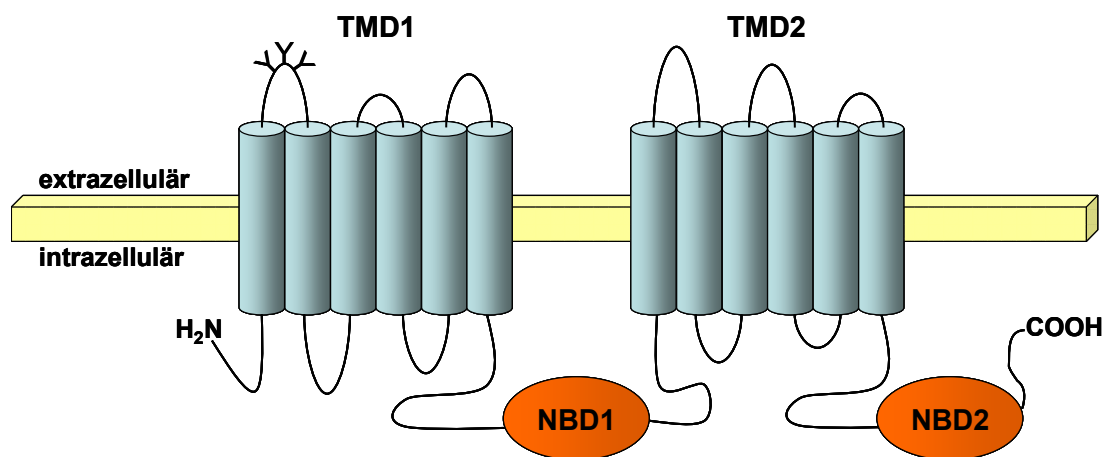


Abb. 1.3: Topologiemodell von ABCB1.

Abb. 1.3 zeigt eine schematische Darstellung der Topologie von ABCB1. Die beiden aus sechs transmembranären α -Helices und je einer Nukleotidbindungsdomäne bestehenden Hälften beinhalten jeweils 590 Aminosäuren, die über eine Linkerregion aus 60 Aminosäuren miteinander verknüpft sind. Sowohl das N- als auch das C-terminale Ende sind auf der Innenseite der Zytoplasmamembran lokalisiert. Zwischen TM1 und TM2 befinden sich drei Asparaginsäuren, an denen das Protein N-glykosiliert ist. In Mutationsstudien konnte nachgewiesen werden, dass die Glykosilierung keinen Einfluss auf die Funktion des Proteins hat, sondern vielmehr für eine Verankerung des Transporters in der Plasmamembran sorgt.²⁷

Natürlicherweise kommt P-gp in verschiedenen Zellen mit Eliminationsfunktion, u.a. in den Epithelzellen des Darms, den Epithelzellen des proximalen Tubulus der Niere, den Canaliculi der Leber, den Syncytiotrophoblasten der Plazenta und den Epithelien der Blut-Hirn-Schranke vor. Wie schon erwähnt, wird aufgrund der Gewebeverteilung angenommen, dass die physiologische Funktion von P-gp hauptsächlich in einem körpereigenen Schutzmechanismus gegenüber Xenobiotika liegt.

1.3.2 Substrate und Modulatoren

P-gp ist in der Lage, eine bemerkenswerte Vielzahl von Verbindungen, die aus den unterschiedlichsten Strukturklassen stammen, zu erkennen und zu transportieren. Dabei wird in der Literatur meist zwischen Substraten und Modulatoren unterschieden. Als Substrate werden Verbindungen (oft Zytostatika) bezeichnet, die von P-gp aktiv transportiert werden. Modulatoren sind in der Lage, die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber den Zytostatika wiederherzustellen, indem sie die Transportfunktion hemmen ohne dabei selbst zytotoxisch zu sein. Daher werden Modulatoren oft auch als Chemosensitizer bezeichnet. Alternativ kann die Einteilung in Substrate und Modulatoren auch über die Diffusionsgeschwindigkeit, mit der die Substanzen die Zellmembran überwinden, erfolgen. Substrate zeichnen sich dadurch aus, dass sie langsam durch die Membran diffundieren und daher effektiv transportiert werden. Modulatoren hingegen weisen eine hohe Diffusionsgeschwindigkeit auf. Dies führt dazu, dass die Transportfunktion durch den Modulator rasch "abgesättigt" wird, so dass das Substrat ungehindert die Zellmembran passieren kann.²⁹

Tabelle 1.2 zeigt eine Auswahl an Substraten, die von P-gp transportiert werden. Dazu gehören neben den Zytostatika auch Fluoreszenzfarbstoffe und diverse Arzneimittel. Auffallend ist die breite Substratspezifität von ABCB1, strukturelle Gemeinsamkeiten der transportierten Verbindungen lassen sich kaum ausmachen. Allgemein handelt es sich bei den Verbindungen um organische Moleküle mit einem Molekulargewicht zwischen 400 Da und 1900 Da.²⁷ Es werden sowohl aromatische als auch nicht-aromatische, sowie Verbindungen mit basischen oder neutralen Eigenschaften transportiert. Allen Strukturen gemeinsam ist jedoch ein

amphiphatischer Charakter, der im Zusammenhang mit dem Transportzyklus der ABC-Transportproteine eine wichtige Rolle spielt (s. Kapitel 1.5.5).⁶

Tabelle 1.2: Auswahl klinisch relevanter Substrate von ABCB1, nach Shukla et al.¹⁷ und Sharom.³⁰

Substanzklasse	Vertreter
Analgetika	Methadon Morphin
Antibiotika	Erythromycin Gramicidin D
Antidiarrhoika	Loperamid
Antiemetika	Domperidon Ondansedron
Fluoreszenzfarbstoffe	BCECF-AM Calcein-AM Hoechst 33258, Hoechst 33342 Rhodamin 123
H ₂ -Rezeptorantagonisten	Cimetidin
Herzglykoside	Digoxin
HIV-Proteaseinhibitoren	Nelfinavir Ritonavir Saquinavir
Isektizide	Abamectin Ivermectin
Zytostatika	
Anthrazykline	Daunorubicin Doxorubicin Epirubicin
Camptothecine	Irinotecan Topotecan
Colchicumalkaloide	Colchicin
Epipodophyllotoxine	Etoposid Teniposid
Taxane	Docetaxel Paclitaxel
<i>Vinca</i> Alkaloide	Vinblastin Vincristin Vindesin
Verschiedene	Actinomycin D Mitomycin Gramicidin

Der Calciumkanalblocker Verapamil wurde 1981 von Tsuruo et al. als der erste MDR-Modulator entdeckt. Verapamil war in der Lage, das Phänomen der Multidrug Resistenz *in vitro* bei verschiedenen Krebszelllinien aufzuheben.³¹ Daraufhin sind in den achtziger Jahren eine große Bandbreite an Substanzen identifiziert worden, die

in der Lage sind, P-gp zu inhibieren. Diese so genannte "Erste Generation" von MDR-Modulatoren umfasst Wirkstoffe, die bereits zur Behandlung unterschiedlicher Krankheitsbilder zugelassen waren und deren Indikation ursprünglich nicht die Therapie maligner Tumore beinhaltete.^{32,17} Neben den Calciumkanalblockern wie Verapamil, Nifedipin oder Diltiazem gehören zu den Modulatoren der ersten Generation u.a. auch das Immunsuppressivum Cyclosporin A, das Antimalariamittel Chinin und das Antiarrhythmikum Chinidin (s. Tabelle 1.3).

Tabelle 1.3: Zusammenstellung von P-gp Modulatoren nach Shukla et al.¹⁷ und Sharom.³⁰

Substanzklasse	Vertreter
1. Generation	Amiodaron
	Chinidin/Chinin
	Cyclosporin A
	Diltiazem
	Nifedipin
	Verapamil
2. Generation	Dexniguldipin
	Dexverapamil
	trans-Flupentixol
	PSC 833 (Valspodar)
3. Generation	GF120918 (Elacridar)
	LY335979 (Zosusquidar)
	R101933 (Laniquidar)
	VX-710 (Biricodar)
	XR9576 (Tariquidar)

Bei diesen Wirkstoffen gestaltete es sich als problematisch, dass sie aufgrund ihrer geringen Affinität zu P-gp in sehr hohen Dosen eingesetzt werden mussten, was zu einer nicht akzeptablen pharmakologischen Eigenwirkung und somit zu einer erhöhten Toxizität führte. Aufgrund dieser toxischen Nebenwirkungen wurden die Modulatoren der zweiten Generation entwickelt, die sich von denen der ersten Generation ableiten. Dazu gehören Dexverapamil, Dexniguldipin, trans-Flupentixol und Valspodar (PSC 833) (s. Tabelle 1.3). Diese Wirkstoffe weisen eine hohe

Affinität zu P-gp und eine verringerte Toxizität gegenüber ihren Vorgängern auf.¹⁵ Trotz guter Ergebnisse als MDR-Modulatoren wurden die klinischen Prüfungen bei vielen dieser Substanzen eingestellt. Das R-Enantiomer von Verapamil, Dexverapamil, besaß z.B. trotz 200fach niedriger Affinität zu Calciumkanälen und einer mit dem Racemat vergleichbaren Hemmwirkung an P-gp noch immer eine zu hohe Toxizität, um den klinischen Anforderungen zu genügen.³³ Ein weiterer intensiv untersuchter Modulator dieser Generation ist Valspodar (PSC 833), ein Derivat von Cyclosporin A mit geringen immunsuppressiven Eigenschaften und einer 10fach höheren Affinität zu P-gp.³⁴ Valspodar wurde in verschiedenen klinischen Prüfungen (bis Phase III) in Kombination mit diversen Zytostatika getestet.³⁵ Limitierend für den Einsatz von Valspodar als MDR-Modulator ist seine Eigenschaft Cytochrom P450 3A4 zu inhibieren und damit den Metabolismus von z.B. Paclitaxel und Vinblastin zu beeinflussen. Dies führte zu einer veränderten Pharmakokinetik der Zytostatika verbunden mit höheren Plasmakonzentrationen, die mit einer nicht tolerierbaren Toxizität für den Patienten einherging.^{36,37}

Modulatoren der dritten Generation zeichnen sich dadurch aus, dass sie gezielt mit dem Zielprotein P-gp interagieren und eine außerordentlich hohe Affinität zu diesem besitzen. Bei den Verbindungen handelt es sich um neuartige Moleküle, die aufgrund von Struktur-Wirkungsbeziehungen und mittels kombinatorischer Chemie konzipiert wurden. Als wichtigste Eigenschaft sollten diese Substanzen neben der MDR modulierenden Eigenschaft sowohl keinerlei Toxizität zeigen als auch die Pharmakokinetik der Zytostatika nicht beeinflussen. In Tabelle 1.3 sind Modulatoren der dritten Generation aufgeführt, die diesen Anforderungen nahe kommen. Einer der erfolgversprechendsten P-gp Modulatoren der dritten Generation ist das von der Firma Xenova entwickelte Anthranilsäure-Derivat Tariquidar (XR9576). Tariquidar ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der Lage P-gp in nanomolaren Konzentrationen zu hemmen.³⁸ Außerdem interagiert Tariquidar nicht mit den Enzymen der Cytochrom P450-Familie und nimmt somit keinen Einfluss auf die Pharmakokinetik von Zytostatika wie beispielsweise Paclitaxel oder Doxorubicin. Ein weiterer viel versprechender Vertreter der dritten Generation ist Elacridar (GF120918). GF120918 ist strukturverwandt mit XR9576 und zeigt ebenfalls eine hohe Affinität zu P-gp.³⁹ Beide Substanzen stellen keine selektiven P-gp Inhibitoren dar, sondern interagieren auch mit dem ABC-Transporter BCRP.^{40,41} Im Gegensatz zu XR9576 und GF120918 besitzt das Difluorocyclopropyldibenzosuberanderivat Zosuquidar (LY335979) nicht

nur eine hohe Affinität zu P-gp sondern auch eine ausgeprägte Selektivität. Andere Transporter wie BCRP oder MRP1 werden durch LY335979 nicht gehemmt. Auch die pharmakokinetischen Eigenschaften der Zytostatika Docetaxel, Paclitaxel oder Etoposid werden durch Zosuquidar nicht beeinflusst.⁴²

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind weit mehr als hundert P-gp Substrate und Modulatoren bekannt, die Anzahl der Substanzen, die mit P-gp interagieren, wird praktisch täglich größer. Trotzdem wurde bislang noch kein Modulator als Arzneimittel zur Behandlung einer MDR im Rahmen einer Tumortherapie mit Zytostatika zugelassen. Diverse Inhibitoren der zweiten und dritten Generation wurden seit 1993 in klinischen Studien in Kombination mit verschiedenen Zytostatika eingesetzt, die Ergebnisse erfüllten die Erwartungen jedoch nicht. In vielen Fällen war die hohe Eigentoxizität der verwendeten Modulatoren, oder aber auch die pharmakokinetische Interaktion mit den eingesetzten Zytostatika Grund für den Abbruch der Studien. Eine Übersicht über die bis 2005 durchgeführten Studien geben Referenzen 17 und 32. Allein für Cyclosporin A und für Chinin ließ sich ein therapeutischer Nutzen bei der Behandlung von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) in klinischen Studien belegen.^{43,44}

1.3.3 Bindungsstellen von P-gp

Die Art und Anzahl der möglichen Substrat-Bindungsstellen von ABCB1 ist bis heute noch nicht geklärt. Zwar herrscht über die Existenz mehrerer Bindungsstellen weitestgehend Einigkeit, die genaue Anzahl und Spezifität für verschiedene Liganden ist jedoch noch Gegenstand der aktuellen Forschung. Shapiro und Ling konnten zeigen, dass die in Abb. 1.4 dargestellten Verbindungen Rhodamin 123 (R-Seite) und Hoechst 33342 (H-Seite) an unterschiedliche Stellen des Proteins binden, die positiv kooperativ miteinander interagieren.⁴⁵ Allerdings wird nur die H-Seite in der Literatur einheitlich als solche bezeichnet. An diese binden Hoechst-Derivate, Quercetin und Colchicin. Liganden der R-Seite sind neben Rhodamin 123 auch Daunorubicin, Doxorubicin und andere Anthrazykline. In einer weiteren Arbeit demonstrierten Shapiro und Ling, dass eine dritte Bindungsstelle existiert, welche Prazosin sowie Progesteron binden kann und allosterische Eigenschaften besitzt.

Die Bindung dieser beiden Stoffe an P-gp soll die Transportaktivität sowohl der R-, als auch der H-Seite stimulieren.⁴⁶

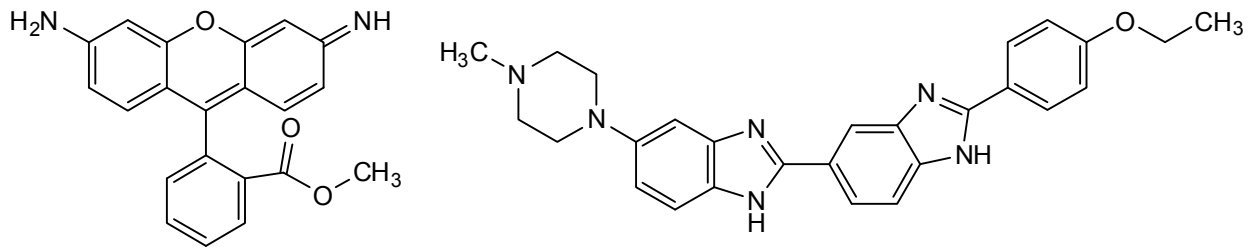


Abb. 1.4: Strukturformeln von Rhodamin 123 (links) und Hoechst 33342 (rechts).

Durch Radioligand-Bindungsexperimente wurde von Martin et al. die Existenz von vier verschiedenen Bindungsstellen postuliert. In Übereinstimmung mit Shapiro und Ling wurde eine der vier als Hoechst-Bindungsstelle identifiziert. Drei weitere Bindungsstellen mit Transportfunktion wurden als Vinblastin-, Paclitaxel- und GF120918-Bindungsstelle bezeichnet. Die Bindungsstelle von Rhodamin 123 konnte nicht identifiziert und zugeordnet werden.⁴⁷ In folgenden Studien wurden insgesamt bis zu sieben unterschiedliche Bindungsstellen postuliert.⁴⁸

Auf der anderen Seite wird die Existenz einer großen Bindungstasche vermutet, die für verschiedene Stoffe überlappende Erkennungsregionen beinhaltet und gleichzeitig zwei oder mehr Moleküle binden kann.^{49,50} Aufgrund der Tatsache, dass sich P-gp durch eine hohe Flexibilität auszeichnet, wird auch vermutet, dass sich die Form der Bindungstasche an das jeweils gebundene Molekül anpassen könnte.^{51,52} Der Ligand ist dabei in der Lage seine eigene Bindungsstelle zu induzieren ("Substrate-induced Fit").

Genauere Erkenntnisse über die Lokalisierung der Bindungsstellen konnte mit Hilfe von Photoaffinitäts-Markierungs- und Mutationsstudien gewonnen werden. Aus den Ergebnissen dieser Studien geht hervor, dass besonders Aminosäuren der TM Helices 5, 6 (TMD1) und 11, 12 (TMD2) an der Bindung von Wirkstoffen beteiligt sind.^{53,54,55}

1.4 MRP1

1.4.1 Aufbau von MRP1

MRP1 (Multidrug Resistance associated Protein 1, ABCC1) gehört zur Subfamilie C der ABC-Transportfamilie. MRP1 wurde im Jahr 1992 von der Arbeitsgruppe Cole et al. entdeckt.⁵⁶ Die Arbeitsgruppe versetzte die kleinzellige Lungenkrebszelllinie H69 über mehre Monate kontinuierlich mit dem Zytostatikum Doxorubicin. Obwohl die erhaltene Zelllinie H69AR kein P-gp exprimiert, wies sie ein ähnliches Resistenzprofil auf. Der für diese Resistenz verantwortliche Transporter wurde MRP1 genannt. Trotz des ähnlichen Resistenzprofils stimmen P-gp und MRP1 in ihrer Aminosäuresequenz nur zu ca. 15-20% überein.^{57,58,59}

ABCC1 besteht aus 1531 Aminosäuren und weist im glykosilierten Zustand ein Molekulargewicht von 190 kDa auf. Die Glykosylierung erfolgt an drei Aminosäuren in Position 19, 23 und 1009.⁶⁰ In Abb. 1.5 ist der schematische Aufbau von MRP1 dargestellt.

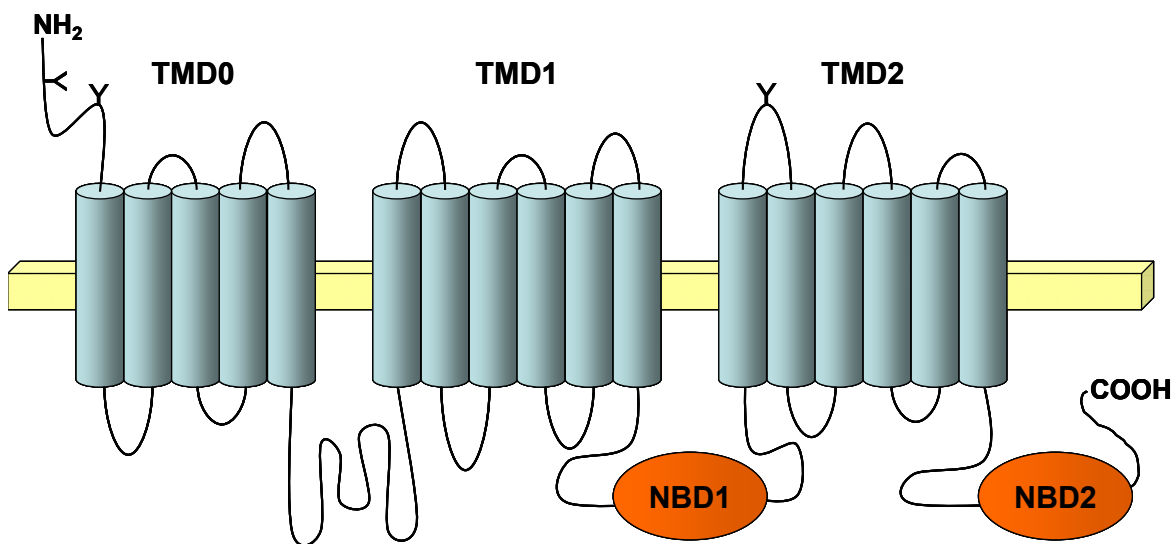


Abb. 1.5: Topologiemodell von ABCC1.

Typisch für einige Vertreter der Subfamilie C ist die Erweiterung des N-terminalen Endes, welches als TMD0 bezeichnet wird.^{61,62,63} Dieses zusätzliche Membransegment besteht aus 5 transmembranären α -Helices, während die beiden anderen

TMD den üblichen Aufbau aus 6 α -Helices und je einer NBD zeigen. Die beiden TMD1 und TMD2 sind in Analogie zu P-gp für die Funktion des Proteins entscheidend, die TMD0 soll hingegen keine Transportfunktion besitzen, sondern dient der Verankerung in der Membran.^{64,65} An die TMD0 schließt sich das N-terminale Ende an, welches auf der extrazellulären Seite lokalisiert ist. Das C-terminale Ende befindet sich intrazellulär. Typisch für die Vertreter der Subfamilie C ist das Fehlen von 13 Aminosäuren zwischen Walker A und Walker B Motiv innerhalb der NBD1^{60,61}, wobei die Rolle dieser Deletion noch nicht bekannt ist. Werden diese fehlenden Aminosäuren durch das entsprechende Stück einer NBD von P-gp ersetzt, führt dies zum Funktionsverlust von MRP1.⁶⁶

Neben der Expression in Tumorzellen, kommt ABCC1 in fast allen Geweben und Organen des menschlichen Körpers vor. Am häufigsten wird MRP1 in der Lunge, den Hoden, der Niere, im Gastrointestinaltrakt, der Blut-Hirn-Schranke sowie in Herz- und Skelettmuskeln exprimiert.^{56,67} Genau wie P-gp wird MRP1 eine physiologische Schutzfunktion des Körpers vor toxischen Fremdstoffen zugesprochen.^{68,69}

1.4.2 Substrate und Modulatoren von MRP1

MRP1 ist in der Lage, eine hohe Anzahl sehr unterschiedlicher endogener und exogener Substanzen zu transportieren. Dazu gehören nicht nur unmodifizierte Xenobiotika, sondern auch deren konjugierte Metabolite. MRP1 transportiert dabei bevorzugt Glukuronid-, Sulfat- und Glutathion-Konjugate mit dem Ziel, die Konzentration potentiell toxischer Metabolite im Organismus möglichst gering zu halten. Einige MRP1 Substrate und ihre Abhängigkeit von Konjugationen sind in Tabelle 1.4 aufgeführt.

17 β -Estradiol, Etoposid oder Bilirubin werden beispielsweise mit Glukuronsäure konjugiert, bevor sie von MRP1 erkannt werden.⁷⁰ Eine besondere Rolle bei dem MRP1 vermittelten Transport einiger Verbindungen kommt Glutathion (GSH) zu. Zum einen werden Substanzen, wie Leukotriene, über die Glutathion-S-Transferase an Glutathion gebunden, bevor sie von ABCC1 aus der Zelle hinausgeschleust werden. Zum anderen erfolgt der Efflux einiger Stoffe ausschließlich über einen Cotransport mit Glutathion. Beispielsweise ist der Transport von *Vinca* Alkaloiden oder Anthrazyklinen, die normalerweise keine MRP1 Substrate darstellen, an Glutathion

gebunden.⁷¹ Des Weiteren ist MRP1 im Gegensatz zu P-gp in der Lage, auch anionische Verbindungen und Schwermetallsalze wie Arsen- oder Antimonoxide zu transportieren.⁷²

Tabelle 1.4: MRP1 Substrate und ihre Konjugate, modifiziert nach Sharom.³⁰

Glukuronid-Konjugate	Bilirubin
	17 β -Estradiol
	Etoposid
GSH-Konjugate	Chlorambucil
	Leukotrien C ₄ , D ₄ , E ₄
	Melphalan
	4-Hydroxynonenal
Sulfat-Konjugate	Estron
	Dehydroepiandrosteron
	Lithocholyltaurin
GSH-abhängig	Aflatoxin
	Anthrazykline (Daunorubicin, Doxorubicin)
	<i>Vinca</i> Alkaloide (Vincristin)
Andere	Folsäure
	Glutathion
	Camptothecine (Topotecan, Irinotecan)
	Epipodophyllotoxine (Etoposid, Teniposid)
	Methotrexat

Bislang wurden nur wenige spezifische MRP1 Inhibitoren beschrieben. Dazu gehören der Leukotrien-Rezeptorantagonist MK571 und der Peptid-Leukotrien-Rezeptorantagonist ONO-1078. Die trizyklischen Isoxazole LY475776 und LY402913 sind in der Lage, den MRP1 vermittelten Transport Glutathion-abhängig zu inhibieren. Daneben existieren weitere unspezifische MPR1 Inhibitoren, die sowohl organische Anionentransporter (z.B. Probenicid, Indometacin) als auch ABC-Transporter wie P-gp oder BCRP hemmen. In einer Studie von Minderman et al. konnte gezeigt werden, dass die Verbindung VX-710 (Biricodar) in der Lage ist, die drei ABC-Transporter P-gp, MRP1 und BCRP gleichermaßen zu inhibieren.⁷³

1.5 BCRP

1.5.1 ABC-Transporter der Subfamilie G

Die ABCG Familie besteht aus den sechs Mitgliedern ABCG1 bis ABCG5 und ABCG8 (s. Tabelle 1.5).³ Alle Mitglieder sind Halbtransporter bestehend aus einer ATP-Bindungsstelle und einer transmembranären Domäne mit sechs α -Helices.³ Im Gegensatz zu den anderen ABC-Transportern besitzen die Vertreter der G-Familie eine umgekehrte Struktur mit der NBD am N-terminalen Ende und der TMD am C-terminalen Ende der Aminosäurekette (s. Abb. 1.6). Um ihre volle Funktionsfähigkeit zu erlangen, müssen sie dimerisieren.^{74,75}

Tabelle 1.5: Mitglieder der ABCG Subfamilie, modifiziert nach Kusuhara et al.⁸³ und Dean et al.³

Gen	Synonym	Genlokus	Vorkommen	Substrate
ABCG1	ABC8, White	21q22.3	Ubiquitär	Cholesterol, Tryptophan
ABCG2	BCRP, MXR, ABCP	4q22	Ubiquitär	Endogene u. exogene Toxine
ABCG3		8p12	Thymus, Milz	?
ABCG4	White2	11q23	Leber	Cholesterol
ABCG5	White3	2p21	Leber, Darm	Cholsterol, Phytosterole
ABCG8		2p21	Laber, Darm	Cholsterol, Phytosterole

Die Mitglieder der Subfamilie G sind Säugetierhomologe der *Drosophila* Gene weiß, braun und scarlet. Diese Gene codieren für Proteine, deren Zusammenspiel eine wichtige Rolle in der Pigmentierung des Auges von *Drosophila melanogaster* (Schwarzbäuchige Taufliege) spielen. Durch Heterodimerisierung des weiß-braunen Proteins entsteht ein Importer, durch den Guanin (Vorstufe der Pteridin-Biosynthese) in das Innere des Insektenauges gelangt und für die rote Färbung des Auges verantwortlich ist. Durch das weiß-scarlet Heterodimer wird Tryptophan ins Auginnere transportiert, welches über die Ommochrom-Biosynthese zur braunen Pigmentierung beiträgt.^{76,77,78} Das humane ABCG1 Gen besitzt eine 34%ige Homologie mit dem Sehpigmenttransporter von *Drosophila melanogaster*.^{76,79} ABCG1 transportiert beim Menschen Cholesterol und Tryptophan und konnte im

Gehirn, der Plazenta, der Milz und der Lunge nachgewiesen werden. Es wird eine Rolle von ABCG1 bei neurologischen Erkrankungen, die den Tryptophan- bzw. Serotonin-Stoffwechsel betreffen, vermutet.⁷⁶

Für die Erkrankung der Sitosterolämie ist ein Defekt im humanen ABCG5 und ABCG8 Gen verantwortlich.⁸⁰ Sitosterolämie ist eine seltene vererbte Erkrankung im Cholesterinstoffwechsel des Menschen. ABCG5 und ABCG8 bilden ein Heterodimer, welches die intestinale Aufnahme bzw. biliäre Ausscheidung von mit der Nahrung aufgenommenen pflanzlichen Sterolen reguliert. Durch Mutationen in einem der beiden Gene kommt es zu einer unkontrollierten Aufnahme von pflanzlichen Cholesterinen im Intestinaltrakt bzw. zu einer verminderten Ausscheidung über die Leber und in Folge zur Anreicherung dieser Substanzen im Blut und in diversen Geweben. Dies führt bei den Patienten zu knotenartigen Fettablagerungen in Haut und Sehnen und zu einer erhöhten Disposition für vorzeitige koronare Arteriosklerose.^{80,81}

Die Funktion von ABCG3 und ABCG4 ist noch weitestgehend unbekannt. ABCG3 ist nahe verwandt mit ABCG2. Es wurde bislang nur in der Maus nachgewiesen, wobei sich die höchsten Konzentrationen in Thymus und Milz fanden.⁸² ABCG4 scheint wie ABCG5 und ABCG8 eine Rolle im Lipid- und Steroid-Metabolismus zu spielen.^{83,84} Lediglich für ABCG2 wurde eine Rolle bei der Entwicklung der MDR beschrieben.^{68,85}

1.5.2 Aufbau von BCRP

BCRP ist der "jüngste" entdeckte und in der Literatur beschriebene ABC-Transporter. Entdeckt wurde BCRP im Jahr 1998 fast zeitgleich von drei unterschiedlichen Arbeitsgruppen. Die Arbeitsgruppe um Doyle et al. versetzte eine Brustkrebszelllinie mit Doxorubicin in Anwesenheit des P-gp Inhibitors Verapamil.⁸⁶ Sie erhielten die Subzelllinie MCF-7/AdrVp, die eine hohe Resistenz gegenüber Doxorubicin zeigte, ohne P-gp oder MRP1 zu exprimieren. Genannt wurde dieses neue Protein BCRP, nicht jedoch etwa aufgrund eines möglicherweise erhöhten Vorkommens in Brustkrebszellen, sondern weil es in einer Brustkrebszelllinie entdeckt wurde. Unabhängig davon isolierten Allikmets et al. eine cDNA nahezu identisch mit der von BCRP aus humanem Plazentagewebe.⁸⁷ Aufgrund der hohen Expression in der Plazenta gaben sie dem Protein den Namen ABCP (P = Plazenta). Auch die

Arbeitsgruppe um Miyake et al. identifizierte ein bislang unbekanntes Gen in der mit Mitoxantron selektierten Darmkrebszelllinie S1-M1-80.⁸⁸ Dieses Gen schien für die hohe Resistenz der Zelllinie gegenüber dem Zytostatikum Mitoxantron verantwortlich zu sein, und sie gaben ihm daher den Namen Mitoxantron Resistenz Gen (MXR). Nachdem die Gensequenz zugänglich wurde, stellte sich heraus, dass alle drei Gene nahezu identisch waren. Aufgrund der engen Verwandtschaft zu dem ABC-Transporter ABCG1, dem humanen Ortholog des *Drosophila white* Gens⁷⁶, wurde BCRP/ABCP/MXR der G-Subfamilie zugewiesen und von dem Human Gene Nomenclature Committee offiziell ABCG2 benannt.

Das Gen für ABCG2 ist auf dem Chromosom 4q22 lokalisiert, erstreckt sich über 66 kb und besteht aus 16 Exons und 15 Introns.⁸⁹ ABCG2 ist aus 655 Aminosäuren zusammengesetzt, hat im glykosilierten Zustand ein Molekulargewicht von 72 kDa und besteht wie alle Vertreter dieser Familie aus einer N-terminalen Nukleotidbindungsdomäne und einer C-terminalen transmembranären Domäne mit sechs α -Helices (Abb. 1.6).⁹⁰

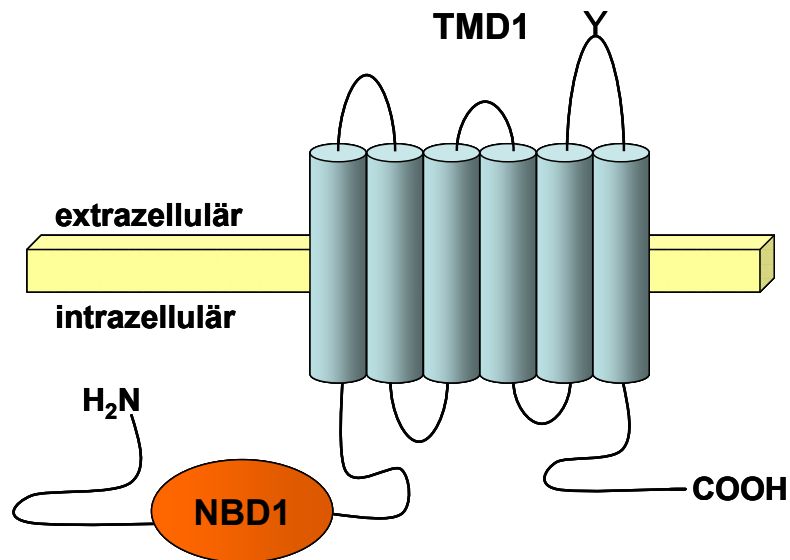


Abb. 1.6: Topologiemodell von ABCG2.

Die Relevanz dieser umgekehrten Struktur bezüglich Funktion und Transport von ABCG2 im Vergleich zu anderen ABC-Transportern ist bislang noch nicht bekannt. Als Halbtransporter muss BCRP dimerisieren, um einen funktionsfähigen Transporter auszubilden. Ob es sich dabei um ein Homodimer, ein Heterodimer oder ein Polymer

aus mehr als zwei Untereinheiten handelt, ist Gegenstand der aktuellen Forschung.^{91,92,93}

Wie in Abb. 1.6 zu erkennen ist, befindet sich zwischen TM5 und TM6 ein großer extrazellulärer Loop. Innerhalb dieses Loops befinden sich drei mögliche N-Glykosilierungsstellen, von denen jedoch nur Asparagin 596 glykosiliert ist. Die Glykosilierung stellt jedoch keine Voraussetzung für die korrekte Einlagerung in der Membran oder für die Transportaktivität dar, sondern dient der Verankerung des Proteins in der Plasmamembran.⁹⁴

Der dritte extrazelluläre Loop verfügt des Weiteren über drei Cysteine, die über die Ausbildung von Disulfidbrücken an der Dimerisierung beteiligt sein sollen. Studien haben gezeigt, dass bei der Durchführung von SDS-gelelektrophoretischen Untersuchungen ohne Zusatz eines reduzierenden Agens BCRP als 140 kDa Bande zu erkennen ist. Nach Zusatz von Mecaptoethanol wird eine 70 kDa Bande sichtbar.^{95,96} Die intermolekulare Disulfidbrücke soll sich jeweils zwischen den beiden Cysteinen in Position 603 ausbilden. Mittels Mutationsstudien konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Ausbildung der Disulfidbrücke nicht essentiell für die Lokalisation und Transportfunktion von BCRP ist. Eine Mutation der Cysteine zu Glycin oder Alanin resultiert in einem funktionsfähigen Protein mit unveränderter Expression und lässt vermuten, dass nicht nur die Disulfidbrücke allein für den Zusammenhalt der beiden Hälften verantwortlich ist. Im Gegensatz dazu bewirkt eine Mutation der Cysteine 592 und 608, die eine intramolekulare Disulfidbrücke bilden, einen kompletten Verlust der Transportaktivität.⁹⁷ Kürzlich wurde ein GXXXG Motiv, welches für die Dimerisierung anderer Membranproteine wie Glycophorin A verantwortlich ist⁹⁸, innerhalb der Gensequenz (Aminosäuren 406-410, TM1) von ABCG2 identifiziert. Die Mutation der Glycine zu Leucinen hatte zwar einen verminderten Transport zur Folge, die Membranexpression des Proteins blieb jedoch unverändert.⁹⁹ Diese Ergebnisse deuten an, dass Dimerisierung und Transportaktivität zwei getrennte Vorgänge darstellen und dass die Zusammenlagerung zweier Hälften nicht automatisch den einwandfreien Transport von Substanzen garantiert.

Das Zusammenspiel diverser Faktoren und komplexer Zusammenhänge beeinflussen die Genregulation und Gewebeverteilung von ABCG2. Die genaue Lokalisation einiger Transportproteine in der Membran kann u.a. durch unterschiedliche Signalwege reguliert werden. Eine wichtige Rolle spielt dabei der

PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg. Betrachtet man beispielsweise den Insulinstoffwechsel, bewirkt ein steigender Insulinspiegel die Aktivierung der Proteinkinase Akt, was zu einer vermehrten Translokation des Glucosetransporters Glut4 in die Plasmamembran und in Folge zu einer erhöhten Aufnahme von Glucose führt.¹⁰⁰ Des Weiteren wird die Membranexpression des Gallensalz-Exporters ABCB11 in die Canaliculi der Leber über eine Aktivierung der PI3K/Akt-Signaltransduktionskaskade gesteuert.¹⁰¹ Auch für ABCG2 wird diskutiert, dass die Aktivität der Proteinkinase Akt an der Regulation der Membranexpression beteiligt sein soll.^{102,103} Die Arbeitsgruppe um Takada et al. hat gezeigt, dass die Behandlung von mit ABCG2 transfizierten Nierenzellen mit den PI3K/Akt Inhibitoren LY294002 und Wortmannin, zu einer Internalisierung von BCRP aus der apikalen Membran in den Intrazellulärraum führt (s. Abb. 1.7). Diese Abnahme korreliert mit dem Phosphorylierungsstatus von Akt.¹⁰³ Der genaue Mechanismus, wie das Enzym Akt die Membranexpression von ABCG2 kontrolliert, ist jedoch noch nicht aufgeklärt.

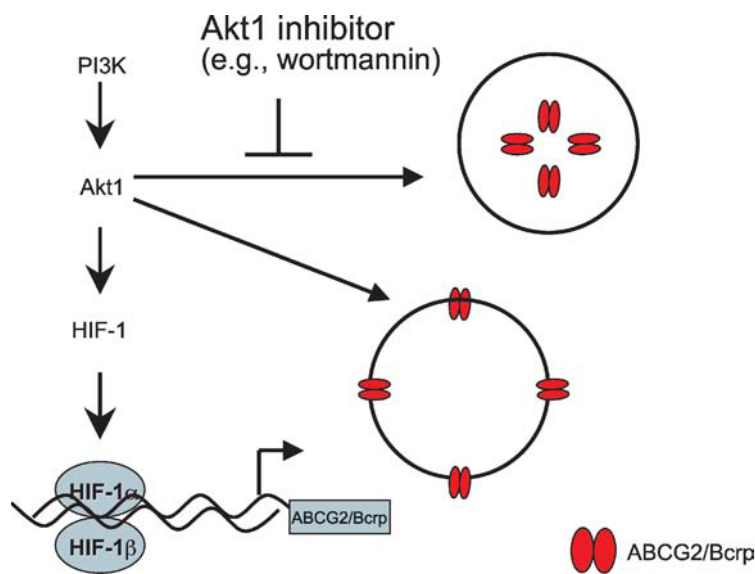


Abb. 1.7: Mögliche Genregulation und Gewebeverteilung von ABCG2. Die Transkription von ABCG2 wird durch den hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) reguliert. Die Lokalisation in der Plasmamembran wird durch die Aktivität des Enzyms Akt bestimmt.⁸⁵

Auch über den genauen Mechanismus der Genregulation von ABCG2 ist bislang noch wenig bekannt. Innerhalb des Promotors wurden zwei Responseelemente (RE), das Hormon-RE¹⁰⁴ und das Hypoxie-RE¹⁰⁵, identifiziert, welche die Transkription von ABCG2 beeinflussen sollen. Verschiedene Studien haben demonstriert, dass die

BCRP Expression in Zellen unter Hypoxie stark ansteigt.^{105,106} Unter Sauerstoffmangel wird der hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), ein Heterodimer aus Hif-1 α und Hif-1 β , aktiviert, bindet an das Hypoxie-RE und bewirkt eine vermehrte Expression von ABCG2 (s. Abb. 1.7). Da Hif-1 α in vielen primären und metastasierenden Tumoren überexprimiert wird, wird angenommen, dass aktivierter HIF-1 in diesen Krebszellen für die BCRP vermittelte Resistenz verantwortlich sein könnte.

1.5.3 Gewebeverteilung und physiologische Funktion

Physiologisch wird ABCG2, ähnlich wie ABCB1 und ABCC1, in unterschiedlichen Geweben des menschlichen Körpers exprimiert, die eine pharmakologisch relevante Barrierefunktion besitzen. Hohe Level an BCRP wurden zum Beispiel in der apikalen Membran polarisierter Zellen von Plazenta, Leber, Gehirn, Dünndarm und Kolon gefunden.^{106,107} Herz, Lunge, Skelettmuskulatur, Pankreas, Milz und Thymus zeigten dagegen keine nennenswerten Level an BCRP.¹⁰⁸

Die hohe Expression von ABCG2 in den Syncytiotrophoblasten der Plazenta lässt vermuten, dass BCRP Teil der Plazentaschranke ist und den Fetus vor toxischen Substanzen schützt. Verabreicht man schwangeren *abcg2* positiven Mäusen das Zytostatikum Topotecan zusammen mit dem BCRP Inhibitor Elacridar, resultiert ein doppelt so hoher Plasmaspiegel von Topotecan im fetalen Kreislauf verglichen mit der Konzentration im mütterlichen Blut.¹⁰⁹ Auch die Gabe von Nitrofurantion bewirkt in schwangeren *abcg2* Knockout-Mäusen eine fünffach erhöhte Konzentration der Substanz im fetalen Kreislauf.¹¹⁰ Im Gegensatz zu der schützenden Funktion von BCRP in der Plazenta, bewirkt die Expression von ABCG2 in der Brustdrüse von stillenden Müttern überraschenderweise eine Anreicherung toxischer Substanzen in der Muttermilch. Von Jonker et al. wurde beschrieben, dass die Konzentration der BCRP Substrate Topotecan und dem cancerogenen 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin (PhIP) in der Milch säugender Mäuse höher war als bei den Knockout-Mäusen.¹¹¹ Weitere Substanzen, die sich in der Muttermilch anreichern, sind z.B. Cimetidin¹¹², Nitrofurantoin¹¹³ und Ciprofloxacin.¹¹⁴ Auf der anderen Seite wurde von Herwaarden et al. bewiesen, dass ABCG2 das B₂-Vitamin Riboflavin, welches als Bestandteil von Dehydrogenasen und Oxygenasen eine

essentielle Rolle im oxidativen Stoffwechsel spielt, während der Lactation aktiv in die Muttermilch sezerniert.¹¹⁵ Es wird diskutiert, ob BCRP bei der Versorgung des Neugeborenen mit weiteren Vitaminen und Nährstoffen eine Rolle spielt.¹¹⁵

Die Expression von BCRP im Gastrointestinaltrakt (GI) ist im Zwölffingerdarm am höchsten und nimmt entlang des Ileum, des aufsteigenden, transversen und absteigenden Teil des Dickdarms bis hin zum Rectum kontinuierlich ab.¹¹⁶ Auch in den Canaliculi⁴⁰ und Hepatozyten¹⁰⁷ der Leber wurden hohe Level an BCRP nachgewiesen. In GI und Leber nimmt BCRP Einfluss auf die Absorption, Metabolisierung und Exkretion von Arzneistoffen sowie endogener und exogener Toxine. Studien an BCRP Knockout-Mäusen haben gezeigt, dass die Bioverfügbarkeit von oral verabreichten Topotecan um das sechsfache ansteigt verglichen mit den Wildtyp-Mäusen.¹⁰⁹ Genauso ist BCRP für die verminderte Aufnahme bzw. die erhöhte Elimination der carcinogenen Substanz PhIP verantwortlich.¹¹⁷ Eine weitere Studie mit *abcg2* Knockout-Mäusen zeigte, dass die Tiere sehr sensitiv gegenüber dem phototoxischen Chlorophyll-Abbauprodukt Pheophorbid A waren, ein Bestandteil von grünen Pflanzen.¹¹⁸ Normalerweise limitiert BCRP die intestinale Aufnahme von Pheophorbid A. Nach Gabe dieser Substanz kam es bei Exposition der Knockout-Mäuse mit Licht zu schweren bzw. teilweise tödlichen Hautläsionen. Ferner ist BCRP, in Analogie zu MRP1, in der Lage Glukuronid- und Sulfat-Konjugate zu transportieren. Beide Transporter unterstützen demnach die Phase II metabolisierenden Enzyme und beschleunigen die Elimination potentiell toxischer Metabolite.

In hämatopoetischen Stammzellen dient BCRP als Marker der so genannten Side Population (SP). Diese Subpopulation wird sichtbar, wenn die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 angefärbt und mittels Durchflusszytometer analysiert werden. Zhou konnte zeigen, dass die Expression von BCRP in SP Zellen für die verminderte Hoechst 33342 Akkumulation verantwortlich ist.¹¹⁹ Die genaue Funktion von BCRP in diesen Zellen ist noch unklar. Für die Hämatopoese scheint die Anwesenheit von ABCG2 nicht essentiell zu sein, da trotz des Verlustes der SP Zellen in *abcg2* Knockout-Mäusen diese eine normale Anzahl von Stammzellen ausbilden.¹¹⁸ Es wird angenommen, dass BCRP den undifferenzierten Status einiger Vorläuferzellen aufrechterhält, indem es den Efflux von Substanzen, die für die Differenzierung wichtig sind, aus diesen Zellen garantiert.¹¹⁹ Auch die Tatsache, dass hämatopoetische Stammzellen von *abcg2* Knockout-Mäusen eine erhöhte

Sensitivität gegenüber dem ABCG2 Substrat Mitoxantron aufweisen¹²⁰ bestätigt die Annahme, dass BCRP als Schutzmechanismus der Stammzellen gegenüber endogenen und exogenen Substanzen dient.

Da Stammzellen in der Lage sind, auch unter hypoxischen Bedingungen zu überleben, untersuchte die Arbeitsgruppe von Krishnamurthy et al. den Einfluss von HIF-1 auf die Genregulation von ABCG2 in diesen Zellen. Sie konnten beweisen, dass die Expression von BCRP in den Vorläuferzellen unter Sauerstoffmangel signifikant erhöht ist. BCRP negative Zellen konnten unter diesen Bedingungen nicht überleben. Die Ursache für das geringe Überleben der *abcg2* defizienten Vorläuferzellen lag in der Akkumulation des Porphyrin-Abkömmlings Häm, dessen Konzentration bei Sauerstoffmangel stark ansteigt. BCRP schützt demnach hämatopoetische Stammzellen vor der Akkumulation von Porphyrinen und sichert somit das Überleben der Zellen unter Sauerstoffmangel.¹⁰⁵

1.5.4 Substrate und Modulatoren von BCRP

Genau wie P-gp und MRP1 ist BCRP in der Lage, eine Vielzahl strukturell unterschiedlicher Zytostatika aus den Zellen heraus zu transportieren. Dazu zählen z.B. Mitoxantron, Camptothecine (Topotecan, Irinotecan, SN-38), Flavopiridol und Methotrexat. Neben Chemotherapeutika werden eine Reihe weiterer Verbindungen aus unterschiedlichen Arzneistoffklassen sowie Fluoreszenzfarbstoffe von BCRP erkannt. Tabelle 1.6 listet eine Auswahl an Substraten, die teilweise mit denen von P-gp und MRP1 überlappen.

Tabelle 1.6: Auswahl klinisch relevanter Substrate von ABCG2, nach Polgar et al.⁹⁹ und Robey et al.¹²⁴ *: Verbindungen, auf die sich die SNP482 auswirkt.

Substanzklasse	Vertreter
Antibiotika	Ciprofloxacin Ofloxacin Norfoxacin Erythromycin Nitrofurantoin
Calciumkanalblocker	Dipyridamol Nifedipin Nitrendipin
Carcinogene Verbindungen	Aflatoxin B1 PhIP

1 Einleitung

Substanzklasse	Vertreter
Fluoreszenzfarbstoffe	BCECF-AM BODIPY-prazosin Hoechst 33342 Lyotracker Green* Rhodamin 123* 6-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein
Glukuronid- u. Sulfat-Konjugate	Benzo[a]pyren-3-sulfat Benzo[a]pyren-3-glukuronid Estron-3-sulfat Dehydroepiandrosteronsulfat 17 β -Estradiolsulfat
HMG-CoA Reduktasehemmer	Rosuvastatin Pitavastatin Cerivastatin
Porphyrine	Häm Pheophorbid A Pyropheophorbid A-Methylester Protoporphyrin IX Phytoporphyrin
Virustatika	Zidovudin Lamivudin Abacavir
Verschiedene	Cimetidin Folsäure Riboflavin Sulfasalazin
Zytostatika	
Anthrachinone	Mitoxanthron Bisantren*
Anthrazykline	Daunorubicin* Doxorubicin* Epirubicin* Flavopiridol
Antimetabolite	Methotrexat*
Camptothecine	9-Aminocamptothecin Homocamptothecin Irinotecan SN-38 (aktiver Metabolit von Irinotecan) SN-38-glukuronid Topotecan
Epipodophyllotoxine	Etoposid* Teniposid

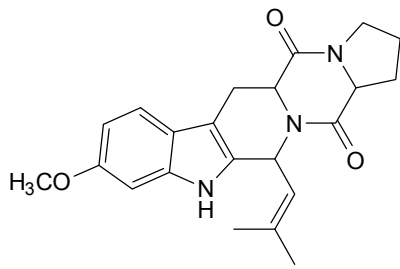
Interessanterweise erweitert eine Mutation von Arginin an Position 482 das Spektrum der transportierten Substrate.^{121,122} Diese Punktmutation (single nucleotide polymorphism, SNP) führt zu einem Austausch der basischen Aminosäure Arginin

durch die neutralen Aminosäuren Threonin (R482T) oder Glycin (R482G) und wird in der Literatur häufig als "gain of function" Mutation bezeichnet. Da diese Veränderungen bislang nicht in humanen Geweben sondern nur in selektierten Zelllinien gefunden wurden, gilt die R482 Variante als Wildtyp.¹²³ Die Mutanten sind in der Lage, die Anthrazykline Doxorubicin, Daunorubicin und Epirubicin sowie Rhodamin 123 zu transportieren, während der Wildtyp keine Resistenz gegenüber diesen Verbindungen zeigt.^{121,124} Zusätzlich resultiert eine erhöhte Resistenz gegenüber Mitoxantron.^{125,126} Die Erkennung anderer Substrate wie zum Beispiel Hoechst 33342 oder Pheophorbid A bleibt unbeeinflusst, jedoch geht die Fähigkeit Methotrexat^{127,128} zu transportieren verloren. Der Verlust der positiven Ladung in Position 482 führt wahrscheinlich zu veränderten elektrostatischen Interaktionen und scheint für die erweiterte Substraterkennung verantwortlich zu sein. Verbindungen, auf die sich die SNP482 auswirkt, sind in Tabelle 1.6 mit einem Stern gekennzeichnet.

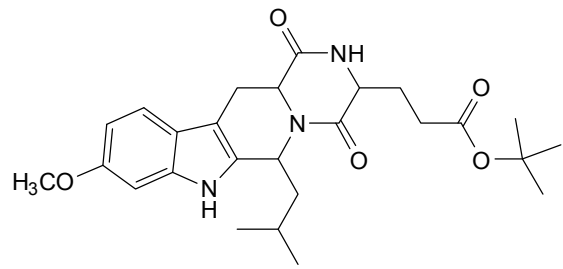
Zwei Aspekte machen die Inhibition von ABCG2 im Rahmen einer Chemotherapie interessant: Zum einen kann die Hemmung von BCRP in Krebszellen mit hoher Expression des Transporters zu einem Anstieg der intrazellulären Zytostatikakonzentration führen und damit das Absterben der malignen Zellen induzieren. Zum anderen bewirkt die durch Inhibition von BCRP entlang des GI-Traktes resultierende erhöhte Bioverfügbarkeit einiger oral verabreichter Arzneimittel eine deutliche Zunahme der Plasmakonzentration, was wiederum zu niedrigeren Einzeldosen und in Folge zu weniger Nebenwirkungen führt.

Im Gegensatz zu P-gp und MRP1 sind bislang nur relativ wenige BCRP Inhibitoren bekannt. Nach Ahmed-Belkacem lassen sich die BCRP Inhibitoren in vier Gruppen einteilen¹²⁹: (1) ABCG2 spezifische Inhibitoren, (2) Breitspektruminhibitoren, (3) Flavonoide und deren Derivate, (4) Tyrosinkinaseinhibitoren. Jeweils zwei Vertreter aus jeder Gruppe sind in Abb. 1.8 dargestellt. Die strukturelle Vielfalt der Verbindungen ist offensichtlich.

Spezifische Inhibitoren

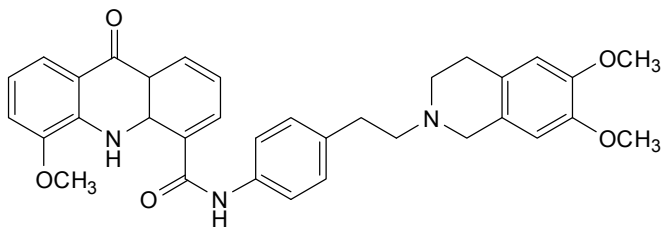


Fumitremorgin C

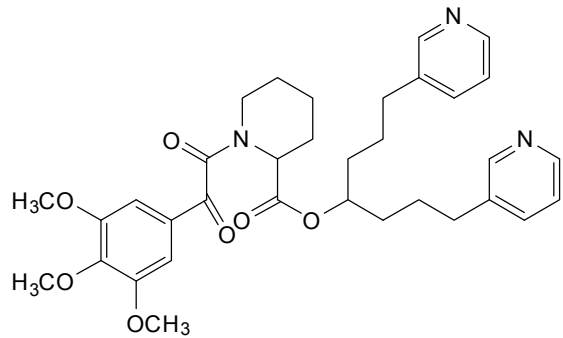


Ko143

Breitspektrum-inhibitoren

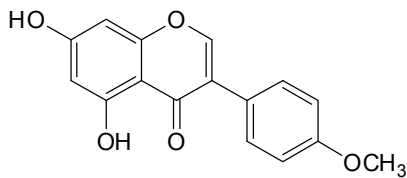


GF120918

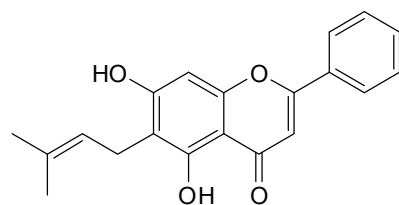


VX-710

Flavonoide

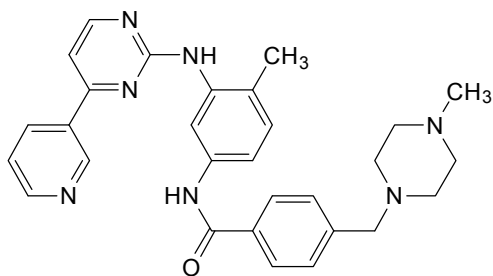


Biochanin A

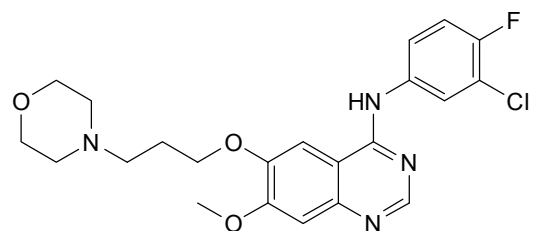


6-Prenylchrysin

Tyrosinkinaseinhibitoren



Imatinib



Gefitinib

Abb. 1.8: Ausgewählte Inhibitoren von ABCG2 (Einteilung nach Ahmed Belkacem et al.¹²⁹).

ABCG2 spezifische Inhibitoren

Nur eine geringe Anzahl an Verbindungen konnten bislang als ABCG2 spezifische Inhibitoren identifiziert werden. Ein Modulator gilt als spezifisch, wenn er keinerlei Interaktion mit den beiden ABC-Transportern P-gp und MRP1 aufweist. Das Mycotoxin Fumitremorgin C (FTC), isoliert aus *Aspergillus fumigatus*, wurde als einer der ersten, hoch potenten, BCRP spezifischen Inhibitoren entdeckt.¹³⁰ Seine ausgeprägte Neurotoxizität limitierte allerdings den Einsatz *in vivo*. Mittels Festphasensynthese konnte eine Bibliothek aus 42 FTC-Derivaten, die als gemeinsames Grundgerüst einen Indoldiketopiperazinring aufweisen, erstellt werden.¹³¹ Unter diesen Verbindungen erwiesen sich Ko132 und Ko143 als hoch aktive Substanzen mit geringer Zytotoxizität.¹³² Mit einem IC₅₀ von 5-10 nmol/l ist Ko143 in der Lage die mitoxantron-vermittelte Resistenz in BCRP positiven Zellen vollständig aufzuheben. Somit ist seine Hemmwirkung doppelt so hoch wie die von FTC und übersteigt die inhibitorische Wirksamkeit von GF120918 sogar um das dreifache. Tierexperimente haben bewiesen, dass die orale Gabe von 10-50 mg/kg Körpergewicht neben einer erhöhten Bioverfügbarkeit von Topotecan, zu keinen neurotoxischen Nebenwirkungen führte, was Ko143 zu einem vielversprechenden Kandidaten für *in vivo* Studien macht.¹³²

Auch das Aminocumarin-Antibiotikum Novobiocin hemmt den Mitoxantron-Efflux in BCRP positiven Zellen und gehört zur Gruppe der BCRP spezifischen Inhibitoren. Mit einem IC₅₀ von 50-100 µmol/l ist seine biologische Aktivität allerdings um ein vielfaches geringer als die der Indoldiketopiperazine.¹³³

Breitspektruminhibitoren

Gruppe 2 umfasst sog. Breitspektruminhibitoren, Verbindungen, die gleichzeitig auch mit P-gp und MRP1 interagieren. Das Acridonderivat GF120918 (Elacridar) zählt zu den P-gp Modulatoren der dritten Generation. De Bruin et al. demonstrierten, dass eine Konzentration von 1 µmol/l GF120918 ausreicht, um die Sensitivität in S1-M1-80 Zellen gegenüber Mitoxantron um das 1850fache zu erhöhen.¹³⁴ Ferner konnte in Phase III Studien gezeigt werden, dass die einmalige Gabe von 1000 mg GF120918 einen Anstieg der Bioverfügbarkeit von oral verabreichten Topotecan (1,0 mg/m²) von 40% auf 97% bewirkt.¹³⁵ Weitere Breitspektruminhibitoren sind z.B. Cyclosporin A¹³⁶, VX-710 (Biricodar)⁷³, Nicardipin¹³⁷ und Reserpin.¹¹⁹ Untersuchungen der

Arbeitsgruppe Robey et al. haben gezeigt, dass der potente P-gp Inhibitor XR9576 (Tariquidar) ebenfalls mit BCRP interagiert.⁴¹

Flavonoide

Natürlich vorkommende Flavonoide und deren Derivate repräsentieren eine weitere Klasse interessanter BCRP Inhibitoren und werden nach Ahmed-Belkacem et al. in Gruppe 3 zusammengefasst. Mehr als 6500 natürliche Flavonoide wurden bislang identifiziert¹³⁸, davon werden vom Menschen täglich ca. 200-1000 mg mit der Nahrung aufgenommen.¹³⁹ Flavonoiden werden aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaft vor allem positive kardiovaskuläre Wirkungen zugeschrieben. Dafür sind neben der unmittelbaren Bindung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) insbesondere die Hemmung der ROS-bildenden Enzyme, Hemmung der Thrombozytenfunktion, Hemmung der Leukozyten-Aktivierung und gefäßerweiternde Eigenschaften verantwortlich.¹⁴⁰ Des Weiteren werden Flavonoiden antiallergische, antiphlogistische, antimikrobielle, antiproliferative und antikanzerogene Wirkungen zugesprochen¹⁴¹, wobei sie ihre Wirkung über mehrere Mechanismen entfalten. Im Vordergrund stehen dabei die Interaktion mit der DNA und diversen Enzymen, ihre Eigenschaft als Radikalfänger, sowie die Beeinflussung von verschiedenen Signaltransduktionswegen in den Zellen (z. B. NF- κ B, MAPK).^{142,143}

Die Interaktion von Flavonoiden mit ABC-Transportern wurde von mehreren Arbeitsgruppen intensiv untersucht. Interessanterweise sind die Affinitäten einiger Flavonoide (z.B. 6-Prenylchrysin, Tectochysin) zu BCRP wesentlich höher als zu P-gp oder MRP1.¹⁴⁴ In einer Studie von Cooray et al. wird berichtet, dass unterschiedliche Flavonoide (finale Konzentration 30 μ mol/l) signifikant die Akkumulation von Mitoxantron und BODIPY-prazosin in zwei unterschiedlichen BCRP exprimierenden Zelllinien erhöhen.¹⁴⁵ Zhang et al. untersuchen 20 natürlich vorkommende Flavonoide hinsichtlich ihrer BCRP modulierenden Eigenschaften. Unter diesen Verbindungen waren Chrysin und Biochanin A die vielversprechendsten Kandidaten mit IC₅₀-Werten zwischen 0,5-1,0 μ mol/l.¹⁴⁶ Auch die beiden Verbindungen Ayanin und Retusin konnten unter 31 Flavonoiden aus unterschiedlichen Subgruppen (Flavanone, Flavone, Flavonole, Isoflavone und Biflavonoide) im Rahmen dieser Arbeit als hoch potente BCRP Inhibitoren identifiziert werden.¹⁴⁷ Die hohe inhibitorische Wirksamkeit, die fehlende Toxizität und das Vorkommen als natürlicher Bestandteil der Nahrung machen den Einsatz von

Flavonoiden als BCRP Inhibitoren in der Krebstherapie interessant. Vor diesem Hintergrund ist es jedoch unerlässlich, die Diät der Patienten während einer Chemotherapie zu kontrollieren. Ein erhöhter Verzehr dieser Verbindungen kann zu erheblichen pharmakokinetischen Interaktionen zwischen den eingesetzten Zytostatika und den Flavonoiden führen.

Tyrosinkinaseinhibitoren

Gruppe 4 beinhaltet Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI). Von einigen TKI ist bekannt, dass sie sowohl mit BCRP als auch mit P-gp und MRP1 interagieren und daher auch als Breitspektrum-inhibitoren bezeichnet werden könnten.^{148,149,150,151} In Analogie zu Flavonoiden zeigen verschiedene Publikationen jedoch, dass TKI wie Imatinib und Gefitinib eine höhere Affinität zu BCRP aufweisen. Laut Literatur wird den TKI unter den BCRP Modulatoren eine besondere Rolle zugesprochen. Diese Besonderheit geht auf einen möglichen multispezifischen Interaktionsmechanismus dieser Verbindungen zurück. Wie bereits in Kapitel 1.5.2 erwähnt, soll der PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg an der Genregulation und Gewebeverteilung von ABCG2 beteiligt sein. Neben der BCRP modulierenden Eigenschaft hemmen TKI den PI3K/Akt-Transduktionsweg und sollen sowohl die Expression von BCRP inhibieren als auch die Internalisierung von BCRP induzieren.^{21,152,153} Da die Interaktionen von TKI mit BCRP in dieser Arbeit intensiv untersucht wurden, werden einige Vertreter dieser Arzneistoffklasse in Kapitel 1.6 näher vorgestellt.

Bis heute wurde noch keine klinische Studie initiiert, in der die Wirksamkeit eines ABCG2 Inhibitors zusammen mit einem Zytostatikum im Rahmen einer Tumortherapie untersucht wurde. Frühere Studien an P-gp haben gezeigt, dass die klinische MDR hoch komplex ist und die Erkenntnisse aus *in vitro* Modellen nicht ohne weiteres auf *in vivo* Studien übertragen werden können. Eine Hürde, die bewältigt werden will, ist die hohe Variabilität in der Responserate bei der Behandlung von Patienten mit MDR-Modulatoren, die von dem Expressionslevel des jeweiligen Transporters abhängig ist. Aber auch die Co-Expression weiterer ABC-Transportproteine bei Patienten, die mit unterschiedlichen Zytostatikaregimen behandelt werden, tragen zu einem unzureichenden Ansprechen auf die Chemotherapie bei. Beispielsweise konnten aufgrund dieser Problematik die Plasmakonzentrationen für eine effektive Hemmung des Transportproteins nicht

erzielt werden. Ein weiteres gravierendes Problem bei der Coadministration eines Inhibitors mit einem Zytostatikum in klinischen Studien ist, wie bereits erwähnt, die gegenseitige pharmakokinetische Beeinflussung der beiden Substanzen, die in den meisten Fällen zu einer erhöhten Toxizität der Verbindungen führt. Durch die Inhibition der ABC-Transporter in physiologischen Barrieren kommt es zu signifikant erhöhten Plasmakonzentrationen des Zytostatikums und in Folge zu nicht tolerierbaren Nebenwirkungen. Auch die Vorhersage der Toxizität der Modulatoren in klinischen Studien gestaltet sich als schwierig. Diese Probleme verkomplizieren den erfolgreichen Einsatz von Modulatoren zur Überwindung der MDR in der klinischen Praxis.

Die Erkenntnisse aus dem Erfolg bzw. Misserfolg vergangener MDR-Inhibitoren sollten dennoch Ideen zur Entwicklung neuer und effizienterer Modulatoren liefern. Der "ideale" Inhibitor für eine Behandlung der MDR sollte folgende Anforderungen erfüllen: (1) Stattfinden einer möglichst spezifischen Interaktion zwischen dem Modulator und dem ABC-Transportprotein. Dazu muss zunächst getestet werden, welcher ABC-Transporter bei der Entwicklung des MDR-Phänotyps involviert ist. Sind mehrere Proteine an der MDR beteiligt, ist der Einsatz von dualen bzw. Breitspektruminhibitoren sinnvoll, (2) die pharmakokinetischen Interaktionen zwischen Modulator und Zytostatikum sollten minimal sein, um toxische Effekte zu vermeiden, (3) außerdem sollte der ideale Kandidat eine hohe Affinität zu dem jeweiligen Transporter aufweisen und (4) selbst nicht toxisch sein.

Um einen maximalen Therapieerfolg zu erreichen, sollte die direkte Hemmung des Transportproteins durch weitere Ansätze ergänzt werden. Ein besseres Verständnis und tiefere Einblicke in die Genregulation und Gewebeverteilung der ABC-Transporter via Signaltransduktionskaskaden können wesentlich dazu beitragen, die MDR in Zukunft erfolgreich zu bekämpfen.

1.5.5 Funktionsweise und Transportzyklus von BCRP

Zur generellen Funktionsweise der ABC-Transporter existieren verschiedene Modelle, von denen die zwei wichtigsten hier kurz vorgestellt werden. Sie wurden erstmals für P-gp beschrieben, können jedoch auch auf MRP1 und BCRP übertragen werden. Das am weitesten verbreitete und akzeptierte Modell ist das des

“hydrophoben Staubsaugers“ (hydrophobic vacuum cleaner): Danach bilden vermutlich zwei BCRP Halbtransporter (im Falle von P-gp oder MRP1 die beiden homologen Hälften) einen Transportkanal, der den Efflux von Molekülen direkt aus der Plasmamembran ermöglicht, während sie durch die Phospholipid-Doppelschicht hindurch diffundieren. Auf diese Weise werden Stoffe ausgeschleust, bevor sie das Zytosol erreichen. Bei dem Flippase-Modell befördert ("flipp") der Transporter die Verbindung von der inneren zur äußeren Seite der Phospholipid-Doppelmembran, von wo diese dann in den Extrazellulärraum entlassen wird.^{154,155}

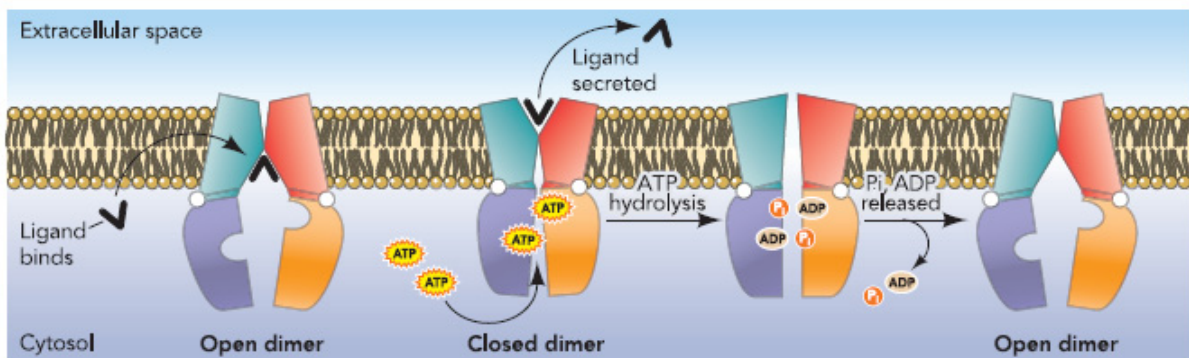


Abb. 1.9: ATP-Switch Modell nach Linton.⁵

Der exakte Mechanismus, wie die ABC-Transporter Substrate aus dem inneren Teil der Phospholipid-Doppelmembran in den Extrazellulärraum transportieren, konnte noch nicht geklärt werden. Das von Higgins und Linton entwickelte so genannte ATP-Switch-Modell beschreibt einen allgemeinen Transportzyklus für ABC-Transporter, der den energieabhängigen Efflux der Substrate gewährleistet.^{5,156} 2008 konnte die Arbeitsgruppe um McDevitt beweisen, dass sich das ATP-Switch-Modell auch auf BCRP übertragen lässt.¹⁵⁷ In Abb. 1.9 ist der Transportmechanismus dargestellt, wobei für BCRP die Ausbildung eines Homodimers angenommen wird.

Im basalen Zustand befinden sich die beiden NBD in einer offenen Dimerkonfiguration (open dimer) mit einer geringen Affinität zu ATP. Der eigentliche Transportzyklus wird gestartet, indem das Substrat an seine Bindungsstelle mit hoher Affinität ("high affinity site") bindet. Durch die Bindung des Substrates erfolgt eine Konformationsänderung der NBD, und die Affinität der NBD für ATP steigt. Im nächsten Schritt binden zwei Moleküle ATP an die NBD, die daraufhin in das geschlossene Dimer (closed dimer) übergehen. Die dabei frei werdende Energie bewirkt eine Konformationsänderung in der TMD. Über die Konformationsänderung

vermittelt, wird die Substratbindungsstelle zur extrazellulären Seite exponiert ("low affinity site"), die Affinität des Substrates zu seiner Bindungsstelle reduziert sich und es kann abdiffundieren. Nun wird ATP hydrolysiert und es kommt zur Ausbildung eines Übergangszustandes. Im letzten Schritt führen die Freigabe von Phosphat (P_i) und ADP durch Rotation und Reorientierung der TMD in den Ausgangszustand zur Wiederherstellung der basalen Konfiguration. Damit ist der Transporter für einen weiteren Transportzyklus bereit.

1.5.6 Bindungsstellen von BCRP

Die genaue Zahl und Spezifität der Bindungsstellen von BCRP ist bislang noch nicht geklärt. Die Arbeitsgruppe von Clark et al. erbrachte 2006 einen Hinweis auf das Vorliegen mehrerer Bindungsstellen, die sich gegenseitig beeinflussen sollen.¹⁵⁸ Mittels Radioligandbindungsstudien wurde die Interaktion der Substrate Doxorubicin, Daunorubicin, Prazosin, Mitoxantron, Rhodamin 123 und Hoechst 33342 mit [3H]-markiertem Daunorubicin an Plasmamembranen von Insektenzellen, die ABCG2^{R482G} exprimieren, untersucht. Die R482G Isoform wurde aufgrund ihres breiteren Substratspektrums ausgewählt. Mit Hilfe von Verdrängungsassays fand die Arbeitsgruppe heraus, dass die Anthrazykline Doxorubicin und Daunorubicin und das Antihypertensivum Prazosin zu einer fast vollständigen Verdrängung (> 90%) von [3H]-Daunorubicin führten. Eine partielle Verdrängung wurde durch die Substrate Mitoxantron (ca. 60%) und Hoechst 33342 (ca. 30%) erreicht. Rhodamin 123 war nicht in der Lage die Bindung des Radioliganden zu reduzieren (< 10%). Zusätzlich wurde die Dissoziationskonstante von [3H]-Daunorubicin in Abwesenheit und in Anwesenheit der untersuchten Verbindungen bestimmt. Nach Massenwirkungsgesetz weist z.B. eine Erhöhung der Dissoziationskonstanten auf ein nicht-kompetitives Interaktionsverhalten zwischen den beiden Reaktionspartnern hin. In Anwesenheit der Verbindungen Prazosin, Hoechst 33342 und Mitoxantron blieb die Dissoziationskonstante von [3H]-Daunorubicin unverändert – ein Hinweis auf eine kompetitive Interaktion. Interessanterweise führte die Anwesenheit des mit [3H]-Daunorubicin strukturell eng verwandten Anthrazyklins Doxorubicin zu einer 13,5fachen Erhöhung der Dissoziationskonstanten, was auf eine nicht-kompetitive Interaktion hinweist. Auf diesen Beobachtungen basierend wurden von Clark et al.

drei Bindungsstellen für BCRP definiert, die miteinander kommunizieren (s. Abb. 1.10). Eine Bindungsstelle wird von Mitoxanthron und Hoechst 33342 besetzt, eine weitere von den Anthrazyklinen Doxorubicin und Daunorubicin und Prazosin. Aufgrund der nur partiellen Verdrängung des Radioliganden durch Mitoxanthron und Hoechst 33342 wird von Clark postuliert, dass [³H]-Daunorubicin an beide Seiten bindet und nur von der einen durch Mitoxanthron und Hoechst 33342 verdrängt werden kann. Diese kompetitive Verdrängung von [³H]-Daunorubicin von einer der beiden Seiten führt gleichzeitig zur Stabilisierung an der anderen Bindungstasche (positive Kooperativität).

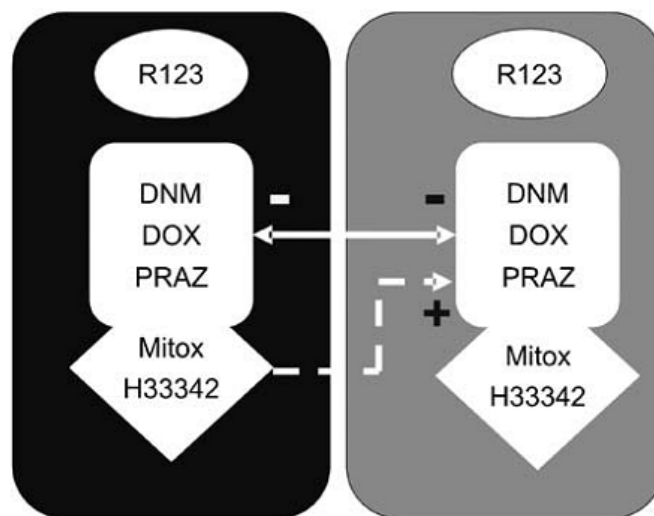


Abb. 1.10: Schematische Darstellung der drei postulierten Bindungsstellen nach Clark et al.¹⁵⁸ Eine Seite wird von Rhodamin 123 (R123) besetzt. Für Daunorubicin (DNM) wurden multiple Bindungsstellen identifiziert, die miteinander kommunizieren. DOX = Doxorubicin, Praz = Prazosin, Mitox = Mitoxanthron, H33342 = Hoechst 33342.

Die Erhöhung der Dissoziationskonstanten von [³H]-Daunorubicin durch unmarkiertes Doxorubicin und Daunorubicin weist auf eine negative Kooperativität zwischen den beiden Bindungsstellen hin. Die dritte Bindungsstelle wird von dem Substrat Rhodamin 123 okkupiert. Hier liegt eine klassische nicht-kompetitive Interaktion mit [³H]-Daunorubicin vor. Es bleibt offen, ob die Kommunikation zwischen den postulierten Bindungsstellen innerhalb eines BCRP Monomers stattfindet, oder ob die in Abb. 1.10 gezeigte Konstellation erst durch Dimerisierung des Halbtransporters zustande kommt.

In einer Studie von Giri et al. wurde über das Vorhandensein multipler Bindungsregionen berichtet, die bei der Interaktion von Substraten mit BCRP involviert sind.¹⁵⁹ Dabei wurde der Einfluss auf den direkten Transport radioaktiv markierter Substrate durch einen Monolayer von MDCK II Zellen, die mit murinem Bcrp1 transfiziert wurden, durch die Anwesenheit bestimmter Inhibitoren untersucht. Zu den untersuchten Substraten gehörten die [³H]-markierten Nukleosidanaloga Abacavir und Zidovudin, der TKI Imatinib und Prazosin. Als Inhibitoren kamen Ko143, GF120918 (Elacridar) und Nelfinavir zum Einsatz. Die Arbeitsgruppe fand heraus, dass Ko143 in der Lage war, den Transport aller Substrate zu inhibieren. Nelfinavir und Elacridar führten zu einer vollständigen Inhibition des Transportes von Abacavir und Zidovudin, jedoch konnten die Verbindungen die Interaktion von Imatinib und Prazosin mit BCRP nur partiell inhibieren. Es wurden mindestens zwei Bindungsstellen identifiziert: die eine wird sowohl von den Nukleosidanaloga Abacavir und Zidovudin als auch von Elacridar und Nelfinavir besetzt. Die Substrate Imatinib und Prazosin interagieren mit der zweiten Bindungstasche. Eine besondere Bedeutung kommt Ko143 zu, das vermutlich in der Lage ist, mit beiden Bindungsarealen zu interagieren.

Zur Identifikation potentieller Bindungsstellen können neben Radioligand-Bindungsstudien auch Photoaffinitätslabeling-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 massenspektrometrisch analysiert. Die Bindungsregionen von photoaktivierbaren Verbindungen können auf diese Weise ermittelt werden. In Photolabelingstudien konnte festgestellt werden, dass Elacridar und Prazosin das Labeling von BCRP mittels [¹²⁵I]IAAP (markiertes Prazosinanalogon) verringern kann, auf der anderen Seite zeigten die Substrate Daunorubicin, Mitoxanthron, Rhodamin 123 und Methotrexat keinen Effekt auf die Bindung von [¹²⁵I]IAAP an BCRP.¹⁶⁰ Neben der Möglichkeit, dass die untersuchten Verbindungen unterschiedliche Affinitäten zu ABCG2 aufweisen, deuten auch diese Untersuchungen auf die Existenz multipler Bindungsstellen hin.

Die Annahme, dass mehrere Bindungsstellen vorhanden sind, wird durch weitere Publikationen unterstützt.^{161,162,163}

1.6 Tyrosinkinasen als therapeutisches Target

Tyrosinkinasen sind eine Gruppe von Proteinen aus der Familie der Proteinkinasen, deren Aufgabe die reversible Übertragung eines γ -Phosphatrestes von ATP auf die Hydroxygruppe der Aminosäure Tyrosin eines anderen Proteins ist. Dadurch wird die Aktivität des jeweiligen Zielproteins beträchtlich beeinflusst, weshalb Tyrosinkinasen als Teil von Rezeptorsystemen einen wichtigen Beitrag zur Signalübertragung leisten. Tyrosinkinasen bilden auch den intrazellulären Teil des Tyrosinkinase-Rezeptorsystems (Insulin-Rezeptor, EGF-Rezeptor, NGF-Rezeptor, PDGF-Rezeptor), über das bevorzugt Signale von Wachstumsfaktoren einlaufen (s. Abb. 1.11). In Kurzform läuft die Aktivierung eines Tyrosinkinase-Rezeptors wie folgt ab: (1) Ligandbindung, (2) Homo- oder Heterodimerisierung, (3) Autophosphorylierung, (4), phosphorylierte Tyrosine werden durch Proteine mit SH2-Domänen erkannt, (5) Signalweiterleitung durch Phosphorylierungskaskaden. Die hintereinander geschalteten Kaskaden, in denen jeweils eine Kinase die nächste phosphoryliert, führt zu einer Verstärkung des an die Zelle herangetragenen Signals im Zellinnern mit dem Ziel, eine effektive Antwort der Zelle auf den Stimulus zu gewährleisten. Abb. 1.11 zeigt schematisch zwei mögliche Signaltransduktionswege, den Ras- (**Rat sarcoma**) und den PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg, die durch Bindung eines Liganden an einen Tyrosinkinase-Rezeptor aktiviert werden können.

Ras ist ein Proto-Onkogen, das für ein so genanntes kleines G-Protein (Guaninnukleotid-bindendes Protein) codiert. G-Proteine besetzen eine Schlüsselposition in der Signalweiterleitung zwischen Rezeptor und Second-Messenger-Systemen und sind an der Regulation zahlreicher Zellfunktionen beteiligt. Die phosphorylierten Tyrosine des aktivierten Tyrosinkinase-Rezeptors nach Ligandbindung dienen als Andockstelle für den Grb2/SOS-Protein-Komplex, ein zytosolisches Adapterprotein. Dieses aktiviert Ras, indem es die Freisetzung von GDP und den anschließenden Austausch mit GTP ermöglicht. Durch Phosphorylierung kommt es nachfolgend zur Aktivierung der Effektorproteine Raf (**Rat fibrosarcoma**), MEK (**mitogen-activated protein kinase kinase**, MAP kinase kinase, MAP2K) und ERK (**extracellular-signal-regulated kinases**). Aktives ERK gelangt letztlich in den Zellkern, wo es durch Phosphorylierung eine Reihe von Transkriptionsfaktoren aktivieren kann. Die Antwort der Zelle auf diesen Stimulus ist vermehrte Angiogenese, Metastasierung, Zellproliferation und verminderte Apoptose

bzw. Zelldifferenzierung. Die Tatsache, dass in 20-30% aller menschlichen Tumoren Punktmutationen im *ras*-Gen gefunden werden, unterstreicht die bedeutende Funktion von Ras bei der Kontrolle des Zellwachstums. Diese Punktmutationen führen allesamt zum Verlust der GTPase-Aktivität von Ras. Da der Wechsel von der GTP-gebundenen Form zur GDP-Form blockiert ist, kommt es zu einer Akkumulation von aktivem Ras und damit zu einem permanenten wachstumsstimulierenden Signal in der Zelle.

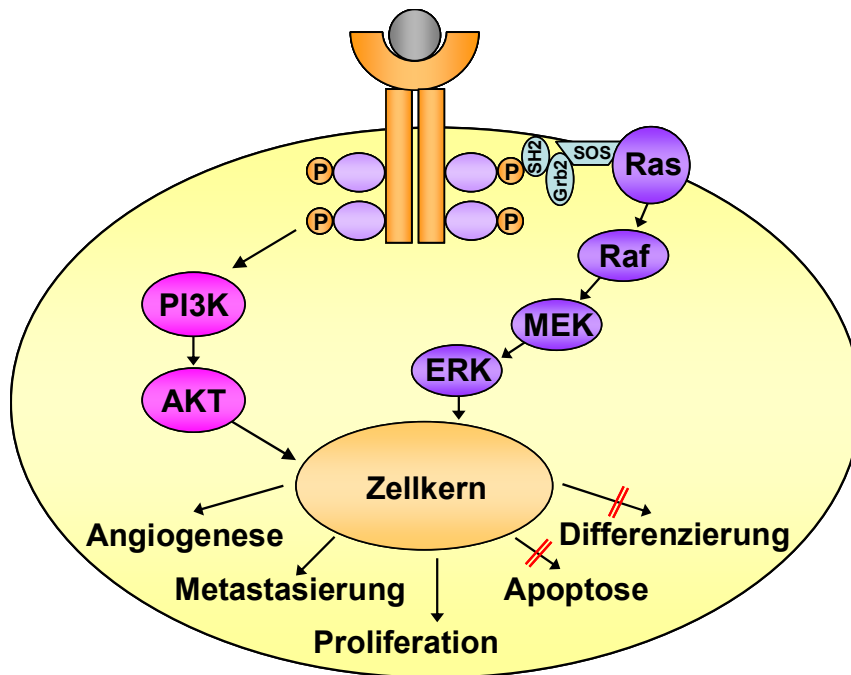


Abb. 1.11: Vereinfachte Darstellung der beiden möglichen Signaltransduktionskaskaden via Ras (lila) oder PI3K (pink). Die Aktivierung des EGFR durch endogene Liganden initiiert die Phosphorylierung. Die Antwort der Zelle auf diesen Stimulus besteht in der Regulation zahlreicher Zellfunktionen.

Die in der vor allem englischsprachigen Literatur oftmals als Akt bezeichnete Proteinkinase B ist ein Enzym des PI3K/Akt-Signalweges, der zahlreiche Auswirkungen auf die Homöostase der Zelle hat, und das Überleben, die Apoptose, die Proliferation und den Stoffwechsel reguliert. Auch hier erfolgt die Aktivierung in mehreren Schritten. Zunächst werden **Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K)** durch aktivierte Rezeptortyrosinkinasen zur Membran rekrutiert und somit aktiviert. Aktivierte PI3K katalysieren die Phosphorylierung der sekundären Botenstoffe PIP₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat) aus PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat). Die Proteinkinase B bindet an das Substrat PIP₃, wird dadurch an die

Zellmembran rekrutiert und aktiviert. Wie oben erwähnt, reguliert die aktivierte Proteinkinase B unter anderem das Überleben, die Proliferation und den Sterbezyklus der betroffenen Zelle.^{164,165}

Im Folgenden sollen zwei in dieser Arbeit vorrangig untersuchten Rezeptor-Tyrosinkinasen, EGFR und BCR-ABL, durch deren Aktivierung die oben beschriebenen Phosphorylierungskaskaden angeschaltet werden, näher vorgestellt werden.

Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (**e**pidermal **g**rowth **f**actor **r**eceptor = EGFR) ist ein Mitglied der ErbB-Familie, einer Unterfamilie von vier eng verwandten Rezeptor-Tyrosinkinasen: EGFR1/HER1 (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) und HER4 (ErbB-4). EGF war einer der ersten voll charakterisierten Wachstumsfaktoren, der als Ligand an EGFR bindet. Die Bindung des Liganden führt zur Aktivierung des EGFR und induziert in Folge die Zellproliferation und Zelldifferenzierung. EGFR besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette mit 1196 Aminosäuren und ist in der Zellmembran einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert. Nach der Bindung des Liganden dimerisiert der EGFR und bildet entweder Homodimere oder Heterodimere mit anderen Mitgliedern der EGFR-Familie. Die Rezeptor-Dimerisierung resultiert in einer strukturellen Veränderung im intrazellulären Bereich des Rezeptors, was zur Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase-Aktivität und Autophosphorylierung führt. EGFR und dessen Familienmitglieder spielen eine Rolle in der Entwicklung und Progression einer Vielzahl von humanen Tumoren, darunter u.a. squamös-zellige Zungenkarzinome, Haut-, Prostata-, Brust- und Eierstockkrebs. Der EGF-Rezeptor wird in verschiedenen Tumorarten hoch reguliert und/oder in mutierter Form vorgefunden, was dazu führt, dass die Tumorzellen unkontrolliert wachsen und sich vermehren.

BCR-ABL (BCR = **B**reakpoint **C**luster **R**egion - benannt aufgrund häufiger Bruchstellen auf dem Gen, ABL = **A**belson **M**urine **L**eukemia **V**iral **O**ncogene **H**omolog 1) ist eine weitere Rezeptor-Tyrosinkinase, die sich bei über 90% der Patienten mit einer chronisch myeloischen Leukämie (CML) und bei 20-25% der akuten lymphatischen Leukämien (ALL) des Erwachsenen findet. Diese Patienten tragen das so genannte Philadelphia-Chromosom, welches durch Translokation von genetischem Material zwischen den Chromosomen 9 und 22 entsteht. Dadurch wird die Tyrosinkinase ABL von Chromosom 9 mit einem Fragment des BCR-Gens auf

Chromosom 22 verknüpft. Die so mutierten Zellen produzieren das chimäre Fusionsprotein BCR-ABL, eine im Vergleich zum ABL mit verstärkter Aktivität ausgestattete Tyrosinkinase, die zur unkontrollierten Vermehrung von weißen Blutkörperchen führt und eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der CML spielt.^{164,165}

Das zunehmende Wissen über die Entstehung bösartiger Tumoren auf molekularer Ebene hat zur Entwicklung neuer zielgerichteter Medikamente ("targeted therapy") geführt. Da dysregulierte Tyrosinkinasen häufig eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Tumorerkrankungen spielen, wurde das Konzept entwickelt, diese Tyrosinkinasen spezifisch mit Inhibitoren zu hemmen. Die medikamentöse Blockierung erfolgt entweder durch Tyrosinkinaseinhibitoren ("small molecules"), die die Kinasedomäne der Rezeptormoleküle ausschalten, durch Inhibitoren der Rezeptordimerisierung oder durch Antikörper, die an die extrazelluläre Domäne binden. Durch ihre Selektivität, d.h. die spezifische Hemmung von Signaltransduktionswegen, die für das Tumorstadium essentiell sind, sind diese Therapien in der Regel durch eine relativ milde Toxizität gekennzeichnet.

Von den in dieser Arbeit untersuchten sechs TKI sind vier für verschiedene Tumorerkrankungen auf dem deutschen Markt zugelassen und sollen nachfolgend kurz vorgestellt werden.

Erlotinib (Tarceva[®], Hoffman-LaRoche) wird zur Therapie des metastasierenden nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) nach dem Versagen von mindestens einer konventionellen Chemotherapie und zur Therapie des Pankreaskarzinoms eingesetzt. Erlotinib ist ein selektiver Inhibitor der Tyrosinkinasedomäne des EGF-Rezeptors. Indem Erlotinib die Tyrosinkinase-Aktivität innerhalb der Zelle blockiert, verhindert es die Signalübertragung über den für das Zellwachstum wichtigen Wachstumsfaktor EGF. Klinische Vorteile für den Patienten sind von einem EGFR-positiven Status des Tumors abhängig. Die häufigsten Nebenwirkungen sind Hautausschläge und Diarrhö.¹⁶⁶

Gefitinib (Iressa[®], Astra-Zenica) ist seit 2009 für alle Therapierichtlinien beim NSCLC zugelassen. Von der Gefitinib-Therapie profitieren NSCLC-Patienten mit einer sog. aktivierenden Mutation der Tyrosinkinasedomäne des EGF-Rezeptors. Deshalb muss vor Therapiebeginn der Nachweis dieser Mutation erbracht werden. Schätzungen zufolge weisen in der westlichen Welt rund 10-15% aller

Lungenkrebspatienten diese spezielle Genmutation auf. Wie bei Erlotinib sind die häufigsten Nebenwirkungen Hautausschläge und Diarrhö.¹⁶⁷

Imatinib (Glivec[®], Novartis) hemmt die Tyrosinkinase-Aktivität von BCR-ABL-positiven Tumorzellen und damit die Proliferation der Zellen. Gleichzeitig wird die Apoptose induziert. Der Wirkmechanismus von Imatinib besteht in der kompetitiven und selektiven Blockade der ATP-Bindungsstelle spezifischer Tyrosinkinasen wie z.B. BCR-ABL. Durch diese Blockade wird die Übertragung eines Phosphatrestes auf das Substrat verhindert. Imatinib ist zugelassen zur Behandlung von Erwachsenen mit BCR-ABL-positiver CML in der chronischen Phase nach Versagen einer Interferon-alpha-Therapie, in der akzelerierten Phase der CML oder in der Blastenkrise. Als hämatologische Nebenwirkungen können Neutropenie oder Thrombozytopenie auftreten. Häufige nicht-hämatologische Nebenwirkungen sind Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Myalgie, Muskelkrämpfe, Hautrötungen und Flüssigkeitsretention.¹⁶⁸

Nilotinib (Tasigna[®], Novartis) ist ein weiterer 2008 eingeführter Inhibitor der Tyrosinkinase-Aktivität von BCR-ABL. Wie Imatinib ist es zur Therapie der Philadelphia-Chromosom-positiven Patienten mit CML in der chronischen und akzelerierten Phase zugelassen, wenn eine Unverträglichkeit oder Therapieresistenz gegen Imatinib vorliegt. Die Anwendung von Nilotinib wird durch seine Hämatotoxizität limitiert. Die häufigsten hämatologischen Nebenwirkungen sind Thrombozytopenie, Neutropenie und Anämie. Nicht-hämatologische Nebenwirkungen entsprechen denen von Imatinib. Nilotinib kann die kardiale ventrikuläre Repolarisation, gemessen als QT-Intervall, konzentrationsabhängig verlängern. Deshalb werden regelmäßige kardiale Untersuchungen unter der Therapie mit Tasigna[®] empfohlen.¹⁶⁹

Zusätzlich zu den TKI wurde in dieser Arbeit auch der chimäre monoklonale IgG₁-Antikörper Cetuximab (Erbix[®], Merck), der spezifisch gegen den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) gerichtet ist, untersucht. Cetuximab bindet an den EGFR mit einer ungefähr 5- bis 10fach höheren Affinität als endogene Liganden. Dabei wird die Bindung endogener EGFR-Liganden blockiert und dadurch die Funktion des Rezeptors gehemmt. Außerdem induziert Cetuximab die Internalisierung des EGFR und kann somit zu dessen Downregulierung führen. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hemmt Cetuximab die Proliferation und induziert die Apoptose EGFR-exprimierender humaner Tumorzellen. Seine Wirkung soll

Cetuximab hauptsächlich via K-Ras-Signaltransduktionskaskade (**Kirsten Rat sarcoma 2 viral oncogene homologue**) entfalten. Erbitux[®] ist indiziert zur Behandlung des metastasierenden, EGFR exprimierenden Kolorektalkarzinoms entweder in Kombination mit einer Chemotherapie oder als Monotherapie. Aktuelle Daten belegen, dass Patienten mit einem metastasierenden Kolorektalkarzinom von K-Ras-Wildtyp signifikant höhere Chancen haben von einer Therapie mit Cetuximab zu profitieren als Patienten mit einer bestimmten Mutation im K-Ras Gen. Außerdem ist Erbitux[®] indiziert zur Behandlung von Patienten mit Plattenepithelkarzinom im Kopf- und Halsbereich in Kombination mit einer Strahlentherapie, oder in Kombination mit einer platin-basierten Chemotherapie.¹⁷⁰

Trotz großer Fortschritte auf dem Gebiet der “targeted therapy“ zeigen in Abhängigkeit von bestimmten genetischen Merkmalen nicht alle Tumoren die gleiche Sensitivität gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren, außerdem können sich unter Therapie durch verschiedene Mechanismen auch hier Resistenzen entwickeln. Daher sind diese neuen Medikamente in der Regel in Kombinationstherapien am wirksamsten.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die Multidrug Resistenz (MDR) von Krebszellen stellt ein bedeutendes Problem bei der Behandlung von Tumoren mit Chemotherapeutika dar. Vor allem die Expression der drei ABC-Transporter P-gp, MRP1 und BCRP spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der MDR. Außerdem beeinflussen sie aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens in physiologischen Barrieren und ihrer breiten Substraterkennung die Absorption, Distribution, Metabolisierung und Exkretion vieler Arzneistoffe.

Im Fokus dieser Arbeit steht die funktionelle Charakterisierung des ABC-Transporters BCRP. Um ein besseres Verständnis der Funktionsweise von BCRP zu erlangen, wurden unterschiedliche Ansätze verfolgt. Dazu war es nötig, neue Methoden zu etablieren und bekannte Methoden anzuwenden bzw. weiterzuentwickeln:

- Optimierung und Weiterentwicklung des Hoechst 33342-Assays an BCRP exprimierenden Zellen. Mit Hilfe dieses Testsystems sollen neben bekannten Verbindungen auch neu im Arbeitskreis synthetisierte Tariquidar-Analoga bezüglich ihrer Hemmwirkung gegenüber BCRP untersucht werden. Die erhaltenen Aktivitätswerte an BCRP sollen mit den Aktivitätswerten an P-gp verglichen werden, um herauszufinden, welche Strukturmerkmale die Interaktion mit P-gp und/oder BCRP begünstigen. Die Erstellung von 2D- und 3D-QSAR Modellen ermöglicht einen Einblick in den Zusammenhang zwischen Struktur und Wirkung.
- Etablierung und Weiterentwicklung eines HTS-fähigen Pheophorbid A-Assays am Durchflusszytometer. Mit Hilfe dieses BCRP-spezifischen Assays soll die biologische Wirksamkeit weiterer Modulatoren an BCRP bestimmt und mit den Ergebnissen aus dem Hoechst 33342-Assay verglichen werden.
- Screening weiterer Verbindungen, die strukturverwandt zu Tariquidar sind, bezüglich ihrer BCRP modulierenden Eigenschaften. Dabei liegt der Fokus auf dem Einfluss unterschiedlich substituierter Linker im Grundgerüst auf die Hemmwirkung gegenüber BCRP. Ein weiteres wichtiges Ziel der funktionellen Untersuchungen besteht darin, herauszufinden, ob möglicherweise auch nicht-basische Tariquidar-Analoga mit geringem Molekulargewicht zu einer

deutlichen Inhibition von BCRP führen. Auch hier sollen wesentliche Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet werden.

- Zur Bestimmung der Selektivität der Modulatoren sollen diese auch auf ihre inhibitorischen Eigenschaften gegenüber den beiden ABC-Transportern P-gp und MRP1 untersucht werden.
- Ein zentrales Motiv dieser Arbeit besteht in der Intention, potentielle Bindungsstellen von BCRP mit Hilfe der etablierten funktionellen Assays zu untersuchen und einen Einblick zu gewinnen, wie sich die möglichen Bindungsstellen gegenseitig beeinflussen. Ferner sollen mittels Kombinationsassays mögliche allosterische Effekte analysiert werden, um Rückschlüsse auf die gegenseitige Beeinflussung der Bindungsstellen ziehen zu können.
- Des Weiteren soll die Interaktion von Tyrosinkinaseinhibitoren mit BCRP näher charakterisiert werden. Kernpunkt dieser Untersuchung ist die potentielle Beeinflussung der BCRP Expression durch Tyrosinkinaseinhibitoren via PI3K/Akt-Signaltransduktionskaskade. Die Auswirkungen der Genregulation von ABCG2 durch die TKI soll sowohl auf Protein- als auch auf funktioneller Ebene nachgewiesen werden.

Die gewonnenen Erkenntnisse sollen zu einem besseren Verständnis der Funktionsweise von BCRP beitragen. Das Verständnis über den Zusammenhang zwischen Struktur und Wirkung der untersuchten BCRP Inhibitoren ermöglicht die Entwicklung neuer, potenterer Verbindungen. Eine bessere Vorstellung über die Beeinflussung der BCRP Funktion und der Genregulation via bestimmter Signaltransduktionswege, verbunden mit der zielgerichteten Synthese neuer Inhibitoren, kann dazu beitragen die durch ABC-Transporter vermittelte MDR in Zukunft wirksam zu bekämpfen.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden unter aseptischen Bedingungen an einer Werkbank mit laminarem Luftstrom kultiviert, um eine Kontamination mit Fremdstoffen oder Fremdorgansimen zu vermeiden.

Damit das eingesetzte Nährmedium die optimale Temperatur für das Arbeiten mit den Zellen erreicht, wurde es vor Beginn der Kultivierung ca. 15 min in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Zusammensetzung der einzelnen Nährmedien ist zelllinienspezifisch und wird in Kapitel 3.5 gesondert aufgeführt. Je nach benötigter Zellzahl wuchsen die Zellen in T175-Gewebekulturflaschen (175 cm² Fläche) oder in T75-Gewebekulturflaschen (75 cm² Fläche) bei 37°C unter 5% CO₂-Atmosphäre und einer relativen Luftfeuchte von 95%. Das Nährmedium musste alle zwei bis drei Tage erneuert werden, wobei die Häufigkeit von der Dichte des Zellrasens (Konfluenz) abhing. Für eine T75-Gewebekulturschale wurden 15-20 ml und für eine T175-Gewebekulturschale 25-30 ml des entsprechenden Nährmediums verwendet. Das im Medium vorhandene Phenolrot diente als Indikator zur Erneuerung des Nährmediums. Die aufgrund des Wachstums der Zellen während des Zitronensäurezyklus entstehenden Säuren und die damit verbundene Erniedrigung des pH-Wertes bewirken einen Farbumschlag des Indikators von rot nach gelb.

Erreichte der Zellrasen eine Konfluenz von 80-90%, wurden die Zellen "geerntet", d.h. sie wurden von der Oberfläche der Gewebekulturflaschen abgelöst. Dabei wurde das Nährmedium mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt. Anschließend wurde der Zellrasen in Abhängigkeit von der Größe der Gewebekulturschale mit 2 ml (T75) bzw. 3 ml (T175) PBS-Pufferlösung (Phosphatgepufferte-Kochsalzlösung, s. Kapitel 3.9.1) gespült, um den Ablösungsprozess behindernde Reste des Nährmediums zu entfernen. Im Anschluss daran wurde die gleiche Menge eines Trypsin-EDTA-Gemisches hinzu gegeben, um die Zellen von den Gewebekulturschalen abzulösen. Um eine rasche und optimale Ablösung der Zellen zu gewährleisten, wurden die Flaschen für einige Minuten bei 37°C im Inkubator gelagert. Die Einwirkzeit des Trypsins war zelllinienspezifisch und wird in Kapitel 3.5 näher beschrieben. Bei beginnender Ablösung der Zellen (mikroskopische Beobachtung) wurde durch

leichtes Klopfen der Zellkulturflasche gegen die Handinnenfläche der Ablösevorgang unterstützt. Nachdem die Zellen abgelöst waren, wurde durch Zugabe von 7 ml (T175) bzw. 8 ml (T75) Nährmedium das Volumen in der Gewebekulturschale auf 10 ml ergänzt. Mehrmaliges Auf- und Abpipettieren löste die restlichen Zellen vom Boden der Gewebekulturschale. Anschließend wurde die erhaltende Zellsuspension in ein 50 ml PP-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 221 g für 4 min bei 4°C zentrifugiert. Um das entstandene Zellpellet zu resuspendieren, wurde der Überstand abgesaugt und unter mehrmaligen Auf- und Abpipettieren mit 10 ml frischem Nährmedium versetzt. Von dieser homogenen Zellsuspension wurde das gewünschte Volumen in eine neue Gewebekulturschale überführt, die je nach Fläche entweder 15 ml (T75) oder 30 ml (T175) vorgelegtes Nährmedium enthielt. Die auszusäende Zellzahl wurde so gewählt, dass bis zur erneuten Passagierung 3-4 Tage vergingen.

Bei Durchführung eines Versuches (s. Kapitel 3.11 ff.) wurde die restliche Zellsuspension für die Zellzählung vorbereitet (s. Kapitel 3.10).

3.2 Inkulturnahme von Zellen

Die Lagerung der Zellen erfolgte in Aliquots in einem -80°C kalten Gefrierschrank oder in flüssigem Stickstoff. Zur Inkulturnahme der Zellen wurde ein eingefrorenes, kryokonserviertes Aliquot in einem 37°C temperierten Wasserbad aufgetaut und anschließend unter der sterilen Werkbank in eine mit 15 ml des entsprechenden Nährmediums gefüllte T75-Gewebekulturschale überführt. Um ein Anheften der Zellen am Boden der Gewebekulturschale zu gewährleisten, wurden die Zellen anschließend im Inkubator bei 37°C und einem CO₂ Gehalt von 5% gelagert. Nach ca. 24 h wurde das Nährmedium gewechselt, um das beim Einfrieren zugesetzte DMSO (**Dimethylsulfoxid**) zu entfernen.

3.3 Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen einer konfluenten T75- bzw. T175-Gewebekulturflasche wurden, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, geerntet. Das nach Zentrifugation erhaltene Zellpellet wurde in 1,8 ml (T75) bzw. 2,7 ml (T175) Nährmedium resuspendiert und mehrmalig auf-

und abpipettiert, um eine homogene Zellsuspension zu erhalten. Jeweils 900 µl der Zellsuspension wurden in je 2 (T75) bzw. 3 (T175) Kryoröhrchen überführt und zu diesen je 100 µl DMSO hinzugefügt. Der Zusatz von 10% DMSO bewirkt, dass eine die Zellmembran schädigende Kristallbildung beim Einfrieren der Zellen verhindert wird. Anschließend wurden die Zellen zunächst bei -80°C eingefroren, um dann in flüssigem Stickstoff dauerhaft gelagert zu werden.

3.4 Behandlung der Zellen mit Zytostatika

Alle Arbeiten mit Zytostatika wurden im Zytostatikalarbor unter der Leitung von Prof. Dr. U. Jaehde durchgeführt. Eine spezielle Werkbank mit Personenschutz erlaubte das Arbeiten mit den behandelten Zellkulturen. Auch die Lagerung der mit Zytostatika versetzten Gewebekulturschalen oder Mikrotiterplatten erfolgte in einem separaten Inkubator (37°C, 5% CO₂, 95% rel. Luftfeuchte). Der Umgang mit Zytostatika erfordert besondere Vorsichtsmaßnahmen. Die zu beachtenden Vorschriften sollen hier nicht näher behandelt werden und können den entsprechenden Literaturquellen entnommen werden.¹⁷¹

3.5 Zelllinien

3.5.1 MCF-7 Wildtyp und MCF-7 MX

Die Zelllinien MCF-7 und MCF-7 MX wurden dem Arbeitskreis freundlicherweise von Dr. E. Schneider (Wadsworth Center, Albany, NY, USA) überlassen. Bei der Zelllinie MCF-7 handelt es sich um eine humane Mammakarzinomzelllinie. Die Zelllinie MCF-7 MX geht ursprünglich auf die Zelllinie MCF-7 zurück. Sie wurde durch kontinuierliche Zugabe des Zytostatikums Mitoxanthron gegen dieses resistent gemacht. Die Zelllinien waren zu Beginn der Doktorarbeit bereits im Labor vorhanden und in ausreichender Menge kryokonserviert, so dass sie nur noch, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, in Kultur genommen werden mussten. Zur Aufrechterhaltung der Resistenz konnten die Zellen eine Passage lang mit Mitoxanthron in einer finalen Konzentration von 100 nmol/l behandelt werden. Die Passagierung der Zellen wurde

bis zur Passage 50 begrenzt. Bei Erreichen von Passage 50 wurden neue MCF-7 MX Zellen aus den Kryovials ausgefroren, da über diese Passage hinaus die Aufrechterhaltung des Resistenzgrades nicht mehr gewährleistet werden konnte. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in RPMI-1640 Medium mit einem Zusatz von 10% FKS (Fetales Kälberserum) und 1% P/S (Penicillin/Streptomycin) kultiviert. Zum Ablösen der Zellen mit Trypsin/EDTA reichten 3-5 min bei 37°C aus.

3.5.2 MDCK II (Madin-Darby Canine Kidney) Wildtyp und MDCK II BCRP

Der hier verwendete Subklon MDCK II wurde aus einer späteren Passage der MDCK Zelllinie, die aus der Niere von Hunden stammt, gewonnen und weist leicht veränderte Eigenschaften auf.¹⁷² Die Zelllinie MDCK II BCRP (im weiteren Verlauf der Arbeit als MDCK BCRP bezeichnet) wurde durch Transfektion mit humaner BCRP cDNA aus der sensitiven Zelllinie erhalten.^{113,173} Beide Zelllinien wurden uns dankenswerterweise von Prof. Dr. A. Schinkel (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Da diese beiden Zelllinien neu in den Arbeitskreis eingeführt worden sind, wurden sie zunächst vermehrt und in zahlreichen Kryovials (s. Kapitel 3.3) konserviert. Kultiviert wurden die Zelllinien in D-MEM Medium mit 10% FKS, 1% P/S und 1% L-Glutamin. Zum Ablösen der Zellen mussten diese für ca. 10 Minuten mit Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert werden. Die Passagierung wurde bei der transfizierten Zelllinie auf maximal 25 festgelegt, um den Resistenzgrad zu erhalten.

3.5.3 A2780 Wildtyp und A2780 Adr

Die Zelllinien A2780 und A2780 Adr wurden über die European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, Wiltshire, UK) bezogen. Die sensitive Zelllinie A2780 (ECACC No. 93112519) stammt aus einem humanen, epithelialen Ovarialkarzinom.¹⁷⁴ Die Zelllinie A2780 Adr (ECACC No. 93112520) wurde aus der sensitiven Zelllinie A2780 durch kontinuierliches Stressen mit dem Zytostatikum Doxorubicin erzeugt. Auch diese beiden Zelllinien waren zu Beginn der Arbeit in ausreichender Menge vorhanden. Zur Aufrechterhaltung der Resistenz wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen mit 100 nmol/l Doxorubicin behandelt. Auch hier

wurde die Passagierung auf max. Passage 50 begrenzt. Kultiviert wurden die Zellen in RPMI-1640 Medium mit einem Zusatz von 10% FKS und 1% P/S im Inkubator. Die Einwirkzeit des Trypsin/EDTA-Gemisches betrug ca. 3-5 min bei 37°C.

3.5.4 MDCK Wildtyp und MDCK MDR1

Die Zelllinie MDCK (ECACC No. 84121903) wurde in folgendem Nährmedium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert: D-MEM mit Zusatz von 10% FKS, 1% P/S und 1% L-Glutamin. Die Zelllinie MDCK MDR1, die durch Transfektion mit humaner P-gp cDNA gewonnen wurde, wurde wie die sensitive Linie MDCK behandelt. Hier wurde dem Nährmedium allerdings zusätzlich 200 µg/ml G-418 (Geneticindisulfat) zur Aufrechterhaltung der Resistenz zugesetzt. Diese beiden Zelllinien wurden von Prof. Dr. P. Borst (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Die Einwirkzeit des Trypsin/EDTA-Gemisches betrug ca. 10 min bei 37°C.

3.5.5 2008 Wildtyp und 2008 MRP1

Wie bei der Zelllinie A2780 handelt es sich auch bei der 2008 um eine humane Ovarialkarzinomzelllinie.¹⁷⁵ Die Zelllinie 2008 MRP1 wurde durch Transfektion mit humaner MRP1 cDNA aus der sensitiven Zelllinie erhalten. Transfiziert wurden die Zellen im Arbeitskreis von Prof. Dr. P. Borst^{176,177}, der auch diese Zellen freundlicherweise zur Verfügung stellte. Kultiviert wurden die Zelllinien in RPMI-1640 Medium mit 10% FKS und 1% P/S. Zum Ablösen der Zellen mussten diese für ca. 5 Minuten mit Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert werden. Die Passagierung wurde bei den transfizierten Zelllinien auf maximal 25 festgelegt, um den Resistenzgrad zu erhalten.

3.5.6 Cal-27 Zelllinie

Die humane Zungenkarzinomzelllinie Cal-27 wurde über die DSMZ (**D**eutsche **S**ammlung von **M**ikroorganismen und **Z**ellkulturen, Braunschweig, Deutschland)

bezogen. Die Zelllinie (DSMZ Nr.: ACC 446) wurde 1982 aus einem wenig differenzierten squamös-zelligen Zungenkarzinom eines 56-jährigen Mannes vor der Behandlung etabliert.¹⁷⁸ Die Cal-27 Zelllinie wurde zur Untersuchung des **Endothelin Growth Factor Receptors** (EGFR) herangezogen, da fast 97% der Kopf-Hals-Tumore EGFR überexprimieren.¹⁷⁹ Die adhären wachsende Zelllinie wurde in D-MEM Medium unter Zusatz von 10% FKS, 1% P/S und 1% L-Glutamin kultiviert. Zum Ablösen der Zellen mussten diese für ca. 5 Minuten mit Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert werden.

3.6 Materialien für das Arbeiten mit Zellen

Materialien	Hersteller, Firma	Artikelnummer
1.5 Natural Flat Cap Microcentrifuge Tubes	Sarstedt	72690001
1,5 Amber Flat Cap Microcentrifuge Tubes	Starlab	S16155107
5 ml Polystyrene Round-bottom Tube 12 x 75 mm, steril	Becton Dickinson	352054
1000-5000 µl Bulk, Natural Pipette Tips	Starlab	I1009-5000
Black Microwell SH 96-Well, untreated	Nunc	237108
CASY [®] ton Lösung	Schärfe System	43001
Cellstar [®] Tissue Culture Flasks, 25 cm ² , steril, filter Cap	Greiner bio-one	658175
Conical Test Tube PP 15 ml, steril	nerbeplus GmbH	025027001
Conical Test Tube PP 50 ml, steril	nerbeplus GmbH	025707001
Cryo.s PP with screw cap, sterile	Greiner bio-one	123263
FACS-Testtubes	Sarstedt	551579
FACSClean [™]	Becton Dickinson	340345
FACSFlow [™]	Becton Dickinson	342003
FACSRinse [™]	Becton Dickinson	340346
Fetales Kälberserum	Sigma	F 7524
Genitacin (G418)	GIBCO	11811-064
L-Glutamine 200 mmol/l	Sigma	G 7513
Membranfilter 0,2 µm, steril	Whatman	10462200
Nährmedium D-MEM 5671	Sigma	M 5650
Nährmedium RPMI-1640	PAN Biotech GmbH	P0416500

3 Material und Methoden

Materialien	Hersteller, Firma	Artikelnummer
Penicillin-Streptomycin Lösung	Sigma	P0781
PS Microplatte 96-Well, nicht steril, F-bottom	Greiner bio-one	655101
PS Microplatte 96-Well, nicht steril, U-bottom	Greiner bio-one	650001
Serological Pipette 10 ml, steril	Sarstedt	861254001
Serological Pipette 25 ml, steril	Sarstedt	861685001
TipOne 0,1-5 µl Natural Pipette Tips	Starlab	S1111-3000
TipOne 1-200 µl Yellow Pipette Tips	Starlab	S1111-0006
TipOne 101-1000 µl Natural Pipette Tips	Starlab	S1111-2020
Tissue Culture Flasks, 75 cm ² , steril, filter Cap	Sarstedt	831813002
Tissue Culture Flasks, 175 cm ² , steril, filter Cap	Sarstedt	831812002
Tissue Culture Plate 6-Well, flat bottom with lid, sterile	Sarstedt	831839
Tissue Culture Plate 96-Well, flat bottom with lid, sterile	Sarstedt	831835
Trypsin-EDTA-Lösung	PAN Biotech GmbH	P100231SP

3.7 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller, Firma	Artikelnummer
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma	A 7906
Calcein-AM	Calbiochem	206700
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck	P4901
Cetuximab	Geschenk der Uniklinik Bonn	
Cobalt(II)sulfat-heptahydrat	Merck	102546
Cyclosporin A	Sigma	C3662
D-Glucose-Monohydrat	Merck	1040740500
Diltiazem	Sigma	D 2521
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Acros	AC19773
Dithiothreitol	Applichem	A2948
Doxorubicin	Fluka	44583
Erlotinib	LC Laboratories	E 4007

3 Material und Methoden

Chemikalie	Hersteller, Firma	Artikelnummer
FITC anti-human P-Glycoprotein (MDR) mouse IgG2b	PharMingen Becton	557002
FITC-labeled goat anti-mouse Ig antibody	Sigma	K6070
Gefitinib	LC Laboratories	G 4408
HEPES freie Säure	Applichem	A3707
Hoechst 33342	Sigma	B 2261
Imatinib	Geschenk der Merlin-Apotheke, Bonn	
Indometacin	Sigma	I7378
Kaliumchlorid	Merck	1.04936
Kaliumdihydrogenphosphat	Applichem	A3095
Ko143	Tocris	3241
Luciferase	Invitrogen	A22066
Luciferin	Invitrogen	A22066
LY294002	Biozol	70920
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Applichem	A4101
Melsept SF	Braun	18907
Methanol	Merck	107018
Mitoxantron	Sigma	M 6545
MK571	Biozol	70720
Natriumazid	Fluka	71290
Natriumchlorid	Merck	106404
Natriumorthovanadat	Aldrich	450243
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Applichem	A4732
Natriumhydroxid Maßlösung 1 mol/l	Grüssing	22195
Nicardipin	Sigma	N 7510
Nilotinib	LC Laboratories	N 8207
Normal Goat Serum	Sigma	K 9080
Novobiocin	Sigma	N 1628
PD153035	Tocris	1037
PD158780	Tocris	2615
Pheophorbid A	Frontier Scientific Inc.	15664296
PE-conjugated mouse monoclonal anti-human Bcrp1/ABCG2 IgG _{2B}	R&D Systems	FAB995P
Phycoerythrin-conjugated mouse monoclonal anti-human EGFR IgG _{2A}	R&D Systems	FAB10951P

3 Material und Methoden

Chemikalie	Hersteller, Firma	Artikelnummer
Primary anti-human BCRP monoclonal BXP-21 antibody	Abcam	ab3380
Progesteron	Sigma	P 01030
Reserpin	Sigma	R 0875
Salzsäure Maßlösung 1 mol/l	Grüssing	23204
Triton-X-100	Sigma	T 9284
Tyrphostin AG	LC Laboratories	T 3655
Verapamil HCl	Sigma	V 4629

3.8 Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller, Firma	Seriennummer
Accu-Jet	Brand	0441938
CASY [®] 1 Modell TT	Schärfe System	SC1 TT
CO ₂ Air Jacketed Incubator	IBS Integra Bioscience	98313042705
FACSCALIBUR	Becton Dickinson	E3231
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200	Zeiss	3819001929
FLUOstar Optima	BMG Lab Technologies	4131164
FLUOstar Optima	BMG Lab Technologies	4132279
Laborzentrifuge Universal 32R	Hettrich Zentrifugen	00026200100
Laborzentrifuge Universal 320R	Hettrich Zentrifugen	00009990100
Mikroskop Wilovert Standard	Hund Wetzlar	90110180
pH-Meter 744	Metrohm	20506
Pipette 0,1-2,5 µl	Eppendorf	3638475
Pipette 2-20 µl	Eppendorf	3407866
Pipette 20-200 µl	Eppendorf	3534296
Pipette 100-1000 µl	Eppendorf	4741196
Pipette 500-5000 µl	Eppendorf	3615095
POLARstar Galaxy	BMG Lab Technologies	4030639
RH basic Magnetrührer	IKA Labortechnik	03061661
Sicherheitswerkbank Safe 2010	Holten LaminAir	30406338
Transferpipette -87-12, 10-200 µl	Brand	08E12592
Vakuumpumpe BVC21	Vacuubrand	28806907288084
Vortexschüttler Minishaker	IKA-Works Inc.	03147200
Wasserbad Typ 1083	GFL	11530203

3.9 Pufferlösungen

3.9.1 Phosphatgepufferte-Kochsalzlösung pH 7,4 (PBS)

Zum Spülen der Zellen wurde in der Regel PBS-Puffer (phosphatgepufferte Kochsalzlösung = phosphate buffered saline) verwendet. Des Weiteren diente der Puffer als Grundlage zur Herstellung weiterer Lösungen. Der pH-Wert von 7,4 wurde mit Hilfe 0,1 mol/l Natronlauge eingestellt. Vor Gebrauch wurde die Lösung bei 121°C und 2 bar Druck 20 min autoklaviert und danach im Kühlschrank aufbewahrt. In Tabelle 3.1 sind die Inhaltsstoffe des PBS-Puffers mit Molekulargewicht und Einwaagen aufgeführt:

Tabelle 3.1: Zusammensetzung Phosphatgepufferte-Kochsalzlösung pH 7,4 (PBS).

Substanz	Molare Masse [g/mol]	Einwaage [g]
Natriumchlorid	58,44	8,0
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	177,99	1,4
Kaliumdihydrogenphosphat	136,09	0,2
Kaliumchlorid	74,55	0,2

Die entsprechenden Mengen wurden in ein Glasgefäß gegeben und mit destilliertem Wasser auf 1000,0 ml aufgefüllt.

3.9.2 Krebs-HEPES-Puffer pH 7,4 (KHP)

Die meisten Zellversuche wurden in Krebs-HEPES-Puffer (KHP) durchgeführt. KHP besitzt im Gegensatz zum Nährmedium den entscheidenden Vorteil, dass seine Zusammensetzung frei von störenden Enzymen und Farbstoffen ist und die Zellen mittelfristig am Leben erhält.

KHP wurde als fünffach Puffer (5x) auf Vorrat hergestellt. In Tabelle 3.2 ist die Zusammensetzung mit Molekulargewicht und Einwaagen von KHP 5x aufgeführt.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung Krebs-HEPES-Puffer pH 7,4 (KHP).

Substanz	Molare Masse [g/mol]	Einwaage [g]
Natriumchlorid	58,44	17,330
Kaliumchlorid	74,55	0,876
Kaliumdihydrogenphosphat	136,09	0,408
Natriumhydrogencarbonat	84,01	0,882
D-Glucosemonohydrat	198,17	5,796
HEPES (freie Säure)	238,30	5,958

Die entsprechenden Mengen der oben aufgeführten Substanzen wurden in einen 500 ml-Messkolben eingewogen, mit destilliertem Wasser bis zu einem Volumen von etwa 450 ml aufgefüllt und der pH-Wert mit 1,0 mol/l Natronlauge 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 wurden 100,0 ml der 5x-Lösung aufgetaut, in einen 500 ml-Messkolben gegeben und mit 650 µl einer 1 mol/l Calciumchlorid-Lösung (1,47 g Calciumchloriddihydrat in 10 ml dest. Wasser gelöst) versetzt. Danach wurde der Messkolben mit etwa 400 ml destilliertem Wasser gefüllt. Anschließend wurden 600 µl einer 1 mol/l Magnesiumsulfatheptahydrat-Lösung (2,465 g Magnesiumsulfatheptahydrat in 10 ml dest. Wasser gelöst) hinzugefügt und mit destilliertem Wasser auf 500,0 ml ergänzt. Die 500 ml konnten beliebig aliquotiert werden und wurden bei -20°C gelagert. Vor Verwendung des Puffers in Versuchen wurde dieser steril filtriert.

3.10 Bestimmung der Zellzahl mittels Casy Modell TT

Die Zellzahl wurde mit dem CASY[®]1 Modell TT System von der Firma Schärfe bestimmt. Das CASY[®]1 System (**C**ell Counter **A**nalyser **S**ystem) verbindet das Verfahren der Widerstandsmessung für Partikel ("Coulter-Counter") mit einer modernen Signalauswertung (Pulsflächenanalyse). Dazu wurden 20 µl der vorbereiteten Zellen (s. Kapitel 3.1) in 10 ml einer steril filtrierten CASY[®]ton-Elektrolytlösung überführt und durch leichtes Schwenken verteilt. Bei der Messung wird die Lösung mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Kapillare

definierten Durchmessers (150 μm) und definierter Länge transportiert. Während der Messung wird über zwei Elektroden eine Spannung an die Kapillarstrecke angelegt und der Widerstand gemessen. Unter den hier herrschenden Bedingungen eines konstanten Stromflusses sind Spannung und Widerstand zueinander proportional. Die Widerstandsänderung beim Durchtritt von Zellen durch die Messkapillare, die im Gegensatz zur reinen Elektrolytlösung keine leitenden Eigenschaften besitzen, führt zu einer Widerstandserhöhung, die proportional zur Fläche der Zellen ist. Dieses Messsignal wird mit einer Frequenz von 1 MHz abgetastet, so dass nicht nur die Amplitude, die der Zellzahl entspricht, sondern der gesamte Verlauf des Signals erfasst wird. Aus diesen vielen Einzelmessungen pro Zelle berechnet CASY[®]1 das Integral der Messsignale (Pulsflächenanalyse) und ermittelt anhand dieser Werte das Volumen einer einzelnen Zelle. Durch die Messung vieler Zellen lassen sich auf diese Weise die Zelldichte und die Größenverteilung einer Zellkultur bestimmen. 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.

Mit Hilfe dieses Systems kann auch der Anteil toter Zellen bestimmt werden. Tote Zellen besitzen ein scheinbar kleineres Volumen, da die Plasmamembran keine isolierenden Eigenschaften mehr besitzt. Die Kernmembran ist dagegen noch intakt und stellt einen elektrischen Widerstand dar, so dass der Zellkern ein elektrisches Signal bei Durchtritt durch die Kapillare erzeugt, das seinem Volumen entspricht und deshalb entsprechend kleiner als das Signal intakter Zellen ist. Für den eigentlichen Messbereich wurde die untere Messgrenze auf 8 μm und die obere Messgrenze auf 40 μm festgelegt. So werden Zelltrümmer (kleiner als 8 μm) von der Messung ausgeschlossen. Zellagglomerate, die einen Durchmesser größer als 40 μm besitzen und auf eine unzureichende Vereinzelung der Zellen zurückzuführen sind, wurden bei der Zählung ebenfalls nicht berücksichtigt.

3.11 ATP-Assay

3.11.1 Grundlagen zum ATP-Assay

Der ATP-Assay beruht auf dem Prinzip der (Bio-)lumineszenzmessung. Als Biolumineszenz bezeichnet man das Phänomen der Lichterzeugung durch Lebewesen. Sie ist das Ergebnis von biochemischen Reaktionen in Zellen, bei denen die chemische Energie in Form von Lichtquanten abgegeben wird. Die bekanntesten Beispiele sind Leuchtkäfer ("Glühwürmchen"), Leuchtquallen und Einzeller, die für das Meeresleuchten verantwortlich sind. Die biologische Funktion ist vielfältig. Die Leuchtsignale werden zur Partnerwerbung, Kommunikation, Täuschung und als Köder eingesetzt.

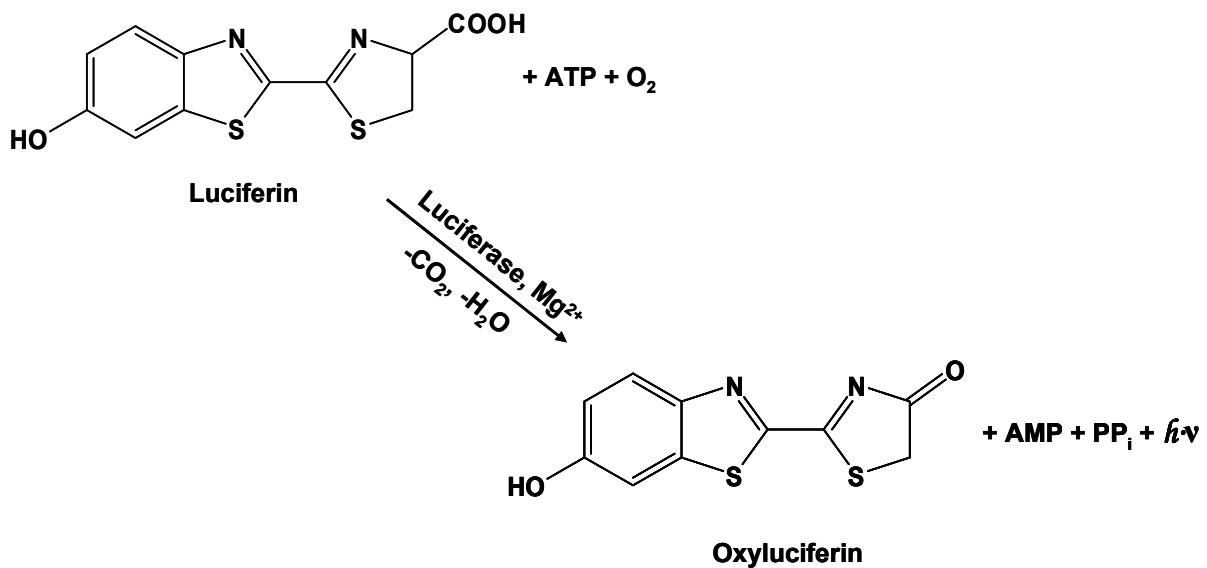


Abb. 3.1: Prinzip des ATP-Assays: Umwandlung von D-Luciferin durch das Enzym Luciferase in Gegenwart von Mg²⁺-Ionen, Sauerstoff und ATP. Entstehung von AMP, Pyrophosphat und einem Lichtquant.

An der Lichterzeugung sind Luciferasen beteiligt. Luciferasen sind Enzyme, die die Oxidation eines Substrates wie z.B. Luciferin mit molekularem Sauerstoff, ATP und Magnesiumionen zu Oxyluciferin katalysieren, wobei ein nicht-stabiler, angeregter Übergangszustand erzeugt wird, der unter Abgabe von Licht in einen stabilen Zustand übergeht (s. Abb. 3.1). Luciferasen können in entsprechend aufgebauten Nachweissystemen zusammen mit Luciferinen zum hochspezifischen und für

minimale Mengen geeigneten qualitativen und quantitativen Nachweis von ATP (Nachweisgrenze 10^{-11} Mol) eingesetzt werden. Das durch die Lumineszenz emittierte Licht ist dabei proportional zur ATP-Menge. Da ATP die universelle Form unmittelbar verfügbarer Energie in jeder Zelle und gleichzeitig ein wichtiger Regulator energieliefernder Prozesse ist, lässt der ATP-Gehalt einer Zelle Rückschlüsse auf die Zellvitalität zu.^{180,181}

3.11.2 Durchführung

Bei einer Konfluenz von ungefähr 80-90% wurden die in T75 oder T175 kultivierten Zellen, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, geerntet und gezählt (Kapitel 3.10). Die Zellen wurden mittels Multikanalpipette in weiße sterile 96er-Mikrotiterplatten mit klarem Boden überführt, so dass 10.000 Zellen in einem Volumen von 90 μ l in jedem Well enthalten waren. Um die Anheftung der Zellen am Boden der Mikrotiterplatte zu gewährleisten, wurde diese daraufhin für ca. 4 h im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ belassen. Anschließend wurden die Zellen mit 10 μ l der jeweils zu untersuchenden Substanzen in den entsprechenden Konzentrationen versetzt (immer mindestens 2 Wells mit identischen Konzentrationen), so dass ein Endvolumen von 100 μ l pro Well resultierte. Als Kontroll- bzw. Nullwert diente das jeweilige Lösungsmittel der Substanzen bzw. KHP. Wegen der stärker ausgeprägten Verdunstung wurden die außen lokalisierten Vertiefungen der Mikrotiterplatte nur mit KHP befüllt und nicht in die Messung mit einbezogen. Die Platten wurden bei 37°C, 5% CO₂ für 72 h inkubiert. Um ATP aus den Zellen freizusetzen, wurden die Zellen nach der Inkubationsphase mit einer 10%igen Triton[®]X-100 Lösung (in PBS) lysiert. In jedes Well der Mikrotiterplatte wurden 10 μ l des Lyseagenses mit Hilfe einer Multikanalpipette gegeben und für die Dauer von ca. 15 min im Inkubator platziert, um den Lysevorgang zu unterstützen.

Zur Detektion des zellulären ATP-Gehalts wurde das *ATP Determination Kit* (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland), welches das Standardreaktionsgemisch zur Durchführung des ATP-Assays enthält, verwendet. Nach erfolgter Zelllyse wurde die Mikrotiterplatte in dem auf 28°C temperierten FLUOstar Optima Microplatereader vermessen.

Tabelle 3.3: Komponenten des Standardreaktionsgemisches zur Durchführung des ATP-Assays.

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

¹10 ml Reaktionspuffer enthalten: 500 mM Tricin, 100 mM Mg₂SO₄, 2 mM EDTA, 2 mM Natriumazid.

Mit Hilfe des Pumpsystems des Microplateraders wurden jeweils 50 µl Standardreaktionsgemisch zu den einzelnen Wells pipettiert. Das Standardreaktionsgemisch musste unter Lichtschutz aufbewahrt werden und enthielt die in Tabelle 3.3 angegebenen Komponenten. Die Test-Parameter des FLUOstar Optima Microplateraders wurden wie in Tabelle 3.4 festgelegt.

Tabelle 3.4: Testparameter für den ATP-Assay im FLUOstar Optima Microplaterader.

Anzahl der Zyklen	150
Messzeit pro Zyklus	0,10 s
Gesamtmesszeit pro Well	8 s
Anzahl der Lichtblitze	10 s ⁻¹
Intervallzeit zwischen zwei Reihen	0,5 s
Vermessung der Mikrotiterplatte	horizontal
Required Value	40 %
Gain	4095
Scan-Modus	Well
Injektionsvolumen pro Well	50 µl

3.11.3 Datenanalyse

Die Bearbeitung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism[®] 5.01. Die ermittelten, maximalen Lumineszenzwerte wurden gegen die logarithmierten Konzentrationen der zu untersuchenden Substanz aufgetragen. Die so erhaltene sigmoidale Kurve wurde mit Hilfe der 4-Parameter-logistischen-Gleichung (vergl. Kapitel 3.18.1)

analysiert und der IC₅₀-Wert ermittelt. Der IC₅₀-Wert gibt den Wert an, bei dem die Hälfte des maximalen Effekts, in diesem Fall die Zellvitalität bzw. Toxizität der Substanz, erreicht wird. Bei Verbindungen, bei denen keine gesamte Konzentrations-Effektkurve aufgenommen wurde, ist der mittels KHP bestimmte Nullwert mit 100% Zellvitalität gleichgesetzt worden. Die bei der eingesetzten Konzentration der untersuchten Substanzen ermittelten Lumineszenzwerte wurden entsprechend normalisiert.

3.12 Hoechst 33342-Assay

3.12.1 Grundlagen zum Hoechst 33342-Assay

Das Bisbenzimidazolderivat Hoechst 33342 besitzt die Eigenschaft sich in die kleine Furche der DNA, besonders innerhalb Adenin-Thymin-reicher Sequenzen einzulagern ohne zu interkalieren.^{182,183,184} Aufgrund dieser Eigenschaft und wegen der Eigenfluoreszenz dieser Verbindung (Exzitationsmaximum von 340 nm, Emissionsmaximum von 450 nm)¹⁸⁵ wird Hoechst 33342 häufig zur Markierung der DNA eingesetzt.¹⁸⁶

Zwei physikochemische Eigenschaften der Substanz ermöglichen die Durchführung des Assays: Die hohe Lipophilie von Hoechst 33342 bewirkt ein leichtes Überwinden der Zellmembran in den Intrazellulärraum. Des Weiteren ist die Fluoreszenzintensität stark von dem Milieu abhängig, in dem sich die Verbindung befindet. Nach Shapiro und Ling bewirkt die Einlagerung von Hoechst 33342 in die DNA oder auch der Eintritt in die Plasmamembran im Vergleich zum wässrigen Milieu eine ausgeprägte Zunahme der Fluoreszenz um den Faktor 750 bis 1500.^{187,188}

Hoechst 33342 ist sowohl ein P-gp als auch ein BCRP Substrat und eignet sich daher zur funktionellen Charakterisierung beider Transporter.^{45,189} Hoechst 33342 kann also von beiden untersuchten Transportproteinen als Substrat erkannt und aus der Zelle hinaus geschleust werden, so dass im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp deutlich weniger Hoechst 33342 in die Zelle gelangt.

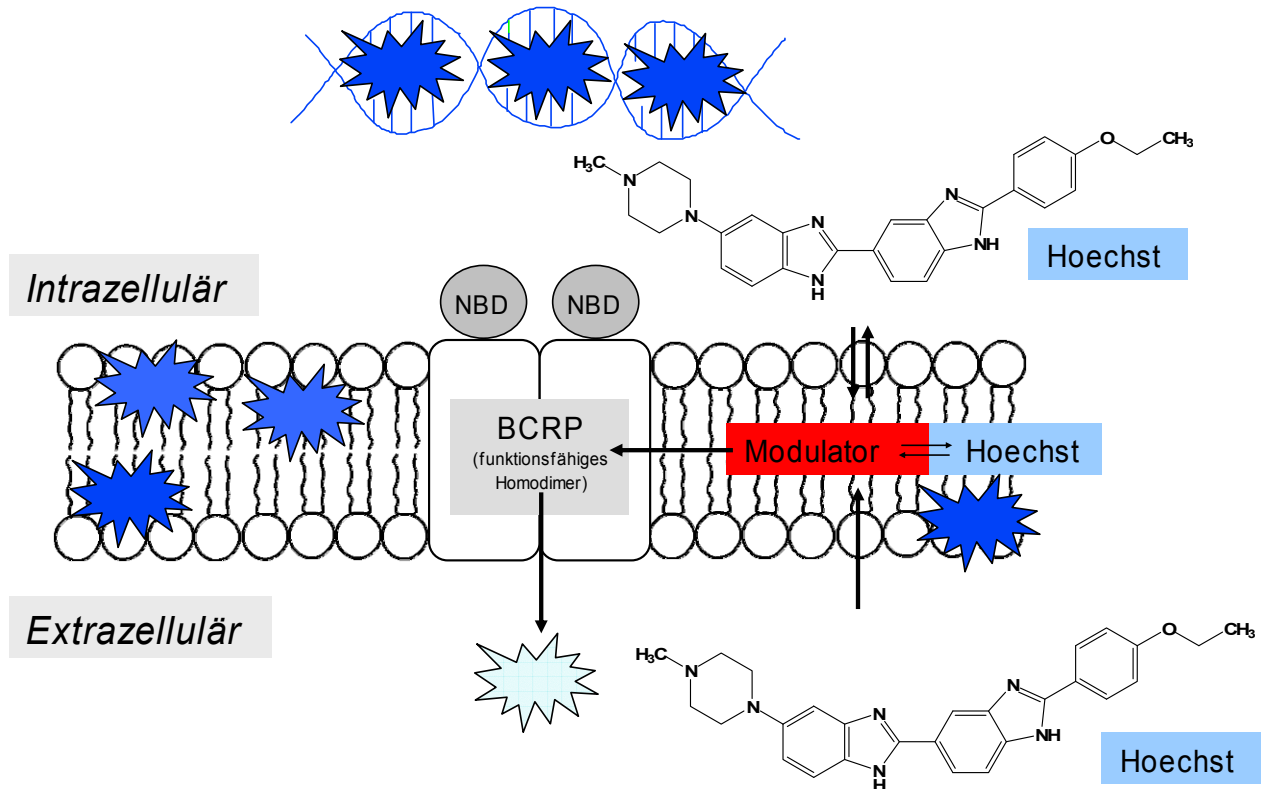


Abb. 3.2: Prinzip des Hoechst 33342-Assays an BCRP.

Gibt man nun einen Modulator des entsprechenden Transportproteins hinzu, wird dieses gehemmt. Dadurch kann mehr Hoechst 33342 in die Zelle gelangen und es kommt zu einem von der Modulatorkonzentration abhängigen Fluoreszenzanstieg in der Zelle (vergl. Abb. 3.2). Der Anstieg der Hoechst 33342-Fluoreszenz folgt einer Reaktionskinetik erster Ordnung und verläuft daher hyperbolisch.¹⁹⁰

3.12.2 Durchführung

Die verschiedenen Zelllinien (A2780, A2780 Adr, MDCK, MDCK MDR1, MCF-7, MCF-7 MX, MDCK II und MDCK BCRP) wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 80-90% kultiviert und, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, geerntet und gezählt (Kapitel 3.10). Für eine 96er-Mikrotiterplatte wurden 3 Millionen Zellen (A2780, A2780 Adr, MDCK, MDCK MDR1) bzw. 4 Millionen Zellen (MCF-7, MCF-7 MX, MDCK II und MDCK BCRP) verwendet.

Das entsprechende Volumen der Zellsuspension wurde aus dem 50 ml PP-Zentrifugneröhrchen in ein 1,5 ml Eppendorfcap überführt. Nach Zentrifugation (7840

g, Shortspin) wurde das Nährmedium entfernt und, ohne das Zellpellet zu beschädigen, durch 1 ml KHP ersetzt. Dann folgten drei Waschschrte, wobei das Pellet jeweils mit 1 ml KHP durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert und dann wieder zentrifugiert wurde (7840 g, Shortspin). In eine Ausplattierschale wurde für jeweils eine 96er-Mikrotiterplatte 9 ml KHP vorgelegt und in diese die Zellsuspension überführt. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Multikanalpipette durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gleichmäßig verteilt. Pro Well wurden 90 µl der Zellsuspension mit Hilfe der Transferpipette in eine schwarze 96er-Mikrotiterplatte nach dem in Abb. 3.3 dargestellten Schema pipettiert.

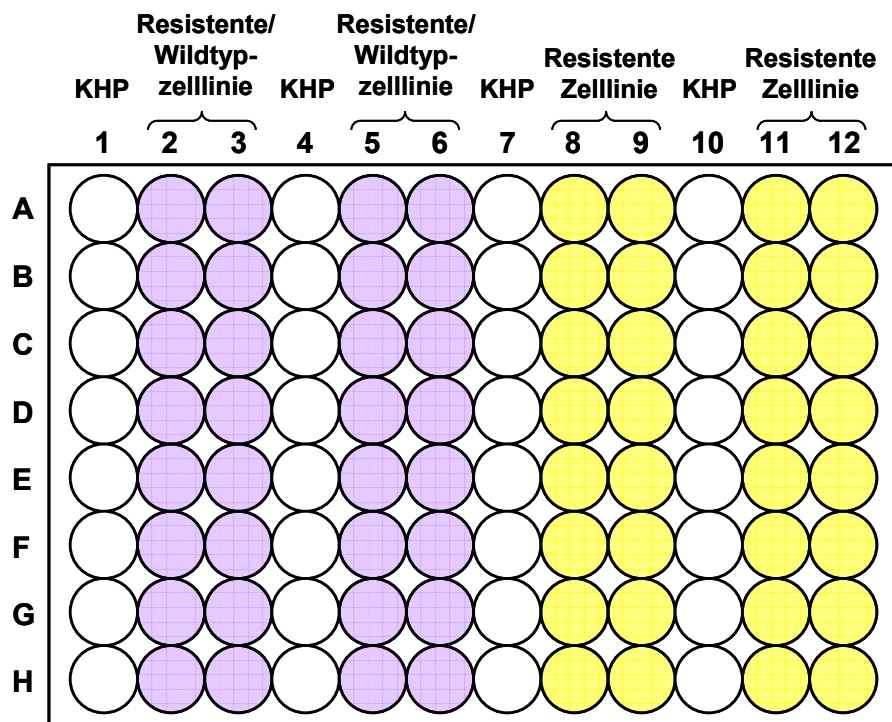


Abb. 3.3: Pipettierschema eines standardmäßigen Hoechst 33342-Assays. Je nach Versuchsanordnung konnten die Reihen 2, 3 und 5, 6 durch die Wildtypzelllinie ersetzt werden. Die weiß dargestellten Vertiefungen der Mikrotiterplatte enthielten nur Puffer und Modulatoren. Die lila bzw. gelben Wells waren dagegen mit Zellen und Modulatoren versehen.

Die Reihen 2, 3, 5, 6, sowie 8, 9, 11 und 12 der Platte wurden mit der Zellsuspension versetzt, während in die übrigen Reihen die gleiche Menge KHP gefüllt wurde (s. Abb. 3.3). Danach erfolgte die Zugabe der Testsubstanzen. Dabei wurden 10 µl einer Modulatorkonzentration in jeweils drei Vertiefungen (Triplets) der Mikrotiterplatte pipettiert (pro Modulatorkonzentration ein Well ohne und zwei Wells mit Zellen), so dass ein Endvolumen von 100 µl pro Well resultierte. Als Kontroll- bzw. Nullwert

diente das jeweilige Lösungsmittel der Substanzen bzw. KHP. Anschließend erfolgte eine 30 minütige Inkubation bei 37°C, 5% CO₂.

Nach Beendigung der Inkubationsphase erfolgte die Zugabe der Hoechst 33342-Lösung. Dazu wurde aus einer 1 mmol/l Stammlösung durch Verdünnen mit Wasser zunächst eine 0,1 mmol/l Lösung hergestellt. Von dieser Lösung wurden 180 µl in ein 15 ml Falcon pipettiert, der 2820 µl Wasser enthielt und mit Hilfe eines Vortexers gut durchmischt. Mittels Multikanalpipette wurden 20 µl dieser Lösung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert, so dass in jedem Well eine Endkonzentration von 1 µmol/l Hoechst 33342 resultierte. Das Gesamtvolumen pro Well betrug 120 µl. Daraufhin wurden die Mikrotiterplatten in die Fluoreszenzreader gestellt und die Fluoreszenz von Hoechst 33342 bei einer Exzitationswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm über einen Zeitraum von 7200 Sekunden im Abstand von 60 Sekunden vermessen. Die weiteren Testparameter wurden wie in Tabelle 3.5 beschrieben festgelegt.

Tabelle 3.5: Einstellungen der Microplatereader für den Hoechst 33342-Assay am Beispiel des FLUOstar Optima.

Anzahl der Zyklen	120
Zyklusdauer	60 s
Anzahl der Lichtblitze	10 s ⁻¹
Intervallzeit zwischen zwei Reihen	0,2 s
Vermessung der Mikrotiterplatte	horizontal
Required Value	20 %
Gain	1800
Scan-Modus	Plate

3.12.3 Datenanalyse

Für die Datenanalyse wurde zunächst ein Microsoft[®] Excel Auswertungssheet erstellt, welches die im Puffer ermittelten Fluoreszenzwerte (Hintergrundfluoreszenz) von den entsprechenden Daten mit Zellen subtrahiert. Die resultierenden Fluoreszenzwerte wurden in das Programm GraphPad Prism[®] 5.01 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-Effektkurve wurden die erhaltenen Y_{\max} -Werte dieser Kurven gegen die korrespondierende logarithmierte Modulator- bzw. Substratkonzentrationen aufgetragen. Alternativ konnten auch die initialen Anstiege der einzelnen Fluoreszenz-Zeit-Verläufe analysiert werden. Als Zeitraum wurde der Bereich zwischen 60 und 1000 s gewählt, da hier eine Reaktionskinetik pseudonullter Ordnung vorlag und die initialen Anstiege daher linear verlaufen. Die Steigungen wurden gegen die korrespondierenden logarithmierten Konzentrationen aufgetragen und mittels der 4-Parameter-logistischen-Gleichung eine sigmoidale Konzentrations-Effektkurve erstellt. (vgl. Kapitel 3.18.1).

3.12.4 Kombinationsassay mit zwei Modulatoren

Bei der Durchführung eines Kombinationsexperimentes wurden zwei Testsubstanzen gleichzeitig verwendet. Die gezählten, homogenisierten Zellen wurden in einer Ausplattierschale, die 9 ml KHP enthielt, gleichmäßig verteilt. Mit Hilfe einer Transferpipette wurden 80 μ l Zellsuspension in jedes Well einer 96er-Mikrotiterplatte pipettiert. Danach wurden 10 μ l der ersten Testsubstanzlösung hinzu pipettiert und die Platte 15 min bei 37°C, 5% CO₂ vorinkubiert. Anschließend wurden 10 μ l der zweiten Testsubstanzlösung in der entsprechenden Konzentration zu jedem Well hinzugefügt, so dass sich ein Endvolumen von 100 μ l ergab. Der erste Modulator wurde in der Regel in vertikaler Richtung hinzugegeben, die Zugabe des zweiten Modulators erfolgte in horizontaler Richtung. Die in Abb. 3.3 gezeigten Reihen ohne Zellen entfielen, so dass mehr Konzentrationen auf die Platte aufgetragen werden konnten. Wie in Kapitel 3.12.2 erläutert, wurde die 96er-Mikrotiterplatte für 30 min in den Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ gestellt und nach Zugabe von 20 μ l Hoechst 33342-Lösung die Fluoreszenz unmittelbar vermessen. Die verwendeten Einstellungen für die Fluoreszenzmessgeräte gleichen denen für den oben beschriebenen Standardassay (Tabelle 3.5). Die erhaltenen Daten wurden direkt in das Programm GraphPad Prism[®] 5.01 transferiert, und, wie in Kapitel 3.12.3 beschrieben, analysiert.

3.13 Calcein AM-Assay

3.13.1 Grundlagen

Calcein-Acetoxymethylester (Calcein-AM) ist eine nicht fluoreszierende Vorstufe des Fluoreszenzfarbstoffs Calcein. Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaft kann der Ester leicht Zellmembranen überwinden. Intrazellulär wird aus Calcein-AM durch unspezifische Esterasen das Calcein-Anion freigesetzt, welches eine starke grüne Fluoreszenz zeigt. Die dabei entstehenden Carbonsäurefunktionen bewirken aufgrund der vierfach negativen Ladung eine deutliche Zunahme der Hydrophilie, so dass das Calcein-Anion die Zellmembran nur noch durch aktiven Transport überwinden kann. Calcein-AM ist ein Substrat sowohl von P-gp als auch von MRP1^{191,192,193}, während das Calcein-Anion nur für MRP1 ein wenn auch deutlich schlechteres, Substrat darstellt.¹⁹⁴ Die Durchführung des Calcein AM-Assays an MRP1 wird in Kapitel 3.13.3 näher erläutert.

Wird Calcein-AM von P-gp als Substrat erkannt, wird es aus der Zelle hinaus geschleust, so dass im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp deutlich weniger Calcein-AM in die Zelle gelangt und somit auch weniger Calcein-AM in das fluoreszierende Anion umgewandelt werden kann. Die Anwesenheit eines Modulators hemmt das Transportprotein. Dadurch kann mehr Calcein-AM in die Zelle gelangen und es kommt zu einem von der Modulatorkonzentration abhängigen Fluoreszenzanstieg in der Zelle (s. Abb. 3.4).^{193,194,195}

Die Bildung des Calcein-Anions ist dabei zum einen abhängig von der Diffusionsgeschwindigkeit des Esters durch die Zellmembran und zum anderen von der Hydrolyse-Geschwindigkeit der Esterasen, die, wie bei den meisten Enzymen, einer Michaelis Menten Kinetik folgt. Die Konzentration des Modulators bleibt während der Messung konstant, während die Konzentration des Esters abnimmt. Da nur einer der beiden Reaktionspartner seine Konzentration verändert, kann eine Reaktionskinetik erster Ordnung angenommen werden, die einen exponentiellen Anstieg der Fluoreszenz verursacht.

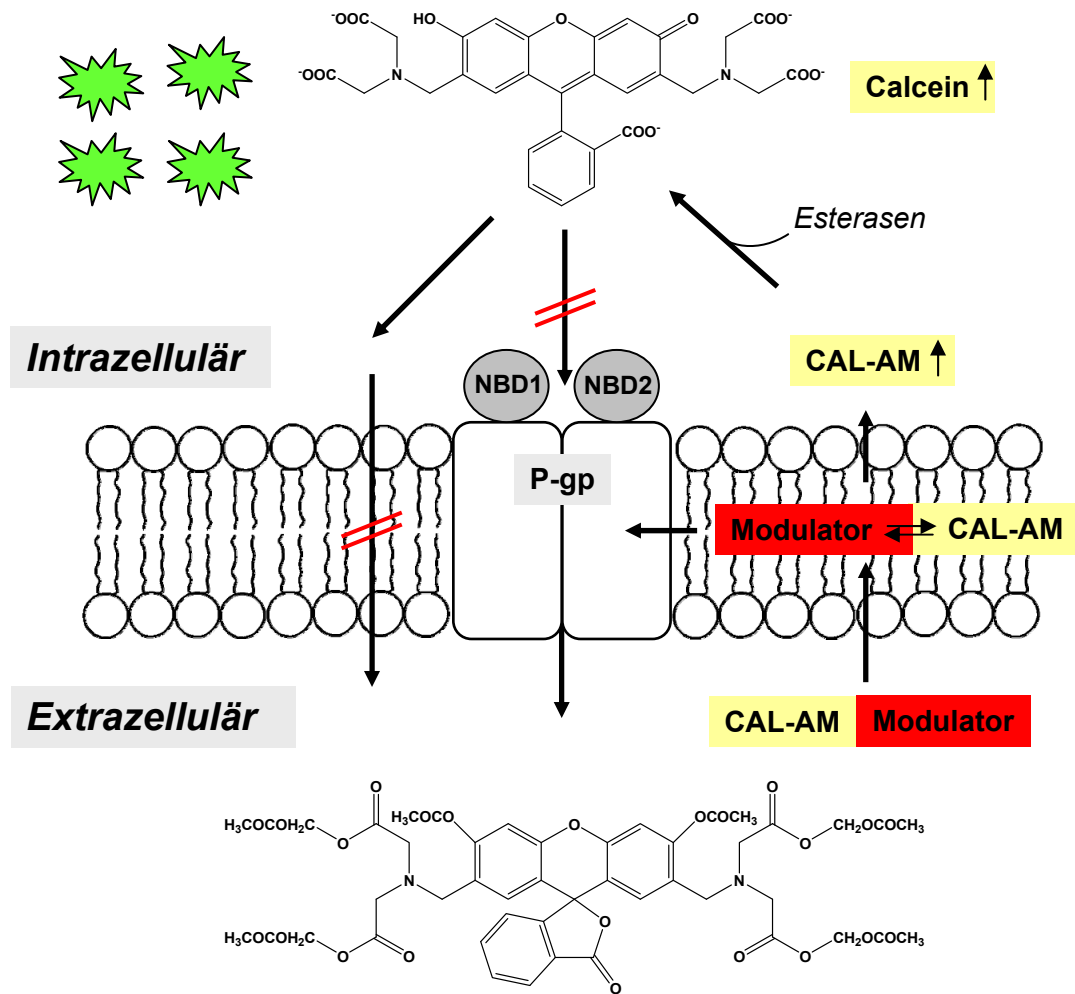


Abb. 3.4: Prinzip des Calcein AM-Assays nach Müller.¹⁹⁶ Mit zunehmender Konzentration des Modulators nimmt die intrazelluläre Fluoreszenz zu (CAL-AM = Calcein AM).

Zu Beginn der Messung ist der Ester noch in großem Überschuss vorhanden, so dass eine Kinetik pseudonullter Ordnung vorliegt. Der Fluoreszenzanstieg ist zu Beginn daher linear. Bei der erst später stattfindenden, signifikanten Verringerung der Esterkonzentration geht der Fluoreszenzanstieg in eine Reaktionskinetik erster Ordnung über.¹⁹⁰

3.13.2 Durchführung

Die unterschiedlichen Zelllinien (A2780, A2780 Adr, MDCK und MDCK MDR1) wurden geerntet (Kapitel 3.1), gezählt (Kapitel 3.10) und in Analogie zum Hoechst 33342-Assay vorbereitet (vgl. Kapitel 3.12.2). Für eine 96er-Mikrotiterplatte wurden 3

Millionen Zellen benötigt und diese nach dem in Abb. 3.3 gezeigten Schema in klare 96er-Mikrotiterplatten überführt. In jedes Well wurden 90 µl Zellsuspension mit Hilfe einer Multikanalpipette gegeben, so dass eine Zelldichte von 30.000 Zellen pro Well resultierte. Nach Zugabe von 10 µl der Testsubstanzen bzw. KHP als Nullwert erfolgte eine 30 minütige Inkubation bei 37°C und 5% CO₂. Kurz vor Beendigung der Inkubation wurde die Calcein-AM Verdünnung aus einer 1 mmol/l Stammlösung durch Verdünnen von 5 µl der Stammlösung in 3995 µl KHP hergestellt und mittels Vortexer homogenisiert. Die Platte wurde aus dem Brutschrank entnommen und in jedes Well 33 µl der Calcein-AM Verdünnung mittels Transferpipette pipettiert.

Daraufhin wurde die Mikrotiterplatte in den auf 37°C temperierten Fluoreszenzreader gestellt und die Fluoreszenz über einen Zeitraum von 1800 Sekunden bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm im Abstand von 60 Sekunden gemessen. Die weiteren Testparameter wurden wie in Tabelle 3.6 beschriebenen festgelegt.

Tabelle 3.6: Testparameter für den Calcein AM-Assay am Beispiel des FLUOstar Optima.

Anzahl der Zyklen	30
Zyklusdauer	60 s
Anzahl der Lichtblitze	10 s ⁻¹
Intervallzeit zwischen zwei Reihen	0,2
Vermessung der Mikrotiterplatte	horizontal
Required Value	20 %
Gain	1800
Scan-Modus	Plate

3.13.3 Calcein-Cobalt-Assay zur Untersuchung von MRP1

Da MRP1 in der Lage ist, sowohl Calcein-AM als auch das Calcein-Anion aus der Zelle herauszuschleusen, musste der Calcein AM-Assay für MRP1 modifiziert werden.¹⁹⁷ Dazu erfolgte der Einsatz von Co²⁺-Ionen, die in der Lage sind, die Fluoreszenz des Calcein-Anions zu quenchen bzw. zu löschen. Cobaltionen verbleiben aufgrund ihrer Ladung weitestgehend außerhalb der Zelle, so dass sie nur die Fluoreszenz des extrazellulären Calcein-Anions löschen können.

Die Durchführung der wesentlichen Schritte des Assays erfolgte in Analogie zum Calcein AM-Assay (Kapitel 3.13.2). In eine 96er-Mikrotiterplatte wurden 80 μl Zellsuspension (2008, 2008 MRP1) nach dem in Abb. 3.3 gezeigten Schema überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 μl einer 10 $\mu\text{mol/l}$ Cobalt-(II)-Lösung zu allen Wells der Mikrotiterplatte. Nun wurden 10 μl der entsprechenden Konzentration der Testsubstanz bzw. KHP als Nullwert hinzupipettiert, so dass das Gesamtvolumen pro Well 100 μl betrug. Es erfolgte eine 30 minütige Inkubation bei 37°C, 5% CO₂. Nach Beendigung der Inkubationsphase wurden 33 μl einer 0,5 $\mu\text{mol/l}$ Calcein AM-Lösung in die einzelnen Wells gegeben und die Fluoreszenz bei den in Kapitel 3.13.2 beschriebenen Bedingungen gemessen.

3.13.4 Datenanalyse

Für die Datenanalyse wurde zunächst mit Hilfe von Microsoft® Excel ein Auswertungssheet erstellt, welches die im Puffer ermittelten Fluoreszenzwerte von den entsprechenden Daten mit Zellen subtrahiert. Die so erhaltenen Fluoreszenzwerte wurden in das Programm GraphPad Prism® 5.01 importiert und für die Fluoreszenzkinetik jeder Modulatorkonzentration eine lineare Regression durchgeführt. Die berechneten Steigungen der Fluoreszenz-Zeitkurven wurden gegen die jeweilige logarithmierte Konzentration der Testsubstanz aufgetragen. Anschließend wurde basierend auf der 4-Parameter-logistischen-Gleichung eine Konzentrations-Effektkurve generiert (vgl. Kapitel 3.18.1).

3.14 Erweiterung des Calcein AM-Assays: Calcein-Toxizitätsassay zur Bestimmung der Zellvitalität von MDCK BCRP Zellen

3.14.1 Grundlagen

Calcein-AM wird, wie in Kapitel 3.13.1 beschrieben, von unspezifischen intrazellulären Esterasen in das fluoreszierende Calcein-Anion gespalten. Aufgrund dieser Tatsache kann die Verbindung auch zur Untersuchung der Zellvitalität herangezogen werden. Da abgestorbene Zellen über keine aktiven Esterasen

verfügen und deshalb kein Calcein erzeugen können, werden lediglich lebende Zellen markiert, die daraufhin eine grüne Fluoreszenz zeigen. Ein weiterer Vorteil der Verwendung von Calcein-AM zur Untersuchung der Zellvitalität besteht darin, dass Calcein kaum zytotoxisch ist und daher vitale Zellprozesse wie beispielsweise die Zellteilung nicht beeinflusst werden.

Da sowohl Calcein-AM als auch das Calcein-Anion keine BCRP Substrate darstellen, kann der Calcein-Toxizitäts-Assay zur Vitalitätsbestimmung BCRP überexprimierender Zellen heran gezogen werden, da die beiden Verbindungen in diesen Zellen intrazellulär akkumulieren können. Der Calcein-Toxizitäts-Assay wurde als Kombinationsassay mit zwei Substanzen durchgeführt. Dabei wurde die Toxizität eines Substrates in Anwesenheit verschiedener BCRP Modulatoren bestimmt. Die Anwesenheit eines BCRP Modulators bewirkt eine Hemmung des Transportproteins, so dass die zytotoxische Substanz nun weiter in die Zelle diffundieren kann und zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Zellvitalität führt. Durch Zusatz von Calcein-AM wird das Ausmaß der Zellvitalitätsabnahme erfasst. Potente BCRP Modulatoren führen schon in geringen Konzentrationen zu einer nennenswerten Hemmung des Transportproteins, so dass mehr zytotoxische Substanz in der Zelle akkumulieren kann. Dies führt zu einer Abnahme der intrazellulären Esterasen und in Folge zu einer Abnahme der Calceinfluoreszenz.

3.14.2 Durchführung

Erreichten die in T175-Gewebekulturschalen kultivierten MDCK II und MDCK BCRP Zellen eine Konfluenz von ungefähr 80-90% wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, geerntet und gezählt (Kapitel 3.10). Für eine klare sterile 96er-Mikrotiterplatte wurden 1 Millionen Zellen benötigt. Das entsprechende Volumen der Zellsuspension wurde unter sterilen Bedingungen in eine Ausplattierschale überführt, die 8 ml Nährmedium enthielt. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mittels Multikanalpipette wurden die Zellen homogenisiert und anschließend wurden 80 µl pro Well in die Mikrotiterplatte überführt. Damit die Zellen sich anheften konnten, wurden die Platten für 4 h in den Brutschrank gestellt. Abb. 3.5 zeigt das Pipettierschema, das zur Durchführung des Calcein-Toxizitäts-Assays verwendet wurde.

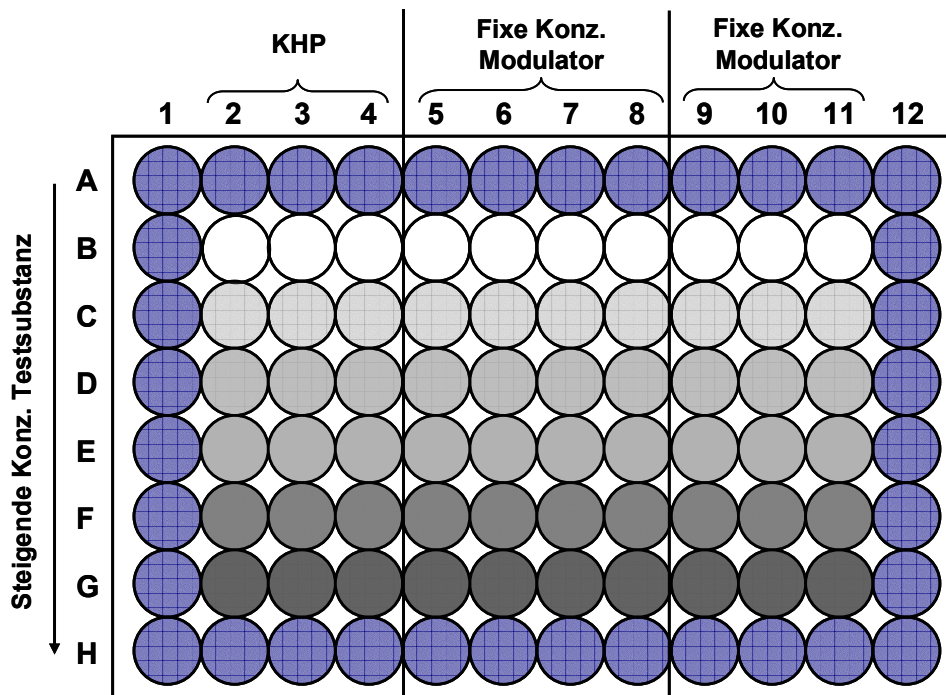


Abb. 3.5: Pipettierschema für den Calcein-Toxizitäts-Assay. Blau unterlegte Wells wurden nicht berücksichtigt. Die Konzentration des Modulators steigt von links nach rechts, während die Konzentration der zytotoxischen Substanz in vertikaler Richtung zunimmt.

Wegen der stärker ausgeprägten Verdunstung wurden die außen lokalisierten, blau hervorgehobenen Vertiefungen der Mikrotiterplatte nur mit KHP befüllt und nicht in die Messung mit einbezogen. Die Platte wurde in drei Bereiche eingeteilt. Die Reihen 2, 3 und 4 enthielten als Kontroll- bzw. Nullwert 10 µl des jeweiligen Lösungsmittels der Substanzen bzw. KHP. Die Reihen 5, 6, 7 und 8 bzw. 9, 10 und 11 wurden mit 10 µl des jeweils zu untersuchenden Modulators in fixen Konzentrationen versehen. Es erfolgte eine erneute Inkubation von 20 Minuten bei 37°C, 5% CO₂. Im Anschluss erfolgte die Zugabe der zytotoxischen Substanz. Es wurden 10 µl der entsprechenden Konzentrationen zugesetzt, wobei immer jeweils 2 Wells mit der gleichen Konzentration versehen wurden (Duplikate) und die Konzentrationen der Testschubstanz in vertikaler Richtung zunahm.

Die Platten wurden nun für 24 h im Brutschrank bei Standardbedingungen inkubiert. Vor Zugabe der Calcein AM-Lösung mussten die Platten von Nährmedium befreit und gespült werden, da die im Nährmedium vorkommenden Farbstoffe und Esterasen die Fluoreszenzmessung stören und die Ergebnisse verfälschen könnten. Das Nährmedium wurde vorsichtig abgesaugt und die Platten dreimal mit jeweils 80 µl KHP pro Well gewaschen. Im letzten Schritt wurden 100 µl KHP in jedes Well

pipettiert und 20 µl der Calcein AM-Verdünnung (vgl. Kapitel 3.13.2) zugegeben. Daraufhin wurden die Mikrotiterplatten in die auf 37°C temperierten Fluoreszenzreader gestellt und die Fluoreszenz über einen Zeitraum von 1800 Sekunden bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm im Abstand von 60 Sekunden gemessen. Die weiteren Testparameter wurden, wie in Tabelle 3.6 beschrieben, festgelegt.

3.15 Pheophorbid A-Assay

3.15.1 Grundlagen

Pheophorbid A gehört chemisch zur Gruppe der Porphyrine. Porphyrine sind organisch-chemische Farbstoffe, die aus vier Pyrrol-Ringen (Tetrapyrrol) bestehen, die durch vier Methingruppen zyklisch miteinander verbunden sind. Der einfachste Vertreter ist Porphin. Porphyrine bzw. porphyrinverwandte Verbindungen kommen z. B. auch als Chlorophyll und als Häm in den Häm-basierten Proteinen Hämoglobin und den verschiedenen Cytochromen vor.

Als BCRP spezifisches Substrat mit fluoreszierenden Eigenschaften (Exzitationsmaximum 395 nm, Emissionsmaximum 670 nm) eignet sich Pheophorbid A hervorragend zur funktionellen Charakterisierung des Transportproteins.^{41,118} Pheophorbid A ist in der Lage durch die Zellmembran zu diffundieren und in der Zelle zu akkumulieren. Wird BCRP von den untersuchten Zellen exprimiert, wird der Farbstoff aktiv aus der Zelle hinaus transportiert, so dass deutlich weniger Pheophorbid A innerhalb der Zelle vorhanden ist. Durch Zugabe eines BCRP Inhibitors wird konzentrationsabhängig der Gehalt an Pheophorbid A in der Zelle erhöht. Es kommt zu einem von der Modulatorkonzentration abhängigen Fluoreszenzanstieg in der Zelle (s. Abb. 3.6), bei dem sich nach einiger Zeit ein Gleichgewicht zwischen Uptake und Efflux einstellt.

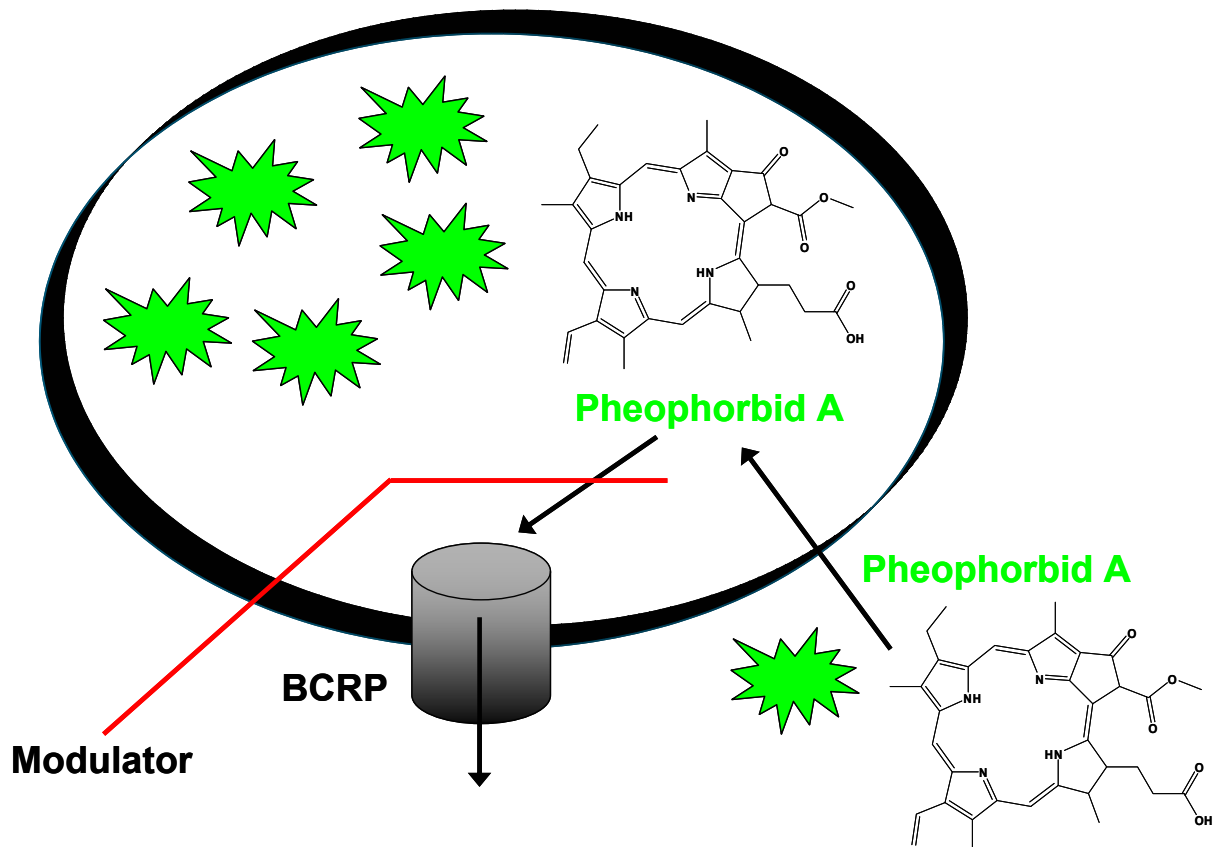


Abb. 3.6: Schematische Darstellung des Pheophorbid A-Assays.

Die Durchführung des Pheophorbid A-Assays erfolgte mittels Durchflusszytometrie am FACS[®]-Calibur der Firma Becton Dickinson. Der Vorteil der Durchflusszytometrie besteht darin, dass jede Zelle einzeln vermessen werden kann, ohne dass im Medium vorhandene, fluoreszierende Substanzen stören.

3.15.2 Funktionsweise eines Durchflusszytometers

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Messverfahren zur Analyse von Partikeln bzw. von Zellen in Suspension. Die Zellen werden einzeln an einer Lichtquelle in einem Flüssigkeitsstrom vorbeigeleitet, wobei sowohl Fluoreszenz- als auch Streulichtsignale analysiert werden. Der Ausdruck "FACS" ist ein registriertes Markenzeichen der Firma Becton Dickinson und steht für **F**luorescence **A**ctivated **C**ell **S**orting.

Ein Durchflusszytometer besteht aus drei wesentlichen Bestandteilen: einem Flüssigkeitssystem, einem optischen System und einem Signal verarbeitenden

System. Das Flüssigkeitssystem besteht aus zwei Flüssigkeitszufuhren, welche die Proben in der Flusskammer an einem Laserstrahl vorbeiführen. Die zu untersuchende Zellsuspension wird dabei über die eine Flüssigkeitszufuhr mit Überdruck in den Messbereich befördert, wobei das eigentliche Probenmaterial zur Gewährleistung eines kontinuierlichen Flusses von einem Mantelstrom isotoner Pufferlösung (Hüllstromflüssigkeit) umgeben ist. Bevor Hüllstrom und Probenstrom sich vereinigen wird letzterer verengt und auf bis zu 7 m/s beschleunigt. Dieser Druck beschleunigt die Zellen beim Eintreffen am Analysepunkt derartig, dass sie in der Suspension einzeln und perlenkettenartig aneinandergereiht vorliegen. Zellaggregate werden durch diesen Vorgang, der auch als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet wird, aufgelöst.

Das optische System wiederum ist aus einer Anregungs- und einer Detektionseinheit aufgebaut. Die Anregungseinheit besteht aus einem Argonlaser, dessen Strahl zu einem horizontal elliptischen Durchmesser von 20 x 60 µm mit ausreichender Signalintensität und Auflösung verformt und gebündelt wird. Am Analysenpunkt trifft monochromatisches Licht einer Wellenlänge von 488 nm auf die Einzelzelle. Die Detektionseinheit erfasst den **Forward Angle Scatter (FSC)**, **Side Scatter (SSC)** und die Fluoreszenz. Jede Zellart streut entsprechend ihrer Größe, der Struktur ihrer Zellmembran und der Art ihrer intrazellulären Bestandteile das auftreffende Licht in spezifischer Weise. Der größte Anteil des Lichtes wird vorwärts gestreut, wobei das Vorwärtsstreulicht (FSC) ein Maß für die Größe der Zelle darstellt. Ein weiterer Teil des Lichtes wird im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreut und als Seitwärtsstreulicht (SSC, 90°-Streulicht) bezeichnet. Das Seitwärtsstreulicht resultiert aus Lichtbrechung und Reflexion und ist abhängig von der Granularität bzw. Komplexität der Zelle. Da die Lichtstreuung mit zunehmendem Winkel zum Laserstrahl schwächer wird, werden die gleichermaßen in alle Richtungen ausgesandten Fluoreszenzsignale ebenfalls im Winkel von 90° detektiert. Hierbei werden Farbteilerspigel und Bandpassfilter für die optische Trennung der Emissionsspektren der verschiedenen Farbstoffe eingesetzt. Je nach emittierter Wellenlänge kann das emittierte Licht in drei unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen (FL1, FL2 und FL3) detektiert werden.

Das Signal verarbeitende System konvertiert optische Signale in elektrische. Als Photodetektoren kommen hierbei Photodioden (FSC) und Photoröhren (FSC und Fluoreszenz) zum Einsatz.

3.15.3 Durchführung

Die verschiedenen Zelllinien (MCF-7, MCF-7 MX, MDCK II und MDCK BCRP) wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 80-90% kultiviert und wie in Kapitel 3.1 beschrieben geerntet und gezählt (Kapitel 3.10). Für eine klare 96er-Mikrotiterplatte wurden 4 Millionen Zellen benötigt.

Die gewünschte Anzahl Zellen wurde der Zellsuspension entnommen und dreimal mit KHP gewaschen (vgl. Kapitel 3.12.2). In eine Ausplattierschale wurde für jeweils eine klare 96er-Mikrotiterplatte mit U-förmigen Boden 17 ml KHP vorgelegt und in diese die Zellsuspension überführt. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Multikanalpipette durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gleichmäßig verteilt. Pro Well wurden 160 μ l der Zellsuspension mit Hilfe der Transferpipette in jedes Well der Mikrotiterplatte eingebracht. Danach erfolgte die Zugabe der Testsubstanzen. Dabei wurden 20 μ l einer Modulatorkonzentration in jeweils mindestens zwei Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert, so dass ein Endvolumen von 180 μ l pro Well resultierte. Als Nullwert diente das Lösungsmittel der jeweiligen Testsubstanzen bzw. KHP. Anschließend erfolgte eine 30 minütige Inkubation bei 37°C, 5% CO₂. Kurz vor Beendigung der Inkubationsphase erfolgte die Herstellung der Pheophorbid A-Lösung, indem 15 μ l einer 1,0 mmol/l Stammlösung in 2985 μ l Wasser verdünnt und mittels Vortexer gut durchmischt wurde. Dabei war zu beachten, dass die Lösung vor Licht geschützt aufzubewahren war. Mit Hilfe einer Transferpipette wurden 20 μ l der Pheophorbid A-Lösung in jedes Well der Platte überführt, so dass eine Endkonzentration von 0,5 μ mol/l pro Well resultierte. Bis zur Einstellung des Steady-States (Gleichgewichtszustands) wurde die Mikrotiterplatte für weitere 2 h in den Inkubator (37°C, 5% CO₂) gestellt. Bevor die Platte vermessen wurde, mussten die Zellen nochmals homogenisiert werden. Dazu wurde mit einer Multikanalpipette durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren die Zellsuspension in jedem Well vorsichtig durchmischt. Die Vermessung der Platten erfolgte am FACS[®]-Calibur bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 670 nm (FL3).

3.15.4 Vorbereitung der Zellen für die Expressionsanalyse mit Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI)

Bei der Untersuchung des Expressionsstatus von BCRP wurden MDCK BCRP Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der entsprechenden Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) für 72 h vorinkubiert. Zunächst wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, geerntet und gezählt (Kapitel 3.10). Anschließend wurde der Zellsuspension das Volumen entnommen, welches 100.000 Zellen enthielt und in jedes Well einer sterilen 6-Well Platte überführt. Die Wells wurden mit Nährmedium auf ein Volumen von 2,7 ml aufgefüllt und für 4 h bei 37°C, 5% CO₂ gelagert, so dass sich die Zellen anheften konnten. In jede Vertiefung wurden 300 µl TKI in den entsprechenden Konzentrationen hinzu pipettiert, so dass ein Endvolumen von 3,0 ml pro Well resultierte. In Abb. 3.7 ist das verwendete Pipettierschema dargestellt.

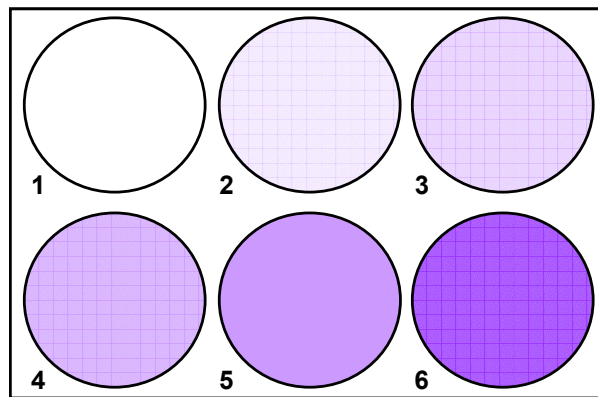


Abb. 3.7: Pipettierschema zur Vorbereitung der 6-Well Platte. Well 1 enthielt als Kontrollwert die unbehandelten Zellen bzw. KHP. Die restlichen Wells enthielten den TKI in steigenden Konzentrationen.

Als Nullwert (unbehandelte Zellen) wurde KHP verwendet. Es folgte eine Vorinkubation der MDCK BCRP Zellen bei 37°C, 5% CO₂ für 72 h. Je nachdem wie viele Zellen für die Durchführung der Versuche benötigt wurden, war es nötig mehrere 6-Well Platten vorzubereiten.

Nach Beendigung der Vorinkubation wurden die Zellen erneut geerntet. Zunächst wurde das Nährmedium mit Hilfe der Vakuumpumpe abgesaugt und jedes Well mit 500 µl PBS gewaschen. Es war zu beachten, dass jedes Well einzeln behandelt werden musste und dass auch die Pipettenspitzen jeweils gewechselt werden mussten, um eine gegenseitige Kontamination der mit den unterschiedlichen

Konzentrationen des TKI behandelten Zellen zu vermeiden. Nach Zugabe von 500 µl Trypsin-EDTA wurden die Zellen für ca. 10 min im Inkubator gelagert, damit sie sich ablösen konnten (vgl. Kapitel 3.5.2). Durch leichtes Klopfen der 6-Well Platte gegen die Handinnenfläche wurde der Ablösevorgang unterstützt. Nachdem die Zellen abgelöst waren, wurde durch Zugabe von 4,5 ml Nährmedium das Volumen in jedem Well auf 5 ml ergänzt. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die restlichen Zellen vom Boden der 6-Well Platte gelöst.

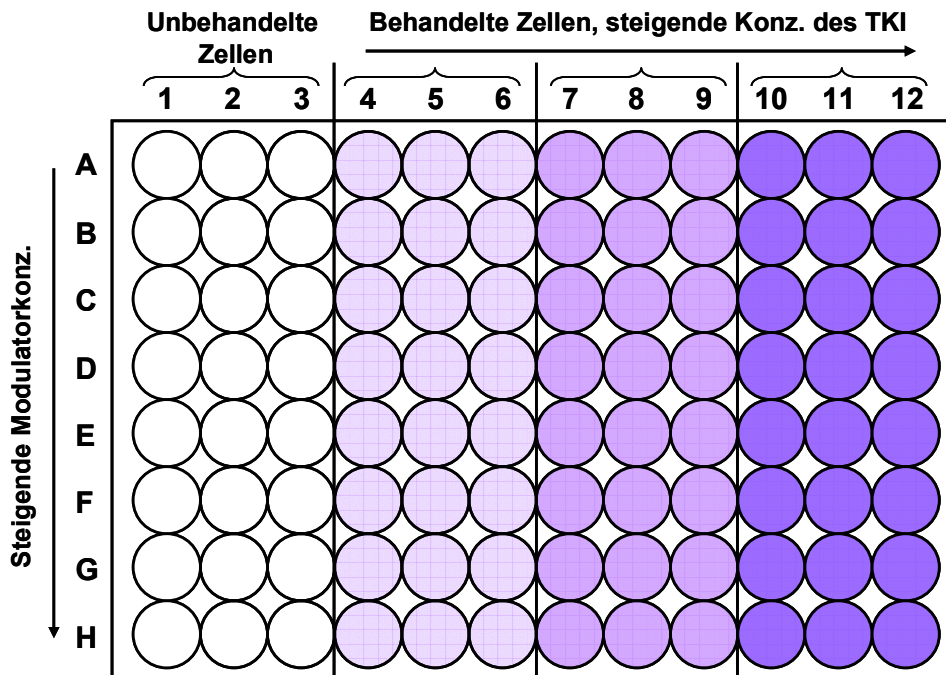


Abb. 3.8: Pipettierschema zur Untersuchung der BCRP Expression. Die Konzentration des jeweiligen TKI (behandelte Zellen) steigt in horizontaler Richtung. Die Konzentration des Modulators nimmt in vertikaler Richtung zu.

Anschließend wurde die erhaltene Zellsuspension in ein 15 ml PP-Zentrifugenröhrchen überführt, wobei für jede Konzentration der behandelten Zellen ein separates Röhrchen verwendet wurde, und bei 221 g für 4 min bei 4°C zentrifugiert. Um das entstandene Zellpellet zu resuspendieren, wurde der Überstand abgesaugt und unter mehrmaligen Auf- und Abpipettieren mit 5 ml frischem Nährmedium versetzt. Jede Konzentration der behandelten Zellen wurde, wie in Kapitel 3.10 beschrieben, gezählt. Für eine 96er-Mikrotiterplatte wurden jeweils 1 Million Zellen benötigt. Abb. 3.8 zeigt das verwendete Pipettierschema. Die Platte wurde in vier Bereiche eingeteilt. Die mit den TKI behandelten Zellen wurden jeweils vertikal in drei Reihen überführt (pro Well 160 µl Zellsuspension in KHP), wobei die

Reihen 1, 2 und 3 die unbehandelten Zellen enthielten. Nun wurden 20 µl der zu untersuchenden Standardsubstanz hinzugegeben, wobei die Konzentrationen in vertikaler Richtung zunahmen. Als Nullwert diente das Lösungsmittel der jeweiligen Testsubstanz bzw. KHP. Im Anschluss wurde die Platte für 30 min in den Inkubator gestellt (37°C, 5% CO₂). Die Zugabe der Pheophorid A-Lösung und die Vermessung der Platte am FACS®-Calibur erfolgte wie in Kapitel 3.15.3 beschrieben.

3.15.5 Datenanalyse

Die Auswertung wurde mit Hilfe des Computerprogramms Cellquest pro® vorgenommen. Bei der Datenanalyse werden Zellen mit ähnlichen Eigenschaften, so genannte Populationen, in dem aufgenommenen Datensatz identifiziert und anschließend hinsichtlich der gewünschten Parameter (z.B. Fluoreszenzintensität) analysiert. Histogramme und Dot-Plots sind zwei unterschiedliche Darstellungen, die dabei am häufigsten verwendet werden. Histogramme zeigen auf der x-Achse die Intensität der gemessenen Signale z.B. einer bestimmten Fluoreszenz. Auf der y-Achse wird die Zahl von Zellen aufgetragen, die mit einer bestimmten Intensität analysiert wurden. Auch Überlagerungsdarstellungen werden häufig als Histogramm gezeigt, bei denen die Verteilungsmuster von Zellen aus zwei verschiedenen Messungen oder Populationen dargestellt werden. Die Kurven werden hierbei durch unterschiedliche Farbwahl oder Linienmuster voneinander abgesetzt.

Als zweidimensionale Darstellungen sind so genannte Dot-Plots (Punktwolkendarstellungen) möglich. In einem Dot-Plot werden auf der x- und y-Achse jeweils die Intensitätsverteilungen von zwei Messparametern aufgetragen. Jede gemessene Zelle wird dann als Punkt ("dot") an der x- und y-Position entsprechend ihrer Intensitäten aufgetragen. Die Auftragung der beiden Parameter FSC (Größe) gegen SSC (Granularität) in einem Dot-Plot erlaubt es beispielsweise durch Setzen eines Analysenfensters ("Gate") bestimmte Zellpopulationen einzugrenzen. Diese Population kann dann selektiv auf ihre Fluoreszenz hin untersucht werden.

Für die Auswertung wurde das geometrische Mittel der gegateten 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-Effektkurve mit Hilfe des Programms GraphPad Prism[®] 5.01 generiert (vgl. Kapitel 3.18.1).

3.16 Markierung der Zellen mit Antikörpern

3.16.1 Markierung von BCRP mit dem Antikörper 5D3

Zur Markierung von BCRP mittels des Antikörpers 5D3 (Phycoerythrin-conjugated mouse monoclonal anti-human Bcrp1/ABCG2 IgG_{2B}) wurden die Zelllinien (A2780, A2780 Adr, MDCK, MDCK MDR1, MCF-7, MCF-7 MX, MDCK II, MDCK BCRP, 2008 und 2008 MRP1), wie in Kapitel 3.1 beschrieben, geerntet und gezählt (s. Kapitel 3.10). Für die Durchführung eines Antikörperversuchs wurden 500.000 Zellen der jeweiligen Zelllinie benötigt und diese in ein 1,5 ml Eppendorfcap überführt. Die Zellen wurden anschließend mit jeweils 1 ml 2%igen Waschpuffer (Zusammensetzung s. Tabelle 3.7) versetzt. Es erfolgte eine Zentrifugation für die Dauer von 1 min bei 655 g und 20°C. Anschließend wurde die überstehende Lösung abgenommen und erneut mit 1 ml 2%igen Waschpuffer versetzt, wobei das Zellpellet durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert wurde. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet mit 10 µl Ziegenserum (normal goat serum) versetzt, vorsichtig durchmischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zugabe des Ziegenserums diente der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Zu der Zellsuspension wurden nun 7 µl des Antikörpers 5D3 (Tabelle 3.7) gegeben und durch leichtes Auf- und Abpipettieren die Lösung homogenisiert. Es folgte eine Inkubation der Zellen bei Raumtemperatur für die Dauer von 30 min. Dabei war zu beachten, dass die Zellen vor Licht geschützt aufzubewahren waren. Nach der Inkubation wurde 1 ml 1%iger Waschpuffer (Tabelle 3.7) zu dem Zellpellet gegeben und die Zellsuspension für 1 min bei 20°C und 655 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet erneut mit 1 ml 1%igem Waschpuffer versetzt und resuspendiert. Auch dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt, wobei beim letzten Schritt die Zellen in 500 µl Waschpuffer 1% homogenisiert wurden.

Tabelle 3.7: Zusammensetzung der für die Markierung von BCRP verwendeten Lösungen.

Verwendete Lösung	Zusammensetzung
Waschpuffer 2%	PBS mit 2,0% BSA (B ovines S erumalbumin)
Waschpuffer 1%	PBS mit 1,0% BSA
Antikörper 5D3	25 µL/mL gelöst in PBS mit 0,1% Natriumazid

Die Lösung wurde anschließend in ein FACS-Teströhrchen gegeben und unmittelbar mit Hilfe des Durchflusszytometers analysiert. Die Analyse der Zellen erfolgte bei einer Spannung von 550 Volt des Fotomultipliers. Die Fluoreszenz wurde für 20 s oder 20.000 gezählte Zellen im Fluoreszenzkanal FL2 bei einer Wellenlänge von 585 nm gemessen. Bei der Durchflusszytometer-basierten Analyse der Zellen wurde sowohl die Fluoreszenzintensität bestimmt als auch das Vorwärts- (FSC) und das Seitwärtsstreulichtes (SSC) aufgenommen. Tote Zellen und Zelltrümmer wurden durch Setzen eines Analysenfensters (Gate) von der Auswertung ausgeschlossen. Für jede einzelne Zelllinie wurden mindestens vier unabhängige Experimente durchgeführt. Die Fluoreszenzwerte der Einzelexperimente (geometric mean) wurden gemittelt und deren Standardabweichung berechnet.

3.16.2 Antikörper-basierte Markierung des Endothelin Growth Factor Receptor (EGFR)

Zur Markierung des Endothelin Growth Factor Receptor (EGFR) wurde ein spezifischer EGFR-Antikörper (Phycoerythrin-conjugated mouse monoclonal anti-human EGFR IgG_{2A}) verwendet. Die Markierung der Zelllinien (Cal-27, MCF-7, MCF-7 MX, MDCK II und MDCK BCRP) erfolgte in gleicher Weise wie in Kapitel 3.16.1 beschrieben.

3.16.3 Antikörper-basierte Markierung von BCRP in mit TKI behandelten MDCK BCRP Zellen

Bei der antikörper-basierten Untersuchung des Expressionsstatus von BCRP wurden MDCK BCRP Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der entsprechenden

Tyrosinkinaseinhibitoren, wie in Kapitel 3.15.4 beschrieben, für 72 h vorinkubiert. Das Aussäen der Zellen in sterile 6-Well Platten und die Zugabe des TKI in den entsprechenden Konzentrationen erfolgte analog. Auch das Ernten und Zählen der Zellen wurde, wie in Kapitel 3.15.4 beschrieben, durchgeführt. Für die Markierung der Zellen mit dem Antikörper 5D3 wurden 500.000 Zellen benötigt. Die weitere Vorgehensweise geschah analog Kapitel 3.16.1.

3.16.4 Markierung von P-gp mit dem Antikörper MRK-16

Zur Markierung von P-gp mittels des Antikörpers MRK-16 (FITC anti-human P-Glycoprotein (MDR) Mouse IgG_{2b}) wurden die Zelllinien (A2780, A2780 Adr, MDCK, MDCK MDR1, MCF-7 und MCF-7 MX) geerntet und gezählt (vgl. Kapitel 3.1 und 3.10). 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 Waschpuffers (Zusammensetzung s. Tabelle 3.8) versetzt und für die Dauer von 4 min bei 266 g und 4°C zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde abgenommen und durch 2 ml Anfärbepuffer (s. Tabelle 3.8) ersetzt. Nach erneuter Zentrifugation (4°C, 266 g, 4 min) wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 100 µl 4°C kalten Anfärbepuffer resuspendiert. Zu der Zellsuspension wurden 20 µl des Antikörpers gegeben und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren die Lösung homogenisiert. Es erfolgte eine Inkubation auf Eis und vor Licht geschützt für die Dauer von 40 min.

Tabelle 3.8: Zusammensetzung der für die Markierung von P-gp benötigten Lösungen.

Verwendete Lösung	Zusammensetzung
Waschpuffer	PBS mit 0,5% BSA (B ovines S erumalbumin)
Anfärbepuffer	PBS mit 0,5% BSA + 0,1% NaN ₃

Nach der Inkubationsphase wurde erneut zentrifugiert (4°C, 266 g, 3 min), die überstehende Flüssigkeit entfernt und das Zellpellet mit 2 ml des Anfärbepuffers überschichtet. Nach erneuter Zentrifugation und anschließender Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 1000 µl Waschpuffer resuspendiert und die Lösung anschließend in ein FACS-Teströhrchen überführt. Die Analyse der Zellen

erfolgte am Durchflusszytometer bei einer Spannung von 550 Volt des Fotomultipliers. Die Fluoreszenz wurde für 10 s oder 10.000 gezählte Zellen im Fluoreszenzkanal FL1 bei einer Wellenlänge von 530 nm gemessen. Die Datenanalyse erfolgt wie in Kapitel 3.16.1 beschrieben.

3.17 Fluoreszenzmikroskopie

3.17.1 Grundlagen

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine effektive Methode einzelne Zellbestandteile, meist Proteine, sichtbar zu machen. Aus dem fluoreszenzmikroskopischen Bild können anschließend Rückschlüsse auf die Lokalisation des Proteins in der Zelle gezogen werden, oder auch Änderungen der Lokalisierung als Antwort der Zelle auf bestimmte Stimuli untersucht werden. Um bestimmte Komponenten einer Zelle wie z.B. Proteine sichtbar zu machen, werden in der Regel fluoreszenzmarkierte Antikörper eingesetzt, die spezifisch an die entsprechenden Substanzen (Antigene) binden. Meist bindet ein unmarkierter Primärantikörper an das Antigen. Anschließend wird ein zweiter, fluoreszenzmarkierter Antikörper (Sekundärantikörper), der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, eingesetzt.

Abb. 3.9 verdeutlicht das Prinzip eines Auflicht-Fluoreszenzmikroskops. Das Präparat wird von oben durch das Objektiv, das gleichzeitig als Kondensator fungiert, beleuchtet. Als Lichtquelle, welche die Anregungswellenlänge des gewählten Fluorochroms enthalten muss, werden meist Quecksilberhochdrucklampen oder entsprechend leistungsfähige Xenon-Leuchten verwendet, die ein breites Spektrum von nutzbaren Wellenlängen zwischen 360 nm und 700 nm liefern. Aus dem gesamten Beleuchtungsspektrum wird zuerst mittels eines Eingangsbandfilters (Anregungsfilters) die anregende Wellenlänge des gewählten Fluorochroms herausgefiltert. Die Anregungsstrahlung gelangt auf einen dichromatischen Teilerspiegel. Dieser reflektiert das Erregerlicht von kleiner Wellenlänge und ist gleichzeitig durchlässig für das längerwellige Licht der Emissionsstrahlung.

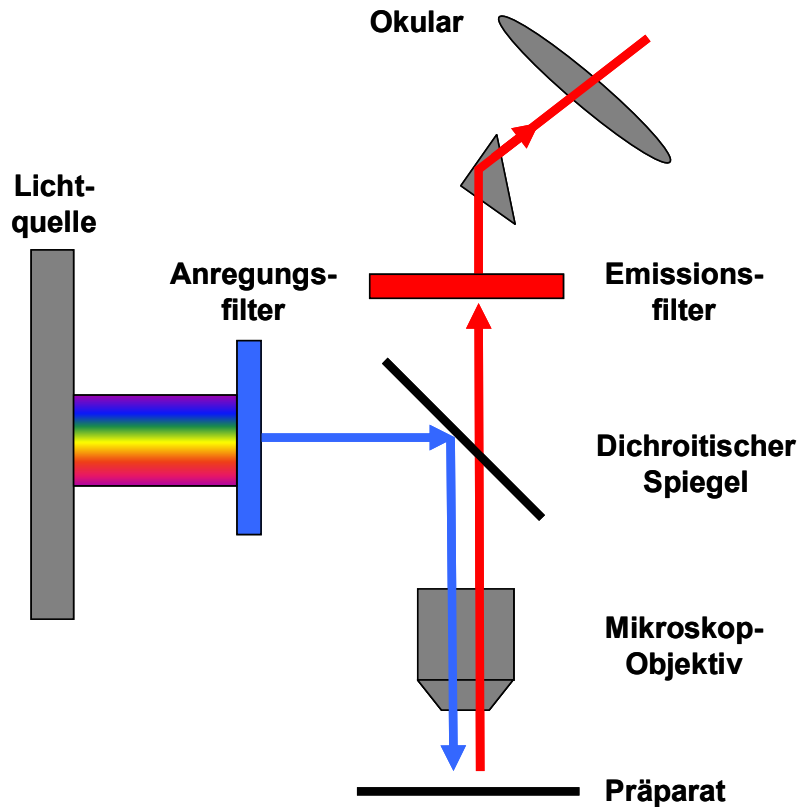


Abb. 3.9: Prinzip eines Auflicht-Fluoreszenzmikroskops.

Die Anregungsstrahlung gelangt durch das Objektiv auf das Präparat und regt das Fluorochrom an, welches daraufhin längerwelliges Licht emittiert. Dieses passiert den dichromatischen Teilerspiegel und trifft auf den Ausgangssperrfilter (Emissionsfilter). Dieser filtert die gewünschte Emissionswellenlänge des Fluorochroms, das eigentliche Fluoreszenzbild. Das Fluoreszenzbild kann entweder durch das Okular betrachtet oder mit einer Foto- oder Videokamera aufgezeichnet werden.

3.17.2 Vorbereiten und Präparieren von MDCK BCRP Zellen mit dem Antikörper BXP-21 für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung

Bei der antikörper-basierten Untersuchung des Expressionsstatus von BCRP mit dem Fluoreszenzmikroskop wurden MDCK BCRP Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der entsprechenden Tyrosinkinaseinhibitoren, wie in Kapitel 3.15.4 beschrieben, für 72 h vorinkubiert. Das Aussäen der Zellen in sterile 6-Well Platten,

die in jedem Well ein Deckgläschen enthielten, und die Zugabe des TKI in den entsprechenden Konzentrationen erfolgte analog. Allerdings wurden anstelle von 100.000 Zellen nur 25.000 Zellen pro Well ausgesät. Nach der Inkubationsphase wurde das Nährmedium mittels Vakuumpumpe abgesaugt und die Deckgläschen in jedem Well dreimal mit 1 ml Waschpuffer (Zusammensetzung s. Tabelle 3.9) gewaschen. Zum Fixieren der Zellen wurde eine 4%ige Paraformaldehydlösung (Tabelle 3.9) verwendet. Nach Zugabe von 1 ml Fixierlösung erfolgte eine kurze Inkubation bei Raumtemperatur für die Dauer von 10 min.

Tabelle 3.9: Zusammensetzung der Lösungen, die für die Präparation von MDCK BCRP Zellen mit dem Antikörper BXP-21 benötigt wurden.

Verwendete Lösung	Zusammensetzung
Waschpuffer	PBS mit 0,5% BSA (Bovines Serumalbumin)
Fixierlösung	PBS mit 4% Paraformaldehyd
Permeabilisierungslösung	PBS mit 1% Triton [®] X-100
Verdünnungslösung für Primär-AK	Waschpuffer mit 0.1% NaN ₃
Verdünnungslösung für Sekundär-AK	Waschpuffer mit 0.1% NaN ₃

Um die Zellmembran für den Antikörper durchlässig zu machen, mussten die Zellen mit 1%iger Triton[®]X-100 Lösung permeabilisiert werden. Dazu wurde der Überstand abgesaugt und 1 ml Triton[®]X-100 Lösung zugegeben. Es erfolgte eine erneute Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min. Die Lösung wurde abgesaugt und jedes Well nochmals mit 1 ml Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 150 µl des Primärantikörpers (Primary anti-human BCRP monoclonal BXP-21 antibody; Verdünnung 1:100 s. Tabelle 3.9). Die 6-Well Platten wurden mit Alufolie umwickelt und eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Um überschüssigen Antikörper zu entfernen, wurde erneut dreimal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen und anschließend 150 µl des Sekundärantikörpers (FITC-labeled goat anti-mouse Ig antibody; Verdünnung 1:50 s. Tabelle 3.9) hinzu pipettiert. Um die Bindung des Sekundärantikörpers zu gewährleisten, wurde erneut eine Stunde bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt inkubiert. Nach zweimaligem waschen mit Waschpuffer wurden die Deckgläschen vorsichtig aus der 6-Well Platte entnommen und trocknen gelassen. Je zwei Deckgläschen wurden mit 1 Tropfen Mounting Medium eingedeckt und auf einem Objektträger fixiert. Die Betrachtung der Präparate unter Verwendung des FITC-Filters (Exzitationswellenlänge 488 nm,

Emissionswellenlänge 520 nm) und die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgten am nächsten Tag. Die Objektträger wurden im Kühlschrank und vor Licht geschützt aufbewahrt.

3.18 Allgemeine Methoden der Datenanalyse

3.18.1 Analyse von Konzentrations-Effektkurven: 4-Parameter-logistische-Gleichung

Sigmoidale Konzentrations-Effektkurven wurden mit Hilfe von Gleichung 3.1 und einer nichtlinearen Regression erzeugt.

Gleichung 3.1:

$$E = \frac{Top - Bottom}{1 + 10^{\eta_H \cdot (\log IC_{50} - \log L)}} + Bottom$$

Bei der Gleichung handelt es sich um die 4-Parameter-logistische-Gleichung. Die in dieser Gleichung enthaltenen vier Parameter können wie folgt definiert werden: Der Bottomwert beschreibt den Effekt, der in Abwesenheit eines Liganden bestimmt wird. Der Topwert stellt den maximal erreichbaren Fluoreszenzanstieg dar. Der IC_{50} bzw. EC_{50} -Wert ist die Ligandkonzentration L , bei der der halbmaximale Effekt erreicht wird. In der sigmoidalen Kurve entsprechen diese Werte dem Wendepunkt der Kurve. Die Steigung im Wendepunkt der Kurve (IC_{50} bzw. EC_{50} -Wert) wird durch den Hillkoeffizienten n_H angegeben. Die Auswertung mit einem variablen Hillkoeffizienten erfolgte nur, wenn die Entscheidung mit einem F -Test (siehe Kapitel 3.18.3) abgesichert wurde. Ansonsten wurde die 3-Parameter-logistische-Gleichung verwendet, in der von $n_H = 1$ ausgegangen wird.

3.18.2 Statistische Kennzahlen

Die in dieser Arbeit angegebenen Werte repräsentieren den arithmetischen Mittelwert \pm Standardabweichung von Messwerten, sofern nichts anderes angegeben

wurde. Dabei wurde eine annähernde Normalverteilung der Werte angenommen. Der arithmetische Mittelwert beschreibt die durchschnittliche Lage einer Verteilung. Aus Messreihen mit n Messwerten x_i wurde dieser Mittelwert mit Hilfe von Gleichung 3.2 berechnet.

Gleichung 3.2:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Die Varianz s^2 ist ein Maß für die Streuung von Beobachtungswerten, die aus einer Stichprobe der Grundgesamtheit stammen. Sie gibt die mittlere quadratische Abweichung vom Mittelwert an und wurde mit folgender Formel berechnet:

Gleichung 3.3:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

Zur Berechnung der Standardabweichung s (standard deviation, SD) aus der Varianz wurde Gleichung 3.4 verwendet. Sie stellt die in der Grundgesamtheit zu erwartende Streuung der Einzelwerte dar und beschreibt somit die Präzision einer Messung.

Gleichung 3.4:

$$s_x = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

3.18.3 Statistischer *F*-Test

Alle statistischen Tests wurden unter der Annahme durchgeführt, dass es sich um eine Normalverteilung der Grundgesamtheit der Messwerte handelt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde auf $p \leq 0,05$ festgesetzt.

Mit dem *F*-Test werden Varianzen von Stichproben mit einem Probenumfang von n_1 und n_2 auf signifikante Unterschiede untersucht. Dazu wird mit Gleichung 3.5 der *F*-Wert berechnet und mit tabellierten *F*-Werten verglichen.

Gleichung 3.5:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Der tabellierte F -Wert ist abhängig von den Freiheitsgraden f der Messreihen ($f_1 = n_1 - 1$ und $f_2 = n_2 - 1$) sowie von der Irrtumswahrscheinlichkeit p . Ist der tabellierte F -Wert kleiner als der errechnete, so bedeutet dies, dass die Varianzen signifikant unterschiedlich voneinander sind und somit auch die Grundgesamtheiten verschieden sind.

Bei einigen Versuchen wurde eine Sonderform des F -Tests eingesetzt.¹⁹⁸ Mit Hilfe dieses statistischen Tests wurde entschieden, ob die nichtlineare Regression mit der drei-Parameter-logistischen-Gleichung, d.h. mit einem fixierten Hill-Koeffizienten von eins, oder mit der vier-Parameter-logistischen-Gleichung berechnet wurde. Dieser F -Wert wurde anhand von Gleichung 3.6 bestimmt:

Gleichung 3.6:

$$F = \frac{\frac{SS_1 - SS_2}{f_1 - f_2}}{\frac{SS_1}{f_2}}$$

Die Variablen SS_1 und f_1 entsprechen der Summe der Fehlerquadrate und der Anzahl der Freiheitsgrade bei Auswertung mit der drei-Parameter-logistischen-Gleichung. Gleiches gilt für die Auswertung mit der vier-Parameter-logistischen-Gleichung für SS_2 und f_2 . Wurde anhand des F -Wertes kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Modellen festgestellt, wurde der Hill-Koeffizient n_H bei der Auswertung des Experiments auf eins fixiert.

3.18.4 Normalisierung der Daten

Um unterschiedliche Datensätze besser vergleichen zu können, wurden die Daten normalisiert. Dabei 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.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Charakterisierung der Zelllinien mittels Antikörperlabelling

Um eine selektive Untersuchung der einzelnen ABC-Transporter in den unterschiedlichen Zelllinien zu gewährleisten, musste zunächst nachgewiesen werden, dass die jeweiligen Transportproteine in den entsprechenden Zelllinien exprimiert werden. Außerdem sollte die Existenz anderer Transportproteine, wie z.B. P-gp in MCF-7 MX oder MDCK BCRP Zellen, widerlegt werden. Dies war von entscheidender Bedeutung, da die Expression anderer Transporter die mit BCRP generierten Ergebnisse beeinflussen können.

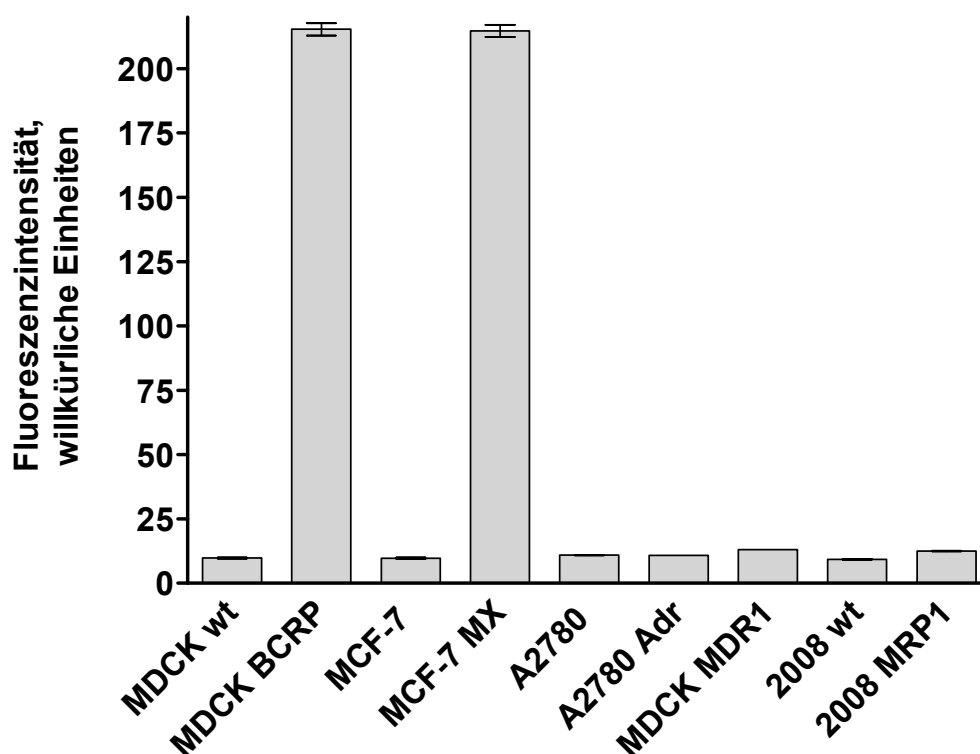


Abb. 4.1: Bestätigung der BCRP Expression in MDCK BCRP und MCF-7 MX Zellen mittels des Antikörpers 5D3. Alle anderen Zelllinien enthalten keine signifikanten Level an BCRP. Dargestellt sind die geometrischen Mittelwerte und Standardabweichungen von mind. 3 unabhängigen Experimenten.

Die in Abb. 4.1 aufgeführten Zelllinien wurden hinsichtlich ihres ABCG2-Expressionsstatus mit Hilfe des BCRP spezifischen Antikörpers 5D3 am FACS

untersucht (vergl. Kapitel 3.16.1). Die Zelllinien MDCK BCRP und MCF-7 MX weisen den höchsten und einen nahezu identischen BCRP Expressionsstatus auf. Die Fluoreszenzwerte für die Zelllinien MDCK wt, MCF-7, A2780, A2780 Adr, MDCK MDR1, 2008 wt und 2008 MRP1 unterscheiden sich nicht bzw. nur kaum von der unter identischen Bedingungen bestimmten Hintergrundfluoreszenz. Zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz wurden die Zellen ohne Antikörper inkubiert und vermessen.

Der für die Bestimmung des BCRP Gehaltes der verschiedenen Zelllinien eingesetzte Antikörper 5D3 ist PE-(Phycoerythrin) gelabelt und kann deshalb direkt am Durchflusszytometer im Fluoreszenzkanal FL2 vermessen werden. Der Antikörper bindet spezifisch an ein extrazelluläres Epitop von BCRP, wobei die genaue Bindungsstelle noch nicht identifiziert wurde. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die drei Cysteine in Position 592, 603 und 608 des dritten extrazellulären Loops von BCRP an der Bindung des Antikörpers beteiligt sind.^{148,199} Andere möglicherweise vorkommende Transportproteine werden aufgrund der Spezifität der Bindung nicht erfasst.

Des Weiteren wurden die Zelllinien A2780, A2780 Adr, MDCK wt, MDCK MDR1, MCF-7, MCF-7 MX, 2008 wt und 2008 MRP1 auf ihren ABCB1 Expressionsstatus untersucht. Dies erfolgte mit Hilfe des P-gp spezifischen Antikörpers MRK-16 (vergl. Kapitel 3.16.4). Der FITC-(Fluoresceinisothiocyanat) gelabelte Primärantikörper bindet an ein Epitop auf der extrazellulären Domäne der vierten Schleife von P-gp.^{200,201} Wie in Abb. 4.2 zu erkennen ist, zeigen die Zelllinien A2780 Adr und MDCK MDR1 den größten P-gp Expressionsstatus, wobei der P-gp Gehalt in A2780 Adr Zellen höher liegt. Die Fluoreszenzwerte für die Zelllinien MDCK wt, MCF-7, MCF-7 MX, A2780, 2008 wt und 2008 MRP1 sind vernachlässigbar und unterscheiden sich nicht von der Hintergrundfluoreszenz. Die Zelllinie MDCK BCRP konnte nicht mit dem Antikörper MRK-16 untersucht werden. Diese Zellen enthalten als Reportergen das grün fluoreszierende Protein (green fluorescence protein, GFP), dessen Emissionswellenlänge bei 509 nm liegt und sich mit der Emissionswellenlänge des FITC-gelabelten Antikörpers MRK-16 (514 nm) überlagert. Beide Emissionswellenlängen werden bei der durchflusszytometrischen Untersuchung im Fluoreszenzkanal FL1 detektiert und können nicht voneinander getrennt werden.

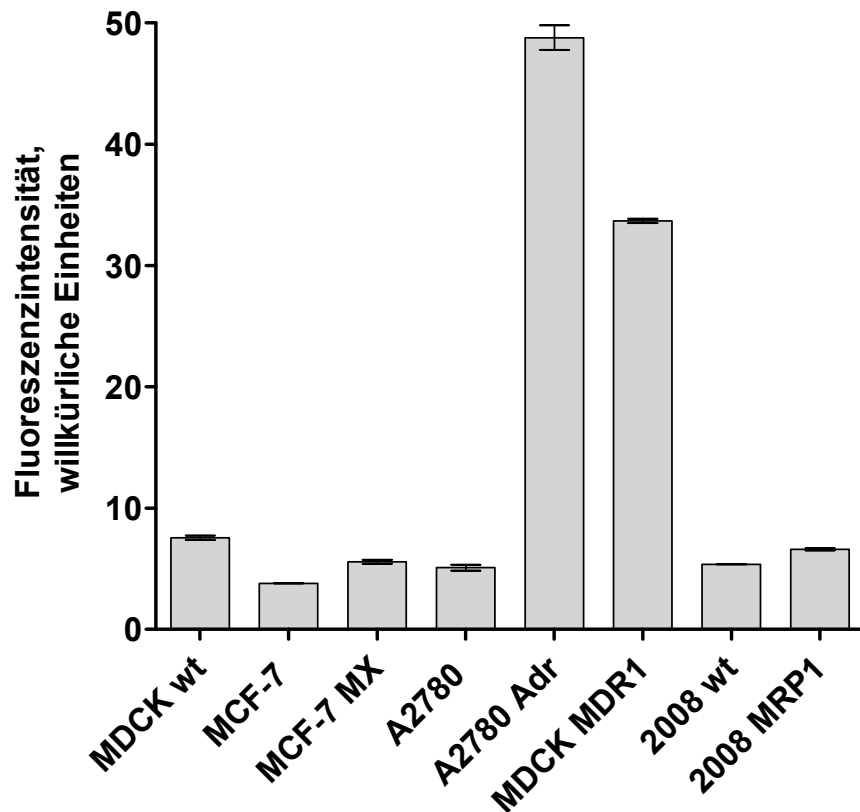


Abb. 4.2: Unterschiedliche Zelllinien, die mit Hilfe des Antikörpers MRK-16 markiert und am Durchflusszytometer untersucht wurden. Die ABCB1 positiven Zelllinien A2780 Adr und MDCK MDR1 exprimieren P-gp. Alle anderen untersuchten Zelllinien weisen keinen signifikanten Level an P-gp auf.

Der Expressionsstatus von MRP1 in 2008 wt und 2008 MRP1 Zellen wurde in der Dissertationsarbeit von Dr. Stefan Leyers mittels Western Blot eingehend untersucht und zeigt, dass die 2008 Ovarialkarzinom-Zelllinie einen hohen Gehalt an MRP1 aufweist.¹⁹⁷ Die Expression von BCRP und P-gp in 2008 MRP1 Zellen kann aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ausgeschlossen werden (s. Abb. 4.1 und Abb. 4.2).

Alle verwendeten transfizierten (MDCK BCRP, MDCK MDR1 und 2008 MRP1) und selektierten Zelllinien (MCF-7 MX und A2780 Adr) enthalten, in Übereinstimmung mit der Literatur, die nur erwünschten Proteine.^{113,202,203} Die selektive Überexpression der einzelnen Transporter in den jeweiligen Zelllinien stellte in dieser Arbeit die notwendige Voraussetzung für die funktionellen Studien an den ABC-Transportern BCRP, P-gp und MRP1 dar.

4.2 Optimierung des Hoechst 33342-Assays

Hoechst 33342 stellt ein Substrat von P-gp^{45,47} als auch von BCRP^{85,189} dar. Aufgrund dieser Tatsache kann Hoechst 33342 zur funktionellen Untersuchung beider Transporter herangezogen werden. Für die funktionelle Charakterisierung von P-gp wurde der Hoechst 33342-Assay bereits in der Dissertationsarbeit von Dr. Henrik Müller etabliert und beschrieben und konnte im Arbeitskreis als HTS-fähiger Assay (HTS = **H**igh **T**hroughput **S**creening) angewendet werden.¹⁹⁶

Ein Ziel dieser Arbeit bestand in der funktionellen Charakterisierung von BCRP mittels Hoechst 33342. Es sollten zunächst Verbindungen untersucht werden, deren Hemmwirkung bereits mittels Hoechst 33342 an P-gp bestimmt worden waren. Durch den Vergleich der Aktivitätswerte dieser Verbindungen sollte herausgefunden werden, welche Strukturmerkmale die Interaktion mit P-gp und/oder BCRP hervorrufen. Dazu musste der Hoechst 33342-Assay zunächst von P-gp exprimierenden Zellen auf BCRP exprimierende Zellen übertragen und etabliert werden.

4.2.1 Etablierung des Hoechst 33342-Assays an BCRP exprimierenden Zellen und Bestimmung der optimalen Hoechst 33342 Konzentration

Für ABCG2 sind bereits Modulatoren bekannt, die die Transportfunktion von BCRP hemmen können. Zu diesen BCRP Modulatoren gehört auch der potente P-gp Inhibitor XR9577²⁰⁴, der im späteren Verlauf auch als Standardsubstanz zur Validierung der Versuchsbedingungen eingesetzt wurde.

Um den Einfluss der BCRP Aktivität untersuchen zu können, wurden Fluoreszenz-Zeitkurven in BCRP exprimierenden MCF-7 MX und in BCRP negativen MCF-7 Zellen aufgenommen. Abb. 4.3 zeigt die unterschiedlichen Fluoreszenz-Zeitkurven von Hoechst 33342 in MCF-7 und MCF-7 MX Zellen. Der Fluoreszenzunterschied zwischen der Wildtypzelllinie (nicht gefüllte Kreise) und der resistenten Zelllinie (gefüllte Vierecke) ist deutlich erkennbar. Bei Betrachtung von Abb. 4.3 wird offensichtlich, dass sich die Fluoreszenz-Zeitverläufe für MCF-7 MX Zellen in Gegenwart des Inhibitors XR9577 (gefüllte Kreise) und von MCF-7 Zellen ohne XR9577 (nicht gefüllte Kreise) nicht unterscheiden.

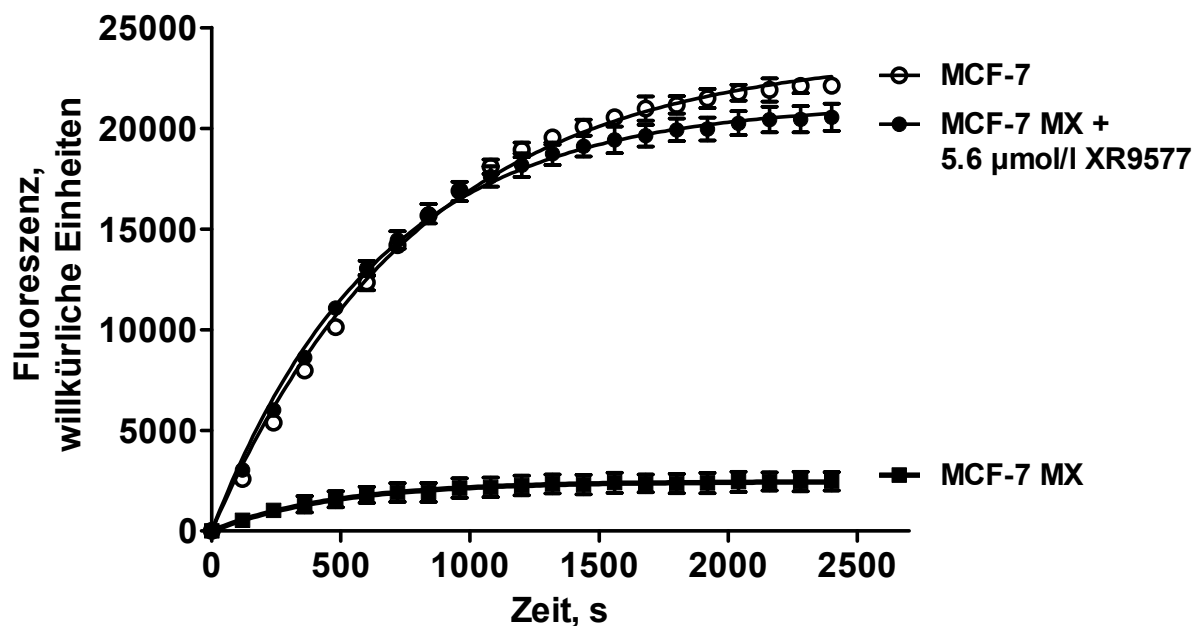


Abb. 4.3: Vergleich von verschiedenen Fluoreszenz-Zeitkurven von Hoechst 33342 (Endkonzentration 5 µmol/l): MCF-7 MX Zellen ohne Modulator (gefüllte Vierecke), MCF-7 MX Zellen, präinkubiert mit 5,6 µmol/l XR9577 (gefüllte Kreise) und MCF-7 Zellen ohne Modulator (nicht gefüllte Kreise). Die Fluoreszenz-Zeitkurve von MCF-7 Zellen mit Modulator (5,6 µmol/l XR9577) überschneidet sich mit der Kurve ohne Modulator und wurde der Übersicht halber weggelassen.

Dies ist darauf zurückzuführen, dass die MCF-7 MX Zellen mit einer BCRP vollständig inhibierenden Konzentration des Modulators XR9577 von 5,6 µmol/l behandelt wurden.²⁰⁴ Der nahezu identische Verlauf der beiden Kurven lässt außerdem darauf schließen, dass die Wildtypzelllinie kein BCRP exprimiert. Der große Unterschied der Fluoreszenz-Zeitkurven in MCF-7 MX Zellen mit und ohne Modulator XR9577 (gefüllte Kreise bzw. gefüllte Vierecke) zeigt, dass BCRP hochaktiv ist, um das Substrat Hoechst 33342 in den Extrazellulärraum zu pumpen. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Literatur und beweist, dass Hoechst 33342 ein BCRP Substrat darstellt.^{86,158,205}

Im Folgenden sollte bestätigt werden, dass XR9577 in der Lage ist die intrazelluläre Fluoreszenz zu erhöhen. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen von XR9577 zugesetzt und Fluoreszenz-Zeitdiagramme aufgenommen. In Abb. 4.4 ist ein typisches Fluoreszenz-Zeitdiagramm von XR9577 im Hoechst 33342-Assay abgebildet.

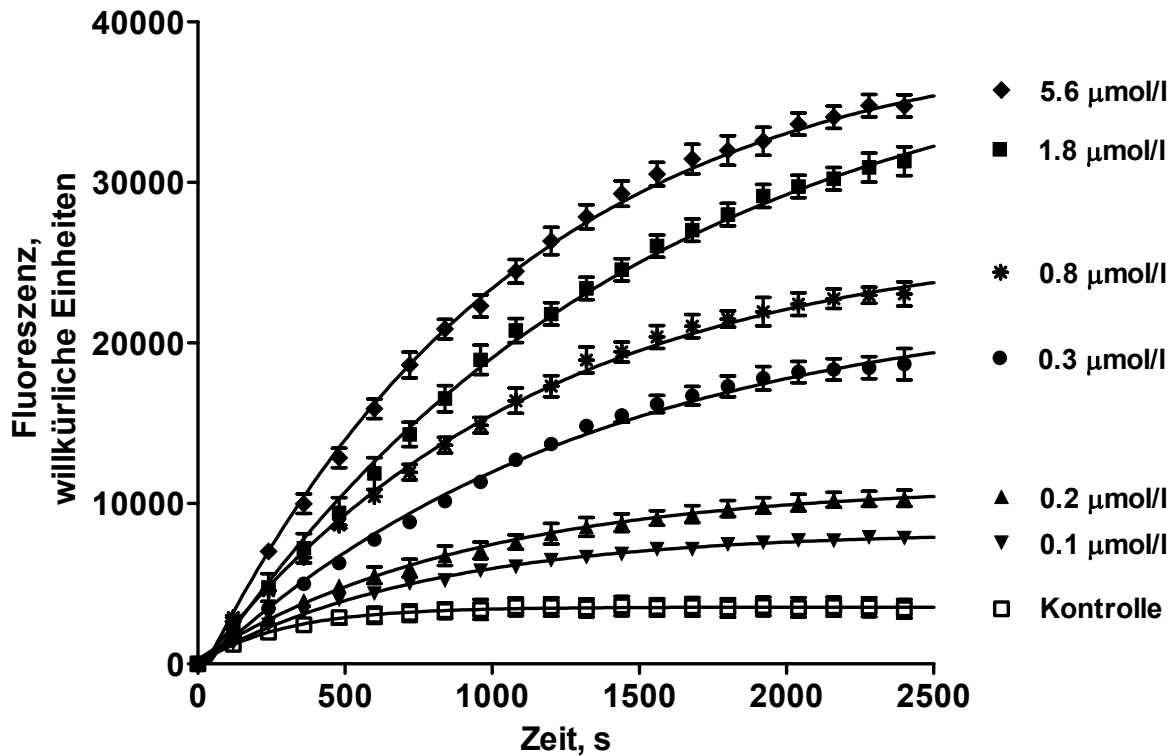


Abb. 4.4: Fluoreszenz-Zeitkurven für verschiedene Konzentrationen des Modulators XR9577, die mit Hilfe des Hoechst 33342-Assays an MCF-7 MX Zellen generiert wurden (0-2500 s). Die Fluoreszenz-Zeitkurven wurden nach dem Modell der einphasig exponentiellen Assoziation analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler eines typischen Experiments mit drei Replikaten aus einer Serie von mind. drei unabhängigen Versuchen.

Anhand der Abbildung wird offensichtlich, dass die Zunahme der Modulatorkonzentration XR9577 mit einem höheren Anstieg der Fluoreszenz verbunden ist. Die Fluoreszenz-Zeitverläufe haben bei einer finalen Hoechst 33342 Konzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ nach etwa 2400 s ihre maximal mögliche Fluoreszenz erreicht. Für die Auswertung der dargestellten Fluoreszenz-Zeitverläufe wurden die nach dem Modell einer einphasig exponentiellen Assoziation generierten Y_{max} -Werte herangezogen. In Abb. 4.5 sind die erhaltenden Y_{max} -Werte gegen die korrespondierenden logarithmierten Konzentrationen des Modulators aufgetragen. Aus der sigmoidalen Kurve lässt sich der pIC_{50} -Wert für XR9577 ableiten, der als Maß für den inhibitorischen Effekt herangezogen werden kann.

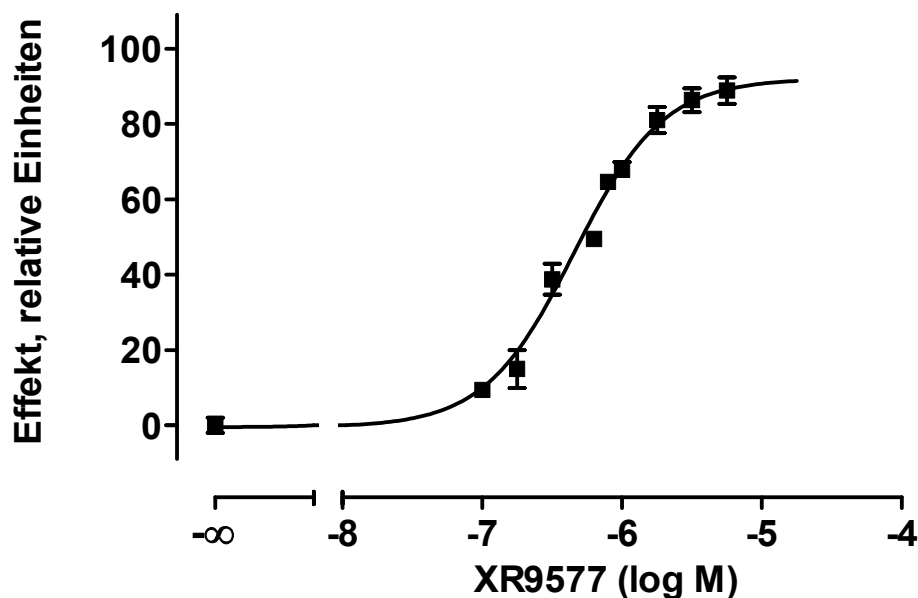


Abb. 4.5: Konzentrations-Effektkurve von XR9577 in MCF-7 MX Zellen (Hoechst 33342-Assay). Für die Auswertung wurden die nach dem Modell der einphasig exponentiellen Assoziation generierten Y_{\max} -Werte herangezogen; pIC_{50} (XR9577) = $6,29 \pm 0,04$, $n_H = 1,18 \pm 0,15$; ($n \geq 3$).

Alternativ konnten auch die initialen Anstiege der in Abb. 4.4 gezeigten Fluoreszenz-Zeitkurven analysiert werden. In Abb. 4.6 ist nur der vordere Abschnitt (0-900 s) der in Abb. 4.4 aufgeführten Fluoreszenz-Zeitverläufe dargestellt. Bis zu diesem Zeitpunkt hat die extrazelluläre Hoechst 33342 Konzentration noch nicht signifikant abgenommen, es liegt also eine Reaktionskinetik pseudonullter Ordnung vor, die erst im weiteren Verlauf in eine Reaktionskinetik erster Ordnung übergeht. In dem bisher etablierten Hoechst 33342-Assay für P-gp konnten für die Generierung von Konzentrations-Effektkurven sowohl die Y_{\max} -Werte (s. Abb. 4.4) als auch die initialen Anstiege (s. Abb. 4.6) verwendet werden. Die resultierenden Konzentrations-Effektkurven unterschieden sich weder hinsichtlich ihrer pIC_{50} -Werte noch hinsichtlich ihrer Hillkoeffizienten (Nachweis mittels F-Test).²⁰⁶ Wurde die Auswertung mittels linearer Regression durchgeführt, ergab sich jedoch die Problematik, dass bei der Entscheidung über den Bereich des quasi linearen Anstiegs individuell unterschiedliche Ergebnisse erhalten wurden. So differierten die Steigungen der einzelnen Geraden um ca. 10%, je nachdem, von wem die Auswertung durchgeführt wurde. Daher wurde zur Ermittlung der Aktivitätswerte die Auswertung der einphasig exponentiellen Assoziation präferiert. Dies bedeutete zwar eine längere Messdauer, lieferte jedoch reproduzierbarere Ergebnisse.

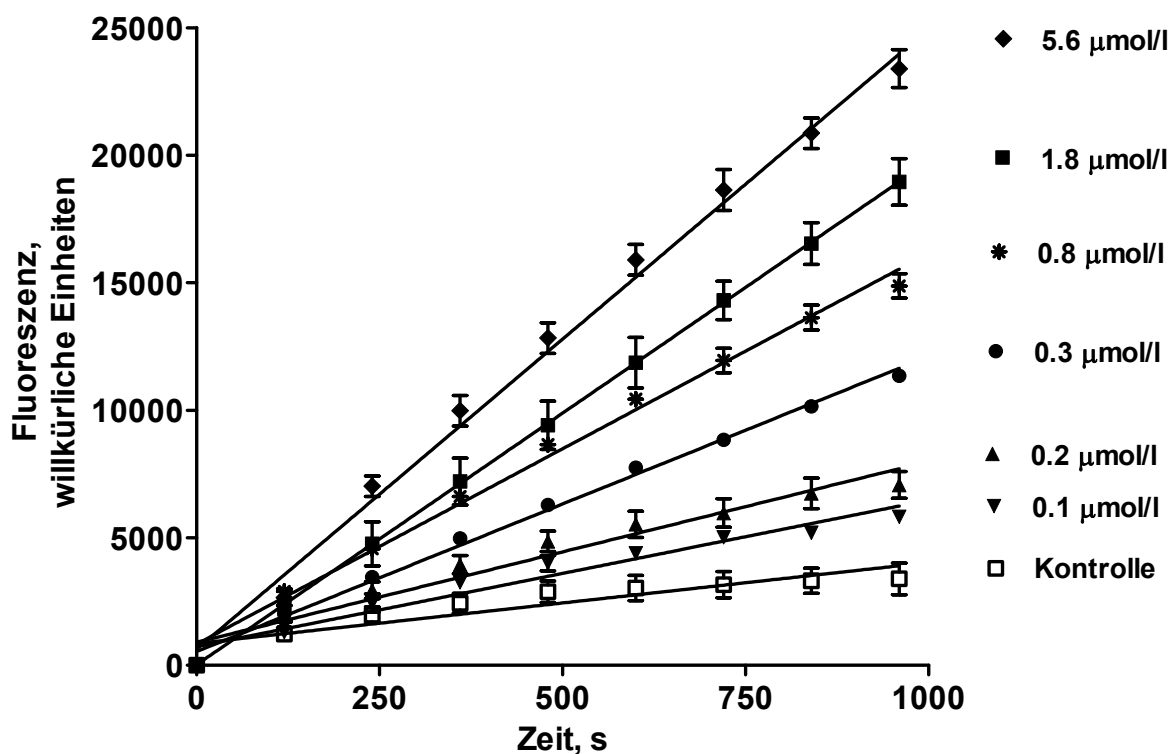


Abb. 4.6: Initialer linearer Anstieg der Fluoreszenz-Zeitkurven für verschiedene Konzentrationen des Modulators XR9577 (Hoechst 33342-Assay, MCF-7 MX Zellen). Die Steigungen der Geraden wurden mittels linearer Regression berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler eines typischen Experiments mit drei Replikaten aus einer Serie von mind. drei unabhängigen Versuchen.

Die Tabelle 4.1 beinhaltet pIC_{50} -Werte für bekannte BCRP Inhibitoren, die mit Hilfe des Hoechst 33342-Assays analysiert wurden. Bei der Ermittlung der Aktivitätswerte wurden beide Auswertungsverfahren, lineare Regression und einphasig verlaufende exponentielle Assoziation, herangezogen. Die Tabelle enthält die beiden BCRP spezifischen Inhibitoren Ko143 und Novobiocin. Das Fumitremorgin C Derivat Ko143 besitzt die höchste inhibitorische Aktivität und ist der bis heute bekannte potenteste BCRP Inhibitor. Die Hemmwirkung von Ko143 übersteigt die von Novobiocin um mehr als 2,5 log-Einheiten. Auch die Tyrosinkinaseinhibitoren Erlotinib, Gefitinib, Imatinib und Nilotinib stellen potente BCRP Inhibitoren dar. Die inhibitorische Wirksamkeit ist vergleichbar mit den beiden von der Firma Xenova entwickelten XR-Verbindungen. Die XR-Verbindungen wurden ursprünglich als potente P-gp Modulatoren entwickelt, stellen aber auch wirksame BCRP Inhibitoren dar.^{207,208,209} Die Verbindungen Verapamil und Cyclosporin A sind bekannte P-gp Modulatoren

4 Ergebnisse und Diskussion

und hemmen den Transporter mit hoher biologischer Aktivität (pIC_{50} (Verapamil) = $5,34 \pm 0,24$, pIC_{50} (Cyclosporin A) = $5,85 \pm 0,09$). An BCRP ist die inhibitorische Wirksamkeit jedoch um ein Vielfaches geringer (s. Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Verbindungen, die mit Hilfe des Hoechst 33342-Assays an MCF-7 MX Zellen untersucht wurden. Die Ermittlung der Aktivitätswerte erfolgte über lineare Regression bzw. einphasig exponentielle Assoziation. Gemittelte pIC_{50} -Werte beziehen sich auf mindestens drei unabhängige Experimente.

Verbindung	$pIC_{50} \pm SD$ (Lineare Regression)	$pIC_{50} \pm SD$ (Einphasig exp. Assoziation)
Cyclosporin A	$4,20 \pm 0,10$	$4,52 \pm 0,11$
Diltiazem	$3,07 \pm 0,08$	$3,29 \pm 0,13$
Erlotinib	$5,70 \pm 0,17$	$5,74 \pm 0,06$
Gefitinib	$5,93 \pm 0,12$	$5,96 \pm 0,17$
Imatinib	$5,39 \pm 0,18$	$5,19 \pm 0,14$
Ko143	$6,51 \pm 0,12$	$6,64 \pm 0,08$
Nicardipin	$4,78 \pm 0,03$	$4,85 \pm 0,19$
Nilotinib	$6,15 \pm 0,06$	$6,20 \pm 0,17$
Novobiocin	$4,18 \pm 0,15$	$4,07 \pm 0,08$
Progesteron	$3,90 \pm 0,24$	$4,03 \pm 0,11$
Reserpin	$4,58 \pm 0,13$	$4,65 \pm 0,15$
Verapamil	$3,28 \pm 0,06$	$3,57 \pm 0,09$
XR9576	$5,91 \pm 0,08$	$6,21 \pm 0,03$
XR9577	$6,11 \pm 0,18$	$6,24 \pm 0,15$

In Abb. 4.7 sind die pIC_{50} -Werte, die mittels Hoechst 33342-Assay nach den beiden Auswertungsmethoden ermittelt wurden, gegeneinander aufgetragen. Der quadrierte Korrelationskoeffizient von 0,98 unterstreicht, dass beide Auswertungsverfahren zu vergleichbaren Ergebnissen führen. Das 95%-Konfidenzintervall der Steigung der Regressionsgeraden schließt den Wert 1 ein.

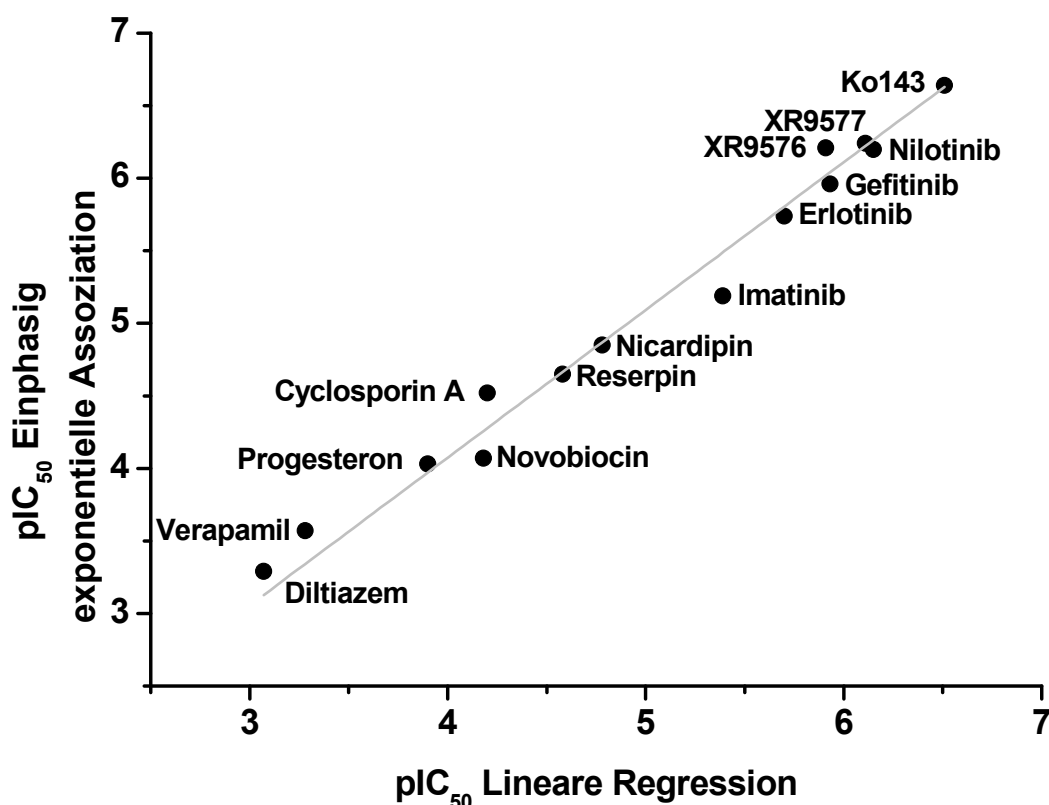


Abb. 4.7: Korrelation der pIC₅₀-Werte von 14 Verbindungen, die nach den beiden Auswertungsverfahren, lineare Regression und einphasig exponentielle Assoziation, ermittelt wurden. $r^2 = 0,98$.

Die ermittelten Aktivitätswerte der Verbindungen aus Tabelle 4.1 wurden bei einer finalen Hoechst 33342 Konzentration von 5 µmol/l gemessen. Bei der späteren Durchführung der enzymkinetischen Versuche bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen (s. Kapitel 4.9 ff) hat sich jedoch gezeigt, dass die Hoechst 33342 Fluoreszenz bei einer Konzentration von 5 µmol/l nicht mehr im linearen Bereich liegt. Abb. 4.8 zeigt den Fluoreszenzverlauf von Hoechst 33342 bei steigenden Substratkonzentrationen. Wie aus Abb. 4.8 zu entnehmen ist, wird bei einer Hoechst 33342 Konzentration von 5 µmol/l bereits eine Sättigung erreicht. Der Fluoreszenzanstieg verläuft nur bis zu einer Substratkonzentration von 2 µmol/l linear, d.h. nur bei niedrigen Konzentrationen sind Fluoreszenzintensität und Konzentration proportional zueinander. Ursache für das Abflachen der Kurve könnte zum einen eine Sättigung der Bindung von Hoechst 33342 an die Membran bzw. an die DNA sein. Zum anderen sind bei der relativ hohen Konzentration von 5 µmol/l auch Quenching-Effekte (Fluoreszenzlöschung) möglich. In Abb. 4.9 ist der

Fluoreszenzverlauf von Hoechst 33342 in MCF-7 MX Zellen bis zu einer maximalen Konzentration von 1,12 $\mu\text{mol/l}$ abgebildet.

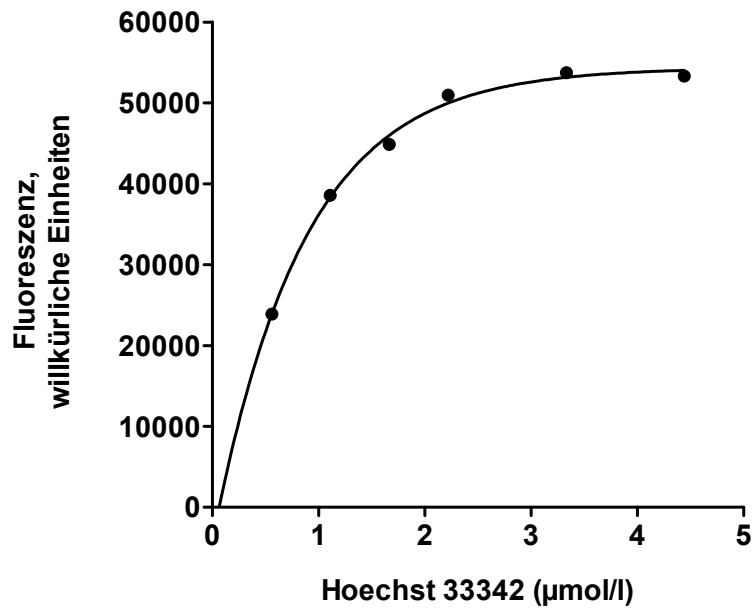


Abb. 4.8: Fluoreszenzverlauf von Hoechst 33342 bei steigenden Substratkonzentrationen (MCF-7 MX Zellen).

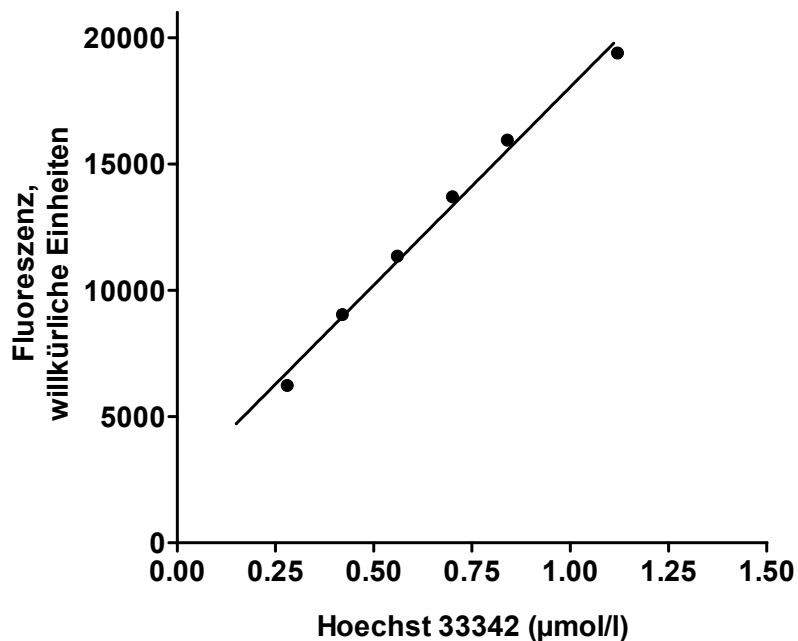


Abb. 4.9: Linearer Fluoreszenzanstieg von Hoechst 33342 bis zu einer Konzentration von 1,12 $\mu\text{mol/l}$ (MCF-7 MX Zellen).

Nach Feststellung dieses Sachverhaltes wurde, aufgrund der Linearität des Fluoreszenzverlaufs, für alle folgenden Experimente eine finale Hoechst 33342 Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ verwendet.

Bei der Verwendung einer finalen Hoechst 33342 Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ war zu beachten, dass die Dauer bis zum Erreichen des steady states um einiges länger war, als bei einer Konzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$. Wie Abb. 4.3 zu entnehmen ist, wird der Gleichgewichtszustand bei einer Hoechst 33342 Konzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ nach ca. 2500 s erreicht. Die Messdauer bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ verlängerte sich auf ca. 7000 s.

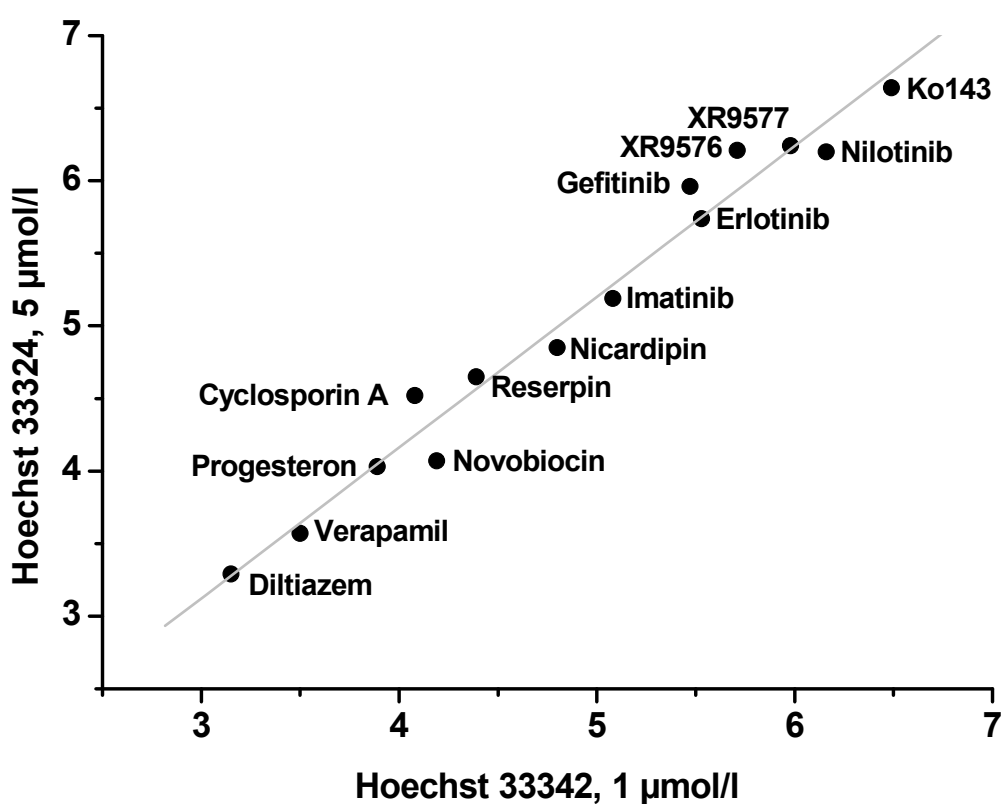


Abb. 4.10: Korrelation der pIC_{50} -Werte, die bei unterschiedlichen Hoechst 33342 Konzentrationen bestimmt wurden (finale Konzentration: 5 $\mu\text{mol/l}$ und 1 $\mu\text{mol/l}$). Die Ermittlung der Aktivitätswerte erfolgte über die einphasig exponentielle Assoziation. $r^2 = 0,97$.

Die in Tabelle 4.1 aufgeführten Verbindungen wurden zusätzlich bei einer finalen Hoechst 33342 Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ vermessen. In Abb. 4.10 sind die pIC_{50} -Werte, die bei den beiden Konzentrationen ermittelt wurden, gegeneinander

aufgetragen. Der quadrierte Korrelationskoeffizient von 0,97 zeigt, dass die Verwendung beider Konzentrationen zu nahezu gleichen Ergebnissen führt.

4.2.2 Einfluss der Mikrotiterplatten auf die Ausgangsfluoreszenz

Betrachtet man Abb. 4.9 fällt auf, dass die Hoechst 33342 Fluoreszenz bei einer Konzentration von 0 $\mu\text{mol/l}$ nicht durch den Wert Null geht, sondern die y-Achse bei einem Fluoreszenzwert von ca. 2650 schneidet. Von der Eigenfluoreszenz von Hoechst 33342 abgesehen, sollte die Anfangsfluoreszenz des Substrates zu Beginn der Reaktion minimal sein, d.h. die Gerade müsste durch den Ursprung der beiden Achsen verlaufen. Um dieses Phänomen erklären zu können, wurden MCF-7 MX Zellen in klare 96er-Mikrotiterplatten ausgesät.

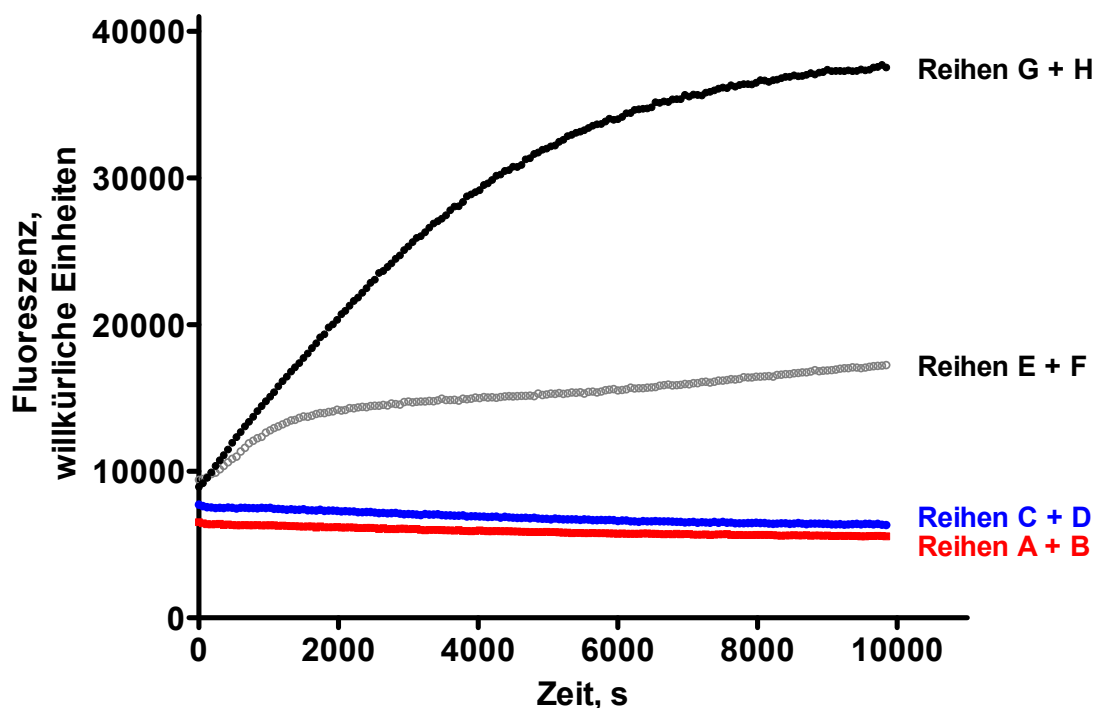


Abb. 4.11: Fluoreszenz-Zeitverlauf in einer klaren 96er-Mikrotiterplatte. Reihen A + B wurden frei gelassen (rote Linie). Reihen C + D enthalten KHP und Hoechst 33342 (blaue Linie). Reihen E-H enthalten MCF-7 MX Zellen, KHP und Hoechst 33342 bzw. 5,6 $\mu\text{mol/l}$ XR9577 und Hoechst 33342 (1 $\mu\text{mol/l}$) (graue bzw. schwarze Linie).

Die Reihen A + B wurden dabei frei gelassen, Reihen C + D enthielten KHP. Die verbleibenden Reihen der Mikrotiterplatte wurden mit Zellen versehen, wobei Reihen E + F anstelle eines Modulators KHP enthielten, Reihen G + H wurde der Modulator

XR9577 in einer finalen Konzentration von 5,6 $\mu\text{mol/l}$ zugesetzt. Anschließend wurde eine 1 $\mu\text{mol/l}$ Hoechst 33342 Lösung in die Reihen C-H pipettiert und die Fluoreszenz im Microplatereader vermessen (vgl. Kapitel 3.12.2).

Abb. 4.11 zeigt den Fluoreszenz-Zeitverlauf nach einer Messzeit von 10.000 s. Der Fluoreszenz-Zeitverlauf von Hoechst 33342 in MCF-7 MX Zellen ohne Inhibitor (graue Linie, Reihen E + F der Mikrotiterplatte) und mit 5,6 $\mu\text{mol/l}$ Inhibitor XR9577 (schwarze Linie, Reihen G + H der Mikrotiterplatte) folgt, wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, zu Beginn einer Reaktionskinetik pseudonullter Ordnung, die erst später in eine Reaktionskinetik erster Ordnung übergeht. Abb. 4.11 zeigt erneut, dass eine Modulatorkonzentration von 5,6 $\mu\text{mol/l}$ mit einem erhöhten Anstieg der Fluoreszenz einhergeht. Nach ca. 8000 s ist die maximal höchste Fluoreszenz erreicht. Betrachtet man Abb. 4.11 fällt auf, dass die Ausgangsfluoreszenz der beiden Kurven – ungehemmt und voll gehemmte Reaktion – bei einem Wert von ca. 8900 startet. Dieser hohe Anfangswert kann jedoch nicht durch die Eigenfluoreszenz von Hoechst 33342 erklärt werden. Anhand der blauen Linie in Abb. 4.11 (Reihen C + D der Mikrotiterplatte) ist erkennbar, dass die Hoechst 33342 Fluoreszenz im wässrigen bei ca. 7400 liegt. Da die Hoechst 33342 Fluoreszenz abhängig ist von dem Milieu, in dem sich die Substanz befindet, kann der Fluoreszenzunterschied zwischen der blauen Linie und dem Startpunkt der grauen bzw. schwarzen Linie erklärt werden (s. Abb. 4.11). Die Anwesenheit der Zellen in den Reihen E-H bewirkt einen Anstieg der Lipophilie in diesen Wells und somit auch eine Zunahme der Hoechst 33342 Fluoreszenz. Bezieht man die rote Linie in Abb. 4.11 (Reihen A + B) mit ein, wird offensichtlich, dass die klare 96er-Mikrotiterplatte eine gewisse unspezifische Eigenfluoreszenz aufweist. Da die Reihen A und B komplett frei gelassen wurden, sollte hier keine Fluoreszenz messbar sein. Der relativ hohe Anfangswert der Hoechst 33342 Fluoreszenz ist demnach auf die unspezifische Eigenfluoreszenz der klaren 96er-Mikrotiterplatte zurückzuführen und erklärt, warum der Fluoreszenzverlauf in Abb. 4.9 nicht durch den Ursprung des Graphen verläuft. Im Folgenden sollte überprüft werden, wie sich die Verwendung einer schwarzen 96er-Mikrotiterplatte auf den Ausgangswert der Hoechst 33342 Fluoreszenz auswirkt. Dazu wurden MCF-7 MX Zellen in schwarze 96er-Mikrotiterplatten ausgesät und, wie oben beschrieben, behandelt. In Abb. 4.12 ist der Fluoreszenz-Zeitverlauf nach einer Messzeit von 7000 s zu sehen. Betrachtet man die Rote Linie in Abb. 4.12 (Reihen A + B der Mikrotiterplatte) ist deutlich erkennbar, dass zu

Beginn der Messung die Ausgangsfluoreszenz nur noch bei einem Wert von ca. 300 liegt. Die unspezifische Fluoreszenz einer schwarzen 96er-Mikrotiterplatte liegt demnach um ein Vielfaches niedriger als die einer klaren 96er-Mikrotiterplatte. Dies kann zum einen dadurch erklärt werden, dass die Wells einer schwarzen Mikrotiterplatte voneinander abgeschirmt sind und keine eventuell auftretende unspezifische gegenseitige Beeinflussung stattfinden kann. Desweiteren scheint auch die gewählte Excitationswellenlänge eine Rolle zu spielen. Die Eigenfluoreszenz der durchsichtigen Platte kommt vermutlich durch die im Hoechst 33342-Assay gewählten Excitation bei 485 nm, die im VIS-Bereich liegt, zustande. Betrachtet man die Ausgangsfluoreszenz der Platten im Calcein AM-Assay bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm (UV-Bereich), liegt diese bei einem Wert, der der Eigenfluoreszenz von Calcein entspricht.¹⁹⁶ Bei dieser Wellenlänge zeigt die Platte demnach keine unspezifische Fluoreszenz.

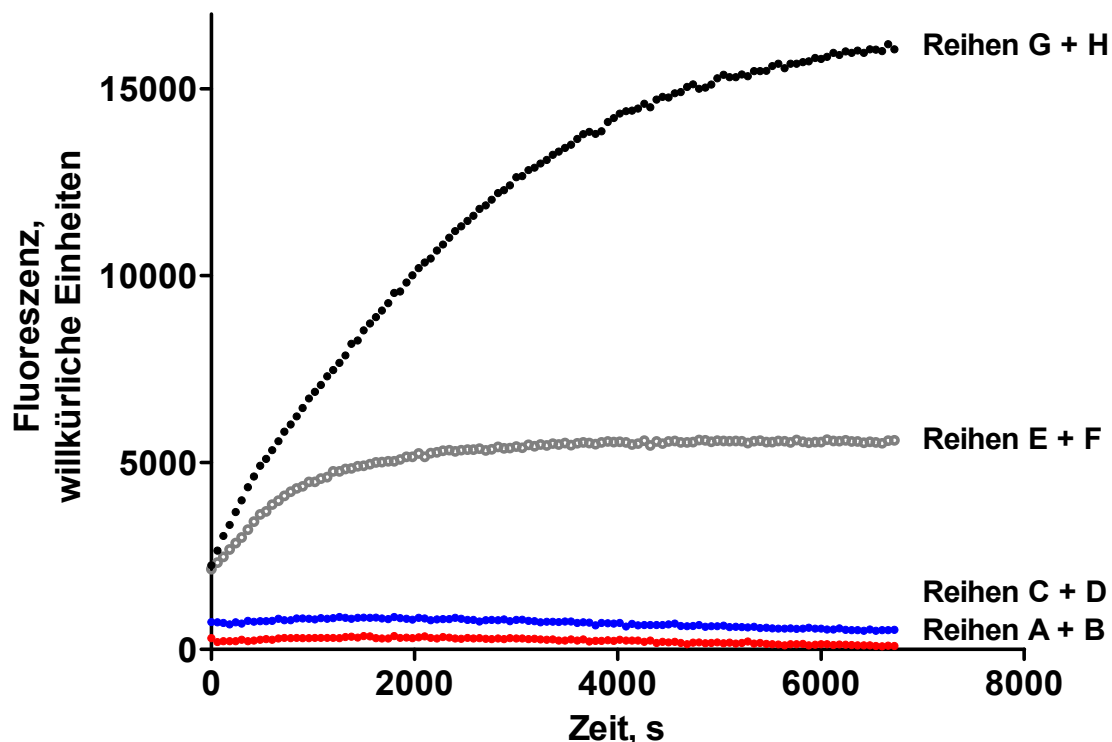


Abb. 4.12: Fluoreszenz-Zeitverlauf in einer schwarzen 96er-Mikrotiterplatte. Reihen A + B wurden frei gelassen (rote Linie). Reihen C + D enthalten KHP und Hoechst 33342 (blaue Linie). Reihen E-H enthalten MCF-7 MX Zellen, KHP und Hoechst 33342 bzw. 5,6 $\mu\text{mol/l}$ XR9577 und Hoechst 33342 (1 $\mu\text{mol/l}$) (graue bzw. schwarze Linie).

Das Balkendiagramm in Abb. 4.13 verdeutlicht noch einmal den ausgeprägten Unterschied in der unspezifischen Fluoreszenz zwischen einer klaren und einer schwarzen Mikrotiterplatte. Graue Balken spiegeln die Ausgangsfluoreszenz der klaren Platte wider. Schwarze Balken zeigen die Fluoreszenz der schwarzen Platte. Der Fluoreszenzwert in den Reihen C + D liegt bei beiden Platten im Schnitt ca. 10% höher als in den Reihen A + B. Dieser Fluoreszenzunterschied ist wahrscheinlich auf die Hoechst 33342 Ausgangsfluoreszenz im Wässrigen zurückzuführen.

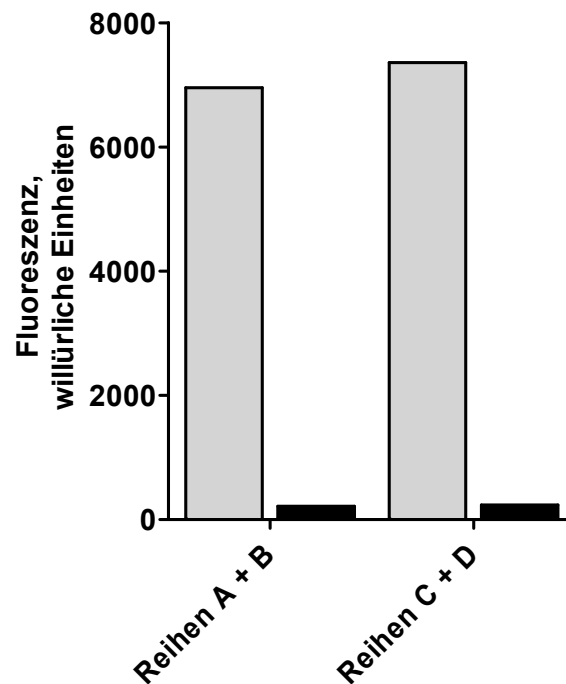


Abb. 4.13: Unspezifische Fluoreszenz einer klaren 96er-Mikrotiterplatte (graue Balken) und einer schwarzen 96er-Mikrotiterplatte (schwarze Balken). Reihen A + B wurden frei gelassen, Reihen C + D enthalten KHP und 1 $\mu\text{mol/l}$ Hoechst 33342.

Für die Bestimmung der Aktivitätswerte von Verbindungen an BCRP mittels des Hoechst 33342-Assays wurden im weiteren Verlauf der Arbeit schwarze 96er-Mikrotiterplatten verwendet.

4.3 Funktionelle Charakterisierung von BCRP in MCF-7 MX Zellen mittels Hoechst 33342-Assay

Mit Hilfe des Hoechst 33342-Assays konnte eine Vielzahl von Verbindungen untersucht werden. Für die Untersuchung von BCRP diente zunächst die Mitoxantron-resistente Brustkrebszelllinie MCF-7 MX. Ein zentrales Motiv dieser Arbeit bestand darin, die erhaltenen Aktivitätswerte an BCRP mit den Aktivitätswerten an P-gp zu vergleichen. Durch den Vergleich der biologischen Aktivitätswerte sollte herausgefunden werden, welche Strukturmerkmale die Interaktion mit P-gp und/oder BCRP hervorrufen.

Die Aktivitätswerte der beiden spezifischen BCRP Modulatoren Ko143 und Novobiocin sowie die von sieben weiteren bekannten P-gp Inhibitoren wurden sowohl an BCRP exprimierenden MCF-7 MX Zellen als auch an P-gp exprimierenden A2780 Adr Zellen mit Hilfe des Hoechst 33342-Assays ermittelt und miteinander verglichen. In Tabelle 4.2 sind die Ergebnisse der Untersuchungen aufgeführt.

Tabelle 4.2: Gemittelte pIC_{50} -Werte und Standardabweichungen von neun Verbindungen, die mittels Hoechst 33342-Assay (5 $\mu\text{mol/l}$, lin. Reg.) an P-gp (A2780 Adr) und BCRP (MCF-7 MX) bestimmt wurden ($n \geq 3$). k.E.: kein Effekt bis 300 $\mu\text{mol/l}$; k.E.*: kein Effekt bis 30 $\mu\text{mol/l}$.

Verbindung	$pIC_{50} \pm SD$ (P-gp)	$pIC_{50} \pm SD$ (BCRP)
Cyclosporin A	$5,85 \pm 0,09$	$4,20 \pm 0,10$
Diltiazem	$4,37 \pm 0,25$	$3,07 \pm 0,08$
Imatinib	$5,14 \pm 0,27$	$5,39 \pm 0,18$
Ko143	k.E.	$6,51 \pm 0,12$
Nicardipin	$5,32 \pm 0,13$	$4,78 \pm 0,03$
Novobiocin	k.E.*	$4,18 \pm 0,15$
Progesteron	$4,32 \pm 0,07$	$3,90 \pm 0,24$
Reserpin	$5,49 \pm 0,09$	$4,58 \pm 0,13$
Verapamil	$5,34 \pm 0,14$	$3,28 \pm 0,06$

Vergleicht man die pIC_{50} -Werte der Verbindungen an BCRP, besitzt das Fumitremorgin-Derivat Ko143 die höchste Aktivität (vgl. Kapitel 4.2.1).

Interessanterweise ist der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib ebenfalls ein potenter BCRP Inhibitor. Die inhibitorische Wirksamkeit dieser Verbindung ist an BCRP beinahe 10fach höher ausgeprägt als die von Novobiocin. In Tabelle 4.2 sind auch die biologischen Aktivitätswerte der Verbindungen an P-gp aufgeführt. Wie zu erwarten war, führen die beiden BCRP spezifischen Inhibitoren Ko143 und Novobiocin zu keiner Interaktion mit P-gp. Die verbleibenden bekannten P-gp Modulatoren aus Tabelle 4.2 sind in der Lage BCRP zu inhibieren, wobei die Aktivität deutlich geringer ausgeprägt ist als an P-gp. Eine Ausnahme stellt der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib dar, der beide Transporter in gleichem Ausmaß zu hemmen scheint. In Abb. 4.14 sind die pIC_{50} -Werte der sieben Verbindungen, die an beiden Transportern aktiv sind, gegeneinander aufgetragen. Der berechnete quadrierte Korrelationskoeffizient von 0,17 zeigt, dass keine Korrelation der Aktivitätswerte zwischen den beiden Transportern P-gp und BCRP besteht.

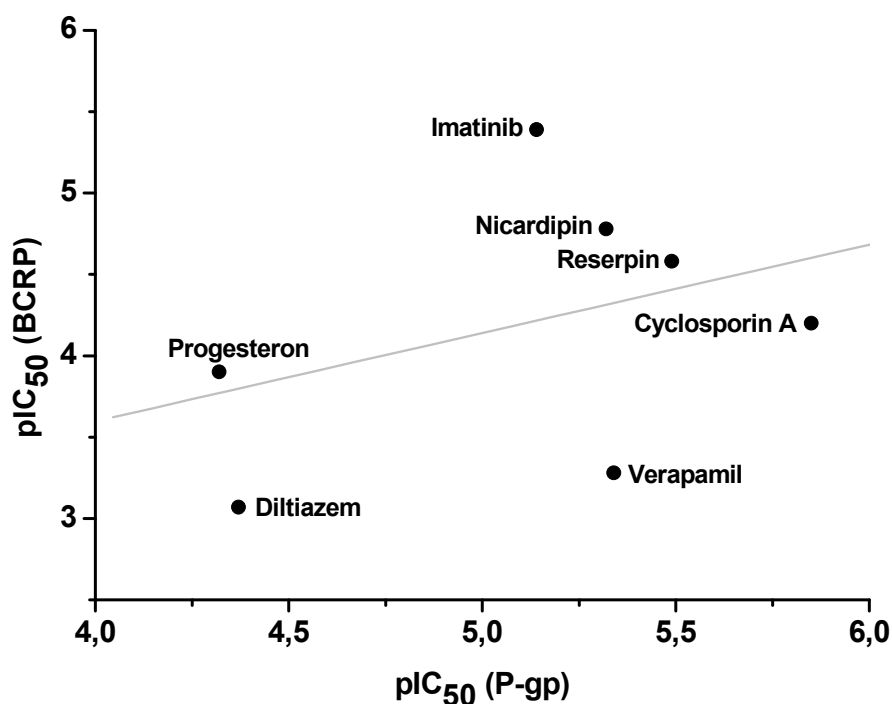


Abb. 4.14: pIC_{50} -Werte (P-gp, A2780 Adr Zellen) gegen pIC_{50} -Werte (BCRP, MCF-7 MX Zellen) für sieben strukturell verschiedene Verbindungen. $r^2 = 0,17$.

Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die untersuchten, strukturell völlig verschiedenen Verbindungen an unterschiedliche Bindungsstellen des jeweiligen Transporters binden. Vermutlich führen die unterschiedlichsten strukturellen Parameter zu einer Interaktion mit P-gp bzw. BCRP.

Um die Validität des in dieser Arbeit weiterentwickelten Hoechst 33342-Assays als angemessenes Testsystem für die Bestimmung der inhibitorischen Wirksamkeit von unterschiedlichen BCRP Inhibitoren nochmals zu unterstreichen, wurden die Aktivitätswerte von fünf Modulatoren aus Tabelle 4.2 mit korrespondierenden Literaturdaten verglichen. In einer Veröffentlichung von Matsson et al. sind sog. "fold increase values" diverser BCRP Inhibitoren beschrieben, die mittels eines Mitoxantron-Akkumulations-Assays in BCRP transfizierten Saos-2 Zellen bestimmt wurden.¹⁶¹ Der fold increase value beschreibt das Verhältnis aus der Akkumulation von Mitoxantron nach Koinkubation mit einem Inhibitor zu der Akkumulation des Substrates ohne Zusatz des Inhibitors. Ko143 diente als Referenzsubstanz, wobei eine 100%ige Hemmung von BCRP durch den Einsatz von 0,5 µmol/l erreicht wurde. Die resultierende Erhöhung der Mitoxanthonakkumulation der untersuchten Verbindungen wurde auf diesen Wert normalisiert. Verbindungen, die in der Lage waren, die Mitoxanthonakkumulation um den Faktor 3 (entspricht einem log fold increase value $\geq 0,47$) zu erhöhen, wurden als BCRP Inhibitoren klassifiziert. Nach Matsson et al. gilt dieser Wert als Schwelle, um zwischen signifikanter und nicht-signifikanter BCRP Modulation unterscheiden zu können.

Ein Nachteil dieser Vorgehensweise ist, dass die Verbindungen bei nur einer fixen Konzentration von 50 µmol/l getestet wurden und daher keine vollständigen Konzentrations-Effektcurven aufgenommen werden konnten. Eine genaue Bestimmung der pIC₅₀-Werte ist daher nicht möglich. Außerdem konnte eine Korrelation der log fold increase values mit den in dieser Arbeit bestimmten pIC₅₀-Werte nur dann stattfinden, wenn die verwendeten Konzentrationen zwischen IC₂₀ und IC₈₀ lagen (entspricht weitestgehend dem linearen Teil der sigmoidalen Konzentrations-Effektcurve). Insgesamt konnten für den Vergleich der Aktivitätswerte fünf Verbindungen ausgewählt werden, die einen log fold increase value $\geq 0,47$ besitzen und bei einer finalen Konzentration von 50 µmol/l getestet wurden. Durch Auftragen der im Hoechst 33342-Assay bestimmten Werte gegen die Literaturwerte von Matsson et al. wurde die in Abb. 4.15 dargestellte Korrelation erhalten. Der berechnete quadrierte Korrelationskoeffizient von 0,90 zeigt, dass die beiden Assays weitgehend identische Ergebnisse liefern. Ko143 konnte nicht in die Korrelation miteinbezogen werden, da der bei Matsson et al. gemessene fold increase value bei einer Konzentration von 0,5 µmol/l bestimmt wurde.

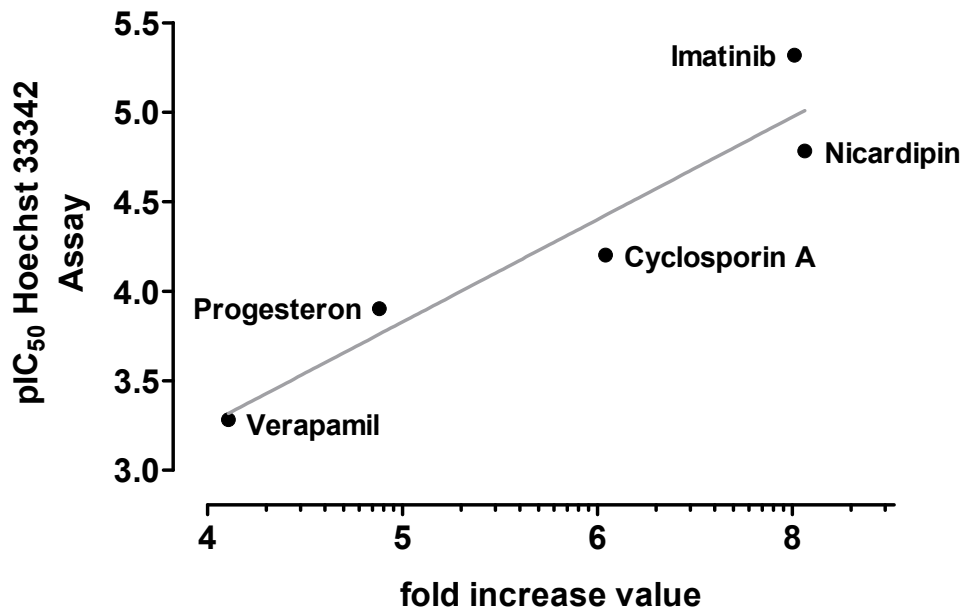


Abb. 4.15: Scatterplot der fünf pIC₅₀-Werte, die mittels Hoechst 33342-Assay in MCF-7 MX Zellen bestimmt wurden und der fold increase values nach Matsson et al. $r^2 = 0,90$.

Wie bereits oben erwähnt konnten nur Verbindungen, die bei gleichen Konzentrationen untersucht wurden, in die Korrelation eingeschlossen werden. Stattdessen wird von Matsson et al. jedoch ein genau bestimmter IC₅₀-Wert für Ko143 von 0,19 µmol/l ± 0,09 angegeben, der sehr gut mit dem in dieser Arbeit bestimmten IC₅₀-Wert für Ko143 von 0,31 µmol/l ± 0,11 korrespondiert.

4.4 Untersuchung von WK-Verbindungen mittels Hoechst 33342-Assay in MCF-7 MX Zellen

Der bekannte P-gp Inhibitor XR9576 (Tariquidar), von der Firma Xenova entwickelt, diente im Arbeitskreis als Leitstruktur für die Synthese weiterer Tariquidar-Analoga, die als WK-Modulatoren bezeichnet wurden. In Abb. 4.16 ist die Strukturformel von XR9576 wiedergegeben.

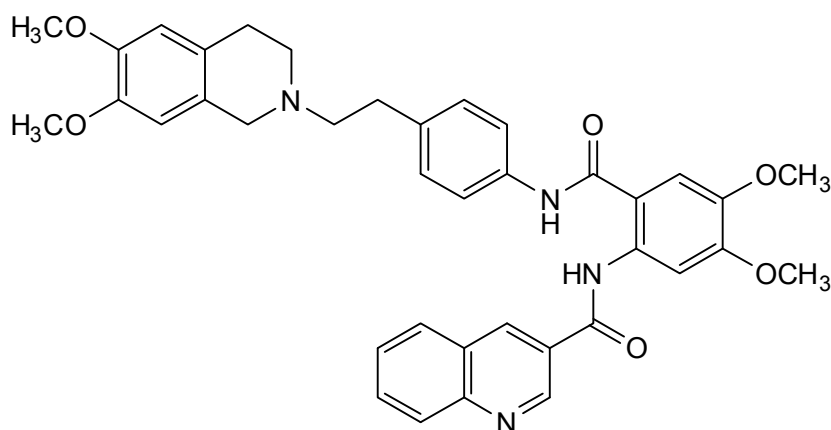


Abb. 4.16: Strukturformel von XR9576 (Tariquidar).

Diese neu synthetisierten Verbindungen wurden in der Dissertationsarbeit von Dr. Henrik Müller in Bezug auf Ihre Interaktion mit P-gp ausführlich untersucht und beschrieben.¹⁹⁶ Untersuchungen der Arbeitsgruppe Robey et al. haben gezeigt, dass XR9576 in der Lage ist, auch die BCRP Aktivität zu hemmen.⁴¹ Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, die im Arbeitskreis synthetisierten WK-Verbindungen, die strukturverwandt zu Tariquidar sind und bereits als P-gp Inhibitoren identifiziert wurden, bezüglich ihrer Hemmwirkung an BCRP zu untersuchen. Zu den untersuchten Verbindungen gehörten 25 im Arbeitskreis neu synthetisierte WK-Derivate und 5 XR-Analoga. Die erhaltenen Aktivitätswerte an BCRP sollten anschließend mit den Aktivitätswerten an P-gp verglichen werden. Auch hier sollte wieder durch den Vergleich der biologischen Aktivitätswerte dieser strukturverwandten Verbindungen herausgefunden werden, welche Strukturmerkmale die Interaktion mit P-gp und/oder BCRP hervorrufen.

4.4.1 Allgemeiner Aufbau der WK-Verbindungen

Die WK-Verbindungen enthalten die in Abb. 4.17 A und B zu erkennenden Grundgerüste. Das tertiäre Stickstoffatom des Tetrahydroisochinolin-Heterozyklus bildet bei den Tariquidar-Analoga das basische Zentrum. An die Aminkomponente schließt sich ein variabler Linker (häufig Ethylphenyl) an, der mit einer Amid-Partialstruktur verknüpft ist. Diese Verknüpfung kann zusätzlich mit einem aromatischen Bereich verbunden sein, der die größte strukturelle Diversität aufweist (s. R^2 in Abb. 4.17 A). Je nach Vorhandensein dieses aromatischen Bereiches können die WK-Verbindungen in die so genannten großen (Abb. 4.17 A) und kleinen Modulatoren (Abb. 4.17 B) unterteilt werden.

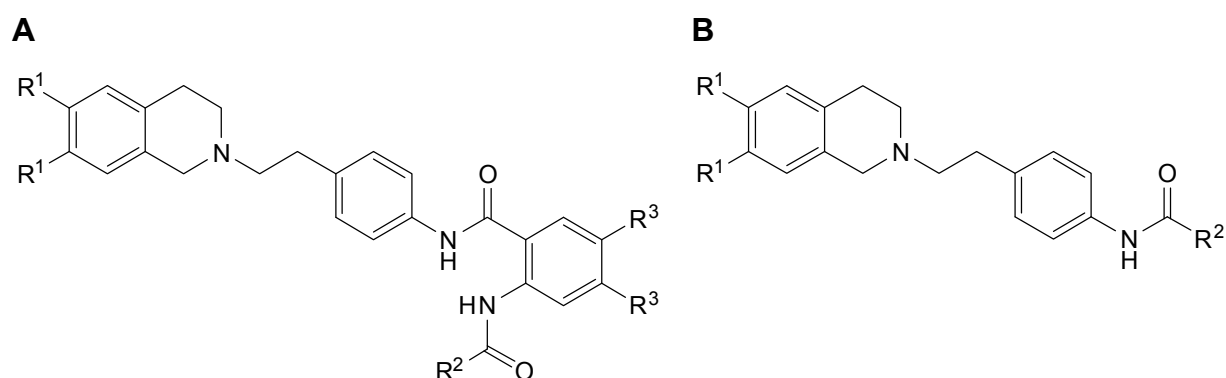


Abb. 4.17: Grundgerüst der Tariquidar-Analoga. A: Grundgerüst der großen WK-Verbindungen. B: Grundgerüst der kleinen WK-Verbindungen.

4.4.2 Biologische Aktivität an BCRP und P-gp

Tabelle 4.3 enthält die Strukturen und pIC_{50} -Werte der untersuchten Tariquidar-Analoga bzw. WK-Modulatoren, die an BCRP exprimierenden MCF-7 MX Zellen und an P-gp exprimierenden A2780 Adr Zellen mit Hilfe des Hoechst 33342-Assays bestimmt wurden. Der Datensatz kann, je nach Grundgerüst, in zwei Gruppen eingeteilt werden (s. Tabelle 4.3). Die sechs großen Anthranilamid-Derivate basieren auf Grundgerüst A. Die verbleibenden 24 Verbindungen gehören zu den kleinen WK-Modulatoren und basieren auf Grundgerüst B. Alle 30 Verbindungen weisen als gemeinsames Strukturelement den Tetrahydroisochinolinethylphenylamidrest auf.

4 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.3: Strukturen und pIC₅₀-Werte der untersuchten XR-Analoga und WK-Modulatoren (Hoechst 33342-Assay, MCF-7 MX bzw. A2780 Adr Zellen, n ≥ 3).

Verbindung	R ¹	R ²	R ³	pIC ₅₀ ± SD (BCRP)	pIC ₅₀ ± SD (P-gp) ^a
Grundgerüst A					
XR9456	OCH ₃	Phenyl	H	5,40 ± 0,13	6,29 ± 0,06
XR9544	OCH ₃	3-Chinolyl	H	5,30 ± 0,19	6,78 ± 0,09
XR9576	OCH ₃	3-Chinolyl	OCH ₃	5,84 ± 0,04	7,14 ± 0,12
XR9577	H	3-Chinolyl	H	6,00 ± 0,23	6,45 ± 0,07
XR9504	OCH ₃	4-Methylphenyl	H	5,41 ± 0,25	6,28 ± 0,23
WK-X-34	OCH ₃	3,4-Dimethoxyphenyl	H	5,68 ± 0,12	6,48 ± 0,15
Grundgerüst B					
WK-X-14	OCH ₃	2-Nitrophenyl	H	3,96 ± 0,15	5,26 ± 0,03
WK-X-15	H	2-Nitrophenyl	H	4,10 ± 0,09	4,87 ± 0,02
WK-X-16	OCH ₃	2-Aminophenyl	H	4,07 ± 0,18	4,95 ± 0,24
WK-X-17	H	2-Aminophenyl	H	4,13 ± 0,23	5,02 ± 0,04
WK-X-30	OCH ₃	4-Nitrophenyl	H	5,12 ± 0,18	5,86 ± 0,06
WK-X-31	H	4-Nitrophenyl	H	5,18 ± 0,20	5,30 ± 0,16
WK-X-33	OCH ₃	4-Aminophenyl	H	3,58 ± 0,17	5,15 ± 0,09
WK-X-37	H	4-Aminophenyl	H	4,11 ± 0,12	5,38 ± 0,32
WK-X-51	OCH ₃	3-Chinolyl	H	4,62 ± 0,17	6,84 ± 0,25
WK-X-52	H	3-Chinolyl	H	5,30 ± 0,09	6,38 ± 0,09
WK-X-56	OCH ₃	3,4-Dimethoxyphenyl	H	4,32 ± 0,07	5,27 ± 0,25
WK-X-57	OCH ₃	4,5-Dimethoxy- 2-nitrophenyl	H	4,19 ± 0,05	5,31 ± 0,14
WK-X-58	OCH ₃	4-Chinolyl	H	4,44 ± 0,15	5,65 ± 0,27
WK-X-66	OCH ₃	Benzo-1,3-dioxol	H	4,82 ± 0,14	5,85 ± 0,19
WK-Y-1	OCH ₃	2-Bromphenyl	H	4,66 ± 0,05	5,46 ± 0,54
WK-Y-2	OCH ₃	3-Bromphenyl	H	4,64 ± 0,21	5,49 ± 0,63
WK-Y-3	OCH ₃	4-Bromphenyl	H	4,94 ± 0,02	5,61 ± 0,37
WK-Y-15	OCH ₃	Phenyl	H	4,61 ± 0,09	5,32 ± 0,27
WK-Y-25	OCH ₃	1-Naphthyl	H	4,89 ± 0,13	5,73 ± 0,18
WK-Y-26	OCH ₃	2-Naphthyl	H	5,14 ± 0,10	6,11 ± 0,37
WK-Y-27	OCH ₃	2-Chinoxalinyll	H	5,22 ± 0,20	6,68 ± 0,16
WK-Y-28	OCH ₃	3-Isochinolyl	H	5,22 ± 0,10	6,11 ± 0,20
WK-Y-29	OCH ₃	3-Pyridyl	H	4,35 ± 0,05	5,50 ± 0,23
WK-Y-30	OCH ₃	6-Chinolyl	H	4,84 ± 0,07	6,13 ± 0,21

^a pIC₅₀-Werte für P-gp wurden Ref. 196 entnommen, mit Ausnahme von XR9576 und WK-Y-15, deren Aktivitätswerte in dieser Arbeit bestimmt wurden.

Betrachtet man die Aktivitätswerte an BCRP, erwies sich XR9577 unter diesen Verbindungen als die potenteste Substanz im Hoechst 33342-Assay. Verbindungen mit Grundgerüst B waren im Schnitt um den Faktor 10 schlechter wirksam als ihre großen Analoga. Aus den in Tabelle 4.3 angegebenen Ergebnissen können für BCRP folgende Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet werden:

Die Methoxygruppen, die am Tetrahydroisochinolinring in Position 6 und 7 lokalisiert sind (R^1), führen in der Regel zu einer Verschlechterung der Hemmwirkung gegenüber BCRP. Die Substanz XR9577 ($pIC_{50} = 6,00 \pm 0,23$), die in R^1 keine Methoxygruppen besitzt, ist fast um das Fünffache besser wirksam als ihr Analogon XR9544 ($pIC_{50} = 5,30 \pm 0,19$) mit Methoxygruppen. Die Aktivitätswerte der Substanzen WK-X-37 ($pIC_{50} = 4,11 \pm 0,12$) und WK-X-33 ($pIC_{50} = 3,58 \pm 0,17$) sowie der Verbindungen WK-X-52 ($pIC_{50} = 5,30 \pm 0,09$) und WK-X-51 ($pIC_{50} = 4,62 \pm 0,17$) verhalten sich analog.

Handelt es sich bei den Verbindungen mit Grundgerüst A beim Substituenten R^2 um einen 3,4-Dimethoxyphenylrest, nimmt die Aktivität des Inhibitors im Vergleich zu einer Verbindung mit unsubstituiertem Phenylrest R^2 leicht zu. WK-X-34 ($pIC_{50} = 5,68 \pm 0,12$) ist beispielsweise etwas stärker wirksam als XR9456 ($pIC_{50} = 5,40 \pm 0,13$).

Betrachtet man die Verbindungen, die auf Grundgerüst B basieren, wird deutlich, dass eine in para-Position lokalisierte Nitrogruppe des Phenyl-Substituenten R^2 im Gegensatz zu einer Nitrogruppe in ortho-Position zu einer verstärkten Inhibition von BCRP führt. Dies ergibt sich aus dem Vergleich der pIC_{50} -Werte der ortho-Nitro-Derivate WK-X-14 ($pIC_{50} = 3,96 \pm 0,15$) und WK-X-15 ($pIC_{50} = 4,10 \pm 0,11$) mit den pIC_{50} -Werten der analogen para-Nitro-Derivate WK-X-30 ($pIC_{50} = 5,12 \pm 0,18$) und WK-X-31 ($pIC_{50} = 5,18 \pm 0,20$).

WK-X-33 und WK-X-37 besitzen in para-Position des Phenylrestes R^2 eine Aminofunktion. Die pIC_{50} -Werte von WK-X-33 ($pIC_{50} = 3,58 \pm 0,17$) und WK-X-37 ($pIC_{50} = 4,11 \pm 0,12$) sind deutlich kleiner als die pIC_{50} -Werte der korrespondierenden Nitro-Analoga WK-X-30 ($pIC_{50} = 5,12 \pm 0,18$) und WK-X-31 ($pIC_{50} = 5,18 \pm 0,20$). Ein para-Nitro-Substituent des Phenylrestes R^2 ist demnach gegenüber einem para-Amino-Substituenten bevorzugt.

Die Erweiterung des aromatischen Bereichs von einem Monozyklus (R^2), wie in der Verbindung WK-Y-15 ($pIC_{50} = 4,61 \pm 0,09$) in Form eines unsubstituierten Phenylrestes R^2 gegeben, in einen Bicyclus, der in der Substanz WK-Y-26 ($pIC_{50} = 5,14 \pm 0,10$) als Naphthyl-Substituent vorkommt, trägt zu einer effektiveren

Hemmung von BCRP bei. In Übereinstimmung damit besitzt das 3-Chinolin-Derivat WK-X-51 ($pIC_{50} = 4,62 \pm 0,17$) einen höheren pIC_{50} -Wert als das 3-Pyridin-Derivat WK-Y-29 ($pIC_{50} = 4,35 \pm 0,05$), wobei der Unterschied hier geringer ausfällt.

Die Einführung eines Stickstoffatoms wie in der Verbindung WK-Y-29 ($pIC_{50} = 4,35 \pm 0,05$) in den Phenylsubstituenten R^2 führt im Vergleich zu der Verbindung WK-Y-15 ohne Stickstoffatom ($pIC_{50} = 4,61 \pm 0,09$) zu einer verringerten Interaktion mit BCRP. Noch stärker macht sich dieser Unterschied bei einem Vergleich der beiden Verbindungen WK-Y-26 ($pIC_{50} = 5,14 \pm 0,10$) und WK-X-51 ($pIC_{50} = 4,62 \pm 0,17$), die einen stickstoffhaltigen 3-Chinolyrest besitzt, bemerkbar.

Auch die Position des Stickstoffatoms im bicyklischen Substituenten R^2 beeinflusst die Höhe des pIC_{50} -Wertes der Verbindungen. Das 2-Chinolin-Derivat WK-Y-28 ($pIC_{50} = 5,22 \pm 0,10$) besitzt im Vergleich zu dem 6-Chinolin-Derivat WK-Y-30 ($pIC_{50} = 4,84 \pm 0,07$) und dem 3-Chinolin-Derivat WK-X-51 ($pIC_{50} = 4,62 \pm 0,17$) einen größeren pIC_{50} -Wert.

Die Einführung eines weiteren Stickstoffatoms in den 3-Chinolin-Substituenten R^2 , die zu einem Chinoxalin-Heterozyklus wie in WK-Y-27 ($pIC_{50} = 5,22 \pm 0,20$) führt, bewirkt im Vergleich zu WK-X-51 ($pIC_{50} = 4,62 \pm 0,17$) eine bemerkenswerte Erhöhung der biologischen Aktivität.

Die biologischen Aktivitätswerte der Verbindungen an P-gp wurden bereits in der Dissertationsarbeit von Dr. Henrik Müller ausführlich diskutiert und können Referenz 196 entnommen werden.

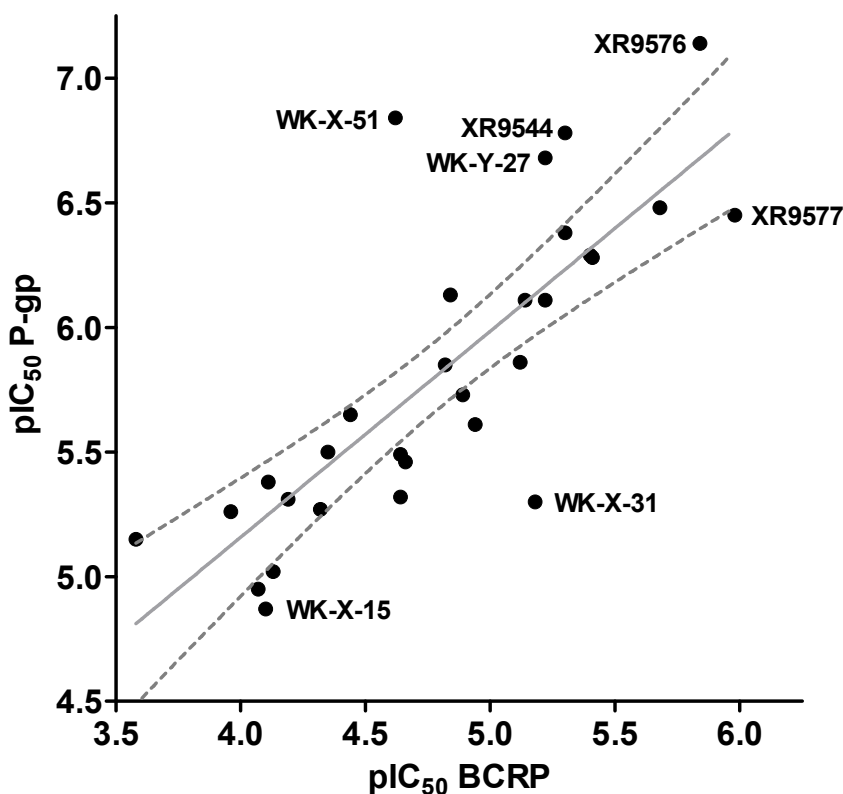


Abb. 4.18: Scatterplot der pIC_{50} -Werte an MCF-7 MX und A2780 Adr Zellen für 30 unterschiedliche XR-Analoga und WK-Derivate (Hoechst 33342-Assay). $r^2 = 0,62$.

Vergleicht man die pIC_{50} -Werte der 30 Verbindungen, die an BCRP und P-gp generiert wurden, ergibt sich eine nur moderate Korrelation. Wie Abb. 4.18 zu entnehmen ist, beträgt der berechnete quadrierte Korrelationskoeffizient 0,62. Mehr als die Hälfte der Verbindungen liegen außerhalb des 95% Konfidenzintervalls. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass unterschiedliche strukturelle Merkmale die Interaktion mit den beiden ABC-Transportern P-gp und BCRP beeinflussen.

4.4.3 Free-Wilson Analyse ausgewählter WK-Verbindungen

Um die Strukturelemente zu identifizieren, die signifikant die Interaktion mit BCRP bzw. P-gp beeinflussen, wurde für einen Teil der 30 WK-Verbindungen eine klassische 2D-QSAR (**Q**uantitative **S**tructure **A**ctivity **R**elationship) Analyse in Form einer Free-Wilson Analyse durchgeführt. Die Free-Wilson Analyse, die im Jahr 1964 entwickelt wurde, dient der Struktur-Wirkungs-Aufklärung chemisch verwandter

Substanzen. Die Free-Wilson Analyse geht davon aus, dass in einer Reihe chemisch verwandter Substanzen eine Referenzverbindung, meist die unsubstituierte Ausgangsverbindung, per se einen ganz bestimmten Beitrag μ zur biologischen Wirkung liefert. Jeder Substituent an diesem Gerüst bedingt eine Veränderung a_i der Aktivität. Der Beitrag des Substituenten zur biologischen Wirksamkeit ist dabei additiv. Die biologische Wirksamkeit einer Verbindung kann nach Gleichung 4.1 berechnet werden:

Gleichung 4.1:

$$BA = \sum a_i X_i + \mu$$

Die biologische Aktivität BA setzt sich zusammen aus dem Beitrag des i-ten Substituenten a_i und dem Vorhandensein dieses Substituenten X_i . Für den Fall, dass der i-te Substituent vorhanden ist, nimmt X für diesen Substituenten den Wert 1 an, bei Fehlen des Strukturelementes ergibt sich der Wert 0. Bei der Free-Wilson Analyse handelt es sich um eine "echte" Struktur-Wirkungsanalyse, da sie Parameter, die strukturelle Information kodieren (1 für vorhanden, 0 für nicht vorhanden), mit biologischen Wirkungen korreliert. Außerdem ist sie einfach durchzuführen, da allein die Strukturen und die biologischen Daten bekannt sein müssen. Nachteile der Free-Wilson Analyse sind, dass die strukturelle Variation an mindestens zwei unterschiedlichen Substitutionsorten vorliegen muss, da sonst nicht genügend Freiheitsgrade für die Anwendung der statistischen Methode gegeben sind. Des Weiteren sind Vorhersagen nur für neue Kombinationen der in der Analyse bereits berücksichtigten Substituenten möglich, nicht jedoch für neue Substituenten.²¹⁰

In die Free-Wilson Analyse wurden nur die in Tabelle 4.4 aufgeführten Verbindungen einbezogen, da nur diese Substituenten aufweisen, die häufiger als einmal unter den Substanzen vertreten sind. Jeder Substituententyp sollte häufiger als einmal vorkommen, da er ansonsten per se signifikant ist. Die Substituenten der 15 WK-Verbindungen, die mit Hilfe der Free-Wilson Analyse untersucht wurden, sind in Tabelle 4.4 angegeben: (a) 6,7-Dimethoxy, (b) ortho-Nitrophenyl, (c) ortho-Aminophenyl, (d) para-Nitrophenyl, (e) 3,4-Dimethoxyphenyl, (f) Chinolyl und (g) Amidlinker 2 (Amidlinker 2 bezieht sich auf die großen XR-Analoga).

Tabelle 4.4: Free-Wilson Matrix der 15 WK-Modulatoren. Verbindung WK-X-37 diente als Referenz und ist grau unterlegt (Verb. = Verbindung, ph. = phenyl, Chin. = Chinolyl).

Verb.	pIC ₅₀ BCRP	pIC ₅₀ P-gp	R ¹ 6,7-Di- meth- oxy	R ² o- Nitro ph.	R ² o- Amino ph.	R ² p- Nitro ph.	R ² 3,4-Di- meth- oxyph.	R ² 3- Chin.	Amid- linker 2
XR9544	5,30	6,78	1	0	0	0	0	0	1
XR9577	6,00	6,45	0	0	0	0	0	0	1
XR9576	5,84	7,14	1	0	0	0	1	0	1
WK-X-14	3,96	5,26	1	1	0	0	0	0	0
WK-X-15	4,10	4,87	0	1	0	0	0	0	0
WK-X-16	4,07	4,95	1	0	1	0	0	0	0
WK-X-17	4,13	5,02	0	0	1	0	0	0	0
WK-X-30	5,12	5,86	1	0	0	1	0	0	0
WK-X-31	5,18	5,30	0	0	0	1	0	0	0
WK-X-33	3,58	5,15	1	0	0	0	0	0	0
WK-X-37	4,11	5,38	0	0	0	0	0	0	0
WK-X-51	4,62	6,84	1	0	0	0	0	1	0
WK-X-52	5,30	6,38	0	0	0	0	0	1	0
WK-X-56	4,32	5,27	1	0	0	0	1	0	0
WK-X-57	4,19	5,31	1	1	0	0	1	0	0

Die Free-Wilson Matrix (Tabelle 4.4) wurde mit Hilfe einer multiplen linearen Regression analysiert. Als Referenz wurde die Substanz WK-X-37 festgelegt.

Tabelle 4.5: Regressionskoeffizienten und Standardfehler der Free-Wilson Analysen von 15 untersuchten Verbindungen.

Name	Koeffizient ± Standardfehler (BCRP)	Koeffizient ± Standardfehler (P-gp)
Konstante	4,178 ± 0,092	4,969 ± 0,102
(R¹) 6,7 Dimethoxy	-0,362 ± 0,109	+0,292 ± 0,111
(R²) para-Nitrophenyl	+1,153 ± 0,152	+0,465 ± 0,166
(R²) 3,4-Dimethoxyph.	+0,422 ± 0,139	-
(R²) 3-Chinolyl	+0,963 ± 0,152	+1,495 ± 0,166
Amidlinker 2	+1,636 ± 0,128	+1,627 ± 0,143

Deskriptoren für die Variablen ortho-Nitrophenyl sowie ortho-Aminophenyl, die keinen signifikanten Beitrag für die Aktivität der Verbindungen leisteten, wurden über die sog. Rückwärtsmethode ausgeschlossen. Tabelle 4.5 enthält die finalen Modelle, die unter Einbeziehung der statistisch signifikanten Variablen resultieren. In Tabelle 4.6 sind die statistischen Kennzahlen der Free-Wilson Analysen zusammengestellt.

Tabelle 4.6: Statistische Kennzahlen der Free-Wilson Analysen für 15 WK-Derivate.

	F-Wert	R ²	R	Standardfehler des Schätzers
BCRP	41,95	0,959	0,979	0,19
P-gp	45,21	0,948	0,973	0,21

Die Ergebnisse in Tabelle 4.5 verdeutlichen, dass Methoxygruppen an Positionen 6 und 7 der Tetrahydroisochinolin-Teilstruktur signifikant zu einer verstärkten P-gp Inhibition beitragen. Betrachtet man den Einfluss der Methoxygruppen auf die Inhibition von BCRP, führen diese zu einer geringeren Hemmung. Verbindungen ohne Methoxygruppen in Position 6 und 7 zeigen folglich eine höhere Interaktion mit BCRP. Vergleicht man beispielsweise die Aktivität der beiden XR-Analoga XR9577 und XR9544 (Tabelle 4.3) fällt auf, dass XR9577 an BCRP eine höhere Aktivität aufweist als sein Analogon XR9544 mit Methoxygruppen in Position 6 und 7 ($pIC_{50} (XR9577)_{BCRP} = 6,00 \pm 0,23$, $pIC_{50} (XR9544)_{BCRP} = 5,30 \pm 0,19$). Umgekehrt ist die Verbindung XR9544 an P-gp stärker wirksam als XR9577 ($pIC_{50} (XR9544)_{P-gp} = 6,78 \pm 0,09$, $pIC_{50} (XR9577)_{P-gp} = 6,45 \pm 0,07$). Auch bei den jeweiligen Pärchen der kleinen WK-Verbindungen, die auf Grundgerüst B basieren (Tabelle 4.3), zeigen die Derivate ohne Methoxygruppen in Position 6 und 7 an BCRP eine stärkere Hemmung als an P-gp. Besonders deutlich ist der Unterschied bei den beiden Verbindungen WK-X-51 und WK-X-52, die an Position R² einen 3-Chinolyrest tragen ($pIC_{50} (WK-X-51)_{BCRP} = 4,62 \pm 0,17$, $pIC_{50} (WK-X-52)_{BCRP} = 5,30 \pm 0,09$; $pIC_{50} (WK-X-51)_{P-gp} = 6,84 \pm 0,25$, $pIC_{50} (WK-X-52)_{P-gp} = 6,38 \pm 0,09$). Befinden sich Methoxygruppen an den Positionen 4 und 5 (R³) führt dies zu einer Zunahme der Interaktion mit BCRP, aber nicht mit P-gp. Drei Strukturelemente tragen sowohl bei P-gp als auch bei BCRP zu einer verstärkten Inhibition bei: (i) die para-Nitrogruppe bei Verbindungen abgeleitet von Grundgerüst B (R²), (ii) die Erweiterung eines monozyklischen Restes in einen bizyklischen Rest (R²) bei Verbindungen basierend auf Grundgerüst B und (iii) die Einführung eines zweiten Amidlinkers.

Interessanterweise ist der Einfluss dieser Teilstrukturen jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt. Die elektronenziehende para-Nitrogruppe bei Verbindungen mit Grundgerüst B als Grundstruktur (WK-X-30 und WK-X-31 vgl. Tabelle 4.3 und Tabelle 4.5) bewirkt bei BCRP eine sehr viel stärkere Inhibition als bei P-gp. Andererseits ruft die Anwesenheit eines 3-Chinolylysubstituenten (WK-X-51 und WK-X-52 vgl. Tabelle 4.3 und Tabelle 4.5) eine erhöhte Inhibition von P-gp hervor, die bei BCRP schwächer ausgeprägt ist. Die Einführung eines zweiten Amidlinkers (Verbindungen mit Grundgerüst A) führt bei beiden ABC-Transporten in gleichem Maße zu einer Erhöhung der biologischen Aktivität. Modulatoren, denen Grundgerüst A zugrunde liegt, können als duale Inhibitoren bezeichnet werden, da sie sowohl BCRP als auch P-gp mit vergleichbarer Potenz hemmen (s. Tabelle 4.3 und Tabelle 4.5).

Tabelle 4.7: Mit Hilfe der Regressionsgleichung berechnete pIC_{50} -Werte, gemessene pIC_{50} -Werte und Residuen der 15 WK-Derivate für BCRP und P-gp.

Verbindung	BCRP			P-gp		
	pIC_{50} gemessen	pIC_{50} berechnet	Residuen	pIC_{50} gemessen	pIC_{50} berechnet	Residuen
XR9544	5,30	5,45	0,18	6,78	6,89	0,16
XR9577	6,00	5,81	-0,13	6,45	6,60	0,18
XR9576	5,84	5,87	0,08	7,14	6,89	-0,18
WK-X-14	3,96	3,82	-0,17	5,26	5,26	-0,02
WK-X-15	4,10	4,18	0,06	4,87	4,97	0,05
WK-X-16	4,07	3,82	-0,28	4,95	5,26	0,27
WK-X-17	4,13	4,18	0,03	5,02	4,97	-0,09
WK-X-30	5,12	4,97	-0,13	5,86	5,73	-0,13
WK-X-31	5,18	5,33	0,17	5,30	5,43	0,11
WK-X-33	3,58	3,82	0,19	5,15	5,26	0,08
WK-X-37	4,11	4,18	0,05	5,38	4,97	-0,43
WK-X-51	4,62	4,78	0,16	6,84	6,76	-0,03
WK-X-52	5,30	5,14	-0,13	6,38	6,46	0,12
WK-X-56	4,32	4,24	-0,10	5,27	5,26	-0,03
WK-X-57	4,19	4,24	0,03	5,31	5,26	-0,07

Die in Tabelle 4.7 angegebenen pIC_{50} -Werte und ihre Residuen wurden mit Hilfe der Regressionsgleichung aus Tabelle 4.5 sowohl für BCRP als auch für P-gp berechnet. Die in Tabelle 4.7 aufgeführten berechneten und experimentellen pIC_{50} -Werte sind in Abb. 4.19 für BCRP und in Abb. 4.20 für P-gp gegeneinander aufgetragen. Das Bestimmtheitsmaß der Korrelation für BCRP beträgt 0,96, die Steigung der Regressionsgeraden differiert nicht von 1 (s. Abb. 4.19). Die Abb. 4.20 zeigt die Korrelation der berechneten und gemessenen pIC_{50} -Werte in Bezug auf P-gp. Der berechnete quadrierte Korrelationskoeffizient beträgt 0,93 und liegt etwas niedriger als der bei BCRP. Auch hier differiert die Steigung der Geraden nicht von 1 (s. Abb. 4.20).

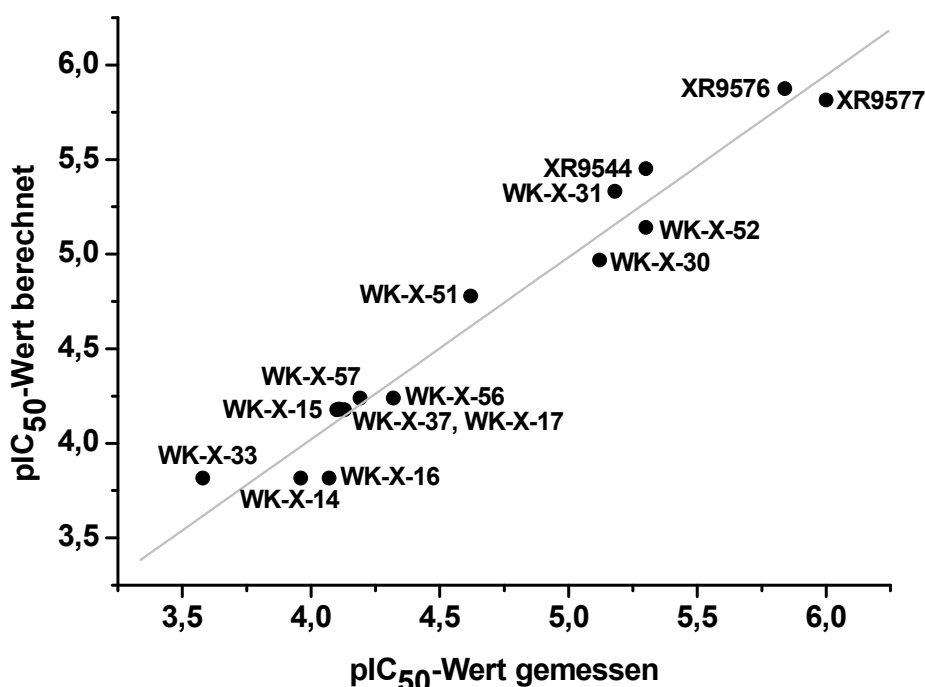


Abb. 4.19: Gemessene gegen berechnete pIC_{50} -Werte der verschiedenen WK-Derivate an BCRP, $r^2 = 0,96$.

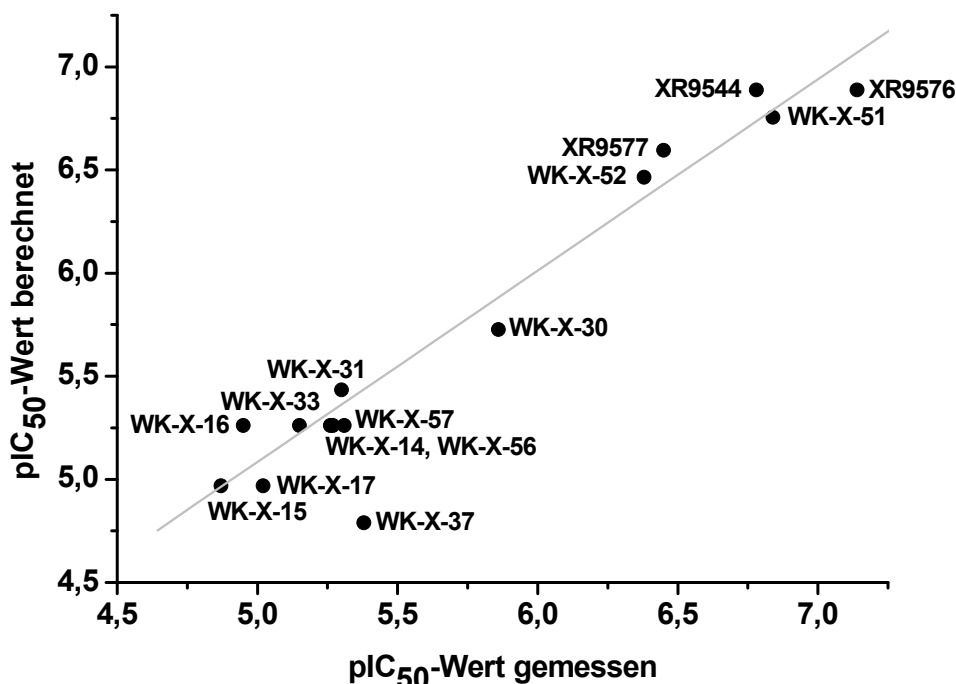


Abb. 4.20: Gemessene gegen berechnete pIC₅₀-Werte der verschiedenen WK-Derivate an P-gp, $r^2 = 0,93$.

Anhand Tabelle 4.7 wird ersichtlich, dass die Regressionsgleichung für P-gp für die Verbindung WK-X-37 die schlechteste Vorhersage der Aktivität ergibt. Bei einem Vergleich des mit Hilfe des Hoechst 33342-Assays bestimmten pIC₅₀-Wertes mit dem berechneten pIC₅₀-Wert fällt auf, dass der gemessene Wert um 0,43 log-Einheiten höher liegt als der berechnete. Dies ist dadurch zu erklären, dass der meist positive Beitrag der Methoxygruppen am Tetrahydroisochinolinring bei dieser Verbindung nicht gefunden wird. WK-X-37 (pIC₅₀ = 5,38 ± 0,32) zeigt sogar eine höhere inhibitorische Aktivität an P-gp als sein Analogon WK-X-33 (pIC₅₀ = 5,15 ± 0,09) mit Methoxygruppen am Tetrahydroisochinolinring.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Vorhersage der pIC₅₀-Werte der untersuchten WK-Verbindungen mit Hilfe der aus der Free-Wilson Analyse erhaltenen Regressionsgleichungen sowohl für BCRP als auch für P-gp zu sehr guten Ergebnissen führt. Entfernt man die Verbindung WK-X-37 aus der Korrelation in Abb. 4.20 steigt das Bestimmtheitsmaß sogar auf 0,97.

Da die Lipophilie der Verbindungen eine wichtige Rolle sowohl bei der Diffusion der Substanzen durch die Plasmamembran als auch bei der Interaktion mit den

Transportproteinen spielt, sollte überprüft werden, ob die Aktivitätswerte der WK-Verbindungen allein aufgrund einer Zunahme der Lipophilie zurückzuführen sind.

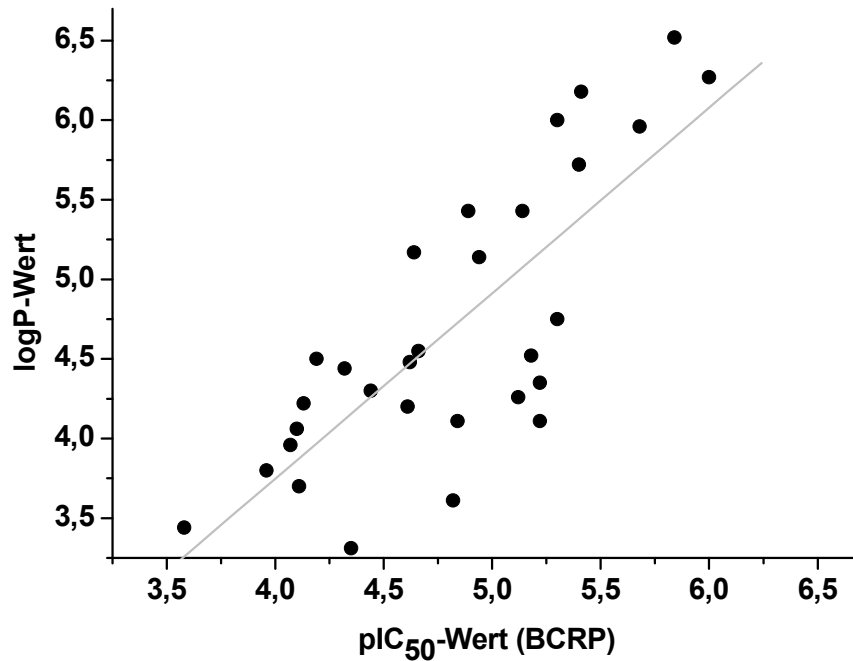


Abb. 4.21: Plot der pIC₅₀-Werte gegen die berechneten logP-Werte bezogen auf BCRP, $r^2 = 0,60$.

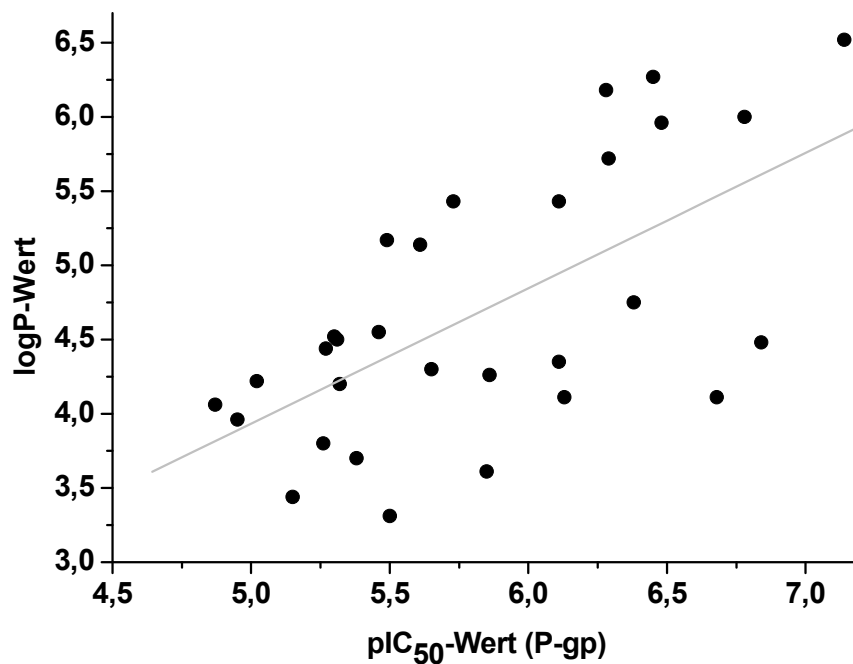


Abb. 4.22: Plot der pIC₅₀-Werte gegen die berechneten logP-Werte bezogen auf P-gp, $r^2 = 0,40$.

Je höher die Lipophilie einer Substanz ist, desto besser kann sie sich in die Plasmamembran einlagern. Von dort findet dann die Wechselwirkung mit dem Transportprotein statt. Dabei fördern die Wechselwirkungen der funktionellen Gruppen der Modulatoren mit BCRP bzw. P-gp eine gezielte, spezifische Interaktion. Eine Erhöhung der lipophilen Eigenschaften trägt eher zu einer unspezifischen, indirekten Förderung der Wechselwirkung mit den Transportproteinen bei. In Abb. 4.21 bzw. Abb. 4.22 sind die Aktivitätswerte der untersuchten Verbindungen an BCRP (Abb. 4.21) bzw. P-gp (Abb. 4.22) gegen die berechneten logP-Werte (berechnet mit ACD/Labs, Version 5.09) aufgetragen. Der berechnete quadrierte Korrelationskoeffizient von 0,60 (BCRP) bzw. 0,40 (P-gp) zeigt, dass keine Korrelation zwischen den Aktivitätswerten und der Lipophilie der Verbindungen besteht.

4.4.4 3D-QSAR Untersuchungen der WK-Modulatoren

Wie schon in Kapitel 4.4.3 erwähnt, wird bei der Verwendung von Quantitativ-Struktur-Wirkungsbeziehungen (QSAR) versucht, die Zusammenhänge zwischen chemischen Strukturen und biologischen Wirkungen zu erfassen und sie quantitativ mit mathematischen Modellen zu beschreiben. Grundlage für quantitative Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur und biologischer Wirkung ist die Annahme, dass die Unterschiede in den physikochemischen Eigenschaften der Substanzen für die relative Stärke ihrer Wechselwirkung mit einem biologischen Target verantwortlich sind. Solche Wechselwirkungen tragen additiv zur Affinität eines Wirkstoffs an seinen Rezeptor bei. 3D-QSAR Methoden versuchen Bindungseigenschaften mit Kenngrößen zu korrelieren, die aus der dreidimensionalen Struktur der Liganden abgeleitet werden. Als Grundlage wird dazu eine räumliche Überlagerung (Alignment) der Wirkstoffmoleküle benötigt, die die relative Orientierung in der Bindungstasche annähern soll.

Der zugrunde liegende Datensatz bei der Durchführung einer 3D-QSAR Untersuchung muss mehrere Bedingungen erfüllen: (i) alle Verbindungen müssen dem gleichen Wirkmechanismus folgen, d.h. das gleiche biologische Target besitzen, (ii) der Aktivitätsbereich aller getesteten Verbindungen sollte im Idealfall mindestens zwei bis drei Größenordnungen umfassen, wobei eine möglichst homogene

Verteilung der Aktivitätswerte über den gesamten Wertebereich vorliegen sollte, (iii) die strukturellen Unterschiede innerhalb des Datensatzes sollten nicht zu stark sein, da sonst kein sinnvolles Alignment mehr möglich ist.²¹¹

Vorraussetzung 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 3D-QSAR ist dieses Überlagerungsverfahren essentiell, da hierbei Molekülfelder an gleichen räumlichen Punkten verglichen werden.

Zur Analyse der 3D-QSAR wurden zwei verschiedene Verfahren angewendet. Bei diesen handelt es sich zum einem um die von Cramer et al. entwickelte vergleichende Molekülfeldanalyse (**C**omparative **M**olecular **F**ield **A**nalysis = CoMFA)²¹¹ und zum anderen um den von Klebe et al. entworfenen Vergleich molekularer Ähnlichkeits-Indizes (**C**omparative **M**olecular **S**imilarity **I**ndices **A**nalysis = CoMSIA).²¹² Im Folgenden sollen diese beiden Verfahren kurz erläutert werden.

Bei der Durchführung einer CoMFA werden die überlagerten Liganden in ein dreidimensionales Gitter platziert, um potenzielle Interaktionsmöglichkeiten zu ermitteln. Die Punkte des Gitters weisen einen regelmäßigen Abstand von 1 oder 2 Å Maschenweite auf. An jedem Gitterpunkt werden Sondenatome dazu verwendet, die sterischen und elektrostatischen Wechselwirkungsenergien zwischen diesen Sonden und jedem Molekül des Datensatzes zu berechnen. Die Gesamtheit der Wechselwirkungsbeiträge an den Gitterpunkten bezeichnet man als Feld des Moleküls. Dieses Molekülfeld ist spezifisch für eine Struktur und wird durch die Vielzahl der Wechselwirkungsenergien charakterisiert. Zur Ermittlung der sterischen und elektrostatischen Wechselwirkungsenergien wird meistens ein sp^3 -hybridisiertes Kohlenstoffatom mit einer Ladung von +1 verwendet. Für die Berechnung der sterischen Interaktionsenergien wird das Lennard-Jones-Potential verwendet. Elektrostatische Wechselwirkungen werden hingegen durch das Coulomb-Potential beschrieben. In Abb. 4.23 ist der Kurvenverlauf des Lennard-Jones-Potentials und des Coulomb-Potentials dargestellt. Das Lennard-Jones-Potential ist ein Modell für die zwischenmolekulare Wechselwirkung zweier Atome ohne Berücksichtigung ihrer Ladungen. Negative Potentialwerte entsprechen einer gegenseitigen Anziehung, positive Werte einer Abstoßung der Teilchen. Wird ihr wechselseitiger Abstand unendlich, strebt das Potential gegen Null. Bei Annäherung durchläuft es wegen der wechselseitigen Polarisierung ein flaches Minimum, um dann wegen der Abstoßung

der Atome zu positiv unendlichen Werten anzusteigen. Das Coulomb-Potential berücksichtigt nur elektrostatische Wechselwirkungen. Bei gleichsinnig geladenen Teilchen wird es für geringe Abstände ebenfalls unendlich groß. Bei entgegengesetzt geladenen Teilchen resultieren negativ unendliche Werte. Diese dem Betrag nach extrem großen Feldbeiträge werden an Gitterpunkten erreicht, die nahe der Oberfläche bzw. innerhalb eines Moleküls liegen. Sie müssen in der CoMFA-Analyse vermieden werden. Daher limitiert man Feldbeiträge oberhalb und unterhalb eines vorgegebenen Grenzwerts ("cut off") auf den dort erreichten Wert (30 kcal/mol).

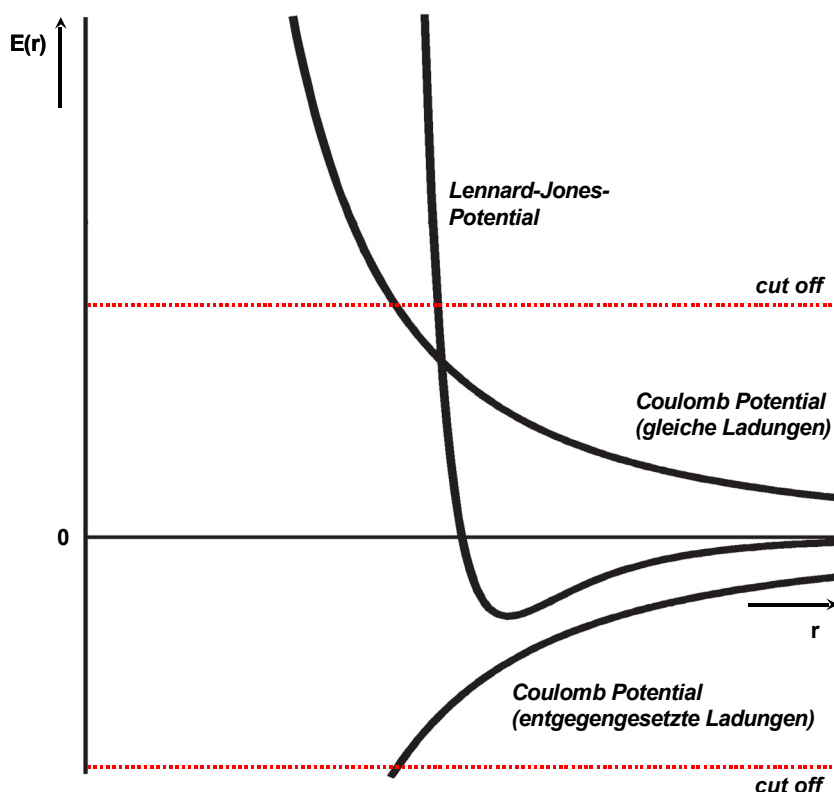


Abb. 4.23: Lennard-Jones- und Coulomb-Potential-Verlauf, die zur Beschreibung von zwischenmolekularen Wechselwirkungen in der CoMFA herangezogen werden (modifiziert nach Kubinyi et al.²¹⁰).

Vergleicht man die in Abb. 4.23 abgebildeten Kurven fällt auf, dass der hyperbolische Verlauf des Coulomb-Potentials deutlich flacher ist, so dass die elektrostatischen Wechselwirkungen auch Interaktionen mit weiter entfernten Teilchen zulassen.²¹¹

Im Gegensatz zur CoMFA werden bei der CoMSIA keine Wechselwirkungsenergien, sondern relative Ähnlichkeiten zueinander verglichen. In Analogie zur CoMFA werden die Strukturen in ein 3D-Gitter mit einer Maschenweite von 2 Å eingesetzt

und mit verschiedenen Sonden die Moleküleigenschaften ermittelt. Aus diesen Daten können dann mittels einer Gauß-Funktion die Ähnlichkeitsindizes berechnet werden. Im Gegensatz zum hyperbolischen Verlauf der oben beschriebenen Potentiale (Abb. 4.23) strebt die Gaußsche Glockenkurve für kleiner werdende Abstände gegen einen endlichen Wert (s. Abb. 4.24). Es müssen also keine Grenzwerte festgesetzt werden. Eine geringfügige Veränderung der Platzierung der Verbindung im Gitter bleibt ohne gravierenden Einfluss auf das Analyseergebnis.²¹⁰ Des Weiteren hat sie den Vorteil, dass sie gleichmäßiger ansteigt und auch Daten aus den Bereichen innerhalb von Molekülen mit in die Erstellung des Modells einbezogen werden können (s. Abb. 4.24).

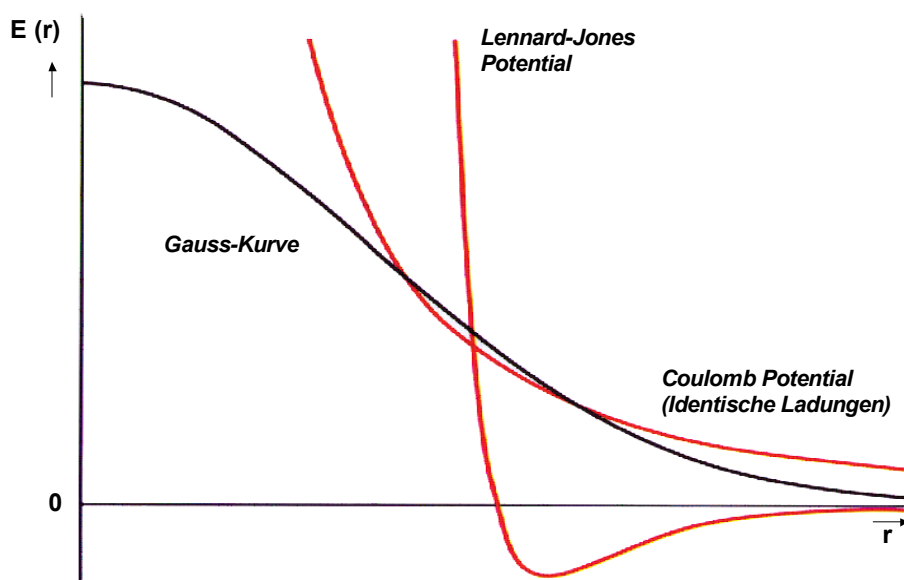


Abb. 4.24: Vergleich der in der CoMFA verwendeten Potentiale (rot) mit der in der CoMSIA verwendeten Gauß-Kurve (modifiziert nach Kubinyi et al.²¹⁰).

Mit Hilfe der PLS-Analyse (**P**artial **L**east **S**quares) werden die Feldbeiträge mit den Affinitäten in Bezug gesetzt. Die PLS-Analyse ist eine statistische Methode, die aus einer großen Datenmenge relevante und erklärende Faktoren, die so genannten PLS-Vektoren, extrahiert. Bei CoMFA-Analysen beschreiben diese Vektoren die Bereiche der Felder, die mit den experimentell bestimmten Affinitäten am besten korrelieren. Das Ergebnis ist eine Gleichung, die angibt, in welchem Ausmaß bestimmte Gitterpunkte der einzelnen Felder zu den Bindungsaffinitäten beitragen.

Um die Signifikanz der erstellten Modelle zu prüfen, kommen unterschiedliche Validierungsmethoden zum Einsatz. Zu diesen Validierungsverfahren gehört die

Leave-One-Out-Methode (LOO-Methode). Hierbei entnimmt man dem Datensatz zufällig eine Verbindung. Mit den verbleibenden Derivaten wird ein Modell erstellt und anhand dieses Modells die Affinität der herausgenommenen Verbindung vorhergesagt. Dieses Verfahren wird nacheinander auf alle Verbindungen des Datensatzes angewandt. Die Güte der Vorhersagekraft stellt ein Maß für die Zuverlässigkeit und Signifikanz des Modells dar. Die folgenden Parameter können zur Beurteilung der Güte des Modells eingesetzt werden: Unter Einbeziehung der Anzahl der untersuchten Verbindungen n und der ermittelten Komponenten c lässt sich die kreuzvalidierte Standardabweichung s_{press} (**Standard deviation of Predictive Sum of Squares**) berechnen.

Gleichung 4.2:

$$s_{press} = \sqrt{\frac{\sum (Y_{beobachtet} - Y_{vorhergesagt})^2}{n - c - 1}}$$

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

Gleichung 4.3:

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

Der q^2 -Wert kann Werte zwischen $-\infty$ und $+1$ annehmen. Ein Wert von $+1$ sagt aus, dass ein perfektes Modell erzielt wurde. Alle Vorhersagen treffen exakt die gemessenen Bindungsaffinitäten. Es gibt keine Abweichungen. Ein Wert von $q^2 = 0$ sagt aus, dass die Vorhersage des Modells nicht besser oder schlechter ist als kein Modell, d.h. als der Mittelwert aller Affinitäten. Nimmt q^2 negative Werte an, ist das Modell schlechter als die Mittelwerte, d.h. schlechter als kein Modell. Gute Modelle ergeben sich etwa ab q^2 -Werten von größer 0,4-0,5. Allgemein gilt, dass die Zahl der für eine Beschreibung des Modells notwendigen Komponenten etwa 10% der Anzahl der Verbindungen entsprechen sollte.²¹⁰

Die hier gezeigten Daten und Bilder der 3D-QSAR wurden in Zusammenarbeit mit Dr. H. Müller aus denen in dieser Arbeit erhobenen biologischen Daten erstellt. Ein

Vorteil bei der Durchführung der 3D-QSAR bestand darin - im Gegensatz zur Free-Wilson Methode - alle 30 Verbindungen in die Analyse mit einbeziehen zu können. Wie bereits oben erwähnt, ist die Voraussetzung für die Korrelation der biologischen Daten mit den Eigenschaften der 3D-Strukturen die räumliche Überlagerung der Moleküle. Da für P-gp bereits 3D-QSAR Analysen mit WK-Modulatoren im Rahmen der Dissertationsarbeiten von Dr. W. Klinkhammer und Dr. H. Müller durchgeführt wurden, wurde das bereits bestehende Alignment der Verbindungen verwendet.^{196,213,214} Genaue Angaben zur Durchführung des Alignments können den entsprechenden Literaturquellen entnommen werden. Auf Basis dieses Alignments wurden mit den entsprechenden Sonden Molekülfelder ermittelt, mit den biologischen Daten mittels PLS-Methode korreliert und zunächst mittels der Leave-One-Out Methode (LOO) validiert. Die Ergebnisse der CoMFA und CoMSIA-Modelle sind in Tabelle 4.8 sowohl für BCRP als auch für P-gp zusammengefasst. Alle möglichen Felder und Feldkombinationen wurden berechnet. Die besten Modelle sind fett markiert (s. Tabelle 4.8). Die q^2 -Werte aller CoMFA- und CoMSIA-Modelle sind $> 0,52$, die optimale Anzahl der Komponenten variiert zwischen 2 und 6. Bei Betrachtung der CoMSIA-Modelle für beide Transporter fällt auf, dass in der Regel höhere q^2 -Werte resultieren als bei den CoMFA-Modellen und diese deshalb den CoMFA-Modellen vorzuziehen sind.

Die beste Vorhersage der Aktivitätswerte für BCRP konnte durch Kombination der CoMSIA-Felder "elektrostatisch" und "Wasserstoffbrückendonor" erbracht werden. Hier resultierte ein q^2 -Wert von 0,801. Wird zusätzlich das sterische Feld mit einbezogen, kommt es zu einer leichten Erhöhung des q^2 -Wertes auf 0,803 bei einer Anzahl der Komponenten von 4 (s. Tabelle 4.8). Modelle ohne das Wasserstoffbrückendonor-Feld waren generell von statistisch schlechterer Qualität. Bei Erstellung der CoMFA-Modelle ergab sich ein ähnliches Bild. Wird das Wasserstoffbrückendonor-Feld miteinbezogen führt dies zu signifikant besseren Modellen. Für die Inhibition von P-gp resultierten die besten CoMSIA-Modelle in einer Kombination aus elektrostatischem und Wasserstoffbrückenakzeptor-Feld ($q^2 = 0,866$, $n_{\text{opt}} = 4$) und der Kombination aus elektrostatischem, sterischem und Wasserstoffbrückenakzeptor-Feld ($q^2 = 0,863$, $n_{\text{opt}} = 4$). Bezieht man das hydrophobe Feld mit ein, führt dies zu einer leichten Abnahme des entsprechenden q^2 -Wertes.

4 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.8: Ergebnisse der 3D-QSAR: CoMFA- und CoMSIA-Modelle für BCRP und P-gp. Die besten Modelle sind fett unterlegt.

Felder	BCRP					P-gp				
	LOO		n	NV		LOO		n	NV	
	q ²	S _{press}		r ²	SD	q ²	S _{press}		r ²	SD
CoMFA										
E	0.613	0.395	3	0.835	0.257	0.833	0.277	5	0.962	0.132
E+HBond	0.732	0.339	4	0.934	0.166	0.685	0.389	6	0.963	0.133
HBond	0.707	0.350	4	0.920	0.183	0.542	0.433	2	0.779	0.301
S	0.525	0.432	3	0.743	0.321	0.757	0.325	3	0.892	0.215
S+E	0.665	0.367	3	0.856	0.241	0.823	0.290	4	0.951	0.147
S+E+HBond	0.757	0.321	4	0.949	0.147	0.751	0.323	2	0.884	0.218
S+HBond	0.760	0.317	4	0.949	0.150	0.720	0.338	2	0.875	0.226
CoMSIA										
A	0.549	0.436	3	0.702	0.346	0.570	0.436	4	0.764	0.323
D	0.558	0.424	3	0.649	0.376	0.439	0.498	4	0.551	0.446
D+A	0.662	0.369	3	0.822	0.268	0.620	0.418	4	0.833	0.272
E	0.675	0.361	3	0.843	0.251	0.823	0.274	3	0.924	0.180
E+A	0.599	0.402	3	0.773	0.302	0.866	0.243	4	0.930	0.175
E+D	0.801	0.283	4	0.917	0.187	0.828	0.276	4	0.913	0.196
E+H	0.698	0.368	5	0.902	0.206	0.815	0.293	5	0.948	0.154
E+H+A	0.635	0.398	3	0.814	0.274	0.853	0.260	5	0.954	0.146
E+H+D	0.783	0.296	3	0.878	0.221	0.822	0.292	6	0.945	0.163
E+H+D+A	0.755	0.330	3	0.868	0.230	0.808	0.291	4	0.917	0.192
H	0.590	0.431	6	0.864	0.248	0.759	0.333	5	0.923	0.188
H+A	0.609	0.483	5	0.865	0.242	0.761	0.332	5	0.916	0.196
H+D	0.727	0.338	3	0.818	0.270	0.721	0.366	6	0.880	0.240
H+D+A	0.716	0.359	6	0.931	0.178	0.684	0.382	5	0.894	0.221
S	0.525	0.437	3	0.702	0.346	0.793	0.308	5	0.923	0.188
S+A	0.544	0.428	3	0.725	0.333	0.802	0.296	4	0.872	0.238
S+D	0.695	0.373	4	0.830	0.266	0.758	0.341	6	0.935	0.177
D+E	0.684	0.356	3	0.837	0.256	0.842	0.275	5	0.955	0.144
S+E+A	0.602	0.400	3	0.772	0.302	0.863	0.246	4	0.944	0.157
S+E+D	0.803	0.282	4	0.916	0.187	0.824	0.279	4	0.917	0.192
S+E+H	0.678	0.374	5	0.895	0.213	0.826	0.285	4	0.899	0.241
S+E+H+A	0.639	0.397	5	0.887	0.222	0.857	0.251	4	0.918	0.190
S+E+H+D	0.785	0.294	3	0.886	0.214	0.806	0.296	3	0.896	0.210
S+E+H+D+A	0.749	0.320	3	0.874	0.225	0.813	0.282	3	0.909	0.197
S+H	0.593	0.421	5	0.826	0.275	0.821	0.293	6	0.960	0.138
S+H+A	0.615	0.410	5	0.868	0.240	0.841	0.271	5	0.934	0.174
S+H+D	0.757	0.313	3	0.840	0.254	0.770	0.331	3	0.821	0.276

Felder: S = Sterisch, E = Elektrostatisch, HBond = Wasserstoffbrücken, H = Hydrophob, A = Wasserstoffbrückenakzeptor, D = Wasserstoffbrückendonor.

In Abb. 4.25 sind die mit Hilfe des besten CoMSIA-Modells (S+E+D) für BCRP vorhergesagten pIC_{50} -Werte gegen die experimentellen pIC_{50} -Werte aufgetragen. Alle Verbindungen wurden mit der gleichen Präzision vorhergesagt. Es sind keine nennenswerten Ausreißer vorhanden.

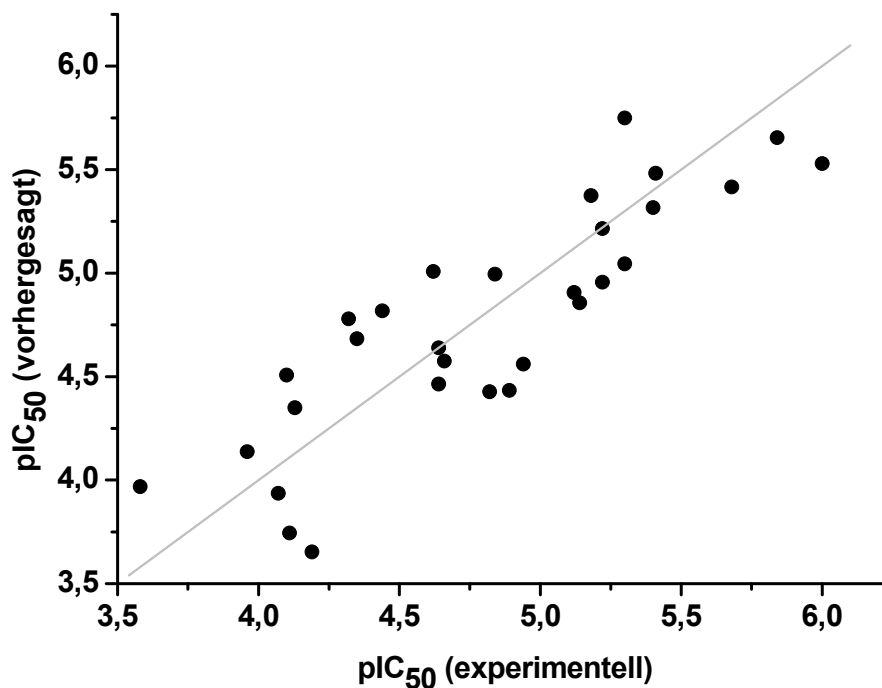


Abb. 4.25: Auftragung der gemessenen pIC_{50} -Werte der WK-Modulatoren (Hoechst 33342-Assay, MCF-7 MX Zellen) gegen die mittels CoMSIA-Feldkombination S+E+D vorhergesagten und anhand der LOO-Methode validierten pIC_{50} -Werte für BCRP.

Abb. 4.26 zeigt den Plot der vorhergesagten Aktivitätswerte, die auf dem besten CoMSIA-Modell (S+E+A) für P-gp basieren, gegen die gemessenen pIC_{50} -Werte.

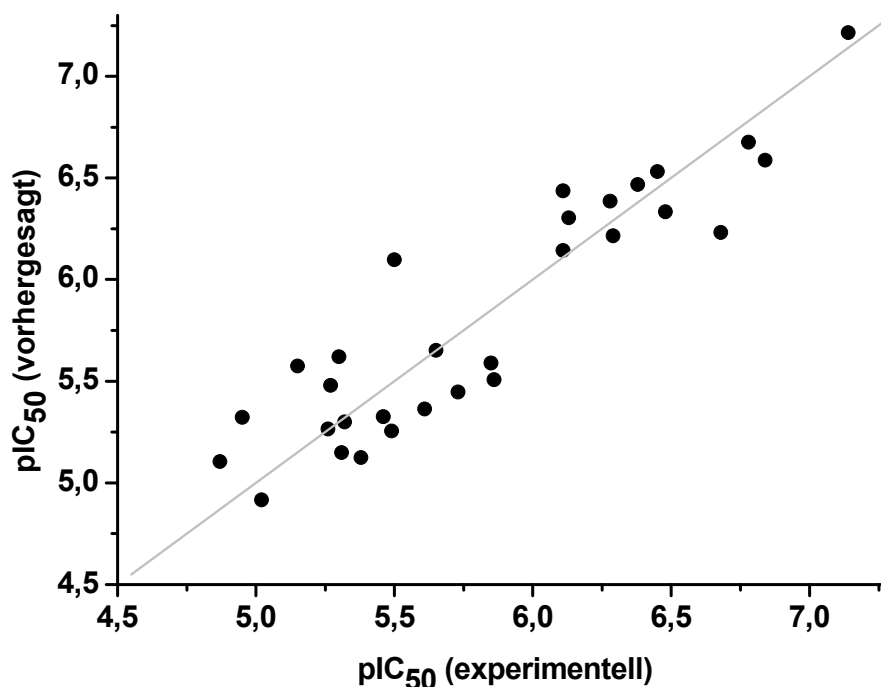


Abb. 4.26: Plot der mit Hilfe des Hoechst 33342-Assays an A2780 Adr Zellen bestimmten pIC_{50} -Werte der Tariquidar-Analoga gegen die mittels CoMSIA-Feldkombination S+E+A berechneten pIC_{50} -Werte für P-gp.

Um auszuschließen, dass die erhaltenen Modelle nicht nur auf einer zufälligen Korrelation beruhen, wurden die besten Modelle mittels des sog. Verwürfelungstests (Scrambling Stability Test) und der gruppenweisen Kreuzvalidierung (Leave-Many-Out-Methode bzw. LMO) validiert. Die zuvor angewendete 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.²¹⁵ Daher wird die LMO-Methode als robusteres und verlässlicheres Validierungsverfahren angesehen.^{215,161} Bei der LMO-Methode wird der Datensatz in zwei bis fünf Gruppen jeweils gleicher Größe unterteilt. Unter diesen Bedingungen werden nacheinander zunächst 80% bis runter zu 50% der Verbindungen für die Generierung des Modells verwendet, um anschließend die Aktivitätswerte der ausgelassenen Verbindungen vorherzusagen. Für die besten Modelle wurden im Rahmen der LMO-Methode 100 Wiederholungen jeder Analyse mit zufälliger Gruppeneinteilung durchgeführt. Die Ergebnisse für die gruppenweise Kreuzvalidierung sind in der folgenden Tabelle 4.9 enthalten. Die Tabelle enthält die gemittelten q^2 -Werte und deren Standardabweichungen.

Tabelle 4.9: Validierung der besten 3D-QSAR Modelle mit Hilfe der LMO-Methode (100 Wiederholungen).

BCRP				
CoMSIA Felder				
Gruppenzahl	E+D $q^2 \pm SD$	E+H+D $q^2 \pm SD$	S+E+D $q^2 \pm SD$	S+E+H+D $q^2 \pm SD$
30 (LOO)	0.801	0.783	0.803	0.785
5	0.702 \pm 0.138	0.684 \pm 0.122	0.703 \pm 0.139	0.694 \pm 0.130
4	0.681 \pm 0.145	0.631 \pm 0.156	0.672 \pm 0.156	0.634 \pm 0.150
3	0.598 \pm 0.181	0.586 \pm 0.153	0.595 \pm 0.144	0.570 \pm 0.142
2	0.507 \pm 0.228	0.420 \pm 0.218	0.515 \pm 0.194	0.469 \pm 0.195
P-gp				
CoMSIA Felder				
Gruppenzahl	E+A $q^2 \pm SD$	E+H+A $q^2 \pm SD$	S+E+A $q^2 \pm SD$	S+E+H+A $q^2 \pm SD$
30 (LOO)	0.866	0.853	0.863	0.857
5	0.841 \pm 0.025	0.830 \pm 0.029	0.842 \pm 0.027	0.832 \pm 0.033
4	0.828 \pm 0.037	0.824 \pm 0.033	0.833 \pm 0.029	0.823 \pm 0.040
3	0.813 \pm 0.053	0.801 \pm 0.052	0.808 \pm 0.060	0.806 \pm 0.065
2	0.759 \pm 0.079	0.750 \pm 0.087	0.736 \pm 0.079	0.741 \pm 0.074

Betrachtet man die Ergebnisse der LMO-Methode für P-gp zeigt sich, dass die Verringerung der q^2 -Werte bis zu einer Gruppenzahl von 3 noch 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. Bei den Modellen, die auf der Inhibition von BCRP beruhen, nimmt der q^2 -Wert vergleichsweise stärker ab, wenn man von der LOO-Methode zur LMO-Methode mit 5 Gruppen übergeht. Dies kann durch die ungleichmäßige Verteilung der Verbindungen mit zusätzlicher Wasserstoffbrückendonorfunktion erklärt werden: diese finden sich in nur 10 der 30 untersuchten Verbindungen, wobei darunter alle sechs großen Derivate mit Grundgerüst A, aber nur vier kleine Verbindungen mit Grundgerüst B fallen. Betrachtet man dagegen das Verhalten der q^2 -Werte innerhalb der LMO-Methode, so kommt es hier zu einer nur geringen Abnahme der q^2 -Werte um den Wert 0,03, wenn die Anzahl der Gruppen von fünf auf drei reduziert wird. Ein nennenswerter Abfall des q^2 -Wertes ergibt sich erst bei Entfernung von 50% der Verbindungen aus dem Datensatz (s. Tabelle 4.9).

Eine weitere Methode, die Validität der 3D-QSAR Modelle zu gewährleisten, ist der Verwürfelungstest. Die Aktivitätsdaten werden zufallsbasiert gemischt und auf die Verbindungen verteilt. Dann werden die q^2 -Werte mit Hilfe der LOO-Methode

berechnet. Auch dieser Vorgang wurde 50mal wiederholt um zufallsbasierte Ergebnisse zu vermeiden. In Tabelle 4.10 sind die gemittelten q^2 -Werte und deren Standardabweichungen für BCRP und P-gp angegeben.

Tabelle 4.10: Validierung der besten CoMFA- und CoMSIA-Modelle mit Hilfe des Verwürfelungstests. Mittelwerte und Standardabweichungen basieren auf 50 zufällig generierten Datensätzen.

Verwürfelungstest			
BCRP		P-gp	
CoMSIA Felder	$q^2 \pm SD$	CoMSIA Felder	$q^2 \pm SD$
E+D	-0.208 ± 0.360	E+A	-0.218 ± 0.189
E+H+D	-0.218 ± 0.201	E+H+A	-0.205 ± 0.151
S+E+D	-0.201 ± 0.338	S+E+A	-0.222 ± 0.145
S+E+H+D	-0.213 ± 0.204	S+E+H+A	-0.284 ± 0.249

Der Verwürfelungstest sollte einen signifikanten Abfall des q^2 -Wertes hervorrufen. Alle in Tabelle 4.10 aufgeführten q^2 -Werte sind kleiner als 0 und dokumentieren, dass zufallsbasiert gemischte Aktivitätswerte nicht zu scheinbar validen CoMSIA-Modellen führen. Das Maß für die Vorhersagekraft der besten CoMSIA-Modelle konnte durch die beiden Validierungsverfahren 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 so genannte Konturdiagramme (engl. contour plots) visualisiert werden. Wenn eine bestimmte Eigenschaft im Bereich der überlagerten Moleküle signifikant die Aktivität der Verbindung beeinflusst, wird diese Region farblich hervorgehoben. Für das Design neuer Wirkstoffe stellen Konturdiagramme ein wichtiges Hilfsmittel dar, da sie angeben, an welchen Stellen die Eigenschaften einer Leitstruktur zu verändern sind, damit eine Affinitätssteigerung erzielt wird. Abb. 4.27 zeigt das Konturdiagramm des besten CoMSIA-Modells S+E+D für BCRP zusammen mit XR9577. In Abb. 4.28 ist das Konturdiagramm mit der Verbindung WK-X-51 wiedergegeben.

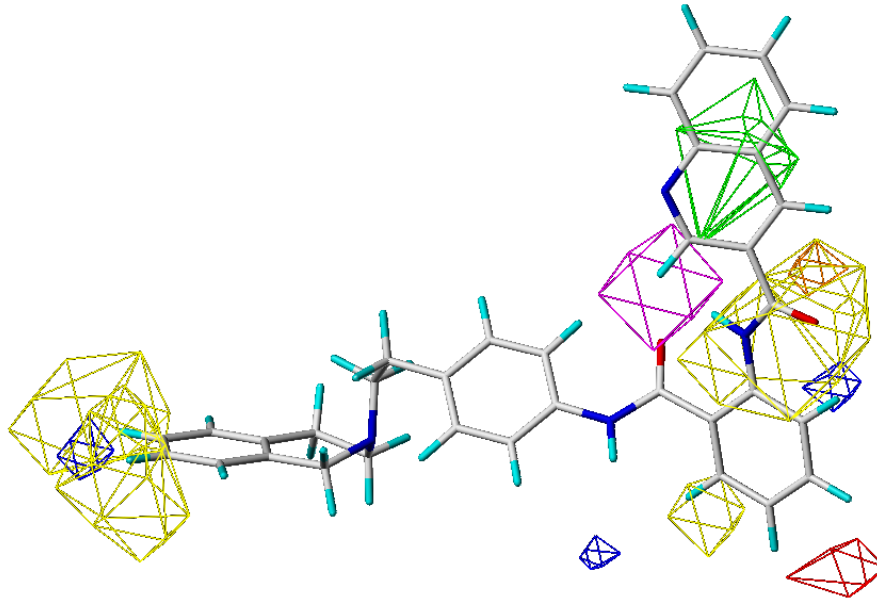


Abb. 4.27: CoMSIA Konturdiagramm des S+E+D Modells (BCRP) mit Verbindung XR9577. Sterisches Feld: grün (bevorzugt), gelb (ungünstig); elektrostatisches Feld: blau (positive Ladung bevorzugt), rot (negative Ladung bevorzugt); H-Brückendonorfeld: magenta (bevorzugt), orange (ungünstig).

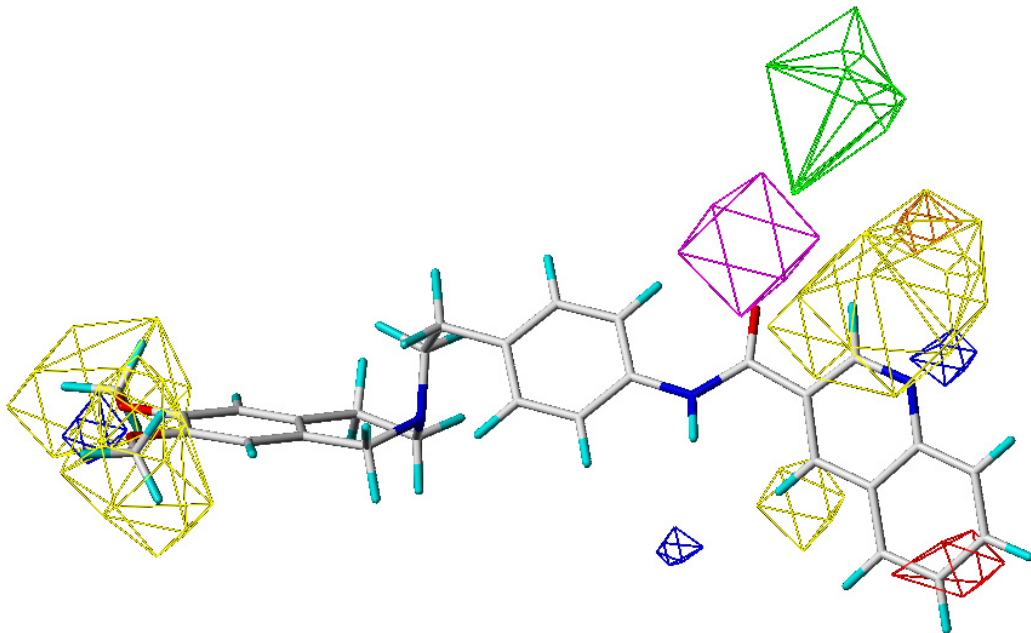


Abb. 4.28: CoMSIA Konturdiagramm (S+E+D für BCRP) zusammen mit der Verbindung WK-X-51.

Der grüne Bereich markiert das sterische Feld, welches mit dem 3-Chinoly substituenten der Verbindung XR9577 zusammenfällt. XR9577 wurde unter den 30 untersuchten Substanzen als der potenteste BCRP Inhibitor identifiziert. Das grüne sterische Feld gibt die Anwesenheit eines Substituenten in Position R² der großen Derivate wieder. Voluminöse Reste in dieser Position bewirken eine Erhöhung der biologischen Aktivität und sind typisch für die sechs Verbindungen mit einem Anthranilamidrest. Gelbe Bereiche markieren sterisch ungünstige Regionen. Diese beruhen auf Verbindungen mit geringer biologischer Aktivität. In Abb. 4.27 bzw. Abb. 4.28 sind drei gelbe Felder zu sehen. Zwei veranschaulichen den negativen Einfluss der Methoxygruppen in Position 6 und 7 des Tetrahydroisochinolinrestes auf die inhibitorische Wirksamkeit. Methoxygruppen in dieser Position finden sich z.B. bei der Verbindung WK-X-51 – ein Modulator mit geringer Aktivität an BCRP (s. Abb. 4.28). Die blaue Kontur des elektrostatischen Feldes verdeutlicht, dass positive Ladungen zu einer verstärkten Interaktion mit BCRP führen. Negative Ladungen in dieser Position bewirken eine Verringerung der pIC₅₀-Werte. Der blaue Bereich, der in der Nachbarschaft der Methoxygruppen in Position 6 und 7 des Tetrahydroisochinolinrestes zu finden ist, hebt hervor, dass die partial negativ geladenen Sauerstoffatome der Methoxygruppen zu einer Verringerung der biologischen Aktivität beitragen. Die Sauerstoffatome der para-Nitrogruppe bei Verbindungen mit Grundgerüst B (R²) sind ebenfalls partial negativ geladen. Der positive Einfluss dieses Substituenten auf die Inhibierbarkeit von BCRP wird durch den dort gelegenen roten Bereich (negative Ladung favorisiert) offensichtlich. Verbindungen mit einem para-Nitros substituenten (WK-X-30 und WK-X-31) besaßen im Hoechst 33342-Assay eine weitaus höhere Aktivität an BCRP als Verbindungen mit para-Aminofunktion (WK-X-33 und WK-X-37). Des Weiteren kann die rote Kontur auch auf Verbindungen mit Grundgerüst B mit einen bityklischen Substituenten (R²) zurückzuführen sein. Die hohe Elektronendichte der sp²-hybridisierten Kohlenstoffatome bewirkt eine verstärkte Interaktion mit BCRP.

Wasserstoffbrückendonoreigenschaften besitzen alle der 30 untersuchten Verbindungen in Form des Phenylamidstickstoffes, der in beiden Grundgerüsten vertreten ist. Zusätzlich sind Wasserstoffbrückendonorfunktionen bei allen sechs großen Verbindungen, jedoch nur bei vier der kleinen Derivate (WK-X-16, WK-X-17, WK-X-33 und WK-X-37) vorhanden. Bei den großen Modulatoren handelt es sich dabei um den Anthranilamidstickstoff, bei den vier kleinen WK-Modulatoren stellt die

Wasserstoffbrückendonor-Funktion eine Aminogruppe in ortho- (WK-X-16, WK-X-17) bzw. para-Position (WK-X-33 und WK-X-37) des Phenylrings (R^2) dar. In Magenta werden Bereiche angezeigt, wo Substituenten mit Wasserstoffbrückendonorfunktion zu einer erhöhten Interaktion mit BCRP führen. Diese Kontur ist in der Nähe des Anthranilamidstickstoffes der großen Derivate lokalisiert (s. Abb. 4.27), sie fehlt jedoch bei den kleinen Derivaten mit ortho-Aminogruppen als Donorfunktion (WK-X-16, WK-X-17). Wahrscheinlich ist die magentafarbene Kontur nur auf die großen Verbindungen mit einem Anthranilamidstickstoff zurückzuführen. Dies wird durch die hohe biologische Aktivität dieser Verbindungen an BCRP verdeutlicht. Die pIC_{50} -Werte der kleinen WK-Modulatoren mit Aminogruppen als Wasserstoffbrückendonor sind im Schnitt 1,5 bis 2 log-Einheiten niedriger als die der großen Inhibitoren.

Für P-gp wurden die Konturdiagramme der sterischen, elektrostatischen und Wasserstoffbrückenakzeptor-Felder generiert, um zu veranschaulichen, wie die biologische Wirksamkeit der WK-Verbindungen von bestimmten strukturellen Charakteristika abhängig ist. Abb. 4.29 zeigt das Konturdiagramm des besten CoMSIA-Modells S+E+A für P-gp zusammen mit XR9577. In Abb. 4.30 ist das Konturdiagramm mit Verbindung WK-X-51 wiedergegeben. Im Gegensatz zu Abb. 4.27 bzw. Abb. 4.28 sind hier zwei grüne Bereiche vorhanden, die den positiven Einfluss des sterischen Feldes wiedergeben. Einer der beiden Bereiche bezieht sich, in Analogie zu BCRP, auf die großen WK-Verbindungen mit einem voluminösen Rest in Position R^2 . Dabei ist der positive Beitrag auch hier am größten, wenn sich ein 3-Chinoly substituent an dieser Stelle befindet (s. Abb. 4.29). Zusätzlich ist eine zweite grüne Kontur des sterischen Feldes sichtbar. Diese bezieht sich auf Verbindungen mit Grundgerüst B, die anstelle eines monozyklischen einen bicyklischen Rest in Position R^2 tragen. Hier ist die grüne Kontur nur bei Verbindungen mit bicyklischem Substituenten R^2 besetzt. Die Erweiterung eines monozyklischen Substituenten R^2 (vergl. WK-X-16) zu einem bicyklischen Substituenten R^2 (WK-X-51) führt zu einer verbesserten Hemmung von P-gp. Wird die Hemmung von P-gp durch eine negative Partialladung begünstigt, wird dies durch eine rote Kontur des elektrostatischen Feldes angezeigt.

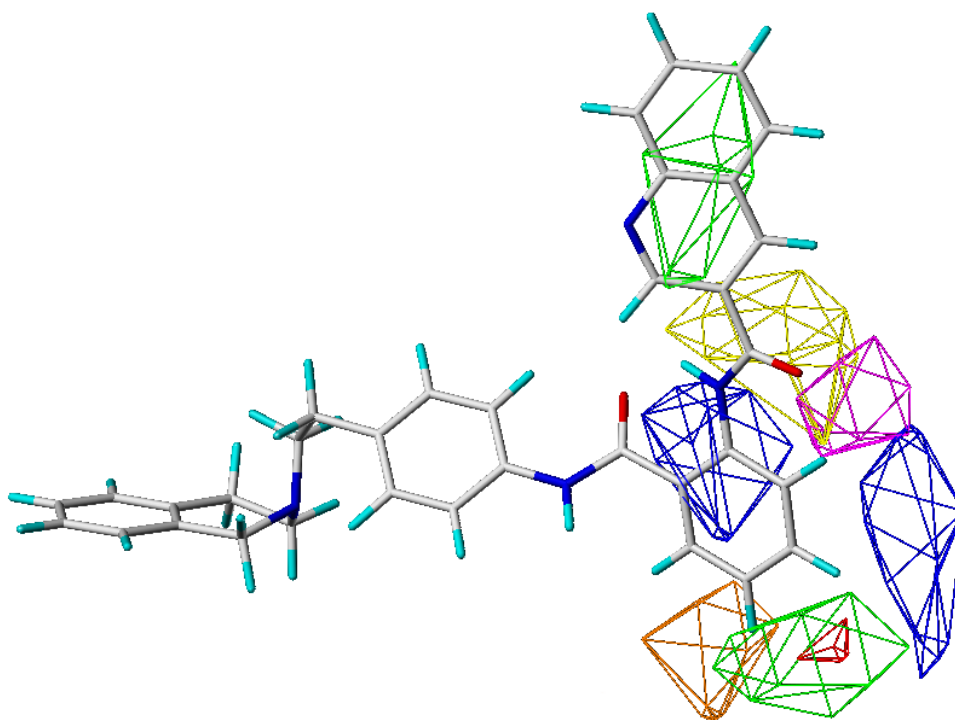


Abb. 4.29: CoMSIA Konturdiagramm des S+E+A Modells (P-gp) mit Verbindung XR9577. Sterisches Feld: grün (bevorzugt), gelb (ungünstig); elektrostatisches Feld: blau (positive Ladung bevorzugt), rot (negative Ladung bevorzugt); H-Brückenakzeptorfeld: magenta (bevorzugt), orange (ungünstig).

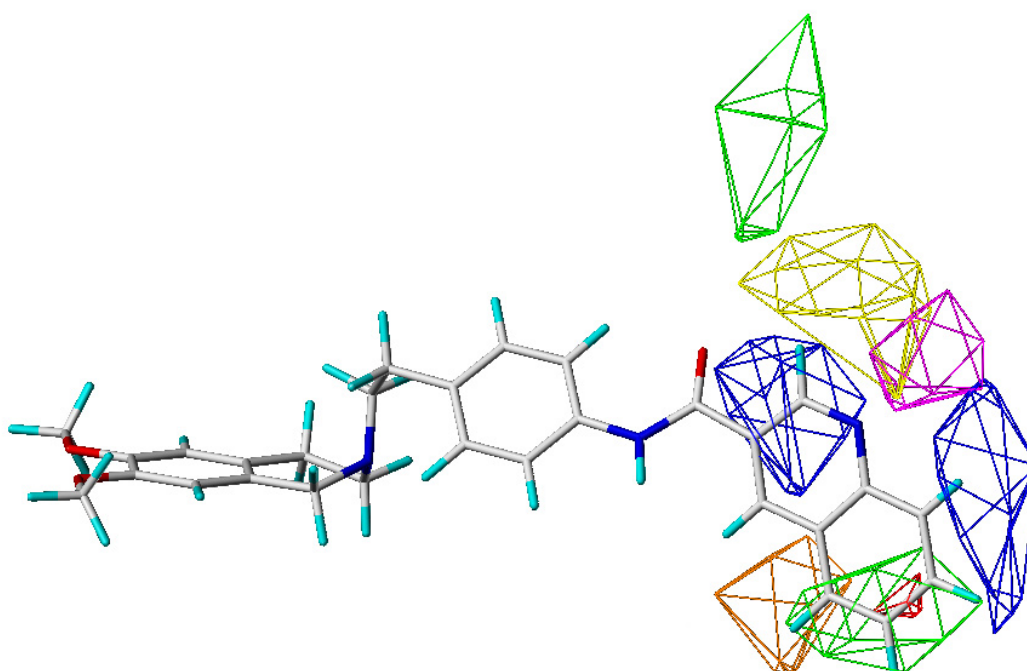


Abb. 4.30: CoMSIA Konturdiagramm (S+E+A für P-gp) mit der Verbindung WK-X-51.

Zum einen kann die rote Kontur in Abb. 4.29 bzw. Abb. 4.30 auf die partial negativ geladene Nitrogruppe bei Verbindungen mit Grundgerüst B (z.B. WK-X-30 und WK-X-31) zurückzuführen sein. Aber auch die sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatome der bityklischen Substituenten (R^2) bei Verbindungen mit Grundgerüst B tragen zum positiven Einfluss des elektrostatischen Feldes bei. Alle Verbindungen, die auf Grundgerüst B basieren und anstelle eines monozyklischen einen bityklischen Rest aufweisen, besitzen höhere pIC_{50} -Werte. Blaue Bereiche des elektrostatischen Feldes zeigen an, dass eine negative Ladung in dieser Position zu einer Verringerung der pIC_{50} -Werte führt. Eine blaue Kontur ist in der Nähe der bityklischen Substituenten der kleinen WK-Modulatoren zu sehen. Diese kann auf die Wasserstoffatome am Bityklus zurückzuführen sein. Da Wasserstoffatome eine positive Partialladung tragen, wird auf indirekte Weise der positive Einfluss der bityklischen Substituenten auf die Inhibierbarkeit von P-gp veranschaulicht.

Das magentafarbene Feld markiert Bereiche, bei denen Substituenten mit Wasserstoffbrückenakzeptor-Funktion zu einer verstärkten Interaktion mit P-gp führen. Die erstaunlich hohe Aktivität der Verbindung WK-X-51 ist wahrscheinlich auf die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenakzeptor-Interaktion des Chinolinstickstoffs zurückzuführen (vergl. Abb. 4.30). Nicht favorisierte Wasserstoffbrückenakzeptor-Interaktionen sind in den orange markierten Bereichen zu erwarten.

Vergleicht man die beiden besten CoMSIA-Modelle, S+E+D für BCRP und S+E+A für P-gp, liegt der Hauptunterschied in dem Beitrag des Wasserstoffbrückendonorbzw. -akzeptorfeldes. Wird das Wasserstoffbrückendonorfeld in die verschiedenen CoMSIA-Modelle für BCRP miteinbezogen, kommt es in allen Fällen zu einer Erhöhung des q^2 -Wertes. Wie bereits oben erwähnt, geht die magentafarbene Kontur auf den positiven Einfluss der Amidgruppe bei den großen Derivaten mit Anthranilamidpartialstruktur zurück. Diese Verbindungen zeigten sich im Hoechst 33342-Assay als die potentesten BCRP Inhibitoren.

Auf der anderen Seite leistet das Wasserstoffbrückendonorfeld keinen positiven Beitrag zur Inhibierbarkeit von P-gp. Bei einer Kombination der Felder unter Hinzunahme des Wasserstoffbrückendonorfeldes, sinkt der q^2 -Wert des entsprechenden Modells. Dies kann dadurch erklärt werden, dass sowohl Verbindungen mit Grundgerüst A als auch mit Grundgerüst B (WK-X-51, WK-X-52 und WK-Y-27) vergleichbare pIC_{50} -Werte aufweisen. Demnach ist der Einfluss der Amidgruppe bei den Anthranilamidderivaten auf die inhibitorische Wirksamkeit

vergleichsweise kleiner. Im Gegensatz dazu wirkt sich das Einbeziehen des Wasserstoffbrückenakzeptor-Feldes positiv auf die Inhibition von P-gp aus. Der magentafarbene Bereich des Wasserstoffbrückenakzeptor-Feldes in Abb. 4.29 bzw. Abb. 4.30 kann auf zwei Arten zu Stande kommen: (i) durch die Akzeptorfunktion des Sauerstoffatoms der Amidgruppe bei Verbindungen mit Grundgerüst A, (ii) durch das Einführen eines 3-Chinoly substituenten als Wasserstoffbrückenakzeptor bei Verbindungen mit Grundgerüst B (WK-X-51, WK-X-52, WK-Y-27).

Interessanterweise konnten zwei hoch potente P-gp Modulatoren (WK-X-51 und WK-Y-27) identifiziert werden, die an BCRP eine vergleichsweise geringe inhibitorische Wirksamkeit aufwiesen. Dies kann durch einen Vergleich der Konturdiagramme in Abb. 4.28 und Abb. 4.30 verdeutlicht werden. Es ist offensichtlich, dass sich die zweite grüne Kontur des sterischen Feldes nur bei P-gp positiv auf die pIC_{50} -Werte auswirkt. Dieser grüne Bereich, der bei BCRP fehlt, bezieht sich auf Substanzen mit Grundgerüst B, die einen bicyklischen Substituenten in Position R^2 enthalten. Um die Interaktion mit P-gp noch weiter zu erhöhen, kann zusätzlich eine Wasserstoffbrückenakzeptor-Funktion in Form eines Stickstoffs in den Bicyklus eingeführt werden. Die beiden Modulatoren WK-X-52 und WK-Y-27 erfüllen diese Voraussetzungen und können aufgrund ihrer hohen biologischen Wirksamkeit an P-gp als Inhibitoren mit Präferenz zu diesem Transporter bezeichnet werden.

4.4.5 Zusammenfassung der Struktur-Wirkungsbeziehungen

In Abb. 4.31 sind die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der untersuchten Verbindungen auf Basis der 2D- und 3D-Analysen zusammengefasst. In der Abbildung wird verdeutlicht, welche strukturellen Parameter die Interaktion mit P-gp bzw. BCRP beeinflussen. Blaue "Plus-Kreise" beschreiben positive Auswirkungen der Substituenten auf die Inhibition von P-gp. Orangefarbene Kreise zeigen den Einfluss der strukturellen Parameter auf die Interaktion der Verbindungen mit BCRP.

4.5 Vergleich der Zelllinien MCF-7 MX und MDCK BCRP

Für die Bestimmung der Aktivitätswerte verschiedener Verbindungen an BCRP wurde nicht nur die MCF-7 MX Zelllinie verwendet, sondern auch die stabil transfizierte Zelllinie MDCK BCRP. Die Zelllinie MDCK BCRP wurde durch Transfektion mit humaner BCRP cDNA aus der sensitiven Zelllinie gewonnen¹⁷³ und dem Arbeitskreis von Prof. Dr. A. Schinkel (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt.

Wie schon in Kapitel 4.1 beschrieben, wurden die aufgeführten Zelllinien hinsichtlich ihres ABCG2-Expressionsstatus mit Hilfe des BCRP spezifischen Antikörpers 5D3 am FACS untersucht. Aus den gezeigten Ergebnissen geht hervor, dass die Zelllinien MDCK BCRP und MCF-7 MX einen hohen und nahezu identischen BCRP Expressionsstatus aufweisen. Die Wildtypzelllinie MDCK II exprimiert dagegen keine nennenswerten Level an BCRP (Kapitel 4.1). Durch einen Vergleich der Aktivitätsdaten von Verbindungen, die sowohl an MDCK BCRP als auch an MCF-7 MX Zellen bestimmt wurden, sollte bekräftigt werden, dass die gemessenen Werte ausschließlich die Hemmung von BCRP widerspiegeln. Bisher konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die ABC-Transporter P-gp und MRP1 in MCF-7 MX Zellen nicht überexprimiert sind. Zellen, die durch Zugabe steigender Konzentrationen eines Zytostatikums resistent gemacht werden, wie es bei der Zelllinie MCF-7 MX der Fall ist, unterliegen einem hohen Selektionsdruck. Demnach ist nicht auszuschließen, dass weitere ABC-Transportproteine von diesen Zellen exprimiert werden, die die hier gezeigten Ergebnisse potentiell beeinflussen können. Um die Expression weiterer Transportproteine in MCF-7 MX Zellen ausschließen zu können, wurden die pIC_{50} -Werte ausgewählter Substanzen, die an beiden Zelllinien (MCF-7 MX und MDCK BCRP) ermittelt wurden, miteinander verglichen. Tabelle 4.11 zeigt die untersuchten Inhibitoren und deren Aktivitätswerte, die bereits für die Etablierung des Hoechst 33342-Assays verwendet wurden (vergl. Kapitel 4.2.1). Die Substanzen zeichnen sich durch eine starke strukturelle Diversität aus. Durch die strukturelle Vielfalt sollte die Aussagekraft der Korrelation erhöht werden. In Abb. 4.32 sind die pIC_{50} -Werte der Verbindungen, die an beiden Zelllinien mit Hilfe des Hoechst 33342-Assays (Endkonzentration 1 $\mu\text{mol/l}$) ermittelt wurden, gegeneinander geplottet. Der quadrierte Korrelationskoeffizient beträgt 0,98 und hebt hervor, dass in beiden

Zelllinien BCRP den Hauptresistenzmechanismus darstellt und die Ergebnisse nicht durch andere ABC-Transportproteine beeinflusst werden.

Tabelle 4.11: pIC_{50} -Werte und Standardabweichungen der unterschiedlichen Substanzen, die an MDCK BCRP Zellen mit Hilfe des Hoechst 33342-Assays (1 $\mu\text{mol/l}$) bestimmt wurden.

Verbindung	$pIC_{50} \pm SD$ (MDCK BCRP)	Verbindung	$pIC_{50} \pm SD$ (MDCK BCRP)
Cyclosporin A	$3,78 \pm 0,13$	Nilotinib	$6,17 \pm 0,06$
Diltiazem	$3,09 \pm 0,19$	Novobiocin	$4,19 \pm 0,11$
Erlotinib	$5,61 \pm 0,09$	Progesteron	$3,92 \pm 0,19$
Gefitinib	$5,49 \pm 0,07$	Reserpin	$4,65 \pm 0,15$
Imatinib	$5,03 \pm 0,14$	Verapamil	$3,61 \pm 0,08$
Ko143	$6,96 \pm 0,28$	XR9576	$5,69 \pm 0,04$
Nicardipin	$4,55 \pm 0,18$	XR9577	$6,13 \pm 0,05$

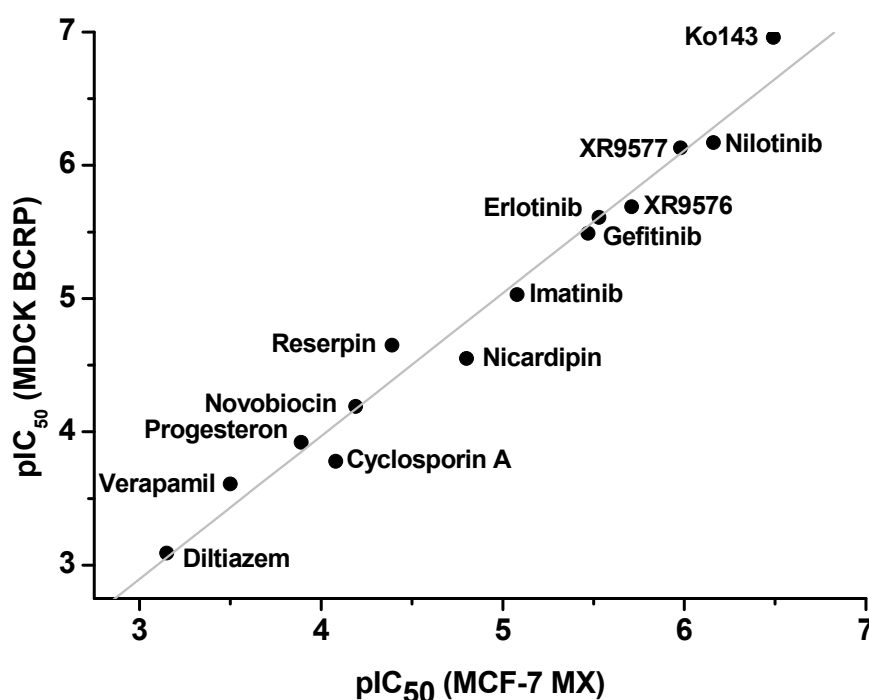


Abb. 4.32: Plot der pIC_{50} -Werte für 14 verschiedene Verbindungen in MCF-7 MX und MDCK BCRP Zellen (Hoechst 33342-Assay, 1 $\mu\text{mol/l}$). $r^2 = 0,98$.

Ein weiterer Vorteil der MDCK BCRP Zellen besteht darin, dass sie als Reporterzellen das grün fluoreszierende Protein (green fluorescence protein, GFP) enthalten.¹⁷³ GFP ist ein von der Qualle *Aequoria victoria* gebildetes Protein, das bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert.^{216,217} Seine Bedeutung in der Zellbiologie liegt in der Möglichkeit GFP mit beliebigen anderen Proteinen zu fusionieren. Durch die Fluoreszenz des GFP kann die räumliche und zeitliche Verteilung des gewünschten Proteins in lebenden Zellen, Geweben oder Organismen direkt beobachtet und analysiert werden. Der Wildtyp des Proteins absorbiert bei 395 nm am stärksten, weist aber auch einen geringeren Peak bei 475 nm auf. Die Emission liegt bei 508 nm. Das eigentliche Fluorophor bildet sich durch Zyklisierung aus der Tripeptidsequenz Ser65-Tyr66-Gly67 innerhalb der 238 Aminosäuren umfassenden Polypeptidkette. Durch Mutation bestimmter Aminosäuren sind eine Vielzahl von GFP-Varianten entwickelt worden, die hinsichtlich der Absorptions- und Emissionsspektren sowie der Leuchtstärke optimiert wurden. So bewirkt eine Punktmutation der Aminosäure Serin an Position 65 zu Threonin (S65T) eine erhöhte Fluoreszenzintensität und Photostabilität sowie eine Verschiebung des Absorptionsmaximums nach 488 nm.²¹⁸ Durch die Erzeugung weiterer Mutanten wurde das GFP systematisch so verändert, dass die in der Fluorimetrie handelsüblichen Filtersets optimal ausgenutzt werden können.

In MDCK BCRP Zellen wurde zur Herstellung des GFP-Fusionsproteins die BCRP cDNA mit der GFP-DNA verbunden und dieser Vektor durch Transfektion in die sensitive Zelle eingebracht¹⁷³, um von dieser selbständig exprimiert zu werden. In MDCK BCRP Zellen korreliert demnach die GFP-Fluoreszenz mit der relativen BCRP Expression. Diesen entscheidenden Vorteil der MDCK BCRP Zelllinie gegenüber der MCF-7 MX Zelllinie kann man sich auf unterschiedliche Art und Weise zu Nutzen machen und spielt im weiteren Verlauf der Arbeit eine erhebliche Rolle.

Zunächst wurde das Vorhandensein von GFP in MDCK BCRP Zellen mit Hilfe des Microplatereaders nachgewiesen. Dazu wurden MDCK wt und MDCK BCRP Zellen in schwarze 96er-Mikrotiterplatten ausgesät und die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm gemessen. Abb. 4.33 zeigt den Fluoreszenzverlauf in MDCK (nicht gefüllte Vierecke) und MDCK BCRP Zellen (grüne Vierecke). Es ist eindeutig zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensität der MDCK Zellen bei Null liegt und diese Zellen demnach kein

GFP enthalten. Die Fluoreszenz in MDCK BCRP Zellen liegt dagegen bei einem Wert von ungefähr 1150 und belegt, dass GFP exprimiert wird.

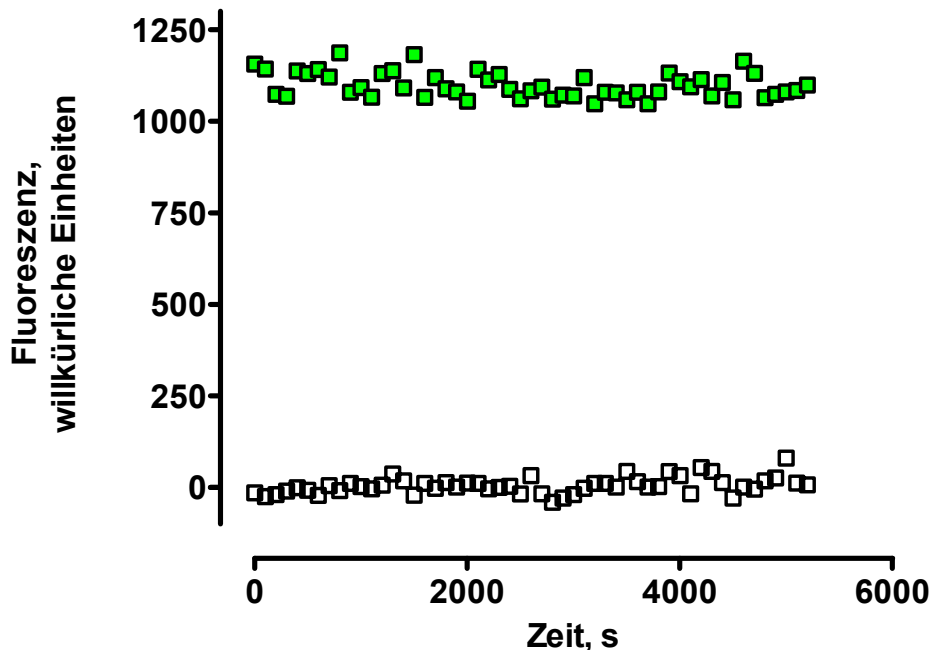


Abb. 4.33: Nachweis von GFP in MDCK BCRP Zellen (grüne Vierecke). Die Wildtypzelllinie exprimiert kein GFP (nicht gefüllte Vierecke). Exzitation 485 nm, Emission 520 nm. Unspezifische Fluoreszenz der Mikrotiterplatte abgezogen.

Des Weiteren kann während der Durchführung des Hoechst 33342-Assays der BCRP Expressionsstatus in MDCK BCRP Zellen beobachtet werden. Durch gleichzeitige Anregung von Hoechst 33342 bei 395 nm und GFP bei 485 nm kann der Fluoreszenzverlauf beider Substanzen im Microplatereader verfolgt werden. In Abb. 4.34 ist die Kinetik der Fluoreszenz für Hoechst 33342 (blau) und GFP (grün) abgebildet. Die GFP-Fluoreszenz liegt im Schnitt bei einem Wert von 1250. Der Vorteil der Simultanmessung besteht darin, die BCRP Expression bei der Durchführung jedes Versuchs überprüfen zu können, um bei Abnahme der GFP-Fluoreszenz ggf. neue Zellen ausfrieren zu können. Die relativ aufwendige Kontrolle des BCRP Expressionsstatus mittels Antikörper 5D3 am Durchflusszytometer, die in regelmäßigen Abständen durchgeführt werden sollte, entfällt.

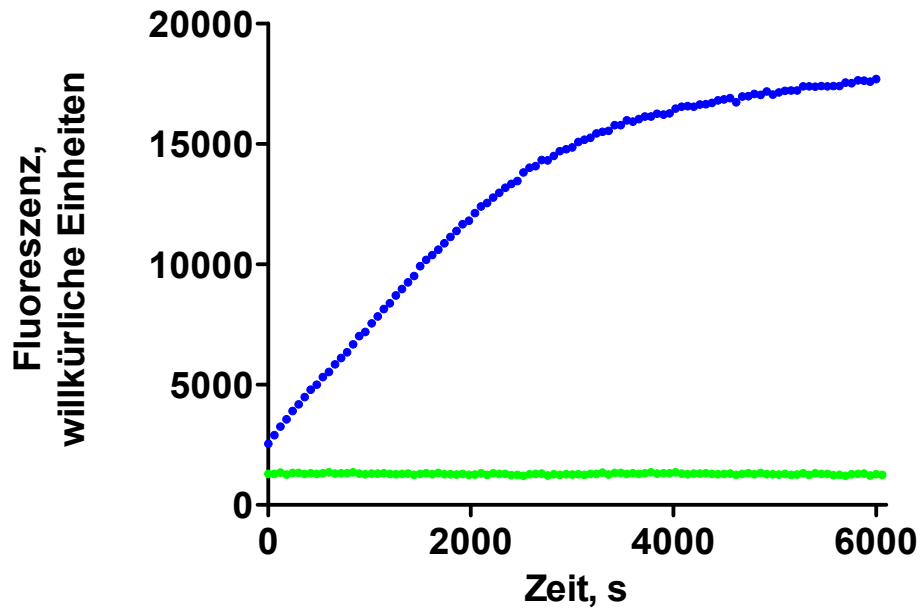


Abb. 4.34: Simultane Messung der Hoechst 33342-Fluoreszenz (Exzitation 395 nm, blau, nach Präinkubation mit 5,6 $\mu\text{mol/l}$ XR9577) und der GFP-Fluoreszenz (Exzitation 485 nm, grün) in MDCK BCRP Zellen.

Die Expression des GFP-BCRP-Fusionsproteins in MDCK BCRP Zellen bietet die unschätzbare Möglichkeit gleichzeitig Funktion und Expression des ABC-Transporters BCRP untersuchen zu können.

4.6 Der Pheophorbid A-Assay – Entwicklung und Anwendung

4.6.1 Etablierung eines HTS-fähigen Pheophorbid A-Assays in BCRP exprimierenden MCF-7 MX Zellen

Pheophorbid A gehört chemisch zur Gruppe der Porphyrine. Porphyrine stellen eine große Klasse von Verbindungen dar, zu denen auch die Pigmentfarbstoffe Chlorophyll, Häm und Cobalamin gehören. Bereits im Jahr 2002 hat die Arbeitsgruppe von Schinkel et al. bewiesen, dass Pheophorbid A von BCRP als Substrat erkannt und transportiert wird.¹¹⁸ Der unschätzbare Vorteil von Pheophorbid A besteht darin, dass die beiden ABC-Transporter P-gp und MRP1 nicht mit Pheophorbid A interagieren und die Verbindung daher als BCRP spezifisches Substrat bezeichnet werden kann.⁴¹ Substrate und Modulatoren führen zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Fluoreszenz von Pheophorbid A. In Abb. 4.35 ist das Absorptionsspektrum von Pheophorbid A abgebildet. Das Anregungsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 395 nm, bei 670 nm besitzt die Verbindung ihr Emissionsmaximum.

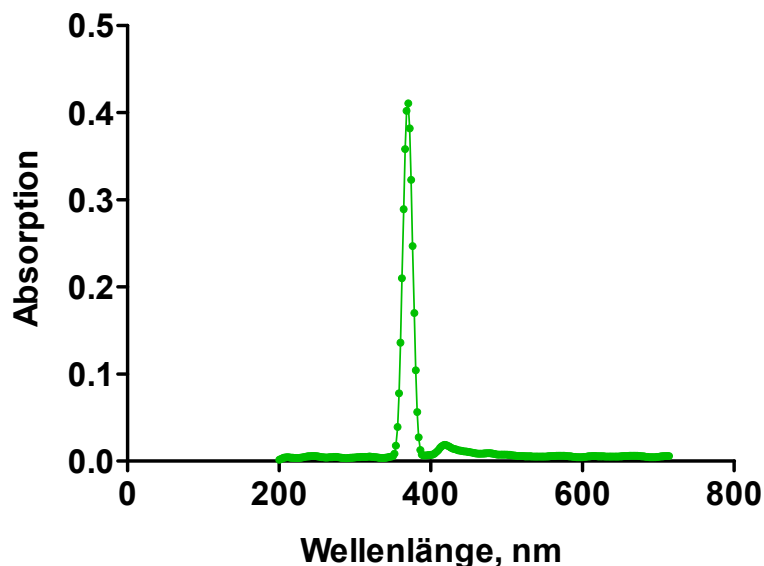


Abb. 4.35: Absorptionsspektrum von Pheophorbid A. Das Absorptionsmaximum liegt bei 395 nm.

In dieser Arbeit wurde der Pheophorbid A-Assay an MCF-7 MX und MDCK BCRP Zellen am Durchflussszytometer etabliert und zu einem HTS-fähigen Assay weiterentwickelt. In Anlehnung an die Literatur wurden bei der Durchführung des Assays zunächst Röhren (FACS-Testtubes) zur Bestimmung der biologischen Aktivität unterschiedlicher Inhibitoren verwendet.^{41,118} Dazu wurden MCF-7 und MCF-7 MX Zellen geerntet (s. Kapitel 3.1), mit KHP gewaschen, je 1 Millionen Zellen auf unterschiedliche Röhren verteilt (Endvolumen 800 μ l) und mit 100 μ l eines Modulators in ansteigenden Konzentrationen 30 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Röhren mit 100 μ l der Pheophorbid A-Lösung versehen (Endkonzentration 1 μ mol/l) und unmittelbar in festgesetzten Zeitabständen am FACS vermessen. Zwischen den einzelnen Messungen wurden die Röhren vor Licht geschützt im Wasserbad bei 37°C aufbewahrt. Die Fluoreszenzkinetik von Pheophorbid A, präinkubiert mit dem Modulator XR9577, ist in Abb. 4.36 zu sehen.

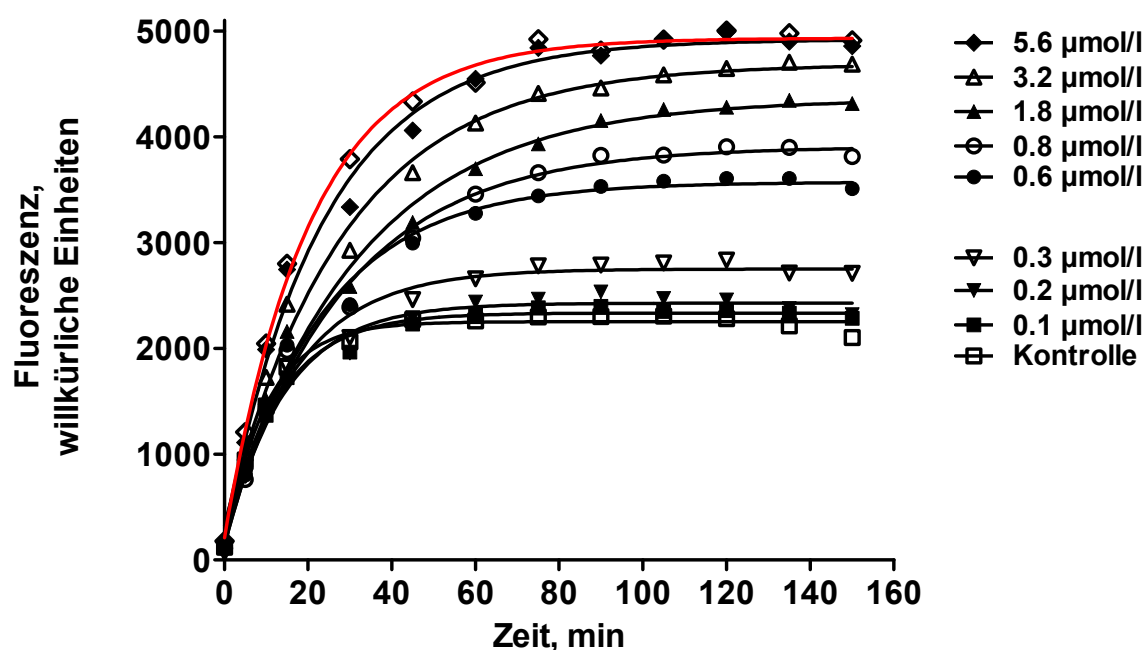


Abb. 4.36: Fluoreszenz-Zeitkurven für verschiedene Konzentrationen des Modulators XR9577 in MCF-7 MX Zellen, die mit Hilfe des Pheophorbid A-Assays in Röhren generiert wurden. Die rote Linie bezieht sich auf die Wildtypzelllinie MCF-7.

Der Fluoreszenzunterschied zwischen der Wildtypzelllinie (nicht gefüllte Rauten, rote Linie) und der resistenten Zelllinie (nicht gefüllte Vierecke) ist deutlich erkennbar. Mit Zunahme der Modulatorkonzentration steigt die Pheophorbid A Fluoreszenz in MCF-

7 MX Zellen an. Eine vollständige Hemmung von BCRP konnte mit einer Konzentration des Modulators von $5,6 \mu\text{mol/l}$ erreicht werden (gefüllte Rauten, Abb. 4.36). Die Fluoreszenz-Zeitverläufe für MCF-7 MX Zellen in Gegenwart des Inhibitors XR9577 (gefüllte Rauten) und von MCF-7 Zellen ohne XR9577 (nicht gefüllte Rauten, rote Linie) unterscheiden sich nicht. Wie aus Abb. 4.36 zu entnehmen ist, haben die Fluoreszenz-Zeitverläufe bei einer finalen Pheophorbid A Konzentration von $1 \mu\text{mol/l}$ nach etwa 100 min ihre maximale Fluoreszenz erreicht. Die Fluoreszenzkinetik von Pheophorbid A gelangt nach dieser Zeit in die Sättigungsphase, d.h. eine längere Inkubation der Zellen führt zu keinem weiteren Anstieg der Fluoreszenz mehr. Diese Erkenntnis ist essentiell für die spätere Umstellung der Versuchbedingungen von den Röhrcchen auf einen HTS-fähigen 96er-Mikrotiterplattenmodus, da sie die Inkubationsdauer der Platten mit dem Substrat festlegt.

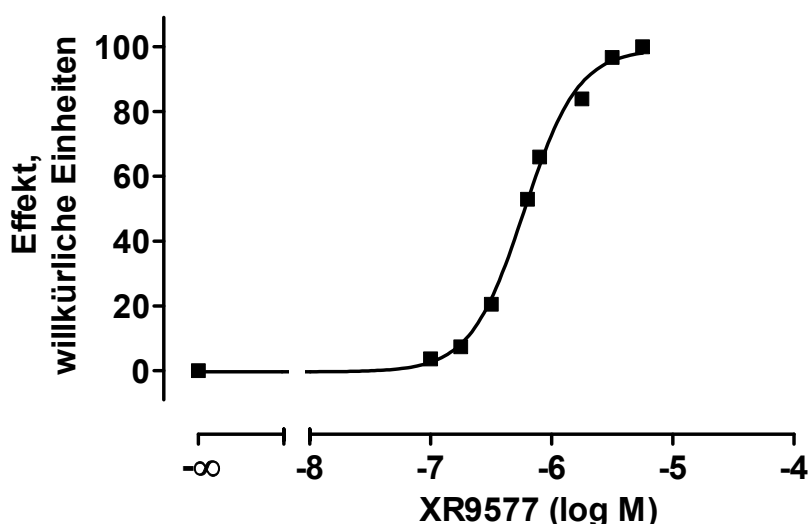


Abb. 4.37: Konzentrations-Effektkurve für XR9577 (Pheophorbid A-Assay, MCF-7 MX Zellen): $\text{pIC}_{50} = 6,20 \pm 0,02$, $n_H = 1,51 \pm 0,22$. Beispiel für ein typisches Experiment aus einer Serie von mind. drei unabhängigen Einzelerperimenten.

Für die Auswertung der dargestellten Fluoreszenz-Zeitverläufe wurden die maximal erreichten Fluoreszenzwerte gegen die logarithmischen Konzentrationen des Modulators aufgetragen und mit Hilfe der 4-Parameter-logistischen-Gleichung eine sigmoide Konzentrations-Effektkurve erstellt. Abb. 4.37 zeigt die resultierende Konzentrations-Effektkurve des Modulators XR9577 in MCF-7 MX Zellen. Der pIC_{50} -Wert der Verbindung liegt bei 6,20 mit einem Hillkoeffizienten von 1,51. Tabelle 4.12

beinhaltet pIC_{50} -Werte und Hillkoeffizienten weiterer Verbindungen, die mit Hilfe des Pheophorbid A-Assays an MCF-7 MX Zellen analysiert wurden.

Tabelle 4.12: Verbindungen, die mit Hilfe des Pheophorbid A-Assays (Röhrchen) an MCF-7 MX 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	$4,56 \pm 0,08$	$1,20 \pm 0,09$
Gefitinib	$5,75 \pm 0,10$	$1,27 \pm 0,17$
Imatinib	$5,57 \pm 0,06$	$1,89 \pm 0,33$
Ko143	$6,44 \pm 0,03$	$2,35 \pm 0,26$
Nicardipin	$4,75 \pm 0,05$	$1,58 \pm 0,27$
Novobiocin	$3,98 \pm 0,05$	$1,35 \pm 0,26$
Progesteron	$3,84 \pm 0,10$	1,00
Reserpin	$3,53 \pm 0,29$	1,00
Verapamil	$3,59 \pm 0,09$	1,00
XR9576	$5,84 \pm 0,04$	$1,34 \pm 0,31$
XR9577	$6,16 \pm 0,12$	$1,39 \pm 0,74$

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte der Pheophorbid A-Assay von den Röhrchen auf einen HTS-fähigen Plattenmodus umgestellt werden. Die Durchführung des Assays in 96er-Mikrotiterplatten besitzt den Vorteil, dass die zeitaufwendige Aufnahme der Kinetik entfällt. Wie aus Abb. 4.36 zu entnehmen ist, ist eine Sättigung der Pheophorbid A Fluoreszenz nach ca. 110 min erreicht. Für die Inkubation der Platten mit dem Substrat wurde daher ein Zeitraum von 120 min gewählt. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung der 96er-Wellplatten besteht darin, wesentlich mehr Verbindungen pro Versuchstag untersuchen zu können. Das Screening nach BCRP Modulatoren wird dadurch um ein Vielfaches erleichtert.

Um die optimale Pheophorbid A Konzentration für die Durchführung des Assays im Plattenmodus ermitteln zu können, wurden MCF-7 MX Zellen (mit und ohne Präinkubation von $5,6 \mu\text{mol/l}$ XR9577) in klare 96er-Mikrotiterplatten ausgesät und mit unterschiedlichen Konzentrationen Pheophorbid A am FACS vermessen (vergl. Kapitel 3.15.3). Abb. 4.38 zeigt den Fluoreszenzverlauf in MCF-7 MX Zellen bei unterschiedlichen Pheophorbid A Konzentrationen.

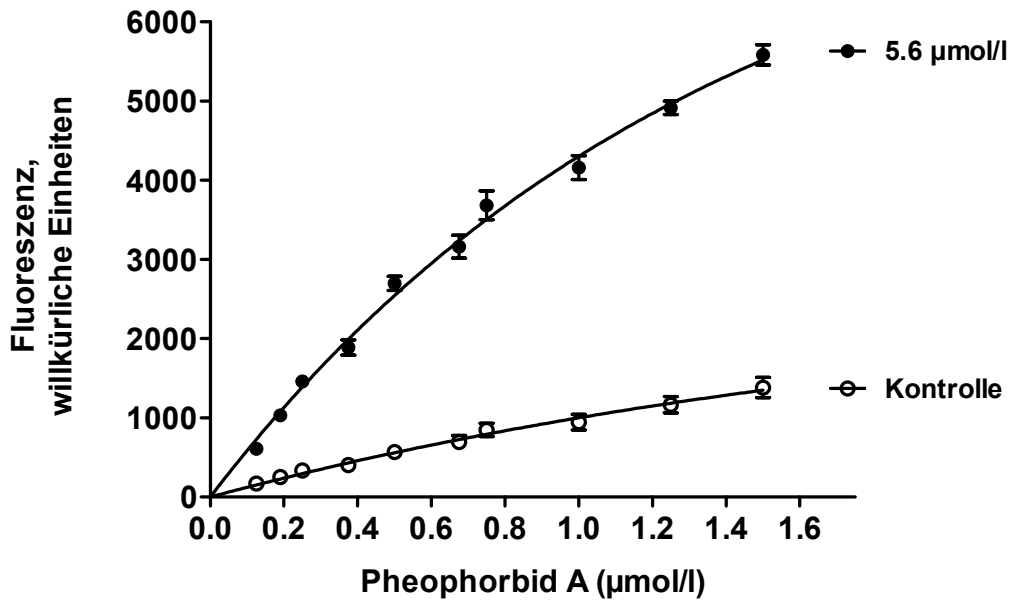


Abb. 4.38: Fluoreszenzverlauf von Pheophorbid A bei unterschiedlichen Konzentrationen in MCF-7 MX Zellen. Ungehemmte Reaktion (nicht gefüllte Kreise), gehemmte Reaktion (gefüllte Kreise; 5,6 µmol/l XR9577).

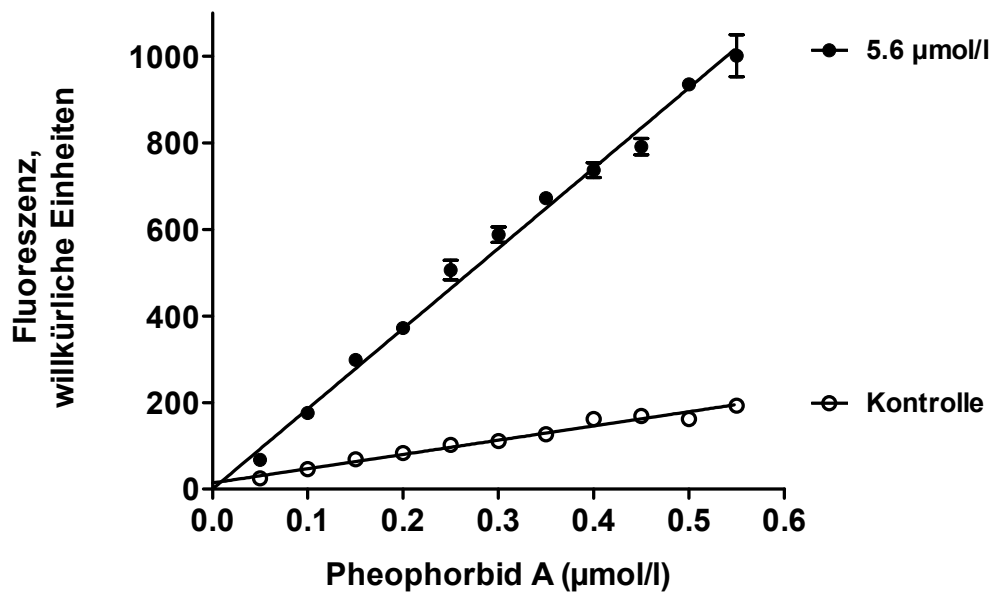


Abb. 4.39: Der Fluoreszenzverlauf von Pheophorbid A verläuft bis zu einer Konzentration von 0,55 µmol/l linear.

Nicht gefüllte Kreise beziehen sich auf die ungehemmte Reaktion. Gefüllte Kreise zeigen den Fluoreszenzverlauf bei vollständiger Hemmung von BCRP mit 5,6 µmol/l XR9577. Beide Kurven gehen durch den Ursprung des Graphen. Aus Abb. 4.38 geht

jedoch hervor, dass die Fluoreszenz von Pheophorbid A nur etwa bis zu einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ annähernd linear verläuft. Bei Konzentrationen größer 1 $\mu\text{mol/l}$ zeigt sich eine Krümmung der Kurve. Der Fluoreszenzverlauf von Pheophorbid A bis zu einer maximalen Konzentration von 0,55 $\mu\text{mol/l}$ ist in Abb. 4.39 zu sehen. Da die Fluoreszenz bis zu dieser Konzentration linear verläuft, wurde für die weitere funktionelle Untersuchung potentieller BCRP Inhibitoren im Plattenmodus eine finale Pheophorbid A Konzentration von 0,5 $\mu\text{mol/l}$ gewählt.

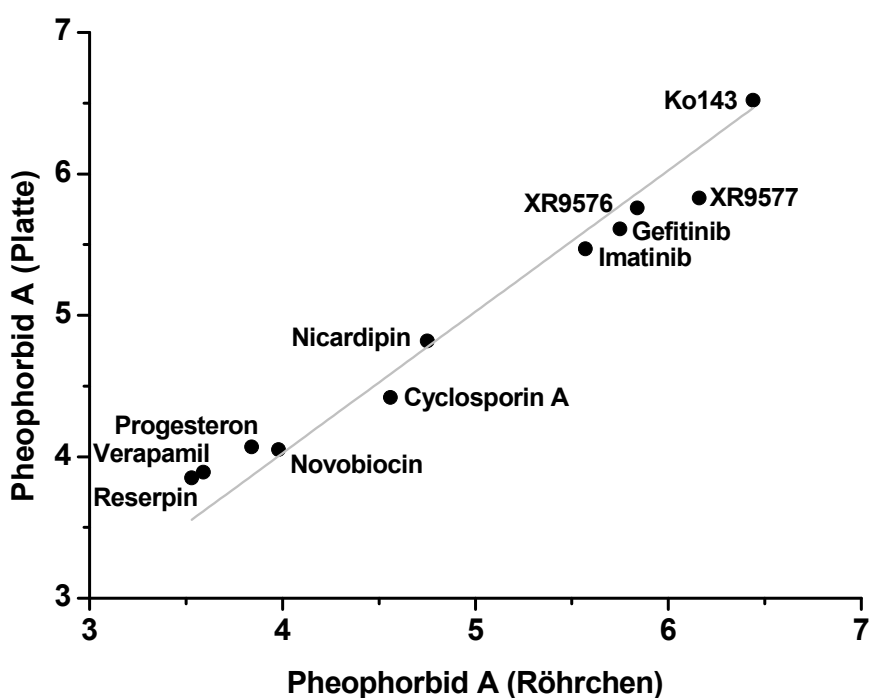


Abb. 4.40: pIC₅₀-Werte von 11 Verbindungen, die mit Hilfe des Pheophorbid A-Assays in Röhrchen und in 96er-Mikrotiterplatten an MCF-7 MX Zellen bestimmt wurden. $r^2 = 0,95$.

In Abb. 4.40 sind die pIC₅₀-Werte, die mit Hilfe des Pheophorbid A-Assays an MCF-7 MX Zellen in Röhrchen ermittelt wurden (s. Tabelle 4.12), gegen die pIC₅₀-Werte, die in 96er-Mikrotiterplatten bestimmt wurden, aufgetragen. Der quadrierte Korrelationskoeffizient von 0,95 unterstreicht, dass beide Testsysteme zu vergleichbaren Ergebnissen führen, wobei die Durchführung im Plattenmodus der in Röhrchen aus oben genannten Gründen vorzuziehen ist.

4.6.2 Erweiterte Anwendung des Pheophorbid A-Assays bei MDCK BCRP Zellen

Wie in Kapitel 4.5 beschrieben, besitzen MDCK BCRP Zellen das GFP-BCRP-Fusionsprotein. Die Korrelation der GFP-Fluoreszenz mit der relativen BCRP Expression kann man sich bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der Zelllinie auf spezielle Weise zu Nutze machen. Die Detektion der GFP-Fluoreszenz erfolgt in Fluoreszenzkanal FL1 (530 nm). In die Auswertung der Pheophorbid A Fluoreszenz (FL3, 670 nm) wurde die Kenntnis über die Expression aus Kanal FL1 eingebunden. Das "Gaten" der Ergebnisse in FL3 (Funktion) über FL1 (Expression), ermöglichte es Zellen mit signifikant differierender Expression von der weiteren Analyse auszuschließen. Der Dotplot in Abb. 4.41 A zeigt eine Zellpopulation - aufgenommen in Fluoreszenzkanal FL1 - die auf die GFP-Fluoreszenz zurückgeht. Durch Setzen des Gates (rote Umrandung in Abb. 4.41 A) werden nur Zellen mit ähnlicher BCRP Expression in die Auswertung miteinbezogen (s. Abb. 4.41 B).

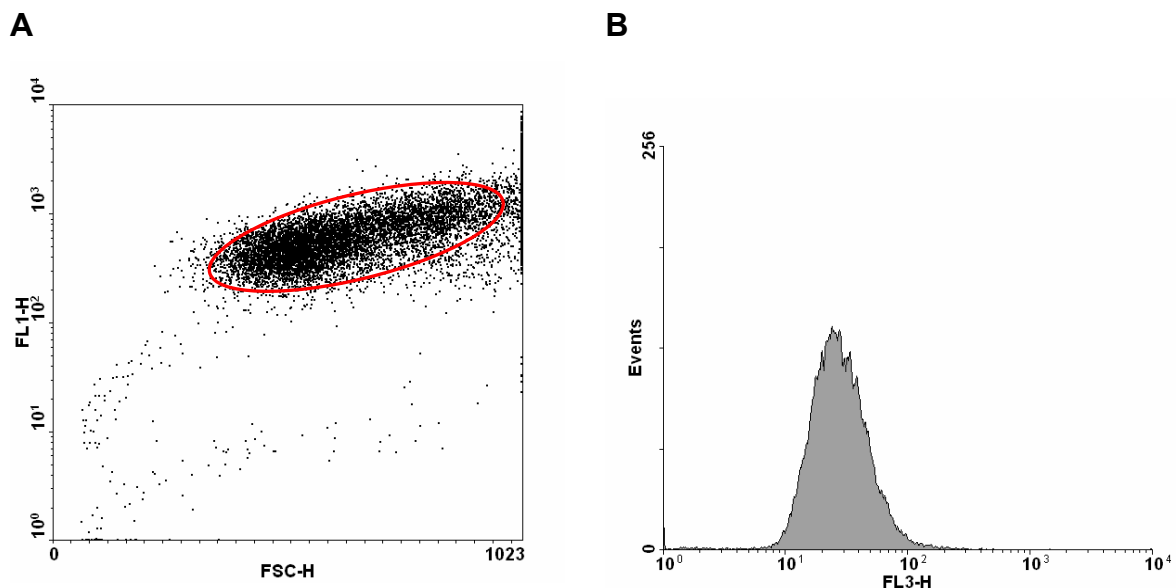


Abb. 4.41 A: Dotplot einer Zellpopulation (MDCK BCRP) aufgenommen in FL1 (530 nm). Das Gate (rote Umrandung) schließt Zellen mit gleicher BCRP Expression ein. **B:** Analyse der BCRP Funktion: Fluoreszenzintensität von Pheophorbid A (MDCK BCRP, 5,6 $\mu\text{mol/l}$ XR9577), die in FL3 (670 nm) durch das "gaten" in FL1 (530 nm) resultiert.

4 Ergebnisse und Diskussion

Die Korrelation der pIC₅₀-Werte von 14 strukturell unterschiedlichen Verbindungen, die in MDCK BCRP Zellen mit Hilfe des Pheophorbid A-Assays auf der einen Seite und mittels des Hoechst 33342-Assays auf der anderen Seite bestimmt wurden, ist in Abb. 4.42 wiedergegeben.

Tabelle 4.13: pIC₅₀-Werte und Standardabweichungen von 14 Verbindungen, die mit Hilfe des Pheophorbid A-Assays (Plattenmodus) und des Hoechst 33342-Assays (1 µmol/l) an MDCK BCRP Zellen bestimmt wurden (n ≥ 3).

Verbindung	pIC ₅₀ ± SD (Pheophorbid A-Assay)	pIC ₅₀ ± SD (Hoechst 33342-Assay)
Cyclosporin A	4,13 ± 0,17	3,78 ± 0,13
Diltiazem	3,10 ± 0,13	3,09 ± 0,19
Erlotinib	5,73 ± 0,09	5,61 ± 0,09
Gefitinib	5,76 ± 0,12	5,49 ± 0,07
Imatinib	5,57 ± 0,16	5,03 ± 0,14
Ko143	6,76 ± 0,20	6,96 ± 0,28
Nicardipin	4,69 ± 0,20	4,55 ± 0,18
Nilotinib	6,59 ± 0,16	6,17 ± 0,06
Novobiocin	4,25 ± 0,16	4,19 ± 0,11
Progesteron	4,28 ± 0,21	3,92 ± 0,19
Reserpin	4,42 ± 0,22	4,65 ± 0,15
Verapamil	3,89 ± 0,11	3,61 ± 0,08
XR9576	5,75 ± 0,06	5,69 ± 0,04
XR9577	6,43 ± 0,18	6,13 ± 0,05

Die zugrunde liegenden pIC₅₀-Werte können Tabelle 4.13 entnommen werden. Die Bestimmung der Aktivitätswerte im Hoechst 33342-Assay erfolgte mit einer finalen Hoechst 33342 Konzentration von 1 µmol/l. Für die Generierung der pIC₅₀-Werte wurde die Auswertungsmethode über die einphasig exponentielle Assoziation gewählt. Der quadrierte Korrelationskoeffizient von 0,96 beweist, dass beide Testsysteme für eine funktionelle Charakterisierung des ABC-Transporters BCRP geeignet sind. Jedoch hat die Kombination aus Verwendung von MDCK BCRP Zellen im Pheophorbid A-Assay zwei entscheidende Vorteile: (1) Nachweis der Spezifität der Interaktion durch die Auswahl eines spezifischen Substrates,

unterstützt durch (2) die detaillierte, expressions-basierte Auswertung bei der Verwendung von MDCK BCRP Zellen.

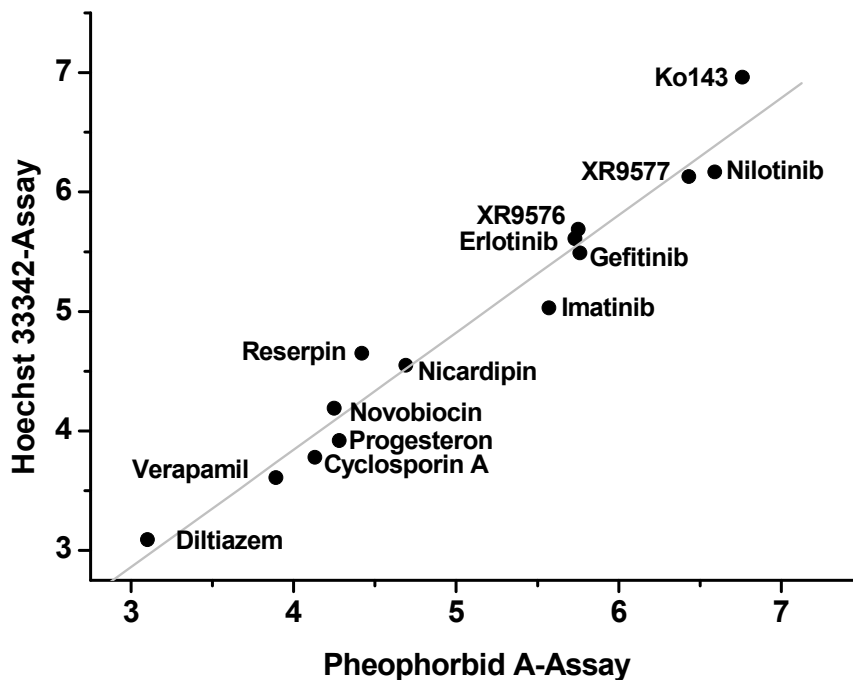


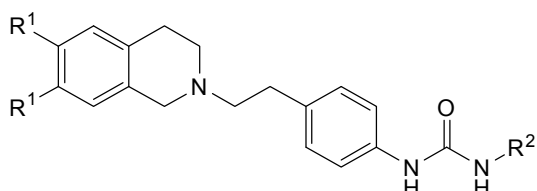
Abb. 4.42: Scatterplot von 14 strukturell verschiedenen Verbindungen, die mit Hilfe des Hoechst 33342-Assays und des neu entwickelten Pheophorbid A-Assays an MDCK BCRP Zellen bestimmt wurden. $r^2 = 0,96$.

Im Zuge dieser Arbeit konnte ein HTS-fähiger Assay mit dem BCRP spezifischen Substrat Pheophorbid A etabliert werden. Die Verwendung von MDCK BCRP Zellen ermöglicht es, gleichzeitig Expression und Funktion des ABC-Transporters BCRP untersuchen zu können.

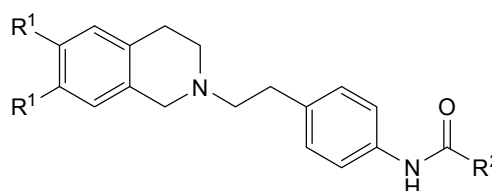
4.7 Funktionelle Untersuchung ausgewählter WK-Verbindungen vom Harnstoff-Typ

Bisher wurden in dieser Arbeit Tariquidar-Analoga untersucht, die auf zwei unterschiedlichen Grundgerüsten basieren (Abb. 4.17 A und B). Die Verbindungen interagieren mit BCRP in mikromolaren Konzentrationen. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte der Einfluss unterschiedlicher Linker am Tetrahydroisochinolinethylphenylgerüst auf die inhibitorische Wirksamkeit der Verbindungen an BCRP analysiert werden.

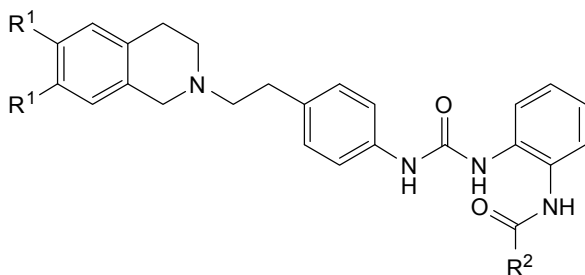
Gruppe 1



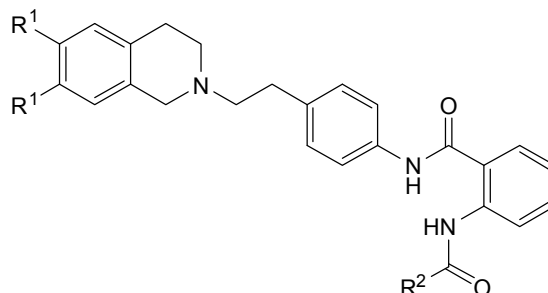
Gruppe 2



Gruppe 3



Gruppe 4



Gruppe 5

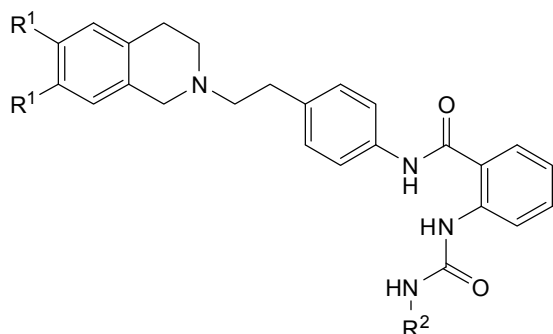


Abb. 4.43: Die untersuchten Verbindungen basieren auf fünf verschiedenen Grundgerüsten mit unterschiedlichen Linkern.

Im Fokus dieser Untersuchung standen WK-Modulatoren, bei denen die Tetrahydroisochinolinethylphenylpartialstruktur entweder über einen Amidlinker, oder

über einen Harnstofflinker mit dem hydrophoben Rest verknüpft ist. Bezüglich ihrer Grundstruktur lassen sich die untersuchten Verbindungen in fünf Gruppen einteilen (s. Abb. 4.43). Vertreter aus Gruppen 1 und 2 gehören zu den "kleinen" WK-Modulatoren und besitzen entweder eine Harnstoffpartialstruktur (Gruppe 1) oder einen Amidlinker (Gruppe 2). Das Molekulargewicht dieser Verbindungen beträgt ca. 400 Da und ist vergleichsweise gering. Vertreter aus den Gruppen 3, 4 und 5 stellen "große" WK-Modulatoren mit einem höheren Molekulargewicht dar. Diese Verbindungen besitzen grundsätzlich zwei Linker. Der erste Linker schließt sich – analog zu den kleinen Derivaten – direkt an den Ethylphenylrest an und kann entweder aus einer Harnstoffpartialstruktur (Gruppe 3 in Abb. 4.43), oder einer Amidpartialstruktur (Gruppen 4 und 5 in Abb. 4.43) bestehen. Der zweite Linker verknüpft das Grundgerüst mit dem hydrophoben Teil R^2 der Verbindungen. Bei den Gruppen 3 und 4 in Abb. 4.43 ist dieser Rest (R^2) über einen Amidlinker verknüpft, bei Vertretern aus Gruppe 5 findet sich an dieser Position eine Harnstoffpartialstruktur. Einige Vertreter aus den Gruppen 2 und 4 wurden bereits in Kapitel 4.4 eingehend untersucht.

4.7.1 Biologische Aktivität an den ABC-Transportern BCRP, P-gp und MRP1

Um den Einfluss unterschiedlicher Linkertypen auf die Hemmwirkung der WK-Verbindungen an BCRP analysieren zu können, wurden insgesamt 16 Substanzen ausgewählt. In Tabelle 4.14 sind die strukturellen Parameter und die Aktivitätswerte der untersuchten Modulatoren aufgeführt, die mit Hilfe des Pheophorbid A-Assays an MDCK BCRP Zellen bestimmt wurden. Wie aus Tabelle 4.14 zu entnehmen ist, interagieren alle 16 Verbindungen mit BCRP. Die inhibitorische Wirksamkeit der Substanzen an P-gp wurde bereits im Zuge der Dissertationsarbeit von Dr. Henrik Müller an P-gp exprimierenden A2780 Adr Zellen bewiesen.¹⁹⁶ Da der ABC-Transporter MRP1 neben BCRP und P-gp ebenfalls bei der Entwicklung der MDR beteiligt sein soll, war es von Interesse zu überprüfen, ob die Verbindungen auch mit MRP1 interagieren. Daher wurde die potentielle Interaktion der WK-Modulatoren zusätzlich mittels des Calcein AM-Assays an 2008 MRP1 Zellen untersucht (vergl. Kapitel 3.13.3).

Tabelle 4.14: Strukturen und pIC₅₀-Werte mit Standardabweichung der WK-Modulatoren mit modifiziertem Verknüpfungsbereich an MDCK BCRP Zellen (Pheophorbid A-Assay), n ≥ 3.

Verbindung	R ¹	R ²	pIC ₅₀ ± SD
Grundgerüst 1			
WK-X-46	H	2-Nitrophenyl	5,06 ± 0,12
WK-X-74	OCH ₃	2-Nitrophenyl	5,04 ± 0,15
WK-X-86	OCH ₃	4-Nitrophenyl	5,58 ± 0,22
WK-X-48	H	2-Aminophenyl	4,13 ± 0,08
WK-X-76	OCH ₃	2-Aminophenyl	4,23 ± 0,10
WK-X-89	OCH ₃	4-Aminophenyl	4,33 ± 0,10
Grundgerüst 2			
WK-X-15	H	2-Nitrophenyl	4,34 ± 0,20
WK-X-14	OCH ₃	2-Nitrophenyl	4,39 ± 0,10
WK-X-30	OCH ₃	4-Nitrophenyl	5,36 ± 0,16
WK-X-17	H	2-Aminophenyl	4,68 ± 0,21
WK-X-16	OCH ₃	2-Aminophenyl	4,96 ± 0,22
WK-X-33	OCH ₃	4-Aminophenyl	4,01 ± 0,08
Grundgerüst 3			
WK-X-78	OCH ₃	3,4-Dimethoxy-phenyl	5,16 ± 0,19
Grundgerüst 4			
WK-X-34	OCH ₃	3,4-Dimethoxy-phenyl	6,07 ± 0,06
WK-X-36	H	4-Nitrophenyl	6,20 ± 0,19
Grundgerüst 5			
WK-X-92	OCH ₃	4-Nitrophenyl	6,30 ± 0,07

In Abb. 4.44 sind die Ergebnisse an MRP1 zusammengefasst. Die Abbildung zeigt die Akkumulation des Substrates Calcein-AM in 2008 MRP1 Zellen präinkubiert mit 10 µmol/l des jeweiligen Modulators. Höhere Konzentrationen konnten aufgrund der geringen Löslichkeit der WK-Verbindungen nicht eingesetzt werden. Der Standardmodulator Indometacin (die Endkonzentration lag hier aufgrund der besseren Löslichkeit bei 100 µmol/l) führt zu einer 100%igen Hemmung des ABC-Transporters (pIC₅₀ = 4,87 ± 0,15). Die drei großen Verbindungen WK-X-34, WK-X-36 und WK-X-92 zeigten eine schwache Interaktion mit MRP1. Die eingesetzten

Konzentrationen von 10 $\mu\text{mol/l}$ reichten jedoch nicht aus, um MRP1 vollständig zu inhibieren. Die Konzentrations-Effektkurven dieser Substanzen konnten nur durch Fixierung des Top-Wertes über den Standardmodulator Indometacin, der im gleichen Experiment bestimmt wurde, erstellt werden. Die so extrapolierten IC_{50} -Werte lagen bei allen drei Verbindungen $> 20 \mu\text{mol/l}$. Die übrigen 13 WK-Modulatoren zeigten keine Interaktion mit MRP1 (vergl. Abb. 4.44).

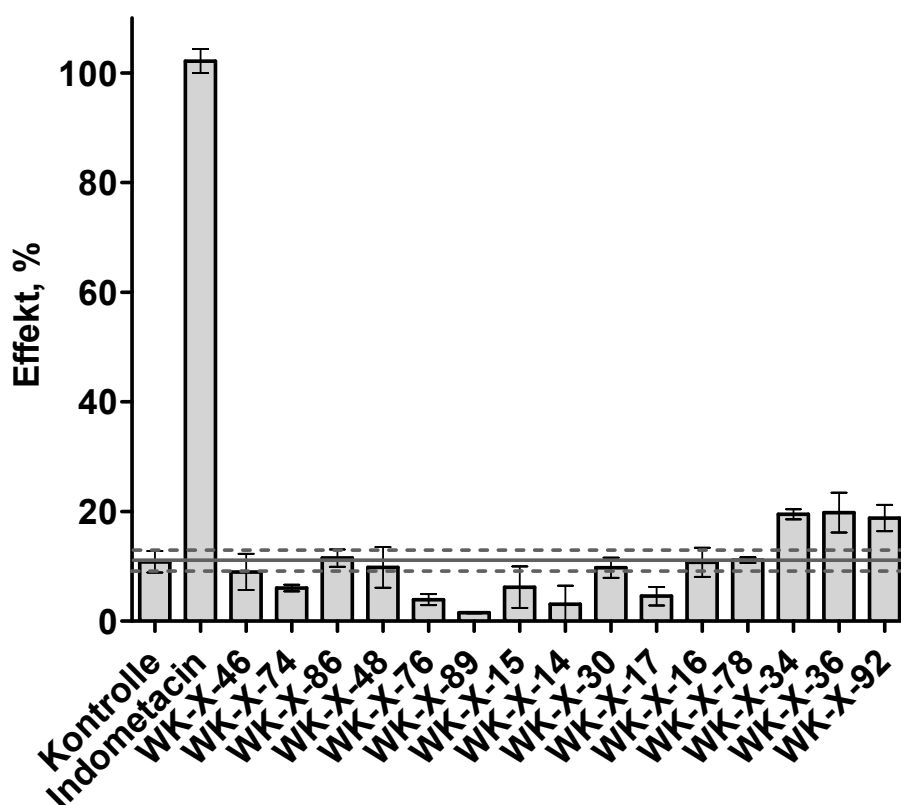


Abb. 4.44: Akkumulation von Calcein-AM in 2008 MRP1 Zellen. Die maximal eingesetzte Konzentration der WK-Verbindungen betrug 10 $\mu\text{mol/l}$. Die Normalisierung der Daten erfolgte über 100 $\mu\text{mol/l}$ Indometacin als 100 % Hemmung ($n \geq 3$). Die dunkelgrauen Linien beziehen sich auf Mittelwert und Standardabweichung der Kontrolle.

Die Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten WK-Modulatoren mit den ABC-Transportern P-gp und BCRP interagieren. Sie können daher als Breitspektrum-inhibitoren bzw. als duale Inhibitoren bezeichnet werden. Der Einsatz eines dualen Inhibitors in der klinischen Praxis kann immer dann von Vorteil sein, wenn die Resistenz der Krebszellen Chemotherapeutika betrifft, die Substrate beider ABC-Transporter sind.

4.7.2 Struktur-Wirkungsbeziehungen

Betrachtet man die pIC_{50} -Werte der Verbindungen, die auf Grundgerüst 1 basieren wird deutlich, dass Derivate mit einer ortho-Nitrofunktion eine wesentlich höhere Aktivität an BCRP besitzen als die korrespondierenden Amino-Analoga. Dies ergibt sich aus dem Vergleich der pIC_{50} -Werte der ortho-Nitroderivate WK-X-46 ($pIC_{50} = 5,06 \pm 0,12$) und WK-X-74 ($pIC_{50} = 5,04 \pm 0,15$) mit den pIC_{50} -Werten der analogen ortho-Aminoderivate WK-X-48 ($pIC_{50} = 4,13 \pm 0,08$) und WK-X-76 ($pIC_{50} = 4,23 \pm 0,10$). Der Shift der Nitrogruppe von ortho nach para wie in Verbindung WK-X-86 ($pIC_{50} = 5,58 \pm 0,22$) bewirkt eine wesentliche Erhöhung der biologischen Aktivität. Auf der anderen Seite führt die Reduktion der para-Nitrogruppe in eine para-Aminogruppe zu einer 20fachen Abnahme der inhibitorischen Wirksamkeit (WK-X-89: $pIC_{50} = 4,33 \pm 0,10$).

Bei den Vertretern aus Gruppe 2 sind die Unterschiede in den pIC_{50} -Werten bezüglich der Substitution in ortho-Position geringer ausgeprägt. Hier sind jedoch die Aktivitätswerte der ortho-Nitroderivate von WK-X-15 ($pIC_{50} = 4,34 \pm 0,20$) und WK-X-14 ($pIC_{50} = 4,39 \pm 0,10$) geringer als die der ortho-Aminoderivate WK-X-17 ($pIC_{50} = 4,68 \pm 0,21$) und WK-X-16 ($pIC_{50} = 4,96 \pm 0,22$). In Übereinstimmung mit den Harnstoffderivaten aus Gruppe 1 ist die Lokalisation der Nitrogruppe entscheidend für die Interaktion mit BCRP. Eine Nitrogruppe in para-Position (WK-X-30: $pIC_{50} = 5,36 \pm 0,16$) bewirkt eine Steigerung der Aktivität um den Faktor 10 im Vergleich zu den ortho-Nitroverbindungen WK-X-15 und WK-X-14. Des Weiteren ist auch bei Verbindungen mit Grundgerüst 2 eine para-Nitrogruppe wie bei WK-X-30 ($pIC_{50} = 5,36 \pm 0,16$) gegenüber einer para-Aminogruppe (WK-X-33: $pIC_{50} = 4,01 \pm 0,08$) favorisiert.

Um die energetisch bevorzugten Konformationen der Verbindungen analysieren zu können wurde zunächst mit Hilfe des Programms SYBYL die 3D-Struktur des Grundgerüsts generiert. Die Grundstruktur N-{4-[2-(3,4-Dihydro-1*H*-isochinolin-2-yl)-ethyl]-phenyl}-carbonsäureamid ist allen 16 Verbindungen gemeinsam und wurde unter Anwendung des Kraftfeldes MMFF94s energieminiert. Die Grundstruktur wurde als Aggregat definiert und für alle Verbindungen beibehalten. Die Strukturen aller 16 Modulatoren wurden hiervon ausgehend erstellt und nur die angefügten Substituenten energieminiert. Abb. 4.45 zeigt die Überlagerung der favorisierten Konformationen der drei Verbindungen WK-X-46, WK-X-15 und WK-X-17.

Im Falle des Harnstoffderivates WK-X-46 (grün, Abb. 4.45) ergibt sich eine energetisch günstige Konformation, wenn die ortho-Nitrogruppe nach "oben" ausgerichtet ist. Diese planare Konformation wird durch eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Sauerstoffatom der Nitrogruppe und einer NH-Gruppe der Harnstoffpartialstruktur stabilisiert. Bei den korrespondierenden Amidderivaten aus Gruppe 2 sind grundsätzlich zwei Ausrichtungen der ortho-Nitrogruppe möglich: zeigt die Nitrogruppe nach "oben" wie bei der Verbindung WK-X-15 (magenta, Abb. 4.45) bildet sich über eine Wasserstoffbrücke ein energetisch günstiges 7-gliedriges Ringsystem. Die Ausrichtung der Nitrogruppe nach "unten" ist von etwa gleicher Energie. In beiden Fällen bewirkt das Vorhandensein der ortho-Nitrogruppe eine Drehung des Phenylringes um 45° aus der Ebene. Dies führt zu einer energetisch ungünstigen Konformation und erklärt, warum die ortho-Nitroamide (Grundgerüst 2) schlechter wirksam sind als die ortho-Nitroharnstoffe (Grundgerüst 1). Außerdem differiert die Position der Nitrogruppe bei den Harnstoffderivaten WK-X-46 und WK-X-74 und den korrespondierenden Amidderivaten WK-X-15 und WK-X-14 um ca. 3Å (Abb. 4.45) und könnte ebenfalls zur Beeinflussung der pIC_{50} -Werte dieser Verbindungen beitragen.

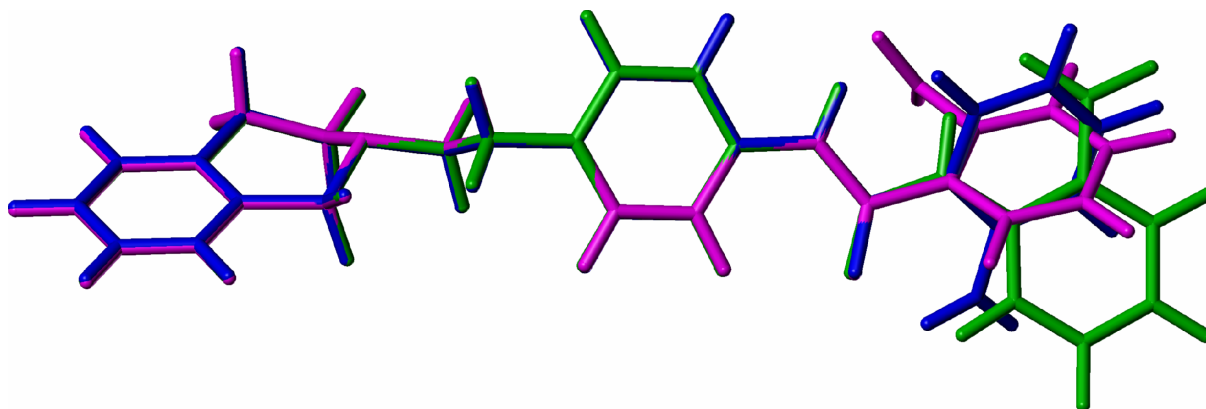


Abb. 4.45: Die Überlagerung der favorisierten Konformationen der Verbindungen WK-X-46 (grün), WK-X-15 (magenta) und WK-X-17 (blau) zeigt, dass WK-X-46 im Vergleich zu WK-X-15 und WK-X-17 bezüglich R^2 eine planare Konformation annimmt.

Bei den ortho-Aminoderivaten aus den Gruppen 1 und 2 ergibt sich ein umgekehrtes Bild. Betrachtet man die energetisch günstige Konformation der Verbindung WK-X-17 (blau, Abb. 4.45) zeigt sich, dass die ortho-Aminogruppe nach "unten" ausgerichtet ist. Stabilisiert wird diese planare Konformation durch eine

Wasserstoffbrücke zwischen dem Wasserstoffatom der Aminogruppe und dem Amidsauerstoffatom. Bei den Harnstoffderivaten ist die Ausbildung dieser Wasserstoffbrücke nicht möglich. Die energetisch günstigen, planaren Konformationen (WK-X-46, WK-X-74 mit Grundgerüst 1 und WK-X-17, WK-X-16 mit Grundgerüst 2) spiegeln sich in den pIC_{50} -Werten der Verbindungen wider und bestärken die Annahme, dass eine planare Ausrichtung der Phenylringe bei der Inhibition von BCRP favorisiert ist.

Die Anwesenheit von Methoxygruppen in Position 6 und 7 des Tetrahydroisochinolinringes wirkt sich geringfügig auf die Inhibierbarkeit von BCRP aus. In Übereinstimmung mit den 2D- und 3D-QSAR Analysen (Kapitel 4.4.3 und 4.4.4) besitzen WK-Verbindungen ohne Methoxygruppen eine höhere Aktivität an BCRP.

Der Modulator WK-X-78, der auf Grundgerüst 3 basiert, zählt zu den Verbindungen mit höherem Molekulargewicht und besitzt in Position R^2 einen zusätzlichen aromatischen Rest. Die Anwesenheit des 3,4-Dimethoxyphenylringes bewirkt eine Intensivierung der Interaktion von WK-X-78 ($pIC_{50} = 5,16 \pm 0,19$) mit BCRP im Vergleich zu dem Aminoanalogon WK-X-76 ($pIC_{50} = 4,23 \pm 0,10$) mit Grundgerüst 1. Wird jedoch der Harnstofflinker bei WK-X-78 durch einen Amidlinker, wie bei Verbindungen mit Grundgerüst 4, ersetzt, führt dies zu einer wesentlichen Erhöhung der biologischen Aktivität an BCRP. Bei einem Vergleich der pIC_{50} -Werte von WK-X-78 ($pIC_{50} = 5,16 \pm 0,19$) und WK-X-34 ($pIC_{50} = 6,07 \pm 0,06$) wird deutlich, dass die Anwesenheit des Amidlinkers am Ethylphenylrest eindeutig bevorzugt ist und die Interaktion mit BCRP um den Faktor 10 intensiviert. Der Austausch des 3,4-Dimethoxyphenylsubstituenten mit einem elektronenziehenden para-Nitrosubstituenten (WK-X-36: $pIC_{50} = 6,26 \pm 0,19$) bei Verbindungen mit Grundgerüst 4 führt zu keiner weiteren nennenswerten Steigerung des pIC_{50} -Wertes.

Unter den 16 untersuchten WK-Modulatoren wurde die Verbindung WK-X-92, die auf Grundgerüst 5 basiert, als der potenteste BCRP Inhibitor identifiziert ($pIC_{50} = 6,30 \pm 0,07$). Im Vergleich zu Verbindungen mit Grundgerüst 3 sind die beiden Linker vertauscht. Verbindungen mit Grundgerüst 5 zeichnen sich dadurch aus, dass sie, in Übereinstimmung mit Verbindungen aus den Gruppen 2 und 4, am Ethylphenylrest einen Amidlinker besitzen. Der zweite aromatische Substituent R^2 ist über eine Harnstoffpartialstruktur mit dem Grundgerüst verbunden.

Abb. 4.46 zeigt die energetisch optimierten Strukturen je eines Vertreters aus den Gruppen 3-5. Die Abbildung zeigt eindeutig, dass die in grün dargestellte Verbindung WK-X-78 eine andere Konformation einnimmt als WK-X-36 (magenta, Abb. 4.46) und WK-X-92 (blau, Abb. 4.46).

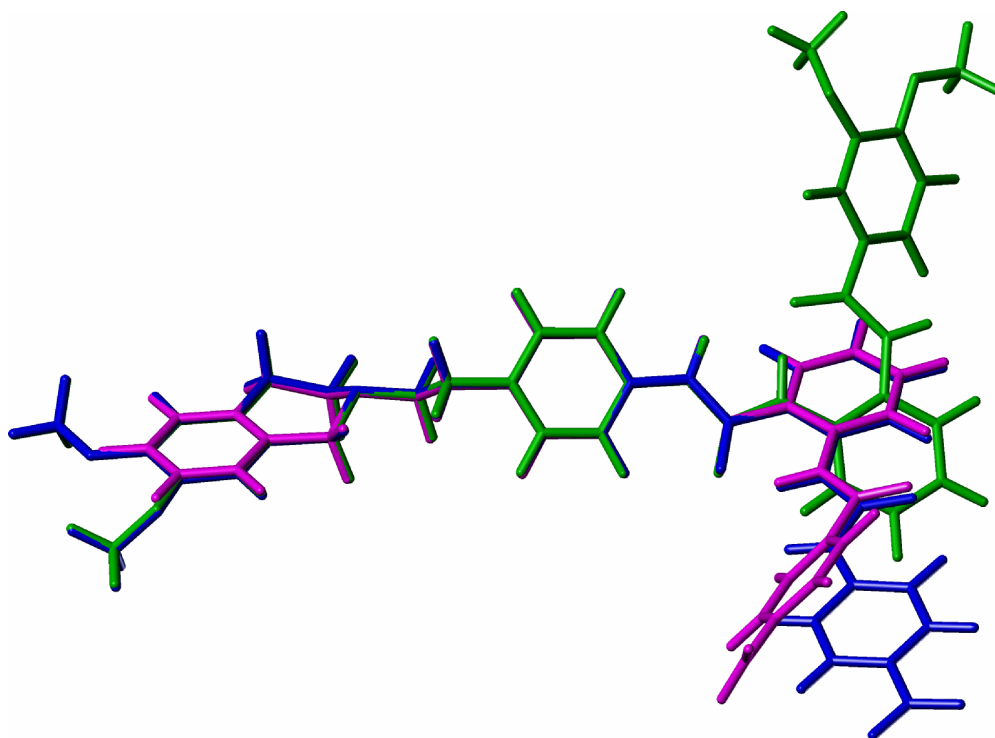


Abb. 4.46: Überlagerung dreier Verbindungen mit Grundgerüst 3-5. Die Anwesenheit des Harnstofflinkers bei Verbindung WK-X-78 (grün) bewirkt eine Orientierung des Substituenten R^2 , die stark von den Verbindungen WK-X-36 (magenta) und WK-X-92 (blau) abweicht.

Die Anwesenheit des Harnstofflinkers am Ethylphenylrest von WK-X-78 führt zu zwei bevorzugten Konformationen. Die Konformation mit der geringsten Energie ist in Abb. 4.46 wiedergegeben und ergibt sich durch Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen dem Wasserstoffatom der Harnstoffpartialstruktur und dem Sauerstoffatom des benachbarten Amidlinkers. Die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen dem Harnstoffsauerstoffatom und dem Amidwasserstoffatom wäre ebenso möglich (der 3,4-Dimethoxyphenylrest in Abb. 4.46 würde nach "unten" zeigen), ist jedoch um 2 kcal/mol disfavorisiert. Bei beiden Konformationen ist R^2 in eine Richtung orientiert, die stark von den energetisch günstigen Konformationen von WK-X-36 und WK-X-92 abweicht. Die Orientierung des Substituenten R^2 bei WK-X-78, verursacht durch die

Anwesenheit des Harnstofflinkers am Ethylphenylrest, scheint einen negativen Einfluss auf die inhibitorische Wirksamkeit der Verbindung auszuüben.

Eine typische Konzentrations-Effektkurve von WK-X-92 ist in Abb. 4.47 illustriert (gefüllte Kreise). In der Abbildung sind zusätzlich die sigmoidalen Kurvenverläufe des bislang potentesten BCRP spezifischen Inhibitors Ko143 (nicht gefüllte Kreise), des weniger aktiven spezifischen Modulators Novobiocin (gefüllte Dreiecke) und des Breitspektrummodulators XR9576 (gefüllte Vierecke) skizziert.

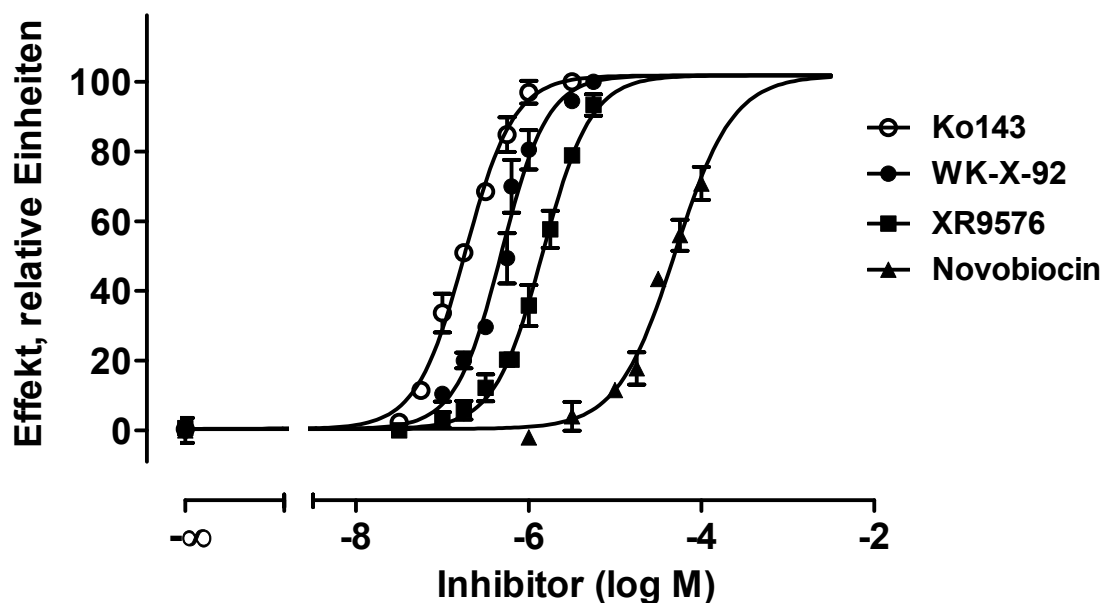


Abb. 4.47: Vergleich der Aktivitätswerte von Ko143, XR9576, Novobiocin und WK-X-92, die mittels Pheophorbid A-Assay an MDCK BCRP Zellen bestimmt wurden. pIC_{50} (Ko143) = $6,74 \pm 0,03$ (nicht gefüllte Kreise), pIC_{50} (WK-X-92) = $6,31 \pm 0,03$ (gefüllte Kreise), pIC_{50} (XR9576) = $5,84 \pm 0,03$ (gefüllte Vierecke), pIC_{50} (Novobiocin) = $4,30 \pm 0,03$ (gefüllte Dreiecke). Beispiel für ein typisches Experiment aus einer Serie von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Aufgrund der hohen biologischen Aktivität von WK-X-92 an BCRP kann dieser Modulator als viel versprechende Leitstruktur für die Synthese neuer und potenter BCRP Inhibitoren dienen. Die kleine Gruppe der bisher bekannten hoch aktiven BCRP Inhibitoren kann um eine neue Strukturklasse erweitert werden.

4.8 Funktionelle Untersuchung von WK-Verbindungen mit Hydroxyphenylamid-Partialstruktur

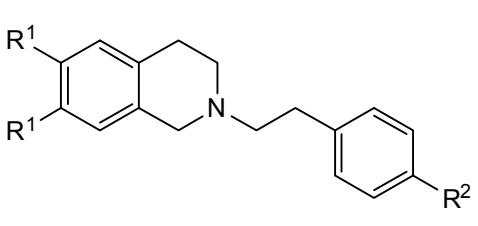
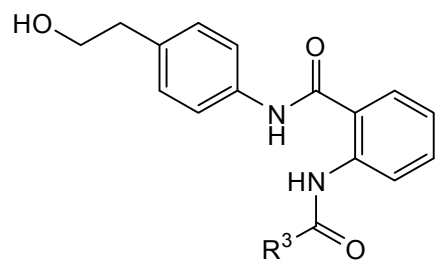
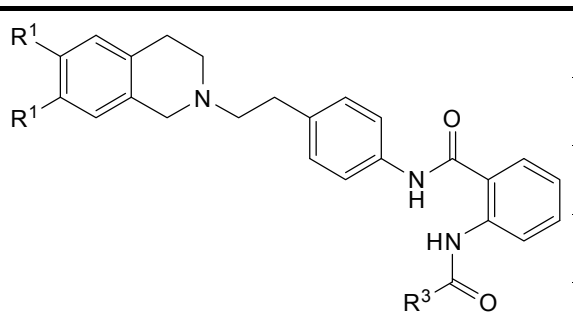
Bevor weitere WK-Verbindungen analysiert wurden, sind zunächst in Zusammenarbeit mit Dr. H. Müller ausgewählte Flavonoide bezüglich ihrer Hemmwirkung an BCRP untersucht worden.¹⁴⁷ Nach Ahmed-Belkacem et al. sind die Affinitäten einiger natürlich vorkommender Flavonoide und deren Derivate (z.B. 6-Prenylchrysin, Tectochysin) zu BCRP wesentlich höher als zu P-gp oder MRP1. Daher können Flavonoide als relativ spezifische BCRP Inhibitoren angesehen werden.¹²⁹

Die Tatsache, dass Flavonoide teilweise hoch affine Verbindungen an BCRP darstellen und verhältnismäßig geringe Molekulargewichte aufweisen, sowie keine basischen Eigenschaften besitzen, führte dazu, den Fokus bei der pharmakologischen Charakterisierung mehr auf insgesamt "kleinere" und teilweise nicht-basische Verbindungen zu richten. Deshalb wurden aus der von W. Klinkhammer erstellten Substanzbibliothek, die strukturverwandte Verbindungen zu Tariquidar enthält, in besonderem Maße Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht für die funktionelle Untersuchung an BCRP ausgewählt.

4.8.1 Struktureller Aufbau der Verbindungen

Die ausgewählten Modulatoren basieren auf den in Tabelle 4.15 wiedergegebenen Grundgerüsten 1, 2 und 3. Zusätzlich sind alle strukturellen Parameter aufgeführt. Grundgerüst 1 besteht aus einer Tetrahydroisochinolinethylphenyl-Teilstruktur. Verbindungen mit Grundgerüst 2 stellen Anthranilsäurederivate mit zwei Amidfunktionen dar. Das Stickstoffatom des ersten Amids ist mit einem Hydroxyethylphenylrest verbunden, der zweite Amidstickstoff ist mit unterschiedlichen aromatischen Resten (R^3) substituiert. Neben diesen Verbindungen sind auch die analogen, eher als hochmolekular zu bezeichnenden Substanzen (Grundgerüst 3) in Tabelle 4.15 eingebunden. Grundgerüst 3 kombiniert die strukturellen Parameter aus den Grundgerüsten 1 und 2 und repräsentiert die Grundstruktur der klassischen "großen" XR-Analoga, die in dieser Arbeit bereits eingehend untersucht wurden.

Tabelle 4.15: Strukturen der untersuchten Verbindungen. Substanzen mit Grundgerüst 1 und 2 stellen Verbindungen mit geringem Molekulargewicht dar. Grundgerüst 3 basiert auf den Analoga mit hohem Molekulargewicht.

Grundgerüst 1	Verbindung	R ¹	R ²
	WK-X-10	OCH ₃	Nitro
	WK-X-11	H	Nitro
	WK-X-12	OCH ₃	Amino
	WK-X-13	H	Amino
Grundgerüst 2	Verbindung	R ³	
	WK-X-7	Phenyl	
	WK-X-8	3-Chinolylyl	
	WK-X-9	2-Nitrophenyl	
	WK-X-20	2-Aminophenyl	
	WK-X-27	4-Nitrophenyl	
	WK-X-28	4-Methylphenyl	
Grundgerüst 3	Verbindung	R ¹	R ³
	WK-X-19	H	Phenyl
	WK-X-23	H	2-Nitrophenyl
	WK-X-25	H	4-Methylphenyl
	WK-X-36	H	4-Nitrophenyl
	XR9577	H	3-Chinolylyl

Ein wichtiges Ziel der funktionellen Untersuchung dieser Verbindungen bestand darin herauszufinden, ob möglicherweise auch niedermolekulare, nicht-basische Tariquidar-Analoga (in Analogie zu Flavonoiden) zu einer deutlichen Inhibition von BCRP führen. Ein zentrales Motiv war es ferner wesentliche Struktur-Wirkungsbeziehungen ableiten zu können.

4.8.2 Biologische Aktivität an BCRP, P-gp und MRP1

Tabelle 4.16 enthält die biologischen Aktivitätswerte der 15 untersuchten Verbindungen, die mittels des Hoechst 33342-Assays (Endkonzentration 1 $\mu\text{mol/l}$, Auswertung über one phase exp. Association) und des Pheophorbid A-Assays an BCRP bestimmt wurden. Für die Untersuchung an BCRP diente die mit ABCG2 stabil transfizierte Zelllinie MDCK BCRP.

Tabelle 4.16: Biologische Aktivitätswerte und Standardabweichungen der 15 untersuchten Verbindungen (zu den strukturellen Parametern s. Tabelle 4.15); $n \geq 3$. k.E.*: kein Effekt bis 100 $\mu\text{mol/l}$; k.E.: kein Effekt bis 10 $\mu\text{mol/l}$.**

Verbindung	BCRP		P-gp	MRP1
	MDCK BCRP pIC ₅₀ \pm SD Hoechst	MDCK BCRP pIC ₅₀ \pm SD Pheophorbid A	MDCK MDR1 pIC ₅₀ \pm SD Calcein-AM	2008 MRP1 pIC ₅₀ \pm SD Calcein-AM
WK-X-10	k.E.*	k.E.*	4,75 \pm 0,01	k.E.*
WK-X-11	k.E.*	k.E.*	4,15 \pm 0,04	k.E.*
WK-X-12	k.E.*	k.E.*	3,64 \pm 0,08	k.E.*
WK-X-13	k.E.*	k.E.*	3,15 \pm 0,04	k.E.*
WK-X-7	5,10 \pm 0,07	5,59 \pm 0,14	k.E.**	k.E.**
WK-X-8	5,71 \pm 0,07	6,06 \pm 0,17	k.E.**	k.E.**
WK-X-9	4,85 \pm 0,11	5,32 \pm 0,13	k.E.**	k.E.**
WK-X-20	4,92 \pm 0,04	5,26 \pm 0,11	k.E.**	k.E.**
WK-X-27	5,86 \pm 0,08	6,23 \pm 0,17	k.E.**	k.E.**
WK-X-28	5,46 \pm 0,05	5,98 \pm 0,16	k.E.**	k.E.**
WK-X-19	4,89 \pm 0,09	5,37 \pm 0,15	5,14 \pm 0,06	4,59 \pm 0,12
WK-X-23	5,19 \pm 0,02	5,61 \pm 0,09	5,10 \pm 0,01	4,59 \pm 0,16
WK-X-25	5,26 \pm 0,05	5,69 \pm 0,18	5,16 \pm 0,16	4,47 \pm 0,10
WK-X-36	5,90 \pm 0,08	6,20 \pm 0,19	5,44 \pm 0,18	4,68 \pm 0,18
XR9577	6,16 \pm 0,08	6,43 \pm 0,18	6,48 \pm 0,09	5,01 \pm 0,10

Substanzen mit Grundgerüst 1 zeigen keine Hemmwirkung an BCRP. Verbindungen, die auf Grundgerüst 2 und 3 beruhen, konnten als BCRP Inhibitoren identifiziert werden, wobei WK-X-8, WK-X-27, WK-X-28, WK-X-36 und XR9577 die höchste Aktivität aufweisen. Interessanterweise zeigen die sechs Verbindungen mit

Grundgerüst 2 keine Affinität zu P-gp oder MRP1 (Tabelle 4.16) und können daher als BCRP spezifische Inhibitoren bezeichnet werden. Betrachtet man die pIC_{50} -Werte dieser sechs spezifischen Modulatoren (MDCK BCRP Zellen, Pheophorbid A-Assay), können folgende Struktur-Wirkungsbeziehungen aufgestellt werden: befindet sich ein elektronenziehender para-Nitrophenylsubstituent in Position R^3 wird die höchste Aktivität erreicht (pIC_{50} (WK-X-27) = $6,23 \pm 0,17$). Die Einführung eines elektronenschiebenden Methylsubstituenten in dieser Position führt zu einer nur geringen Abnahme des pIC_{50} -Wertes (pIC_{50} (WK-X-28) = $5,98 \pm 0,16$) und lässt vermuten, dass elektrostatische oder sterische Effekte einen nur geringen Einfluss auf die Inhibierbarkeit von BCRP ausüben. Die Position der elektronenziehenden Gruppe scheint einen entscheidenden Einfluss auf die biologische Aktivität zu haben. Das ortho-Nitroderivat WK-X-9 (pIC_{50} = $5,32 \pm 0,13$) zeigt im Vergleich zum para-Nitrosubstituierten Derivat WK-X-27 (pIC_{50} = $6,23 \pm 0,17$) eine deutlich geringere Aktivität an BCRP. Die Reduktion der ortho-Nitro- zur ortho-Aminogruppe wirkt sich kaum auf die Inhibierbarkeit aus (pIC_{50} (WK-X-20) = $5,26 \pm 0,11$). Betrachtet man die am Phenylring unsubstituierte Verbindung WK-X-7 fällt auf, dass die Elimination der ortho-Nitro- bzw. ortho-Aminogruppe kaum Einfluss auf die inhibitorische Wirksamkeit ausübt (pIC_{50} (WK-X-7) = $5,59 \pm 0,14$). Die Anwesenheit eines 3-Chinolylysubstituenten (R^3) führt wiederum zu einer ausgeprägten Inhibition von BCRP (pIC_{50} (WK-X-8) = $6,06 \pm 0,17$).

Vergleicht man die pIC_{50} -Werte der Verbindungen mit Grundgerüst 2 mit den korrespondierenden großen Analoga (Grundgerüst 3) wird deutlich, dass die drei Strukturmerkmale 3-Chinolylyl, para-Methyl und para-Nitro (R^3) in beiden Gruppen signifikant zur biologischen Aktivität beitragen. Interessanterweise hat demnach die Zugehörigkeit zu einer der beiden Gruppen keinen Einfluss auf die Aktivität. Es kann angenommen werden, dass die Tetrahydroisochinolin-Partialstruktur keinen Einfluss auf die Interaktion mit BCRP hat.

Abb. 4.48 zeigt die Konzentrations-Effektcurven von WK-X-27 im Vergleich mit den beiden spezifischen Inhibitoren Ko143 und Novobiocin. WK-X-27 besitzt eine nahezu vergleichbare inhibitorische Wirksamkeit wie der potente Modulator Ko143 und kann als der vielversprechendste BCRP Modulator aus dieser Serie klassifiziert werden. Außerdem zeigt WK-X-27 eine um annähernd zwei log-Einheiten höhere Aktivität als Novobiocin.

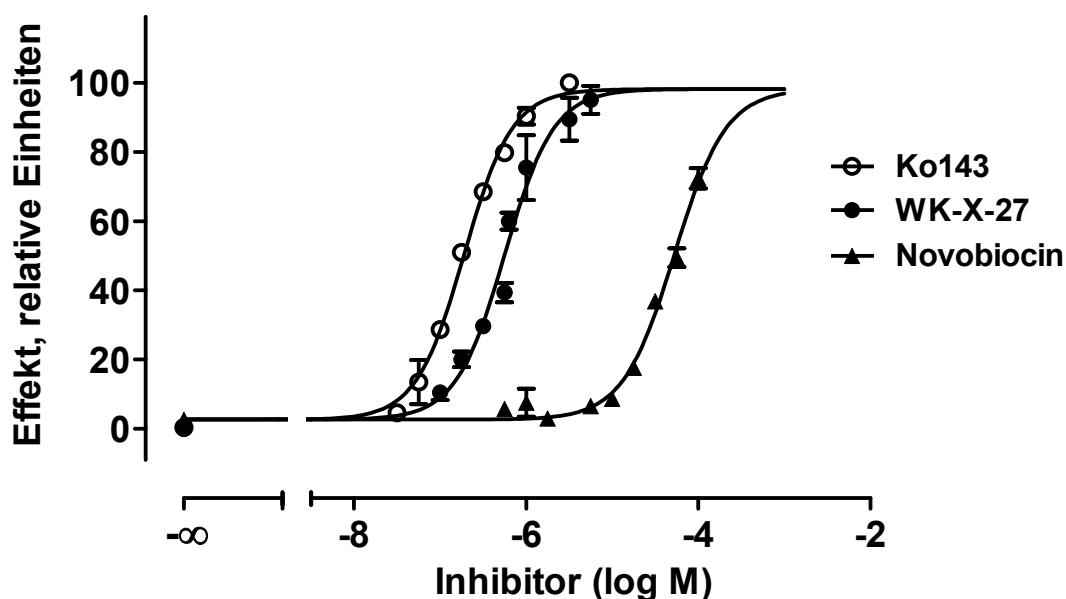


Abb. 4.48: Vergleich der Hemmwirkung von WK-X-27 mit Ko143 und Novobiocin bestimmt mittels Pheophorbid A-Assay an MDCK BCRP Zellen. pIC_{50} (Ko143) = $6,71 \pm 0,03$ (nicht gefüllte Kreise), pIC_{50} (WK-X-27) = $6,25 \pm 0,03$ (gefüllte Kreise), pIC_{50} (Novobiocin) = $4,27 \pm 0,03$ (gefüllte Dreiecke). Dargestellt ist ein typisches Experiment aus einer Serie von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Ein BCRP Inhibitor ist spezifisch, wenn er keine Affinität zu den ABC-Transportern P-gp und MRP1 aufweist.¹²⁹ Deshalb wurden die biologischen Aktivitäten aller 15 Verbindungen auch an P-gp und MRP1 untersucht. Für die funktionelle Untersuchung von MRP1 diente der etablierte Calcein AM-Assay und die mit MRP1 stabil transfizierte 2008 MRP1 Zelllinie. Die Ergebnisse in Tabelle 4.16 zeigen, dass Verbindungen mit Grundgerüst 3 eine schwache Affinität zu MRP1 aufweisen. Mit Ausnahme von XR9577 besitzen alle Modulatoren eine geringere Wirksamkeit als der Standardmodulator Indometacin ($pIC_{50} = 4.87 \pm 0.18$). Alle Verbindungen, die auf Grundgerüst 1 und 2 basieren, interagieren nicht mit MRP1. Für die funktionelle Untersuchung von P-gp diente ebenfalls der Calcein AM-Assay und P-gp transfizierte MDCK MDR1 Zellen. Verbindungen mit Grundgerüst 1 und 3 interagieren mit P-gp (s. Tabelle 4.16). Da Verbindungen mit Grundgerüst 3 strukturell eng mit Tariquidar verwandt sind, verwundert es nicht, dass diese Modulatoren eine hohe Hemmwirkung gegenüber P-gp besitzen. Auch hier zeigten die sechs Vertreter aus Gruppe 2 keine Interaktion mit P-gp.

Ursache der BCRP-Spezifität ist das Fehlen der basischen Tetrahydroisochinolin-Partialstruktur bei Verbindungen mit Grundgerüst 2. Wird die Hydroxygruppe der spezifischen Inhibitoren durch diese Teilstruktur ersetzt, resultiert eine zusätzliche Interaktion mit P-gp. Vermutlich ist die Anwesenheit eines protonierbaren Stickstoffes essentiell für eine Interaktion mit P-gp. Dies wird auch deutlich, wenn man die Verbindungen mit Grundgerüst 1 betrachtet, die eine, wenn auch schwache, Affinität zu P-gp aufweisen. Verbindungen mit Grundgerüst 3 zeigen an BCRP eine vergleichbare Aktivität wie Verbindungen mit Grundgerüst 2. Daher kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Tetrahydroisochinolin-Partialstruktur nicht an der Interaktion mit BCRP beteiligt ist.

Auch die Arbeitsgruppe von Kühnle et al. veröffentlichte 2009 eine Studie, in der Tariquidar-Analoga hinsichtlich Ihrer Interaktion mit den ABC-Transportern BCRP, P-gp und MRP1 untersucht wurden.²¹⁹ Ausgehend von Tariquidar wurden von Kühnle et al. Verbindungen mit geringfügigen strukturellen Veränderungen am Benzamidkern synthetisiert. Diese Veränderungen im Substitutionsmuster führten zu einem drastischen Shift der Breitspektrummodulatoren hin zu ABCG2 spezifischen Inhibitoren. Dabei war die Selektivität für BCRP 100-500fach höher als für P-gp, an MRP1 zeigten die Verbindungen keine Aktivität. Die strukturellen Veränderungen erfolgten an zwei Positionen im Molekül: (i) Shift des 3-Chinolyrcarbonsäureamidrestes von ortho nach meta und Variation des Heteroaromaten (vgl. Abb. 4.16), (ii) Austausch der beiden Methoxygruppen in Position 3 und 4 gegen Ester-, Methoxy- oder Methylgruppen. Ausgehend davon wurden zwei Serien synthetisiert, bei denen entweder die eine oder die andere Position im Molekül variierte. Die höchste biologische Aktivität an BCRP wurde bei Verbindung **6** mit einem 2-Chinolyrcarbonsäureamidrest in meta-Position und einem 4-Methylester ($IC_{50} = 60 \text{ nmol/l} \pm 10$) und bei Verbindung **5** mit einem 3-Chinolyrcarbonsäureamidrest in meta-Position und einem 4-Methylester ($IC_{50} = 119 \text{ nmol/l} \pm 22$) gefunden. Auch hier diente als Vergleichsubstanz der BCRP spezifische Modulator Ko143, dessen IC_{50} mit $225 \text{ nmol/l} \pm 33$ angegeben wird. Somit ist Verbindung **6** um ein vierfaches potenter als Ko143. Interessanterweise war keine der von Kühnle et al. untersuchten Verbindungen in der Lage BCRP zu 100% zu hemmen. Eine 100%ige Hemmung wurde nur von Fumitremorgin C in einer finalen Konzentration von $10 \text{ } \mu\text{mol/l}$ erreicht. Die potente Verbindung **6** erreicht diesen Wert jedoch nur zu 56% (Verbindung **5** sogar nur zu 41%) und muss daher als

Partialinhibitor eingestuft werden. Im Gegensatz zu einem Vollinhibitor zeichnet sich ein Partialinhibitor dadurch aus, dass trotz steigender Konzentrationen der Maximaleffekt nicht erreicht wird. Hierbei muss jedoch differenziert werden, ob es sich tatsächlich um einen "echten" Partialinhibitor handelt, oder ob der Topwert der Konzentrations-Effektkurve bzw. der Maximaleffekt nur aufgrund von Löslichkeitsproblemen der entsprechenden Verbindung zustande kommt. Eine geringe Löslichkeit kann dazu führen, dass die Verbindung während der Versuchsdurchführung ausfällt und es dadurch zu einem vorzeitigen Abflachen der sigmoidalen Konzentrations-Effektkurve kommt. Dies hat zur Folge, dass bei scheinbar erreichtem Maximaleffekt der pIC_{50} -Wert der Verbindung zu hoch eingestuft wird. In diesem Fall muss der Topwert über eine Standardverbindung (z.B. Ko143), die im gleichen Experiment vermessen wird, fixiert werden. In der Arbeit von Kühnle et al. wird angegeben, dass die synthetisierten Inhibitoren eine geringe Löslichkeit aufweisen. Fixiert man den Topwert von Verbindung **6** auf den von Ko143, resultiert ein IC_{50} -Wert von nunmehr 216 nmol/l, bei Verbindung **5** steigt der IC_{50} sogar auf 1,44 μ mol/l. Die von Kühnle et al. angegebenen hohen Aktivitätswerte relativieren sich dadurch. Trotzdem handelt es sich bei den von Kühnle et al. entwickelten Substanzen um potente und spezifische BCRP Inhibitoren, die einen hohen Stellenwert in dieser Gruppe von Verbindungen einnehmen.

4.8.3 Bestimmung der Zelltoxizität mittels ATP-Assay

Alle in Tabelle 4.16 aufgeführten Modulatoren wurden auf ihre potentielle Zelltoxizität untersucht. Dazu wurde der in Kapitel 3.11 beschriebene ATP-Assay und die beiden sensitiven Zelllinien A2780 und MCF-7 verwendet. Das Balkendiagramm in Abb. 4.49 zeigt, dass die spezifischen Inhibitoren keinen Einfluss auf die Zellvitalität ausüben. Nach einer Inkubationsphase der Substanzen (Endkonzentration 10 μ mol/l) von 72 h ist die Toxizität der Verbindungen vergleichbar mit der in KHP aufgenommenen Kontrolle. Im Vergleich dazu führt die auf Grundgerüst 3 basierende Verbindung XR9577 zu einer starken Abnahme der Zellvitalität. Die geringe Toxizität der spezifischen BCRP Modulatoren stellt eine wichtige und essentielle Voraussetzung für die weitere detaillierte Untersuchung wie z.B. *in vivo* Studien dieser Substanzklasse dar. 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, weckt die Gesamtlage wenig Hoffnung. Viel versprechende Verbindungen, wie die beiden Modulatoren XR9576 oder GF120918, die in präklinischen Studien als potente und nicht toxische Inhibitoren identifiziert wurden, erfüllten die Erwartungen in späteren Phase III Studien nicht (vgl. Kapitel 1.3.2). Die Studien mussten entweder aufgrund der auftretenden Toxizität der Verbindungen oder aufgrund eines schlechten Nutzen-Risiko-Verhältnisses im Vergleich zur Kontrollgruppe abgebrochen werden.^{25,220} Gerade diese Tatsache macht die Suche nach nicht-toxischen Modulatoren mit minimalen pharmakokinetischen Interaktionen umso dringlicher.

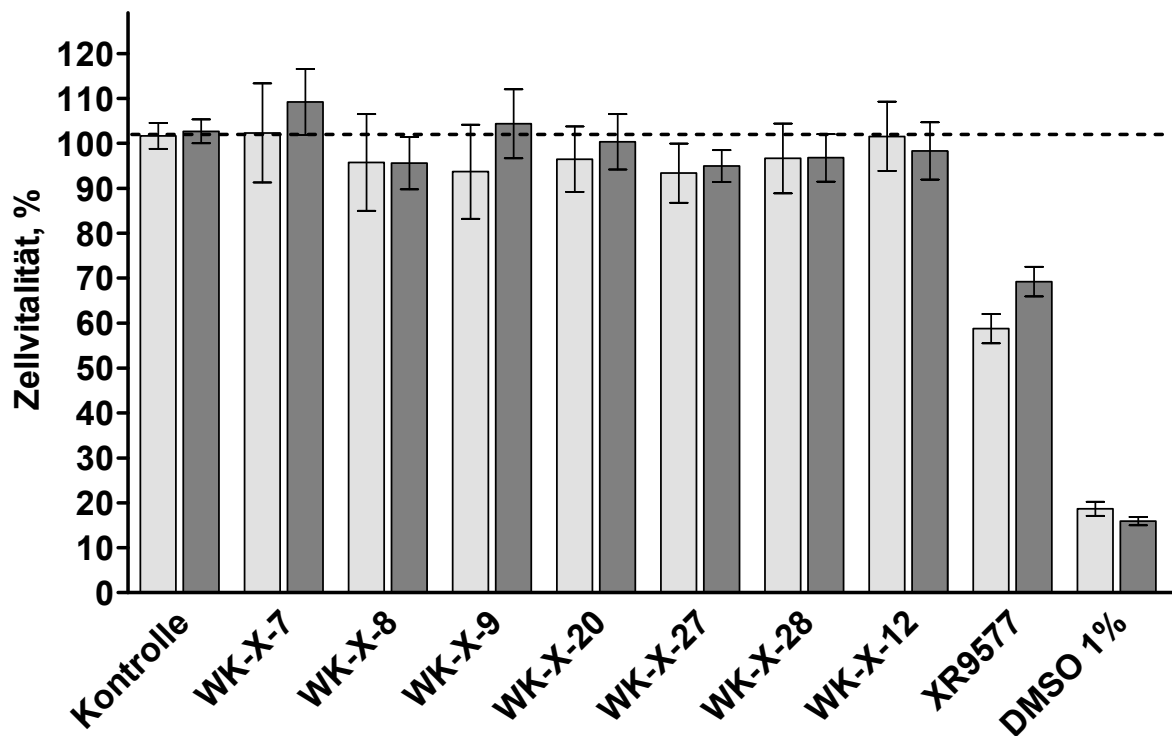


Abb. 4.49: Balkendiagramm der potentiellen Toxizität von den sechs spezifischen Inhibitoren, WK-X-12 und XR9577, die mittels ATP-Assay in sensitiven A2780 (hellgrau) und MCF-7 (dunkelgrau) Zellen bestimmt wurde (Endkonzentration 10 $\mu\text{mol/l}$). Der Zusatz von 1% DMSO führt zu einer signifikanten Abnahme der Zellvitalität. Dargestellt ist ein typisches Experiment aus einer Serie von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Im Zuge dieser Arbeit konnte eine neue Klasse spezifischer BCRP Inhibitoren identifiziert werden. Die Klasse spezifischer BCRP Inhibitoren, die bislang nur aus

Fumitremorgin C, Ko143 und seinen Derivaten, Novobiocin und die von Kühnle et al. synthetisierten Tariquidar-Analoga bestand, muss daher um diese Gruppe erweitert werden. Hierbei handelt es sich um ein besonders interessantes und viel versprechendes Ergebnis. Die Resultate dieser Arbeit liefern essentielle Ideen für die zielgerichtete Synthese weiterer strukturell ähnlicher spezifischer BCRP Inhibitoren.

4.9 Charakterisierung des Bindungsverhaltens ausgewählter WK-X-Modulatoren mit BCRP

Die Tatsache, dass der Tetrahydroisochinolinrest der WK-X-Verbindungen scheinbar nicht an der Interaktion mit BCRP beteiligt ist, lieferte den Ausgangspunkt dazu, den Interaktionstyp ausgewählter WK-X-Verbindungen mit den beiden Substraten Hoechst 33342 und Pheophorbid A festzustellen, um so einen tieferen Einblick in das Bindungsverhalten dieser Substanzen mit BCRP zu erlangen. Eine Differenzierung verschiedener Interaktionsarten mit BCRP ist nur möglich, wenn die Messungen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen durchgeführt 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.

4.9.1 Theoretischer Hintergrund

Die Michaelis-Menten-Theorie (nach Leonor Michaelis und Maud Menten 1913), die die Grundlage der Enzymkinetik bildet, beschreibt in einem mathematischen Modell näherungsweise die Kinetik von Enzymen (beispielsweise auch die von ABC-Transportern wie BCRP). Sie gilt für enzymatisch katalysierte Reaktionen mit folgendem generellen Mechanismus: Das Enzym bindet zuerst reversibel an sein Substrat und bildet einen Enzym-Substrat-Komplex. Das Substrat wird anschließend umgewandelt und der Komplex zerfällt in das freie Enzym und das Reaktionsprodukt. Die Michaelis-Menten-Theorie erlaubt eine quantitative Beschreibung der anfänglichen Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der vorhandenen Substratkonzentration sowie weiterer Parameter. Die Kinetik enzymatischer Reaktionen zeigt das Phänomen der Sättigung: bei sehr hohen Substratkonzentrationen kann die Umsatzgeschwindigkeit v nicht weiter gesteigert werden, d.h. es wird ein Wert v_{max} erreicht. Die Sättigungsfunktion eines "Michaelis-Menten Enzyms" lässt sich unter Verwendung der Parameter K_m und v_{max} wie folgt formulieren:

Gleichung 4.4:

$$v_0 = \frac{v_{\max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

Die Gleichung beschreibt eine Hyperbel und ist schematisch in Abb. 4.50 wiedergegeben. v_0 gibt hierbei die initiale Reaktionsgeschwindigkeit bei einer bestimmten Substratkonzentration $[S]$ an. v_{\max} ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit. Eine Kenngröße für eine enzymatische Reaktion ist die Michaeliskonstante K_m . Der K_m -Wert gibt die Substratkonzentration an, bei der die Umsatzgeschwindigkeit halbmaximal ist ($v = v_{\max}/2$), die also bei Halbsättigung des Enzyms vorliegt.

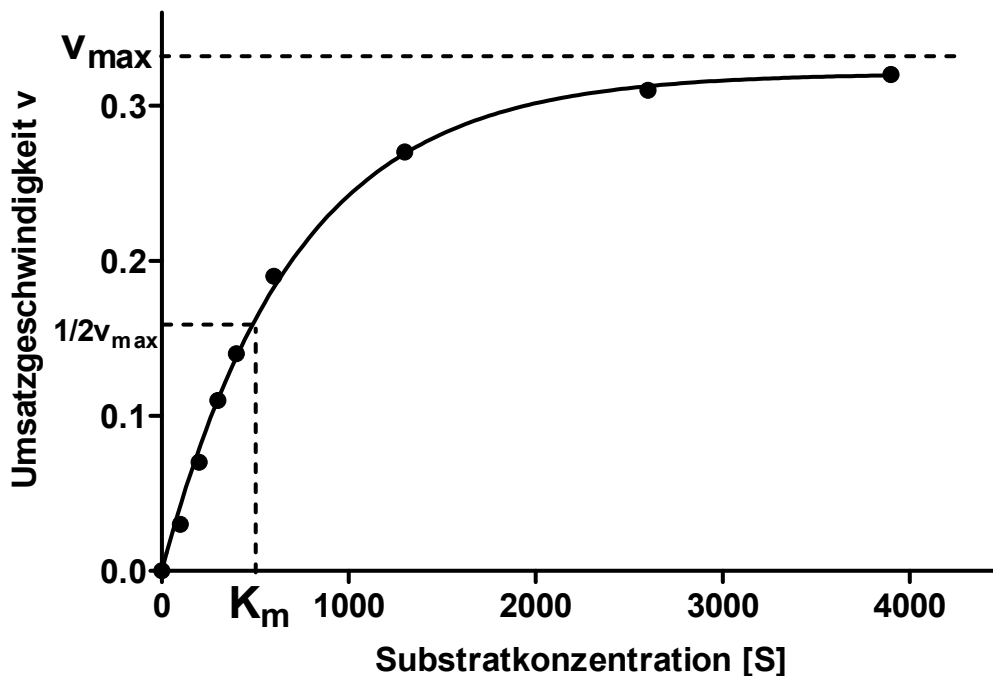


Abb. 4.50: Schematische Darstellung der Sättigungshyperbel eines Michaelis-Menten Enzyms.²²¹

Da die Sättigung asymptotisch angenähert wird, sind hierzu Substratkonzentrationen erforderlich, die mehr als dem zehnfachen K_m -Wert entsprechen. Im Umkehrschluss gilt: Hat man für ein Enzym eine Sättigungshyperbel gemessen, d.h. die Umsatzgeschwindigkeit v als Funktion der Substratkonzentration $[S]$ bestimmt, so lassen sich daraus v_{\max} (die Aktivität) und K_m (die reziproke Affinität) ableiten.

Linearisierungsverfahren eignen sich für die schnelle grafische Bestimmung der wichtigen Kinetikparameter K_m und v_{max} . Das Linearisierungsverfahren nach Lineweaver-Burk beschreibt eine doppelt reziproke Darstellung, bei der $1/v$ als Funktion von $1/[S]$ aufgetragen wird. Aus der Michaelis-Menten-Gleichung (vgl. Gleichung 4.4) wird durch Umformung

Gleichung 4.5:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{v_{max} \times [S]} = \frac{K_m}{v_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}}$$

Der Graph schneidet die x-Achse bei $-1/K_m$, und die y-Achse bei $1/v_{max}$, was direkt von der graphischen Auftragung abgelesen werden kann.

Inhibitoren ändern die Eigenschaften von Enzymen und hemmen die enzymatische Reaktion. Aus enzymkinetischer Sicht sind drei verschiedene Interaktionsformen zwischen Substrat und Inhibitor möglich: (i) kompetitiv, (ii) nicht-kompetitiv, (iii) unkompetitiv bzw. Inhibitoren von Mischtyp.^{222,223} Im Folgenden sollen die unterschiedlichen Interaktionsformen kurz vorgestellt werden.

Bei der **Kompetition** konkurriert ein Modulator direkt mit einem Substrat um dieselbe Bindungsstelle. Das Enzym E kann das Substrat S und den Inhibitor I nicht gleichzeitig binden. Bei der kompetitiven Hemmung kann der Inhibitor jedoch durch das Substrat aus dem Enzym verdrängt werden, v_{max} ändert sich also nicht. Allerdings wird für jede gewünschte Geschwindigkeit eine höhere Substratkonzentration $[S]$ benötigt, der scheinbare K_m -Wert wird also mit steigender Inhibitorkonzentration $[I]$ höher. Im Lineweaver-Burk-Diagramm führt dies zu einer Schar von Geraden, die einen gemeinsamen Schnittpunkt auf der y-Achse ($1/v_{max}$) haben. Die Schnittpunkte auf der Abzisse spiegeln den Wert $-1/K_m$ wider.

Bei der **nicht-kompetitiven Hemmung** binden Substrat S und Inhibitor I an unterschiedliche Stellen am Enzym E. Durch Bindung des Inhibitors an das Enzym wird die Substratbindung nicht beeinflusst. Der Inhibitor I ist somit in der Lage sowohl an das freie Enzym E als auch an den Enzym-Substrat-Komplex ES zu binden. Das Substrat kann mit dem Enzym-Inhibitor-Komplex EI ebenfalls eine Reaktion eingehen, jedoch ist der gebildete Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex ESI nicht in der Lage das Produkt P zu bilden. Die nicht-kompetitive Hemmung führt im Lineweaver-Burk-Diagramm zu einer Schar von Geraden, die sich für unterschiedliche

Inhibitorkonzentrationen in genau einem Punkt auf der Abzisse ($-1/K_m$) schneiden, d.h. der K_m -Wert für das Substrat bleibt unverändert. Der Ordinatenschnittpunkt jeder Gerade liegt bei $1/v_{max}$, d.h. dass die Anwesenheit des nicht-kompetitiven Inhibitors die Maximalgeschwindigkeit v_{max} um den Faktor $1/I$ verringert.

Die **unkompetitive Hemmung** zeichnet sich dadurch aus, dass der Inhibitor I nicht an das freie Enzym E bindet, sondern nur an den Enzym-Substrat-Komplex ES. Höhere Konzentrationen des Substrates S können daher den Hemmstoff nicht vom Enzym E verdrängen, sondern führen zu vermehrter Bindung. Umgekehrt vermindert die Bindung des Hemmstoffes die Konzentration von ES, nach dem Prinzip von Le Chatelier muss sich also zusätzliches ES aus Enzym und Substrat bilden: Der scheinbare K_m -Wert vermindert sich, die Affinität des Enzymes für das Substrat wird mit steigender Inhibitorkonzentration größer. Gleichzeitig nimmt v_{max} ab. Im Lineweaver-Burk-Diagramm findet sich eine Schar paralleler Geraden.

4.9.2 Enzymkinetischer Auswertungsansatz zur Bestimmung des Interaktionstyps im Hoechst 33342- und im Pheophorbid A-Assay

Um den Interaktionstyp der Verbindungen mit den beiden Substraten Hoechst 33342 und Pheophorbid A feststellen zu können, wurden Experimente bei unterschiedlichen Konzentrationen der Substrate durchgeführt und die erhaltenen Daten enzymkinetisch mittels Lineweaver-Burk Linearisierungsverfahren ausgewertet.

Die Vorgehensweise soll am Beispiel des Hoechst 33342-Assays und der Verbindung WK-X-27 in MDCK BCRP Zellen kurz erläutert werden. Zunächst wurden Konzentrations-Effektcurven des Modulators bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen aufgenommen. Die Auswertung erfolgte über das Modell einer einphasig exponentiellen Assoziation. Die Bottom- und Top-Werte der generierten Konzentrations-Effektcurven wurden für jede Substratkonzentration bestimmt und gegeneinander geplottet. Die resultierenden Geraden sind in Abb. 4.51 wiedergegeben. Nach Abzug der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz der Mikrotiterplatte (vgl. Kapitel 4.2.2) verlaufen beide Geraden durch den Ursprung des Graphen.

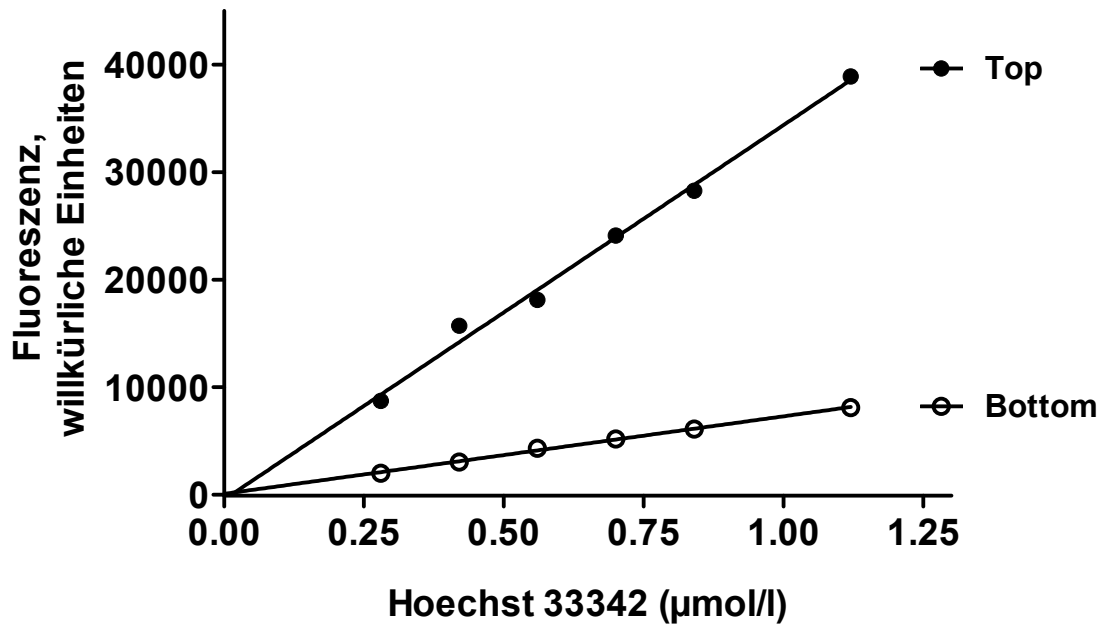


Abb. 4.51: Bottom- und Topwerte von WK-X-27 bei unterschiedlichen Hoechst 33342 Konzentrationen. Nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz schneiden sich die Geraden im Ursprung des Graphen.

Nach linearer Regression wurden mit Hilfe der Geradengleichung die optimalen Bottom- und Topwerte berechnet. Für eine enzymkinetische Auswertung müssen die gemessenen Fluoreszenzwerte so transformiert werden, dass sie zur Transportgeschwindigkeit proportional sind. Dies erreicht man, indem man die Fluoreszenzwerte in folgende Formel einsetzt:

Gleichung 4.6:

$$v = k_{\text{BCRP}} = \text{Top} - \text{Fluoreszenzwert}$$

In Abb. 4.52 sind verschiedene Konzentrations-Effektkurven von WK-X-27 zu erkennen, die bei verschiedenen Substratkonzentrationen aufgenommen wurden. Die Fluoreszenzwerte wurden in die obere Gleichung eingesetzt, die einzelnen k_{BCRP} -Werte bzw. Effluxgeschwindigkeiten bestimmt und gegen die logarithmische Konzentration des Modulators aufgetragen. Die BCRP Aktivität oder relative Effluxgeschwindigkeit wird umso kleiner, je stärker BCRP durch den Modulator inhibiert wird.

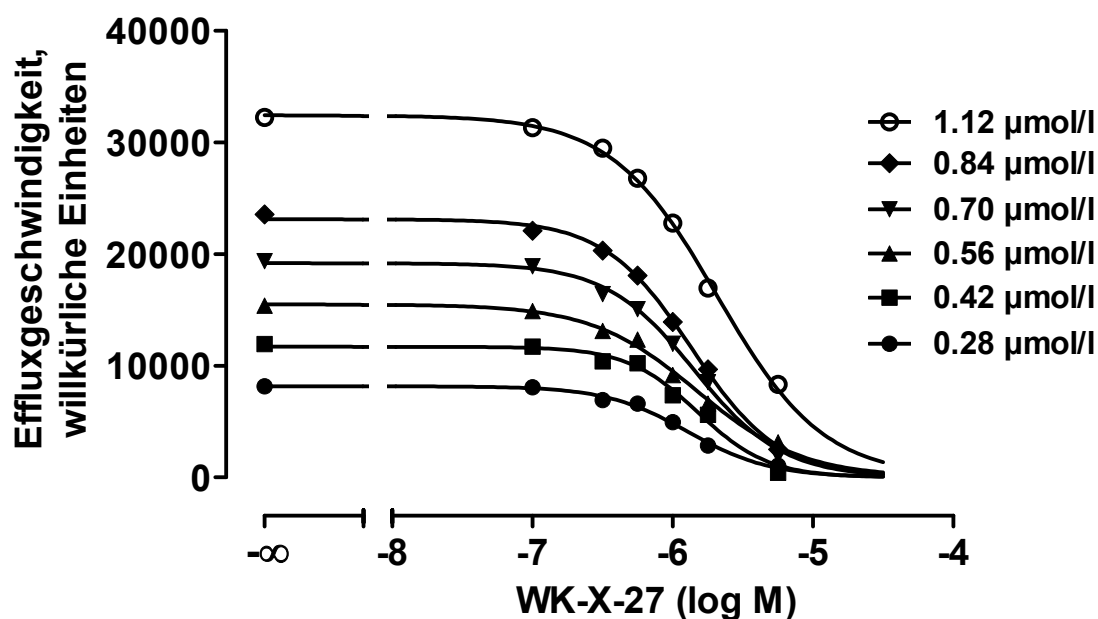


Abb. 4.52: Effluxgeschwindigkeit bzw. k_{BCRP} gegen die Modulatorkonzentration von WK-X-27 (Hoechst 33342-Assay, MDCK BCRP Zellen).

Die für das Linearisierungsverfahren nach Lineweaver und Burk benötigten Werte S und v wurden nach folgenden Formeln berechnet:

Gleichung 4.7:

$$c_{in} = S = \frac{[S] \times Fluo}{Top}$$

Gleichung 4.8:

$$v = [S] - c_{in}$$

Die so berechneten Werte wurden in das Programm GraphPad Prism[®] 5.01 überführt und mittels doppelt reziproker Transformation nach Lineweaver-Burk linearisiert. Abb. 4.53 zeigt das Lineweaver-Burk-Diagramm der Verbindung WK-X-27 bei unterschiedlichen Hoechst 33342 Konzentrationen. Die Abbildung zeigt, dass mit zunehmender Inhibitorkonzentration der apparente K_m -Wert (Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse im negativen Bereich) ansteigt, v_{max} bleibt dagegen unverändert (gemeinsamer Schnittpunkt auf der y-Achse). Wie bereits erwähnt, ist dies typisch für eine Kompetition zwischen Inhibitor und Substrat.

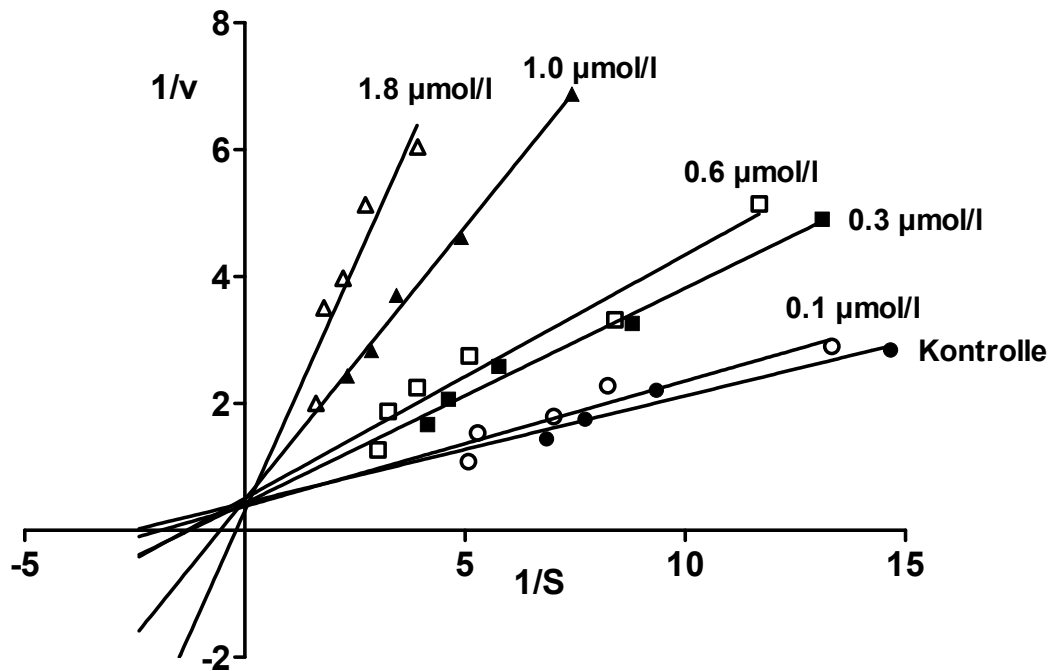


Abb. 4.53: Lineweaver-Burk-Diagramm für WK-X-27 und Hoechst 33342.

Die Lineweaver-Burk-Darstellung ist mit dem 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. Deshalb wurden die generierten Daten mittels eines weiteren Linearisierungsverfahren nach Hanes-Woolf analysiert. Im Hanes-Wolf-Diagramm wird S/v gegen S aufgetragen.^{222,223} Liegt eine kompetitive Interaktion von Substrat und Inhibitor vor, ändert sich v_{\max} nicht, da der Inhibitor mit steigenden Konzentrationen des Substrates vollständig vom Enzym verdrängt werden kann. In der graphischen Auftragung nach Hanes-Woolf zeigt sich dies an den parallel zueinander verlaufenden Geraden mit gleicher Steigung $1/v_{\max}$. 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. 4.54 erkennt man, dass die einzelnen Geraden annähernd parallel zueinander verlaufen. Aus Abb. 4.54 geht in Übereinstimmung mit dem in Abb. 4.53 dargestellten Lineweaver-Burk-Diagramm hervor, dass zwischen dem Substrat Hoechst 33342 und dem Modulator WK-X-27 der Interaktionstyp der Konkurrenz vorliegt. Beide Substanzen binden vermutlich an die gleiche Bindungsstelle von BCRP.

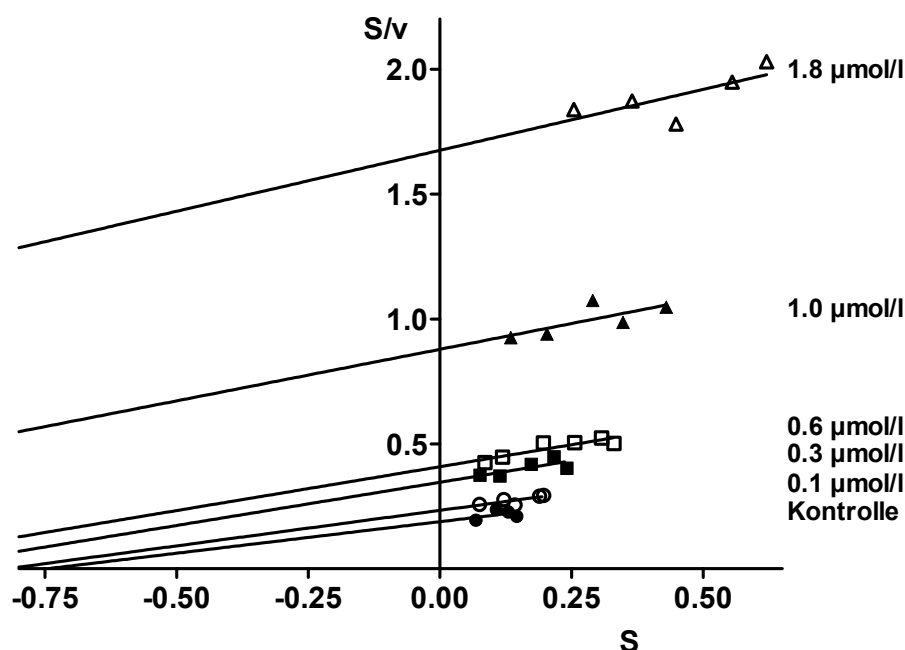


Abb. 4.54: Hanes-Woolf-Diagramm für WK-X-27 und Hoechst 33342.

Im Folgenden war es von Interesse herauszufinden, welcher Interaktionstyp bei Verwendung des Substrates Pheophorbid A resultiert. WK-X-27 wurde daher auch in Gegenwart unterschiedlicher Pheophorbid A Konzentrationen enzymkinetisch untersucht. Wie das in Abb. 4.55 wiedergegebene Lineweaver-Burk-Diagramm veranschaulicht, liegt für die Interaktion von WK-X-27 und Pheophorbid A ein nicht-kompetitiver Zusammenhang vor. Ein nicht-kompetitiver Inhibitor ist dadurch charakterisiert, dass er in der Lage ist, v_{\max} zu verringern ohne K_m zu verändern. Die nicht-kompetitive Wechselwirkung zwischen Substrat und Modulator wird auch in dem in Abb. 4.56 dargestellten Hanes-Woolf-Diagramm offensichtlich. Der K_m -Wert resultiert als Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse. Mit zunehmender Modulatorkonzentration wird die Steigung der einzelnen Geraden immer steiler, und v_{\max} nimmt immer kleinere Werte an. Aus diesen Ausführungen geht hervor, dass WK-X-27 und Pheophorbid A unterschiedliche Bindungsstellen von BCRP besetzen.

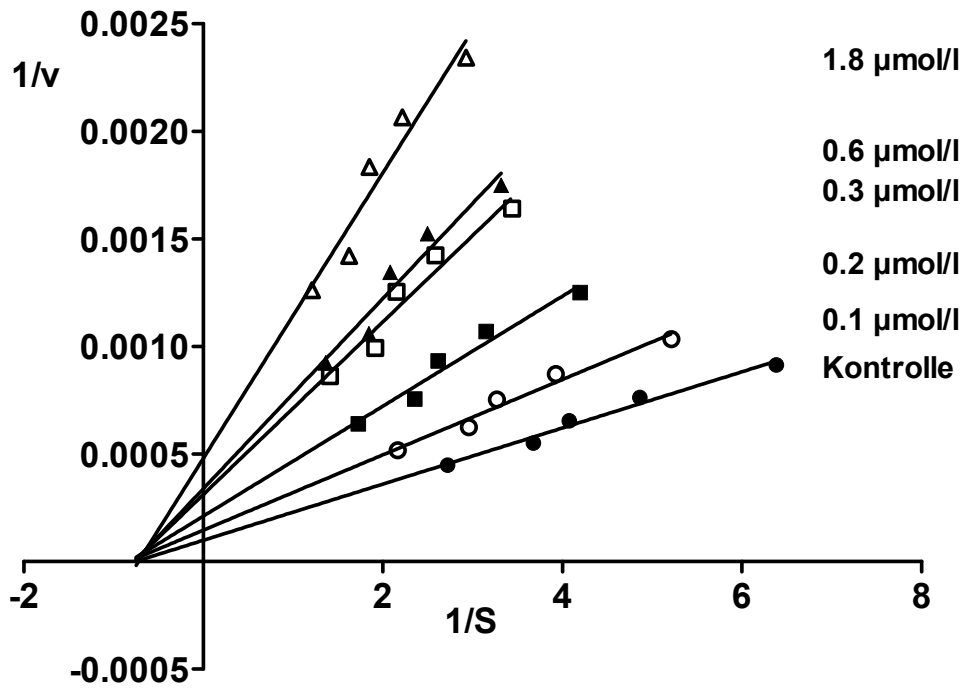


Abb. 4.55: Lineweaver-Burk-Diagramm für WK-X-27 und Pheophorbid A.

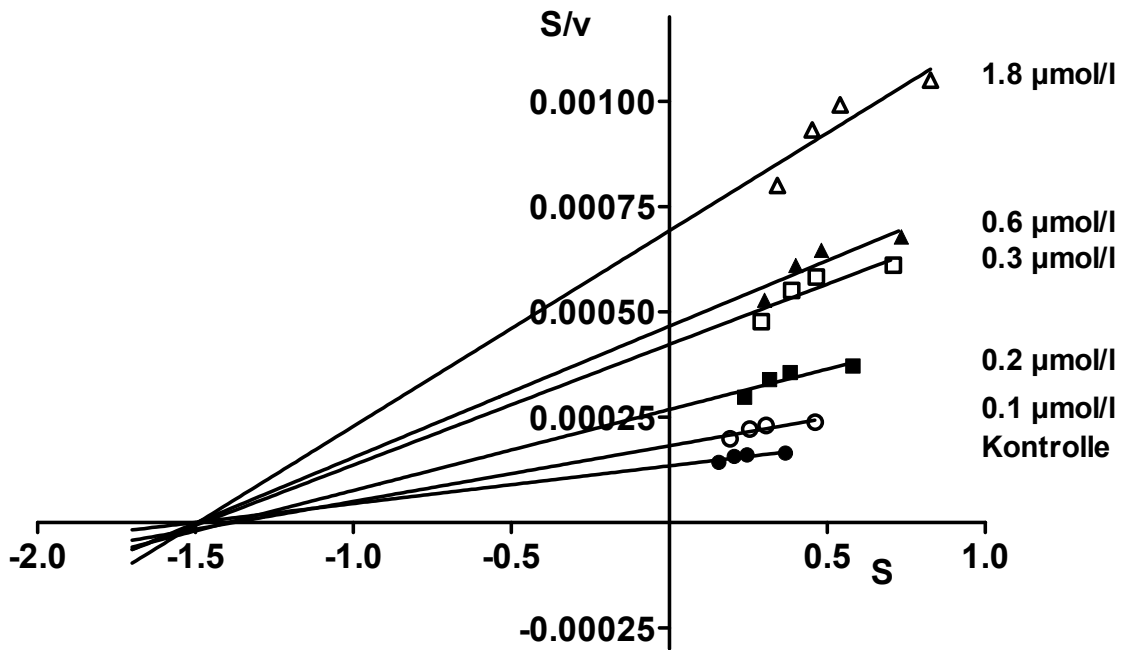
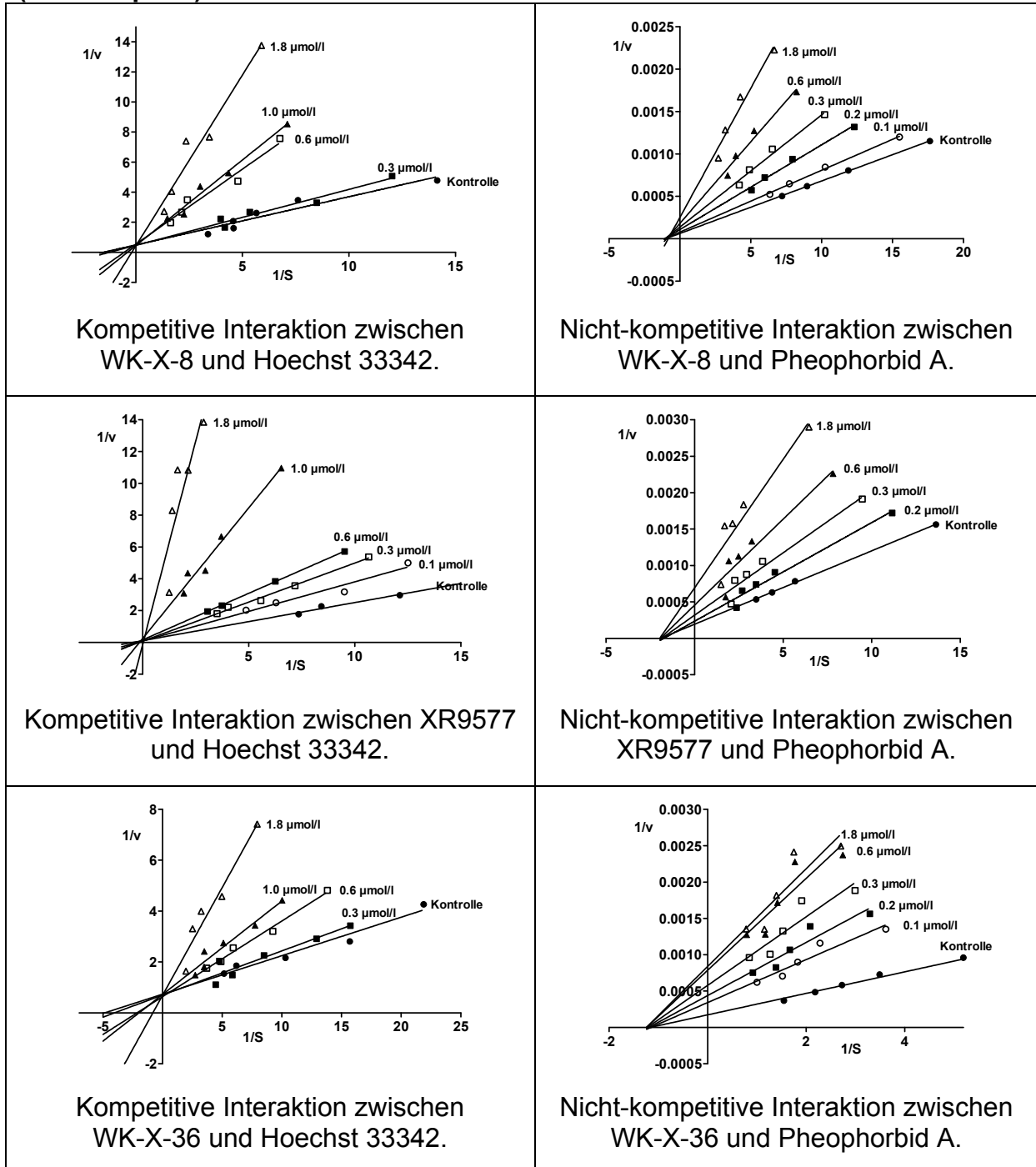


Abb. 4.56: Hanes-Woolf-Diagramm für WK-X-27 und Pheophorbid A.

4 Ergebnisse und Diskussion

Um festzustellen, ob der Tetrahydroisochinolinrest der großen WK-X-Verbindungen an der Interaktion mit BCRP beteiligt ist, wurden drei weitere Modulatoren für eine enzymkinetische Analyse bei unterschiedlichen Hoechst 33342 bzw. Pheophorbid A Konzentrationen aus Tabelle 4.15 ausgewählt.

Tabelle 4.17: Lineweaver-Burk-Diagramme für die Verbindungen WK-X-8, XR9577 und WK-X-36 mit Hoechst 33342 (linke Spalte) und Pheophorbid A (rechte Spalte).



Die bisherigen Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass der BCRP spezifische Modulator WK-X-27, eine Verbindung ohne Tetrahydroisochinolinrest, an die gleiche Bindungsstelle bindet wie Hoechst 33342, Pheophorbid A scheint jedoch eine andere Region im Protein zu besetzen. Welcher Interaktionstyp ist aber bei den großen XR-Analoga mit Tetrahydroisochinolinrest zu erwarten? In Tabelle 4.17 sind die Ergebnisse der drei Verbindungen WK-X-8, XR9577 und WK-X-36 in Form von Lineweaver-Burk-Diagrammen zusammengefasst. Das 3-Chinolylderivat WK-X-8, ein weiterer Vertreter der spezifischen Inhibitoren mit Grundgerüst 2 (s. Tabelle 4.15), zeigt das gleiche Interaktionsverhalten wie das 4-Nitrophenylanalogon WK-X-27. Interessanterweise ergab sich die gleiche Interaktionsform bei den beiden großen WK-X-Verbindungen. Aus den in Tabelle 4.17 gezeigten Diagrammen geht hervor, dass zwischen XR9577 und WK-X-36 und dem Substrat Hoechst 33342 eine kompetitive Interaktion vorliegt (linke Spalte). Die Geraden schneiden sich in einem gemeinsamen Punkt auf der y-Achse, der apparente K_m -Wert wird größer. Die Lineweaver-Burk-Diagramme der rechten Spalte in Tabelle 4.17 spiegeln die nicht-kompetitive Interaktion zwischen dem Substrat Pheophorbid A und XR9577 bzw. WK-X-36 wider. Aus diesen Ausführungen geht hervor, dass sowohl Verbindungen mit Grundgerüst 2 als auch deren große Analoga mit Grundgerüst 3 den gleichen Interaktionstyp mit den beiden Substraten Hoechst 33342 (kompetitiv) und Pheophorbid A (nicht-kompetitiv) besitzen. Der Tetrahydroisochinolinrest scheint demnach nicht an der Interaktion mit BCRP beteiligt zu sein.

Zusätzlich wurde der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib bei unterschiedlichen Hoechst 33342 und Pheophorbid A Konzentrationen untersucht. Imatinib wurde ausgewählt, da es möglicherweise an die ATP-Seite der Nukleotidbindungsstelle von BCRP binden könnte.²²⁴ Abb. 4.57 zeigt das Lineweaver-Burk-Diagramm von Imatinib und Pheophorbid A. Imatinib kann als unkompetitiver bzw. sog. "Mischtyp-Inhibitor" angesehen werden, der an eine andere Bindungsstelle bindet als Pheophorbid A. Ein solcher Mischtyp-Inhibitor zeichnet sich dadurch aus, dass er zu einer Abnahme sowohl von K_m als auch von v_{max} führt. Die Geraden in Abb. 4.57 verlaufen zunächst parallel, schneiden sich aber im weiteren Verlauf in einem Punkt unterhalb der x-Achse im negativen Bereich. In Abb. 4.58 sind die möglichen Interaktionsformen eines Mischtyp-Inhibitors I mit einem Enzym E schematisch aufgeführt.

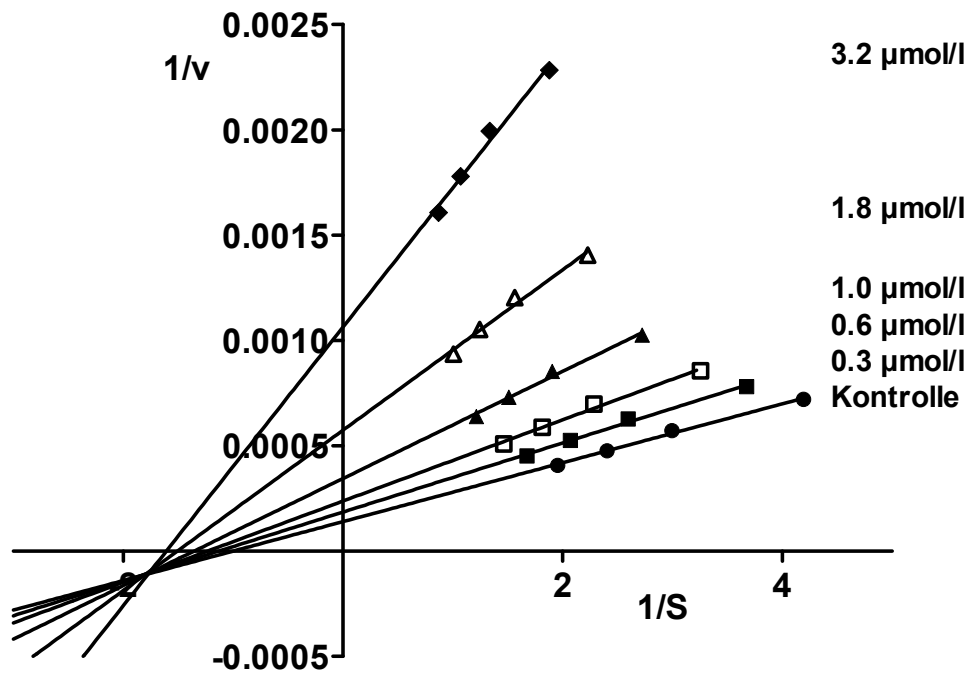


Abb. 4.57: Lineweaver-Burk-Diagramm für Imatinib und Pheophorbid A.

Im Gegensatz zu einem unkompetitiven Inhibitor bindet der Mischtyp-Inhibitor auch an den freien Rezeptor.²²² Außerdem ist der gebildete ternäre Komplex aus Enzym, Substrat und Inhibitor noch produktiv, besitzt jedoch eine geringere Geschwindigkeit als der Komplex aus Transporter und Substrat allein ($\beta < 1$).

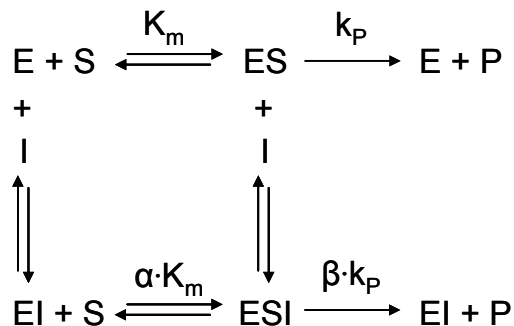


Abb. 4.58: Mögliche Interaktionsformen eines Mischtyp-Inhibitors I mit dem Enzym E, modifiziert nach Segel et al.²²²

Des Weiteren führt die Anwesenheit eines unkompetitiven bzw. Mischtyp-Inhibitors zu einer Erhöhung der Affinität des Substrates zu dem Enzym. Der Mischtyp-Inhibitor Imatinib zeigt eine positive Kooperativität mit der Substratbindungsstelle von Pheophorbid A und erhöht somit die Affinität des Substrates zu dessen Bindungsstelle ($\alpha < 1$). Aufgrund der positiven Kooperativität ist die Imatinib-

Bindungsstelle nicht identisch mit der von den WK-X-Verbindungen, die auf Grundgerüst 2 oder 3 basieren. Auch bei der enzymkinetischen Auswertung mit unterschiedlichen Hoechst 33342 Konzentrationen verhielt sich Imatinib als Mischtyp-Inhibitor. Tyrosinkinaseinhibitoren scheinen eine besondere Rolle bei der Interaktion mit BCRP einzunehmen. Die Arbeitsgruppe von Saito et al. hat gezeigt, dass TKI wie Imatinib und Gefitinib keine Konkurrenz mit ATP eingehen.²²⁴ Die Versuche wurden in ABCG2 positiven Plasmamembranvesikeln von SF9 Zellen bei unterschiedlichen ATP-Konzentrationen durchgeführt. Es wurde eine unkompetitive Interaktion zwischen den TKI und ATP festgestellt. Dies bedeutet, dass TKI nur in Anwesenheit von ATP mit BCRP interagieren. Das Ergebnis verwundert nicht, da die Anwesenheit bzw. Hydrolyse von ATP einen essentiellen Bestandteil des Transportmechanismus von BCRP darstellt. Des Weiteren weist die von Saito et al. festgestellte unkompetitive Interaktion darauf hin, dass die Affinität von ATP zu seiner BCRP Bindungsstelle in Anwesenheit eines TKI erhöht wird. In Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen scheint der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib eine allosterische Bindungsstelle von BCRP zu besetzen, wobei eine positive Kooperativität mit den beiden Bindungsstellen von Pheophorbid A und Hoechst 33342 zu bestehen scheint.

4.9.3 Kombinationsexperimente zur Charakterisierung des allosterischen Bindungsverhaltens von Imatinib

Die bisherigen Ergebnisse lieferten Hinweise, dass Imatinib ein allosterischer Modulator zu sein scheint. Der Begriff Allosterie (griechisch von allo = anders und steros = Ort) soll im Folgenden kurz erläutert werden.

Als allosterischer Modulator wird in der Pharmakologie eine Substanz bezeichnet, welche die Effekte eines Agonisten an einem Zielprotein, in der Regel einem Rezeptor, verändert ohne dabei selbst eine Wirkung zu zeigen. Allosterische Modulatoren binden an eine andere (allosterische) Bindungsstelle als die orthosterische Agonistenbindungsstelle. Die Bindung eines Orthosters kann durch das Alloster auf zwei unterschiedliche Arten beeinflusst werden: (i) Förderung der Bindung des Orthosters durch das Alloster (positive Kooperativität), (ii) die Bindung

des Orthosters an den Rezeptor wird durch das Alloster abgeschwächt (negative Kooperativität).

Auf Basis der Untersuchung von Imatinib bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen verbunden mit dem enzymkinetischen Auswertungsansatz konnte gezeigt werden, dass Imatinib an eine andere Bindungsstelle bindet als Pheophorbid A oder Hoechst 33342 und gleichzeitig die Affinität beider Substrate an deren Bindungsstellen erhöht. Es stellte sich nun die Frage, ob Imatinib tatsächlich als "klassisches" Alloster eingestuft werden kann. Wie bereits oben erwähnt, ist ein allosterischer Modulator dadurch charakterisiert, dass er selbst keine Wirkung am Rezeptor besitzt. Imatinib müsste demnach an eine Bindungsstelle binden, die keine Transporteigenschaften besitzt, sondern eine rein regulatorische Funktion inne hat. In dieser Arbeit wurde die Interaktion von Imatinib mit BCRP im Hoechst 33342- und im Pheophorbid A-Assay bereits untersucht (vgl. Kapitel 4.5 und 4.6.2). Imatinib führte in beiden Assays zu einer Inhibition von BCRP, wie die pIC_{50} -Werte an MDCK BCRP Zellen zeigen: pIC_{50} (Hoechst 33342-Assay) = $5,03 \pm 0,14$, pIC_{50} (Pheophorbid A-Assay) = $5,57 \pm 0,16$. Auch andere Publikationen bestätigen die inhibitorische Aktivität von Imatinib an BCRP.^{148,225,226,227} Aufgrund der Inhibierbarkeit von BCRP durch Imatinib, bestätigt durch die Ergebnisse aus der Literatur und dieser Arbeit, ist eine Charakterisierung von Imatinib als Alloster im klassischen Sinne nicht zulässig. Um die gegenseitige Beeinflussung der Bindungsstellen dennoch näher charakterisieren zu können, wurde Imatinib in Kombination mit anderen Verbindungen mit Hilfe des Pheophorbid A- und des Hoechst 33342-Assays analysiert. Für die Durchführung solcher Kombinationsexperimente wurden Konzentrations-Effektkurven eines Modulators in Abwesenheit (Kontrolle) und in Gegenwart fixer Konzentrationen des potenziellen Allosters Imatinib aufgenommen (vgl. Kapitel 3.12.4). Von besonderem Interesse war hierbei herauszufinden, wie sich die biologischen Aktivitätswerte der spezifischen Verbindungen und ihrer Analoga mit Grundgerüst 3 in Gegenwart von ansteigenden Konzentrationen Imatinib ändern. Ein Beispiel für dieses Experiment, bestimmt mittels Pheophorbid A-Assay, kann Abb. 4.59 entnommen werden. Es ist offensichtlich, dass durch ansteigende Konzentrationen von Imatinib die Konzentrations-Effektkurve von WK-X-27 signifikant parallel nach links verschoben wird (positive Kooperativität). Die Hillkoeffizienten der Einzelkurven differieren nicht. Abb. 4.59 zeigt auch, dass die Bottom-Werte der einzelnen Konzentrations-

Effektkurven mit zunehmender Imatinibkonzentration angehoben werden, was den Eigeneffekt von Imatinib verdeutlicht. Die Anwesenheit von Imatinib führt zu einer etwa 5fachen Steigerung der Aktivität von WK-X-27. Für die Kombination von Imatinib und WK-X-27 resultiert demnach ein überadditiver Effekt. Auch für die Kombination Imatinib und XR9577 wurde im Pheophorbid A-Assay das gleiche Verhalten festgestellt.

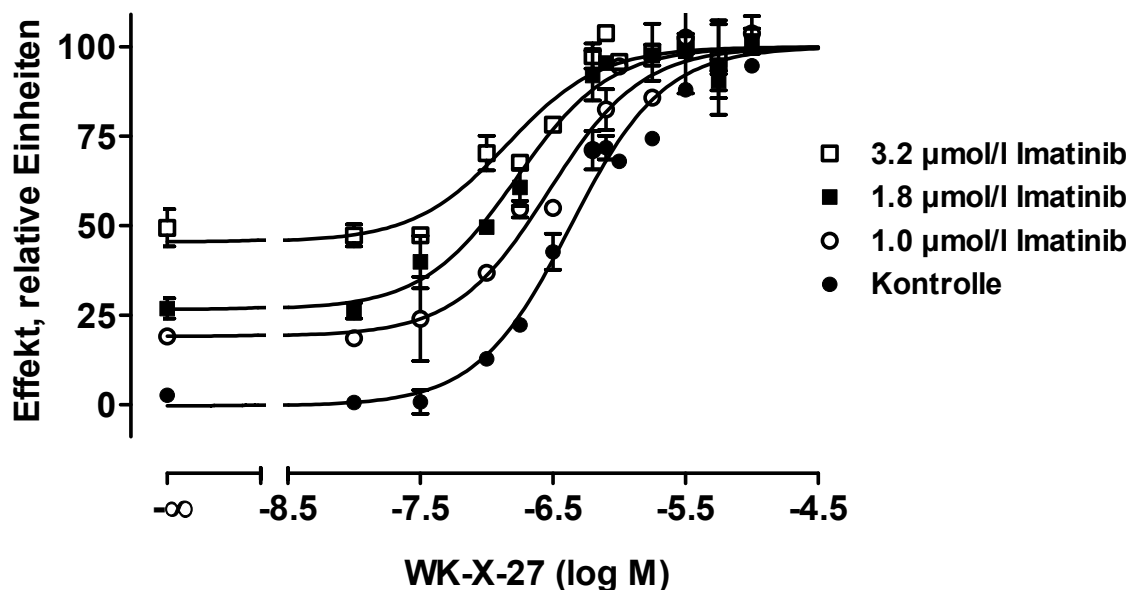


Abb. 4.59: Konzentrations-Effektkurve von WK-X-27 in An- und Abwesenheit definierter Imatinibkonzentrationen bestimmt mittels Pheophorbid A-Assay an MDCK BCRP Zellen. Kontrolle: $pIC_{50} 6,30 \pm 0,08$, 1,0 µmol/l Imatinib: $pIC_{50} = 6,53 \pm 0,04$, 1,8 µmol/l Imatinib: $pIC_{50} = 6,77 \pm 0,04$, 3,2 µmol/l Imatinib: $pIC_{50} = 6,84 \pm 0,05$. Dargestellt ist ein typisches Experiment aus einer Serie von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Kombiniert man dagegen WK-X-27 und XR9577 in fixen Konzentrationen, lässt sich kein überadditiver Effekt feststellen. In Abb. 4.60 sind die Konzentrations-Effektkurven Form wiedergegeben. Die Abbildung zeigt, dass es zu keiner parallelen Linksverschiebung der Konzentrations-Effektkurven kommt. Die pIC_{50} -Werte sind nicht signifikant voneinander verschieden (überprüft mittels F-Test).

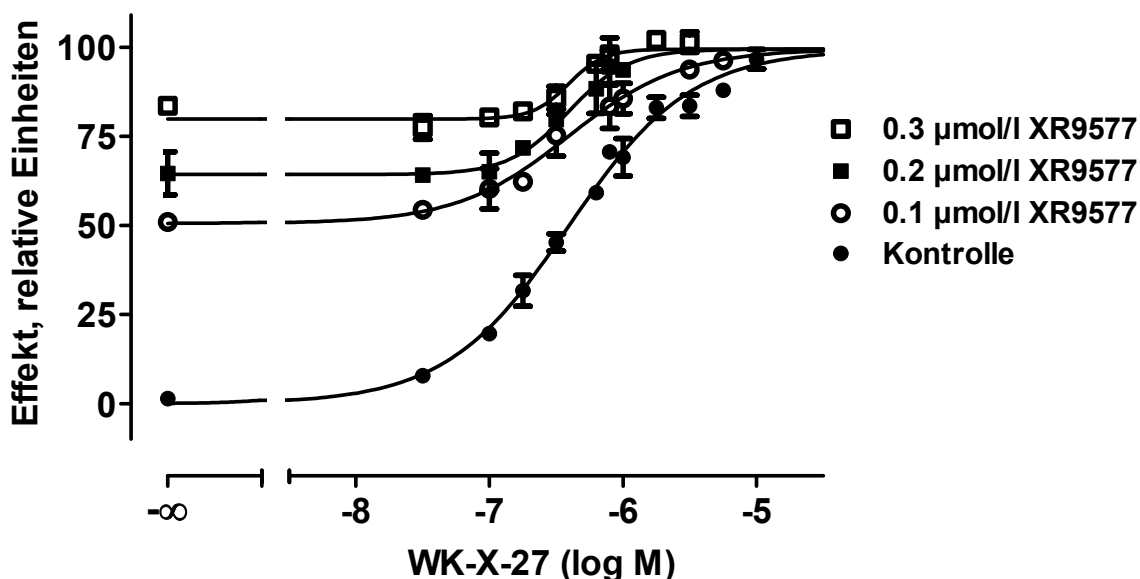


Abb. 4.60: Konzentrations-Effektkurve von WK-X-27 in An- und Abwesenheit definierter XR9577 Konzentrationen bestimmt mittels Pheophorbid A-Assay an MDCK BCRP Zellen. Der mittels F-Test berechnete pIC_{50} -Wert beträgt für jede Kurve $6,37 \pm 0,03$. Dargestellt ist ein typisches Experiment aus einer Serie von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Die Kombinationsexperimente zeigen, in Übereinstimmung mit den Interaktionsstudien bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen, dass Verbindungen mit Grundgerüst 2 und 3 an die gleiche Bindungsstelle von BCRP binden und der Tetrahydroisochinolinrest nicht an der Interaktion mit BCRP beteiligt ist. Des Weiteren konnte Imatinib als Alloster - jedoch nicht im klassischen Sinne - identifiziert werden, welcher eine andere Bindungsstelle besetzt als die spezifischen Verbindungen oder ihre Analoga mit Grundgerüst 3 und der eine positive Kooperativität auf diese "WK-X-Bindungsstelle" ausübt. Außerdem ist Imatinib als Mischtyp-Inhibitor in der Lage, die Affinität der Substrate Pheophorbid A und Hoechst 33342 zu erhöhen.

4.10 Interaktion von Tyrosinkinaseinhibitoren mit BCRP

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde nun der Fokus auf Gruppe 4 der BCRP Inhibitoren gerichtet. Nach Ahmed-Belkacem et al. beinhaltet diese Gruppe Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI).¹²⁹ Von einigen TKI ist bekannt, dass sie sowohl mit BCRP als auch mit P-gp und MRP1 interagieren und daher auch als Breitspektrum-inhibitoren bezeichnet werden könnten.^{148,149,150,151} Verschiedene Publikationen zeigen jedoch, dass TKI wie Imatinib und Gefitinib eine höhere Affinität zu BCRP aufweisen. In einer Publikation von Özvegy-Laczka et al. wurden die Aktivitätswerte der beiden TKI Gefitinib und Imatinib an BCRP, P-gp und MRP1 verglichen.¹⁴⁸ Dabei besaßen die Verbindungen an BCRP eine weitaus höhere Aktivität als an den beiden anderen ABC-Transportern. Gefitinib zeigte an ABCG2 transfizierten HL60-ABCG2 Zellen einen IC_{50} von $0,4 \mu\text{mol/l}$, der IC_{50} von Imatinib betrug $0,9 \mu\text{mol/l}$. Für die Inhibition von P-gp bzw. MRP1 wurden im Calcein AM-Assay deutlich höhere Konzentrationen benötigt. Der IC_{50} für Gefitinib in HL60-MDR1 bzw. HL60-MRP1 Zellen lag bei $4\text{-}5 \mu\text{mol/l}$, bis zum Erreichen des halbmaximalen Effektes mussten 10fach höhere Konzentrationen eingesetzt werden als für die Inhibition von BCRP. Die inhibitorische Wirksamkeit von Imatinib an P-gp bzw. MRP1 war sogar um den Faktor 20 geringer als an BCRP ($IC_{50} = 20\text{-}30 \mu\text{mol/l}$).

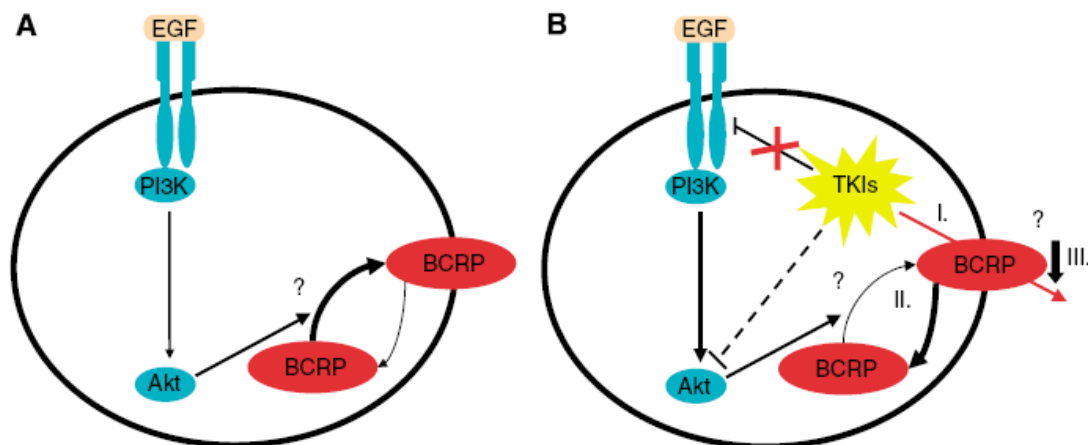


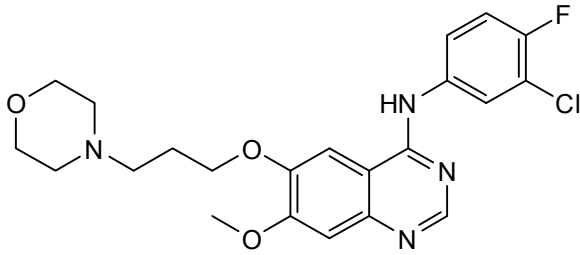
Abb. 4.61: Möglicher Einfluss von Tyrosinkinaseinhibitoren via PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg auf den BCRP Expressionsstatus, nach Lemos et al.¹⁵³

Laut Literatur wird den TKI unter den BCRP Modulatoren eine besondere Rolle zugesprochen. Diese Besonderheit geht auf einen möglichen multispezifischen Interaktionsmechanismus dieser Verbindungen zurück. Es wird diskutiert, dass der PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg die Expression und Lokalisation von BCRP beeinflussen soll (vgl. Kapitel 1.5.2). TKI sollen dabei den durch EGF induzierten PI3K/Akt-Transduktionsweg hemmen und damit sowohl die Expression von BCRP inhibieren als auch die Inkorporation von BCRP in die Plasmamembran induzieren (s. Abb. 4.61).^{21,152,153} Dieser Hinweis aus der Literatur bildete die Grundlage dafür, den möglichen multispezifischen Interaktionsmechanismus einiger TKI mit dem ABC-Transporter BCRP in dieser Arbeit näher zu charakterisieren.

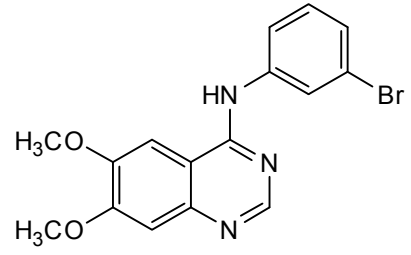
4.10.1 Bestimmung der Aktivitätswerte ausgewählter TKI an BCRP, P-gp und MRP1

Zunächst wurden verschiedene TKI auf funktioneller Ebene an den ABC-Transportern BCRP, P-gp und MRP1 untersucht. Zu diesen TKI gehören die EGFR Inhibitoren Gefitinib, Erlotinib, Tyrphostin, PD153035, PD158780 und die BCR-ABL Inhibitoren Imatinib und Nilotinib. Die chemischen Strukturen sind in Abb. 4.62 wiedergegeben. Die EGFR Inhibitoren stellen Phenylaminochinazoline dar, wobei Gefitinib und Erlotinib zu den Verbindungen mit einem höheren Molekulargewicht zählen. Das Grundgerüst der BCR-ABL Inhibitoren Imatinib und Nilotinib basiert auf einem 2-Phenylaminopyrimidin, das mit einem 3-Pyridyl-Substituenten verknüpft ist. Die funktionelle Untersuchung erfolgte mit Hilfe des Hoechst 33342-Assays (Endkonzentration 1 $\mu\text{mol/l}$; Auswertung über one phase exp. Association) und des Pheophorbid A-Assays an MDCK BCRP Zellen. Zusätzlich wurden die Verbindungen an den ABC-Transportern P-gp (MDCK MDR1 Zellen, Calcein AM-Assay) und MRP1 (2008 MRP1 Zellen, Calcein AM-Assay) untersucht. Die ermittelten biologischen Aktivitätswerte sind in Tabelle 4.18 aufgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass die TKI eine hohe inhibitorische Potenz an BCRP aufweisen. In Übereinstimmung mit der Literatur ist ihre Aktivität an den beiden anderen ABC-Transportern wesentlich schwächer ausgeprägt. Die beiden Phenylaminochinazoline PD158780 und Tyrphostin zeigten keinerlei Interaktion mit P-gp und MRP1.

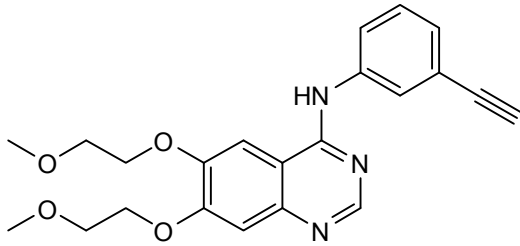
EGFR Inhibitoren



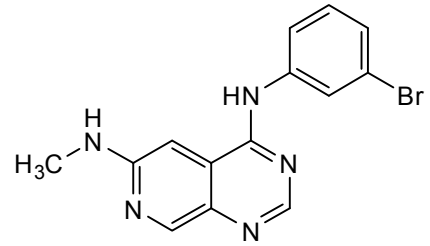
Gefitinib



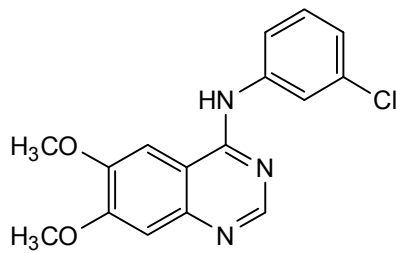
PD153035



Erlotinib

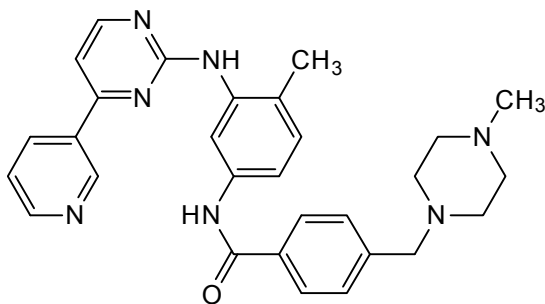


PD158780

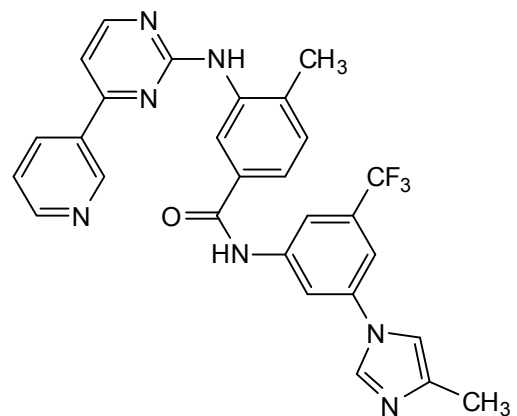


Tyrphostin

BCR-ABL Inhibitoren



Imatinib



Nilotinib

Abb. 4.62: Strukturformeln der untersuchten TKI.

Tabelle 4.18: Biologische Aktivitätswerte und Standardabweichung der 7 untersuchten TKI (n ≥ 3). k.E.*: kein Effekt bis 10 µmol/l.

Verbindung	BCRP		P-gp	MRP1
	MDCK BCRP pIC ₅₀ ± SD Hoechst	MDCK BCRP pIC ₅₀ ± SD Pheophorbid A	MDCK MDR1 pIC ₅₀ ± SD Calcein-AM	2008 MRP1 pIC ₅₀ ± SD Calcein-AM
Gefitinib	5,49 ± 0,07	5,76 ± 0,12	4,97 ± 0,09	4,84 ± 0,05
Erlotinib	5,61 ± 0,09	5,73 ± 0,09	4,72 ± 0,16	5,41 ± 0,08
PD153035	5,60 ± 0,07	5,79 ± 0,24	4,53 ± 0,17	k.E.*
PD158780	6,44 ± 0,08	6,60 ± 0,15	k.E.*	k.E.*
Tyrphostin	5,26 ± 0,03	5,62 ± 0,15	k.E.*	k.E.*
Imatinib	5,03 ± 0,14	5,57 ± 0,16	4,20 ± 0,12	4,17 ± 0,07
Nilotinib	6,17 ± 0,06	6,59 ± 0,16	5,52 ± 0,08	4,27 ± 0,09

Betrachtet man die Aktivitätswerte der "kleinen" Phenylaminochinazoline PD158780, PD153035 und Tyrphostin an BCRP (Hoechst 33342-Assay) fällt auf, dass ein bromsubstituierter Benzolring wie in Verbindung PD158780 ($pIC_{50} = 6,44 \mu\text{mol/l} \pm 0,08$) und PD153035 ($pIC_{50} = 5,60 \mu\text{mol/l} \pm 0,07$) zu einer stärkeren Hemmwirkung führt als ein Chloratom an gleicher Position (pIC_{50} (Tyrphostin) = $5,26 \mu\text{mol/l} \pm 0,03$). Des Weiteren steigt die inhibitorische Potenz, wenn an Stelle zweier Methoxygruppen in Position 6 und 7 des Chinazolinringes (pIC_{50} (Tyrphostin) = $5,26 \mu\text{mol/l} \pm 0,03$; pIC_{50} (PD153035) = $5,60 \mu\text{mol/l} \pm 0,07$) ein Methylamin in Position 6 vorhanden ist (pIC_{50} (PD158780) = $6,44 \mu\text{mol/l} \pm 0,08$). Werden die Methoxygruppen in Position 6 und 7 durch voluminöse Reste substituiert, führt dies zu einer geringfügigen Beeinflussung der Aktivität (pIC_{50} (Gefitinib) = $5,49 \mu\text{mol/l} \pm 0,07$; pIC_{50} (Erlotinib) = $5,61 \mu\text{mol/l} \pm 0,09$). Die beiden Verbindungen PD158780 ($pIC_{50} = 6,44 \mu\text{mol/l} \pm 0,08$) und Nilotinib ($pIC_{50} = 6,17 \mu\text{mol/l} \pm 0,06$) konnten als BCRP Inhibitoren mit der höchsten Potenz identifiziert werden.

4.10.2 Nachweis von EGFR in den verwendeten Zelllinien mittels spezifischem Antikörper

Um die potentielle Beeinflussung der Expression von ABCG2 durch TKI via PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg untersuchen zu können, musste ErbB1 in ABCG2

transfizierten MDCK BCRP Zellen nachgewiesen werden. Der für die Bestimmung des EGFR Gehaltes der verschiedenen Zelllinien eingesetzte Antikörper ist PE-gelabelt und kann deshalb direkt am Durchflusszytometer im Fluoreszenzkanal FL2 vermessen werden. Der Antikörper bindet spezifisch an ein extrazelluläres, cysteinreiches Epitop von EGFR. Die in Abb. 4.63 aufgeführten Zelllinien wurden hinsichtlich ihres EGFR-Expressionsstatus mit Hilfe des EGFR spezifischen Antikörpers am FACS untersucht (vergl. Kapitel 3.16.2).

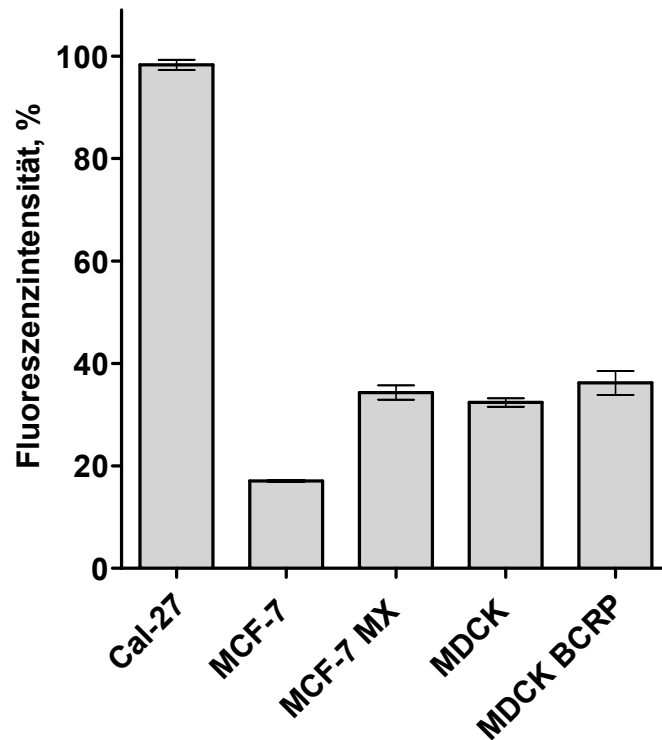


Abb. 4.63: Unterschiedliche Zelllinien, die mit Hilfe des EGFR Antikörpers am Durchflusszytometer untersucht wurden (FL2). Alle Zelllinien exprimieren EGFR.

Als Positivkontrolle diente die squamös-zellige Zungenkarzinomzelllinie Cal-27. Laut Literatur exprimieren 97% der Kopf-Hals-Tumore EGFR.¹⁷⁹ Abb. 4.63 zeigt deutlich, dass der EGFR-Gehalt in Cal-27 Zellen am höchsten ist. Die EGFR Expression in Cal-27 Zellen wurde auf 100% gesetzt und die Daten entsprechend normalisiert. Die Zelllinien MCF-7 MX, MDCK und MDCK BCRP weisen einen im Vergleich zur Cal-27 Zelllinie geringeren, nahezu identischen EGFR Expressionsstatus auf. Der Fluoreszenzwert für die Zelllinie MCF-7 liegt etwas niedriger als der der BCRP positiven MCF-7 MX Zellen. Da es sich bei den MCF-7 MX Zellen um eine mit Mitoxantron gestresste Zelllinie handelt, kann der höhere EGFR Gehalt als Antwort

der Zelle auf den Selektionsdruck zurückzuführen sein. Anhand des Balkendiagramms wird deutlich, dass alle untersuchten Zelllinien EGFR überexprimieren und daher die Voraussetzung erfüllen "EGFR-BCRP-Interaktionen" untersuchen zu können.

4.10.3 Sensitivierungsexperimente mittels Calcein-Toxizitätsassay

Wie in Kapitel 3.14.1 bereits beschrieben, wird Calcein-AM von unspezifischen intrazellulären Esterasen in das fluoreszierende Calcein-Anion gespalten. Aufgrund dieser Tatsache kann die Verbindung auch zur Untersuchung der Zellvitalität herangezogen werden. Da weder Calcein-AM noch das Calcein-Anion BCRP Substrate darstellen, wird die intrazelluläre Konzentration der Substanzen von BCRP nicht beeinflusst.

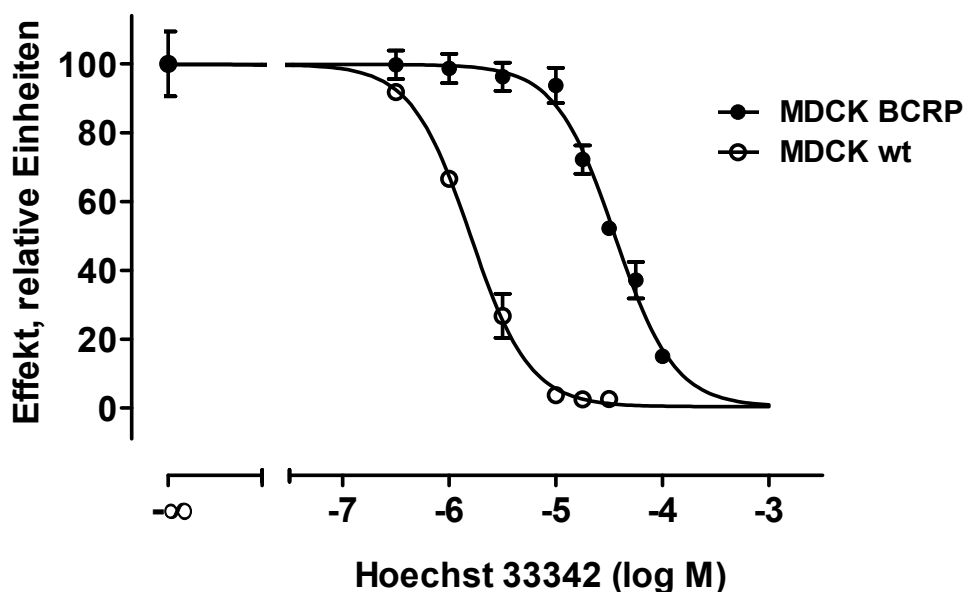


Abb. 4.64: Konzentrations-Effektkurven der Wildtypzelllinie MDCK (nicht gefüllte Kreise) und der resistenten Zelllinie MDCK BCRP (gefüllte Kreise) für Hoechst 33342 bestimmt mit Hilfe des Calcein-Toxizitätsassays; pIC_{50} (MDCK) = $4,45 \pm 0,03$, pIC_{50} (MDCK BCRP) = $5,80 \pm 0,04$.

Um die Spezifität der Interaktion zwischen TKI und BCRP näher charakterisieren zu können, wurden mit Hilfe des Calcein-Toxizitätsassays Sensitivierungsexperimente durchgeführt. Zunächst wurde der Resistenzfaktor von Hoechst 33342 in MDCK bzw. MDCK BCRP Zellen bestimmt. Der Resistenzfaktor stellt den Quotienten aus dem

IC₅₀-Wert dar, der an der resistenten Zelllinie MDCK BCRP ermittelt wurde, und dem korrespondierenden IC₅₀-Wert, bestimmt an der Wildtypzelllinie MDCK.

Die IC₅₀-Werte wurden mit dem in Kapitel 3.14.2 beschriebenen Calcein-Toxizitätsassays ermittelt. In Abb. 4.64 sind beispielhaft zwei Konzentrations-Effektcurven für Hoechst 33342 wiedergegeben. Die beiden Konzentrations-Effektcurven sind hinsichtlich ihrer Hillkoeffizienten nicht signifikant voneinander verschieden (mittels F-Test nachgewiesen). Der pIC₅₀-Wert für die resistente Zelllinie MDCK BCRP beträgt 4,45 µmol/l ± 0,03, der pIC₅₀-Wert für die Wildtypzelllinie liegt bei 5,80 µmol/l ± 0,04. Somit resultiert ein Resistenzfaktor von etwa 22.

Nun war es von Interesse herauszufinden, wie TKI die Toxizität von Hoechst 33342 beeinflussen. Werden Konzentrations-Effektcurven von Hoechst 33342 in Gegenwart von verschiedenen TKI-Konzentrationen aufgenommen, so sollte der Effekt des Substrates ansteigen, da der Modulator mit ansteigender Konzentration BCRP in zunehmendem Maße inhibiert.

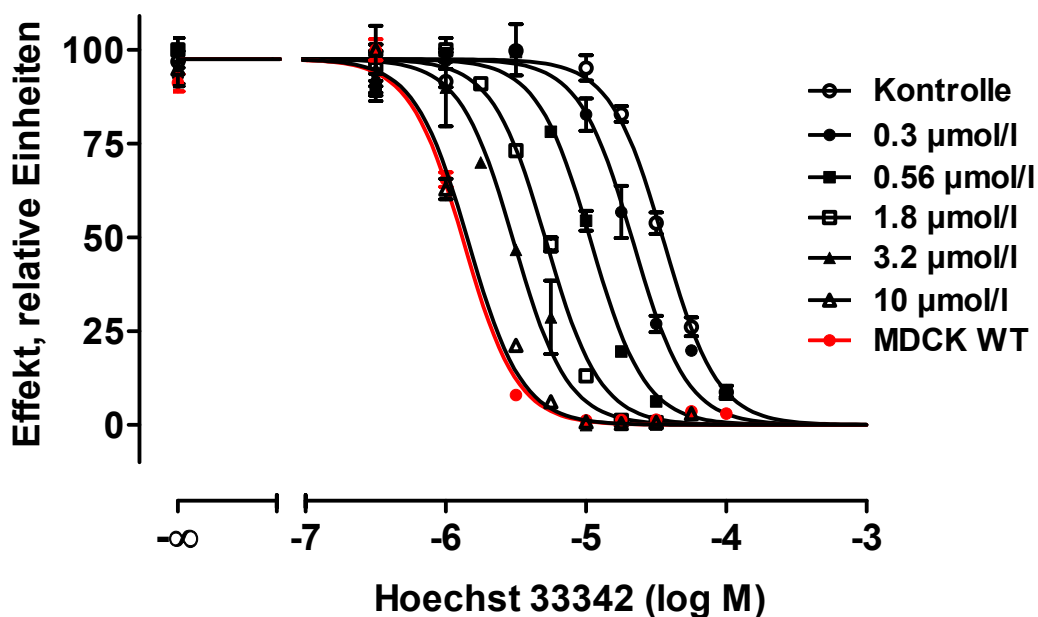


Abb. 4.65: Konzentrations-Effektkurve von Hoechst 33342 in Anwesenheit steigender Gefitinibkonzentrationen (bestimmt mit Hilfe des Calcein-Toxizitätsassays an MDCK BCRP und MDCK Zellen). Dargestellt ist ein typisches Experiment aus einer Serie von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

In Abb. 4.65 sind die Konzentrations-Effektcurven für Hoechst 33342 in Gegenwart und Abwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen des TKI Gefitinib wiedergegeben. Die einzelnen, normalisierten Konzentrations-Effektcurven wurden

unter Festlegung gemeinsamer Bottom-, Topwerte sowie Hillkoeffizienten (mittels F-Test nachgewiesen) mit Hilfe der 4-Parameter-logistischen-Gleichung analysiert und die pIC_{50} -Werte berechnet. Wie in Abb. 4.65 zu erkennen ist, wird die Konzentrations-Effektkurve von Hoechst 33342 in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration des Modulators Gefitinib parallel nach links verschoben. Die in Abb. 4.65 in rot dargestellte Kurve entspricht der Konzentrations-Effektkurve von Hoechst 33342, die in der Wildtypzelllinie MDCK aufgenommen wurde. Es ist ersichtlich, dass sich die rote Kurve und die Kurve unter Zusatz von 10 $\mu\text{mol/l}$ Gefitinib (gefüllte Dreiecke, Abb. 4.65) überlagern. Eine finale Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ Gefitinib führt zu einer vollständigen Inhibition von BCRP bis zum Niveau des Wildtyps. Die konzentrationsabhängige Linksverschiebung kann mit Hilfe des Dose-Ratio-Wertes quantifiziert werden. Die Dose-Ratio-Werte wurden nach folgender Formel berechnet:

Gleichung 4.9:

$$DR = \frac{IC_{50}(\text{In Abwesenheit des Modulators})}{IC_{50}(\text{In Gegenwart des Modulators})}$$

In Abb. 4.66 ist eine sigmoidale Kurve des TKI Gefitinib zu erkennen. Die logarithmierten Dose-Ratio-Werte (log DR-Werte) wurden gegen die korrespondierenden, logarithmierten Konzentrationen von Gefitinib aufgetragen und eine nichtlineare Regression basierend auf der 4-Parameter-logistischen-Gleichung vorgenommen. Der kleinste log DR-Wert wurde auf Null (IC_{50} -Wert von Hoechst 33342 in Abwesenheit des TKI) fixiert und legt das untere Plateau der in Abb. 4.66 dargestellten Kurve fest. Der Topwert wird über den maximalen log DR-Wert bzw. den IC_{50} -Wert der sensitiven Zelllinie vorgegeben. Der auf Basis der 4-Parameter-logistischen-Gleichung kalkulierte pIC_{50} -Wert von Gefitinib beträgt $5,68 \pm 0,03$.

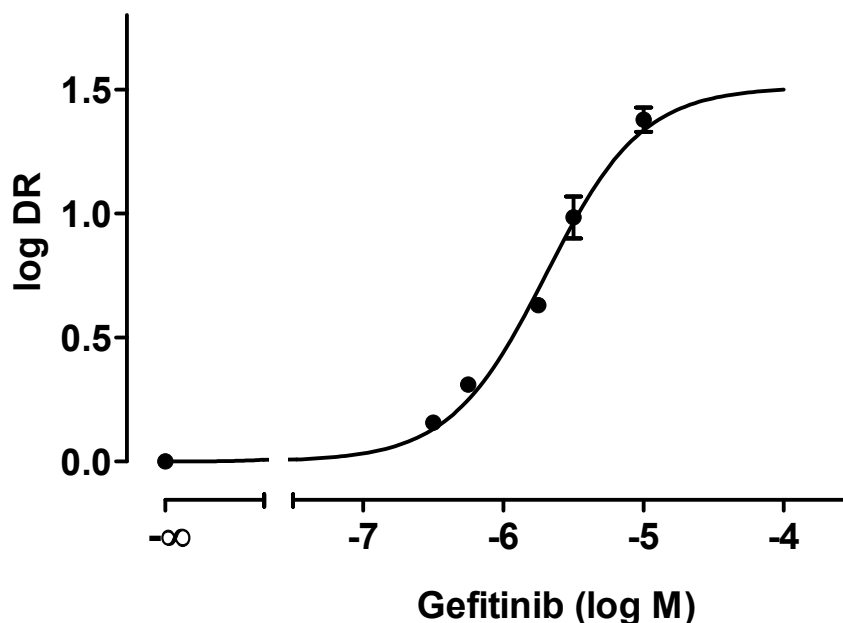


Abb. 4.66: log DR-Werte gegen log c (Gefitinib). Der ermittelte pIC_{50} -Wert beträgt $5,68 \mu\text{mol/l} \pm 0,03$.

Auch die verbliebenen TKI aus Tabelle 4.18 wurden in gleicher Weise im Calcein-Toxizitätsassay untersucht und die resultierenden log DR-Werte berechnet. In Tabelle 4.19 sind die pIC_{50} -Werte, dargestellt als Wendepunkte der log DR gegen log c (TKI)-Kurven, zusammengestellt.

Tabelle 4.19: angegebene pIC_{50} -Werte stellen die Wendepunkte der log DR gegen log c (Modulator/Hoechst 33342-)Kurven dar (Calcein-Toxizitätsassay, MDCK BCRP Zellen).

Verbindung	$pIC_{50} \pm SD$	Verbindung	$pIC_{50} \pm SD$
Gefitinib	$5,68 \pm 0,03$	Tyrphostin	$5,76 \pm 0,04$
Erlotinib	$5,86 \pm 0,05$	Imatinib	$5,60 \pm 0,04$
PD153035	$5,84 \pm 0,05$	Nilotinib	$6,34 \pm 0,06$
PD158780	$6,49 \pm 0,03$		

Alle Verbindungen waren in der Lage, die Konzentrations-Effektcurve von Hoechst 33342 bis zum Niveau des Wildtyps zu verschieben. Diese Sensitivierung beweist in indirekter Weise die Spezifität der Interaktion zwischen den TKI und BCRP.

4.10.4 Beeinflussung des Expressionsstatus von BCRP durch Tyrosinkinase-inhibitoren

Wie in Abb. 4.61 zu erkennen, ist der Ausgangspunkt für die potentielle Beeinflussung der ABCG2 Expression der EGF-EGFR Transduktionsweg. Durch die Hemmung der intrazellulären PI3K/Akt-Kaskade soll die Abnahme der ABCG2 Expression induziert und die Lokalisation in der Plasmamembran vermindert werden. Bei der Analyse der "EGFR-BCRP-Interaktionen" lag der Fokus auf den EGFR Inhibitoren Gefitinib und PD158780 und den BCR-ABL Inhibitoren Imatinib und Nilotinib. Die Abnahme der ABCG2 Expression durch Inkubation mit den Verbindungen wurde unterschieden in (i) Abnahme der Membranexpression und (ii) Abnahme der Gesamtexpression von BCRP. Die Veränderung der Membranexpression konnte durch Einsatz des BCRP spezifischen Antikörpers 5D3 mittels Durchflusszytometrie (FL2) nachgewiesen werden. GFP diente als Reporter gen, um die Gesamtexpression zu quantifizieren (FL1). Da die BCRP Expression mit der GFP Expression korreliert, konnte so auf einfache Weise die Gesamtproteinmenge bestimmt werden, ohne aufwendige Western-Blotting Experimente durchführen zu müssen.

Zunächst wurden MDCK BCRP Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der entsprechenden TKI wie in Kapitel 3.15.4 beschrieben für 72 h vorinkubiert. Nach der Markierung der Zellen mit dem Antikörper 5D3 (Kapitel 3.16.1), wurden sie am Durchflusszytometer hinsichtlich ihres BCRP Expressionsstatus untersucht. Die Balkendiagramme in Abb. 4.67 A und B zeigen, dass die Inkubation der Zellen mit den EGFR Inhibitoren Gefitinib (Abb. 4.67 A) und PD158780 (Abb. 4.67 B) zu einer signifikanten dosisabhängigen Abnahme der Membran- (grau) und der Gesamtexpression (grün) von BCRP führt. Die BCRP Expression der unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurde auf 100% gesetzt und die Daten entsprechend normalisiert. Die Inkubation der Zellen mit 1,8 $\mu\text{mol/l}$ Gefitinib führt zu einer deutlichen Abnahme der BCRP Expression um 60%. Der Einsatz einer höheren Konzentration von 3,16 $\mu\text{mol/l}$ scheint die Membranexpression nicht weiter zu reduzieren (Abb. 4.67 A). Auch die Inkubation der Zellen mit 1,8 $\mu\text{mol/l}$ PD158780 bewirkt eine Erniedrigung der Membranexpression auf 40% (Abb. 4.67 B). Betrachtet man die Gesamtexpression (grüne Balken in Abb. 4.67 A, B), so ist zu erkennen, dass diese im Vergleich zur Membranexpression weniger stark abnimmt. Die maximale Reduktion für beide TKI

beträgt ca. 40%. Dies bestätigt die Annahme, dass die Behandlung der Zellen mit den TKI, neben der Abnahme der Gesamtexpression, eine Veränderung der Lokalisation von BCRP bewirkt. Wie in Abb. 4.61 skizziert, kommt es vermutlich zu einer Internalisierung von BCRP.

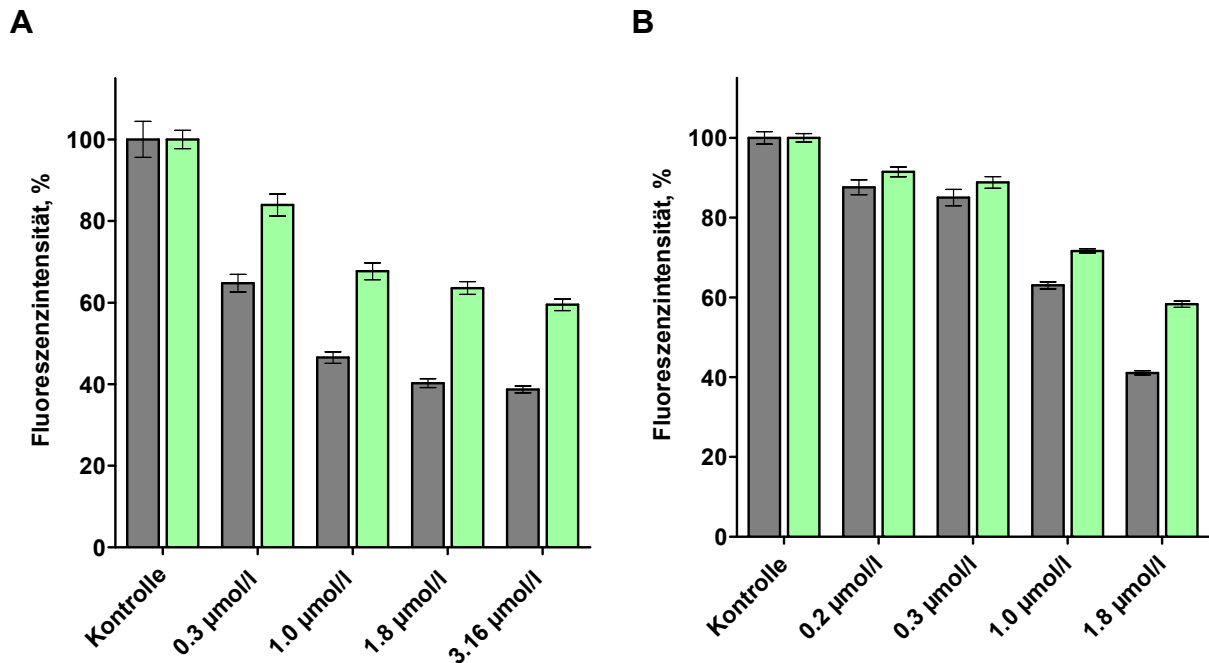


Abb. 4.67: Signifikante, dosisabhängige Abnahme der Membran- (graue Balken, 5D3) und der Gesamtexpression (grüne Balken, GFP) von BCRP in MDCK BCRP Zellen nach 72 h. A: Inkubation der Zellen mit Gefitinib, B: Inkubation der Zellen mit PD158780, $n \geq 3$.

Die folgende Abb. 4.68 A und B zeigt MDCK BCRP Zellen, die in Analogie zu den vorher dargestellten Durchflusszytometrie-basierten Experimenten zur Bestimmung des ABCG2 Expressionsstatus nicht mit dem Antikörper 5D3, sondern nach dem in Kapitel 3.17.2 beschriebenen Verfahren mit dem nicht fluoreszierenden Antikörper BXP-21 gelabelt wurden. Mittels fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen sollte die Abnahme des BCRP Gehaltes durch Gefitinib und PD158780 visualisiert werden. BXP-21 ist spezifisch für BCRP, bindet jedoch im Gegensatz zu 5D3 an ein intrazelluläres Epitop. Um die Zellmembran für den Antikörper durchlässig zu machen, mussten die Zellen daher zunächst mit 1%iger Triton[®]X-100 Lösung permeabilisiert werden (s. Kapitel 3.17.2).

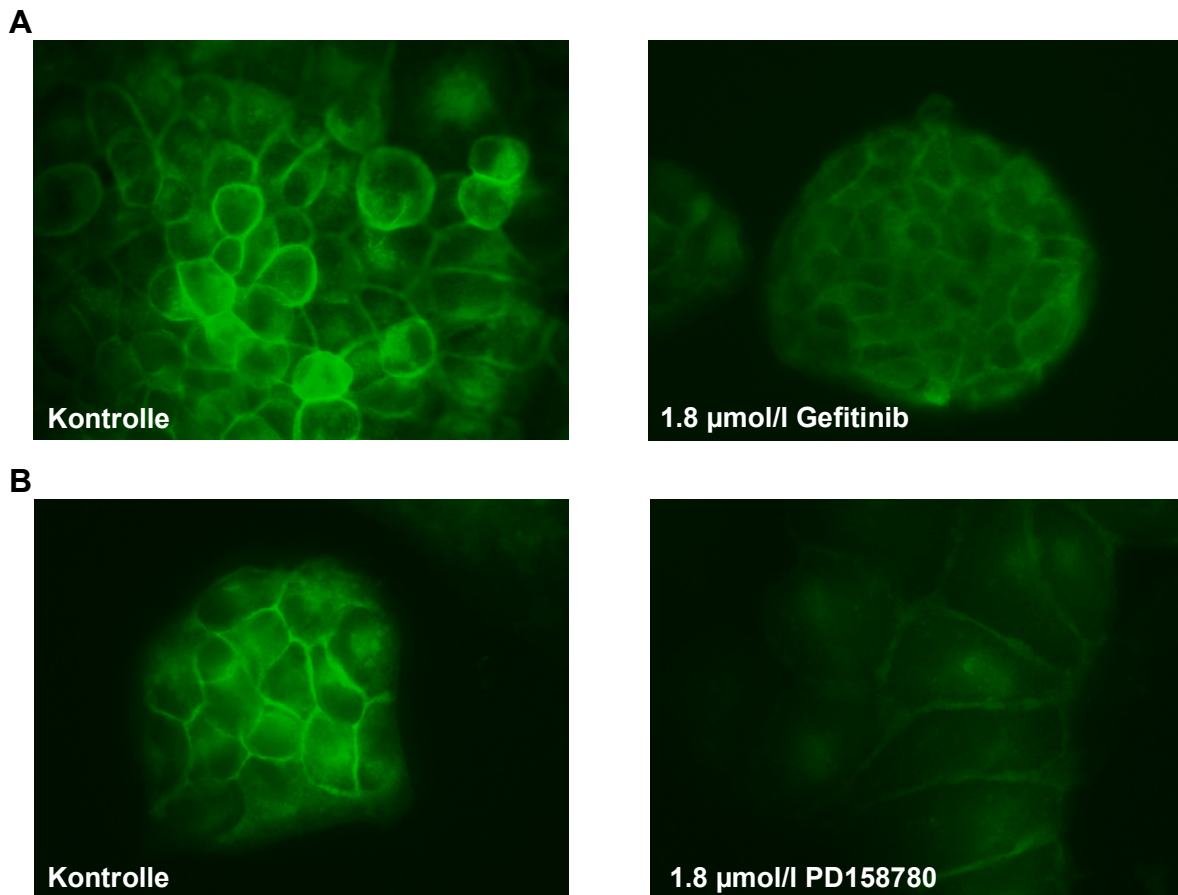


Abb. 4.68: MDCK BCRP Zellen, die mit dem Antikörper BXP-21 und dem FITC gelabelten Sekundärantikörper markiert und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops mit FITC-Filter betrachtet wurden. A: Abnahme der Membranexpression durch 1,8 µmol/l Gefitinib. B: Internalisierung von BCRP durch Inkubation der Zellen mit 1,8 µmol/l PD158780. Inkubationszeit: 72 h.

Die Tatsache, dass BXP-21 nicht selbst fluoresziert, macht die Verwendung eines FITC-gelabelten Sekundärantikörpers notwendig, der den Nachweis und die Quantifizierung des BCRP Gehaltes in MDCK BCRP Zellen ermöglicht.^{205,228} Die Zellen wurden dabei durch den FITC-Filter (Exzitationswellenlänge 488 nm, Emissionswellenlänge 520 nm) im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die beiden Abbildungen zeigen deutlich die Anfärbung der Zellen durch den Antikörperkomplex. Betrachtet man die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der unbehandelten Zellen (jeweils linke Abbildung) fällt diese Anfärbung besonders im Bereich der Zellmembran auf. Die Inkubation der Zellen mit 1,8 µmol/l Gefitinib (Abb. 4.68 A) bzw. 1,8 µmol/l PD158780 (Abb. 4.68 B) bewirkt eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität in der Zellmembran. Bei der Betrachtung der Wildtyp Zelllinie MDCK konnte (unter gleichen Bedingungen) keine Anfärbung der Zellen beobachtet werden. Zusätzlich zu den Durchflusszytometer-basierten Ergebnissen konnte die

Internalisierung von BCRP mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen nachgewiesen werden.

Nun war es von Interesse herauszufinden, wie sich die Inkubation von MDCK BCRP Zellen mit dem spezifischen PI3K/Akt Inhibitor LY294002 auswirkt. LY294002 interagiert nicht mit EGFR, sondern greift direkt in die Signaltransduktionskaskade ein, indem es reversibel das Enzym PI3K hemmt. Mit einem IC_{50} von $1,4 \mu\text{mol/l}$ ist LY294002 etwas weniger potent als Wortmannin, ein ebenfalls bekannter irreversibler PI3K Inhibitor ($IC_{50} = 5 \text{ nmol/l}$).²²⁹

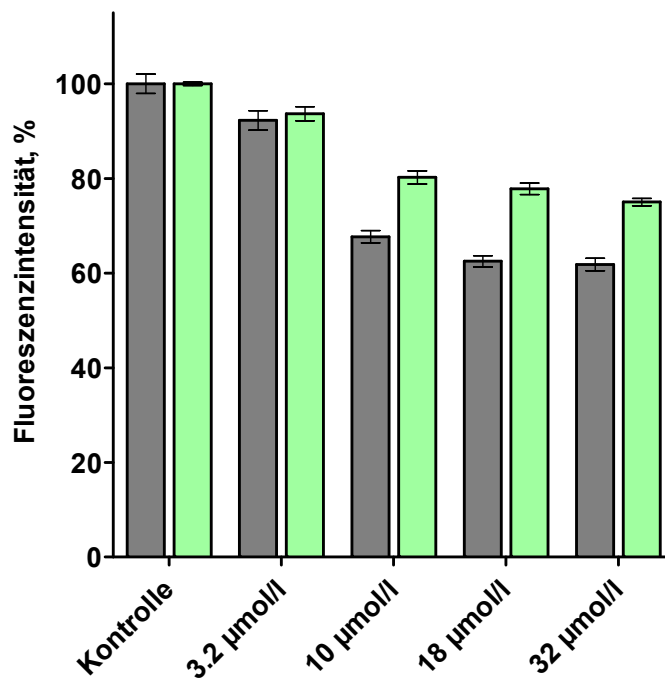


Abb. 4.69: Dosisabhängige Abnahme der Membran (graue Balken, 5D3) und der Gesamtexpression (grüne Balken, GFP) von BCRP durch Inkubation (72 h) von MDCK BCRP Zellen mit dem PI3K/Akt Inhibitor LY294002.

Abb. 4.69 zeigt das Balkendiagramm nach 72stündiger Inkubation von MDCK BCRP Zellen mit LY294002. Auch hier kommt es zu einer signifikanten dosisabhängigen Abnahme der Membran- (grau) und der Gesamtexpression (grün) von BCRP. Vergleicht man jedoch die Balkendiagramme in Abb. 4.67 A, B mit dem in Abb. 4.69 fällt auf, dass die Expressionsabnahme insgesamt weniger stark ausfällt. Bei einer Endkonzentration von $32 \mu\text{mol/l}$ LY294002 fällt die Membranexpression auf ca. 62%, die Gesamtexpression liegt bei ca. 75%. Die Inkubation der Zellen mit LY294002 diene als Positivkontrolle und beweist, dass der BCRP Expressionsstatus abhängig

ist von der PI3K/Akt-Signaltransduktionskaskade. Dabei scheint die direkte Hemmung des Enzyms PI3K mit LY294002 einen geringeren Einfluss auf die ABCG2 Genregulation auszuüben, als die Inhibition der Signaltransduktionskaskade mit den TKI via EGFR.

Auch die Arbeitsgruppe von Takada et al. hat den Einfluss der Aktivität des Enzyms PI3K auf den BCRP Expressionsstatus untersucht.¹⁰³ Dazu wurden mit BCRP transfizierte polarisierte LLC-PK-1 Zellen mit den beiden PI3K-Inhibitoren LY294002 und Wortmannin behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit dem BCRP Antikörper BXP-21 gelabelt und die Membranexpression am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass es nach Zusatz von 20 $\mu\text{mol/l}$ LY294002 bzw. 200 nmol/l Wortmannin zu einer Internalisierung von BCRP kommt. Auf der anderen Seite führte die Inkubation der Zellen mit EGF, dem natürlichen Liganden des EGFR, zu einer deutlichen Erhöhung der BCRP Membranexpression. In der Arbeit von Takada blieb die Gesamtexpression von BCRP allerdings unverändert (mittels Western-Blot nachgewiesen). Dies steht im Gegensatz zu den in dieser Arbeit festgestellten Ergebnissen. Ursache für die in der Studie von Takada unveränderte Gesamtexpression kann auf die relativ kurze Inkubationsdauer (ca. 2 h) der Zellen mit den Substanzen zurückzuführen sein, bei der im Normalfall noch keine Veränderung in der Genexpression nachgewiesen werden kann.

In einem anderen Zusammenhang wurde von der Arbeitsgruppe von Ee et al. der Einfluss von 17β -Estradiol auf die Genregulation von ABCG2 untersucht.¹⁰⁴ In der Literatur ist bekannt, dass bei der Behandlung von Zellen, die sowohl Estrogenrezeptor-positiv ($\text{ER}\alpha$ -positiv) als auch ABCG2 positiv sind, es mit Estrogenen zu einer Hochregulierung der BCRP Expression kommt.^{104,230,231,232} $\text{ER}\alpha$ -positive T47D:A18 Zellen, transfiziert mit ABCG2, wurden mit 17β -Estradiol inkubiert und der Gehalt an BCRP mRNA mittels RT-PCR analysiert. Um eine Veränderung in der Genexpression feststellen zu können, mussten die Zellen für mindestens 24 h mit dem Estrogen inkubiert werden. Die Arbeitsgruppe konnte in der Promotorregion des Gens, welches für *abcg2* kodiert, ein Estrogenresponse-Element (ERE) identifizieren. Als Promotor wird in der Genetik eine Nukleotid-Sequenz auf der DNA bezeichnet, die die regulierte Expression eines Gens ermöglicht. Die wichtigste Eigenschaft eines Promotors ist die spezifische Wechselwirkung mit bestimmten DNA-bindenden Proteinen wie in diesem Fall 17β -Estradiol, welche den

Start der Transkription des Gens durch die RNA-Polymerase vermitteln. Bindet nun 17β -Estradiol an das ERE, wird der Promotor aktiviert und es kommt in Folge zu einer Erhöhung der BCRP Expression. Ein ähnlicher Zusammenhang wird in einer Publikation von Zhang beschrieben.²³³ Die Bindung von 17β -Estradiol an das ERE in der Promotorregion von BCRP führt zu einer signifikanten Zunahme der BCRP Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. ER α - und BCRP-positive MCF-7 Zellen wurden mit 3 nmol/l 17β -Estradiol für mindestens 72 h inkubiert. Dabei erhöhte sich der mRNA Level von BCRP um das 8fache, der BCRP Proteinlevel stieg auf das 3fache. Beide Studien zeigen auf eindrucksvolle Weise, dass die Genregulation der BCRP Expression ein komplexer Vorgang ist, der durch die unterschiedlichsten Faktoren beeinflusst werden kann.

In einer Studie von Nakanishi et al. wurde die Interaktion zwischen BCRP und Imatinib in BCR-ABL positiven K562 Zellen untersucht.²¹ Bei den K562 Zellen handelt es sich um eine humane CML Zelllinie, die aufgrund ihrer Entartung eine hohe PI3K-Aktivität aufweist. Die Behandlung der Zellen mit Imatinib führt zu einer Inhibition des PI3K/Akt-Signaltransduktionsweges und in Folge zu einer Downregulation des ABC-Transporters BCRP. Nachdem die Zellen mit 5 μ mol/l Imatinib behandelt wurden, wurde die Membranexpression von BCRP mittels Antikörper 5D3 am Durchflusszytometer untersucht. Die Expressionsabnahme war dabei zeit- und dosisabhängig. Bei einer Konzentration von 5 μ mol/l Imatinib sank der BCRP Gehalt nach 14 h um 60%. Eine Imatinibkonzentration von 0,1 μ mol/l bzw. 0,25 μ mol/l führte nach 120 h zu einer Reduktion auf 50% bzw. 35%. Im Gegensatz dazu blieb der BCRP Gehalt in BCR-ABL negativen MCF-7/AdrVp Zellen nach Behandlung mit Imatinib unverändert. Zusätzlich wurde auch die Veränderung in der Gesamtexpression von BCRP mittels Western-Blot untersucht. Auch hier kam es zu einer Downregulation von BCRP um 50% nach 14stündiger Inkubation mit 5 μ mol/l Imatinib. Der BCRP Gehalt in BCR-ABL negativen Zellen veränderte sich nicht. Des Weiteren wurde in dieser Studie auch der Effekt von LY294002 auf den BCRP Expressionsstatus untersucht. Die direkte Inhibition des PI3K/Akt-Signaltransduktionsweges mit 10-50 μ mol/l LY294002 führte nach 14 h zu einer ähnlichen Reduktion der Gesamtexpression wie bei Imatinib. Die Ergebnisse der Studie zeigen, in Übereinstimmung mit dieser Arbeit, dass die Aktivität der PI3K/Akt-Signaltransduktionskaskade eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der BCRP Expression spielt.

Nun stellte sich die Frage, ob und in welchem Ausmaß die beiden BCR-ABL Inhibitoren Imatinib und Nilotinib Einfluss auf die ABCG2 Expression in BCR-ABL negativen MDCK BCRP Zellen ausüben. Wie bereits erwähnt, interagieren die beiden Verbindungen nicht mit dem EGF-Rezeptor, sondern inhibieren selektiv die Tyrosinkinase in BCR-ABL positiven Zellen. Demnach sollte die Behandlung von MDCK BCRP Zellen mit den beiden Substanzen die BCRP Expression nicht beeinflussen.

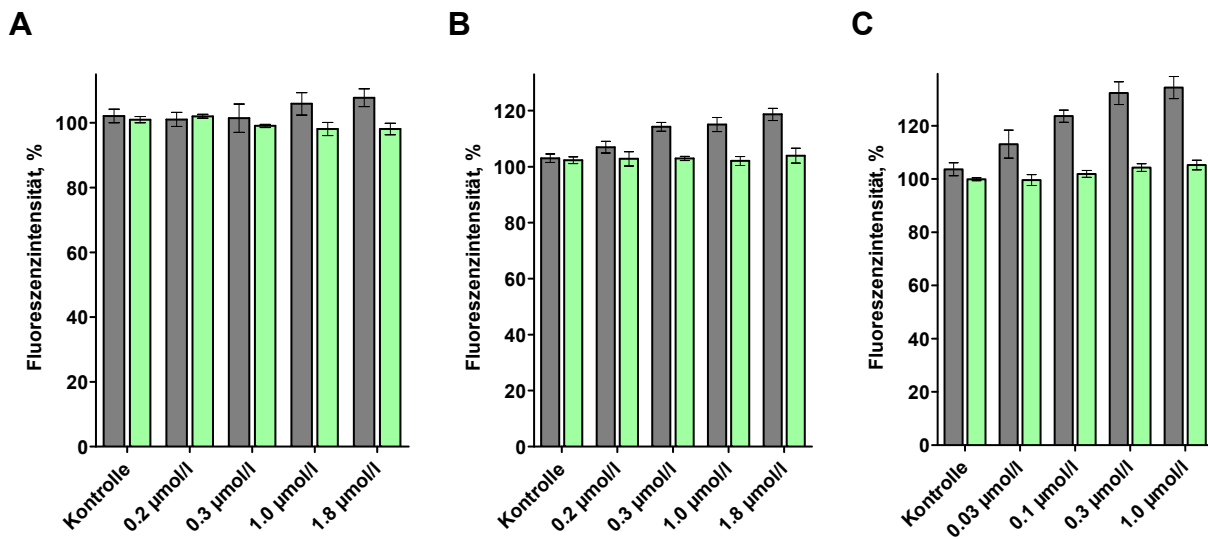


Abb. 4.70: Einfluss der BCR-ABL Inhibitoren Imatinib (A) und Nilotinib (B) und Ko143 (C) auf den BCRP Expressionsstatus (MDCK BCRP Zellen, Inkubation 72 h). Die Verbindungen bewirken eine verstärkte Interaktion zwischen BCRP und dem Antikörper 5D3 (graue Balken).

Diese Überlegung bestätigt sich, wenn man Abb. 4.70 A und B betrachtet. MDCK BCRP Zellen wurden für 72 h mit ansteigenden Konzentrationen Imatinib (Abb. 4.70 A) und Nilotinib (Abb. 4.70 B) behandelt und der BCRP Expressionsstatus am Durchflusszytometer detektiert. Wie aus Abb. 4.70 A und B hervorgeht, kommt es weder zu einer Abnahme der Membran- (grau) noch der Gesamtexpression (grün) von BCRP. Im Gegenteil scheint der ABCG2 Gehalt in der Plasmamembran (graue Balken) mit steigender Modulatorkonzentration noch zuzunehmen. Zusätzlich wurde der BCRP spezifische Modulator Ko143 hinsichtlich einer Beeinflussung der BCRP Genregulation untersucht. Da Ko143 nicht an den EGF-Rezeptor bindet, sondern direkt mit BCRP interagiert, sollte es auch hier zu keiner Veränderung des BCRP Expressionsstatus kommen. Wie aus Abb. 4.70 C hervorgeht, bleibt die Gesamtexpression (grüne Balken) von BCRP nach Inkubation mit Ko143

unverändert. Aber auch hier scheint die BCRP Expression in der Membran (graue Balken) mit steigenden Modulatorkonzentrationen zuzunehmen. Wie ist dieses Phänomen zu erklären? Die Zunahme des BCRP Gehalts in der Plasmamembran kann zwei mögliche Ursachen haben: (1) zum einen besteht die Möglichkeit, dass die BCR-ABL Inhibitoren bzw. Ko143 in der Lage sind, ähnlich wie 17 β -Estradiol, eine Erhöhung der BCRP Expression zu induzieren, (2) zum anderen kann es möglich sein, dass die Anwesenheit bestimmter Verbindungen die Bindung des Antikörpers 5D3 beeinflussen und in Folge der BCRP Gehalt in der Plasmamembran scheinbar erhöht wird. Laut Literatur ist bekannt, dass bestimmte Substanzen in der Lage sind, die Bindung des Antikörpers 5D3 zu modulieren.^{148,234} Dabei ist die Bindung des Antikörpers an sein extrazelluläres Epitop abhängig von der Konformation von BCRP. Die Inhibition von BCRP mit dem spezifischen Modulator Ko143 führt zu einer verstärkten Interaktion zwischen BCRP und 5D3 und erhöht die Bindung des Antikörpers. Bei dem von Higgins und Linton beschriebenen ATP-Switch-Modell (Kapitel 1.5.5) befinden sich die Nukleotidbindungsstellen im basalen Zustand in einer offenen Dimerkonfiguration mit einer geringen Affinität zu ATP. Der eigentliche Transportzyklus von BCRP beginnt, indem das Substrat an seine Bindungsstelle mit hoher Affinität (high affinity site) bindet. In diesem Zustand scheint die Affinität des Antikörpers 5D3 an BCRP am größten zu sein. Hemmt man die BCRP Aktivität dagegen mit Natriumorthovanadat, kommt es zu einer verminderten Bindung von 5D3. Natriumorthovanadat lagert sich an das nach der Hydrolyse von ATP entstandene ADP an und hemmt so dessen Freisetzung. Damit bleibt ein Vanadatgebundener Übergangszustand bestehen, der es BCRP nicht mehr erlaubt, in seinen Grundzustand zurückzukehren. Da die Freisetzung von Vanadat aus dem ADP-Vanadat-Komplex heraus nur sehr langsam verläuft, kommt der Transportprozess somit zum Erliegen. In diesem "eingefrorenen" Zustand ist BCRP nicht mehr in der Lage den Antikörper zu binden. Auch der Zusatz des nicht-hydrolysierbaren AMP-PNP Komplex führt zu einer verminderten Interaktion mit 5D3. Aus diesen Ausführungen aus der Literatur geht hervor, dass die aktuelle Konformation von BCRP signifikant die Bindung des Antikörpers an sein extrazelluläres Epitop beeinflusst. Das Balkendiagramm in Abb. 4.70 C bestätigt die Angaben aus der Literatur. Die Inkubation der Zellen mit steigenden Konzentrationen Ko143 führt zu einer erhöhten Interaktion zwischen BCRP und 5D3 (graue Balken). Die Behandlung der Zellen mit 1,0 $\mu\text{mol/l}$ Ko143 bewirkt eine Steigerung der Bindung des Antikörpers

um 30%. Die Tatsache, dass die Gesamtexpression konstant bleibt (grüne Balken in Abb. 4.70 A-C) zeigt, dass die Regulation der Genexpression durch Ko143 bzw. durch Imatinib und Nilotinib nicht beeinflusst wird und die Ergebnisse ausschließlich auf der konformationsbedingten Erhöhung der Interaktion zwischen BCRP und 5D3 beruhen.

Die Tatsache, dass die Bindung des Antikörpers von der Anwesenheit bestimmter Modulatoren beeinflusst werden kann, warf die Frage auf, ob möglicherweise auch EGFR Inhibitoren zu einer Veränderten Interaktion von 5D3 mit BCRP führen und die bislang erzielten Ergebnisse nur aufgrund dieser speziellen Wechselwirkung zustande kamen.

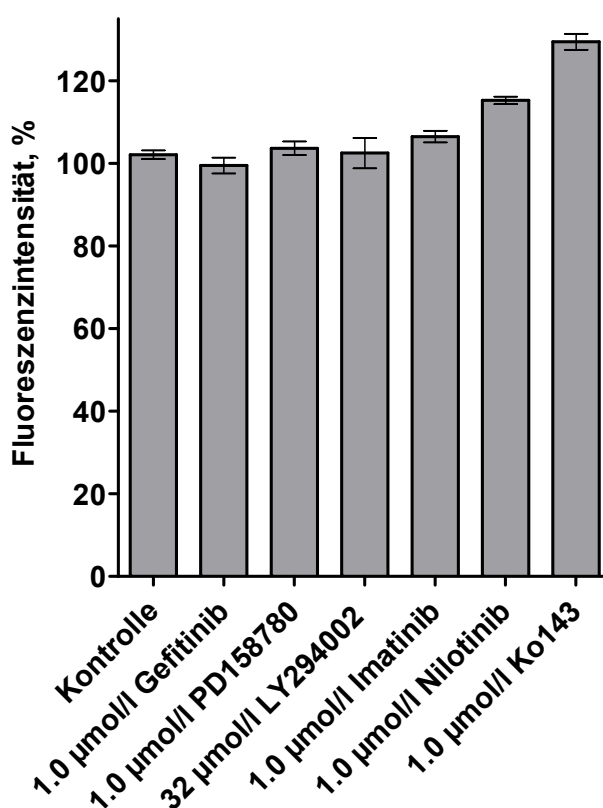


Abb. 4.71: Einfluss der untersuchten Verbindungen auf die Interaktion zwischen BCRP und dem Antikörper 5D3 bei einer Inkubationszeit von 4 Stunden (MDCK BCRP Zellen).

Um dies zu widerlegen wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt, bei dem MDCK BCRP Zellen mit fixen Konzentrationen der Testsubstanzen für die Dauer von 4 h inkubiert wurden. Der Inkubationszeitraum war bei der Durchführung des Experimentes von entscheidender Bedeutung. Eine Behandlung der Zellen für vier Stunden reicht aus, um eine eventuelle Beeinflussung der Substanzen auf die

Antikörperbindung zu detektieren. Auf der anderen Seite darf es während dieser Zeit noch nicht zu einer Internalisierung bzw. Induktion von BCRP in die Plasmamembran kommen, da dies zu falsch positiven Ergebnissen führen würde. Die Ergebnisse des Kontrollexperimentes sind in Abb. 4.71 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die EGFR Inhibitoren Gefitinib und PD158780 und der PI3K/Akt Inhibitor LY294002 die Bindung des Antikörpers nicht beeinflussen. Die Fluoreszenzwerte unterscheiden sich nicht von der Kontrolle (unbehandelte Zellen). Eine leichte Erhöhung des Fluoreszenzwertes konnte bei den beiden BCR-ABL Inhibitoren Imatinib und Nilotinib festgestellt werden. In Übereinstimmung mit der Literatur und den in Abb. 4.70 C gezeigten Ergebnissen, führt die Inkubation der Zellen mit 1,0 $\mu\text{mol/l}$ Ko143 nach 4 h zu einer deutlichen Zunahme der 5D3 Bindung.

TKI stellen eine Möglichkeit dar, die EGFR-vermittelte gesteigerte Proliferation, Metastasierung, Angiogenese und die verminderte Apoptose in Krebszellen zu inhibieren. Eine Alternative ist die Behandlung der Patienten mit dem chimären monoklonalen IgG₁-Antikörper Cetuximab, der spezifisch gegen EGFR gerichtet ist. Cetuximab blockiert die Bindung endogener EGFR-Liganden und induziert die Internalisierung des EGF-Rezeptors (s. Kapitel 1.6). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob Cetuximab - ähnlich wie die TKI - Einfluss auf die ABCG2 Genregulation nimmt. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abb. 4.72 zusammengefasst. Die Behandlung von MDCK BCRP Zellen mit steigenden Konzentrationen Cetuximab für 72 h bewirkt eine Internalisierung von BCRP (graue Balken Abb. 4.72). Im Vergleich zu den TKI ist die Abnahme der Membranexpression jedoch wesentlich geringer ausgeprägt. Die Reduktion des BCRP Gehalts in der Membran nach Behandlung der Zellen mit 1200 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab beträgt lediglich 20% im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte Zellen). Betrachtet man die grünen Balken in Abb. 4.72, fällt auf, dass die Gesamtexpression kaum beeinflusst wird. Wie bereits beschrieben (Kapitel 1.6), soll Cetuximab seine Wirkung hauptsächlich über die K-Ras-Signaltransduktionskaskade entfalten. Dies bedeutet, dass die PI3K/Akt-Kaskade bei der Behandlung der Zellen mit Cetuximab nicht oder nur in geringem Maße inhibiert wird und demnach keine Auswirkung auf die BCRP Gesamtexpression festzustellen ist. Trotzdem scheint der Antikörper eine Downregulation von BCRP zu bewirken.

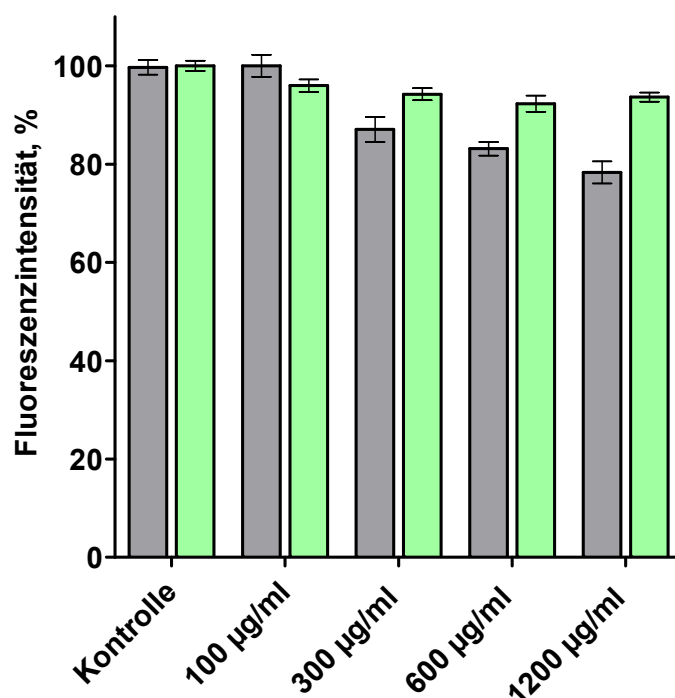


Abb. 4.72: Einfluss des EGFR Antikörpers Cetuximab auf die ABCG2 Genregulation (72 h Inkubationszeit, MDCK BCRP Zellen). Während die Membranexpression leicht abnimmt (graue Balken, 5D3) bleibt die Gesamtexpression (grüne Balken, GFP) nahezu unverändert.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die EGFR Inhibitoren Gefitinib und PD158780 und der PI3K/Akt Inhibitor LY294002 in der Lage sind, den Expressionsstatus von ABCG2 via PI3K/Akt-Signaltransduktionskaskade zu verringern. Zusätzlich kommt es zu einer Internalisierung von BCRP. Die BCR-ABL Inhibitoren Imatinib und Nilotinib und Ko143 - Verbindungen, die nicht mit EGFR interagieren - zeigen keinen Einfluss auf den BCRP Expressionslevel. Diese Substanzen bewirken lediglich eine verstärkte Interaktion zwischen dem Antikörper 5D3 und BCRP. Der EGFR spezifische Antikörper Cetuximab bewirkt zwar eine Downregulation des Proteins in der Membran, aufgrund des Wirkmechanismus via K-Ras-Signaltransduktionskaskade bleibt die Gesamtexpression jedoch nahezu unverändert.

Doch was ist zu erwarten, wenn zwei Verbindungen mit unterschiedlichem Wirkmechanismus kombiniert werden? Kommt es möglicherweise zu überadditiven Effekten, wenn ein TKI mit dem PI3K/Akt Inhibitor LY294002 bzw. mit Cetuximab in niedrigen Konzentrationen kombiniert wird? Dazu wurden MDCK BCRP Zellen für 72 h sowohl mit den Einzelsubstanzen als auch in Kombination inkubiert und der

ABCG2 Expressionsstatus am Durchflusszytometer bestimmt. Abb. 4.73 A und B zeigt die Ergebnisse dieser Kombinationsexperimente.

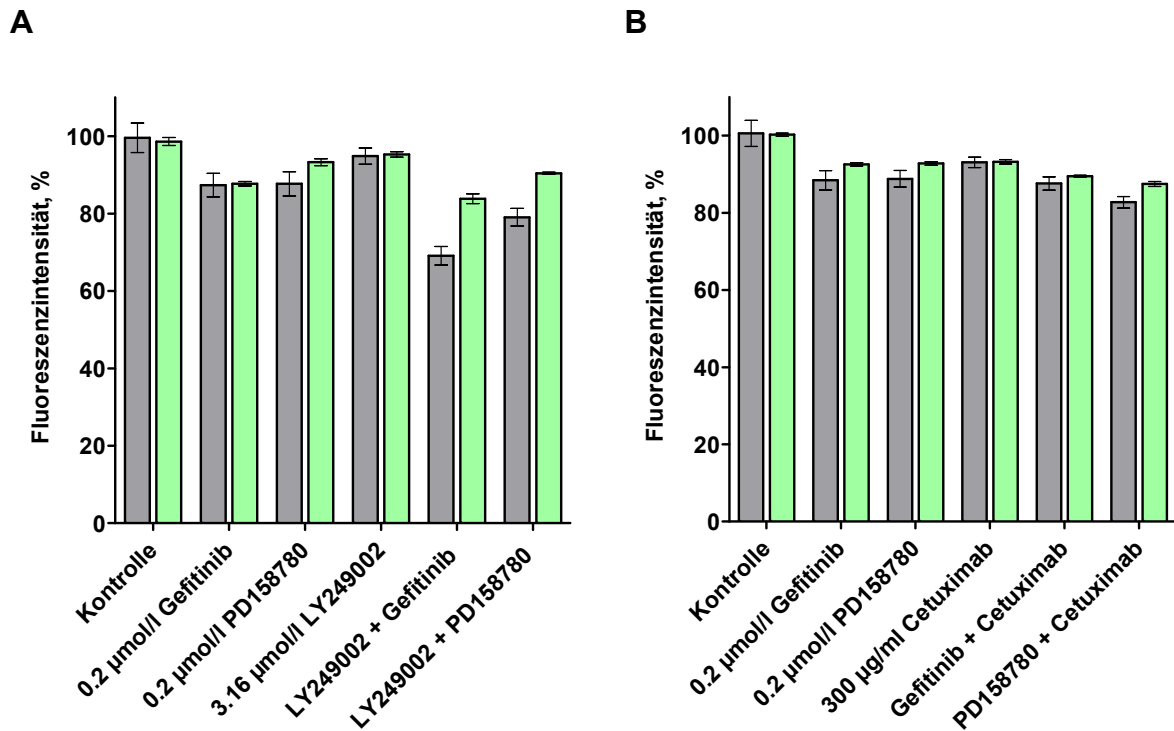


Abb. 4.73 A: Kombination von Gefitinib bzw. PD158780 mit LY294002 führt zu überadditiven Effekten sowohl hinsichtlich der Membran- (grau, 5D3) als auch der Gesamtexpression (grün, GFP) von BCRP. **B:** Bei Kombination eines EGFR Inhibitors mit Cetuximab bleibt der BCRP Expressionsstatus unbeeinflusst. Inkubationszeit 72 h.

In Abb. 4.73 A ist der resultierende BCRP Gehalt nach Behandlung der Zellen mit 0,2 µmol/l Gefitinib bzw. PD158780 und 3,2 µmol/l LY294002 sowie in Kombination zu erkennen. Die alleinige Inkubation der Zellen mit den EGFR Inhibitoren Gefitinib bzw. PD158780 in einer Konzentration von 0,2 µmol/l und dem PI3K/Akt Inhibitor LY294002 (Endkonzentration 3,2 µmol/l) führt zu einer geringfügigen Abnahme der Membran- (graue Balken) und der Gesamtexpression (grüne Balken) von BCRP. In Kombination kommt es jedoch zu einer signifikanten Reduktion des BCRP Gehaltes in der Plasmamembran. Die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit PD158780 und LY294002 bewirkt eine Abnahme des Proteingehaltes um 25%. Ersetzt man PD158780 durch Gefitinib, sinkt der BCRP Gehalt sogar um 35%. Die Abnahme der Membranexpression lässt sich durch die Kombination eines EGFR Inhibitors mit einem PI3K/Akt Inhibitor steigern. Um den gleichen Effekt zu erzielen sind dabei deutlich geringere Konzentrationen nötig. Vergleicht man Abb. 4.73 A mit Abb. 4.67

A und B fällt auf, dass bei alleiniger Inkubation Konzentrationen von 0,3 $\mu\text{mol/l}$ Gefitinib bzw. 1,0 $\mu\text{mol/l}$ PD158780 nötig sind, um den BCRP Gehalt auf 65% zu reduzieren.

Wird dagegen ein EGFR Inhibitor mit dem EGFR Antikörper Cetuximab kombiniert, so kommt es zu keiner signifikanten Änderung der ABCG2 Expression (Abb. 4.73 B). Sowohl die Membran- (grau) als auch die Gesamtexpression (grün) unterscheiden sich bei Kombination von Gefitinib und Cetuximab bzw. PD158780 und Cetuximab nicht von der Behandlung mit den Verbindungen allein. Laut Fachinformation des Herstellers¹⁷⁰ induziert Cetuximab eine Internalisierung des EGF-Rezeptors und führt somit zu einer Downregulation des Proteins. Möglicherweise kommt es auch bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zu einer Internalisierung des EGF-Rezeptors in MDCK BCRP Zellen, wenn diese mit Cetuximab behandelt werden. Dies hat zur Folge, dass weniger EGFR als Angriffspunkt für die TKI zur Verfügung steht und der Effekt der TKI - in diesem Fall die Abnahme der BCRP Expression via PI3K/Akt-Signaltransduktionskaskade - abgeschwächt wird. Folglich ist bei Kombination eines TKI mit Cetuximab kein überadditiver Effekt feststellbar.

Um zu überprüfen, ob eine Behandlung von EGFR positiven Zellen mit Cetuximab tatsächlich zu einer Internalisierung des Rezeptors führt, wurde ein entsprechendes Kontrollexperiment durchgeführt. Cal-27 Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen Cetuximab versetzt und nach 72 h der EGFR Expressionsstatus mit dem EGFR spezifischen Antikörper am Durchflusszytometer untersucht (FL2) (vergl. Kapitel 3.16.2). Die Zelllinie Cal-27 wurde ausgewählt, da sie per se einen höheren EGFR Gehalt aufweist, und eine Abnahme in der Expression besser detektiert werden kann. Abb. 4.74 zeigt den EGFR Expressionsstatus von Cal-27 Zellen nach 72stündiger Inkubation mit Cetuximab. Es ist deutlich zu erkennen, dass eine Cetuximabkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ zu einer signifikanten Abnahme des EGFR Gehaltes in der Plasmamembran auf ca. 65% führt. Die Expressionsabnahme lässt sich durch höhere Konzentrationen nur noch geringfügig steigern.

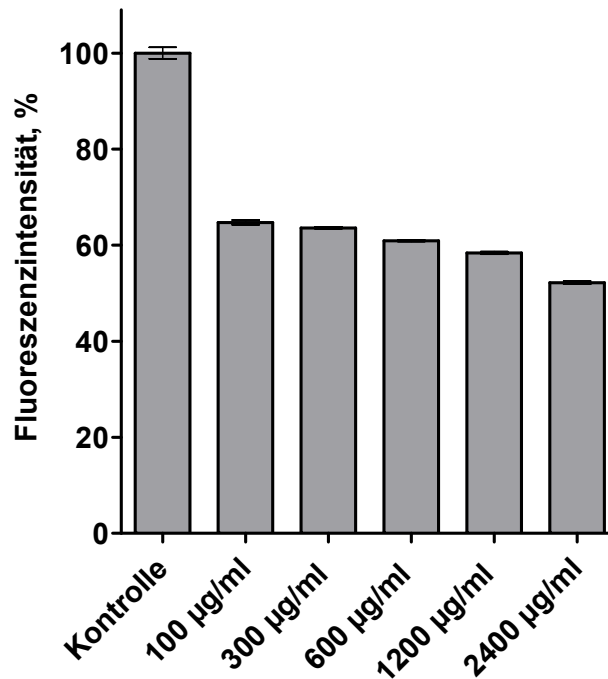


Abb. 4.74: Inkubation von Cal-27 Zellen (72 h) mit Cetuximab führt zu einer signifikanten Downregulation des EGF-Rezeptors.

Um die Aussage dieses Experimentes zu verifizieren, musste ausgeschlossen werden, dass sich die beiden Antikörper in ihrer Bindung an den Rezeptor beeinträchtigen. Da beide Antikörper an ein extrazelluläres Epitop von EGFR binden, ist es durchaus möglich, dass die Abnahme des Fluoreszenzwertes lediglich aufgrund einer Verdrängung oder sterischen Hinderung des EGFR Antikörpers durch Cetuximab zustande kommt. Deshalb wurde das gleiche Experiment zusätzlich bei einer Inkubationszeit von 1 h durchgeführt. Nach diesem Zeitraum sollte eine Internalisierung des EGFR noch nicht nachweisbar sein. Beeinflussen sich beide Antikörper in Ihrer Bindung im Sinne einer sterischen Hinderung, so sollte der Fluoreszenzwert nach 1 h bereits signifikant abnehmen. Das Balkendiagramm in Abb. 4.75 zeigt, dass sich der Fluoreszenzwert der Kontrolle (unbehandelte Zellen) nicht von dem Fluoreszenzwert der mit Cetuximab behandelten Zellen unterscheidet. Eine gegenseitige Beeinträchtigung in der Bindung der Antikörper an den EGF-Rezeptor kann aufgrund dieses Ergebnisses ausgeschlossen werden.

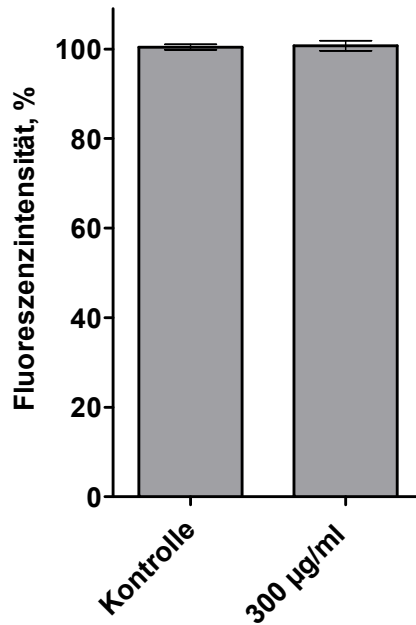


Abb. 4.75: Inkubation von Cal-27 Zellen für 1 h mit Cetuximab. Die Zellen wurden mit dem spezifischen EGFR-Antikörper markiert und am Durchflusszytometer untersucht (FL2). Der Fluoreszenzwert der mit Cetuximab behandelten Zellen unterscheidet sich nicht von der Kontrolle (unbehandelte Zellen).

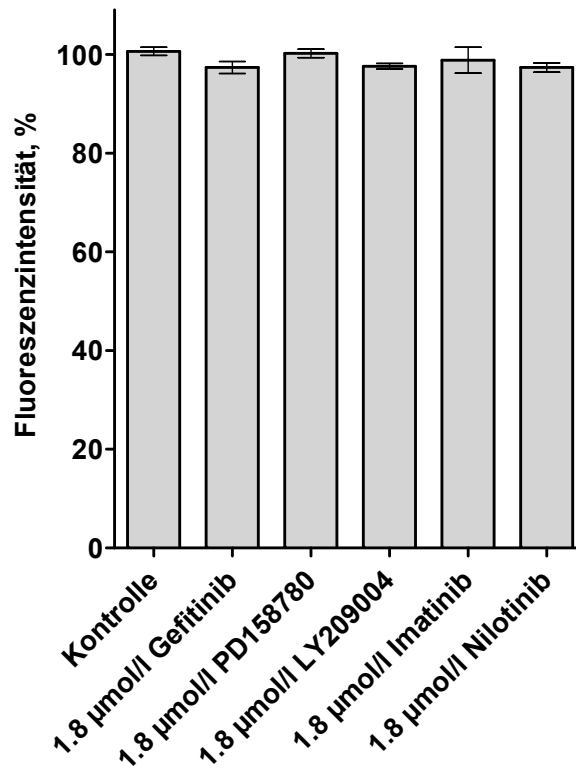


Abb. 4.76: Einfluss der TKI auf den EGFR Expressionsstatus (Cal-27 Zellen, 72 h Inkubation).

Die Tatsache, dass Cetuximab in der Lage ist eine Downregulation von EGFR zu induzieren, führte zu der Überlegung, ob nicht auch die TKI Einfluss auf den EGFR Expressionsstatus nehmen. Ein veränderter EGFR Gehalt durch TKI könnte sich auch auf die PI3K/Akt vermittelte Abnahme der BCRP Expression auswirken. Abb. 4.76 zeigt die mögliche Beeinflussung der untersuchten TKI und LY294002 in Cal-27 Zellen nach 72stündiger Inkubationszeit. Die resultierenden Fluoreszenzwerte unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrolle (unbehandelte Zellen). Die Behandlung der Zellen mit den Verbindungen bleibt ohne Einfluss auf die EGFR Expression.

4.10.5 Untersuchung der Expressionsabnahme von BCRP auf funktioneller Ebene mittels Pheophorbid A-Assay

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass TKI Einfluss auf die ABCG2 Genregulation nehmen. Die Abnahme der BCRP Expression via PI3K/Akt-Signaltransduktionskaskade konnte sowohl hinsichtlich des Gesamt- als auch des Membrangehaltes nachgewiesen werden. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich die Expressionsabnahme von BCRP auch auf funktioneller Ebene auswirkt. Dazu wurden TKI in Kombination mit einem Standardmodulator mit Hilfe des Pheophorbid A-Assays am Durchflusszytometer analysiert. Für die Durchführung solcher Kombinationsexperimente wurden Konzentrations-Effektkurven von XR9577 in unbehandelten Zellen (Kontrolle) und in mit fixen Konzentrationen der EGFR Inhibitoren Gefitinib und PD158780 und der BCR-ABL Inhibitoren Imatinib und Nilotinib behandelten Zellen aufgenommen (vgl. Kapitel 3.15.4). Ein verminderter ABCG2 Expressionsstatus zeigt sich durch einen Anstieg des Bottom-Wertes, d.h. die Response nimmt im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte Zellen) ab. Gleichzeitig kommt es zu einer Erhöhung des pIC_{50} Wertes des Standardmodulators XR9577. Zusätzlich konnte bei der Durchführung der Experimente überprüft werden, ob das in der Plasmamembran exprimierte BCRP überhaupt noch funktionsfähig war. Um den Eigeneffekt bzw. mögliche allosterische Effekte der untersuchten TKI ausschließen zu können, musste sichergestellt werden, dass die Verbindungen vor der Durchführung der Experimente möglichst quantitativ entfernt wurden. Daher wurde das Nährmedium einige Stunden vor Beginn des Erntens der Zellen

abgesaugt und die 6-Well Platten mehrmals mit frischem Nährmedium versetzt. Dies sollte gewährleisten, dass die Ergebnisse ausschließlich auf die veränderte BCRP Expression zurückzuführen sind.

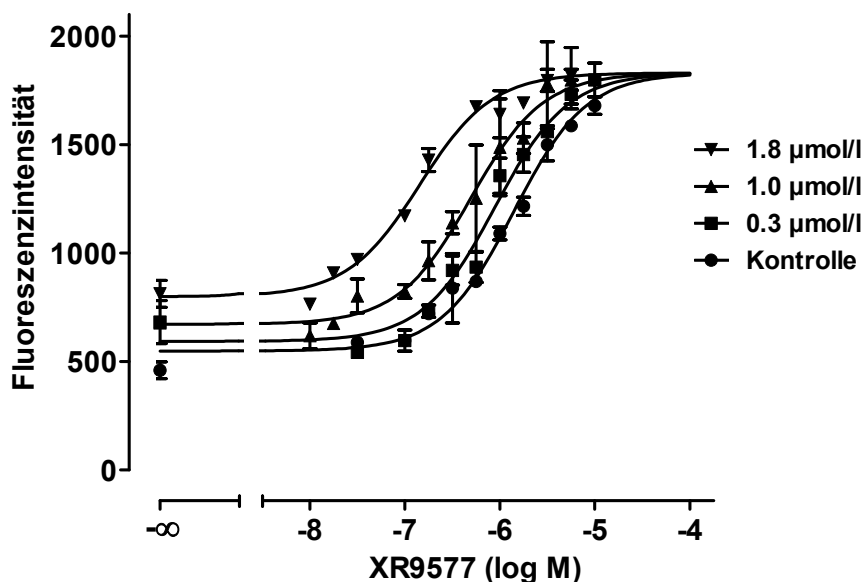


Abb. 4.77: Untersuchung des BCRP Expressionsstatus auf funktioneller Ebene nach Inkubation von MDCK BCRP Zellen mit Gefitinib (72 h) mittels Pheophorbid A-Assay. Beispiel für ein typisches Experiment aus einer Serie von mind. drei unabhängigen Einzelerperimenten.

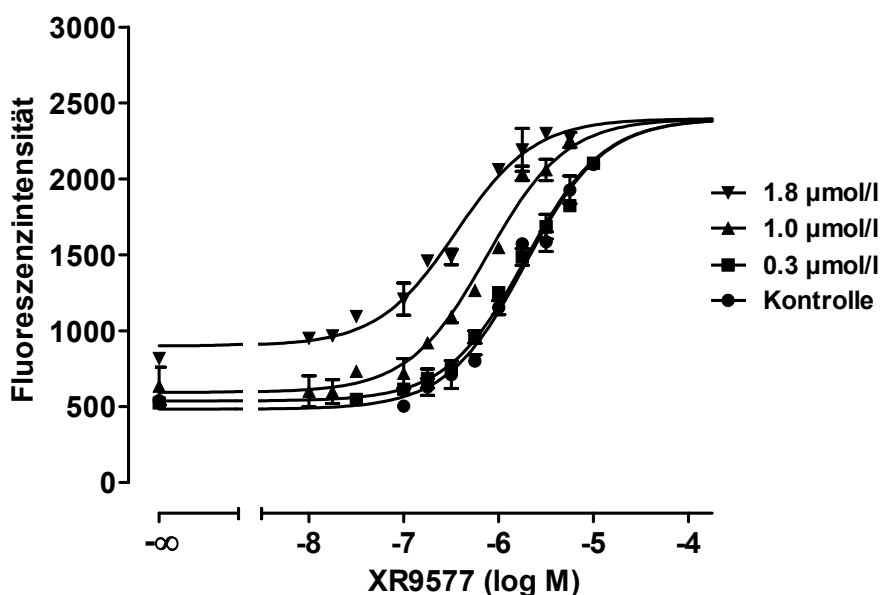


Abb. 4.78: Untersuchung des BCRP Expressionsstatus auf funktioneller Ebene nach Inkubation von MDCK BCRP Zellen mit PD158780 (72 h) mittels Pheophorbid A-Assay (n = 3).

Abb. 4.77 und Abb. 4.78 zeigen die Expressionsabnahme von BCRP in MDCK BCRP Zellen auf funktioneller Ebene nach 72stündiger Inkubation mit den EGFR Inhibitoren Gefitinib (Abb. 4.77) und PD158780 (Abb. 4.78). Gefüllte Kreise zeigen die Konzentrations-Effektcurve von XR9577, die aus den unbehandelten Zellen mit unverändertem BCRP Expressionsstatus resultiert. Es ist offensichtlich, dass die Bottom-Werte der einzelnen Konzentrations-Effektkurven in den mit den EGFR Inhibitoren behandelten Zellen konzentrationsabhängig angehoben werden. Je geringer der BCRP Gehalt in den Zellen ist, desto höher ist die Ausgangsfluoreszenz des Substrates Pheophorbid A bei niedrigen Inhibitorkonzentrationen. Der Topwert, d.h. der Maximaleffekt des Modulators bleibt hingegen unverändert. Die beiden Abbildungen zeigen auch, dass mit abnehmenden BCRP Gehalt die Konzentrations-Effektcurve von XR9577 signifikant parallel nach links verschoben wird, d.h. der pIC_{50} -Wert der Verbindung wird größer.

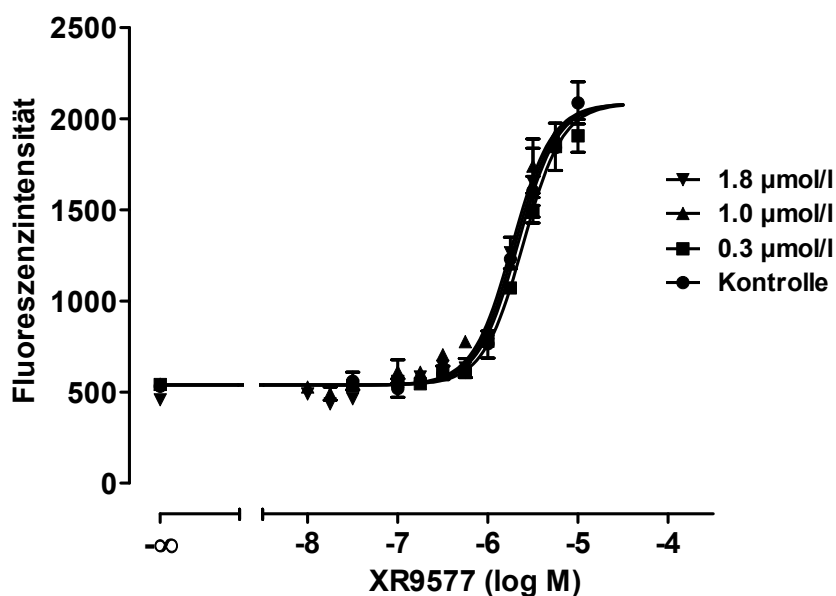


Abb. 4.79: Behandlung von MDCK BCRP Zellen (72 h) mit ansteigenden Konzentrationen Imatinib. Ein Einfluss auf die BCRP Expression auf funktioneller Ebene mittels Pheophorbid A-Assay konnte nicht nachgewiesen werden.

In Abb. 4.79 und Abb. 4.80 sind die resultierenden Konzentrations-Effektkurven des Modulators XR9577 wiedergegeben, die in mit Imatinib (Abb. 4.79) bzw. Nilotinib (Abb. 4.80) behandelten MDCK BCRP Zellen mittels Pheophorbid A-Assay aufgenommen wurden. Wie bereits zu erwarten war, ist kein Unterschied in den

Konzentrations-Effektkurven feststellbar. Weder die Bottom- noch die pIC_{50} -Werte unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle.

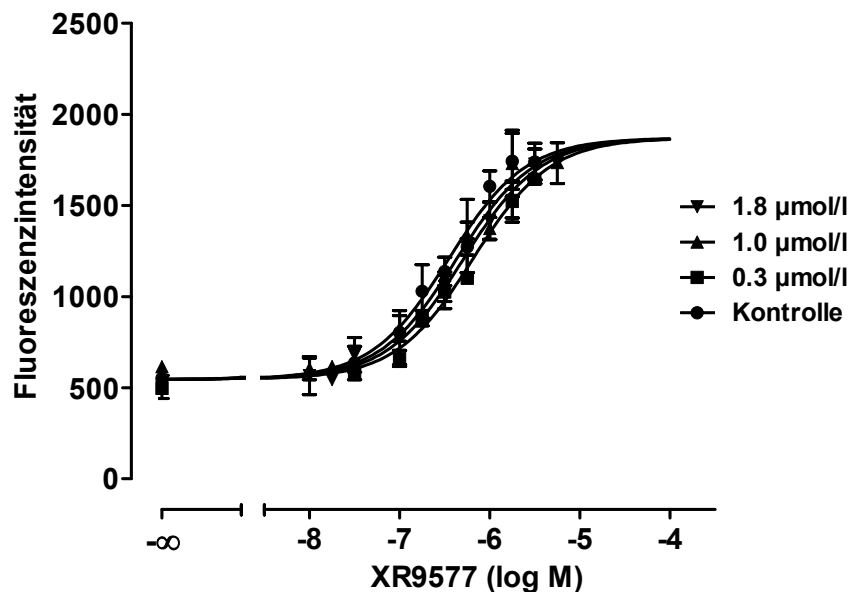


Abb. 4.80: Behandlung von MDCK BCRP Zellen (72h) mit ansteigenden Konzentrationen Nilotinib. Ein Einfluss auf die BCRP Expression auf funktioneller Ebene mittels Pheophorbid A-Assay konnte nicht nachgewiesen werden.

Neben der Abnahme der Gesamt- und der Membranexpression von BCRP auf Proteinebene durch die EGFR Inhibitoren Gefitinib und PD158780, konnte mit Hilfe des Pheophorbid A-Assays auch die verminderte BCRP Expression auf funktioneller Ebene nachgewiesen werden. Die Aktivität des in der Plasmamembran exprimierten Proteins bleibt dabei erhalten.

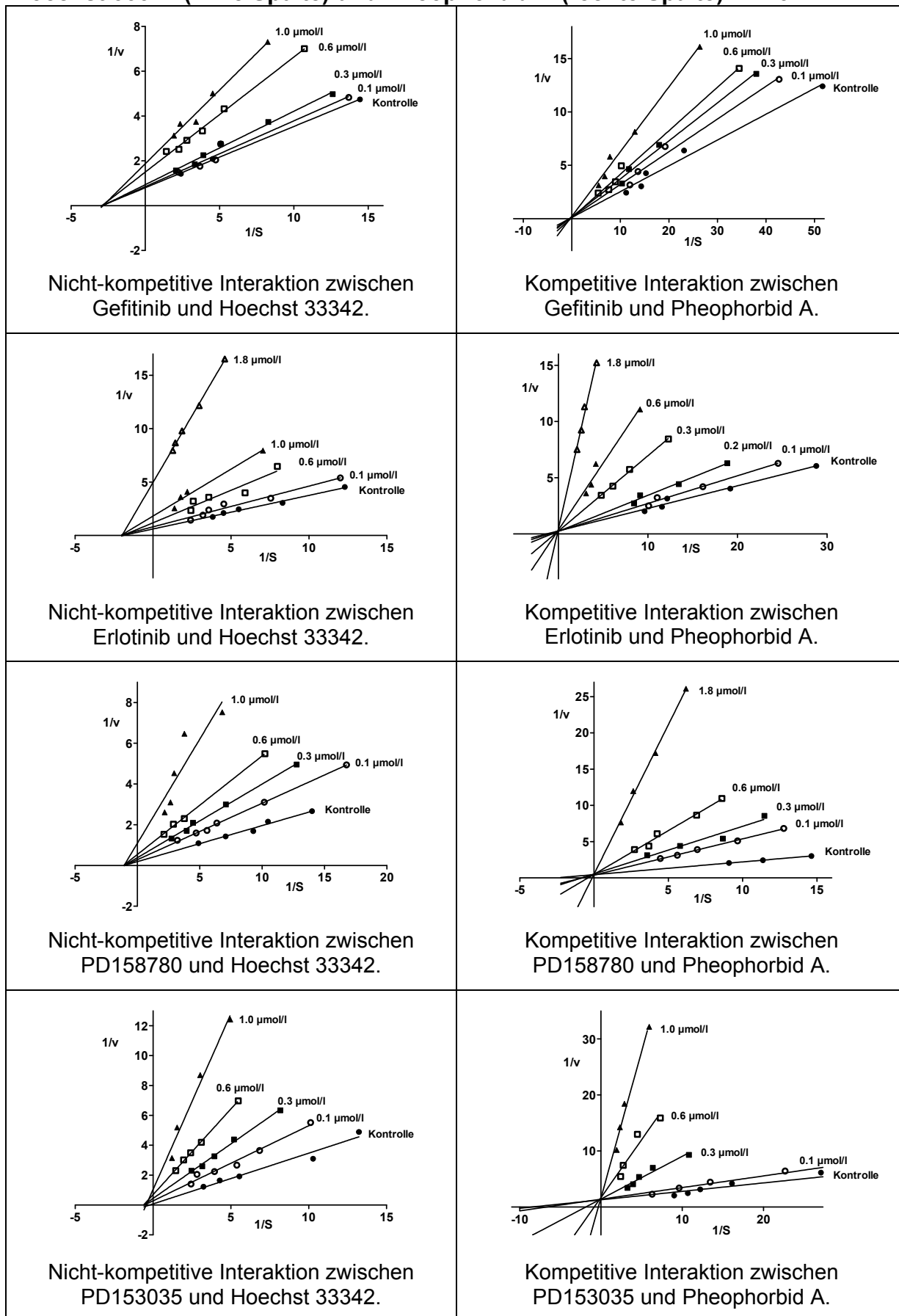
4.10.6 Enzymkinetischer Auswertungsansatz zur Bestimmung des Interaktionstyps der TKI im Hoechst 33342- und im Pheophorbid A-Assay

In Kapitel 4.9.2 wurden bereits ausgewählte WK-X-Verbindungen hinsichtlich Ihres Interaktionstyps mit den beiden Substraten Hoechst 33342 und Pheophorbid A untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass sowohl Verbindungen mit Grundgerüst 2 (WK-X-27, WK-X-8 aus Tabelle 4.15) als auch deren großen Analoga mit Grundgerüst 3 (WK-X-36 und XR9577 aus Tabelle 4.15), den gleichen Interaktionstyp mit den beiden Substraten Hoechst 33342 (kompetitiv) und Pheophorbid A (nicht-kompetitiv) besitzen. Imatinib wurde als "Mischtyp-Inhibitor" identifiziert, der eine weitere Bindungsstelle besetzt und eine positive Kooperativität auf die "WK-X-Bindungsstelle" ausübt. Außerdem ist Imatinib in der Lage, die Affinität von den Substraten Pheophorbid A und Hoechst 33342 zu erhöhen.

Um mehr über die Interaktion von Verbindungen mit BCRP in Erfahrung zu bringen und um weitere mögliche Bindungsstellen von BCRP identifizieren zu können, wurden die TKI aus Abb. 4.62 enzymkinetisch im Hoechst 33342- und im Pheophorbid A-Assay untersucht. Da die TKI strukturell keinerlei Ähnlichkeit mit den WK-X-Verbindungen haben, war es von besonderem Interesse herauszufinden, welchen Interaktionstyp diese Substanzen mit den beiden Substraten besitzen.

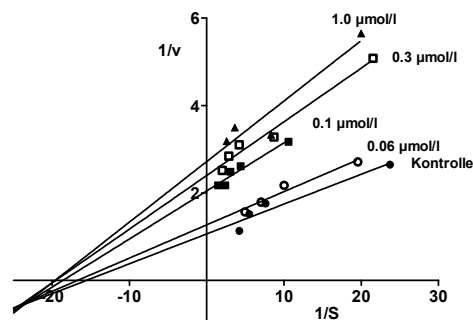
Wie bereits in Kapitel 4.9.2 beschrieben, wurden Experimente bei unterschiedlichen Konzentrationen der Substrate durchgeführt und die erhaltenen Daten enzymkinetisch mittels Lineweaver-Burk Linearisierungsverfahren ausgewertet. In Tabelle 4.20 sind die Ergebnisse der vier EGFR Inhibitoren Gefitinib, Erlotinib, PD153035 und PD158780 in Form von Lineweaver-Burk-Diagrammen zusammengefasst. Aus den in Tabelle 4.20 gezeigten Diagrammen geht hervor, dass zwischen den EGFR Inhibitoren und dem Substrat Hoechst 33342 ein nicht-kompetitiver Zusammenhang vorliegt (linke Spalte). Die Geraden schneiden sich in genau einem Punkt auf der Abzisse ($-1/K_m$), d.h. der K_m -Wert für das Substrat Hoechst 33342 bleibt unverändert. Die Maximalgeschwindigkeit v_{max} (Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse) wird durch die Anwesenheit des nicht-kompetitiven Inhibitors um den Faktor $1/I$ verringert. Die TKI und Hoechst 33342 besetzen unterschiedliche Bindungsstellen.

Tabelle 4.20: Lineweaver-Burk-Diagramme für die vier EGFR Inhibitoren mit Hoechst 33342 (linke Spalte) und Pheophorbid A (rechte Spalte). n ≥ 3.



Die Lineweaver-Burk-Diagramme der rechten Spalte in Tabelle 4.20 spiegeln die kompetitive Interaktion zwischen den TKI und dem Substrat Pheophorbid A wider. Die Abbildungen zeigen, dass mit zunehmender Inhibitorkonzentration der apparente K_m -Wert (Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse im negativen Bereich) ansteigt, v_{max} bleibt dagegen unverändert (gemeinsamer Schnittpunkt auf der y-Achse). Die Ergebnisse zeigen, dass die vier EGFR Inhibitoren die gleiche Bindungsstelle besetzen wie Pheophorbid A.

A



B

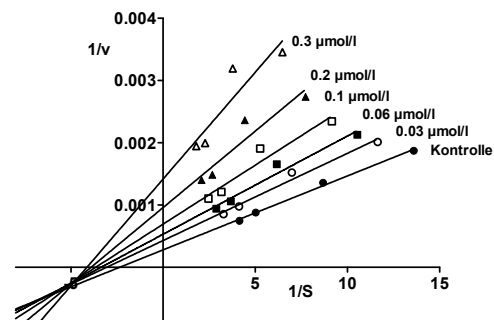


Abb. 4.81: Die Lineweaver-Burk-Diagramme für den BCR-ABL Inhibitor Nilotinib mit Hoechst 33342 (A) und Pheophorbid A (B) zeigen eine Interaktion vom Mischtyp.

Abb. 4.81 A und B zeigt die Lineweaver-Burk-Diagramme des BCR-ABL Inhibitors Nilotinib mit Hoechst 33342 (Abb. 4.81 A) bzw. mit Pheophorbid A (Abb. 4.81 B). In Übereinstimmung mit Imatinib (Kapitel 4.9.2) kann Nilotinib als unkompetitiver bzw. "Mischtyp-Inhibitor" angesehen werden, der eine andere Bindungsstelle besetzt als Hoechst 33342 oder Pheophorbid A. Wie in Abb. 4.81 A und B zu erkennen ist, führt Nilotinib zu einer Abnahme sowohl von K_m als auch von v_{max} . Die Geraden verlaufen zunächst annähernd parallel, schneiden sich aber im weiteren Verlauf in einem Punkt unterhalb der x-Achse im negativen Bereich. Genau wie Imatinib führt die Anwesenheit von Nilotinib zu einer Erhöhung der Affinität der Substrate Hoechst 33342 und Pheophorbid A zu dem ABC-Transporter BCRP (positive Kooperativität). Die beiden strukturell verwandten BCR-ABL Inhibitoren Imatinib und Nilotinib binden vermutlich an die gleiche Bindungsstelle von BCRP.

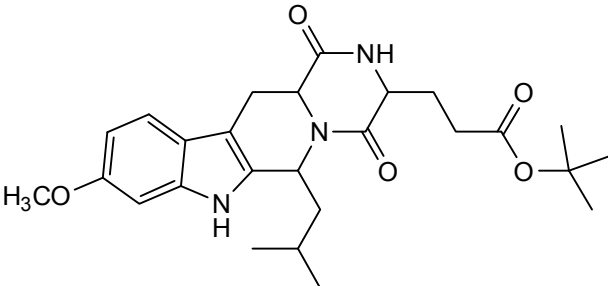
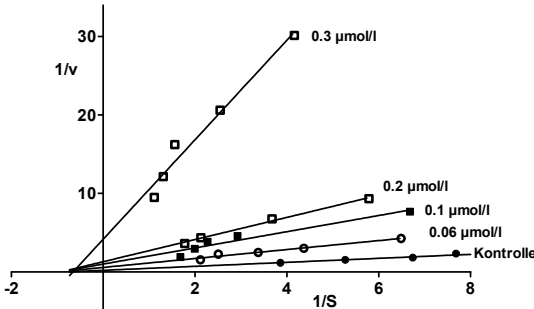
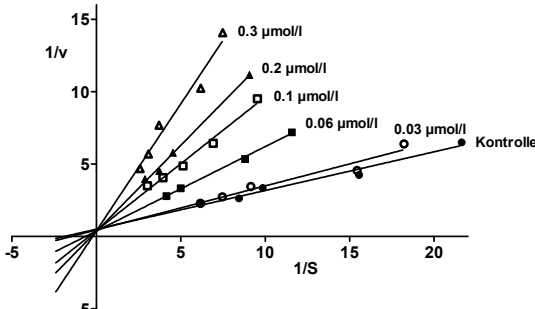
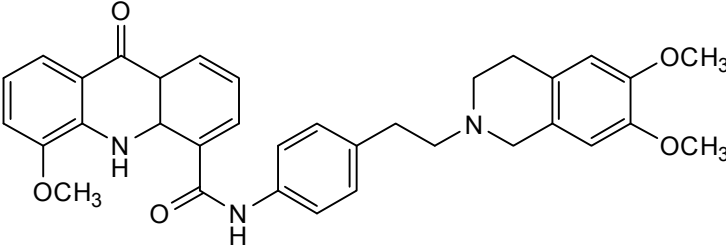
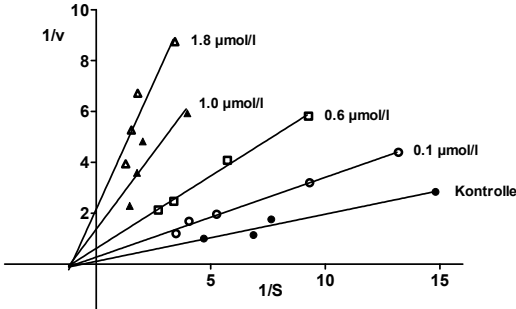
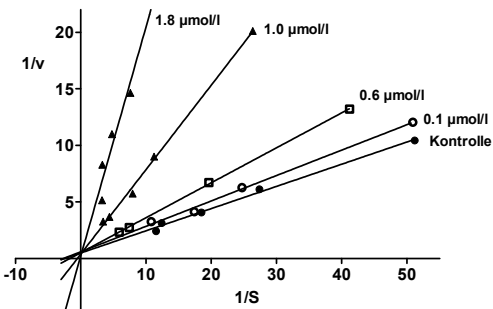
4.11 Modell über mögliche Bindungsstellen von BCRP

Die genaue Zahl und Spezifität der Bindungsstellen von BCRP ist bislang noch nicht geklärt (vergl. Kapitel 1.5.6). Laut Literatur ist lediglich bekannt, dass vermutlich multiple Bindungsstellen existieren, die sich gegenseitig beeinflussen.^{158,159,160}

Ein zentrales Motiv dieser Arbeit bestand darin, potentielle Bindungsstellen von BCRP nachzuweisen und deren gegenseitige Interaktion auf funktioneller Ebene zu charakterisieren. Die Kenntnis über die Bindungsstellen und deren mögliche gegenseitige Beeinflussung kann die Suche nach geeigneten, potenten Inhibitoren vereinfachen.

Bislang wurden in dieser Arbeit sowohl vier Tariquidar-Analoga, WK-X-27 und WK-X-8, die als BCRP spezifische Inhibitoren identifiziert wurden, die beiden Breitspektruminhibitoren WK-X-36 und XR9577 als auch die vier EGFR Inhibitoren Gefitinib, Erlotinib, PD158780, PD153035 sowie die beiden BCR-ABL Inhibitoren Imatinib und Nilotinib hinsichtlich Ihrer Interaktion mit den Substraten Hoechst 33342 und Pheophorbid A an BCRP transfizierten MDCK BCRP Zellen enzymkinetisch untersucht. Um das Spektrum der Verbindungen noch zu erweitern, wurden zwei weitere BCRP Inhibitoren bei unterschiedlichen Hoechst 33342 und Pheophorbid A Konzentrationen analysiert und die Ergebnisse mittels Lineweaver-Burk-Linearisierungsverfahren ausgewertet. Tabelle 4.21 zeigt die Strukturformeln des BCRP spezifischen Modulators Ko143 und des Breitspektruminhibitors GF120918 mit den resultierenden Lineweaver-Burk-Diagrammen. Wie aus der linken Spalte hervorgeht, weisen die identischen K_m -Werte und die abnehmenden v_{max} -Werte auf ein nicht-kompetitives Interaktionsverhalten der Substanzen mit dem Substrat Hoechst 33342 hin. Die Inhibitoren Ko143 bzw. GF120918 und Hoechst 33342 besetzen unterschiedliche Bindungsstellen von BCRP. Die kompetitive Interaktion mit Pheophorbid A wird bei Betrachten der rechten Spalte deutlich. Die Affinität des Substrates zu BCRP wird mit steigender Inhibitorkonzentration geringer, die Maximalgeschwindigkeit v_{max} bleibt unverändert. Ko143 bzw. GF120918 und Pheophorbid A besetzen das gleiche Bindungsareal von BCRP.

Tabelle 4.21: Strukturformeln und Lineweaver-Burk-Diagramme für Ko143 und GF120918 mit Hoechst 33342 (linke Spalte) und Pheophorbid A (rechte Spalte).

<p>Ko143</p> 	
 <p>Nicht-kompetitive Interaktion zwischen Ko143 und Hoechst 33342.</p>	 <p>Kompetitive Interaktion zwischen Ko143 und Pheophorbid A.</p>
<p>GF120918</p> 	
 <p>Nicht-kompetitive Interaktion zwischen GF120918 und Hoechst 33342.</p>	 <p>Kompetitive Interaktion zwischen GF120918 und Pheophorbid A.</p>

In Abb. 4.82 sind die aus dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über das Bindungsverhalten der zwölf untersuchten Substanzen mit den Substraten Hoechst 33342 und Pheophorbid A an dem ABC-Transporter BCRP zusammengefasst. Das Modell in Abb. 4.82 beinhaltet drei mögliche Bindungsstellen: Eine wird von Pheophorbid A besetzt. Die kompetitive Interaktion von Pheophorbid A mit sowohl den Tyrosinkinaseinhibitoren Gefitinib, Erlotinib, PD158780 und PD153035 als auch mit Ko143 und GF120918 lässt die Schlussfolgerung zu, dass diese Verbindungen an das gleiche Bindungsepitop von BCRP binden. Das jeweils nicht-kompetitive Interaktionsverhalten mit Hoechst 33342 beweist, dass die Hoechst 33342 Bindungsregion an einer anderen Stelle innerhalb des Proteins lokalisiert sein muss. Die untersuchten WK-X-Verbindungen interagieren mit Pheophorbid A nicht-kompetitiv, ein zusätzlicher Hinweis darauf, dass eine weitere Bindungsstelle existieren muss. Diese zweite Bindungsstelle wurde als die sog. "WK-X-Bindungsstelle" identifiziert. Sie wird sowohl von Hoechst 33342 als auch von den Tariquidar-Analoga okkupiert (kompetitive Interaktion). Da nicht nur Verbindungen mit Grundgerüst 2 sondern auch solche mit Grundgerüst 3 das gleiche Interaktionsverhalten sowohl mit Hoechst 33342 als auch mit Pheophorbid A zeigten, scheint der Tetrahydroisochinolinrest nicht an der Interaktion mit BCRP beteiligt zu sein. Interessanterweise interagiert GF120918, strukturell verwandt mit den WK-X-Verbindungen, mit Hoechst 33342 nicht-kompetitiv und mit Pheophorbid A kompetitiv, also genau umgekehrt wie die Tariquidar-Analoga. Demnach muss der Rest R² (s. Abb. 4.17 B) essentiell an der Bindung im Protein beteiligt sein. Weitere Studien in Zukunft können klären, inwieweit die Position und das Vorhandensein des Stickstoffatoms bzw. der Carbonylgruppe in Position R² den Bindungsmodus dieser Inhibitoren beeinflussen können. Neben diesen beiden Bindungsstellen wurde eine dritte identifiziert, die von den BCR-ABL Inhibitoren Imatinib und Nilotinib besetzt wird. Zwischen den beiden TKI besteht ein unkompetitiver Zusammenhang mit Hoechst 33342 bzw. mit Pheophorbid A. Als Mischtyp-Inhibitoren sind sie in der Lage, die Affinität der beiden Substrate an deren Bindungsstellen zu erhöhen. Mit Hilfe von Kombinationsexperimenten konnte die gegenseitige Beeinflussung der Bindungsstellen näher charakterisiert werden. Die signifikante Linksverschiebung der Konzentrations-Effektkurve von WK-X-27 in Anwesenheit von Imatinib zeigt, dass die Bindungsstellen im Sinne einer positiven Kooperativität miteinander kommunizieren.

Der enzymkinetische Auswertungsansatz zur Bestimmung des Interaktionstyps von Verbindungen mit bestimmten Substraten liefert Hinweise auf das Vorhandensein möglicher Bindungsstellen innerhalb des ABC-Transporters BCRP. Es jedoch nicht möglich, genauere Einblicke über die Lokalisation der eigentlichen Bindungs epitope zu erlangen.

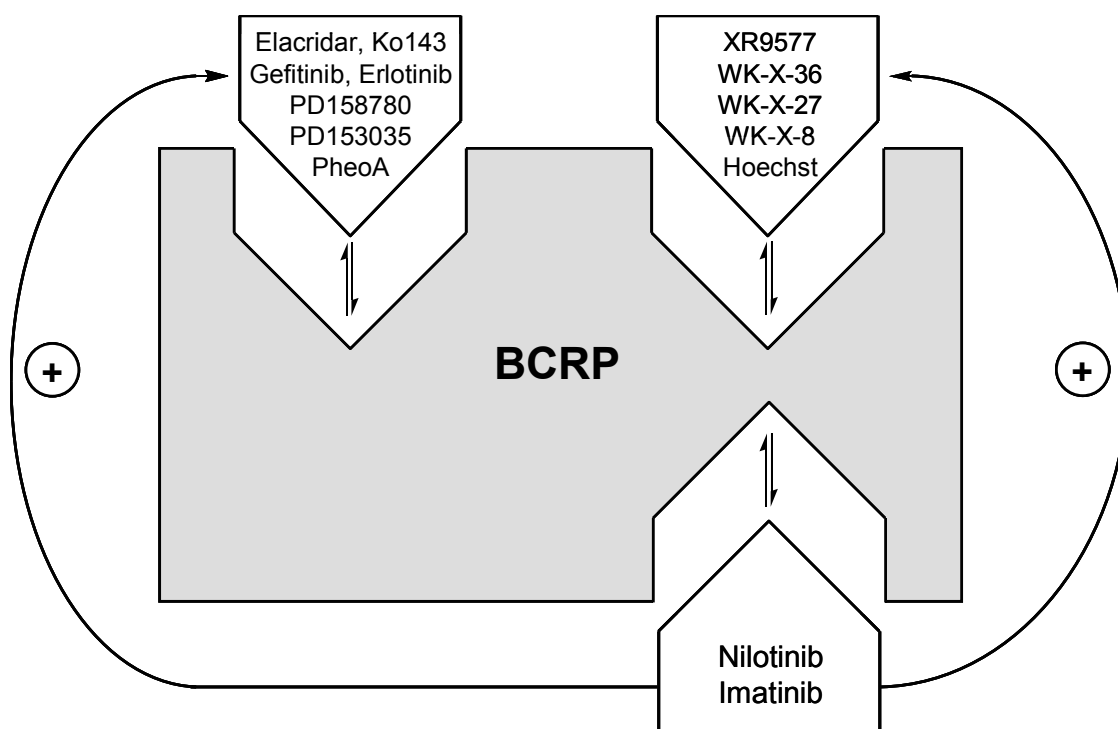


Abb. 4.82: Modell über mögliche Bindungsstellen von BCRP.

Genauere Erkenntnisse über die Lokalisierung der Bindungsstellen gewinnt man beispielsweise mit Hilfe von Photoaffinitätsmarkierungen. Der entsprechend derivatisierte spezifische Ligand bzw. Modulator wird mit der im Idealfall aufgereinigten BCRP-Proteinsuspension unter optimierten Bedingungen inkubiert. Nach Einstellung des Gleichgewichts wird der Modulator durch Bestrahlung mit UV-Licht zum Eingehen einer kovalenten Bindung mit benachbarten Aminosäuren angeregt, wodurch es zu einer Fixierung des ansonsten labilen Gleichgewichts zwischen dem Modulator und BCRP kommt. Durch anschließende denaturierende Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Autoradiographie kann das markierte BCRP detektiert werden. Von diesem Protein kann mittels proteolytischem Verdau und anschließender Massenspektroskopie die Proteinsequenz identifiziert werden,

welche letztendlich an der Bindung des Modulators beteiligt ist. Allerdings gestalten die geringen K_D -Werte potentieller Liganden die Durchführung solcher Experimente schwierig und sind zugleich limitierender Faktor. Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung von potentiellen Bindungsstellen ist die Durchführung von Mutagenesestudien. Durch eine gezielte Veränderung der DNA können einzelne Nukleinbasen eines Gens ausgetauscht werden. Somit können Rezeptorepitope der Bindungsstelle identifiziert werden, die für die Affinität von Modulatoren essentiell sind.

Dennoch lassen die in dieser Arbeit festgestellten Interaktionstypen der 12 untersuchten, strukturell aus unterschiedlichen Klassen stammenden Substanzen einen tieferen Einblick in den Wirkmechanismus der Modulatoren zu. Ein besseres Verständnis über den Wirkmechanismus des Inhibitors ist deshalb von Interesse, da es auch zur Entwicklung neuer, potenterer Modulatoren beitragen kann.

5 Zusammenfassung

Die Multidrug Resistenz (MDR) von Krebszellen stellt ein bedeutendes Problem bei der Behandlung von Tumoren mit Chemotherapeutika dar. Ein entscheidender Mechanismus bei der Entwicklung der MDR ist u.a. die erhöhte Expression des ABC-Transporters BCRP. Als membranständige Effluxpumpe nutzt BCRP die durch ATP Hydrolyse freigesetzte Energie, um Substanzen entgegen eines Konzentrationsgradienten aus den Zellen hinauszutransportieren. Bei Krebszellen führt dies zu einer Verringerung der intrazellulären Zytostatikakonzentration und in Folge zum Versagen der Chemotherapie.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Ansätze und Strategien gewählt, um die Interaktion von bekannten und neuen Modulatoren mit dem ABC-Transporter BCRP zu charakterisieren. Um die Hemmwirkung der Verbindungen an BCRP zu bestimmen, wurden verschiedene zellbasierte Akkumulations-Assays entwickelt, etabliert oder bereits bestehende modifiziert und angewendet. Der Hoechst 33342-Assay wurde von P-gp auf BCRP exprimierende MCF-7 MX und MDCK BCRP Zellen übertragen, optimiert und weiterentwickelt. Mit Hilfe dieses Testsystems wurden neben bekannten Verbindungen auch neu im Arbeitskreis synthetisierte Tariquidar-Analoga (WK-Verbindungen) bezüglich ihrer Hemmwirkung gegenüber BCRP untersucht. Durch den Vergleich der erhaltenen Aktivitätswerte an BCRP mit denen an P-gp wurden Strukturmerkmale identifiziert, welche die Interaktion mit P-gp und/oder BCRP hervorrufen. Für 30 WK-Modulatoren wurden 2D- und 3D-Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet. Dabei konnten CoMFA- und CoMSIA-Modelle erstellt werden, die eine gute Vorhersage der biologischen Aktivitätswerte ermöglichten. Sterische und elektrostatische Charakteristika spielen bei der Interaktion mit beiden Transportern eine wesentliche Rolle. Der Hauptunterschied liegt in dem Beitrag des Wasserstoffbrückendonor- bzw. akzeptorfeldes. Wasserstoffbrückendoneigenschaften an definierten Positionen im Molekül tragen zu einer verbesserten Aktivität gegenüber BCRP bei, für die Inhibierbarkeit von P-gp haben sich Verbindungen mit Wasserstoffbrückenakzeptoreigenschaften als optimal erwiesen. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse der 2D- und 3D-QSAR Analysen von den 30 untersuchten Tariquidar-Analoga können für das Design und die Synthese neuer und potenter Modulatoren sowohl für BCRP als auch für P-gp herangezogen werden.

Als BCRP-spezifisches Testsystem wurde der Pheophorbid A-Assay an MCF-7 MX und MDCK BCRP Zellen am Durchflusszytometer etabliert und zu einem HTS-fähigen Assay weiterentwickelt. Dieses Testsystem wurde für die Untersuchung zahlreicher Substanzen eingesetzt. Das Einbeziehen der mit BCRP transfizierten Zelllinie MDCK BCRP in die funktionelle Charakterisierung von ABCG2 besaß wesentliche Vorteile: (i) Aufgrund der Expression des GFP-BCRP-Fusionsproteins in MDCK BCRP Zellen konnte bei Durchflusszytometer-basierten Experimenten in die Auswertung der Pheophorbid A Fluoreszenz (FL3) die Kenntnis über die Expression (FL1) eingebunden werden, und durch das "gaten" Zellen mit signifikant differierender Expression von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden, (ii) auch bei der Durchführung des Hoechst 33342-Assays konnte durch gleichzeitige Anregung von Hoechst 33342 bei 395 nm und GFP bei 485 nm der Fluoreszenzverlauf beider Substrate im Microplaterreader verfolgt werden, um sowohl die Funktion des Transportproteins BCRP als auch dessen Expression überprüfen zu können, (iii) wurde die Beeinflussung des Expressionsstatus von BCRP durch Tyrosinkinaseinhibitoren untersucht, diente GFP als Reporter gen, um die Gesamtexpression zu quantifizieren.

Bei einem Vergleich der pIC_{50} -Werte strukturell verschiedener Modulatoren, die mit Hilfe beider Assays generiert wurden ($r^2 = 0,96$), konnte gezeigt werden, dass beide Testsysteme für eine funktionelle Charakterisierung des ABC-Transporters BCRP geeignet sind. Die Kombination aus Verwendung von MDCK BCRP Zellen im Pheophorbid A-Assay hat dabei zwei entscheidende Vorteile: (1) Nachweis der Spezifität der Interaktion durch die Auswahl eines spezifischen Substrates, unterstützt durch (2) die detaillierte, expressions-basierte Auswertung bei der Verwendung von MDCK BCRP Zellen.

Mit Hilfe des Hoechst 33342- und des Pheophorbid A-Assays wurde der Einfluss unterschiedlicher Linkertypen im Grundgerüst der WK-Verbindungen auf die Inhibierbarkeit von BCRP analysiert. Dabei wurde die Verbindung WK-X-92 als neue Leitstruktur für die Synthese hoch potenter BCRP Modulatoren identifiziert. In dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass auch Verbindungen, die ein geringes Molekulargewicht besitzen und teilweise nicht-basisch sind, zu einer bemerkenswerten Hemmung von ABCG2 führen. Im Zuge dieser Untersuchungen wurde eine neue Klasse spezifischer BCRP Modulatoren mit geringer Toxizität identifiziert. Die Klasse spezifischer BCRP Inhibitoren, die bislang nur aus

Fumitremorgin C, Ko143 und seinen Derivaten, Novobiocin und die von Kühnle et al. synthetisierten Tariquidar-Analoga bestand, muss daher um diese Gruppe erweitert werden. Die Resultate dieser Untersuchungen liefern essentielle Ideen für die zielgerichtete Synthese weiterer strukturell ähnlicher spezifischer BCRP Inhibitoren. Ursache der Spezifität dieser neu entdeckten WK-Verbindungen ist das Fehlen der basischen Tetrahydroisochinolin-Partialstruktur. Wird die Hydroxygruppe der spezifischen Inhibitoren durch diese Teilstruktur ersetzt, resultiert eine zusätzliche Interaktion mit P-gp. In nachfolgenden Experimenten wurde analysiert, inwieweit die Anwesenheit der Tetrahydroisochinolin-Partialstruktur an der Interaktion mit BCRP beteiligt ist.

Die Interaktion von Tyrosinkinaseinhibitoren mit BCRP konnte erfolgreich näher charakterisiert werden. Kernpunkt dieser Untersuchungen war die potentielle Beeinflussung der BCRP Expression durch Tyrosinkinaseinhibitoren via PI3K/Akt-Signaltransduktionskaskade. Es wurde demonstriert, dass die EGFR Inhibitoren Gefitinib und PD158780 und der PI3K/Akt Inhibitor LY294002 in der Lage sind, den Expressionsstatus von ABCG2 via PI3K/Akt-Signaltransduktionskaskade zu verringern. Zusätzlich kam es zu einer Internalisierung von BCRP. Die BCR-ABL Inhibitoren Imatinib und Nilotinib und Ko143 - Verbindungen, die nicht mit EGFR interagieren - zeigten keinen Einfluss auf den BCRP Expressionslevel. Diese Substanzen bewirkten lediglich eine verstärkte Interaktion zwischen dem Antikörper 5D3 und BCRP. Der EGFR spezifische Antikörper Cetuximab bewirkte zwar eine Downregulation des Proteins in der Membran, aufgrund des Wirkmechanismus via K-Ras-Signaltransduktionskaskade blieb die Gesamtexpression jedoch nahezu unverändert. Neben der Abnahme der Gesamt- und der Membranexpression von BCRP auf Proteinebene durch die EGFR Inhibitoren Gefitinib und PD158780, konnte mit Hilfe des Pheophorbid A-Assays auch die verminderte BCRP Expression auf funktioneller Ebene nachgewiesen werden. Die Funktion des in der Plasmamembran exprimierten Proteins blieb dabei erhalten. Die Aktivität der PI3K/Akt-Signaltransduktionskaskade spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der BCRP Expression.

Ein zentrales Motiv dieser Arbeit bestand in der Intention, potentielle Bindungsstellen von BCRP mit Hilfe der etablierten funktionellen Assays zu untersuchen und einen Einblick zu gewinnen, wie sich die möglichen Bindungsstellen gegenseitig beeinflussen. Die Identifizierung der Interaktionsform von insgesamt 12

Verbindungen aus unterschiedlichen Substanzklassen konnte durch die Bestimmung der Hemmwirkung im Hoechst 33342- und im Pheophorbid A-Assay bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen erreicht werden. Unter Anwendung des Linearisierungsverfahrens nach Lineweaver-Burk wurde für die WK-X-Verbindungen und Hoechst 33342 eine kompetitive Interaktion nachgewiesen. Mit Pheophorbid A lag hingegen eine nicht-kompetitive Wechselwirkung vor. Die Tatsache, dass nicht nur Verbindungen mit Grundgerüst 2 sondern auch solche mit Grundgerüst 3 das gleiche Interaktionsverhalten sowohl mit Hoechst 33342 als auch mit Pheophorbid A zeigten, demonstriert, dass der Tetrahydroisochinolinrest nicht an der Interaktion mit BCRP beteiligt ist. Diese These konnte mit Hilfe von Kombinationsexperimenten bestätigt werden, in denen gezeigt wurde, dass die WK-X-Verbindungen mit der gleichen Bindungsstelle interagieren. Für die EGFR-Inhibitoren, GF120918 und Ko143 und Hoechst 33342 lag eine nicht-kompetitive Wechselwirkung vor. Mit Pheophorbid A zeigten diese Verbindungen ein kompetitives Interaktionsverhalten. Die BCR-ABL Inhibitoren Imatinib und Nilotinib wurden als Mischtyp-Inhibitoren identifiziert, die in der Lage sind, die Affinität der beiden Substrate Hoechst 33342 und Pheophorbid A an deren Bindungsstelle zu erhöhen. Mit Hilfe von Kombinationsexperimenten konnte die gegenseitige Beeinflussung der Bindungsstellen näher charakterisiert werden.

Auf Basis der aus diesen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse wurde ein Modell über drei mögliche Bindungsstellen von BCRP erstellt. Eine wird von den WK-X-Verbindungen und Hoechst 33342 besetzt, eine zweite von den EGFR-Inhibitoren, GF120918, Ko143 und Pheophorbid A und eine dritte von den BCR-ABL Inhibitoren Imatinib und Nilotinib. Diese Bindungsstelle kommuniziert mit den beiden anderen Bindungsstellen im Sinne einer positiven Kooperativität.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Allikmets, R.; Gerrard, B.; Hutchinson, A.; and Dean, M. Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database. *Hum. Mol. Genet.* **1996**, *5*, 1649-1655.
- 2 Gottesman, M. M. and Pastan, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 385-427.
- 3 Dean, M.; Rzhetsky, A.; and Allikmets, R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* **2001**, *11*, 1156-1166.
- 4 Choudhuri, S. and 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.
- 5 Linton, K. J. Structure and function of ABC transporters. *Physiology. (Bethesda.)* **2007**, *22*, 122-130.
- 6 Sarkadi, B.; Homolya, L.; Szakacs, G.; and Varadi, A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol Rev.* **2006**, *86*, 1179-1236.
- 7 Rengelshausen, J.; Goggelmann, C.; Burhenne, J.; Riedel, K. D.; Ludwig, J.; Weiss, J.; Mikus, G.; Walter-Sack, I.; and Haefeli, W. E. Contribution of increased oral bioavailability and reduced nonglomerular renal clearance of digoxin to the digoxin-clarithromycin interaction. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2003**, *56*, 32-38.
- 8 Greiner, B.; Eichelbaum, M.; Fritz, P.; Kreichgauer, H. P.; von Richter, O.; Zundler, J.; and Kroemer, H. K. The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J. Clin. Invest* **1999**, *104*, 147-153.
- 9 Dietrich, C. G.; Geier, A.; and Oude Elferink, R. P. ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut. *Gut* **2003**, *52*, 1788-1795.
- 10 Fromm, M. F. Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans. *Eur. J. Clin. Invest* **2003**, *33 Suppl 2*, 6-9.
- 11 Choi, C. H. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int.* **2005**, *5*, 30.
- 12 Annilo, T.; Chen, Z. Q.; Shulenin, S.; Costantino, J.; Thomas, L.; Lou, H.; Stefanov, S.; and Dean, M. Evolution of the vertebrate ABC gene family: analysis of gene birth and death. *Genomics* **2006**, *88*, 1-11.

- 13 Kim, W. S.; Weickert, C. S.; and Garner, B. Role of ATP-binding cassette transporters in brain lipid transport and neurological disease. *J. Neurochem.* **2008**, *104*, 1145-1166.
- 14 Polgar, O.; Robey, R. W.; and Bates, S. E. ABCG2: structure, function and role in drug response. *Expert. Opin. Drug Metab Toxicol.* **2008**, *4*, 1-15.
- 15 Krishna, R. and 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.
- 16 Bodo, A.; Bakos, E.; Szeri, F.; Varadi, A.; and Sarkadi, B. The role of multidrug transporters in drug availability, metabolism and toxicity. *Toxicol. Lett.* **2003**, *140-141*, 133-143.
- 17 Shukla, S.; Wu, C. P.; and Ambudkar, S. V. Development of inhibitors of ATP-binding cassette drug transporters: present status and challenges. *Expert. Opin. Drug Metab Toxicol.* **2008**, *4*, 205-223.
- 18 Kanzaki, A.; Takebayashi, Y.; Ren, X. Q.; Miyashita, H.; Mori, S.; Akiyama, S.; and Pommier, Y. Overcoming multidrug drug resistance in P-glycoprotein/MDR1-overexpressing cell lines by ecteinascidin 743. *Mol. Cancer Ther.* **2002**, *1*, 1327-1334.
- 19 Choi, C. H.; Sun, K. H.; An, C. S.; Yoo, J. C.; Hahm, K. S.; Lee, I. H.; Sohng, J. K.; and Kim, Y. C. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by 5,6,7,3',4'-pentamethoxyflavone (Sinensetin). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *295*, 832-840.
- 20 Mei, Y.; Qian, F.; Wei, D.; and Liu, J. Reversal of cancer multidrug resistance by green tea polyphenols. *J. Pharm. Pharmacol.* **2004**, *56*, 1307-1314.
- 21 Nakanishi, T.; Shiozawa, K.; Hassel, B. A.; and Ross, D. D. Complex interaction of BCRP/ABCG2 and imatinib in BCR-ABL-expressing cells: BCRP-mediated resistance to imatinib is attenuated by imatinib-induced reduction of BCRP expression. *Blood* **2006**, *108*, 678-684.
- 22 Masuda, Y.; Kobayashi, H.; Holland, J. F.; and Ohnuma, T. Reversal of multidrug resistance by a liposome-MDR1 ribozyme complex. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1998**, *42*, 9-16.
- 23 Nagata, J.; Kijima, H.; Hatanaka, H.; Asai, S.; Miyachi, H.; Abe, Y.; Yamazaki, H.; Nakamura, M.; Watanabe, N.; Mine, T.; Kondo, T.; Scanlon, K. J.; and Ueyama, Y. Reversal of drug resistance using hammerhead ribozymes against multidrug resistance-associated protein and multidrug resistance 1 gene. *Int. J. Oncol.* **2002**, *21*, 1021-1026.
- 24 Nieth, C.; Priebisch, A.; Stege, A.; and Lage, H. Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). *FEBS Lett.* **2003**, *545*, 144-150.

- 25 Nobili, S.; Landini, I.; Giglioni, B.; and Mini, E. Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance. *Curr. Drug Targets*. **2006**, *7*, 861-879.
- 26 Juliano, R. L. and Ling, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *455*, 152-162.
- 27 Schinkel, A. H. and Jonker, J. W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 3-29.
- 28 Loo, T. W.; Bartlett, M. C.; and Clarke, D. M. Processing mutations located throughout the human multidrug resistance P-glycoprotein disrupt interactions between the nucleotide binding domains. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 38395-38401.
- 29 Eytan, G. D.; Regev, R.; Oren, G.; and Assaraf, Y. G. The role of passive transbilayer drug movement in multidrug resistance and its modulation. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 12897-12902.
- 30 Sharom, F. J. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics*. **2008**, *9*, 105-127.
- 31 Tsuruo, T.; Iida, H.; Tsukagoshi, S.; and Sakurai, Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.* **1981**, *41*, 1967-1972.
- 32 Szakacs, G.; Paterson, J. K.; Ludwig, J. A.; Booth-Genthe, C.; and Gottesman, M. M. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 219-234.
- 33 Wilson, W. H.; Bates, S. E.; Fojo, A.; Bryant, G.; Zhan, Z.; Regis, J.; Wittes, R. E.; Jaffe, E. S.; Steinberg, S. M.; and Herdt, J. Controlled trial of dexverapamil, a modulator of multidrug resistance, in lymphomas refractory to EPOCH chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* **1995**, *13*, 1995-2004.
- 34 te Boekhorst, P. A.; van Kapel, J.; Schoester, M.; and Sonneveld, P. 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.
- 35 Thomas, H. and Coley, H. M. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control* **2003**, *10*, 159-165.
- 36 Bates, S.; Kang, M.; Meadows, B.; Bakke, S.; Choyke, P.; Merino, M.; Goldspiel, B.; Chico, I.; Smith, T.; Chen, C.; Robey, R.; Bergan, R.; Figg, W. D.; and Fojo, T. A Phase I study of infusional vinblastine in combination with the P-glycoprotein antagonist PSC 833 (valspodar). *Cancer* **2001**, *92*, 1577-1590.

- 37 Chico, I.; Kang, M. H.; Bergan, R.; Abraham, J.; Bakke, S.; Meadows, B.; Rutt, A.; Robey, R.; Choyke, P.; Merino, M.; Goldspiel, B.; Smith, T.; Steinberg, S.; Figg, W. D.; Fojo, T.; and Bates, S. Phase I study of infusional paclitaxel in combination with the P-glycoprotein antagonist PSC 833. *J. Clin. Oncol.* **2001**, *19*, 832-842.
- 38 Martin, C.; Berridge, G.; Mistry, P.; Higgins, C.; Charlton, P.; and Callaghan, R. The molecular interaction of the high affinity reversal agent XR9576 with P-glycoprotein. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *128*, 403-411.
- 39 Hyafil, F.; Vergely, C.; Du, V. P.; and Grand-Perret, T. In vitro and in vivo reversal of multidrug resistance by GF120918, an acridonecarboxamide derivative. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 4595-4602.
- 40 Maliepaard, M.; van Gastelen, M. A.; Tohgo, A.; Hausheer, F. H.; van Waardenburg, R. C.; de Jong, L. A.; Pluim, D.; Beijnen, J. H.; and Schellens, J. H. Circumvention of breast cancer resistance protein (BCRP)-mediated resistance to camptothecins in vitro using non-substrate drugs or the BCRP inhibitor GF120918. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 935-941.
- 41 Robey, R. W.; Steadman, K.; Polgar, O.; Morisaki, K.; Blayney, M.; Mistry, P.; and Bates, S. E. Pheophorbide a is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 1242-1246.
- 42 Mistry, P.; Stewart, A. J.; Dangerfield, W.; Okiji, S.; Liddle, C.; Bootle, D.; Plumb, J. A.; Templeton, D.; and 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.
- 43 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.; and 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.
- 44 Solary, E.; Drenou, B.; Campos, L.; de Cremoux, P.; Mugneret, F.; Moreau, P.; Lioure, 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.; and 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.
- 45 Shapiro, A. B. and Ling, V. Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *250*, 130-137.
- 46 Shapiro, A. B.; Fox, K.; Lam, P.; and 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.

- 47 Martin, C.; Berridge, G.; Higgins, C. F.; Mistry, P.; Charlton, P.; and Callaghan, R. Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 624-632.
- 48 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.
- 49 Loo, T. W. and 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.
- 50 Pleban, K.; Kopp, S.; Csaszar, E.; Peer, M.; Hrebicek, T.; Rizzi, A.; Ecker, G. F.; and 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.
- 51 Loo, T. W. and Clarke, D. M. Location of the rhodamine-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 44332-44338.
- 52 Loo, T. W.; Bartlett, M. C.; and 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.
- 53 Isenberg, B.; Thole, H.; Tummler, B.; and Demmer, A. Identification and localization of three photobinding sites of iodoarylazidoprazosin in hamster P-glycoprotein. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 2629-2634.
- 54 Loo, T. W. and Clarke, D. M. Cross-linking of human multidrug resistance P-glycoprotein by the substrate, tris-(2-maleimidoethyl)amine, is altered by ATP hydrolysis. Evidence for rotation of a transmembrane helix. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 31800-31805.
- 55 Loo, T. W. and 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.
- 56 Cole, S. P.; Bhardwaj, G.; Gerlach, J. H.; Mackie, J. E.; Grant, C. E.; Almquist, K. C.; Stewart, A. J.; Kurz, E. U.; Duncan, A. M.; and Deeley, R. G. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **1992**, *258*, 1650-1654.
- 57 Chang, X. B. A molecular understanding of ATP-dependent solute transport by multidrug resistance-associated protein MRP1. *Cancer Metastasis Rev.* **2007**, *26*, 15-37.

- 58 Haimeur, A.; Conseil, G.; Deeley, R. G.; and Cole, S. P. The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr. Drug Metab* **2004**, *5*, 21-53.
- 59 Boumendjel, A.; Baubichon-Cortay, H.; Trompier, D.; Perrotton, T.; and Di Pietro, A. Anticancer multidrug resistance mediated by MRP1: recent advances in the discovery of reversal agents. *Med. Res. Rev.* **2005**, *25*, 453-472.
- 60 Cole, S. P. and Deeley, R. G. Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays* **1998**, *20*, 931-940.
- 61 Deeley, R. G.; Westlake, C.; and Cole, S. P. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev.* **2006**, *86*, 849-899.
- 62 Hipfner, D. R.; Deeley, R. G.; and Cole, S. P. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1461*, 359-376.
- 63 Bakos, E. and Homolya, L. Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pflugers Arch.* **2007**, *453*, 621-641.
- 64 Bakos, E.; Hegedus, T.; Hollo, Z.; Welker, E.; Tusnady, G. E.; Zaman, G. J.; Flens, M. J.; Varadi, A.; and Sarkadi, B. Membrane topology and glycosylation of the human multidrug resistance-associated protein. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 12322-12326.
- 65 Hipfner, D. R.; Almquist, K. C.; Leslie, E. M.; Gerlach, J. H.; Grant, C. E.; Deeley, R. G.; and Cole, S. P. Membrane topology of the multidrug resistance protein (MRP). A study of glycosylation-site mutants reveals an extracytosolic NH2 terminus. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 23623-23630.
- 66 Gao, M.; Cui, H. R.; Loe, D. W.; Grant, C. E.; Almquist, K. C.; Cole, S. P.; and Deeley, R. G. Comparison of the functional characteristics of the nucleotide binding domains of multidrug resistance protein 1. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 13098-13108.
- 67 Flens, M. J.; Zaman, G. J.; van, d., V; Izquierdo, M. A.; Schroeijers, A. B.; Scheffer, G. L.; van der, G. P.; de Haas, M.; Meijer, C. J.; and Scheper, R. J. Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *Am. J. Pathol.* **1996**, *148*, 1237-1247.
- 68 Leslie, E. M.; Deeley, R. G.; and Cole, S. P. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *204*, 216-237.
- 69 Wijnholds, J.; deLange, E. C.; Scheffer, G. L.; van den Berg, D. J.; Mol, C. A.; van, d., V; Schinkel, A. H.; Scheper, R. J.; Breimer, D. D.; and Borst, P. Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and

- contributes to the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J. Clin. Invest* **2000**, *105*, 279-285.
- 70 Jedlitschky, G.; Leier, I.; Buchholz, U.; Barnouin, K.; Kurz, G.; and Keppler, D. Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 988-994.
- 71 Renes, J.; de Vries, E. G.; Nienhuis, E. F.; Jansen, P. L.; and Muller, M. ATP- and glutathione-dependent transport of chemotherapeutic drugs by the multidrug resistance protein MRP1. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *126*, 681-688.
- 72 Zaman, G. J.; Lankelma, J.; van Tellingen, O.; Beijnen, J.; Dekker, H.; Paulusma, C.; Oude Elferink, R. P.; Baas, F.; and Borst, P. Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1995**, *92*, 7690-7694.
- 73 Minderman, H.; O'Loughlin, K. L.; Pendyala, L.; and Baer, M. R. VX-710 (biricodar) increases drug retention and enhances chemosensitivity in resistant cells overexpressing P-glycoprotein, multidrug resistance protein, and breast cancer resistance protein. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 1826-1834.
- 74 Velamakanni, S.; Wei, S. L.; Janvilisri, T.; and van Veen, H. W. ABCG transporters: structure, substrate specificities and physiological roles: a brief overview. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2007**, *39*, 465-471.
- 75 Schmitz, G. and Kaminski, W. E. ABC transporters and cholesterol metabolism. *Front Biosci.* **2001**, *6*, D505-D514.
- 76 Croop, J. M.; Tiller, G. E.; Fletcher, J. A.; Lux, M. L.; Raab, E.; Goldenson, D.; Son, D.; Arciniegas, S.; and Wu, R. L. Isolation and characterization of a mammalian homolog of the *Drosophila* white gene. *Gene* **1997**, *185*, 77-85.
- 77 Sullivan, D. T. and Sullivan, M. C. Transport defects as the physiological basis for eye color mutants of *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.* **1975**, *13*, 603-613.
- 78 Sullivan, D. T.; Bell, L. A.; Paton, D. R.; and Sullivan, M. C. Genetic and functional analysis of tryptophan transport in Malpighian tubules of *Drosophila*. *Biochem. Genet.* **1980**, *18*, 1109-1130.
- 79 Chen, H.; Rossier, C.; Lalioti, M. D.; Lynn, A.; Chakravarti, A.; Perrin, G.; and Antonarakis, S. E. Cloning of the cDNA for a human homologue of the *Drosophila* white gene and mapping to chromosome 21q22.3. *Am. J. Hum. Genet.* **1996**, *59*, 66-75.
- 80 Berge, K. E.; Tian, H.; Graf, G. A.; Yu, L.; Grishin, N. V.; Schultz, J.; Kwiterovich, P.; Shan, B.; Barnes, R.; and Hobbs, H. H. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* **2000**, *290*, 1771-1775.

- 81 Miettinen, T. A. Phytosterolaemia, xanthomatosis and premature atherosclerotic arterial disease: a case with high plant sterol absorption, impaired sterol elimination and low cholesterol synthesis. *Eur. J. Clin. Invest* **1980**, *10*, 27-35.
- 82 Mickley, L.; Jain, P.; Miyake, K.; Schriml, L. M.; Rao, K.; Fojo, T.; Bates, S.; and Dean, M. An ATP-binding cassette gene (ABCG3) closely related to the multidrug transporter ABCG2 (MXR/ABCP) has an unusual ATP-binding domain. *Mamm. Genome* **2001**, *12*, 86-88.
- 83 Kusuvara, H. and Sugiyama, Y. ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Pflugers Arch.* **2007**, *453*, 735-744.
- 84 Wang, N.; Lan, D.; Chen, W.; Matsuura, F.; and Tall, A. R. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2004**, *101*, 9774-9779.
- 85 Krishnamurthy, P. and Schuetz, J. D. Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2006**, *46*, 381-410.
- 86 Doyle, L. A.; Yang, W.; Abruzzo, L. V.; Krogmann, T.; Gao, Y.; Rishi, A. K.; and Ross, D. D. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1998**, *95*, 15665-15670.
- 87 Allikmets, R.; Schriml, L. M.; Hutchinson, A.; Romano-Spica, V.; and Dean, M. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 5337-5339.
- 88 Miyake, K.; Mickley, L.; Litman, T.; Zhan, Z.; Robey, R.; Cristensen, B.; Brangi, M.; Greenberger, L.; Dean, M.; Fojo, T.; and Bates, S. E. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 8-13.
- 89 Knutsen, T.; Rao, V. K.; Ried, T.; Mickley, L.; Schneider, E.; Miyake, K.; Ghadimi, B. M.; Padilla-Nash, H.; Pack, S.; Greenberger, L.; Cowan, K.; Dean, M.; Fojo, T.; and Bates, S. Amplification of 4q21-q22 and the MXR gene in independently derived mitoxantrone-resistant cell lines. *Genes Chromosomes. Cancer* **2000**, *27*, 110-116.
- 90 Wang, H.; Lee, E. W.; Cai, X.; Ni, Z.; Zhou, L.; and Mao, Q. Membrane topology of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) determined by epitope insertion and immunofluorescence. *Biochemistry* **2008**, *47*, 13778-13787.
- 91 Ozvegy, C.; Litman, T.; Szakacs, G.; Nagy, Z.; Bates, S.; Varadi, A.; and Sarkadi, B. Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *285*, 111-117.

- 92 McDevitt, C. A.; Collins, R. F.; Conway, M.; Modok, S.; Storm, J.; Kerr, I. D.; Ford, R. C.; and Callaghan, R. Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2. *Structure*. **2006**, *14*, 1623-1632.
- 93 Xu, J.; Liu, Y.; Yang, Y.; Bates, S.; and Zhang, J. T. Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 19781-19789.
- 94 Diop, N. K. and Hrycyna, C. A. N-Linked glycosylation of the human ABC transporter ABCG2 on asparagine 596 is not essential for expression, transport activity, or trafficking to the plasma membrane. *Biochemistry* **2005**, *44*, 5420-5429.
- 95 Bailey-Dell, K. J.; Hassel, B.; Doyle, L. A.; and Ross, D. D. Promoter characterization and genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette transporter G2) gene. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1520*, 234-241.
- 96 Kage, K.; Tsukahara, S.; Sugiyama, T.; Asada, S.; Ishikawa, E.; Tsuruo, T.; and Sugimoto, Y. Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *Int. J. Cancer* **2002**, *97*, 626-630.
- 97 Henriksen, U.; Fog, J. U.; Litman, T.; and Gether, U. Identification of intra- and intermolecular disulfide bridges in the multidrug resistance transporter ABCG2. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 36926-36934.
- 98 Russ, W. P. and Engelman, D. M. The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J. Mol. Biol.* **2000**, *296*, 911-919.
- 99 Polgar, O.; Robey, R. W.; Morisaki, K.; Dean, M.; Michejda, C.; Sauna, Z. E.; Ambudkar, S. V.; Tarasova, N.; and Bates, S. E. Mutational analysis of ABCG2: role of the GXXXG motif. *Biochemistry* **2004**, *43*, 9448-9456.
- 100 Ugi, S.; Imamura, T.; Maegawa, H.; Egawa, K.; Yoshizaki, T.; Shi, K.; Obata, T.; Ebina, Y.; Kashiwagi, A.; and Olefsky, J. M. Protein phosphatase 2A negatively regulates insulin's metabolic signaling pathway by inhibiting Akt (protein kinase B) activity in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell Biol.* **2004**, *24*, 8778-8789.
- 101 Misra, S.; Ujhazy, P.; Gatmaitan, Z.; Varticovski, L.; and Arias, I. M. The role of phosphoinositide 3-kinase in taurocholate-induced trafficking of ATP-dependent canalicular transporters in rat liver. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 26638-26644.
- 102 Mogi, M.; Yang, J.; Lambert, J. F.; Colvin, G. A.; Shiojima, I.; Skurk, C.; Summer, R.; Fine, A.; Quesenberry, P. J.; and Walsh, K. Akt signaling regulates side population cell phenotype via Bcrp1 translocation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 39068-39075.

- 103 Takada, T.; Suzuki, H.; Gotoh, Y.; and Sugiyama, Y. Regulation of the cell surface expression of human BCRP/ABCG2 by the phosphorylation state of Akt in polarized cells. *Drug Metab Dispos.* **2005**, *33*, 905-909.
- 104 Ee, P. L.; Kamalakaran, S.; Tonetti, D.; He, X.; Ross, D. D.; and Beck, W. T. Identification of a novel estrogen response element in the breast cancer resistance protein (ABCG2) gene. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 1247-1251.
- 105 Krishnamurthy, P.; Ross, D. D.; Nakanishi, T.; Bailey-Dell, K.; Zhou, S.; Mercer, K. E.; Sarkadi, B.; Sorrentino, B. P.; and Schuetz, J. D. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 24218-24225.
- 106 Maliepaard, M.; Scheffer, G. L.; Faneyte, I. F.; van Gastelen, M. A.; Pijnenborg, A. C.; Schinkel, A. H.; van De Vijver, M. J.; Scheper, R. J.; and Schellens, J. H. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 3458-3464.
- 107 Fetsch, P. A.; Abati, A.; Litman, T.; Morisaki, K.; Honjo, Y.; Mittal, K.; and Bates, S. E. Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues. *Cancer Lett.* **2006**, *235*, 84-92.
- 108 Doyle, L. A. and Ross, D. D. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* **2003**, *22*, 7340-7358.
- 109 Jonker, J. W.; Smit, J. W.; Brinkhuis, R. F.; Maliepaard, M.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H.; and Schinkel, A. H. Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 1651-1656.
- 110 Zhang, Y.; Wang, H.; Unadkat, J. D.; and Mao, Q. Breast cancer resistance protein 1 limits fetal distribution of nitrofurantoin in the pregnant mouse. *Drug Metab Dispos.* **2007**, *35*, 2154-2158.
- 111 Jonker, J. W.; Merino, G.; Musters, S.; van Herwaarden, A. E.; Bolscher, E.; Wagenaar, E.; Mesman, E.; Dale, T. C.; and Schinkel, A. H. The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 127-129.
- 112 Gerck, P. M.; Oo, C. Y.; Paxton, E. W.; Moscow, J. A.; and McNamara, P. J. Interactions between cimetidine, nitrofurantoin, and probenecid active transport into rat milk. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *296*, 175-180.
- 113 Merino, G.; Jonker, J. W.; Wagenaar, E.; van Herwaarden, A. E.; and Schinkel, A. H. The breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) affects pharmacokinetics, hepatobiliary excretion, and milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 1758-1764.
- 114 Merino, G.; Alvarez, A. I.; Pulido, M. M.; Molina, A. J.; Schinkel, A. H.; and Prieto, J. G. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) transports

- fluoroquinolone antibiotics and affects their oral availability, pharmacokinetics, and milk secretion. *Drug Metab Dispos.* **2006**, *34*, 690-695.
- 115 van Herwaarden, A. E.; Wagenaar, E.; Merino, G.; Jonker, J. W.; Rosing, H.; Beijnen, J. H.; and Schinkel, A. H. Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B₂) into milk. *Mol. Cell Biol.* **2007**, *27*, 1247-1253.
- 116 Gutmann, H.; Hruz, P.; Zimmermann, C.; Beglinger, C.; and Drewe, J. Distribution of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) mRNA expression along the human GI tract. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *70*, 695-699.
- 117 van Herwaarden, A. E.; Jonker, J. W.; Wagenaar, E.; Brinkhuis, R. F.; Schellens, J. H.; Beijnen, J. H.; and Schinkel, A. H. The breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) restricts exposure to the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 6447-6452.
- 118 Jonker, J. W.; Buitelaar, M.; Wagenaar, E.; Van Der Valk, M. A.; Scheffer, G. L.; Scheper, R. J.; Plosch, T.; Kuipers, F.; Elferink, R. P.; Rosing, H.; Beijnen, J. H.; and Schinkel, A. H. The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2002**, *99*, 15649-15654.
- 119 Zhou, S.; Schuetz, J. D.; Bunting, K. D.; Colapietro, A. M.; Sampath, J.; Morris, J. J.; Lagutina, I.; Grosveld, G. C.; Osawa, M.; Nakauchi, H.; and Sorrentino, B. P. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 1028-1034.
- 120 Zhou, S.; Morris, J. J.; Barnes, Y.; Lan, L.; Schuetz, J. D.; and Sorrentino, B. P. Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2002**, *99*, 12339-12344.
- 121 Honjo, Y.; Hrycyna, C. A.; Yan, Q. W.; Medina-Perez, W. Y.; Robey, R. W.; van de, L. A.; Litman, T.; Dean, M.; and Bates, S. E. Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 6635-6639.
- 122 Allen, J. D.; Jackson, S. C.; and Schinkel, A. H. A mutation hot spot in the Bcrp1 (Abcg2) multidrug transporter in mouse cell lines selected for Doxorubicin resistance. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 2294-2299.
- 123 Cervenak, J.; Andrikovics, H.; Ozvegy-Laczka, C.; Tordai, A.; Nemet, K.; Varadi, A.; and Sarkadi, B. The role of the human ABCG2 multidrug transporter and its variants in cancer therapy and toxicology. *Cancer Lett.* **2006**, *234*, 62-72.

- 124 Robey, R. W.; Honjo, Y.; Morisaki, K.; Nadjem, T. A.; Runge, S.; Risbood, M.; Poruchynsky, M. S.; and Bates, S. E. Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity. *Br. J. Cancer* **2003**, *89*, 1971-1978.
- 125 Mitomo, H.; Kato, R.; Ito, A.; Kasamatsu, S.; Ikegami, Y.; Kii, I.; Kudo, A.; Kobatake, E.; Sumino, Y.; and Ishikawa, T. A functional study on polymorphism of the ATP-binding cassette transporter ABCG2: critical role of arginine-482 in methotrexate transport. *Biochem. J.* **2003**, *373*, 767-774.
- 126 Miwa, M.; Tsukahara, S.; Ishikawa, E.; Asada, S.; Imai, Y.; and Sugimoto, Y. Single amino acid substitutions in the transmembrane domains of breast cancer resistance protein (BCRP) alter cross resistance patterns in transfectants. *Int. J. Cancer* **2003**, *107*, 757-763.
- 127 Volk, E. L.; Farley, K. M.; Wu, Y.; Li, F.; Robey, R. W.; and Schneider, E. Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 5035-5040.
- 128 Volk, E. L. and Schneider, E. Wild-type breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is a methotrexate polyglutamate transporter. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 5538-5543.
- 129 Ahmed-Belkacem, A.; Pozza, A.; Macalou, S.; Perez-Victoria, J. M.; Boumendjel, A.; and Di Pietro, A. Inhibitors of cancer cell multidrug resistance mediated by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Anticancer Drugs* **2006**, *17*, 239-243.
- 130 Rabindran, S. K.; Ross, D. D.; Doyle, L. A.; Yang, W.; and Greenberger, L. M. Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 47-50.
- 131 van Loevezijn, A.; Allen, J. D.; Schinkel, A. H.; and Koomen, G. J. Inhibition of BCRP-mediated drug efflux by fumitremorgin-type indolyl diketopiperazines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 29-32.
- 132 Allen, J. D.; van Loevezijn, A.; Lakhai, J. M.; van, d., V; van Tellingen, O.; Reid, G.; Schellens, J. H.; Koomen, G. J.; and Schinkel, A. H. Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Mol. Cancer Ther.* **2002**, *1*, 417-425.
- 133 Shiozawa, K.; Oka, M.; Soda, H.; Yoshikawa, M.; Ikegami, Y.; Tsurutani, J.; Nakatomi, K.; Nakamura, Y.; Doi, S.; Kitazaki, T.; Mizuta, Y.; Murase, K.; Yoshida, H.; Ross, D. D.; and Kohno, S. Reversal of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)-mediated drug resistance by novobiocin, a coumermycin antibiotic. *Int. J. Cancer* **2004**, *108*, 146-151.
- 134 de Bruin, M.; Miyake, K.; Litman, T.; Robey, R.; and Bates, S. E. Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. *Cancer Lett.* **1999**, *146*, 117-126.

- 135 Kruijtzter, C. M.; Beijnen, J. H.; Rosing, H.; Bokkel Huinink, W. W.; Schot, M.; Jewell, R. C.; Paul, E. M.; and Schellens, J. H. Increased oral bioavailability of topotecan in combination with the breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitor GF120918. *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 2943-2950.
- 136 Qadir, M.; O'Loughlin, K. L.; Fricke, S. M.; Williamson, N. A.; Greco, W. R.; Minderman, H.; and Baer, M. R. Cyclosporin A is a broad-spectrum multidrug resistance modulator. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 2320-2326.
- 137 Zhang, Y.; Gupta, A.; Wang, H.; Zhou, L.; Vethanayagam, R. R.; Unadkat, J. D.; and Mao, Q. BCRP transports dipyridamole and is inhibited by calcium channel blockers. *Pharm. Res.* **2005**, *22*, 2023-2034.
- 138 Teillet, F.; Boumendjel, A.; Boutonnat, J.; and Ronot, X. Flavonoids as RTK inhibitors and potential anticancer agents. *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 715-745.
- 139 Kuhnau, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.* **1976**, *24*, 117-191.
- 140 Mladenka, P.; Zatloukalova, L.; Filipsky, T.; and Hrdina, R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49*, 963-975.
- 141 Hänsel, R. and Sticher, O. Pharmakognosie Phytopharmazie. *Springer Verlag Berlin, 7. Auflage*, **2004**, 789-791.
- 142 Havsteen, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* **2002**, *96*, 67-202.
- 143 Wang, M. Extending the good diet, good health paradigm: modulation of breast cancer resistance protein (BCRP) by flavonoids. *Toxicol. Sci.* **2007**, *96*, 203-205.
- 144 Ahmed-Belkacem, A.; Pozza, A.; Munoz-Martinez, F.; Bates, S. E.; Castanys, S.; Gamarro, F.; Di Pietro, A.; and Perez-Victoria, J. M. Flavonoid structure-activity studies identify 6-prenylchrysin and tectochrysin as potent and specific inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 4852-4860.
- 145 Cooray, H. C.; Janvilisri, T.; van Veen, H. W.; Hladky, S. B.; and Barrand, M. A. Interaction of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *317*, 269-275.
- 146 Zhang, S.; Yang, X.; and Morris, M. E. Flavonoids are inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *65*, 1208-1216.
- 147 Pick, A.; Muller, H.; Mayer, R.; Haenisch, B.; Pajeva, I. K.; Weigt, M.; Bonisch, H.; Muller, C. E.; and Wiese, M. Structure-activity relationships of flavonoids as inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP). *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2090-2102.

- 148 Ozvegy-Laczka, C.; Hegedus, T.; Varady, G.; Ujhelly, O.; Schuetz, J. D.; Varadi, A.; Keri, G.; Orfi, L.; Nemet, K.; and Sarkadi, B. High-affinity interaction of tyrosine kinase inhibitors with the ABCG2 multidrug transporter. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *65*, 1485-1495.
- 149 Hegedus, T.; Orfi, L.; Seprodi, A.; Varadi, A.; Sarkadi, B.; and Keri, G. Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the human multidrug transporter proteins, MDR1 and MRP1. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1587*, 318-325.
- 150 Shi, Z.; Peng, X. X.; Kim, I. W.; Shukla, S.; Si, Q. S.; Robey, R. W.; Bates, S. E.; Shen, T.; Ashby, C. R., Jr.; Fu, L. W.; Ambudkar, S. V.; and Chen, Z. S. Erlotinib (Tarceva, OSI-774) antagonizes ATP-binding cassette subfamily B member 1 and ATP-binding cassette subfamily G member 2-mediated drug resistance. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 11012-11020.
- 151 Tiwari, A. K.; Sodani, K.; Wang, S. R.; Kuang, Y. H.; Ashby, C. R., Jr.; Chen, X.; and Chen, Z. S. Nilotinib (AMN107, Tasigna) reverses multidrug resistance by inhibiting the activity of the ABCB1/Pgp and ABCG2/BCRP/MXR transporters. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *78*, 153-161.
- 152 Mimeault, M.; Hauke, R.; and Batra, S. K. Recent advances on the molecular mechanisms involved in the drug resistance of cancer cells and novel targeting therapies. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2008**, *83*, 673-691.
- 153 Lemos, C.; Jansen, G.; and Peters, G. J. Drug transporters: recent advances concerning BCRP and tyrosine kinase inhibitors. *Br. J. Cancer* **2008**, *98*, 857-862.
- 154 Varma, M. V.; Ashokraj, Y.; Dey, C. S.; and Panchagnula, R. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacol. Res.* **2003**, *48*, 347-359.
- 155 Higgins, C. F. Flip-flop: the transmembrane translocation of lipids. *Cell* **1994**, *79*, 393-395.
- 156 Higgins, C. F. and Linton, K. J. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 918-926.
- 157 McDevitt, C. A.; Crowley, E.; Hobbs, G.; Starr, K. J.; Kerr, I. D.; and Callaghan, R. Is ATP binding responsible for initiating drug translocation by the multidrug transporter ABCG2? *FEBS J.* **2008**, *275*, 4354-4362.
- 158 Clark, R.; Kerr, I. D.; and Callaghan, R. Multiple drugbinding sites on the R482G isoform of the ABCG2 transporter. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *149*, 506-515.
- 159 Giri, N.; Agarwal, S.; Shaik, N.; Pan, G.; Chen, Y.; and Elmquist, W. F. Substrate-dependent breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2)-mediated interactions: consideration of multiple binding sites in in vitro assay design. *Drug Metab Dispos.* **2009**, *37*, 560-570.

- 160 Ejendal, K. F. and Hrycyna, C. A. Differential sensitivities of the human ATP-binding cassette transporters ABCG2 and P-glycoprotein to cyclosporin A. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 902-911.
- 161 Matsson, P.; Englund, G.; Ahlin, G.; Bergstrom, C. A.; Norinder, U.; and Artursson, P. A global drug inhibition pattern for the human ATP-binding cassette transporter breast cancer resistance protein (ABCG2). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *323*, 19-30.
- 162 Hazai, E. and Bikadi, Z. Homology modeling of breast cancer resistance protein (ABCG2). *J. Struct. Biol.* **2008**, *162*, 63-74.
- 163 Takenaka, K.; Morgan, J. A.; Scheffer, G. L.; Adachi, M.; Stewart, C. F.; Sun, D.; Leggas, M.; Ejendal, K. F.; Hrycyna, C. A.; and Schuetz, J. D. Substrate overlap between Mrp4 and Abcg2/Bcrp affects purine analogue drug cytotoxicity and tissue distribution. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 6965-6972.
- 164 Koolman, J.; and Röhm, K.-H. Taschenatlas der Biochemie. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 3. Auflage, 2002*, 384-389/398.
- 165 Berg, J.; Tymoczko, J.; and Stryer, L. Biochemie. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, 5. Auflage, 2003*, 431-460.
- 166 Rote Liste®Online: Fachinformation Tarceva®.
- 167 Rote Liste®Online: Fachinformation Iressa®.
- 168 Rote Liste®Online: Fachinformation Glivec®.
- 169 Rote Liste®Online: Fachinformation Tassigna®.
- 170 Rote Liste®Online: Fachinformation Erbitux®.
- 171 www.gaa-m-s.bayern.de/downloads/zytostatika.pdf. Umgang mit Zytostatika.
- 172 Louvard, D. Apical membrane aminopeptidase appears at site of cell-cell contact in cultured kidney epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1980**, *77*, 4132-4136.
- 173 Pavek, P.; Merino, G.; Wagenaar, E.; Bolscher, E.; Novotna, M.; Jonker, J. W.; and Schinkel, A. H. Human breast cancer resistance protein: interactions with steroid drugs, hormones, the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine, and transport of cimetidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *312*, 144-152.
- 174 Hamilton, T. C.; Young, R. C.; and Ozols, R. F. Experimental model systems of ovarian cancer: applications to the design and evaluation of new treatment approaches. *Semin. Oncol.* **1984**, *11*, 285-298.
- 175 DiSaia, P. J.; Sinkovics, J. G.; Rutledge, F. N.; and Smith, J. P. Cell-mediated immunity to human malignant cells. A brief review and further studies with two gynecologic tumors. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1972**, *114*, 979-989.

- 176 Evers, R.; Kool, M.; van Deemter, L.; Janssen, H.; Calafat, J.; Oomen, L. C.; Paulusma, C. C.; Oude Elferink, R. P.; Baas, F.; Schinkel, A. H.; and Borst, P. Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA. *J. Clin. Invest* **1998**, *101*, 1310-1319.
- 177 Bakos, E.; Evers, R.; Szakacs, G.; Tusnady, G. E.; Welker, E.; Szabo, K.; de Haas, M.; van Deemter, L.; Borst, P.; Varadi, A.; and Sarkadi, B. Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32167-32175.
- 178 Gioanni, J.; Fischel, J. L.; Lambert, J. C.; Demard, F.; Mazeau, C.; Zanghellini, E.; Ettore, F.; Formento, P.; Chauvel, P.; Lalanne, C. M.; and . Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **1988**, *24*, 1445-1455.
- 179 Azemar, M.; Schmidt, M.; Arlt, F.; Kennel, P.; Brandt, B.; Papadimitriou, A.; Groner, B.; and Wels, W. Recombinant antibody toxins specific for ErbB2 and EGF receptor inhibit the in vitro growth of human head and neck cancer cells and cause rapid tumor regression in vivo. *Int. J. Cancer* **2000**, *86*, 269-275.
- 180 Petty, R. D.; Sutherland, L. A.; Hunter, E. M.; and Cree, I. A. Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. *J. Biolumin. Chemilumin.* **1995**, *10*, 29-34.
- 181 Lundin, A.; Hasenson, M.; Persson, J.; and Pousette, A. Estimation of biomass in growing cell lines by adenosine triphosphate assay. *Methods Enzymol.* **1986**, *133*, 27-42.
- 182 Tawar, U.; Jain, A. K.; Dwarakanath, B. S.; Chandra, R.; Singh, Y.; Chaudhury, N. K.; Khaitan, D.; and 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.
- 183 Tawar, U.; Jain, A. K.; Chandra, R.; Singh, Y.; Dwarakanath, B. S.; Chaudhury, N. K.; Good, L.; and 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.
- 184 Adhikary, A.; Buschmann, V.; Muller, C.; and 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.
- 185 Parish, C. R. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol. Cell Biol.* **1999**, *77*, 499-508.
- 186 Kiechle, F. L. and Zhang, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clin. Chim. Acta* **2002**, *326*, 27-45.

- 187 Shapiro, A. B. and Ling, V. Reconstitution of drug transport by purified P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 16167-16175.
- 188 Shapiro, A. B. and Ling, V. Using purified P-glycoprotein to understand multidrug resistance. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1995**, *27*, 7-13.
- 189 Kim, M.; Turnquist, H.; Jackson, J.; Sgagias, M.; Yan, Y.; Gong, M.; Dean, M.; Sharp, J. G.; and Cowan, K. The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 22-28.
- 190 Martin, A. M.; Swabrick, J.; Cammarata, A.; Stricker H. Physikalische Pharmazie. *Wissenschaftliche Verlags-Gesellschaft, Stuttgart*, 3. Auflage, **1987**, 1-587.
- 191 Feller, N.; Broxterman, H. J.; Wahrer, D. C.; and Pinedo, H. M. ATP-dependent efflux of calcein by the multidrug resistance protein (MRP): no inhibition by intracellular glutathione depletion. *FEBS Lett.* **1995**, *368*, 385-388.
- 192 Olson, D. P.; Taylor, B. J.; and Ivy, S. P. Detection of MRP functional activity: calcein AM but not BCECF AM as a Multidrug Resistance-related Protein (MRP1) substrate. *Cytometry* **2001**, *46*, 105-113.
- 193 Tiberghien, F. and Loor, F. Ranking of P-glycoprotein substrates and inhibitors by a calcein-AM fluorometry screening assay. *Anticancer Drugs* **1996**, *7*, 568-578.
- 194 Essodaigui, M.; Broxterman, H. J.; and 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.
- 195 Eneroth, A.; Astrom, E.; Hoogstraate, J.; Schrenk, D.; Conrad, S.; Kauffmann, H. M.; and 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.
- 196 Müller, H. Funktionelle Untersuchungen des ABC-Transporters P-Glykoprotein. Dissertation, Universität Bonn, **2007**.
- 197 Leyers, S. Funktionelle Untersuchungen der Multidrug-Resistance-Associated-Proteins (MRP) 1 und 2. Dissertation, Universität Bonn, **2009**.
- 198 Motulsky, H.J. Prism 5 Statistics Guide, *San Diego CA: GraphPad Software Inc.* **2007**.
- 199 Ozvegy-Laczka, C.; Laczko, R.; Hegedus, C.; Litman, T.; Varady, G.; Goda, K.; Hegedus, T.; Dokholyan, N. V.; Sorrentino, B. P.; Varadi, A.; and Sarkadi, B. Interaction with the 5D3 monoclonal antibody is regulated by intramolecular rearrangements but not by covalent dimer formation of the human ABCG2 multidrug transporter. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 26059-26070.

- 200 Okochi, E.; Iwahashi, T.; and Tsuruo, T. Monoclonal antibodies specific for P-glycoprotein. *Leukemia* **1997**, *11*, 1119-1123.
- 201 Aihara, M.; Aihara, Y.; Schmidt-Wolf, G.; Schmidt-Wolf, I.; Sikic, B. I.; Blume, K. G.; and 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.
- 202 Volk, E. L.; Rohde, K.; Rhee, M.; McGuire, J. J.; Doyle, L. A.; Ross, D. D.; and Schneider, E. Methotrexate cross-resistance in a mitoxantrone-selected multidrug-resistant MCF7 breast cancer cell line is attributable to enhanced energy-dependent drug efflux. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 3514-3521.
- 203 Scheffer, G. L.; Kool, M.; Heijn, M.; de Haas, M.; Pijnenborg, A. C.; Wijnholds, J.; van Helvoort, A.; de Jong, M. C.; Hooijberg, J. H.; Mol, C. A.; van der, L. M.; de Vree, J. M.; van, d., V; Elferink, R. P.; Borst, P.; and Scheper, R. J. Specific detection of multidrug resistance proteins MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, and MDR3 P-glycoprotein with a panel of monoclonal antibodies. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 5269-5277.
- 204 Jekerle, V.; Klinkhammer, W.; Reilly, R. M.; Piquette-Miller, M.; and Wiese, M. Novel tetrahydroisoquinolin-ethyl-phenylamine based multidrug resistance inhibitors with broad-spectrum modulating properties. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2007**, *59*, 61-69.
- 205 Ifergan, I.; Shafran, A.; Jansen, G.; Hooijberg, J. H.; Scheffer, G. L.; and 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.
- 206 Müller, H.; Klinkhammer, W.; Globisch, C.; Kassack, M. U.; Pajeva, I. K.; and Wiese, M. New functional assay of P-glycoprotein activity using Hoechst 33342. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7470-7479.
- 207 Pick, A.; Müller, H.; and Wiese, M. Structure-activity relationships of new inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8224-8236.
- 208 Pick, A.; Müller, H.; and Wiese, M. Novel lead for potent inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 180-183.
- 209 Pick, A.; Klinkhammer, W.; and Wiese, M. Specific inhibitors of the breast cancer resistance protein (BCRP). *ChemMedChem.* **2010**, *5*, 1498-1505.
- 210 Böhm, H.-J.; Klebe, G.; and Kubinyi, H. Wirkstoffdesign. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*, **1996**, 361-397.
- 211 Cramer, R. D., III; Patterson, D. E.; and Bunce, J. D. Recent advances in comparative molecular field analysis (CoMFA). *Prog. Clin. Biol. Res.* **1989**, *291*, 161-165.

- 212 Klebe, G.; Abraham, U.; and Mietzner, T. Molecular similarity indices in a comparative analysis (CoMSIA) of drug molecules to correlate and predict their biological activity. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 4130-4146.
- 213 Klinkhammer, W. Design, Synthese und 3D-QSAR neuartiger P-gp-Modulatoren, Dissertation, Universität Bonn, **2006**.
- 214 Müller, H.; Pajeva, I. K.; Globisch, C.; and Wiese, M. Functional assay and structure-activity relationships of new third-generation P-glycoprotein inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 2448-2462.
- 215 Höltje, H.-D.; Sippl, W.; Rognan, D. and Folkers, G. Molecular Modelling. *Wiley-VCH, Weinheim*, **2008**, 1-296.
- 216 Shimomura, O.; Johnson, F. H.; and Saiga, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell Comp Physiol* **1962**, *59*, 223-239.
- 217 Shimomura, O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J. Microsc.* **2005**, *217*, 1-15.
- 218 Heim, R.; Cubitt, A. B.; and Tsien, R. Y. Improved green fluorescence. *Nature* **1995**, *373*, 663-664.
- 219 Kühnle, M.; Egger, M.; Müller, C.; Mahringer, A.; Bernhardt, G.; Fricker, G.; König, B.; and Buschauer, A. Potent and selective inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2) derived from the p-glycoprotein (ABCB1) modulator tariquidar. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1190-1197.
- 220 Kuppens, I. E.; Witteveen, E. O.; Jewell, R. C.; Radema, S. A.; Paul, E. M.; Mangum, S. G.; Beijnen, J. H.; Voest, E. E.; and Schellens, J. H. A phase I, randomized, open-label, parallel-cohort, dose-finding study of elacridar (GF120918) and oral topotecan in cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 3276-3285.
- 221 http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/81/Michaelis-Menten_plot.svg/440px-Michaelis-Menten_plot.svg.png.
- 222 Segel, I. Enzyme Kinetics. *John Wiley and Sons, New York*, **1975**.
- 223 Bisswanger, H. Enzymkinetik. *Wiley-VCH, Weinheim*, 3. Auflage, **2002**, 53-169.
- 224 Saito, H.; Hirano, H.; Nakagawa, H.; Fukami, T.; Oosumi, K.; Murakami, K.; Kimura, H.; Kouchi, T.; Konomi, M.; Tao, E.; Tsujikawa, N.; Tarui, S.; Nagakura, M.; Osumi, M.; and Ishikawa, T. A new strategy of high-speed screening and quantitative structure-activity relationship analysis to evaluate human ATP-binding cassette transporter ABCG2-drug interactions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *317*, 1114-1124.
- 225 Houghton, P. J.; Germain, G. S.; Harwood, F. C.; Schuetz, J. D.; Stewart, C. F.; Buchdunger, E.; and Traxler, P. Imatinib mesylate is a potent inhibitor of

- the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 in vitro. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 2333-2337.
- 226 Burger, H.; van Tol, H.; Boersma, A. W.; Brok, M.; Wiemer, E. A.; Stoter, G.; and Nooter, K. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood* **2004**, *104*, 2940-2942.
- 227 Breedveld, P.; Pluim, D.; Cipriani, G.; Wielinga, P.; van Tellingen, O.; Schinkel, A. H.; and Schellens, J. H. The effect of Bcrp1 (Abcg2) on the in vivo pharmacokinetics and brain penetration of imatinib mesylate (Gleevec): implications for the use of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitors to enable the brain penetration of imatinib in patients. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 2577-2582.
- 228 Minderman, H.; Suvannasankha, A.; O'Loughlin, K. L.; Scheffer, G. L.; Scheper, R. J.; Robey, R. W.; and Baer, M. R. Flow cytometric analysis of breast cancer resistance protein expression and function. *Cytometry* **2002**, *48*, 59-65.
- 229 Liu, Y.; Jiang, N.; Wu, J.; Dai, W.; and Rosenblum, J. S. Polo-like kinases inhibited by wortmannin. Labeling site and downstream effects. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 2505-2511.
- 230 Wang, H.; Zhou, L.; Gupta, A.; Vethanayagam, R. R.; Zhang, Y.; Unadkat, J. D.; and Mao, Q. Regulation of BCRP/ABCG2 expression by progesterone and 17beta-estradiol in human placental BeWo cells. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **2006**, *290*, E798-E807.
- 231 Wang, H.; Unadkat, J. D.; and Mao, Q. Hormonal regulation of BCRP expression in human placental BeWo cells. *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 444-452.
- 232 Pradhan, M.; Bembinster, L. A.; Baumgarten, S. C.; and Frasor, J. Proinflammatory cytokines enhance estrogen-dependent expression of the multidrug transporter gene ABCG2 through estrogen receptor and NF{kappa}B cooperativity at adjacent response elements. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 31100-31106.
- 233 Zhang, Y.; Zhou, G.; Wang, H.; Zhang, X.; Wei, F.; Cai, Y.; and Yin, D. Transcriptional upregulation of breast cancer resistance protein by 17beta-estradiol in ERalpha-positive MCF-7 breast cancer cells. *Oncology* **2006**, *71*, 446-455.
- 234 Ozvegy-Laczka, C.; Varady, G.; Koblos, G.; Ujhelly, O.; Cervenak, J.; Schuetz, J. D.; Sorrentino, B. P.; Koomen, G. J.; Varadi, A.; Nemet, K.; and Sarkadi, B. Function-dependent conformational changes of the ABCG2 multidrug transporter modify its interaction with a monoclonal antibody on the cell surface. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 4219-4227.

7 Veröffentlichungen

Wissenschaftliche Originalarbeiten

Pick, A.; Müller, H.; Wiese, M. Structure-Activity Relationships of New Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2). *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8224-8236.

Pick, A.; Müller, H.; Wiese, M. Novel lead for potent inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 180-183.

Pick, A.; Klinkhammer, W.; Wiese, M. Specific Inhibitors of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP). *Chem. Med. Chem.* **2010**, *5*, 1498-1505.

Pick, A.; Müller, H.; Pajeva, I. K.; Weigt, M.; Mayer, R.; Haenisch, B.; Bönisch, H.; Müller, C. E.; Wiese, M. Structure-activity relationships of flavonoids as inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP). *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2090-2102.

Abstrakta / Kongressbeiträge

Pick, A.; Müller, H.; Wiese, M. Structure-Activity Relationships of New Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2). *FEBS Special Meeting*, Innsbruck, **2008** (Poster).

Pick, A.; Müller, H.; Wiese, M. Structure-Activity Relationships of New Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2). *DPhG Jahrestagung*, Bonn, **2008** (Poster).

Pick, A.; Müller, H.; Wiese, M. New and Specific Inhibitors of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP). *Symposium des GRK677*, Bonn, **2009** (Poster).

Steggemann, K.; Pick, A.; Wiese, M. Synthesis of Tariquidar analogues with an urea substructure as BCRP modulators. *Symposium des GRK677*, Bonn, **2009** (Poster).

Pick, A.; Müller, H.; Bendas, G.; Wiese, M. Interaction of Tyrosinekinase-Inhibitors with Breast Cancer Resistance Protein (BCRP). *Internationales Symposium des GRK 677*, Bonn, **2009** (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, Mai 2011

Anne Pick