

# **Funktionelle Untersuchungen des ABC-Transporters ABCG2**

## **Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Sibylle Maria Hanl**

aus Bonn

Bonn 2021



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

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Wiese
2. Gutachter: Prof. Dr. Finn Kristian Hansen

Tag der Promotion: 28.09.2021

Erscheinungsjahr: 2021



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	ABC-Transporter .....	1
1.2	Proteinstrukturen von ABCG2, ABCB1 und ABCC1.....	3
1.3	ABCG2 .....	6
1.4	ABCB1 .....	15
1.5	ABCC1 .....	20
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>25</b>
3.1	Verwendete Zelllinien .....	25
3.1.1	MDCK II Wildtyp und MDCK II BCRP .....	25
3.1.2	PLB-985 Wildtyp und PLB-985 ABCG2 .....	25
3.1.3	A2780 Wildtyp und A2780adr.....	26
3.1.4	MCF-7 Wildtyp und MCF-7 MX.....	26
3.1.5	H69AR .....	26
3.2	Zellkultur.....	27
3.2.1	Adhärente Zellen.....	27
3.2.2	Suspensionszellen .....	28
3.2.3	Zellzahlbestimmung .....	28
3.2.4	Inkulturnahme von Zellen.....	28
3.2.5	Kryokonservierung von adhärenen Zellen.....	29
3.2.6	Kryokonservierung von Suspensionszellen.....	29
3.2.7	Krebs-HEPES-Puffer (KHP).....	29
3.3	Materialien.....	31
3.4	Chemikalien .....	32
3.5	Geräte .....	35
3.6	Hoechst 33342 Assay .....	37
3.6.1	Grundlagen zum Hoechst 33342 Assay.....	37
3.6.2	Durchführung des Hoechst 33342 Assays .....	37
3.7	Calcein AM Assay .....	39

3.7.1	Grundlagen zum Calcein AM Assay .....	39
3.7.2	Durchführung des Calcein AM Assays .....	40
3.8	Grundlagen der Durchflusszytometrie .....	42
3.8.1	Datenerfassung .....	42
3.9	Pheophorbid A Assay .....	43
3.9.1	Grundlagen zum Pheophorbid A Assay.....	43
3.9.2	Durchführung des Pheophorbid A Assays.....	43
3.10	Rhodamin 123 Assay .....	45
3.10.1	Grundlagen zum Rhodamin 123 Assay.....	45
3.10.2	Durchführung des Rhodamin 123 Assays .....	45
3.11	Rhod 4 AM Assay .....	46
3.11.1	Grundlagen zum Rhod 4 AM Assay .....	46
3.11.2	Durchführung des Rhod 4 AM Assays.....	47
3.11.3	Untersuchungen mit dem konfokalen Lasermikroskop.....	48
3.12	MTT Assay .....	49
3.12.1	Grundlagen zum MTT Assay.....	49
3.12.2	Durchführung des MTT Assays .....	50
3.13	5D3-Shift Assay .....	51
3.13.1	Grundlagen zum 5D3-Shift Assay .....	51
3.13.2	Durchführung des 5D3-Shift Assays .....	51
3.14	Sf9 Zellen und Baculovirus.....	52
3.14.1	Sf9 Zellen .....	52
3.14.2	Baculovirus.....	53
3.14.3	Inkulturnahme.....	53
3.14.4	Adhärenz Kultivierung .....	53
3.14.5	Suspensionskultur .....	54
3.14.6	Kryokonservierung .....	54
3.14.7	Infektion der Sf9 Zellen mit Baculovirus .....	54
3.14.8	Virusamplifikation .....	55
3.15	Membranpräparation .....	55
3.15.1	Verwendete Lösungen.....	55
3.15.2	Durchführung der Membranpräparation .....	57
3.15.3	Proteinbestimmung .....	58
3.16	Vanadat-sensitiver ATPase Assay .....	58

3.16.1	Grundlagen zum Vanadat-sensitiven ATPase Assay .....	58
3.16.2	Verwendete Lösungen .....	59
3.16.3	Vanadat-sensitiver ATPase Assay im Röhrchen.....	62
3.16.4	Vanadat-sensitiver ATPase Assay in der Mikrotiterplatte.....	63
3.17	Konformationsanalyse.....	64
3.18	Datenanalyse .....	66
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>69</b>
4.1	Pheophorbid A Simultan-Assay.....	69
4.1.1	Gating-Strategie.....	70
4.1.2	Diskussion der Gating-Strategie.....	72
4.1.3	Schlussfolgerung.....	75
4.2	Rhod 4 AM Assay.....	76
4.2.1	Kinetik von Rhod 4 AM.....	77
4.2.2	HTS-fähiger Assay mit Rhod 4 AM für ABCB1.....	79
4.2.3	Untersuchung bekannter ABCB1 Inhibitoren .....	81
4.2.4	Schlussfolgerung.....	87
4.2.5	Untersuchung mit dem konfokalen Lasermikroskop.....	87
4.3	Funktionelle Charakterisierung der PLB-985 Zelllinie.....	89
4.4	Charakterisierung von DCFH-DA an ABCG2 .....	94
4.4.1	Voruntersuchungen.....	95
4.4.2	Anwendung eines HTS-fähigen DCFH-DA Assays.....	101
4.4.3	Schlussfolgerung.....	104
4.5	Charakterisierung der OMP-Verbindungen .....	105
4.5.1	Fluoreszenzspektren der OMP-Verbindungen .....	106
4.5.2	Untersuchung der OMP-Verbindungen an ABCB1 .....	107
4.5.3	Schlussfolgerung.....	109
4.6	Optimierung des Vanadat-sensitiven ATPase Assays .....	110
4.6.1	Beladung der Sf9-Membranen mit Cholesterol .....	110
4.6.2	HTS-fähiger Vanadat-sensitiver ATPase Assay.....	112
4.7	Charakterisierung von Quercetin und Ko143 .....	120
4.7.1	Vanadat-sensitiver ATPase Assay.....	120
4.7.2	Strategie der Prozentualisierung der Daten .....	122
4.7.3	Charakterisierung mit funktionellen Assays .....	123

4.7.4	5D3-Shift Assay.....	124
4.7.5	Schlussfolgerung.....	126
4.8	Untersuchung von Tariquidar-Analoga.....	127
4.8.1	Tariquidar.....	131
4.8.1.1	Vanadat-sensitiver ATPase Assay.....	132
4.8.1.2	Charakterisierung mit funktionellen Assays.....	134
4.8.2	Tariquidar-Analoga.....	135
4.8.2.1	Vanadat-sensitiver ATPase Assay.....	137
4.8.2.2	Charakterisierung mit Hilfe von funktionellen Assays.....	141
4.8.3	Tariquidar-Analoga mit Tetrahydroisochinolinrest mit veränderter Grundstruktur.....	143
4.8.3.1	Vanadat-sensitiver ATPase Assay.....	145
4.8.3.2	Charakterisierung mit funktionellen Assays.....	148
4.8.4	Tariquidar-Analoga ohne Tetrahydroisochinolinrest mit veränderter Grundstruktur.....	149
4.8.4.1	Vanadat-sensitiver ATPase Assay.....	151
4.8.4.2	Charakterisierung mit funktionellen Assays.....	153
4.8.5	Untersuchung ausgewählter SK-, Kö- und MS-Verbindungen.....	154
4.8.5.1	Vanadat-sensitiver ATPase Assay.....	156
4.8.5.2	Charakterisierung mit funktionellen Assays.....	160
4.8.6	Untersuchung von Elacridar-Analoga.....	161
4.8.6.1	Vanadat-sensitiver ATPase Assay.....	162
4.8.6.2	Charakterisierung mit funktionellen Assays.....	164
4.8.7	Konformationsanalyse der Tetrahydroisochinoline.....	164
4.8.8	Schlussfolgerung.....	170
4.9	Untersuchung von 2-Arylamino-1 <i>H</i> -benzimidazolen.....	173
4.9.1	Vanadat-sensitiver ATPase Assay.....	177
4.9.2	Charakterisierung mit funktionellen Assays.....	182
4.9.3	Schlussfolgerung.....	184
4.10	Kombinationsexperimente im Vanadat-sensitiven ATPase Assay.....	185
4.10.1	Kombination von Ko143 und XR9577 mit Quercetin.....	186
4.10.2	Kombinationen von Tariquidar-Analoga.....	191
4.10.3	Kombinationen mit Fluoreszenzfarbstoffen.....	196
4.10.3.1	Vanadat-sensitiver ATPase Assay.....	197



4.10.3.2	Charakterisierung mit funktionellen Assays .....	198
4.10.3.3	Kombinationen mit Hoechst 33342 .....	200
4.10.4	Schlussfolgerung.....	208
4.11	Tyrosinkinase-Inhibitoren .....	209
4.11.1	Vanadat-sensitiver ATPase Assay .....	211
4.11.2	Charakterisierung mit funktionellen Assays .....	213
4.11.3	Toxizität.....	215
4.11.4	Konformationsanalyse von Imatinib und Nilotinib.....	218
4.11.5	Schlussfolgerung.....	219
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>221</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>225</b>
<b>7</b>	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>249</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A2780	humane Ovarialkarzinomzelllinie
ABC	ATP binding cassette, ATP-Bindungsstelle
ABCB1	Gen-Nomenklatur von P-Glykoprotein (P-gp )
ABCC1	Gen-Nomenklatur von Multidrug Resistance associated Protein 1 (MRP1)
ABCG2	Gen-Nomenklatur von Breast Cancer resistance Protein (BCRP)
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin, Rinder Serumalbumin
CHO	Chinese Hamster Ovarian, Ovarzellen des chinesischen Hamsters
DCF	2',7'-Dichlorfluorescein
DCFH	2',7'-Dichlordihydrofluorescein
DCFH-DA	2',7'-Dichlordihydrofluoresceindiacetat
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC <sub>b</sub>	effektive Konzentration für einen Effekt b %
EC <sub>50</sub>	halbmaximale effektive Konzentration
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FACS	Fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FKS	Fetales Kälberserum
GI <sub>50</sub>	halbmaximale Wachstumshemmung
GSH	reduziertes Glutathion
H69AR	kleinzellige Lungentumorzelllinie, Doxorubicin resistent
HTS	High-Throughput-Screening, Hochdurchsatz Screening
IC <sub>50</sub>	halbmaximale inhibitorische Konzentration

KHP	Krebs-HEPES-Puffer
MDCK II	Madin Darby Canine Kidney II Zelllinie
MDR	Multidrug Resistance, Multiple Zytostatikaresistenz
MCF-7	humane Mammakarzinomzelllinie
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NBD	Nukleotid-Bindungsdomäne
PDGF-R	Platelet-derived Growth Factor Receptor
pEC <sub>b</sub>	Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration für einen Effekt von b %
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pEC <sub>50</sub>	Negativer dekadischer Logarithmus der halbmaximalen Effekt Konzentration
pGI <sub>50</sub>	Negativer dekadischer Logarithmus der halbmaximalen Wachstumshemmung
P <sub>i</sub>	Anorganisches Phosphat
pIC <sub>50</sub>	Negativer dekadischer Logarithmus der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration
PLB-985	Akute Myeloische Leukämie Zellen
rpm	Revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
SD	Standard deviation, Standardabweichung
Sf9	immortalisierte Ovarzellen aus Spodoptera frugiperda
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TMD	Transmembranäre Domäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGFR	Vascular Endothelium Growth Factor Receptor



# 1 Einleitung

## 1.1 ABC-Transporter

ABC-Transporter (ATP binding cassette) gehören zu einer der größten Klassen von Membranproteinen die ubiquitär in Organismen vorkommen.<sup>1-4</sup> Bis auf wenige Ausnahmen benutzen sie Energie, die bei der Hydrolyse aus Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat (P<sub>i</sub>) frei wird, um Moleküle aktiv durch die Zellmembran zu transportieren.<sup>5-7</sup> Bei Bakterien findet man sowohl Importer als auch Exporter. Eukaryoten besitzen bis auf wenige Ausnahmen nur Exporter.<sup>2,5,8</sup> Die meisten ABC-Transporter besitzen einen charakteristischen Aufbau.<sup>2-4,9</sup> Die kleinste Funktionseinheit besteht aus zwei Hälften, die insgesamt mindestens vier Domänen enthalten, zwei Transmembranären Domänen (TMDs) und zwei Nukleotid Bindungsdomänen (NBDs) im Zytosol. Die TMDs bestehen aus  $\alpha$ -Helices mit variabler Struktur, während die NBDs charakteristische hochkonservierte Sequenzmotive enthalten. Diese sind das Walker A Motiv, der Q-Loop, die Subfamilien spezifische NBD-Signatur (C-Loop), das Walker B Motiv und der His-Switch.<sup>3</sup> Die beiden NBDs steuern durch ATP-Hydrolyse den Transport von Substanzen. Der genaue Mechanismus dazu ist noch nicht abschließend geklärt.<sup>10</sup> Neben Voll-Transportern sind auch Halb-Transporter bekannt, die nur eine TMD und NBD besitzen. Sie müssen zunächst dimerisieren um funktionsfähig zu sein.<sup>11,12</sup> Bis jetzt sind 48 humane ABC-Proteine bekannt, die sich aufgrund der Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenz der NBDs in sieben Untergruppen (ABCA – ABCG) einteilen lassen.<sup>3,4,13</sup>

ABC-Transporter finden sich überall im Körper und sind an vielfältigen physiologischen Vorgängen beteiligt.<sup>8,14</sup> Mutationen in ABC-Transportern können zu einer vollständigen oder eingeschränkten Funktionsfähigkeit des Transporters führen und genetische Erkrankungen zur Folge haben.<sup>15</sup> So liegen z.B. bei der Zystischen

Fibrose Defekte in ABCC7, bei der Adrenoleukodystrophie (ALD) Defekte in ABCD1 oder beim Dublin-Johnson-Syndrom Defekte in ABCC2 vor.<sup>7,15,16</sup>

ABC-Transporter werden häufig in Geweben mit Barriere-Funktion wie der Blut-Hirn-Schranke, der Leber, der Plazenta oder im Darm exprimiert.<sup>17,18</sup> Physiologisch sind sie nicht nur am Transport von einer Vielzahl unterschiedlicher endogener Substrate und Xenobiotica, sondern auch an zellulären Prozessen oder deren Regulation beteiligt.<sup>19–21</sup> So haben ABC-Transporter einen Einfluss auf die Absorption, Distribution, Metabolisierung und Exkretion von Arzneistoffen und spielen dadurch eine Rolle bei der Interaktion von Arzneistoffen oder auch bei der Wirksamkeit von Therapien.<sup>22,23</sup> Sie transportieren z.B. eine Reihe von Antiarrhythmika, Tyrosinkinase-Inhibitoren, Zytostatika, Flavonoiden, Hormonen, Antibiotika, Calcium-Kanal Blockern oder Virustatika.<sup>21,22,24</sup> Daher wird auch in der präklinischen Entwicklung von Arzneistoffen von der FDA empfohlen, die Interaktion von Arzneistoffen mit ABC-Transportern standardmäßig zu untersuchen. So haben die im Rahmen der Zulassung beobachteten Wechselwirkungen, unter anderem mit ABCB1, den Eingang in die medizinische Fachinformation von Arzneimitteln wie Cabazitaxel, Posaconazol oder Clarithromycin gefunden.<sup>23,25–30</sup>

Einige Transporter sind an dem Phänomen der Multidrug-Resistance (MDR) beteiligt. Die pharmakologisch relevantesten ABC-Transporter sind dabei ABCB1 (P-gp), ABCC1 (MRP1) und ABCG2 (BCRP).<sup>17,18,22</sup> Sie können zu einem Therapieversagen der Chemotherapie führen, da sie Zytostatika aktiv aus den Tumorzellen hinauspumpen und so zur Verminderung der Wirkkonzentration der Zytostatika führen oder verhindern, dass Zytostatika, die z.B. bei Hirntumoren die Blut-Hirn Schranke überwinden müssen, ihren Wirkort erreichen.<sup>21,31</sup> Vor rund 30 Jahren wurden erste Untersuchungen mit klinischen Studien am Menschen begonnen, die zum Ziel hatten, ABC-Transporter, speziell ABCB1, als geeignete Zielstruktur zur Verbesserung von Chemotherapien zu etablieren.<sup>32–37</sup> Allerdings waren die Ergebnisse von klinischen Phase II und Phase III Studien sehr ernüchternd. Entweder führte die Kombination von Zytostatika und ABCB1-Inhibitor zu erhöhten Nebenwirkungen (Verapamil) oder aufgrund von Interaktionen mit CYP450-Enzymen zu einer schlechteren Verträglichkeit des Zytostatikums (Valspodar) oder hatten keinen positiven Outcome für die Patienten (Tariquidar).<sup>38,39</sup> Das hatte zur Folge, dass

dieser Forschungszweig nahezu eingestellt wurde und sich die verbleibende Forschung auf mechanistische und funktionelle Aspekte der ABC-Transporter beschränkte.<sup>40</sup> Retrospektiv waren die Studiendesigns mangelhaft. So wurde z.B. nicht überprüft, ob in den Tumoren das Zieltarget ABCB1 hochreguliert war. Zudem ist heute klar, dass in Tumoren oftmals multiple ABC-Transporter überexprimiert werden. Verbesserungen der diagnostischen Methoden und Fortschritte in der personalisierten Medizin und daraus resultierende Erkenntnisse aus Genexpression, Genmutation und Single-Nucleotid Polymorphismus (SNP) Studien deuten darauf hin, dass ABC-Transporter als Biomarker oder als Zielstrukturen in Kombinations-therapien wieder in den Fokus der Aufmerksamkeit rücken sollten.<sup>40</sup>

Im Folgenden werden nun die drei Transporter ABCB1, ABCC1 und ABCG2 näher vorgestellt. Diese sind bei der Entstehung der MDR involviert.

### **1.2 Proteinstrukturen von ABCG2, ABCB1 und ABCC1**

Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen stellt eine große Herausforderung in der Biologie dar. Diese ist für das Verständnis der Funktion von Proteinen jedoch grundlegend. Die Methode der Kryoelektronenmikroskopie, die seit den 1960er Jahren zur Strukturaufklärung eingesetzt wird, war lange aufgrund ihrer begrenzten Auflösung von maximal 7-9 Å nur eingeschränkt nutzbar. In den letzten 7 Jahren wurde die Methode jedoch durch mehrere Entwicklungen stark verbessert. Zum einen konnte durch den Einsatz einer neuen Generation von Elektronen-Detektoren das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert werden, zum anderen führte der Einsatz von Kameras mit hoher Bildfrequenz zu einer größeren Auflösung und zum dritten wurden durch verbesserte Algorithmen große Fortschritte in der computergestützten Auswertung erzielt. Dies führte dazu, dass mittlerweile Auflösungen bis 3 Å erreicht werden können.<sup>41,42</sup>

In der Folge wurden in den letzten drei Jahren unter anderem hochaufgelöste Kryoelektronenmikroskopstrukturen der ABC-Transporter ABCB1, ABCC1 und ABCG2 veröffentlicht.<sup>43-49</sup> Da sowohl die Bindung von Inhibitoren als auch Aktiva-

toren der basalen ATPase Aktivität visualisiert werden konnte, ermöglichen die Aufnahmen die Darstellung der Bindungstaschen und detailliertere Modelle zur Deutung der Transportmechanismen, die in den folgenden Kapiteln beschrieben werden.

Die Proteinstrukturen der drei Transporter sind in Abbildung 1-1 dargestellt. Die Transporter sind in der nach innen geöffneten Nukleotid-freien Konformation abgebildet. Die Membranebene ist als grauer Balken dargestellt.

Die transmembranären  $\alpha$ -Helices lassen sich von den im Zytosol gelegenen NBDs unterscheiden. Dabei wird deutlich, wie grundlegend sich ABCB1, ABCC1 und ABCG2 strukturell voneinander unterscheiden. So ist ABCG2 offenkundig kleiner als ABCB1 und ABCC1. Die räumliche Anordnung der funktionellen Domänen von ABCG2 unterscheidet sich von denen der anderen beiden Transporter. Während die TMDs der beiden Monomere von ABCG2 nebeneinander in der Membran liegen, liegen die TMDs von ABCB1 und ABCC1 ineinander verschränkt vor und haben dadurch im Gegensatz zu den TMDs von ABCG2 Kontakte mit beiden NBDs. Als Besonderheit weisen einige Transporter der ABCC-Familie eine TMD0 auf, deren Funktion nicht abschließend geklärt ist.<sup>92</sup> Die Verbindung von TMD0 und Lasso-Motiv ist in der Kryoelektronenmikroskopaufnahme von ABCC1 nicht enthalten. Dies deutet auf einen flexiblen Molekülbereich hin.<sup>48,49</sup>



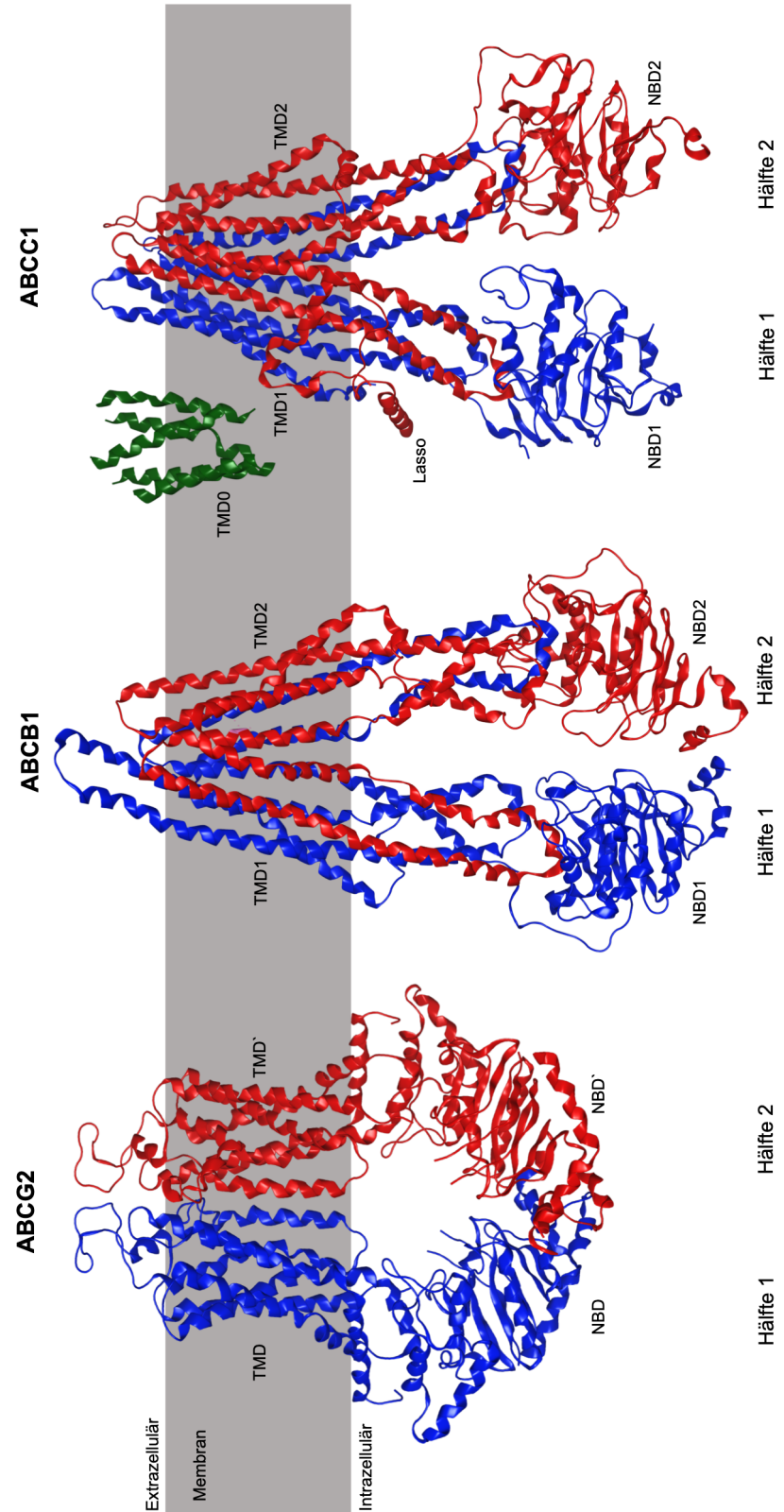
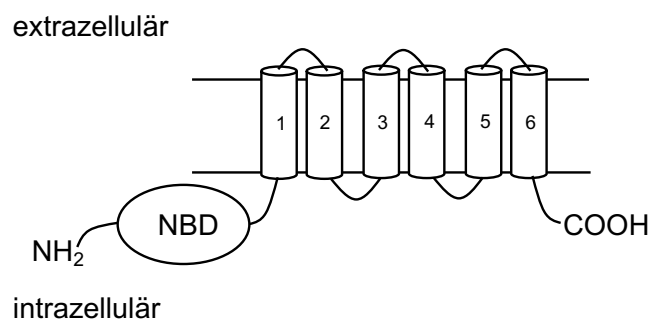


Abbildung 1-1: Proteinstrukturen: humanes ABCG2 (Homodimer), Jackson et al. (PDB: 6FEQ),<sup>44</sup> humanes ABCB1, Alam et al. (PDB: 6QEX),<sup>47</sup> und bovines ABCC1, Johnson et al. (PDB: 5UJA).<sup>48</sup>

### 1.3 ABCG2

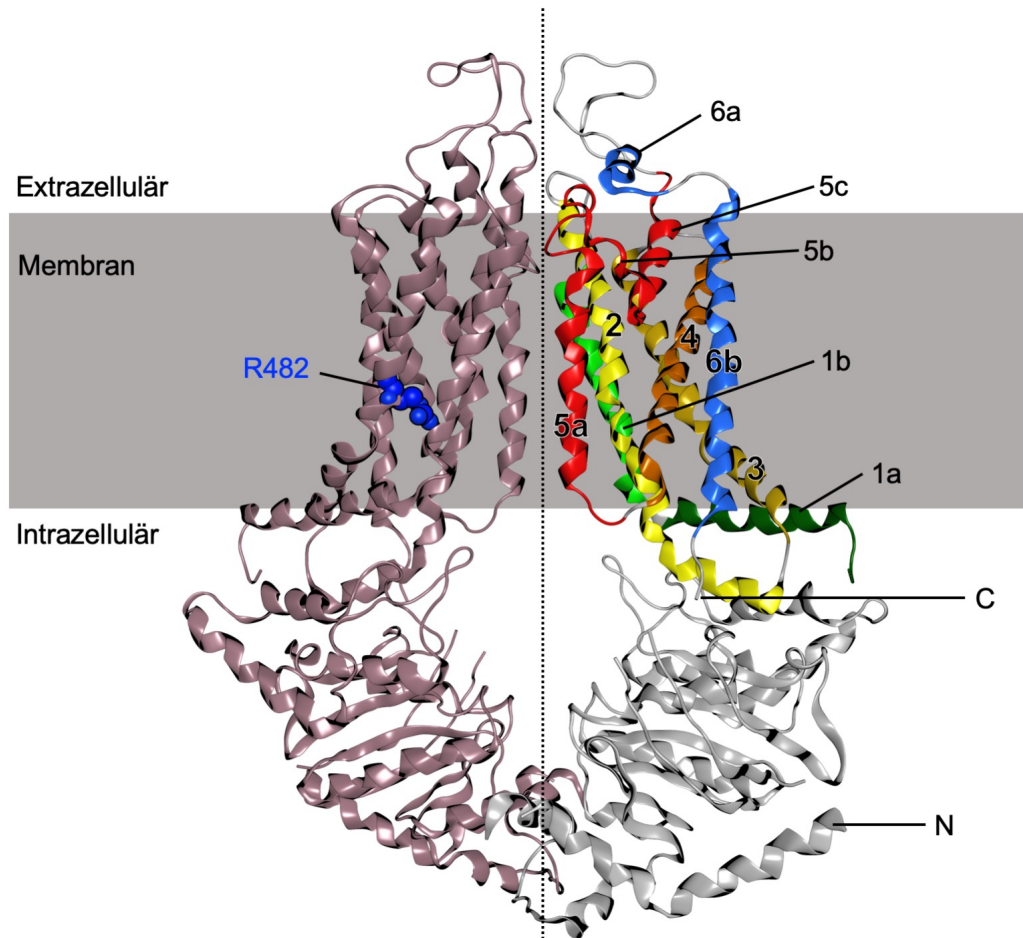
ABCG2 (BCRP) wurde im Jahre 1998 von Doyle et al. in der Doxorubicin resistenten Zelllinie MCF-7/AdrVp entdeckt und fast zeitgleich ebenfalls von den Arbeitsgruppen um Miyake und Allikmets beschrieben.<sup>50–53</sup> ABCG2 wird in einer Reihe von Geweben, wie der Lunge, Leber, Blut-Hirn-Schranke, Plazenta oder Dünndarm exprimiert.<sup>54</sup> Zusätzlich findet sich ABCG2 auch in sogenannten Side-Populations von Stammzellen des blutbildenden Systems.<sup>55</sup>

Das humane ABCG2-Gen ist auf dem Chromosom 4q22 lokalisiert.<sup>56</sup> Es besteht aus 655 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 72 kDa.<sup>13,57</sup> ABC-Transporter der ABCG-Familie bestehen aus einer NBD am N-Terminus und einer TMD und stellen so Halbtransporter dar.<sup>11,12,57</sup> Sie müssen dimerisieren um Funktionsfähig zu sein. ABCG2 fungiert dabei als Homodimer.<sup>10,45</sup> Das Topologiemodell von ABCG2 ist in Abbildung 1-2 abgebildet.



**Abbildung 1-2: Topologiemodell von ABCG2.**

Die Struktur des Homodimers von ABCG2 ist in Abbildung 1-3 abgebildet. Abgeleitet wurde sie aus Kryoelektronenmikroskopstrukturen von Jackson et al. und Taylor et al..<sup>44,45</sup> Die Monomere sind farblich getrennt dargestellt. Im linken Monomer ist die Position R482 gekennzeichnet. Der Austausch von Arginin zu Threonin oder Glycin an dieser Position führt zu einer Veränderung der Substratspezifität von ABCG2. Im rechten Monomer sind die Helices 1a, 1b, 2, 3, 4, 5a, 5b, 5c, 6a und 6b der TMD farblich unterschiedlich abgebildet, C- und N-Terminus ebenfalls markiert.



**Abbildung 1-3: Struktur des Homodimers von ABCG2 (PDB: 6FEQ).<sup>44,45</sup> Linkes Monomer: Kennzeichnung der Position R482. Rechtes Monomer: Kennzeichnung der Helices 1a, 1b, 2, 3, 4, 5a, 5b, 5c, 6a und 6b der TMD sowie des C- und des N-Terminus.**

ABCG2 besitzt eine breite Substraterkennung.<sup>12,57</sup> Es kann sowohl große, hydrophobe, positiv oder negativ geladene Moleküle, Fluoreszenzfarbstoffe oder Toxine transportieren. Ein Überblick über ausgewählte Verbindungen, die mit ABCG2 interagieren, ist in Tabelle 1-1 gegeben.

Aktuelle Sequenzanalysen deuten auf mehr als 15.000 SNPS (Single Nucleotide Polymorphismus) des ABCG2 Gens hin.<sup>58</sup> Mutationen können zu einer Veränderung der Proteinexpression, Funktion oder einer veränderten Substratspezifität führen. So bewirkt die Mutation von Arginin an der Position 482 zu Threonin oder Glycin, die im linken Monomer in Abbildung 1-3 abgebildet ist, dass ABCG2 Rhodamin 123 transportieren kann, welches vom Wildtyp nicht als Substrat erkannt wird.<sup>45,56,59</sup> R482 ist auf TM3 lokalisiert, dort bildet es eine Wasserstoffbrückenbindung mit S521 auf TM4. Der Abstand zur Bindungstasche beträgt 9 Å, daher ist der

Effekt auf die Substratspezifität wahrscheinlich durch allosterische Effekte zu erklären.<sup>45</sup> Es ist nicht geklärt, inwieweit diese Mutation klinisch relevant ist, da sie bisher ausschließlich in Zellkulturen gefunden wurde.

**Tabelle 1-1: Auswahl von ABCG2 Modulatoren und Substraten.**<sup>57,60-65</sup>

<b>Substanzklasse</b>	<b>Verbindung</b>
Zytostatika	Mitoxantron Bisanthren Topotecan Irinotecan SN-38 Aza-Anthrapyrazol Diflomotecan
Virustatika	Lamivudin Zidovudin
Antibiotika	Ciprofloxacin Erythromycin Nitrofurantoin
Glukuronid- und Sulfatkonjugate	Estradiol-17- $\beta$ -D-glukuronid Dehydroepiandrosteron-3-sulfat
Flavonoide	Quercetin Genistein
Tyrosinkinase-Inhibitoren	Gefitinib Erlotinib Imatinib Nilotinib
Verschiedene	Omeprazol Prazosin Abacavir Sulfasalazin Cimetidin Indolcarbazol Flavopiridol Tariquidar Elacridar

Substanzklasse	Verbindung
Porphyrine	Pheophorbid A Protoporphyrin
Fluoreszenzfarbstoffe	Bodipy-prazosin Hoechst 33342

In der Vergangenheit wurden viele Versuche unternommen, generelle Konzepte für den Transportmechanismus der ABC-Transporter zu entwickeln. Dazu zählen z.B. das ATP-Switch-Modell oder das Kolben-Modell.<sup>66,67</sup> Die strukturellen und phylogenetischen Unterschiede der ABC-Transporter legen aber nahe, dass dieser Ansatz überholt ist und dass trotz mechanistischer Ähnlichkeiten unterschiedliche Transportmechanismen bei den verschiedenen ABC-Transportern vorliegen.<sup>68</sup>

Taylor et al. haben mit Hilfe von Kryoelektronenmikroskopstrukturen von ABCG2 ein Modell für den Transportmechanismus von ABCG2 entwickelt.<sup>45</sup> Das Schema ist in Abbildung 1-4 dargestellt.

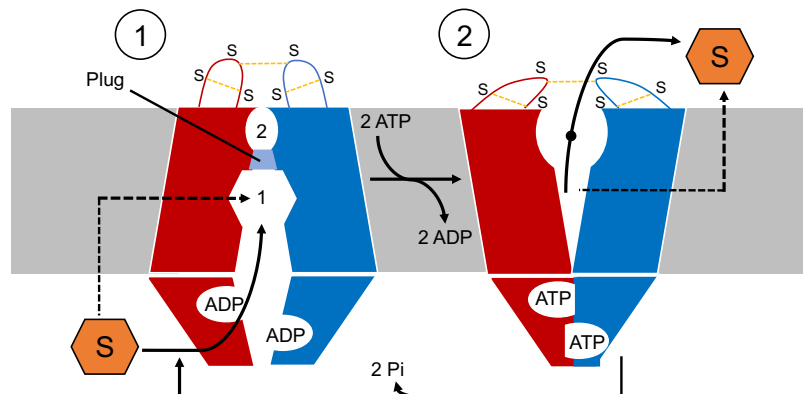
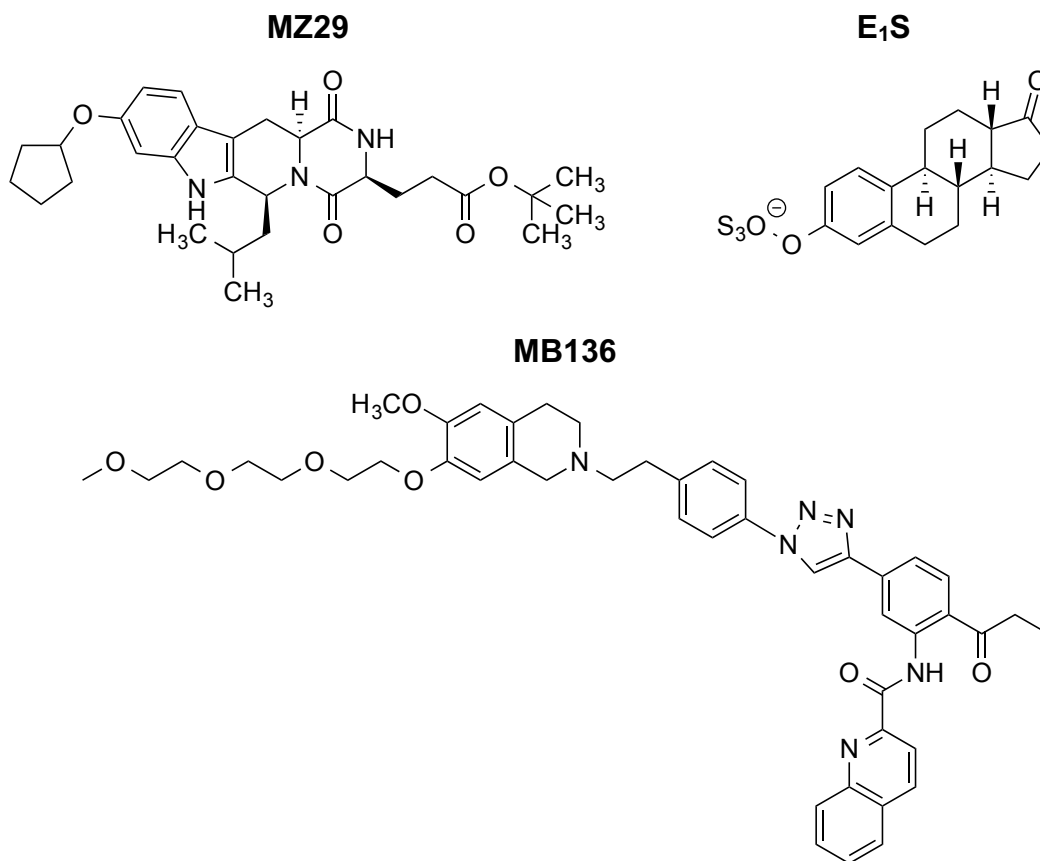


Abbildung 1-4: Transportmechanismus von ABCG2 nach Taylor et al.<sup>45</sup>

Zunächst tritt in 1 das Substrat „S“ vom Zytosol oder über die Membran in Bindungstasche 1 ein. Bindungstasche 2 bleibt durch einen Leucin-Pfropfen „Plug“ verschlossen. Das Schließen der NBDs durch Bindung von ATP führt zu einer Konformationsänderung von ABCG2. Diese führt in 2 dazu, dass sich ABCG2 nach außen öffnet und das Substrat „S“ über Bindungstasche 2 in den Extrazellulärraum freigegeben wird. Die Freisetzung von anorganischem Phosphat  $P_i$  sorgt für die Wiederherstellung des nach innen geöffneten Zustands 1 von ABCG2.

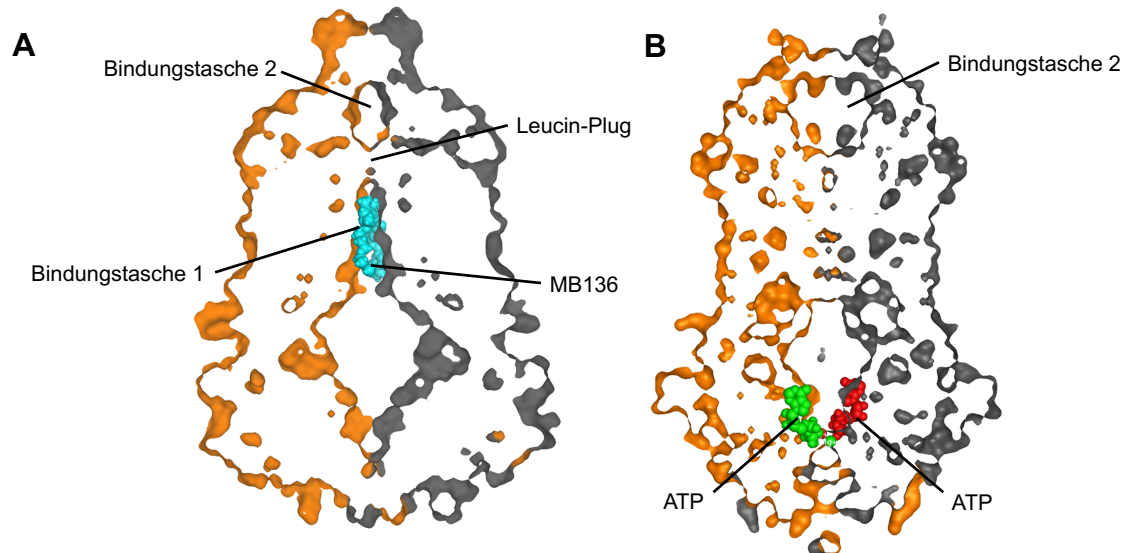
Manolaridis et al. ist es gelungen, Kryoelektronenmikroskopstrukturen von ABCG2 im ATP-gebundenen Zustand und Substrat-gebundenen Zustand aufzunehmen.<sup>43</sup> Dazu wurde die Mutante ABCG2<sub>EQ</sub> verwendet, die statt des katalytischen Glutamins ein Glutamin enthält und so eine verlangsamte ATPase Aktivität und Transportgeschwindigkeit aufweist. Jackson et al. und Taylor et al. veröffentlichten zudem Kryoelektronenmikroskopstrukturen von ABCG2 im Inhibitor-gebundenen Zustand.<sup>44,45</sup> Die Kryoelektronenmikroskopstrukturen mit den Inhibitoren (MZ29 und MB136) und dem Aktivator (E<sub>1</sub>S) der basalen ATPase Aktivität zeigen, dass sowohl Inhibitoren als auch Aktivatoren in Bindungstasche 1 binden.<sup>43–45</sup> Die Strukturformeln von MZ29, MB136 und E<sub>1</sub>S sind in Abbildung 1-5 abgebildet.



**Abbildung 1-5: Strukturformeln des Ko143-Analogons MZ29, von Estron-3-Sulfat (E<sub>1</sub>S) und des Tariquidar-Analogons MB136.**<sup>43–45</sup>

Die Kryoelektronenmikroskopstrukturen ermöglichen eine genauere Beschreibung des Transportmechanismus von ABCG2. In Abbildung 1-6 ist ABCG2 im Querschnitt, sowohl mit dem Inhibitor MB136 gebunden im nach innen geöffneten Zustand, Abbildung 1-6 A, als auch mit ATP gebunden im nach außen geöffneten

Zustand, Abbildung 1-6 B, abgebildet. Die einzelnen Monomere sind dabei verschiedenfarbig (orange und grau) eingefärbt. Neben den gekennzeichneten Bereichen der Bindungstasche 1, Bindungstasche 2 und dem Leucin-Plug, sind auch Hohlräume im Protein erkennbar.



**Abbildung 1-6: Querschnitt durch die Oberfläche des Homodimers von ABCG2. Die Oberflächen der ABCG2 Monomere sind orange und grau eingefärbt A: ABCG2 in der nach innen geöffnete Konformation mit dem Inhibitor MB136 (PDB: 6FEQ).<sup>44</sup> B: ABCG2 in der nach außen geöffnete Konformation mit gebundenem ATP (PDB: 6HBU).<sup>43</sup>**

Der Transportprozess von ABCG2 läuft vermutlich im Einzelnen wie von Manolaridis beschrieben ab.<sup>43</sup> Das Substrat oder auch der Inhibitor tritt aus dem Zytoplasma oder der Lipiddoppelschicht in Bindungstasche 1 ein und bindet, wie in Abbildung 1-6 A für den Inhibitor MB136 abgebildet, weit oben im Protein. Für die Interaktion zwischen Substrat und ABCG2 spielen vermutlich die Aminosäuren N436, F439 und T435 in TM5a und TM2 eine bedeutende Rolle. Bindungstasche 1 ist, wie ebenfalls in Abbildung 1-6 A erkennbar, nach oben durch den Leucin-Pfropf (L554, L555 und L554', L555') im Loop zwischen TM5a und TM5b verschlossen. Die ATP-Bindungsstellen befinden sich zwischen den Walker A Motiven. Die Bindung von ATP und  $Mg^{2+}$  führt wie in Abbildung 1-6 B dargestellt zum Schließen der NBDs.  $Mg^{2+}$  interagiert dabei mit dem  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphat des jeweiligen ATPs. Drei konservierte Seitenketten koordinieren das  $\gamma$ -Phosphat. R184 von der gegenüberliegenden NBD bildet eine Salzbrücke zum  $\alpha$ -Phosphat aus.

Bindet ATP, rotieren die  $\alpha$ -helikalen Domänen der NBDs um  $35^\circ$  und erreichen die gegenüberliegende NBD. Die Rotation ist notwendig für die Dimerisierung der NBDs und die Kraftübertragung des Transportzyklus. Die Verbindungsstelle der jeweiligen TMD und NBD bleibt im Nukleotid-freien und ATP-gebundenen Zustand weitestgehend an ihrer Position im Monomer und bilden den Drehpunkt für die weitere Bewegung im Protein. Diese Verbindungsstelle besteht aus der verbindenden Helix CnH (TM1a) und der koppelnden Helix CpH (der Carboxyterminale-Teil von TM2). Durch die Drehung der NBDs werden die zytoplasmatischen Teile der TMDs gegeneinandergedrückt. Die jeweiligen Helices CpH der beiden Monomere nähern sich auf  $7,0 \text{ \AA}$  an, während die einzelnen Monomere weiter in Bewegung sind. Die  $\alpha$ -Helices CnH und CpH rotieren durch die Überlagerung der NBDs um  $20^\circ$ . Diese Drehung führt zu einer weiteren  $40^\circ$ -Drehung der helikalen Achse der TMDs. Die Verdrehung innerhalb des ABCG2 Homodimers führt damit zu einer Konformationsänderung und, wie in Abbildung 1-6 B erkennbar, zu einer Öffnung von Bindungstasche 2. Dabei wird das Substrat in einer peristaltischen Bewegung in den Extrazellulärraum befördert.

Diese Konformationsänderung hat eine wichtige Konsequenz für Bindungstasche 1. Im Substrat-gebundenen Zustand liegen die Aminosäuren F439 im Abstand von  $8,0 \text{ \AA}$  vor. Im ATP-gebundenen Zustand beträgt der Abstand nur  $3,5 \text{ \AA}$ . Bindungstasche 1 ist damit wesentlich kleiner bzw. wie in Abbildung 1-6 B deutlich, in der Kryoelektronenmikroskopaufnahme nicht mehr erkennbar. Das Substrat muss daher um in den Extrazellulärraum zu gelangen in der Lage sein, zunächst den Leucin-Pfropf zwischen TM5a und TM5b als Checkpoint zu überwinden und das Zentrum des Proteins zu passieren bevor dieses sich verschließt. Im Umkehrschluss bedeutet das aber auch, dass die NBDs sich nur schließen können, wenn sich das Substrat aus Bindungstasche 1 hinausbewegen kann. Durch die Freigabe von ADP und  $P_i$  kann der Transporter wieder in die Ausgangsposition zurückkehren. Bei ABCG2 scheint also kein stabiler Zwischenzustand, sondern eine transiente Konformationsänderung vorzuliegen.



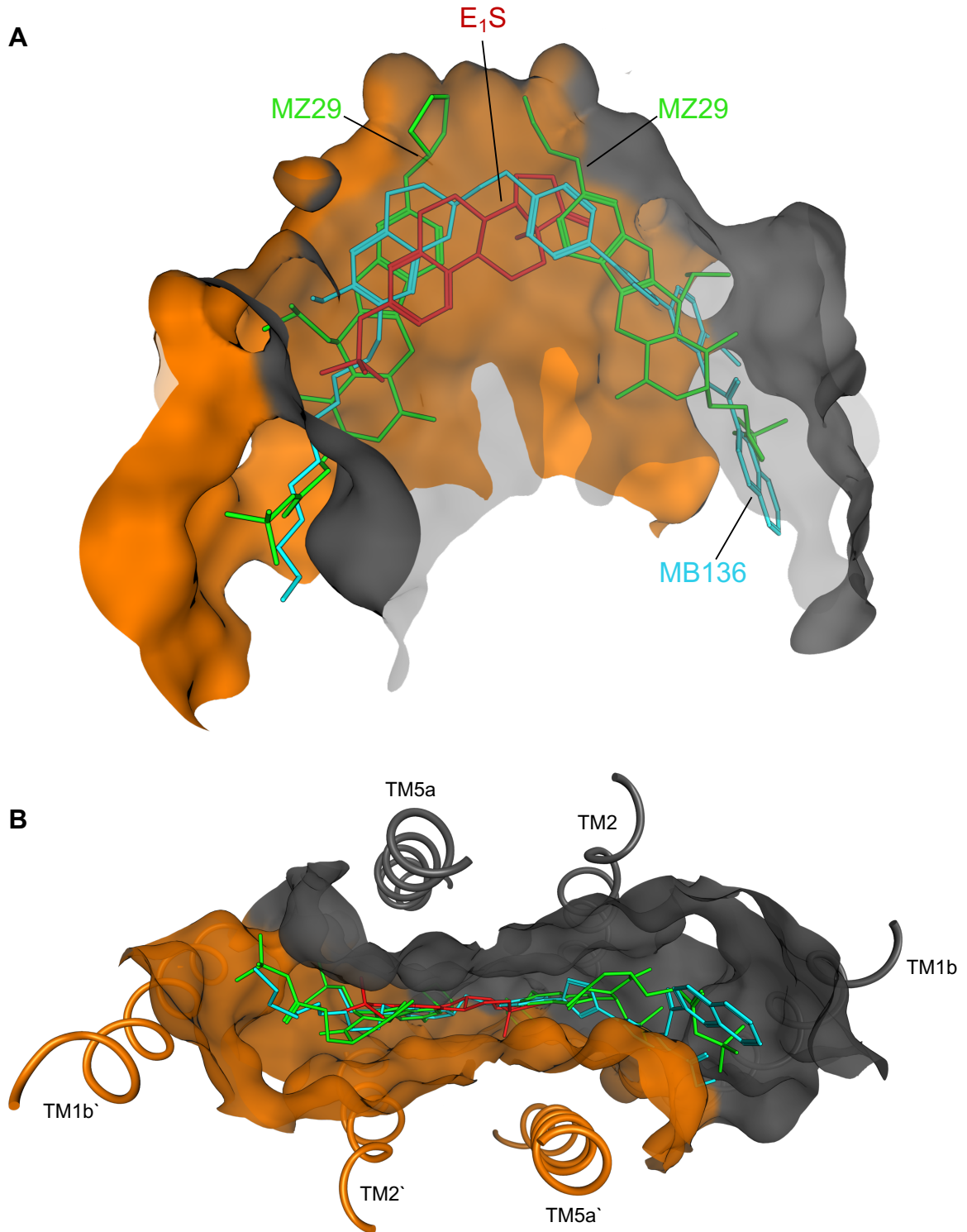


Abbildung 1-7: Überlagerte Strukturen der Inhibitoren **MZ29** (PDB: 6ETI) und **MB136** (PDB: 6FEQ) und des Aktivators **E<sub>1</sub>S** (PDB: 6HCO) der ATPase Aktivität in Bindungstasche 1 von ABCG2. Die Oberflächen der ABCG2 Monomere sind **orange** und **grau** eingefärbt.<sup>43,44</sup> Es binden zwei Moleküle MZ29, ein Molekül MB136 und ein Molekül E<sub>1</sub>S. A: Seitenansicht. B: Ansicht von unten mit den an der Interaktion beteiligten Helices TM1b, TM2 und TM5a.

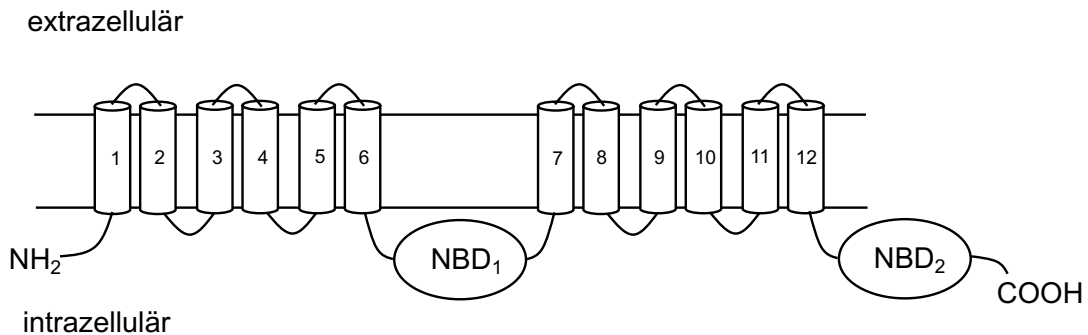
In Abbildung 1-7 sind die Verbindungen MZ29, MB136 und E<sub>1</sub>S graphisch in Bindungstasche 1 übereinander gelagert dargestellt. Dazu wurden die Oberflächen der einzelnen Monomere farblich unterschiedlich eingefärbt (grau und orange) und die Verbindungen in der Bindungstasche sowohl in einer leicht schrägen Seitenansicht, Abbildung 1-7 A, und von unten, Abbildung 1-7 B, dargestellt. In Abbildung 1-7 B ist gut zu erkennen, dass die Bindungstasche von ABCG2 flach und schlitzförmig aufgebaut ist und die Verbindungen genau zwischen den einzelnen Monomeren binden.<sup>44</sup> Interessanterweise bindet ein Molekül des Aktivators E<sub>1</sub>S und ein Molekül des Inhibitors MB136 in der Bindungstasche, während zwei Moleküle des Inhibitors MZ29 binden. E<sub>1</sub>S kann dabei in zwei Orientierungen um 180° gedreht vorliegen.<sup>43</sup> MB136 besitzt vermutlich, aufgrund der bei den Kryoelektronenmikroskopstrukturen gefundenen niedrigeren Elektronendichte als der von MZ29, multiple Bindungsmodi und kann sich leicht in der Bindungstasche bewegen.<sup>44</sup> E<sub>1</sub>S bindet zwischen TM2 und TM5a der beiden Monomere. Bei den Inhibitoren der ATPase Aktivität, MB136 und MZ29, liegen neben den Kontakten zwischen TM2 und TM5a zusätzliche Kontakte mit Aminosäuren in TM1b vor. TM1b, TM2 und TM5a sind in Abbildung 1-7 B hervorgehoben. Die zusätzlichen Interaktionen der Inhibitoren mit den TMs könnten die erhöhte Bindungsaffinität der Inhibitoren im Vergleich zu Substraten erklären. Sie führen dazu, dass Inhibitoren den Transporter durch Verkeilen der Bindungstasche immobilisieren.<sup>43</sup>

Es ist bekannt, dass Cholesterol für die Funktion von ABCG2 bedeutend ist, und dass ABCG2 häufig in lipidreichen Bereichen der Plasmamembran zu finden ist.<sup>69,70</sup> Allerdings wird Cholesterol nicht signifikant von ABCG2 transportiert.<sup>69</sup> Jackson et al. fanden mit Hilfe von Kryoelektronenmikroskopstrukturen in der Phospholipiddoppelschicht eine Art Gürtel aus angeordnetem Cholesterol um ABCG2.<sup>44</sup> An jedem ABCG2 Monomer befinden sich fünf Cholesterol Moleküle. Diese sitzen in hydrophoben Furchen auf der Oberfläche von ABCG2, unter anderem zwischen TM5b TM5c und TM6b, und interagieren mit hydrophoben Resten von ABCG2. Zusätzlich verschließt ein Cholesterol Molekül den membranären Eingang in Bindungstasche 1.<sup>44</sup> Möglicherweise übt Cholesterol so seinen regulierenden Effekt auf die Funktion von ABCG2 aus.

## 1.4 ABCB1

ABCB1 (P-gp) wurde im Jahre 1976 von Juliano und Ling in der Colchicin resistenten CHO (Chinese Hamster Ovarian) Zelllinie CH<sup>R</sup> entdeckt.<sup>71</sup> Er ist vermutlich der bis jetzt am besten untersuchte ABC-Transporter.<sup>72</sup> ABCB1 kommt in einer Reihe von Geweben mit physiologischer Barrierefunktion vor und wird unter anderem in Darm, Leber, Niere, Blut-Hirn-Schranke oder Plazenta exprimiert.<sup>73,74</sup>

Das humane ABCB1-Gen ist auf dem Chromosom 7q21.12 lokalisiert.<sup>16,75</sup> ABCB1 besteht aus 1280 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 170 kDa.<sup>75,76</sup> Es besteht aus zwei homologen Hälften, die aus je einer NBD im Zytosol und einer TMD mit 6 Helices aufgebaut sind.<sup>77</sup> Die beiden homologen Hälften sind über einen Linker aus 75 Aminosäuren miteinander verbunden.<sup>78</sup> Das Topologiemodell von ABCB1 ist in Abbildung 1-8 abgebildet. Kryoelektronenmikroskopaufnahmen zeigen, dass die funktionellen Hälften des Proteins überkreuzt aus beiden homologen Hälften gebildet werden.<sup>79</sup> Die Funktionseinheiten bestehen aus den TMs 1-3, 6, 10 und 11 und aus den TMs 4, 5, 7-9 und 12.<sup>77</sup>



**Abbildung 1-8: Topologiemodell von ABCB1.**

ABCB1 transportiert eine Vielzahl von verschiedenen Substraten. Es handelt sich dabei meist um organische Moleküle mit einer Größe von 200-1900 Da, die oft, aber nicht ausschließlich, aromatische Gruppen enthalten. Die Moleküle sind meist ungeladen oder schwach basisch. Gemeinsam ist ihnen oft ein amphiphiler Charakter.<sup>71-73,80</sup> Da ABCB1 vor allem in Geweben mit Barrierefunktion vorkommt, wird vermutet, dass die physiologische Aufgabe von ABCB1 im Schutz der Zellen vor

toxischen Substanzen besteht.<sup>16</sup> In Tabelle 1-2 sind einige mit ABCB1 interagierende Verbindungen aufgeführt.

**Tabelle 1-2: Auswahl von ABCB1 Modulatoren und Substraten.**<sup>22,72,74,77,78</sup>

<b>Substanzklasse</b>	<b>Verbindung</b>
Zytostatika	Daunorubicin
	Doxorubicin
	Mitoxantron
	Vincristin
	Vinblastin
	Topotecan
	Etoposid
	Paclitaxel
Virustatika	Ritonavir
	Saquinavir
	Nelfinavir
Antibiotika	Erythromycin
Herz-Kreislauf-Therapeutika	Verapamil
	Diltiazem
	Digoxin
	Nifedipin
	Amiodaron
Tyrosinkinase-Inhibitoren	Gefitinib
	Imatinib
Verschiedene	Dexamethason
	Loperamid
	Morphin
	Cyclosporin A
	Tacrolimus
	Colchicin
	Progesteron
	Simvastatin
	Ondansetron
	Ketoconazol
Fluoreszenzfarbstoffe	Calcein AM
	Hoechst 33342
	Rhodamin 123
	Fluoro-2
	Fura-2

Geschichtlich lassen sich die Modulatoren von ABCB1 in drei Generationen einteilen.<sup>78</sup> Ein Überblick dazu ist in Tabelle 1-3 aufgeführt. Die erste Generation umfasst Substanzen, die bereits eine klinische Anwendung hatten und Untersuchungen zeigten, dass sie mit ABCB1 interagieren. Die zweite Generation wurde speziell gegen MDR entwickelt. Viele dieser Substanzen sind Analoga von Verbindungen der ersten Generation, die eine geringere Toxizität aufweisen. Allerdings inhibieren die Verbindungen der zweiten Generation neben ABCB1 auch CYP3A4 und haben dadurch nur eine eingeschränkte klinische Anwendung. Die dritte Generation von Inhibitoren wurden speziell für ABCB1 entwickelt, allerdings haben auch sie Effekte auf andere Transporter wie z.B. ABCG2.<sup>81-83</sup>

**Tabelle 1-3: Einteilung der Inhibitoren von ABCB1 in Generationen.**<sup>78,81,84</sup>

<b>Generation</b>	<b>Verbindungen</b>
1. Generation	Chinin Chinidin Cyclosporin A Verapamil Reserpin Tamoxifen
2. Generation	Dexverapamil Valspodar (PSC 833) Dofequidarfumarat (MS-209)
3. Generation	Elacridar (GF120918) Tariquidar (XR9576) Zosuquidar (LY335979) Biricodar (VX-710) HM30181

Aus der Literatur sind für ABCB1 ebenfalls einige Flavonoide, Peptide und p53-Inhibitoren (QB-Verbindungen) bekannt, die den Transport von ABCB1 selektiv aktivieren.<sup>85-87</sup> Es wird vermutet, dass die Aktivatoren den Transport durch ABCB1 allosterisch beeinflussen.

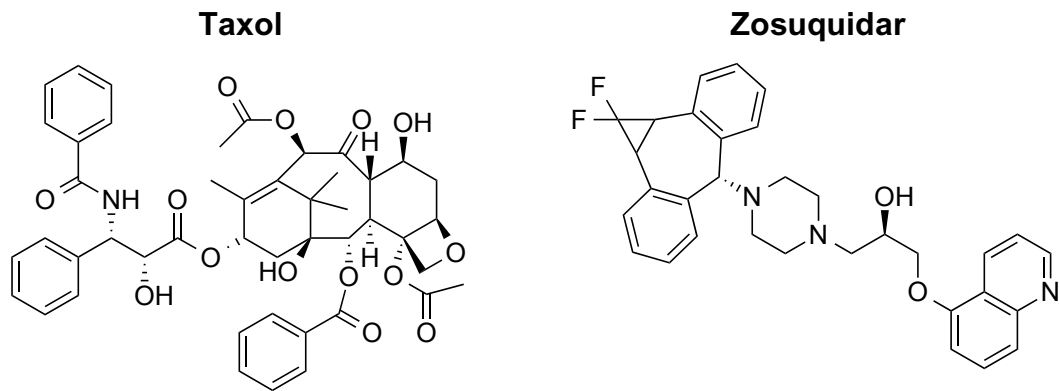


Abbildung 1-9: Strukturformeln von Taxol und Zosuquidar.

Alam et al. haben mit Hilfe von Kryoelektronenmikroskopstrukturen von ABCB1 ein Modell für den Transport entwickelt.<sup>47</sup> Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch von Kim et al. vorgeschlagen.<sup>46</sup> Alam et al. ist es gelungen, ABCB1 sowohl gebunden mit einem Substrat (Taxol) als auch mit einem Inhibitor (Zosuquidar) aufzunehmen. Für die Bindung des Inhibitors wurde dabei das chimäre Protein ABCB1<sub>HM</sub> (Human/Maus) verwendet. Beide Verbindungen binden in der gleichen Bindungstasche. Dabei bindet ein Molekül Taxol, während an gleicher Stelle zwei Moleküle Zosuquidar binden.

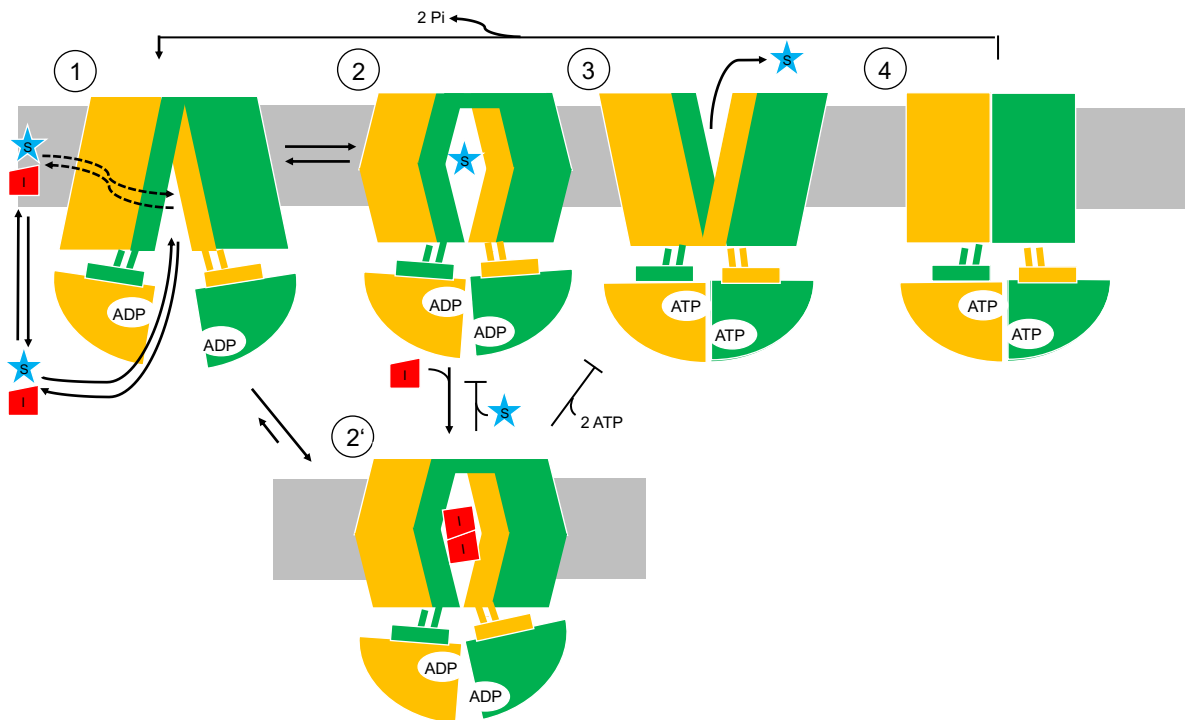


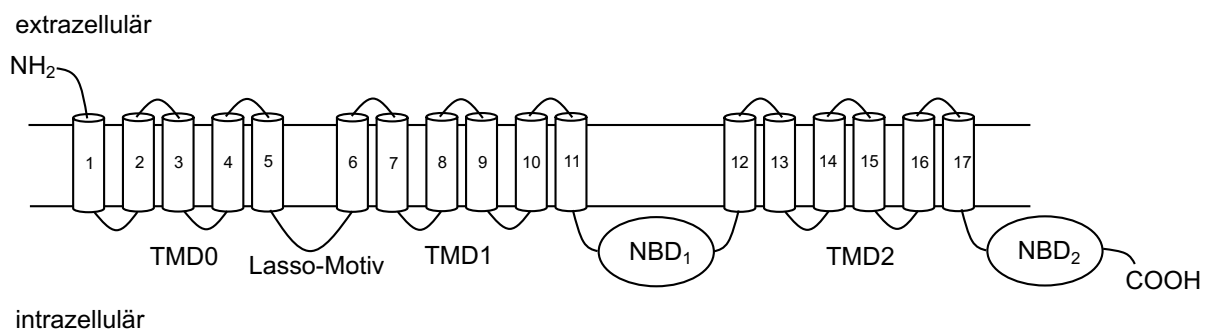
Abbildung 1-10: Transportmechanismus von ABCB1 nach Alam et al.<sup>47</sup>

Das Schema des Transportzyklus ist in Abbildung 1-10 dargestellt. Die Bindung des Substrats S in 1 in der zentralen Bindungstasche scheint eine Konformationsänderung von ABCB1 herbeizuführen. In der Folge wird die Bindungstasche in 2 durch ein Abknicken von TM4 und TM10 verschlossen. Dies führt gleichzeitig zu einer Annäherung der NBDs. Die Bindungsstelle wird dabei durch Aminosäuren aller 12 TMs gebildet und hat im Gegensatz zu der flachen Bindungstasche von ABCG2 eine kugelige Form. Die Bindung des Inhibitors in 1 führt ebenfalls durch die Konformationsänderung von ABCB1 zum Verschließen der Bindungstasche in 2'. Die Anordnung der Hauptketten und Seitenketten innerhalb der Bindungstasche entsprechen bei der Bindung des Inhibitors weitestgehend der Anordnung, die auch mit dem Substrat vorliegt. Allerdings treten durch die Bindung des Inhibitors in der zweiten Hälfte des Transportes strukturelle Unterschiede auf. Kleine Verschiebungen in der Bindungstasche amplifizieren sich nach außen und führen über TM7, TM8 und TM12 zu einem nach außen gerichteten Shift der intrazellulären Helix 2 (koppelnde Helix 1). Dadurch vergrößert sich die Distanz zwischen den NBDs. Die Bildung der ATP-gebundenen Konformation 3 von ABCB1 mit geschlossenen NBDs führt durch Konformationsänderungen in TM4 und TM6 von TMD1 und symmetrisch in TM10 und TM12 von TMD2 zu einer peristaltischen Bewegung, durch die die Verbindungen in den Extrazellulärraum geschleust werden. Durch die Freigabe von zwei  $P_i$  wird der nach innen geöffnete Zustand 1 wiederhergestellt. Die Bindung des Inhibitors in 2' führt zu einer Arretierung des Transporters in der verschlossenen Konformation, daher können die NBDs nicht schließen. Die ATPase Aktivität ist somit unterbrochen und ABCB1 kann sich nicht mehr nach außen öffnen.

## 1.5 ABCC1

Der Transporter ABCC1 (MRP1) wurde im Jahr 1992 von Cole et al. in der Doxorubicin resistenten Lungenkrebs Zelllinie H69AR entdeckt.<sup>88</sup> ABCC1 wird in verschiedenen Geweben wie Lunge, Niere, Skelett, Herzmuskel, Plazenta, Hoden oder Makrophagen exprimiert.<sup>89</sup>

ABCC1 ist auf dem Chromosom 16q13.11 lokalisiert.<sup>90</sup> Es besteht aus 1531 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 190 kDa.<sup>13,91</sup> ABCC1 ist aus fünf Domänen aufgebaut.<sup>92</sup> Es besteht aus drei TMDs (TMD0, TMD1 und TMD2) und zwei NBDs, von denen offenbar nur eine katalytisch aktiv ist.<sup>93</sup> TMD1 und TMD2 sind an dem Transport beteiligt. Die Funktion von TMD0 ist bisher nicht abschließend geklärt.<sup>92,94</sup> Zwischen TMD0 und TMD1 befindet sich ein sogenanntes Lasso-Motiv, das für die Faltung und Funktion von ABCC1 essentiell ist.<sup>48</sup> In Abbildung 1-11 ist das Topologiemodell von ABCC1 abgebildet.



**Abbildung 1-11: Topologiemodell von ABCC1.**

ABCC1 transportiert eine Vielzahl von Substraten. Diese sind strukturell verschieden und stellen oft amphiphile organische Säuren mit großen hydrophoben Gruppen dar.<sup>48</sup> Physiologisch stellt ABCC1 einen Schutz vor Xenobiotika dar und transportiert neben Glutathion-Konjugaten wie dem proinflammatorischen Leukotrien C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) auch eine Reihe von in Phase II metabolisierten Verbindungen wie Glukuronid-Konjugate, anionische Gallensalze und Sulfat-Konjugate. Da ABCC1 eine Rolle beim Efflux der oxidierten und reduzierten Form von Glutathion spielt, das viele physiologische und pathophysiologische Prozesse beeinflusst, spielt es auch



eine Rolle bei oxidativem Stress.<sup>89,92</sup> Ein Großteil der hydrophoben oder kationischen Verbindungen wird nur in Gegenwart von Glutathion transportiert.<sup>92</sup> Ein Überblick über transportierte Verbindungen ist in Tabelle 1-4 gegeben.

**Tabelle 1-4: Auswahl von ABCC1 Modulatoren und Substraten.**<sup>92,95,96</sup>

<b>Substanzklasse</b>	<b>Verbindung</b>
Glukuronid-Konjugate	Bilirubin
	17 $\beta$ -Estradiol
	Etoposid
GSH-Konjugate	Chlorambucil
	Leukotrien C <sub>4</sub> , D <sub>4</sub> und E <sub>4</sub>
	Melphalan
	4-Hydroxynonenal
	Cyclophosphamid
Sulfat-Konjugate	Estron
	Dehydroepiandrosteron
	Lithocholyltaurin
GSH-abhängig	Aflatoxin
	Daunorubicin
	Doxorubicin
	Vincristin
Verschiedene	Folsäure
	Glutathione (GSH, GSSG)
	Ritonavir
	Topotecan
	Irinotecan
	Teniposid
	Methotrexat
	Gefitinib
	Ciprofloxacin
	Natriumarsenat
	MK-571
Verapamil	
Fluoreszenzfarbstoffe	Calcein AM
	Calcein

Einige Verbindungen wie z.B. Verapamil, Indinavir oder Vincristin können den GSH-Efflux von ABCC1 steigern auch wenn der Mechanismus dahinter noch unbekannt ist.<sup>92</sup>

Kryoelektronenmikroskopstrukturen von Johnson und Chen mit bovinem MRP1, das zu 91 % identisch mit humanem MRP1 ist, legen nahe, dass MRP1 eine zweiteilige Bindungstasche, unterteilt in P-Tasche und H-Tasche, aufweist.<sup>48,49</sup> Bei der P-Tasche handelt es sich um eine positiv geladene Region, die den GSH-Rest koordiniert, bei der H-Tasche handelt es sich um eine hydrophobe Region. Die Bindungstasche ist vermutlich ausschließlich über das Cytoplasma zugänglich.<sup>48</sup>

Johnson und Chen haben aufgrund ihrer Untersuchungen ein Transportmodell für ABCC1 entwickelt.<sup>48,49</sup> Dazu wurde eine Mutante bMRP1-E1454Q, die statt des katalytischen Glutamats ein Glutamin enthält und so eine verlangsamte ATPase Aktivität und Transportgeschwindigkeit aufweist, und das Substrat LTC<sub>4</sub> verwendet. In Abwesenheit von ATP ist ABCC1 nach innen geöffnet und die NBDs haben einen großen Abstand zueinander. Bindet ein Substrat, bewegen sich die TMDs aufeinander zu und formen die Bindungstasche. Der Zugang zum Zytoplasma bleibt zunächst erhalten. Allerdings führt die Bewegung der TMDs zueinander auch die NBDs näher zusammen. Bindet nun ATP, dimerisieren die NBDs, dies führt durch eine Konformationsänderung der TMDs zu einer nach außen geöffneten Konformation. Die Konformationsänderung führt zu einer Veränderung der Bindungsaffinität des Substrates, das jetzt in den Extrazellulärraum freigegeben wird. Die Hydrolyse von ATP zu ADP und P<sub>i</sub> stellt anschließend die nach innen geöffneten Ausgangsposition von ABCC1 wieder her.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Das Phänomen der MDR ist seit 50 Jahren bekannt und stellt ein bedeutsames Problem bei der Behandlung von Tumoren mit Chemotherapeutika dar. Vor allem die ABC-Transporter ABCB1, ABCC1 und ABCG2 sind an der Entstehung der MDR beteiligt. Diese Transporter spielen eine wichtige Rolle bei der Absorption, Distribution, Metabolisierung und Exkretion von Arzneistoffen. Die Transporter unterscheiden sich in ihrem Aufbau und damit auch in ihrem Transportmechanismus weitestgehend. Sie kommen ubiquitär im Organismus vor. In Tumoren können multiple Transporter überexprimiert vorliegen, die zahlreiche SNPs aufweisen können. Trotz diverser Versuche Anfang der 2000er Jahre ist es nicht gelungen, einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz bei Auftreten der MDR in der klinischen Anwendung zu etablieren. Es ist nicht möglich eine einfache und allgemeingültige Erklärung für die Entstehung der MDR aufzustellen. Allerdings ergeben sich durch die Fortschritte der diagnostischen Methoden und der personalisierten Medizin in den letzten Jahren für die Behandlung der MDR wieder neue Möglichkeiten. Grundlage für die therapeutische Anwendung bildet das Verständnis der mechanistischen Vorgängen auf Transporter-Ebene.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die Charakterisierung des ABC-Transporters ABCG2 gelegt. Ziel war es unter Berücksichtigung verschiedener Methoden Erkenntnisse zur mechanistischen Funktionsweise und Charakterisierung von Bindungsstellen zu sammeln. Dazu wurden verschiedene Methoden zur Charakterisierung der Interaktion der Modulatoren mit ABCG2 kombiniert.

Um Kenntnisse über Bindungsstellen zu erhalten, wurden die in unserem Arbeitskreis entwickelten fluorimetrischen Methoden Hoechst 33342 Assay und Pheophorbid A Assay um den Vanadat-sensitiven ATPase Assay erweitert. Die unterschiedlichen Assay-Systeme besitzen bei der Interpretation der Daten eine jeweils limitierte Aussagekraft. Der Vergleich und die Zusammenführung der erhal-

tenen Ergebnisse, welche mit den verschiedenen Assays erhalten werden, ermöglicht daher eine präzisere Beschreibung der Interaktion der Modulatoren mit ABCG2 als bisher und lässt bessere Rückschlüsse auf Bindungsstellen zu. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Erkenntnisse tragen so ihren Teil dazu bei, die Funktionsweise von ABCG2 besser zu verstehen.

Für die vorliegende Arbeit wurden im Detail die im Folgenden aufgeführten verschiedenen thematischen Schwerpunkte verfolgt:

- Optimierung der im Arbeitskreis bestehenden fluorimetrischen Methoden. Dazu gehörte die Einführung einer neuen Zelllinie, die HTS-fähige Simultanbestimmungsmethode von Modulatoren in verschiedenen Zelllinien am FACS, und die Charakterisierung von Farbstoffen an ABCG2, ABCB1 und ABCC1.
- Etablierung und Optimierung eines Vanadat-sensitiven ATPase Assays zur vollständigeren Charakterisierung von Modulatoren. Dieser Assay wurde für die effektivere Nutzung auf HTS angepasst und umgestellt.
- Einführung des 5D3-Shift-Assays. Dieser Assay ermöglicht zusammen mit dem Vanadat-sensitiven ATPase Assay eine sich ergänzende Beschreibung der Interaktion von Modulatoren mit ABCG2.
- Von besonderer Bedeutung war das Screening von mit Tariquidar und Elacridar verwandten Verbindungen mit Hilfe des Vanadat-sensitiven ATPase Assays und dem Vergleich mit den bereits etablierten funktionellen Assays. Dies ermöglicht zusammen mit den veröffentlichten Strukturen aus Kryoelektronenmikroskopstrukturen eine detaillierte Beschreibung der Bindungsmodalitäten der Verbindungen mit ABCG2.
- Der Einfluss der Fluoreszenzfarbstoffe Hoechst 33342 und Pheophorbid A auf die ATPase Aktivität wurde charakterisiert. Diese beiden Verbindungen stellen Substrate für ABCG2 dar.
- Zudem wurden mit Hilfe des Vanadat-sensitiven ATPase Assays der Effekt von 2-Arylamino-1H-benzimidazolen und Tyrosinkinase-Inhibitoren auf die basale ATPase Aktivität von ABCG2 untersucht und mit Daten aus den funktionellen Assays verglichen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Verwendete Zelllinien

##### 3.1.1 MDCK II Wildtyp und MDCK II BCRP

Die MDCK (Madine Darby Canin Kidney) Zelllinie stammt ursprünglich aus der Niere von Hunden.<sup>97</sup> Bei der MDCK II Zelllinie handelt es sich um einen Subklon der MDCK Zelllinie mit leicht veränderten Membraneigenschaften im Vergleich zur Ursprungszelllinie.<sup>98</sup> Die MDCK II BCRP Zelllinie wurde durch retrovirale Transfektion mit humaner ABCG2 cDNA (Wildtyp R482) erzeugt, welche mit cDNA des GFP (Green Fluorescent Protein) verknüpft ist.<sup>99</sup> GFP besitzt Exzitationsmaxima von 395 nm und einem kleineren bei 470 nm und ein Emissionsmaximum von 509 nm mit einer Schulter bei 540 nm.<sup>100</sup> Die Zelllinien MDCK II Wildtyp und MDCK II BCRP wurden freundlicherweise von Dr. Alfred Schinkel (The Netherlands Cancer Institut, Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden adhären in D-MEM mit 10 % FKS (**F**etales **K**älberserum), 50 U/ml Penicillin G, 50 µg/ml Streptomycin und 2 mmol/l L-Glutamin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

##### 3.1.2 PLB-985 Wildtyp und PLB-985 ABCG2

Bei der humanen Zelllinie PLB-985 handelt es sich um Akute Myeloische Leukämie Zellen.<sup>101</sup> Die PLB-985 ABCG2 Zelllinie wurden aus der PLB-985 Wildtyp Zelllinie durch retrovirale Transfektion mit cDNA von ABCG2 und nachfolgender Selektion mit Mitoxantron erhalten.<sup>102</sup> Die Zelllinien PLB-985 Wildtyp und PLB-985 ABCG2 wurden freundlicherweise von Dr. Csilla Özvegy-Laczka (Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Ungarn) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in Suspension in RPMI mit Glutamin, mit 10 % FKS, 50 U/ml Penicillin G und 50 µg/ml Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 3.1.3 A2780 Wildtyp und A2780adr

Die humanen Ovarialkarzinomzelllinien A2780 (No. 93112519) und A2780adr (No. 93112520) wurden von der European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK) bezogen. Die resistente A2780adr Zelllinie wurde durch kontinuierliche Zugabe von Doxorubicin aus der Zelllinie A2780 erzeugt.<sup>103</sup> Zur Aufrechterhaltung der Resistenz wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen mit 100 nmol/l Doxorubicin behandelt. Kultiviert wurden die adhären Zellen mit RPMI-1640 Medium mit 10 % FKS, 50 U/ml Penicillin G und 50 µg/ml Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

### 3.1.4 MCF-7 Wildtyp und MCF-7 MX

Bei der MCF-7 Zelllinie handelt es sich um eine humane Mammakarzinomzelllinie.<sup>104</sup> Die Zelllinie MCF-7 MX wurde durch kontinuierliche Behandlung mit Mitoxantron aus der Wildtyp Zelllinie MCF-7 erhalten.<sup>51,105</sup> Die Zelllinien wurden von Dr. E Schneider (Wadsworth Center, Albany, NY, USA) zur Verfügung gestellt. Zur Aufrechterhaltung der Resistenz wurden die Zellen regelmäßig mit 250 nmol/l Mitoxantron versetzt. Die adhären Zellen wurden in RPMI-1640 Medium mit 20 % FKS, 50 U/ml Penicillin G und 50 µg/ml Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 3.1.5 H69AR

Die kleinzellige Lungentumorzelllinie H69AR wurde über die American Type Culture Collection (ATCC, CRL-11351) bezogen. Die resistente H69AR Zelllinie wurde durch kontinuierliche Behandlung mit Doxorubicin aus der Zelllinie NCI-H69 (ATCC HTB-119) erzeugt.<sup>106</sup> Diese Zelllinien wurde zur Untersuchung von ABCC1 benutzt. Die adhären wachsenden Zelllinien wurden in RPMI-1640 Medium mit 20 % FKS, 50 U/ml Penicillin G und 50 µg/ml Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 3.2 Zellkultur

Alle hier verwendeten Säugetierzellen wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und einer relativen Luftfeuchte von 95 % kultiviert. Die Arbeiten an offenen Gefäßen wurden unter aseptischen Bedingungen in einer Werkbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Das eingesetzte Nährmedium wurde vor Beginn der Arbeit auf 37 °C erwärmt. Die Zusammensetzung der Nährmedien unterschied sich je nach Zelllinie, siehe Kapitel 3.1. Das im Medium enthaltene Phenolrot diente als Indikator für das Wachstum der Zellen. Die beim Zellwachstum im Zitronensäurezyklus entstehenden Säuren sorgten für eine pH-Wert Erniedrigung die zu einer Verfärbung des Mediums von Rot nach Gelb führte. Das Medium wurde je nach Wachstum der Zellen alle 2-3 Tage ersetzt.

#### 3.2.1 Adhärente Zellen

Die adhärent wachsenden Zelllinien wurden in Gewebekulturflaschen mit 75 cm<sup>2</sup> oder 175 cm<sup>2</sup> (T75 bzw. T175) in 15-20 ml (T75) oder 25-30 ml (T175) Nährmedium im Inkubator kultiviert. Erreichte der Zellrasen eine Dichte von 90 %, wurden die Zellen subkultiviert. Dazu wurde zuerst das vorhandene Medium entfernt. Anschließend wurde der Zellrasen mit 2 ml (T75) bzw. 3 ml (T175) PBS-Pufferlösung gespült. Anschließend wurde zur Ablösung der Zellen die gleiche Menge eines Trypsin-EDTA-Gemisches (0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA) hinzugegeben. Die Zelllinie MDCK II wurde zur Beschleunigung des Ablöseprozesses für einige Minuten im Inkubator bei 37 °C gelagert. Die beginnende Ablösung der Zellen wurde durch sanftes Klopfen unterstützt. Anschließend wurden die Zellen mit frischem Medium komplett abgelöst und durch auf- und abpipettieren vom Flaschenboden abgespült und suspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt und bei 266 g und 4 °C für 4 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen wurden in frischem Medium suspendiert und in der gewünschten Konzentration in einer neuen Gewebekulturflasche ausgesät.

### 3.2.2 Suspensionszellen

Die in Suspension wachsenden Zellen wurden in T75 Gewebekulturflaschen oder T175 Gewebekulturflaschen mit 12 ml (T75) oder 24 ml (T175) Nährmedium im Inkubator kultiviert. Erreichten die Zellen eine Konzentration von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml wurden die Zellen subkultiviert. Dazu wurde die Zellsuspension in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt und bei 266 g und 4 °C für 4 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das verbrauchte Nährmedium entfernt und die Zellen in frischem Nährmedium suspendiert und in einer Konzentration von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml erneut ausgesät.

### 3.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe des CASY® 1 Model TT bestimmt. Bei der Messung wird an einer Kapillare mit 150 µm Innendurchmesser eine elektrische Spannung angelegt. Die Widerstandsänderung ist proportional zu der Größe der passierenden Zelle. So lässt sich die Anzahl der Zellen und deren Größenverteilung ermitteln.<sup>107</sup>

Die Zellen wurden zunächst, wie in Kapitel 3.2.1 und 3.2.2 beschrieben, abgelöst und zentrifugiert und entweder für einen Versuch mit KHP gewaschen und suspendiert oder für die Weiterkultivierung in Medium suspendiert. Bei dem Waschschrift wurden die Zellen in 3 ml KHP suspendiert und bei 266 g und 4 °C für 4 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen erneut in 3 ml frischem KHP aufgenommen. Für die Zellzahlbestimmung wurde 20 µl der Zellsuspension mit 10 ml steril filtrierter CASY®ton Lösung gemischt und vermessen.

### 3.2.4 Inkulturnahme von Zellen

Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Inkulturnahme wurde ein kryokonserviertes Aliquot bei 37 °C aufgetaut und in ein 15 ml PP-Röhrchen mit



9 ml frischem Medium suspendiert. Anschließend wurde die Suspension bei 266 g und 4 °C für 4 Minuten zentrifugiert um das bei der Kryokonservierung eingesetzte und für die Zellen toxische DMSO zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand entfernt, die Zellen mit 5 ml frischem Nährmedium versetzt und in eine T25 Gewebekulturflasche (25 cm<sup>2</sup>) überführt und bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % anwachsen gelassen.

### **3.2.5 Kryokonservierung von adhärennten Zellen**

Die Zellen wurden in T175 Gewebekulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert. Die Zellen wurden, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, abgelöst und zentrifugiert und in frischem Medium suspendiert. Von der Suspension wurden anschließend je 900 µl in Kryoröhrchen überführt und mit 100 µl DMSO als Kryoprotektivum versetzt. Die Aliquots wurden sofort bei -80 °C eingefroren und nach 24 h in flüssigen Stickstoff überführt.

### **3.2.6 Kryokonservierung von Suspensionszellen**

Die Zellen wurden bis zu einer Konzentration von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml kultiviert und, wie unter Kapitel 3.2.2 beschrieben, zentrifugiert und in einer Mischung aus 50 % FKS, 10 % DMSO und 40 % Medium zu 1 ml aliquotiert und, wie unter Kapitel 3.2.5 beschrieben, eingefroren.

### **3.2.7 Krebs-HEPES-Puffer (KHP)**

Die funktionellen Assays wurden in Krebs-HEPES-Puffer (KHP) durchgeführt. So konnten die Zellen kurzfristig überleben und die Versuche ohne störende Enzyme und Farbstoffe durchgeführt werden. Dazu wurde zunächst eine 5-fach konzentrierte Lösung hergestellt, die bei Bedarf unter Zusatz von 1,3 mmol/l Calciumchlorid und 1,2 mmol/l Magnesiumsulfat für die zellulären Assays verdünnt wurde.

### 3 Material und Methoden

---

<b>KHP-Stammlösung (5x), pH 7,4</b>		finale Konzentration
Natriumchlorid	17,330 g	593 mmol/l
Kaliumchlorid	0,876 g	23,5 mmol/l
Kaliumdihydrogenphosphat	0,408 g	6,00 mmol/l
Natriumhydrogencarbonat	0,882 g	21,0 mmol/l
D-Glucosemonohydrat	5,796 g	58,4 mmol/l
HEPES (freie Säure)	5,958 g	50,0 mmol/l
Destilliertes Wasser	Auffüllen auf 500,0 ml	

---

Die Lösung wurde mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt, aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

---

<b>1 mol/l Calciumchlorid-Lösung</b>		finale Konzentration
Calciumchlorid Dihydrat	1,47 g	1 mol/l
Destilliertes Wasser	Auffüllen auf 10,0 ml	

---

Die Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

---

<b>1 mol/l Magnesiumsulfat-Lösung</b>		finale Konzentration
Magnesiumsulfat Heptahydrat	2,46 g	1 mol/l
Destilliertes Wasser	Auffüllen auf 10,0 ml	

---

Die Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

---

<b>KHP (1x), pH 7,4 RT</b>		finale Konzentration
KHP Stammlösung (5x)	100,0 ml	
1 M Calciumchlorid-Lösung	650 µl	1,3 mmol/l
1 M Magnesiumsulfat-Lösung	600 µl	1,2 mmol/l
Destilliertes Wasser	Auffüllen auf 500,0 ml	

---

Die Lösung wurde sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

### 3.3 Materialien

<b>Materialien</b>	<b>Hersteller, Firma</b>	<b>Artikelnummer</b>
1,5 Amber Flat Cap Microcentrifuge Tubes	Starlab	S16144107
1,5 Natural Flat Cap Microcentrifuge Tubes	Sarstedt	72690001
1000-5000 µl Bulk, Natural Pipettes Tips	Starlab	I1009-5000
5 ml Polystyrene Round-bottom Tube 12 x 75 mm, steril	Becton Dickinson	352054
Belüftungsschraubkappen DURAN® mit PFTE-Membran	Roth	KCN0.1
Black Microwell SH 96-Well, untreated	Nunc	237108
Cellstar®Tissue Culture Flasks, 25cm <sup>2</sup> , 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, steril	Greiner bio-one	123263
Einmalküvetten PMMA (1,5 ml halbmikro)	Brand	759115
Rotilabo®-Erlenmeyerkolben	Roth	NY87.1
FACS Teströhrchen	BD Bioscience	352054
FACS-Testtubes	Sarstedt	551579
Glaspasteurpipetten (230 mm)	VWR international	612-1702
Membranfilter 0,2 µM, steril	Whatman	10462200
Nährmedium D-MEM 5671	Sigma	M-5650
Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging	PM-996
PS Microplatte 96-Well, nicht steril, F-bottom	Greiner bio-one	655101
PS Microplatte 96-Well, nicht steril, U-bottom	Greiner bio-one	650001

### 3 Material und Methoden

<b>Materialien</b>	<b>Hersteller, Firma</b>	<b>Artikelnummer</b>
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 Natural Pipette Tips	Starlab	S1111-0006
TipOne 101-1000 µl Natural Pipette Tips	Starlab	S1111-2020
Tissue Culture Flasks, 175 cm <sup>2</sup> , steril, filter Cap	Sarstedt	831812002
Tissue Culture Flasks, 75 cm <sup>2</sup> , steril, filter Cap	Sarstedt	831813002
Tissue Culture Plate 6-Well, flat-bottom with lid, sterile	Sarstedt	831839
Tissue Culture Plate 96-Well, flat-bottom with lid, sterile	Sarstedt	831835
µ-Dish 35 mm, high	ibidi	81156

### 3.4 Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller, Firma</b>	<b>Artikelnummer</b>
Adenosintri-phosphat (ATP)	Sigma	A-2383
Ammoniummolybdat Tetrahydrat	Sigma	A-1343
Antibiotic-Antimycotic 100X	Gibco	15240
Aprotinin	Sigma	A-1153
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma	A-7906
Calcein AM	Calbiochem	206700
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck	P4901
CASY <sup>®</sup> ton Lösung	Schärfe System	43001
Chlorprothixen		
Cholesterol/RAMEB complex	Cyclolab	CY-9002

### 3 Material und Methoden

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller, Firma</b>	<b>Artikelnummer</b>
D-Glucose-Monohydrat	Merck	1040740500
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Acros	AC19773
Dithiothreitol	Appllichem	A2948
Doxorubicin	Fluka	44583
Eisessig	Fisher Scientific	A/0400/PB17
Erlotinib	LC Laboratories	E 4007
Ethylen-bis-(oxyethylenitrilo)- tetraessigsäure (EGTA)	Sigma	E-2889
FACSClean™	Becton Dickinson	340345
FACSFlow™	Becton Dickinson	342003
FACSRinse™	Becton Dickinson	340346
Fetales Kälberserum	Sigma	F-7524
Gefitinib	LC Laboratories	G4408
Glycerol 100% wasserfrei	Appllichem	A1123
HEPES freie Säure	Appllichem	A3707
Hoechst 33342	Sigma	B-2261
Imatinib	Geschenk der Merlin-Apotheke Bonn	
Kaliumantimontartrat	Acros	223800050
Kaliumchlorid	Merck	1.04936
Kaliumdihydrogenphosphat	Appllichem	A3095
Ko143	Tocris	3241
L-Glutamine 200 mM	Sigma	G-7513
L(+)-Ascorbinsäure	Appllichem	A1052
Leupeptin Hemisulfat	Appllichem	A2183
Loperamid		
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck	105833
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Appllichem	A4101
Mannitol		
Melsept SF	Braun	18907
Methanol	Merck	107018

### 3 Material und Methoden

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller, Firma</b>	<b>Artikelnummer</b>
Mitoxantron	Sigma	M-6545
MOPS	Sigma	M-1254
Nährmedium RPMI-1640	PAN Biotech GmbH	P0416500
Natriumazid	Fluka	71290
Natriumchlorid	Merck	106404
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma	L-6026
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Appllichem	A4732
Natriumhydroxid Maßlösung 1N	Grüssing	22195
Natriumorthovanadat	Aldrich	450243
Nilotinib	LC Laboratories	N 8207
Ouabain Octahydrat	Fluka	75640
Penicillin-Streptomycin Lösung	Sigma	P0781
PerCP-Cy <sup>TM</sup> 5.5 Mouse Anti-Human CD338 Antikörper	BD Biosciences	561460
PerCP-Cy <sup>TM</sup> 5.5 Mouse IgG2b $\kappa$ Isotype Control	BD Biosciences	558304
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma	P-2126
Pheophorbid A	Frontier Scientific Inc.	15664296
Quest Rhod 4-AM	biomo	ABD-21121
Rhodamin 123	Acros	419091000
Salzsäure Maßlösung 1N	Grüssing	23204
Schwefelsäure	Merck	1.00731.2511
Spodopan	Pan Biotech	P04-850500
Sunitinib		
Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan (Tris)	Appllichem	A2264
Trypsin-EDTA-Lösung	PAN Biotech GmbH	P100231SP
DPBS	PAN Biotech	P04-35500
Tyrphostin AG	LC Laboratories	T 9284
Verapamil HCl	Sigma	V-4629

### 3.5 Geräte

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller, Firma</b>	<b>Artikelnummer</b>
Accu-Jet	Brand	0441938
CASY® 1 Model TT	Schärfe System	SC1TT
CO <sub>2</sub> Air Jacketed Incubator	IBS Integra Bioscience	98313042705
Dounce Hand-Homogenisator 15 ml	Scherf Präzision	SCERSP- 885303-0015
Dounce Hand-Homogenisator 2 ml	Sartorius	8530732
Dounce Hand-Homogenisator 2 ml	Sartorius	8530793
Dounce Hand-Homogenisator 7 ml	Wheaton	357524
FACSCalibur™	Becton Dickinson	E3231
FLUOstar Optima	BMG Lab Technolo- gies	4131164
FLUOstar Optima	BMG Lab Technolo- gies	4132279
Guava®easyCyte™	Millipore Sigma	
Handdispenser Handystep	Brand	
Laborzentrifuge Avanti J-25	Beckman Coulter	
Laborzentrifuge Universal 32R	Hettrich Zentrifugen	00026200100
Laborzentrifuge Universal 32R	Hettrich Zentrifugen	00009990100
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop Nikon A1R	Nikon GmbH Düssel- dorf	
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG	
Mikroskop Wilovert Standard	Hund Wezlar	90110180
Orbital Shaker Model 4520	Forma Scientific Inc.	
PH-Meter 744	Methrom	20506
Pipette 0,1-2,5 µl	Eppendorf	3638475
Pipette 100-1000 µl	Eppendorf	4741196
Pipette 2-20 µl	Eppendorf	3407866
Pipette 20-200 µl	Eppendorf	3534296

### 3 Material und Methoden

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller, Firma</b>	<b>Artikelnummer</b>
Pipette 500-5000 µl	Eppendorf	36150595
POLARstar Galaxy	BMG Lab Technologies	4030639
RH basic Magnetrührer	IKA Labortechnik	03061661
Sicherheitswerkbank Safe 2010	Holten LaminAir	30406338
Thermomixer comfort	Eppendorf	
Transferpipette -87-12, 10-200 µl	Brand	08E12592
Ultrazentrifuge Optima LE-80K	Beckmann Coulter	
Ultrazentrifugengläser (für Typ 45 Ti)	Beckman Coulter	355655
Ultrazentrifugengläser (für Typ 70 Ti)	Beckman Coulter	349622
UV-Photometer Ultrospec 4000	Amersham Biosciences	
Vakuumpumpe BVC21	Vacuubrand	28806907288084
Vortexschüttler Minishaker	IKA-Works Inc.	03147200
Vortexschüttler Vortex Genie 2	Scientific Industries	
Wasseraufbereitungsanlage Elix	Millipore	
Wasseraufbereitungsanlage MilliQ Biocel A10	Millipore	
Wasserbad Typ 1083	GFL	11520203



## 3.6 Hoechst 33342 Assay

### 3.6.1 Grundlagen zum Hoechst 33342 Assay

Bei dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 handelt es sich um ein Bisbenzimidazol.<sup>108</sup> Der Fluoreszenzfarbstoff wird gewöhnlich zur Markierung von DNA eingesetzt.<sup>109</sup> Hoechst 33342 lagert sich in die Phospholipiddoppelschicht von Membranen und in Bereiche der DNA an, besonders an Adenin-Thymin-reichen Sequenzen.<sup>110–112</sup> Durch die Veränderung des Milieus ergibt sich eine Verschiebung des Spektrums vom Exzitationsmaximum 340 nm und Emissionsmaximum 510-540 nm hin zum Exzitationsmaximum 355 nm und Emissionsmaximum 450 nm, verbunden mit einer Intensitätssteigerung des emittierten Lichts. Hoechst 33342 ist ein Substrat für ABCB1 und ABCG2 und kann daher zur funktionellen Charakterisierung beider Transporter verwendet werden.<sup>113,114</sup>

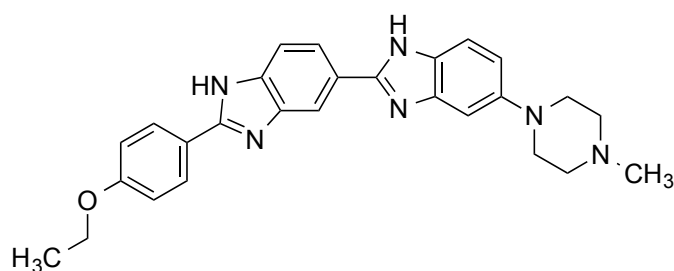


Abbildung 3-1: Strukturformel von Hoechst 33342.

### 3.6.2 Durchführung des Hoechst 33342 Assays

Zunächst wurden die zu untersuchenden Substanzen und Negativkontrollen in den erforderlichen Konzentrationen in schwarze 96er-Mikrotiterplatten mit flachem Boden vorgelegt. Die Zellen wurden, wie in Kapitel 3.2.1 bzw. Kapitel 3.2.2 und Kapitel 3.2.3 beschrieben, geerntet, gewaschen und gezählt. Die Zellsuspension wurde mit KHP auf die Konzentration von 30.000 Zellen/Well verdünnt, mit der Multikanalpipette zu den Proben gegeben und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 30 Minuten im Inkubator inkubiert. Währenddessen wurde die Hoechst 33342 Stamm-lösung (10 mmol/l) in KHP verdünnt und anschließend in einer finalen Konzentration von 1 µmol/l zügig mit Hilfe der Multikanalpipette auf die Proben gegeben. Es

ergab sich ein Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{l}$ . Daraufhin wurde die Platte in den Fluoreszenzreader gebracht und bei den folgenden Einstellungen vermessen:

---

<b>Einstellung der Fluoreszenzreader</b>	
Scan-Modus	Plate
Messrichtung der Mikrotiterplatte	Horizontal
Temperatur	37 °C
Exzitationswellenlänge	355 nm
Emissionswellenlänge	460 nm
Anzahl der Zyklen	120
Zyklusdauer	60 s
Anzahl der Lichtblitze	10 s <sup>-1</sup>
Intervallzeit zwischen zwei Reihen	0,2 s
Required Value	20 %
Gain FLUOstar	1500
Gain POLARstar	43
Schütteln	30 sec vor Beginn

---

Die erhaltenen Daten wurden mit Microsoft Excel ausgewertet. Dazu wurde zunächst für jedes Well die Kinetik des Fluoreszenzanstiegs über die 120 Minuten optisch geprüft, dann wurde das jeweilige Minimum ermittelt und von jeweils allen erhaltenen Fluoreszenzwerten des Wells abgezogen. Dann wurde der Mittelwert für jede Konzentration der Testsubstanzen für den Zeitraum 100-109 Minuten berechnet. Anschließend wurden die so erhaltenen Daten mit GraphPad Prism® 6.0 gegen die entsprechenden Modulator Konzentrationen aufgetragen. Mittels 4-Parameter-logistischer Gleichung wurde eine sigmoidale Konzentrations-Effektkurve erstellt.

### 3.7 Calcein AM Assay

#### 3.7.1 Grundlagen zum Calcein AM Assay

Der nicht fluoreszierende Calcein Acetoxymethylester (Calcein AM) ist eine Vorstufe des Fluoreszenzfarbstoffes Calcein, einem Fluorescein-Derivat.<sup>115</sup> Calcein weist ein Exzitationsmaximum von 495 nm und ein Emissionsmaximum von 515 nm auf. Calcein wird in der Zellkultur als Calcium Indikator eingesetzt.<sup>116</sup>

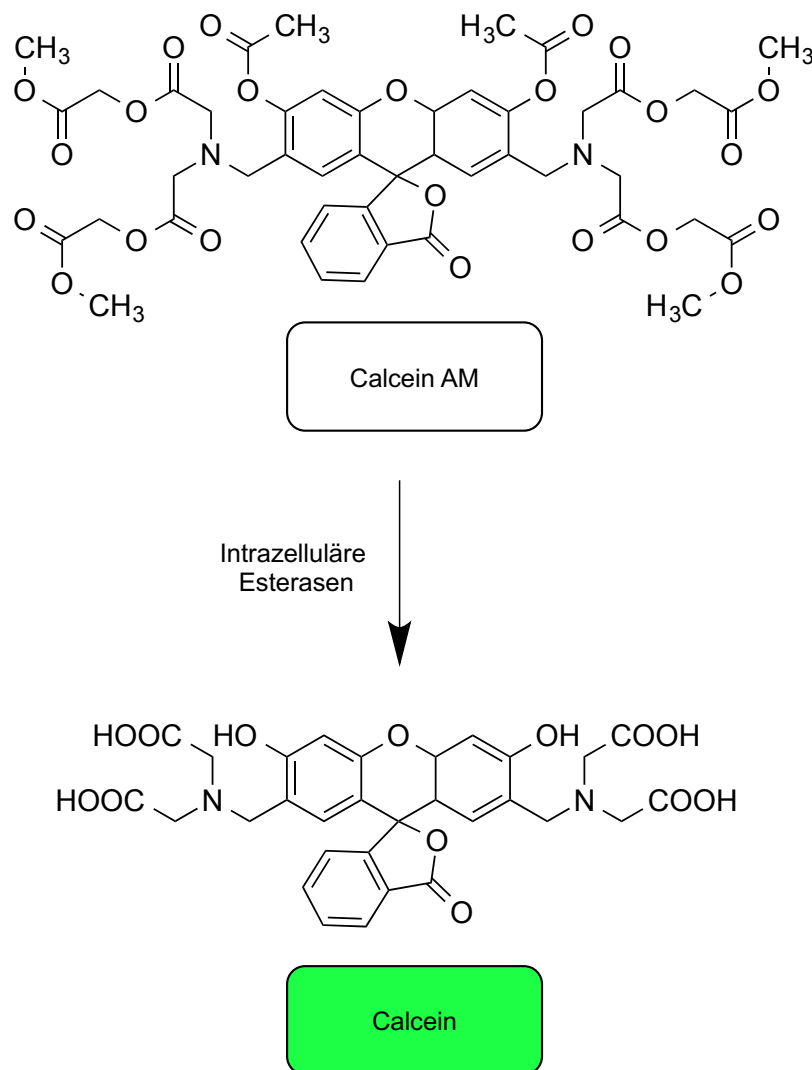


Abbildung 3-2: Schema der Spaltung von Calcein AM zum fluoreszierenden Calcein.

Der Ester kann leicht Zellmembranen überwinden und wird intrazellulär von Esterasen gespalten.<sup>117</sup> Calcein kann die Zellmembran aufgrund seiner negativen Ladung nicht mehr überwinden und akkumuliert in der Zelle. Calcein AM stellt ein Substrat für ABCB1 und ABCC1 dar. Calcein kann nicht mehr von ABCB1 transportiert werden. Im Gegensatz dazu ist ABCC1 in der Lage neben Calcein AM auch Calcein zu transportieren, wobei Calcein das schlechtere Substrat ist.<sup>118,119</sup> In Zellen mit hoher ABCB1 und ABCC1 Expression kann Calcein AM durch die Transporter heraus transportiert werden. Werden die Transportproteine jedoch gehemmt, akkumuliert Calcein AM in den Zellen und wird zum fluoreszierenden Calcein umgesetzt. Der resultierende Anstieg der intrazellulären Fluoreszenz folgt zu Beginn einer Kinetik erster Ordnung. Die Steigung ist dabei proportional der Zunahme der intrazellulären Calcein-Konzentration.<sup>120</sup>

#### **3.7.2 Durchführung des Calcein AM Assays**

Zunächst wurden die zu untersuchenden Substanzen in den erforderlichen Konzentrationen und eine Negativkontrolle in 96er-Mikrotiterplatten mit flachem Boden vorgelegt. Die Zellen wurden, wie in Kapitel 3.2.1 und Kapitel 3.2.3 beschrieben, geerntet, gewaschen und gezählt. Die Zellsuspension wurde mit KHP auf die Konzentration von 30.000 Zellen/Well verdünnt, mit der Multikanalpipette zu den Proben gegeben und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 30 Minuten im Inkubator inkubiert. Währenddessen wurde die Calcein AM Stammlösung (1,25 µmol/l) in KHP verdünnt und anschließend in einer finalen Konzentration von 0,31 µmol/l zügig mit Hilfe der Multikanalpipette auf die Proben gegeben. Es ergab sich ein Gesamtvolumen von 133 µl. Daraufhin wurde die Platte in den Fluoreszenzreader gestellt und bei den folgenden Einstellungen vermessen:

---

#### Einstellung der Fluoreszenzreader

---

Scan-Modus	Plate
Messrichtung der Mikrotiterplatte	Horizontal
Temperatur	37 °C
Exzitationswellenlänge	485 nm
Emissionswellenlänge	520 nm
Anzahl der Zyklen	60
Zyklusdauer	60 s
Anzahl der Lichtblitze	10 s <sup>-1</sup>
Intervallzeit zwischen zwei Reihen	0,2 s
Required Value	20 %
Gain FLUOstar	1500
Gain POLARstar	15
Schütteln	30 sec vor Beginn

---

Die erhaltenen Daten wurden mit Microsoft Excel ausgewertet. Die Steigung der Fluoreszenz über 10-29 Minuten wurde für jede Konzentration der Testsubstanzen berechnet. Anschließend wurden die so erhaltenen Steigungen mit GraphPad Prism<sup>®</sup> 6.0 gegen die entsprechenden Modulator Konzentrationen aufgetragen. Mittels 4-Parameter-logistischer Gleichung wurde eine sigmoidale Konzentrations-Effektkurve erstellt.

### 3.8 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorting) handelt es sich um ein optisches Messverfahren.<sup>121</sup> Es wird zur Analyse von Zellen oder Partikeln in Suspensionen verwendet. Dabei werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung einzeln an einem Laser, hier ein Argonlaser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm, vorbeigeleitet. Es werden sowohl Fluoreszenz als auch Streulichtsignale detektiert welche zur Charakterisierung der Zellen herangezogen werden können. Folgende Parameter werden dabei von dem Messgerät erfasst.

- Das Vorwärtsstreulicht (FSC, Forward Angle Light Scatter) wird in Strahlrichtung gemessen. Es ist proportional zur Zelloberfläche und ein Maß für die Größe der betrachteten Zelle.
- Das Seitwärtsstreulicht (SSC, Side Scatter) wird rechtwinklig gemessen. Es ist ein Maß für die Granularität der Zelle.
- Die emittierte Fluoreszenz wird ebenfalls rechtwinklig in unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen gemessen.

Auf diese Art und Weise können Antikörperfärbungen und intrazelluläre Fluoreszenz gemessen und quantifiziert werden. Das detektierte Licht wird durch Interferenzfilter gefiltert und mit Hilfe von Photodetektoren verstärkt. Bei dem verwendeten FACSCalibur™ werden für die Kanäle FI1 und FI2 Bandpass Filter verwendet, für den langwelligsten Kanal FI3 wird ein Longpass Filter benutzt.<sup>122,123</sup>

#### 3.8.1 Datenerfassung

Die gemessenen Fluoreszenzwerte können anschließend in Form von Histogrammen oder Dotplots dargestellt und analysiert werden. Die Auswertung erfolgte zunächst mit Hilfe des Programms FlowJo®. Basierend auf dem FSC-SSC Dotplot wurde die Hauptpopulation der vitalen Zellen erfasst. Zellfragmente und Zellagglom-

merate, die die Messung verzerren können, wurden dadurch ausgeschlossen. Anschließend wurden die Mediane der Fluoreszenzwerte, der so selektierten Hauptpopulationen, bestimmt und gegen die Konzentrationen der Modulatoren mit GraphPad Prism® 6.0 aufgetragen. Mit Hilfe der 4-Parameter-logistischen Gleichung wurde eine sigmoidale Konzentrations-Effektkurve erstellt.

## 3.9 Pheophorbid A Assay

### 3.9.1 Grundlagen zum Pheophorbid A Assay

Bei Pheophorbid A handelt es sich um ein Porphyrinderivat mit fluoreszierenden Eigenschaften.<sup>124</sup> Es hat ein Exzitationsmaximum bei 395 nm und ein Emissionsmaximum bei 670 nm. Es stellt ein selektives Substrat von ABCG2 dar.<sup>125,126</sup> Wird ABCG2 gehemmt, akkumuliert Pheophorbid A in der Zelle und die Fluoreszenz steigt.

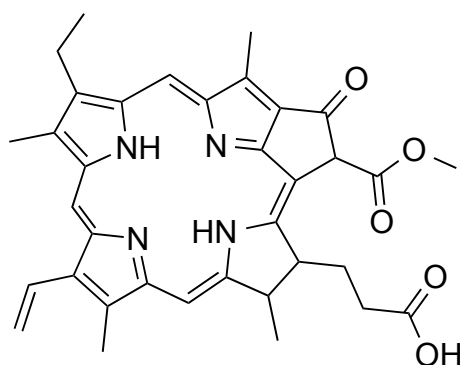


Abbildung 3-3: Strukturformel von Pheophorbid A.

### 3.9.2 Durchführung des Pheophorbid A Assays

Zu Beginn des Versuchs wurden die zu untersuchenden Substanzen in den erforderlichen Konzentrationen und die Negativkontrolle in die 96er-Mikrotiterplatte vorgelegt. Die Zellen wurden, wie in Kapitel 3.2.1 bzw. Kapitel 3.2.2 und Kapitel 3.2.3 beschrieben, geerntet, gewaschen und gezählt. Die Zellsuspension wurde mit KHP auf die Konzentration von 45.000 Zellen/Well verdünnt, mit der Multikanalpipette

zu den Proben gegeben und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 30 Minuten inkubiert. Währenddessen wurde die Pheophorbid A Stammlösung (10 mmol/l) in KHP verdünnt und anschließend in einer finalen Konzentration von 0,5 µmol/l zügig mit Hilfe der Multikanalpipette auf die Proben gegeben. Es ergab sich ein Gesamtvolumen von 200 µl. Daraufhin wurde die Platte für 2 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> lichtgeschützt in den Inkubator gestellt. Nach 2 h wurden die Zellsuspensionen in jeder Vertiefung durch auf- und abpipettieren gemischt und die Mikrotiterplatte am FACSCalibur™ vermessen.

---

<b>Einstellung FACSCalibur™</b>			
Modus	High Throughput		
Messrichtung der Mikrotiterplatte	Horizontal		
Platte	96 Well F-Plate		
Exzitationswellenlänge	488 nm		
Emissionswellenlänge	670 nm (FI3)		
Sample Volume	10 µl		
Mixing Volume	100 µl		
FSC	E1	5	lin
SSC	350	1	log
FI1	550	1	log
FI3	550	1	log

---

Die Mediane der Fluoreszenz der Hauptpopulationen wurden, wie in Kapitel 3.8.1 beschrieben, in einer Exceltabelle exportiert. Anschließend wurden die so erhaltenen Daten mit GraphPad Prism® 6.0 gegen die entsprechenden Konzentrationen der Modulatoren aufgetragen und mittels 4-Parameter-logistischer Gleichung eine sigmoidale Konzentrations-Effektkurve erstellt.



## 3.10 Rhodamin 123 Assay

### 3.10.1 Grundlagen zum Rhodamin 123 Assay

Rhodamin 123 ist ein Xantherivat aus der Klasse der Triphenylmethanfarbstoffe.<sup>127</sup> Es hat ein Exzitationsmaximum bei 507 nm und ein Emissionsmaximum bei 529 nm. Rhodamin 123 diffundiert in die Zelle und reichert sich im Mitochondrium an.<sup>128,129</sup> Es stellt ein Substrat von ABCB1 dar.<sup>130</sup> Wird ABCB1 durch Modulatoren inhibiert kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Fluoreszenz.

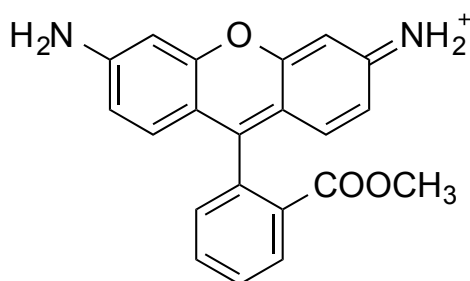


Abbildung 3-4: Strukturformel von Rhodamin 123.

### 3.10.2 Durchführung des Rhodamin 123 Assays

Die zu untersuchenden Substanzen und die Negativkontrolle wurden zu Beginn des Versuchs in den erforderlichen Konzentrationen in die 96er-Mikrotiterplatte vorgelegt. Die Zellen wurden, wie in Kapitel 3.2.1 und Kapitel 3.2.3 beschrieben, geerntet, gewaschen und gezählt. Die Zellsuspension wurde mit KHP auf die Konzentration von 30.000 Zellen/Well verdünnt, mit der Multikanalpipette zu den Proben gegeben und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 30 Minuten inkubiert. Währenddessen wurde die Rhodamin 123 Stammlösung (0,1 mmol/l) in KHP verdünnt und anschließend in einer finalen Konzentration von 0,3 µmol/l zügig mit Hilfe der Multikanalpipette auf die Proben gegeben. Es ergab sich ein Gesamtvolumen von 200 µl. Daraufhin wurde die Platte für 2 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> vor Licht geschützt in den Inkubator gestellt. Anschließend wurde die Zellsuspension in jeder Vertiefung durch auf- und abpipettieren gemischt und am FACSCalibur™ vermessen.

<b>Einstellung FACSCalibur™</b>			
Modus	High Throughput		
Messrichtung der Mikrotiterplatte	Horizontal		
Platte	96 Well F-Plate		
Exzitationswellenlänge	488 nm		
Emissionswellenlänge	530 nm (F11)		
Sample Volume	10 µl		
Mixing Volume	100 µl		
FSC	E1	5	lin
SSC	350	1	log
FI1	500	1	log

Die Mediane der Fluoreszenzen der Hauptpopulationen wurden, wie in Kapitel 3.8.1 beschrieben, ermittelt und in einer Exceltabelle exportiert. Anschließend wurden die so erhaltenen Daten mit GraphPad Prism® 6.0 gegen die entsprechenden Konzentrationen aufgetragen und mittels 4-Parameter-logistischer Gleichung eine sigmoidale Konzentrations-Effektkurve erstellt.

### 3.11 Rhod 4 AM Assay

#### 3.11.1 Grundlagen zum Rhod 4 AM Assay

Rhod 4 AM (Rhodamin-4-Acetoxy-methylester) ist ein Xanthenderivat, das ein für Calciumindikatoren typisches BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N',-tetraessigsäure) Strukturelement enthält.<sup>131,132</sup> Der Ester Rhod 4 AM kann durch die Zellmembran diffundieren und wird durch intrazelluläre Esterasen gespalten.<sup>133</sup> Rhod 4 verbleibt aufgrund seiner negativen Ladung in den Zellen. Die Fluoreszenz wird durch intrazelluläres Calcium gesteigert. Rhod 4 hat ein Exzitationsmaximum von 530 nm und ein Emissionsmaximum von 555 nm. Laut Literatur stellt es ein Substrat von ABCB1, ABCC1 und ABCG2 dar.<sup>134–136</sup> Werden die Transporter gehemmt verbleibt Rhod 4 in den Zellen und es zeigt sich eine Zunahme der Fluoreszenz.

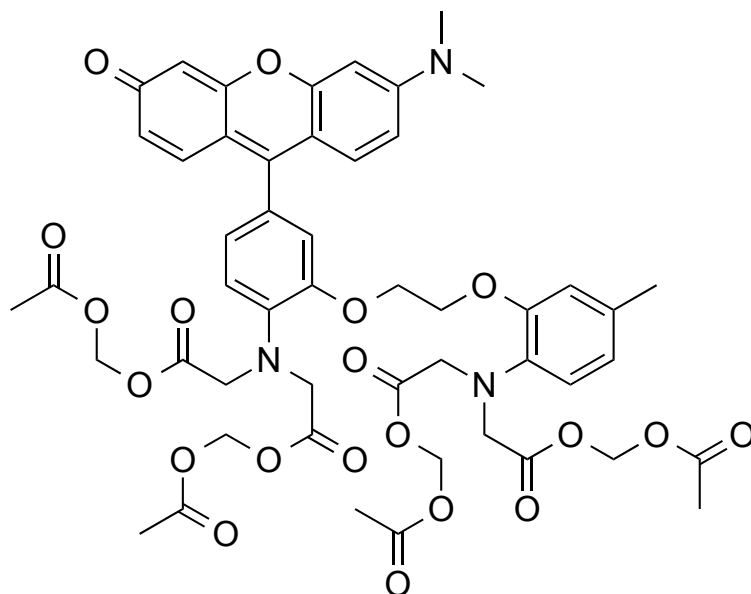


Abbildung 3-5: Strukturformel von Rhod 4 AM.

### 3.11.2 Durchführung des Rhod 4 AM Assays

Zu Beginn des Versuchs wurden die zu untersuchenden Substanzen in den erforderlichen Konzentrationen und die Negativkontrolle in die 96er-Mikrotiterplatte vorgelegt. Die Zellen wurden, wie in Kapitel 3.2.1 bzw. Kapitel 3.2.2 und Kapitel 3.2.3 beschrieben, geerntet, gewaschen und gezählt. Die Zellsuspension wurde mit KHP auf die Konzentration von 45.000 Zellen/Well verdünnt, mit der Multikanalpipette zu den Proben gegeben und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 30 Minuten inkubiert. Währenddessen wurde die Rhod 4 AM Stammlösung (1 mmol/l) in KHP verdünnt und anschließend in einer finalen Konzentration von 1,5 µmol/l zügig mit Hilfe der Multikanalpipette auf die Proben gegeben. Es ergab sich ein Gesamtvolumen von 200 µl. Daraufhin wurde die Platte für 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> vor Licht geschützt in den Inkubator gestellt. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte auf Eis gestellt und die Zellsuspension jeder Vertiefung durch auf- und abpipettieren gemischt. Die Mikrotiterplatte wurde am FACSCalibur™ vermessen.

---

<b>Einstellung FACSCalibur™</b>			
Modus	High Throughput		
Messrichtung der Mikrotiterplatte	horizontal		
Platte	96 Well F-Plate		
Exzitationswellenlänge	488 nm		
Emissionswellenlänge	585 nm (FI2)		
Sample Volume	10 µl		
Mixing Volume	100 µl		
FSC	E1	5	lin
SSC	350	1	log
FI2	600	1	log

---

Die Mediane der Fluoreszenz der Hauptpopulation wurden, wie in Kapitel 3.8.1 beschrieben, ermittelt und in einer Exceltabelle exportiert. Anschließend wurden die so erhaltenen Daten mit GraphPad Prism® 6.0 gegen die entsprechenden Konzentrationen aufgetragen und mittels 4-Parameter-logistischer Gleichung eine sigmoidale Konzentrations-Effektkurve erstellt.

#### **3.11.3 Untersuchungen mit dem konfokalen Lasermikroskop**

Bei der konfokalen Mikroskopie ist im Gegensatz zur klassischen Mikroskopie eine Lochblende in den Strahlengang des Mikroskops eingebaut.<sup>137</sup> Dadurch wird störendes Streulicht ausgeschlossen und die Auflösung erhöht. Allerdings führt die Blende zu einer verringerten Empfindlichkeit. Deshalb wird das Bild gerastert und setzte sich aus vielen Einzelmessungen zusammen, die anschließend vom Computer zusammengefügt werden.

Die Aufnahmen wurden mit den Zelllinien A2780 Wildtyp und A2780adr durchgeführt. Die Zelllinien wurden, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, geerntet und, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, in Medium gewaschen. Anschließend wurden 10.000 Zellen in 300 µl Nährmedium in Deckgläschen ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in den Inkubator gestellt. Nach 24 h wurde das Medium entfernt und

durch 900 µl KHP ersetzt. Dann wurden die Zellen entweder mit 10 µmol/l XR9577 versetzt oder Kontrollen ohne Modulator vorbereitet und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde Rhod 4 AM in einer Konzentration von 1,5 µmol/l dazugegeben und die Proben bei Raumtemperatur mit dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop Nikon A1R untersucht.

Einstellung Nikon A1R	
Exzitationswellenlänge	543 nm
	HV 206, Offset -45
Emissionswellenlänge	585 nm
Scan Size	1024
Scan Speed	1/8

## 3.12 MTT Assay

### 3.12.1 Grundlagen zum MTT Assay

Mit Hilfe des MTT Assays wurde die Toxizität von Substanzen untersucht. Das wasserlösliche gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid (MTT, Thiazolylblau) wird in lebenden Zellen durch mitochondriale Dehydrogenasen zu einem schwerlöslichen blauen Formazan reduziert.<sup>138</sup> Die Absorption des gebildeten Farbstoffes ist proportional der Zellvitalität.

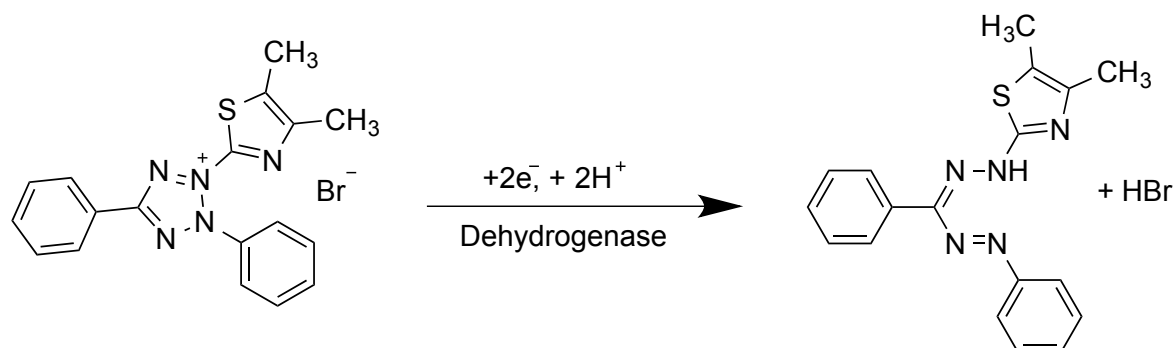


Abbildung 3-6: Reaktionsschema der Reduktion von MTT zum Formazan.

### 3.12.2 Durchführung des MTT Assays

Zu Beginn des Versuchs wurden die zu untersuchenden Substanzen in den erforderlichen Konzentrationen und die Kontrollen in sterile 96er-Mikrotiterplatte mit flachem Boden vorgelegt. Als Kontrolle wurde neben Puffer ebenfalls 10 % DMSO (finale Konzentration) benutzt. Bei dieser Konzentration sind nach 3 Tagen keine lebensfähigen Zellen mehr vorhanden. Die Zellen wurden, wie in Kapitel 3.2.1 und Kapitel 3.2.3 beschrieben, geerntet, gewaschen und gezählt. Allerdings wurde statt KHP weiter Nährmedium benutzt. Die Zellzahl wurde jeweils so gewählt, dass die unbehandelten Kontrollen nach 72 h eine Konfluenz von 95 % aufwiesen, d.h. zwischen 3.000 – 10.000 Zellen pro Well. Die Zellsuspension wurde mit Hilfe der Multikanalpipette auf die Platte hinzugegeben. Das Gesamtvolumen betrug 200 µl. Die Zwischenräume der Mikrotiterplatte wurden als Schutz gegen Verdunstung mit PBS befüllt. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 71 h im Inkubator inkubiert. Nach 71 h wurde in jede Vertiefung 40 µl frisch hergestellte MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS) hinzupipettiert. Nach 1 h wurde der Überstand entfernt und das Formazan durch Zugabe von je 100 µl DMSO gelöst. Die Absorption des blauen Formazans wurde bei 595 nm mit dem FLUOstar Optima Microplatereader (BMG Lab Technologies) gemessen. Zusätzlich wurde die Hintergrundabsorption bei 710 nm gemessen und von der Absorption des Formazans abgezogen.

Die erhaltenen Daten wurden gegen die Konzentration der Testsubstanzen aufgetragen und mit GraphPad Prism<sup>®</sup> 6.0 wurde mittels 4-Parameter-logistischer Gleichung eine sigmoidale Konzentrations-Effektkurve erstellt.

### 3.13 5D3-Shift Assay

#### 3.13.1 Grundlagen zum 5D3-Shift Assay

Der 5D3-Antikörper richtet sich gegen ein externes Epitop von ABCG2.<sup>139</sup> Die Strukturaufklärung der Bindungsstelle wurde von Taylor et al. aus Kryoelektronenmikroskopstrukturen von ABCG2 gebunden an den 5D3-Antikörper abgeleitet.<sup>45</sup> Die Bindungsstelle befindet sich demnach im dritten extrazellulären Loop EL3, welcher TM5c und TM6a miteinander verbindet. Um die ATPase Aktivität maximal zu inhibieren reicht bereits ein Antikörpermolekül aus.<sup>45</sup> In Kombinationsexperimenten mit dem 5D3-Antikörper und steigenden Konzentrationen von Modulatoren von ABCG2 konnte eine konzentrationsabhängige Verschiebung der Bindungsintensität von 5D3 beobachtet werden.<sup>140,141</sup> Der 5D3-Antikörper bindet stärker, wenn sich ABCG2 im geschlossenen Zustand befindet. Dieser Umstand, kann zur Charakterisierung der Interaktionen von Modulatoren mit ABCG2 herangezogen werden.<sup>83</sup>

#### 3.13.2 Durchführung des 5D3-Shift Assays

Bei dem verwendeten Antikörper handelt es sich um den monoklonalen Antikörper PerCP-Cy<sup>TM</sup>5.5 Mouse Anti-Human CD338, vom Isotyp IgG2b, κ.<sup>142</sup> Der konjugierte primäre Antikörper hat ein Exzitationsmaximum von 482 nm und ein Emissionsmaximum von 695 nm. Für die Isotypenkontrolle wurde der Antikörper PerCP-Cy<sup>TM</sup>5.5 Mouse IgG2b, κ Isotype Control verwendet.<sup>143</sup>

Die PLB-985 Zellen wurden, wie unter Kapitel 3.2.2 beschrieben, geerntet, in frisch hergestelltem Färbepuffer gewaschen und, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, gezählt.

Färbepuffer		finale Konzentration
BSA	0,13 g	0,25 % (m/V)
PBS	Auffüllen auf 50 ml	

2,5 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml wurden in Eppendorf-Caps überführt und entweder mit der Negativkontrolle oder den Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt und bei 37 °C und 300 rpm in dem Thermomixer für 5 Minuten inkubiert. Dann wurden der Antikörper oder die Isotypenkontrolle zu den Proben dazugegeben. Der Gehalt des 5D3-Antikörpers lag dabei final bei 0,2 µg/µl. Die Zellsuspension wurde erneut bei 37 °C und 300 rpm in dem Thermomixer für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Färbepuffer gewaschen, in PBS resuspendiert und in Röhren am FACSCalibur™ vermessen.

---

Einstellung FACSCalibur™			
Exzitationswellenlänge	488 nm		
Emissionswellenlänge	670 nm (FI3)		
FSC	E1	5	lin
SSC	375	1	log
FI3	550	1	log

---

### 3.14 Sf9 Zellen und Baculovirus

#### 3.14.1 Sf9 Zellen

Bei den Sf9 Zellen handelt es sich um immortalisierte Ovarzellen von Larven der Nachtfalterart *Spodoptera frugiperda*.<sup>144</sup> Die Zelllinie Sf9 stammt von der Zelllinie IPLBSF-21 ab. Sie werden als Wirt benutzt, um rekombinante Proteine zu erzeugen. Die Zelllinie wurde uns freundlicherweise von Dr. Christine Hrycyna (Purdue University, Indiana, USA) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden bei 27 °C in Spodopan mit 0,5 % Antibiotic-Antimycotic 100X entweder adhärent oder in Suspension kultiviert.



### 3.14.2 Baculovirus

Das Baculovirus-Expressions-Vektor-System (BEVS) wird benutzt, um rekombinante Proteine herzustellen. Baculoviren gehören zu einer diversen Gruppe von großen doppelsträngigen DNA Viren, die verschiedene Mottenarten befallen.<sup>145</sup> Das hier benutzte Baculovirus ist ein *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV). Es enthält humane cDNA von ABCG2.<sup>11</sup> Es wurde uns freundlicherweise von Dr. Csilla Özvegy-Laczka (Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Ungarn) zur Verfügung gestellt. Das Virus wurde entweder bei 4 °C oder bei -80 °C lichtgeschützt gelagert.

### 3.14.3 Inkulturnahme

Die Sf9 Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen, vorsichtig bei Raumtemperatur aufgetaut und in 9 ml Medium überführt. Anschließend wurde bei 184 g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Das Medium wurde entfernt und das Zellpellet in frischem Medium suspendiert. Die Zellen wurden zunächst adhärent bei 27 °C kultiviert.

### 3.14.4 Adhärenente Kultivierung

Die Sf9 Zellen wurden alle 2-3 Tage bei 90 %-iger Konfluenz in der mid-log Phase ihres Wachstums gesplittet. Zunächst wurde das Medium bis auf 10 ml entfernt und die Zellen durch Abspülen mit der Pipette vom Flaschenboden abgelöst. Die Suspension wurde bei 184 g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Das verbrauchte Medium wurde entfernt. Die Sf9 Zellen wurden in einer Konzentration von 300.000 Zellen/ml in T175er Flaschen mit 30 ml Medium ausgesät und maximal über 20 Passagen kultiviert.

### 3.14.5 Suspensionskultur

Adhärente Sf9 Zellen wurden, wie in Kapitel 3.14.4 beschrieben, vom Flaschenboden abgelöst und das verbrauchte Medium durch Zentrifugation entfernt. Anschließend wurden die Zellen in autoklavierte 250 ml Erlenmeyerkolben mit maximal 100 ml Medium in einer Konzentration von 300.000 Zellen/ml überführt, mit autoklavierten Membrandeckeln verschlossen und bei 27 °C und 125 rpm im Orbital Shaker kultiviert. Das Zellwachstum wurde regelmäßig mit Hilfe des Casy® 1 Modell TT überprüft. Die Zellen wurden bis maximal 2 Millionen Zellen/ml wachsen gelassen und alle 3-4 Tage auf 300.000 Zellen/ml verdünnt. Alle 2 Wochen wurde das Medium komplett ausgetauscht.

### 3.14.6 Kryokonservierung

Die Sf9 Zellen wurden, wie in Kapitel 3.14.4 beschrieben, kultiviert, geerntet und zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in Einfriermedium (60 % Medium, 30 % FKS und 10 % DMSO) eingefroren. Aus einer T175er Flasche wurden 3 Backups erstellt. Diese wurden zunächst für 48 h bei -80 °C eingefroren und dann in den Stickstofftank überführt.

### 3.14.7 Infektion der Sf9 Zellen mit Baculovirus

Die Zellen wurden, wie in Kapitel 3.14.5 beschrieben, kultiviert. 30 Millionen Zellen wurden in T175er Flaschen überführt. Nach 10-15 Minuten wurde das Medium bis auf 5 ml entfernt und 3 ml Viruslösung ( $1-2 \cdot 10^8$  pfu/ml) dazugegeben. Die Sf9 Zellen wurden für 1 h mit dieser hohen Viruskonzentration bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurden 15 ml frisches Medium auf die infizierten Zellen gegeben und für 3 weitere Tage inkubiert.

### 3.14.8 Virusamplifikation

Wenn notwendig, z.B. nach Lagerung der Viruslösung bei -80 °C wurde die Viruslösung erneut amplifiziert. Die Sf9 Zellen wurden, wie unter 3.14.5 beschrieben, kultiviert. 15 Millionen Zellen wurden mit 20 ml frischem Medium in T175er Flaschen ausgesät und mit 500 µl Viruslösung versetzt. Die Zellen wurden für 7-10 Tage bei 27 °C kultiviert. Der Virushaltige-Überstand wurde abgenommen und für 6-12 Monate bei 4 °C oder für längere Zeit bei -80 °C lichtgeschützt gelagert.

### 3.15 Membranpräparation

#### 3.15.1 Verwendete Lösungen

<b>Waschpuffer, pH 7, RT</b>		finale Konzentration
Tris	6,005 g	50 mmol/l
Mannitol	54,81 g	300 mmol/l
Milli-Q Wasser	Auffüllen auf 1000 ml	

Der Puffer wurde mit 1 N HCl auf pH 7 bei Raumtemperatur eingestellt und in einer geeigneten Duranglasflasche bei 4 °C gelagert. Vor der Benutzung wurden 50 ml Waschpuffer mit 25 µl frischer PMSF 100 mg/ml Lösung versetzt.

<b>100 mg/ml PMSF</b>	
PMSF	10 mg
DMSO	100 ml

Die Lösung wurde vor Gebrauch immer frisch hergestellt und bis zur Benutzung auf Eis gelagert.

<b>1,7 mol/l Tris</b>		finale Konzentration
Tris	20,587 g	1,7 mol/l
Milli-Q Wasser	Auffüllen auf 100 ml	

Die Lösung wurde bei 4 °C in einer geeigneten Duranglasflasche gelagert.

### 3 Material und Methoden

---

<b>100 mmol/l EGTA-Tris, pH 7, RT</b>		finale Konzentration
EGTA	3,804 g	100 mmol/l
Milli-Q Wasser	Auffüllen auf 100 ml	

---

Die EGTA-Lösung wurde mit 1,7 mol/l Tris-Lösung auf pH 7 eingestellt und bei 4 °C in einer geeigneten Duranglasflasche gelagert.

---

<b>TME, pH 7, RT</b>		finale Konzentration
Tris	6,055 g	50 mmol/l
Mannitol	9,135 g	50 mmol/l
EGTA-Tris, pH7	20 ml 100 mmol/l EGTA-Tris	2 mmol/l
Milli-Q Wasser	Auffüllen auf 1000 ml	

---

Die Lösung wurde mit 1 N HCl auf pH 7 eingestellt und in einer geeigneten Duranglasflasche bei 4 °C gelagert.

---

<b>TMEP</b>	
TME	50 ml
Aprotinin 2 mg/ml	200 µl
Leupeptin 10 mg/ml	50 µl
DTT 0,1 mol/l	1 ml
PMSF 100 mg/ml	25 µl

---

Die Lösung wird vor Gebrauch frisch hergestellt und auf Eis gelagert.

---

<b>2 mg/ml Aprotinin</b>	
Aprotinin	2 mg
Milli-Q Wasser	1 ml

---

Die Lösung wurde auf 200 µl aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

---

<b>10 mg/ml Leupeptin</b>	
Aprotinin	10 mg
Milli-Q Wasser	1 ml

---

Die Lösung wurde auf 50 µl aliquotiert und bei -20 °C gelagert

---

**0,1 mol/l DTT**

---

DTT	0,3086 g
Milli-Q Wasser	20 ml

---

Die Lösung wurde auf 1 ml aliquotiert und bei -20 °C gelagert

---

**10 mmol/l Cholesterol**

---

finale Konzentration

Cholesterol	25 mg	10 mmol/l
TMEP	2 ml	

---

Die Lösung wurde frisch hergestellt und bis zur Benutzung auf Eis gelagert.

#### 3.15.2 Durchführung der Membranpräparation

ABCG2 wurde von den Sf9 Zellen nach Infektion mit dem Baculovirus membranständig produziert. Die Konzentration von ABCG2 lag dabei ungefähr bei 4 % der Gesamtproteine. Für weitere Versuche mussten die Membranproteine der Sf9 Zellen präpariert werden. Die mit dem Baculovirus infizierten Zellen wurden nach 72 h durch leichtes Schlagen gegen die Flasche vom Flaschenboden gelöst. Die Suspension wurde bei 415 g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Das Pellet wurde entweder bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert oder direkt für die Membranpräparation benutzt.

Die folgenden Arbeitsschritte fanden unter Eiskühlung statt. Das Pellet wurde zunächst mit 5 ml, dann mit 10 ml frisch zubereitetem Waschpuffer gewaschen. Alle weiter zu benutzenden Gefäße und Geräte wurden mit frisch hergestelltem TMEP gespült und auf Eis gekühlt. Das gewaschene Zellpellet wurde dann in 4 ml frisch hergestelltem TMEP resuspendiert und vorsichtig ohne die Zellkerne zu zerstören für 10 Minuten auf Eis mit dem Dounce Hand-Homogenisator ohne Einarbeitung von Luft aufgeschlossen. Die Suspension wurde anschließend bei 415 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein gekühltes Ultrazentrifugenglas überführt. Das Pellet wurde erneut vorsichtig mit 4 ml TMEP für 10 Minuten auf Eis mit dem Dounce Hand-Homogenisator aufgeschlossen und wieder bei 415 g, 4 °C und 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden zusammengeführt und mit 2 ml 10 mmol/l Cholesterol Lösung versetzt. Die Lösung wurde sanft

geschwenkt und mit finalen 2 mmol/l Cholesterol für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in der vorgekühlten Ultrazentrifuge für 60 Minuten bei 18.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Membranpellet in frischem TMEP vorsichtig auf Eis für ein paar Minuten im Dounce Hand-Homogenisator resuspendiert, sofort aliquotiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert.

#### **3.15.3 Proteinbestimmung**

Die Proteinmenge wurde mit Hilfe des Pierce BCA-Assay Kits, Thermo Scientific, nach Gebrauchsanweisung des Herstellers, bestimmt.<sup>146</sup> Als Standard wurde Albumin verwendet. Mit den Konzentrationen 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml und 400 µg/ml wurde die Kalibriergerade erstellt. Es wurden jeweils 25 µl der Standardverdünnungsreihe in Duplikaten in eine 96er-Mikrotiterplatte mit flachem Boden pipettiert. Die Probe wurde mit Wasser 1:50 verdünnt und in Triplikaten in je 25 µl in die Platte pipettiert. 200 µl der frisch hergestellten BCA-Arbeitslösung (50 Teile Reagenz A und 1 Teil Reagenz B) wurden dazugegeben. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte bei 60 °C für 60 Minuten erhitzt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Im Anschluss wurde die Platte bei 570 nm mit Hilfe des Multiplate-Readers Multiscan-Ex vermessen und der Proteingehalt der Probe anhand der Kalibrierreihe mit Excel berechnet.

#### **3.16 Vanadat-sensitiver ATPase Assay**

##### **3.16.1 Grundlagen zum Vanadat-sensitiven ATPase Assay**

Der ATPase Assay beruht auf der kolorimetrischen Bestimmung von anorganischem Phosphat ( $P_i$ ), welches bei der Hydrolyse von ATP zu ADP freigesetzt wird.<sup>147,148</sup> Die bei der Hydrolyse von ATP zu ADP und  $P_i$  freiwerdende Energie

wird von ABCG2 für den Transport von Substanzen benutzt. ABCG2 besitzt allerdings bereits im Ruhezustand eine moderate basale Aktivität der ATPase.<sup>11</sup> Der Nachweis von  $P_i$  beruht auf der kolorimetrischen Bestimmung als Molybdänblau in Anwesenheit von Ascorbinsäure und Antimon, dessen Absorption bestimmt wird.<sup>149</sup> Die Menge des gebildeten Farbstoffs ist dem ATP-Verbrauch proportional. Als Referenz wurde Natriumorthovanadat ( $V_i$ ) benutzt. Natriumorthovanadat lagert sich nach einem katalytischen Zyklus in der ATP-Bindungstasche an und hemmt als  $ADP \cdot V_i \cdot Mg^{2+}$ -Komplex die Freisetzung von ADP. Damit wird die Funktion der ATPase unterbunden.<sup>96,148,150</sup>

#### 3.16.2 Verwendete Lösungen

<b>0,1 mol/l MOPS-Tris, pH 7, RT</b>		finale Konzentration
MOPS	2,09 g	0,1 mol/l
Milli-Q Wasser	100 ml	

Die Lösung wurde mit 1,7 mol/l Tris-Lösung, siehe Kapitel 3.15.1, auf pH 7 eingestellt und in einer geeigneten Duranglasflasche bei 4 °C gelagert.

<b>1 mol/l KCl</b>		finale Konzentration
KCl	7,46 g	1 mol/l
Milli-Q Wasser	100 ml	

Die Lösung wurde in einem Falcon bei 4 °C gelagert.

<b>0,1 mol/l Natriumazid</b>		finale Konzentration
Natriumazid	0,6501 g	0,1 mol/l
Milli-Q Wasser	100 ml	

Die Lösung wurde in einem Falcon bei 4 °C gelagert.

<b>10 mmol/l Ouabain</b>		finale Konzentration
Ouabain	0,0073 g	10 mmol/l
Milli-Q Wasser	1 ml	

Die Lösung wurde frisch hergestellt und bis zum Verbrauch auf Eis gelagert.

### 3 Material und Methoden

---

#### ATPase Assay Mix

---

	10 ml	6 ml	finale Konzentration
0,1 mol/l MOPS-Tris, pH 7	4000 $\mu$ l	2400 $\mu$ l	40 mmol/l
0,1 mol/l EGTA-Tris, pH 7	50 $\mu$ l	30 $\mu$ l	0,5 mmol/l
1 mol/l KCl	500 $\mu$ l	300 $\mu$ l	50 mmol/l
0,1 mol/l Natriumazid	500 $\mu$ l	300 $\mu$ l	5 mmol/l
0,1 mol/l DTT	200 $\mu$ l	120 $\mu$ l	2 mmol/l
10 mmol/l Ouabain	1000 $\mu$ l	600 $\mu$ l	1 mmol/l
Milli-Q Wasser	3750 $\mu$ l	2250 $\mu$ l	

---

Der ATPase Assay Mix wurde zunächst ohne Ouabain und DTT hergestellt, aliquotiert und bei 4 °C gelagert. Ouabain (10 mmol/l) und DTT (0,1 mol/l) wurden jeweils frisch hinzugefügt. Während des Versuchs wurde die Lösung auf Eis in einem 15 ml Falcon gelagert.

---

#### ATP-Stammlösung 200 mmol/l

---

MgCl <sub>2</sub>	0,81324 g
Na <sub>2</sub> ATP	2,2044 g
Milli-Q Wasser	Auffüllen auf 20 ml

---

Die Lösung wurde mit frisch hergestellter 1,7 mol/l Tris-Lösung, siehe Kapitel 3.15.1, auf pH 7 eingestellt. Da ATP sehr hydrolyseempfindlich ist, wurde die ATP-Lösung zügig in der Kühlkammer bei 4 °C hergestellt. Anschließend wurde die Lösung in 500  $\mu$ l aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die Lösung wurde frisch vor Gebrauch mit ATPase Assay Mix auf die gewünschte Konzentration verdünnt und bis zum Verbrauch auf Eis gelagert.

---

#### 100 mmol/l Natriumorthovanadat

---

		finale Konzentration
Natriumorthovanadat	18,39 mg	100 mmol/l
Milli-Q Wasser	1 ml	

---

Die Lösung wurde bei -20 °C in einem Eppendorfcap gelagert.



### 3 Material und Methoden

---

<b>60 mmol/l Natriumorthovanadat</b>		finale Konzentration
Natriumorthovanadat	11,034mg	60 mmol/l
Milli-Q Wasser	1 ml	

---

Die Lösung wurde bei -20 °C in einem Eppendorfcap gelagert.

---

<b>P<sub>i</sub>-Reagenz</b>		finale Konzentration
Konzentrierte Schwefelsäure	35 ml	2,5 mol/l
Ammoniummolybdat	5 g	1 % (m/V)
Kaliumantimonyltartrat	0,07 g	0,014 % (m/V)
Milli-Q Wasser	Auffüllen auf 500 ml	

---

Die Lösung wurde bei 4 °C in einer geeigneten Duranglasflasche gelagert.

---

<b>20 %-ige Essigsäure</b>		finale Konzentration
Eisessig	100 ml	20 % (V/V)
Milli-Q Wasser	Auffüllen auf 500 ml	

---

Die Lösung wurde bei 4 °C in einer geeigneten Duranglasflasche gelagert.

---

<b>1 %-ige Ascorbinsäure</b>		finale Konzentration
Ascorbinsäure	0,1 g	1 % (m/V)
Milli-Q Wasser	Auffüllen auf 10 ml	

---

Die Lösung wurde jeweils frisch hergestellt und lichtgeschützt auf Eis bis zum Verbrauch gelagert

---

<b>100 mmol/l Phosphat-Stammlösung</b>		finale Konzentration
Kaliumhydrogenphosphat	174,18 mg	100 mmol/l
Milli-Q Wasser	10 ml	

---

Die Lösung wurde bei -20 °C in einem 15 ml Falcon gelagert.

<b>1 mmol/l Phosphat-Stammlösung</b>		finale Konzentration
100 mmol/l Phosphat-Stammlösung	100 µl	1 mmol/l
Milli-Q Wasser	9900 ml	

Die Lösung wurde bei 4 °C in einem 15 ml Falcon gelagert.

### 3.16.3 Vanadat-sensitiver ATPase Assay im Röhrchen

Der Vanadat-sensitive ATPase Assay wurde nach der Methode von Sarkadi et al. durchgeführt.<sup>11,151</sup> Die folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Der ATPase Assay Mix wurde zunächst in 2 ml Caps vorgelegt. Die zu untersuchenden Substanzen wurden in DMSO gelöst und in den gewünschten Konzentrationen dazugegeben. Als Standards wurden jeweils 1,3 mmol/l Natriumorthovanadat, welches zur Hemmung aller ABCG2 vermittelten Transportprozesse führte, 1 µmol/l Quercetin für die maximale Stimulation, 1 µmol/l Ko143 zur maximalen Inhibition, DMSO zur Bestimmung der basalen ATPase Aktivität und eine Probe mit durch SDS inaktiviertem Protein zur Kontrolle der Reagenzien und des ATP-Zerfalls, mitvermessen. Die Konzentration von DMSO lag in den Proben bei 1 %. Dann wurde die Membran vorsichtig aufgetaut und mit dem ATPase Assay Mix auf 1 mg/ml verdünnt. 10 µl, also entsprechend 10 µg Membranproteine, wurden zum Versuchsansatz dazugegeben und bei 37 °C für 5 Minuten im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion unter Zugabe von 3,33 mmol/l MgATP gestartet. Nach exakt 20 Minuten wurde der Ansatz aus dem Wasserbad entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 5 %-iger SDS-Lösung gestoppt. Zur Detektion des Phosphats wurde zunächst eine Kalibrierreihe mit 0, 10, 20 und 50 nmol Phosphat, oder je nach zu erwartender Absorption angepassten Konzentrationen, aus der 1 mmol/l Phosphat-Stammlösung in Assay Mix hergestellt. Da die Qualität des SDS die Farbreaktion beeinflussen kann, wurde es ebenfalls zur Kalibrierreihe hinzugegeben.<sup>152</sup> Dann wurden die Proben und die Kalibrierreihe mit je 300 µl P<sub>i</sub>-Reagenz, 750 µl 20 %-iger Essigsäure und 150 µl der frisch hergestellten 1 %-igen Ascorbinsäurelösung versetzt. Nach exakt 20 Minuten wurde die Absorption bei 880 nm zügig vermessen, da der gebildete Farbstoff zwar stabil ist, aber das in der Lösung vorhandene ATP unter den gegebenen Bedingungen weiter hydrolysiert.<sup>153</sup>

Mit Hilfe der Kalibrierreihe wurde der Phosphatgehalt in nmol berechnet. Der Phosphatgehalt der Proben mit Natriumorthovanadat wurde von den anderen Proben abgezogen. Anschließend wurde die Umsetzungsrate von ATP zu ADP und  $P_i$  durch ABCG2 in nmol  $P_i$ /min/mg Protein berechnet.

Wenn es sich um reine Aktivierung oder Inhibition der basalen ATPase handelte, wurde die so berechnete Aktivität von ABCG2 mit GraphPad Prism<sup>®</sup> 6.0 gegen die entsprechenden Konzentrationen der Verbindungen aufgetragen und mittels 4-Parameter-logistischer Gleichung eine sigmoidale Konzentrations-Effektkurve erstellt. Bei biphasischen Verläufen wurde eine Bell-shaped Konzentrations-Effektkurve erzeugt.

Wird bei nachfolgenden Berechnungen und Darstellungen nichts anderes angegeben, wurde die ATPase Aktivität in Prozent wie im Folgenden beschrieben berechnet. Zur Bestimmung von  $E_{max}$  für Inhibitionskurven wurde die basale ATPase Aktivität als 0 % und die mit Ko143 1  $\mu$ mol/l inhibierte ATPase Aktivität als -100 % dargestellt. Zur Bestimmung von  $E_{max}$  für Aktivierungskurven wurde die basale ATPase Aktivität als 0 % und die mit Quercetin 1  $\mu$ mol/l aktivierte ATPase Aktivität als +100 % dargestellt.

#### **3.16.4 Vanadat-sensitiver ATPase Assay in der Mikrotiterplatte**

Die folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Der ATPase Assay Mix wurde zunächst in die Vertiefungen der 96er-Mikrotiterplatte mit flachem Boden vorgelegt. Das weitere Vorgehen erfolgte bis auf einige Modifikationen analog den in Kapitel 3.16.3 beschriebenen Abläufen. Die Konzentration von DMSO lag pro Well bei 2 % und die Membran wurde in einer finalen Konzentration von 5  $\mu$ g/Vertiefung benutzt. Die Platte wurden anschließend für 5 Minuten auf dem Thermomix bei 37 °C bei 300 rpm geschüttelt. Anschließend wurde die Reaktion unter Zugabe von 3,33 mmol/l MgATP gestartet. Nach exakt 20 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 40  $\mu$ l 5 %-iger SDS-Lösung gestoppt. Die Kalibrierreihe zur Detektion des Phosphats mit 0, 5, 10, 20 nmol Phosphat wurde zeitgleich mit den Proben

inkubiert, geschüttelt und mit 40 µl 5 %-iger SDS-Lösung versetzt um. Anschließend wurden die Proben und die Kalibrierreihe mit je 200 µl Detektionsreagenz versetzt. Das Detektionsreagenz bestand aus P<sub>i</sub>-Reagenz, 20 %-iger Essigsäure und 1 %-iger frisch hergestellte Ascorbinsäure im Verhältnis 50 : 125 : 25. Nach genau 20 Minuten wurde die Absorption des Phosphats bei 710 nm vermessen. Die Auswertung erfolgte wie unter Kapitel 3.16.3 beschrieben.

#### 3.17 Konformationsanalyse

Für die hier durchgeführte Untersuchung der Bindung von Tariquidar-Analoga mit ABCG2 wurden zwei verschiedene computergestützte Methoden genutzt. Dazu wurde zunächst ein Pharmakophor anhand der von Jackson et al.<sup>44</sup> publizierten Konformation von MB136 in der Bindungstasche von ABCG2 mit dem Programm MOE (Version 2018.01, Molecular Operating Environment Chemical Computing Group Inc., Montreal Canada) erstellt. Zusätzlich wurde mit dem Modul Flexible Alignment eine Überlagerung von einer Auswahl hier getesteter Verbindungen mit MB136 durchgeführt.

Die untersuchten Moleküle wurden dazu zunächst mit ChemBioDraw (Version 13.0.2.3020, PerkinElmer) gezeichnet, in das Programm MOE importiert und in einer Datenbank gespeichert. Anschließend wurden sie in dem Kraftfeld MMFF94x energieminiert. Diese energieminierte Konformation wurde als Ausgangskonformation für die weitere Analyse benutzt. Da die Konformation von MB136 in der Bindungstasche von ABCG2 bekannt ist, wurde anhand dieser ein Pharmakophor erstellt. Anschließend wurde untersucht, inwieweit die hier untersuchten Analoga ähnliche Konformationen einnehmen können. Zunächst wurde eine stochastische Konformationssuche durchgeführt. Dafür wurden zufällig alle Bindungen rotiert, die generierte Struktur/Konformation minimiert und mit bereits bestehenden Konformationen verglichen. Dies wurde wiederholt bis entweder die Anzahl an Versuchen eine neue Konformation zu erzeugen überschritten war oder eine maximale Anzahl an Versuchen erreicht wurde.<sup>154</sup> Die stochastische Konformationssuche wurde mit folgenden Einstellungen durchgeführt.

---

<b>Einstellung stochastische Konformationssuche</b>	
Stochastic	
Rejection limit	100
Iteration limit	10.000
Rms gradient	0,005
MM Iteration limit	500
Allow amide bond rotation	Yes
Allow unconstrained double bond rotation	Yes
Invert unconstrained double bond rotation	Yes
Enforce chair conformations	Yes
RMSD Limit	0,25 include hydrogens
Energy Window	7
Conformation Limit	10.000

---

Ferner wurden Konformationen mit Hilfe des Moduls Flexible Alignment erzeugt. Diese Methode basiert ebenfalls auf stochastischen Modellen. Die Atome und funktionellen Gruppen werden beim Flexiblen Alignment aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften und ihrer Volumina miteinander verglichen.<sup>155</sup> Der Ligand MB136 wurde dazu in der publizierten Konformation fixiert. Das Flexible Alignment wurde mit nachfolgenden Einstellungen durchgeführt.

---

<b>Einstellung Flexibles Alignment</b>	
Iteration Limit	200
Failure Limit	20
Energy Cutoff	15
Calculate Forcefield Charges Prior Search	Yes
Stochastic Conformation Search	Yes
Settings	Standard settings

---

### 3.18 Datenanalyse

Für die Beschreibung der experimentellen Messwerte sind verschiedene Gleichungen notwendig, die die linearen oder nichtlinearen Zusammenhänge von Vorgängen an den Transportern beschreiben. Die verwendeten Gleichungen und statistischen Kennzahlen sind im Folgenden erläutert.

**Formel 3-1: 4-Parameter logistische Gleichung.**

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

Die sigmoidalen Konzentrations-Effektkurven wurden unter Verwendung der 4-Parameter logistischen Gleichung erstellt. Damit lässt sich der konzentrationsabhängige Effekt eines Modulators an seiner Zielstruktur beschreiben.<sup>156</sup>

Der Parameter *Bottom* stellt den in Abwesenheit eines Modulators gemessenen Wert dar. *Top* beschreibt den gemessenen maximalen Effekt. Der Hillkoeffizient  $n_H$  gibt die Steigung im Wendepunkt der Kurve wieder. Alternativ wurde die 3-Parameter logistische Gleichung mit einem Hillkoeffizienten  $n_H$  von 1 verwendet. Der  $IC_{50}$ -Wert ist die Ligandenkonzentration  $L$ , bei der der halbmaximale Effekt erreicht wird, dies entspricht dem Wendepunkt der Kurve.

**Formel 3-2: Arithmetisches Mittel.**

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

Das arithmetische Mittel ist ein Lageparameter für normalverteilte Daten. Dabei stellt  $n$  die Anzahl dar.

**Formel 3-3: Median für n=ungerade.**

$$\tilde{x} = x_{\frac{n+1}{2}}$$

**Median für n=gerade.**

$$\tilde{x} = \frac{1}{2} \left( x_{\frac{n}{2}} + x_{\frac{n}{2}+1} \right)$$

Der Median eignet sich als Lageparameter für schiefe Verteilungen.

**Formel 3-4: Varianz.**

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

Die Varianz  $s^2$  gibt die mittlere quadratische Abweichung vom Mittelwert an und ist ein Maß für die Streuung der Messwerte.

**Formel 3-5: Standardabweichung.**

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

Die Standardabweichung  $s$  ist die Wurzel der Varianz. Sie beschreibt die Präzision der Messung.

**Formel 3-6: Standardfehler des Mittelwertes.**

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Der Standardfehler des Mittelwertes gibt an, wie präzise der Mittelwert bestimmt wurde.

**Formel 3-7: Polynome 2. Ordnung**

$$P(x) = b_0 + b_1x + b_2x^2$$

Ein Polynom besteht aus einer Summe von Potenzfunktionen.

**Formel 3-8: Einphasige exponentielle Assoziation.**

$$y = y_{max} \cdot (1 - e^{-k \cdot X})$$

Die einphasige exponentielle Assoziation beschreibt einen funktionellen Zusammenhang zwischen einer unabhängigen Variablen  $X$  und einer abhängigen Variablen  $y$ . Bei der hier benutzten Anwendung stellt  $X$  die Konzentration dar, während  $k$  die Wachstumsrate beschreibt.<sup>156</sup>

**Formel 3-9: Bell-shaped Dosis-Wirkungs Gleichung.**

$$y = Dip + Section1 + Section2$$

Die Formel besteht aus der Summe von zwei Dosis-Wirkungskurven, eine stimuliert, die andere inhibiert.<sup>156</sup> Die einzelnen Bestandteile lassen sich folgendermaßen ausdrücken.

$$Section1 = \frac{Span1}{1 + 10^{(logEC_{50\_1} - x) \cdot nH_1}}$$

$$Section2 = \frac{Span2}{1 + 10^{(x - logEC_{50\_2}) \cdot nH_2}}$$

und

$$Span1 = Plateau1 - Dip$$

$$Span2 = Plateau2 - Dip$$

Dabei entsprechen  $Plateau1$  und  $Plateau2$  den rechten und linken Plateaus der Kurve,  $Dip$  ist das mittlere Plateau, also der Peak der Kurve. Bei  $logEC_{50\_1}$  und  $logEC_{50\_2}$  handelt es sich um die Konzentration der halbmaximalen Stimulation oder Inhibition, während es sich bei  $nH_1$  und  $nH_2$  um die Steigungen handelt.



## 4 Ergebnisse und Diskussion

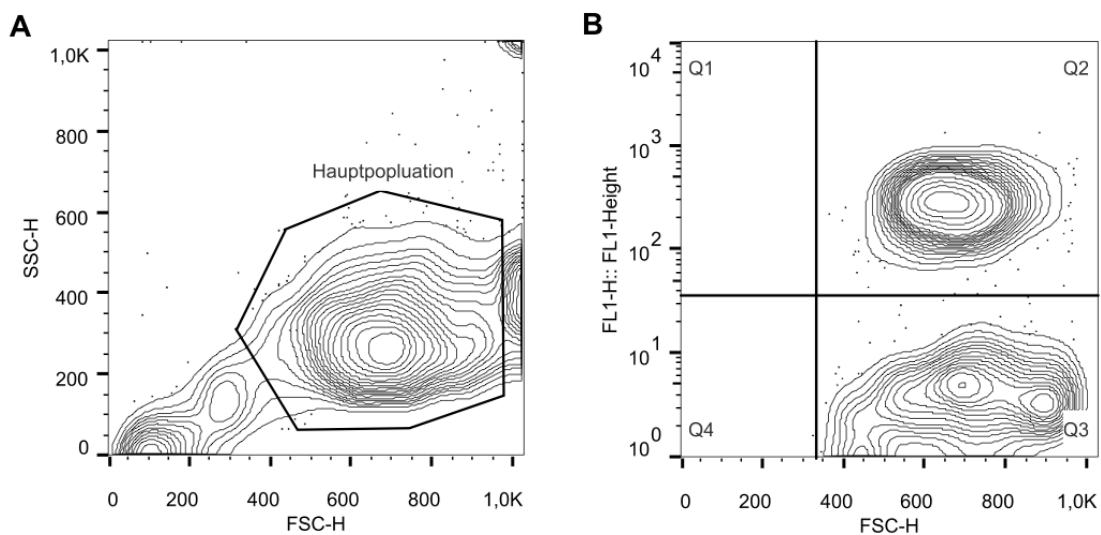
### 4.1 Pheophorbid A Simultan-Assay

Bei der Durchführung von fluoreszenzbasierten funktionellen Assays am FACSCalibur™ werden grundsätzlich eine Vielzahl von Parametern zeitgleich erfasst. So ist es z.B. möglich mehrere Farbstoffe in verschiedenen Kanälen gleichzeitig zu detektieren. Da in unserer Arbeitsgruppe viele Substanzen in Hochdurchsatz Assays analysiert werden, wurde untersucht, ob sich die Effekte von Modulatoren simultan in verschiedenen Zelllinien messen lassen. So könnten Screenings effektiver und schneller durchgeführt werden. Möglich ist eine Simultanbestimmung verschiedener Zelllinien durch Marker oder Färbungen der Zellen in Kombination mit komplexeren Gating-Methoden am FACSCalibur™. In der Pubchem BioAssay Database findet sich ein möglicher Assay von der Arbeitsgruppe um R. Larson.<sup>157</sup> Die Arbeitsgruppe benutzte CCRF-Adr Zellen mit ABCB1 und IgMXP3 Zellen mit ABCG2 um diese im HTS-Modus gleichzeitig mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1 zu vermessen. JC-1 ist ein Substrat beider Transporter. Die CCRF-Adr Zellen wurden zuvor mit FarRed DDAO CellTrace SE kovalent eingefärbt. Durch komplexes Gating können die verschiedenen Zellen bei der Auswertung voneinander getrennt werden und somit die Aktivität der Transporter gleichzeitig bestimmt werden.

Die Zelllinie MDCK II BCRP bietet sich als idealer Part für eine Simultanbestimmung an, da sie sich durch das GFP, das an ABCG2 gekoppelt ist, im FACSCalibur™ zuordnen lässt.<sup>100</sup> In einer kleinen Versuchsreihe wurde geprüft, ob es möglich war, Substanzen gleichzeitig an den beiden Zelllinien MDCK II BCRP und MCF-7 MX, die beide ABCG2 enthalten, im Pheophorbid A Assay zu vermessen.

### 4.1.1 Gating-Strategie

Die Versuchsdurchführung erfolgte bis auf eine kleine Modifikationen wie in Kapitel 3.9.2 beschrieben. Bei der Simultanbestimmung wurden für jede Zelllinie 22.500 Zellen/Well benutzt. Die verwendete Gating-Methode ist in Abbildung 4-1 dargestellt. In der Hauptpopulation in Abbildung 4-1-A sind beide Zelllinien enthalten. Für die komplexere Gating-Strategie in Abbildung 4-1-B wurde der Umstand ausgenutzt, dass die MDCK II BCRP Zellen durch das gekoppelte GFP in Kanal FI1 eine Fluoreszenz zeigen (Q2: GFP+), während die MCF-7 MX Zellen dort keine Fluoreszenz aufweisen (Q3: GFP-). So lassen sich in Kanal FI1 die Fluoreszenzintensität von Pheophorbid A der beiden Populationen GFP+ und GFP- separat bestimmen und als Konzentrations-Effektkurven darstellen.



**Abbildung 4-1: Gating-Strategie im Pheophorbid A Simultan-Assay. A: Gate Hauptpopulation. B: Quadranten der Unterpopulationen Q2: GFP+ = MDCK II BCRP und Q3: GFP- = MCF-7 MX.**

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4-1: Ergebnisse für die Untersuchungen im Pheophorbid A Simultan-Assay und Einzel-Assay mit MDCK II BCRP und MCF-7 MX Zellen. Die gemittelten Werte ergeben sich aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 4-1-A: Ermittelte  $pIC_{50}$ -Werte mit Standardabweichungen.

	MDCK II BCRP		MCF-7 MX	
	Simultan-Assay	Einzel-Assay	Simultan-Assay	Einzel-Assay
	$pIC_{50} \pm SD$	$pIC_{50} \pm SD$	$pIC_{50} \pm SD$	$pIC_{50} \pm SD$
<b>XR9577</b>	6,74 ± 0,45	6,56 ± 0,30	6,44 ± 0,12	6,64 ± 0,47
<b>Ko143</b>	6,63 ± 0,08	6,57 ± 0,16	6,44 ± 0,06	6,44 ± 0,03 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Gemessen von Anne Pick.<sup>158</sup>

Tabelle 4-1-B: Ermittelte  $IC_{50}$ -Werte mit Standardabweichungen.

	MDCK II BCRP		MCF-7 MX	
	Simultan-Assay	Einzel-Assay	Simultan-Assay	Einzel-Assay
	$IC_{50} \pm SD$ [nmol/l]	$IC_{50} \pm SD$ [nmol/l]	$IC_{50} \pm SD$ [nmol/l]	$IC_{50} \pm SD$ [nmol/l]
<b>XR9577</b>	232 ± 178	308 ± 146	365 ± 66	299 ± 245
<b>Ko143</b>	239 ± 29	277 ± 68	365 ± 34	363 ± 17 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Gemessen von Anne Pick.<sup>158</sup>

In Tabelle 4-1 sind die erhaltenen Ergebnisse für die Zelllinien MDCK II BCRP und MCF-7 MX im Pheophorbid A Simultan-Assay und dem Einzel-Assay mit Pheophorbid A aufgeführt.

Die ermittelten  $pIC_{50}$ -Werte der beiden Zelllinien MDCK II BCRP und MCF-7 MX unterscheiden sich nicht. Abbildung 4-2 zeigt ein typisches Ergebnis dieser kleinen Testreihe. In Abbildung 4-2-A ist die Simultanmessung in Abbildung 4-2-B sind zwei Einzelmessungen dargestellt.

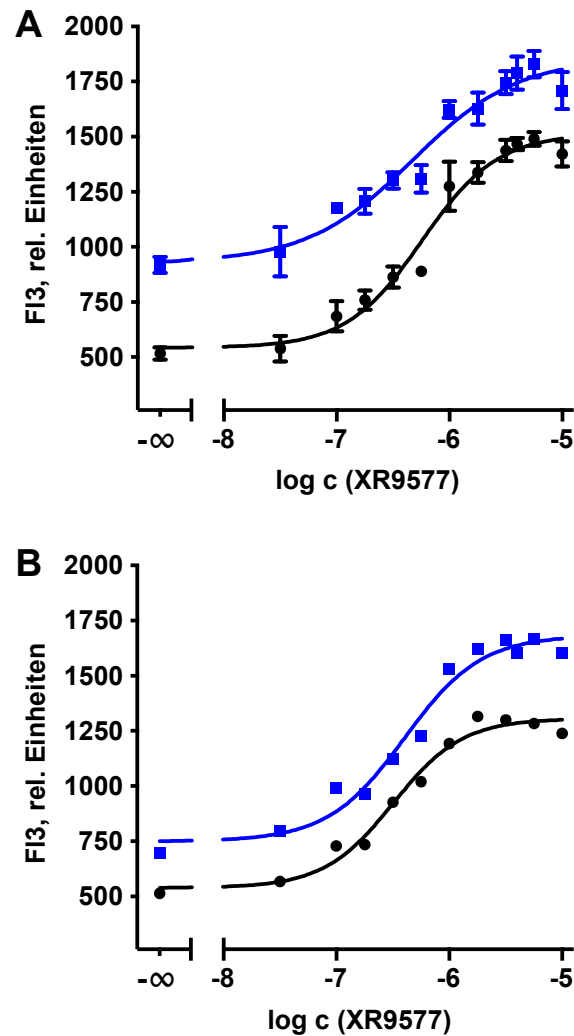


Abbildung 4-2: Konzentrations-Effektkurven im Pheophorbid A Assay mit XR9577. A: Simultanmessung MDCK II BCRP (●) und MCF-7 MX Zellen (■). B: Einzelmessungen: MDCK II BCRP (●) und MCF-7 MX Zellen (■).

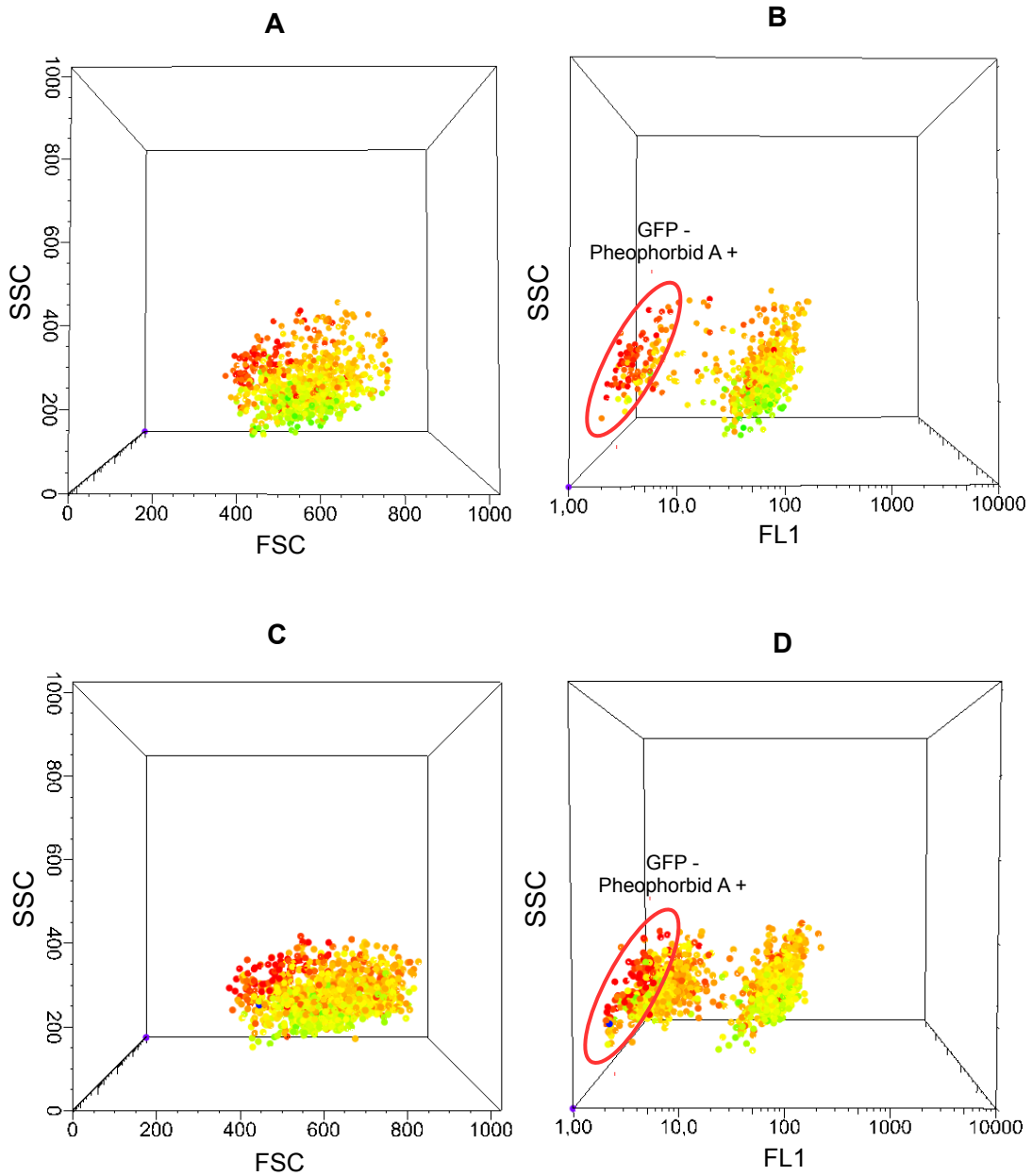
#### 4.1.2 Diskussion der Gating-Strategie

Die beiden Zelllinien MDCK II BCRP und MCF-7 MX unterschieden sich in den gemessenen Intensitäten der Fluoreszenzen, wie in Abbildung 4-2-B erkennbar. Die Zelllinie MCF-7 MX besitzt höhere Top- und Bottom-Werte. Dies könnte mit der unterschiedlichen Zellgröße in Zusammenhang stehen. Die MDCK II BCRP Zellen sind im Durchschnitt mit  $16,43 \mu\text{m} \pm 0,94$  kleiner als die MCF-7 MX Zellen mit  $18,95 \mu\text{m} \pm 0,50$ . So können die MCF-7 Zellen mehr Farbstoff aufnehmen und zeigen eine höhere Fluoreszenz.

Außerdem besteht bei der komplexeren Gating-Strategie eine zusätzliche mögliche Fehlerquelle, die im Folgenden näher erläutert wird.

Bei der Zelllinie MDCK II BCRP handelt es sich um eine stabil transfizierte Zelllinie, dennoch befinden sich in der Hauptpopulation dieser Zelllinie MDCK II BCRP Zellen, die kein GFP und damit auch kein ABCG2 enthalten. Diese Zellen werden der Population GFP- zugerechnet und sind in Abbildung 4-3-B markiert. Die markierten Zellen besitzen kein ABCG2, d.h. Pheophorbid A akkumuliert. In Abbildung 4-3-D sind diese Zellen in der MCF-7 MX Zellpopulation ohne GFP weiterhin erkennbar. Betrachtet man ausschließlich MCF-7 MX Zellen, hier nicht abgebildet, sind deutlich weniger Zellen ohne ABCG2 beobachtbar. Bei der Simultanmessung werden daher MDCK II BCRP ohne ABCG2 fälschlicherweise als MCF-7 MX Zellen mit hoher Pheophorbid A Konzentration identifiziert, da ihnen das ABCG2 fehlt, welches Pheophorbid A wieder aus den Zellen hinaustransportieren kann. In der Folge erhöht sich in der Simultanmessung der Bottom-Wert, während die Spanne zwischen Bottom und Top und die Steigung der Konzentrations-Effektkurve der MCF-7 MX Zellen kleiner werden. Über ein weiteres Gate ließen sich zwar bei aktivem ABCG2 Pheophorbid A positive Zellen abtrennen, allerdings ist dies bei inhibiertem ABCG2 nicht mehr möglich. Zudem können Zellen ohne ABCG2 bei jeder Zelllinie, die ohne Selektionsdruck kultiviert wird, auftreten. Um das Ergebnis also nicht weiter zusätzlich zu verzerren, wurde auf die Möglichkeit eines dritten Gates verzichtet. Außerdem zeigt sich bei den ermittelten  $pIC_{50}$ -Werten aus Tabelle 4-1 kein störender Einfluss durch die fälschlicherweise den MCF-7 MX Zellen zugeordneten MDCK II BCRP Zellen. Daher konnte diese Problematik vernachlässigt werden.

## 4 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4-3: 3D-Dotplot von MDCK II BCRP und MCF-7 MX Zellen ohne Modulator im Pheophorbid A Assay. Einfärbung für Pheophorbid A: Intensität zunehmend von grün (niedrig) nach rot (hoch). A und B: MDCK II BCRP Zellen, rot markiert: GFP negativ und Pheophorbid A positiv. C und D: MDCK II BCRP und MCF-7 MX Zellen rot markiert: GFP negativ und Pheophorbid A positiv.**

### 4.1.3 Schlussfolgerung

Abschließend lässt sich festhalten, dass es möglich ist, die beiden verschiedenen ABCG2-haltigen Zelllinien simultan zu vermessen. Damit lässt sich die Testung eines großen Satzes von Modulatoren einfacher und effizienter gestalten. Die Testung des gleichen Transporters in verschiedenen Zelllinien empfiehlt sich prinzipiell, um zelllinienspezifische Variationen und Einflüsse bei der Bestimmung der Aktivität von Testsubstanzen auszuschließen.

Da der Schwerpunkt dieser Arbeit jedoch im Weiteren nicht darauf ausgerichtet war große Datensätze zu produzieren, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

## 4.2 Rhod 4 AM Assay

Rhod 4 AM gehört wie Rhodamin 123 zu den Xanthenderivaten, besitzt aber wie Calcein AM eine Esterstruktur. Es wird wie Calcein AM als Calciumindikator eingesetzt.<sup>136</sup> Im Unterschied zu Rhodamin 123 reichert sich Rhod 4 im Zytosol und nicht im Mitochondrium an.<sup>128,159</sup> Die Esterstruktur ermöglicht, analog zu Calcein AM, ein schnelles Überwinden der Zellmembran. Obwohl Rhod 4 ein Exzitationsmaximum von 530 nm aufweist lässt es sich mit dem Argonlaser bei 488 nm anregen. Damit eignet es sich für die durchflusszytometrische Untersuchung. Die Fluoreszenzspektren sind in Abbildung 4-4 dargestellt.

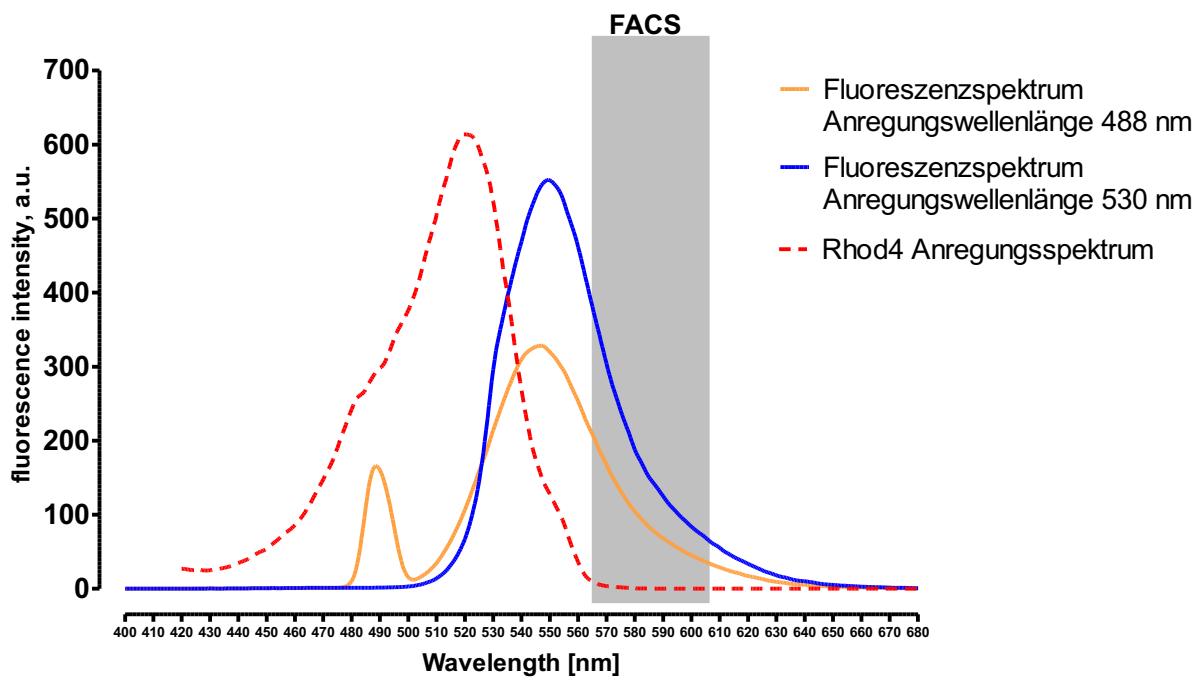


Abbildung 4-4: Fluoreszenzspektrum von Rhod 4 aufgenommen nach Esterhydrolyse.<sup>133</sup> In grau ist der mit dem FACSCalibur™ detektierte Wellenlängenbereich FI2 dargestellt.

Laut Lebedeva et al. soll es sich bei Rhod 4 AM um ein Substrat von ABCB1, ABCC1 und ABCG2 handeln.<sup>134</sup> Das wurde mit A2780 Wildtyp und A2780adr, H69AR und MCF-7 Wildtyp und MCF-7 MX Zelllinien überprüft.



### 4.2.1 Kinetik von Rhod 4 AM

Zunächst wurden Versuche am Microplatereader analog der Vorschrift des Calcein AM Assays, wie in Kapitel 3.7.2 beschrieben, durchgeführt. Diese führten allerdings zu keinen auswertbaren Ergebnissen. Daher wurden alle weiteren Untersuchungen mit Hilfe des FACSCalibur™ durchgeführt. Die Messung wurde zuerst in FACS-Teströhrchen durchgeführt. Zunächst wurden die A2780 Wildtyp, A2780adr, H69AR und MCF-7 Wildtyp und MCF-7 MX Zelllinien, wie in den Kapiteln 3.2.1 und 3.2.3 beschrieben, geerntet, mit KHP gewaschen und gezählt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml und mit den entsprechenden Inhibitoren bei 37 °C und 400 rpm im Wasserbad vor Licht geschützt für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen mit Rhod 4 AM versetzt und alle 5 Minuten vermessen. Zwischen den Messungen wurden die Proben bei 37 °C und 400 rpm geschüttelt und vor den Messungen kurz resuspendiert.

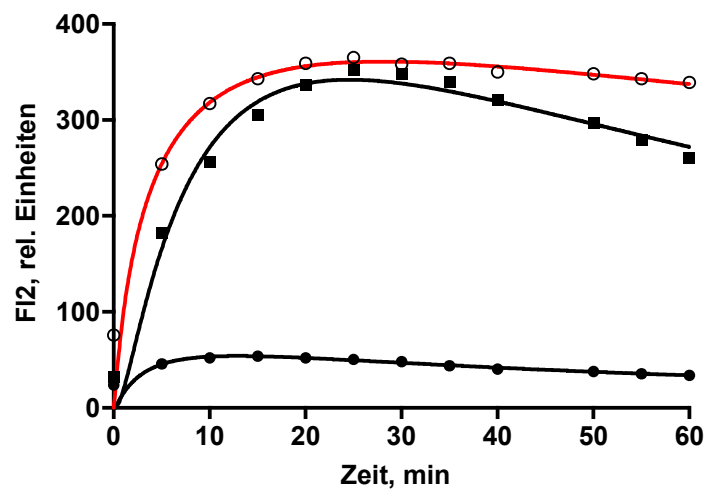


Abbildung 4-5: Aufnahmekinetik von 1,5 µmol/l Rhod 4 AM in der Zelllinie A2780 Wildtyp (○) und A2780adr (●) und A2780adr mit XR9577 1 µmol/l (■).

Abbildung 4-5 zeigt die Fluoreszenzkinetik von Rhod 4 AM in den Zelllinien A2780 Wildtyp und A2780adr. Zwischen der Wildtypzelllinie und der ungehemmten resistenten Zelllinie tritt ein deutlicher Fluoreszenzunterschied auf. Der Fluoreszenzverlauf der A2780 Wildtyp Zellen und der mit XR9577 gehemmten A2780adr Zellen unterscheidet sich kaum. Rhod 4 AM ist damit ein Substrat von

ABCB1. Nach 30 Minuten ist ein Maximum der Fluoreszenzzunahme erreicht, welches nach 40 Minuten vor allem in der inhibierten A2780adr Zelllinie wieder abnimmt. Dieser Umstand ist für die weitere Versuchsplanung am HTS wichtig, da die Messung dort ungefähr 15 Minuten in Anspruch nimmt.

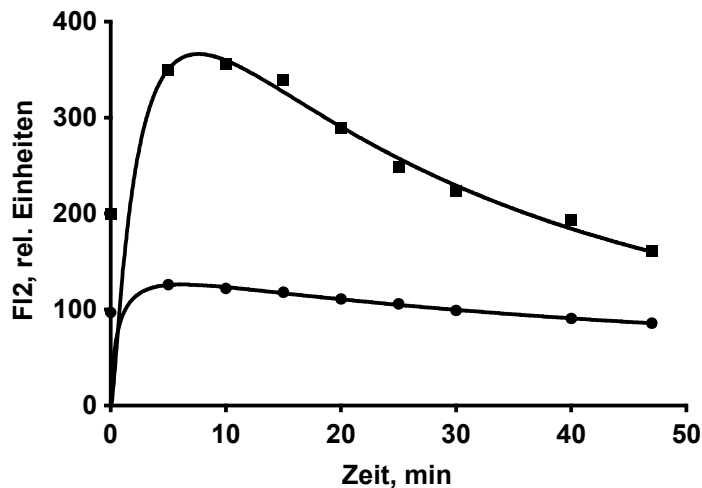


Abbildung 4-6: Aufnahmekinetik von 2 µmol/l Rhod 4 AM in der Zelllinie H69AR (●) und H69AR inhibiert mit SMS-A-50 10 µmol/l (■).<sup>160</sup>

In Abbildung 4-6 ist die Fluoreszenzkinetik für Rhod 4 AM in ABCC1 überexprimierenden H69AR Zellen dargestellt. Zwischen der gehemmten und ungehemmten resistenten Zelllinie ist der Fluoreszenzunterschied deutlich. Zu beobachten ist, dass nach 15 Minuten ein Maximum der Fluoreszenzzunahme erreicht ist und eine Abnahme der intrinsischen Fluoreszenz erfolgt. Möglicherweise wird auch das negativ geladene Rhod 4 nach der Spaltung, wie auch Calcein, durch ABCC1 wieder aus der Zelle herausgeschleust.<sup>118</sup>

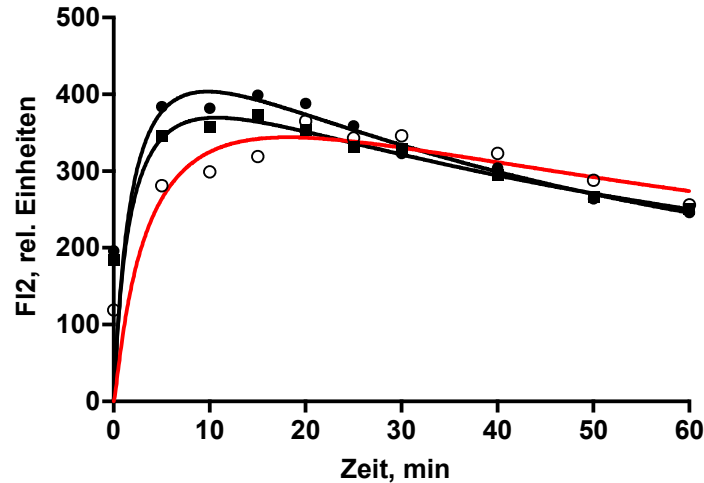


Abbildung 4-7: Aufnahmekinetik von 2  $\mu\text{mol/l}$  Rhod 4 AM in der Zelllinie MCF-7 Wildtyp (○), MCF-7 MX (●) und MCF-7 MX inhibiert mit XR9577 1  $\mu\text{mol/l}$  (■).

Abbildung 4-7 zeigt die Fluoreszenzkinetik von Rhod 4 AM in ABCG2 überexprimierenden Zellen. Zwischen der Wildtypzelllinie und der resistenten Zelllinie ist unter den gewählten Bedingungen kein Fluoreszenzunterschied erkennbar. Die Fluoreszenzintensität der MCF-7 Wildtyp Zellen und der mit XR9577 gehemmten MCF-7 MX Zellen unterscheidet sich ebenfalls nicht. Damit lässt sich nicht bestätigen, dass Rhod 4 AM ein Substrat von ABCG2 darstellt. Das deckt sich mit der Tatsache, dass auch weder das gut untersuchte Xanthenderivat Rhodamin 123 noch der Calciumindikator Calcein AM Substrate von ABCG2 darstellen.<sup>11,57</sup>

#### 4.2.2 HTS-fähiger Assay mit Rhod 4 AM für ABCB1

Aufgrund der Beobachtungen in Kapitel 4.2.1 wurde nur für die Zelllinien A2780 Wildtyp und A2780adr ein HTS-fähiger Assay entwickelt. Zunächst wurden die Versuche weiterhin in FACS-Teströhrchen durchgeführt. Neben der Inkubationszeit ist die eingesetzte Konzentration des Substrats ein wichtiger Parameter für weitere Versuche. Es wurden verschiedene Konzentrationen getestet. Dazu wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37 °C und 400 rpm im Wasserbad mit und ohne Modulator geschüttelt. Da die Fluoreszenz nach längerer Inkubation beim Wildtyp wieder abnahm, wurde die Inkubation nach 30 Minuten gestoppt. Dazu wurde der Überstand abzentrifugiert, die Zellen in eiskaltem PBS resuspendiert und bis zur Messung auf Eis gelagert.

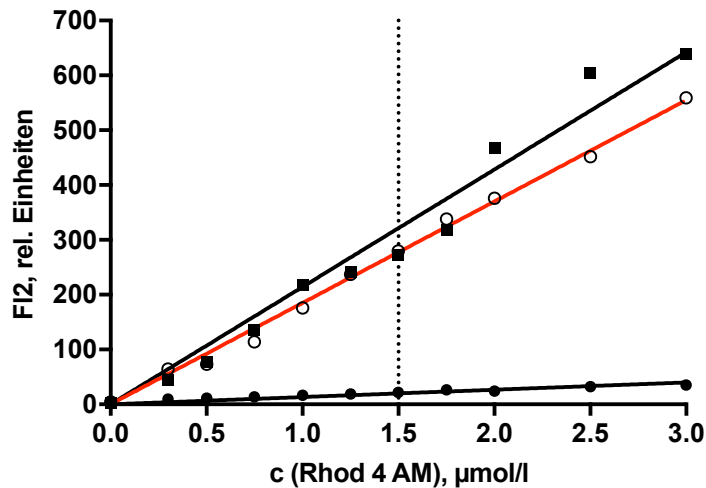


Abbildung 4-8: Konzentrationsabhängige Fluoreszenz von Rhod 4 AM in der Zelllinie A2780 Wildtyp (○) und A2780adr (●) und A2780adr inhibiert mit 1 µmol/l XR9577 (■).

Abbildung 4-8 zeigt die konzentrationsabhängige Fluoreszenzzunahme von Rhod 4 AM in A2780 Zellen. Die gemessenen Fluoreszenzwerte der eingesetzten Konzentrationen waren unter den gewählten Bedingungen linear. Es ergab sich ein Regressionskoeffizient von  $r^2=0,995$  für die Zelllinie A2780 Wildtyp, von  $r^2=0,970$  für die ungehemmte Zelllinie A2780adr und von  $r^2=0,975$  für die mit 1 µmol/l XR9577 gehemmte Zelllinie A2780adr. Die Proportionalität von Konzentration und Fluoreszenz war damit gewährleistet. Da für die weiteren Untersuchungen eine Konzentration gewählt werden sollte, die ein ausreichend starkes Signal lieferte aber auch wirtschaftlich war, wurden für weitere Versuche 1,5 µmol/l als Konzentration von Rhod 4 AM gewählt.

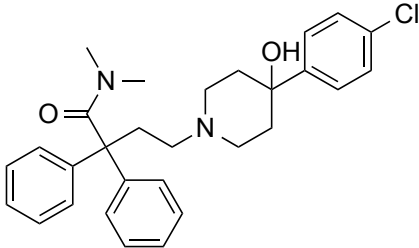
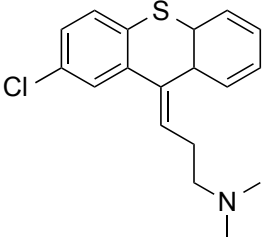
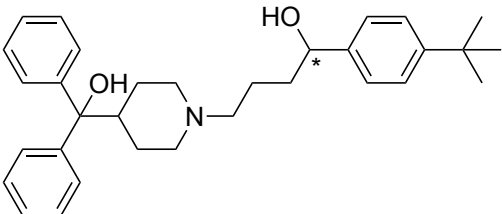
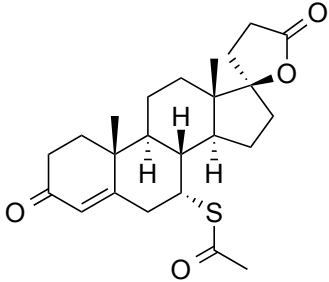
Zur Umstellung des Rhod 4 AM-Assays von Rörchen auf einen HTS-fähigen Assay wurden aufgrund der erhaltenen Ergebnisse folgende Bedingungen aufgestellt:

- Inkubationszeit 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>
- Eingesetzte Konzentration von Rhod 4 AM von 1,5 µmol/l
- nach der Inkubationszeit Resuspension der Zellsuspension in der Mikrotiterplatte auf Eis und direkt anschließender Messung

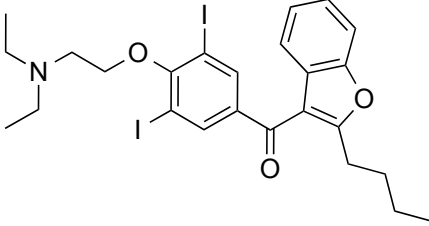
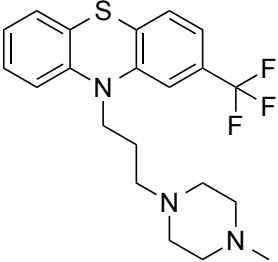
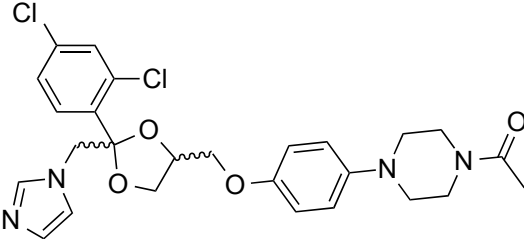
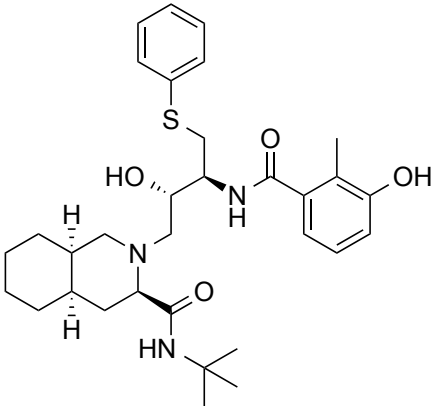
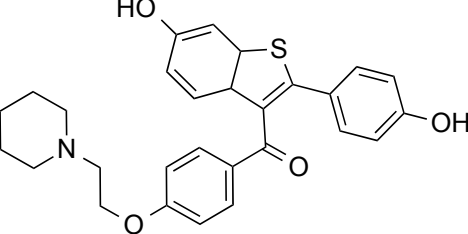
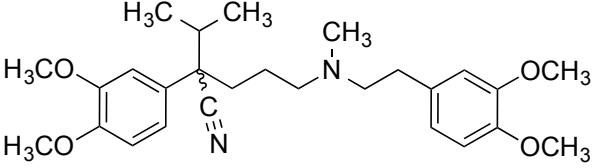
### 4.2.3 Untersuchung bekannter ABCB1 Inhibitoren

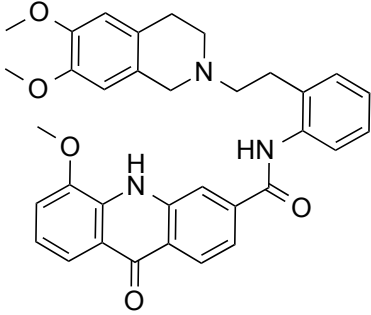
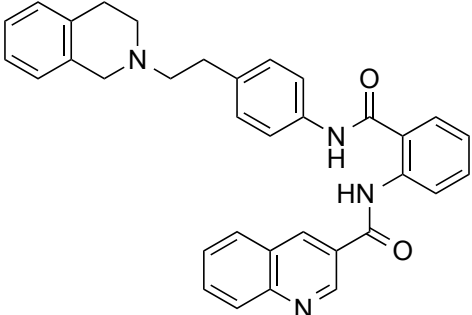
Für die Etablierung des Assays wurden einige strukturell verschiedene Arzneistoffe untersucht, von denen bekannt ist, dass sie mit ABCB1 interagieren. Diese wurden im Rhod 4 AM Assay, Calcein AM Assay und Rhodamin 123 Assay untersucht und die erhaltenen Ergebnisse miteinander verglichen. Die Strukturformeln der untersuchten Arzneistoffe sind in Tabelle 4-2 aufgeführt.

Tabelle 4-2: Strukturformeln der untersuchten Arzneistoffe.

Verbindung	Strukturformel
Loperamid	
Chlorprothixen	
Terfenadin	
Spirolacton	

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Verbindung	Strukturformel
Amiodaron	
Trifluoperazin	
Ketoconazol	
Nelfinavir	
Raloxifen	
Verapamil	

Verbindung	Strukturformel
Elacridar	
XR9577	

Die Aktivitätswerte der ausgewählten ABCB1 Modulatoren wurden mit der Zelllinie A2780adr ermittelt. Die Ergebnisse sind Tabelle 4-3 aufgelistet.

**Tabelle 4-3: Ergebnisse für die Untersuchungen mit Rhod 4 AM Assay, Calcein AM Assay und Rhodamin 123 Assay an A2780adr Zellen. n.b. = nicht bestimmbar.**

**Tabelle 4-3-A: Ermittelte pIC<sub>50</sub>-Werte mit Standardabweichungen.**

Verbindung	Rhod 4 AM Assay	Calcein AM Assay	Rhodamin 123 Assay
	pIC <sub>50</sub> ± SD	pIC <sub>50</sub> ± SD	pIC <sub>50</sub> ± SD
Loperamid	5,38 ± 0,22	5,57 ± 0,03	5,61 ± 0,12
Chlorprothixen	n.b.	4,84 ± 0,16*	n.b.
Terfenadin	5,51 ± 0,22	5,56 ± 0,09	5,55 ± 0,06
Spirolacton	5,04 ± 0,15	5,06 ± 0,04	4,75 ± 0,21
Amiodaron	6,15 ± 0,45	6,05 ± 0,12	5,98 ± 0,10
Mefloquin	5,77 ± 0,07	5,33 ± 0,14*	n.b.
Trifluoperazin	5,59 ± 0,16*	5,57 ± 0,14	5,22 ± 0,20
Ketoconazol	5,55 ± 0,29	5,44 ± 0,09	n.b.
Nelfinavir	5,43 ± 0,16	5,38 ± 0,02	n.b.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Verbindung	Rhod 4 AM Assay	Calcein AM Assay	Rhodamin 123 Assay
	$pIC_{50} \pm SD$	$pIC_{50} \pm SD$	$pIC_{50} \pm SD$
Raloxifen	$5,34 \pm 0,27$	$5,24 \pm 0,08$	$4,87 \pm 0,10$
Verapamil	$5,75 \pm 0,15$	$5,52 \pm 0,14$	$5,65 \pm 0,06$
Elacridar	$6,73 \pm 0,33$	$6,66 \pm 0,39$	$6,42 \pm 0,02$
XR9577	$6,59 \pm 0,20$	$6,74 \pm 0,24$	$6,46 \pm 0,29$

\* auf XR9577 gefittet.

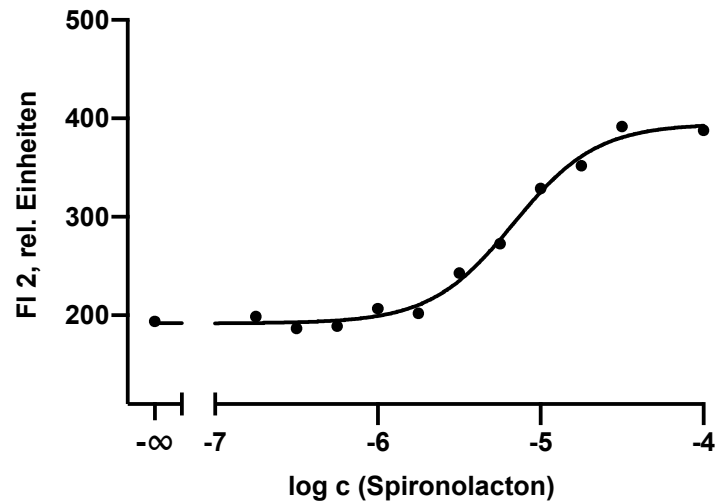
**Tabelle 4-3-B: Ermittelte  $IC_{50}$ -Werte mit Standardabweichungen.**

Verbindung	Rhod 4 AM Assay	Calcein AM Assay	Rhodamin 123 Assay
	$IC_{50} \pm SD$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$IC_{50} \pm SD$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$IC_{50} \pm SD$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]
Loperamid	$4,41 \pm 1,51$	$2,69 \pm 0,12$	$2,45 \pm 0,46$
Chlorprothixen	n.b.	$14,9 \pm 3,7^*$	n.b.
Terfenadin	$3,27 \pm 1,12$	$2,78 \pm 0,38$	$2,83 \pm 0,26$
Spirolacton	$9,36 \pm 2,16$	$8,73 \pm 0,53$	$18,7 \pm 6,1$
Amiodaron	$0,894 \pm 0,689$	$0,906 \pm 0,166$	$1,06 \pm 0,16$
Mefloquin	$1,71 \pm 0,18$	$4,78 \pm 1,03^*$	n.b.
Trifluoperazin	$2,65 \pm 0,65^*$	$2,75 \pm 0,59$	$6,31 \pm 1,96$
Ketoconazol	$3,11 \pm 1,44$	$3,67 \pm 0,50$	n.b.
Nelfinavir	$3,84 \pm 0,94$	$4,17 \pm 0,13$	n.b.
Raloxifen	$4,97 \pm 2,13$	$5,80 \pm 0,71$	$13,7 \pm 2,1$
Verapamil	$1,83 \pm 0,42$	$3,09 \pm 0,66$	$2,25 \pm 0,21$
Elacridar	$0,233 \pm 0,174$	$0,261 \pm 0,169$	$0,380 \pm 0,012$
XR9577	$0,269 \pm 0,084$	$0,194 \pm 0,073$	$0,382 \pm 0,177$

\* auf XR9577 gefittet.

Interessanterweise lassen sich Mefloquin, Ketoconazol und Nelfinavir im Rhodamin 123 Assay nicht vermessen. Chlorprothixen lässt sich sowohl im Rhod 4 AM Assay und Rhodamin 123 Assay nicht eindeutig bestimmen.





**Abbildung 4-9: Konzentrations-Effektkurve von Spironolacton im Rhod 4 AM Assay an A2780adr Zellen.**

In Abbildung 4-9 ist exemplarisch eine typische Konzentrations-Effektkurve die mit dem Rhod 4 AM Assay ermittelt wurde für Spironolacton abgebildet.

Die Korrelationen der ermittelten  $pIC_{50}$ -Werte der verschiedenen Assays sind in Abbildung 4-10 dargestellt. Die quadrierten Korrelationskoeffizienten betragen für Rhod 4 AM und Calcein AM  $r^2=0,902$ , für Rhod 4 AM und Rhodamin 123  $r^2=0,874$  und für Rhodamin 123 und Calcein AM  $r^2=0,906$ .

## 4 Ergebnisse und Diskussion

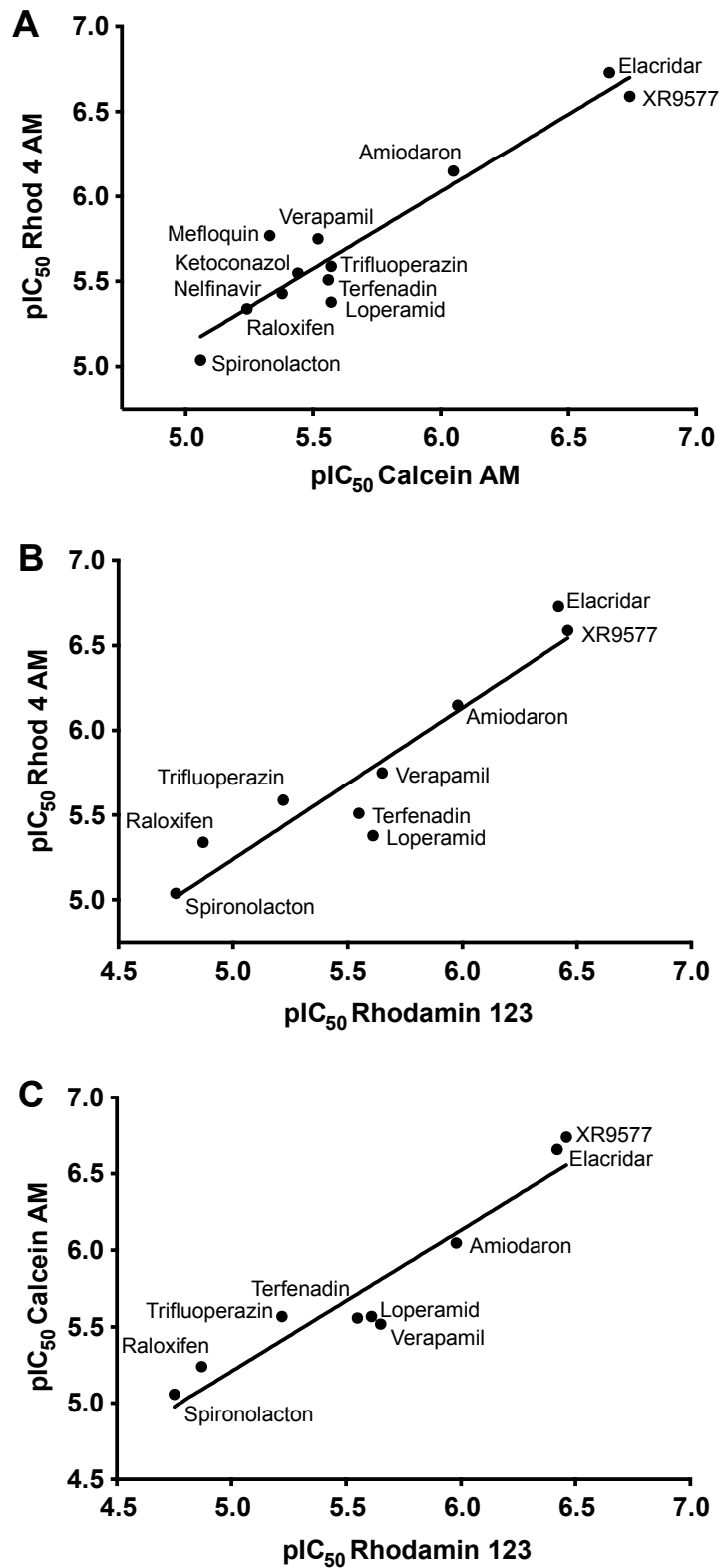


Abbildung 4-10: Korrelation der ermittelten pIC<sub>50</sub>-Werte. A: Rhod 4 AM Assay mit Calcein AM Assay,  $r^2=0,902$ . B: Rhod 4 AM Assay mit Rhodamin 123 Assay,  $r^2=0,874$ . C: Calcein AM Assay mit Rhodamin 123 Assay,  $r^2=0,906$ .

### 4.2.4 Schlussfolgerung

Trotz anders lautender Literatur ist Rhod 4 AM im Rahmen dieser Untersuchungen kein Substrat von ABCG2. Es kann aber zur Charakterisierung von ABCB1 und ABCC1 eingesetzt werden.

Für ABCB1 ließ sich ein HTS-fähiger Assay mit dem Substrat Rhod 4 AM für das FACSCalibur™ entwickeln, der sich ebenso wie Calcein AM und Rhodamin 123 zur funktionellen Untersuchung von ABCB1 Modulatoren eignet. Das neue Testsystem lieferte dabei vergleichbare Ergebnisse zu den bereits bekannten Messmethoden.

### 4.2.5 Untersuchung mit dem konfokalen Lasermikroskop

Mit Hilfe des konfokalen Lasermikroskops wurde die Aufnahme von Rhod 4 AM in den lebenden Zelllinien A2780 Wildtyp und A2780adr Zellen aufgezeichnet. Die Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Thomas Ross, Arbeitskreis Prof. Dr. Bendas, durchgeführt. Es wurde bereits am FACSCalibur™ gezeigt, dass ABCB1 in der Lage ist Rhod 4 AM aus den Zellen hinauszupumpen. Diese Beobachtung konnte wie in Abbildung 4-11 dargestellt mit dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop bestätigt werden. Der Unterschied in der Fluoreszenzzunahme zwischen den Zelllinien A2780 Wildtyp und A2780adr ist deutlich erkennbar. Außerdem konnte beobachtet werden, dass durch die Zugabe von 10 µmol/l des ABCB1 Inhibitors XR9577 die Fluoreszenz in der Zelllinie A2780adr zunimmt. Der Unterschied der Fluoreszenzintensität kann damit auf die Tätigkeit des Transporters ABCB1 zurückgeführt werden, der Rhod 4 AM aktiv aus der Zelle ausschleusen kann. Es konnte somit auch mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops gezeigt werden, dass Rhod 4 AM ein Substrat von ABCB1 ist.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

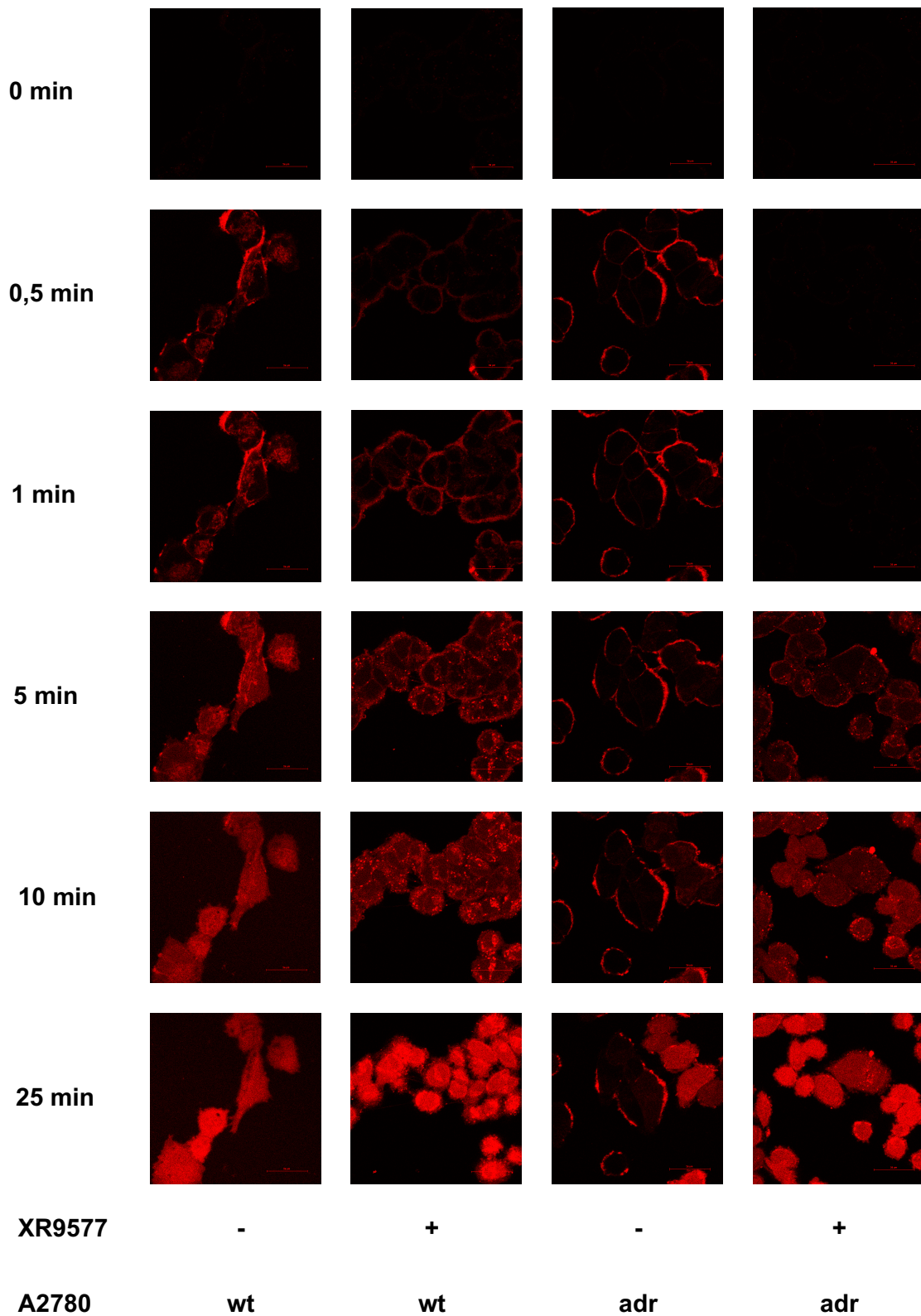


Abbildung 4-11: Aufnahme von Rhod 4 AM, 1,5  $\mu\text{mol/l}$ , in die Zelllinien A2780 Wildtyp (wt) und A2780adr (adr) in Abwesenheit (-) oder Anwesenheit (+) des Modulators XR9577, 10  $\mu\text{mol/l}$ , bei Raumtemperatur.

### 4.3 Funktionelle Charakterisierung der PLB-985 Zelllinie

Die Suspensionszelllinien PLB-985 Wildtyp und PLB-985 ABCG2 wurden uns freundlicherweise von Dr. Csilla Özvegy-Laczka (Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Ungarn) zur Verfügung gestellt und im Laufe dieser Arbeit in unserem Arbeitskreis eingeführt. Die humane Zelllinie PLB-985 wurde bereits 1985 kultiviert, charakterisiert und etabliert.<sup>101</sup> Die Zellen entstammen einer 38-jährigen Patientin mit Akuter Myeloischer Leukämie. Phänotypisch handelt es sich bei den PLB-985 Zellen um maligne Myelomonoblasten.<sup>101</sup> Ujhelly et al. etablierten 2003 die transfizierte Zelllinie PLB-985 ABCG2.<sup>102</sup> Die PLB-985 Wildtyp Zellen wurden dazu retroviral transfiziert und anschließend mit Mitoxantron selektiert. Die Selektion führte zu einer Induktion der Granulozytenreifung.<sup>102</sup> Die PLB-985 ABCG2 Zellen exprimieren ABCG2 in einem ähnlichen Ausmaß wie die Zelllinie MCF-7 MX und zeigen sich im Vergleich zu der Wildtyp Zelllinie resistenter gegenüber steigender Mitoxanthronexpositionen.<sup>102,161</sup> Die Zelllinie PLB-985 eignet sich außerordentlich gut für die Charakterisierung von Verbindungen im 5D3-Shift Assay.<sup>141</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, ob sich die Zelllinien PLB-985 Wildtyp und PLB-985 ABCG2 auch für den Einsatz in den funktionellen Assays Hoechst 33342 Assay und Pheophorbid A Assay eignen. Es wurde eine Testreihe mit verschiedenen Verbindungen im Hoechst 33342 Assay und Pheophorbid A Assay durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-4 aufgeführt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 4-4: pIC<sub>50</sub>-Werte und IC<sub>50</sub>-Werte mit Standardabweichungen von WK- und KS-Verbindungen mit PLB-985 ABCG2 Zellen im Hoechst 33342 Assay und Pheophorbid A Assay.**

Verbindung	Hoechst 33342 Assay		Pheophorbid A Assay	
	pIC <sub>50</sub> ± SD	IC <sub>50</sub> ± SD [µmol/l]	pIC <sub>50</sub> ± SD	IC <sub>50</sub> ± SD [µmol/l]
WK-X-19	5,16 ± 0,15*	7,10 ± 1,64*	5,37 ± 0,07*	4,29 ± 0,46*
XR9577	6,24 ± 0,19	0,600 ± 0,177	6,55 ± 0,25	0,303 ± 0,119
WK-X- 23	5,02 ± 0,02*	9,55 ± 0,29	5,13 ± 0,02*	7,42 ± 0,23*
WK-X-36	5,94 ± 0,24	1,23 ± 0,46	6,05 ± 0,17	0,921 ± 0,242
WK-X-25	5,51 ± 0,27*	3,36 ± 1,44	5,49 ± 0,13	3,30 ± 0,66
WK-X-38	5,31 ± 0,03	4,90 ± 0,22	-	-
WK-X-41	5,67 ± 0,07	2,15 ± 0,23	-	-
WK-X-18	4,98 ± 0,02*	10,5 ± 0,3*	4,96 ± 0,01*	11,0 ± 0,2*
WK-X-32	5,48 ± 0,13	3,38 ± 0,67	5,35 ± 0,11*	4,53 ± 0,76*
WK-X-29	5,71 ± 0,06	1,96 ± 0,18	-	-
WK-X-34	5,75 ± 0,03	1,78 ± 0,08	-	-
WK-X-75	5,91 ± 0,15	1,26 ± 0,29	-	-
WK-X-7	4,66 ± 0,09*	22,1 ± 3,0	-	-
WK-X-9	4,69 ± 0,01*	20,4 ± 0,3*	-	-
WK-X-27	5,78 ± 0,09	1,68 ± 0,23	-	-
KS-144	5,15 ± 0,07*	7,12 ± 0,44	-	-

\* gefittet auf Top XR9577

Die erhaltenen pIC<sub>50</sub>-Werte wurden mit denen der MDCK II BCRP-Zelllinie (vgl. Tabelle 4-17) korreliert. Die ermittelten Regressionsgeraden sind in Abbildung 4-12 abgebildet. Die beiden Zelllinien MDCK II BCRP und PLB-985 ABCG2 liefern mit den Korrelationskoeffizienten von  $r^2 = 0,973$  im Hoechst 33342 Assay und  $r^2 = 0,931$  im Pheophorbid A Assay vergleichbare Ergebnisse. Der Vergleich der Steigungen mit  $m = 0,95 \pm 0,04$  (95 % Konfidenzintervall: 0,86 – 1,04) im Hoechst 33342 Assay und  $m = 0,82 \pm 0,10$  (95 % Konfidenzintervall: 0,56 – 1,08) im Pheophorbid A Assay lässt keine signifikante Abweichung zwischen den Zelllinien erkennen.

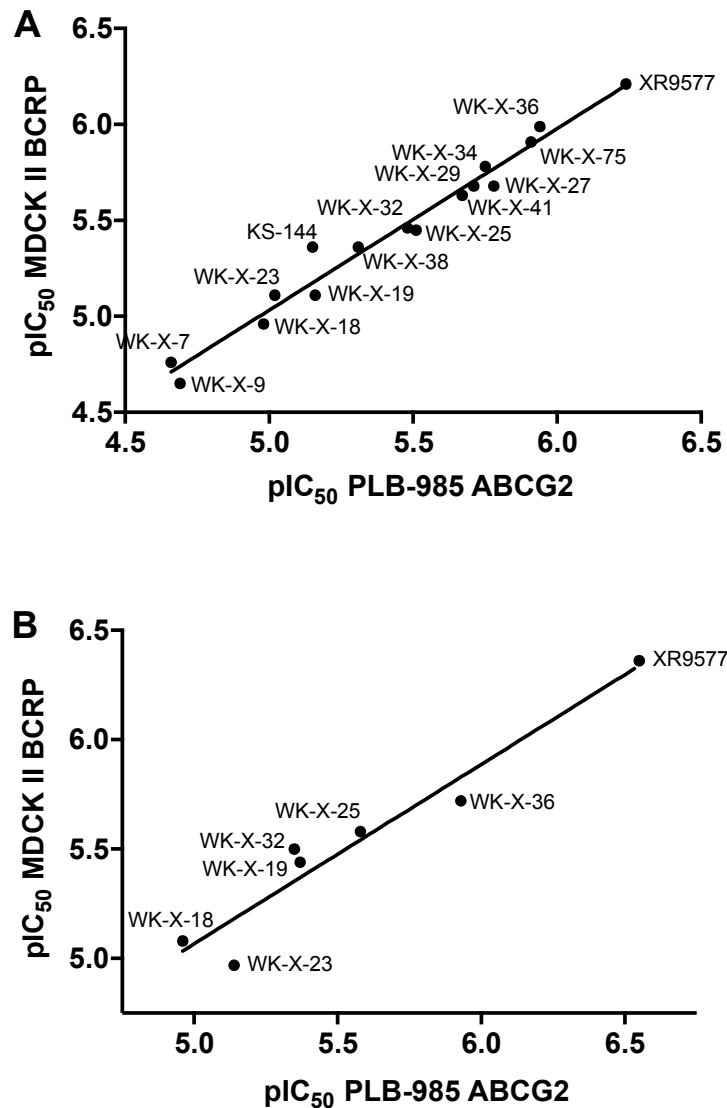


Abbildung 4-12: Lineare Regression der pIC<sub>50</sub>-Werte der PLB-985 ABCG2 und MDCK II BCRP Zelllinien. A: Hoechst 33342 Assay,  $r^2 = 0,973$ . B: Pheophorbid A Assay,  $r^2 = 0,931$ .

Vergleicht man die sigmoidalen Konzentrations-Effektkurven der MDCK II BCRP und PLB-985 ABCG2 Zelllinien im Hoechst 33342 Assay und Pheophorbid A Assay in Abbildung 4-13, kann man Unterschiede in der Fluoreszenzintensität der Zelllinien beobachten, d.h. es treten unterschiedliche Top und Bottom-Werte in den Kurven der Assays auf. Das kann durch die unterschiedliche Zellgröße der verwendeten Zelllinien bedingt sein. Die mit Hilfe des CASY® 1 Model TT bestimmte mittlere Größe der MDCK II BCRP Zellen beträgt  $16,43 \mu\text{M} \pm 0,93$  und die der PLB-985 ABCG2 Zellen beträgt  $11,89 \mu\text{M} \pm 0,44$ . Erkennbar ist die unterschiedliche Zellgröße auch in der unterschiedlichen Lage der Zellen im FSC-SSC-Plot am FACSCalibur™ (hier nicht abgebildet). Die Lage der Zellen auf der FSC-Achse

entspricht ihrer relativen Größe. Abbildung 4-13 zeigt exemplarisch die sigmoidalen Konzentrations-Effektcurve in den Zelllinien MDCK II BCRP und PLB-985 ABCG2 von XR9577 im Pheophorbid A Assay.

Da bei den MDCK II BCRP und den PLB-985 ABCG2 Zellen sowohl im Hoechst 33342 Assay als auch im Pheophorbid A Assay die Differenz zwischen den Top- und Bottom-Werten der Konzentrations-Effektkurven gleich groß ist, ist davon auszugehen, dass die beiden Zelllinien ABCG2 in ähnlichem Ausmaß exprimieren.

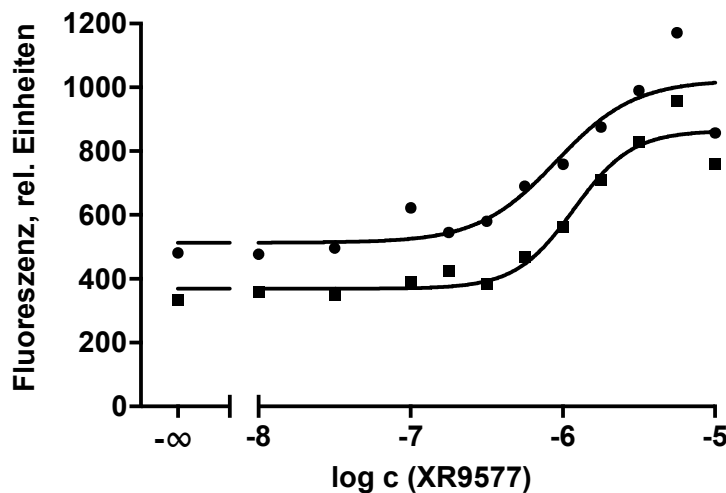


Abbildung 4-13: MDCK II BCRP (●) Zellen und PLB-985 ABCG2 (■) im Pheophorbid A Assay mit XR9577.

Im Calcein AM Assay zeigen die PLB-985 Wildtyp und PLB-985 ABCG2 Zellen die gleiche Steigung. Diese kann auch in der gleichen Größenordnung bei der Zelllinie A2780 Wildtyp beobachtet werden. Die Steigung lässt sich durch ansteigende Modulatorkonzentrationen von XR9577 nicht beeinflussen. Die Zelllinien PLB-985 und PLB-985 ABCG2 exprimieren also weder ABCB1 noch ABCC1 in einem die Assays störenden Ausmaß.

Die Zelllinie MDCK II enthält dagegen nativ die caninen ABC-Transporter ABCB1, ABCC1 und ABCC2, welche von Goh et al. auch funktionell nachgewiesen werden konnten.<sup>162</sup> Humanes ABCB1 und canines ABCB1 zeigen eine Übereinstimmung von 78 %. Trotz dieser Übereinstimmung kann canines ABCB1 nicht mit dem An-



tikörper MRK-16, welcher gegen das humane ABCB1 gerichtet ist, detektiert werden.<sup>158</sup> Da Hoechst 33342 ein Substrat für ABCG2 und für ABCB1 ist, kann es von beiden Transportern, dem humanen ABCG2 und dem caninen ABCB1, aus den Zellen hinaus transportiert werden. Pheophorbid A dagegen ist kein Substrat von ABCB1.

Ein Vorteil der PLB-985 Zellen ist, dass es sich bei ihnen um Suspensionszellen handelt. Das vereinfacht sowohl die Abläufe während der Kultivierung der Zellen, als auch die Versuchsvorbereitungen. Außerdem heften sich die Zellen während der Inkubationszeit von 2 h nicht am Boden der Wells an. Dies ist bei Messungen am FACSCalibur™ sehr vorteilhaft.

Aus den Untersuchungen lässt sich also zusammenfassend feststellen, dass die Zelllinien PLB-985 Wildtyp und PLB-985 ABCG2 für die Untersuchung von ABCG2 in funktionellen Assays und für die Charakterisierung von Testsubstanzen sehr gut geeignet ist.

#### 4.4 Charakterisierung von DCFH-DA an ABCG2

DCFH-DA (2',7'-Dichlorfluorescein-diacetat oder 2',7'-Dichlordihydrofluorescein-diacetat) ist eine nichtfluoreszierende, reduzierte Form des Fluoresceins.<sup>163</sup> Es wird als Indikator für reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in Zellen verwendet.<sup>164–167</sup> DCFH-DA kann durch die Zellmembran diffundieren und wird in der Zelle durch intrazelluläre Esterasen zum nichtfluoreszierenden DCFH (2',7'-Dichlorfluorescein oder 2',7'-Dichlordihydrofluorescein) gespalten. DCFH kann die Zellmembran nicht mehr passiv überwinden und wird durch ROS zum fluoreszierenden DCF (2',7'-Dichlorfluorescein) oxidiert. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 4-14 dargestellt.<sup>168</sup> Die Arbeitsgruppe um Prochazkova et al. beschreibt, dass DCFH von ABCG2 transportiert wird.<sup>169</sup>

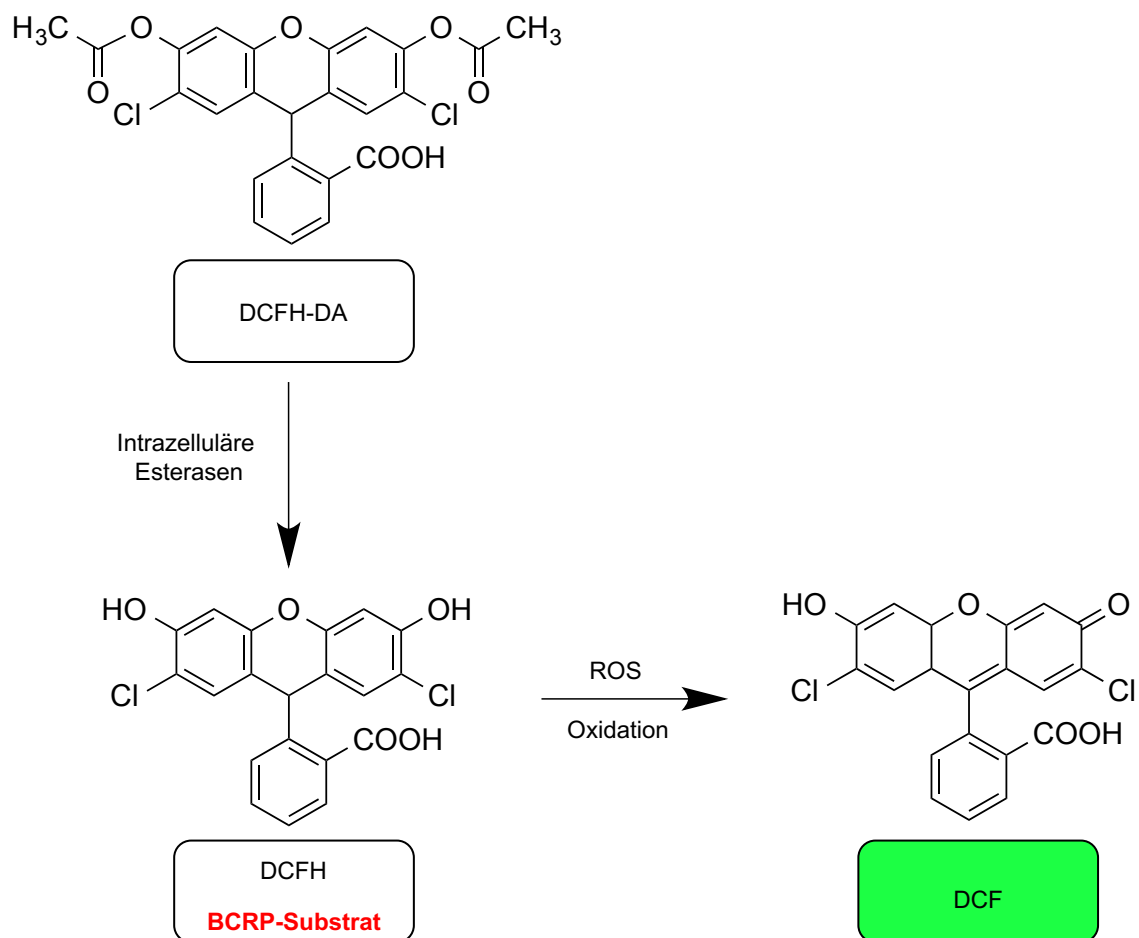


Abbildung 4-14: Reaktionsschema der Spaltung und Oxidation vom nichtfluoreszierenden DCFH-DA zum fluoreszierenden DCF.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, ob zutrifft, dass DCFH ein Substrat für ABCG2 darstellt und inwieweit es sich für einen HTS-fähigen Assay eignet. Für die Versuche wurden die Zelllinien PLB-985 Wildtyp, PLB-985 ABCG2, MDCK II Wildtyp und MDCK II BCRP ausgewählt. DCF besitzt ein Exzitationsmaximum von 495 nm und ein Emissionsmaximum von 529 nm. Es konnte somit am Fluoreszenzreader bei 485 nm angeregt und bei 520 nm vermessen werden.

### 4.4.1 Voruntersuchungen

Die Versuche wurden zunächst in Anlehnung an den Hoechst 33342 Assay, beschrieben in Kapitel 3.6, mit einer kleinen Modifikation durchgeführt. So wurden 45.000 Zellen/Well verwendet. Die Konzentration des eingesetzten DCFH-DA lag zwischen 1  $\mu\text{mol/l}$  und 10  $\mu\text{mol/l}$ .

Für die Messung am Fluoreszenzreader wurden die unten aufgeführten Einstellungen benutzt.

---

<b>Einstellung der Fluoreszenzreader</b>	
Scan-Modus	Plate
Messrichtung der Mikrotiterplatte	Horizontal
Temperatur	37 °C
Exzitationswellenlänge	485 nm
Emissionswellenlänge	520 nm
Anzahl der Zyklen	120
Zyklusdauer	60 s
Anzahl der Lichtblitze	10 s <sup>-1</sup>
Intervallzeit zwischen zwei Reihen	0,2 s
Required Value	20 %
Gain FLUOstar	1800
Gain POLARstar	15
Schütteln	30 sec vor Beginn

---

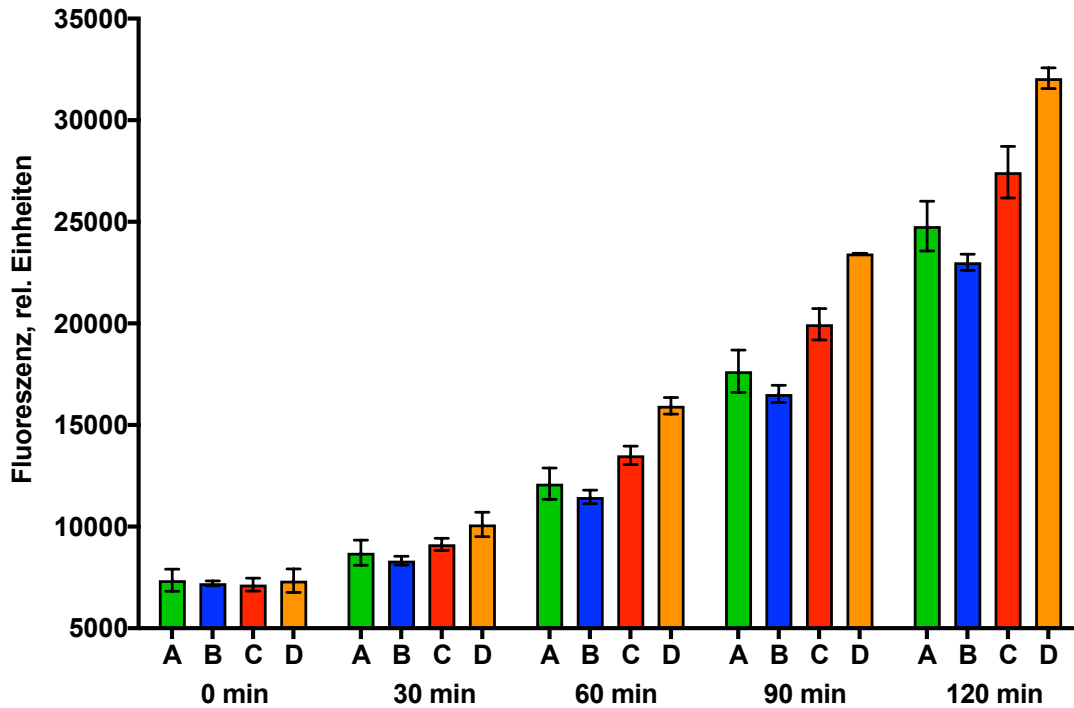


Abbildung 4-15: Fluoreszenz der PLB-985 ABCG2 Zellen mit DCFH-DA 1 µmol/l und verschiedenen Konzentrationen des Modulators XR9577 (A: 0 µmol/l, B: 0,1 µmol/l, C: 1 µmol/l, D: 10 µmol/l) zum Zeitpunkt 0, 30, 60, 90 und 120 Minuten nach Messbeginn.

Abbildung 4-15 zeigt den Fluoreszenzanstieg von DCF in der Zelllinie PLB-985 ABCG2 mit 1 µmol/l DCFH-DA über die Zeit. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität tritt in Abhängigkeit von der Zeit in allen Proben auf. Wird ABCG2 gehemmt ist die Fluoreszenzzunahme stärker ausgeprägt.

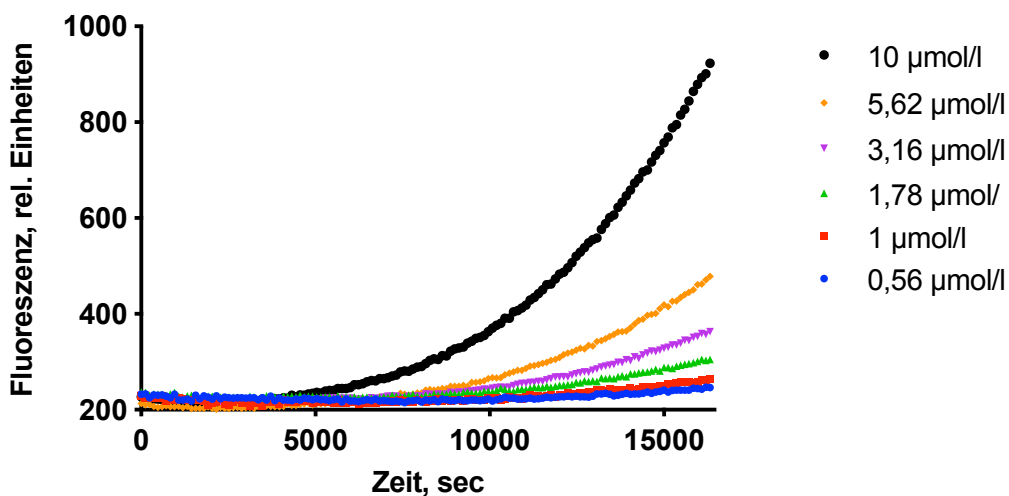


Abbildung 4-16: Fluoreszenzanstieg von DCFH-DA in verschiedenen Konzentrationen über einen Zeitraum von 16.080 Sekunden in KHP ohne Zellen.

Um die Stabilität des Farbstoffs zu untersuchen, wurde eine Messung im Fluoreszenzreader in KHP über einen Zeitraum von 16.080 Sekunden ohne Zellen durchgeführt. Die erhaltene Kinetik ist in Abbildung 4-16 abgebildet. Es wird deutlich, dass DCFH-DA nicht stabil ist. Lediglich bis zu 5.040 Sekunden ist der Substanz für alle eingesetzten Konzentrationen beständig. Daher wurde für alle weiteren Untersuchungen nur das Zeitfenster von 300-5.040 Sekunden berücksichtigt.

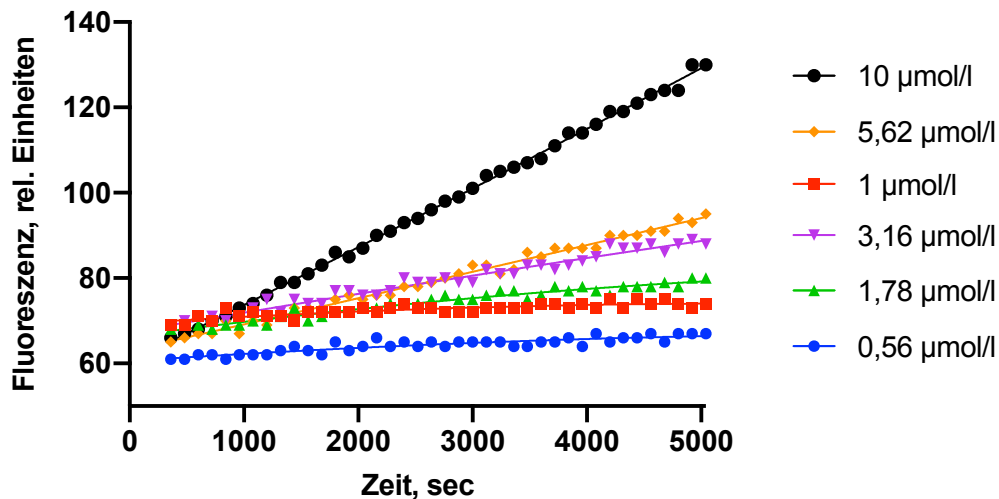


Abbildung 4-17: Verschiedene Konzentrationen DCFH-DA in MDCK II BCRP Zellen gemessen über den Zeitraum 360-5.040 Sekunden.

Es stellte sich die Frage, mit welcher mathematischen Gleichung die aufgenommene Kinetik beschrieben werden kann. Die Kinetik in den MDCK II BCRP Zellen in Abbildung 4-17 scheint zunächst linear zu sein. Betrachtet man dann jedoch die Fluoreszenzkinetik in der Zelllinie PLB-985 ABCG2 in Abbildung 4-18 ist ein linearer Zusammenhang nicht mehr zutreffend. Da die Fluoreszenz von DCFH-DA multifaktoriell ist, ist dies nicht weiter erstaunlich.

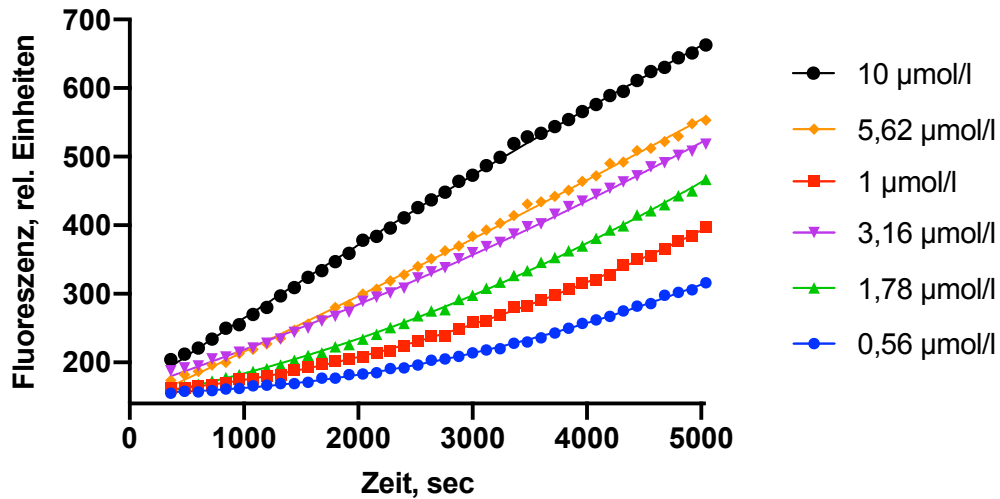


Abbildung 4-18: Messung verschiedener Konzentrationen DCFH-DA in PLB-985 ABCG2 Zellen dargestellt über den Zeitraum 360-5040 Sekunden

Mit Hilfe von Residuen wurde entschieden, welches mathematische Modell geeignet ist, die Fluoreszenzkinetik von DCFH-DA zu beschreiben. Die Residuenanalyse bedient sich der grafischen Darstellung als Diagnoseinstrument zur Modellverbesserung. Erkennbar sind unter anderem systematische Abweichungen und Streubreite des für die Beschreibung der Daten gewählten mathematischen Modells.<sup>170</sup> Als mathematische Modelle wurden die lineare Regression (Polynom 1. Ordnung), das Polynom 2. Ordnung und die exponentielle Wachstums-Gleichung mit Hilfe des Programms GraphPad Prism<sup>®</sup> 6.0 miteinander verglichen.

#### Formel 4-1: Polynome Allgemeine Formel

$$P(x) = b_0 + b_1x + b_2x^2 + b_3x^3 + b_4x^4 + \dots + b_nx^n$$

Das Polynom summiert die Vielfachen von Potenzen einer Variablen.<sup>156</sup> In Abbildung 4-19 sind die Residuen für die lineare Regression, das Polynom 2. Ordnung und die exponentielle Wachstums-Gleichung für die Zelllinie PLB-985 ABCG2 abgebildet.

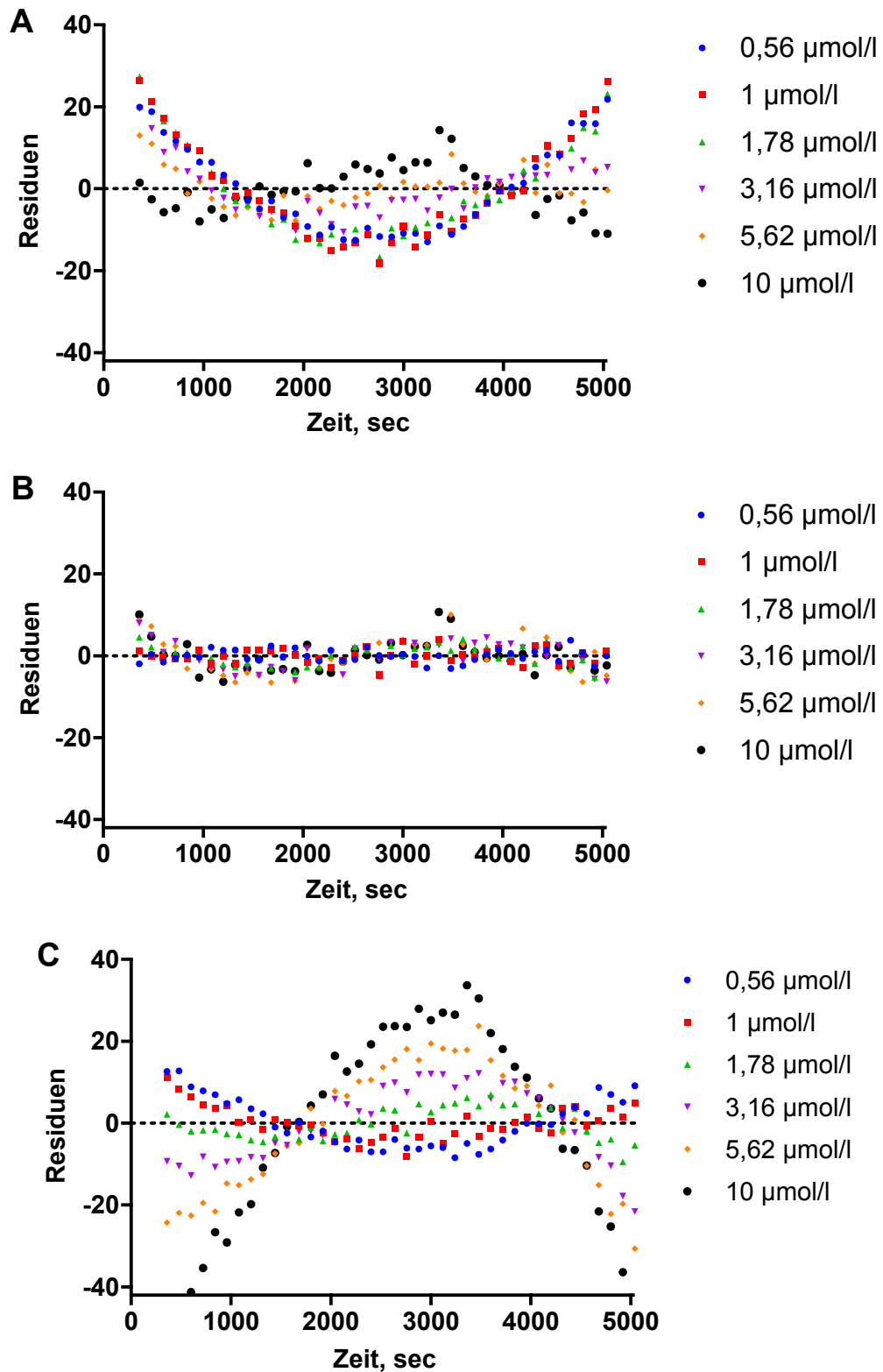


Abbildung 4-19: Residuen verschiedener Konzentrationen DCFH-DA in PLB-985 ABCG2 Zellen dargestellt über den Zeitraum 360-5040 Sekunden. A: lineare Regression. B: Polynom 2. Ordnung. C: Exponentielle Wachstums-Gleichung.

Aus der Betrachtung der Residuen ergibt sich, dass das Polynom 2. Ordnung zur mathematischen Beschreibung der Fluoreszenzkinetik herangezogen werden kann. Zwar scheint auch damit eine leichte systematische Abweichung der Residuen vorzuliegen, allerdings ist diese um ein Vielfaches geringer als bei der linearen Funktion oder der exponentiellen Wachstumsgleichung. Auf den Einsatz von Polynomen höherer Ordnung wurde verzichtet, da die Vielzahl an ermittelbaren Faktoren die Interpretation der Daten erschwert.

Um zu entscheiden, welcher Bestandteil des Polynoms 2. Ordnung für die Darstellung der sigmoidalen Dosis-Effektkurve geeignet ist, wurden die Faktoren  $b_0$  bzw.  $b_1$  aus Messreihen mit verschiedenen Konzentrationen des Modulators XR9577 mit Hilfe der 4-Parameter logistischen Gleichung aufgetragen. Dabei wurde untersucht, ob sinnvolle Darstellungen erhalten werden konnten und ob die erhaltenen  $pIC_{50}$ -Werte mit den  $pIC_{50}$ -Werten, die zeitgleich mit dem Hoechst 33342 Assay erhalten wurden, übereinstimmten. Als Ergebnis dieser Betrachtung wurde  $b_1$  als Parameter ausgewählt.

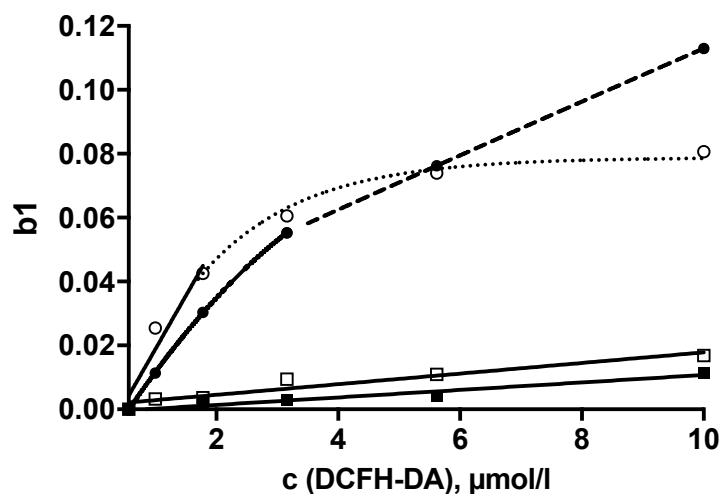


Abbildung 4-20: Verschiedene Konzentrationen DCFH-DA mit PLB-985 Wildtyp (○), PLB-985 ABCG2 (●), MDCK II Wildtyp (□) und MDCK II BCRP (■).

In Abbildung 4-20 sind verschiedene Konzentrationen von DCFH-DA gegen  $b_1$  aufgetragen. Für die Zelllinien PLB-985 Wildtyp ist eine annähernde Linearität nur über den Konzentrationsbereich von 0,56 - 1,78  $\mu\text{mol/l}$  ( $r^2=0,928$ ) gegeben, für die PLB ABCG2 Zelllinien ergibt sich ein linearer Zusammenhang über den Konzentrationsbereich von 0,56 - 3,16  $\mu\text{mol/l}$  ( $r^2=0,993$ ). Für die MDCK II Wildtyp Zelllinie



( $r^2=0,923$ ) und die MDCK II BCRP Zelllinie ( $r^2=0,967$ ) ergibt sich ein linearer Zusammenhang über die gesamte Konzentration von 0,56 - 10  $\mu\text{mol/l}$ . Die Steigung ist jedoch mit 0,0017 für die MDCK II Wildtyp und mit 0,0011 für die MDCK II BCRP Zelllinien kleiner als die der beiden PLB-985 Zelllinien (Steigung PLB-985 Wildtyp  $m=0,0334$ , Steigung PLB-985 ABCG2  $m=0,0212$ ). Die Untersuchung der MDCK II Wildtyp und MDCK II BCRP Zelllinien mit 3,16  $\mu\text{mol/l}$  XR9577 zeigten, dass die Steigung der Wildtypzelllinie durch XR9577 nicht beeinflusst wurde, sich die Steigung der MDCK II BCRP Zelllinie aber ungefähr auf das Niveau der Wildtyp Zellen erhöhte. Gleiches wurde auch bei den Zelllinien PLB-985 Wildtyp und PLB-985 ABCG2 beobachtet.

Die unterschiedliche Zunahme der Fluoreszenzintensität von DCF in den beiden Zelllinien MDCK II und PLB-985 ist auffallend. Möglicherweise liegen zellspezifische Unterschiede in den einzelnen geschwindigkeitsbestimmenden Schritten, d.h. die Spaltung des Esters durch Esterasen und der Oxidation zum DCF, in den verschiedenen Zellen vor. Es finden sich Untersuchungen dazu, dass sowohl bei der Akuten Myeloischen Leukämie als auch der Chronischen Myeloischen Leukämie die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies erhöht ist und zu einem Fortschreiten der Erkrankung führen.<sup>171,172</sup> Das bedeutet, dass die Zelllinie PLB-985 im Vergleich zur MDCK II Zelllinie nativ hohe Level an ROS besitzt, welches für die Oxidation von DCFH zum fluoreszierenden DCF verantwortlich ist.<sup>173–175</sup>

### 4.4.2 Anwendung eines HTS-fähigen DCFH-DA Assays

Für die Untersuchung ob DCFH-DA für einen HTS-fähigen Assay geeignet ist, wurde mit den Substanzen XR9577 und Ko143 eine kleine Testreihe durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse aus Kapitel 4.4.1 wurde entschieden, 1  $\mu\text{mol/l}$  DCFH-DA für die Versuche zu verwenden. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 4-5 aufgeführt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 4-5: Ergebnisse für die Untersuchungen mit PLB-985 ABCG2 und MDCK II BCRP Zellen im DCFH-DA-Assay und im Hoechst 33342 Assay.**

**Tabelle 4-5-A: Ermittelte pIC<sub>50</sub>-Werte mit Standardabweichungen.**

Verbindung	PLB-985 ABCG2		MDCK II BCRP	
	DCFH-DA	Hoechst 33342	DCFH-DA	Hoechst 33342
	pIC <sub>50</sub> ± SD	pIC <sub>50</sub> ± SD	pIC <sub>50</sub> ± SD	pIC <sub>50</sub> ± SD
Ko143	6,96 ± 0,01	6,84 ± 0,01	6,43 ± 0,03	6,74 ± 0,04
XR9577	6,31 ± 0,22	6,37 ± 0,11	6,05 ± 0,17	6,42 ± 0,44

**Tabelle 4-5-B: Ermittelte IC<sub>50</sub>-Werte mit Standardabweichungen.**

Verbindung	PLB-985 ABCG2		MDCK II BCRP	
	DCFH-DA	Hoechst 33342	DCFH-DA	Hoechst 33342
	IC <sub>50</sub> ± SD [nmol/l]	IC <sub>50</sub> ± SD [nmol/l]	IC <sub>50</sub> ± SD [nmol/l]	IC <sub>50</sub> ± SD [nmol/l]
Ko143	110 ± 2	145 ± 1	372 ± 17	182 ± 11
XR9577	518 ± 178	441 ± 116	921 ± 242	475 ± 356

Während die ermittelten pIC<sub>50</sub>-Werte im DCFH-DA-Assay und im Hoechst 33342 Assay ähnliche Ergebnisse für Ko143 und XR9577 bei den PLB-985 ABCG2 Zellen zeigten, schwanken die Ergebnisse der MDCK II BCRP Zellen stärker. In Abbildung 4-21 sind zwei Konzentrations-Effektcurven für XR9577 mit PLB-985 und MDCK II Zellen abgebildet.

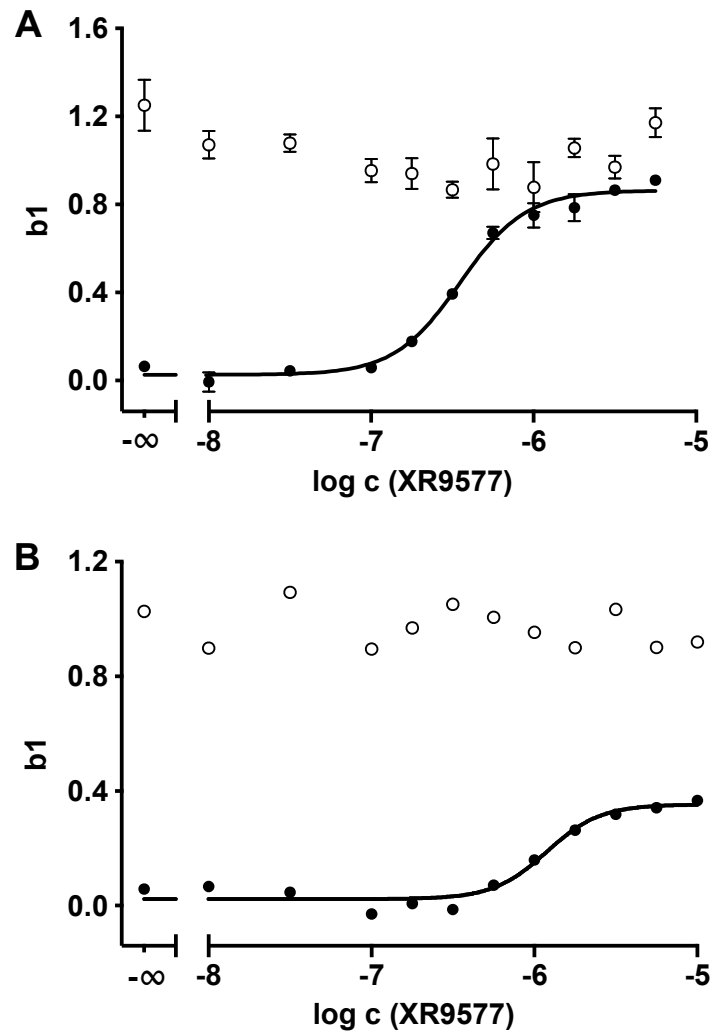


Abbildung 4-21: Konzentrations-Effektcurven im DCFH-DA-Assay für XR9577 A: PLB-985 Wildtyp (○) und PLB-985 ABCG2 (●) und B: MDCK II Wildtyp (□) und MDCK II BCRP (■).

Möglicherweise müsste für die MDCK II BCRP Zelllinie eine höhere Konzentration des Farbstoffs eingesetzt werden um höhere b1-Werte zu erhalten. Außerdem sind die Ergebnisse aus Tabelle 4-5 durch die kleine Anzahl an getesteten Verbindungen wenig repräsentativ.

### 4.4.3 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass DCFH-DA bzw. DCFH ein Substrat für ABCG2 darstellt. Es war prinzipiell möglich, mit DCFH-DA einen HTS-fähigen Assay am Fluoreszenzreader durchzuführen.

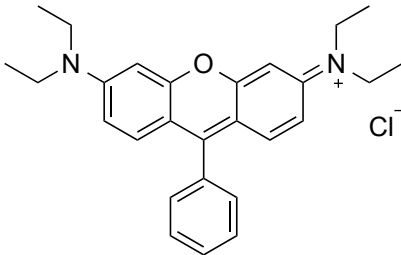
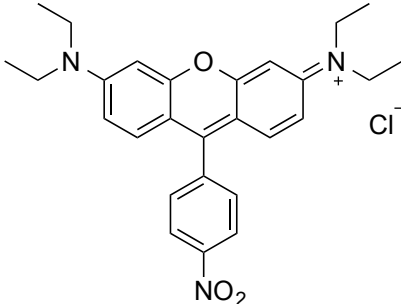
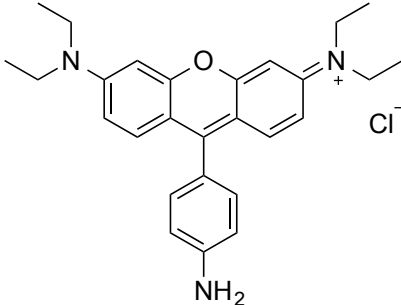
Die Fluoreszenz ist jedoch von mehreren Faktoren abhängig und dadurch sehr störanfällig. So ist der Farbstoff nur eingeschränkt stabil. Außerdem kommt der Auswahl der verwendeten Zelllinie eine entscheidende Bedeutung zu. Die Akute Myeloische Leukämie Zelllinien PLB-985 Wildtyp und PLB-985 ABCG2 besitzen hohe Level an ROS und zeigen dadurch eine stärkere Fluoreszenzzunahme von DCF und sind somit besser geeignet als die Zelllinien MDCK II Wildtyp und MDCK II BCRP.<sup>173,176</sup>

Außerdem war es schwierig, ein passendes mathematisches Modell für die Beschreibung des Fluoreszenzanstiegs zu ermitteln. Die Verwendung des Polynoms 2. Ordnung ist nicht optimal, da es schwierig ist, biologische Daten mit Polynomen zu interpretieren. Daher wurde der vielversprechende Ansatz nicht weiterverfolgt und optimiert.

## 4.5 Charakterisierung der OMP-Verbindungen

Ein Projekt unserer Arbeitsgruppe mit dem Ziel neue Fluoreszenzfarbstoffe aus der Gruppe der Xanthenderivate zu entwickeln, wurde von Herrn Obeid M. Maleksha bearbeitet. Als Leitsubstanzen wurden dazu die Triphenylmethanfarbstoffe Rhodamin 123 und Tetramethylrosamin benutzt, von denen bekannt ist, dass sie Substrate von ABCB1 darstellen.<sup>177–179</sup> Die getesteten Verbindungen sind in Tabelle 4-6 aufgeführt.

Tabelle 4-6: Strukturformeln der OMP Substanzen.

Verbindung	Strukturformel
OMP1	
OMP2	
OMP3	

Verbindung	Strukturformel
OMP4	
OMP5	

#### 4.5.1 Fluoreszenzspektren der OMP-Verbindungen

Zunächst wurde untersucht, ob die Substanzen bei der Wellenlänge des Argonlaser des FACSCalibur™ bei 488 nm angeregt und in welchem Wellenlängenbereich die Fluoreszenz detektiert werden konnte. Die mit dem Luminescence Spektrometer LS55 erhaltenen Spektren sind in Abbildung 4-22 dargestellt. Die Substanzen OMP1, OMP3, OMP4 und OMP5 waren bei 488 nm anregbar und zeigten bei 575 nm eine detektierbare Emission. Die Verbindung OMP2 zeigte innerhalb der Messgrenzen des Geräts keine Emission. Bei weiteren Untersuchungen am FACSCalibur™, konnte OMP2 allerdings in FI3 (670LP) detektiert werden. Der Grund für die fehlende Emission von OMP2 am Luminescence Spektrometer LS55, liegt in der limitierten Hardware des Geräts. Der eingebaute Standard-Photomultiplier ist nicht sensitiv genug für Emissionswellenlängen oberhalb von 600 nm.<sup>180</sup>

Die verschiedenen Substituenten der OMP-Verbindungen in *para*-Position zum Xanthen beeinflussen als funktionelle Gruppen die Fluoreszenzintensität. Dabei besitzen -NH<sub>2</sub> und -OCH<sub>3</sub> +M-Effekte und -NO<sub>2</sub> einen -M-Effekt. Die Nitrogruppe

in OMP2 bewirkt als Antiauxochrom eine Verstärkung der  $\pi$ -Elektronen Delokalisation, die zu einer Zunahme des bathochromen Effekts führt.<sup>181,182</sup>

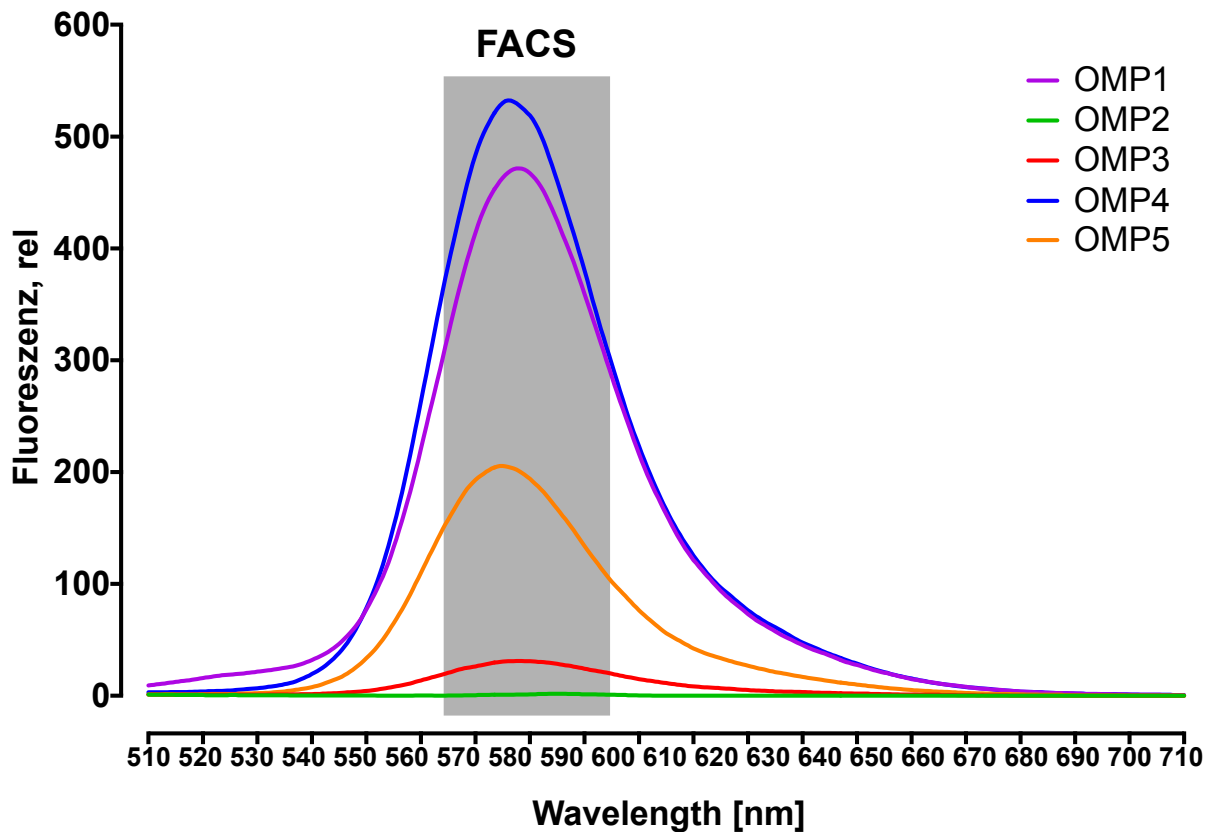
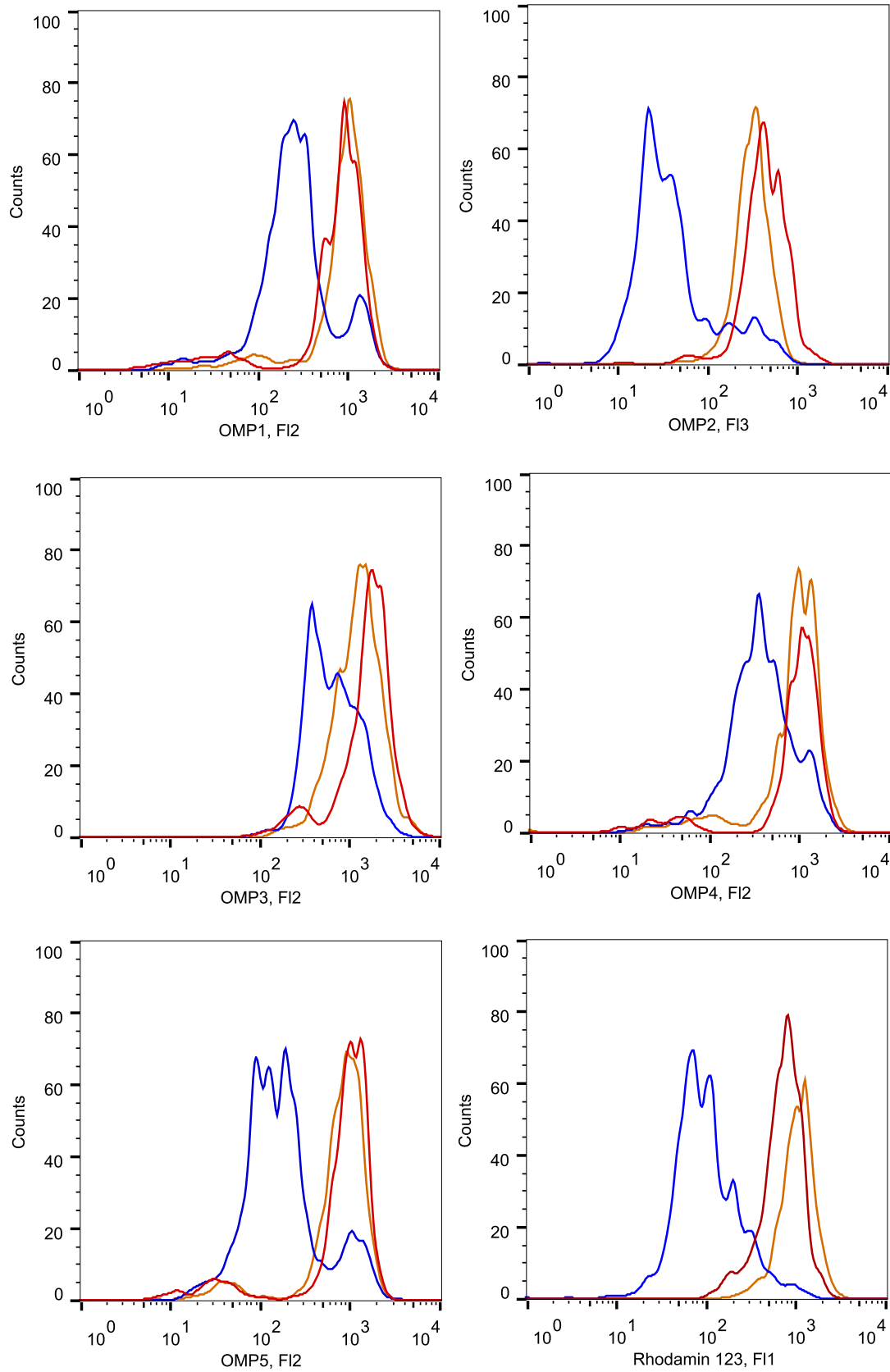


Abbildung 4-22: Emissionsspektrum von OMP1, OMP2, OMP3, OMP4 und OMP5 angeregt bei 488 nm. In grau ist der mit dem FACSCalibur™ detektierte Wellenlängenbereich in FI2 dargestellt.

#### 4.5.2 Untersuchung der OMP-Verbindungen an ABCB1

Die Untersuchungen der OMP-Verbindungen wurden mit ABCB1 exprimierenden A2780 Wildtyp und A2780adr Zellen am FACSCalibur™ durchgeführt. Die Versuche wurden, wie in Kapitel 3.10.2 im Rhodamin 123 Assay beschrieben, in Mikrotiterplatten und unter Lichtschutz durchgeführt. Die OMP-Substanzen wurden dazu in verschiedenen Konzentrationen für 2 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit oder ohne Modulator XR9577 (1,78  $\mu$ mol/l) inkubiert. Zum Vergleich wurde Rhodamin 123 ebenfalls mit vermessen.

## 4 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4-23: Fluoreszenz von OMP1 (0,1  $\mu\text{mol/l}$ ), OMP2 (0,3  $\mu\text{mol/l}$ ), OMP3 (0,3  $\mu\text{mol/l}$ ), OMP4 (0,1  $\mu\text{mol/l}$ ), OMP5 (0,1  $\mu\text{mol/l}$ ) und Rhodamin 123 (0,3  $\mu\text{mol/l}$ ) in A2780 Wildtyp Zellen (orange), A2780adr Zellen (blau) und A2780adr Zellen mit 1,78  $\mu\text{mol/l}$  XR9577 (rot) gemessen am FACSCalibur™.**



In Abbildung 4-23 sind die Ergebnisse der Fluoreszenzuntersuchung von OMP1, OMP2, OMP3, OMP4, OMP5 und Rhodamin 123 abgebildet. Die ungehemmte Zelllinie A2780adr zeigte für alle Farbstoffe eine verminderte Fluoreszenz. Die Hemmung des Transporters führte zu dem gleichen Anstieg der Fluoreszenz, der auch in der Wildtyp Zelllinie beobachtet werden konnte. Alle getesteten OMP-Verbindungen wurden also von ABCB1 transportiert. Die Verbindungen OMP1, OMP3, OMP4 und OMP5 konnten in Kanal FI2 (585/45) detektiert werden, während OMP2 in Kanal FI3 (LP 670) vermessen wurde. Die Fluoreszenz der Verbindungen wies unterschiedliche Intensitäten auf. Deshalb wurden sie in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. OMP1, OMP4 und OMP5 wurden in einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{mol/l}$  benutzt, während OMP2, OMP3 und Rhodamin 123 mit 0,3  $\mu\text{mol/l}$  vermessen wurden.

### 4.5.3 Schlussfolgerung

Es konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzfarbstoffe OMP1, OMP2, OMP3, OMP4 und OMP5 aus der Familie der Triphenylmethanfarbstoffe als potentielle Farbstoffe für die Charakterisierung von ABCB1 infrage kommen. Sie werden von ABCB1 transportiert. Die Einführung einer Nitrogruppe in *para*-Stellung zum Xanthen als strukturelle Variation führte im Vergleich zu einer bathochromen Verschiebung der Emissionswellenlänge. Damit bieten sich die Verbindungen auch für Simultanmessungen mit verschiedenen Farbstoffen an.

### 4.6 Optimierung des Vanadat-sensitiven ATPase Assays

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zusammen mit Katja Stefan der von der Arbeitsgruppe um Balazs Sarkadi (Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Ungarn) entwickelte Vanadat-sensitive ATPase Assay in unseren Arbeitskreis eingeführt und um ein Protokoll für einen Mikrotiterplatten-Assay erweitert.<sup>11,151</sup> Der Assay wird verwendet, um die Effekte von Modulatoren auf die basale ATPase Aktivität von ABCG2, das von Insektenzellen exprimiert wird, zu ermitteln. Ein ähnlicher Vanadat-sensitiver ATPase Assay für ABCG2, wurde bereits zuvor in unserem Arbeitskreis von Anna Jacobs durchgeführt.<sup>183</sup> In dem in dieser Arbeit durchgeführten Assay wurde als wichtigste Unterscheidung Cholesterol zugesetzt. Die Beladung der Membranen mit Cholesterol macht den Vanadat-sensitiven ATPase Assay empfindlicher.<sup>151</sup>

#### 4.6.1 Beladung der Sf9-Membranen mit Cholesterol

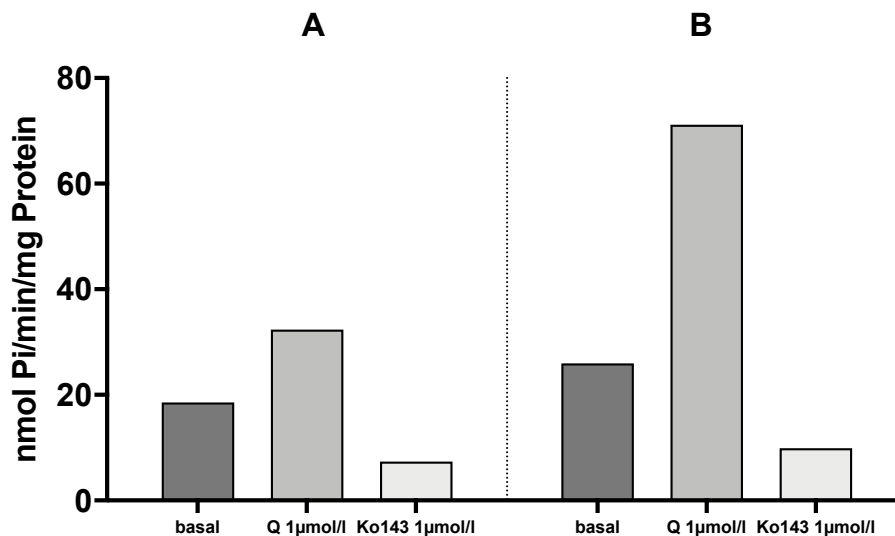
Der Vanadat-sensitive ATPase Assay mit ABCG2 wird von verschiedenen Arbeitsgruppen standardmäßig mit Sf9-Zellenmembranen, die mit Cholesterol beladen sind, durchgeführt.<sup>11,151,184</sup> Untersuchungen in Sf9-Membranen zeigen, dass ABCG2 im Vergleich zu ABCB1 eine hohe basale ATPase Aktivität besitzt, die sich zwar durch Inhibitoren eindeutig hemmen lässt, aber durch Aktivatoren nur schwach aktivierbar ist und damit eingeschränkt sensitiv ist.<sup>11,151</sup>

Es konnte funktionell nachgewiesen werden, dass Cholesterol eine regulierende Wirkung auf die Funktion von ABCG2 hat und dass die ATPase Aktivität dann deutlich stärker stimuliert werden kann.<sup>69,151,185,186</sup> Die Transportaktivität von ABCG2 kann im Gegenzug durch Cholesterolverarmung reversibel gehemmt werden.<sup>70,151</sup> Die Insektenzelllinie Sf9 enthält mit 6-8 µg/mg Protein Membranpreparation wenig Cholesterol. Säugetierzellen enthalten 30-50 µg/mg Protein Membranpreparation Cholesterol.<sup>151</sup> ABCG2 kommt auch nativ in Cholesterol reichen Umgebungen der Zellmembran vor.<sup>70,187</sup>

Neuere Untersuchungen mit Kryoelektronenmikroskopstrukturen von Jackson et al. zeigen eine Interaktion von Phospholipiden und Cholesterol mit den in der

Lipiddoppelschicht verankerten TMDs.<sup>44</sup> Außerdem konnten Taylor et al. zeigen, dass Cholesterol in der Bindungstasche von ABCG2 binden kann, obwohl es nicht transportiert wird.<sup>45</sup>

Die Sf9-Membranen wurden daher, wie in Kapitel 3.15 beschrieben, während der Herstellung der Membranpräparation mit dem Cholesterol RAMEB-Cyclodextrin Komplex von CyloLab in einer Konzentration von 2,5 mg/ml beladen.



**Abbildung 4-24: ATPase Aktivität von ABCG2, basale ATPase Aktivität, stimulierte ATPase Aktivität mit Quercetin 1 µmol/l und inhibierte ATPase Aktivität mit Ko143 1 µmol/l. A: Membran ohne Cholesterol-Cyclodextrin. B: Membran mit Cholesterol-Cyclodextrin 2,5 mg/ml.**

In Abbildung 4-24 sind exemplarisch die im ATPase Assay erhaltenen Daten von einer unbeladenen Membran (A) und einer mit 2,5 mg/ml Cholesterol beladenen Membran (B) abgebildet. Dabei sind für beide Membranen jeweils die basale, die mit 1 µmol/l Quercetin maximal stimulierte und die mit 1 µmol/l Ko143 maximal inhibierte ATPase Aktivität dargestellt. Der Aktivierungsfaktor von 1 µmol/l Quercetin beträgt in diesem Beispiel für die Membran ohne Cholesterolbeladung (Abbildung 4-24-A) 1,74. Die Aktivierung durch 1 µmol/l Quercetin beträgt für die mit Cholesterol beladene Membran (Abbildung 4-24-B) das 2,74-fache der basalen ATPase Aktivität. Es wird damit deutlich, dass das Messfenster für ATPase Aktivatoren im ATPase Assay deutlich steigt und der Assay sensitiver wird. Die basale ATPase Aktivität wird, wie in der Literatur beschrieben, durch Cholesterol ebenfalls leicht gesteigert.<sup>69</sup>

Die in dieser Arbeit durchgeführten Vanadat-sensitiven ATPase Assays wurden aufgrund der gesteigerten Sensitivität alle mit Membranen durchgeführt, die mit dem Zusatz von 2,5 mg/ml des Cholesterol RAMEB-Cyclodextrin Komplexes von Cyclolab angereichert wurden. Aufgrund des größeren Messfensters ließen sich Verbindungen, die zu einer Aktivierung der basalen ATPase Aktivität führen, so leichter identifizieren und bewerten.

### 4.6.2 HTS-fähiger Vanadat-sensitiver ATPase Assay

Der im Arbeitskreis etablierte Vanadat-sensitive ATPase Assay wird standardmäßig im Röhrchen durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde er mit dem Ziel, den Probendurchsatz zu erhöhen und gleichzeitig die eingesetzte Proteinmenge zu verringern, auf Mikrotiterplatten übertragen.

Die Umsetzungsrate von ATP zu ADP und anorganischem Phosphat ( $P_i$ ) in „nmol  $P_i$ /min/mg Protein“ ist ein zeitsensitiver Prozess. Deshalb ist eine sehr akkurate Durchführung des Vanadat-sensitiven ATPase Assays im Röhrchen notwendig. Die zeitkritischsten Punkte sind dabei die Zugabe von ATP, die Beendigung der Umsetzungsreaktion von ATP zu ADP und  $P_i$  mit 5 %-igem SDS und der Zeitpunkt der Absorptionsmessung mit der Zugabe der Detektionsreagenzien. Je nach Probenumfang liegen so bis zu 15 Minuten zwischen der ersten und der letzten Probe. Dadurch wird die Durchführung sehr aufwändig und die mögliche Probenanzahl des Assays ist limitiert.

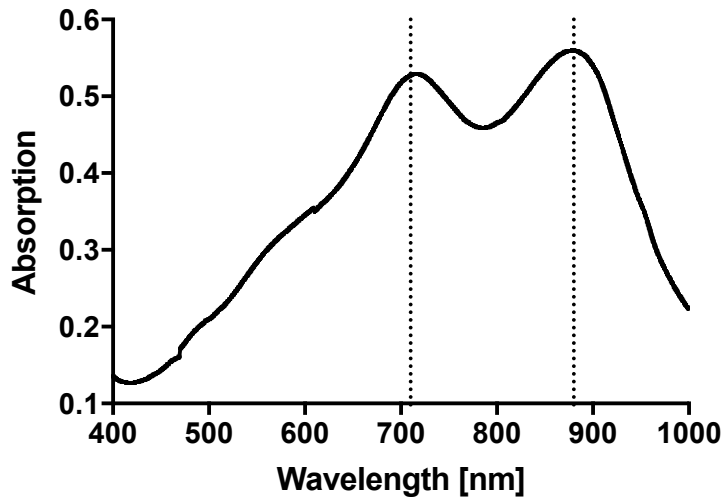
Die Durchführung von Assays im Mikromaßstab erlaubt durch die Hilfe von Stepper-Pipetten oder Multikanalpipetten eine schnellere zeitliche Abfolge bei der Zugabe von Reagenzien. Kombiniert mit der zügigen Messung der Absorption am Microplatereader, von unter einer Minute für die gesamte 96er Mikrotiterplatte, lässt sich so der Probendurchsatz vergrößern.

Die Herstellung der Membran ist ein langwieriger und fehleranfälliger Prozess über einige Wochen, der jedoch nur eine geringe Ausbeute liefert. Die benötigte Membranmenge stellt daher ebenfalls einen limitierenden Faktor dar.

Um die im Röhren-Assay ermittelten Daten mit den im Mikromaßstab erhaltenen Messergebnissen vergleichen zu können, wurde bei der Übertragung des ATPase Assays auf die Mikrotiterplatte versucht, möglichst wenige Veränderungen einzuführen. Die Reagenzien und das Detektionsreagenz wurden in gleicher Zusammensetzung verwendet. Die Puffer und Reagenzien wurde mit Hilfe von Stepper-Pipetten zugegeben, da sich bei der Benutzung der Multikanalpipette, vor allem bei der Zugabe von 5 %-igem SDS, Luftblasen in den Wells bildeten, welche die Absorptionsmessung störten. Die Anpassung der Volumina wurde anhand des ATPase Assay Protokolls für ABCG2 „BCRP-M TR ATPase Assay Protocoll Cat. No. SBAT05“ von Sigma Aldrich, einem kommerziellen in weiten Teilen analogen Vanadat-sensitiven ATPase Assay, durchgeführt.<sup>188</sup>

Die Microplatereader verfügen über eine eingeschränkte Filterauswahl. Da die Bestimmung von Phosphat im HTS-Modus ebenfalls mit Hilfe der von Murphy und Riley beschriebenen Methode mit Ammoniummolybdat in Gegenwart von Ascorbinsäure und Antimon durchgeführt wurde, musste die Detektionswellenlänge von 880 nm im Röhren-Assay auf 710 nm im Microplatereader angepasst werden.<sup>149</sup> Dabei wird ausgenutzt, dass sich bei der verwendeten Bestimmungsmethode von Phosphat das Absorptionsmaximum von Molybdänblau durch die Anwesenheit von Antimon von 820 nm auf 882 nm verschiebt und es eine Schulter bei 715 nm besitzt.

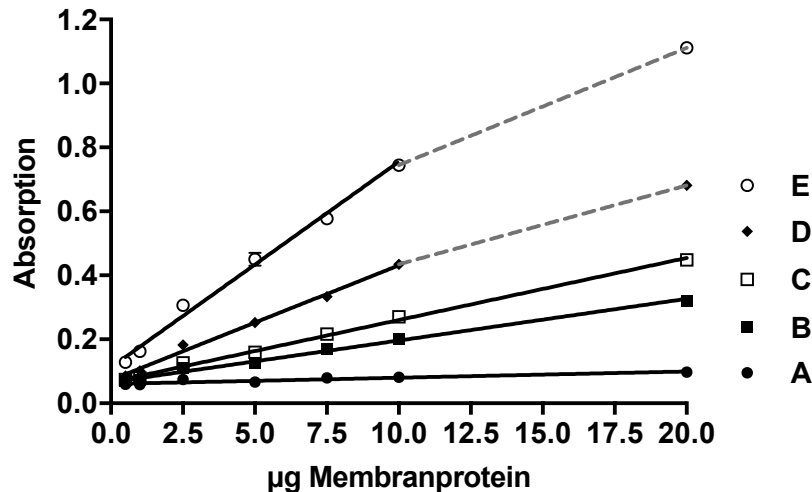
Das Absorptionsspektrum von Molybdänblau ist in Abbildung 4-25 dargestellt.



**Abbildung 4-25: Absorptionsspektrum von Molybdänblau in Gegenwart von Ascorbinsäure und Antimon. Markiert sind die Wellenlängen 710 nm (Mikrotiterplatte) und 880 nm (Röhrchen).**

Die Verschiebung der Messung zu einer geringeren Absorptionswellenlänge in Kombination mit dem verringerten Assayvolumen führte bei farbigen Verbindungen, wie z.B. Tariquidar und Elacridar, zu Messfehlern. Diese wurden daher weiterhin im Röhrchen-Assay vermessen.

Für die Reduktion der eingesetzten Membranmenge wurden die Absorptionen der im Assay standardmäßig, wie in Kapitel 3.16 beschrieben, eingesetzten Kontrollen gegen die verschiedenen Membranmengen aufgetragen. Die gemessenen Absorptionenwerte der Phosphatbestimmung mit verschiedenen Mengen Membranprotein sind in Abbildung 4-26 abgebildet. Die Absorption verläuft für alle Proben bis 10  $\mu\text{g}$  linear. Die Berechnung der Umsatzrate von ATP zu ADP und  $\text{P}_i$  lässt sich für die eingesetzten Membranmengen von 0,5  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$ , 2,5  $\mu\text{g}$ , 5  $\mu\text{g}$  und 10  $\mu\text{g}$  sinnvoll aus den gemessenen Absorptionen berechnen. Allerdings sind die Absorptionsunterschiede bei kleinen Membranmengen sehr klein und unterscheiden sich für 0,5  $\mu\text{g}$  und 1  $\mu\text{g}$  kaum von der Absorption des Hintergrunds. Um die Membranmenge von 10  $\mu\text{g}$  im Röhrchen-Assay zu senken und gleichzeitig ausreichend große Absorptionenwerte für stabile und reproduzierbare Messergebnisse zu erhalten, erschien es daher sinnvoll die Membranproteinmenge auf 5  $\mu\text{g}$  Protein/Well zu verringern.



**Abbildung 4-26: Absorption verschiedener Mengen Membranprotein. A: mit 5 %-igem SDS inaktivierte Membran, B: mit 1,2 mmol/l Vanadat inhibierte unspezifische ATPase Aktivität, C: mit 1 µmol/l Ko143 inhibierte ATPase Aktivität, D: basale ATPase Aktivität, E: mit 1 µmol/l Quercetin stimulierte ATPase Aktivität.**

Bei der Messung der Absorption der Kalibrierreihe der Mikrotiterplatte wurde die Beobachtung gemacht, dass die gemessenen Absorptionen und die eingesetzten Phosphatmengen nicht mehr linear zusammenhängen. Der ermittelte Graph für die Messung der Phosphat-Kalibrierreihe in der Mikrotiterplatte ist in Abbildung 4-27-A abgebildet. Die Messung der gleichen Kalibrierreihe bei 710 nm und 880 nm im Röhrchen, abgebildet in Abbildung 4-27-B, weist einen linearen Zusammenhang auf.

Die Suche nach möglichen Erklärungen gestaltete sich zunächst kompliziert. Da die gemessenen Absorptionen im Röhrchen linear zu den eingesetzten Phosphatmengen sind, wurde ausgeschlossen, dass die Ursache in einem fehlenden Kausalzusammenhang der Abhängigkeit Stoffmenge und Absorption liegen. Als Ursache wurde vielmehr ein Zusammenhang mit der Messanordnung angenommen.

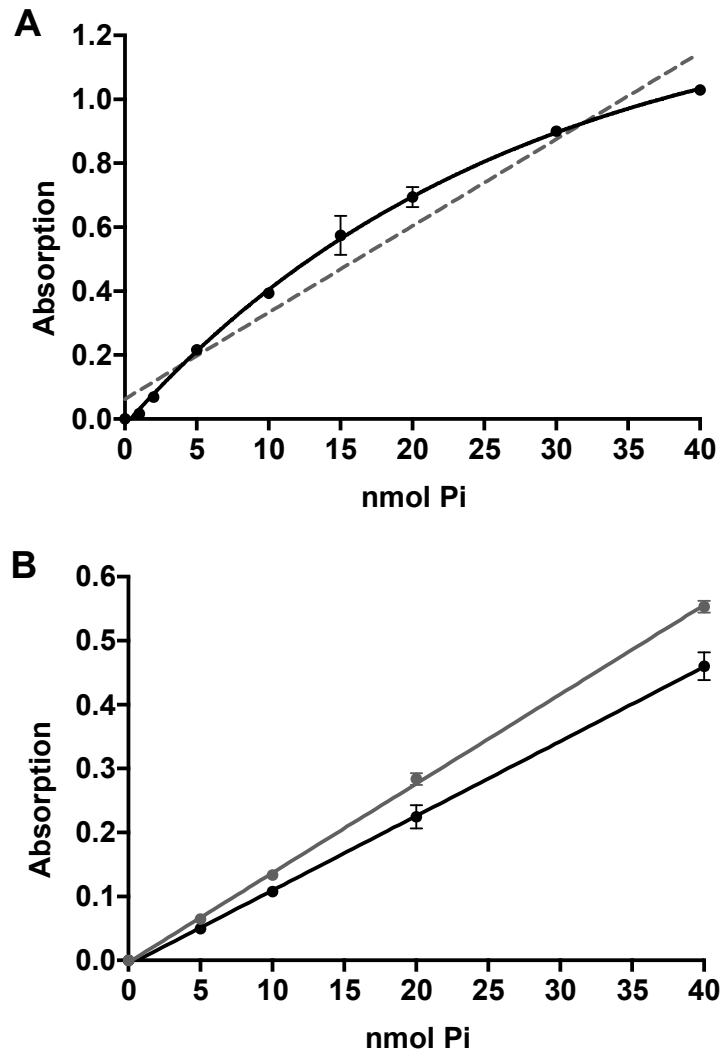


Abbildung 4-27: Kalibrierreihe Phosphat. A: Mikrotiterplatte 710 nm, einphasig verlaufenden exponentielle Assoziation (schwarze Linie), lineare Regression (grau gestrichelte Linie). B: Küvette, 710 nm (schwarz), 880 nm grau, beides lineare Regression.

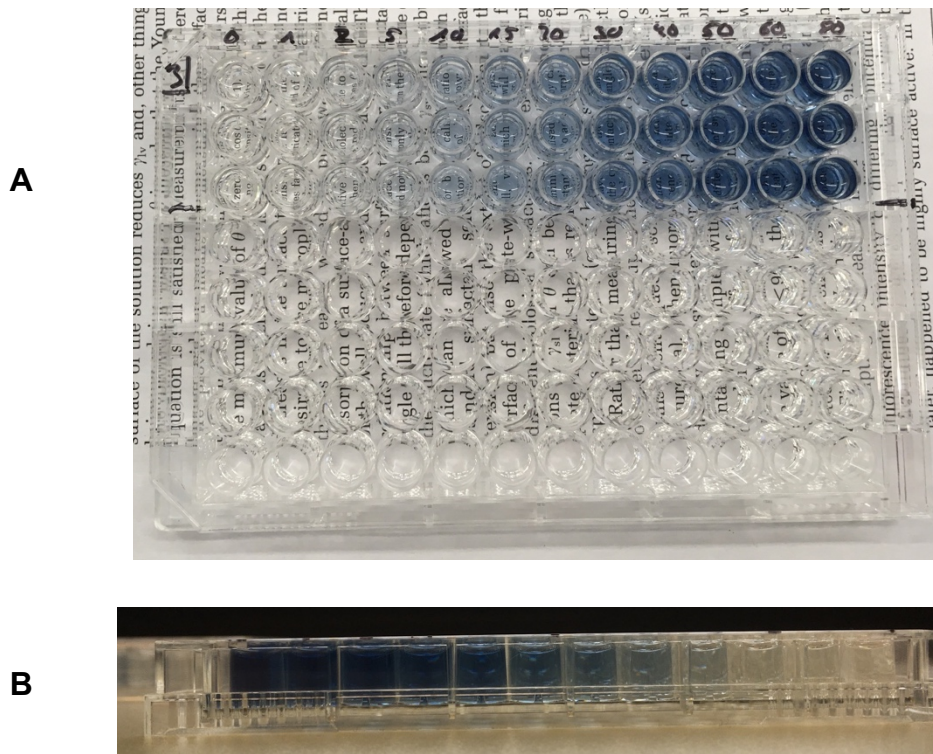
Die Messung des Röhren-Assays erfolgt in einer Küvette unter Standardbedingungen mit einer Pfadlänge von 1 cm. Diese Standardbedingungen gelten nicht für die Messung in der Mikrotiterplatte. Bei der Suche nach möglichen Ursachen wurden daher verschiedene Faktoren überprüft.

Zunächst wurde eine erneute Absorptionsmessung mit dem Microplatereader eines anderen Herstellers durchgeführt. Anstatt des POLARstars von BMG lab technologies wurde die Messung mit dem Multiskan-Ex von Thermo Scientific durchgeführt. Die Messung führte zu dem gleichen Ergebnis. Anschließend wurde untersucht, ob die Richtung des Strahlengangs durch die Probe verantwortlich für das Phänomen ist, aber auch hier zeigt der Wechsel zwischen Top- und Bottom-



Reading keine Veränderung des Messergebnisses. Ebenso führte der Einsatz verschiedener Fabrikate von Mikrotiterplatten zu keiner Änderung.

Eine mögliche Lösung ergab sich bei der optischen Begutachtung der Mikrotiterplatten. Die Fotos der Phosphat-Kalibrierreihe in einer Platte sind in Abbildung 4-28 abgebildet.



**Abbildung 4-28: Kapillaraszension in der Mikrotiterplatte. Die oberen drei Reihen sind mit einer Phosphatkalibrierreihe befüllt, der Rest der Platte ist leer. A: Aufsicht. B: Seitenansicht.**

Bei der Übertragung des Vanadat-sensitiven ATPase Assays vom Röhrchen auf die Mikrotiterplatte treten Menisken auf. Diese sind als Wölbung der Flüssigkeit in der Seitenansicht der Platte in Abbildung 4-28-B deutlich erkennbar. Als Folge treten Linseneffekte auf und die einfallenden Lichtstrahlen werden gebrochen. Die mit der Kalibrierreihe befüllten Wells wirken so als Verkleinerungslinsen. Erkennbar ist das in der sichtbaren Verkleinerung der darunter liegende Schrift in Abbildung 4-28-A.

An Grenzflächen verschiedener Phasen (z.B. fest/flüssig) tritt durch Adhäsionskräfte zwischen den verschiedenen Materialien eine mechanische Spannung, die Grenzflächenspannung, auf. Darunter versteht man die Kraft tangential zur Grenzfläche. Diese versucht die Grenzfläche zu verkleinern. Sie ist abhängig von der Oberflächenspannung der Phasen. Beim Zusammentreffen mehrerer Phasen führt die Einstellung des Gleichgewichts zu der Ausbildung eines bestimmten Winkels der Grenzflächenspannungen. Das spielt bei der Kapillarität, dem Aufsteigen von Flüssigkeiten in engen Rohrgefäßen, eine Rolle.<sup>189</sup> Die Kapillarwirkung beruht auf dem Zusammenspiel von Kohäsionskräften innerhalb einer Flüssigkeit und Adhäsionskräften zwischen Flüssigkeit und Kapillare. Das Aufsteigen der Flüssigkeit bewirkt eine Krümmung der Oberfläche. Dabei können sowohl konkave als auch konvexe Menisken auftreten, abhängig davon ob die Adhäsionskräfte oder die Kohäsionskräfte überwiegen.<sup>190–192</sup>

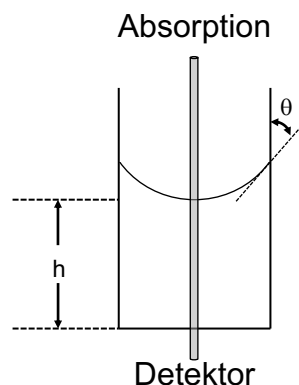


Abbildung 4-29: Kapillaraszension einer Flüssigkeit nach Moore.<sup>191</sup>

Die aus der Oberflächenspannung der Flüssigkeit nach oben gerichtete Kraft  $F_K$  im inneren der Kapillare lässt sich folgendermaßen beschreiben.

**Formel 4-2: Kraft im inneren der Kapillare.**

$$F_K = 2\pi r \gamma \cos\theta$$

Dabei bezeichnet  $2\pi r$  den Kreisumfang der Kapillare,  $\gamma$  die Oberflächenspannung und  $\theta$  den Kontaktwinkel zwischen der Flüssigkeit und der Kapillarwand.<sup>193</sup>

Das Auftreten von Menisken an Grenzflächen kann bei der Interpretation von Absorptions- und Fluoreszenzmessungen zu Fehlern führen. Wenn sie wie eine Verkleinerungslinse wirken, können sie das einfallende Licht bündeln, oder durch asymmetrische Menisken die x-Achse verschieben. Außerdem können sie die Höhe der Flüssigkeit und damit die Pfadlänge verändern.<sup>194–196</sup>

Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz, beschrieben in Formel 4-3, ist eine konstante Pfadlänge  $d$  für die Berechnung der Konzentration  $c$ , also auch der Stoffmenge, mit dem Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$  Voraussetzung.

**Formel 4-3: Lambert-Beersches Gesetz**

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Diese Voraussetzung ist, aufgrund der durch die Menisken auftretenden veränderten Höhe der Flüssigkeit in den Wells der Mikrotiterplatte, nicht gegeben. Phosphat interagiert mit SDS und führt bei steigenden Konzentrationen zu einer Veränderung der Oberflächenspannung.<sup>197</sup> Die daraus resultierende Abweichung wird bei der Erstellung der Kalibrierreihe aus der gemessenen Absorption gegen den eingesetzten Phosphatgehalt in nmol sichtbar. Die im Röhren-Assay lineare Funktion ist im Mikrotiter-Assay gekrümmt.

Aus Abbildung 4-27-A wird deutlich, dass eine lineare Regression der Messdaten, hier die grau gestrichelte Linie, bei niedrigen und hohen Phosphatmengen zu einer Berechnung von zu niedrigen Phosphatmengen aus den ermittelten Absorptionen führt, während bei mittlerem Phosphatgehalt eine zu hohe Phosphatmenge aus den Absorptionswerten berechnet wird.

Üblicherweise wird bei Menisken in Mikrotiterplatten eine Pfadlängenkorrektur durchgeführt.<sup>195</sup> Dazu wird ein Korrekturfaktor ermittelt, der sich für jedes Well aus der Absorption des Puffers bei 975 nm und 900 nm berechnet. Bei der hier vorliegenden Versuchsanordnung, ist die Berechnung des Korrekturfaktors jedoch nicht möglich, da der verwendete Farbstoff in diesem Bereich ebenfalls absorbiert. Um einer systematisch falschen Berechnung des Phosphatgehalts der Proben entgegen-

genzuwirken, wurde die Phosphatmenge deshalb anstatt mit Hilfe der linearen Regression mit dem nichtlinearen Modell der einphasig verlaufenden exponentiellen Assoziationskurve, der schwarzen Linie in Abbildung 4-27-A, berechnet.

#### 4.7 Charakterisierung von Quercetin und Ko143

Das Flavonoid Quercetin und der Fumitremorgin C Abkömmling Ko143 wurden, wie von Sarkadi und in der Literatur beschrieben, bei allen folgenden ATPase-Untersuchungen als Standards benutzt.<sup>58,184,198-200</sup> Dabei dienen sie zum einen als interne Qualitätskontrollen der Membran, zum anderen werden sie als Bezugspunkte genutzt, um die ATPase Aktivitäten unterschiedlicher Versuche und unterschiedlicher Membranen vergleichbar zu machen. Bei Quercetin handelt es sich um einen Aktivator der basalen ATPase Aktivität, während Ko143 ein Inhibitor der basalen ATPase Aktivität darstellt. Die Inhibition der ATPase Aktivität durch Ko143 lässt sich laut mündlicher Auskunft von Dr. Csilla Özvegy-Laczka (Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Ungarn) nicht durch andere Verbindungen aufheben. Daher wird Ko143 auch zur Überprüfung von unspezifischen Effekten von Verbindungen auf die ATPase Aktivität von ABCG2 verwendet.

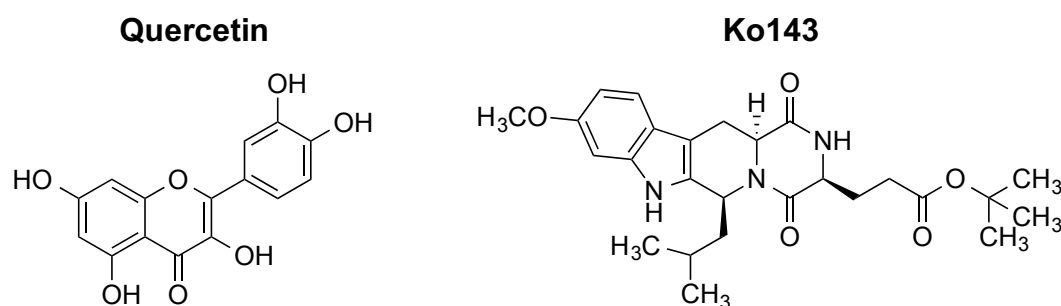


Abbildung 4-30: Strukturformeln von Quercetin und Ko143.

##### 4.7.1 Vanadat-sensitiver ATPase Assay

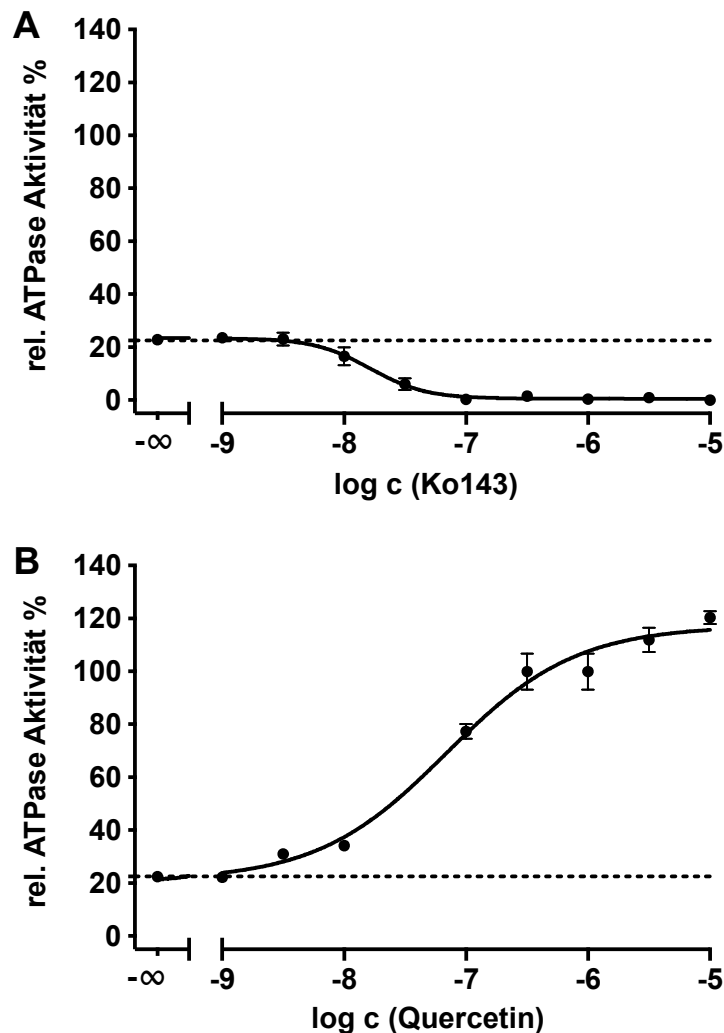
Zunächst wurden die Effekte der beiden Substanzen auf die basale ATPase Aktivität untersucht. Die ermittelten pIC<sub>50</sub>-Werte sind in Tabelle 4-7 aufgeführt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 4-7: Effekt auf die basale ATPase Aktivität von ABCG2 und ermittelte pEC<sub>50</sub>-Werte bzw. EC<sub>50</sub>-Werte mit Standardabweichungen.**

Verbindung	Effekt auf ATPase Aktivität	pEC <sub>50</sub> ± SD	EC <sub>50</sub> ± SD [nmol/l]
Ko143	Inhibition	7,89 ± 0,10	13,0 ± 2,0
Quercetin	Aktivierung	7,41 ± 0,06	39,1 ± 3,6

In Abbildung 4-31 sind die Effekte auf die basale ATPase Aktivität dargestellt. Quercetin stimuliert die ATPase, Ko143 inhibiert die ATPase. Für die Abbildungen wurden Ko143 1 µmol/l als 0 % skaliert und Quercetin 1 µmol/l als 100 %.



**Abbildung 4-31: Effekte auf die basale ATPase Aktivität. 0 % = Ko143 1 µmol/l, 100 % = Quercetin 1 µmol/l, gestrichelte Linie = basale Aktivität. A: Ko143 und B: Quercetin.**

### 4.7.2 Strategie der Prozentualisierung der Daten

Die in Abbildung 4-31 benutzte Darstellung der Skalierung wurde gewählt, um die Größenordnung der basalen ATPase Aktivität zu verdeutlichen. Die basale ATPase Aktivität liegt bei etwa ein Viertel der maximal stimulierten ATPase Aktivität. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse die basale ATPase Aktivität mit 0 % in der Mitte zwischen der Stimulation von Quercetin 1  $\mu\text{M}$  mit 100 % und der Inhibition von Ko143 1  $\mu\text{M}$  mit -100 % dargestellt. Dadurch werden die ursprünglichen Graphen verzerrt. Trotzdem erschien diese Darstellung hier zweckmäßig. Die verwendeten Membranen unterschieden sich je nach Charge in ihrer ATPase Aktivität. Das führt dazu, dass die absoluten Werte der basalen ATPase Aktivität zwischen ca. 20-70 nmol  $\text{P}_i/\text{min}/\text{mg}$  Protein schwanken, die maximal stimulierte ATPase Aktivität schwankt dementsprechend zwischen 65-160 nmol  $\text{P}/\text{min}/\text{mg}$  Protein und die maximal inhibierte ATPase Aktivität schwankt zwischen ca. 10-20 nmol  $\text{P}/\text{min}/\text{mg}$  Protein. Die Tendenz hinsichtlich Aktivierung und Inhibierung ist zwar immer ähnlich, das absolute Ausmaß kann dadurch aber stark schwanken. Um die Ergebnisse, die mit den unterschiedlichen Membranen erhalten wurden, dennoch vergleichen zu können, erschien es daher sinnvoll diese relativ zur maximalen Stimulation beziehungsweise Inhibition bezogen auf die basale Aktivität abzubilden.

Bei der Interpretation der prozentualisierten Daten müssen einige wichtige Dinge beachtet werden. Die Fehler der Verbindungen, die die ATPase Aktivität aktivieren, erscheinen durch die Prozentualisierung kleiner, während die Fehler der Verbindungen, die die ATPase inhibieren, größer wirken. Das fällt besonders ins Gewicht, wenn sehr unterschiedliche Membranqualitäten verwendet werden, oder biphasische Verbindungen charakterisiert werden.

Die im weiteren Verlauf dieser Arbeit ermittelten  $\text{pEC}_{50}$ -Werte bzw.  $\text{EC}_{50}$ -Werte der Inhibitoren und Aktivatoren der ATPase Aktivität beziehen sich daher immer auf die Ursprungsdaten. Die maximalen Effekte  $E_{\text{max}}$  beziehen sich immer auf die prozentualisierten Werte.

### 4.7.3 Charakterisierung mit funktionellen Assays

Die Aktivität der beiden Substanzen Quercetin und Ko143 wurde in den funktionellen Assays Hoechst 33342 Assay und im Pheophorbid A Assay untersucht. Die erhaltenen Daten sind in Tabelle 4-8 aufgeführt.

**Tabelle 4-8: Ermittelte pIC<sub>50</sub>-Werte bzw. IC<sub>50</sub>-Werte von Ko143 und Quercetin mit PLB-985 ABCG2 Zellen im Hoechst 33342 Assay und Pheophorbid A Assay. n.b.: nicht bestimmbar**

Verbindung	Hoechst 33342 Assay		Pheophorbid A Assay	
	pIC <sub>50</sub> ± SD	IC <sub>50</sub> ± SD [µmol/l]	pIC <sub>50</sub> ± SD	IC <sub>50</sub> ± SD [µmol/l]
Ko143	6,32 ± 0,11	0,485 ± 0,082	6,28 ± 0,09	0,530 ± 0,073
Quercetin	n.b.	n.b.	5,51 ± 0,14	3,16 ± 0,68

Beide Verbindungen sind in der Lage, den Transport von Fluoreszenzfarbstoffen zu hemmen. Im Hoechst 33342 Assay ist die Aktivität von Quercetin gegenüber ABCG2 allerdings nicht bestimmbar. In einer Veröffentlichung von Shapiro et al. findet sich eine ausführliche Diskussion über die Fähigkeit von Quercetin, die Fluoreszenz von Hoechst 33342 zu quenchen.<sup>201</sup> Dies war bei steigender Konzentration von Quercetin in der Zelllinie PLB-985 Wildtyp an einer ausgeprägten Fluoreszenzabnahme von Hoechst 33342 erkennbar. Hier nicht gezeigte Messungen von Quercetin im Durchflusszytometer Guava®easyCyte™ zeigen allerdings, dass Quercetin bei der Wellenlänge von Hoechst 33342 selbst nicht fluoresziert. Dieser Quenchingeffekt trat im Pheophorbid A Assay nicht auf und es konnte ein pIC<sub>50</sub>-Wert von 5,51 für Quercetin ermittelt werden. Bei Quercetin handelt es sich daher um einen moderaten Modulator von ABCG2.

Ko143 ist mit einem pIC<sub>50</sub>-Wert von 6,32 im Hoechst 33342 Assay und einem pIC<sub>50</sub>-Wert von 6,28 im Pheophorbid A Assay in den funktionellen Assays ein guter Modulator von ABCG2. Die für Ko143 bestimmten pIC<sub>50</sub>-Werte finden sich auch in der Literatur.<sup>198,199</sup>

#### 4.7.4 5D3-Shift Assay

Im 5D3-Shift Assay liefern Ko143 und Quercetin, wie im ATPase Assay, ebenfalls gegensätzliche Ergebnisse. Die ermittelten  $pEC_{50}$ -Werte mit Standardabweichung sind in Tabelle 4-9 aufgeführt.

**Tabelle 4-9:  $pEC_{50}$ -Werte bzw.  $EC_{50}$ -Werte mit Standardabweichungen von Quercetin und Ko143 mit PLB-985 ABCG2 Zellen im 5D3-Shift-Assay.**

Verbindung	5D3-Shift Assay	
	$pEC_{50} \pm SD$	$EC_{50} \pm SD$ [nmol/l]
Ko143	7,43 $\pm$ 0,05	37,3 $\pm$ 2,8
Quercetin	6,62 $\pm$ 0,26	259 $\pm$ 106

Abbildung 4-32 zeigt die Graphen des 5D3-Shift Assays, kombiniert mit den in Kapitel 4.7.1 ermittelten ATPase-Daten. Die berechneten  $pEC_{50}$ -Werte von Ko143 im ATPase Assay mit 7,89 und im 5D3-Shift Assay mit 7,43 unterscheiden sich interessanterweise wenig, während die ermittelten Daten von Quercetin mit 7,41 im ATPase Assay und 6,63 im 5D3-Shift Assay größere Abweichungen aufweisen. Der durch Quercetin bewirkte 5D3-Shift liegt bei ungefähr 30 % des mit Ko143 erhaltenen Shifts, in Abbildung 4-32 als 100 % dargestellt.

Veröffentlichungen von Kryoelektronenmikroskopstrukturen von ABCG2 von Manolaridis, Jackson und Taylor mit einem Ko143-Analogon als Inhibitor der ATPase Aktivität und  $E_1S$  als Substrat und Aktivator der ATPase Aktivität in Kombination mit dem 5D3-Antikörper zeigen Hintergründe für den beobachteten 5D3-Shift.<sup>43-45</sup>

Die Bindung des Inhibitors Ko143 führt zu einer Hemmung der Funktionsfähigkeit von ABCG2. Die durch Ko143 stabilisierte Konformation von ABCG2 im nach außen geschlossenen Zustand führt durch die Stabilisierung des EL3-Loops, an dem der 5D3-Antikörper bindet, zu einer stärkeren Bindung des 5D3-Antikörpers.<sup>45</sup> Der hemmende Effekt von Vanadat und Ko143 auf die ATPase Aktivität im Vanadat-sensitiven ATPase Assay sind ähnlich. Ko143 interagiert mit der Substratbin-



dungsstelle von ABCG2.<sup>141</sup> Vanadat hingegen interagiert mit der Nukleotidbindungsstelle von ABC-Transportern.<sup>202,203</sup> Ko143 arretiert ABCG2 im nach innen geöffneten Zustand, Vanadat dagegen im nach außen geöffneten Zustand.<sup>43–45,204</sup> Dies lässt sich auch im 5D3-Shift Assay beobachten.<sup>141</sup> Ko143 führt ebenso wie ATP-Verarmung zu einem maximalen Shift, während Vanadat einen minimalen Shift bewirkt.

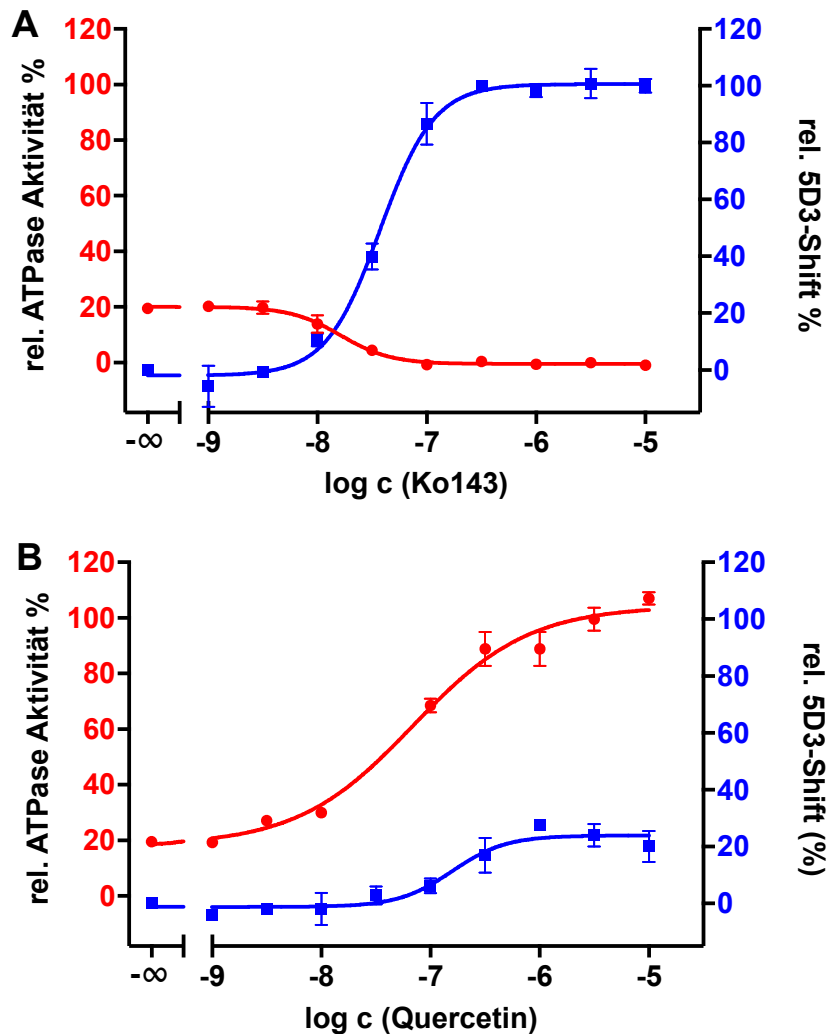


Abbildung 4-32: Effekt auf ATPase Aktivität und 5D3-Shift. ATPase Aktivität = rot (0 % = Ko143 1  $\mu\text{mol/l}$ , 100 % = Quercetin 1  $\mu\text{mol/l}$ ), 5D3-Shift = blau (0 % = negativ Kontrolle, 100 % = Ko143 1  $\mu\text{mol/l}$ ). A: Ko143. B: Quercetin.

Da Quercetin als Aktivator der ATPase Aktivität die Stimulation des Transporters bewirkt und somit die geschlossene Konformation von ABCG2 nicht stabilisiert, bindet der 5D3-Antikörper auch hier schwächer. Der durch Quercetin bewirkte 5D3-Shift liegt bei 30 % des mit Ko143 erhaltenen Shifts. Diese Größenordnung

findet sich auch in der Literatur. Es wird postuliert, dass Verbindungen, die die ATPase inhibieren einen 5D3-Shift von mindestens 70 % im Vergleich zu Ko143 bewirken.<sup>83</sup>

Dabei ist zu beachten, dass die Bindung des 5D3-Antikörpers an ABCG2 ebenfalls zu einer Reduktion der ATPase Aktivität führt und es sich somit auch um einen Inhibitor handelt.<sup>44,141</sup> Wird er zur Charakterisierung von Modulatoren eingesetzt, muss er daher in einer ausreichenden Verdünnung verwendet werden.<sup>141</sup>

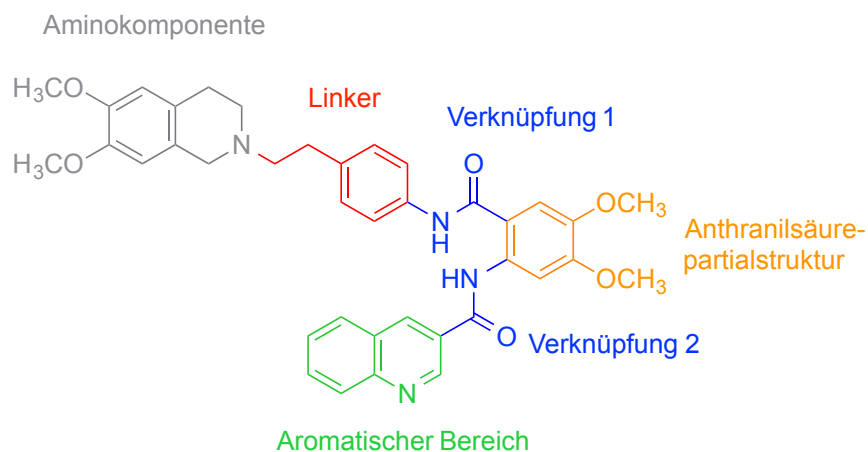
### 4.7.5 Schlussfolgerung

Quercetin und Ko143 eignen sich gut als Standardverbindungen für den Vanadat-sensitiven ATPase Assay, da sie ausgeprägten Effekte auf die ATPase Aktivität von ABCG2 haben. Die maximale Stimulation beziehungsweise Inhibition beider Verbindungen ist größer als die der anderen in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen.

Die Interaktion von Quercetin und Ko143 mit ABCG2 unterscheidet sich grundlegend. So handelt es sich bei Quercetin um einen Aktivator der basalen ATPase Aktivität und bei Ko143 um einen Inhibitor. Dies lässt sich nicht nur im Vanadat-sensitiven ATPase Assay, sondern auch im 5D3-Shift Assay beobachten. Da diese Unterscheidung in der Interaktion mit ABCG2 nicht aus den Ergebnissen der funktionellen Assays, Hoechst 33342 Assay und Pheophorbid A Assay, ableitbar sind, liefern die beiden Assays, Vanadat-sensitiven ATPase Assay und 5D3-Shift Assay, wertvolle ergänzende Erkenntnisse.

## 4.8 Untersuchung von Tariquidar-Analoga

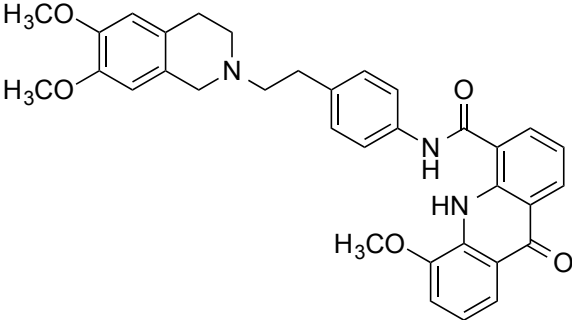
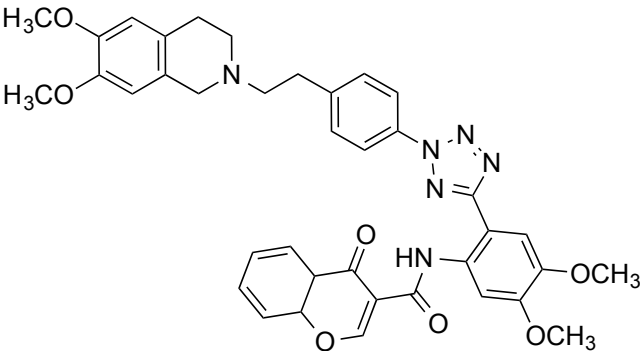
Die Verbindungen Tariquidar (XR9576) von Xenova und Elacridar (GF120918) von GlaxoSmithKline wurden vor ca. 20 Jahren als Hoffnungsträger zur Überwindung der MDR in der Krebstherapie entwickelt. Beide Verbindungen zeigten große inhibitorische Aktivität gegenüber ABCB1 und *in vivo* eine geringe Toxizität.<sup>37,205</sup> Sie sind strukturell ähnlich aufgebaut und bestehen aus einer basischen Aminokomponente, die über einen aromatischen Linker mit einem großen hydrophoben aromatischen Bereich verknüpft ist. Ursprünglich waren sie als Inhibitoren von ABCB1 entwickelt worden, allerdings hemmen sie ebenfalls ABCG2.<sup>206,207</sup> Die Strukturformel von Tariquidar mit allgemeinen Strukturmerkmalen ist in Abbildung 4-33 dargestellt.



**Abbildung 4-33: Strukturformel von Tariquidar mit allgemeinen Strukturmerkmalen nach Steggemann.<sup>208</sup>**

Man ging davon aus, dass Tariquidar und Elacridar als Zusatz bei der Chemotherapie für die klinische Anwendung bei MDR geeignet wären. Leider erfüllten sich die großen Erwartungen in klinischen Studien jedoch nicht.<sup>38,39</sup> Die großen Hoffnungen, die über die Jahre in die beiden Substanzen gesetzt wurden, führten allerdings dazu, dass eine Vielzahl an analogen Verbindungen synthetisiert wurden, z.B. das Tetrazol HM30181.

Tabelle 4-10: Strukturformeln von Elacridar und HM30181.

Verbindung	Strukturformel
<b>Elacridar</b>	
<b>HM30181</b>	

Auch in unserem Arbeitskreis wurden und werden seit rund 15 Jahren MDR-Modulatoren synthetisiert und an ABCB1, ABCC1 und ABCG2 charakterisiert. Darunter sind vielseitige Substanzbibliotheken mit Tariquidar-Analoga, Elacridar-Analoga und HM30181-Analoga. Die Bibliotheken tragen dabei das Namenskürzel des jeweiligen Synthetikers, so wurden die **WK**-Verbindungen von **Werner Klinkhammer**, die **KS**-Verbindungen von **Kerstin Steggemann**, die **MAC**-Verbindungen von **Matthias Christlieb** und die **SK**- bzw. **Kö**-Verbindungen von **Sebastian Köhler** synthetisiert. Mehrere Doktorarbeiten haben sich bereits mit diesen Verbindungen befasst.<sup>158,177,208–214</sup>

Eine der maßgeblichsten Entdeckungen wurde dabei in der Doktorarbeit von Anne Pick beschrieben. „Kleine“, nicht-basische Tariquidar-Analoga ohne Tetrahydroisochinolin führen zu einer Abnahme der Potenz der Verbindungen gegenüber ABCB1 und zu einer Zunahme der Potenz gegenüber ABCG2.<sup>158,210,215–217</sup> Das führte dazu, dass die von Werner Klinkhammer begonnene Substanzbibliothek von Tariquidar-Analoga, die überwiegend den Tetrahydroisochinolinrest enthielten, um eine Vielzahl von verkleinerten Verbindungen von Kerstin Steggemann

(Tariquidar-Analoga), Matthias Christlieb (Elacridar-Analoga) und Sebastian Köhler (HM30181-Analoga) ergänzt wurde.

Der im Laufe dieser Arbeit etablierte und optimierte Vanadat-sensitive ATPase Assay eröffnete neue Möglichkeiten zur Charakterisierung dieser vielseitigen Substanzklassen.

Telbisz et al. beschreiben Tariquidar und Elacridar als Inhibitoren der basalen ATPase Aktivität.<sup>83</sup> Telbisz et al. vermuten, dass die Molekülgröße bei der Aktivierung oder Inhibition der basalen ATPase Aktivität eine Rolle spielen könnte.<sup>69</sup> Voruntersuchungen von verkleinerten SK-Verbindungen ohne Tetrahydroisochinolinrest mit Hilfe des Vanadat-sensitiven ATPase Assays, zeigten eine Aktivierung der basalen ATPase Aktivität.

Aufgrund dieser Beobachtung wurde untersucht, ob es sich bei den Tariquidar-Analoga unserer Substanzbibliothek mit Tetrahydroisochinolinrest, um Inhibitoren der basalen ATPase Aktivität handelt. Daneben wurde untersucht, ob die verkleinerten Tariquidar-Analoga ohne Tetrahydroisochinolinrest Aktivatoren der basalen ATPase Aktivität sein könnten. Zur Überprüfung dieser Hypothesen wurde zunächst ein kleines Set Substanzen mit bzw. ohne Tetrahydroisochinolinrest im Vanadat-sensitiven ATPase Assay getestet.

Als erste Ergebnisse diese Annahme zu stützen schienen, wurde der Testsatz der Tariquidar-Analoga vergrößert.

Die getesteten Verbindungen enthalten jeweils die in Abbildung 4-34 dargestellten Grundstrukturen. Bei der Auswahl der Substanzen dabei wurde darauf geachtet, dass für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse, gleiche Substituenten, vor allem in Position R<sup>2</sup>, an den verschiedenen Grundstrukturen vorlagen.

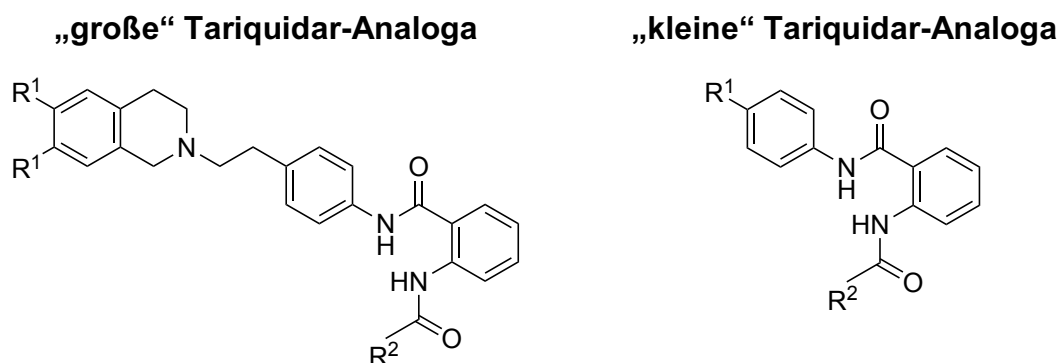
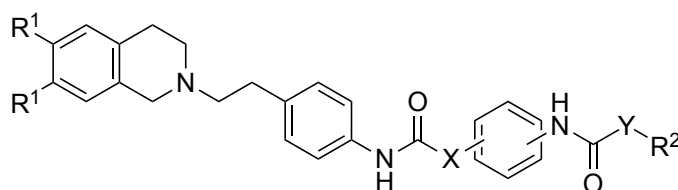


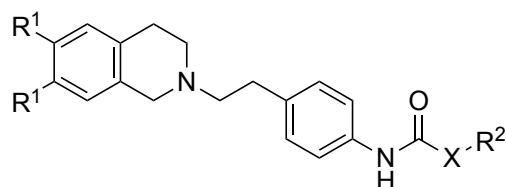
Abbildung 4-34: Testsatz der Tariquidar-Analoga mit und ohne Tetrahydroisochinolin.

Im nächsten Schritt wurde das Set von Verbindungen aus Abbildung 4-34 um Verbindungen mit größeren Variationen der Grundstruktur erweitert. Die veränderten Grundstrukturen sind in Abbildung 4-35 abgebildet.

**„große“ Tariquidar-Analoga mit variiertem Linker 1 und 2**



**„große“ Tariquidar-Analoga mit variiertem Linker 1 ohne Anthranilsäurepartialstruktur**



**„kleine“ Tariquidar-Analoga mit variiertem Linker 1 und 2**

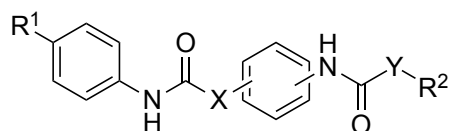


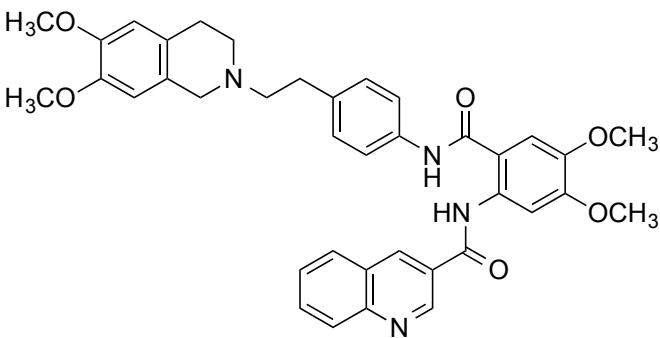
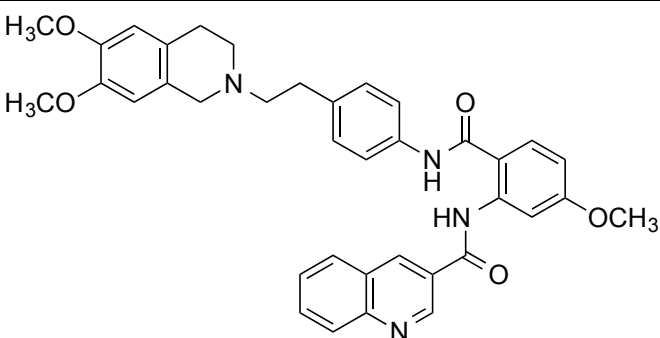
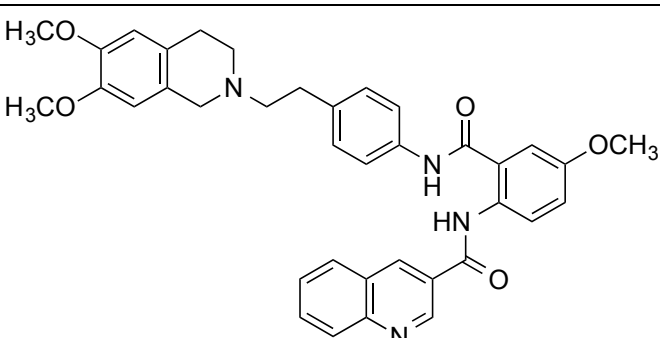
Abbildung 4-35: Testsatz der Tariquidar-Analoga mit Variation der Grundstruktur mit und ohne Tetrahydroisochinolin.

Die Verbindungen wurden im Folgenden mit dem Vanadat-sensitiven ATPase Assay und funktionell im Hoechst 33342 Assay und Pheophorbid A Assay untersucht, um die Ergebnisse der verschiedenartigen Assays hier direkt vergleichen zu können.

#### 4.8.1 Tariquidar

Die Testreihe wurde mit Tariquidar und strukturell sehr ähnlichen Verbindungen, die an der Anthranilsäurepartialstruktur modifiziert sind, begonnen. Die Strukturformeln sind in Tabelle 4-11 abgebildet.

Tabelle 4-11: Tariquidar und Analoga mit variiertes Anthranilsäurepartialstruktur.

Verbindung	Strukturformel
Tariquidar	
KS-321	
KS-333	

Verbindung	Strukturformel
WK-X-32	

#### 4.8.1.1 Vanadat-sensitiver ATPase Assay

Die Effekte von Tariquidar und der analogen Verbindungen auf die basale ATPase Aktivität sind in Tabelle 4-12 aufgeführt.

Tabelle 4-12: Effekt auf die basale ATPase Aktivität gemessen bis 10  $\mu\text{mol/l}$ .

Verbindung	Effekt auf ATPase Aktivität	$\text{pEC}_{50} \pm \text{SD}$	$\text{EC}_{50} \pm \text{SD}$ [nmol/l]	$\text{E}_{\text{max}} \pm \text{SD}$ [%]
Tariquidar	Inhibition	$5,11 \pm 0,11$	$7870 \pm 1320$	$-59 \pm 3$
KS-321	Inhibition	$7,98 \pm 0,35$	$12,1 \pm 6,9$	$-81 \pm 2$
KS-333	Inhibition	$5,59 \pm 0,36$	$2980 \pm 1760$	$-22 \pm 6$
WK-X-32	Inhibition	$7,51 \pm 0,28$	$33,8 \pm 15,0$	$-74 \pm 35$

Alle Verbindungen zeigen eine Inhibition der basalen ATPase Aktivität. In Abbildung 4-36 sind die Verläufe der ATPase Aktivität von Tariquidar, KS-321 und KS-333 abgebildet. Verbindung KS-321, welche nur eine Methoxygruppe an der Anthranilsäurepartialstruktur in Position 5 trägt, hat im Vergleich mit Tariquidar einen stärker inhibitorischen Effekt auf die ATPase Aktivität. Verbindung KS-333, welche eine Methoxygruppe in Position 4 trägt, hat einen höheren  $\text{E}_{\text{max}}$ -Wert als Tariquidar. Die Verbindung WK-X-32, die keine Methoxygruppen an der Anthranilsäurepartialstruktur besitzt, hat einen ähnlichen inhibitorischen und einen ähnlichen maximalen Effekt auf die Hemmung der ATPase Aktivität wie KS-321. Offenbar hat der Wegfall des Substituenten in Position 4 einen Einfluss auf die Interaktion der Verbindungen mit ABCG2. Auch Kühnle et al. beobachteten bei



Tariquidar-Analoga bei Wegfall des Substituenten in Position 4 eine Verstärkung des Einflusses der Verbindungen auf ABCG2 in einem Mitoxantronefflux Assay.<sup>218</sup>

In der Literatur finden sich widersprüchliche Angaben über den Effekt von Tariquidar auf die ATPase Aktivität. Kannan et al. sowie Li et al. beschreiben Tariquidar in einem Berylliumfluorid-sensitiven ATPase Assay als Aktivator der ATPase Aktivität.<sup>207,219</sup> Telbisz et al. und Locher et al. berichten mit dem Vanadat-sensitiven ATPase Assay über eine Inhibierung der ATPase durch Tariquidar bzw. eines Tariquidar-Analogons.<sup>44,83</sup> In der vorliegenden Arbeit wurden die Versuche mit Tariquidar, KS-321 und KS-333 im Röhrchen mit Hilfe des Vanadat-sensitiven ATPase Assays, wie auch von Telbisz et al., nach der Methode von Sarkadi et al. durchgeführt.<sup>11,151</sup>

Möglicherweise könnten die Hintergründe der sich widersprechenden Literaturquellen in der unterschiedlichen Ausführung der Methoden liegen.

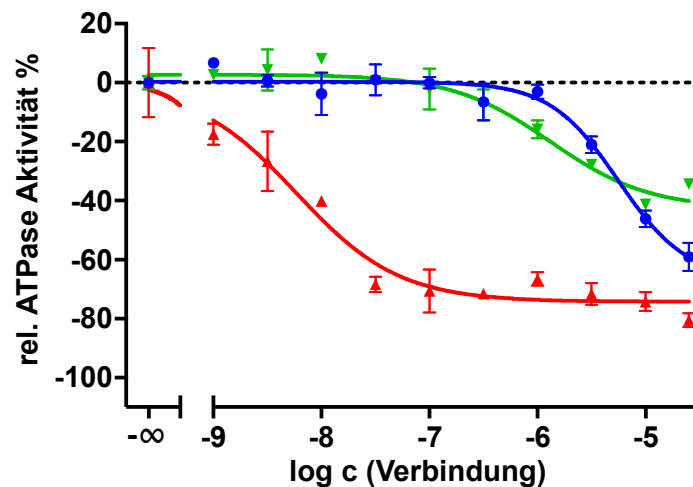


Abbildung 4-36: Effekt auf die basale ATPase Aktivität von Tariquidar (●), KS-321 (▲) und KS-333 (▼).

#### 4.8.1.2 Charakterisierung mit funktionellen Assays

Die Substanzen wurden auch funktionell im Hoechst 33342 Assay und im Pheophorbid A Assay mit MDCK II BCRP-Zellen untersucht. Die ermittelten  $pIC_{50}$ -Werte und  $IC_{50}$ -Werte mit Standardabweichung sind in Tabelle 4-13 aufgeführt.

**Tabelle 4-13: Ermittelte  $pIC_{50}$ -Werte bzw.  $IC_{50}$ -Werte mit MDCK II BCRP Zellen im Hoechst 33342 Assay und Pheophorbid A Assay.**

Verbindung	Hoechst 33342 Assay		Pheophorbid A Assay	
	$pIC_{50} \pm SD$	$IC_{50} \pm SD$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$pIC_{50} \pm SD$	$IC_{50} \pm SD$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]
Tariquidar	$6,22 \pm 0,04$	$0,604 \pm 0,037$	$5,33 \pm 0,12$	$4,76 \pm 0,87$
KS-321	$6,57 \pm 0,04$	$0,270 \pm 0,016$	$6,14 \pm 0,11$	$0,735 \pm 0,123$
KS-333	$5,77 \pm 0,08$	$1,71 \pm 0,21$	$5,58 \pm 0,12$	$2,67 \pm 0,49$
WK-X-32	$5,46 \pm 0,20$	$3,85 \pm 1,85$	$5,50 \pm 0,13$	$3,22 \pm 0,64$

Der Einfluss der Methoxygruppen an der Anthranilsäurepartialstruktur auf die Interaktionsstärke mit ABCG2 ist im Vanadat-sensitiven ATPase Assay deutlich erkennbar. KS-321 und WK-X-32 hemmen die ATPase Aktivität mit ca. zwei log-Einheiten stärker als Tariquidar oder KS-333. In den funktionellen Assays Hoechst 33342 Assay und Pheophorbid A Assay ist ein stärkerer Einfluss auf die Funktion von ABCG2 jedoch nur für KS-321 erkennbar. Die Verbindung WK-X-32, die keine Methoxygruppen an der Anthranilsäurepartialstruktur besitzt, zeigt in fluoreszenz-basierten Assays eine deutlich schwächere Aktivität als im ATPase Assay.

Die Verbindungen Tariquidar, KS-321 und KS-333 zeigen im Hoechst 33342 Assay eine höhere inhibitorische Aktivität als im Pheophorbid A Assay. Dies trifft besonders auf Tariquidar zu. Dafür kommen verschiedene mögliche Ursachen in Betracht. Zum einen sind die Verbindungen leicht farbig und könnten wie andere farbige Verbindungen, z.B. Quercetin, die Fluoreszenz von Hoechst 33342 beeinflussen.<sup>201</sup> Außerdem ist Tariquidar ein potenter Inhibitor von ABCB1.<sup>77,84</sup> Canines ABCB1 kommt nativ in den MDCK II BCRP Zellen vor, kann ebenfalls Hoechst 33342 transportieren und ist so in der Lage, die im Hoechst 33342 Assay erhaltenen Ergebnisse zu beeinflussen.<sup>162</sup>

### 4.8.2 Tariquidar-Analoga

Zunächst wurden aus der Substanzbibliothek Verbindungen getestet, die sich in der Anwesenheit bzw. Abwesenheit des Tetrahydroisochinolinrestes unterscheiden und Variationen im aromatische Bereich enthalten. Die Verknüpfungen der Grundstruktur bleiben unverändert. Keine der Verbindungen enthält Methoxygruppen an der Anthranilsäurepartialstruktur.

Die Grundstrukturen der Verbindungen sind in Tabelle 4-14 wiedergegeben.

**Tabelle 4-14: Grundstrukturen der „großen“ und „kleinen“ Tariquidar-Analoga.**

„große“ Tariquidar-Analoga	„kleine“ Tariquidar-Analoga
Gruppe 1	Gruppe 2

Bei der Zusammenstellung der Verbindungen wurden in beiden Gruppen Substanzen mit möglichst ähnlichem Substitutionsmuster ausgesucht, um durch ähnliche elektronenziehende oder elektronenschiebende Gruppen, eine Vergleichbarkeit der Gruppen untereinander zu erreichen. Die Substituenten der untersuchten Verbindungen von Gruppe 1 und Gruppe 2 sind in Tabelle 4-15 dargestellt. Die Verbindung XR9577, wurde in mehreren vorangegangenen Doktorarbeiten als Standardvergleichssubstanz für ABCG2 benutzt.<sup>158,177,210</sup> Da die Verbindung neben Ko143 auch hier als Standard benutzt wurde, ist sie im Rahmen dieser Arbeit mit dem Xenova-Namen XR9577, anstatt der internen Kennzeichnung WK-X-24, gekennzeichnet.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 4-15: Strukturen der untersuchten WK-Verbindungen und KS-Verbindungen aus Gruppe 1 und Gruppe 2.**

<b>Verbindung</b>	<b>R<sup>1</sup></b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>3</sup></b>
<b>Gruppe 1</b>			
WK-X-19	H	Phenyl	-
XR9577	H	3-Chinolyl	-
WK-X- 23	H	2-Nitrophenyl	-
WK-X-36	H	4-Nitrophenyl	-
WK-X-25	H	4-Metylphenyl	-
WK-X-38	H	3,4-Methoxyphenyl	-
WK-X-41	H	4-Cyanophenyl	-
WK-X-18	OCH <sub>3</sub>	Phenyl	-
WK-X-32	OCH <sub>3</sub>	3-Chinolyl	-
WK-X-29	OCH <sub>3</sub>	4-Metylphenyl	-
WK-X-34	OCH <sub>3</sub>	3,4-Methoxyphenyl	-
WK-X-75	OCH <sub>3</sub>	4-Cyanophenyl	-
<b>Gruppe 2</b>			
WK-X-7	HOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	Phenyl	-
WK-X-9	HOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	2-Nitrophenyl	-
WK-X-27	HOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	4-Nitrophenyl	-
WK-X-28	HOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	4-Metylphenyl	-
KS-157	HOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	3,4-Methoxyphenyl	-
KS-144	HOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	4-Cyanophenyl	-
WK-X-20	HOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	2-Aminophenyl	-
KS-167	H	3-Chinolyl	-
KS-168	H	4-Nitrophenyl	-
KS-251	OH	4-Nitrophenyl	-
KS-174	(C=O)Phenyl	4-Nitrophenyl	-
KS-166	H	3,4-Methoxyphenyl	-
KS-274	HOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	4-Nitrophenyl	Naphtyl

#### 4.8.2.1 Vanadat-sensitiver ATPase Assay

Die Verbindungen wurden mit Hilfe des Vanadat-sensitiven ATPase Assays untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 4-16 aufgeführt.

**Tabelle 4-16: Effekt auf die basale ATPase Aktivität gemessen bis 10  $\mu\text{mol/l}$ . n.b. = nicht bestimmbar.**

Verbindung	Effekt auf ATPase Aktivität	$\text{pEC}_{50} \pm \text{SD}$	$\text{EC}_{50} \pm \text{SD}$ [nmol/l]	$\text{E}_{\text{max}} \pm \text{SD}$ [%]
<b>Gruppe 1</b>				
WK-X-19	Inhibition	$6,37 \pm 0,38$	$504 \pm 316$	$-86 \pm 15$
XR9577	Inhibition	$8,16 \pm 0,26$	$7,48 \pm 3,07$	$-77 \pm 11$
WK-X- 23	Inhibition	$6,36 \pm 0,74$	$820 \pm 1340$	$-77 \pm 16$
WK-X-36	Inhibition	$6,72 \pm 0,71$	$340 \pm 504$	$-51 \pm 15$
WK-X-25	Inhibition	$6,47 \pm 0,64$	$543 \pm 680$	$-64 \pm 3$
WK-X-38	Inhibition	$6,98 \pm 0,35$	$121 \pm 69$	$-64 \pm 31$
WK-X-41	Inhibition	$7,03 \pm 0,02$	$93,4 \pm 2,8$	$-87 \pm 11$
WK-X-18	Inhibition	$5,36 \pm 0,75$	$8340 \pm 13600$	$-69 \pm 33$
WK-X-32	Inhibition	$7,51 \pm 0,28$	$33,8 \pm 15,0$	$-74 \pm 35$
WK-X-29	Inhibition	$5,62 \pm 0,49$	$3160 \pm 2720$	$-58 \pm 2$
WK-X-34	Inhibition	$6,19 \pm 0,66$	$1070 \pm 1400$	$-59 \pm 12$
WK-X-75	Inhibition	$6,23 \pm 0,12$	$599 \pm 110$	$-49 \pm 6$
<b>Gruppe 2</b>				
WK-X-7	Aktivierung	$6,89 \pm 0,08$	$129 \pm 16$	$47 \pm 7$
WK-X-9	Aktivierung	$6,67 \pm 0,03$	$214 \pm 10$	$38 \pm 3$
WK-X-27	Aktivierung	$7,84 \pm 0,45$	$18,2 \pm 14,1$	$72 \pm 0,5$
WK-X-28	Aktivierung	$7,67 \pm 0,09$	$21,6 \pm 3,0$	$63 \pm 4$
KS-157	Aktivierung	$8,56 \pm 0,61$	$4,23 \pm 4,92$	$48 \pm 3$
KS-144	Aktivierung	$7,51 \pm 0,11$	$31,3 \pm 5,3$	$54 \pm 6$
WK-X-20	Aktivierung	$6,85 \pm 0,05$	$142 \pm 11$	$73 \pm 0,5$
KS-167	Aktivierung	$8,34 \pm 0,30$	$5,07 \pm 2,43$	$61 \pm 1$
KS-168	Aktivierung	$7,38 \pm 0,19$	$43,5 \pm 12,8$	$54 \pm 7$
KS-251	Aktivierung	$7,75 \pm 0,21$	$18,7 \pm 6,1$	$74 \pm 1$
KS-174	Aktivierung	$8,55 \pm 0,27$	$3,07 \pm 1,31$	$46 \pm 5$

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Verbindung	Effekt auf ATPase Aktivität	pEC <sub>50</sub> ± SD	EC <sub>50</sub> ± SD [nmol/l]	E <sub>max</sub> ± SD [%]	
KS-166	biphasisch	max	8,66 ± 0,69	4,35 ± 6,13	47 ± 7
		min	4,73 ± 0,26*	20100 ± 8300*	0 ± 7 <sup>#</sup>
KS-274	biphasisch	max	8,42 ± 0,43	4,70 ± 3,43	61 ± 2
		min	n.b.	n.b.	34 ± 3 <sup>#</sup>

\* gefittet auf Ko143 1 µmol/l. # maximaler Effekt bei 10 µmol/l.

Alle Substanzen aus Gruppe 1, die den Tetrahydroisochinolinrest enthalten, inhibieren die basale ATPase Aktivität. Fehlt der Tetrahydroisochinolinrest bei den Verbindungen der Gruppe 2, wird die basale ATPase Aktivität gesteigert. Die Verbindungen lassen sich also, wie angenommen, nicht nur hinsichtlich ihrer Grundgerüste, sondern auch hinsichtlich ihrer Interaktion mit der ATPase Aktivität von ABCG2 uneingeschränkt in die beiden Gruppen aufteilen. Der Tetrahydroisochinolinrest ist offensichtlich von grundlegender Bedeutung für die Interaktion der Verbindungen mit ABCG2.

Die Substanz XR9577 aus Gruppe 1 inhibiert die basale ATPase Aktivität mit einem pEC<sub>50</sub>-Wert von 8,16 und einem E<sub>max</sub> von -77 % innerhalb der Gruppe 1 in der niedrigsten Konzentration. Das Pendant WK-X-32, welches Methoxygruppen am Tetrahydroisochinolin trägt, ist mit einem pEC<sub>50</sub>-Wert von 7,51 und einem E<sub>max</sub> von 74 % ebenfalls in der Lage die ATPase Aktivität in niedrigen Konzentrationen zu hemmen. Die Verbindungen WK-X-18, mit einem pEC<sub>50</sub>-Wert von 5,36 und einem E<sub>max</sub> von -69 % und WK-X-29, mit einem pEC<sub>50</sub>-Wert von 5,62 und einem E<sub>max</sub> von -58 % , hemmen die ATPase Aktivität erst im mikromolaren Bereich. Keine der Substanzen aus Gruppe 1 erreicht die gleiche Inhibition der ATPase Aktivität, die durch Ko143 erhalten werden kann, allerdings kommen WK-X-19 mit einem E<sub>max</sub> von -86 % und WK-X-41 mit einem E<sub>max</sub> von -87 % der maximalen Inhibition von -100 % von Ko143 nahe.

In Abbildung 4-37 sind die Effekte auf die basale ATPase Aktivität für WK-X-32 als Vertreter für die ATPase Inhibitoren, für KS-168 als Vertreter für die ATPase Aktivatoren, und KS-274 als Vertreter für die biphasische Modulatoren der ATPase Aktivität abgebildet.

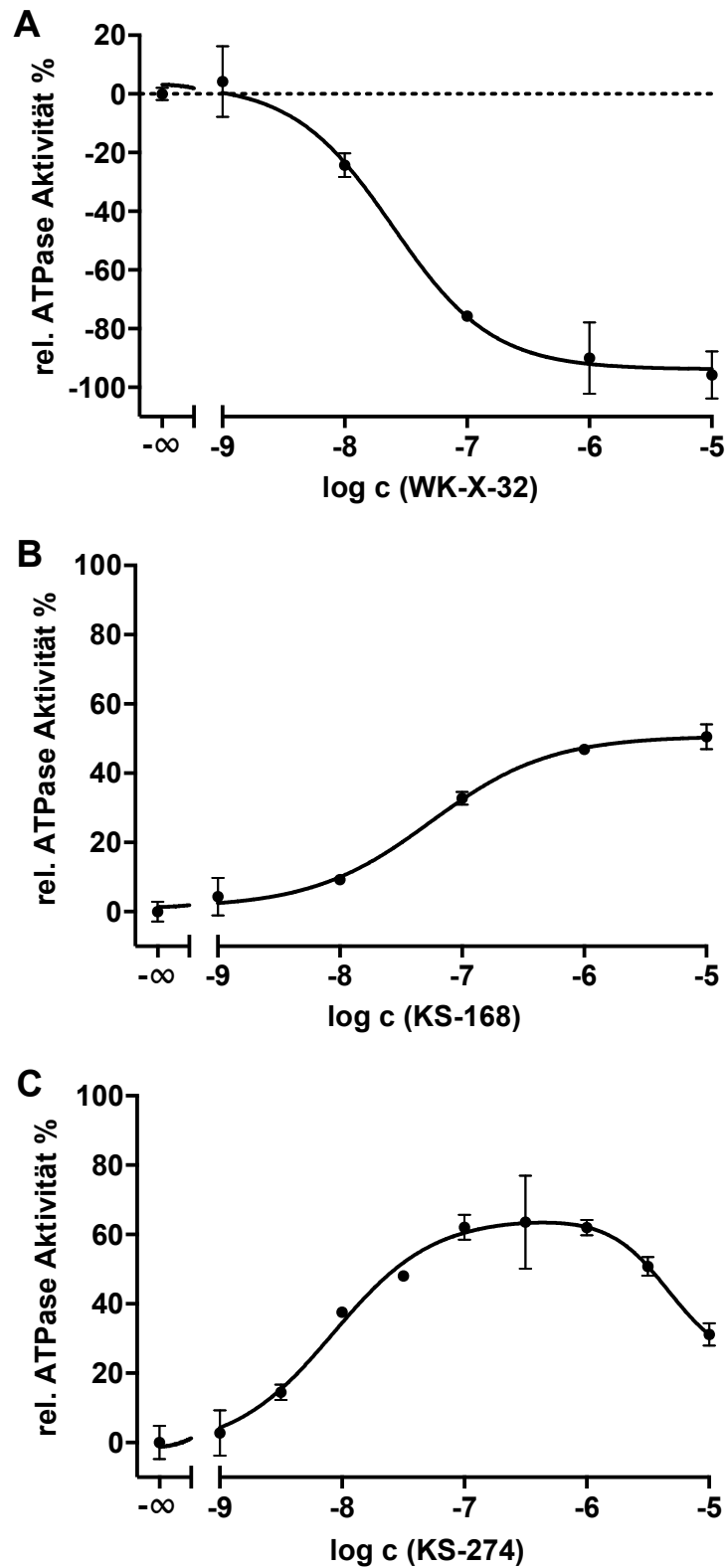


Abbildung 4-37: Effekt auf die basale ATPase Aktivität bis 10  $\mu\text{mol/l}$ . A: WK-X-32. B: KS-168. C: KS-274.

Die „kleinen“ Tariquidar-Analoga der Gruppe 2 ohne Tetrahydroisochinolinrest stimulieren die ATPase Aktivität. Die Verbindung KS-157 mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 8,56 und einem  $E_{max}$  von 48 %, Verbindung KS-167 mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 8,34 und einem  $E_{max}$  von 61 % und KS-174 mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 8,55 und einem  $E_{max}$  von 46 % stimulieren die ATPase Aktivität in niedrigen nanomolaren Konzentrationen. Die Stimulation der ATPase Aktivität von WK-X-27, mit einem  $E_{max}$  von 72 %, WK-X-20, mit einem  $E_{max}$  von 73 % und KS-251, mit einem  $E_{max}$  von 74 %, erreichen mit über 70 % im Vergleich mit Quercetin die höchste Aktivierung.

Die Verbindungen KS-166 und KS-274 steigern die ATPase Aktivität zunächst konzentrationsabhängig bis 1  $\mu\text{mol/l}$ , danach nimmt die Stimulation erneut ab. KS-166 trägt als  $R^2$  einen 3,4-Methoxyphenylrest, KS-274 besitzt an  $R^3$  einen Naphtylrest, ist aber sonst wie WK-X-27 identisch substituiert. Der biphasische Effekt auf die ATPase Aktivität ist bei diesen beiden Verbindungen deutlich ausgeprägt, tritt aber mit leichter Tendenz bei allen Verbindungen auf, die einen 3,4-Methoxyphenylrest oder ein 4-Nitrophenyl-Substituenten besitzen.

Vergleicht man innerhalb der Gruppe 1, die Verbindungspärchen mit und ohne Methoxygruppen an Position 6 und 7 am Tetrahydroisochinolinrest, WK-X-19 und WK-X-18, XR9577 und WK-X-32, WK-X-25 und WK-X-29, WK-X-38 und WK-X-34 und WK-X-41 und WK-X-75, fällt auf, dass die Verbindungen, die keine Methoxygruppen enthalten, die ATPase Aktivität in niedrigeren Konzentrationen hemmen als die Verbindungen die Methoxygruppen enthalten. Die Korrelation der  $pEC_{50}$ -Werte der Verbindungspärchen ist in Abbildung 4-38 abgebildet. Interessanterweise korrelieren die  $E_{max}$ -Werte mit einem  $r^2$ -Wert von 0,063 jedoch nicht.

Die Methoxygruppen in Position 6 und 7 am Tetrahydroisochinolinrest führen im Vanadat-sensitiven ATPase Assay, wie auch in der Literatur von Pick et al. und Pajeva et al. beschrieben, zu einer Verschlechterung der Hemmwirkung gegenüber ABCG2. In diesem Fall um 0,7 bis 1 log-Einheiten.<sup>220,221</sup>



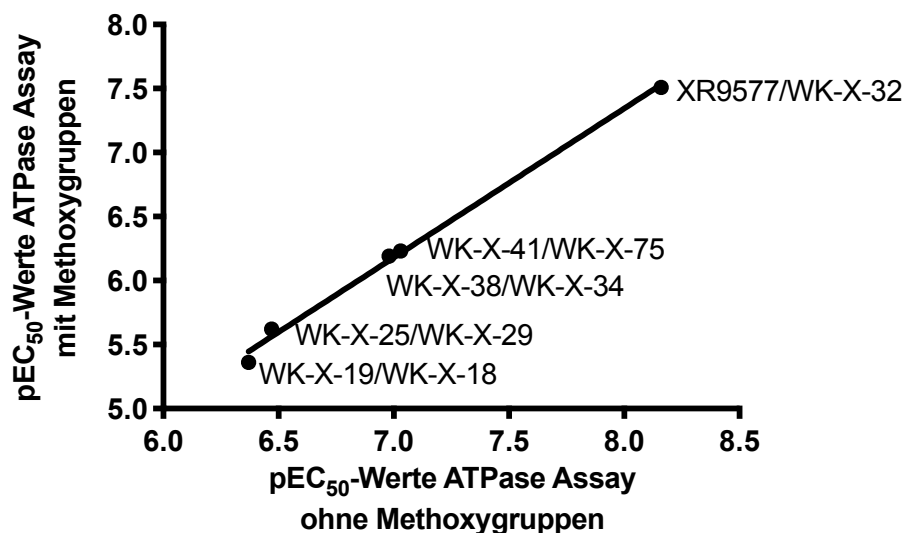


Abbildung 4-38: Korrelation der  $pEC_{50}$ -Werte des Vanadat-sensitiven ATPase Assays der Verbindungspaare aus Gruppe 1 mit und ohne Methoxygruppen am Tetrahydroisochinolin  $r^2=0,996$

#### 4.8.2.2 Charakterisierung mit Hilfe von funktionellen Assays

Zur vollständigen Charakterisierung der Verbindungen wurden diese mit den funktionellen Assays Hoechst 33342 Assay und Pheophorbid A Assay an MDCK II BCRP und PLB-985 ABCG2 untersucht. Die erhaltenen  $pIC_{50}$ -Werte und  $IC_{50}$ -Werte mit Standardabweichungen sind für die Versuche mit MDCK II BCRP Zellen in Tabelle 4-17 aufgeführt.

Tabelle 4-17: Ermittelte  $pIC_{50}$ -Werte bzw.  $IC_{50}$ -Werte der WK- und KS-Verbindungen mit MDCK II BCRP mit Hilfe des Hoechst 33342 Assays und Pheophorbid A Assays. n.b. = nicht bestimmbar bis 52  $\mu\text{mol/l}$ .

Verbindung	Hoechst 33342 Assay		Pheophorbid A Assay	
	$pIC_{50} \pm SD$	$IC_{50} \pm SD$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$pIC_{50} \pm SD$	$IC_{50} \pm SD$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]
<b>Gruppe 1</b>				
WK-X-19	$5,11 \pm 0,09^*$	$7,84 \pm 1,08^*$	$5,44 \pm 0,45^*$	$4,58 \pm 3,53^*$
XR9577	$6,21 \pm 0,24$	$0,659 \pm 0,248$	$6,36 \pm 0,22$	$0,462 \pm 0,158$
WK-X-23	$5,11 \pm 0,15^*$	$7,97 \pm 1,84^*$	$4,97 \pm 0,22^*$	$11,3 \pm 3,9^*$
WK-X-36	$5,99 \pm 0,04$	$1,02 \pm 0,06$	$5,72 \pm 0,05$	$1,91 \pm 0,15$
WK-X-25	$5,45 \pm 0,31^*$	$3,96 \pm 1,97^*$	$5,58 \pm 0,16$	$2,71 \pm 0,67$

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Verbindung	Hoechst 33342 Assay		Pheophorbid A Assay	
	pIC <sub>50</sub> ± SD	IC <sub>50</sub> ± SD [µmol/l]	pIC <sub>50</sub> ± SD	IC <sub>50</sub> ± SD [µmol/l]
WK-X-38	5,36 ± 0,14	4,47 ± 0,96	5,38 ± 0,03	4,17 ± 0,19
WK-X-41	5,63 ± 0,04	2,35 ± 0,14	5,52 ± 0,08	3,04 ± 0,37
WK-X-18	4,96 ± 0,02*	11,0 ± 0,3*	5,08 ± 0,02*	8,32 ± 0,25*
WK-X-32	5,46 ± 0,20	3,85 ± 1,85	5,50 ± 0,13	3,22 ± 0,64
WK-X-29	5,68 ± 0,23	2,22 ± 0,80	-	-
WK-X-34	5,73 ± 0,12	1,89 ± 0,35	5,40 ± 0,12	4,05 ± 0,74
WK-X-75	5,91 ± 0,17	1,27 ± 0,33	5,36 ± 0,18	4,53 ± 1,26
<b>Gruppe 2</b>				
WK-X-7	4,76 ± 0,12*	17,7 ± 3,2*	5,02 ± 0,08	9,62 ± 1,17
WK-X-9	4,65 ± 0,21*	23,6 ± 7,7*	5,16 ± 0,01	6,92 ± 0,11
WK-X-27	5,68 ± 0,02	2,09 ± 0,06	5,60 ± 0,19	2,62 ± 0,77
WK-X-28	5,85 ± 0,24	1,51 ± 0,57	5,57 ± 0,28	2,95 ± 1,31
KS-157	5,60 ± 0,05	2,52 ± 0,19	5,51 ± 0,04	3,03 ± 0,18
KS-144	5,36 ± 0,02*	4,37 ± 0,13*	5,19 ± 0,08	6,50 ± 0,79
WK-X-20	4,95 ± 0,17	11,6 ± 2,0	5,09 ± 0,09	8,19 ± 1,00
KS-167	n.b.	n.b.	5,34 ± 0,05	4,58 ± 0,35
KS-168	n.b.	n.b.	5,06 ± 0,13	8,88 ± 1,77
KS-251	5,85 ± 0,02	1,41 ± 0,04	5,63 ± 0,07	2,36 ± 0,25
KS-174	n.b.	n.b.	4,30 ± 0,14	51,3 ± 11,0
KS-166	6,09 ± 0,11	0,824 ± 0,139	5,69 ± 0,12	2,08 ± 0,38
KS-274	6,15 ± 0,05	0,710 ± 0,054	5,89 ± 0,38	1,52 ± 0,96

\* gefittet auf Top XR9577.

Die Verbindungen KS-167, KS-168 und KS174 aus Gruppe 2 lassen sich im Hoechst 33342 Assay nicht vermessen, während die Interaktion der Substanzen im Pheophorbid A Assay ermittelbar ist. Möglicherweise könnte dies ähnlich wie bei Quercetin durch Fluoreszenzlöschung von Hoechst 33342 bedingt sein.<sup>201</sup> Die beiden Verbindungen KS-166 und KS-274, die jeweils eine biphasische ATPase Aktivierung bewirken, liefern im Hoechst 33342 Assay bessere Ergebnisse als im Pheophorbid A Assay.

Die Substituenten an R<sup>2</sup> scheinen für die Aktivität der Verbindungen in den funktionellen Assays bedeutend zu sein. Die Verbindungen WK-X-19, WK-X-18 und WK-X-7, die einen unsubstituierten Phenylring aufweisen und die Verbindungen WK-X-23, WK-X-9 mit einem 2-Nitrophenylrest zeigen eine schwache Aktivität in beiden funktionellen Assays. Die Verbindung KS-174 zeigte im Hoechst 33342 Assay keine und im Pheophorbid A Assay eine schlechte Aktivität gegenüber ABCG2. Allerdings lässt sich für diese Verbindungen durch die Ergebnisse des ATPase Assays keine schlechte Interaktion mit ABCG2 bestätigen.

Für die Verbindungspaare mit oder ohne Methoxygruppen in Position 6 und 7 am Tetrahydroisochinolinrest der Gruppe 1 (WK-X-19 und WK-X-18, XR9577 und WK-X-32, WK-X-25 und WK-X-29, WK-X-38 und WK-X-34, WK-X-41 und WK-X-75) ist anders als im Vanadat-sensitiven ATPase Assay in den funktionellen Assays kein systematischer Einfluss auf die ABCG2 Interaktion durch Ab- oder Anwesenheit der Methoxygruppen am Tetrahydroisochinolinrest zu beobachten.

### **4.8.3 Tariquidar-Analoga mit Tetrahydroisochinolinrest mit veränderter Grundstruktur**

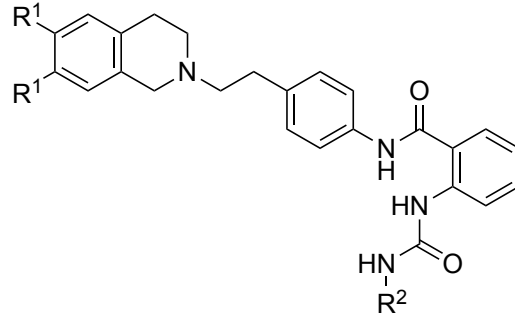
Um weitere Ursachen für die grundlegend verschiedenen Effekte der Tariquidar-Analoga auf die basale ATPase Aktivität zu untersuchen, wurden weitere Verbindungen untersucht. Es sollte dabei überprüft werden, ob tatsächlich nur der Tetrahydroisochinolinrest ausschlaggebend für die gegensätzliche Interaktion der Tariquidar-Analoga mit der ATPase von ABCG2 ist oder ob andere Faktoren wie die Molekülgröße ausschlaggebend sein könnten.

Dafür wurden zuerst „große“ Tariquidar-Analoga mit veränderten Verknüpfungsmustern analysiert. Zunächst wurden Verbindungen untersucht, die Veränderungen in Verknüpfung 1 und Verknüpfung 2 aufweisen. Die Grundstrukturen sind in Tabelle 4-18 dargestellt.

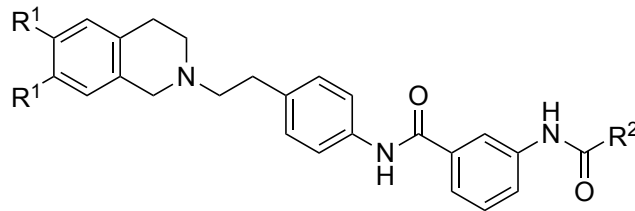
Tabelle 4-18: Grundstrukturen der untersuchten „großen“ Tariquidar-Analoga mit verändertem Verknüpfungsmuster.

**„große“ Tariquidar-Analoga**

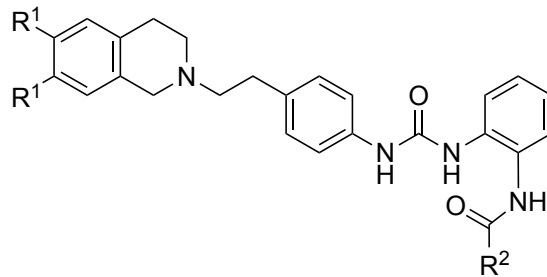
**Gruppe 3**



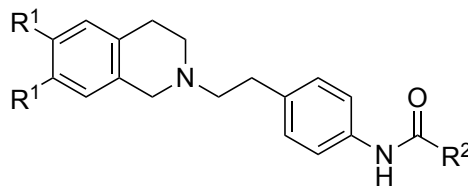
**Gruppe 4**



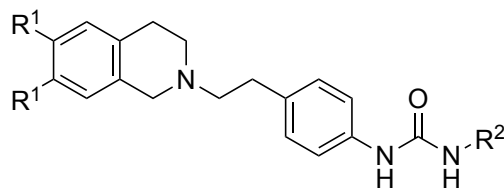
**Gruppe 5**



**Gruppe 6**



**Gruppe 7**



Die Strukturen der Verbindungen sind in Tabelle 4-19 dargestellt. Die Substituenten für R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> wurden in Anlehnung an die Verbindungen aus Tabelle 4-15 ausgewählt.

**Tabelle 4-19: Strukturen der untersuchten „großen“ Tariquidar-Analoga mit verändertem Verknüpfungsmuster.**

<b>Verbindung</b>	<b>R<sup>1</sup></b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>Gruppe 3</b>		
WK-X-92	OCH <sub>3</sub>	4-Nitrophenyl
<b>Gruppe 4</b>		
WK-X-49	H	3-Chinolyl
KS-132	H	4-Nitrophenyl
<b>Gruppe 5</b>		
WK-X-78	OCH <sub>3</sub>	3,4-Methoxyphenyl
<b>Gruppe 6</b>		
WK-X-52	H	3-Chinolyl
WK-X-51	OCH <sub>3</sub>	3-Chinolyl
WK-X-14	OCH <sub>3</sub>	2-Nitrophenyl
<b>Gruppe 7</b>		
WK-X-46	H	2-Nitrophenyl
WK-X-74	OCH <sub>3</sub>	2-Nitrophenyl
KS-224	H	Phenyl

#### 4.8.3.1 Vanadat-sensitiver ATPase Assay

Zunächst wurden die Verbindungen mit Hilfe des ATPase Assays untersucht. Die beobachteten Effekte auf die ATPase Aktivität sind in Tabelle 4-20 aufgeführt.

Tabelle 4-20: Effekt auf die basale ATPase Aktivität gemessen bis 10  $\mu\text{mol/l}$ .

Verbindung	Effekt auf ATPase Aktivität	$pEC_{50} \pm SD$	$EC_{50} \pm SD$ [nmol/l]	$E_{max} \pm SD$ [%]
<b>Gruppe 3</b>				
WK-X-92	Inhibition	$5,73 \pm 0,52$	$2540 \pm 2360$	$-92 \pm 11$
<b>Gruppe 4</b>				
WK-X-49	Inhibition	$8,25 \pm 0,34$	$6,42 \pm 3,55$	$-30 \pm 13$
KS-132	Inhibition	$6,42 \pm 0,11$	$386 \pm 65$	$-61 \pm 10$
<b>Gruppe 5</b>				
WK-X-78	Inhibition	$5,68 \pm 0,37$	$2450 \pm 149$	$-61 \pm 7$
<b>Gruppe 6</b>				
WK-X-52	Inhibition	$6,48 \pm 0,40$	$191 \pm 127$	$-61 \pm 10$
WK-X-51	Inhibition	$6,46 \pm 0,32$	$390 \pm 201$	$-62 \pm 1$
WK-X-14	Inhibition > 1 $\mu\text{mol/l}$	-	-	$-18 \pm 4$
<b>Gruppe 7</b>				
WK-X-46	Inhibition	$5,74 \pm 0,34$	$2080 \pm 1150$	$-15 \pm 2$
WK-X-74	Inhibition	$5,98 \pm 0,003$	$1050 \pm 5$	$-48 \pm 1$
KS-224	kein Effekt	-	-	-

Die getesteten Verbindungen mit Tetrahydroisochinolinrest und veränderter Grundstruktur haben, wie die bereits beschriebenen Tariquidar-Analoga mit Tetrahydroisochinolinrest, einen inhibitorischen Effekt auf die ATPase Aktivität. In der Literatur wird vermutet, dass die Molekülgröße für die Aktivierung oder Inhibition der ATPase Aktivität ausschlaggebend sein könnte.<sup>43,69</sup> Interessanterweise zeigen aber selbst die kleineren Verbindungen aus Gruppe 6 und Gruppe 7 eine Inhibition der ATPase Aktivität.

Die Verbindung WK-X-92, die in Verknüpfung 2 statt des Amids einen Harnstoff besitzt, zeigt mit einem  $E_{max}$  von -92 % im Vergleich mit den Verbindungen der Gruppe 1 den stärksten inhibitorischen Effekt auf die ATPase Aktivität. Der Harnstoff in Verknüpfung 2 erhöht offenbar die Interaktion mit ABCG2. Ähnliches hatte auch Anne Pick in ihrer Dissertation beobachtet.<sup>158</sup> WK-X-49 aus Gruppe 4, welches in Verknüpfung 2 statt in *ortho*- in *meta*- Position verknüpft ist, zeigt einen zu

der korrespondierenden Verbindung XR9577 ( $pEC_{50}$ -Wert 8,16) aus Gruppe 1, die in *ortho*-Position verknüpft ist, einen ähnlichen  $pEC_{50}$ -Wert mit 8,25. Allerdings erreicht WK-X-49 einen deutlich geringeren  $E_{max}$ -Wert von -30 % als XR9577 mit -77 %. Die Verbindung KS-132 zeigt mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 6,42 einen  $pEC_{50}$ -Wert (6,72) wie die korrespondierende *ortho*-verknüpfte Verbindung WK-X-36, erreicht aber im Vergleich zu WK-X-36 ( $E_{max}$  -51 %) einen stärkeren maximalen Effekt von -61 %. Die Verbindung WK-X-78, die einen Harnstoff in Verknüpfung 1 aufweist, hat mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 5,68 und einem  $E_{max}$  von -61 % einen ähnlichen Einfluss auf die ATPase Aktivität wie auch die korrespondierende Verbindung WK-X-34 mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 6,19 und einem  $E_{max}$  von -59 %.

Die Verbindungen aus Gruppe 6 und Gruppe 7 haben eine geringere Molekülgröße als die anderen Tariquidar-Analoga mit Tetrahydroisochinolinrest. Der aromatische Bereich ist direkt an Verknüpfung 1 gekoppelt. Die Verbindungen WK-X-52 und WK-X-51, welche mit einem 3-Chinolinrest an  $R^2$  verknüpft sind, interagieren mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 6,48 und einem  $E_{max}$  von -61 % für WK-X-52 und einem  $pEC_{50}$ -Wert von 6,46 und einem  $E_{max}$  von -52 % für WK-X-51 schwächer als die strukturellen Pendants XR9577 ( $pEC_{50}$  8,16 und  $E_{max}$  -77 %) und WK-X-32 ( $pEC_{50}$  7,51 und  $E_{max}$  -74 %) mit ABCG2. WK-X-14, welches mit einem 2-Nitrophenylrest verknüpft ist, zeigt erst ab 10  $\mu\text{mol/l}$  eine Inhibition der ATPase Aktivität. Die verkleinerten Verbindungen aus Gruppe 7 zeigen mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 5,74 und einem  $E_{max}$  von -15 % für WK-X-46 und einem  $pEC_{50}$ -Wert von 5,98 und einem  $E_{max}$  von -48 % für WK-X-74 zwar ähnliche  $pEC_{50}$ -Werte wie Verbindung WK-X-78, die ebenfalls den Harnstoff in der Verknüpfung enthält, jedoch kleinere  $E_{max}$ -Werte. Die Verbindung KS-224, die einen Phenylrest als  $R^2$  trägt, zeigt bis 10  $\mu\text{mol/l}$  keinen Effekt auf die ATPase Aktivität.

Die Verkleinerung des Grundgerüsts führt zu einer abgeschwächten Interaktion mit der ATPase von ABCG2, während die Einführung des Harnstoffs als Linker 2 größere Effekte zeigt.

### 4.8.3.2 Charakterisierung mit funktionellen Assays

Zur vollständigen Charakterisierung wurden die Verbindungen ebenfalls mit Hilfe der funktionellen Assays Hoechst 33342 Assay und Pheophorbid A Assay getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-21 aufgeführt.

**Tabelle 4-21: Ermittelte  $pIC_{50}$ -Werte bzw.  $IC_{50}$ -Werte der WK- und KS-Verbindungen mit MDCK II BCRP mit Hilfe des Hoechst 33342 Assays und Pheophorbid A Assays. n.a. = nicht aktiv bis 52  $\mu\text{mol/l}$ .**

Verbindung	Hoechst 33342 Assay		Pheophorbid A Assay	
	$pIC_{50} \pm SD$	$IC_{50} \pm SD$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$pIC_{50} \pm SD$	$IC_{50} \pm SD$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]
<b>Gruppe 3</b>				
WK-X-92	$6,19 \pm 0,05$	$0,648 \pm 0,049$	$5,75 \pm 0,14$	$1,82 \pm 0,39$
<b>Gruppe 4</b>				
WK-X-49	$6,30 \pm 0,07$	$0,504 \pm 0,054$	$5,64 \pm 0,30$	$2,54 \pm 1,22$
KS-132	$5,27 \pm 0,08$	$5,12 \pm 0,66$	$4,66 \pm 0,25^*$	$23,5 \pm 9,3^*$
<b>Gruppe 5</b>				
WK-X-78	$5,05 \pm 0,30$	$9,89 \pm 4,74$	$4,99 \pm 0,13$	$11,0 \pm 4,3$
<b>Gruppe 6</b>				
WK-X-52	$5,05 \pm 0,13$	$9,09 \pm 1,81$	$4,88 \pm 0,04$	$13,2 \pm 0,8$
WK-X-51	$4,91 \pm 0,21$	$12,9 \pm 4,2$	$4,79 \pm 0,23$	$17,2 \pm 6,2$
WK-X-14	n.a.	n.a.	$4,56 \pm 0,13^*$	$28,1 \pm 5,6^*$
<b>Gruppe 7</b>				
WK-X-46	$5,55 \pm 0,16$	$2,90 \pm 0,72$	$4,91 \pm 0,01^*$	$12,3 \pm 0,2^*$
WK-X-74	n.a.	n.a.	$4,94 \pm 0,05$	n.a.
KS-224	$4,76 \pm 0,26^*$	$18,8 \pm 7,7^*$	$4,88 \pm 0,08$	$13,3 \pm 1,6$

\* gefittet auf Top Ko143.

Die Verbindungen WK-X-14 und WK-X-74 können nicht im Hoechst 33342 Assay aber im Pheophorbid A Assay vermessen werden. Möglicherweise liegt auch hier, wie zuvor in Kapitel 4.8.2.2 beschrieben, eine Fluoreszenzlöschung von Hoechst 33342 vor. Für die Verbindungen WK-X-92, WK-X-49 und WK-X-46 treten große Unterschiede zwischen den im Hoechst 33342 Assay und im Pheophorbid A



Assay ermittelten  $pIC_{50}$ -Werten auf. Möglicherweise liegen auch hier die gleichen Probleme mit caninem ABCB1, wie in Kapitel 4.8.1.2 beschrieben, vor.

Die Verbindung WK-X-78, die einen deutlichen Einfluss auf die ATPase Aktivität zeigt, hat interessanterweise in den funktionellen Assays mit einem  $pIC_{50}$ -Wert von 5,05 im Hoechst 33342 Assay und von 4,99 im Pheophorbid A Assay nur einen schwachen Effekt. Für die verkleinerten Verbindungen der Gruppe 6 und Gruppe 7 lässt sich auch in den funktionellen Assays die Abnahme der Potenz beobachten. Anscheinend bewirken auch hier wie bereits in Gruppe 1 und Gruppe 2 beobachtet der 2-Nitrophenyl- und der Phenylrest eine schlechtere Interaktion mit ABCG2.

### 4.8.4 Tariquidar-Analoga ohne Tetrahydroisochinolinrest mit veränderter

#### Grundstruktur

Um weitere Gründe für die verschiedenen Effekte der Tariquidar-Analoga auf die basale ATPase Aktivität zu ergründen, wurden auch „kleine“ Tariquidar-Analoga mit veränderten Verknüpfungsmustern analysiert. Auch hier wurden Verbindungen getestet, die Veränderungen in Verknüpfung 1 und Verknüpfung 2 aufweisen. Die Grundstrukturen sind in Tabelle 4-22 aufgeführt.

**Tabelle 4-22: Strukturen der untersuchten „kleinen“ Tariquidar-Analoga mit verändertem Verknüpfungsmuster.**

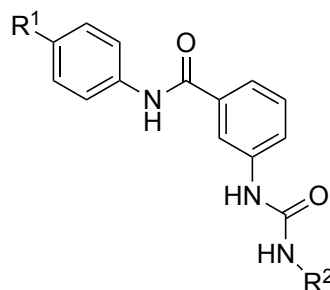
---

#### „kleine“ Tariquidar-Analoga

---

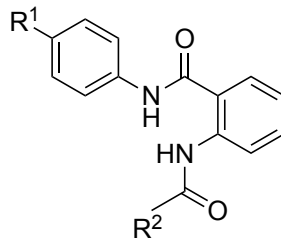
##### Gruppe 8

---

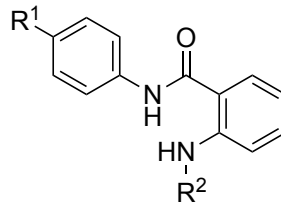


## 4 Ergebnisse und Diskussion

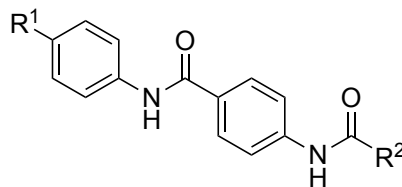
### Gruppe 9



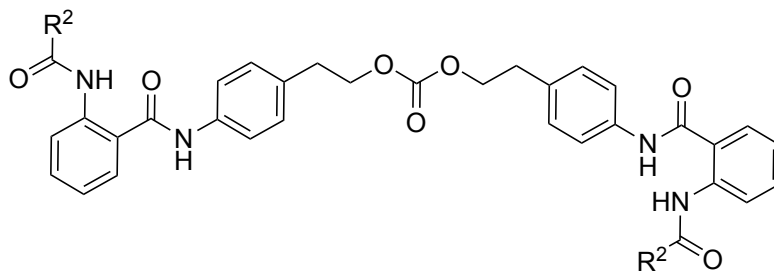
### Gruppe 10



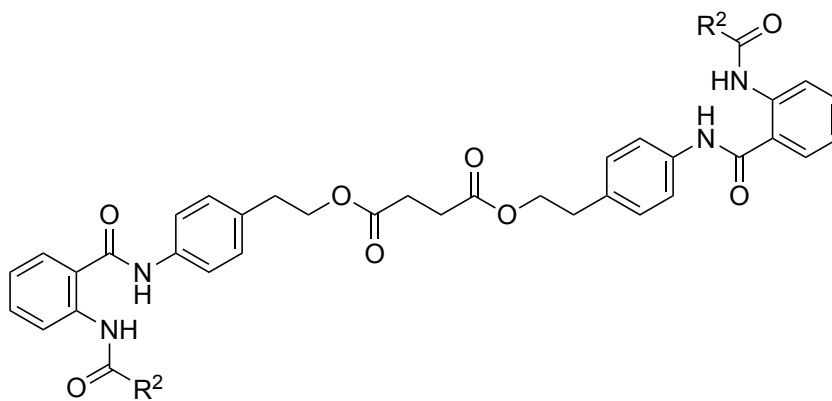
### Gruppe 11



### Gruppe 12



### Gruppe 13



Auch hier wurden Verbindungen gewählt, die möglichst gleiche Substituenten für R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> im Vergleich mit den Verbindungen aus Gruppe 2 in Tabelle 4-15 aufweisen. Die Strukturen sind in Tabelle 4-23 aufgeführt.

**Tabelle 4-23: Strukturen der untersuchten „kleinen“ Tariquidar-Analoga mit verändertem Verknüpfungsmuster.**

Verbindung	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
<b>Gruppe 8</b>		
KS-090	HOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	4-Nitrophenyl
<b>Gruppe 9</b>		
KS-328	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	4-Nitrophenyl
KS-305	4OH-cHex	4-Nitrophenyl
<b>Gruppe 10</b>		
KS-290	HOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	Phenyl
<b>Gruppe 11</b>		
KS-091	HOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	4-Nitrophenyl
<b>Gruppe 12</b>		
KS-403	-	4-Nitrophenyl
<b>Gruppe 13</b>		
KS-408	-	4-Nitrophenyl

#### 4.8.4.1 Vanadat-sensitiver ATPase Assay

Zunächst wurden die Verbindungen mit Hilfe des ATPase Assays untersucht. Die beobachteten Effekte auf die ATPase Aktivität sind in Tabelle 4-24 aufgeführt.

Tabelle 4-24: Effekt auf die basale ATPase Aktivität gemessen bis 10  $\mu\text{mol/l}$ .

Verbindung	Effekt auf ATPase Aktivität	$\text{pEC}_{50} \pm \text{SD}$	$\text{EC}_{50} \pm \text{SD}$ [nmol/l]	$\text{E}_{\text{max}} \pm \text{SD}$ [%]
<b>Gruppe 8</b>				
KS-090	Aktivierung	$7,42 \pm 0,51$	$51,3 \pm 46,5$	$70 \pm 7$
<b>Gruppe 9</b>				
KS-328	Aktivierung	$7,85 \pm 0,06$	$14,2 \pm 1,3$	$41 \pm 1$
KS-305	Aktivierung	$6,81 \pm 0,17$	$160 \pm 42$	$33 \pm 13$
<b>Gruppe 10</b>				
KS-290	kein Effekt	-	-	-
<b>Gruppe 11</b>				
KS-091	kein Effekt	-	-	-
<b>Gruppe 12</b>				
KS-403	kein Effekt	-	-	-
<b>Gruppe 13</b>				
KS-408	kein Effekt	-	-	-

Die Verbindungen der Gruppe 8 und Gruppe 9 ohne Tetrahydroisochinolinrest mit verändertem Verknüpfungsmuster zeigen auch hier eine Aktivierung der ATPase Aktivität. Die Verbindungen der Gruppen 10-13 sind im Vanadat-sensitiven ATPase Assay inaktiv.

Die Verbindung KS-090, die einen Harnstoff in *meta*-Position in Verknüpfung 2 enthält, aktiviert die ATPase Aktivität mit einem  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von 7,42 und einem  $\text{E}_{\text{max}}$  von 70 % ähnlich der analogen Verbindung WK-X-27 mit einem  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von 7,84 und einem  $\text{E}_{\text{max}}$  von 72 %, die über Amid verknüpft ist.

Die Verbindungen KS-328 und KS-305, die wieder das Amid in Verknüpfung 2 besitzen, aber keinen aromatischen Teil als Linker, aktivieren die basale ATPase Aktivität mit einem  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von 7,85 und einem  $\text{E}_{\text{max}}$  von 41 % für KS-328 und  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von 6,81 und einem  $\text{E}_{\text{max}}$  von 33 % für KS-305. Allerdings sind die  $\text{E}_{\text{max}}$ -Werte niedriger als die der analog substituierten Verbindung WK-X-27.

Die Verbindung KS-290 der Gruppe 10, die keine Amidverknüpfung in Linker 2 enthält, ist an der ATPase inaktiv. Verbindung KS-091, welche Verknüpfung 2 in *para*-Position trägt ist ebenfalls inaktiv.

Die Verbindungen KS-403 und KS-408 liegen als Ester vor. Da in den aufbereiteten Membranfragmenten der Sf9-Zellen keine Esterasen vorkommen, ist es nicht erstaunlich, dass kein Effekt auf die ATPase Aktivität beobachtet werden kann.

#### 4.8.4.2 Charakterisierung mit funktionellen Assays

Die Verbindungen wurden mit den funktionellen Assays Hoechst 33342 Assay und Pheophorbid A Assay untersucht. Die erhaltenen Daten sind in Tabelle 4-25 aufgeführt.

**Tabelle 4-25: Ermittelte  $pIC_{50}$ -Werte bzw.  $IC_{50}$ -Werte der WK- und KS-Verbindungen mit MDCK II BCRP mit Hilfe des Hoechst 33342 Assays und Pheophorbid A Assays. n.a. = nicht aktiv bis 52  $\mu\text{mol/l}$ .**

Verbindung	Hoechst 33342 Assay		Pheophorbid A Assay	
	$pIC_{50} \pm SD$	$IC_{50} \pm SD$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$pIC_{50} \pm SD$	$IC_{50} \pm SD$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]
<b>Gruppe 8</b>				
KS-090	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>Gruppe 9</b>				
KS-328	$5,16 \pm 0,18$	$7,18 \pm 2,00$	$4,98 \pm 0,05$	$10,5 \pm 0,8$
KS-305	$4,84 \pm 0,05$	$14,5 \pm 1,1$	$5,08 \pm 0,06$	$8,35 \pm 0,76$
<b>Gruppe 10</b>				
KS-290	$5,13 \pm 0,09$	$7,48 \pm 1,03$	$5,04 \pm 0,05$	$9,15 \pm 0,70$
<b>Gruppe 11</b>				
KS-091	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>Gruppe 12</b>				
KS-403	$4,94 \pm 0,14$	$11,7 \pm 2,5$	$4,33 \pm 0,02$	$45,8 \pm 1,4$
<b>Gruppe 13</b>				
KS-408	$5,01 \pm 0,23$	$10,4 \pm 3,7$	$4,81 \pm 0,33$	$17,6 \pm 9,4$

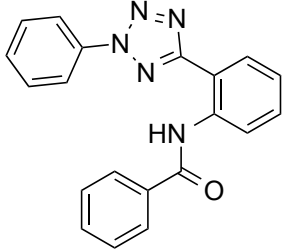
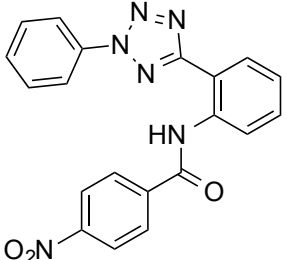
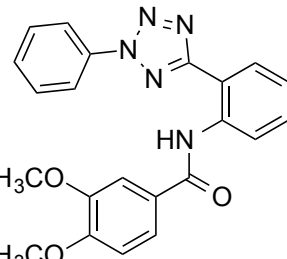
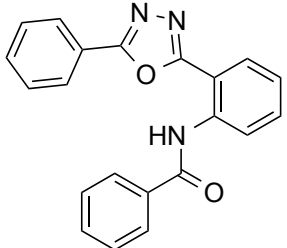
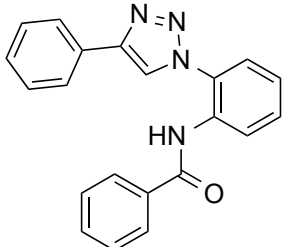
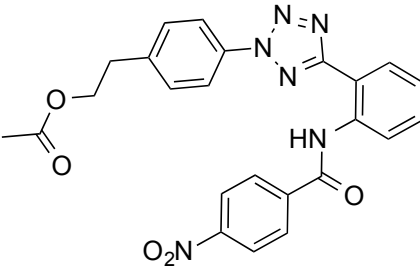
Die Ergebnisse in den funktionellen Assays unterscheiden sich von denen, die mit Hilfe des ATPase Assays erhalten wurden. Verbindung KS-090 und Verbindung KS-091 sind weder im Hoechst 33342 Assay noch im Pheophorbid A Assay aktiv. Das deckt sich mit Daten aus der Dissertation von Federico Marighetti.<sup>210</sup> Dennoch aktiviert KS-090 die basale ATPase Aktivität. Im Gegensatz dazu lässt sich KS-290 in beiden Assays vermessen, ist aber im ATPase Assay inaktiv. Die Aktivität der Esterverbindungen KS-403 und KS-408 lässt sich im Hoechst 33342 Assay und Pheophorbid A Assay bestimmen. Allerdings sind die ermittelten  $pIC_{50}$ -Werte, für KS-403 mit 4,94 im Hoechst 33342 Assay und 4,33 im Pheophorbid A Assay und für KS-408 mit 5,01 im Hoechst 33342 Assay und 4,81 im Pheophorbid A Assay, deutlich schlechter als die der korrespondierenden Verbindung WK-X-27.

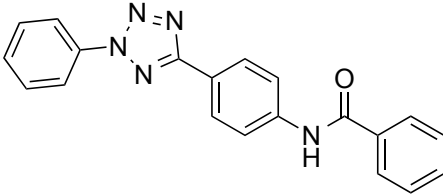
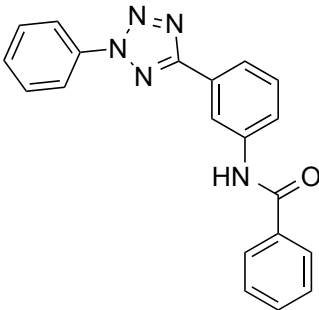
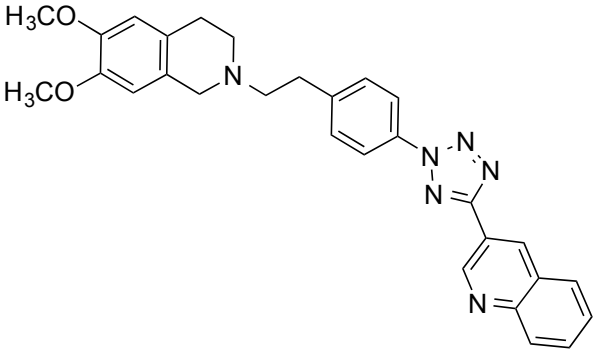
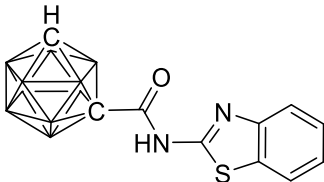
### 4.8.5 Untersuchung ausgewählter SK-, Kö- und MS-Verbindungen

Nachdem die Testreihe der verschiedenen Tariquidar-Analoga mit und ohne Tetrahydroisochinolinrest, die von Werner Klinkhammer und Kerstin Steggemann synthetisiert worden waren, durchgeführt worden war, wurde die Testreihe um die von Sebastian Köhler synthetisierten HM30181-Analoga erweitert. Diese Verbindungen tragen statt des Amids in Verknüpfung 1 in der Regel ein Tetrazol. Für diese Testreihe wurden Analoga zu den bereits getesteten Substanzen und Verbindungen mit möglichst großer Variation der Grundstruktur ausgewählt. Die untersuchten Strukturen sind in Tabelle 4-26 aufgeführt.

Neben den HM30181-Analoga wurde auch eines der in Zusammenarbeit mit Dr. Matthias Scholz synthetisierten Carborancarboxamide, welches im funktionellen Hoechst 33342 Assay eine Inhibition des Transportes von Hoechst 33342 zeigt, überprüft.<sup>214</sup> Diese Verbindung besteht aus einer Bor-Wasserstoff und Kohlenstoff-Wasserstoff Untereinheit. Es besitzt in dieser Testreihe durch seine Struktur jedoch eine Sonderstellung.

Tabelle 4-26: Strukturen der SK- und Kö- und MS-Verbindungen.

Verbindung	Strukturformel
SK-A-32	
SK-A-90	
SK-A-92	
SK-C-09	
SK-E-05	
Kö-36	

Verbindung	Strukturformel
SK-A-106	
SK-A-107	
Kö-19	
MS15mA17	

#### 4.8.5.1 Vanadat-sensitiver ATPase Assay

Die Verbindungen wurden zunächst mit Hilfe des ATPase Assays untersucht. Die beobachteten Effekte auf die basale ATPase Aktivität sind in Tabelle 4-27 aufgelistet.



Tabelle 4-27: Effekt auf die basale ATPase Aktivität gemessen bis 10  $\mu\text{mol/l}$ .

Verbindung	Effekt auf ATPase Aktivität		$\text{pEC}_{50} \pm \text{SD}$	$\text{EC}_{50} \pm \text{SD}$ [nmol/l]	$E_{\text{max}} \pm \text{SD}$ [%]
SK-A-32	Aktivierung		$8,30 \pm 0,42$	$6,14 \pm 4,35$	$46 \pm 4$
SK-A-90	Aktivierung		$8,28 \pm 0,18$	$5,45 \pm 1,51$	$69 \pm 11$
SK-A-92	Aktivierung		$8,57 \pm 0,37$	$3,15 \pm 1,92$	$67 \pm 1$
SK-C-09	Aktivierung		$8,38 \pm 0,07$	$4,19 \pm 0,45$	$43 \pm 6$
SK-E-05	Aktivierung		$7,09 \pm 0,08$	$81,9 \pm 10,0$	$53 \pm 1$
Kö-36	Aktivierung		$8,28 \pm 0,02$	$5,25 \pm 0,16$	$28 \pm 1$
SK-A-106	Aktivierung		$8,25 \pm 0,28$	$6,16 \pm 2,74$	$63 \pm 5$
SK-A-107	Aktivierung		$7,86 \pm 0,10$	$14,0 \pm 2,1$	$62 \pm 8$
Kö-19	Inhibition		$7,65 \pm 0,37$	$26,2 \pm 15,6$	$-81 \pm 4$
MS15mA17	biphasisch	max	$8,69 \pm 0,05$	$2,05 \pm 0,16$	$17 \pm 4$
		min	$6,54 \pm 0,54$	$403 \pm 394$	$-25 \pm 11$

Bei den HM30181-Analoga zeigt sich das gleiche Muster, das auch bei den klassischen Tariquidar-Analoga beobachtet werden kann. Die Verbindung Kö-19, die einen Tetrahydroisochinolinrest enthält, führt zu einer Inhibition der basalen ATPase Aktivität. Während die Verbindungen, die keinen Tetrahydroisochinolinrest enthalten, alle zu einer Aktivierung der basalen ATPase Aktivität führen.

Die unsubstituierte Verbindung SK-A-32, erreicht einen ähnlichen  $E_{\text{max}}$ -Wert von 46 % wie die korrespondierende Verbindung WK-X-7 mit Amidlinker mit einem  $E_{\text{max}}$  von 47 %. Allerdings ist SK-A-32 mit einem  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von 8,30 deutlich potenter als WK-X-7 mit einem  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von 6,89. SK-C-09, welches statt des Tetrazollinkers einen Oxadiazollinker trägt, besitzt einen ähnlichen  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von 8,38 und einen ähnlichen  $E_{\text{max}}$ -Wert von 43 % wie SK-A-32. SK-E-05, welches einen Triazolring als Verknüpfung 1 besitzt, beeinflusst mit einem  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von 7,09 die ATPase Aktivität erst bei höheren Konzentrationen, erreicht aber mit einem  $E_{\text{max}}$ -Wert von 53 % einen ähnlichen Effekt wie SK-A-32 und SK-C-09. Die *para*-Nitrophenyl Verbindung SK-A-90 aktiviert die ATPase Aktivität mit einem  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von 8,28 stärker als die korrespondierende Verbindung KS-168 mit Amidlinker mit einem  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von 7,38. Sie erreicht einen höheren maximalen Effekt

von 69 % als KS-168 mit 54 %. Die Dimethoxyphenyl Verbindung SK-A-92 zeigt mit 8,57 einen ähnlichen  $pEC_{50}$ -Wert wie die korrespondierenden Verbindungen KS-166 mit Amidlinker mit 8,66 und KS-157, die zu dem Amidlinker einen Ethanolrest besitzt, mit 8,56. Allerdings liegt der maximale Effekt auf die ATPase Aktivität mit 67 % höher als bei KS-166 mit 47 % oder KS-157 mit 48 %. Wie bei KS157 liegt bei SK-A-92 anders als bei KS-166 kein biphasischer Effekt vor. Der Acetyles-ter Kö-36 aktiviert die ATPase Aktivität mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 8,28 gleich stark wie SK-A-90 mit Tetrazolrest aber ohne Acetyles-ter mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von ebenfalls 8,28. Allerdings ist der  $E_{max}$ -Wert von Kö-36 mit 28 % deutlich geringer als bei SK-A-90 mit einem  $E_{max}$  von 69 %. Der Acetyles-ter scheint die Aktivierung der ATPase Aktivität im Vergleich herabzusetzen. Interessanterweise sind die *para*- (SK-A-106) und *meta*-verknüpften Verbindungen (SK-A-107) mit  $pEC_{50}$ -Werten von 8,25 für SK-A-106 und 7,86 für SK-A-107 im Vanadat-sensitiven ATPase Assay aktiv, während KS-090, die *para*-Verknüpfte Amid-Verbindung, inaktiv ist. Sie erreichen sogar mit  $E_{max}$ -Werten von 63 % für SK-A-106 und 62 % für SK-A-107 höhere Effekte als die *ortho*-verknüpfte Verbindung SK-A-32 mit 46 %. Die Verbindung Kö-19, die einen Tetrahydroisochinolinrest besitzt, hat mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 7,65 und einem  $E_{max}$ -Wert von -81 % einen deutlich stärkeren inhibierenden Effekt auf die ATPase als die korrespondierende Verbindung WK-X-51 mit Amidlinker mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 6,46 und einem  $E_{max}$ -Wert von -52 %.

Die Verbindungen, die als Verknüpfung 1 einen Tetrazollinker haben, besitzen damit stärkere Effekte auf die ATPase Aktivität als ihre korrespondierenden Amid-Verbindungen. Der Oxadiazollinker zeigt den gleichen Effekt wie der Tetrazollinker, während der Triazollinker erst bei höheren Konzentrationen eine Aktivierung der ATPase Aktivität zeigt.

In Abbildung 4-39 sind die Effekte auf die basale ATPase Aktivität für einige SK-Verbindungen im Vergleich zu den korrespondierenden Verbindungen mit Amidlinker abgebildet. Abbildung 4-39 A zeigt die ATPase Aktivierung der gleich substituerten Verbindungen SK-C-09 mit Oxadiazollinker und SK-A-32 mit Tetrazollinker im Vergleich mit der Verbindung WK-X-7 mit Amidlinker. Es ist erkennbar, dass SK-C-09 und SK-A-32 keine Unterschiede bei der Aktivierung der ATPase Aktivität zeigen, während WK-X-7, die ATPase erst in höheren

Konzentrationen aktiviert. In Abbildung 4-39 B ist SK-A-90 mit Tetrazollinker im Vergleich zu der sonst gleich substituierten Verbindung KS-168 mit Amidlinker abgebildet. Die unterschiedlichen maximalen Effekte bei der Aktivierung der ATPase Aktivität sind deutlich erkennbar.

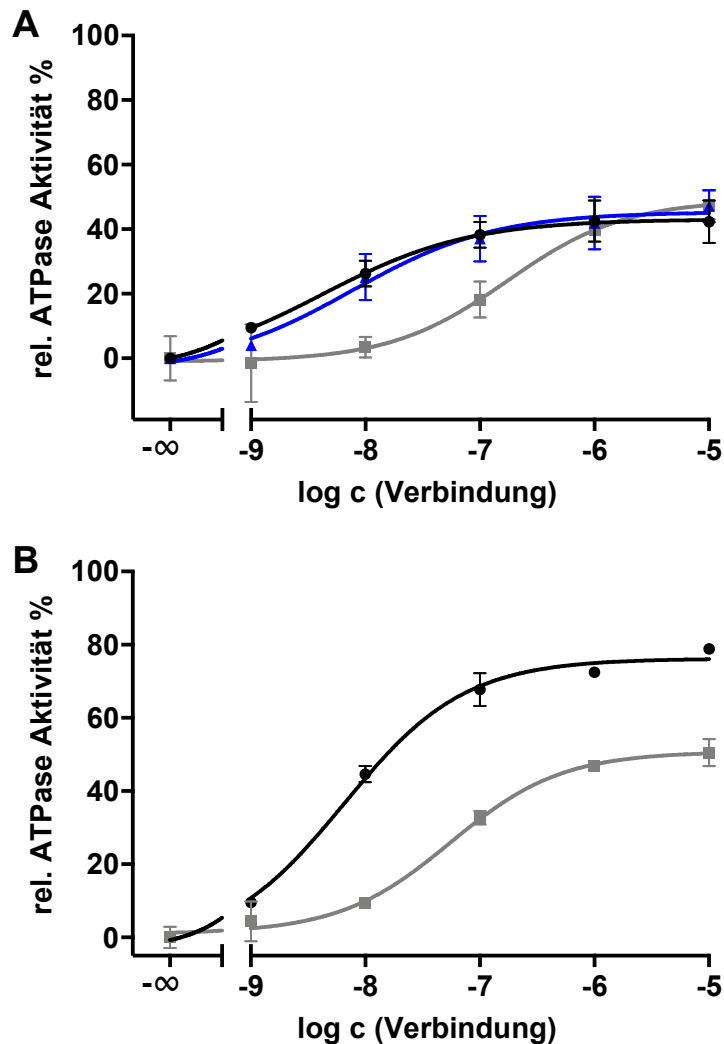


Abbildung 4-39: Effekt auf die basale ATPase Aktivität bis 10 µmol/l. A: SK-C-09 (●), SK-A-32 (▲) und WK-X-7 (■). B: SK-A-90 (●) und KS-168 (■).

Das Carborancarboxamid MS15mA17 unterscheidet sich strukturell grundlegend von den übrigen Verbindungen aus Tabelle 4-26. Es besitzt einen biphasischen Effekt auf die basale ATPase Aktivität. Der ermittelte Graph ist in Abbildung 4-40 abgebildet. Die ATPase wird zunächst mit einem pEC<sub>50</sub>-Wert von 8,69 auf ein geringes E<sub>max</sub> von 17 % aktiviert, um dann mit einem pEC<sub>50</sub>-Wert von 6,54 auf den E<sub>max</sub> von -25 % abzusinken.

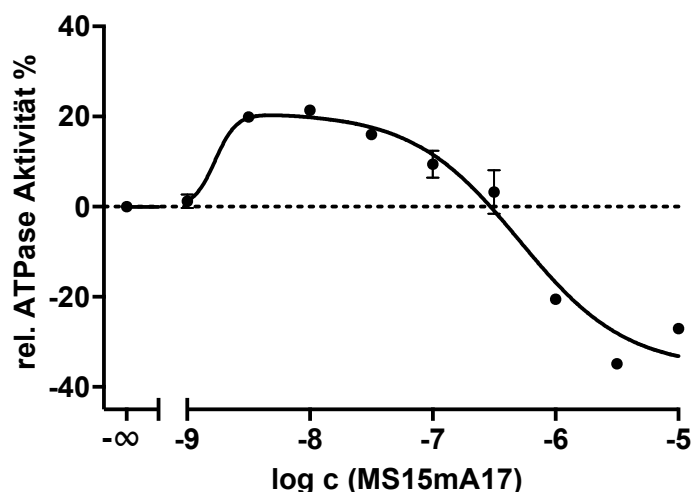


Abbildung 4-40: Effekt von MS15mA17 auf die basale ATPase Aktivität.

#### 4.8.5.2 Charakterisierung mit funktionellen Assays

Die im Hoechst 33342 ermittelten  $pIC_{50}$ -Werte bzw.  $IC_{50}$ -Werte der SK-, Kö- und MS-Verbindungen sind in Tabelle 4-28 aufgeführt. Ein großer Teil der dort aufgeführten Daten wurden von Sebastian Köhler und Katja Silbermann ermittelt.

Tabelle 4-28: Ermittelte  $pIC_{50}$ -Werte bzw.  $IC_{50}$ -Werte der SK- Kö und MS-Verbindungen mit Hilfe des Hoechst 33342 Assays und MDCK II BCRP Zellen.

Verbindung	Hoechst 33342 Assay	
	$pIC_{50} \pm SD$	$IC_{50} \pm SD$ [nmol/l]
SK-A-32	$6,95 \pm 0,46^a$	$143 \pm 113^a$
SK-A-90	$6,50 \pm 0,11^b$	$321 \pm 54^b$
SK-A-92	$6,94 \pm 0,27^a$	$125 \pm 53^a$
SK-C-09	$6,96 \pm 0,10^a$	$111 \pm 17^a$
SK-E-05	$6,41 \pm 0,10^{#*}$	$394 \pm 60^{#*}$
Kö-36	$6,54 \pm 0,06^{\#}$	$290 \pm 26^{\#}$
SK-A-106	$5,54 \pm 0,35^a$	$3320 \pm 1900^a$
SK-A-107	n.b. <sup>a</sup>	n.b. <sup>a</sup>
Kö-19	$5,29 \pm 0,03^{\#}$	$4080 \pm 186^{\#}$

Verbindung	Hoechst 33342 Assay	
	pIC <sub>50</sub> ± SD	IC <sub>50</sub> ± SD [nmol/l]
MS15mA17	6,86 ± 0,11 <sup>a</sup>	140 ± 24 <sup>a</sup>

<sup>#</sup>gemessen mit PLB-985 ABCG2. n.b. = nicht bestimmbar bis 10 µmol/l. <sup>a</sup>: gemessen von Sebastian Köhler mit MDCK II BCRP Zellen. <sup>b</sup>: gemessen von Katja Silbermann mit MDCK II BCRP Zellen. \*51 % ± 7 von XR9577

Die Verbindung SK-A-107, welche eine Aktivierung der basalen ATPase Aktivität zeigt, besitzt keine Aktivität im Hoechst 33342 Assay. Möglicherweise ließe sich die Verbindung aber im Pheophorbid A Assay vermessen, da dies auch bei Verbindungen in den vorangegangenen Kapiteln 4.8.2.2 und 4.8.3.2 möglich war. Die mit einem Triazolanker verknüpfte Verbindung SK-E-05, welche im ATPase Assay einen geringeren pIC<sub>50</sub>-Wert besitzt als die analogen-Verbindungen, erreicht im Hoechst 33342 Assay mit 51 % ein niedrigeres Plateau als XR9577.

Alle hier getesteten SK- und Kö-Verbindungen zeigen im Hoechst 33342 Assay bessere pIC<sub>50</sub>-Werte als ihre korrespondierenden Amid-Verbindungen. Es lässt sich sowohl aus den Ergebnissen des Vanadat-sensitiven ATPase Assays als auch aus dem funktionellen Hoechst 33342 Assay für die hier untersuchten Verbindungen schlussfolgern, dass das Tetrazol eine Verbesserung in der Interaktion mit ABCG2 bewirkt.

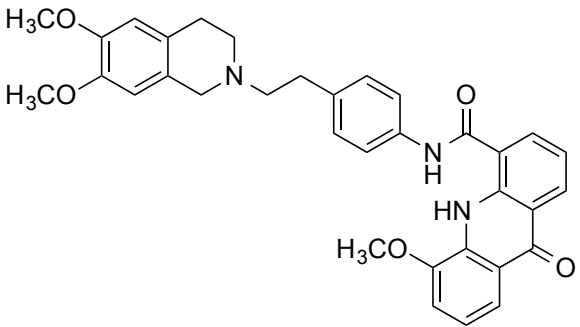
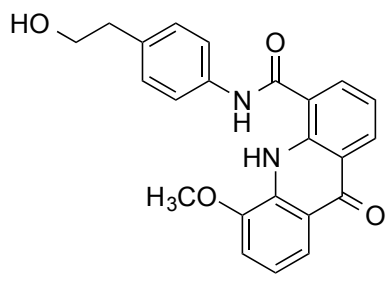
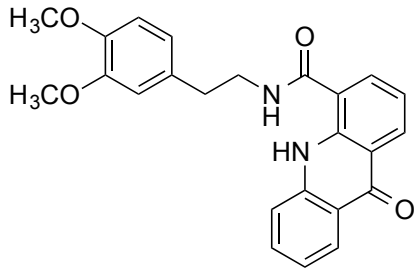
#### 4.8.6 Untersuchung von Elacridar-Analoga

Die vorangegangenen Charakterisierungen der Tariquidar-Analoga und HM30181-Analoga wurden in diesem Abschnitt um einige von Matthias Christlieb synthetisierte Elacridar-Analoga erweitert. Dazu wurden neben Elacridar, das das Tetrahydroisochinolin enthält, die beiden kleineren Elacridar-Analoga MAC-212 und MAC-249, die keinen Tetrahydroisochinolinrest besitzen, getestet. Die Strukturen sind in Tabelle 4-29 aufgeführt.

Der Einfluss der „kleinen“ Elacridar-Analoga gegenüber ABCG2 wurde ebenfalls von Boumendjel et al. untersucht und publiziert und konnte von Arnaud et al. für

die Verbindung MBLI-87, diese entspricht der hier getesteten Verbindung MAC-249, auch *in vivo* nachgewiesen werden.<sup>222,223</sup>

Tabelle 4-29: Strukturformeln von Elacridar und den MAC-Verbindungen.

Verbindung	Strukturformel
Elacridar	
MAC-212	
MAC-249	

#### 4.8.6.1 Vanadat-sensitiver ATPase Assay

Die für die Elacridar und die Elacridar-Analoga MAC-212 und MAC-249 erhaltenen Effekte auf die ATPase Aktivität sind in Tabelle 4-30 dargestellt.

Tabelle 4-30: Effekt auf die basale ATPase Aktivität gemessen bis 25  $\mu\text{mol/l}$ .

Verbindung	Effekt auf ATPase Aktivität	$\text{pEC}_{50} \pm \text{SD}$	$\text{EC}_{50} \pm \text{SD}$ [nmol/l]	$\text{E}_{\text{max}} \pm \text{SD}$ [%]
Elacridar	Inhibition	$7,90 \pm 0,16$	$13,0 \pm 3,2$	$-33 \pm 11$
MAC-212	Aktivierung	$7,68 \pm 0,10$	$21,1 \pm 3,2$	$42 \pm 6$
MAC-249	Aktivierung	$8,25 \pm 0,38$	$6,64 \pm 4,17$	$51 \pm 1$

Auch hier lässt sich dasselbe Phänomen wie bereits bei den vorangegangenen Untersuchungen der Tariquidar-Analoga beobachten. Elacridar, welches einen Tetrahydroisochinolinrest als Strukturmerkmal besitzt, inhibiert die basale ATPase Aktivität mit einem  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von 7,90 und einem  $\text{E}_{\text{max}}$  von -33 %. Es hat damit zwar einen Effekt auf die basale ATPase Aktivität bei geringeren Konzentrationen als Tariquidar ( $\text{pEC}_{50} = 5,11$ ), erreicht aber nur einen schwächeren maximalen Effekt als Tariquidar ( $\text{E}_{\text{max}} = -59$  %). Die Verbindungen MAC-212 und MAC-249, denen der Tetrahydroisochinolinrest fehlt, aktivieren die ATPase Aktivität von ABCG2 mit einem  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von 7,68 für MAC-212 und 8,25 für MAC-249 und einem  $\text{E}_{\text{max}}$  von 42 % für MAC-212 und 51 % für MAC-249. Die Verbindung MAC-249, welche eine 3,4-Dimethoxyphenylethyl Gruppe an der Amid-Verknüpfung von Linker 1 trägt, ist dabei im Vergleich mit MAC-212 die potentere Verbindung. Die ATPase Aktivitätsprofile von Elacridar, MAC-212 und MAC-249 sind in Abbildung 4-41 abgebildet.

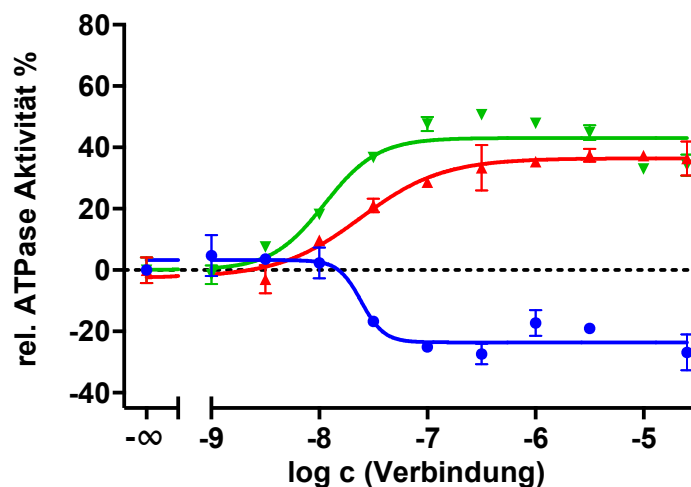


Abbildung 4-41: Effekt von Elacridar(●), MAC-212 (▲) und MAC-249 (▼) auf die basale ATPase Aktivität von ABCG2.

#### 4.8.6.2 Charakterisierung mit funktionellen Assays

Die Verbindungen vom Elacridar-Typ wurden ebenfalls im Hoechst 33342 Assay untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 4-31 aufgeführt.

**Tabelle 4-31: Mit Hoechst 33342 Assay an MDCK II BCRP Zellen ermittelte pIC<sub>50</sub>-Werte bzw. IC<sub>50</sub>-Werte mit Standardabweichungen.**

Verbindung	Hoechst 33342 Assay	
	pIC <sub>50</sub> ± SD	IC <sub>50</sub> ± SD [nmol/l]
Elacridar	6,44 ± 0,04	364 ± 22
MAC-212	6,11 ± 0,09	784 ± 108
MAC-249	6,32 ± 0,13	488 ± 97

Die hier untersuchten Elacridar-Analoga zeigen im Hoechst 33342 Assay eine Inhibition des Hoechst 33342 Transports durch ABCG2 im nanomolaren Bereich. Ähnliche Ergebnisse finden sich für Elacridar und MAC-249 (in der Veröffentlichung als MBLI-87 bezeichnet) in einem Mitoxantronefflux Assay in einer Veröffentlichung von Boumendjel et al.<sup>222</sup>

#### 4.8.7 Konformationsanalyse der Tetrahydroisochinoline

Im Jahr 2017 wurden von Taylor et al. erstmalig Kryoelektronenmikroskopstrukturen von ABCG2 veröffentlicht.<sup>45</sup> In der darauf folgenden Veröffentlichung von Jackson et al. im Jahr 2018 wurde das Tariquidar-Analogon MB136 als Inhibitor der ATPase Aktivität eingesetzt und dessen Bindungsmodalitäten in der Bindungstasche von ABCG2 diskutiert.<sup>44</sup> Jackson et al. beobachteten, dass nur ein Molekül MB136 in der Bindungstasche von ABCG2 bindet und, da sich die Verbindung in der Tasche bewegen kann, vermutlich mehrere Bindungsmöglichkeiten vorliegen. Dabei scheint MB136 sich zwischen TM1b, TM2 und TM5a in der Bindungstasche zu verklemmen und so die Funktion von ABCG2 einzuschränken. Das erklärt auch die Inhibition der basalen ATPase Aktivität durch das Tariquidar-Analogon. In Kapitel 1.3 ist MB136 in Abbildung 1-7 in der Bindungstasche von ABCG2 abgebildet.

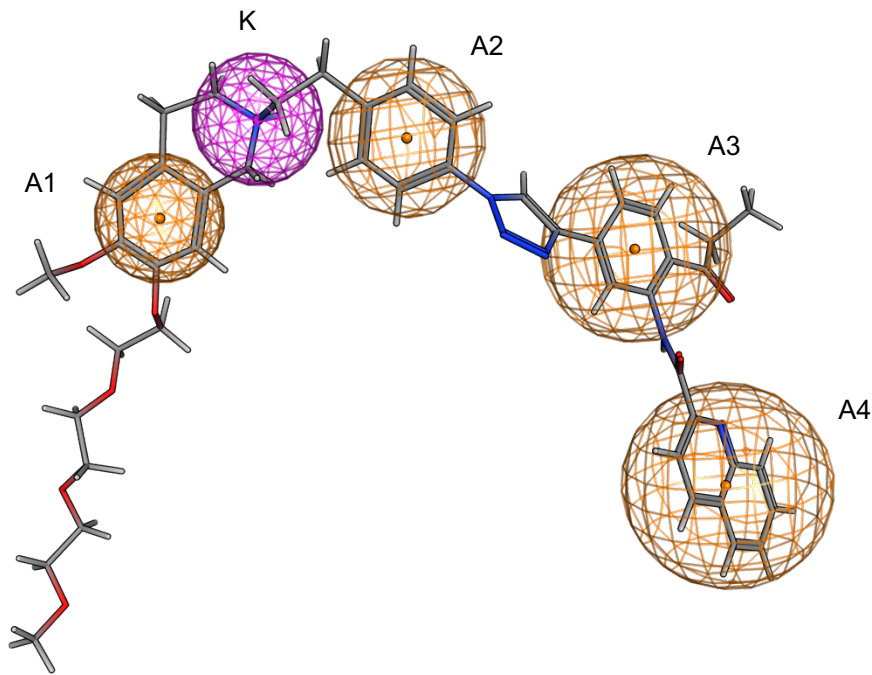


Strukturell unterscheidet sich MB136 von den in dieser Arbeit getesteten Tariquidar- und HM30181-Analoga, welche wie MB136 einen Tetrahydroisochinolinrest besitzen, durch die Pegylierung des Tetrahydroisochinolins, einem Triazol in Verknüpfung 1 und in der *meta*-Substitution des Aromaten in Verknüpfung 2. Aufgrund der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit mit den hier getesteten Analoga, wurde mit Hilfe von computergestützten Methoden untersucht, ob die hier getesteten Verbindungen ebenfalls in der Lage sein könnten, in vergleichbarer Konformation wie MB136 in der Bindungstasche von ABCG2 zu binden.

Für diese Untersuchung wurden Tariquidar-Analoga mit Tetrahydroisochinolinrest ausgewählt. Dazu gehörten Tariquidar-Analoga ohne veränderte Grundstruktur (KS-321, WK-X-18, XR9577, WK-X-29, WK-X-32, WK-X-34, WK-X-36), Tariquidar-Analoga mit veränderter Grundstruktur (WK-X-92, WK-X-49, KS-132, WK-X-51, WK-X-74, WK-X-78), das HM30181-Analagon Kö-19 sowie Elacridar. Für jede Verbindung wurde eine stochastische Konformationssuche durchgeführt.

Anhand der von Jackson et al.<sup>44</sup> publizierten Konformation von MB136 in der Bindungstasche von ABCG2 wurde ein Pharmakophor erstellt. In der veröffentlichten Struktur des Komplexes aus MB136 und ABCG2 sind fast ausschließlich hydrophobe Wechselwirkungen mit ABCG2 erkennbar. Für das Pharmakophor wurden daher die Position des Tetrahydroisochinolinrestes und die Positionen der Aromaten benutzt. In Abbildung 4-42 ist das Pharmakophor abgebildet.

Für die Definition des Pharmakophors wurde das Tetrahydroisochinolin über die Lage der Aromaten A1 (orange) und des protonierbaren Stickstoffs K (violett) definiert und die Position der enthaltenen Aromaten A2, A3 und A4 (orange) gekennzeichnet. Zusätzlich wurde die Ausrichtung der  $\pi$ -Elektronen für die Aromaten des Tetrahydroisochinolins A1 und des Aromaten in Linker 1 A2 fixiert. Da es sich bei diesen um das gemeinsame Strukturelement aller Verbindungen handelt, sollten die Aromaten gleich ausgerichtet sein. Für eine bessere Übersicht der Abbildung wurde diese Fixierung in Abbildung 4-42 allerdings nicht wiedergegeben.



**Abbildung 4-42: Anhand der Konformation von MB136 definiertes Pharmakophor. Orange: aromatische Wechselwirkungen. Violett: Wasserstoffbrückenbindungen.**

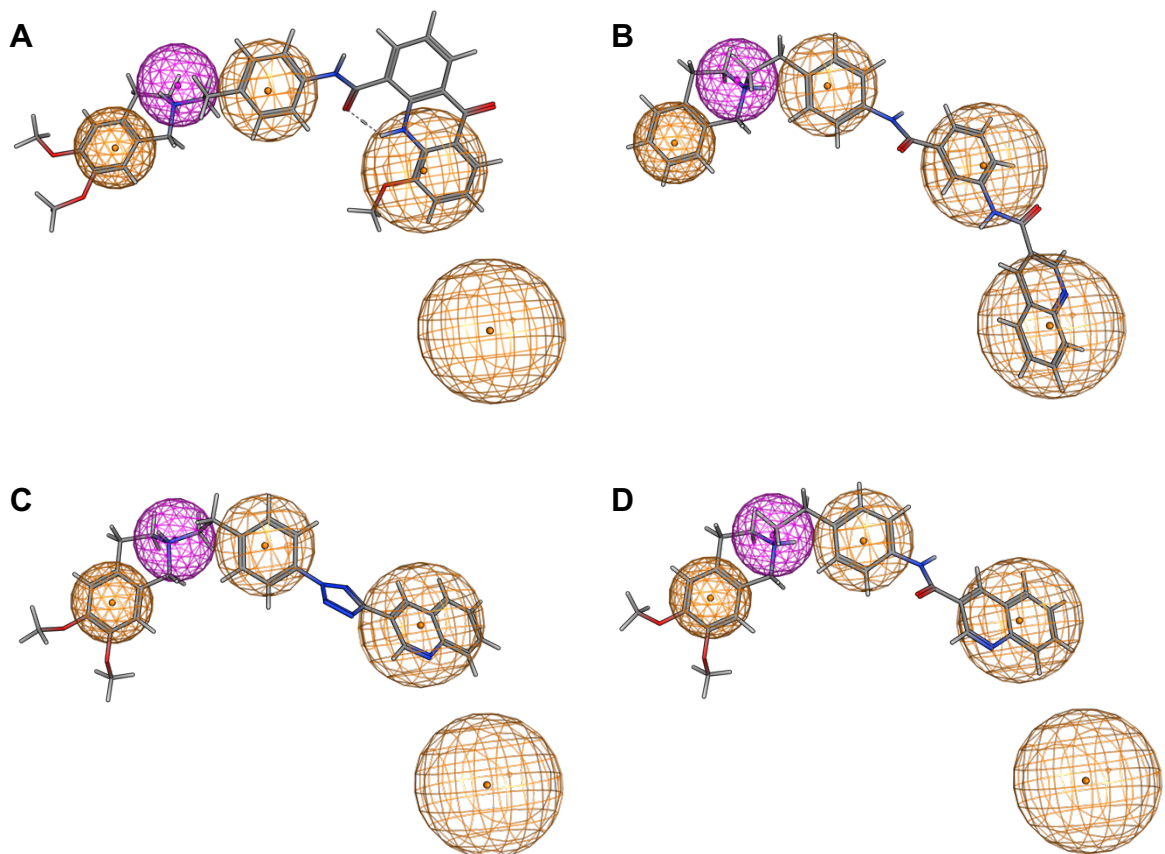
Anhand der Proteinstruktur von ABCG2 wurden die höchstwahrscheinlich an Wechselwirkungen beteiligten Aminosäuren und daraus abgeleitet die TMs von ABCG2 ermittelt. Bei den aromatischen Bereichen sind bei A1 TM2 und TM5', bei A2 TM5 und TM2', bei A3 TM5 und TM2' und bei A4 TM5 und TM1' beteiligt. Der Bereich K des protonierbaren Stickstoffs des Tetrahydroisochinolins interagiert mit den beiden Aminosäuren Met549 und Met549' von TM5 und TM5'. Damit liegt der protonierbare Stickstoff des Tetrahydroisochinolins genau in der Mitte der Bindungstasche von ABCG2. Knapp oberhalb befindet sich der Leucin-Pfropf aus L554, L555 und L554', L555', welcher Bindungstasche 1 und Bindungstasche 2 von ABCG2 verschließt.

Vergleicht man die von Jackson et al.<sup>44</sup> veröffentlichten Kryoelektronenmikroskopstrukturen, die die gebundenen Liganden MB136 und MZ29 enthalten, mit dem definierten Pharmakophor von MB136, wird deutlich, dass die beiden gebundenen Ko143-Analoga MZ29 jeweils mit ihrer Indol-Teilstruktur im Bereich A1 und A2 liegen und die gleiche Ausrichtung der  $\pi$ -Elektronen aufweisen. Diese Ausrichtung lässt sich auch bei der Überlagerung der von Manolaridis et al.<sup>43</sup> veröffentlichten

Kryoelektronenmikroskopstruktur von E<sub>1</sub>S mit dem Pharmakophor von MB136 beobachten. Da E<sub>1</sub>S in zwei verschiedenen Ausrichtungen gedreht jeweils um 180° gebunden vorgefunden wurde, liegt diese Wechselwirkung für den aromatischen Ring A des Steroids ebenfalls mit den Bereichen A1 bzw. A2 vor.

Zunächst wurde überprüft, ob sich die mit Hilfe der stochastischen Konformationsuche erzeugten Konformationen der ausgewählten Verbindungen mit dem Pharmkophor überlagern lassen. Die Position ist hinsichtlich des Tetrahydroisochinolins als essentiell definiert.

Die Überlagerung war sowohl für Elacridar, die verkürzten Verbindungen WK-X-51 und Kö-19 sowie für die in Verknüpfung 2 meta-substituierte Verbindungen WK-X-49 und KS-132 erfolgreich. In Abbildung 4-43 sind die Überlagerungen von Elacridar, WK-X-49, Kö-19 und WK-X-51 mit dem Pharmakophor dargestellt.

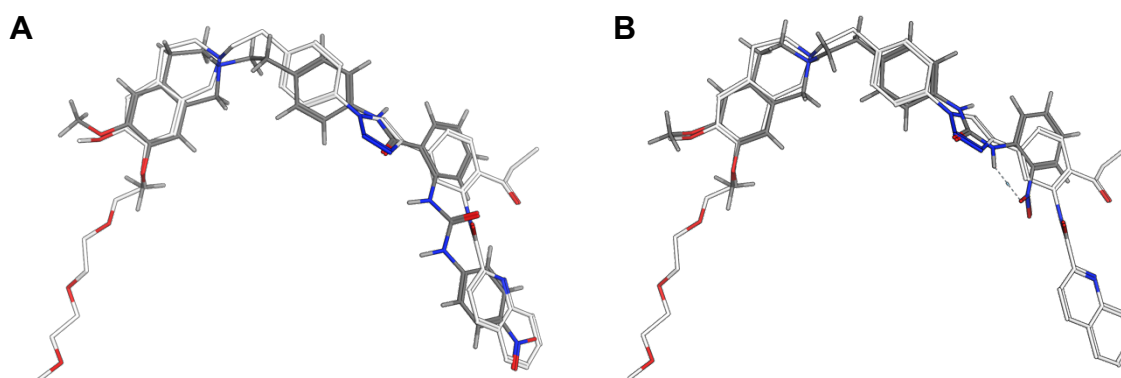


**Abbildung 4-43: Überlagerung mit dem Pharmakophor. A: Elacridar. B: WK-X-49. C: Kö-19. D: WK-X-51.**

In Abbildung 4-43 ist erkennbar, dass sowohl Elacridar (A), das verkürzte HM30181-Analogon Kö-19 (C) und auch das verkürzte Tariquidar Analogon WK-X-51 (D) keine Wechselwirkungen in dem unteren aromatischen Bereich A4 des Pharmakophors eingehen. Dennoch hemmen diese Verbindungen die ATPase Aktivität und inhibieren den Transport von Fluoreszenzfarbstoffen in funktionellen Assays. Das legt die Vermutung nahe, dass dieser Bereich für die Interaktion mit ABCG2 nicht essentiell ist. Die erzeugten Konformationen der in Verknüpfung 2 *meta*-verknüpften Verbindung WK-X-49 (B) und die der hier nicht abgebildeten Verbindung KS-132 stimmen wie MB136 für alle fünf definierten Bereiche des Pharmakophors überein.

Die Konformationen der übrigen Verbindungen, die mit Hilfe der stochastischen Konformationssuche erzeugt wurden, ließen sich nur unzureichend mit dem Pharmakophor überlagern.

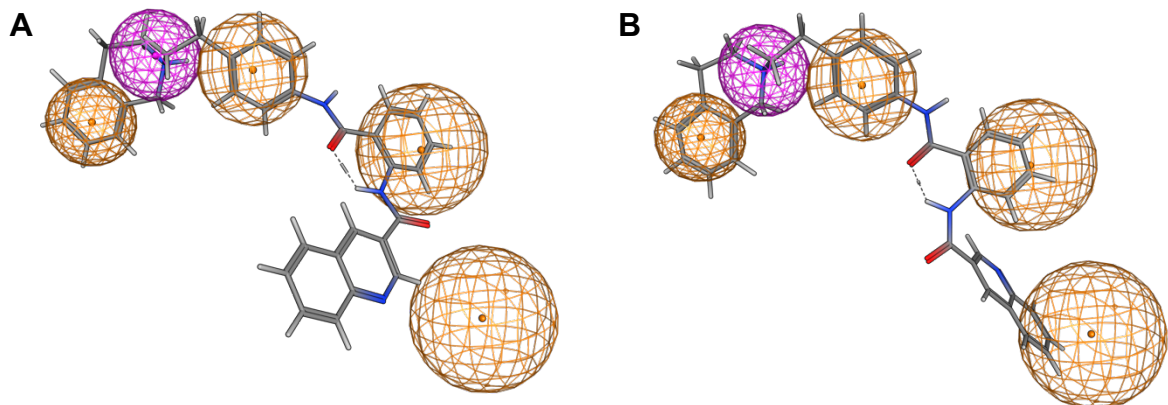
Bei der benutzten stochastischen Konformationssuche mit MOE wurden energetisch günstige Konformationen in einer hydrophilen Umgebung berechnet. Diese unterscheidet sich jedoch von den hydrophoben Gegebenheiten in der Bindungstasche. Daher wurde für die Konformationssuche für die in Verknüpfung 2 *ortho*-substituierten Verbindungen eine andere Strategie gewählt. Um Konformationen zu erzeugen, die mit der Konformation des Liganden MB136 überlagert werden können, wurde für die Verbindungen KS-321, WK-X-18, XR9577, WK-X-29, WK-X-32, WK-X-34, WK-X-36, WK-X-74, WK-X-78 und WK-X-92 zusätzlich das MOE Modul Flexible Alignment genutzt.



**Abbildung 4-44: Flexible Alignment von A: MB136 (weiß) und WK-X-92 (grau) und B: MB136 (weiß) und WK-X-74 (grau)**

In Abbildung 4-44 sind mit Flexible Alignment erzeugte Konformationen der beiden Verbindungen WK-X-92 (A), welche einen Harnstoff in Verknüpfung 2 enthält, und WK-X-74 (B), welche ein verkürztes Tariquidar-Analogon mit Harnstoff in Verknüpfung 1 enthält, abgebildet. Die beiden Verbindungen sind prinzipiell in der Lage, eine ähnliche Konformation wie MB136 einzunehmen. Allerdings liegen dabei sowohl bei WK-X-92 als auch bei WK-X-74 ungünstige Winkel in den Verknüpfungen vor.

Die bei der stochastischen Konformationssuche bevorzugte Linkerkonformation, der in Verknüpfung 2 *ortho*-substituierten Verbindungen, ist das *trans*-Amid. Dadurch ist der untere aromatische Bereich der Verbindungen mit *trans*-Konformation des Amids nicht deckungsgleich zu der langgestreckten Konformation der Verbindung MB136 und damit auch nicht deckungsgleich zu dem definierten Pharmakophor. Um Konformationen erzeugen zu können, die mit der Konformation von MB136 überlagert werden konnten, musste auch die Berechnung energetisch ungünstigerer Konformationen zugelassen werden. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 4-45 die mit der stochastischen Konformationssuche berechneten Konformationen der Verbindung XR9577 für das *trans*-Amid (A) und *cis*-Amid (B) dargestellt.



**Abbildung 4-45: Überlagerung von XR9577 mit dem Pharmakophor. A: *trans*-Amid. B: *cis*-Amid.**

Die üblicherweise sterisch bevorzugte Konformation von Amiden ist die energetisch günstigere *trans*-Konformation, abgebildet für XR9577 in Abbildung 4-45 A. Diese Konformation weicht bei Bereich A4 von den definierten Bereichen im Pharmakophor ab. Die Konformation des energetisch ungünstigeren *cis*-Amids, welche

in Abbildung 4-45 B gezeigt ist, überlagert mit allen definierten Bereichen des Pharmakophors.

Die in Abbildung 4-45 A abgebildete und berechnete Konformation von XR9577 berücksichtigt nicht, dass in der flachen Bindungstasche von ABCG2 eingeschränkt Platz vorhanden ist. Weitere Untersuchungen zur Lage der Konformation von XR9577 in der Bindungstasche legen aber nahe, dass für die Bindung der *trans*-Konformation genügend Platz in der Bindungstasche wäre.

Diese für XR9577 geschilderte Problematik bei der Konformationssuche ergab sich bei allen hier untersuchten, in Verknüpfung 2 *ortho*-substituierten Verbindungen (KS-321, WK-X-18, XR9577, WK-X-29 WK-X-32, WK-X-34 und WK-X-36).

Die hier durchgeführten Analysen zeigen, dass die räumliche Ausrichtung der Amide in Verknüpfung 1 und Verknüpfung 2 wichtig zu sein scheint, damit die Verbindungen in die flache Bindungstasche von ABCG2 passen können. Unter der Voraussetzung, dass die Lage des Tetrahydroisochinolins für alle hier untersuchten Verbindungen gleich ist, ist es wahrscheinlich, dass die in Verknüpfung 1 *ortho*-substituierten Verbindungen eine abgewinkelte Konformation einnehmen. Vermutlich binden sie also, im Vergleich zu MB136, leicht abgewandelt in der Bindungstasche von ABCG2.

### 4.8.8 Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich aus den erhaltenen Daten des Vanadat-sensitiven ATPase Assays für die Tariquidar-Analoga, HM30181-Analoga und Elacridar-Analoga festhalten, dass der Tetrahydroisochinolinrest wichtig für die Art der Interaktion der untersuchten Verbindungen mit ABCG2 ist. Wie in Kryoelektronenmikroskopstrukturen von ABCG2 beobachtet und auch von Pick et al. für die Tariquidar-Analoga mit und ohne Tetrahydroisochinolinrest berichtet, binden Substrate und Inhibitoren der ATPase Aktivität in die gleiche Bindungstasche von ABCG2.<sup>43–45,217</sup> Dennoch haben die verschiedenen Strukturvarianten der Verbindungen gegensätzliche Einflüsse auf die ATPase Aktivität. Verbindungen mit Tetrahydroisochinolinrest inhibieren die basale ATPase Aktivität von ABCG2, analoge Verbindungen ohne Tetrahydroisochinolinrest aktivieren diese.

Die Verbindungen mit Tetrahydroisochinolinrest, die ursprünglich als ABCB1-Modulatoren entwickelt wurden, haben im Vergleich auf die ATPase Aktivität von ABCB1 einen gegensätzlichen aktivierenden biphasischen Effekt.<sup>211,224,225</sup> Die Abwesenheit des Tetrahydroisochinolins erhöht gleichzeitig die Prävalenz der getesteten Verbindungen für ABCG2.<sup>216,217</sup>

Veränderungen in Verknüpfungsmustern und den Substituenten des aromatischen Bereichs der beiden Grundstrukturen führen zu einer Veränderung des Ausmaßes der Aktivierung oder der Inhibierung der ATPase Aktivität in dem gemessenen Konzentrationsbereich. Außerdem scheinen die Veränderungen von Verknüpfungsmustern und den Substituenten des aromatischen Bereichs der Grundstruktur Einfluss auf den Transport der Fluoreszenzfarbstoffe Hoechst 33342 und Pheophorbid A durch ABCG2 zu besitzen.

Bedauerlicherweise lassen jedoch die mit den funktionellen Assays, Hoechst 33342 Assay und Pheophorbid A Assay, erhaltenen Daten keine Rückschlüsse auf die Art der Interaktion von getesteten Verbindungen mit ABCG2 zu.

Der von Pajeva et al. und Pick et al. berichtete Einfluss der Methoxygruppen des Tetrahydroisochinolinrestes auf die Interaktion mit ABCG2 lässt sich im ATPase Assay bestätigen. Diese führen, wie in der Literatur beschrieben, zu einer Verschlechterung der Interaktion mit ABCG2, die sich hier in kleineren pEC<sub>50</sub>-Werten im Vanadat-sensitiven ATPase Assay äußert.<sup>220,221</sup>

Die Positionen 4 und 5 an der Anthranilsäurepartialstruktur, scheinen bei den direkten Tariquidar-Analoga KS-321 und KS-333, wie auch von Kühnle et al. und Pajeva et al. berichtet, für die Interaktion mit ABCG2 bedeutend zu sein.<sup>221,226</sup> Variationen dieser Methoxygruppen führen entweder zu einer Zunahme oder Abnahme der Inhibierung der ATPase Aktivität. Bedauerlicherweise enthält die im Arbeitskreis vorhandene Substanzbibliothek kaum Verbindungen mit diesen Substitutionsvarianten, so dass eine gründlichere Überprüfung dieser Beobachtung nicht möglich war.

Der Austausch des Amids in Verknüpfung 1 gegen die Strukturen Tetrazol, Oxadiazol und 1,2,3-Triazol mit höherer Planarität scheint, wie auch in der Doktorarbeit von Sebastian Köhler berichtet, für die Interaktion mit ABCG2 allgemein vorteilhaft zu sein.<sup>214</sup> Die Verbindungen zeigen, sowohl im Vanadat-sensitiven ATPase Assay und in den funktionellen Assays, eine verbesserte Interaktion mit ABCG2 als die korrespondierenden Amide.

Jackson et al. konnten in Kryoelektronenmikroskopstrukturen von ABCG2 mit dem Tariquidar-Analogen MB136 zeigen, dass MB136 die Bindungstasche von ABCG2 durch multiple Bindungen blockiert.<sup>44</sup> Die computergestützte Untersuchung der Konformationen von Tariquidar-Analoga, HM30181-Analoga und Elacridar zeigte, dass es möglich ist, dass die verkleinerten Verbindungen mit Tetrahydroisochinolinrest, die in Verknüpfung 2 *meta*-substituierten Verbindungen und Elacridar eine der von MB136 entsprechende Konformation einnehmen könnten. Die Konformationen der in Verknüpfung 2 *ortho*-verknüpften Verbindungen lassen sich allerdings nicht ohne weiteres mit der publizierten Konformation von MB136 überlagern. Das legt die Vermutung nahe, dass diese Verbindungen möglicherweise ähnlich aber leicht abgewandelt in der Bindungstasche von ABCG2 binden.



## 4.9 Untersuchung von 2-Arylamino-1H-benzimidazolen

Eine weitere Substanzbibliothek unseres Arbeitskreises beinhaltet verschiedene 2-Arylamino-1H-benzimidazole. Die Grundstruktur ist in Abbildung 4-46 abgebildet. Diese gegenüber ABCG2 und teilweise auch ABCB1 aktiven Verbindungen wurden von Lars Möllmann (LM-Verbindungen) synthetisiert und mit dem funktionellen Hoechst 33342 Assay charakterisiert. Die Substanzbibliothek wurde später von Anna Spindler (ASP-Verbindungen) ergänzt. Außerhalb unseres Arbeitskreises finden sich keine Veröffentlichungen zu dieser Substanzklasse als MDR Modulatoren.

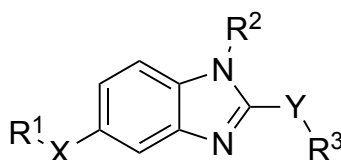


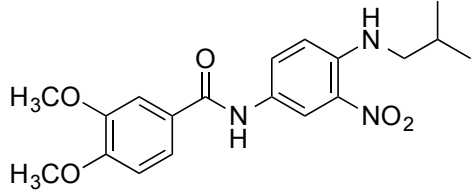
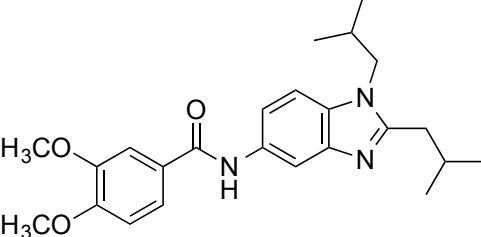
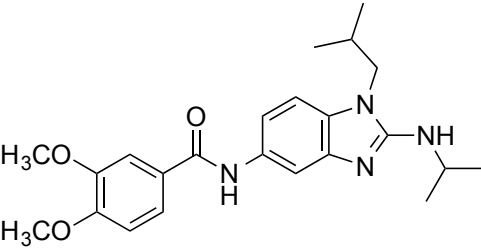
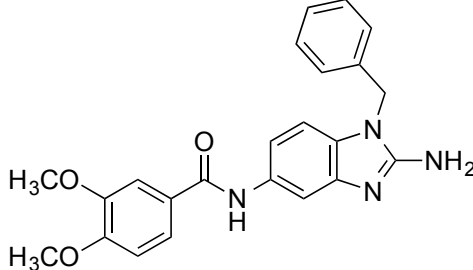
Abbildung 4-46: Übersicht der Grundstruktur der 2-Arylamino-1H-benzimidazole nach Möllmann.<sup>227</sup>

Die Verbindungen wurden im Rahmen dieser Arbeit, analog zu Kapitel 4.8, zunächst mit Hilfe des Vanadat-sensitiven ATPase Assays und anschließend mit funktionellen Assays untersucht. Die LM-Verbindungen wurden in der Dissertation von Lars Möllmann mit Hilfe von Pharmakophormodellen auf Struktur-Wirkungsbeziehungen mit ABCG2 ausführlich charakterisiert.<sup>227</sup> Für die Aktivität gegenüber ABCG2 ist an R<sup>1</sup> ein elektronenarmes aromatisches System erforderlich. Linker X kann eine variable Länge aufweisen, benötigt aber einen Wasserstoffbrücken Donor und Akzeptor. R<sup>2</sup> kann eine voluminöse hydrophobe oder aromatische Struktur sein. Für Linker Y ist ein Wasserstoffbrücken Donor möglich, aber nicht essentiell. R<sup>3</sup> sollte ebenfalls wie R<sup>1</sup> ein elektronenarmes aromatisches System sein.

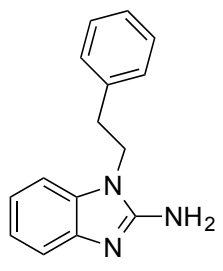
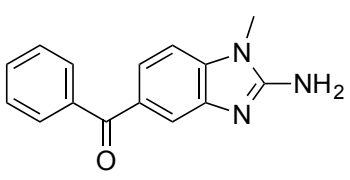
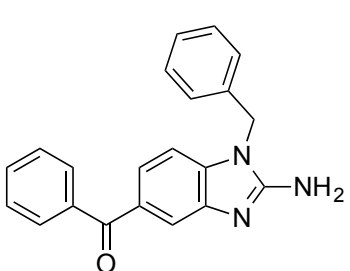
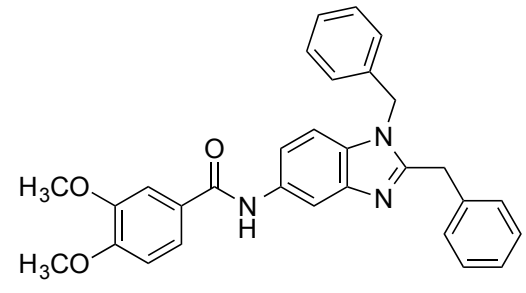
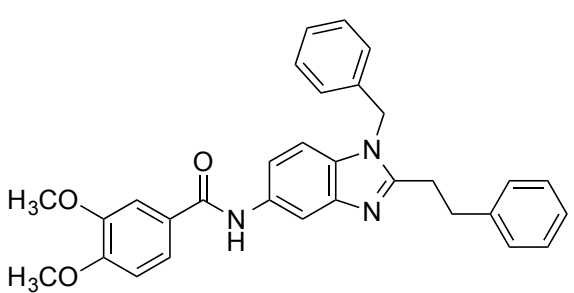
Die getesteten Verbindungen wurden aufgrund struktureller Gemeinsamkeiten und der Charakteristiken, die von Lars Möllmann herausgearbeitet worden sind, in fünf Gruppen eingeteilt.<sup>227</sup> Die Strukturen sind in Tabelle 4-32 abgebildet.

Die Verbindungen in Gruppe 1 enthalten als Variation keinen oder nur einen aromatischen Rest in Position  $R^2$  und  $R^3$ , sowie als weitere Variation, wie in ASP-002, kein NH in Linker Y. Bei der Verbindung ASP-001 handelt es sich um eine Vorstufe der Synthese. Verbindungen in Gruppe 2 besitzen keinen Rest  $R^3$ , nur eine  $NH_2$ -Gruppe und ein im Vergleich zu den anderen Gruppen verkleinerten Rest  $R^1$ . Strukturen in Gruppe 3 enthalten als Variation keine Aminogruppe in Linker Y. Gruppe 4 umfasst Verbindungen, die alle Elemente des von Lars Möllmann beschriebenen Pharmakophors enthalten mit Variationen in Linker X und  $R^3$ . In Gruppe 5 variiert die Länge von Linker X.

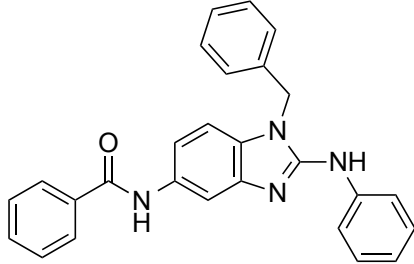
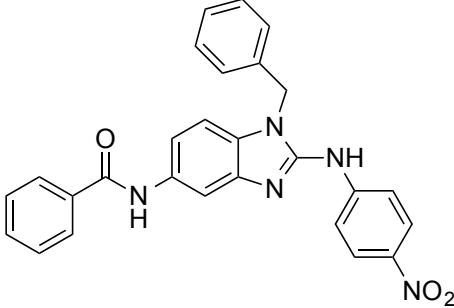
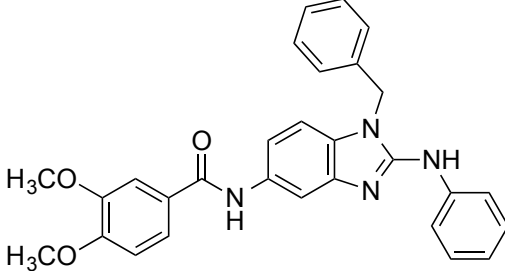
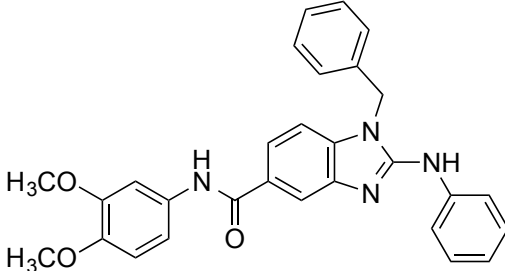
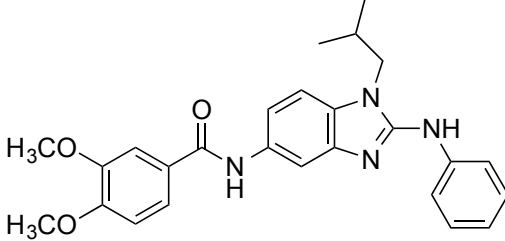
Tabelle 4-32: Strukturen der ausgewählten 2-Arylamino-1H-benzimidazole.

Verbindung	Strukturformel
<b>Gruppe 1</b>	
ASP-001	
ASP-002	
ASP-003	
LM-2.22	

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Verbindung	Strukturformel
<b>Gruppe 2</b>	
LM-2.1	
LM-2.17	
LM-2.34	
<b>Gruppe 3</b>	
LM-H-9	
ASP-016	

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Verbindung	Strukturformel
LM-I-1	
LM-I-3	
LM-I-2	
LM-I-6	
LM-I-10	

## Gruppe 5

Verbindung	Strukturformel
LM-I-14	
LM-I-13	
ASP-009	

#### 4.9.1 Vanadat-sensitiver ATPase Assay

Die 2-Arylamino-1*H*-benzimidazole wurden mit Hilfe des Vanadat-sensitiven ATPase Assays untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-33 dargestellt.

Tabelle 4-33: Effekt auf die basale ATPase Aktivität gemessen bis 10  $\mu\text{mol/l}$ . n.b. = nicht bestimmbar.

Verbindung	Effekt auf ATPase Aktivität	$\text{pEC}_{50} \pm \text{SD}$	$\text{EC}_{50} \pm \text{SD}$ [nmol/l]	$\text{E}_{\text{max}} \pm \text{SD}$ [%]
<b>Gruppe 1</b>				
ASP-001	Aktivierung	$8,08 \pm 0,01$	$8,32 \pm 0,13$	$69 \pm 9$
ASP-002	Aktivierung	$7,41 \pm 0,09$	$39,2 \pm 5,4$	$30 \pm 2$
ASP-003	Aktivierung	$6,77 \pm 0,05$	$170 \pm 13$	$20 \pm 1$
LM-2.22	Aktivierung	$6,38 \pm 0,22$	$441 \pm 151$	$18 \pm 2$
<b>Gruppe 2</b>				

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Verbindung	Effekt auf ATPase Aktivität	pEC <sub>50</sub> ± SD	EC <sub>50</sub> ± SD [nmol/l]	E <sub>max</sub> ± SD [%]	
LM-2.1	inaktiv	-	-	-	
LM-2.17	Aktivierung	5,51 ± 0,07	3910 ± 417	68 ± 2	
LM-2.34	Aktivierung	6,54 ± 0,05	289 ± 22	34 ± 2	
<b>Gruppe 3</b>					
LM-H-9	Inhibition	5,78 ± 0,18	1720 ± 479	-59 ± 1	
ASP-016	Inhibition	7,77 ± 0,38	20,1 ± 12,6	-71 ± 1	
<b>Gruppe 4</b>					
LM-I-1	biphasisch	max	7,71 ± 0,24	20,8 ± 7,8	19 ± 5
		min	5,59 ± 0,10	2600 ± 397	-78 ± 5 <sup>#</sup>
LM-I-3	biphasisch	max	7,94 ± 0,65	18,7 ± 24,0	16 ± 4
		min	6,14 ± 0,21	711 ± 233	-65 ± 8 <sup>#</sup>
LM-I-2	biphasisch	max	7,68 ± 0,25	22,5 ± 8,8	16 ± 1
		min	5,65 ± 0,06	2250 ± 205	-41 ± 12 <sup>#</sup>
LM-I-6	biphasisch	max	7,85 ± 0,03	14,1 ± 0,6	38 ± 5
		min	5,61 ± 0,05	2460 ± 187	0 ± 3 <sup>#</sup>
LM-I-10	biphasisch	max	7,73 ± 0,07	18,6 ± 2,7	67 ± 3
		min	n.b.	n.b.	46 ± 7 <sup>#</sup>
<b>Gruppe 5</b>					
LM-I-14	Inhibition	6,02 ± 0,01	955 ± 14	-70 ± 6	
LM-I-13	Inhibition	5,54 ± 0,01	2880 ± 44	-33 ± 14	
ASP-009	Inhibition	5,52 ± 0,01	3020 ± 46	-30 ± 2	

<sup>#</sup> maximaler Effekt bei 10 µmol/l.

Die strukturellen Merkmale der Verbindungen führen im Vanadat-sensitiven ATPase Assay zu unterschiedlichen Effekten auf die basale ATPase Aktivität.

Um auszuschließen, dass es sich bei der schwachen Aktivierung der ATPase Aktivität durch die Verbindungen der Gruppe 4 um eine Messartefakt handeln könnte, wurden alle Verbindungen mit steigenden Konzentrationen zusammen mit 1 µmol/l Ko143 vermessen, vergleiche dazu auch Kapitel 4.10.1. Würde es sich um unspezifische Effekte handeln, müssten diese nach mündlicher Auskunft von

Dr. Csilla Özvegy-Laczka auch in der Kombination mit dem Inhibitor der ATPase Aktivität sichtbar sein. Da aber in Kombination mit Ko143 keine Veränderung der ATPase Aktivität beobachtet werden konnte, handelt es sich um tatsächliche Effekte auf die ATPase Aktivität.

Die Verbindungen der Gruppe 1 aktivieren die basale ATPase Aktivität. Den stärksten Effekt hat dabei ASP-001, die Vorstufe der Synthese, mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 8,08 und einem  $E_{max}$  von 69 %. Die Anwesenheit des NH in Linker Y bei ASP-003 führt im Vergleich zu ASP-002 zu einer Verringerung der Aktivierung der ATPase Aktivität. Die Verbindung LM-2.22, die einen Benzylrest an  $R^2$  und keine hydrophoben Gruppen an Linker Y trägt, verhält sich dagegen ähnlich wie ASP-003.

Die Verbindungen der Gruppe 2 besitzen wie LM-2.22 als Linker Y ein primäres Amin, jedoch fehlten entweder  $R^1$  und Linker X komplett (LM-2.1) oder der Elektronenakzeptor von Linker X (LM-2.17 und LM-2.34). Das führt dazu, dass LM-2.1 inaktiv gegenüber der ATPase von ABCG2 ist, während die Verbindungen LM-2.17 und LM-2.34 die ATPase Aktivität mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 5,51 für LM-2.17 und 6,54 für LM-2.34 und einem  $E_{max}$  68 % für LM-2.17 und von 34 % für LM-2.34 aktivieren. Interessanterweise führt der Unterschied, also die Abwesenheit (LM-2.17) bzw. Anwesenheit (LM-2.34) des Benzylrestes dazu, dass LM-2.17 die ATPase zwar erst in höheren Konzentrationen als LM-2.34 aktiviert, dafür der Effekt aber stärker ausgeprägt ist.

Gruppe 3 besitzt kein sekundäres Amin in Linker Y. Diese Verbindungen zeigen eine Inhibition der basalen ATPase Aktivität. Dabei führt die Verlängerung des Linkers um eine Methylgruppe in ASP-016 im Vergleich mit LM-H-9 zu einer Verstärkung der Inhibition.

Gruppe 4 besitzt ein sekundäres Amin als Linker Y. Dieses führt zu einer Veränderung in der Interaktion mit der ATPase. Die Verbindungen aktivieren die ATPase zunächst, führen dann aber konzentrationsabhängig zu einer Inhibition. Innerhalb dieser Gruppe ist zu beobachten, dass LM-I-2, welches eine 3,4-Methoxyphenylgruppe als  $R^1$  besitzt mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 7,68 und einem  $E_{max}$  von 16 % die ATPase ähnlich stark aktiviert wie LM-I-1, welches nur eine Phenylgruppe als  $R^1$  besitzt, mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 7,71 und einem  $E_{max}$  von 19 %. Allerdings unterscheiden sich die maximalen Effekte der Inhibition mit einem  $E_{max}$  von -41 %

für LM-I-2 und einem  $E_{\max}$  von -78 % für LM-I-1. Die Einführung der Nitrogruppe in  $R^3$  bei LM-I-3 zeigt dagegen keinen großen Einfluss. LM-I-3 verhält sich gegenüber der ATPase Aktivität wie LM-I-1. Dagegen führt der Tausch von Elektronenakzeptor und Elektronendonator in Linker X in LM-I-6 mit einem  $E_{\max}$  von 38 % für die Stimulation und einem  $E_{\max}$  von 0 % für die Inhibition im Vergleich zu den anderen Verbindungen innerhalb der Gruppe zu einer deutlichen Veränderung im biphasischen Aktivierungsprofil der ATPase. Die Verbindung LM-I-10, welche ähnlich aufgebaut ist wie LM-I-2, aber an  $R^2$  einen Isopropylrest trägt aktiviert die ATPase Aktivität mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 7,73 und einem  $E_{\max}$  für die Stimulation von 67 % sehr deutlich, während die Inhibition bis 10  $\mu\text{mol/l}$  nur bis auf 46 % absinkt. Die Verlängerung von Linker X in Gruppe 5 führt zu einer Inhibition der basalen ATPase Aktivität. Dabei ist interessant, dass der Harnstoff in LM-I-14 die Inhibition mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 6,02 und einem maximalen Effekt von -70 % gegenüber LM-I-13 und ASP-009 stärker ausfällt. Durch die Verlängerung von Linker X um einen Propyl-Rest in ASP-009 fällt die Aktivität gegenüber der ATPase ab.

Kleine Veränderungen der Struktur der 2-Arylamino-1*H*-benzimidazole reichen also aus, um vollständig andere Effekte auf die basale ATPase Aktivität auszuüben. So führt Verbindung ASP-002, die kein sekundäres Amin in Linker Y besitzt und zwei Isopropylreste an  $R^2$  und  $R^3$  trägt, zu einer Aktivierung der ATPase Aktivität, während LM-H-9, welches zwei Aromaten an  $R^2$  und  $R^3$  aufweist, sonst aber gleich aufgebaut ist, zu einer Inhibition führt. Im Gegensatz dazu führt Verbindung LM-I-2, welche im Vergleich zu LM-H-9, neben den Aromaten als  $R^2$  und  $R^3$  eine Aminogruppe als Linker Y besitzt, zu einem biphasischen Verlauf der ATPase Aktivität. Verbindung LM-I-14, die einen Harnstoff als Linker X trägt, führt im Gegensatz zu LM-I-1 oder LM-I-6 mit vertauschter Amidgruppe, die zu einem biphasischen Verlauf der ATPase Aktivität führen, zu einer Inhibition der ATPase. In Abbildung 4-47 sind die Graphen einiger Verbindungen exemplarisch dargestellt.



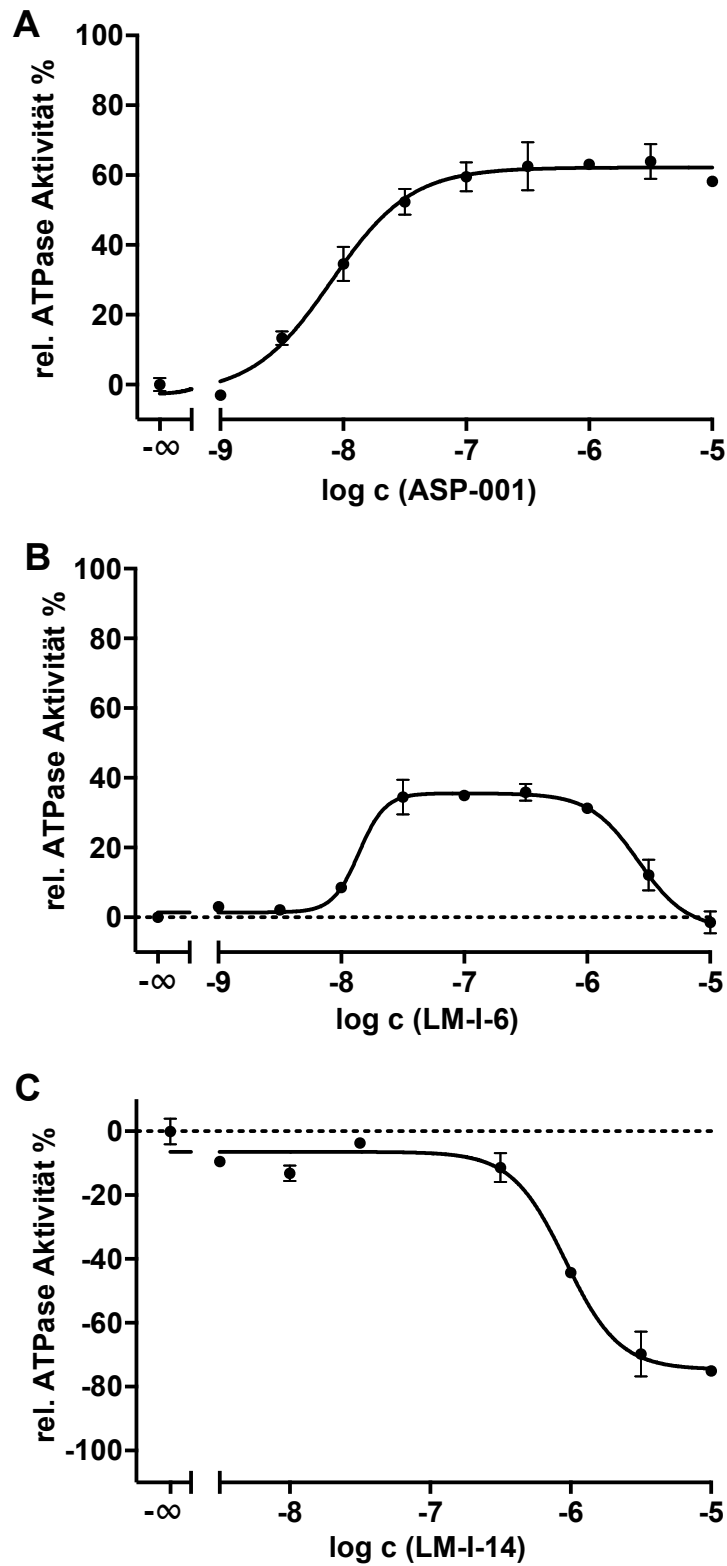


Abbildung 4-47: Effekt auf die basale ATPase Aktivität. A: ASP-001. B: LM-I-6. C: LM-I-14.

Lars Möllmann beschreibt in seiner Dissertation die Merkmale dieser Verbindungs-klasse, welche für die Interaktion mit ABCG2 essentiell sind.<sup>227</sup> Diese können durch die erhaltenen Ergebnisse im Vanadat-sensitiven ATPase Assay bestätigt werden. So beschreibt er, dass bereits große hydrophobe Reste an R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> für die Interaktion der Verbindungen mit ABCG2 ausreichen, allerdings führen sie zu gegensätzlichen Effekten auf die ATPase Aktivität. Das Fehlen der Aromaten, ganz oder teilweise, führt in diesen Positionen zu einer Steigerung der ATPase Aktivität.

Der Verbindung LM-H-9 wurde von Lars Möllmann aufgrund einer veränderten Verschiebung im <sup>13</sup>C-NMR an Position C2 eine Sonderstellung im Vergleich mit den Substanzen aus Gruppe 4 zugeordnet. Diese Sonderstellung bestätigt sich durch die hier erhaltenen Ergebnisse. LM-H-9 und die Substanzen der Gruppe 3, die kein sekundäres Amin als Linker Y besitzen, inhibieren die ATPase Aktivität, während die Verbindungen der Gruppe 4, die das sekundäre Amin besitzen, einen biphasischen Verlauf zeigen.

Lars Möllmann, beschreibt außerdem, dass Verbindung LM-I-6 aufgrund der vertauschten Amidstruktur in Linker X zu einer verbesserten Aktivität gegenüber ABCG2 führt. Dies spiegelt sich auch in der stärkeren Aktivierung der basalen ATPase Aktivität durch Verbindung LM-I-6 im Vergleich zur sonst analogen Verbindung LM-I-2 wieder.

Zudem ist laut Lars Möllmann die Länge von Linker X wichtig. Auch das bestätigt sich hier, da die Substanzen mit verlängertem Linker X im Vergleich mit Gruppe 4 zu einer reinen Inhibition der ATPase Aktivität führen.

### 4.9.2 Charakterisierung mit funktionellen Assays

Die 2-Arylamino-1H-benzimidazole wurden auch funktionell im Hoechst 33342 Assay und im Pheophorbid A Assay mit PLB-985 ABCG2 Zellen untersucht. Die erhaltenen Daten sind in Tabelle 4-34 aufgeführt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 4-34: Ermittelte pIC<sub>50</sub>-Werte bzw. IC<sub>50</sub>-Werte mit PLB-985 ABCG2 im Hoechst 33342 Assay und Pheophorbid A-Assay. n.a. bis 52 µmol/l**

Verbindung	Hoechst 33342 Assay		Pheophorbid A Assay	
	pIC <sub>50</sub> ± SD	IC <sub>50</sub> ± SD [µmol/l]	pIC <sub>50</sub> ± SD	IC <sub>50</sub> ± SD [µmol/l]
<b>Gruppe 1</b>				
ASP-001	5,65 ± 0,18	2,32 ± 0,65	5,90 ± 0,11	1,28 ± 0,22
ASP-002	5,53 ± 0,15	3,02 ± 0,70	5,46 ± 0,14	3,55 ± 0,76
ASP-003	4,45 ± 0,10*	35,9 ± 5,5*	4,62 ± 0,10*	24,2 ± 3,7*
LM-2.22	4,84 ± 0,10*	14,6 ± 2,2*	4,97 ± 0,24*	11,5 ± 4,3*
<b>Gruppe 2</b>				
LM-2.1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
LM-2.17	4,43 ± 0,01*	37,2 ± 0,6*	n.a.	n.a.
LM-2.34	4,71 ± 0,40	23,4 ± 15,7	4,84 ± 0,15*	14,8 ± 3,4*
<b>Gruppe 3</b>				
LM-H-9	5,48 ± 0,07	3,33 ± 0,36	5,63 ± 0,13	2,43 ± 0,68
ASP-016	5,61 ± 0,12	2,50 ± 0,46	5,76 ± 0,02	1,74 ± 0,05
<b>Gruppe 4</b>				
LM-I-1	5,80 ± 0,21	1,67 ± 0,55	5,74 ± 0,18	1,89 ± 0,53
LM-I-3	6,39 ± 0,10	0,412 ± 0,063	6,23 ± 0,07	0,592 ± 0,063
LM-I-2	5,91 ± 0,08	1,24 ± 0,15	5,83 ± 0,09	1,49 ± 0,21
LM-I-6	5,94 ± 0,16	1,18 ± 0,29	5,69 ± 0,08	2,06 ± 0,25
LM-I-10	5,54 ± 0,07	2,90 ± 0,31	5,49 ± 0,02	3,24 ± 0,10
<b>Gruppe 5</b>				
LM-I-14	5,94 ± 0,05	1,15 ± 0,09	6,08 ± 0,06	0,835 ± 0,076
LM-I-13	5,78 ± 0,01	1,66 ± 0,03	5,93 ± 0,14	1,20 ± 0,26
ASP-009	5,39 ± 0,12	4,14 ± 0,76	5,40 ± 0,23	4,23 ± 1,52

\* gefittet auf Top Ko143.

Es finden sich bei den hier getesteten Verbindungen in Gruppe 1 Analogien zum Effekt auf die ATPase Aktivität und der Stärke der Inhibition des Transports von Hoechst 33342 und Pheophorbid A wieder. So sind die Verbindungen ASP-003 und LM-2.22 aus Gruppe 1, die im ATPase Assay nur einen schwachen maximalen Effekt zeigen, auch schlechte Inhibitoren des Transports von Hoechst 33342 und Pheophorbid A. Die erhöhte Aktivität in den funktionellen Assays von LM-I-3, welches eine Nitrogruppe besitzt, aus Gruppe 3, lässt sich durch die ATPase Daten nicht erklären. Lars Möllmann bezeichnete diese Verbindung als Ausreißer und vermutet, dass LM-I-3 veränderte physikochemische Eigenschaften aufweist.<sup>227</sup> Verbindung LM-2.17 aus Gruppe 2 ist schwach im Hoechst 33342 Assay aktiv und inaktiv im Pheophorbid A Assay, bewirkt aber eine deutliche Aktivierung der ATPase Aktivität. LM-2.34 dagegen ist im Vergleich zu den anderen Verbindungen der Gruppe 2 sowohl in beiden funktionellen Assays als auch im ATPase Assay aktiv.

### 4.9.3 Schlussfolgerung

Die untersuchten 2-Arylamino-1*H*-benzimidazole zeigen bereits bei kleinen strukturellen Abweichungen große Veränderungen in ihrem Effekt auf die ATPase Aktivität von ABCG2. Möglicherweise bewirken diese strukturellen Unterschiede eine Veränderung in der Interaktion mit der Bindungstasche von ABCG2 die dann entweder zu einer Hemmung, Aktivierung oder einem biphasischen Verlauf der ATPase Aktivität führt. Da Kryoelektronenmikroskopstrukturen von ABCG2 durch Manolaridis et al. eine erhöhte Affinität von Inhibitoren im Vergleich zu Substraten in der Bindungstasche nahe legen, scheint sich diese durch die verschiedenen strukturellen Modifikationen zu verändern.<sup>43</sup>

Hinweise auf die unterschiedlichen Effekte der 2-Arylamino-1*H*-benzimidazole auf die ATPase Aktivität von ABCG2 liefern die in der Dissertation von Lars Möllmann beschriebenen Beobachtungen.<sup>227</sup> Verschiedene Eigenschaften der Verbindungen lassen sich durch die Kombination von Daten aus funktionellen Assays, physikochemischen Eigenschaften, Verschiebungen im <sup>13</sup>C-NMR und Berechnung von Atomabständen beschreiben. Dies spiegelt sich in den unterschiedlichen Effekten auf die ATPase Aktivität von ABCG2 wider.

### 4.10 Kombinationsexperimente im Vanadat-sensitiven ATPase Assay

Um ein besseres Verständnis über die unterschiedlichen Interaktionen der Verbindungen mit ABCG2 zu erhalten, wurden mit Hilfe des Vanadat-sensitiven ATPase Assays Kombinationsversuche durchgeführt. Laut mündlicher Auskunft von Dr. Csilla Özvegy-Laczka (Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Ungarn) kann der hemmende Effekt von Ko143 auf die ATPase Aktivität bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  nicht aufgehoben werden. Daher wurde im Folgenden untersucht, wie es sich in dieser Hinsicht mit anderen Verbindungen, welche die ATPase Aktivität hemmen, verhält. Dazu wurden jeweils zwei verschiedene Verbindungen zusammen in einem Versuch eingesetzt. Bei jeweils einer der Verbindungen handelt es sich um einen Inhibitor der ATPase Aktivität, bei der anderen Verbindung handelt es sich um einen Aktivator. Eine der beiden Verbindungen wurde in gleichbleibender Konzentration, die andere in steigenden Konzentrationen eingesetzt. Anschließend wurden die Partner in einer erneuten Messung vertauscht. Als beschreibende Parameter wurden die  $\text{pEC}_{50}$ -Werte, die maximalen Effekte und die Schnittpunkte der Graphen mit der basalen ATPase Aktivität  $\text{pEC}_b$  berechnet.  $\text{pEC}_b$  wurde als beschreibender Parameter ausgewählt, da sich bei diesem Schnittpunkt mit der basalen ATPase Aktivität die Effekte der beiden Verbindungspartner auf die ATPase Aktivität gegenseitig aufheben. Die erhaltenen Daten wurden dazu, wie in Kapitel 4.7.2 beschrieben, normiert, während die  $\text{pEC}_{50}$ - und  $\text{pEC}_b$ -Werte bzw.  $\text{EC}_{50}$ - und  $\text{EC}_b$ -Werte aus den unveränderten Rohdaten berechnet wurden.

Es wurden Versuche mit Ko143 und XR9577 als Inhibitoren der ATPase Aktivität und Quercetin als Aktivator der ATPase Aktivität durchgeführt. Daneben wurden in Experimenten inhibierende und aktivierende Verbindungspaare von Tariquidar-Analoga mit und ohne Tetrahydroisochinolinrest kombiniert. Zusätzlich wurde eine Testreihe von Kombinationsexperimenten mit ATPase aktivierenden Tariquidar-Analoga ohne Tetrahydroisochinolinrest und ATPase aktivierenden 2-Arylamino-1*H*-benzimidazolen mit Hoechst 33342 als Inhibitor der ATPase Aktivität durchgeführt.

#### 4.10.1 Kombination von Ko143 und XR9577 mit Quercetin

Zunächst wurden die Inhibitoren der ATPase Aktivität Ko143 und XR9577 mit dem Aktivator Quercetin kombiniert. Die einzelnen Effekte der Verbindungen auf die ATPase Aktivität wurden bereits in Kapitel 4.7.1 und Kapitel 4.8.2.1 beschrieben. Als konstante Konzentration wurde in den Kombinationsexperimenten jeweils 1  $\mu\text{mol/l}$  eingesetzt. Diese Konzentration wurde gewählt, da Ko143, XR9577 und Quercetin hier bereits ihre maximalen Effekte auf die ATPase Aktivität erreichen. Die Ergebnisse der Kombinationsexperimente sind in Tabelle 4-35 aufgelistet.

**Tabelle 4-35: Effekt auf die basale ATPase Aktivität.**

**Tabelle 4-35-A: Effekt der Einzelsubstanzen auf die basale ATPase Aktivität gemessen bis 10  $\mu\text{mol/l}$ . Ermittelt wurden  $\text{pEC}_{50}$ ,  $\text{EC}_{50}$  und die maximalen Effekte mit Standardabweichungen.**

Verbindung	Effekt auf ATPase Aktivität	$\text{pEC}_{50} \pm \text{SD}$	$\text{EC}_{50} \pm \text{SD}$ [nmol/l]	$E_{\text{max}} \pm \text{SD}$ [%]
Ko143	Inhibition	$7,89 \pm 0,10$	$13,0 \pm 2,0$	$-100 \pm 4$
XR9577	Inhibition	$8,16 \pm 0,26$	$7,48 \pm 3,07$	$-77 \pm 11$
Quercetin	Aktivierung	$7,41 \pm 0,06$	$39,1 \pm 3,6$	$+100 \pm 4$

**Tabelle 4-35-B: Effekte auf die basale ATPase Aktivität, gemessen bis 10  $\mu\text{mol/l}$ . Ermittelt wurden  $\text{pEC}_{50}$ ,  $\text{pEC}_b$  und die maximalen Effekte mit Standardabweichungen .**

Verbindung	Effekt auf ATPase Aktivität	$\text{pEC}_{50} \pm \text{SD}$	$E_{\text{max}} \pm \text{SD}$ [%]	$\text{pEC}_b \pm \text{SD}$
Quercetin + 1 $\mu\text{mol/l}$ Ko143	keine	-	-	-
Ko143 + 1 $\mu\text{mol/l}$ Quercetin	Inhibition	$7,23 \pm 0,03$	$-98 \pm 7$	$6,96 \pm 0,03$
Quercetin +1 $\mu\text{mol/l}$ XR9577	Aktivierung	$5,90 \pm 0,09$	$68 \pm 7$	$6,17 \pm 0,16$
XR9577 +1 $\mu\text{mol/l}$ Quercetin	Inhibition	$6,44 \pm 0,13$	$-67 \pm 7$	$5,86 \pm 0,09$

**Tabelle 4-35-C: Effekte auf die basale ATPase Aktivität gemessen bis 10  $\mu\text{mol/l}$ . Ermittelt wurden  $\text{EC}_{50}$ ,  $\text{EC}_b$  und die maximalen Effekte mit Standardabweichungen.**

<b>Verbindung</b>	<b>Effekt auf ATPase Aktivität</b>	<b><math>\text{EC}_{50} \pm \text{SD}</math> [nmol/l]</b>	<b><math>E_{\text{max}} \pm \text{SD}</math> [%]</b>	<b><math>\text{EC}_b \pm \text{SD}</math> [nmol/l]</b>
Quercetin + 1 $\mu\text{mol/l}$ Ko143	keine	-	-	-
Ko143 + 1 $\mu\text{mol/l}$ Quercetin	Inhibition	$58,9 \pm 2,7$	$-98 \pm 7$	$110 \pm 5$
Quercetin +1 $\mu\text{mol/l}$ XR9577	Aktivierung	$1270 \pm 174$	$68 \pm 7$	$696 \pm 172$
XR9577 +1 $\mu\text{mol/l}$ Quercetin	Inhibition	$370 \pm 74$	$-67 \pm 7$	$1390 \pm 191$

Die Graphen der Kombinationsexperimente von Quercetin und Ko143 sind in Abbildung 4-48 abgebildet. Quercetin ist nicht in der Lage den inhibitorischen Effekt von Ko143 aufzuheben. Laut mündlicher Auskunft von Dr. Csilla Özvegy-Laczka (Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Ungarn) trifft diese Beobachtung für Ko143 generell zu. Ko143 wird daher zur Prüfung auf unspezifische Effekte auf die ATPase Aktivität eingesetzt. Dies wurde unter anderem bei der Untersuchung der 2-Arylamino-1H-benzimidazole in Kapitel 4.9 ausgenutzt.

Die Aktivierung der ATPase Aktivität mit 1  $\mu\text{mol/l}$  Quercetin lässt sich durch steigende Konzentrationen Ko143 hemmen. Ko143 inhibiert die mit Quercetin stimulierte ATPase und hat einen  $\text{pEC}_b$  von 6,96. Bei dieser Konzentration liegt Quercetin in ungefähr 10-fachem Überschuss vor. Bei äquimolaren Mengen von Quercetin und Ko143 erreicht die ATPase Aktivität bereits nahezu den Wert der maximalen Inhibition von Ko143 alleine.

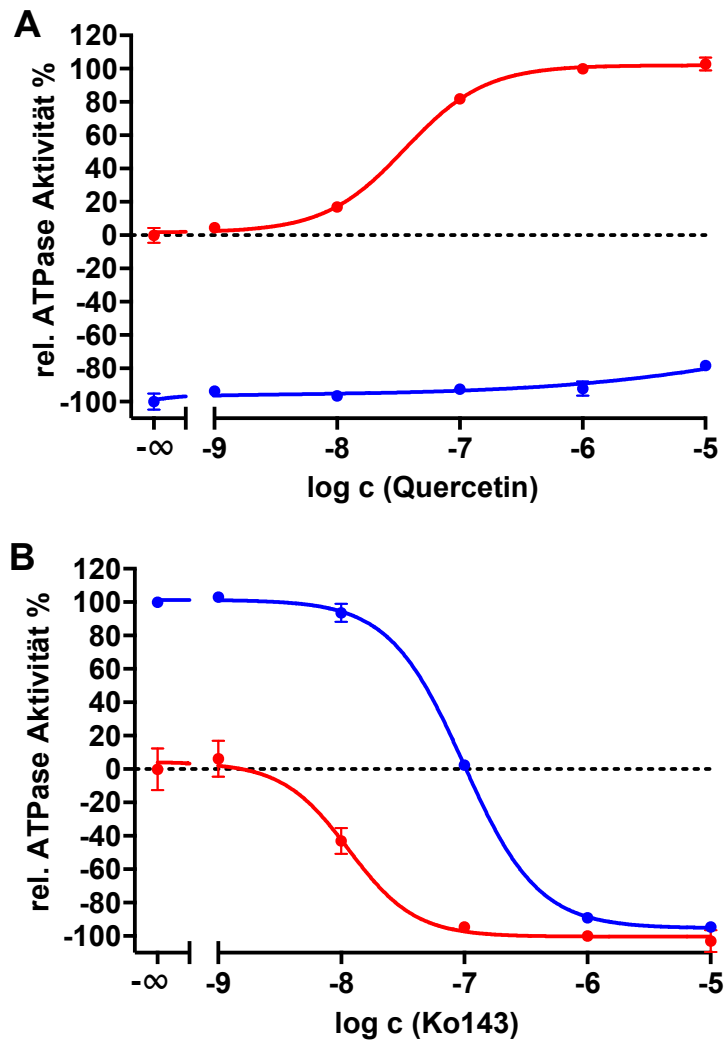


Abbildung 4-48: Effekt auf die ATPase Aktivität. A: Quercetin (rot) und Quercetin mit 1 µmol/l Ko143 (blau). B: Ko143 (rot) und Ko143 mit 1 µmol/l Quercetin (blau). Startpunkt der ATPase Aktivitäten der Graphen sind A: rot: basale Aktivität und blau: Ko143 1 µmol/l und B: rot: basale Aktivität und blau: Quercetin 1 µmol/l.

Die Graphen der Kombinationsexperimente von Quercetin und XR9577 sind in Abbildung 4-49 abgebildet. Quercetin kann den Effekt von XR9577 auf die ATPase Aktivität wieder aufheben und schneidet die basale ATPase Aktivität bei einem  $pEC_b$  von 6,17, also ungefähr bei der gleichen Konzentration beider Verbindungen. Allerdings erreicht Quercetin in der Kombination mit XR9577 bis zu der Konzentration von 10 µmol/l nur einen maximalen Effekt von 68 % und bleibt damit deutlich unter der maximalen Aktivierung von 100 % von Quercetin allein. XR9577 erreicht bei einer Konzentration von 10 µmol/l einen  $E_{max}$ -Wert von -67 %, der maximale Effekt von XR9577 allein liegt dagegen bei -77 %.



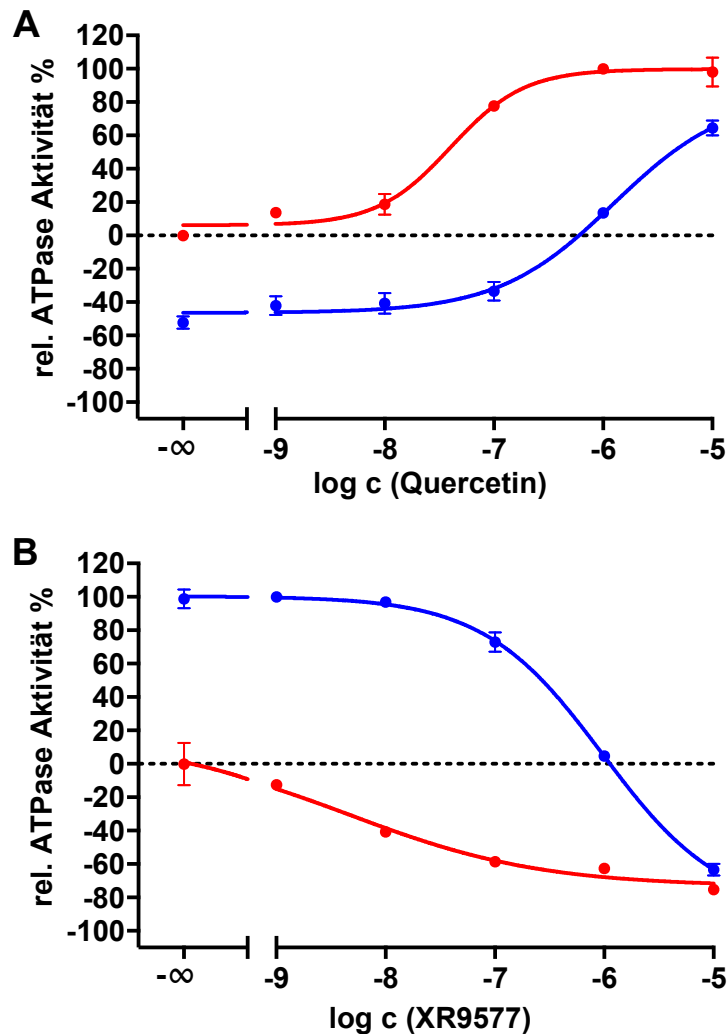


Abbildung 4-49: Effekt auf die ATPase Aktivität. A: Quercetin (rot) und Quercetin mit 1 µmol/l XR9577 (blau). B: XR9577 (rot) und XR9577 mit 1 µmol/l Quercetin (blau). Startpunkt der ATPase Aktivitäten der Graphen sind A: rot: basale Aktivität und blau: XR9577 1 µmol/l und B: rot: basale Aktivität und blau: Quercetin 1 µmol/l.

Die Ergebnisse der Kombinationsexperimente mit Quercetin zeigen unterschiedliche Ergebnisse für Ko143 und dem Tariquidar-Analogon XR9577. Die Aktivierung der ATPase Aktivität mit 1 µmol/l Quercetin lässt sich durch steigende Konzentrationen von Ko143 und XR9577 hemmen. Ko143 hat aber mit einem  $pEC_{50}$  von 7,23 einen stärker hemmenden Effekt auf die mit 1 µmol/l Quercetin stimulierte ATPase als XR9577 mit einem  $pEC_{50}$  von 6,44. Der Effekt von Quercetin auf die ATPase Aktivität lässt sich durch Ko143 damit schneller aufheben als durch XR9577. Quercetin ist außerdem in der Lage, den Effekt von XR9577 auf die ATPase Aktivität zu überwinden, während dies bei Ko143 nicht möglich ist.

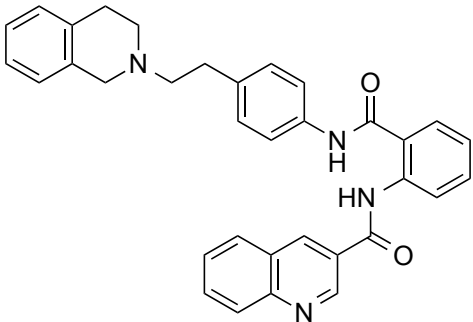
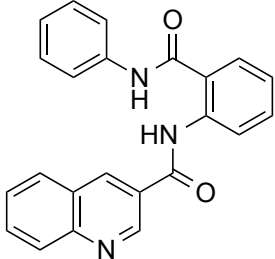
Der Effekt auf die ATPase Aktivität im Vanadat-sensitiven ATPase Assay von Ko143 in dem hier benutzten Versuchsmodell ist ähnlich dem von Vanadat. Der Effekt von Vanadat auf die ATPase Aktivität lässt sich ebenfalls nicht aufheben. Dabei interagiert Ko143 jedoch mit der Substratbindungsstelle von ABCG2.<sup>141</sup> Vanadat hingegen interagiert mit der Nukleotidbindungsstelle von ABC-Transportern.<sup>202,203</sup> Ko143 arretiert ABCG2 im nach innen geöffneten Zustand, Vanadat dagegen im nach außen geöffneten Zustand.<sup>43-45,204</sup> Dies lässt sich auch wie in der Literatur von Özvegy-Laczka beschrieben im 5D3-Shift Assay beobachten.<sup>141</sup> Ko143 führt ebenso wie ATP-Verarmung zu einem maximalen Shift, während Vanadat einen minimalen Shift bewirkt. Die Kryoelektronenmikroskopstrukturen von ABCG2 bestätigen diese Beobachtungen.<sup>43-45</sup>

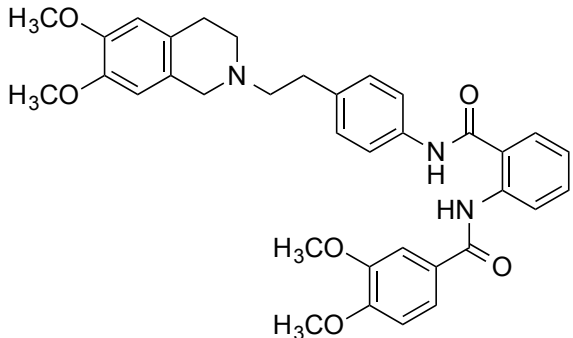
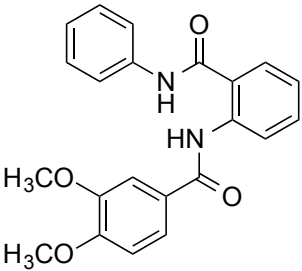
Die durch die Kombinationsexperimente erhaltenen Ergebnisse legen nahe, dass sich die beiden Inhibitoren der ATPase Aktivität, Ko143 und XR9577, in der Art und Weise ihrer Interaktion mit ABCG2 unterscheiden. In der Veröffentlichung von Jackson et al. wird mit Hilfe der Kryoelektronenmikroskopie die Bindung der beiden Verbindungen MZ29, ein Ko143-Analogon, und MB136, ein Tariquidar-Analogon, beschrieben.<sup>44</sup> Die beiden ATPase Inhibitoren binden, wie in Kapitel 1.3 in Abbildung 1-7 dargestellt, überlappend an der Bindungsstelle von ABCG2. Allerdings binden zwei Moleküle MZ29, während ein Molekül MB136 bindet. Diese Stöchiometrie wurde ebenfalls mit Hilfe von ATPase Daten bestätigt.<sup>44</sup> Dabei scheint MB136 im Gegensatz zu MZ29 multiple Bindungen einzugehen und sich in der Bindungstasche bewegen zu können, da die aufgenommene Elektronendichte für MB136 unschärfer ist.<sup>44</sup> Die Ergebnisse der Konformationsanalyse in Kapitel 4.8.7 legen nahe, dass die Beobachtungen von Jackson et al., auf die Verbindung XR9577 übertragbar sein könnten. Inwieweit die Stöchiometrie oder die Unterschiede bei der Bindung in Bindungstasche 1 von ABCG2 für die unterschiedlichen Effekte auf die ATPase Aktivität in der Kombination mit Quercetin verantwortlich ist, lässt sich hier nicht klären.

#### 4.10.2 Kombinationen von Tariquidar-Analoga

Als nächste Testreihe wurden jeweils Tariquidar-Analoga mit und ohne Tetrahydroisochinolin im Vanadat-sensitiven ATPase Assay miteinander kombiniert. Dazu wurden mit XR9577 und KS-167 sowie WK-X-34 und KS-166 zwei analog substituierte Verbindungspaare ausgewählt. Die Strukturen sind in Tabelle 4-36 abgebildet. Die einzelnen Effekte der Verbindungen auf die ATPase Aktivität wurden bereits in Kapitel 4.8.2.1 beschrieben.

Tabelle 4-36: Strukturen der ausgewählten Tariquidar-Analoga.

Verbindung	Struktur
XR9577	
KS-167	

Verbindung	Struktur
WK-X-34	
KS-166	

Bei dem Verbindungspaar XR9577 und KS-167 handelt es sich um einen Inhibitor und einen Aktivator der basalen ATPase Aktivität. Während das Verbindungspaar WK-X-34 und KS-166 aus einem Inhibitor und einer biphasisch aktivierenden Verbindung besteht. Die ermittelten Effekte auf die basale ATPase Aktivität sind in Tabelle 4-37 aufgeführt.

Tabelle 4-37: Effekt auf die basale ATPase.

Tabelle 4-37-A: Effekt der Einzelsubstanzen auf die basale ATPase Aktivität gemessen bis 10  $\mu\text{mol/l}$ . Ermittelt wurden  $\text{pEC}_{50}$ ,  $\text{EC}_{50}$  und die maximalen Effekte mit Standardabweichungen.

Verbindung	Effekt auf ATPase Aktivität	$\text{pEC}_{50} \pm \text{SD}$	$\text{EC}_{50} \pm \text{SD}$ [nmol/l]	$\text{E}_{\text{max}} \pm \text{SD}$ [%]
XR9577	Inhibition	$8,16 \pm 0,26$	$7,48 \pm 3,07$	$-77 \pm 11$
KS-167	Aktivierung	$8,34 \pm 0,30$	$5,07 \pm 2,43$	$61 \pm 1$
WK-X-34	Inhibition	$6,19 \pm 0,66$	$1070 \pm 1400$	$-59 \pm 12$
KS-166	biphasisch	max $8,66 \pm 0,69$	$4,35 \pm 6,13$	$47 \pm 7$
		min $4,73 \pm 0,26^*$	$20100 \pm 8300^*$	$0 \pm 7$

\* gefittet auf Ko143 1  $\mu\text{mol/l}$ .

## 4 Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 4-37-B: Effekte auf die basale ATPase Aktivität, gemessen bis 10  $\mu\text{mol/l}$ . Ermittelt wurden  $\text{pEC}_{50}$ ,  $\text{pEC}_b$  und die maximalen Effekte mit Standardabweichungen.**

Verbindung	Effekt auf ATPase Aktivität	$\text{pEC}_{50} \pm \text{SD}$	$E_{\text{max}} \pm \text{SD}$ [%]	$\text{pEC}_b \pm \text{SD}$
KS-167 + 1 $\mu\text{mol/l}$ XR9577	Aktivierung	$5,99 \pm 0,07$	$21 \pm 4$	$5,94 \pm 0,06$
XR9577 + 1 $\mu\text{mol/l}$ KS-167	Inhibition	$6,37 \pm 0,09$	$-61 \pm 4$	$6,21 \pm 0,32$
KS-166 + 1 $\mu\text{mol/l}$ WK-X-34	biphasisch max	$6,47 \pm 0,42$	$0 \pm 5$	ca. 6,0
	min	$4,67 \pm 0,06^*$	$-18 \pm 6$	
WK-X-34 + 1 $\mu\text{mol/l}$ KS-166	Inhibition	$5,89 \pm 0,27$	$-51 \pm 6$	$5,85 \pm 0,11$

\* gefittet auf Ko143 1  $\mu\text{mol/l}$ .

**Tabelle 4-37-C: Effekte auf die basale ATPase Aktivität gemessen bis 10  $\mu\text{mol/l}$ . Ermittelt wurden  $\text{EC}_{50}$ ,  $\text{EC}_b$  und die maximalen Effekte mit Standardabweichungen.**

Verbindung	Effekt auf ATPase Aktivität	$\text{EC}_{50} \pm \text{SD}$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$E_{\text{max}} \pm \text{SD}$ [%]	$\text{EC}_b \pm \text{SD}$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]
KS-167 + 1 $\mu\text{mol/l}$ XR9577	Aktivierung	$1,03 \pm 0,11$	$21 \pm 4$	$1,15 \pm 0,11$
XR9577 + 1 $\mu\text{mol/l}$ KS-167	Inhibition	$0,431 \pm 0,059$	$-61 \pm 4$	$0,694 \pm 0,358$
KS-166 + 1 $\mu\text{mol/l}$ WK-X-34	biphasisch max	$0,415 \pm 0,294$	$0 \pm 5$	ca. 1,0
	min	$21,5 \pm 2,0^*$	$-18 \pm 6$	
WK-X-34 + 1 $\mu\text{mol/l}$ KS-166	Inhibition	$1,40 \pm 0,60$	$-51 \pm 6$	$1,43 \pm 0,24$

\* gefittet auf Ko143 1  $\mu\text{mol/l}$ .

Die Graphen der Kombinationsexperimente von KS-167 und XR9577 sind in Abbildung 4-50 abgebildet. Die durch 1  $\mu\text{mol/l}$  KS-167 stimulierte ATPase Aktivität lässt sich mit steigenden Konzentrationen von XR9577 hemmen. Die Konzentrations-Effektkurve schneidet die basale ATPase Aktivität bei einem  $\text{pEC}_b$  von 6,21 bei ungefähr äquimolaren Mengen von KS-167 und XR9577. Umgekehrt aktivieren

steigende Konzentrationen KS-167 die mit 1  $\mu\text{mol/l}$  XR9577 inhibierte ATPase Aktivität. Auch hier schneidet die ermittelte Konzentrations-Effektkurve die basale ATPase Aktivität bei mit einem  $\text{pEC}_{50}$  von 5,94 bei ungefähr äquimolaren Konzentrationen beider Verbindungen. Bemerkenswerterweise unterscheiden sich beide Kurven in ihren maximalen Effekten. So ist XR9577 bei 10-fachem Konzentrationsüberschuss in der Lage, mit einem  $E_{\text{max}}$  von -61 % die ATPase Aktivität zu inhibieren. Der maximale Effekt von XR9577 allein liegt dagegen bei -77 %. KS-167 aktiviert bei 10-fachem Konzentrationsüberschuss die ATPase Aktivität mit einem  $E_{\text{max}}$ -Wert von 21 %. Der maximale Effekt von KS-167 alleine liegt dagegen bei 61 %.

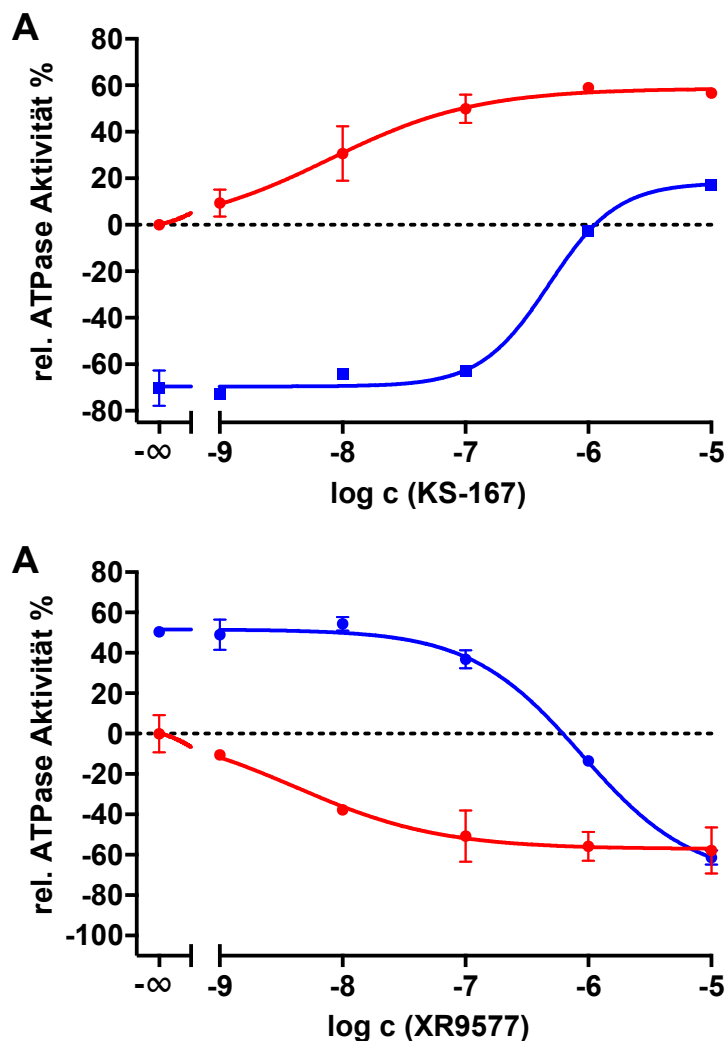


Abbildung 4-50: Effekt auf die ATPase Aktivität. A: KS-167 (rot) und KS-167 mit 1  $\mu\text{mol/l}$  XR9577 (blau). B: XR9577 (rot) und XR9577 mit 1  $\mu\text{mol/l}$  KS-167 (blau). Startpunkt der ATPase Aktivitäten der Graphen sind A: rot: basale Aktivität und blau: XR9577 1  $\mu\text{mol/l}$  und B: A: rot: basale Aktivität und blau: KS-167 1  $\mu\text{mol/l}$ .

Die Graphen der Kombinationsexperimente von KS-166 und WK-X-34 sind in Abbildung 4-51 abgebildet. KS-166 zeigt als Besonderheit einen biphasischen Verlauf der ATPase Aktivität.

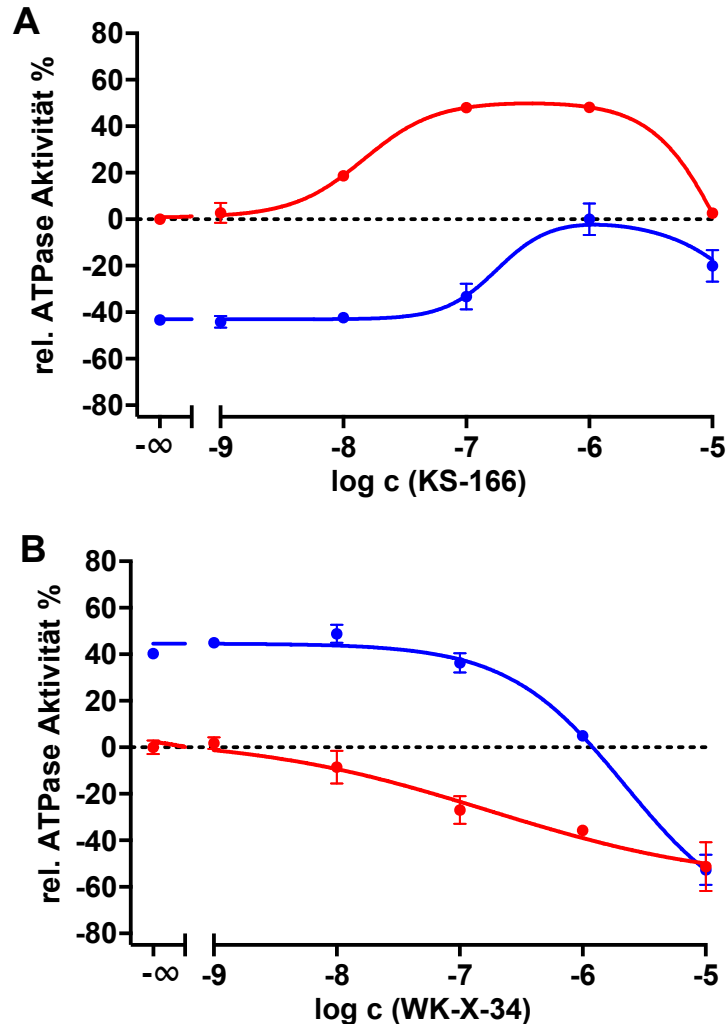


Abbildung 4-51: Effekt auf die ATPase Aktivität. A: KS-166 (rot) und KS-166 mit 1  $\mu\text{mol/l}$  WK-X-34 (blau). B: WK-X-34 (rot) und WK-X-34 mit 1  $\mu\text{mol/l}$  KS-166 (blau). Startpunkt der ATPase Aktivitäten der Graphen sind A: rot: basale Aktivität und blau: WK-X-34 1  $\mu\text{mol/l}$  und B: rot: basale Aktivität und blau: KS-166 1  $\mu\text{mol/l}$ .

Die durch 1  $\mu\text{mol/l}$  KS-166 stimulierte ATPase Aktivität lässt sich mit steigenden Konzentrationen von WK-X-34 hemmen. Die Konzentrations-Effektkurven schneiden auch hier die basale ATPase Aktivität mit einem  $\text{pEC}_b$  von 5,85 bei ungefähr äquimolaren Mengen von KS-166 und WK-X-34. Umgekehrt aktivieren steigende Konzentrationen von KS-166 auch hier die mit 1  $\mu\text{mol/l}$  WK-X-34 inhibierte ATPase Aktivität zunächst und diese erreicht bei  $\text{pEC}_b$  von ungefähr 6,0 die basale ATPase Aktivität. Danach sinkt die ATPase Aktivität wieder. WK-X-34 ist bei 10-fachem

Konzentrationsüberschuss in der Lage, in Anwesenheit des Aktivators KS-166, mit einem  $E_{\max}$  von -51 % nahezu den inhibitorischen Effekt von WK-X-34 allein von -59 % zu erreichen. Anders verhält es sich bei der Kombination von KS-166 mit 1  $\mu\text{mol/l}$  WK-X-34. Der maximale Effekt liegt mit -18 % und damit niedriger als dem von KS-166 allein von 0 %.

Der Aktivator der ATPase Aktivität KS-167 und der biphasische Aktivator der ATPase Aktivität KS-166 können also auch wie zuvor Quercetin die inhibitorischen Effekte von XR9577 und WK-X-34 auf die ATPase Aktivität überwinden, während die Inhibitoren ebenfalls die aktivierenden Effekte aufheben können. Die Hemmung der ATPase Aktivität erscheint in der Kombination der hier untersuchten Verbindungen stärker ausgeprägt als die Aktivierung.

### 4.10.3 Kombinationen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Die Fluoreszenzfarbstoffe Hoechst 33342 und Pheophorbid A sind bekannte Substrate von ABCG2.<sup>114,125</sup> Sie werden in unserem Arbeitskreis, aber auch in anderen Arbeitsgruppen, zur funktionellen Charakterisierung von ABC-Transportern eingesetzt. Bis jetzt ist nicht zweifelsfrei geklärt, inwieweit die Aktivierung oder Inhibierung der ATPase Aktivität von ABCG2 mit der Substrateigenschaft zusammenhängt.

Bei den funktionellen Assays von ABCG2 mit Hoechst 33342 und Pheophorbid A werden in der Regel gleichzeitig zwei Verbindungen, ein Fluoreszenzfarbstoff und ein Modulator von ABCG2, untersucht. Ausgewertet wird dabei der Einfluss des Modulators auf den Transport des Farbstoffs durch ABCG2.

Daher wurde im Folgenden zum einen untersucht, welchen Effekt die Fluoreszenzfarbstoffe Hoechst 33342 und Pheophorbid A auf die ATPase Aktivität von ABCG2 haben. Außerdem wurde überprüft welche Effekte die Kombination von Fluoreszenzfarbstoff und Modulator, ähnlich wie in den funktionellen Assays, auf die ATPase Aktivität von ABCG2 hat.



#### 4.10.3.1 Vanadat-sensitiver ATPase Assay

Die mit dem Vanadat-sensitiven ATPase Assay erhaltenen Daten für Hoechst 33342 und Pheophorbid A sind in Tabelle 4-38 aufgeführt.

**Tabelle 4-38: Effekt auf die basale ATPase Aktivität von ABCG2 gemessen bis 32  $\mu\text{mol/l}$ . n.b. = nicht bestimmbar.**

Verbindung	Effekt auf ATPase Aktivität	$\text{pEC}_{50} \pm \text{SD}$	$\text{EC}_{50} \pm \text{SD}$ [nmol/l]	$\text{E}_{\text{max}} \pm \text{SD}$ [%]
Hoechst 33342	Inhibition	$5,91 \pm 0,14$	$1300 \pm 465$	$-82 \pm 22$
Pheophorbid A	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Das Substrat Hoechst 33342 ist mit einem  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von 5,91 und einem  $\text{E}_{\text{max}}$  von -82 % ein Inhibitor der basalen ATPase Aktivität von ABCG2. Ähnliche Beobachtungen finden sich auch in der Literatur.<sup>83,228</sup>

Die Ermittlung des Effektes von Pheophorbid A auf die basale ATPase Aktivität von ABCG2 gestaltet sich schwierig. Die Proben, die höhere Konzentrationen von Pheophorbid A enthalten, sind grün verfärbt. Die Messung bis zu 1  $\mu\text{mol/l}$  Pheophorbid A zeigt keinen Effekt auf die basale ATPase Aktivität. Leider ließ sich auch im Vergleich der ATPase Aktivitätsmessungen in der Mikrotiterplatte und im Röhrchen nicht abschließend klären, ob die beobachtete Abnahme der Absorption bei Konzentrationen über 1  $\mu\text{mol/l}$  durch die Störung der Absorptionsmessung oder durch einen tatsächlichen Effekt ausgelöst wurde.

Offenbar ist die Inhibition der ATPase Aktivität kein Ausschlusskriterium dafür, dass eine Verbindung ein Substrat von ABCG2 darstellt. Der Effekt auf die basale ATPase Aktivität von Hoechst 33342 ist in Abbildung 4-52 abgebildet.

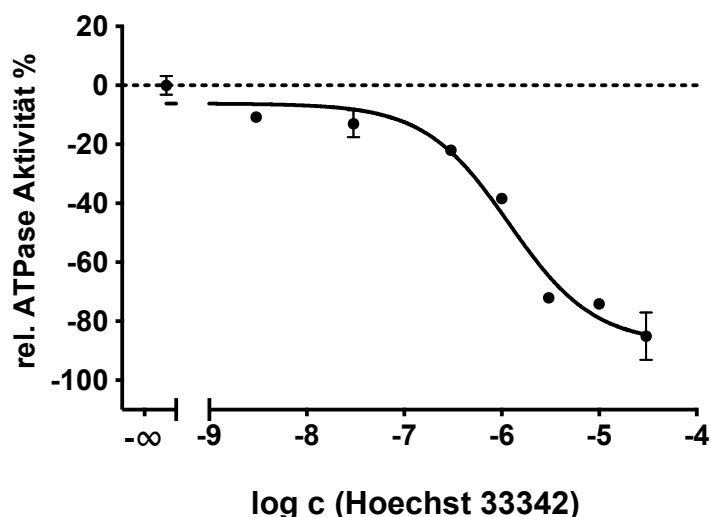


Abbildung 4-52: Effekt von Hoechst 33342 auf die basale ATPase Aktivität von ABCG2.

Inwieweit sich die Konzentrationen der Verbindungen im Vanadat-sensitiven ATPase Assay und in den funktionellen Assays tatsächlich entsprechen, ist unklar. Zum einen herrschen bei den verschiedenen Testsystemen in lebenden Zellkulturen oder mit Proteinen in Membranfragmenten unterschiedliche Bedingungen. Zum andern ist nicht geklärt, inwieweit sich die Effekte von Verbindungen auf die ATPase Aktivität auf die Funktion von ABCG2 auswirken. Daher ist nicht exakt geklärt, ob die im funktionellen Hoechst 33342 eingesetzte Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$ , die genau in dem Bereich des  $\text{pEC}_{50}$ -Wertes des Vanadat-sensitiven ATPase Assays liegt, auch im funktionellen Assay den gleichen Effekt auf die ATPase Aktivität von ABCG2 besitzt.

#### 4.10.3.2 Charakterisierung mit funktionellen Assays

Für die weitere Charakterisierung wurden Hoechst 33342 im Pheophorbid A Assay und Pheophorbid A im Hoechst 33342 Assay durchflusszytometrisch mit dem Durchflusszytometer Guava®easyCyte™ untersucht. Die erhaltenen Graphen sind in Abbildung 4-53 abgebildet.

Hoechst 33342 ist in dem gewählten Konzentrationsbereich bis 31,6  $\mu\text{mol/l}$  nicht in der Lage, den Pheophorbid A Transport nennenswert zu hemmen. Dabei kann Quenching von Pheophorbid A durch Hoechst 33342 ausgeschlossen werden, da

keine Effekte bei der Wildtyp Zelllinie beobachtbar sind. Im Gegensatz dazu hemmt Pheophorbid A den Transport von Hoechst 33342. Allerdings ist leider kein eindeutiger  $pIC_{50}$ -Wert aus der Konzentrations-Effektkurve bestimmbar, da Pheophorbid A die Fluoreszenz von Hoechst 33342 quencht. Das Quenching ist sowohl in den durchflusszytometrisch ermittelten Daten in den PLB-985 Wildtyp und PLB-985 ABCG2 Zellen, als auch in mit Microplaterereader erhaltenen Daten beobachtbar.

Aufgrund der im Vanadat-sensitiven ATPase Assay erhaltenen Ergebnisse eignet sich nur Hoechst 33342 für weitere Kombinationsexperimente im ATPase Assay.

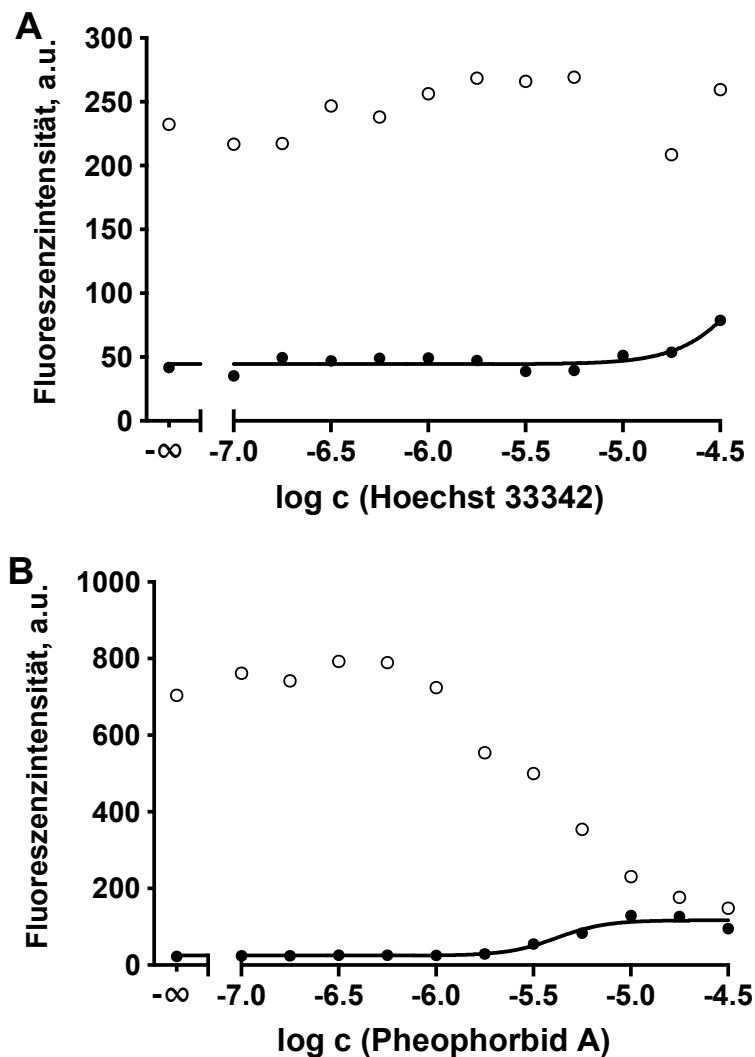


Abbildung 4-53: Konzentrations-Effektkurven mit PLB-985 Wildtyp (○) und PLB-985 ABCG2 (●) Zellen. A: Hoechst 33342 im Pheophorbid A Assay. B: Pheophorbid A im Hoechst 33342 Assay

### 4.10.3.3 Kombinationen mit Hoechst 33342

Da es sich bei Hoechst 33342 um einen Inhibitor der basalen ATPase Aktivität handelt, wurden die Kombinationsexperimente mit Aktivatoren der basalen ATPase Aktivität durchgeführt.

Von den verschiedenen bereits untersuchten Gruppen wurden einige Vertreter ausgesucht. ASP-002 als ATPase Aktivator, LM-I-10 als biphasischer ATPase Aktivator, sind beide aus der Gruppe der 2-Arylamino-1*H*-benzimidazole. KS-167 gehört zu der Gruppe der Tariquidar-Analoga ohne Tetrahydroisochinolinrest. Das Flavonoid Quercetin wird als Standardverbindung des Vanadat-sensitiven ATPase Assays genutzt. KS-167 und Quercetin weisen die Besonderheit auf, dass sich ihre Aktivität gegenüber ABCG2 im funktionellen Hoechst 33342 Assay nicht bestimmen lässt. Die einzelnen Effekte der Verbindungen auf die ATPase Aktivität wurden bereits in Kapitel 4.7.1, Kapitel 4.8.2.1, Kapitel 4.9.1 und Kapitel 4.10.3.1 beschrieben.

Bei der für die Kombinationsexperimente gewählten Konzentration von 1 µmol/l haben die Aktivatoren der basalen ATPase Aktivität ASP-002, KS-167 und Quercetin ihre maximalen Effekte auf die ATPase Aktivität erreicht. Hoechst 33342 dagegen erreicht bei 1 µmol/l einen halbmaximalen Effekt auf die Inhibition der ATPase Aktivität. Da Hoechst 33342 jedoch in dieser Konzentration im funktionellen Assay eingesetzt wird, also davon auszugehen ist, dass bei dieser Konzentration im funktionellen Assay auch keine maximale Hemmung der ATPase Aktivität von ABCG2 vorliegt, wurde diese Konzentration für Hoechst 33342 als zweckmäßig angesehen.

Die erhaltenen Daten der Kombinationsexperimente sind in Tabelle 4-39 aufgeführt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 4-39: Effekt auf die basale ATPase Aktivität von ABCG2 gemessen bis 10 µmol/l.**

**Tabelle 4-39-A: Effekt der Einzelsubstanzen auf die basale ATPase Aktivität gemessen bis 10 µmol/l. Ermittelt wurden pEC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub> und die maximalen Effekte mit Standardabweichungen.**

Verbindung	Effekt auf ATPase Aktivität	pEC <sub>50</sub> ± SD	EC <sub>50</sub> ± SD [nmol/l]	E <sub>max</sub> ± SD [%]
ASP-002	Aktivierung	7,41 ± 0,09	39,2 ± 5,4	30 ± 2
LM-I-10	biphasisch	max	7,73 ± 0,07	18,6 ± 2,7
		min	n.b.	n.b.
KS-167	Aktivierung	8,34 ± 0,30	5,07 ± 2,43	61 ± 1
Quercetin	Aktivierung	7,41 ± 0,06	39,1 ± 3,6	100 ± 4
Hoechst 33342	Inhibition	5,91 ± 0,14	1300 ± 465	-82 ± 22

#maximaler Effekt bei 10 µmol/l

**Tabelle 4-39-B. Effekte auf die basale ATPase Aktivität, gemessen bis 10 µmol/l. Ermittelt wurden pEC<sub>50</sub>, pEC<sub>b</sub> und die maximalen Effekte mit Standardabweichungen. n.b.=nicht bestimmbar**

Verbindung	Effekt auf ATPase Aktivität	pEC <sub>50</sub> ± SD	E <sub>max</sub> ± SD [%]	pEC <sub>b</sub> ± SD
ASP-002 + 1 µmol/l Hoechst 33342	Aktivierung	6,42 ± 0,14	17 ± 4	6,80 ± 0,07
Hoechst 33342 + 1 µmol/l ASP 002	Inhibition	5,96 ± 0,03*	-70 ± 21#	5,83 ± 0,18*
LM-I-10 + 1 µmol/l Hoechst 33342	biphasisch	max	6,89 ± 0,05	38 ± 2
		min	n.b.	27 ± 10#
Hoechst 33342 + 1 µmol/l LM-I-10	Inhibition	5,84 ± 0,11*+	-64 ± 22#	6,01 ± 0,26
KS-167 + 1 µmol/l Hoechst 33342	Aktivierung	7,03 ± 0,002	30 ± 4	7,38 ± 0,05
Hoechst 33342 + 1 µmol/l KS-167	Inhibition	5,64 ± 0,07*	-66 ± 9#	5,52 ± 0,04*

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Verbindung	Effekt auf ATPase Aktivität	pEC <sub>50</sub> ± SD	E <sub>max</sub> ± SD [%]	pEC <sub>b</sub> ± SD
Quercetin + 1 µmol/l Hoechst 33342	Aktivierung	6,52 ± 0,20	85 ± 12	7,13 ± 0,002
Hoechst 33342 + 1 µmol/l Quercetin	Inhibition	5,42 ± 0,01 <sup>+</sup>	-37 ± 1 <sup>#</sup>	5,62 ± 0,29

\* gefittet auf Hoechst 33342, + 3-parameter logistische Gleichung, # maximaler Effekt bei 10 µmol/l

Tabelle 4-39-C. Ermittelte EC<sub>50</sub>-Werte und EC<sub>b</sub>-Werte mit Standardabweichungen.

Verbindung	Effekt auf ATPase Aktivität	EC <sub>50</sub> ± SD [nmol/l]	E <sub>max</sub> ± SD [%]	EC <sub>b</sub> ± SD [nmol/l]
ASP-002 + 1 µmol/l Hoechst 33342	Aktivierung	317 ± 14	17 ± 4	159 ± 17
Hoechst 33342 + 1 µmol/l ASP 002	Inhibition	1100 ± 50 <sup>*</sup>	-70 ± 21 <sup>#</sup>	1540 ± 427 <sup>*</sup>
LM-I-10 + 1 µmol/l Hoechst 33342	biphasisch max min	129 ± 10 n.b.	38 ± 2 27 ± 10 <sup>#</sup>	16 ± 10 n.b.
Hoechst 33342 + 1 µmol/l LM-I-10	Inhibition	1470 ± 246 <sup>+</sup>	-64 ± 22 <sup>#</sup>	1060 ± 434
KS-167 + 1 µmol/l Hoechst 33342	Aktivierung	93 ± 0,2	30 ± 4	42 ± 3
Hoechst 33342 + 1 µmol/l KS-167	Inhibition	2300 ± 245 <sup>*</sup>	-66 ± 9 <sup>#</sup>	3030 ± 184 <sup>*</sup>

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Verbindung	Effekt auf ATPase Aktivität	EC <sub>50</sub> ± SD [nmol/l]	E <sub>max</sub> ± SD [%]	EC <sub>b</sub> ± SD [nmol/l]
Quercetin + 1 µmol/l Hoechst 33342	Aktivierung	316 ± 98	85 ± 12	74 ± 0,3
Hoechst 33342 + 1 µmol/l Quercetin	Inhibition	3800 ± 58 <sup>+</sup>	-37 ± 1 <sup>#</sup>	2640 ± 1220 <sup>+</sup>

\* gefittet auf Hoechst 33342, + 3-parameter logistische Gleichung, # maximaler Effekt bei 10 µmol/l

Die mit 1 µmol/l Hoechst 33342 inhibierte ATPase Aktivität lässt sich durch die Aktivatoren ASP-002 (pEC<sub>50</sub> = 6,42), LM-I-10 (pEC<sub>50</sub> = 6,89), KS-167 (pEC<sub>50</sub> = 7,03) und Quercetin (pEC<sub>50</sub> = 6,52) wieder stimulieren. Hoechst 33342 kann in steigenden Konzentrationen, die mit jeweils 1 µmol/l ASP-002 (pEC<sub>50</sub> = 5,96), LM-I-10 (pEC<sub>50</sub> = 5,84), KS-167 (pEC<sub>50</sub> = 5,64) und Quercetin (pEC<sub>50</sub> = 5,42) aktivierte ATPase Aktivität, hemmen. Da kein unteres Plateau erreicht wurde, wurden die Kurven dazu auf Hoechst 33342 10 µmol/l gefittet.

Die Konzentrationen der EC<sub>50</sub>-Werte der Aktivatoren sind in der Kombination mit Hoechst 33342 1 µmol/l niedriger als bei den Einzelexperimenten der Verbindungen. Umgekehrt sind die EC<sub>50</sub>-Werte, die mit steigenden Hoechst 33342 Konzentrationen erhalten werden, in den Kombinationsexperimenten niedriger als in der Einzelmessung mit Hoechst 33342. Das zeigt sich auch beim Vergleich der pEC<sub>b</sub>-Werte.

In Abbildung 4-54 sind zur Veranschaulichung die Graphen der Kombinationsexperimente von KS-167 und Hoechst 33342 abgebildet, in Abbildung 4-55 die Graphen von Quercetin und Hoechst 33342.

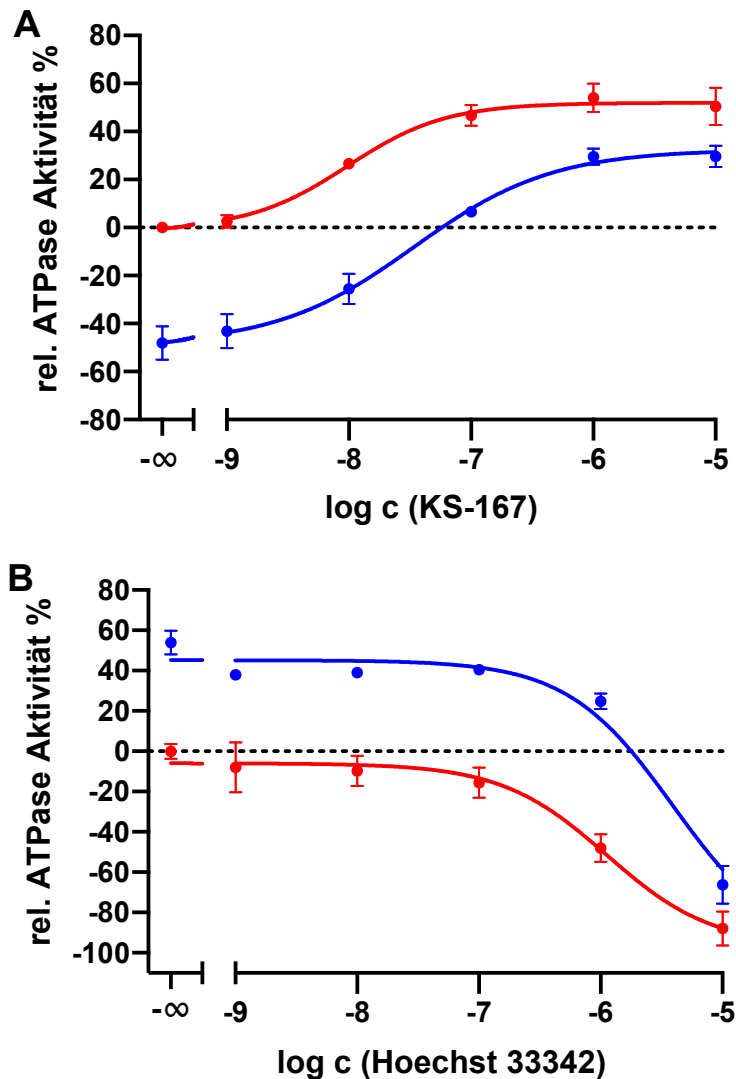


Abbildung 4-54: Effekt auf die ATPase Aktivität. A: KS-167 (rot) und KS-167 mit 1  $\mu\text{mol/l}$  Hoechst 33342 (blau). B: Hoechst 33342 (rot) und Hoechst 33342 mit 1  $\mu\text{mol/l}$  KS-167 (blau), gefittet auf Hoechst 33342 10  $\mu\text{mol/l}$ , Hillslope = 1. Startpunkt der ATPase Aktivitäten der Graphen sind A: rot: basale Aktivität und blau: Hoechst 33342 1  $\mu\text{mol/l}$  und B: : rot: basale Aktivität und blau: KS-167 1  $\mu\text{mol/l}$ .

Die Konzentrations-Effektkurven der ATPase Aktivatoren schneiden den Wert der basalen ATPase Aktivität bei Konzentrationen, bei denen Hoechst 33342 im Überschuss vorliegt. In der Kombination von 1  $\mu\text{mol/l}$  Hoechst 33342 und ASP-002 liegt der  $\text{pEC}_{50}$ -Wert bei 6,80, in der Kombination mit LM-I-10 bei einem  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von 7,87, bei der Kombination mit KS-167 bei einem  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von 7,38 und bei der Kombination mit Quercetin bei einem  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von 7,13.



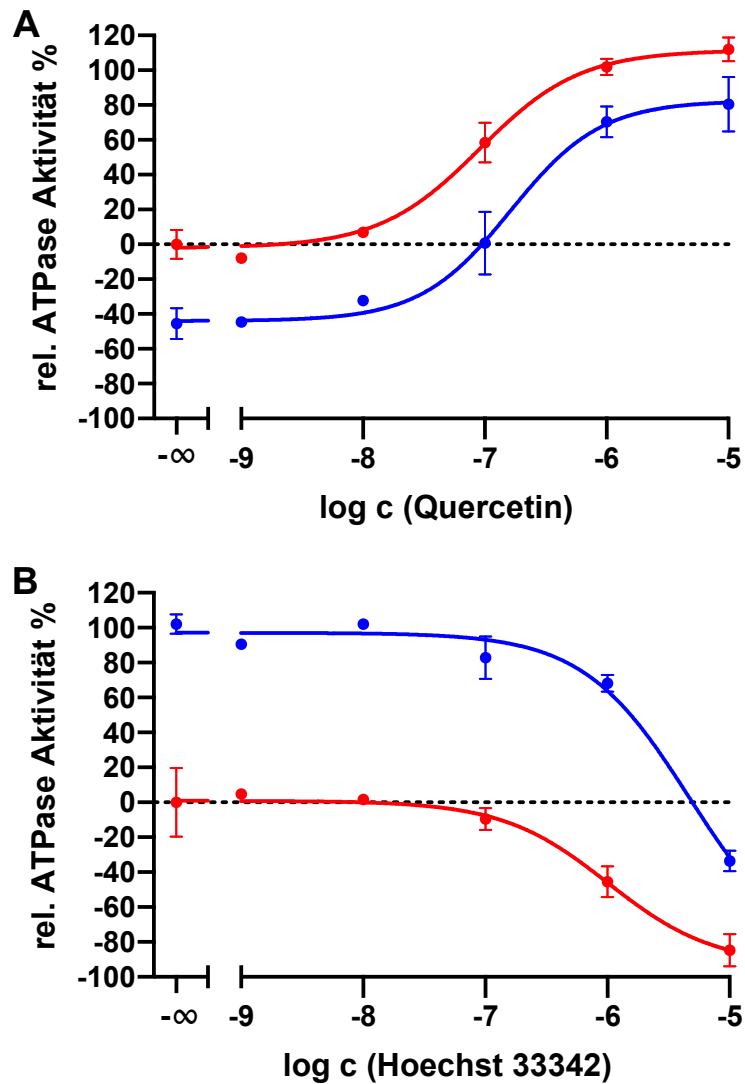


Abbildung 4-55: Effekt auf die ATPase Aktivität. A: Quercetin (rot) und Quercetin mit 1 µmol/l Hoechst 33342 (blau). B: Hoechst 33342 (rot) und Hoechst 33342 mit 1 µmol/l Quercetin (blau), gefittet auf Hoechst 33342 10 µmol/l und Hillslope = 1. Startpunkt der ATPase Aktivitäten der Graphen sind A: rot: basale Aktivität und blau: Hoechst 33342 1 µmol/l und B: rot: basale Aktivität und blau: Quercetin 1 µmol/l.

Die aktivierte ATPase lässt sich durch steigende Konzentrationen von Hoechst 33342 nicht leicht hemmen. Es wurden höhere Konzentrationen von Hoechst 33342 benötigt sowie die Kurven auf Hoechst 33342 10 mmol/l gefittet. Mit ASP-002 schneidet die ATPase Aktivität den Wert der basalen ATPase Aktivität bei einem  $pEC_b$ -Wert von 5,83, mit LM-I-10 bei einem  $pEC_b$ -Wert von 6,01, in der Kombination mit KS-167 bei dem  $pEC_b$ -Wert von 5,52 und in Kombination mit Quercetin bei einem  $pEC_b$ -Wert von 5,62.

Die maximalen Effekte auf die ATPase Aktivität sind, wie in Tabelle 4-39 aufgeführt, in den Kombinationsexperimenten vermindert.

In Abbildung 4-56 ist der Graph der Korrelation der ermittelten  $E_{\max}$ -Werte für die Aktivierung der ATPase Aktivität der Verbindungen ASP-002, LM-I-10, KS-167 und Quercetin der Einzelmessungen und der erhaltenen  $E_{\max}$ -Werte für die Kombinationen von ASP-002, LM-I-10, KS-167 und Quercetin mit Hoechst 33342 1  $\mu\text{mol/l}$  abgebildet ( $r^2 = 0,902$ ).

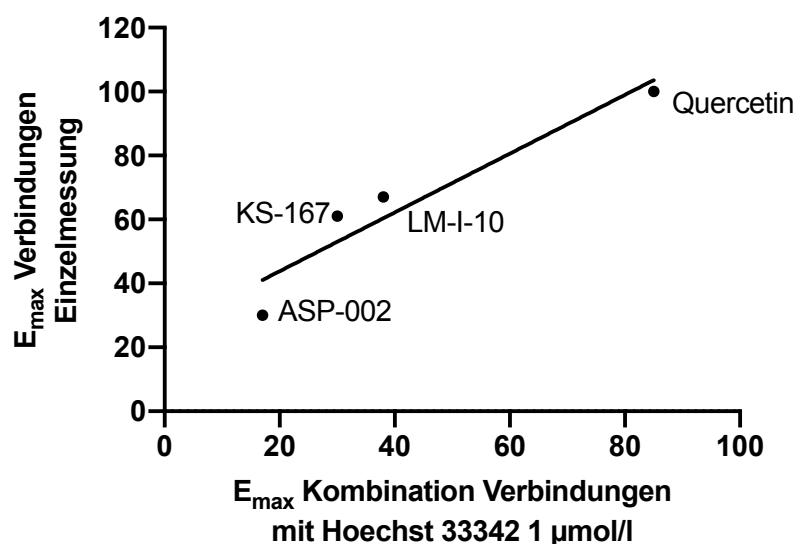


Abbildung 4-56: Korrelation der maximalen Effekte auf die ATPase Aktivität der Einzelmessungen der Verbindungen ASP-002, LM-I-10, KS-167 und Quercetin (y-Achse) und der Kombinationsexperimente der Verbindungen ASP-002, LM-I-10, KS-167 und Quercetin mit Hoechst 33342 1  $\mu\text{mol/l}$  (x-Achse),  $r^2=0,902$ .

Korrelationen ergeben sich ebenfalls für die maximalen aktivierenden Effekte auf die ATPase Aktivität der Verbindungen ASP-002, LM-I-10, KS-167 und Quercetin in Kombination mit 1  $\mu\text{mol/l}$  Hoechst 33342 und der maximalen hemmenden Effekte der Kombinationen von Hoechst 33342 mit ASP-002, LM-I-10, KS-167 und Quercetin in jeweils fixer Kombination von 1  $\mu\text{mol/l}$  ( $r^2 = 0,983$ ). Sowie ebenfalls für die maximalen Effekte der Verbindungen in Einzelmessung mit den maximalen inhibierenden Effekten von Hoechst 33342 in Kombination mit den Verbindungen in der Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  ( $r^2 = 0,820$ ). Die erhaltenen  $pEC_{50}$ -Werte der ATPase Aktivität der Kombinationsexperimente von ASP-002, LM-I-10, KS-167

und Quercetin mit 1  $\mu\text{mol/l}$  Hoechst 33342 korrelieren zudem mit den  $\text{pEC}_{50}$ -Werten der Einzelmessungen ( $r^2 = 0,828$ ).

Da es sich nur um wenige Verbindungen handelt, sind die Korrelationen vorsichtig zu betrachten. Dennoch deutet sich ein systematischer Effekt an. Es konnte dagegen kein Zusammenhang der anderen Parametern  $\text{pEC}_{50}$  und  $\text{pEC}_b$  der Kombinations- bzw. Einzelexperimente beobachtet werden.

Für den Vergleich der hier ermittelten Ergebnisse mit denen der funktionellen Assays sind die  $\text{pIC}_{50}$ -Werte aus den funktionellen Assays der Kapitel 4.7.3, 4.8.2.2 und 4.9.2 hier noch einmal kurz aufgeführt. ASP-002 hat im Hoechst 33342 Assay einen  $\text{pIC}_{50}$ -Wert von 5,53 und im Pheophorbid A Assay von 5,46, LM-I-10 hat im Hoechst 33342 Assay einen  $\text{pIC}_{50}$ -Wert von 5,54 und im Pheophorbid A Assay von 5,49. KS-167 ist im Hoechst 33342 Assay ebenso wie Quercetin nicht bestimmbar. KS-167 hat im Pheophorbid A Assay einen  $\text{pIC}_{50}$ -Wert von 5,34 und Quercetin hat im Pheophorbid A Assay einen  $\text{pIC}_{50}$ -Wert von 5,51. Die  $\text{pIC}_{50}$ -Werte, die in den funktionellen Assays ermittelt wurden, sind für die Verbindungen recht ähnlich. Die ATPase Daten unterscheiden sich dagegen stärker untereinander sowohl für die einzelnen Verbindungen, als auch für die Kombinationen. Dabei ist der größte Unterschied bei den maximalen Effekten auf die ATPase Aktivität beobachtbar.

Obwohl für KS-167 und Quercetin keine  $\text{pIC}_{50}$ -Werte im funktionellen Hoechst 33342 Assay bestimmbar sind, zeigen die in den Kombinationsexperimenten im Vanadat-sensitiven ATPase Assay ermittelten Daten, dass diese Verbindungen die Interaktion von Hoechst 33342 und ABCG2 beeinflussen. Der Hoechst 33342 Assay eignet sich in Screenings daher nur bedingt zur alleinigen Interaktionsbestimmung von Verbindungen mit ABCG2.

### 4.10.4 Schlussfolgerung

Die Effekte der Substanzen der untersuchten Verbindungspaare WK-X-34 mit KS-166, XR9577 mit KS-167 und XR9577 mit Quercetin auf die ATPase Aktivität von ABCG2 lassen sich bei äquimolar eingesetzten Mengen jeweils aufheben. Allerdings scheint der maximale Effekt der Inhibitoren XR9577 und WK-X-34 auf die ATPase Aktivität in dieser Kombination stärker zu sein als der maximale Effekt der Aktivatoren KS-167 und KS-166. In der Kombination mit dem Flavonoid Quercetin kann dies für XR9577 ebenso beobachtet werden.

Die Verbindung Ko143 inhibiert die ATPase stärker als die Tariquidar-Analoga mit Tetrahydroisochinolinrest. Das wird auch bei der Kombination von XR9577 und Quercetin deutlich. Die anders geartete Interaktion von Ko143 und der Tariquidar-Analoga ist auch in den veröffentlichten Kryoelektronenmikroskopstrukturen erkennbar.<sup>43-45</sup> Während ein Tariquidar-Analogon mit Tetrahydroisochinolinrest in der Bindungstasche bindet, binden dort zwei Moleküle eines Ko143-Analogons. Die aufgenommene Elektronendichte der Verbindungen deutet daraufhin, dass das Tariquidar-Analogon sich in der Bindungstasche bewegen kann.

Hoechst 33342 hemmt als Substrat die ATPase Aktivität von ABCG2. Die Hemmwirkung lässt sich durch Aktivatoren jedoch bei niedrigen Konzentrationen aufheben. Vermutlich handelt es bei der Interaktion von Hoechst 33342 mit den Testverbindungen, wie von Anne Pick für die Tariquidar-Analoga ohne Tetrahydroisochinolinrest und von Sebastian Köhler für die Tetrazol-haltigen Analoga mit enzymkinetischen Methoden beschrieben, um eine kompetitive Interaktion der Verbindungen mit Hoechst 33342.<sup>158,214,229</sup> Die Affinität von Hoechst 33342 scheint dabei niedriger zu sein, als die der Testverbindungen, da sich die Effekte von Hoechst 33342 aufheben lassen, auch wenn Hoechst 33342 im Verhältnis zu den anderen Modulatoren im Überschuss vorliegt.

Die Korrelation der maximalen Effekte der ATPase Aktivatoren ASP-002, LM-I-10, KS-167 und Quercetin zwischen Kombinationsexperimenten mit Hoechst 33342 und Einzelexperimenten deutet auf einen systematischen Zusammenhang auf den maximal erreichten Effekt der Verbindungen in Bezug auf die ATPase Aktivität hin.

### 4.11 Tyrosinkinase-Inhibitoren

Tyrosinkinasen gehören zu einer großen Familie von Enzymen, die andere Proteine durch die Übertragung des  $\gamma$ -Phosphats von ATP modifizieren und so Signalkaskaden ins Zellinnere weiterleiten.<sup>230</sup> Sie sind an einer Reihe von physiologischen Prozessen wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Adhäsion und Zelltod beteiligt.<sup>231</sup> Die Dysregulation von Tyrosinkinasen kann zu unkontrolliertem Zellwachstum, antiapoptotischen Effekten oder Metastasierung führen.<sup>232</sup>

Tyrosinkinase-Inhibitoren sind meist hydrophobe Verbindungen, die spezifische Targets besitzen.<sup>233</sup> Dabei binden sie häufig kompetitiv mit ATP.<sup>234</sup> Sie werden bei der Behandlung maligner Tumore eingesetzt und haben eine geringere Toxizität als konventionelle Chemotherapeutika.<sup>233,235</sup> Allerdings beeinflusst das Phänomen der MDR, genau wie bei anderen Chemotherapeutika auch, den Therapieerfolg mit Tyrosinkinase-Inhibitoren.<sup>233</sup> Mahon et al. entdeckten, dass die Überexpression von ABCB1 *in vitro* einen Effekt auf die Zytotoxizität von Imatinib hat.<sup>236</sup> Özvegy-Laczka et al. berichteten, dass die Tyrosinkinase-Inhibitoren Imatinib und Gefitinib mit ABCG2 interagieren.<sup>161</sup> Anders als ursprünglich angenommen, binden Tyrosinkinase-Inhibitoren nicht wie bei ihren Zieltargets, den Tyrosinkinasen, an die ATP-Bindungsstelle, sondern interagieren mit der Substratbindungsstelle der ABC-Transporter.<sup>237,238</sup> ABC-Transporter können dabei nicht nur direkt den Transport von Tyrosinkinase-Inhibitoren aus den Tumorzellen hinaus bewirken, sondern auch ihre Absorption, Distribution, Metabolisierung und Exkretion beeinflussen und so einen Therapieerfolg einschränken.<sup>233,234</sup>

Von den hier untersuchten Tyrosinkinase-Inhibitoren Gefitinib, Erlotinib, Imatinib, Nilotinib, Sunitinib und Sorafenib ist bereits bekannt, dass sie mit ABCG2 interagieren.<sup>40,233,234,239,240</sup> Die Strukturformeln der Tyrosinkinase-Inhibitoren sind in Tabelle 4-40 aufgeführt. Sie unterscheiden sich nicht nur in ihren Zielstrukturen, sondern auch strukturell.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 4-40: Tyrosinkinase-Inhibitoren.**

Verbindung	Strukturformel
Gefitinib	
Erlotinib	
Imatinib	
Nilotinib	
Sunitinib	
Sorafenib	

Bei den Verbindungen Gefitinib und Erlotinib handelt es sich um zwei Chinazolin-Derivate, die vor allem Tyrosinkinase der EGFR-Familie hemmen.<sup>64</sup> Das 2-Phenylaminopyrimidinderivat Imatinib und das Benzamid-Derivat Nilotinib gehören zur Subgruppe der BCR-ABL-Inhibitoren.<sup>234</sup> Sunitinib, ein Indolinon-Derivat, und Sorafenib ein Pyridincarbonsäuremethyramid, hemmen unter anderem PDGFR, VEGFR, c-Kit und FLT3 und gehören zu den Multikinase-Inhibitoren.<sup>241</sup>

#### 4.11.1 Vanadat-sensitiver ATPase Assay

Zunächst wurde der Effekt der Tyrosinkinase-Inhibitoren auf die basale ATPase Aktivität untersucht. Die ermittelten Effekte auf die basale ATPase Aktivität sind in Tabelle 4-41 aufgeführt.

**Tabelle 4-41: Effekt der Tyrosinkinase-Inhibitoren auf die basale ATPase Aktivität gemessen bis 10  $\mu\text{mol/l}$ .**

Verbindung	Effekt auf ATPase Aktivität	$\text{pEC}_{50} \pm \text{SD}$	$\text{EC}_{50} \pm \text{SD}$ [nmol/l]	$\text{E}_{\text{max}} \pm \text{SD}$ [%]	
Gefitinib	Aktivierung	$7,72 \pm 0,38$	$23,5 \pm 14,1$	$55 \pm 6$	
Erlotinib	Aktivierung	$8,05 \pm 0,33$	$10,1 \pm 5,4$	$72 \pm 8$	
Imatinib	Inhibition	$6,23 \pm 0,17$	$609 \pm 160$	$-55 \pm 5$	
Nilotinib	biphasisch	max	$8,57 \pm 0,28$	$2,95 \pm 1,31$	$47 \pm 6$
		min	$5,51 \pm 0,01$	$3090 \pm 47$	$-27 \pm 6$
Sunitinib	Aktivierung	$8,19 \pm 0,72$	$11,7 \pm 18,8$	$18 \pm 5$	
Sorafenib	biphasisch	max	$7,59 \pm 0,57$	$37,4 \pm 39,4$	$26 \pm 12$
		min	$5,02 \pm 0,08$	$9620 \pm 1170$	$-86 \pm 15$

Die beiden Chinazoline Gefitinib und Erlotinib aktivieren mit einem  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von 7,72 und einem  $\text{E}_{\text{max}}$  von 55 % für Gefitinib und mit einem  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von 8,05 und einem  $\text{E}_{\text{max}}$  von 72 % für Erlotinib die ATPase Aktivität, wobei Erlotinib mit einem höheren  $\text{pEC}_{50}$ -Wert und einer höheren maximalen Effekt stärker aktiviert als Gefitinib. In der Literatur findet sich für Gefitinib zunächst eine Steigerung

der ATPase Aktivität und ab Konzentrationen über 10  $\mu\text{mol/l}$  eine erneute Hemmung der ATPase Aktivität.<sup>83,161,242,243</sup>

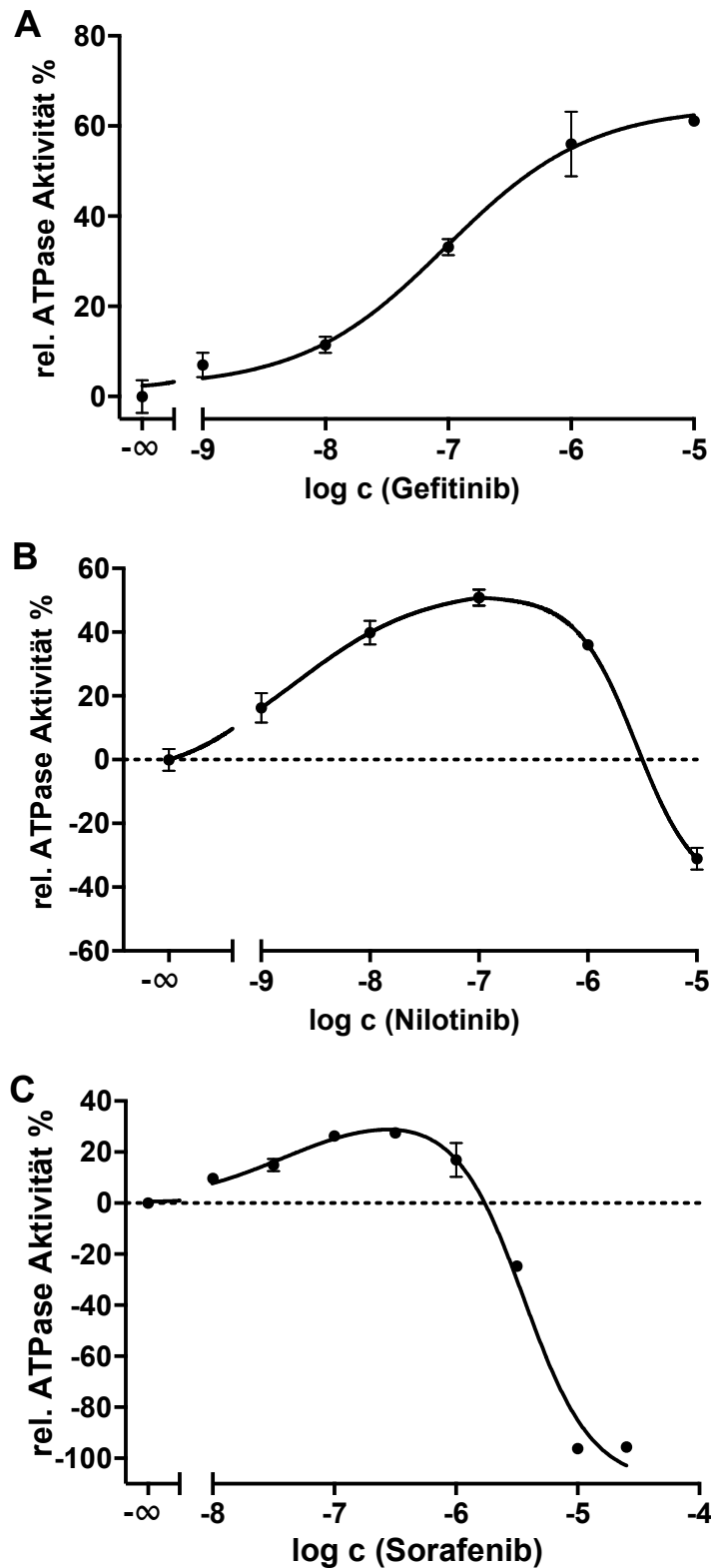


Abbildung 4-57: Effekt auf die basale ATPase Aktivität. A: Gefitinib. B: Nilotinib, C: Sorafenib.



Imatinib ist mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 6,23 und einem  $E_{max}$  von -55 % ein Inhibitor der ATPase Aktivität. Nilotinib aktiviert die ATPase mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 8,57 und einem  $E_{max}$  von 18 % zunächst, inhibiert diese dann aber mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 5,51 und einem  $E_{max}$  von -27 % wieder. Die Inhibition und der biphasische Verlauf von Imatinib und Nilotinib sind in der Literatur dokumentiert.<sup>83,161,244</sup>

Sunitinib ist mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 8,19 und einem  $E_{max}$  von 18 % ein Aktivator der ATPase Aktivität. In einer Veröffentlichung von Shukla et al., mit einem Berylliumfluorid-sensitiven ATPase Assay, wird ebenfalls die Aktivierung der ATPase Aktivität beschrieben.<sup>239</sup>

Sorafenib hat wie Nilotinib einen biphasischen Effekt auf die ATPase Aktivität mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von 7,59 und einen  $E_{max}$  von 26 % für die Aktivierung und einen  $pEC_{50}$ -Wert von 5,02 und einen  $E_{max}$  von -50 % für die Inhibition der ATPase Aktivität.

Die Effekte auf die ATPase Aktivität von Gefitinib, Nilotinib und Sorafenib sind in Abbildung 4-57 abgebildet.

### 4.11.2 Charakterisierung mit funktionellen Assays

Die verschiedenen Tyrosinkinase-Inhibitoren wurden mit MDCK II BCRP und MCF-7 MX Zellen im funktionellen Hoechst 33342 Assay untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-42 aufgeführt.

Tabelle 4-42: Ermittelte pIC<sub>50</sub>-Werte bzw. IC<sub>50</sub>-Werte mit MDCK II BCRP und MCF-7 MX Zellen im Hoechst 33342 Assay.

Verbindung	MDCK II BCRP		MCF-7 MX	
	pIC <sub>50</sub> ± SD	IC <sub>50</sub> ± SD [µmol/l]	pIC <sub>50</sub> ± SD	IC <sub>50</sub> ± SD [µmol/l]
Gefitinib	5,84 ± 0,19	1,51 ± 0,44	5,52 ± 0,11	3,06 ± 0,52
Erlotinib	5,83 ± 0,03	1,48 ± 0,07	5,57 ± 0,21	2,83 ± 0,93
Imatinib	5,62 ± 0,23	2,55 ± 0,92	5,01 ± 0,33	11,1 ± 5,9
Nilotinib	6,28 ± 0,09	0,530 ± 0,073	6,23 ± 0,22	0,667 ± 0,356
Sunitinib	6,29 ± 0,38*	0,606 ± 0,380*	5,97 ± 0,25*	1,15 ± 0,45*
Sorafenib	5,52 ± 0,09	3,05 ± 0,42	5,62 ± 0,09	2,42 ± 0,33

\*erniedrigter Top im Vergleich zu Ko143 (ca. 52 % mit MDCK II BCRP, ca. 37 % mit MCF-7 MX)

Alle untersuchten Tyrosinkinase-Inhibitoren zeigen auch in dem funktionellen Hoechst 33342 Assay eine Interaktion mit ABCG2. Die beiden Chinazoline Gefitinib (pIC<sub>50</sub> MDCK II BCRP: 5,84 und pIC<sub>50</sub> MCF-7 MX: 5,52) und Erlotinib (pIC<sub>50</sub> MDCK II BCRP: 5,83 und pIC<sub>50</sub> MCF-7 MX: 5,57) besitzen dabei für beide Zelllinien ähnliche pIC<sub>50</sub>-Werte.

Imatinib besitzt pIC<sub>50</sub>-Werte von 5,62 (MDCK II BCRP) und 5,01 (MCF-7 MX) und entspricht damit Werten aus der Literatur.<sup>158</sup>

Nilotinib ist mit den pIC<sub>50</sub>-Werten von 6,28 (MDCK II BCRP) und 6,23 (MCF-7 MX) die potenteste Verbindung im funktionellen Hoechst 33342 Assay. Sunitinib erreicht im Hoechst 33342 Assay, im Vergleich zu Ko143 mit einem Top von ca. 52 % mit MDCK II BCRP und ca. 37 % mit MCF-7 MX, in beiden Zelllinien niedrigere Top-Werte als die übrigen Verbindungen. Sunitinib ist eine gelb gefärbte Substanz und stört möglicherweise die Fluoreszenz von Hoechst 33342.

Sorafenib hat mit den pIC<sub>50</sub>-Werten von 5,52 (MDCK II BCRP) und 5,62 (MCF-7 MX) ähnliche pIC<sub>50</sub>-Werte wie die beiden Chinazoline und Imatinib.

Die mit dem Hoechst 33342 Assay erhaltenen pIC<sub>50</sub>-Werte lassen keinen Rückschluss auf die Interaktion der Verbindungen mit der basalen ATPase Aktivität von ABCG2 zu.

### 4.11.3 Toxizität

Die Toxizität von ausgewählten Tyrosinkinase-Inhibitoren, Gefitinib, Erlotinib, Imatinib und Sunitinib, mit MDCK II Wildtyp, MDCK II BCRP und MCF-7 Wildtyp und MCF-7 MX Zellen wurde mit Hilfe des MTT-Assays untersucht.

Um Lösungsmittelleffekte auszuschließen, wurde die Toxizität von DMSO ebenfalls untersucht. Die erhaltenen Graphen sind in Abbildung 4-58 abgebildet.

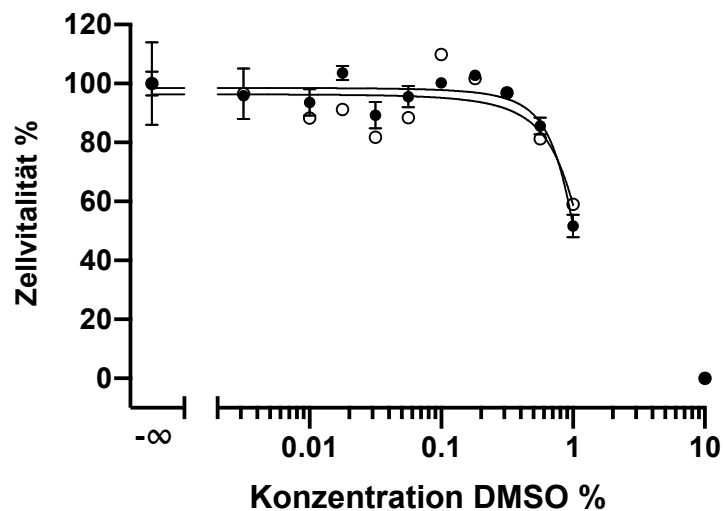


Abbildung 4-58: Ergebnisse MTT-Assay mit MDCK II Wildtyp Zellen (○) und MDCK II BCRP Zellen (●).

Dabei ist auf der x-Achse die Konzentration von DMSO dargestellt. Die maximale Konzentration von DMSO beträgt 10 %. Bei dieser Konzentration sind nahezu alle Zellen nach 72 h Inkubation gestorben.

In Tabelle 4-43 sind die erhaltenen  $pGI_{50}$ -Werte von Gefitinib, Erlotinib, Imatinib und Sunitinib aufgeführt.

Tabelle 4-43: Mit Hilfe des MTT-Assays bestimmte pGI<sub>50</sub>-Werte bzw. GI<sub>50</sub>-Werte der Tyrosinkinase-Inhibitoren. N.t.= nicht toxisch unter 10 µmol/lTabelle 4-43-A: Ermittelte pGI<sub>50</sub>-Werte mit Standardabweichungen.

Verbindung	MDCK II Wildtyp	MDCK II BCRP	MCF-7 Wildtyp	MCF-7 MX
	pGI <sub>50</sub> ± SD	pGI <sub>50</sub> ± SD	pGI <sub>50</sub> ± SD	pGI <sub>50</sub> ± SD
Gefitinib	6,04 ± 0,37	6,06 ± 0,16	n.t.	5,87 ± 0,10*
Erlotinib	5,81 ± 0,13	6,03 ± 0,18	n.t.	6,25 ± 0,10*
Imatinib	5,66 ± 0,12	5,21 ± 0,04	4,77 ± 0,03	4,72 ± 0,04
Sunitinib	6,13 ± 0,12	6,14 ± 0,12	5,29 ± 0,04	5,28 ± 0,04

\* Ausbildung eines Plateaus: Gefitinib 52 ± 4 %, Erlotinib 54 ± 6 %.

Tabelle 4-43-B: Ermittelte GI<sub>50</sub>-Werte mit Standardabweichungen.

Verbindung	MDCK II Wildtyp	MDCK II BCRP	MCF-7 Wildtyp	MCF-7 MX
	GI <sub>50</sub> ± SD [µmol/l]	GI <sub>50</sub> ± SD [µmol/l]	GI <sub>50</sub> ± SD [µmol/l]	GI <sub>50</sub> ± SD [µmol/l]
Gefitinib	1,07 ± 0,65	0,897 ± 0,221	n.t.	1,37 ± 0,21*
Erlotinib	1,58 ± 0,32	0,969 ± 0,270	n.t.	0,569 ± 0,087*
Imatinib	2,22 ± 0,41	6,18 ± 0,38	17,0 ± 0,8	19,1 ± 1,1
Sunitinib	0,754 ± 0,138	0,737 ± 0,135	5,14 ± 0,31	5,26 ± 0,32

\* Ausbildung eines Plateaus: Gefitinib 52 ± 4 %, Erlotinib 54 ± 6 %.

Die Chinazolin-Derivate Gefitinib und Erlotinib sind für beide Zelllinien MDCK II Wildtyp und MDCK II BCRP toxisch. Dies findet sich für Gefitinib auch in der Dissertation von Michael Krapf.<sup>245</sup> Für die Zelllinien MCF-7 Wildtyp und MCF-7 MX ergibt sich dagegen ein abweichendes Bild. Gefitinib und Erlotinib sind zwar für die BCRP exprimierende Zelllinie MCF-7 MX toxisch, aber nicht für die Zelllinie MCF-7 Wildtyp. In der Literatur wird die fehlende Toxizität von Gefitinib und Erlotinib auf die Zelllinie MCF-7 Wildtyp ebenfalls beschrieben.<sup>64,246</sup>

Das 2-Phenylaminopyrimidinderivat Imatinib ist sowohl für die Zelllinien MDCK II Wildtyp, MDCK II BCRP, MCF-7 Wildtyp und MCF-7 MX toxisch. Dabei ist die Toxizität in den Wildtyp-Zelllinien und den ABCG2 exprimierenden Zellen jeweils ähnlich. Allerdings unterscheidet sich das Ausmaß der Toxizität in den verschiedenen

Zelllinien MDCK II und MCF-7. Bei den MDCK II Zelllinien ist die Toxizität um ungefähr eine halbe log-Einheit gegenüber den MCF-7 Zelllinien erhöht.

Sunitinib ist wie Imatinib für alle hier getesteten Zelllinien toxisch. Dabei bestehen sowohl zwischen den MDCK II Wildtyp und MDCK II BCRP Zellen als auch zwischen den MCF-7 Wildtyp und MCF-7 MX Zellen keine Unterschiede in der Toxizität. Dies bestätigen auch Untersuchungen von Dai et al., die die Toxizität von Sunitinib an S1 und ABCG2 exprimierenden S1-M1-80 Zellen untersucht haben.<sup>247</sup>

Die Toxizität von Sunitinib in den MDCK II und MCF-7 Zelllinien unterscheidet sich jedoch um fast 0,9 log-Einheiten.

In Abbildung 4-59 sind die im MTT-Assay erhaltenen Toxizitäten von Gefitinib und Sunitinib dargestellt.

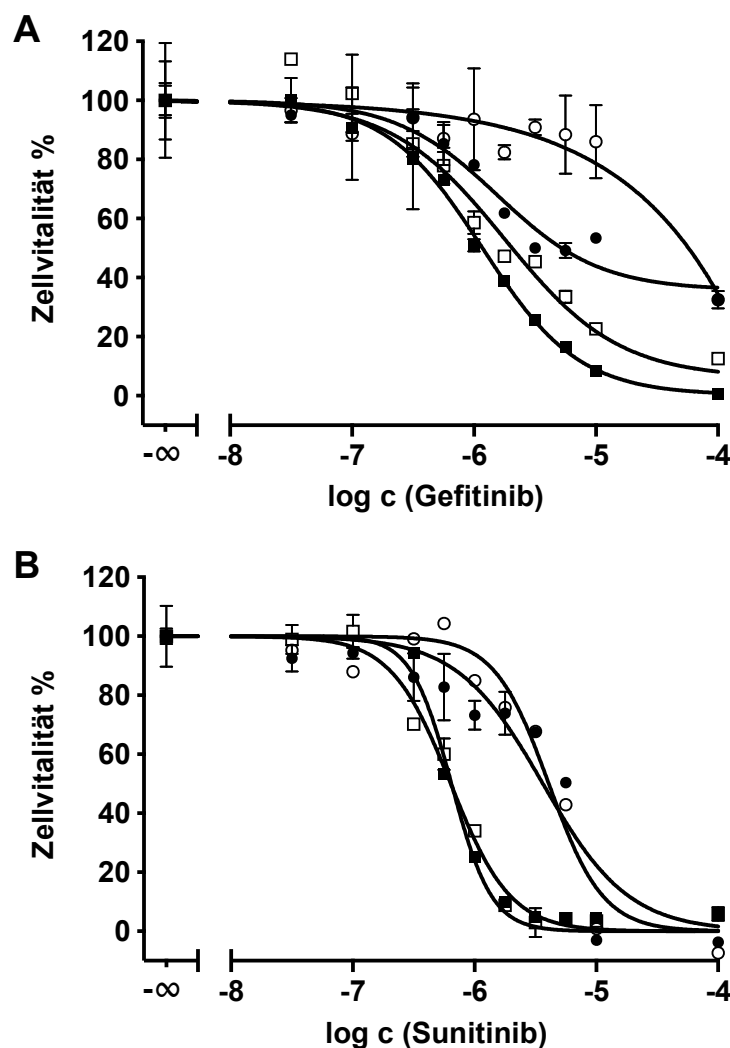


Abbildung 4-59: Ergebnisse MTT-Assay mit MCF-7 Wildtyp (○), MCF-7 MX (●), MDCK II Wildtyp (□) und MDCK II BCRP (■) Zellen. A: Gefitinib. B: Sunitinib

Die unterschiedliche Toxizität, die in den Zelllinien MDCK II und MCF-7 beobachtet werden kann, wurde in unserem Arbeitskreis in der Dissertation von Federico Marighetti bereits früher beschrieben.<sup>210</sup> Genauso verhält es sich mit der fehlenden Toxizität von Verbindungen, hier von Gefitinib und Erlotinib, in der Zelllinie MCF-7 Wildtyp, die aber in der Zelllinie MCF-7 MX vorhanden ist. Die von Federico Marighetti unter anderem im MTT-Assay getesteten Verbindungen WK-X-27, KS-166 und KS-251 sind toxisch für die Zelllinie MCF-7 MX, jedoch nicht für die Zelllinie MCF-7 Wildtyp. Die beobachtete Toxizität der Verbindungen ist daher auch ein für Zelllinien spezifischer Effekt.

### 4.11.4 Konformationsanalyse von Imatinib und Nilotinib

In dem in Kapitel 4.8.7 mit Hilfe der veröffentlichten Konformation von MB136 erstellten Pharmakophormodell (Abbildung 4-42) wurden Übereinstimmungen der Wechselwirkungen des Ko143-Analogons und des Substrats E<sub>1</sub>S von ABCG2 gefunden. Daher wurde auch in diesem Kapitel ein flexibles Alignment mit MB136 für Imatinib, einem Inhibitor der ATPase Aktivität, und Nilotinib, einer Verbindung mit biphasischen Aktivierungsprofil, durchgeführt. Die Überlagerungen sind in Abbildung 4-60 dargestellt.

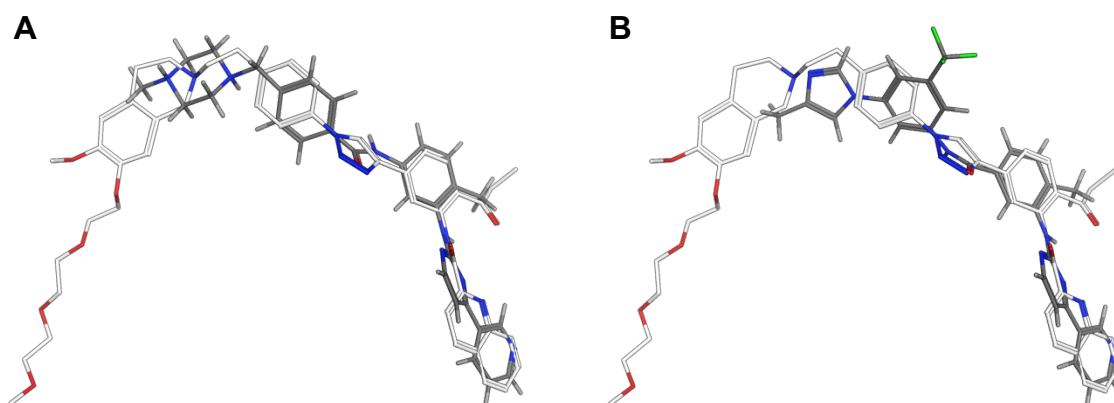


Abbildung 4-60: Flexible Alignment von A: MB136 (weiß) und Imatinib (grau) und B: MB136 (weiß) und Nilotinib (grau).

In Abbildung 4-60 A ist zu erkennen, dass sich die strukturellen Merkmale von Imatinib mit denen von MB136 im Pharmakophormodell herausgestellten Merkmalen aus Abbildung 4-42, ebenfalls überlagert werden können. Die aromatischen Wechselwirkungen A2, A3 und A4 des Pharmakophormodells können überlagert werden, die Amid-Teilstruktur kann mit dem Triazol überlagert werden und die beiden protonierbaren Stickstoffe des Piperazins können mit dem protonierbaren Stickstoff des Tetrahydroisochinolins überlagert werden, während A1 fehlt. Da es sich bei beiden Verbindungen MB136 und Imatinib um Inhibitoren der ATPase Aktivität handelt, und Imatinib wie MB136 eine gestreckte Konformation in der Bindungstasche von ABCG2 einnehmen kann, ist es denkbar, dass in der Bindungstasche ähnliche Wechselwirkungen, wie hier vorgeschlagen, vorliegen.

Nilotinib aktiviert die ATPase Aktivität zunächst, inhibiert diese aber bei steigenden Konzentrationen wieder. Die Art der Interaktion von Nilotinib mit ABCG2 unterscheidet sich daher vermutlich von der von MB136 und Imatinib. Dennoch lassen sich auch hier im flexiblen Alignment mit MB136 (Abbildung 4-60 B) wichtige Strukturmerkmale des Pharmakophormodells wiederfinden. So können auch hier die aromatischen Strukturen von Nilotinib mit den Bereichen A2, A3 und A4 des Pharmakophors und die Amidteilstruktur mit dem Triazol überlagert werden.

### 4.11.5 Schlussfolgerung

Die hier untersuchten strukturell unterschiedlichen Tyrosinkinase-Inhibitoren bestätigen sowohl im Vanadat-sensitiven ATPase Assay als auch im funktionellen Hoechst 33342 Assay ihre Interaktion mit ABCG2. So strukturell unterschiedlich sie sind, so verschieden sind auch ihre Effekte auf die ATPase Aktivität. Sie aktivieren die ATPase Aktivität, inhibieren diese oder haben sowohl aktivierende als auch inhibierende Effekte.

Es lässt sich zwischen den mit Hilfe des funktionellen Assays ermittelten Daten und den unterschiedlichen Einflüssen auf die ATPase Aktivität kein gemeinsames Muster in den beiden Assays beobachten.

Die mit Hilfe des MTT-Assays ermittelten Ergebnisse geben keine klare Antwort, ob die Toxizität der Tyrosinkinase-Inhibitoren auf die Anwesenheit von ABCG2 zurückzuführen ist. Möglicherweise haben die Tyrosinkinase-Inhibitoren einen Einfluss auf die Expression von ABCG2.<sup>248</sup> Zudem liegt bei den verschiedenen Zelllinien ein zelllinienspezifischer Effekt vor. Das kann damit zusammenhängen, dass in den verschiedenen Krebszellen auch Targets der Tyrosinkinase-Inhibitoren hochreguliert sein können und diese dadurch einen Einfluss auf die Toxizität der Verbindungen haben können.

Die Überlagerung von Imatinib mit MB136 führt unter Berücksichtigung des definierten Pharmakophormodells von MB136 und der beobachteten ähnlichen Effekte auf die ATPase Aktivität von ABCG2 zur Hypothese, dass Imatinib ähnlich MB136 in die Bindungstasche von ABCG2 binden könnte.



### 5 Zusammenfassung

Humane ABC-Transporter spielen unter anderem eine bedeutende Rolle für die Absorption, Distribution, Metabolisierung und Exkretion von Arzneistoffen und sind an der MDR von Tumoren beteiligt. Das Phänomen der MDR stellt ein bedeutsames Problem in der Behandlung von Tumoren mit Chemotherapeutika dar. Trotz intensiver Forschung ist es bis heute nicht gelungen, einen effektiven Ansatz in der Klinik zu etablieren. Mittlerweile ist bekannt, dass in Tumoren multiple ABC-Transporter überexprimiert werden und zahlreiche SNPs vorliegen können. Fortschritte in der personalisierten Medizin und in den wissenschaftlichen Methoden und Standards werden ein verbessertes Verständnis der komplexen Bedeutung dieser ABC-Transporter im Tumorgeschehen ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Methoden etabliert und genutzt, um ein weiterführendes Verständnis zur Funktionsweise von ABCG2 unter Berücksichtigung neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse zu gewinnen. Ein zentrales Thema stellte dabei die Charakterisierung von Verbindungen bezüglich ihres Effektes auf die basale ATPase Aktivität von ABCG2 dar. Um den Einfluss von Verbindungen auf die ATPase Aktivität von ABCG2 messen zu können wurde mit dem Vanadat-sensitiven ATPase Assay in diesem Arbeitskreis ein neues Testsystem etabliert und für HTS modifiziert.

Es ist bisher nicht eindeutig geklärt, ob sich aus der Einteilung Inhibitor oder Aktivator der basalen ATPase Aktivität die klare Einordnung Inhibitor oder Substrat von ABCG2 ableiten lässt, oder ob es sich dabei um eine Einteilung mit konzentrationsabhängigem fließendem Übergang handelt. Vermutlich liegt aber letzteres vor, da in dieser Arbeit unter anderem gezeigt wurde, dass Hoechst 33342, ein Substrat von ABCG2, die basale ATPase Aktivität inhibiert. Die Einteilung Inhibitor oder Aktivator der basalen ATPase Aktivität dient also eher einer Orientierung der Interaktionsweise mit ABCG2. Zu berücksichtigen ist auch, dass konzentrationsabhängige Effekte vorliegen können. So wurde bei einigen Verbindungen zunächst

eine konzentrationsabhängige Aktivierung der ATPase Aktivität beobachtet, die bei höheren Konzentrationen jedoch wieder inhibiert wurde.

Mit Hilfe des Vanadat-sensitiven ATPase Assays und den bereits etablierten funktionellen Assays, Hoechst 33342 Assay und Pheophorbid A Assay, wurden Vertreter aus verschiedenen in diesem Arbeitskreis synthetisierten Substanzbibliotheken hinsichtlich ihrer Effekte auf die ATPase Aktivität von ABCG2 untersucht. Zunächst wurde eine Reihe von Tariquidar-Analoga, HM30181-Analoga und Elacridar-Analoga charakterisiert. Als eine entscheidende strukturelle Modifikation stellte sich dabei die Anwesenheit oder Abwesenheit des Tetrahydroisochinolinrestes heraus. Der Tetrahydroisochinolinrest führte bei allen Verbindungen, unabhängig von der Grundstruktur, zu einer Inhibition der basalen ATPase Aktivität. Fehlte dieser Rest wurde die basale ATPase Aktivität aktiviert oder im Falle einiger Verbindungen zunächst aktiviert und bei höheren Konzentrationen wieder inhibiert. Die kürzlich veröffentlichten Kryoelektronenmikroskopstrukturen mit gebundenen Inhibitoren oder Aktivatoren der ATPase Aktivität von ABCG2 durch Manolaridis et al.<sup>43</sup>, Jackson et al.<sup>44</sup> und Taylor et al.<sup>45</sup> unterstützen diese Beobachtung. Die Kryoelektronenmikroskopstrukturen zeigen, dass Inhibitoren und Aktivatoren der ATPase Aktivität in der gleichen Bindungsstelle von ABCG2 binden, aber durch unterschiedliche Interaktionen mit den TMs verschiedene Auswirkungen auf die Funktion von ABCG2 haben. Basierend auf der veröffentlichten Kryoelektronenmikroskopstruktur mit dem Tariquidar-Analogen MB136 von Jackson et al.<sup>44</sup>, einem Inhibitor der ATPase Aktivität, wurde ein Pharmakophormodell erstellt. Die im Rahmen dieser Arbeit für eine Auswahl der hier getesteten analogen ATPase-Inhibitoren durchgeführte Konformationssuche ergab, dass diese entweder eine gleiche, oder bei den in Verknüpfung 2 *ortho*-substituierten Verbindungen eine ähnliche, in Teilen deckungsgleiche Konformation in der Bindungstasche von ABCG2 einnehmen könnten.

Kombinationsexperimente im Vanadat-sensitiven ATPase Assay legen ebenfalls nahe, dass die Bindung von Ko143 und der Tariquidar-Analoga mit Tetrahydroisochinolinrest in der Bindungstasche von ABCG2 unterschiedlich ist. Diese Beobachtung scheint sich durch die Ergebnisse der Kryoelektronenmikroskopstrukturen von Jackson et al. bezüglich der Bindung von zwei Ko143-Analoga MZ29 und eines Tariquidar-Analogons MB136 zu bestätigen.<sup>44</sup>

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Charakterisierung von 2-Arylamino-1*H*-benzimidazolen. Es konnte gezeigt werden, dass geringe strukturelle Modifikationen, darunter der Austausch von hydrophoben Gruppen gegen aromatische Strukturen in den Positionen 1 und 3 am Benzimidazol, der Austausch einer CH<sub>2</sub>-Gruppe gegen eine NH-Gruppe im Linker an Position 3 oder die Verlängerung des Linkers in Position 5 des Benzimidazols zu drastischen Veränderungen des Einflusses auf die ATPase Aktivität führten. Diese Beobachtung bestätigt die von Lars Möllmann für diese Substanzklasse beschriebenen Struktur-Wirkungsbeziehungen.<sup>227</sup>

Unter Verwendung der neu etablierten Methode des Vanadat-sensitiven ATPase Assays wurden Kombinationsexperimente mit Hoechst 33342 und Aktivatoren der basalen ATPase Aktivität mit verschiedener Grundstruktur durchgeführt. So wurden Tariquidar-Analoga ohne Tetrahydroisochinolinrest, ATPase aktivierende 2-Arylamino-1*H*-benzimidazole und das Flavonoid Quercetin untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Verbindungen unabhängig von ihrer Grundstruktur in der Lage waren, die inhibierende Wirkung von Hoechst 33342 auf die ATPase Aktivität zu überwinden. Diese Beobachtung könnte der Hemmung des Hoechst 33342 Transports im funktionellen Hoechst 33342 Assay entsprechen.

Der Versuch, die Daten des Vanadat-sensitiven ATPase Assays mit Ergebnissen der beiden funktionellen Assays, Hoechst 33342 Assay und Pheophorbid A Assay, zu vergleichen, führte leider zu keinem Ergebnis. Daher müssen der Vanadat-sensitive ATPase Assay und die funktionellen Testsysteme als sich ergänzende, aber unabhängige Testmodelle aufgefasst werden.

Neben der Charakterisierung von Substanzbibliotheken unseres Arbeitskreises wurde die Interaktion von ausgewählten Tyrosinkinase-Inhibitoren mit ABCG2 untersucht. Diese strukturell heterogenen Verbindungen befinden sich in der klinischen Anwendung bei Tumorpatienten. Individuelle SNPs von ABC-Transportern, können die Bioverfügbarkeit von Tyrosinkinase-Inhibitoren für Patienten individuell verändern und so z.B. zu veränderten Nebenwirkungen von Tyrosinkinase-Inhibitoren führen.<sup>238</sup> Daher wurden in den letzten Jahren unter anderem mit Imatinib, Erlotinib, Gefitinib, Sunitinib und Sorafenib klinische Studien durchgeführt, um herauszufinden, inwieweit sich ABC-Transporter als Biomarker für eine interindividuelle Pharmakokinetik eignen.

Neben der Charakterisierung dieser Verbindungen an ABCG2 mit Hilfe des Vanadat-sensitiven ATPase Assays, funktionellen Assays und eines Toxizitäts-Assays, konnten für Imatinib mit Hilfe des Pharmakophormodells von MB136 weitgehend die gleichen an der Wechselwirkung mit ABCG2 beteiligten strukturellen Merkmale beschrieben werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- (1) Holland, B. I.; Cole, S. P. C.; Kuchler, K.; Higgins, Ch. F. *ABC Proteins - From Bacteria to Man*, 1st ed.; Academic Press: Amsterdam, Boston, 2003.
- (2) Kos, V.; Ford, R. C. The ATP-Binding Cassette Family: A Structural Perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66* (19), 3111–3126.
- (3) Sarkadi, B.; Homolya, L.; Szakács, G.; Váradi, A. Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoimmunity Defense System. *Physiol. Rev.* **2006**, *86* (4), 1179–1236.
- (4) Linton, K. J. Structure and Function of ABC Transporters. *Physiology* **2007**, *22* (2), 122–130.
- (5) Higgins, C. F. ABC Transporters: From Microorganisms to Man. *Annu Rev Cell Biol* **1992**, *8*, 67–113.
- (6) Linton, K. J.; Higgins, C. F. The Escherichia Coli ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins. *Mol. Microbiol.* **1998**, *28*, 5–13.
- (7) Dean, M. The Genetics of ATP-Binding Cassette Transporters. *Methods Enzymol.* **2005**, *400* (1972), 409–429.
- (8) Wilkens, S. Structure and Mechanism of ABC Transporters. *F1000Prime Rep.* **2015**, *7* (14), 7–14.
- (9) Rees, D. C.; Johnson, E.; Lewinson, O. ABC Transporters: The Power to Change. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10* (3), 218–227.
- (10) Khunweeraphong, N.; Stockner, T.; Kuchler, K. The Structure of the Human ABC Transporter ABCG2 Reveals a Novel Mechanism for Drug Extrusion. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 13767.
- (11) Ozvegy, C.; Litman, T.; Szakács, G.; Nagy, Z.; Bates, S.; Váradi, a; Sarkadi, B. Functional Characterization of the Human Multidrug Transporter, ABCG2, Expressed in Insect Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *285* (1), 111–117.
- (12) Sarkadi, B.; Ozvegy-Laczka, C.; Németh, K.; Váradi, A. ABCG2 - a Transporter for All Seasons. *FEBS Lett.* **2004**, *567* (1), 116–120.

- 
- (13) Vasiliou, V.; Vasiliou, K.; Nebert, D. W. Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Family. *Hum. Genomics* **2012**, 3 (3), 281–290.
- (14) Dawson, R. J. P.; Hollenstein, K.; Locher, K. P. Uptake or Extrusion: Crystal Structures of Full ABC Transporters Suggest a Common Mechanism. *Mol. Microbiol.* **2007**, 65 (2), 250–257.
- (15) Dean, M.; Annilo, T. Evolution of the ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily in Vertebrates. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2005**, 6 (1), 123–142.
- (16) Dean, M.; Rzhetsky, A.; Allikmets, R. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *Genome Res.* **2001**, 11 (7), 1156–1166.
- (17) Huls, M.; Russel, F. G. M.; Masereeuw, R. The Role of ATP Binding Cassette Transport in Tissue Defense and Organ Regeneration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, 328 (1), 3–9.
- (18) Borst, P.; Elferink, R. O. Mammalian ABC Transporters in Health and Disease. *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, 71 (1), 537–592.
- (19) Dassa, E.; Bouige, P. The ABC of ABCs: A Phylogenetic and Functional Classification of ABC Systems in Living Organisms. *Res. Microbiol.* **2001**, 152, 211–229.
- (20) Dean, M.; Allikmets, R. Complete Characterization of the Human ABC Gene Family. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2001**, 33 (6), 475–479.
- (21) Eckford, P. D. W.; Sharom, F. J. ABC Efflux Pump-Based Resistance to Chemotherapy Drugs. *Chem. Rev.* **2009**, 109 (7), 2989–3011.
- (22) Szakács, G.; Váradi, A.; Ozvegy-Laczka, C.; Sarkadi, B. The Role of ABC Transporters in Drug Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov. Today* **2008**, 13 (9–10), 379–393.
- (23) Giacomini, K. M.; Huang, S.-M.; Tweedie, D. J.; Benet, L. Z.; Brouwer, K. L. R.; Chu, X.; Dahlin, A.; Ecers, R.; Fischer, V.; Hillgren, K. M.; Hoffmaster, K. A.; Ishikawa, T.; Keppler, D.; Kim, R. B.; Lee, C. A.; Niemi, M.; Polli, J. W.; Sugiyama, Y.; Swaan, P. W.; Ware, J. A.; Wright, S. H.; Yee, S. W.; Zamek-Gliszczynski, M. J.; Zhang, L. Membrane Transporters in Drug Development. *Nature* **2010**, 9, 215–236.
- (24) An, Y.; Ongkeko, W. M. ABCG2: The Key to Chemoresistance in Cancer Stem Cells? *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2009**, 5 (12), 1529–1542.
- (25) Food and Drug Administration. In Vitro Metabolism- and Transporter-

- Mediated Drug-Drug Interaction Studies Guidance for Industry. *FDA Guidel.* **2017**, No. 2017-10–24, 47.
- (26) Hillgren, K. M.; Keppler, D.; Zur, A. A.; Giacomini, K. M.; Stieger, B.; Cass, C. E.; Zhang, L. Emerging Transporters of Clinical Importance: An Update from the International Transporter Consortium. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2013**, *94* (1), 52–63.
- (27) Szakács, G.; Paterson, J. K.; Ludwig, J. A.; Booth-Genthe, C.; Gottesman, M. M. Targeting Multidrug Resistance in Cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5* (3), 219–234.
- (28) Sanofi Genzyme. *Fachinformation: Jevtana® 60 Mg Konzentrat Und Lösungsmittel Zur Herstellung Einer Infusionslösung*; 2017.
- (29) MSD. *Fachinformation: Noxafil® 100 Mg Magensaftresistente Tabletten*; 2018.
- (30) Stadapharm. *Fachinformation: Clarithromycin STADA® 250 Mg Filmtabletten, Clarithromycin STADA® 500 Mg*; 2018.
- (31) Mellor, H. R.; Callaghan, R. Resistance to Chemotherapy in Cancer: A Complex and Integrated Cellular Response. *Pharmacology* **2008**, *81* (4), 275–300.
- (32) Pusztai, L.; Wagner, P.; Ibrahim, N.; Rivera, E.; Theriault, R.; Symmans, F. W.; Wong, F.; Blumenschein, G.; Fleming, D. R.; Rouzier, R.; Boniface, G.; Hortobagyi, G. N. Phase II Study of Tariquidar, a Selective P-Glycoprotein Inhibitor, in Patients with Chemotherapy-Resistant, Advanced Breast Carcinoma. *Cancer* **2005**, *104* (4), 682–691.
- (33) Ozols, R. F.; Cunnion, R. E.; Klecker, R. W.; Hamilton, T. C.; Ostchega, Y.; Parrillo, J. E.; Young, R. C. Verapamil and Adriamycin in the Treatment of Drug-Resistant Ovarian Cancer Patients. *J. Clin. Oncol.* **1987**, *5* (4), 641–647.
- (34) Chico, I.; Kang, M. H.; Bergan, R.; Abraham, J.; Bakke, S.; Meadows, B.; Rutt, A.; Robey, R.; Choyke, P.; Merino, M.; Goldspile, B.; Smith, T.; Steinberg, S.; Figg, W. D.; Fojo, T.; Bates, S. Phase I Study of Infusional Paclitaxel in Combination With the P-Glycoprotein Antagonist PSC 833. *J. Clin. Oncol.* **2001**, *19* (3), 832–842.
- (35) Millwar, M. J.; Cantwell, B. M. J.; Munro, N. C.; Robinson, A.; Corris, P. A.; Harris, A. L. Oral Verapamil with Chemotherapy for Advanced Non-Small

- Cell Lung Cancer: A Randomised Study. *Br. J. Cancer* **1993**, 67 (5), 1031–1035.
- (36) Caligiuri, M.; George, S. L.; Lee, E. J.; Smith, R.; Schiffer, C. A.; Powell, B. L.; Szatrowski, T. P.; Dodge, R. K.; Baer, M.; Lemke, S. Phase 3 Study of the Multidrug Resistance Modulator PSC-833 in Previously Untreated Patients 60 Years of Age and Older with Acute Myeloid Leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 9720. *Blood* **2001**, 100 (4), 1224–1232.
- (37) Kelly, R. J.; Draper, D.; Chen, C. C.; Robey, R. W.; Figg, W. D.; Piekarz, R. L.; Chen, X.; Gardner, E. R.; Balis, F. M.; Venkatesan, A. M.; Steinberg, S. M.; Fojo, T.; Bates, S. E. A Pharmacodynamic Study of Docetaxel in Combination with the P-Glycoprotein Antagonist Tariquidar (XR9576) in Patients with Lung, Ovarian, and Cervical Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2011**, 17 (3), 569–580.
- (38) Chung, F. S.; Santiago, J. S.; De Jesus, M. F. M.; Trinidad, C. V.; See, M. F. E. Disrupting P-Glycoprotein Function in Clinical Settings: What Can We Learn from the Fundamental Aspects of This Transporter? *Am. J. Cancer Res.* **2016**, 6 (8), 1583–1598.
- (39) Yu, M.; Ocana, A.; Tannock, I. F. Reversal of ATP-Binding Cassette Drug Transporter Activity to Modulate Chemoresistance: Why Has It Failed to Provide Clinical Benefit? *Cancer Metastasis Rev.* **2013**, 32 (1–2), 211–227.
- (40) Robey, R. W.; Pluchino, K. M.; Hall, M. D.; Fojo, A. T.; Bates, S. E.; Gottesman, M. M. Revisiting the Role of ABC Transporters in Multidrug-Resistant Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, 18 (7), 452–464.
- (41) Bai, X.; McMullan, G.; Scheres, S. H. W. How Cryo-EM Is Revolutionizing Structural Biology. *Trends Biochem. Sci.* **2015**, 40 (1), 49–57.
- (42) Kapoor, P.; Horsey, A. J.; Cox, M. H.; Kerr, I. D. ABCG2: Does Resolving Its Structure Elucidate the Mechanism? *Biochem. Soc. Trans.* **2018**, 46 (6), 1485–1494.
- (43) Manolaridis, I.; Jackson, S. M.; Taylor, N. M. I.; Kowal, J.; Stahlberg, H.; Locher, K. P. Cryo-EM Structures of a Human ABCG2 Mutant Trapped in ATP-Bound and Substrate-Bound States. *Nature* **2018**, Letter (563), 426–430.
- (44) Jackson, S. M.; Manolaridis, I.; Kowal, J.; Zechner, M.; Taylor, N. M. I.; Bause, M.; Bauer, S.; Bartholomaeus, R.; Bernhardt, G.; Koenig, B.;



- Buschauer, A.; Stahlberg, H.; Altmann, K.-H.; Locher, K. P. Structural Basis of Small-Molecule Inhibition of Human Multidrug Transporter ABCG2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2018**, *25* (4), 333–340.
- (45) Taylor, N. M. I.; Manolaridis, I.; Jackson, S. M.; Kowal, J.; Stahlberg, H.; Locher, K. P. Structure of the Human Multidrug Transporter ABCG2. *Nature* **2017**, *546* (7659), 504.
- (46) Kim, Y.; Chen, J. Molecular Structure of Human P-Glycoprotein in the ATP-Bound, Outward-Facing Conformation. *Science* **2018**, *359* (6378), 915–919.
- (47) Alam, A.; Kowal, J.; Broude, E.; Roninson, I.; Locher, K. P. Structural Insight into Substrate and Inhibitor Discrimination by Human P-Glycoprotein. *Science* **2019**, *363* (6428), 753–756.
- (48) Johnson, Z. L.; Chen, J. Structural Basis of Substrate Recognition by the Multidrug Resistance Protein MRP1. *Cell* **2017**, *168*, 1075–1085.
- (49) Johnson, Z. L.; Chen, J. ATP Binding Enables Substrate Release from Multidrug Resistance Protein 1. *Cell* **2018**, *172*, 81–89.
- (50) Doyle, L. a; Yang, W.; Abruzzo, L. V; Krogmann, T.; Gao, Y.; Rishi, a K.; Ross, D. D. A Multidrug Resistance Transporter from Human MCF-7 Breast Cancer Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95* (26), 15665–15670.
- (51) Ross, D. D.; Yang, W.; Abruzzo, L. V.; Dalton, W. S.; Schneider, E.; Lage, H.; Dietel, M.; Greenberger, L.; Cole, S. P. C.; Doyle, L. A. Atypical Multidrug Resistance: Breast Cancer Resistance Protein Messenger RNA Expression in Mitoxantrone-Selected Cell Lines. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **1999**, *91* (5), 429–433.
- (52) Allikmets, R.; Schriml, L. M.; Hutchinson, A.; Romano-Spica, V.; Dean, M. A Human Placenta-Specific ATP-Binding Cassette Gene (ABCP) on Chromosome 4q22 That Is Involved in Multidrug Resistance. *Cancer Res.* **1998**, *58* (23), 5337–5339.
- (53) Miyake, K.; Mickley, L.; Litman, T.; Zhan, Z.; Robey, R.; Cristensen, B.; Brangi, M.; Greenberger, L.; Dean, M.; Fojo, T.; Bates, S. E. Molecular Cloning of cDNAs Which Are Highly Overexpressed in Mitoxantrone-Resistant Cells. *Cancer Res.* **1999**, *59* (1), 8–13.
- (54) Fetsch, P. A.; Abati, A.; Litman, T.; Morisaki, K.; Honjo, Y.; Mittal, K.; Bates, S. E. Localization of the ABCG2 Mitoxantrone Resistance-Associated Protein in Normal Tissues. *Cancer Lett.* **2006**, *235* (1), 84–92.

- (55) Scharenberg, C. W.; Harkey, M. A.; Torok-Storb, B. The ABCG2 Transporter Is an Efficient Hoechst 33342 Efflux Pump and Is Preferentially Expressed by Immature Human Hematopoietic Progenitors. *Blood* **2002**, *99* (2), 507–513.
- (56) Staud, F.; Pavek, P. Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2005**, *37* (4), 720–725.
- (57) Staud, F.; Pavek, P. Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2005**, *37* (4), 720–725.
- (58) Zámbo, B.; Bartos, Z.; Móznér, O.; Szabó, E.; Várady, G.; Poór, G.; Pálinkás, M.; Andrikovics, H.; Hegedus, T.; Homolya, L.; Sarkadi, B. Clinically Relevant Mutations in the ABCG2 Transporter Uncovered by Genetic Analysis Linked to Erythrocyte Membrane Protein Expression. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 1–13.
- (59) Honjo, Y.; Hrycyna, C. A.; Yan, Q.; Medina-pe, W. Y.; Robey, R. W.; Laar, A. Van De; Litman, T.; Dean, M.; Bates, S. E. Acquired Mutations in the MXR/BCRP/ABCP Gene Alter Substrate Specificity in MXR/BCRP/ABCP-Overexpressing Cells. *Cancer Res.* **2001**, *61* (301), 6635–6639.
- (60) Marquez, B.; Van Bambeke, F. ABC Multidrug Transporters: Target for Modulation of Drug Pharmacokinetics and Drug-Drug Interactions. *Curr. Drug Targets* **2011**, *12* (5), 600–620.
- (61) Doyle, L. A.; Ross, D. D. Multidrug Resistance Mediated by the Breast Cancer Resistance Protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* **2003**, *22* (47 REV. ISS. 6), 7340–7358.
- (62) Mao, Q.; Unadkat, J. D. Role of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Drug Transport—an Update. *AAPS J.* **2014**, *17* (1), 65–82.
- (63) Eadie, L. N.; Hughes, T. P.; White, D. L. Interaction of the Efflux Transporters ABCB1 and ABCG2 with Imatinib, Nilotinib, and Dasatinib. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2014**, *95* (3), 294–306.
- (64) Shi, Z.; Parmar, S.; Peng, X.-X.; Shen, T.; Robey, R. W.; Bates, S. E.; Fu, L.-W.; Shao, Y.; Chen, Y.-M.; Zang, F.; Chen, Z.-S. The Epidermal Growth Factor Tyrosine Kinase Inhibitor AG1478 and Erlotinib Reverse ABCG2-Mediated Drug Resistance. *Oncology* **2009**, *21*, 483–489.
- (65) Stacy, A. E.; Jansson, P. J.; Richardson, D. R. Molecular Pharmacology of

- ABCG2 and Its Role in Chemoresistance. *Mol. Pharmacol.* **2013**, *84* (5), 655–669.
- (66) Jones, P. M.; George, A. M. A Reciprocating Twin-Channel Model for ABC Transporters. *Q. Rev. Biophys.* **2014**, *47* (3), 189–220.
- (67) George, A. M.; Jones, P. M. Perspectives on the Structure-Function of ABC Transporters: The Switch and Constant Contact Models. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2012**, *109* (3), 95–107.
- (68) Locher, K. P. Mechanistic Diversity in ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *23* (6), 487–493.
- (69) Telbisz, Á.; Hegedüs, C.; Váradi, A.; Sarkadi, B.; Özvegy-laczka, C. Regulation of the Function of the Human ABCG2 Multidrug Transporter by Cholesterol and Bile Acids: Effects of Mutations in Potential Substrate and Steroid Binding Sites. *Drug Metab. Dispos.* **2014**, *42* (4), 575–585.
- (70) Szilagyi, J. T.; Vetrano, A. M.; Laskin, J. D.; Aleksunes, L. M. Localization of the Placental BCRP/ABCG2 Transporter to Lipid Rafts: Role for Cholesterol in Mediating Efflux Activity. *Placenta* **2017**, *55*, 29–36.
- (71) Juliano, R. L.; Ling, V. A Surface Glycoprotein Modulating Drug Permeability in Chinese Hamster Ovary Cell Mutants. *BBA - Biomembr.* **1976**, *455* (1), 152–162.
- (72) Schinkel, A. H.; Jonker, J. W. Mammalian Drug Efflux Transporters of the ATP Binding Cassette (ABC) Family: An Overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64* (SUPPL.), 138–153.
- (73) Gottesman, M. M.; Fojo, T.; Bates, S. E. Multidrug Resistance in Cancer: Role of ATP-Dependent Transporters. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2* (1), 48–58.
- (74) Kathawala, R. J.; Gupta, P.; Ashby, C. R. J.; Chen, Z. The Modulation of ABC Transporter Mediated Multidrug Resistance in Cancer: A Review of the Past Decade. *Drug Resist. Updat.* **2014**, 1–17.
- (75) Yakusheva, E. N.; Titov, D. S. Structure and Function of Multidrug Resistance Protein 1. *Biochem. Moscow* **2018**, *83* (8), 907–929.
- (76) Chen, C. jie; Chin, J. E.; Ueda, K.; Clark, D. P.; Pastan, I.; Gottesman, M. M.; Roninson, I. B. Internal Duplication and Homology with Bacterial Transport Proteins in the Mdr1 (P-Glycoprotein) Gene from Multidrug-Resistant Human Cells. *Cell* **1986**, *47* (3), 381–389.
- (77) Sharom, F. J. The P-Glycoprotein Multidrug Transporter. *Essays Biochem.*

- 2011**, 50, 161–178.
- (78) Srinivas, E.; Narashima Murthy, J.; Raghu Ram Rao, A.; Narahari Sastry, G. Recent Advances in Molecular Modeling and Medicinal Chemistry Aspects of Phospho-Glycoprotein. *Curr. Drug Metab.* **2006**, 7, 205–217.
- (79) Aller, S. G.; Yu, J.; Ward, A.; Weng, Y.; Chittaboina, S.; Zhuo, R.; Harrell, P. M.; Trinh, Y. T.; Zhang, Q.; Urbatsch, I. L.; Chang, G. Structure of P-Glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. *Science* **2009**, 323 (March), 1718–1723.
- (80) Schinkel, A. H. The Physiological Function of Drug-Transporting P-Glycoproteins. *Semin. Cancer Biol.* **1997**, 8 (3), 161–170.
- (81) Breedveld, P.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. Use of P-Glycoprotein and BCRP Inhibitors to Improve Oral Bioavailability and CNS Penetration of Anticancer Drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, 27 (1), 17–24.
- (82) De Bruin, M.; Miyake, K.; Litman, T.; Robey, R.; Bates, S. E. Reversal of Resistance by GF120918 in Cell Lines Expressing the ABC Half-Transporter, MXR. *Cancer Lett.* **1999**, 146 (2), 117–126.
- (83) Telbisz, Á.; Hegedüs, C.; Özvegy-Laczka, C.; Goda, K.; Várady, G.; Takáts, Z.; Szabó, E.; Sorrentino, B. P.; Váradi, A.; Sarkadi, B. Antibody Binding Shift Assay for Rapid Screening of Drug Interactions with the Human ABCG2 Multidrug Transporter. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, 45 (1–2), 101–109.
- (84) Amin, M. L. P-Glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. *Drug Target Insights* **2013**, 7, 27–34.
- (85) Wang, E. J.; Barecki-Roach, M.; Johnson, W. W. Elevation of P-Glycoprotein Function by a Catechin in Green Tea. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 297 (2), 412–418.
- (86) Sharom, F. J.; Yu, X.; Didiato, G.; Chu, Joseph W. K. Synthetic Hydrophobic Peptides Are Substrates for P-Glycoprotein and Stimulate Drug Transport. *Biochem. J.* **1996**, 320 (2), 421–428.
- (87) Kondratov, R. V.; Komarov, P. G.; Becker, Y.; Ewenson, A.; Gudkov, A. V. Small Molecules That Dramatically Alter Multidrug Resistance Phenotype by Modulating the Substrate Specificity of P-Glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, 98 (24), 14078–14083.
- (88) Cole, S. P. C.; Bhardwaj, G.; Gerlach, J. H.; Mackie, J. E.; Grant, C. E.; Almquist, K. C.; Stewart, A. J.; Kurz, E. U.; Duncan, A. M. V.; Deeley, R. G.

- Overexpression of a Transporter Gene in a Multidrug-Resistant Human Lung Cancer Cell Line. *Science* **1992**, 258, 1650–1654.
- (89) Sodani, K.; Patel, A.; Kathawala, R. J.; Chen, Z.-S. Multidrug Resistance Associated Protein in Multidrug Resistance. *Chin. J. Cancer* **2012**, 31 (2), 58–73.
- (90) Slot, A. J.; Molinski, S. V.; Cole, S. P. C. Mammalian Multidrug-Resistance Proteins (MRPs). *Essays Biochem.* **2011**, 50, 179–207.
- (91) Mao, Q.; Cole, S. P. C.; Deeley, R. G.; Holzenburg, A.; Ford, R. C.; Rosenberg, M. F. The Structure of the Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1/ABCC1). *J. Biol. Chem.* **2002**, 276 (19), 16076–16082.
- (92) Cole, S. P. C. Targeting Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1, ABCC1): Past, Present, and Future. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2013**, 54 (1), 95–117.
- (93) Gao, M.; Cui, H. R.; Loe, D. W.; Grant, C. E.; Almquist, K. C.; Cole, S. P. C.; Deeley, R. G. Comparison of the Functional Characteristics of the Nucleotide Binding Domains of Multidrug Resistance Protein 1. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275 (17), 13098–13108.
- (94) Lee, J. Y.; Rosenbaum, D. M. Transporters Revealed. *Cell* **2017**, 168 (6), 951–953.
- (95) Nabekura, T.; Yamaki, T.; Ueno, K.; Kitagawa, S. Effects of Plant Sterols on Human Multidrug Transporters ABCB1 and ABCC1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, 369 (2), 363–368.
- (96) Sharom, F. J. ABC Multidrug Transporters: Structure, Function and Role in Chemoresistance. *Pharmacogenomics* **2008**, 9 (1), 105–127.
- (97) Louvard, D. Apical Membrane Aminopeptidase Appears at Site of Cell-Cell Contact in Cultured Kidney Epithelial Cells. *Cell Biol.* **1980**, 77 (7), 4132–4136.
- (98) Hansson, G. C.; Simons, K.; Van Meer, G.; Simons, K. Two Strains of the Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Cell Line Have Distinct Glycosphingolipid Compositions. *EMBO J.* **1986**, 5 (3), 483–489.
- (99) Pavek, P.; Merino, G.; Wagenaar, E.; Bolscher, E.; Novotna, M.; Jonker, J. W.; Schinkel, A. H. Human Breast Cancer Resistance Protein: Interactions with Steroid Drugs, Hormones, the Dietary Carcinogen 2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazo(4,5-b)Pyridine, and Transport of Cimetidine. *J. Pharmacol.*

- Exp. Ther.* **2005**, 312 (1), 144–152.
- (100) Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W. W.; Prasher, D. C. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science* **1994**, 263, 802–805.
- (101) Tucker, K. A.; Lilly, M. B.; Heck, L. J.; Rado, T. A. Characterization of a New Human Diploid Myeloid Leukemia Cell Line (PLB-985) With Granulocytic and Monocytic Differentiating Capacity. *Blood* **1987**, 70 (2), 372–378.
- (102) Ujhelly, O.; Ozvegy, C.; Várady, G.; Cervenak, J.; Homolya, L.; Grez, M.; Scheffer, G.; Roos, D.; Bates, S. E.; Váradi, A.; Sarkadi, B.; Németh, K. Application of a Human Multidrug Transporter (ABCG2) Variant as Selectable Marker in Gene Transfer to Progenitor Cells. *Hum. Gene Ther.* **2003**, 14 (4), 403–412.
- (103) Hamilton, T. C.; Young, R. C.; Ozols, R. F. Experimental Model Systems of Ovarian Cancer: Applications to the Design and Evaluation of New Treatment Approaches. *Sem. Oncol.* **1984**, 11, 285–298.
- (104) Brooks, S. C.; Locke, E. R.; Soule, H. D. Estrogen Receptor in a Human Cell Line (MCF-7) from Breast Carcinoma. *J. Biol. Chem.* **1973**, 248 (10), 6251–6253.
- (105) Nakagawa, M.; Schneider, E.; Dixon, K. H.; Horton, J.; Kelley, K.; Morrow, C.; Cowan, K. H. Reduced Intracellular Drug Accumulation in the Absence of P-Glycoprotein (Mdr1) Overexpression in Mitoxantrone-Resistant Human MCF-7 Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* **1992**, 52 (22), 6175–6181.
- (106) Slovak, M. L.; Ho, J. P.; Bhardwaj, G.; Human, H. A. R.; Lines, C.; Kurz, E. U.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. C. Localization of a Novel Multidrug Resistance-Associated Gene in the HT1080/DR4 and H69AR Human Tumor Cell Lines. *Cancer Res.* **1993**, No. 14, 3221–3225.
- (107) Lindl, T. *Zell- Und Gewebekultur*, Akademischer Verlag: Heidelberg-Berlin, 2002.
- (108) Arndt-Jovin, D. J.; Jovin, T. M. Analysis and Sorting of Living Cells According to Deoxyribonucleic Acid Content. *J. Histochem. Cytochem.* **1977**, 25 (7), 585–589.
- (109) Kiechle, F. L.; Zhang, X. Apoptosis: Biochemical Aspects and Clinical Implications. *Clin. Chim. Acta* **2002**, 326 (1–2), 27–45.
- (110) Shapiro, A. B.; Ling, V. Reconstitution of Drug Transport by Purified P-

- Glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270 (27), 16167–16175.
- (111) Müller, H.; Klinkhammer, W.; Globisch, C.; Kassack, M. U.; Pajeva, I. K.; Wiese, M. New Functional Assay of P-Glycoprotein Activity Using Hoechst 33342. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15 (23), 7470–7479.
- (112) Tawar, U.; Jain, A. K.; Chandra, R.; Singh, Y.; Dwarakanath, B. S.; Chaudhury, N. K.; Good, L.; Vibha Tandon. 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 (45), 13339–13346.
- (113) Shapiro, A. B.; Ling, V. Reconstitution of Drug Transport by Purified P-Glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 16167–16175.
- (114) Scharenberg, C. W.; Harkey, M. a; Torok-Storb, B.; Scharenberg, C. W.; Harkey, M. a; Torok-storb, B. The ABCG2 Transporter Is an Efficient Hoechst 33342 Efflux Pump and Is Preferentially Expressed by Immature Human Hematopoietic Progenitors. *Blood* **2002**, 99 (2), 507–512.
- (115) Hoelzl Wallach, D. F.; Surgenor, D. M.; Soderberg, J.; Delano, E. Preparation and Properties of 3,6-Dihydroxy-2,4-Bis- [ N,N ' -Di-(Carboxymethyl)-Aminomethyl]Fluoran. *Anal. Chem.* **1959**, 31 (3), 456–460.
- (116) Kepner, B. L.; Hercules, D. M. Fluorometric Determination of Calcium in Blood Serum. *Anal. Chem.* **1963**, 35 (9), 1238–1240.
- (117) Homolya, L.; Holló, Z.; Germann, U. A.; Pastan, I.; Gottesman, M. M.; Sarkadi, B. Fluorescent Cellular Indicators Are Extruded by the Multidrug Resistance Protein. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268 (29), 21493–21496.
- (118) Essodaigui, M.; Broxterman, H. J.; Garnier-Suillerot, A. Kinetic Analysis of Calcein and Calcein–Acetoxymethylester Efflux Mediated by the Multidrug Resistance Protein and P-Glycoprotein. *Biochemistry* **1998**, 37, 2243–2250.
- (119) Tiberghien, F.; Loo, F. Ranking of P-Glycoprotein Substrates and Inhibitors by a Calcein-AM Fluorometry Screening Assay. *Anticancer. Drugs* **1996**, 7 (5), 568–578.
- (120) Eneroth, A.; Åström, E.; Hoogstraate, J.; Schrenk, D.; Conrad, S.; Kauffmann, H.-M.; Gjellan, K. Evaluation of a Vincristine Resistant Caco-2 Cell Line for Use in a Calcein AM Extrusion Screening Assay for P-Glycoprotein Interaction. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, 12 (3), 205–214.
- (121) Dittrich, W. M.; Göhde, W. H. Flow-Through Chamber for Photometers to

- Measure and Count Particles in a Dispersion Medium. 211,798, 1973.
- (122) Crosland-Taylor, P. J. A Device for Counting Small Particles Suspended in a Fluid through a Tube. *Nature* **1953**, 171 (4340), 37–38.
- (123) Macey, M. G. *Flow Cytometry - Principles and Applications*, 1st ed.; Human Press: Totowa, New Jersey, 2007.
- (124) Krasnovsky, A. A.; Neverov, K. V.; Egorov, S. Y.; Roeder, B.; Levald, T. Photophysical Studies of Pheophorbide A and Pheophytin A. Phosphorescence and Photosensitized Singlet Oxygen Luminescence. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **1990**, 5, 245–254.
- (125) Robey, R. R. W.; Steadman, K.; Polgar, O.; Morisaki, K.; Blayney, M.; Mistry, P.; Bates, S. E. Pheophorbide a Is a Specific Probe for ABCG2 Function and Inhibition. *Cancer Res.* **2004**, 64, 1242–1246.
- (126) 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. J. O.; Rosing, H.; Beijnen, J. H.; Schinkel, A. H. The Breast Cancer Resistance Protein Protects against a Major Chlorophyll-Derived Dietary Phototoxin and Protoporphyrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99 (24), 15649–15654.
- (127) Pal, P.; Zeng, H.; Durocher, G.; Girard, D.; Li, T.; Gupta, A. K.; Giasson, R.; Blanchard, L.; Gaboury, L.; Balassy, A.; Turmel, C.; Laperrière, A.; Villeneuve, L. Phototoxicity of Some Bromine-Substituted Rhodamine Dyes: Synthesis, Photophysical Properties and Application as Photosensitizers. *Photochem. Photobiol.* **1996**, 63 (2), 161–168.
- (128) Johnson, L. V.; Walsh, M. L.; Chen, L. B. Localization of Mitochondria in Living Cells with Rhodamine 123. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1980**, 77 (2), 990–994.
- (129) Summerhayes, I. C.; Lampidis, T. J.; Bernal, S. D.; Nadakavukaren, J. J.; Nadakavukaren, K. K.; Shepherd, E. L.; Chen, L. B. Unusual Retention of Rhodamine 123 by Mitochondria in Muscle and Carcinoma Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1982**, 79 (17), 5292–5296.
- (130) Darzynkiewicz, Z.; Traganos, F.; Staiano-Coico, L.; Kapuscinski, J.; Melamed, M. R. Interaction of Rhodamine 123 with Living Cells Studied by Flow Cytometry. *Cancer Res.* **1982**, 42 (3), 799–806.
- (131) Minta, A.; Kao, J. P. Y.; Tsien, R. Y. Fluorescent Indicators for Cytosolic Calcium Based on Rhodamine and Fluorescein Chromophores. *J. Biol.*



- Chem.* **1989**, 264 (14), 8171–8178.
- (132) Molecular Probes. *Rhod Calcium Indicators*; 2010.
- (133) Molecular Probes. *Acetoxymethyl (AM) and Acetate Esters*; 2001.
- (134) Lebedeva, I.; Pande, P.; Patton, W. F. Processes and Kits for Determining Multi-Drug Resistance of Cells. WO 2011/139634 A1, May 3, 2013.
- (135) Lebedeva, I. V.; Pande, P.; Patton, W. F. Sensitive and Specific Fluorescent Probes for Functional Analysis of the Three Major Types of Mammalian ABC Transporters. *PLoS One* **2011**, 6 (7), e22429.
- (136) Martin, V. V.; Beierlein, M.; Morgan, J. L.; Rothe, A.; Gee, K. R. Novel Fluo-4 Analogs for Fluorescent Calcium Measurements. *Cell Calcium* **2004**, 36 (6), 509–514.
- (137) Engelhardt, J.; Knebel, W. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie. *Phys. unserer Zeit* **1993**, No. 2, 70–78.
- (138) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, 65 (1–2), 55–63.
- (139) Abbott, B. L.; Colapietro, A. M.; Barnes, Y.; Marini, F.; Andreeff, M.; Sorrentino, B. P. Low Levels of ABCG2 Expression in Adult AML Blast Samples. *Blood* **2002**, 100 (13), 4594–4601.
- (140) Ozvegy-Laczka, C.; Laczkó, R.; Hegedus, C.; Litman, T.; Várady, G.; Goda, K.; Hegedus, T.; Dokholyan, N. V.; Sorrentino, B. P.; Váradi, A.; 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 (38), 26059–26070.
- (141) Ozvegy-Laczka, C.; Várady, G.; Köblös, G.; Ujhelly, O.; Cervenak, J.; Schuetz, J. D.; Sorrentino, B. P.; Koomen, G.-J.; Váradi, A.; Németh, K.; 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 (6), 4219–4227.
- (142) BD Pharmingen. *Technical Data Sheet PerCP-Cy5.5 Mouse Anti-Human CD338*.
- (143) Pharmingen, B. *Technical Data Sheet PerCP-Cy 5.5 Mouse IgG2b, k Isotype Control*.
- (144) Vaughn, J. L. L.; Goodwin, R. H. H.; Tompkins, G. J. J.; McCawley, P. The

- Establishment of Two Cell Lines from the Insect Spodoptera Frugiperda (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* **1977**, 13 (4), 213–217.
- (145) O'Reilly, D. R.; Miller, L. K.; Luckow, V. A. *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*; Oxford University Press, 1992.
- (146) Thermo Scientific. *Pierce BCA Protein Assay Kit*.
- (147) Ambudkar, S. V. Drug-Stimulatable ATPase Activity in Crude Membranes of Human MDR1-Transfected Mammalian Cells. *Methods Enzymol.* **1998**, 292 (1996), 504–514.
- (148) Sarkadi, B.; Price, E. M.; Boucher, R. C.; Germann, U. a; Scarborough, G. a. Expression of the Human Multidrug Resistance CDNA in Insect Cells Generates a High Activity Drug Stimulated Membrane ATPase. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267 (7), 4854–4858.
- (149) Murphy, J.; Riley, J. P. A Modified Single Solution for the Determination of Phosphate in Natural Waters. *Anal. Chim. Acta* **1962**, 27, 31–36.
- (150) Senior, A. E.; Al-Shawi, M. K.; Urbatsch, I. L. The Catalytic Cycle of P-Glycoprotein. *FEBS Lett.* **1995**, 377 (3), 285–289.
- (151) Telbisz, A.; Müller, M.; Ozvegy-Laczka, C.; Homolya, L.; Szente, L.; Váradi, A.; Sarkadi, B. Membrane Cholesterol Selectively Modulates the Activity of the Human ABCG2 Multidrug Transporter. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, 1768 (11), 2698–2713.
- (152) Chifflet, S.; Torriglia, A.; Chiesa, R.; Tolosa, S. A Method for the Determination of Inorganic-Phosphate in the Presence of Labile Organic Phosphate and High-Concentrations of Protein: Application to Lens ATPases. *Anal. Biochem.* **1988**, 168 (1), 1–4.
- (153) Ambudkar, S. V. ATPase Activity in Crude Membranes of Human MDR1 Transfected Mammalian Cells. *Methods Enzymol.* **1998**, 292 (1996), 504–514.
- (154) Chemical Computing Group Inc. *MOE (Molecular Operating Environment)*; Montreal, Canada, 2014.
- (155) Labute, P.; Williams, C.; Feher, M.; Sourial, E.; Schmidt, J. M. Flexible Alignment of Small Molecules. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 1483–1490.
- (156) Motulsky, A.; Christopoulos, H. Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression - A Practical Guide to Curve Fitting. *Prism Man.* **2003**, 351.

- (157) AID 1818 - Summary of High-throughput multiplex screening for ABC transporter inhibitors.
- (158) Pick, A. *Funktionelle Untersuchungen Des ABC-Transporters Breast Cancer Resistance Protein (BCRP)*; Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2011.
- (159) AAT Bioquest. *Quest Rhod- 4<sup>TM</sup> Calcium Reagents and Screen Quest<sup>TM</sup> Rhod-4 NW Calcium Assay Kits Quest Rhod- 4<sup>TM</sup> Calcium Indicators , the Most Sensitive Red Fluorescent Calcium Probe*; 2012.
- (160) Schmitt, S. M. *Purines and 9-Deazapurines as Modulators of Multidrug Resistance-Associated Protein 1*; Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2017.
- (161) Ozvegy-Laczka, C.; Hegedus, T.; Várady, G.; Ujhelly, O.; Schuetz, J. D.; Váradi, A.; Kéri, G.; Orfi, L.; Németh, K.; Sarkadi, B. High-Affinity Interaction of Tyrosine Kinase Inhibitors with the ABCG2 Multidrug Transporter. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *65* (6), 1485–1495.
- (162) Goh, L. B.; Spears, K. J.; Yao, D.; Ayrton, A.; Morgan, P.; Roland Wolf, C.; Friedberg, T. Endogenous Drug Transporters in in Vitro and in Vivo Models for the Prediction of Drug Disposition in Man. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *64* (11), 1569–1578.
- (163) Brandt, R.; Keston, A. S. Synthesis of Diacetyldichlorofluorescein: A Stable for Fluorometric Analysis. *Anal. Biochem.* **1965**, No. 11, 6–9.
- (164) Rosenkranz, A. R.; Schmaldienst, S.; Stuhlmeier, K. M.; Chen, W.; Knapp, W.; Zlabinger, G. J. A Microplate Assay for the Detection of Oxidative Products Using 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetate. *J. Immunol. Methods* **1992**, *156* (1), 39–45.
- (165) Ohashi, T.; Mizutani, A.; Murakami, A.; Kojo, S.; Ishii, T.; Taketani, S. Rapid Oxidation of Dichlorodihydrofluorescein with Heme and Hemoproteins: Formation of the Fluorescein Is Independent of the Generation of Reactive Oxygen Species. *FEBS Lett.* **2002**, *511* (1–3), 21–27.
- (166) Wang, H.; Joseph, J. A. Quantifying Cellular Oxidative Stress by Dichlorofluorescein Assay Using Microplate Reader. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *27* (99), 612–616.
- (167) Molecular Probes. *Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Reagents*; 2006.

- (168) Cell Biolabs Inc. *OxiSelect™ Intracellular ROS Assay Kit (Green Fluorescence)*.
- (169) Prochazkova, J.; Kubala, L. L.; Kotasova, H.; Gudernova, I.; Sramkova, Z.; Pekarova, M.; Sarkadi, B. B.; Pachernik, J.; Procházková, J.; Kubala, L. L.; Kotasová, H.; Gudernová, I.; Šrámková, Z.; Pekarová, M.; Sarkadi, B. B.; Pacherník, J. ABC Transporters Affect the Detection of Intracellular Oxidants by Fluorescent Probes. *Free Radic. Res.* **2011**, *45* (7), 779–787.
- (170) Stahel, W. Residuen-Analyse  
<https://stat.ethz.ch/~stahel/courses/cheming/sl-resanal.ps>.
- (171) Godfrey, R.; Arora, D.; Bauer, R.; Stopp, S.; Müller, J. P.; Heinrich, T.; Böhmer, S. A.; Dagnell, M.; Schnetzke, U.; Scholl, S.; Östman, A.; Böhmer, F. D. Cell Transformation by FLT3 ITD in Acute Myeloid Leukemia Involves Oxidative Inactivation of the Tumor Suppressor Protein-Tyrosine Phosphatase DEP-1/ PTPRJ. *Blood* **2012**, *119* (19), 4499–4511.
- (172) Nieborowska-Skorska, M.; Kopinski, P. K.; Ray, R.; Hoser, G.; Ngaba, D.; Flis, S.; Cramer, K.; Reddy, M. M.; Koptyra, M.; Penserga, T.; Glodkowska-Mrowka, E.; Bolton, E.; Holyoake, T. L.; Eaves, C. J.; Cerny-Reiterer, S.; Valent, P.; Hochhaus, A.; Hughes, T. P.; Van Der Kuip, H.; Sattler, M.; Wiktor-Jedrzejczak, W.; Richardson, C.; Dorrance, A.; Stoklosa, T.; Williams, D. A.; Skorski, T. Rac2-MRC-CIII-Generated ROS Cause Genomic Instability in Chronic Myeloid Leukemia Stem Cells and Primitive Progenitors. *Blood* **2012**, *119* (18), 4253–4263.
- (173) Verchier, Y.; Lardy, B.; Nguyen, M. V. C.; Morel, F.; Arbault, S.; Amatore, C. Concerted Activities of Nitric Oxide Synthases and NADPH Oxidases in PLB-985 Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *361* (2), 493–498.
- (174) Clay, A. T.; Lu, P.; Sharom, F. J. Interaction of the P-Glycoprotein Multidrug Transporter with Sterols. *Biochemistry* **2015**, *54* (43), 6586–6597.
- (175) Gabelloni, M. L.; Sabbione, F.; Jancic, C.; Bass, J. F.; Keitelman, I.; Iula, L.; Oleastro, M.; Geffner, J. R.; Trevani, A. S. NADPH Oxidase Derived Reactive Oxygen Species Are Involved in Human Neutrophil IL-1 $\beta$  Secretion but Not in Inflammasome Activation. *Eur. J. Immunol.* **2013**, *43* (12), 3324–3335.
- (176) Tlili, A.; Dupré-Crochet, S.; Erard, M.; Nüsse, O. Kinetic Analysis of Phagosomal Production of Reactive Oxygen Species. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *50* (3), 438–447.

- (177) Sterz, K. *Funktionelle Untersuchung von Benzimidazolen Und Acridonsäureamiden Als Modulatoren Des ABC-Transporters ABCB1*; Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2012.
- (178) Gannon, M. K.; Holt, J. J.; Bennett, S. M.; Wetzell, B. R.; Loo, T. W.; Bartlett, M. C.; Clarke, D. M.; Sawada, G. A.; Higgins, J. W.; Tomblin, G.; Raub, T. J.; Detty, M. R. Rhodamine Inhibitors of P-Glycoprotein: An Amide/Thioamide “ Switch ” for ATPase Activity. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3328–3341.
- (179) Gibson, S. L.; Holt, J. J.; Ye, M.; Donnelly, D. J.; Ohulchanskyy, T. Y.; You, Y.; Detty, M. R. Structure–Activity Studies of Uptake and Phototoxicity with Heavy-Chalcogen Analogues of Tetramethylrosamine in Vitro in Chemosensitive and Multidrug-Resistant Cells. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13* (23), 6394–6403.
- (180) Perkin Elmer. *LS-50B User ’ s Guide*; 1999.
- (181) Strähle, H.; Seitz, W.; Güsten, H. Substituent Effects on the Fluorescence of 1,3-Diphenyl-2-Pyrazoline. *Zeitschrift für Naturforsch.* **1976**, *31*.
- (182) Latscha, H. P.; Klein, H. A. *Organische Chemie: Chemie-Basiswissen II*; Springer-Verlag, 1982.
- (183) Jacobs, A. *Expression, Aufreinigung Und Funktionelle Untersuchungen Der ABC-Transporter ABCB1 Und ABCG2*; Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2010.
- (184) Winter, E.; Lecerf-Schmidt, F.; Gozzi, G.; Peres, B.; Lightbody, M.; Gauthier, C.; Özvegy-Laczka, C.; Szakacs, G.; Sarkadi, B.; Creczynski-Pasa, T. B. T. B.; Boumendjel, A.; Di Pietro, A. Structure-Activity Relationships of Chromone Derivatives toward the Mechanism of Interaction with and Inhibition of Breast Cancer Resistance Protein ABCG2. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (24), 9849–9860.
- (185) Telbisz, Á.; Özvegy-Laczka, C.; Hegedűs, T.; Váradi, A.; Sarkadi, B. Effects of the Lipid Environment, Cholesterol and Bile Acids on the Function of the Purified and Reconstituted Human ABCG2 Protein. *Biochem. J.* **2013**, *450* (2), 387–395.
- (186) Hegedűs, C.; Telbisz, Á.; Hegedus, T.; Sarkadi, B.; Özvegy-Laczka, C. Lipid Regulation of the ABCB1 and ABCG2 Multidrug Transporters. *Adv. Cancer Res.* **2015**, *125*, 97–137.

- (187) Storch, C. H.; Eehalt, R.; Haefeli, W. E.; Weiss, J. Localization of the Human Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Lipid Rafts/Caveolae and Modulation of Its Activity by Cholesterol in Vitro. *J Pharmacol Exp Ther* **2007**, 323 (1), 257–264.
- (188) Sigma Aldrich. *BCRP-M TR ATPase Assay Protocol Cat.No.SBAT05*; 2007.
- (189) <https://www.spektrum.de/lexikon/physik/grenzflaechenspannung/6135>.
- (190) Atkins, P. W. *Physikalische Chemie*; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, 2006.
- (191) Moore, W. J. *Physikalische Chemie*; Walter de Gruyter: Berlin - New York, 1986.
- (192) Leuenberger, H. *Martin Physikalische Pharmazie*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2002.
- (193) Martin, A. *Physical Pharmacy*; Lippincott Williams & Wilkins, 1994.
- (194) Petersen, J.; Nguyen, J. Comparison of Absorbance and Fluorescence Methods for Determining Liquid Dispensing Precision. *J. Assoc. Lab. Autom.* **2005**, 10 (2), 82–87.
- (195) Lampinen, J.; Raitio, M.; Perälä, A.; Oranen, H.; Harinen, R. *Correction Method for Photometric DNA Quantification Assay*; 2012.
- (196) Cottingham, M. G.; Bain, C. D.; Vaux, D. J. T. Rapid Method for Measurement of Surface Tension in Multiwell Plates. *Lab. Investig.* **2004**, 84 (4), 523–529.
- (197) Bahri, M. A.; Hoebeke, M.; Grammenos, A.; Delanaye, L.; Vandewalle, N.; Seret, A. Investigation of SDS, DTAB and CTAB Micelle Microviscosities by Electron Spin Resonance. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2006**, 290 (1–3), 206–212.
- (198) Spindler, A.; Stefan, K.; Wiese, M. Synthesis and Investigation of Tetrahydro- $\beta$ -Carboline Derivatives as Inhibitors of the Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2). *J. Med. Chem.* **2016**, 59 (13), 6121–6135.
- (199) Krapf, M. K.; Gallus, J.; Vahdati, S.; Wiese, M. New Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) Containing a 2,4-Disubstituted Pyridopyrimidine Scaffold. *J. Med. Chem.* **2018**, 61 (8), 3389–3408.
- (200) Gozzi, G. J.; Bouaziz, Z.; Winter, E.; Daflon-Yunes, N.; Honorat, M.; Guragossian, N.; Marminon, C.; Glaucio, V.; Bollacke, A.; Guillon, J.; Pinaud, N.; Marchivie, M.; Cadena, S. M.; Jose, J.; Borgne, M. Le; Di Pietro, A.

- Phenolic Indeno [1,2-b]Indoles as ABCG2-Selective Potent and Non-Toxic Inhibitors Stimulating Basal ATPase Activity. *Drug Des. Devel. Ther.* **2015**, *9*, 3481–3495.
- (201) Shapiro, A. B.; Ling, V. Effect of Quercetin in Hoechst 33342 Transport by Purified and Reconstituted P-Glycoprotein. *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *53* (4), 587–596.
- (202) Szabó, K.; Welker, E.; Bakos, É.; Müller, M.; Roninson, I.; Váradi, A.; Sarkadi, B. Drug-Stimulated Nucleotide Trapping in the Human Multidrug Transporter MDR1. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (17), 10132–10138.
- (203) Özvegy, C.; Váradi, A.; Sarkadi, B. Characterization of Drug Transport, ATP Hydrolysis, and Nucleotide Trapping by the Human ABCG2 Multidrug Transporter. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (50), 47980–47990.
- (204) Moeller, A.; Lee, S. C.; Tao, H.; Speir, J. A.; Chang, G.; Urbatsch, I. L.; Potter, C. S.; Carragher, B.; Zhang, Q. Distinct Conformational Spectrum of Homologous Multidrug ABC Transporters. *Structure* **2015**, *23* (3), 450–460.
- (205) Hubensack, M.; Müller, C.; Höcherl, P.; Fellner, S.; Spruss, T.; Bernhardt, G.; Buschauer, A. Effect of the ABCB1 Modulators Elacridar and Tariquidar on the Distribution of Paclitaxel in Nude Mice. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2008**, *134* (5), 597–607.
- (206) De Bruin, M.; Miyake, K.; Litman, T.; Robey, R.; Bates, S. E. Reversal of Resistance by GF120918 in Cell Lines Expressing the ABC Half-Transporter, MXR. *Cancer Lett.* **1999**, *146* (2), 117–126.
- (207) Kannan, P.; Telu, S.; Shukla, S.; Ambudkar, S. V.; Pike, V. W.; Halldin, C.; Gottesman, M. M.; Innis, R. B.; Hall, M. D. The “Specific” P-Glycoprotein Inhibitor Tariquidar Is Also a Substrate and an Inhibitor for Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2). *ACS Chem. Neurosci.* **2011**, *2* (2), 82–89.
- (208) Steggemann, K. *Design Und Synthese Neuartiger Inhibitoren Für Den ABC-Transporter Breast Cancer Resistance Protein*; Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2011.
- (209) Jekerle, V. *Investigations of Combined Strategies to Reverse P-Glycoprotein- and BCRP-Mediated Multidrug Resistance in Human Ovarian Cancer Cells and Xenograft Tumors*; 2006.
- (210) Marighetti, F. *Investigation of a BCRP-Inhibitors Class Using QSAR and*

- Machine Learning Methods; Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2018.
- (211) Sievers, J. G. *Optimierung Der Aufreinigung Und Rekonstitution von Humanem P-Glykoprotein in S. Cerevisiae Zur Charakterisierung Neuer Modulatoren*; Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2007.
- (212) Müller, H. *Funktionelle Untersuchungen Des ABC-Transporters P-Glykoprotein*; Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2007.
- (213) Klinkhammer, W. *Design , Synthese Und 3D-QSAR Neuartiger P-Gp-Modulatoren*; Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2006.
- (214) Köhler, S. C. *Über ABCG2-Inhibitoren Mit Heteroaryl-Phenylamid- Und Carborancarboxamid-Grundstruktur*; Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2016.
- (215) Marighetti, F.; Steggemann, K.; Hanl, M.; Wiese, M. Synthesis and Quantitative Structure-Activity Relationships of Selective BCRP Inhibitors. *ChemMedChem* **2013**, 8 (1), 125–135.
- (216) Marighetti, F.; Steggemann, K.; Karbaum, M.; Wiese, M. Scaffold Identification of a New Class of Potent and Selective BCRP Inhibitors. *ChemMedChem* **2015**, 10 (4), 742–751.
- (217) Pick, A.; Klinkhammer, W.; Wiese, M. Specific Inhibitors of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP). *ChemMedChem* **2010**, 5 (9), 1498–1505.
- (218) Kühnle, M.; Egger, M.; Müller, C.; Mahringer, A.; Bernhardt, G.; Fricker, G.; König, B.; 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 (4), 1190–1197.
- (219) Li, X.-Q.; Wang, L.; Lei, Y.; Hu, T.; Zhang, F.; Cho, C.; To, K. K. W. W. Reversal of P-Gp and BCRP-Mediated MDR by Tariquidar Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 101, 560–572.
- (220) Pick, A.; Müller, H.; Wiese, M. Structure-Activity Relationships of New Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2). *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16 (17), 8224–8236.
- (221) Pajeva, I. K.; Wiese, M. Structure–Activity Relationships of Tariquidar



- Analogs as Multidrug Resistance Modulators. *AAPS J.* **2009**, *11* (3), 435–444.
- (222) Boumendjel, A.; Macalou, S.; Ahmed-Belkacem, A.; Blanc, M.; Di Pietro, A. Acridone Derivatives: Design, Synthesis, and Inhibition of Breast Cancer Resistance Protein ABCG2. *Bioorganic Med. Chem.* **2007**, *15* (8), 2892–2897.
- (223) Arnaud, O.; Boumendjel, A.; Gze, A.; Honorat, M.; Matera, E. L.; Guitton, J.; Stein, W. D.; Bates, S. E.; Falson, P.; Dumontet, C.; Di Pietro, A.; Payen, L. The Acridone Derivative MBLI-87 Sensitizes Breast Cancer Resistance Protein-Expressing Xenografts to Irinotecan. *Eur. J. Cancer* **2011**, *47* (4), 640–648.
- (224) Meyer, J. *Untersuchung Der Protein/Substrat-Interaktion an Rekombinantem P-Glykoprotein*; Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2008.
- (225) Loo, T. W.; Bartlett, M. C.; Detty, M. R.; Clarke, D. M. The ATPase Activity of the P-Glycoprotein Drug Pump Is Highly Activated When the N-Terminal and Central Regions of the Nucleotide-Binding Domains Are Linked Closely Together. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (32), 26806–26816.
- (226) Kühnle, M.; Egger, M.; Müller, C.; Mahringer, A.; Bernhardt, G. G.; Fricker, G.; König, B.; Buschauer, A.; Kühnle, M.; Egger, M.; Müller, C.; Mahringer, A.; Bernhardt, G. G.; Fricker, G.; König, B.; 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* (4), 1190–1197.
- (227) Möllmann, L. *Benzimidazol-Analoga Als Modulatoren von ABC-Transportern*; Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2011.
- (228) Bircsak, K. M.; Richardson, J. R.; Aleksunes, L. M. Inhibition of Human MDR1 and BCRP Transporter ATPase Activity by Organochlorine and Pyrethroid Insecticides. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2013**, *27* (2), 157–164.
- (229) Köhler, S. C.; Silbermann, K.; Wiese, M. Phenyltetrazolyl-Phenylamides: Substituent Impact on Modulation Capability and Selectivity toward the Efflux Protein ABCG2 and Investigation of Interaction with the Transporter. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *124*, 881–895.

- (230) Müller-Tidow, C.; Krug, U.; Brunnberg, U. Tyrosinkinase Als Ziele Neuer Onkologischer Therapien. *Dtsch. Arztebl.* **2007**, *104* (19), 1312–1320.
- (231) Wu, P.; Nielsen, T. E.; Clausen, M. H. FDA-Approved Small-Molecule Kinase Inhibitors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36* (7), 422–439.
- (232) Arora, A.; Scholar, E. M. Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315* (3), 971–979.
- (233) Wang, X.-K.; Fu, L.-W. Interaction of Tyrosine Kinase Inhibitors with the MDR-Related ABC Transporter Proteins. *Curr. Drug Metab.* **2010**, *11* (7), 618–628.
- (234) Brózik, A.; Hegedüs, C.; Erdei, Z.; Hegedüs, T.; Özvegy-Laczka, C.; Szakács, G.; Sarkadi, B. Tyrosine Kinase Inhibitors as Modulators of ATP Binding Cassette Multidrug Transporters: Substrates, Chemosensitizers or Inducers of Acquired Multidrug Resistance? *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2011**, *7* (5), 623–642.
- (235) Zhang, J.; Yang, P. L.; Gray, N. S. Targeting Cancer with Small Molecule Kinase Inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9* (1), 28–39.
- (236) Chen, Y.-J.; Huang, W.-C.; Wei, Y.-L.; Hsu, S.-C.; Yuan, P.; Lin, H. Y.; Wistuba, I. I.; Lee, J. J.; Yen, C.-J.; Su, W.-C.; Chang, K.-Y.; Chang, W.-C.; Chou, T.-C.; Chou, C.-K.; Tsai, C.-H.; Hung, M.-C. Elevated BCRP/ABCG2 Expression Confers Acquired Resistance to Gefitinib in Wild-Type EGFR-Expressing Cells<sup>1</sup>. *PLoS One* **2011**, *6* (6), e21428.
- (237) Shukla, S.; Chen, Z. S.; Ambudkar, S. V. Tyrosine Kinase Inhibitors as Modulators of ABC Transporter-Mediated Drug Resistance. *Drug Resist. Updat.* **2012**, *15* (1–2), 70–80.
- (238) Noguchi, K.; Katayama, K.; Sugimoto, Y. Human ABC Transporter ABCG2/BCRP Expression in Chemoresistance: Basic and Clinical Perspectives for Molecular Cancer Therapeutics. *Pharmacogenomics. Pers. Med.* **2014**, *7*, 53–64.
- (239) Shukla, S.; Robey, R. W.; Bates, S. E.; Ambudkar, S. V. Sunitinib (Sutent, SU11248), a Small-Molecule Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Blocks Function of the ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters P-Glycoprotein (ABCB1) and ABCG2. *Drug Metab. Dispos.* **2009**, *37* (2), 359–365.

- (240) Pennati, M.; Zuco, V.; Gatti, L.; Beretta, G. L.; Cassinelli, G. Overcoming ABC Transporter-Mediated Multidrug Resistance: The Dual Role of Tyrosine Kinase Inhibitors as Multitargeting Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *142*, 271–289.
- (241) Hu, S.; Chen, Z.; Franke, R.; Orwick, S.; Zhao, M.; Rudek, M. A.; Sparreboom, A.; Baker, S. D. Interaction of the Multikinase Inhibitors Sorafenib and Sunitinib with Solute Carriers and ATP-Binding Cassette Transporters. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15* (19), 6062–6069.
- (242) Hegedüs, C.; Truta-Feles, K.; Antalffy, G.; Várady, G.; Németh, K.; Ozvegy-Laczka, C.; Kéri, G.; Orfi, L.; Szakács, G.; Settleman, J.; Váradi, A.; Sarkadi, B. Interaction of the EGFR Inhibitors Gefitinib, Vandetanib, Pelitinib and Neratinib with the ABCG2 Multidrug Transporter: Implications for the Emergence and Reversal of Cancer Drug Resistance. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *84* (3), 260–267.
- (243) Elkind, N. B.; Szentpétery, Z.; Apáti, Á.; Ujhelly, O.; Szabo, K. Multidrug Transporter ABCG2 Prevents Tumor Cell Death Induced by the Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Iressa (ZD1839 , Gefitinib) Multidrug Transporter ABCG2 Prevents Tumor Cell Death Induced. *Cancer Res.* **2005**, 1770–1777.
- (244) Hegedus, C.; Ozvegy-Laczka, C.; Apáti, a; Magócsi, M.; Németh, K.; Orfi, L.; Kéri, G.; Katona, M.; Takáts, Z.; Váradi, a; Szakács, G.; Sarkadi, B. Interaction of Nilotinib, Dasatinib and Bosutinib with ABCB1 and ABCG2: Implications for Altered Anti-Cancer Effects and Pharmacological Properties. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *158* (4), 1153–1164.
- (245) Krapf, M. *Investigation of Quinazoline Derivates as Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2)*; Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2017.
- (246) Yang, C.; Huang, C.; Yang, C.; Chu, Y.; Cheng, A.; Whang-peng, J.; Yang, P. Gefitinib Reverses Chemotherapy Resistance in Gefitinib-Insensitive Multidrug Resistant Cancer Cells Expressing ATP-Binding Cassette Family Protein. *Cancer Res.* **2005**, *65* (15), 6943–6950.
- (247) Dai, C. ling; Liang, Y. ju; Wang, Y. sheng; Tiwari, A. K.; Yan, Y. yan; Wang, F.; Chen, Z. sheng; Tong, X. zhen; Fu, L. wu. Sensitization of ABCG2-Overexpressing Cells to Conventional Chemotherapeutic Agent by Sunitinib

Was Associated with Inhibiting the Function of ABCG2. *Cancer Lett.* **2009**, 279 (1), 74–83.

- (248) Pick, A.; Wiese, M. Tyrosine Kinase Inhibitors Influence ABCG2 Expression in EGFR-Positive MDCK BCRP Cells via the PI3K/Akt Signaling Pathway. *ChemMedChem* **2012**, 7 (4), 650–662.

## 7 Veröffentlichungen

### Wissenschaftliche Originalarbeiten

Marighetti F, Steggemann K, Karbaum M, Wiese M. Scaffold Identification of a New Class of Potent and Selective BCRP Inhibitors. *ChemMedChem* **10**, 742-751 (2015). <https://doi.org/10.1002/cmdc.201402498>

### Kongressbeiträge

M. Karbaum, F. Marighetti, M. Wiese: Diverse Effects of Structurally Related Tariquidar Analogues on ATPase Activity of ABCG2. *European Conference on Therapeutic Targets and Medicinal Chemistry*, Münster, 2015 (Poster)

M. Karbaum, T. Ross, M. Wiese: New Fluorescence based assay for multidrug resistance related ABC-transporters. *FEBS Meeting*, Innsbruck, 2014 (Poster)