

**Synthese, Charakterisierung und biologische
Evaluation von MDR-modulierenden und
antibakteriellen Wirkstoffen mit 1,4-Dihydropyridin-
bzw. 9,10-Dihydroacridin-Grundstruktur**

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

- Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn David Kreutzer

Verteidigungsdatum: 20.12.2023

Gutachter:

1. Prof. Dr. Andreas Hilgeroth

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Wolfgang-Langenbeck-Str. 4, 06120 Halle (Saale)

2. Prof. Dr. Christoph Ritter

Universität Greifswald, Friedrich-Ludwig-Jahn-Str. 17, 17489 Greifswald

3. Prof. Dr. Sonja Keßler

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Wolfgang-Langenbeck-Str. 4, 06120 Halle (Saale)

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VII
1. EINLEITUNG	1
2. GRUNDLAGEN	3
2.1 MULTIDRUG RESISTANCE	3
2.2. ANTIBIOTIKARESISTENZ	6
2.3. ATP-BINDING-CASSETTE TRANSPORTER (ABC-TRANSPORTER)	10
2.3.1. P-GLYKOPROTEIN (P-GP)	21
2.3.2. MRP1 (ABCC1, GS-X PUMPE)	32
2.3.3. MRP2 (ABCC2, cMOAT)	35
2.4 RESISTANCE-NODULATION-CELL DIVISION EFFLUXPUMPEN (RND-EFFLUXPUMPEN)	37
3. ZIELSTELLUNG DIESER ARBEIT	44
4. SYNTHESE UND ANALYTISCHE UNTERSUCHUNG DER VERBINDUNGEN	46
4.1 SYNTHESE DER 3-SUBSTITUIERTEN 1,4-DIHYDROPYRIDINE	46
4.1.1 N-ALKYLIERUNG VON NIKOTINSÄUREETHYLESTER	47
4.1.2 ARYLATION DER N-BENZYLPIRIDINIUM VERBINDUNGEN	49
4.2 SYNTHESE DER 9,10-DIHYDROACRIDINE	56
4.2.1 N-ALKYLIERUNG VON ACRIDIN	57
4.2.2 ARYLATION DER N-BENZYLACRIDINIUM VERBINDUNGEN	59
4.3 CHARAKTERISIERUNG DER SYNTHETISIERTEN VERBINDUNGEN	64
5 BIOANALYTISCHE EVALUIERUNG DER NEUARTIGEN MDR-MODULIERENDEN UND ANTIBAKTERIELLEN WIRKSTOFFE	73
5.1 BIOLOGISCHE EVALUIERUNG DER 1,4-DIHYDROPYRIDINE	73
5.1.1 BESTIMMUNG DER P-GP TRANSPORTERAFFINITÄT DER 1,4-DIHYDROPYRIDINE MITTELS FLUORESCENZ-UPTAKE-ASSAY	73
5.1.2 BESTIMMUNG DES POTENTIALS DER P-GP INHIBIERENDEN 1,4-DIHYDROPYRIDINE ZUR RESISTENZÜBERWINDUNG MITTELS MTT-ASSAY	80

Inhaltsverzeichnis

5.1.3	BESTIMMUNG DER ZYTOTOXISCHEN WIRKUNG DER P-GP INHIBIERENDEN 1,4-DIHYDROPYRIDINE MITTELS MTT-ASSAY	84
5.1.4	BESTIMMUNG DER MRP-1 UND MRP-2 TRANSPORTERAFFINITÄT MITTELS FLUORESZENZ-UPTAKE-ASSAY	85
5.2	BIOLOGISCHE EVALUIERUNG DER 9,10-DIHYDROACRIDINE	92
5.2.1	BESTIMMUNG DER P-GP TRANSPORTERAFFINITÄT DER 9,10-DIHYDROACRIDINE MITTELS FLUORESZENZ-UPTAKE-ASSAY	92
5.2.2	BESTIMMUNG DER ZYTOTOXISCHEN UND ANTIPROLIFERATIVEN WIRKUNG DER P-GP INHIBIERENDEN 9,10-DIHYDROACRIDINE MITTELS MTT-ASSAY	96
5.2.3	BESTIMMUNG DES ANTIBAKTERIELLEN EFFEKTS DER 9,10-DIHYDROACRIDINE MIT HILFE DER MINIMALEN HEMM-KONZENTRATION (MIC)	98
5.2.4	BESTIMMUNG DER AKKUMULATION VON ETHIDIUMBROMID DER 9,10-DIHYDROACRIDINE MIT HILFE DES RELATIVEN FLUORESZENZINDEX (RFI)	105
5.2.5	BESTIMMUNG DER POTENZIERENDEN WIRKUNG DER 9,10-DIHYDROACRIDINE IN KOMBINATION MIT ANDEREN ANTIBIOTIKA	108
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	116
7	EXPERIMENTELLER TEIL	122
7.1	METHODEN UND MATERIALIEN	122
7.1.1	ALLGEMEINE METHODE	122
7.1.2	BIOLOGISCHE METHODEN	125
7.1.3	MATERIALIEN	134
7.2	SYNTHESE DER VERBINDUNGEN	140
7.2.1	ALLGEMEINE ARBEITSVORSCHRIFTEN	140
7.2.2	BESCHREIBUNG DER VERBINDUNGEN	142
	REFERENCES	191
	DANKSAGUNGEN	VIII
	LISTE DER VERÖFFENTLICHUNGEN	XIII
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	XV

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
ABC	ATP binding cassette
Acr	Acriflavine resistance protein
AcrAB-TolC	Acriflavine resistance protein-Tolerance colicin E1
ADP	Adenosindiphosphat
ALL	akute lymphatische Leukämie
AMP-PNP	Adenylyl-imidodiphosphate
AMR	antimikrobielle Resistenz
ANLL	akute nichtlymphatische Leukämie
AR	Antibiotikaresistenz
ARS	Antibiotika-Resistenz-Surveillance
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
CA-MRSA	"Community-acquired" MRSA
CFDA	5(6)-Carboxy-fluoresceindiacetat-acetoxymethylester
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CHO	Chinese Hamster Ovary
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration
cMOAT	canalicular multispecific organic anion transporter
CYP3A	Cytochrom P450 3A4
d	Dublett
DART	Deutschen Antibiotika-Resistenzstrategie
DBP	distal binding pocket
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS)
DTGS	deutერიertes Triglycinsulfat
EARS	European Antimicrobial Resistance Surveillance
EB	Ethidiumbromid
EPIs	Efflux pump inhibitors
eq	Äquivalent
ESBL	Extended Spectrum β -Lactamasen
FAR	Fluorescence Activity Ratio
FBS	fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarotspektrometer
GIT	Gastrointestinaltrakt
GLASS	Global Antimicrobial Resistance Surveillance System
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathione disulfide
GST	Glutathion-S-Transferase
H2-Rezeptor	Histaminrezeptor von Typ 2
HA-MRSA	"Hospital-acquired" MRSA
HIV	Humane Immundefizienz-Virus

Abkürzungsverzeichnis

HLB	hydrophilic-lipophilic-balance
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
LA-MRSA	"Livestock-associated" MRSA
LB	lysogeny broth
LTC ₄	Leukotriene C4
m	Multipllett
MarR	multiple antibiotic resistance regulator
MATE	Multidrug and Toxic Compound Extrusion
MDR	Multidrug Resistance bzw. Multiple Drug Resistance
MDR1	Multidrug-Resistance-Protein 1
MDR-TB	multiresistente Tuberkulosebakterien
MFP	Membranfusionsprotein
MFS	Major Facilitator Superfamily
MIC	minimale inhibitorische Konzentration
MRP1	Multidrug Resistance-Related (-Associated) Protein 1
MRP2	Multidrug Resistance-Related (-Associated) Protein 2
MRSA	Methicillin-resistente Staphylococcus aureus
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NBD	nukleotidbindende Domäne
NEM	N-Ethylmaleimid
OD	optische Dichte
OMF	outer membran factor
OMP	outer membran protein
ORSA	Oxacillin-resistenter Staphylococcus aureus
PAP	periplasmatisches Adaptorprotein
PAβN	Phenylalanin-Arginin-β-Naphthylamid
PBP	proximal binding pocket, Pencillin-bindendes Protein
PBS	phosphate-buffered saline
P-gp	P-Glykoprotein
ppm	parts per million
PPMO	Peptid-konjugiertes Phosphordiamidat Morpholino-Oligomer
q	Quartett
QSAR	quantitative structure-activity relationship
RFI	relativer Fluoreszenzindex
RKI	Robert-Koch-Instituts
RNA	Ribonukleinsäure
RND	Resistance-Nodulation-Cell Division
SMR	Small Multidrug Resistance
t	Tripllett
THF	Tetrahydrofuran
TMD	transmembranäre Domäne
ToIC	Tolerance colicin E1
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
WHO	World Health Organization
XDR-TB	extrem resistente Tuberkulosebakterien

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht verschiedene Mechanismen von Zellen um MDR zu gewährleisten	4
Abbildung 2: Übersicht „Vacuum cleaner-Modell“ und „Flippase-Modell“	12
Abbildung 3: Überblick über humane ABC-Transporter.	14
Abbildung 4: MsbA	15
Abbildung 5: BtuCD	15
Abbildung 6: ATP-switch Modell	17
Abbildung 7: alternierendes Modell	18
Abbildung 8: Schema ATP Hydrolyse und Trapping mit Vanadat von P-gp	19
Abbildung 9: Struktur von P-gp	25
Abbildung 10: 2D Struktur von P-gp.....	25
Abbildung 11: schematischer zweidimensionaler Aufbau von MRP-1	32
Abbildung 12: dreidimensionales Modell von Apo MRP-1	33
Abbildung 13: Kristallstruktur des AcrB/AcrZ Komplexes	39
Abbildung 14: Transportmechanismus von AcrABZ-TolC Effluxpumpe	40
Abbildung 15: schematischer Aufbau der RND Effluxpumpe AcrAB-TolC	42
Abbildung 16: Kristallstruktur des AcrAB(Z)-TolC Effluxpumpe	42
Abbildung 17: allgemeine Strukturformel der Zielverbindungen mit 1,4-Dihydropyridin Grundstruktur (links) und 9,10-Dihydroacridin Grundstruktur (rechts)	45
Abbildung 18: Darstellung N-Alkylierung von Nikotinsäureethylester	47
Abbildung 19: Resonanzstrukturen der Pyridiniumverbindung.....	48
Abbildung 20: Darstellung Arylation der N-Benzylpyridinium Verbindungen	50
Abbildung 21: vinyloge Carbamid-Funktion der 1,4-Dihydropyridine	52
Abbildung 22: Bootkonformation 1,4-Dihydropyridine	53
Abbildung 23: Darstellung N-Alkylierung von Acridin.....	57
Abbildung 24: Darstellung Arylation der N-Benzylacridinium Verbindungen	60
Abbildung 25: ¹ H-NMR Spektrum von DHP11.....	65
Abbildung 26: Ausschnitt ¹ H-NMR Spektrum von DHP16.....	67
Abbildung 27: Ausschnitt ¹ H-NMR Spektrum von DHA18.....	68
Abbildung 28: ¹ H-NMR Spektren von DHA12.....	69
Abbildung 29: ¹³ C-NMR Spektrum von DHA12.....	70
Abbildung 30: Ausschnitt DEPT Spektrum von DHA12	71
Abbildung 31: Ausschnitt 1 HMBC Spektrum von DHA12.....	71
Abbildung 32: Ausschnitt 2 HMBC Spektrum von DHA12.....	72
Abbildung 33: Ausschnitt HSQC Spektrum von DHA12.....	72
Abbildung 34: allgemeine Strukturformel der Zielverbindungen mit 1,4-Dihydropyridin Grundstruktur (links) und Verapamil (rechts).....	75
Abbildung 35: Umsetzung von MTT (gelb) zu Formazan (violett) mittels mitochondrialer Reduktasen.....	80
Abbildung 36: Resistenzüberwindung in L5178Ymdr Zellen mithilfe der synthetisierten 1,4- Dihydropyridin-Verbindungen und Verapamil.....	82
Abbildung 37: Reaktion CFDA zu CF	85
Abbildung 38: allgemeine Strukturformel der Zielverbindungen mit 1,4-Dihydropyridin Grundstruktur (links) und Probenecid (rechts).....	87

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 39: allgemeine Strukturformel der Zielverbindungen mit 9,10-Dihydroacridin Grundstruktur (links) und Verapamil (rechts)	93
Abbildung 40: allgemeine Strukturformel der Zielverbindungen mit 9,10-Dihydroacridin Grundstruktur.....	99
Abbildung 41: Strukturformel Ethidiumbromid	105
Abbildung 42: allgemeine Strukturformel der Zielverbindungen mit 9,10-Dihydroacridin Grundstruktur.....	109
Abbildung 43: allgemeine Strukturformel der Zielverbindungen mit 9,10-Dihydroacridin Grundstruktur.....	111

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht Effluxtransporter der ABC-Superfamilie	13
Tabelle 2: P-gp Substrate	27
Tabelle 3: P-gp Inhibitoren	29
Tabelle 4: MRP-1 Substrate	34
Tabelle 5: Substitutionsmuster N-Benzyl-Pyridiniumionen Verbindungen	47
Tabelle 6: Substitutionsmuster 1,4-Dihydropyridin Verbindungen	51
Tabelle 7: Substitutionsmuster N-Benzyl-Acriniumionen Verbindungen	58
Tabelle 8: Substitutionsmuster 9,10-Dihydroacridin Verbindungen	61
Tabelle 9: Ergebnisse durchflusszytometrischer Assay 1,4-Dihydropyridine P-gp	76
Tabelle 10: Ergebnisse Resistenzüberwindung 1,4-Dihydropyridine.....	82
Tabelle 11: BCA-Assay	86
Tabelle 12: Ergebnisse durchflusszytometrischer Assay 1,4-Dihydropyridine MRP-1/-2.....	88
Tabelle 13: Ergebnisse durchflusszytometrischer Assay 9,10-Dihydroacridine P-gp	94
Tabelle 14: Ergebnisse antiproliferativer Assay 9,10-Dihydroacridine	97
Tabelle 15: antibakterieller Effekt 9,10-Dihydroacridine.....	100
Tabelle 16: Ethidiumbromid-Akkumulation 9,10-Dihydroacridine (I).....	107
Tabelle 17: Ethidiumbromid-Akkumulation 9,10-Dihydroacridine (II).....	107
Tabelle 18: potenzierende Wirkung 9,10-Dihydroacridine <i>E. coli</i> AG100 und <i>E. coli</i> AG100 A (I) .	109
Tabelle 19: potenzierende Wirkung 9,10-Dihydroacridine <i>E. coli</i> AG100 und <i>E. coli</i> AG100 A (II) .	110
Tabelle 20: potenzierende Wirkung 9,10-Dihydroacridine <i>S. aureus</i> ATCC 25923 und <i>S. aureus</i> MRSA 272123 (I).....	112
Tabelle 21: potenzierende Wirkung 9,10-Dihydroacridine <i>S. aureus</i> ATCC 25923 und <i>S. aureus</i> MRSA 272123 (II).....	113

1. Einleitung

Verschiedene Krankheitsbilder weisen eine intrinsische bzw. erlernte Arzneimittelresistenz auf ¹. Zu diesen Krankheiten gehören u.a. Krebs, Malaria und bakterielle Infektionen ². Arzneimittelresistenzen stellen erhebliche Hürden bei der Behandlung dieser Krankheiten dar.

Unter dem Begriff Krebs versteht man eine umfangreiche Gruppe von Krankheiten, bei welcher ein unkontrolliertes Wachstum von Zellen auftritt und keine Homöostase zwischen Zellwachstum und Zelltod existiert. Durch Metastasierung können diese abnormalen Zellen sich in gesunde Gewebe und Organe ausbreiten und bösartige Tumore bilden. Weltweit gesehen ist Krebs nach Herzerkrankungen die zweithäufigste Todesursache und führt jedes Jahr zu circa 10 Millionen Toten ³. In Deutschland verstarben 2019 circa 230.000 Menschen an einer Krebserkrankung ⁴. Zu den häufigsten Krebsarten gehören die der Lunge, der Brustdrüse und des Kolons. Eine zielgerichtete und effektive Therapie von Tumorerkrankungen ist essentiell für das Überleben der Patienten.

Sowohl seit langem eingesetzte als auch neue Wirkstoffe in der Tumorthherapie besitzen das Problem der Resistenzentwicklung. Im Zuge einer Resistenzentwicklung können entartete Tumorzellen zur Sicherstellung ihres Überlebens u.a. transmembranäre Transporterproteine exprimieren, welche eine diverse Bandbreite an Substanzen wie z.B. Zytostatika aus den Zellen ausschleusen und dadurch einen Therapieerfolg entgegenwirken.

Neben Resistenzen gegenüber Zytostatika können auch Resistenzen gegenüber Antibiotika bei der Chemotherapie problematisch werden, da Antibiotika im Rahmen von Operationen und Chemotherapien prophylaktisch verwendet werden ⁵. Antibiotika-Resistenzen, welche sich im Laufe der vergangenen Jahrzehnte stetig zunehmend verbreitet haben, erschweren in Kombination mit dem Rückgang der Entwicklung neuartiger antibakterieller Wirkstoffe die Behandlung gängiger bakterieller Infektionen. Neben Antibiotika können auch Reserveantibiotika von Resistenzen betroffen sein ⁶.

Als eines ihrer zehn wichtigsten Ziele für das Jahr 2021 definierte die WHO die Erhaltung der Wirksamkeit antimikrobiell wirksamer Wirkstoffe, um weiterhin Infektionskrankheiten erfolgreich bekämpfen zu können ⁷. Ebenfalls können bei der Behandlung bakterieller Infektionen vergleichbar mit der Tumorthherapie durch die gesteigerte Expressierung von Transportern Resistenzen gegenüber Antibiotika entstehen.

Die neuen Erkenntnisse und das Wissen über die Entstehung bzw. Behandlung von Tumor- und Antibiotika-resistenten Erkrankungen führen dazu, dass die Bedeutung von Modulatoren, welche die Wirkung von Zytostatika und Antibiotika steigern bzw. wiederherstellen können, sowie von

Einleitung

neuartigen antibakteriell wirksamen Wirkstoffen an Relevanz für die Verbesserung der Therapieeffizienz gewinnt. Zusätzlich sind für die Zukunft auch Wirkstoffe, welche in Kombination mit Antibiotika deren Wirkung potenzieren können, von besonderem Interesse bei der Erhaltung der Wirksamkeit von bereits etablierten Antibiotika.

In der vorliegenden Arbeit geben die nachfolgenden Kapitel eine kurze Einführung in die Thematik Multidrug Resistance sowie Antibiotikaresistenz. Im Anschluss werden detailliert die Transporterproteine P-gp, MRP-1, MRP-2 und AcrAB-TolC besprochen, welche eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Resistenzen bei Krebs- bzw. Bakterienzellen spielen.

2. Grundlagen

2.1 Multidrug Resistance

MDR, die Abkürzung für „Multidrug Resistance“ bzw. „Multiple Drug Resistance“, ist ein häufig auftretendes Phänomen bei der Behandlung von Krebserkrankungen und bakteriellen Infektionen und kann in vielen Fällen zum Therapieversagen führen⁸. MDR lässt sich z.B. bei Tumorzellen beobachten, welche mittels unterschiedlicher Mechanismen eine Resistenz ggü. strukturell verschiedenen Zytostatika entwickeln können⁹. Aus diesem Grund ist auch eine Erhöhung der Dosis oder eine Kombination mehrerer antineoplastischer Wirkstoffe mit unterschiedlichen Wirkmechanismen bei der Umgehung dieser pleiotropen Kreuzresistenz nicht zielführend und verursacht somit ein relevantes Problem in der klinischen Praxis⁹⁻¹¹.

Mehrere Mechanismen, die zur Resistenzentwicklung beitragen, werden im Folgenden beschrieben. Man unterscheidet im Allgemeinen in zelluläre und nicht-zelluläre Resistenzmechanismen.

Der nicht-zelluläre Mechanismus ist abhängig von den physiologisch veränderten Eigenschaften in der Umgebung von soliden Tumoren, wie z.B. die verminderte Angio- und Vaskulogenese bei Tumoren, wodurch sich im Resultat eine verminderte Diffusions- und Aufnahmefähigkeit für Zytostatika aus dem Gefäßsystem in Krebszellen ergibt und somit die zytotoxische Wirkung ausbleibt¹². Zwischen dem interstitiellen Kompartiment von Tumorgewebe und normalen Gewebe gibt es diverse Unterschiede: z.B. die Größe des Interstitiums, der hohe hydrostatische Flüssigkeitsdruck im Interstitium und das Fehlen eines arbeitsfähigen lymphatischen Systems. Diese stellen zusätzliche Hindernisse in der Zytostatikatherapie dar¹³. Auch eine an der Plasmamembran vorhandene veränderte pH-Wert Differenz, verursacht durch das saure Milieu infolge des Vorhandenseins von hypoxischen Gewebes, kann den Transport von Anthracyclinen (wie z.B. Daunorubicin) in das Innere einer Krebszelle beeinträchtigen¹⁴.

Zu den zellulären Resistenzmechanismen zählt u.a. die veränderte Aktivität von Enzymen wie der Glutathion-S-Transferase (GST) oder der Topoisomerase. Eine Konjugation von Glutathion, katalysiert durch die Glutathion-S-Transferase, mit einem antineoplastischen Wirkstoff ergibt während der Biotransformation eine polare Verbindung, welche im Verlauf der Exkretion aus der Zelle translokalisiert werden kann. In resistenten Krebszelllinien konnten erhöhte Expressionsraten von GST bestimmt werden^{15,16}. Zytostatika, welche einen der beiden Typen der Topoisomerase als Zielenzym haben, können in resistenten Zelllinien durch eine vorliegende Unterexpression von Topoisomerase oder durch Genmutationen bei Topoisomerase keine

therapeutische Wirkung mehr vollbringen, obwohl sie in einer therapeutischen Konzentration in der Zelle vorliegen^{12,17}.

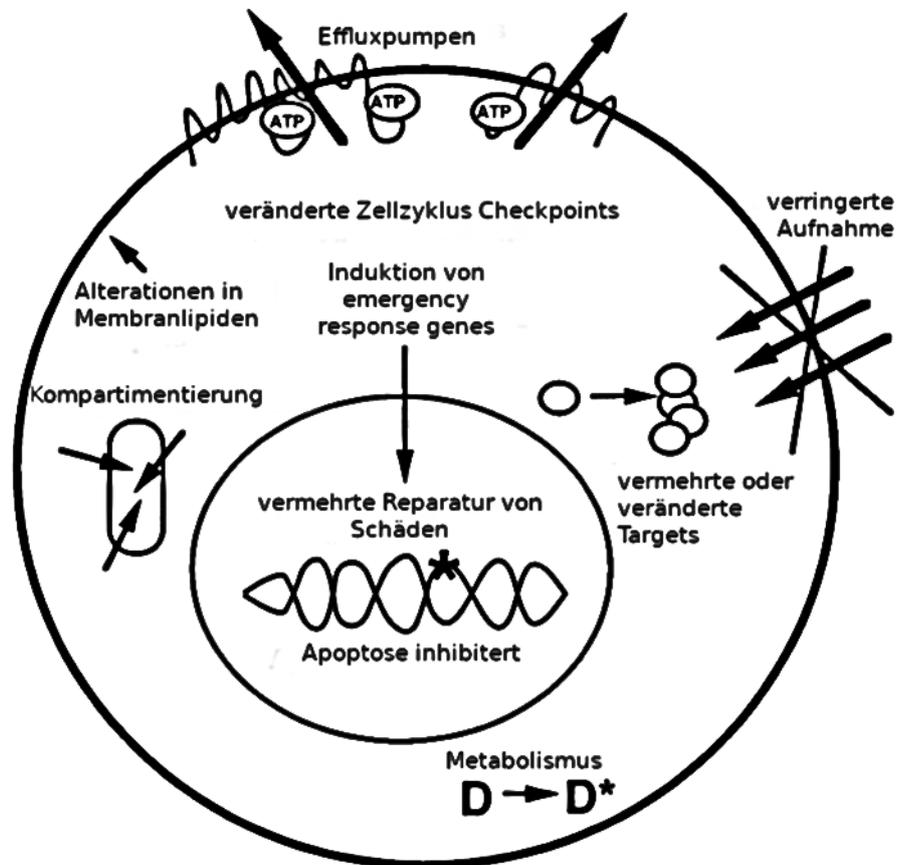


Abbildung 1: Übersicht verschiedene Mechanismen von Zellen um MDR zu gewährleisten, modifiziert nach¹⁸

Weitere zelluläre Mechanismen sind u.a. die erhöhte Metabolisierung von Zytostatika, welche Substrate von Cytochrom P450-Systemen sind, die erhöhte DNA-Reparaturaktivität nach Arzneistoff-induzierter Beschädigung, veränderte Expression von Zielproteinen und reduzierte Apoptose durch Veränderungen im Signalweg der Apoptose^{19,20}. Ebenfalls konnte mithilfe von Mitoxantron in resistenten Tumorzellen gezeigt werden, dass durch eine erhöhte Vesikelsynthese und Kompartimentierung eine Resistenz ggü. einen zytostatisch aktiven Stoff ausgebildet werden kann²¹. Diese genannten Resistenzmechanismen werden auch als nicht klassische bzw. nicht transportbasierte Mechanismen bezeichnet. Als einer der wichtigsten zellulären Resistenzmechanismen gehört die Überexpression von Effluxproteinen wie ABC-Transportern in Krebszellmembranen, welche auch als klassische bzw. transportbasierte Resistenzmechanismen bezeichnet werden und im Rahmen dieser Arbeit im Detail diskutiert werden. Abbildung 1 zeigt

Grundlagen

eine Übersicht von verschiedenen Resistenzmechanismen, welche von einer Krebszelllinie ausgebildet werden können.

2.2. Antibiotikaresistenz

Neben dem Auftreten von Resistenzen bei der Anwendung von zytostatisch wirksamen Arzneimitteln im Zuge der onkologischen Behandlung gibt es auch bei der Therapie von bakteriellen Infektionen mit Antibiotika ein ansteigendes Erscheinen von Resistenzen, verbunden mit einem gesteigerten Therapieversagen und eine dadurch erhöhte Mortalität. Anstelle des Begriffs „Antibiotikaresistenz (AR)“ wird häufig auch von „antimikrobieller Resistenz (AMR)“ gesprochen, welche zusätzlich zu der Resistenz ggü. Antibiotika auch Resistenzen ggü. anderen antimikrobiellen Arzneimitteln wie Virostatika beinhaltet. Die WHO (World Health Organization) zählt Mehrfachresistenzen gegen Antibiotika zu einer weltweit zunehmenden Bedrohung für die Prävention und Behandlung von Infektionen und als eine der dreizehn größten Herausforderungen dieser Dekade ²². Für das Jahr 2015 konnte mithilfe von Daten des „European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)“ circa 670.000 durch Antibiotika-resistente Bakterien verursachte Infektionen in Europa zugeordnet werden, welche zu knapp 30.000 Toden führte ²³. Das nationale Surveillancesystem, welches der flächendeckenden Sammlung und Analyse von Antibiotikaresistenz-bezogenen Daten in Deutschland dient, ist die „Antibiotika-Resistenz-Surveillance (ARS)“ des Robert-Koch-Instituts (RKI), international ist es das „Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS)“ der WHO. Im Jahr 2015 hat die Bundesregierung mit der „Deutschen Antibiotika-Resistenzstrategie (DART 2020)“ einen Plan erarbeitet, mit welchem die Entstehung von Antibiotikaresistenzen präventiv bekämpft und eingedämmt werden soll ²⁴. Teil der Strategie ist u.a. die Förderung des „One-Health-Ansatzes“, welcher die verschiedenen Beteiligten der Sektoren Humanmedizin, Veterinärmedizin und Umweltwissenschaften zur gemeinsamen Zusammenarbeit vereint, um die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen zu vermindern ²⁴. Ein weiterer wichtiger Bestandteil zur Verhinderung von antimikrobiellen Resistenzen ist das sog. „Antimicrobial Stewardship“, welches als oberstes Ziel den verantwortungsbewussten und optimierten Einsatz bei der Antibiotikatherapie für die verschiedenen beteiligten Akteure, wie z.B. Ärzte, Patienten, pharmazeutische Industrie oder Gesetzesgeber, verfolgt ²⁵. Auf internationaler Ebene wurde im Jahr 2015 von u.a. der WHO der „Global Action Plan on Antimicrobial Resistance“ definiert ²⁶. Dieser Plan umfasst ebenfalls eine angemessene und optimierte Verwendung von Antibiotika bei der Behandlung von Infektionskrankheiten sowie die Förderung der Entwicklung neuer antibakterieller Arzneistoffe ²⁶. Es gibt diverse Faktoren, welche eine geringe Empfindlichkeit bzw. eine Resistenz gegen antimikrobielle Verbindungen begünstigen und ermöglichen: übermäßiger Gebrauch und metaphylaktische Anwendung von Antibiotika bei Tieren in der Lebensmittelproduktion, unangemessene Verschreibung von Antibiotika bei bspw. viralen Infektionen, unzulässige

Verwendung von Breitspektrum- bzw. Reserveantibiotika, mangelhafte Compliance des Patienten uvm.²⁷. Ein Beispiel für die Problematik der übermäßigen Verwendung von Antibiotika im landwirtschaftlichen Rahmen ist das in der Nutztierhaltung bzw. Veterinärmedizin eingesetzte und beim Menschen als Reserveantibiotikum für multiresistente gramnegative Infektionen verwendete Colistin (auch Polymixin E), da Bakterien durch Transfer die für die Colistin-Resistenz nötigen *mcr*-Gene austauschen können, wodurch eine erfolgreiche Behandlung von multiresistenten Erregern erheblich erschwert wird⁶. Die übermäßige Verwendung von Colistin führt aktuell zu einer weitreichenden globalen Entwicklung von Resistenzen gegenüber diesem Reserveantibiotikum²⁸.

Bei den Resistenzmechanismen, welche Bakterien gegen Antibiotika entwickeln können, unterscheidet man grundsätzlich zwischen intrinsischen bzw. natürlichen und erworbenen Resistenzen^{1,29,30}. Intrinsische Resistenzen begründen sich auf die natürlich gegebenen Charakteristika von Mikroorganismen, z.B. die strukturellen Unterschiede von grampositiven bzw. -negativen Bakterien, welche die Membranpermeabilität von Antibiotika beeinflussen, oder die basale Expression von Transporterproteinen. Ein Beispiel hierfür ist Vancomycin, welches unwirksam bei durch gramnegative Bakterien verursachten Infektionen ist, da es nicht deren äußere Membran durchdringen kann¹. Eine erlernte Resistenz entsteht durch Mutationen in der DNA von Bakterien, welche den jeweiligen Bakterien einen Überlebensvorteil gegenüber antimikrobiell wirksamen Pharmaka gibt. Diese Mutationen können zu einer erhöhten Expression von Effluxpumpen oder von inaktivierenden bzw. modifizierenden Enzymen, z.B. β -Lactamasen oder Acetyltransferasen, führen. Resistenzgene können durch Plasmidtransfer von einer Bakterienspezies in entweder dieselbe oder in eine andere Spezies horizontal übertragen werden. Auch ein verstärkter Metabolismus von Antibiotika oder eine veränderte Zielstruktur für Antibiotika, z.B. DNA-Gyrase und Topoisomerase IV als Angriffsziel von Fluorchinolonen, können zu einer Entstehung von Resistenzen beisteuern³¹. Für das bereits erwähnte Colistin konnte in manchen gramnegativen Bakterien eine gesteigerte Produktion von Kapselpolysacchariden als Resistenzmechanismus festgestellt werden²⁸. Die Kapselpolysaccharide schirmen die Bindungsseiten, mit welchen das Polymyxin interagiert, ab, wodurch eine antibakterielle Wirkung verhindert wird³².

Folgende Transporter Superfamilien sind an dem Efflux von Antibiotika bzw. Toxinen und der Entstehung der MDR von Bakterien verantwortlich: ABC Familie, MFS („Major Facilitator Superfamily“), SMR („Small Multidrug Resistance“) Familie, RND (Resistance-Nodulation-Cell Division) Familie und MATE („Multidrug and Toxic Compound Extrusion“) Familie³³. Als einer der ersten identifizierten bakteriellen MDR Transporter, welcher zu der Familie der ABC Transporter gehört, gilt *LMR*A, ein Strukturhomologon des humanen MDR1³⁴. Weitere Beispiele für bakterielle

MDR Transporter sind AcrB (Mitglied der RND Familie), EmrE (Mitglied der SMR Familie), NorM (Mitglied der MATE Familie) und EmrD (Mitglied der MFS) ^{35,36}. Die Überexpression von Transporterproteinen kann zu einer Zunahme der MIC (minimale inhibitorische Konzentration) eines Antibiotikums oder mehrerer Antibiotika führen ³⁷. Effluxpumpen erfüllen für den jeweiligen Mikroorganismus auch physiologische Funktionen wie die Translokation von Galle oder Hormonen aus den Bakterienzellen heraus ³⁷.

Bekannte MDR Organismen sind ESBL-Gene (Extended Spectrum β -Lactamasen) besitzende Bakterienspezies wie *E. coli* oder *Klebsiella pneumoniae*, Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE), Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin-resistente MRSA und multiresistente bzw. extensiv resistente Tuberkulosebakterien (MDR- bzw. XDR-TB) ³⁰.

Staphylococcus aureus ist ein klinisch relevanter grampositiver Erreger, welcher im Menschen zu Haut- und Weichgewebsinfektionen sowie Fremdkörper-assoziierten Infektionen (z.B. an Gefäßkathetern und Gelenkprothesen), Osteomyelitis, Sepsis und Organabszedierungen führen kann ³⁸. *S. aureus* kann eine Resistenz gegenüber dem β -Lactamantibiotikum Methicillin und häufig im gleichen Zuge eine Multiresistenz gegen andere Antibiotika wie Aminoglykoside, Makrolide, Tetracycline, etc. in seltenen Fällen auch gegen Vancomycin, ausbilden, genannt MRSA (bzw. Vancomycin resistente MRSA) ³⁶. MRSA wurde das erste Mal im Jahr 1963 beschrieben ³⁹ und ist in vielen Fällen der Auslöser von nosokomialen, also im Krankenhaus erworbenen Infektionen und nur schwer therapierbar, da die Anzahl einsetzbarer Antibiotika gegen MRSA begrenzt ist. Den Umstand erschwerend kommt eine zurückgefahrenere Forschung und Entwicklung neuer Antibiotika hinzu. Neben der Abkürzung MRSA ist auch die Abkürzung ORSA („Oxacillin-resistenter *Staphylococcus aureus*“) geläufig. Generell kann man drei Varianten von MRSA unterscheiden: HA-MRSA („Hospital-acquired“ MRSA), welcher in Krankenhäusern und anderen medizinischen Einrichtungen auftritt, CA-MRSA („Community-acquired“ MRSA), welcher abseits von Krankenhäusern auftritt, und LA-MRSA („Livestock-associated“ MRSA), welcher bei der Nutztierhaltung erscheint. MRSA erhält seine β -Lactamresistenz durch das Gen *mecA*, welches PBP2A, eine abgewandelte Form des Penicillin-bindenden Proteins (PBP), codiert ^{40,41}. β -Lactamantibiotika besitzen nur eine geringe Bindungsaffinität für PBP2A, wodurch es zu einem Wirkungsverlust für die jeweiligen Antibiotika und zu einer Resistenzbildung für den Erreger kommt ³¹. Für die Therapie von MRSA werden Teicoplanin, Daptomycin, Ceftarolin, Linezolid und Vancomycin eingesetzt ³⁸. Vor einigen Jahren konnte auch für das zyklische Peptidantibiotikum Lugdunin, welches von *Staphylococcus lugdunensis* produziert wird, eine antimikrobielle Wirksamkeit bei durch *Staphylococcus aureus* und MRSA verursachten Infektionen beobachtet werden ^{42,43}. Weitere neue unspezifische Antiinfektiva mit dem Anwendungsgebiet MRSA, welche sich noch in der klinischen Entwicklung (ab Phase III) befinden, kurz vor der Zulassung stehen oder

Grundlagen

noch nicht vermarktet sind (Stand: 03/2020), sind die Fluorchinolone Delafloxacin, Zabofloxacin und Lascufloxacin, das Aminoglykosid Plazomicin, das Glykopeptid Cefilavancin, das Oxazolidinon Contezolid, der Dihydrofolat-Reduktase-Inhibitor Iclaprim, das Chinolon Nemonoxacin und das Tetracyclin-Analogon Omadacyclin ⁴⁴. Spezifisch gegen *Staphylococcus aureus* und MRSA einsetzbare Wirkstoffe, welche sich aktuell noch in der klinischen Entwicklung (ab Phase II) befinden (Stand: 03/2020), sind die monoklonalen Antikörper Tosatoxumab und Suvratoxumab sowie die Phagenlysine Exebacase und N-Rephasin ⁴⁴.

Neben dem Anwendungsgebiet MRSA gibt es auch weitere sich in der Pipeline befindliche bzw. bereits zugelassene Antibiotika (Stand: 08/2021), welche gegen andere bakterielle Erreger wirken ⁴⁵:

Wirkstoff	Klasse	Anwendungsgebiet	Status
Meropenem Vaborbactam	/ Carbapenem	Harnwegsinfektionen	Seit 2018 von EMA zugelassen
Cefiderocol	Cephalosporin	Sepsis, Harnwegsinfektionen	Seit 2020 von EMA zugelassen
Imipenem / Cilastatin + Relebactam	Carbapenem + β - Lactamase Inhibitor	Harnwegsinfektionen, Pneumonie	Seit 2020 von EMA zugelassen
Solithromycin	Makrolid	Pneumonie	Phase III
Sulopenem	Penem	Harnwegsinfektionen	Phase III
Ridinilazol	Niedermolekulares Antibiotikum	<i>Clostridium difficile</i> Infektion	Phase III
Sulbactam Diazabicycloctan	/ β -Lactam + β - Lactam-Inhibitor	Harnwegsinfektionen	Phase III

Um eine bestehende Antibiotikaresistenz zu überwinden, können neben MDR-Modulatoren, welche von Bakterienzellen exprimierte Effluxpumpen inhibieren, auch neuartige antibakterielle sowie potenzierende Wirkstoffe, welche in kombinierter Anwendung die Wirkung von Antibiotika wiederherstellen können und somit synergistisch wirken, verwendet werden.

Im Nachfolgenden werden die in dieser Arbeit relevanten Transporterproteine, welche in die MDR involviert sind, genauer beleuchtet.

2.3. ATP-Binding-Cassette Transporter (ABC-Transporter)

Im Jahr 1990 wurden erstmals Proteine, welche eine ATP-Bindungsdomäne (ATP: Adenosintriphosphat) besitzen, als ABC-Proteine bezeichnet ⁴⁶. Eine ältere Bezeichnung zur Beschreibung von ABC-Transportern ist der Begriff „Traffic ATPase“, der aufgrund der Kontrolle dieser Transporter über die Transportrichtung unter Verwendung von ATP als Energiequelle entstanden ist und unter anderem zur Unterscheidung von anderen Transportern wie Ionen ATPasen (z.B. Mg ATPase) dient ⁴⁷.

Die ABC-Transporter gehören zu einer der größten Superfamilien unter den Transportproteinen und sind weit verbreitet in verschiedenen Spezies wie Prokaryonten, Eukaryonten, Protozoen, Insekten, Pflanzen und Tieren ⁸. In eukaryontischen Zellen transportieren Proteine der ABC-Superfamilie eine große Bandbreite verschiedenster Substanzen (in Abhängigkeit ihrer physikochemischen Eigenschaften) mittels aktiven Transports gegen ein Konzentrationsgefälle über biologische Membranen hinweg (z.B. Zellmembranen, aber auch intrazelluläre Membranen von Organellen wie endoplasmatisches Retikulum, Peroxisomen und Mitochondrien) ⁴⁸. In bakteriellen Zellen erfolgt dieser Transport über die Cytoplasmamembran ⁴⁸. Mitglieder der humanen ABC-Transporter sind u.a. verantwortlich für die Multiple Drug Resistance und die Regulierung ATP-gesteuerter Ionenkanäle ⁴⁹. Die ABC-Transporter sind ebenfalls beteiligt an dem Transport von Lipiden und Cholesterol, der Antigenpräsentation sowie für die bei der Metabolisierung vermittelte Exkretion von Xenobiotika in Galle, Urin und Faeces (Phase-III Metabolismus) ^{49,50}.

Aufbau:

Der Prototyp eines ABC-Transporters besteht aus zwei transmembranären Domänen (TMDs) und zwei nukleotidbindenden Domänen. In bakteriellen Zellen sind diese vier Domänen in zwei oder vier einzelne Polypeptide untergliedert, in eukaryontischen Zellen sind die zwei TMDs und die zwei NBDs meist in einem Polypeptid vereint (sog. „Volltransporter“, TMD1 – NBD1 – TMD2 – NBD2), dessen N- und C-Terminus sich auf der cytoplasmatischen Seite der Membran befinden ⁴⁸.

Neben „Volltransportern“ gibt es auch „Halbtransporter“, welche aus einer TMD und einer NBD bestehen und mittels Homo- bzw. Heterodimerisierung einen funktionalen Transporter bilden ¹⁹.

Die TMDs sowie die NBDs weisen unterschiedliche strukturelle Eigenschaften sowie Funktionen auf.

Die TMDs durchziehen die Membran fünf- bis zehnmal (meist sechsmal) mit α -Helices und binden und transportieren die Substrate ¹⁹.

Die hochkonservierte ATP-Bindungsdomäne, welche auch als nukleotidbindende Domäne, kurz NBD, bezeichnet wird, ist das namensgebende Charakteristikum der ABC-Transporter⁵¹. Die NBDs gewährleisten durch die Bindung und Hydrolyse von ATP zu ADP (ADP: Adenosindiphosphat) eine Konformationsänderung im Transporter und damit verbunden die Translokation von Substraten über Biomembranen⁵². Drei hochkonservierte Sequenzmotive sind in den NBDs aufzufinden, die Walker A- (auch: P-Loop) und Walker B-Motive sowie das Signatur-C-Motiv (auch: LSGGQ bzw. Linker-Peptid), welches charakteristisch für die ABC-Transporter ist und diese von anderen ATP-bindenden Proteinen unterscheidet^{48,52,53}. Die Walker A- und Walker B-Motive, welche ursprünglich von *Walker et. al* erforscht und nach jenem benannt wurden⁵⁴, sind von essentieller Bedeutung für die Bindung von Nucleotiden¹¹, eine Mutation in dieser Region kann zu einem Verlust der ATPase Aktivität führen⁵⁵.

Mittels Crosslinking-Studien mit P-gp konnte gezeigt werden, dass die beiden NBDs sich räumlich gegenüberstehen; genauer gesagt liegt dem Signatur-C-Motiv der einen NBD das Walker A-Motiv der anderen NBD gegenüber, et vice versa⁵⁶.

Efflux-Transport-Modelle:

Diverse Efflux-Transport-Modelle wurden entwickelt, um die Fähigkeit der ABC-Transporter, Stoffe aus Zellen auszuschleusen, näher zu charakterisieren. Eines der ersten Modelle war das „Porenmodell“ nach *Gerlach, Endicott et al.*, welche postulierten, dass die transmembranären Domänen einen Kanal bilden, durch welchen Stoffe mithilfe von ATP aus der Zelle herausbefördert werden können⁵⁷. Das „Vacuum cleaner-Modell“ wiederum besagt, dass hydrophobe Substrate aus dem Extrazellularraum unter Dehydratation in die Plasmamembran der Zelle verteilt werden und von dort aus mit den Substrat-Bindungsstellen der ABC-Transporter interagieren und zurück in den Extrazellularraum entlassen werden⁵⁸.

Im Gegensatz zum „Porenmodell“ werden die auszuschleusenden Substrate im „Vacuum cleaner-Modell“ nicht aus dem Zytoplasma der Zelle, sondern aus dem Inneren der Plasmamembran entfernt. Evidenz für diese Theorie wurde mithilfe eines Experiments erbracht, welches mithilfe von Resonanzenergietransfer-Untersuchungen und 5-[¹²⁵I]Iodonaphthalen-1-azid ([¹²⁵I]INA), welches membranständige Proteine spezifisch photomarkiert, zeigte, dass das P-gp Substrat und [¹²⁵I]INA-induzierende Doxorubicin vermehrt in der Plasmamembran in der Nähe von P-gp aufzufinden ist, nicht aber im Zellinneren⁵⁸. Eine weitere Untersuchung mit dem P-gp Substrat Hoechst 33342, welches bei Bindung an Membranen fluoresziert, belegte, dass P-gp Stoffe direkt aus der inneren Schicht der Lipiddoppelmembran aufnimmt und durch ATP-Bindung und – Hydrolyse in das wässrige extrazelluläre Medium translokalisiert^{59,60}. Voraussetzung für das „Vacuum cleaner-Modell“ ist die Hydratation des zu transportierenden, hydrophoben Substrates;

dies setzt wiederum voraus, dass die Bindungstasche des ABC-Transporters zugänglich für Wasser ist ⁶¹. Experimentelle Untersuchungen sprechen sowohl für den Wassereintritt in die Substrat-Bindungstasche ⁶¹ als auch dagegen ⁶².

Ein weiteres Modell zur Beschreibung des Effluxes von Stoffen ist das „Flippase-Modell“, bei welchem im Gegensatz zum „Vacuum cleaner-Modell“ die Substrate von den ABC-Transportern nicht in das extrazelluläre Medium, sondern in die äußere Schicht der Plasmamembran „flippen“, von wo aus sie sich in das wässrige Medium verteilen können ⁶³. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist der Transport zwischen der inneren und äußeren Schicht der Lipiddoppelmembran, welcher nicht mit der Hydrophobizität der zu transportierenden Stoffe korreliert ^{64,65}. Die Freisetzung in die äußere Membranschicht ist meist energetisch begünstigt, da für die Freisetzung in das extrazelluläre Medium eine Zufuhr von Energie für die Rehydratation des hydrophoben Substrats nötig ist ¹⁹. Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass sich das „Vacuum cleaner-Modell“ und das „Flippase-Modell“ nicht gegenseitig ausschließen. Abbildung Nr. 2 gibt eine Übersicht über die genannten Efflux-Transport-Modelle.

Loo, Clarke postulierten, dass Substrate von der Plasmamembran aus die Substrat-Bindungsstelle der ABC-Transporter mittels sog. „gates“, welche von den TMs, genauer TM5/8 und TM2/11, gebildet werden, erreichen ⁶⁶. Die Bindung von Stoffen erfolgt dabei nach einem sog. „induced-fit-Mechanismus“: die Interaktion zwischen Substrat und Bindungsstelle verursacht zahlreiche Verschiebungen, u.a. Rotationen und laterale Bewegungen, in den transmembranären Helices, wodurch sich die Bindungsstelle spezifisch dem Substrat anpasst und sich die „gates“ schließen ⁶⁷. Diese Hypothese ist eine Erklärung für die Tatsache, dass ABC-Transporter ein breites, chemisch und strukturell sehr unterschiedliches Spektrum an Substanzen transportieren können.

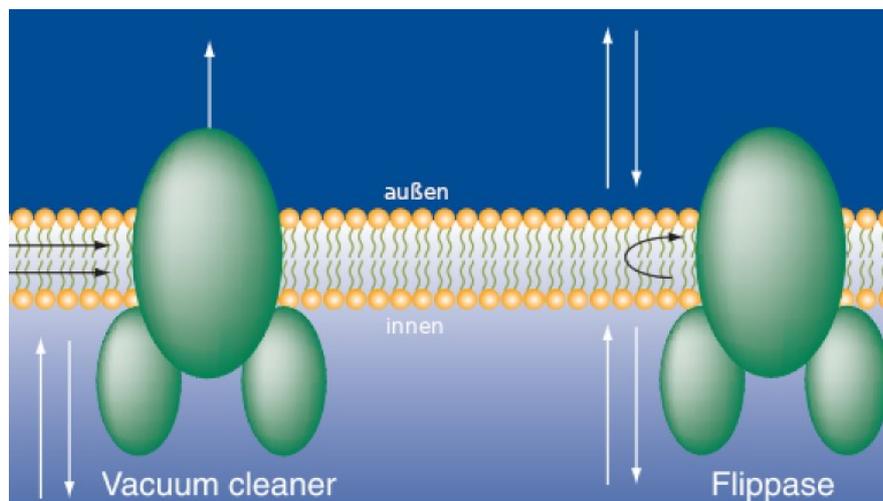


Abbildung 2: Übersicht „Vacuum cleaner-Modell“ und „Flippase-Modell“, modifiziert nach ⁴⁸

Vertreter:

Zu den bekanntesten Vertretern von ABC-Transportern, welche MDR in humanen Krebs vermitteln können, gehören P-Glykoprotein (P-gp, MDR1, ABCB1), MRP1 (ABCC1) und BCRP (ABCG2) ¹⁹. Tabelle Nr. 1 gibt eine Übersicht über die 49 vom menschlichen Genom codierbaren Effluxtransporter der ABC-Superfamilie, welche sich in sieben Unterfamilien unterteilen (ABCA bis ABCG) ^{53,68,69}:

Unterfamilie	ABC-Gene
ABCA	ABCA1, ABCA2, ABCA3, ABCA4, ABCA5, ABCA6, ABCA7, ABCA8, ABCA9, ABCA10, ABCA11, ABCA12, ABCA13
ABCB	ABCB1, ABCB2, ABCB3, ABCB4, ABCB5, ABCB6, ABCB7, ABCB8, ABCB9, ABCB10, ABCB11
ABCC	ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC5, ABCC6, CFTR, ABCC8, ABCC9, ABCC10, ABCC11, ABCC12
ABCD	ABCD1, ABCD2, ABCD3, ABCD4
ABCE	ABCE1
ABCF	ABCF1, ABCF2, ABCF3
ABCG	ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, ABCG8

Tabelle 1: Übersicht Effluxtransporter der ABC-Superfamilie ^{53,68,69}

In den Unterfamilien ABCD und ABCG besitzen die ABC-Transporter nur eine NBD und eine TMD und stellen somit sog. „Halbtransporter“ dar, welche erst durch Homo- bzw. Heterodimerisierung biologisch aktiv werden ⁵⁰. Ein Beispiel für einen ABC-Transporter mit drei TMDs ist MRP1, welcher extra eine N-terminale TMD mit fünf transmembranären (TM) Helices besitzt ¹⁹. Die ABCB Unterfamilie besitzt als einzige Unterfamilie der ATPasen sowohl „Halbtransporter“ als auch „Volltransporter“ ⁵³. Die ABCE und ABCF Unterfamilien sind aufgrund ihrer fehlenden TMDs keine Transporter, phylogenetisch betrachtet gruppieren sie sich dessen ungeachtet zu den anderen ABC-Genen ⁷⁰. Die folgende Abbildung gibt einen kurzen schematischen Überblick über humane ABC-Transporter und ihre strukturelle Diversität:

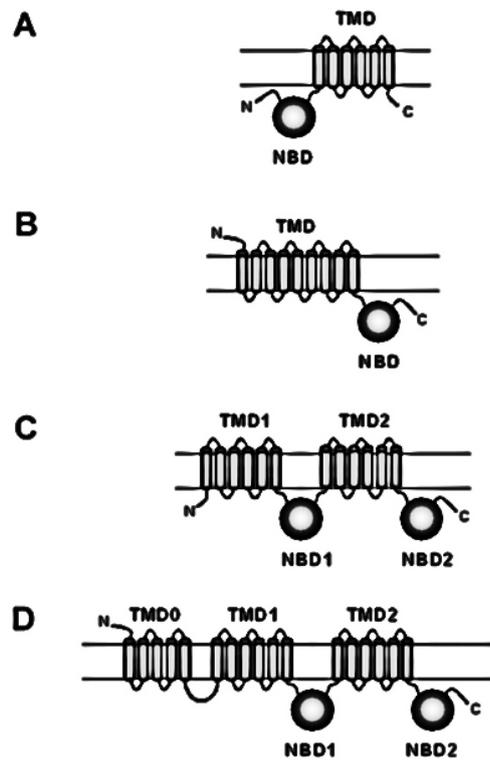


Abbildung 3: Überblick über humane ABC-Transporter. A und B zeigen Halbtransporter, welche durch Dimerisierung zu aktiven Transportern werden. Im Gegensatz dazu stellen C und D bereits aktive Transporter dar. C zeigt die Struktur von P-gp (TMD-1 – NBD-1 – TMD2 – NBD-2). D zeigt die Struktur von MRP-1/-2 (zusätzliche TMD0-Einheit). TMD: transmembranäre Domäne, NBD: Nukleotid-bindende Domäne. Modifiziert nach ¹¹

Kristallstrukturen von ABC-Transportern:

Erste hochauflösende Kristallstrukturen von intakten ABC-Transportern wurden im Jahre 2001 mithilfe eines Lipid A Transporters von *E. coli*, MsbA ⁷¹, und im Jahre 2002 mithilfe eines Vitamin B12 Transporters von *E. coli*, BtuCD ⁷², bestimmt. Die folgenden Abbildungen zeigen die Struktur der beiden ABC-Transporter:

Grundlagen

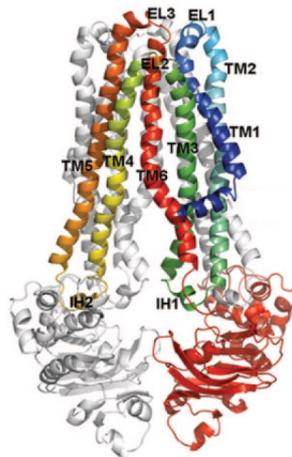


Abbildung 4: MsbA (TM: transmembranäre Helices, EL: extrazelluläre Loops, IH: intrazelluläre Helices), modifiziert nach ⁷¹

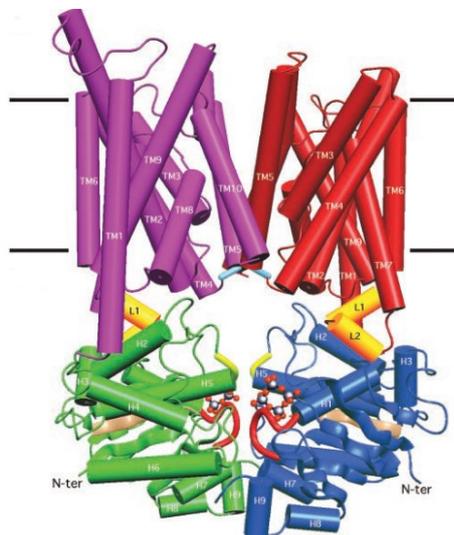


Abbildung 5: BtuCD (TM: transmembranäre Helices), modifiziert nach ⁷²

P-gp besitzt eine zweifache Pseudosymmetrieachse, siehe Abschnitt „Aufbau und Struktur“ unter „P-Glykoprotein (P-gp)“.

Transportzyklen von ABC-Transportern:

Die Analyse der Strukturen von Transporter gibt Rückschlüsse auf den Aufbau der Transporter der ATPase Familie und deren Funktionsweise bzw. Transportmechanismen. Im Folgenden werden kurz einige der Theorien über den katalytischen und ATP-abhängigen Transportzyklus von ABC-Transportern vorgestellt. Grundsätzlich kann man Modelle des katalytischen Zyklus in zwei Gruppen einteilen ⁷³: bei Modellen der ersten Gruppe durchlaufen die NBDs eine vollständige Separation, bei Modellen der zweiten Gruppe bleibt zumindest während des Zyklus eine nukleotidbindende Seite im ständigen Kontakt. Beispiele für Modelle der ersten Gruppe sind das

„ATP-switch“ Modell ⁷⁴ sowie das „tweezers-like“ Modell ⁷⁵ und das „processive clamp“ Modell ⁷⁶. Beispiele für Modelle der zweiten Gruppe sind das alternierende Modell ⁷⁷ und die daraus abgeleiteten Konzepte wie zum Beispiel das „constant contact“ Modell ⁷⁸, das „occluded nucleotide“ Modell ⁷⁹⁻⁸¹, das „twin-cylinder engine“ Modell ⁸² und das „reciprocating twin channel“ Modell ⁸³. Im Folgenden wird jeweils ein Vertreter der beiden Gruppen, namentlich das „ATP-switch“ Modell und das alternierende Modell, vorgestellt.

Higgins, Linton postulierten 2004 das sog. „ATP-switch“ Modell, welches den Transport von Substraten in vier Schritte unterteilt (sowohl für Importer als auch für Exporter gültig) ⁷⁴:

- Schritt I: Die Bindung von Substraten an die Bindungstasche der TMDs fördert die Bildung einer ATP-abhängigen geschlossenen Dimerkonformation der NBDs („head-to-tail“ Konformation)
- Schritt II: Die Bindung von zwei ATP-Molekülen führt zu einer geschlossenen (Sandwich-)Dimerbildung und zu der Freisetzung des zu transportierenden Substrats durch Verringerung der Affinität in der Substrat-bindenden Seite
- Schritt III: Hydrolyse von ATP zu ADP und Phosphat
- Schritt IV: Freisetzung von Phosphat und ADP und der damit verbundenen Dissoziation des NBD-Dimers (Wiederherstellung des Ausgangszustands)

Laut diesem Modell befinden sich die NBDs also entweder in einem voneinander getrennten oder in einem dimerisierten Zustand. Es wird zwischen einer nach innen und einer nach außen gerichteten Konformation der TMDs und zwischen einer offenen und einer geschlossenen Dimerform der NBDs umgeschaltet („geswitcht“). Zu Schritt IV sei angemerkt, dass Untersuchungen mit Vanadat an P-gp zeigen konnten, dass zuerst Phosphat, welches mit Vanadat um die Bildung des jeweiligen P-gp-MgADP-Komplexes konkurriert, und danach ADP freigesetzt wird ^{77,84}. Ebenso konnten Kristallstrukturuntersuchungen an stabilen ATP-Sandwich-Dimeren diese Vermutung bekräftigen ⁸⁴. Entscheidendes Detail des „ATP-switch“-Modells ist die Tatsache, dass die Substratfreisetzung aufgrund der Bindung (und nicht aufgrund der Hydrolyse) von ATP und anschließender Dimerisierung der NBDs erfolgt. Zweidimensionale Kristallstrukturuntersuchungen an P-gp mit einem nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogen (AMP-PNP) und „Trapping“ mit ADP/Vanadat bzw. mit monoklonalen MDR1-Antikörpern (UIC2) konnten u.a. zeigen, dass die ATP-Bindung während des ATPase-Zyklus sowohl die Affinität für Substrate in der Substrat-Bindungstasche verringert als auch Veränderungen in der Konformation der transmembranären Domänen hervorruft ⁸⁵. Folgende Abbildung zeigt einen schematischen Überblick von dem „ATP-switch“ Modell:

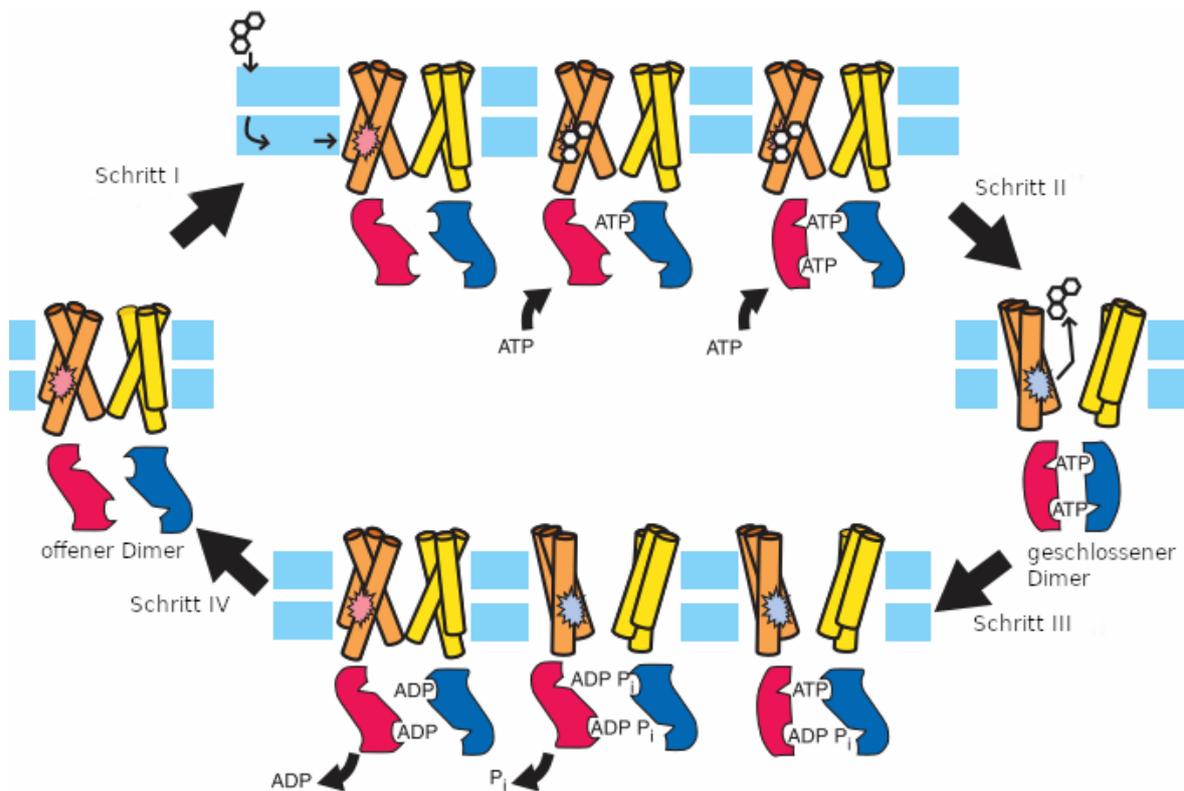


Abbildung 6: ATP-switch Modell (Erklärungen zu den einzelnen Schritten: siehe Text), modifiziert nach ⁷⁴

Vor dem „ATP-switch“-Modell wurde das alternierende Modell („alternating two-site mechanism“) von *Senior et al.* am Beispiel des P-gp ediert, bei welchem der entscheidende Punkt ist, dass für den Substrattransport nicht nur die Bindung von ATP, sondern zwingend die abwechselnde Hydrolyse von ATP an den ABC-Domänen notwendig ist ⁷⁷. Am Anfang liegt beim alternierenden Modell ein ATP beispielsweise gebunden an der NBD des C-Terminus vor ⁷⁷. Folgt nun eine Bindung von ATP an der NBD des N-Terminus, so kommt es zu der Hydrolyse des ATPs des C-Terminus zu ADP und Phosphat und damit verbunden zu einer Konformationsänderung ⁷⁷. Das zu translokalisierende Substrat, welches sich in der Bindungstasche befindet, wird durch die an die Konformationsänderung anschließende Relaxation von einer nach innen gerichteten und hoch-affinen Substrat-gebundenen Seite zu einer nach außen gerichteten und niedrig-affinen Substrat-freisetzenden Seite verschoben ⁷⁷. Konsekutiv werden Phosphat und darauffolgend ADP und Substrat freigesetzt ⁷⁷. An dieser Stelle ist der Zyklus vollendet und kann nun wieder von vorne beginnen, unter der Bedingung des alternierenden Mechanismus, dass nun Bindung von ATP am C-Terminus zu einer Hydrolyse von ATP am N-Terminus führt ⁷⁷. Das alternierende Modell entwickelte sich später weiter zum „hydrophobic vacuum cleaner-Modell“ ⁷³. Das in der

nachfolgenden Abbildung gezeigte Schema gibt einen Überblick über die asymmetrische Funktionsweise des alternierenden Modells:

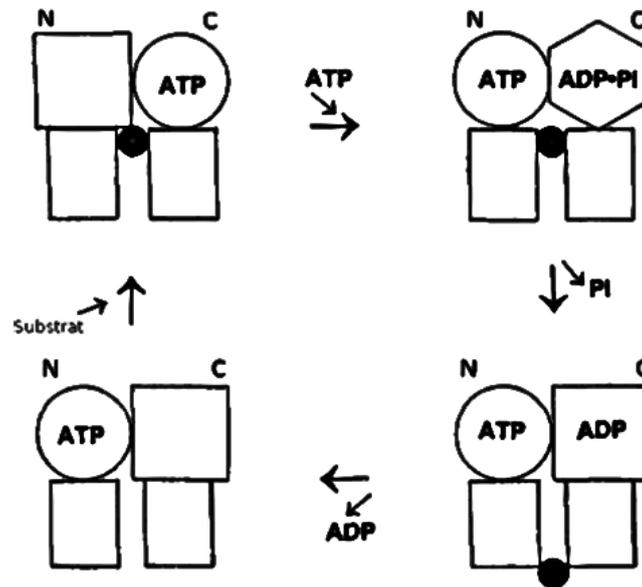


Abbildung 7: alternierendes Modell (TMDs werden durch die rechteckigen Formen und NBDs durch Kreise, Quadrate und Hexagone repräsentiert. Der ausgefüllte schwarze Kreis stellt das Substrat vor), modifiziert nach ⁷⁷

Eine erweiterte Betrachtung des alternierenden Modells wurde von *Al Shawi, Polar et. al.* im Jahr 2003 mittels thermodynamischer Untersuchungen formuliert ⁸⁶. In diesem Modell wird der Transportzyklus von ABC-Transportern am Beispiel des P-Glykoproteins in zwei mögliche Wege unterteilt: der eine Pfad ist der bereits von *Senior et. al.* bekannte Substrat-gebundene ATPase-aktive Zyklus, der andere Pfad ist der Substrat-ungebundene, basale ATPase-aktive Zyklus ^{77,86}. Beide Zyklen teilen sich einen gemeinsamen Ausgangszustand, in welchem ein ATP an einer NBD des P-gp gebunden ist und die zur extrazellulären Seite gelegene Substratbindungszone eine niedrige Affinität und die zur intrazellulären Seite gelegene Substratbindungszone eine hohe Affinität für das zu transportierende Substrat besitzen ⁸⁶. Der basale ATPase-aktive Zyklus erfolgt, wenn kein zu transportierendes Substrat bzw. dieses nur in geringer Konzentration vorliegt ⁸⁶. Bei geringen Substratkonzentrationen wird zufällig einer der beiden möglichen Zyklen durchgeführt ⁸⁶. Konzentrationsabhängig erfolgt bei hohen Substratkonzentrationen nur der Substrat-gebundene ATPase-aktive Zyklus ⁸⁶. In einem ersten Schritt wird beim basalen Zyklus ein zweites ATP an die NBD des P-gp gebunden ⁸⁶. Darauf folgend wird das bereits im Ausgangszustand vorliegende ATP hydrolysiert und Phosphat und ADP freigesetzt ⁸⁶. Um den am Anfang vorliegenden Ausgangszustand wieder herzustellen muss der basale Zyklus erneut

durchlaufen werden, da ATP an zwei unterschiedlichen NBDs binden kann ⁸⁶. Der Substratgekoppelte Weg verläuft wie bei *Senior et. al.* beschrieben (siehe Text oben) ⁷⁷.

Es gibt mehrere Belege für die Tatsache, dass die beiden nukleotidbindenden Domänen miteinander kooperieren müssen, um ATP zu binden bzw. zu hydrolysieren. Zum einen konnte mithilfe von NEM (N-Ethylmaleimid) ein Cystein-Rest von einer NBD kovalent modifiziert werden, wodurch die ATPase-Aktivität des gesamten ABC-Transporters unterbinden werden konnte ⁸⁷. Zum anderen konnte mithilfe von Punktmutationen in den Walker A- bzw. B-Motiven der NBDs von P-gp und „Trapping“ mit Vanadat und 8-Azido-ATP, einem für Photoaffinitätsmarkierung geeigneten ATP-Analogen, gezeigt werden, dass Mutation an einer NBD ATP-Hydrolyse an der anderen NBD verhindert und somit kein „Trapping“ mit Vanadat stattfinden kann, da Vanadat erst nach der Hydrolyse von ATP mit ADP und P-gp einen inhibierenden Komplex bilden kann, siehe nachfolgende Abbildung ^{88,89}.

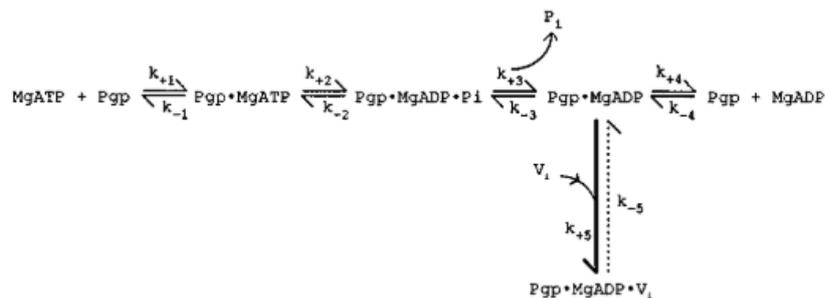


Abbildung 8: Schema ATP Hydrolyse und Trapping mit Vanadat von P-gp ⁹⁰

Es sind also beide NBDs notwendig, welche abhängig voneinander katalytische Prozesse durchführen können, um Nukleotide zu binden und Substrate zu transportieren.

Anzahl und Lokalisation der Bindungsstellen von ABC-Transportern:

ABC-Transporter interagieren mit verschiedensten Substraten bzw. Modulatoren über Bindungsstellen, welche sich in den TMDs befinden. Zahlreiche Untersuchungen befassen sich mit der Fragestellung, wie viele Bindungsstellen ABC-Transporter besitzen und wo genau diese in den TMDs lokalisiert sind. Eine eindeutige und definitive Beantwortung dieser Frage lässt sich aufgrund der unterschiedlichsten Ergebnisse diverser Publikationen nicht treffen. Eine genaue Kenntnis der Anzahl, Funktion und Lage der polyspezifischen Bindungsstellen gewährt ein besseres Verstehen über ABC-Transporter und deren Transportfähigkeit und ermöglicht eine effektivere Entwicklung von Zytostatika und MDR-Modulatoren.

Shapiro, Ling konnten 1997 mithilfe von P-gp-reichen inside-out Plasmamembranvesikeln und Fluoreszenzmessungen zwei verschiedene Bindungsstellen innerhalb des Proteins identifizieren, welche miteinander kooperieren und für den Substrattransport zuständig sind ⁹¹. Eine der Bindungsstellen wird als H-Seite bezeichnet, da diese bevorzugt mit Hoechst 33342 interagiert ⁹¹. Aufgrund der bevorzugten Wechselwirkung mit Rhodamin 123 wird die andere Bindungsstelle als R-Seite bezeichnet ⁹¹. In Anwesenheit von Hoechst 33342 wird der Transport von Rhodamin 123 stimuliert ⁹¹. Vice versa wird in Anwesenheit von Rhodamin 123 der Transport von Hoechst 33342 stimuliert, insgesamt kann also von einer positiven Kooperation zwischen den beiden Bindungsstellen gesprochen werden ⁹¹. Weitere Verbindungen, welche ebenfalls mit der H-Seite wechselwirken und somit mit Hoechst 33342 um die Bindung konkurrieren und Rhodamin 123 Transport stimulieren können, sind Hoechst 33258, Quercetin und Colchicin ⁹¹. Demgegenüber konkurrieren Daunorubicin, Doxorubicin und andere Anthracycline mit Rhodamin 123 um die Bindung an der R-Seite ⁹¹. Der Transport der beiden fluoreszierenden Farbstoffe Hoechst 33342 und Rhodamin 123 kann mithilfe von Vinblastin, Actinomycin D und Etoposid inhibiert werden, da diese Stoffe möglicherweise die gleiche Affinität für beide Bindungsstellen aufweisen oder mit überlappenden Bereichen der beiden Bindungsregionen interagieren ⁹¹.

Dieselben Autoren konnten wenig später eine dritte Bindungsstelle identifizieren, welche einen positiven allosterischen Effekt auf die Translokation von Stoffen an der H- und R-Seite besitzt ⁹². Die dritte Bindungsstelle interagiert mit Prazosin und Progesteron ⁹². Die gleichzeitige Anwesenheit von Rhodamin 123 und Progesteron bzw. Prazosin führt zu einem gesteigerten Transport von Hoechst 33342, verglichen mit der alleinigen Anwesenheit einer der beiden Verbindungen ⁹². Eine Kombination von Progesteron bzw. Prazosin und Hoechst 33342 führt zu einer Stimulation des Rhodamin 123 Transports, welche allerdings geringer ist als die Stimulation über die H-Seite alleine bzw. über die dritte Bindungsstelle alleine ⁹².

Neben der Anzahl der Bindungsstellen ist ebenfalls die Lokalisation der Bindungsstellen innerhalb des Proteins von Interesse. Je nach gewähltem P-gp Substrat konnten unterschiedliche Orte für die räumlich getrennten Bindungsstellen gefunden werden, u.a. die zentrale Kavität des P-gps, welche durch die TMDs im Inneren des Proteins gebildet wird ⁹³, oder die Schnittstelle zwischen TMDs und dem Lipidmilieu ⁹⁴. *Mittra, Pavy et. al.* postulieren, dass durch Konformationsänderungen innerhalb des P-gps die Substrate in Richtung zentraler Kavität verschoben werden und danach über die Translokationspore aus der Zelle geschleust werden ⁹⁴.

An dieser Stelle sei kurz erwähnt, dass anstelle einer bestimmten Anzahl von multispezifischen und räumlich voneinander getrennten Bindungsstellen das Vorhandensein einer einzelnen,

großen, flexiblen Bindungstasche diskutiert wird, welche ein oder zwei Substrate gleichzeitig mittels van der Waals Kräften, Wasserstoffbrückenbindungen, etc. binden und translokalisieren kann³⁵. Diese Bindungstasche müsste mehrere Elektronen-Donor/Akzeptor-Gruppen, geladene Gruppen und aromatische Gruppen besitzen, um eine möglichst große Vielfalt an Substraten binden zu können¹⁹. Mithilfe von Molekulardynamik-Simulationen konnte ein sog. „Bindungsgürtel“ und keine getrennten Bindungsstellen beobachtet werden⁹⁵.

Wie bereits im Abschnitt „Efflux-Transport Modelle“ erwähnt, kann die Existenz von mehreren Bindungsstellen auch mithilfe des „substrate-induced fit“ Mechanismus erklärt werden, bei welchem das Substrat nach dem Eintritt in die Bindungstasche sich selbst seine Bindungsstelle kreiert, indem es mit verschiedensten Bereichen von transmembranären Segmenten wechselwirkt⁹⁶. Voraussetzung für den „substrate-induced fit“ Mechanismus sind die flexiblen und mobilen transmembranären Segmente des ABC-Transporters⁹⁷. Unter Einsatz von Cystein-freien Mutanten von P-gp, in welche unter Einbau von Cystein-Resten Einzel-Cystein Mutanten erstellt worden sind, und Cross-linking Methoden konnte das Bestehen dieser nötigen Voraussetzung belegt werden^{67,97}.

Nach der Bindung des Substrates und des Hervorbringens einer eigenen Bindungsstelle würde das Substrat entsprechend dem „Vacuum cleaner-Modell“ bzw. dem „Flippase Modell“ in das extrazelluläre Medium bzw. in die äußere Membranschicht weitertransportiert werden.

2.3.1. P-Glykoprotein (P-gp)

Die Überexpression des MDR1-Gens ist ein wesentlicher Faktor in der Resistenzproblematik von Zytostatikatherapien, da es das Membranprotein P-gp kodiert⁹⁸. P-gp überexprimierende Krebszellen führen zu einer verringerten Konzentration von diversen Zytostatika innerhalb der Zellen und somit zu einer limitierten Effektivität einer Chemotherapie. P-gp ist ein Mitglied der Superfamilie der ABC-Transporter, die zuerst in Colchicin-resistenten (CH^R) CHO-Zellen („chinese hamster ovary cells“), welche eine Kreuzresistenz gegenüber einer breiten Anzahl verschiedenster Verbindungen aufzeigen, von *Juliano, Ling* charakterisiert wurden⁹⁹. Sie konnten eine Korrelation zwischen Expression des P-Glykoproteins auf der Oberfläche der Zellen und der Resistenz der Zellen gegenüber Colchicin aufweisen⁹⁹. Eine Ausnahme von dieser Korrelation konnte in CH^RS42HA Zellen gezeigt werden; diese Zellen besitzen nur eine geringe nachweisbare Menge von P-gp im Vergleich zu der vorhandenen Colchicin-Resistenz⁹⁹. Die Autoren vermuten, dass neben der P-gp Expression auch weitere Mechanismen für die Resistenz verantwortlich sein können⁹⁹. Das „P“ in P-Glykoprotein steht für Permeabilität und weist auf die verminderte zelluläre Permeabilität von Colchicin hin⁹⁹. Synonyme für P-gp sind ABCB1, MDR1, PGY1, P170 etc.

Es konnten mehrere signifikante Zusammenhänge zwischen P-gp Expression und MDR gefunden werden. Nach der Gabe von Doxorubicin als Perfusion bei Patienten mit Lungenmetastasen konnte innerhalb von 50 Minuten ein (durchschnittlich) 6,8-facher Anstieg des MDR1 RNA-Levels nachgewiesen werden ¹⁰⁰. Ebenfalls konnte bei einer Untersuchung von vielen verschiedenen resistenten Tumoren eine signifikante Assoziation mit einer hohen MDR1 Genexpressionen gefunden werden ¹⁰¹. Zur Bestimmung des Erfolgs bzw. des Misserfolgs einer Neuroblastom-Therapie wurden P-gp Expressionsraten miteinander verglichen, um eine Prognose vor Beginn der Behandlung treffen zu können ¹⁰². Es konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von P-gp mit einem Erfolg in der Therapie korreliert und die erhöhte Anwesenheit von P-gp das Scheitern einer Therapie begünstigt ¹⁰¹. Die Bestimmung des MDR1 RNA-Levels kann also ein wichtiger Parameter für die Konzeption einer individuellen und alternativen Chemotherapie bei bestimmten Tumorerkrankungen sein.

Lokalisation und Verteilung von P-gp:

Das Wissen über die genaue Lokalisation und Verteilung von P-gp im menschlichen Körper konnte mithilfe von immunohistochemischen Gewebeuntersuchungen mit dem monoklonalen Antikörper MRK16 erlangt werden ¹⁰³. Gefunden wurde P-gp u.a. in Zellen der Leber, des Jejunums und des Colons, der Niere und der Bauchspeicheldrüse ¹⁰³. Expression von P-gp konnte dort an apikalen Membranen von Epithelzellen detektiert werden ¹⁰³. Wahrscheinlich spielt P-gp hier eine wichtige Rolle bei Prozessen der Absorption im Intestinum, Verteilung im systemischen Kreislauf und Exkretion von Stoffen bzw. deren Metabolite in Galle und Urin ¹⁰³. Nicht auffindbar war P-gp u.a. in Zellen des Magen, der Lunge, der Milz und der Haut ¹⁰³. Weiterhin konnte P-gp in hohen Mengen in Lymphozyten ¹⁰⁴ und an der luminalen Membran von Endothelzellen der Kapillargefäßen im Gehirn als Teil der Blut-Hirn-Schranke geortet werden ^{105,106}. Weitere Blut-Gewebe-Barrieren, welche P-gp zum Schutze des jeweiligen Gewebes vor der intrazellulären Akkumulation von endo- bzw. exogenen Substanzen exprimieren, sind die Blut-Hoden-Schranke ¹⁰⁷, die Blut-Innenohr-Schranke ¹⁰⁸ sowie die sekretorischen Epithelzellen des Endometriums von Schwangeren ¹⁰⁹ und die Trophoblastenschicht der Plazenta ^{110,111}. Während einer Schwangerschaft ist die Expressionsrate von P-gp in der Plazenta zu Beginn am höchsten und nimmt im Verlauf der Schwangerschaft ab, wodurch auch der Schutz des Fötus vor körperfremden Stoffen abnimmt ¹¹².

Neben den natürlichen physiologischen Vorkommen von P-gp in menschlichen Organen und Geweben ist P-gp auch bei vielen Krebsarten erhöht exprimiert: Krebsarten des Gastrointestinaltrakts (Dünndarm, Dickdarm, Bauchspeicheldrüse, Leber), Krebsarten des hämatopoetischen Systems (Myelom, Lymphom, akute lymphatische bzw. nichtlymphatische

Leukämie bei Erwachsenen (ALL bzw. ANLL)) und Krebsarten des Urogenitalsystems (Niere, Eierstock, Hoden) ^{18,101}.

Abgesehen von der Lokalisation von P-gp an der zytoplasmatischen Membran liegt es auch in intrazellulären Membranen vor, genauer gesagt in nukleären Membranen ^{113,114} und in den Membranen von Vesikeln, z.B. Golgi-Vesikeln ¹¹⁵. An der Kernmembran dient P-gp mittels Effluxfunktion dem Schutz des Nukleus vor z.B. Zytostatika wie Anthracyclinen, welche die Zellteilung hemmen können. Bei P-gp exprimierenden Vesikeln werden die Arzneistoffe innerhalb der Vesikel eingeschlossen und akkumuliert ¹¹⁵. Die Expression von P-gp unterliegt interindividuellen Unterschieden, beispielsweise konnte im Intestium von 24 Versuchspersonen ein bis zu achtfacher Unterschied in der Expressionsrate nachgewiesen werden ¹¹⁶. P-gp scheint in einem synergistischen Zusammenhang mit den für die Biotransformation von Stoffen verantwortlichen 3A-Enzymen der Cytochrom-P450-Superfamilie (CYP3A) zu stehen, da beide Proteine sich ein Substratspektrum sowie eine koordinierte Verteilung im Gewebe, z.B. in Leber und Enterozyten, zu teilen scheinen und sich somit in ihrer Absorptions- bzw. Eliminationsfunktion ergänzen, da P-gp das zu metabolisierende Substrat durch mehrere wiederholte Zyklen via Diffusion und Efflux den abbauenden Enzymen aussetzt ^{117,118}.

Aufbau und Struktur:

P-gp hat ein Molekulargewicht von 170 kDa und ist aus 1280 Aminosäuren aufgebaut ^{10,119}. Wie bereits im Abschnitt „ATP-Binding-Cassette Transporter (ABC-Transporter)“ beschrieben, besteht P-gp ähnlich wie andere ABC-Transporter aus jeweils zwei transmembranären und nukleotidbindenden Domänen, zusammengefasst als ein einzelnes Polypeptid. Die Domänen sind dabei folgendermaßen angeordnet: TMD1 – NBD1 – TMD2 – NBD2. Die beiden TMDs weisen dabei jeweils sechs die Membran durchspannenden α -Helices auf (TM1 – TM6 und TM7 – TM12). Zwischen NBD1 und TMD2 befindet sich ein 60 Aminosäuren langer flexibler Linker, welcher die beiden Hälften von P-gp verbindet ¹¹⁹. Dieser flexible Linker ist essentiell für die Beweglichkeit der beiden P-gp Hälften und deren Konformationsänderungen während des Transportprozesses von Substraten ¹¹⁹. Eine Verkürzung des Linkers reduziert die Flexibilität der beiden Hälften ohne Einfluss auf die basale ATPase Aktivität zu nehmen ¹¹⁹. Die Bereiche von P-gp, welche in der extrazellulären Membran bzw. in dem Zytoplasma lokalisiert sind, besitzen eine große Anzahl von positiv und negativ geladenen Abschnitten ⁹⁵. Die Bereiche innerhalb der Zellmembran sind vorrangig neutral ⁹⁵.

Für die Bindung und die Hydrolyse von ATP ist das Entstehen eines NBD-Dimers notwendig, welcher eine sog. „head-to-tail“ Konformation annimmt ⁷⁰. Zur Unterscheidung der beiden gegenüberliegenden NBDs spricht man häufig von *cis*-NBD bzw. *trans*-NBD. Abgesehen von den

bereits besprochenen konservierten Sequenzmotiven der NBDs von ABC-Transportern, der Walker A- bzw. B-Domäne und des LSGGQ Motivs, gibt es auch den „A-Loop“, den „D-Loop“, den „Q-Loop“, den „H-Loop“ (auch „Switch-Region“ genannt) und den „X-Loop“, welche alle eine entscheidende Rolle bei der Bindung und Hydrolyse von ATP spielen: die Walker A-Domäne, insbesondere das konservierte Lysin dieser Domäne, bindet das ATP an der *cis*-NBD¹²⁰, die Walker B-Domäne, welche reich an Glutamat ist, leitet den für die Hydrolyse von ATP notwendigen nukleophilen Angriff von Wasser (mithilfe von Mg^{2+})¹²⁰, das LSGGQ Motiv ist am *trans*-NBD für die Bindung von ATP zuständig¹²¹, der „A-Loop“ interagiert mit seiner aromatischen Region, häufig Tyrosin, mit dem Adenin des ATPs¹²², der „D-Loop“ ist für den Kontakt der beiden NBDs zueinander verantwortlich¹²³, der „Q-Loop“, bestehend aus einer Glutamin-Einheit, wechselwirkt mit dem γ -Phosphat des ATPs und ist an der TMD-NBD Kommunikation beteiligt¹²⁴, der „H-Loop“, welcher meist aus einer Histidin-Region besteht, nimmt an der katalytischen Reaktion teil und ist für die Kommunikation der NBD-Monomere untereinander verantwortlich¹²⁵ und der „X-Loop“ ist genauso wie der „Q-Loop“ an der Signaltransduktion zwischen TMD und NBD beteiligt¹²⁶. Die Reihenfolge der einzelnen NBD-Sequenzmotive, vom N- zum C-Terminus, lautet wie folgt: „A-Loop“ – Walker A – „Q-Loop“ – „X-Loop“ – ABC-Signature – Walker B – „D-Loop“ – „H-Loop“.

Durch Aminosäureaustausch verursachte Mutationen in den NBDs von P-gp führen zu einem Verlust der ATPase Aktivität und zu einer Elimination der Resistenzentwicklung¹²⁷⁻¹²⁹.

P-gp lässt sich in zwei Hälften unterteilen, bestehend aus je einer TMD und einer NBD, welche eine zweifache Pseudosymmetrieachse besitzen^{93,119}. Diese Pseudo-C2-Symmetrie in der Bindungstasche von P-gp konnte mithilfe von symmetrischen und asymmetrischen käfigdimeren 1,4-Dihydropyridinen, welche als MDR-Modulatoren agieren, bestätigt werden¹³⁰.

Aller, Yu *et al.* konnten 2009 mithilfe einer Röntgenkristallstrukturanalyse von Maus apo-P gp (Nukleotid-frei) mit einer Auflösung von 3,8 Å zeigen, dass die beiden NBDs in einer nach innen gerichteten Konformation in einem Abstand von 30 Å zueinander entfernt liegen und eine 6000 Å³ große Kavität, welche von den transmembranären Helices gebildet wird, vorhanden ist⁹³. Maus-P-gp ist zu 87% sequenzidentisch mit humanen P-gp⁹³. P-gp erstreckt sich über ungefähr 136 Å senkrecht zu und über 70 Å in der Ebene der Lipiddoppelschichtmembran⁹³. Die Abbildungen 13 und 14 zeigen die Struktur und den Aufbau von P-gp, einmal in der bereits beschriebenen Röntgenkristallstruktur⁹³ und in einer zweidimensionalen, schematischen Ansicht¹³¹.

Grundlagen

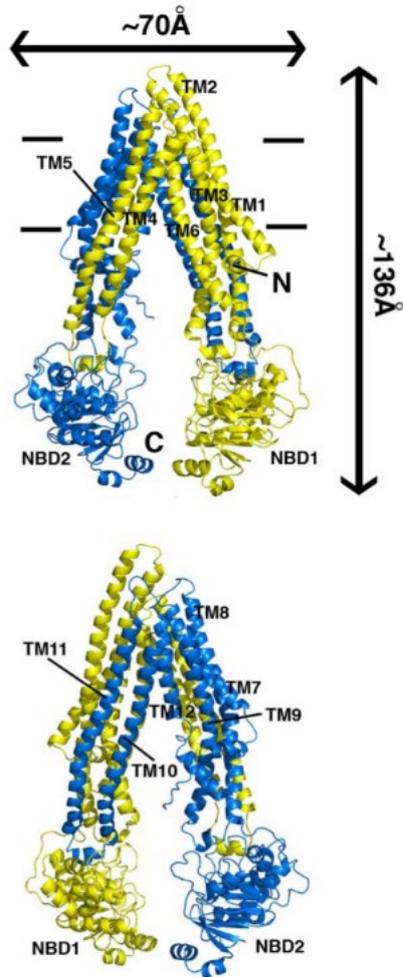


Abbildung 9: Struktur von P-gp. Oben: Vorderansicht, Unten: Rückansicht, modifiziert nach ⁹³

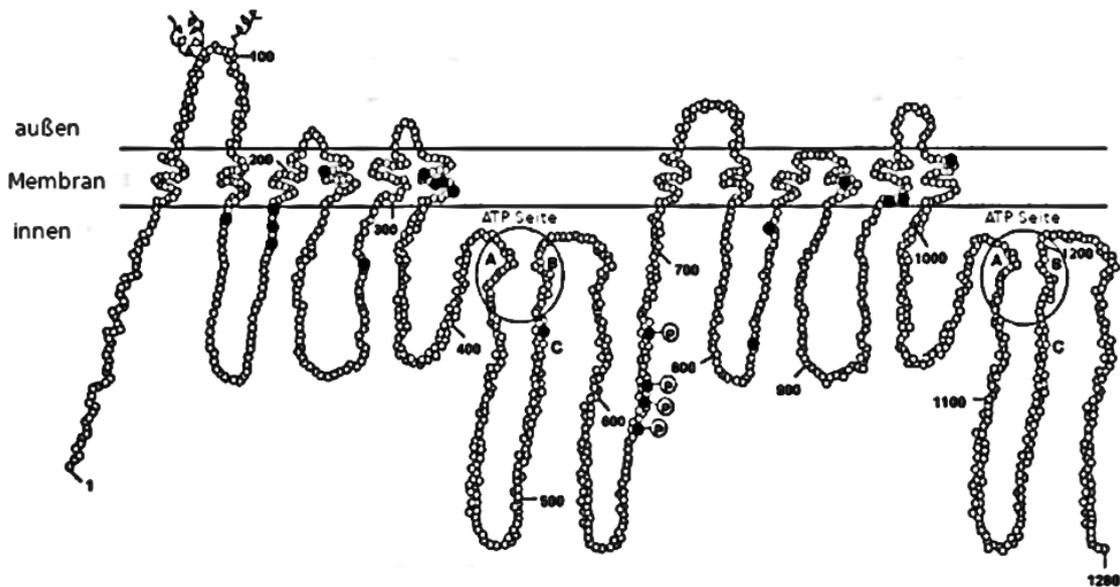


Abbildung 10: 2D Struktur von P-gp, modifiziert nach ¹³¹

Substrate von P-gp:

Es gibt vier verschiedene Arten der Interaktion von Verbindungen mit ABC-Transportern, welche für eine Verbindung überlappend sein können: Verbindungen können zum einen als Substrate fungieren und von den ABC-Transportern translokalisiert werden, sie können als Inhibitoren agieren und somit den Efflux anderer Verbindungen unterbinden, sie können als Induktoren (Bsp.: Rifampicin, Johanniskraut) die Expressionsrate der Transporter erhöhen und sie können als Aktivatoren die Aktivität der Transporter erhöhen^{132,133}. Die gleichzeitige Gabe von beispielweise einem P-gp Substrat und einem P-gp Inhibitor führt zu einer Konkurrenz um die Bindungsstellen: so kommt es bei gleichzeitiger Gabe von z.B. Digoxin und Verapamil zu einer Akkumulation des Digoxins und somit zu unerwünschten Wirkungen für den Patienten¹³⁴. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die Voraussetzungen für die Wechselwirkung von Substraten mit P-gp dargestellt und Beispiele für P-gp Substrate genannt werden.

P-gp besitzt die Eigenschaft eine Vielzahl an strukturell verschiedenen Substanzen aus Zellen auszuschleusen. Neben den in Chemotherapien eingesetzten und für ihre Entwicklung von Resistenzen in Krebszellen bekannten Zytostatika (z.B. Vinblastin, Daunorubicin, Etoposid, Paclitaxel) gibt es weitere Stoffklassen, deren Vertreter ebenfalls als P-gp Substrate fungieren. Gemeinsamkeiten dieser Substrate sind ihre für den Transport notwendigen strukturellen Voraussetzungen, wie z.B. ihr Molekulargewicht, welches zwischen 200 und 1900 Da liegt, ihre lipophile bzw. amphiphile organische Grundstruktur und ihr Verteilungsvermögen in Lipiddoppelschichten¹⁹. Ebenfalls wichtig können ein aromatisches Ringsystem und ein bei physiologischen Bedingungen protonierbares Stickstoffatom sein¹⁹. Des Weiteren können auch die Anzahl und der Abstand von Elektronendonorguppen innerhalb eines Moleküls entscheidend sein¹³⁵. Verbindungen, welche zwei oder drei Elektronendonorguppen in einem Abstand von 2,5 Å oder 4,6 Å besitzen, konnten als P-gp Substrate charakterisiert werden¹³⁵. Ein weiteres gemeinsames Charakteristikum von P-gp Substraten können zwei hydrophobe Gruppen in einem Abstand von 16,5 Å und zwei Wasserstoffbrückenakzeptorgruppen in einem Abstand von 11,5 Å sein¹³⁶. Allgemein lässt sich sagen, dass für die Interaktion von P-gp die Anzahl und die Stärke der Wasserstoffbrückendonorguppen bzw. -akzeptorgruppen zwischen Substrat und P-gp entscheidend sind¹³⁷. Abweichungen von den genannten strukturellen Elementen sind für eine Interaktion mit P-Glykoprotein möglich.

Tabelle Nr. 3 zeigt eine Auswahl von Stoffklassen und ihren Vertretern, welche bekannte P-gp Substrate sind^{19,69,132}.

Grundlagen

Stoffklasse	Beispiele
Analgetika	Morphin, Fentanyl
Antiarrhythmika	Amiodaron, Propafenon, Chinidin
Antibiotika	Erythromycin, Gramicidin D
Antidepressiva	Amitriptylin, Nortriptylin, Doxepin, Venlafaxin, Paroxetin
Antiemetika	Ondansetron, Domperidon
Antiepileptika	Topiramamat, Phenytoin, Carbamazepin, Phenobarbital
Antihelminthika	Ivermectin, Abamectin
Antihistaminika	Fexofenadin, Terfenadin
Antihypertensiva	Reserpin, Propranolol
Arzneipflanzen-Inhaltsstoffe	Colchicin, Curcuminoide
Calciumkanalblocker	Azidopin, Diltiazem, Nifedipin, Verapamil
Calmodulin-Antagonisten	<i>trans</i> -Flupentixol, Trifluoperazin
Fluoreszenzfarbstoffe	Calcein-AM, Hoechst 33342, Rhodamin 123
H₂-Rezeptor-Antagonisten	Cimetidin, Ranitidin
Herzglykoside	Digoxin, Digitoxin
HIV-Proteaseinhibitoren	Nelfinavir, Ritonavir, Saquinavir, Indinavir, Maraviroc, Darunavir
HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren	Lovastatin, Simvastatin
Immunsuppressiva	Cyclosporin A, Tacrolimus
Peptide	Leupeptid, Pepstatin A, Valinomycin
Pestizide	Cypermethrin, Endosulfan, Fenvalerat, Methylparathion
Steroide	Aldosteron, Corticosteron, Cortisol, Dexamethason
Tyrosinkinase-Inhibitoren	Gefitinib, Imatinibmesilat
Zytostatika	
Anthracene	Bisantrene, Mitoxantrone
Anthracycline	Doxorubicin, Daunorubicin
Camptothecine	Topotecan
Epipodophyllotoxine	Etoposid, Teniposid
Taxane	Paclitaxel, Docetaxel
Vincaalkaloide	Vinblastin, Vincristin

Tabelle 2: P-gp Substrate ^{19,69,132}

Modulatoren von P-gp:

MDR-Modulatoren, auch Chemosensitizer oder P-gp Inhibitoren genannt, besitzen die Fähigkeit, den Effluxtransport von P-gp, welches bei einer MDR erhöht exprimiert wird, zu unterbinden und somit in Krebstherapien bei einer gleichzeitigen Gabe mit einem Zytostatikum dessen Zytotoxizität wiederherzustellen. Alternativ lassen sich mit MDR-Modulatoren auch zum einen die Blut-Hirn-Schranke überwinden, um eine medikamentöse Wirkung im Gehirn zu gewährleisten, zum anderen könnte man auch präventiv die Entwicklung einer MDR bei Krebstherapien vereiteln und somit eine Dosiserhöhung von Chemotherapeutika bzw. ein Therapieversagen vermeiden.

Ähnlich wie bei den P-gp Substraten sind auch die P-gp Inhibitoren strukturell sehr divers aufgebaut und besitzen ähnliche Strukturmerkmale, um mit P-gp zu interagieren. Viele MDR-Modulatoren werden selbst von P-gp transportiert und fungieren somit auch als P-gp Substrate, wie z.B. Verapamil, das in P-gp exprimierenden Zellen zu einem erhöhten Verbrauch von ATP führt¹³⁸. MDR-Modulatoren interagieren kompetitiv, nichtkompetitiv oder allosterisch mit der Substratbindungstasche von P-gp und konkurrieren auf diese Weise mit anderen P-gp Substraten¹³⁹. Der genaue Mechanismus von kompetitiven MDR-Modulatoren ist noch nicht genau erforscht; es konnte allerdings für Chinidin und Chinin gezeigt werden, dass diese MDR-Modulatoren, welche vom P-gp von der inneren Schicht der Lipidmembran aufgenommen werden und in die äußere Schicht transportiert werden, mit schneller Geschwindigkeit wieder in die innere Schicht der Membran gelangen (und nicht aus der Zelle hinaus transportiert werden)⁶⁴. Der ABC-Transporter ist somit durch die hohe Transbilayer-Bewegung des MDR-Modulators in einem Zyklus gefangen und kann ein weiteres P-gp Substrat, z.B. ein Zytostatikum, nur noch zu einem geringeren Maße aus Zellen translokalisieren. Neben den durch P-gp transportierten Chemosensitizern gibt es auch jene, welche nicht transportiert werden und einen anderen Wirkmechanismus, wie z.B. die Unterbindung der ATP-Hydrolyse durch Verhinderung der ATP-Bindung¹⁴⁰, besitzen. Ein Beispiel hierfür wäre Disulfiram, welches durch Bildung kovalenter Bindungen von Cysteinresten der NBDs die ATP-Hydrolyse inhibiert und mit der Substratbindungstasche interagieren kann und dadurch den MDR1-verursachten Efflux umkehrt¹⁴¹. Neben diesen genannten Wirkmechanismen kann auch die Beeinflussung der Membranfluidität durch Veränderung der Integrität von Zellmembranlipiden¹⁴² und eine Herunterregulierung der P-gp Expression durch P-gp Inhibitoren zur Überwindung der MDR beitragen¹⁴³.

P-gp Inhibitoren werden in Abhängigkeit von ihrer Wirkstärke, Selektivität und ihres Wechselwirkungspotentials mit anderen Arzneimitteln in vier Generationen aufgeteilt. Tabelle Nr. 4 zeigt eine Übersicht¹⁴⁴.

Grundlagen

Generation	Stoffklasse	Beispiele
1. Generation	Anästhetika	Benzylalkohol, Diethylether, Propofol, Chloroform
	Antimalariamittel	Chinin
	Antiarrhythmika	Amiodaron, Chinidin
	Calciumkanalblocker	Verapamil, Nifedipin
	Immunsuppressiva	Cyclosporin A
	Andere	Disulfiram, Cremophor EL
2. Generation		Valspodar (PSC-833), Biricodar (VX-710), R-Verapamil (Dexverapamil), Dexniguldipin
3. Generation		Zosuquidar (LY335979), Tariquidar (XR9576), Elacridar (GF120918), Ontogen (OC144-093), Laniquidar (R101933)
4. Generation	Tenside und Lipide	Natriumdodecylsulfat, Tween-20, Span-80, Cremophor EL, Nonidet P40
	Flavonoide	Tangeretin, Sinensetin, Quercetin
	Alkaloide	Ellipticin
	Cannabinoide	Cannabidiol
	Coumarine	Cnidiadin
	Peptidomimetika	Reversin
	Duale Liganden	Aminierte Thioxanthone
	Terpene, Ginsenoide,	
	Polyene, Lignane	

Tabelle 3: P-gp Inhibitoren ¹⁴⁴

Für einen optimalen MDR-Modulator gibt es einige strukturelle Voraussetzungen, welche für die Interaktion zwischen Modulator und P-gp förderlich, aber nicht zwingend erforderlich sind und u.a. durch Struktur-Wirkungsbeziehung Analysen untersucht wurden. Als Ergebnis konnte ein logP-Wert von mindestens 2,92 und die damit verbundene Hydrophobizität einer Verbindung, eine mindestens 18 Atom-lange Molekülachse, ein hoher E_{HOMO} -Wert und mindestens ein tertiäres, basisches Stickstoffatom, welches bei einem physiologischen pH-Wert positiv geladen ist, identifiziert werden ¹⁴⁵. Diese Parameter sind relevant, damit der MDR-Modulator mithilfe von

van der Waals Kräften, Wasserstoffbrückenbindungen, nukleophilen und ionischen Interaktionen mit P-gp wechselwirkt. Ebenfalls konnte das Vorhandensein von planaren aromatischen Domänen als wichtige hydrophobe Einheit genannt werden ¹³⁷.

P-gp Inhibitoren der ersten Generation sind Substanzen, die bereits bei anderen therapeutischen Indikationen eingesetzt und nicht spezifisch für die Inhibierung von P-gp entwickelt wurden, für die aber gezeigt werden konnte, dass sie im Zusammenspiel mit Zytostatika zum Überwinden von Resistenzen geeignet sind. Der erste Vertreter dieser Generation ist Verapamil, ein Calciumkanalblocker, der in einer Untersuchung von *Tsuruo, Iida et al.* im Jahre 1981 in Kombination mit Vincristin und Vinblastin deren Zytotoxizität durch Akkumulation in resistenten Zelllinien erhöhen konnte ¹⁴⁶. Verapamil selbst ist wie viele andere Chemosensitizer der ersten Generation ein Substrat von P-gp und konkurriert mit anderen Substraten direkt kompetitiv um den Transport ¹³¹. Cyclosporin A ist ein weiterer MDR-Modulator der ersten Generation, welcher 1986 von *Slater, Sweet et al.* ermittelt wurde und die Resistenz gegenüber Vincristin und Daunorubicin aufheben konnte ¹⁴⁷. Nachteile der ersten P-gp Inhibitoren sind das dominante Erscheinen ihrer pharmakologischen Eigenwirkung, der Mangel an Selektivität und die geringe Affinität zu P-gp, welche zu einer notwendigen Erhöhung der Dosis des P-gp Inhibitors und zu einem vermehrten Auftreten von unerwünschten, teils toxischen Wirkungen führte ¹⁶. Der Vertreter Verapamil müsste für die Umkehr der MDR in so hohen Dosen eingesetzt werden, dass kardiovaskuläre bzw. -toxische Wirkungen auftreten würden ¹².

P-gp Inhibitoren der zweiten Generation wurden entwickelt, welche nicht die Nachteile der ersten Generation aufweisen und sich durch eine erhöhte Wirkstärke bei geringeren Dosen, eine Verringerung der ursprünglichen Wirkung und eine geringere Toxizität definieren sollten ¹⁴⁴. Vertreter der zweiten Generation leiten sich häufig durch strukturelle Modifikationen von der ersten Generation ab, wie zum Beispiel Valspodar, welches ein Cyclosporin D Derivat darstellt. Als weiteres Beispiel sei hier R-Verapamil, ein Enantiomer von Verapamil, genannt, welches nur einen geringen Calciumkanal-hemmenden Effekt bei gleichbleibender MDR-modulierender Wirkung zeigt ¹⁴⁸. Zu den Nachteilen von den Vertretern der zweiten Generation gehören deren pharmakokinetischer Einfluss auf den Metabolismus und die Exkretion von Chemotherapeutika und deren Fähigkeit neben P-gp auch andere ABC-Transporter zu hemmen ¹⁴⁹. MDR-Modulatoren der zweiten Generation sind häufig Substrate oder Inhibitoren von Cytochrom P450, wodurch es zu einer Beeinträchtigung des Metabolismus und der Clearance von Zytostatika und somit zu Fehldosierungen und zu einer erhöhten Toxizität für den Patienten kommen kann ⁶⁸.

P-gp Inhibitoren der dritten Generation wurden mithilfe von QSAR (quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehung, quantitative structure-activity relationship) und kombinatorische Chemie entwickelt und weisen im Vergleich mit der zweiten Generation eine erhöhte Wirkstärke und

Spezifität, teilweise bereits bei nanomolaren Konzentrationen, auf ¹². Ebenfalls beeinflussen sie auch nicht bzw. nur im geringem Maße die Biotransformation von zytostatischen Wirkstoffen über Cytochrom P450 und weisen dadurch nur ein geringes pharmakokinetisches Interaktionspotential auf ¹⁵⁰. Nachteil der dritten Generation von MDR-Modulatoren, wie z.B. Tariquidar oder Zosuquidar, ist das Auftreten toxischer Effekte in klinischen Untersuchungen und ein geringer Einfluss auf die Mortalität der Patienten ^{151,152}.

P-gp Inhibitoren der vierten Generation sind u.a. pflanzliche Inhaltsstoffe (Flavonoide ^{153,154}, Alkaloide, Coumarine, Cannabinoide, Terpene, Polyene, Lignane), Peptidomimetika, Tenside, Lipide und duale Liganden ¹⁴⁴. Man erhofft sich von den Vertretern dieser neuen Generation eine geringe Toxizität und eine höhere Erfolgsaussicht in klinischen Studien im Vergleich zu den vorherigen drei Generationen ¹⁴⁴. Duale Liganden besitzen die Eigenschaft, dass sie entweder MDR-modulierend und zytotoxisch sind oder neben P-gp auch mit anderen ABC-Transportern interagieren können ¹⁴⁴. Tenside wie Tween-20 und Span-80 können in Abhängigkeit von ihrem HLB-Wert und ihrer kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) die Funktion von P-gp mittels Beeinflussung der Membranfluidität inhibieren ¹⁵⁵.

Weitere neu entwickelte P-gp Inhibitoren sind u.a. thiolierte PEG-g-PEI Co-Polymere ¹⁵⁶, 2,5-disubstituierte Furanderivate ¹⁵⁷, Phytinsäure ¹⁵⁸, 6-Methoxy-2-Arylchinoline ¹⁵⁹ und Pyridin-2-one ¹⁶⁰.

Alternative Möglichkeiten zur Beeinflussung von MDR sind wie folgt: Peptide bzw. monoklonale Antikörper können P-gp blockieren; Antisense-Oligonukleotide, Hammerhead-Ribozym und siRNA können MDR1-Gen herunterregulieren; neuartige Zytostatika bzw. neue pharmazeutisch-technologische Wege können zur Umgehung des Effluxprozesses eingesetzt werden (z.B. Doxorubicin in pegylierten Liposomen) ²⁰.

Neben den bereits genannten Nachteilen von MDR-Modulatoren, wie z.B. notwendige hohe therapeutische Dosen oder Beeinflussung von Metabolismus- bzw. Eliminationsprozessen, gibt es noch weitere Probleme bei der gleichzeitigen Anwendung von MDR-modulierenden und zytotoxischen Wirkstoffen. Zum einen kann die Inhibition von ABC-Transportern den Zugang von zytotoxischen Substanzen in sensibles Gewebe ermöglichen und somit zu Schäden abseits des therapeutischen Ziels führen. Zum anderen kann die kurzzeitige Gabe von Chemotherapeutika die Expression von P-gp als Folge der zellulären Schäden induzieren, was die Überwindung der MDR erschwert und durch die Gabe von Protein-Kinase-C Inhibitoren verhindert werden konnte ¹⁶¹. Eine andere Problematik bei der Anwendung von P-gp Inhibitoren ist die Tatsache, dass MDR eine multifaktorielle Ursache besitzt und neben der Überexpression von ABC-Transportern weitere Resistenzmechanismen auftreten können, welche das Überleben der Krebszellen sichern und die

Behandlung erschweren ^{162,163}. Bis zum heutigen Tag wird kein MDR-Modulator praktisch im klinischen Alltag angewendet ¹⁴³.

Die FDA empfiehlt in einem Entwurf aus dem Jahre 2017, dass während der Entwicklung neuer Wirkstoffe diese u.a. in in vitro Studien und, falls notwendig, in in vivo Studien auf ihr Interaktionspotential mit dem ABC-Transporter P-gp untersucht werden ¹⁶⁴.

2.3.2. MRP1 (ABCC1, GS-X Pumpe)

Der zweite wichtige ABC-Transporter, der neben P-gp am Phänomen der MDR involviert ist, ist MRP1, welches 1992 von *Cole, Bhardwaj et al.* in humanen resistenten Lungenkrebszellen identifiziert wurde ¹⁶⁵. MRP1 wird durch das ABCC1 Gen codiert und ist Teil der MRP-Familie, welche sich aus neun Mitgliedern (MRP1 – MRP9) zusammensetzt und Vertreter der C-Subfamilie der ABC-Transporter Superfamilie ist ¹⁶⁶. MRP steht hierbei für „multidrug resistance-associated proteins“ bzw. „multidrug resistance-related proteins“. MRP1 besitzt ein Molekulargewicht von 190 kDa und besteht aus 1531 Aminosäuren, welche ein Polypeptid, bestehend aus drei TMDs und zwei NBDs, bilden ¹⁶⁷. Die Domänen sind wie folgt angeordnet, beginnend mit dem N-Terminus: TMD0 – TMD1 – NBD1 – TMD2 – NBD2 ¹⁶⁸. Der N-Terminus befindet sich im extrazellulären Raum, der C-Terminus befindet sich im intrazellulären Raum ¹⁶⁸. Die beiden NBDs scheinen durch Unterschiede in der Aminosäuresequenz nicht äquivalent zu sein und eine unterschiedliche Affinität für Nukleotide zu haben ¹⁶⁹. Hydrolyse von ATP scheint primär an NBD2 stattzufinden ¹⁶⁹. TMD0 enthält fünf transmembranären Helices und TMD1 bzw. TMD2 sechs transmembranären Helices ¹⁶⁸. TMD0 und TMD1 werden durch eine intrazellulär gelegene Linker-Region miteinander verbunden ¹⁷⁰. TMD0 hat zusammen mit der C-terminalen Region des Proteins eine wichtige Rolle bei der Expression von MRP1 an der Zelloberfläche ¹⁷¹. Das Phosphoglykoprotein MRP1, welches eine 15%ige Aminosäurehomologie zu P-gp aufweist ¹², weist teilweise eine pseudo-C2-symmetrische Struktur auf, welche durch TMD0 Abweichungen besitzt ¹⁷². Folgende Abbildungen zeigen den schematischen zweidimensionalen Aufbau ¹³² und ein dreidimensionales Modell von Apo MRP1 ¹⁷⁰:

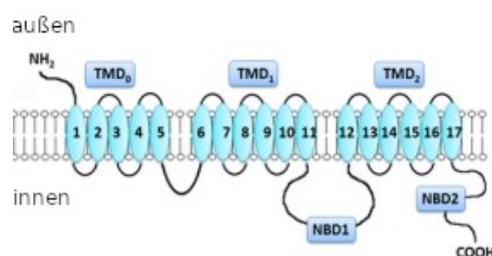


Abbildung 11: schematischer zweidimensionaler Aufbau von MRP-1, modifiziert nach ¹³²

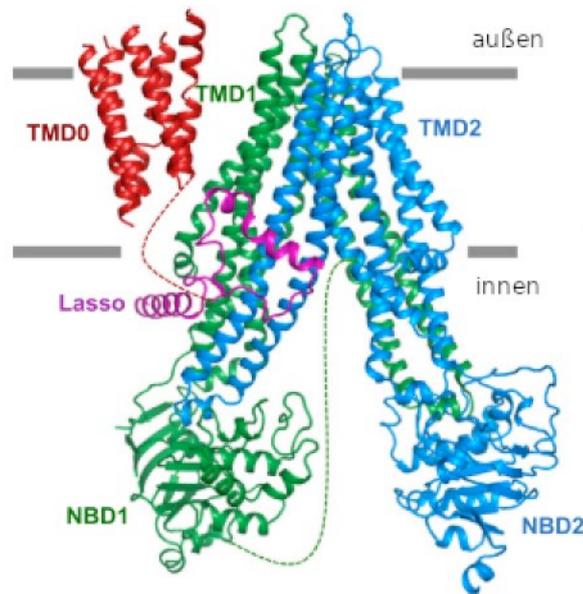


Abbildung 12: dreidimensionales Modell von Apo MRP-1, modifiziert nach ¹⁷⁰

MRP1 dient an physiologischen Barrieren u.a. dem Schutz von sensitivem Gewebe vor potentiell toxischen Xeno- und Endobiotika, welche im Zuge des Phase II Metabolismus als konjugierte Stoffe durch einen ATP-abhängigen Export aus den Zellen heraustransportiert werden. Der ABC-Transporter ist in vielen Geweben im Körper nachweisbar, u.a. Lunge, Dünn- bzw. Dickdarm, Niere, Gehirn, Hoden, Plazenta, Muskelzellen ^{173,174}. In nur sehr geringen Mengen ist MRP1 in der Leber identifizierbar ¹⁷⁵. Mittels immunozytochemischen Methoden konnte gezeigt werden, dass MRP1 im Gegensatz zu P-gp nicht an apikalen, sondern meist an basolateralen Plasmamembranen exprimiert wird ¹⁷⁶. Aufgrund der ubiquitären Verbreitung von MRP1 im menschlichen Körper konnte dieses Protein auch in vielen Tumorgeweben nachgewiesen werden: nicht-kleinzelliger und kleinzelliger Lungenkarzinom, Krebs des GIT, Neuroblastom, Glioma, Retinoblastom, Melanom, Mammakarzinom, Endometriumkarzinom, akute und chronische lymphoblastische Leukämie, etc. ^{166,167}.

MRP1, auch als GS-X Pumpe bezeichnet, transportiert seine Substrate entweder konjugiert mit Glutathion, Glucuronat bzw. Sulfat oder unkonjugiert zusammen mit freien Glutathion ⁴⁸. Das Substratspektrum von MRP1 und P-gp überschneidet sich in gewissen Punkten, mit dem Unterschied, dass MRP1 ebenfalls organische Anionenverbindungen transportieren kann. Tabelle Nr. 5 zeigt ausgewählte Substrate von MRP1, eingeteilt nach Stoffklassen ¹⁹.

Stoffklasse	Beispiel
Antibiotika	Difloxacin, Grepafloxacin
Antivirale Stoffe	Ritonavir, Saquinavir
Fluoreszenzfarbstoffe	Calcein
Folatverbindungen	Folsäure
Glucuronid-Konjugate	Estradiol-17- β -D-glucuronid, Etoposid-glucuronid, Glucuronosylbilirubin
Glutathion-Konjugate	Cyclophosphamid-SG; Doxorubicin-SG; Leukotriene C ₄ , D ₄ , E ₄ ; Prostaglandin A ₂ -SG
Peptide	Glutathion (GSH, reduziert: GSSG)
Halbmetalle	Arsenverbindungen, Antimonverbindungen
Tyrosinkinase-Inhibitoren	Geftinib, Imatinib Mesylate
Zytostatika	
Anthracycline	Doxorubicin, Daunorubicin
Camptothecine	Topotecan, Irinotecan
Epipodophyllotoxine	Etoposid, Teniposid
Vincaalkaloide	Vinblastin, Vincristin

Tabelle 4: MRP-1 Substrate¹⁹

Über die genaue Anzahl der Bindungsstellen von MRP1 lässt sich keine definitive Aussage machen; Untersuchungen konnten allerdings belegen, dass die TMs 10-11 und TMs 16-17 an der Bindung von Substraten beteiligt sind¹⁷⁷. Die generellen Anforderungen an die Bindungsstellen von MRP1 sind Regionen innerhalb des Transportproteins, welche eine Wechselwirkung mit den hydrophoben Substrat und dem freien Glutathion bzw. dem konjugierten Glutathionrest ermöglichen. *Johnson, Chen* diskutieren anhand von kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen von MRP1 eine einzelne zweigeteilte Bindungsseite mit einer positiv geladenen Region für die Wechselwirkung mit Glutathion („P-Tasche“) und eine großer hydrophober Bereich für das Substrat („H-Tasche“), welche es erlauben, dass strukturell vielfältige Verbindungen von MRP1 translokalisiert werden können¹⁷⁰. Es wird vermutet, dass MRP1 im Gegensatz zu P-gp seine Substrate nicht mittels „Vacuum cleaner“ Mechanismus über die Plasmamembran, sondern direkt über das Zytoplasma bzw. der mit Glutathion konjugierte Part über das Zytoplasma und der hydrophobe Part des zu transportierenden Substrates über die Zellmembran aufnimmt und mit dem ABC-Transporter interagiert¹⁹.

Die meisten Chemosensitizer, welche P-gp blockieren können, haben meist keine inhibierende Wirkung auf MRP1¹⁷⁸. Als MRP1-Modulatoren konnten die LTC₄-Analoge MK571 und S-Decylglutathion, der P-gp Inhibitor der zweiten Generation Biricodar, diverse Flavonoide und der unspezifische organische Anionentransport-Inhibitor Probenecid beschrieben werden¹⁹. Weitere Verbindungen mit MRP1-inhibierender Aktivität sind Cyclosporin A, Rapamycin, Tipifarnib, Deforolimus, Everolimus, Temsirolimus, AZD1208, HS-173, YM201636, ESI-09, TAK-733 und CX-6258¹⁷⁹. Eine Übersetzung der im Labor gefundenen MRP1-inhibierenden Verbindungen in die klinische Praxis hat bis jetzt noch nicht stattgefunden.

2.3.3. MRP2 (ABCC2, cMOAT)

MRP2 wurde 1996 von *Büchler, König et al.* in Lebergewebe von Ratten entdeckt und stimmt zu 47,8 % mit humanen MRP1 überein¹⁸⁰. Das humane Homologon von MRP2 konnte wenig später in einer Cisplatin-resistenten Krebszelllinie nachgewiesen werden¹⁸¹. Ein synonyme Begriff von MRP2 ist cMOAT, kurz für „canalicular multispecific organic anion transporter“. Das 1545 Aminosäuren lange MRP2 gehört wie MRP1 zu der C-Subfamilie der ABC-Transporter Superfamilie und wird durch das ABCC2 Gen codiert¹⁸². Das Molekulargewicht von MRP2 beträgt 190 kDa¹⁸². MRP2 besitzt drei TMDs, bestehend aus insgesamt 17 transmembranären Helices, und zwei NBDs¹⁸³. Die Reihenfolge der Domänen entspricht der von MRP1¹⁸³.

MRP2 ist im Gegensatz zu MRP1 an apikalen Membranen lokalisiert und nicht ubiquitär verbreitet¹⁷³. MRP2 kann in der Leber, der Niere, dem Darm, der Gallenblase, der Plazenta, der Lunge und in weiteren humanen Geweben, sowohl in der Plasmamembran als auch in der Kernmembran, nachgewiesen werden^{50,184}. An diesen Membranen kann MRP2 konjugierte Substrate aus Zellen translokalisieren, welche während der zweiten Phase des Metabolismus entstehen, und dem Schutz des jeweiligen Gewebes dienen. MRP2 spielt eine wichtige Rolle bei der Elimination und der Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen, endogenen Stoffen und deren Metabolite¹⁸⁵.

Als Substrate von ABCC2 dienen Konjugate von Glutathion, Sulfat oder Glucuronid und organische Anionenverbindungen sowie unkonjugierte Substrate¹⁸⁵. Zu den Substraten von MRP2 gehören u.a. das Camptothecin Irinotecan, die Anthracycline Doxorubicin und Epirubicin, das Epipodophyllotoxin Etoposid, die Vincaalkaloide Vincristin und Vinblastin sowie die Arzneistoffe Cisplatin, Methotrexat und Mitoxantron^{68,182}. Eine Überexpression von MRP2 konnte in vielen Zelllinien, welche resistent gegenüber Cisplatin sind, beobachtet werden¹⁸⁶. Endogene Substrate von MRP2 sind z.B. Bilirubin, welches mit Glucuronid konjugiert wird und über die Galle

Grundlagen

ausgeschieden wird, und Leukotrien C₄¹⁸⁷. Mutationen in MRP2 können in der Leber zu einer konjugierten Hyperbilirubinämie, auch als Dubin-Johnson-Syndrom bekannt, führen¹⁸⁸.

Wichtige MRP2-inhibierende Substanzen sind Tariquidar, Biricodar, Isothiocyanat-Verbindungen und MK571^{20,68}.

2.4 Resistance-Nodulation-Cell Division Effluxpumpen (RND-Effluxpumpen)

Neben der in Abschnitt „ATP-Binding-Cassette Transporter (ABC-Transporter)“ besprochenen Superfamilie der ABC-Transporter und ihren Vertretern P-gp, MRP-1 und -2 gibt es auch die bereits erwähnte Gruppe der RND-Effluxpumpen, welche genau wie die MFS- und SMR-Transporter durch einen Protonengradienten (proton motive force driven) Substrate translokalisieren können. RND-Pumpen wurden erstmalig in den frühen 1990er Jahren entdeckt und sind hauptsächlich in gramnegativen Bakterien anzutreffen^{189,190}. Die RND-Effluxpumpen befähigen die Bakterienzellen zur Ausschleusung von zellfremden und strukturell diversen Verbindungen wie z.B. antimikrobiell wirksame Arzneistoffe aus dem Zellinneren und bewirken dadurch einen wesentlichen Einfluss auf die Entstehung der intrinsischen und erlernten MDR von gramnegativen Bakterien^{191,192}. Eine Hemmung der RND Effluxpumpen durch Gabe von MDR-Modulatoren bietet das Potenzial resistente Bakterien einer Antibiotikatherapie zugänglich zu machen. Beispiele für RND Effluxpumpen sind u.a. AcrAB-TolC in *E. coli* oder MexAB-OprM in *P. aeruginosa*.

RND Effluxpumpen besitzen neben ihrer Rolle in der MDR von Bakterien auch eine physiologische Funktion, den Export von Stoffwechselprodukten. So konnte durch Inaktivierung der AcrAB-TolC Effluxpumpe gezeigt werden, dass sowohl Aminosäuren wie z.B. Lysin als auch die Dicarbonsäuren Fumarsäure und 2-Hydroxybutandisäure, welche beide Zwischenprodukte des Citratzyklus sind, intrazellulär angereichert werden und schlussfolgernd Substrate der genannten Effluxpumpe sind¹⁹³. Abgesehen von der Relevanz der RND-Effluxpumpen bei der Entstehung von MDR durch Ausschleusung von Antibiotika aus der Zelle und der physiologischen Aufgabe im Stoffwechsel erfüllen die Pumpen auch eine wichtige Funktion in der Virulenz (durch Efflux von Toxinen) und Genregulierung der Bakterien^{191,193}.

Zu den Substraten der RND Effluxpumpen gehören (vergleichbar zu P-gp oder MRP-1/-2) eine Reihe an strukturell vielfältigen Verbindungen. Wie bereits erwähnt werden viele Antibiotika verschiedener Gruppen (Bsp.: β -Lactame, Chinolone, Tetracycline, Chloaramphenicol, Aminoglykoside, etc.) sowie Stoffwechselprodukte von RND Pumpen aus Bakterienzellen herausgeschleust¹⁹⁴. Auch werden u.a. Steroidhormone, quarternäre Ammoniumverbindungen, Sodiumdodecylsulfat, Gallensäuren, Zink, etc. von unterschiedlichen RND Transportern effluert¹⁹⁴.

Mithilfe von EPIs (Efflux pump inhibitors) in Kombination mit Antibiotika kann die MDR von gramnegativen Bakterien überwunden werden. Zu den bekannten RND Inhibitoren gehören u.a. Naphthylpiperazine wie 1-(1-Naphthylmethyl)-piperazin, die Phenothiazin-Derivate

Chlorpromazin und Thioridazin und das Arylpiperidin Pimozid, welche als Neuroleptika eingesetzt werden sowie PA β N (Phenylalanin-Arginin- β -Naphthylamid)^{194,195}.

Lokale und globale Regulatoren bestimmen die transkriptionale Regulation von RND Transportern¹⁹¹. So können Umweltsignale oder die Gabe eines Antibiotikums und die dadurch bedingte erhöhte intrazelluläre Konzentration der Antibiotika zu einer induzierten Steigerung der RND Genexpression führen¹⁹¹. Mutationen in einem negativen Regulator können zu einer Überexpression von RND Effluxpumpen und infolgedessen zur Entstehung einer MDR führen¹⁹¹.

RND Effluxpumpen stellen ein System aus drei Komponenten dar, welches von der inneren Membran bis zur äußeren Membran der Zellwand von gramnegativen Bakterien reicht^{191,194}:

- eine an der Zytoplasmamembran lokalisierte RND-Pumpe
- ein periplasmatisches Adaptorprotein (PAP) der Membranfusionsprotein (MFP) Familie
- ein an der äußeren Membran lokalisierter Kanal (outer membran protein, OMP) der äußeren Membranfaktor (outer membran factor, OMF) Familie

Ein Fehlen einer dieser drei Komponenten führt zum kompletten Verlust der Funktionalität der RND-Pumpen¹⁹⁶. Die meisten Effluxproteine anderer Transporterfamilien translokalisieren ihre Substrate lediglich ins Periplasma, von wo aus diese wieder ins Zytosol diffundieren können. Im Gegensatz dazu ermöglicht die Tatsache, dass RND Pumpen die gesamte Zellwand durchspannen, diesen Pumpen ihre Substrate direkt ins extrazelluläre Medium zu transportieren, wodurch die Substrate zusätzlich erneut die äußere Membran passieren müssen¹⁹⁷. Weitere Details zum Aufbau und Transportmechanismus einer RND Effluxpumpe werden im nachfolgenden Abschnitt anhand des Beispiels der AcrAB-TolC Effluxpumpe dargelegt.

AcrAB-TolC Effluxpumpe in E. coli:

Eine der am meist untersuchtesten RND-Effluxpumpen ist die AcrAB-TolC-Effluxpumpe (bzw. AcrABZ-TolC-Effluxpumpe, siehe weiter unten), welche in *E. coli* vorkommt und ein Molekulargewicht von 771 kDa besitzt¹⁹⁸. Bakterielle Infektionen, welche durch *E. coli* verursacht werden, sind u.a. lebensmittelbedingte Infektionen und Harnwegsinfektionen. Acr steht für „Acriflavine resistance protein“, TolC für „Tolerance colicin E1“. Acriflavine bzw. Acriflaviniumchlorid sind Verbindungen, welche strukturell verwandt sind mit Acridinen, welche im Rahmen dieser Arbeit als Testverbindungen (Dihydroacridin-Verbindungen) synthetisiert und analysiert wurden (siehe Abschnitt „Synthese der 9,10-Dihydroacridine“). Die nachfolgenden Abschnitte beschreiben für die AcrAB-TolC-Effluxpumpe kurz zusammengefasst die globalen und lokalen transkriptionale Regulatoren, die Substrate und deren Spezifität, die bekannten

Inhibitoren, den Transportmechanismus der Pumpe, die Substratbindungstaschen und Details über den Aufbau und die Struktur.

Die Gene von AcrAB-TolC unterliegen in *E. coli* mehreren globalen als auch lokalen transkriptionalen Regulatoren: SoxR, MarR (multiple antibiotic resistance), AcR und EnvR^{199,200}. AcrR, kodiert vom *acrR* Gen, wirkt bspw. als lokaler Repressor sowohl der eigenen als auch der Überexpression des Operons *acrAB* entgegen²⁰⁰.

AcrB in *E. coli* wurde erstmalig im Jahr 1993 von *Ma, Cook et al.* beschrieben¹⁹⁰. AcrB, welches im Komplex als Pumpe fungiert, besitzt wie P-gp bzw. MRP-1/-2 ebenfalls die Fähigkeit eine große Bandbreite an strukturell vielfältigen Verbindungen, welche meist eine lipophile Komponente aufweisen, aus Zellen auszuschleusen¹⁹⁷: kationische Farbstoffe wie Acriflavine, Kristallviolett und Ethidiumbromid; Gallensäuren; Detergenzien wie Natriumdodecylsulfat; Antibiotika wie Penicilline, Cephalosporine, Makrolide, Tetracycline, Rifampicin, etc. Die Substratspezifität wird durch das periplasmatische Adaptorprotein bestimmt¹⁹⁷. Des Weiteren können Mutationen in TolC zu einer veränderten Substratspezifität führen¹⁹⁶. Die Substratspezifität wird von dem inneren Membranprotein AcrZ, welches aus 49 Aminosäuren besteht und mit AcrB wechselwirkt, mitbestimmt²⁰¹. AcrZ wurde erstmals 2012 von *Hobbs, Yin et al.* beschrieben²⁰¹. Das Vorhandensein von AcrZ ermöglicht es der AcrABZ-TolC Pumpe eine größere Vielfalt an Substraten auszuschleusen¹⁹⁸. 2014 wurde von *Du, Wang et al.* mittels Kristallstrukturanalyse der AcrB/AcrZ Komplex dargestellt¹⁹⁸.

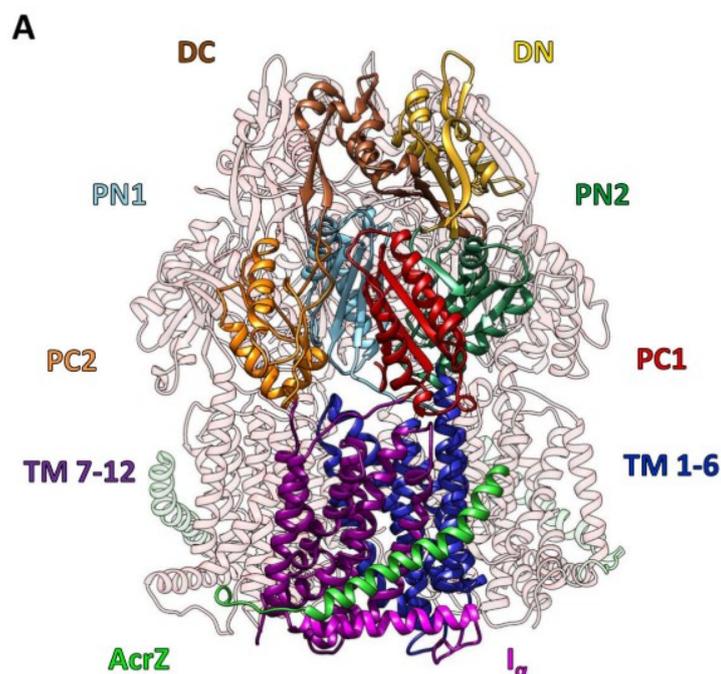


Abbildung 13: Kristallstruktur des AcrB/AcrZ Komplexes (Subdomäne: DC, DN, PN1, PN2, PC1, PC2; transmembranäre Helices: TM1-6 und TM7-12, Linking-Helix: I_α)¹⁹⁸

Bekannte Inhibitoren von AcrAB-ToIC sind u.a. Resveratrol, welches die Expression von ToIC reduziert ²⁰², und PPMO (Peptid-konjugiertes Phosphordiamidat Morpholino-Oligomer), welches die Expression der Effluxpumpe verhindert ²⁰³. Therapeutisch angewandte Modulatoren von AcrAB-ToIC können als Adjuvantien die Wirksamkeit einer Antibiotikatherapie steigern.

Der aus drei Komponenten bestehende Komplex der RND Pumpen ermöglicht es *E. coli* Antibiotika direkt in den Extrazellulärraum auszuschleusen. Wie bereits erwähnt müssen ausgepumpte Antibiotika für das erneute Eindringen ins Innere der Zelle die aufgrund ihres Aufbaus schwer permeable äußere Membranbarriere überwinden ¹⁹⁷.

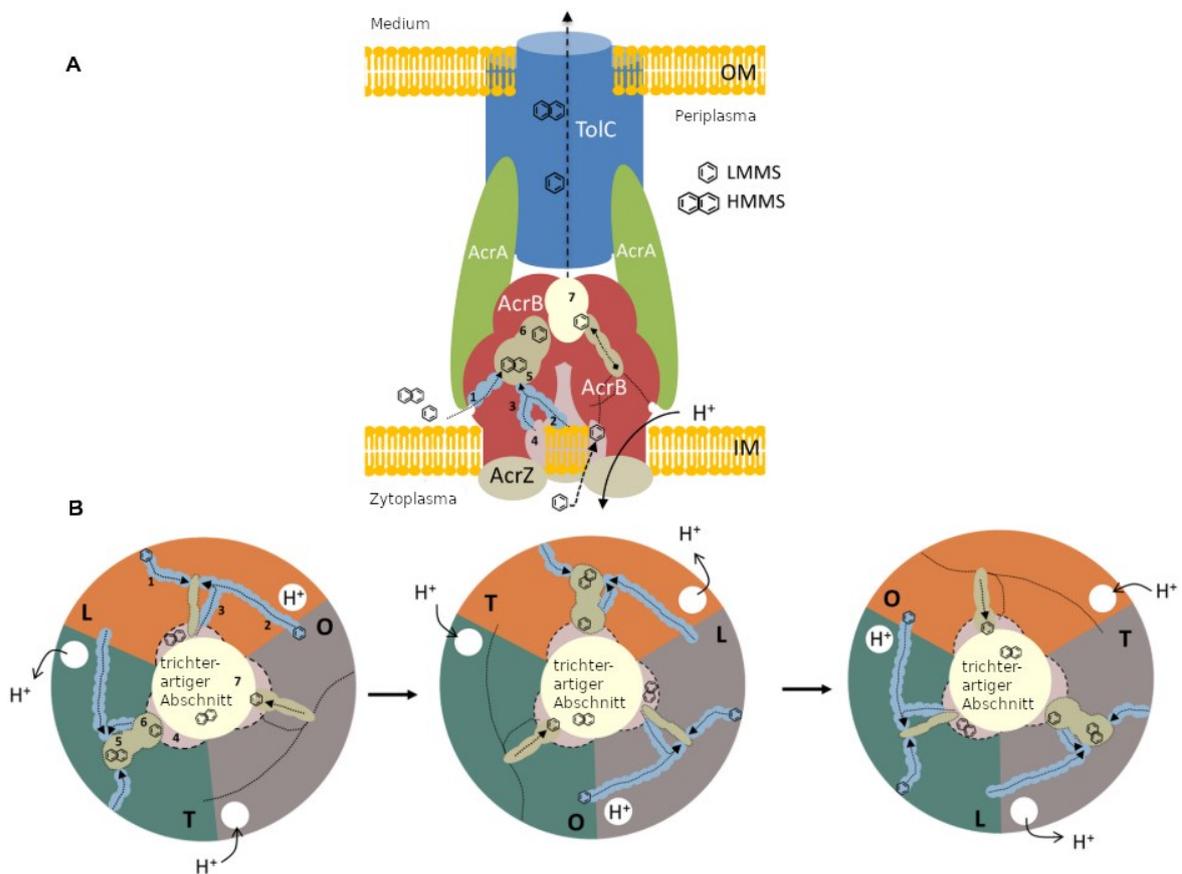


Abbildung 14: Transportmechanismus von AcrABZ-ToIC Effluxpumpe. A: Seitenansicht, B: Draufsicht, OM: äußere Membran, IM: innere Membran, 1: untere äußere Vertiefung, 2: Vesitublarkanal, 3: zentraler Hohlraumkanal, 4: zentraler Hohlraum, 5: proximale Bindungstasche, 6: distale Bindungstasche, 7: zentraler Trichter (trichterartiger Abschnitt), LMMS: Substrat mit niedriger Molekülmasse, HMMS: Substrate mit hoher Molekülmasse. Modifiziert nach ¹⁹⁴

In der apo-Form besitzt der AcrB Trimer eine LLL-Konformation, durch Substratbindung wird diese Konformation in eine asymmetrische Konformation (LTO) umgewandelt ²⁰⁴⁻²⁰⁶. Die Bindung eines Substrates verursacht durch Konformationsänderungen in AcrB und AcrA eine Öffnung des ToIC Kanals ²⁰⁴. Substrate werden dabei von der Effluxpumpe aus dem Periplasma heraus

aufgenommen und durch die verschiedenen Konformationszustände der Protomere von AcrB in einem sog. „funktionalen Rotationsmechanismus“ (functionally rotating mechanism) aus der Zelle transportiert ²⁰⁷. Im Zuge des Substrattransportprozesses durchlaufen die Protomere von AcrB drei verschiedene Konformationszustände: von „access“ (L, loose) über „binding“ (T, tight) zu „extrusion“ (O, open) ¹⁹⁴. Abbildung Nr. 18 zeigt einen genaueren Einblick über den Transportmechanismus der AcrABZ-TolC Effluxpumpe ¹⁹⁴.

Mithilfe von Kristallstrukturanalysen mit unterschiedlichen AcrB Substraten konnten zwei Substratbindungstaschen für AcrB, welche durch ein 11 Aminosäuren-langes „switch loop motif“ voneinander getrennt sind, identifiziert werden ²⁰⁸⁻²¹⁰. Es wird zwischen einer proximalen und einer distalen Bindungstasche (PBP: proximal binding pocket, DBP: distal binding pocket) unterschieden ¹⁹⁵. Die distale Bindungstasche ist eine hydrophobe Bindungstasche und befindet sich in der periplasmatischen Domäne, lokalisiert im „binding“ Protomer ¹⁹⁵. Die proximale Bindungstasche befindet sich hingegen im „access“ Protomer ¹⁹⁵. Substrate mit einem hohen Molekulargewicht interagieren zuerst mit der proximalen und anschließend, nach einer Veränderung der Konformation in der Loopregion, mit der distalen Bindungstasche ²⁰⁸. Substrate mit einem niedrigen Molekulargewicht binden direkt an die distale Bindungstasche ²⁰⁸. RND Effluxpumpeninhibitoren interagieren bevorzugt mit der distalen Bindungstasche, wodurch durch Unterbindung des „Rotationsmechanismus“ der Efflux von Antibiotika aus den Bakterienzellen verhindert werden kann ¹⁹¹.

Wie im vorherigen Abschnitt „Resistance-Nodulation-Cell Division Effluxpumpen (RND-Effluxpumpen)“ beschrieben bestehen RND Pumpen aus drei Komponenten. Im Falle von AcrAB-TolC sind dies die RND-Pumpe AcrB, lokalisiert an der Zytoplasmamembran, das periplasmatische Adaptorprotein AcrB und das äußere Membranprotein TolC. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen sowohl einen schematischen Aufbau der RND Effluxpumpe AcrAB-TolC als auch die durch Kristallstrukturanalyse charakterisierte Struktur des AcrAB(Z)-TolC Komplexes ^{191,209}.

Grundlagen

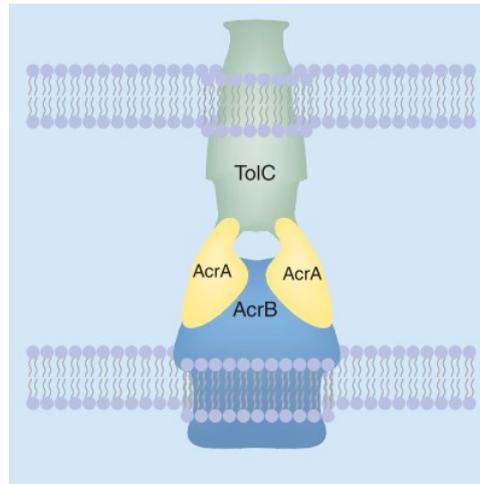


Abbildung 15: schematischer Aufbau der RND Effluxpumpe AcrAB-TolC ¹⁹¹

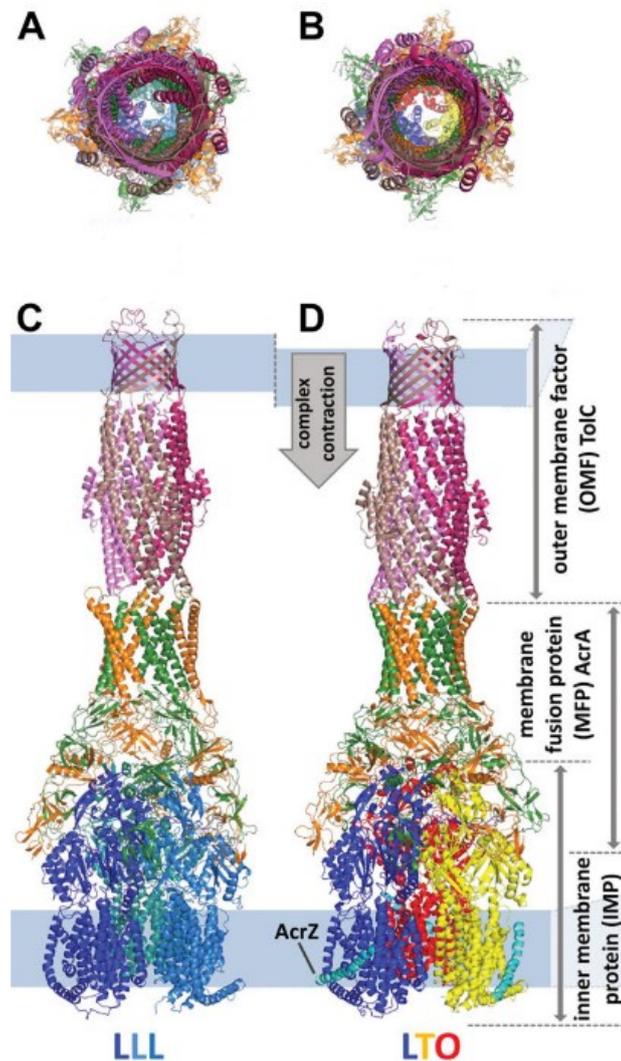


Abbildung 16: Kristallstruktur des AcrAB(Z)-TolC Effluxpumpe. A, C: symmetrische (inaktive) LLL-Konformation; B, D: asymmetrische (aktive) LTO-Konformation ²⁰⁹

Grundlagen

Die drei Komponenten AcrB/AcrA/TolC liegen in folgender Stöchiometrie vor: 3:6:3¹⁹⁸. AcrA ist 397 Aminosäuren lang und dient der Verbindung von AcrB und TolC²⁰⁹. Mithilfe von Kristallstrukturanalysen von AcrB bei einer Auflösung von 3,5 Å konnte gezeigt werden, dass die drei Protomere von AcrB als Homotrimer vorliegen²¹¹. AcrB besitzt zwei transmembranäre Domänen mit insgesamt zwölf transmembranären Helices, welche zwei „loops“ zwischen TM1 und TM2 bzw. TM7 und TM8 besitzen, die sich im Periplasma befinden^{197,209}. AcrB nimmt seine Substrate aus dem Periplasma oder aus der äußeren Schicht der Zytoplasmamembran auf²⁰⁹. Die „proton motive force“, welche eine Konformationsänderung in AcrB verursacht, führt zum Transport von Substraten aus der Zelle¹⁹⁵. Die beiden TMDs weisen eine pseudosymmetrische Struktur auf und bestehen jeweils aus sechs transmembranären Helices²⁰⁹. AcrB rekrutiert zunächst AcrA und bildet ein Zwei-Komponenten-System²¹². Dieses Zwei-Komponenten-System rekrutiert anschließend TolC, um das vollständige Drei-Komponenten-System zu bilden²¹². TolC wurde erstmalig im Jahr 2000 von *Koronakis, Sharff et al.* beschrieben²¹³. Zur Durchführung des Substrattransports formen drei TolC Protomere einen „Tunnel“, welcher der Ausschleusung dient²¹³. Der Tunnel ist mit einer zentralen Kavität verbunden, welche wiederum über kleine Öffnungen („vestibules“) verfügt, welche zum Periplasma reichen und dort Substrate aufnehmen können (siehe auch Abbildung 18)²¹¹. Die Substrate werden dann von der zentralen Kavität weiter zu einem trichterartigen Abschnitt von AcrB zu dem „Tunnel“ der TolC Protomere und anschließend aus der Zelle herausgeleitet^{197,211}.

3. Zielstellung dieser Arbeit

Die Entwicklung und Evaluation neuartiger modulierender Arzneistoffe, welche einer durch transmembranäre Transporterproteine vermittelten Multidrug-Resistance gegenüber herkömmlichen Zytostatika bzw. Antibiotika entgegenwirken und somit deren Wirkung wiederherstellen können, sind von hohem Interesse für die Therapie von Krebserkrankungen und bakteriellen Infektionen. Des Weiteren sind auch neuartige antibakterielle Wirkstoffe sowie Verbindungen, welche die Wirkung von in der Therapie von bakteriellen Infektionen etablierten Antibiotika verstärken bzw. wiederherstellen können, von besonderer Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Derivate von asymmetrischen 1,4-Dihydropyridinen als potenzielle MDR-modulierende Verbindungen mithilfe einer zweistufigen Synthese synthetisiert und analysiert. Die Synthese der 1,4-Dihydropyridine basiert in ihren Grundsätzen u.a. auf vorangegangenen Erkenntnissen innerhalb der Arbeitsgruppe: bereits in vergangenen Arbeiten konnte eine P-gp inhibitorische Aktivität für 1,4-Dihydropyridine aufgezeigt werden¹⁶⁰. In dieser Arbeit sollen diese Erkenntnisse weitergeführt und ergänzt werden. Die synthetisierten Derivate zeigen variierende Substituenten in den aromatischen Benzyl- bzw. Phenyl-Resten auf, wodurch Unterschiede in der Aktivität und Selektivität der Verbindungen gegenüber den Zielproteinen entstehen. Das P-gp und MRP-1/-2 inhibitorische Potential der entwickelten 1,4-Dihydropyridine und ihrer unterschiedlichen Substitution wurde untersucht. Des Weiteren werden die Verbindungen mit der höchsten P-gp modulierenden Aktivität auf ihr zytotoxisches sowie auf ihre Fähigkeit zur Resistenzüberwindung hin untersucht. Die biologische Evaluation an P-gp bzw. MRP-1/-2 exprimierenden Zellen wurde persönlich in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Ritter am Institut der Pharmazie, Universität Greifswald durchgeführt.

Neben den 1,4-Dihydropyridinen wurden symmetrische 9,10-Dihydroacridine entwickelt und analysiert. Die Synthese der 9,10-Dihydroacridine erfolgte, parallel zur Darstellung der 1,4-Dihydropyridinen, mithilfe eines zweistufigen Synthesekonzepts. Die entwickelten Verbindungen variieren in der Stellung der Methyl- bzw. Methoxy-Substituenten in den aromatischen Resten. Im Zuge der biologischen Evaluation wurde die P-gp inhibitorische Aktivität sowie die minimale inhibitorische Konzentration mithilfe verschiedener bakterieller Stämme zur Bestimmung der antibakteriellen Aktivität, das inhibitorische Potential der 9,10-Dihydroacridine gegenüber dem Effluxpumpen-System AcrAB-TolC und die potenzierende Wirkung in Kombination mit anderen Antibiotika untersucht. Die Testung der 9,10-Dihydroacridine wurde extern an der Universität Szeged (Budapest, Ungarn) unter Führung von Joseph Molnar, Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Immunbiologie vom Institut der Medizin, durchgeführt.

Zielstellung dieser Arbeit

Die gewonnenen Ergebnisse der biologischen Evaluation der 1,4-Dihydropyridine und 9,10-Dihydroacridine werden abschließend diskutiert und interpretiert.

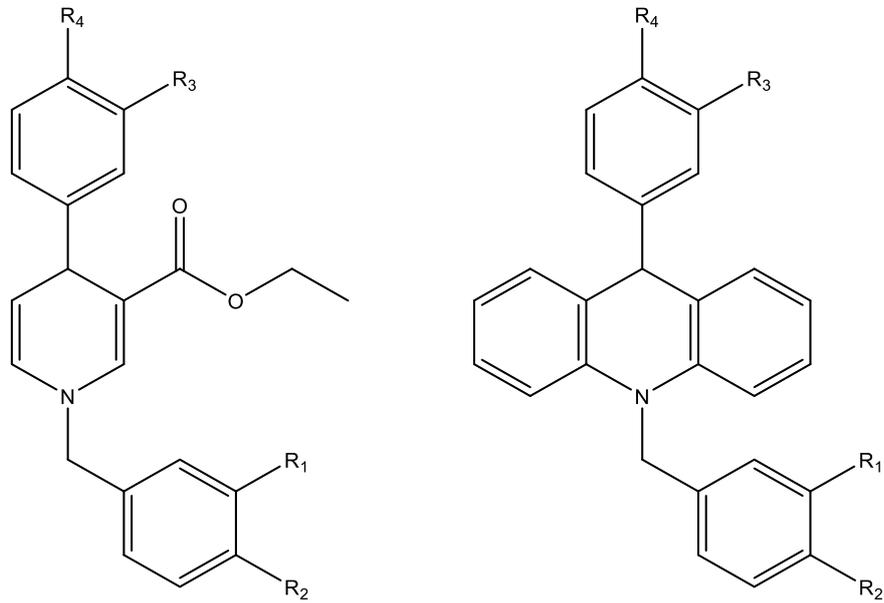


Abbildung 17: allgemeine Strukturformel der Zielverbindungen mit 1,4-Dihydropyridin Grundstruktur (links) und 9,10-Dihydroacridin Grundstruktur (rechts)

4. Synthese und analytische Untersuchung der Verbindungen

In den folgenden Abschnitten werden die Synthesen der Zwischen- und Endprodukte, sowohl der 1,4-Dihydropyridine als auch der 9,10-Dihydroacridine, beschrieben. Darüber hinaus werden die für die Strukturaufklärung durchgeführten analytischen Untersuchungen und deren Ergebnisse dargelegt und diskutiert.

4.1 Synthese der 3-substituierten 1,4-Dihydropyridine

Nifedipin ist ein Calciumkanalblocker mit 1,4-Dihydropyridin-Grundstruktur, welcher neben seiner antihypertensiven Wirkung auch MDR-modulierende Eigenschaften besitzt und ein P-gp Inhibitor der 1. Generation ist ²¹⁴. Eine Calciumkanal inhibierende Wirkung ist bei der Anwendung von MDR-Modulatoren unerwünscht und kann zu einer toxischen Wirkung führen. Analoga von Nifedipin konnten, mit einer vernachlässigbaren L-Typ Calciumkanal blockenden Wirkung, MDR-modulierende Eigenschaften aufweisen, wenn sie in Kombination mit Doxorubicin eingesetzt wurden ²¹⁵. Der Calciumkanalblocker Niguldipin besitzt ebenfalls eine 1,4-Dihydropyridin-Grundstruktur und eine MDR-modulierende Wirkung. Dessen Enantiomer Dexniguldipin, welches eine 40-fach geringere Calciumkanal inhibierende Wirkung als Niguldipin aufweist, zeigt ebenfalls eine MDR-modulierende Wirkung, was zu dem Schluss führt, dass die MDR-modulierende Aktivität dieser Enantiomere unabhängig von ihrer Calciumkanal inhibierenden Wirkung ist ²¹⁶. Die 1,4-Dihydropyridine der Klasse der Calciumkanalblocker dienen als Ausgangspunkt für die Synthese neuartiger MDR-Modulatoren, welche keinen Einfluss auf das kardiovaskuläre System haben. Die 1,4-Dihydropyridin-Grundstruktur kann z.B. auf der einen Seite durch die Einführung von aromatischen Substituenten am Stickstoff bzw. an Position 4, auf der anderen Seite durch die Einbringung von Substituenten am 1,4-Dihydropyridin-Ring an Position 2 und 6 bzw. an Position 3 und 5 modifiziert werden, wodurch die Aktivität gegenüber ABC-Transportern erhöht werden kann.

Die Darstellung der in dieser Arbeit synthetisierten 3-substituierten 1,4-Dihydropyridine geht von einem zweistufigen Synthesekonzept aus. In einem ersten Schritt erfolgt die N-Alkylierung des Nikotinsäureethylesters (auch: Ethylnikotinat). In einem zweiten Schritt werden aus den im ersten Schritt entstandenen Zwischenprodukten, den N-Benzylpyridinium Verbindungen, mittels Arylation die Zielstrukturen, die 1,4-Dihydropyridine.

4.1.1 N-Alkylierung von Nikotinsäureethylester

Als Ausgangsverbindung für die Synthese der Zwischenprodukte wurde der kommerziell erwerbliche Nikotinsäureethylester, eine 3-substituierte Pyridinverbindung, verwendet.

Bei früheren Testungen mit 1,4-Dihydropyridinen konnte gezeigt werden, dass die Ethylester-Funktion einer Methyl ester-Funktion überlegen ist und zu höheren Aktivitäten gegenüber P-gp führt¹⁶⁰. Die Ethylester-Gruppe besitzt im Vergleich zu der Methyl ester-Gruppe eine längere Alkylkette, welche für die P-gp Inhibition relevant ist.

Im Zuge der N-Alkylierung wurde Nikotinsäureethylester ohne Verwendung eines Lösungsmittels mit je einem von vier verschiedenen Benzylhalogeniden umgesetzt, wodurch die vier N-Benzyl-Pyridiniumionen Verbindungen **P01** bis **P04** entstanden. Die folgende Abbildung und Tabelle Nr. 6 gibt eine Übersicht über den stattgefundenen Reaktionsweg und über die synthetisierten Intermediate:

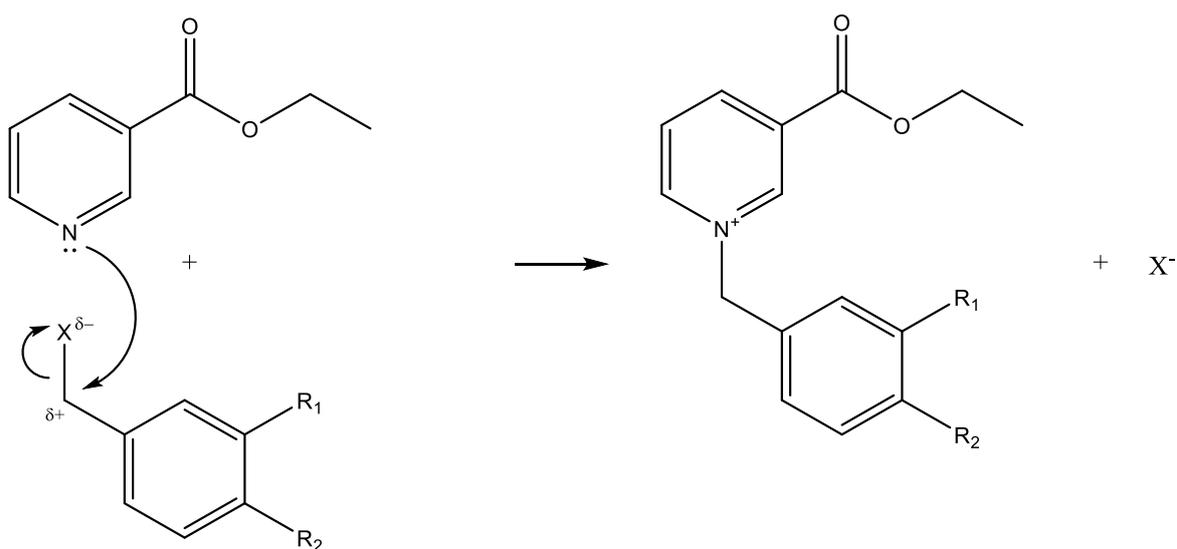


Abbildung 18: Darstellung N-Alkylierung von Nikotinsäureethylester (X: Halogenid)

Bezeichnung	R ₁	R ₂
P01	-OCH ₃	-H
P02	-H	-OCH ₃
P03	-CH ₃	-H
P04	-H	-CH ₃

Tabelle 5: Substitutionsmuster N-Benzyl-Pyridiniumionen Verbindungen

Die genauen Details des Ablaufs der Synthese sind in der AAV1 im Experimentellen Teil geschildert.

Bei der Reaktion handelt es sich um eine nukleophile Substitution. Der Nikotinsäureethylester, welcher ein freies, nicht am π -System des heteroaromatischen Rings beteiligtes Elektronenpaar am Stickstoff aufweist, fungiert als Nukleophil. Das freie Elektronenpaar des Stickstoffs interagiert mit dem partiell positiv geladenen Kohlenstoff des Benzylhalogenids, wodurch eine neue Bindung entsteht. Folgende kommerziell erwerbliche Benzylhalogenide wurden für die Synthese der Zwischenprodukte eingesetzt: 3-Methoxybenzylchlorid, 4-Methoxybenzylchlorid, 3-Methylbenzylchlorid und 4-Methylbenzylbromid. Der Polarisierung der Bindung liegt die direkte Nachbarschaft des Kohlenstoffs des Benzylhalogenids zum Chlorid bzw. Bromid zugrunde. Das Halogenatom dient als Abgangsgruppe und wird im Zuge der Substitution abgespalten. Als Endprodukt erhält man eine Pyridiniumverbindung, welche eine positive Ladung am Stickstoffatom besitzt. Die positive Ladung liegt mesomeriestabilisiert im heteroaromatischen System an den Positionen 2, 4 und 6 vor. Diese Positionen eignen sich durch die positive Ladung für einen nukleophilen Angriff durch ein Grignard-Reagenz, siehe Abschnitt „Arylation der N-Benzylpyridinium Verbindungen“. Nachfolgende Abbildung zeigt die Resonanzstrukturen einer Pyridiniumverbindung:

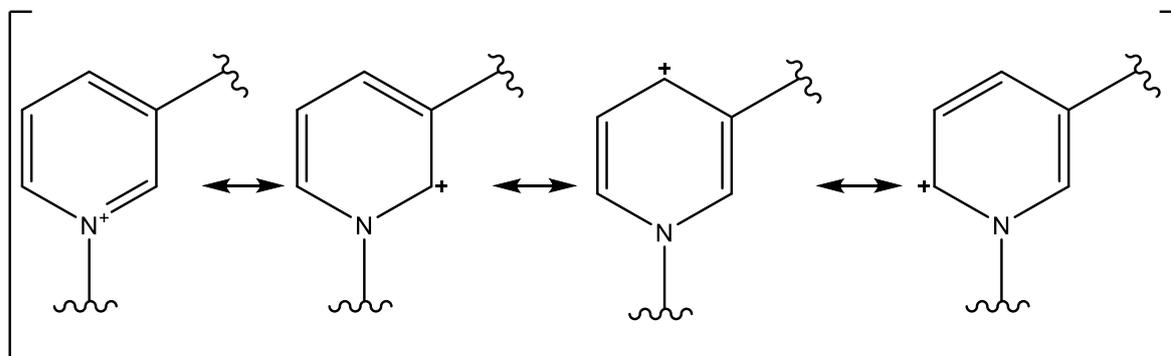


Abbildung 19: Resonanzstrukturen der Pyridiniumverbindung

Es konnten Ausbeuten von bis zu 81 % erzielt werden. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass nur diejenigen Verbindungen sich als Feststoffe auskristallisieren ließen, welche in ihrem Benzylrest in Position 3 substituiert sind (Methoxy- bzw. Methylgruppe). Diese Zwischenprodukte konnten als weißes bis blassgelbes Pulver erhalten werden. Die in Position 4 im Benzylring substituierten Verbindungen stellen zähviskose farblose Flüssigkeiten dar.

4.1.2 Arylation der N-Benzylpyridinium Verbindungen

Die Synthese symmetrischer 1,4-Dihydropyridine erfolgt häufig mithilfe der Hantzschschen Dihydropyridinsynthese²¹⁷ unter Verwendung von Ammoniak bzw. eines primären aliphatischen Amins, eines aromatischen Aldehyds und einer Dicarboxylverbindung. Ein Beispiel für diese Synthese ist die des symmetrischen Nifedipins: hier werden Ammoniak, 2-Nitrobenzaldehyd und Acetessigsäuremethylester eingesetzt. Die in dieser Arbeit synthetisierten 1,4-Dihydropyridine sind asymmetrisch und wurden dementsprechend nicht mittels Hantzschscher Dihydropyridinsynthese gewonnen.

Die aus dem ersten Schritt des Synthesekonzepts gewonnenen Pyridiniumverbindungen werden in diesem Schritt mit organometallischen Grignard-Reagenzien umgesetzt, wodurch asymmetrisch substituierte 1,4-Dihydropyridine entstehen, welche in Position 4 einen Arylsubstituenten besitzen. Folgende Grignard-Reagenzien wurden eingesetzt: 3-Methoxyphenylmagnesiumbromid, 4-Methoxyphenylmagnesiumbromid, m-Tolylmagnesiumchlorid, p-Tolylmagnesiumbromid und 3,4-Dimethoxyphenylmagnesiumbromid. Die verwendeten Grignard-Reagenzien wurden kommerziell erworben. Die unterschiedlichen Grignard-Reagenzien führen dazu, dass die in Position 4 des Pyridin-Rings eingeführten Substituenten variabel sind. Die positive Ladung des Ringstickstoffs in den Zwischenprodukten liegt delokalisiert vor, wodurch ein nukleophiler Angriff des jeweiligen Grignard-Reagenz am Pyridinring ermöglicht wird. Mithilfe des eingesetzten Katalysators Kupfer(I)-iodid sowie Lithiumchlorid erfolgt eine regioselektive Arylation in Position 4 des Pyridin-Rings (siehe unten für weitere Details). Die folgende Abbildung und Tabelle Nr. 7 zeigt den 2. Schritt der zweistufigen Synthese zur Gewinnung von 1,4-Dihydropyridinen sowie eine Übersicht über die synthetisierten Zielstrukturen:

Synthese und analytische Untersuchung der Verbindungen

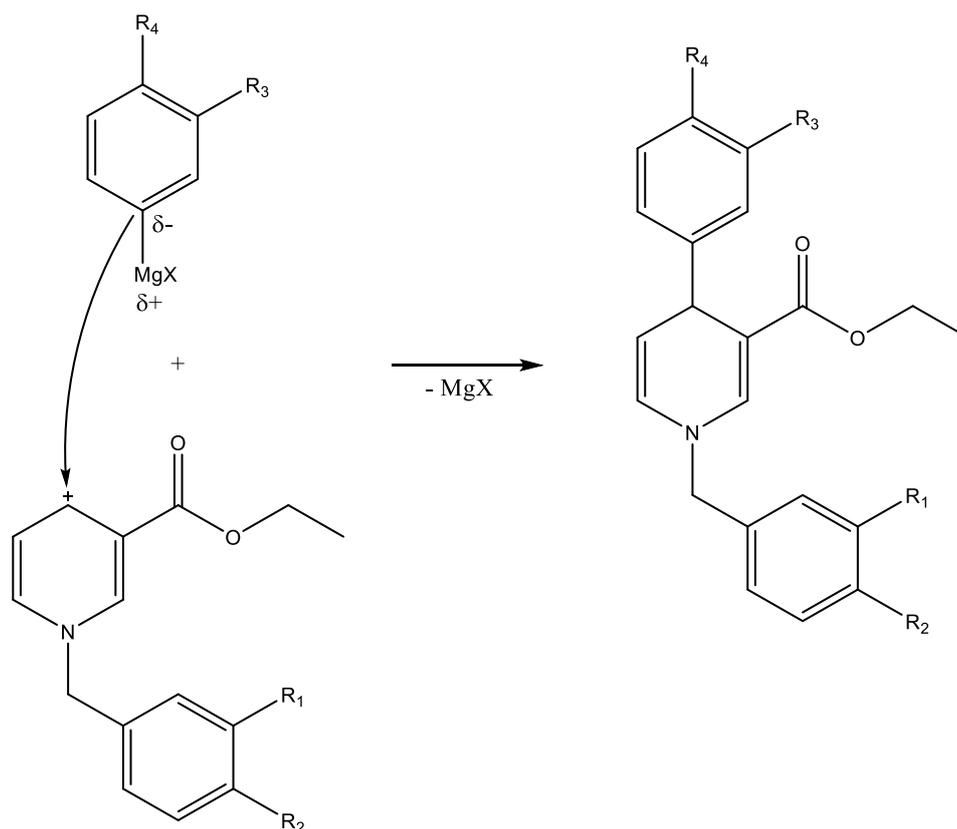


Abbildung 20: Darstellung Arylation der N-Benzylpyridinium Verbindungen

Bezeichnung	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
DHP01	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃
DHP02	-H	-OCH ₃	-H	-OCH ₃
DHP03	-CH ₃	-H	-H	-OCH ₃
DHP04	-H	-CH ₃	-H	-OCH ₃
DHP05	-OCH ₃	-H	-H	-CH ₃
DHP06	-H	-OCH ₃	-H	-CH ₃
DHP07	-CH ₃	-H	-H	-CH ₃
DHP08	-H	-CH ₃	-H	-CH ₃
DHP09	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H
DHP10	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H
DHP11	-CH ₃	-H	-OCH ₃	-H
DHP12	-H	-CH ₃	-OCH ₃	-H
DHP13	-OCH ₃	-H	-CH ₃	-H
DHP14	-H	-OCH ₃	-CH ₃	-H
DHP15	-CH ₃	-H	-CH ₃	-H
DHP16	-H	-CH ₃	-CH ₃	-H

Synthese und analytische Untersuchung der Verbindungen

DHP17	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-OCH ₃
DHP18	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃
DHP19	-CH ₃	-H	-OCH ₃	-OCH ₃
DHP20	-H	-CH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃

Tabelle 6: Substitutionsmuster 1,4-Dihydropyridin Verbindungen

Im Folgenden soll die Synthese der 1,4-Dihydropyridine kurz wiedergegeben werden; eine ausführliche Beschreibung der Synthese ist in der AAV2 im Abschnitt „Synthese der Verbindungen“ dargelegt. Zu Beginn wird das als Zwischenprodukt gewonnene N-Benzylpyridinium Kation in absoluten Tetrahydrofuran (THF) suspendiert bzw. gelöst (je nachdem, ob das Zwischenprodukt als Feststoff oder als zähviskose Flüssigkeit vorliegt). Danach werden bei Raumtemperatur der Katalysator Kupfer(I)-iodid, zusammen mit Lithiumchlorid, und das entsprechende Grignard-Reagenz hinzugegeben. Die Estergruppe des heterocyclischen Ring in Position 3 hindert sterisch gesehen einen nukleophiler Angriff von Grignard-Reagenzien, die einen Substituenten in ortho-Stellung haben ²¹⁸. Nur Grignard-Reagenzien mit meta- bzw. para-Substituenten führen zu 1,4-Dihydropyridinen. Die Esterfunktion ist eine elektronenziehende Gruppe, welche in Position 3 bzw. 5 das mesomere System des Rings erweitert und stabilisiert ²¹⁹. Am Ende der Reaktion wird das gewonnene Produkt gewaschen und säulenchromatographisch aufgearbeitet. Dadurch enthält man ein gelbfarbenes, öliges Endprodukt.

Diese Endprodukte wurden unter Argonatmosphäre gelagert, um eine Oxidationsreaktion des Dihydropyridin-Rings zum korrespondierenden Pyridin-Ring zu verhindern. Eine Oxidation des Dihydropyridin-Rings konnte bei N-Carbomethoxydihydropyridinen beobachtet werden, wenn diese für einen längeren Zeitraum bei Raumtemperatur Luftsauerstoff ausgesetzt sind ²²⁰. Eine Lagerung unter Argonatmosphäre und bei einer Temperatur von – 30°C führte dazu, dass keine Oxidation des Rings mehr stattfand ²²⁰. Diese beiden Erkenntnisse konnten auch bei den in dieser Arbeit vorgestellten 1,4-Dihydropyridin Verbindungen mithilfe einer dünnschichtchromatographischen Untersuchung beobachtet werden. Die Lagerung der gewonnenen Endprodukte erfolgte unter Argonatmosphäre und im Tiefkühlschrank. Durch diese Maßnahmen konnten bis zum Ende der praktischen Arbeiten an dieser Dissertation keine Oxidationen beobachtet werden.

Abgesehen von **DHP07**, **DHP08**, **DHP15** und **DHP16** weisen alle synthetisierten 1,4-Dihydropyridine mindestens eine Methoxy-Gruppe, entweder im Phenyl- oder im N-Benzyl-Substituenten, auf. Diese Methoxy-Gruppen können als Wasserstoffbrückenakzeptoren fungieren und mit den Bindungsregionen der ABC-Transporter wechselwirken. Bisherige Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe ergaben für 1,4-Dihydrochinoline, dass die Verbindungen, welche im

Phenylrest eine 3,4-Dimethoxy-Gruppe anstelle einer 3,5-Dimethoxy-Gruppe besitzen, eine leicht erhöhte P-gp inhibitorischen Aktivität aufweisen²²¹. Ebenfalls konnte bei der biologischen Evaluation von synthetisierten Flavonen und Benzoflavonen, welche zur Untersuchung der Inhibition des ABC-Transporters BCRP entwickelt wurden, gezeigt werden, dass im Vergleich zu den anderen getesteten Verbindungen eine Substitution des Phenylrings mit einer 3,4-Dimethoxy-Gruppe eine erhöhte Aktivität zur Folge hatte²²². Diese Erkenntnis steht im Einklang mit der Tatsache, dass Verapamil, ein P-gp Inhibitor der ersten Generation, der häufig als Referenzsubstanz in der durchflusszytometrischen Untersuchung zur Bestimmung der P-gp modulierenden Fähigkeiten einer Substanz eingesetzt wird, ebenfalls zwei aromatische Regionen mit 3,4-Dimethoxy-Gruppen aufweist. Zwischen diesen beiden aromatischen Bereichen befindet sich eine Amingruppe, welche als basische Linker-Region fungiert. Wie bereits im Abschnitt „P-Glykoprotein (P-gp)“ beschrieben, ist eine basische Amingruppe, welche bei einem physiologischen pH-Wert protoniert vorliegt, ein wichtiges Strukturmerkmal von P-gp Modulatoren. Alle synthetisierten 1,4-Dihydropyridine besitzen ebenfalls einen für P-gp Modulatoren relevanten logP-Wert von mindestens 2,92, genauer gesagt zwischen 3,95 und 5,3 (bezogen auf die von ChemDraw Ultra 13.0 geschätzten logP-Werten).

Eine Hydrolysierbarkeit der gewonnenen Verbindungen wird durch die vorhandene Ethylester-Gruppe unterbunden. Die Ethylester-Gruppe steht in Konjugation mit dem Stickstoff des Dihydropyridin-Rings und stellt eine vinyloge Carbamid-Funktion dar. Diese vinyloge Carbamid-Funktion erschwert eine saure oder basische Hydrolyse des Esters. Entsprechende Pyridin-Analoga, welche keine vinyloge Carbamid-Funktion aufweisen, sind erwartungsgemäß leichter hydrolysierbar. Die folgende Abbildung verdeutlicht die vinyloge Carbamid-Gruppe:

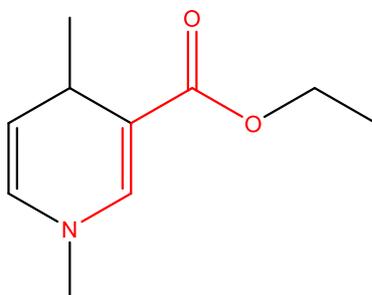


Abbildung 21: vinyloge Carbamid-Funktion der 1,4-Dihydropyridine (rot markiert)

Der 1,4-Dihydropyridin-Ring liegt in einer sog. Bootkonformation vor²²³. Hierbei liegen das Stickstoffatom sowie das Kohlenstoffatom in Position 4 nicht in der Ebene, welche von den Kohlenstoffatomen in Position 2, 3, 5 und 6 gebildet wird. Die Bootkonformation neigt dabei zu „flippen“; die nicht in der Ebene liegenden Bereiche des Rings können dabei sowohl ober- als auch

unterhalb der Ringebene liegen und jeweils ineinander übergehen^{224,225}. Der 4-Arylsubstituent besitzt eine pseudoaxiale Orientierung und schneidet die Ringebene in einem rechten Winkel²²⁴. Die freie Drehbarkeit des 4-Arylsubstituenten kann durch Substituenten in Position 3 bzw. 5 im 1,4-Dihydropyridin-Ring sterisch behindert sein¹⁶⁰. Ebenfalls können Substituenten in Position 2 bzw. 6 im 1,4-Dihydropyridin-Ring zu einer sterischen Hinderung führen²²⁶. Substituenten des Phenylrings, welche sich in meta- oder para-Position befinden, haben keinen Einfluss auf die Flexibilität des 1,4-Dihydropyridin-Rings²²⁷. Eine hohe konformationelle Flexibilität ermöglicht den 1,4-Dihydropyridinen sich der Bindungstasche der ABC-Transporter anzupassen und effektiv mit diesen zu interagieren. Die folgende Abbildung zeigt die Bootkonformation der 1,4-Dihydropyridine:

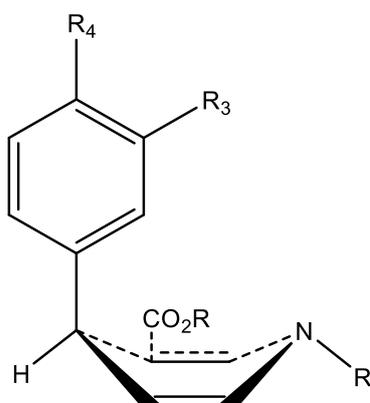


Abbildung 22: Bootkonformation 1,4-Dihydropyridine (Ethylrest der Ethylestergruppe sowie der Benzylrest am Stickstoff sind jeweils mit „R“ abgekürzt)

Es ist bekannt, dass eine große Anzahl von 1,4-Dihydropyridinen unter Einwirkung von UV-Licht (Wellenlänge: 254 nm) Fluoreszenzeigenschaften besitzen. Pyridin und Pyridinium zeigen keine Fluoreszenz. Die Fluoreszenz von Dihydropyridinen kann z.T. zur Unterscheidung von 1,2- bzw. 1,6- zu 1,4-Dihydropyridinen dienen²²⁸. Charakteristisch für 1,4-Dihydropyridine ist eine intensiv blaue bis blauviolette Fluoreszenz, welche sowohl im gelösten als auch im ungelösten Zustand beobachtbar ist²²⁸. Diese Fluoreszenz kann durch die Anwesenheit von Substituenten abgeschwächt sein bzw. verloren gehen. So weisen einige am Stickstoff methylierten symmetrischen 1,4-Dihydropyridine im Vergleich zu ihren unmethylierten Analoga keine Fluoreszenz auf²²⁹. Ebenfalls kann die Einführung von Methyl-Gruppen in die Positionen 2 und 6 des 1,4-Dihydropyridin-Rings dazu führen, dass die Fluoreszenz verloren geht²³⁰. *Sueki, Takei et al.* haben 2014 untersucht, wie sich die Fluoreszenzeigenschaften von 2,6-unsubstituierten Dihydropyridinen durch die Einführung von elektronenschiebenden Substituenten am Stickstoffatom und von elektronenziehenden Substituenten an den Positionen 3 und 5 verändern²³⁰. Ein Ergebnis dieser Untersuchung ist, dass eine elektronenziehende Ethoxycarbonyl-Gruppe in

den Positionen 3 und 5 zu einer starken Fluoreszenz führt, da diese Gruppe Teil des konjugierten Elektronensystems des Dihydropyridin-Rings ist und dieses erweitert²³⁰. Ein solches konjugiertes Elektronensystem nennt man Chromophor bzw. Fluorophor. Ebenfalls kann sich das freie Elektronenpaar des Stickstoffs am konjugierten Elektronensystem beteiligen. Die Elektronen des Chromophors gelangen durch Absorption von Licht vom Grundzustand in einen angeregten Zustand. Die Anregungsenergie wird als Fluoreszenzlicht emittiert, wodurch die Elektronen wieder in den Grundzustand gelangen. Dieses Fluoreszenzlicht ist im Vergleich zum absorbierten Licht in den längerwelligen Bereich des elektromagnetischen Wellenspektrums verschoben. Die im Verlauf dieser Arbeit entwickelten 1,4-Dihydropyridine fluoreszieren alle unter den Einfluss von ultraviolettem Licht mit einer charakteristischen intensiv blauen Farbe.

Für verschiedene 1,4-Dihydropyridine konnte durch Untersuchungen gezeigt werden, dass diese Verbindungen sensitiv gegenüber Tageslicht bzw. UV-Licht sind. Bei Nifedipin wird zum einen die Nitrogruppe unter Einwirkung von Tageslicht durch eine intramolekulare photochemische Redox-Reaktion zu einer Nitroso-Gruppe reduziert, zum anderen wird der 1,4-Dihydropyridin-Ring durch Einwirkung von Tageslicht oder UV-Licht zu einem Pyridin-Ring oxidiert²³¹⁻²³³. Für die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten 1,4-Dihydropyridine konnte beobachtet werden, dass eine Lagerung bei Tageslicht innerhalb weniger Tage dazu führte, dass sich die gelbfarbenen Produkte bräunlich verfärbten. Diese Verfärbung kann u.a. auf eine stattgefundenene Photooxidation zurückgeführt werden. Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen wurden lichtgeschützt gelagert. Die Lichtempfindlichkeit der 1,4-Dihydropyridine kann auch zur Bildung von Käfigdimeren ausgenutzt werden²³⁴. Diese Photodimerisierungsreaktion wurde im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht durchgeführt.

Für die Reaktion der N-Benzylpyridinium Verbindungen mit den entsprechenden Grignard-Reagenzien wird als Katalysator Kupfer(I)-iodid zusammen mit Lithiumchlorid eingesetzt. Das Lösungsmittel bei diesem Syntheseschritt ist abs. Tetrahydrofuran (THF). Das Lithiumchlorid dient der Steigerung der Löslichkeit des Kupfer(I)-iodids. Kupfer(I)-iodid und Lithiumchlorid bilden den leicht löslichen Komplex $\text{CuI} \cdot 2\text{LiCl}$. Bei früheren Reaktionen von Pyridinverbindungen mit Organometall-Verbindungen wurde anstelle von Lithiumchlorid der geruchsintensive Thioether Dimethylsulfid (Me_2S) verwendet²³⁵. Dimethylsulfid steigert die Löslichkeit von Kupfer(I)-iodid nicht so stark wie Lithiumchlorid und führt teilweise bei niedrigen Temperaturen zur Bildung von Suspensionen²³⁵. Neben diesen Gründen und der Geruchsbelastung wurde von der Verwendung von Dimethylsulfid abgesehen. Der Katalysator bewirkt, dass der Phenyl-Substituent aufgrund der Ladungsverteilung der N-Benzylpyridinium Verbindung in Position 4 des heterocyclischen Pyridinrings regioselektiv in hohen Ausbeuten eingefügt wird^{236,237}. Der Katalysator Kupfer(I)-iodid bildet mit den Grignard-Reagenzien intermediär die sehr reaktiven Normant-Reagenzien

(= organische Kupfer-Magnesium-Verbindungen). Ohne den Einsatz von katalytischen Mengen von Kupfer(I)-iodid würde das Grignard-Reagenz neben der Position 4 auch die Position 6 angreifen. Position 2 ist sterisch gehindert durch das Vorhandensein der Ethylesterfunktion in Position 3 des 1,4-Dihydropyridin-Rings. Als Produkt erhält man 1,4-Dihydropyridine mit einem N-Benzyl- und einem 4-Aryl-Rest. Die asymmetrischen 1,4-Dihydropyridine liegen dabei aufgrund der Anwesenheit der Ethylester-Gruppe in Position 3 als racemisches Gemisch (R- und S-Enantiomer) vor, da ein Chiralitätszentrum an Position 4 des Dihydropyridin-Rings vorhanden ist. Die Einführung des Phenyl-Substituenten mithilfe des Grignard-Reagenz verläuft nicht stereoselektiv, wodurch die R- und S-Enantiomere zu gleichen Teilen gebildet werden. Symmetrische 1,4-Dihydropyridine, welche kein Chiralitätszentrum aufweisen, würde man durch Einführung einer Ethylester-Gruppe in Position 5 erreichen. Es erfolgte keine Auftrennung des racemischen Gemischs in die beiden vorliegenden Enantiomere.

Die Endprodukte konnten in Ausbeuten bis zu 61 % gewonnen werden. Die im Laufe der Reaktion entstandenen Nebenprodukte wurden nicht näher charakterisiert, sondern mithilfe einer säulenchromatographischen Aufreinigung von dem gewünschten Endprodukt getrennt. Die synthetisierten 1,4-Dihydropyridine haben eine gelbe Farbe und sind eine ölige Flüssigkeit. Versuche, diese ölige Flüssigkeit mittels Zugabe von Lösungsmitteln und Kühlung zu Feststoffen auszukristallisieren, u.a. mit Methanol, Ethanol, Aceton, etc., blieben erfolglos.

4.2 Synthese der 9,10-Dihydroacridine

Heterocyclische Acridin-Verbindungen besitzen aufgrund ihrer planaren tricyclischen Struktur die Eigenschaft in die Doppelstrang-DNA zu interkalieren, wodurch diese Verbindungen als Zytostatika angewendet werden können²³⁸. Ein Beispiel für eine Verbindung mit Acridin-Grundstruktur und einer zytostatischen Aktivität ist Amsacrin. Die charakteristischen Strukturelemente von DNA-interkalierenden Substanzen sind neben einer planaren, polycyclischen Chromophor-Struktur auch Seitenketten mit basischen Gruppen, welche für die Bindung mit den Nukleinbasen nötig sind²³⁸. Die klinische Anwendung von Acridin-Verbindungen als Zytostatika ist durch das Vorhandensein von unerwünschten Wirkungen eingeschränkt²³⁹.

Für eine Vielzahl an Acridinverbindungen ist bekannt, dass diese eine antiseptische und antibakterielle Wirkung gegenüber grampositiven und –negativen Erregern besitzen^{240–242}. Acridin-Derivate mit einer antiseptischen Wirkung sind z.B. Ethacridinlactat oder Acriflaviniumchlorid^{243,244}. Acridin-Verbindungen, welche eine antibakterielle Wirkung besitzen, sind u.a. Acridin-Sulfonamid Hybride oder Bisacridin-1,8-dione^{245,246}. Auch für 9,10-Dihydroacridin Verbindungen konnte bereits eine gute antibakterielle Wirkung gegenüber grampositiven multiresistenten Erregern (u.a. *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*) festgestellt werden²⁴⁷.

Neben der zytostatischen, antibakteriellen und antiseptischen Wirkung konnten auch Acridin-Verbindungen, welche die MDR überwinden können, gefunden werden²⁴⁸. Ein Beispiel hierfür wäre das bereits erwähnte Elacridar (auch: GF-120918), welches ein P-gp Inhibitor der 3. Generation ist²⁴⁹. Elacridar ist ein 9-Acridon Derivat von Acridin und erhöht durch seine MDR-modulierenden Eigenschaften die Sensibilität von Zytostatika gegenüber resistenten Zellen.

Das vorhandene Wissen über die Fähigkeit von Acridin-Derivaten, die MDR zu überwinden, sowie vorherige Untersuchungen an synthetisierten 9,10-Dihydroacridinen als neuartige MDR-Modulatoren innerhalb der Arbeitsgruppe dienten als Ausgangspunkt für die Synthese weiterer 9,10-Dihydroacridinen, welche eine potenzielle inhibitorische Wirkung an ABC-Transportern haben könnten²⁵⁰. Die synthetisierten 9,10-Dihydroacridine haben eine nonplanare Struktur und sind dementsprechend nicht in der Lage, mit der Doppelstrang-DNA zu interkalieren. Dadurch geht die eigene zytostatische Wirkung verloren, siehe auch Abschnitt „Bestimmung der zytotoxischen und antiproliferativen Wirkung der P-gp inhibierenden 9,10-Dihydroacridine mittels MTT-Assay“.

Das Wissen um Acridinverbindungen, welche antibakterielle Eigenschaften bei grampositiven und gramnegativen Erregern aufweisen, führte dazu, dass für die synthetisierten 9,10-Dihydroacridine auch der antibakterielle Effekt sowie das Potential in Kombination mit anderen Antibiotika deren

Wirkung zu potenzieren untersucht wurden. Ebenfalls wurde die modulierende Wirkung der Verbindungen auf das Effluxpumpen-System AcrAB-TolC analysiert.

Die 9,10-Dihydroacridin-Grundstruktur kann z.B. auf der einen Seite durch die Einführung von aromatischen Substituenten am Stickstoff bzw. an Position 9 in ihrer Aktivität gegenüber ABC-Transportern modifiziert werden.

Die synthetisierten Verbindungen der 1,4-Dihydropyridinen und der 9,10-Dihydroacridinen sind vergleichbar in ihrer Synthese und unterscheiden sich in der Wahl der Ausgangssubstanz (Nikotinsäureethylester bzw. Acridin). Parallel zur Darstellung der 1,4-Dihydropyridinen liegt ein zweistufiges Synthesekonzept vor. In einem ersten Schritt erfolgt die N-Alkylierung des Acridins. In einem zweiten Schritt werden aus den im ersten Schritt entstandenen Zwischenprodukten, den N-Benzylacridinium Verbindungen, mittels Arylation die Zielstrukturen, die 9,10-Dihydroacridine.

4.2.1 N-Alkylierung von Acridin

Die heteroaromatische, kommerziell erwerbliche und schwach basische Verbindung Acridin dient als Ausgangssubstanz für den ersten Schritt der Synthese der 9,10-Dihydroacridine. Acridin wird bei 105 - 115°C geschmolzen, anschließend erfolgt die Zugabe von einer Benzylhalogenid-Verbindung. Eingesetzt wurden folgende drei Benzylhalogenide: Benzylbromid, 3-Methoxybenzyljodid und 4-Methoxybenzylbromid. Als Zwischenprodukt erhält man die drei N-Benzyl-Acridiniumionen **A01** bis **A03**. Folgende Abbildung und Tabelle Nr. 8 gibt eine Übersicht über die Reaktion und über die durch die Synthese gewonnenen Zwischenprodukte:

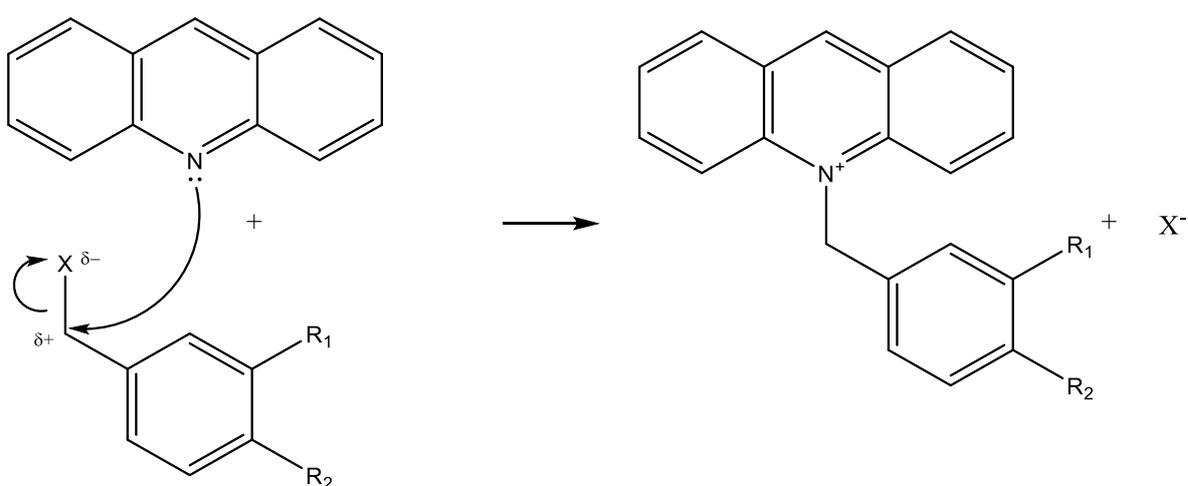


Abbildung 23: Darstellung N-Alkylierung von Acridin (X: Halogenid)

Synthese und analytische Untersuchung der Verbindungen

Bezeichnung	R ₁	R ₂
A01	-H	-H
A02	-OCH ₃	-H
A03	-H	-OCH ₃

Tabelle 7: Substitutionsmuster N-Benzyl-Acridiniumionen Verbindungen

Das Benzylhalogenid 3-Methoxybenzyljodid, welches nicht kommerziell erhältlich ist, wurde aus dem kommerziell erhältlichen 3-Methoxybenzylchlorid mithilfe der Finkelstein-Reaktion gewonnen. Für die nukleophile Substitutionsreaktion wurde 3-Methoxybenzylchlorid unter Rühren bei Raumtemperatur mit Natriumiodid, welches gelöst in Aceton vorliegt, umgesetzt. Das dabei entstehende Natriumchlorid ist in Aceton schlecht löslich und fällt in Aceton aus. Grund für die Synthese von 3-Methoxybenzyljodid war, dass beobachtet werden konnte, dass die Synthese des Zwischenprodukts **A02** nicht mit 3-Methoxybenzylchlorid möglich war. Iodid ist im Rahmen der Substitutionsreaktion eine bessere Abgangsgruppe als Chlorid, wodurch die Reaktivität mit Acridin erhöht wird.

Ebenfalls gelang die Synthese des Zwischenprodukts **A03** mit dem kommerziell verfügbaren 4-Methoxybenzylchlorid nicht. Erst die Verwendung des nicht kommerziell erhältlichen 4-Methoxybenzylbromid führte zu einer erfolgreichen Synthese von **A03**. Gewonnen wurde 4-Methoxybenzylbromid mithilfe von 4-Methoxybenzylalkohol, welches in Benzol gegeben wurde. Nach Zugabe von Bromwasserstoffsäure (62 % V/V) wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die organische Phase mit einer 1 %igen Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Mithilfe des Rotationsverdampfers wurde die organische Phase unter Vakuum verdampft. Das erhaltene Produkt besitzt eine ölige Konsistenz. Diese Reaktionsbeschreibung basiert auf der hier genannten Literaturquelle ²⁵¹. Diese Literaturquelle besagt, dass 4-Methoxybenzylbromid nur kurzfristig stabil ist ²⁵¹, weswegen es nach der Gewinnung direkt für die Synthese von **A03** verwendet wurde.

AAV3 (siehe Abschnitt „Allgemeine Arbeitsvorschriften“) gibt eine ausführliche Beschreibung der Synthese der N-Benzyl-Acridiniumionen wieder. Im Gegensatz zu der in AAV1 beschriebenen Synthese der N-Benzyl-Pyridiniumionen erfolgt nach Beendigung der Reaktion keine Extrahierung mit verschiedenen Lösungsmitteln, sondern es wurde Diethylether hinzugefügt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde mit Diethylether gewaschen und mithilfe eines Methanol/Diethylether-Gemischs (Volumenverhältnis 1:1) umkristallisiert. Alle drei Zwischenprodukte konnten als Feststoffe mit einer hellgrünen bzw. rotschwarzen Farbe gewonnen werden. Es konnten Ausbeuten von bis zu 77 % erzielt werden.

Der detaillierte Reaktionsmechanismus der Synthese der N-Benzylacridinium-Verbindungen entspricht analog dem bereits für die Synthese der N-Benzylpyridinium-Verbindungen erläuterten Mechanismus. Die positive Ladung am Stickstoff liegt delokalisiert im Acridin-Ringsystem vor, analog zur Abbildung Nr. 23 „Resonanzstrukturen der Pyridiniumverbindung“ aus dem Kapitel „N-Alkylierung von Nikotinsäureethylester“.

4.2.2 Arylation der N-Benzylacridinium Verbindungen

Entsprechend der Synthese der 1,4-Dihydropyridine werden ebenfalls die im ersten Reaktionsschritt gewonnenen Verbindungen, in diesem Fall die N-Benzylacridinium Verbindungen, mit den Grignard-Reagenzien umgesetzt. Durch die organometallische Verbindung wird in Position 9 ein (un)substituierter Phenylrest eingeführt. Als Endprodukt entstehen 9,10-Dihydroacridine, welche im Gegensatz zu den 1,4-Dihydropyridinen nicht asymmetrisch, sondern symmetrisch sind. Es wurden sechs verschiedene Grignard-Reagenzien verwendet: Phenylmagnesiumchlorid, 3-Methoxyphenylmagnesiumbromid, 4-Methoxyphenylmagnesiumbromid, m-Tolylmagnesiumchlorid, p-Tolylmagnesiumbromid und 3,4-Dimethoxyphenylmagnesiumbromid.

Die folgende Abbildung und Tabelle zeigt den 2. Schritt der zweistufigen Synthese zur Gewinnung von 9,10-Dihydroacridinen sowie eine Übersicht über die synthetisierten Zielstrukturen:

Synthese und analytische Untersuchung der Verbindungen

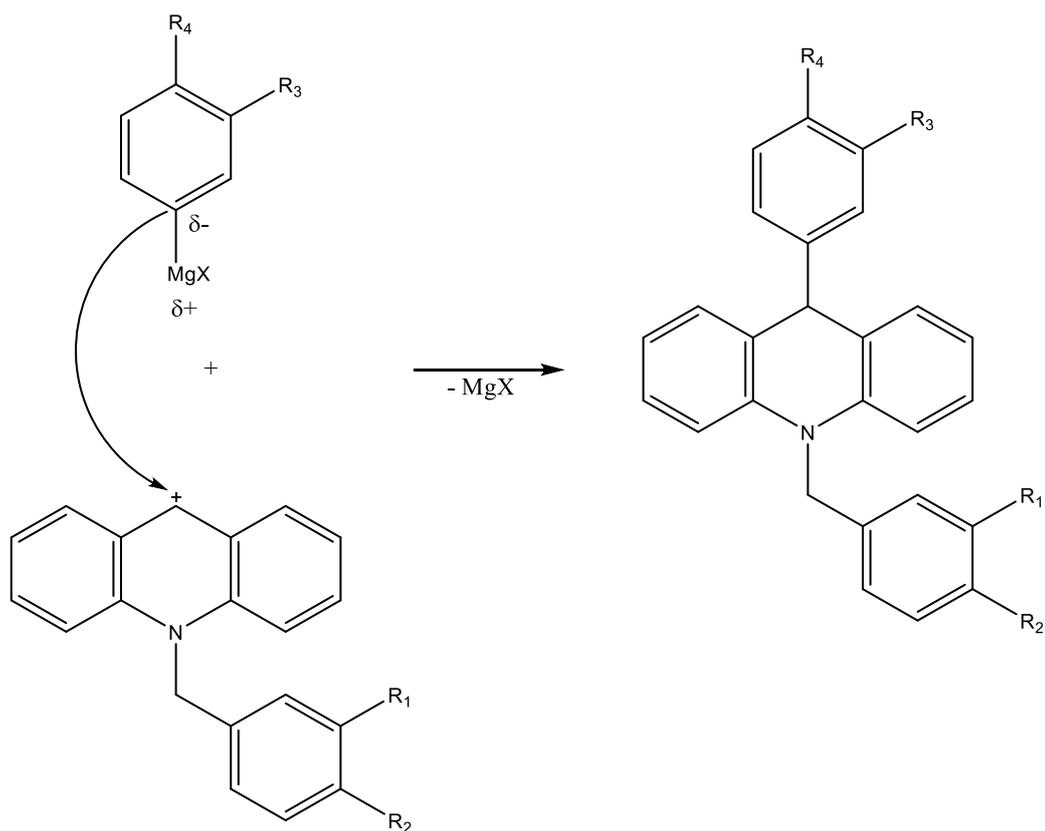


Abbildung 24: Darstellung Arylation der N-Benzylacridinium Verbindungen

Bezeichnung	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
DHA01	-H	-H	-H	-H
DHA02	-OCH ₃	-H	-H	-H
DHA03	-H	-OCH ₃	-H	-H
DHA04	-H	-H	-H	-OCH ₃
DHA05	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃
DHA06	-H	-OCH ₃	-H	-OCH ₃
DHA07	-H	-H	-H	-CH ₃
DHA08	-OCH ₃	-H	-H	-CH ₃
DHA09	-H	-OCH ₃	-H	-CH ₃
DHA10	-H	-H	-OCH ₃	-H
DHA11	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H
DHA12	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H
DHA13	-H	-H	-CH ₃	-H
DHA14	-OCH ₃	-H	-CH ₃	-H
DHA15	-H	-OCH ₃	-CH ₃	-H
DHA16	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃

DHA17	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-OCH ₃
DHA18	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃

Tabelle 8: Substitutionsmuster 9,10-Dihydroacridin Verbindungen

Im Abschnitt „Allgemeine Arbeitsvorschriften“ wird die Synthese der 9,10-Dihydroacridine in der AAV4 genauer erläutert. Die 9,10-Dihydroacridine konnten auf die gleiche Weise wie die 1,4-Dihydropyridine gewonnen werden. Unterschiede finden sich bei dem Einsatz des Lösungsmittelgemischs, welches bei der säulenchromatographischen Aufreinigung verwendet wurde, und dem Aggregatzustand der Endprodukte. Während die 1,4-Dihydropyridine gelbgefärbte, ölige Verbindungen sind, konnten die 9,10-Dihydroacridine unter Kühlung und Zugabe eines Lösungsmittel(gemisches), wie z.B. Methanol, Ethanol und Methanol/Diethylether (Volumenverhältnis 5:1), als weißer Feststoff auskristallisiert werden.

Für die 1,4-Dihydropyridine konnte beobachtet werden, dass eine Lagerung dieser Verbindungen bei Raumtemperatur zu einer Oxidation des Dihydropyridin-Rings geführt hat. Als Maßnahme gegen diese Oxidationsreaktion wurden die gewonnen 1,4-Dihydropyridine im Tiefkühlschrank unter Argonatmosphäre gelagert. Da es bei den 9,10-Dihydroacridinen nicht auszuschließen ist, dass diese zu den entsprechenden 9-Phenylacridin-Verbindungen oxidiert werden könnten, wurden diese proaktiv ebenfalls unter Argonatmosphäre und im Tiefkühlschrank gelagert. Bis zum Ende der praktischen Arbeiten an dieser Dissertation konnten durch diese getroffenen Maßnahmen keine Oxidationen beobachtet werden.

Die Verbindungen **DHA01**, **DHA02**, **DHA03**, **DHA04**, **DHA06**, **DHA10** und **DHA12** wurden bereits in einer vorherigen Arbeit auf ihr ABCB1-inhibitorisches Potential untersucht ²⁵⁰. Keine der sieben Verbindungen zeigte eine größere ABCB1-inhibitorische Wirkung als die Referenzverbindung Verapamil bei einer eingesetzten Konzentration von 10 µM ²⁵⁰. Die beiden 9,10-Dihydroacridin Verbindungen mit den größten FAR-Werten hatten im Gegensatz zu den anderen getesteten Verbindungen jeweils eine Methoxy-Gruppe im Benzyl- und im Phenyl-Rest ²⁵⁰. Als Resultat konnte festgehalten werden, dass die Einführung eines Methoxy-Substituenten die inhibitorische Fähigkeiten der 9,10-Dihydroacridine erhöhen kann ²⁵⁰. Wie bereits erwähnt können Methoxy-Gruppen als Wasserstoffbrückenakzeptoren mit den Bindungsregionen von P-gp interagieren. Das Vorhandensein eines tertiären, basischen Stickstoffatoms sowie eines hohen logP-Werts von mind. 2,92 sind, wie im Abschnitt „P-Glykoprotein (P-gp)“ beschrieben, relevante Strukturmerkmale für die Verwendung von 9,10-Dihydroacridinen als potenzielle P-gp Inhibitoren. Die 1,4-Dihydropyridine und die 9,10-Dihydroacridine unterscheiden sich u.a. durch die eingesetzte Ausgangsverbindung, Nikotinsäureethylester bzw. Acridin. Acridin besitzt im Gegensatz zu Nikotinsäureethylester keine Ethylester-Funktion. Diese Estergruppe kann ebenfalls

wie die Methoxy-Gruppen als Wasserstoffbrückenakzeptor fungieren. Da Acridin keine Estergruppe aufweist, fehlt den 9,10-Dihydroacridinen die Möglichkeit, mit den Bindungsstellen des ABCB1 mithilfe einer Estergruppe am Dihydroacridin-Ring über Wasserstoffbrücken interagieren zu können.

Die synthetisierten 9,10-Dihydroacridine sind nonplanar und besitzen eine C₂-Symmetrie. Ähnlich wie bei den 1,4-Dihydropyridinen konnte auch für die zentrale Pyridineinheit der 9,10-Dihydroacridin Verbindungen eine Bootkonformation festgestellt werden^{252–254}. Diese Bootkonformation, welche mit Röntgenkristallstrukturanalytik ermittelt wurde, liegt verzerrt vor²⁵³. Der 9-Arylsubstituent steht dabei senkrecht zur Ringebene des Acridins²⁵². Die beiden äußeren aromatischen Ringe des Acridins besitzen eine Halbsessel-Konformation²⁵³.

Acridin-Verbindungen besitzen ein großes aromatisches System, wodurch viele dieser Verbindungen unter Einwirkung von UV-Licht Fluoreszenzeigenschaften aufweisen. 9,10-Dihydroacridine, welche kein erweitertes aromatisches System besitzen, sind weniger fluoreszierend als ihre entsprechenden Acridin-Analoga²⁵⁵. Für die synthetisierten 9,10-Dihydroacridine konnte beobachtet werden, dass diese direkt nach der Synthese eine schwach gelb-orange Fluoreszenz aufzeigen. Eine weitere Beobachtung konnte im Rahmen der dünnschichtchromatographischen Analytik gemacht werden: an der Position, an welcher die jeweilige synthetisierte 9,10-Dihydroacridin-Verbindung auf der DC-Platte lokalisiert ist, konnte nach einigen Stunden ohne Einwirkung von UV-Licht eine Gelbfärbung identifiziert werden. Dies lässt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Tatsache zurückführen, dass die 9,10-Dihydroacridine auf der DC-Platte innerhalb einiger Stunden zu den korrespondierenden Acridin-Verbindungen oxidiert werden und dadurch ein chromophores System entsteht, welches durch das vergrößerte konjugierte Elektronensystem die gelbe Farbe bedingt. Ebenfalls konnte unter der UV-Lampe erkannt werden, dass die Fluoreszenz dieser korrespondierenden Acridin-Verbindungen intensiver ist. Die stattgefundenen Oxidation kann auch ähnlich wie bei den 1,4-Dihydropyridinen sich auf die Photooxidation zurückführen lassen. Die im Zuge dieser Arbeit hergestellten 9,10-Dihydroacridine wurden deshalb lichtgeschützt gelagert.

Bei dem zweiten Syntheseschritt wurde neben den jeweiligen N-Benzylacridinium-Verbindungen und Grignard-Reagentien ebenfalls der Katalysator Kupfer(I)-iodid zusammen mit Lithiumchlorid eingesetzt. Diese beiden Substanzen erfüllen denselben Zweck wie bei der Synthese der 1,4-Dihydropyridine: Lithiumchlorid dient der Löslichkeitssteigerung von Kupfer(I)-iodid, welches dazu dient, dass der durch das Grignard-Reagenz eingefügte Aryl-Substituent regioselektiv in Position 9 des N-Benzylacridiniums gelangt. Als Endprodukt dieser Reaktion erhält man im Gegensatz zu den 1,4-Dihydropyridinen kein racemisches Gemisch, da kein Chiralitätszentrum vorhanden ist.

Synthese und analytische Untersuchung der Verbindungen

Die Endprodukte konnten in Ausbeuten bis zu 42 % gewonnen werden. Die im Laufe der Reaktion entstandenen Nebenprodukte wurden nicht näher charakterisiert, sondern mithilfe einer säulenchromatographischen Aufreinigung von dem gewünschten Endprodukt getrennt. Die synthetisierten 9,10-Dihydroacridine haben eine weiße Farbe und sind Feststoffe, welche mithilfe des Einsatzes von Lösungsmitteln und Kühlung gewonnen werden konnten.

4.3 Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen

Die strukturell vergleichbaren Verbindungen der 1,4-Dihydropyridine und 9,10-Dihydroacridine wurden mit folgenden Methoden analytisch untersucht und charakterisiert: massenspektrometrisch mittels ESI (Elektrospray-Ionisation), ^1H - und ^{13}C -NMR-spektroskopisch (sowie z.T. 2D-NMR-spektroskopisch) mittels NMR-Spektrometer und IR-spektroskopisch mittels FT-IR-Spektrometer. Ebenfalls wurde bei den Endprodukten, welche als Feststoffe gewonnen werden konnten, der Schmelzbereich mittels Heitzschmikroskop untersucht. Diese Methoden dienten zur Bestimmung der Identität der Verbindungen. Die Reinheit wurde mittels analytischer HPLC nachgewiesen.

Für die entsprechenden synthetisierten Verbindungen sind die analytischen Ergebnisse im Abschnitt „Beschreibung der Verbindungen“ beschrieben.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der NMR-Analytik anhand einzelner Beispiele für die 1,4-Dihydropyridine bzw. 9,10-Dihydroacridine genauer betrachtet werden.

Die 1,4-Dihydropyridine besitzen zwei aromatische Substituenten, welche durch die Einbringung in ein magnetisches Feld im Rahmen der NMR-Analytik einen Ringstrom aufweisen. Dieser Ringstrom erzeugt wiederum ein Magnetfeld, welches die Protonen des aromatischen Rings entschirmt und eine Verschiebung ins Tieffeld des ^1H -Spektrums bedingt. Ober- und unterhalb der Ringebene erfolgt eine Abschirmung, wodurch benachbarte Protonen ins Hochfeld verschoben werden. Der Dihydropyridin-Ring besitzt keinen Ringstrom und erzeugt dementsprechend auch kein Magnetfeld, welches entschirmt bzw. abschirmt.

Wie bereits erwähnt entsteht bei der Synthese der 1,4-Dihydropyridine ein racemisches Gemisch aufgrund des Chiralitätszentrum in Position 4 des Dihydropyridin-Rings. Die R- und S-Enantiomere sind in den ^1H -NMR-Spektren unter den gegebenen Messbedingungen (z.B. keine Verwendung von achiralen Lösungsmitteln) nicht voneinander unterscheidbar, da die Wasserstoffkerne der beiden Enantiomere die gleiche chemische Verschiebung im Spektrum aufweisen. Das Chiralitätszentrum beeinflusst allerdings die Signale der Wasserstoffkerne in der Ethylestergruppe, genauer gesagt die magnetische Äquivalenz der beiden Methylenprotonen. Ohne Beeinflussung der magnetischen Äquivalenz sollte die Methylengruppe der Ethylestergruppe als ein Quartett im ^1H -Spektrum aufgelöst sein. Anstelle dieser Multiplizität finden sich Signale vom Typ ABX_3 wieder (Spektrum höherer Ordnung):

Synthese und analytische Untersuchung der Verbindungen

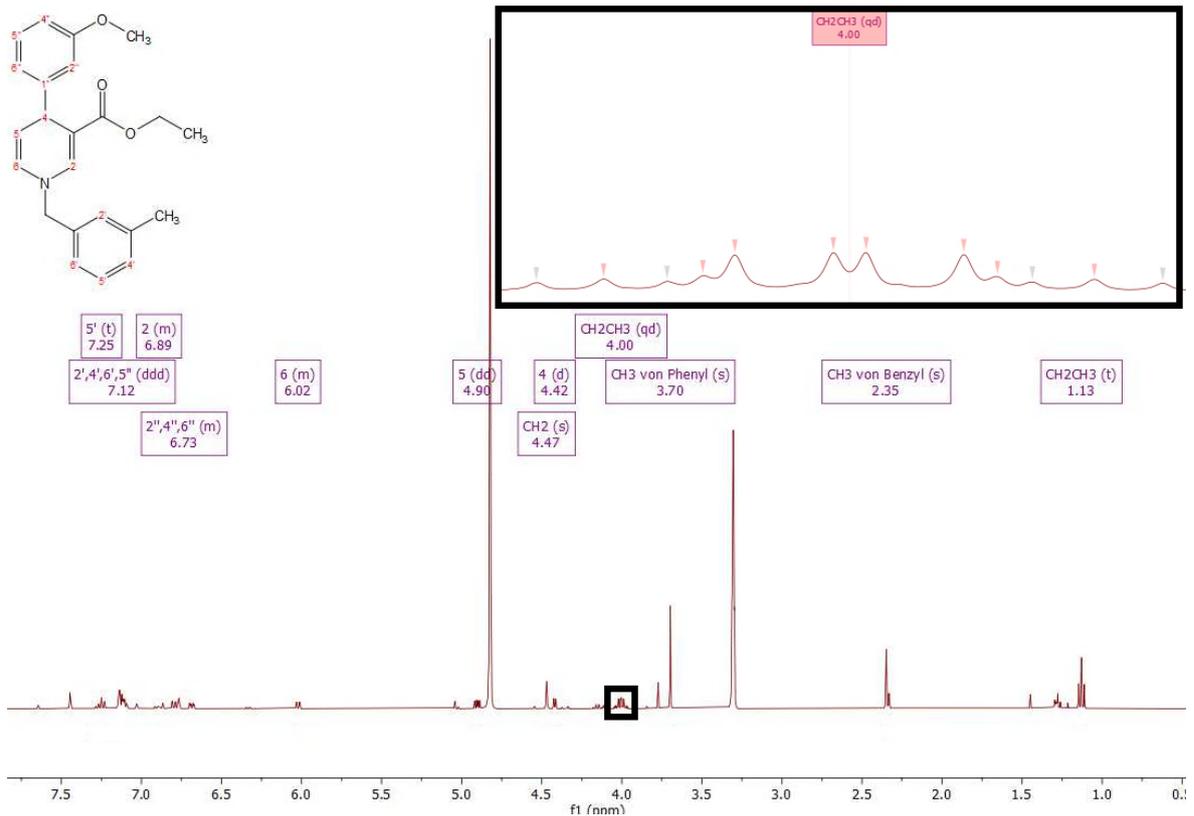


Abbildung 25: ¹H-NMR Spektrum von DHP11. Im vergrößerten Ausschnitt ist der AB-Teil des ABX₃-System zu sehen

Das AB-System stellt die durch die magnetisch verschiedenen Protonen der Methylengruppe verursachte Aufspaltung dar. Der AB-Teil des Multipletts ist symmetrisch und besitzt die Intensitätsverteilung von 1:3:3:1. Der AB-Teil des Multipletts besteht aus einem Quartett von AB-Systemen. Die Wasserstoffkerne der Methylengruppe erscheinen im ¹H-NMR-Spektrum bei einer chemischen Verschiebung von 3,99 – 4,06 ppm und bei einer Kopplungskonstante von 7,1 Hz als Quartett von Dupletts. Die Verbindungen **DHP13** bis **DHP16** sowie **DHP19** stellen keine Quartetts von Dupletts dar, sondern Multipletts mit einer chemischen Verschiebung zwischen 4,11 – 3,96 ppm. Die Protonen der Methylgruppe haben als Kopplungspartner die beiden magnetisch verschiedenen Protonen der Methylengruppe. Der X₃-Teil des ABX₃-Systems spaltet als Tripletts bei einer chemischen Verschiebung von 1,12 – 1,19 ppm mit einer Kopplungskonstante von 7,1 Hz auf.

Die ¹H-NMR Spektren wurden mithilfe des deuterierten Lösungsmittel Methanol-d₄ erstellt. Charakteristische Banden sind die Wasserstoffkerne der Methoxy- und Methyl-Gruppen der aromatischen Substituenten. Die chemische Verschiebung der Methoxy-Gruppe liegt beim Benzyl-Substituenten zwischen 3,71 – 3,84 ppm und beim Phenyl-Substituenten zwischen 3,69 - 3,84 ppm. Der Dimethoxy-Substituent am Phenylring liegt bei den Verbindungen **DHP17** und **DHP18** bei 3,81 bzw. 3,88. Das entsprechende Integral spiegelt sechs Wasserstoffkerne

wieder. Für die Verbindungen **DHP19** und **DHP20** konnten zwei getrennte Signale mit einer chemischen Verschiebung von 3,82 (4-Methoxy) und 3,72 (3-Methoxy) identifiziert werden. Die chemische Verschiebung der Methyl-Gruppe liegt beim Benzyl-Substituenten zwischen 2,29 – 2,40 ppm und beim Phenyl-Substituenten zwischen 2,26 – 2,40 ppm.

Weitere charakteristische Signale werden von den Wasserstoffkernen des Dihydropyridin-Rings (4-H, 5-H und 6-H) sowie von der CH₂-Gruppe des Benzyl-Substituenten generiert. Die chemische Verschiebung von 4-H, das sich am Kohlenstoff, welches das Chiralitätszentrum der 1,4-Dihydropyridine ist, befindet, liegt zwischen 4,36 und 4,46 ppm und wird aufgrund seiner Nachbarschaft zum 5-H mit einer Kopplungskonstante von 4,8 bzw. 4,9 Hz als Duplett aufgespalten. Der Wasserstoffkern von C5 des Dihydropyridin-Rings wechselwirkt mit den sich umgebenden 4-H und 6-H und liegt als Duplett vom Duplett vor. Dieses Signal besitzt eine chemische Verschiebung von 4,87 bis 4,95 ppm. Die Kopplungskonstante, welche die Wechselwirkung von 5-H und 6-H widerspiegelt, beträgt 7,8 Hz. Für die Wechselwirkung von 5-H und 4-H beträgt die Kopplungskonstante 4,9 Hz. Für 6-H liegt die chemische Verschiebung zwischen 6,00 und 6,13 ppm. Das entsprechende Signal wird als Duplett vom Duplett vom Duplett aufgespalten. Teils erscheint das Signal auch als Duplett vom Duplett oder Multipllett. Die Kopplungskonstante von 7,8 Hz stellt die Wechselwirkung von 6-H mit 5-H dar. Die beiden anderen Kopplungskonstanten stellen weiterreichende Fernkopplungen über vier oder mehr Bindungen dar. Die beiden Wasserstoffkerne der CH₂-Gruppe des Benzyl-Rests besitzen eine chemische Verschiebung von 4,42 bis 4,53 ppm und stellen ein Singulett dar. Für die beiden Verbindungen **DHP09** und **DHP19** konnte ein Multipllett identifiziert werden.

Die Wasserstoffkerne der aromatischen Substituenten der 1,4-Dihydropyridine lassen sich nur teilweise genau zuordnen, da diese häufig in einem gemeinsamen Multipllett erscheinen. Eine Unterscheidung kann nur durch die Anwesenheit der Methoxy- und Methyl-Gruppen an den Phenyl- bzw. Benzyl-Substituenten, welche mit ihren +M- bzw. +I-Effekt die Elektronendichte an verschiedenen Positionen im aromatischen Ring erhöhen können und dadurch eine Verschiebung ins Hochfeld bedingen, getroffen werden.

Ebenfalls besitzt das 2-H des Dihydropyridin-Rings eine chemische Verschiebung, welche sich im Tieffeld des Spektrums befindet. Das 2-H des Dihydropyridin-Rings ist bei einigen Verbindungen Bestandteil eines Multipletts, welches auch andere Wasserstoffkerne beinhaltet, bei anderen Verbindungen ein Singulett mit einer chemischen Verschiebung zwischen 6,86 und 7,05 ppm. Besitzen die aromatischen Reste einen Methoxy- bzw. Methyl-Substituenten in meta-Stellung, so weisen 5'-H bzw. 5''-H eine chemische Verschiebung auf, welche sich weit im Tieffeld (ab 7,12 ppm) befindet. Befindet sich die Methyl-Gruppe im Benzyl-Substituenten in para-Stellung, so konnte in den ¹H-NMR-Spektren beobachtet werden, dass in dem Bereich des Tieffelds, in

welchem sich die Signale der aromatischen Wasserstoffkerne befinden, ein Singulett bei einer chemischen Verschiebung von 7,24 bis 7,25 ppm vorhanden ist. Dieses Singulett widerspricht den Erwartungen, da die Wasserstoffkerne, die diesem Signal zugeordnet werden, mit anderen Wasserstoffkernen, z.B. über drei Bindungen mit dem Wasserstoff des benachbarten Kohlenstoffatoms, wechselwirken kann. Die para-ständige Methyl-Gruppe des Benzyl-Substituenten scheint die chemische Aufspaltung dieser Wasserstoffkerne zu beeinflussen. Dasselbe konnte für **DHP19** beobachtet werden.

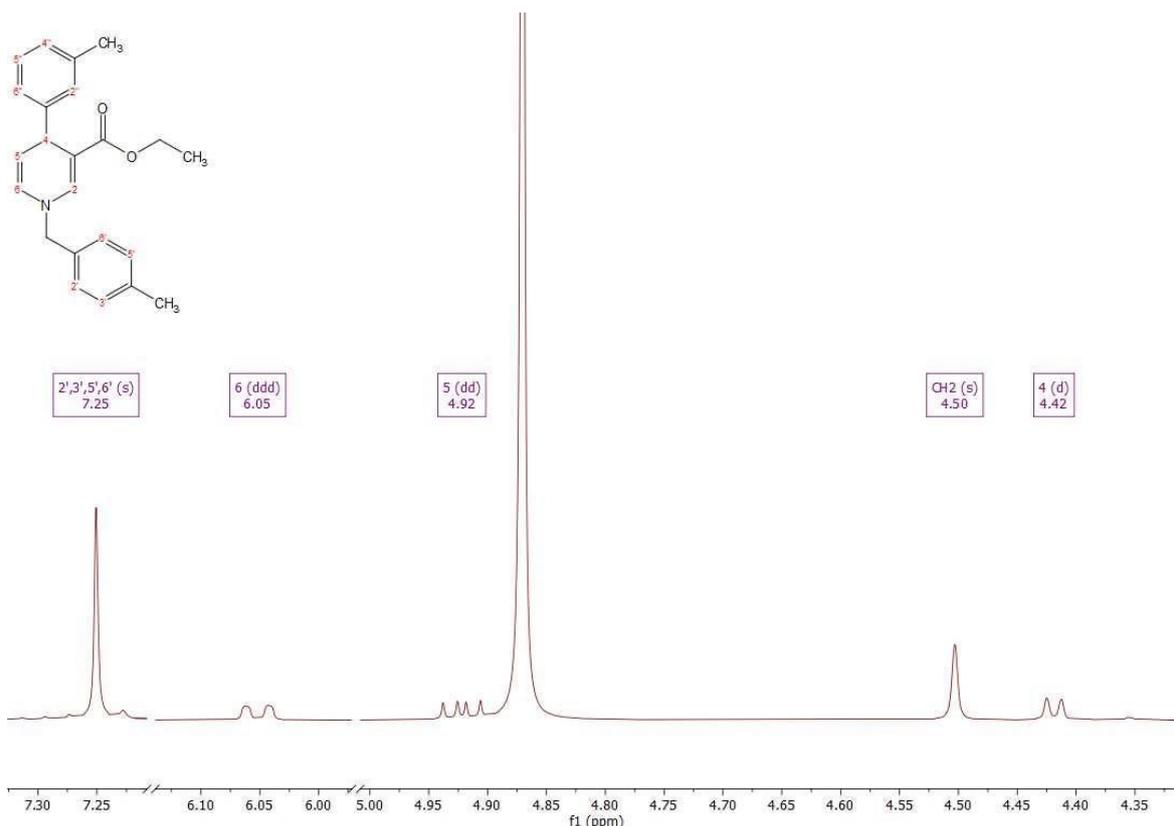


Abbildung 26: Ausschnitt ¹H-NMR Spektrum von DHP16. Signale von 4, CH2, 5, 6 sowie das Singulett von 2', 3', 5' und 6' sind gezeigt.

Die 9,10-Dihydroacridine besitzen wie die 1,4-Dihydropyridinen aromatische Substituenten, welche das Magnetfeld beeinflussen und somit eine Verschiebung ins Hoch- bzw. Tieffeld verursachen. Der Dihydroacridin-Ring besitzt in den beiden äußeren Ringen ein delocalisiertes Elektronensystem, welches durch das Einbringen in ein magnetisches Feld einen Ringstrom aufweist.

Im Gegensatz zu den 1,4-Dihydropyridinen entsteht im Laufe der Synthese der 9,10-Dihydroacridine kein Chiralitätszentrum. Die Verbindungen liegen somit nicht als racemisches Gemisch vor. Auch finden sich keine Signale vom Typ ABX₃, da keine Ethylestergruppe bei den 9,10-Dihydroacridine vorhanden ist.

Synthese und analytische Untersuchung der Verbindungen

Bei der Probenvorbereitung für die $^1\text{H-NMR}$ Spektren wurden die deuterierten Lösungsmittel Methanol- d_4 bzw. Chloroform- d verwendet. Charakteristische Banden sind die Wasserstoffkerne der Methoxy- und Methyl-Gruppen der aromatischen Substituenten. Die chemische Verschiebung der Methoxy-Gruppe liegt im Bereich zwischen 3,69 – 3,80 ppm. Die beiden Verbindungen **DHA17** und **DHA18** besitzen eine Dimethoxy-Gruppe im Phenyl-Substituenten und einer Methoxy-Gruppe im Benzyl-Substituenten. Die Wasserstoffkerne der Methoxy-Gruppe im Benzyl-Rest und der Methoxy-Gruppe in Position 3 im Phenyl-Rest ergeben als Signal ein Singulett bei einer chemischen Verschiebung von 3,79 ppm (**DHA17**) bzw. 3,80 ppm (**DHA18**). Das entsprechende Integral spiegelt hierbei sechs Wasserstoffkerne wieder. Die Methoxy-Gruppe in Position 4 des Phenyl-Rests ergibt ebenfalls ein Singulett, bei einer chemischen Verschiebung von 4,04 ppm.

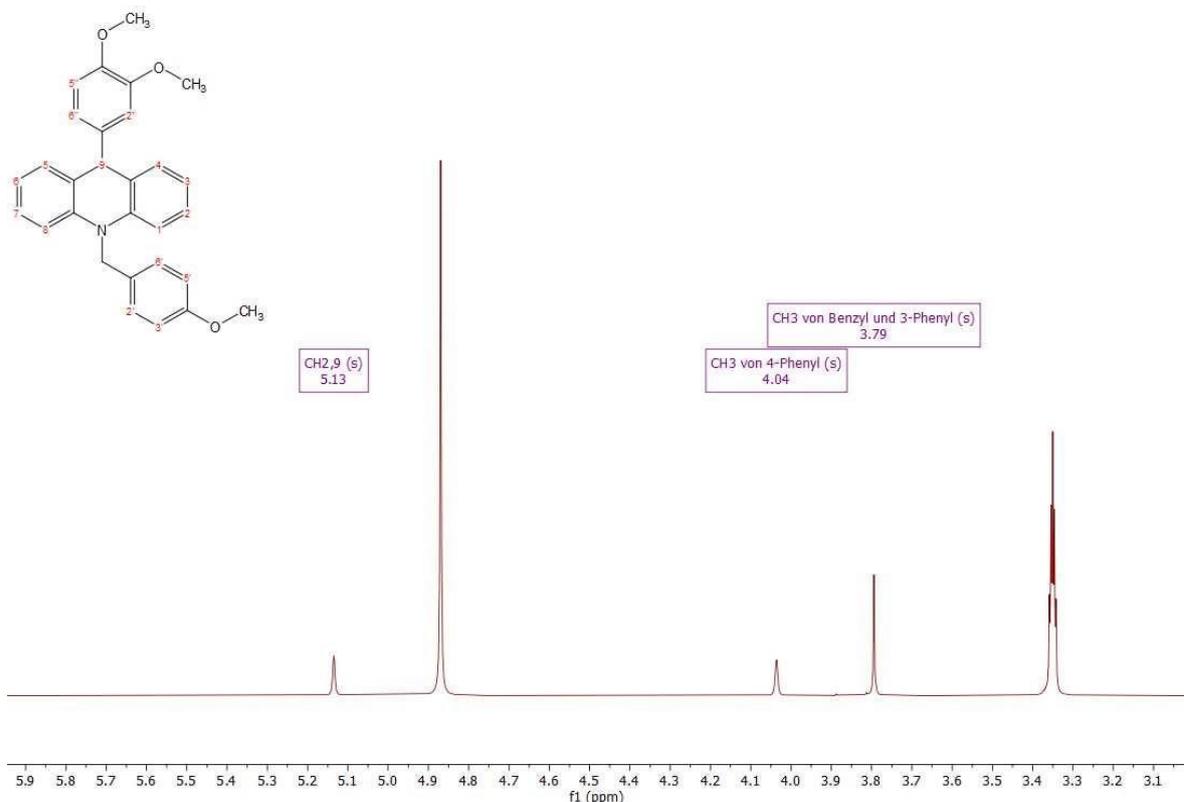


Abbildung 27: Ausschnitt $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von DHA18. Signale von CH_3 von Benzyl und 3-Phenyl, CH_3 von 4-Phenyl sowie CH_2 und 9 sind gezeigt.

Sechs 9,10-Dihydroacridine weisen eine Methyl-Gruppe im Phenyl-Substituenten auf (**DHA07**, **DHA08**, **DHA09**, **DHA13**, **DHA14** und **DHA15**), welche eine chemische Verschiebung von 2,25 - 2,27 ppm besitzen.

Weitere charakteristische Signale werden von dem Wasserstoffkern in Position 9 des 9,10-Dihydroacridin-Rings sowie von den Wasserstoffkernen der CH_2 -Gruppe des Benzyl-Substituenten generiert. Die beiden Wasserstoffkerne der CH_2 -Gruppe des Benzyl-Rests liegen zwischen 5,17 ppm und 5,25 ppm und stellen ein Singulett dar. Der Wasserstoffkern in

Synthese und analytische Untersuchung der Verbindungen

Position 9 wird ebenfalls als ein Singulett dargestellt und liegt bei einer chemischen Verschiebung zwischen 5,25 ppm und 5,34 ppm vor. Bei den beiden Verbindungen **DHA17** und **DHA18** liegen die Wasserstoffkerne der CH₂-Gruppe und der Position 9 als ein gemeinsames Signal, genauer gesagt als ein Singulett, dessen Integral drei Kerne widerspiegelt, bei einer chemischen Verschiebung von 5,14 ppm (**DHA17**) bzw. 5,13 ppm (**DHA18**) vor.

Viele Wasserstoffkerne der 9,10-Dihydroacridine lassen sich nur teilweise genau zuordnen, da diese Bestandteile des aromatischen Bereichs sind und häufig in einem gemeinsamen Multipllett erscheinen. Eine Unterscheidung kann entsprechend den 1,4-Dihydropyridinen häufig nur durch die Anwesenheit der Methoxy- und Methyl-Gruppen an den Phenyl- bzw. Benzyl-Substituenten, welche mit ihren +M- bzw. +I-Effekt die Elektronendichte an verschiedenen Positionen im aromatischen Ring erhöhen können und dadurch eine Verschiebung ins Hochfeld bedingen, getroffen werden. Die Wasserstoffkerne des aromatischen Bereichs besitzen bei den 9,10-Dihydroacridinen eine chemische Verschiebung von circa 6,70 ppm bis 7,30 ppm.

Die folgende Abbildung zeigt ein ¹H-NMR Spektrum eines 9,10-Dihydroacridins:

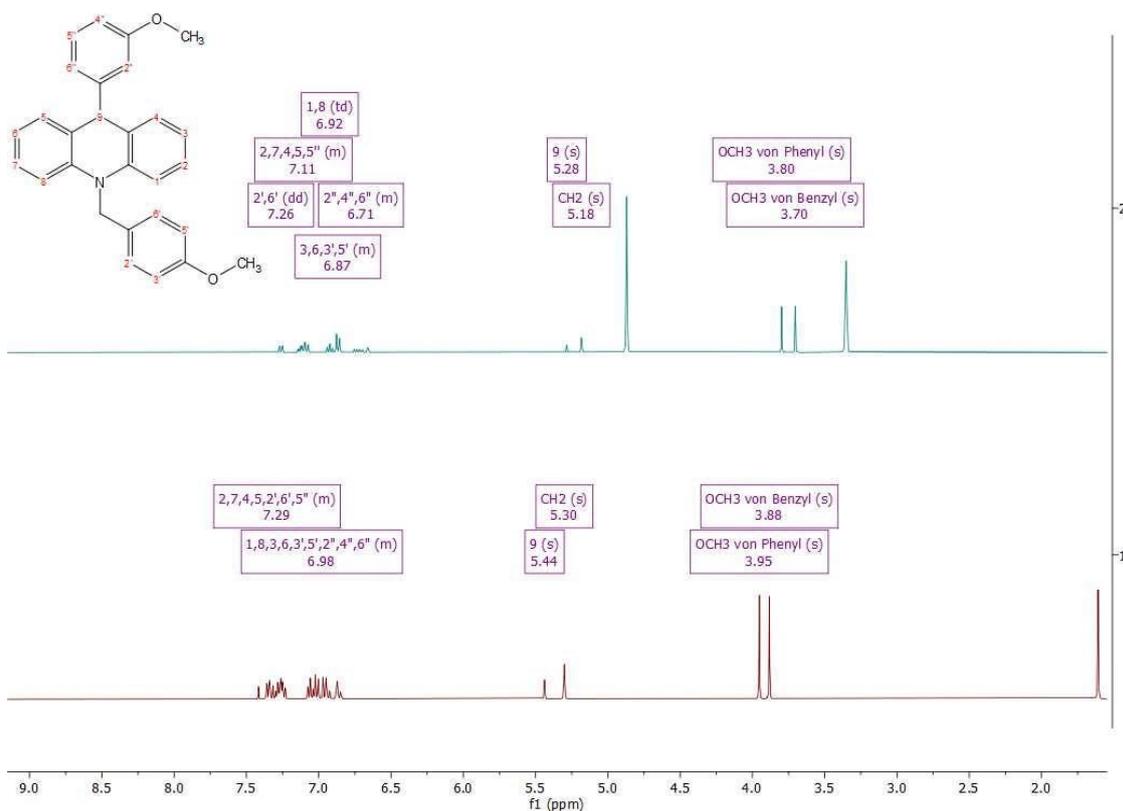


Abbildung 28: ¹H-NMR Spektren von DHA12. Oben: CD₃OD (Referenzpeaks: 4,870 ppm, Singulett, 3,310 ppm, Quintett), Unten: CDCl₃ (Referenzpeak: 1,560 ppm, Singulett)

Anhand der Verbindung **DHA12** soll in den folgenden Abbildungen auch das ¹³C-NMR Spektrum sowie zweidimensionale NMR-Spektren wie DEPT, HMBC und HSQC, welche zur Identifizierung

Synthese und analytische Untersuchung der Verbindungen

einzelner Signale herangezogen wurden, gezeigt werden, um so beispielhaft einen Einblick in die Auswertung der gewonnenen NMR-Spektren der synthetisierten Verbindungen zu zeigen. So konnte z.B. mithilfe des DEPT-NMR-Spektrums folgende Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum zugeordnet werden: 4a, 9a, C-2'', C-8'', C-1, C-8, C-1'', C-3, C-6 und C-5'. Das HMBC- und HSQC-NMR-Spektrum wurde verwendet, um Korrelationen von Signalen zwischen ^1H -Spektrum und ^{13}C -NMR-Spektrum genauer zu betrachten.

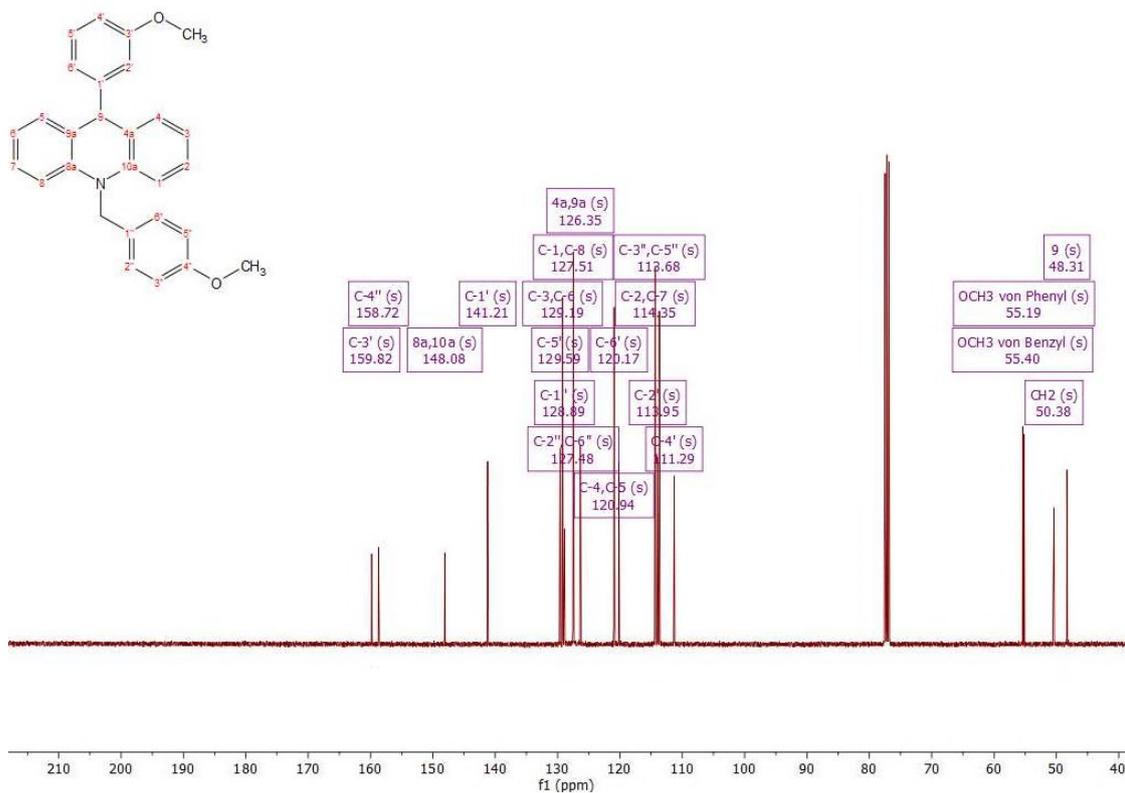


Abbildung 29: ^{13}C -NMR Spektrum von DHA12

Synthese und analytische Untersuchung der Verbindungen

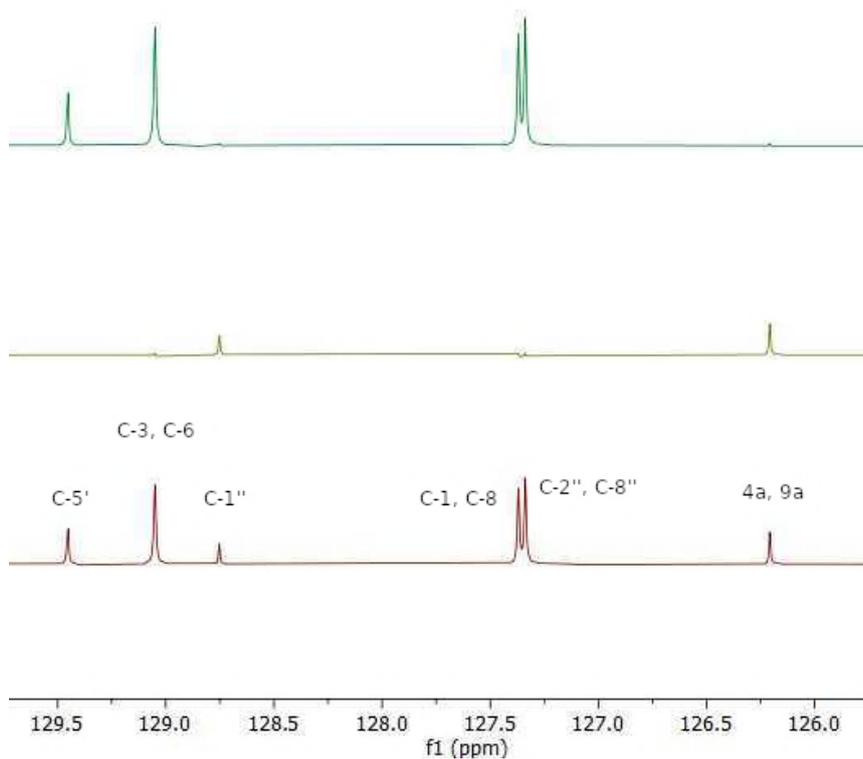


Abbildung 30: Ausschnitt DEPT Spektrum von DHA12. Signale von 4a, 9a, C-2'', C-8'', C-1, C-8, C-1'', C-3, C-6 und C-5' sind gezeigt. Oben: tertiäre Kohlenstoffatome, Mitte: quartäre Kohlenstoffatome, Unten: gesamtes ^{13}C Spektrum

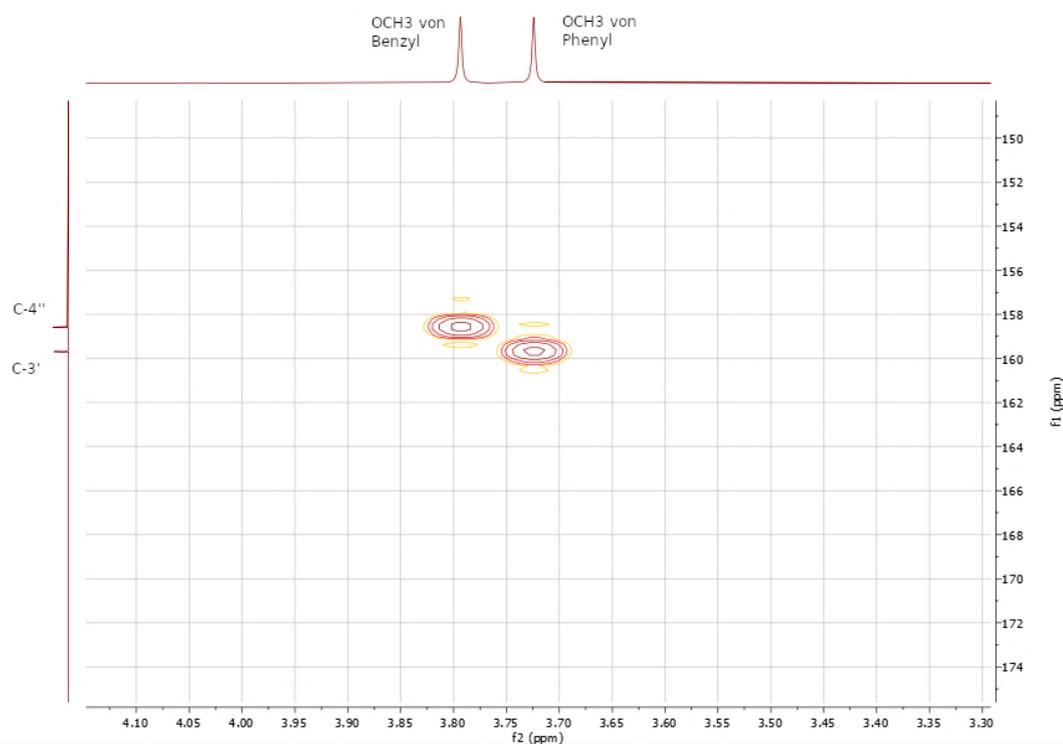


Abbildung 31: Ausschnitt 1 HMBC Spektrum von DHA12. Korrelation von OCH_3 von Phenyl mit C-3' sowie OCH_3 von Benzyl und C-4'' sind gezeigt.

Synthese und analytische Untersuchung der Verbindungen

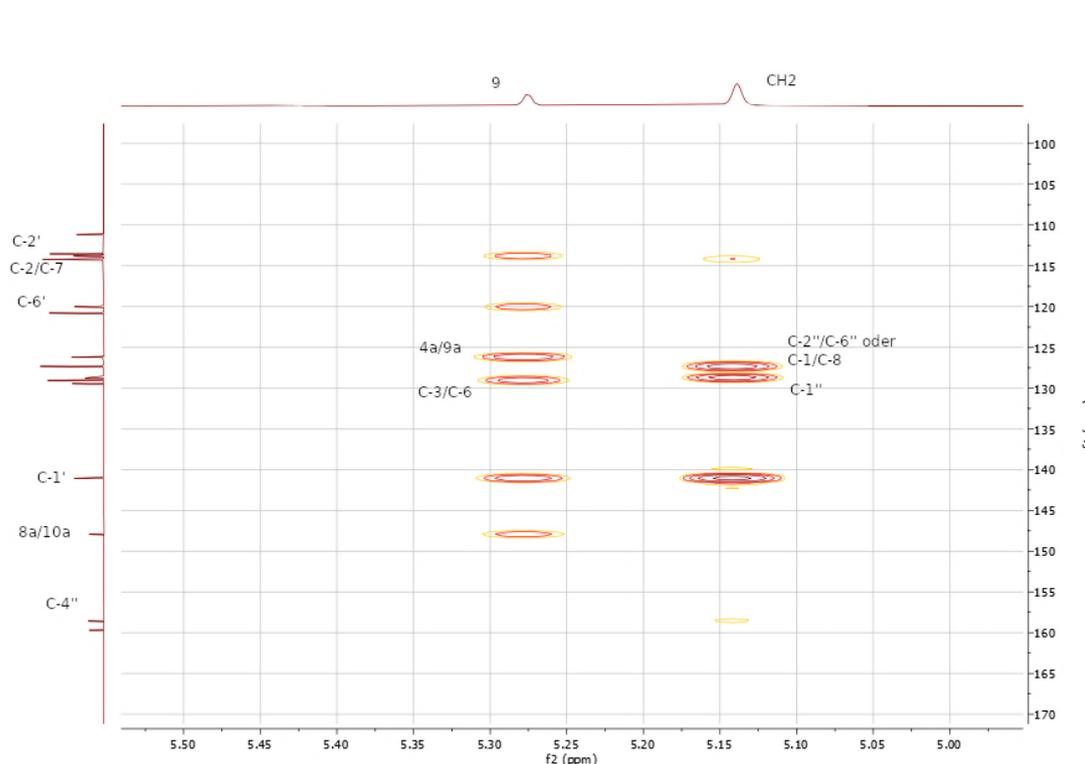


Abbildung 32: Ausschnitt 2 HMBC Spektrum von DHA12. Korrelation von CH₂ mit C-2''/C-6'' oder C-1/C-8 und C-1'' sowie 9 mit 4a/9a und C-3/C-6 sind gezeigt.

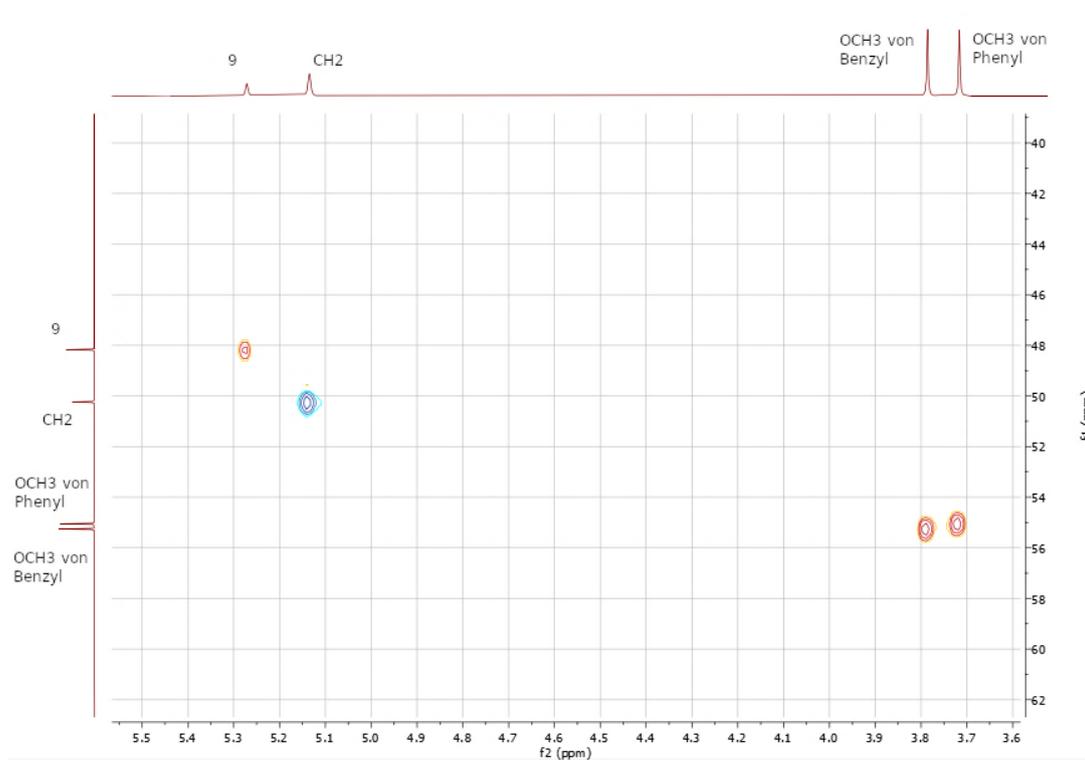


Abbildung 33: Ausschnitt HSQC Spektrum von DHA12. Korrelation von OCH₃ von Phenyl, OCH₃ von Benzyl, CH₂ und 9 sind gezeigt.

5 Bioanalytische Evaluierung der neuartigen MDR-modulierenden und antibakteriellen Wirkstoffe

5.1 Biologische Evaluierung der 1,4-Dihydropyridine

5.1.1 Bestimmung der P-gp Transporteraffinität der 1,4-Dihydropyridine mittels Fluoreszenz-Uptake-Assay

Für die Charakterisierung der P-gp modulierenden Eigenschaften der synthetisierten 1,4-Dihydropyridine wurde ein Maus-T-Lymphom Zellmodell eingesetzt. Die Parenteralzelllinie L5178Y und deren Subzelllinie L5178Ymdr wurden dabei verwendet. Die Zelllinie L5178Ymdr definiert sich im Gegensatz zu L5178Y durch eine Überexpression von humanen P-gp, welche ein Resultat von Gentransfektion ist. Als Selektionsdruck wird während der Zellkultivierung von L5178Ymdr das P-gp Substrat Colchicin, welches eine Mitose-hemmende Wirkung besitzt, in einer Konzentration von 60 ng/ml eingesetzt. Das dem Zellkulturmedium hinzugefügte Colchicin gewährleistet, dass die Expressionsrate von P-gp während der Kultivierung über die Zeit nicht abnimmt, da in der Subzelllinie durch die Überexpression von P-gp Colchicin aktiv aus der Zelle ausgeschleust werden kann. Die Zelllinie L5178Ymdr besitzt somit eine Resistenz gegen die gegebene Konzentration von Colchicin. Konträr dazu würde die Mitose-hemmende Wirkung des Colchicins bei der Parenteralzelllinie durch das fehlende Vorhandensein des ABC-Transporters P-gp die Zellen abtöten.

Die Bestimmung des P-gp modulierenden Potentials der 1,4-Dihydropyridine erfolgte mithilfe von Durchflusszytometrie und Rhodamin 123, einem Fluoreszenzfarbstoff und P-gp Substrat, welches durch die Inhibition von P-gp im Zellinneren akkumulieren kann und infolgedessen zu einer messbaren Steigerung des Fluoreszenzwerts führt, wodurch eine Aussage über die P-gp Transporteraffinität der Inhibitoren getroffen werden kann²⁵⁶. Aufgrund der nicht vorhandenen Überexpression von P-gp reichert sich der Fluoreszenzfarbstoff in der parenteralen Zelllinie L5178Y sowohl in An- als auch in Abwesenheit der P-gp inhibierenden Verbindungen an. Das eingesetzte Durchflusszytometer MACSQuant Analyzer 10 besitzt einen Argonlaser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und ermöglicht durch Verwendung von Filtern eine Detektion der Emission bei einer Wellenlänge von 525 nm (Fluoreszenzkanal B1). Die Testverbindungen wurden zusammen mit Verapamil, einem bekannten P-gp Modulator, als positive Vergleichskontrolle in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt.

Um eine Aussage über die P-gp inhibitorische Aktivität der synthetisierten Verbindungen treffen zu können, wurde für jede einzelne Verbindung der FAR-Wert (Fluorescence Activity Ratio) aus den ermittelten Fluoreszenzwerten (FL-mean Werten) wie folgt berechnet:

Gleichung Nr. 1:
$$FAR = \frac{F_{L5178Y_{mdr-Mod}} - F_{L5178Y_{mdr}}}{F_{L5178Y-Mod} - F_{L5178Y}}$$

(Mod = modulierende Verbindung)

Die Gleichung setzt die gemessenen Fluoreszenzwerte für die resistente Zelllinie ins Verhältnis mit den entsprechenden Werten der parenteralen Zelllinie, wodurch eine Aussage über das Maß der P-gp hemmenden Eigenschaften der Testverbindungen getroffen werden kann. Entsprechend der Formel besitzen Verbindungen mit einem FAR-Wert größer 1 aufgrund der Akkumulation des Farbstoffs im Inneren der Zellen eine P-gp inhibierende Wirkung, während ein FAR-Wert von 1 oder kleiner bedeutet, dass die Verbindung keine P-gp hemmende Wirkung besitzt oder die Ausschleusung des Farbstoffs erhöht. Die FAR-Werte der einzelnen Verbindungen können im Sinne der besseren Vergleichbarkeit mit dem FAR-Wert der Vergleichskontrolle Verapamil ins Verhältnis gesetzt werden. Bei einem Wert dieses Verhältnisses größer 1 besitzt die jeweilige Verbindung für die gegebene Konzentration ein größeres P-gp inhibitorisches Potential als Verapamil. Für Werte kleiner oder gleich 1 besitzt die Verbindung im Vergleich zu Verapamil eine geringere bzw. gleiche P-gp inhibierende Wirkung.

Gleichung Nr. 2:
$$FAR_{Vergleich} = \frac{FAR_{Verbindung}}{FAR_{Verapamil}}$$

Zur Bestimmung der FAR-Werte wird zu Beginn die entsprechende Zelllinie während des Passagierens und der erfolgten Zellzählung so aufgeteilt, dass pro zu testende Probe 500.000 Zellen in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß abgefüllt werden (Zellen liegen in einer Zellsuspension vor). Diese Eppendorf-Gefäße werden danach in einer Zentrifuge bei 4 °C und 2.000 UpM für zwei Minuten zentrifugiert und danach bis zum Ende des Versuches in eine mit Eis gefüllte Styroporbox gegeben, um etwaige Zellprozesse zu unterbinden. Anschließend wird der Überstand per Pipette abgesaugt und das Zellpellet durch Zugabe von Medium resuspendiert. Nun werden die jeweiligen Testverbindungen und Verapamil, welche jeweils in einer 10.000 µM Stammlösung (gelöst in DMSO) vorliegen, so zugesetzt, dass sich bei einer DMSO-Konzentration von 0,1 % pro Probe eine Endkonzentration von 10 µM einstellt. Des Weiteren werden noch drei zusätzliche Proben hergestellt: eine Probe zur Bestimmung der Eigenfluoreszenz der Zelllinie, welche nur mit Medium beladen ist; eine Probe zur Bestimmung des Einflusses des 0,1 %igen Gehalts von DMSO auf die Zellviabilität bzw. des zu ermittelnden Fluoreszenzwertes, welche nur mit Medium und einer DMSO-Konzentration von 0,1 % beladen ist; und eine Probe zur Bestimmung des Fluoreszenzwertes bei alleiniger Beladung mit dem Farbstoff Rhodamin 123 (entspricht in Gleichung Nr. 1 den Werten für $F_{L5178Y_{mdr}}$ bzw. F_{L5178Y}), welche in diesem Schritt des Versuches wie die Eigenfluoreszenzprobe nur mit Medium beladen wird. All diese Proben werden als Nächstes

im Thermomixer bei 37°C und 1.200 U μ M für 20 Minuten inkubiert. In einem zweiten Beladungsschritt werden nun sämtlichen Proben, mit Ausnahme der Eigenfluoreszenz- und der DMSO-Probe, Rhodamin 123 (Endkonzentration: 5 μ M) zugesetzt und für weitere 40 Minuten bei gleichen Bedingungen im Thermomixer behandelt. Nach dieser finalen Inkubation werden die Proben zentrifugiert, der Überstand wird entfernt, kühl gelagertes PBS („phosphate-buffered saline“, „Phosphatgepufferte Salzlösung“) wird hinzugefügt und die Proben werden erneut zentrifugiert. Diese Waschphase wird insgesamt zweimal durchgeführt und dient der Entfernung von extrazellulär lokalisierten Rhodamin 123, welches die abschließende Fluoreszenzmessung beeinträchtigen würde. Am Ende werden die Proben in PBS resuspendiert und mittels Durchflusszytometrie werden pro Messung 10.000 gezählte Zellen („Events“) für jede einzelne Probe vermessen. Die „Events“ befinden sich alle in einem sog. „gate“, welches einen definierten Rahmen für die gemessene Zellgröße und –granularität festlegt. Die Determination eines „Gate“ ermöglicht den Ausschluss von Zellfragmenten bzw. –aggregaten und dementsprechend die Zuordnung von „Events“ zu einer bestimmten Population. Diese Methode wird für jede zu untersuchende Probe bei der gegebenen Konzentration insgesamt dreimal durchgeführt und durch Bestimmung des arithmetischen Mittelwerts der Fluoreszenzwerte unter vorheriger Subtraktion des Fluoreszenzwerts der Eigenfluoreszenzkontrolle die FAR-Werte mittels Gleichung Nr. 1 ermittelt.

Die nachfolgende Tabelle Nr. 10 zeigt die Ergebnisse des durchflusszytometrischen Assays. Für jede untersuchte Verbindung sind der jeweilige FAR-Wert, die Standardabweichung sowie der FAR_{Vergleich}-Wert angegeben.

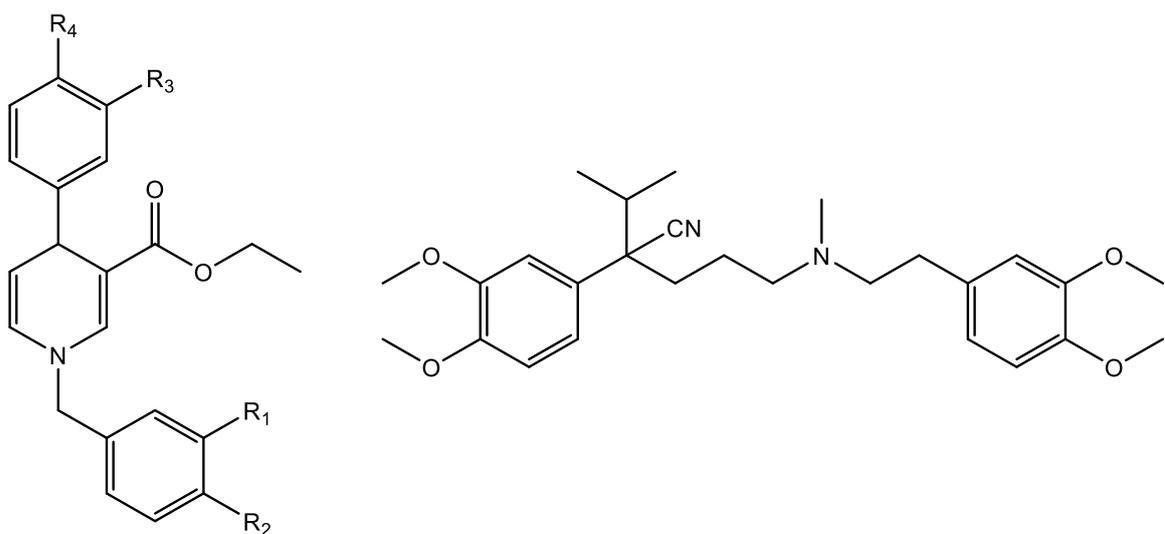


Abbildung 34: allgemeine Strukturformel der Zielverbindungen mit 1,4-Dihydropyridin Grundstruktur (links) und Verapamil (rechts)

Verbindung	-R1	-R2	-R3	-R4	FAR \pm SD	FAR _{Vergleich}
DHP01	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	1,34 \pm 0,07	0,45
DHP02	-H	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	1,41 \pm 0,06	0,48
DHP03	-CH ₃	-H	-H	-OCH ₃	1,51 \pm 0,11	0,51
DHP04	-H	-CH ₃	-H	-OCH ₃	1,54 \pm 0,33	0,52
DHP05	-OCH ₃	-H	-H	-CH ₃	1,12 \pm 0,41	0,38
DHP06	-H	-OCH ₃	-H	-CH ₃	1,37 \pm 0,09	0,46
DHP07	-CH ₃	-H	-H	-CH ₃	1,39 \pm 0,14	0,47
DHP08	-H	-CH ₃	-H	-CH ₃	1,65 \pm 0,39	0,56
DHP09	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	1,48 \pm 0,15	0,50
DHP10	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	1,45 \pm 0,08	0,49
DHP11	-CH ₃	-H	-OCH ₃	-H	1,46 \pm 0,07	0,49
DHP12	-H	-CH ₃	-OCH ₃	-H	1,73 \pm 0,13	0,59
DHP13	-OCH ₃	-H	-CH ₃	-H	1,35 \pm 0,11	0,46
DHP14	-H	-OCH ₃	-CH ₃	-H	1,23 \pm 0,03	0,42
DHP15	-CH ₃	-H	-CH ₃	-H	1,04 \pm 0,33	0,35
DHP16	-H	-CH ₃	-CH ₃	-H	1,16 \pm 0,04	0,39
DHP17	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	2,75 \pm 0,46	0,93
DHP18	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	1,44 \pm 0,08	0,49
DHP19	-CH ₃	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	2,69 \pm 0,65	0,91
DHP20	-H	-CH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	1,91 \pm 0,18	0,65
Verapamil	-	-	-	-	2,95 \pm 0,25	1,00

Tabelle 9: Ergebnisse durchflusszytometrischer Assay 1,4-Dihydropyridine P-gp

Alle synthetisierten 1,4-Dihydropyridin-Verbindungen zeigen bei einer Konzentration von 10 μ M einen FAR-Wert $>$ 1 und somit eine P-gp inhibitorische Aktivität.

Unter allen getesteten Verbindungen besitzt Verapamil den höchsten FAR-Wert mit 2,95, unter den 1,4-Dihydropyridinen besitzen die Verbindungen **DHP17** und **DHP19** mit den FAR-Werten von 2,75 bzw. 2,69 eine ähnliche modulierende Wirkung wie Verapamil (FAR_{Vergleich} von 0,93 bzw. 0,91). Die drittwirksamste 1,4-Dihydropyridin-Verbindung ist **DHP20** mit einem FAR-Wert von 1,91 (FAR_{Vergleich} von 0,65).

Die Testverbindungen mit den niedrigsten FAR-Werten sind **DHP05**, **DHP15** und **DHP16** mit 1,12; 1,04 bzw. 1,16 (FAR_{Vergleich} von 0,38; 0,35 bzw. 0,39). Für die Verbindungen **DHP05** und **DHP15** sei zusätzlich erwähnt, dass unter Mitbetrachtung der Standardabweichung dieser Verbindungen der FAR-Wert $<$ 1 liegt. Somit kann für diese beiden Dihydropyridine nicht sicher ausgesagt werden,

ob diese eine P-gp modulierende Aktivität besitzen. Die restlichen 1,4-Dihydropyridinen reihen sich mit ihren FAR-Werten zwischen den Werten der genannten Verbindungen ein.

Die Verbindungen **DHP01** bis **DHP04** besitzen als strukturelle Gemeinsamkeit im 4-Phenyl-Rest eine Methoxygruppe in para-Stellung. Der Vergleich der FAR-Werte lässt darauf schließen, dass die Einführung von Methyl- anstelle von Methoxy-Gruppen im Benzyl-Rest einen tendenziell leicht erhöhten Einfluss auf den FAR-Wert ergibt (FAR-Werte der Methoxy-Gruppen: 1,34 (meta) und 1,41 (para); FAR-Werte der Methyl-Gruppen: 1,51 (meta) und 1,54 (para)), unabhängig davon, ob die Methyl-Gruppe in meta- oder para-Stellung ist. Ebenfalls lässt sich der minimale Trend erkennen, dass die para-Stellung der Methoxy- bzw. Methylgruppe im Benzyl-Rest verglichen mit der meta-Stellung zu geringfügig erhöhten FAR-Werten führt. Alle vier Verbindungen haben bei einer Konzentration von 10 µM ungefähr die halbe inhibitorische P-gp Aktivität im Vergleich zu Verapamil.

Die nächsten vier Verbindungen, **DHP05** bis **DHP08**, besitzen im 4-Phenyl-Rest anstelle einer Methoxygruppe eine Methylgruppe in para-Stellung. Auch hier lassen sich dieselben zwei Aussagen treffen wie bei den Verbindungen **DHP01** bis **DHP04**: zum einen führen die Methyl-Gruppen des Benzyl-Restes unabhängig der meta- bzw. para-Stellung im Durchschnitt zu höheren FAR-Werten als die Methoxy-Gruppen (FAR-Werte der Methoxy-Gruppen: 1,12 (meta) und 1,37 (para); FAR-Werte der Methyl-Gruppen: 1,39 (meta) und 1,65 (para)), zum anderen sind die FAR-Werte bei der Substitution der Methoxy- bzw. Methyl-Reste in para-Stellung des Benzyl-Restes leicht erhöht im Vergleich zur Substitution in meta-Stellung. Des Weiteren sind die Verbindungen **DHP05** bis **DHP08** bei einer Konzentration von 10 µM in ihren P-gp modulierenden Eigenschaften ungefähr 0,5-fach so wirksam wie Verapamil.

Unter diesen genannten acht Testverbindungen besitzen **DHP04** und **DHP08** die größten FAR-Werte. Beide Verbindungen weisen eine Methyl-Gruppe in para-Stellung im Benzyl-Rest auf, welche vorteilhaft für die P-gp Hemmung erscheint.

Bei den Verbindungen **DHP09** bis **DHP12** liegt eine Methoxy-Gruppe im Phenyl-Ring in meta-Position vor. Beim direkten Vergleich der FAR-Werte lässt sich kein Unterschied in der P-gp hemmenden Wirkung für die Verbindungen **DHP09**, **DHP10** und **DHP11** treffen (entsprechende FAR-Werte: 1,48; 1,45 und 1,46). Die Position der Methoxy-Gruppe in meta- bzw. para-Position und die meta-Stellung der Methyl-Gruppe im Benzyl-Ring führen nicht zu einem nachweisbaren Unterschied in den FAR-Werten. Einzig **DHP12** mit einem FAR-Wert von 1,73 zeigt eine deutlich stärkere Hemmwirkung gegenüber P-gp als die drei vorherig genannten Verbindungen. **DHP12** besitzt wie **DHP04** und **DHP08** eine Methyl-Gruppe in para-Stellung im Benzyl-Rest. Setzt man die $FAR_{\text{Vergleich}}$ -Werte von **DHP09** bis **DHP12** in Relation, so lässt sich feststellen, dass diese Verbindungen gemessen an Verapamil eine 50-60 %ige P-gp Hemmwirkung aufweisen.

Anstelle einer im Phenyl-Ring lokalisierten Methoxy-Gruppe in meta-Position besitzen die Verbindungen **DHP13** bis **DHP16** an dieser Stelle eine Methyl-Gruppe. Im Gegensatz zu den vorher besprochenen zwölf Verbindungen, bei welchen die Methyl-Substitution der Methoxy-Substitution in Bezug auf die P-gp Inhibition überlegen war, besitzen die Verbindungen **DHP15** und **DHP16**, welche eine Methyl-Gruppe im Benzyl-Ring haben, ersichtlich geringere FAR-Werte als die Verbindungen **DHP13** und **DHP14**, welche eine Methoxy-Gruppe im Benzyl-Ring haben (FAR-Werte der Methoxy-Gruppen: 1,35 und 1,23; FAR-Werte der Methyl-Gruppen: 1,04 und 1,16). Die Betrachtung der FAR-Werte und der FAR_{Vergleich}-Werte der vier Verbindungen lässt den Schluss zu, dass eine Methyl-Gruppe in meta-Stellung im Phenyl-Ring eine verhältnismäßig negative Auswirkung auf die modulierenden Eigenschaften der synthetisierten Verbindungen auf den P-gp Transporter hat.

Die letzten vier untersuchten Verbindungen sind **DHP17** bis **DHP20**, welche alle eine Methoxy-Gruppe in Position 3 und 4 im Phenyl-Rest aufweisen. Von allen getesteten 1,4-Dihydropyridinen besitzen **DHP17** und **DHP19** die größten FAR-Werte mit 2,75 bzw. 2,69, womit sie bei einer Konzentration von 10 µM über eine annähernd gleich starke P-gp Inhibition wie Verapamil verfügen (entsprechende FAR_{Vergleich}-Werte: 0,93 bzw. 0,91). Beide Verbindungen kennzeichnet ein meta-Substituent im N-Benzyl-Ring. Die Methoxy-Gruppe führt hierbei zu einem leicht höheren FAR-Wert als die Methyl-Gruppe. Setzt man den FAR-Wert von **DHP17** denen von **DHP01** bzw. **DHP09** entgegen (FAR-Werte: 1,34 bzw. 1,48), so wird der Vorteil eines 3,4-Dimethoxy-Substituenten anstelle einer 3- bzw. 4-Methoxy-Gruppe im Phenyl-Ring besonders ersichtlich. Zu der gleichen Erkenntnis kommt man beim Vergleich von **DHP19** mit **DHP03** bzw. **DHP11**. Auch **DHP20** hat im Vergleich zu den anderen getesteten 1,4-Dihydropyridinen einen hohen FAR-Wert von 1,91. Setzt man die FAR-Werte von **DHP19** und **DHP20** in Relation, so lässt sich feststellen, dass die Methyl-Gruppe in Position 3 des Benzyl-Rests einen deutlich positiveren Effekt auf die P-gp Hemmwirkung hat als in Position 4. Dasselbe lässt sich auch über das Verhältnis der im Benzyl-Ring Methoxy-substituierten Verbindungen **DHP17** und **DHP18**, welches einen FAR-Wert von 1,44 aufweist, aussagen. **DHP18** hat die schwächsten P-gp modulierende Eigenschaften unter den im Phenyl-Rest 3,4-Dimethoxy-substituierten 1,4-Dihydropyridinen. Im Allgemeinen lässt sich zusammenfassen, dass der 3,4-Dimethoxy-Substituent den anderen Substituenten im Phenyl-Ring im Durchschnitt deutlich überlegen ist.

Bis jetzt wurden die Verbindungen zur Diskussion von Struktur-Wirkungs-Beziehungen nach ihrem Substituenten im Phenyl-Ring eingeteilt. Zusätzliche Beobachtungen lassen sich durch die Einteilung nach den Substituenten im N-Benzyl-Ring machen. Vergleicht man beispielsweise **DHP01** und **DHP05** miteinander, welche beide im Benzyl-Rest eine Methoxy-Gruppe in meta-Stellung besitzen, fällt auf, dass im Phenyl-Rest ein höherer FAR-Wert mit einer Methoxy-Gruppe

(**DHP01**) anstelle einer Methyl-Gruppe (**DHP05**) in Position 4 erreicht wird (FAR-Werte: 1,34 bzw. 1,12). Eine entsprechende Aussage lässt sich über die Verbindungen **DHP09** und **DHP13** treffen, welche im Phenyl-Ring eine Methoxy- bzw. Methyl-Gruppe in Position 3 besitzen (FAR-Werte: 1,48 bzw. 1,35). Zu einer ähnlichen Kenntnis kommt man bei den Verbindungen **DHP03** und **DHP07** bzw. **DHP11** und **DHP15** (entsprechende FAR-Werte: 1,51 und 1,39 bzw. 1,46 und 1,04), welche alle vier einen Methyl-Substituenten in meta-Position im Benzyl-Ring besitzen, bei **DHP02** und **DHP06** bzw. **DHP10** und **DHP14** (entsprechende FAR-Werte: 1,41 und 1,37 bzw. 1,45 und 1,23), welche eine Methoxy-Gruppe in para-Position im Benzyl-Ring besitzen, sowie bei **DHP12** und **DHP16** (entsprechende FAR-Werte: 1,73 und 1,16), welche eine Methyl-Gruppe in para-Position im N-Benzyl-Rest besitzen. Einzige Ausnahme von dieser Beobachtung sind die beiden Verbindungen **DHP04** und **DHP08**: hier führt der Methyl-Substituent im Phenyl-Ring in Position 4 zu einem höheren FAR-Wert als der Methoxy-Substituent. Grundsätzlich lässt sich allerdings zusammenfassen, dass ein Methoxy-Substituent im Phenyl-Ring zu einer stärkeren P-gp Inhibition führt. Unter Betracht der 3,4-Dimethoxy-substituierten Verbindungen **DHP17** bis **DHP20**, lässt sich zusätzlich aussagen, dass Methoxy-Gruppen in Position 3 und 4, mit Ausnahme von **DHP18**, zu sehr erhöhten FAR-Werten führt und demzufolge von einer besonders ausgeprägten Wechselwirkung dieser Verbindungen mit der P-gp Bindungstasche ausgegangen werden kann.

5.1.2 Bestimmung des Potentials der P-gp inhibierenden 1,4-Dihydropyridine zur Resistenzüberwindung mittels MTT-Assay

Eine weitere Methode, um die P-gp modulierenden Eigenschaften der synthetisierten Endverbindungen zu identifizieren und zu charakterisieren, ergibt sich durch den Einsatz eines MTT-Assays. Der namensgebene Farbstoff MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) besitzt eine gelbe Farbe, welche in viablen Zellen durch mitochondriale Reduktasen in das violett gefärbte Formazan reduziert wird.

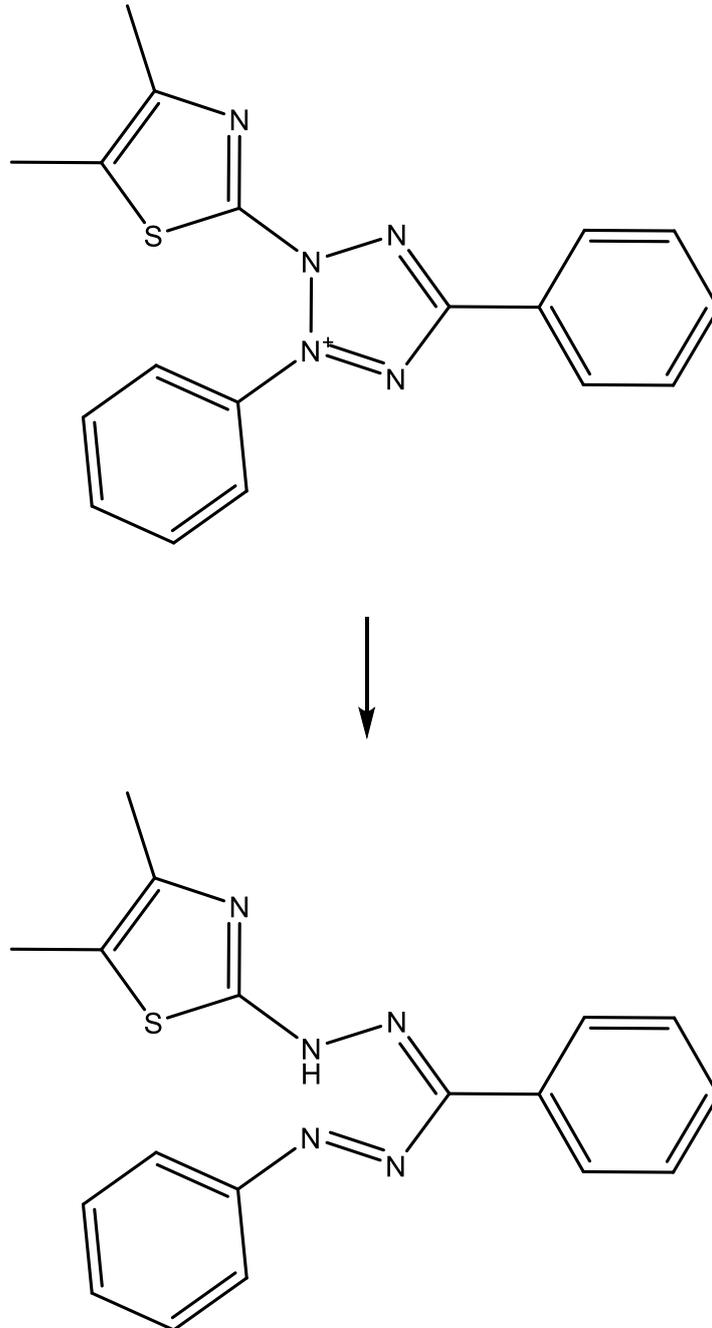


Abbildung 35: Umsetzung von MTT (gelb) zu Formazan (violett) mittels mitochondrialer Reduktasen

Mithilfe einer Absorptionsmessung kann ermittelt werden, in welchem Verhältnis der Farbstoff MTT in Abhängigkeit von der Viabilität der Zellen in Formazan umgewandelt wird. Dementsprechend lässt sich durch den Vergleich von Zellen, welche den Testverbindungen und einem zytotoxischen Agens ausgesetzt wurden, und unbehandelten Kontrollzellen eine Aussage über das Potential der synthetisierten P-gp Inhibitoren zur Überwindung der Resistenz bei Verwendung eines Zytostatikums treffen. Die Absorptionswerte, welche bei unterschiedlich eingesetzten Konzentrationen des Zytostatikums ermittelt werden, lassen sich graphisch darstellen. Durch einen sigmoiden Kurvenfit erhält man IC_{50} -Werte, welche eine wichtige Größe bei der Charakterisierung der inhibitorischen Wirkung von u.a. P-gp Modulatoren ist. Die resistente Zelllinie L5178Y_{mdr} besitzt durch ihre Überexpression des ABC-Transporters P-gp für zytotoxische P-gp Substrate wie z.B. Doxorubicin einen höheren IC_{50} -Wert als die parenterale Zelllinie L5178Y. Durch den Einsatz der Testverbindungen bzw. von Verapamil wird P-gp blockiert und die Resistenz gegenüber Doxorubicin herabgesetzt, wodurch sich eine Annäherung des IC_{50} -Wertes an den der Zelllinie L5178Y ergibt und dadurch die Resistenz aufgehoben wird. Dabei gilt: je kleiner der bestimmte IC_{50} -Wert, desto besser ist der P-gp Inhibitor bei der eingesetzten Konzentration wirksam. Die IC_{50} -Werte wurden mittels Dreifachbestimmung ermittelt.

Für den MTT-Test zur Resistenzüberwindung wurden 96-well Platten verwendet, welche pro Well mit 10.000 Zellen der Zelllinie L5178Y_{mdr} bzw. L5178Y beladen wurden. Die Testverbindungen bzw. Verapamil wurden in einer Endkonzentration von 10 μ M hinzugegeben. Als zytotoxisch wirksame Verbindung wurden die jeweiligen Wells mit Doxorubicin beladen. Doxorubicin wurde dabei in Konzentrationen von 0,01 μ M bis 80 μ M eingesetzt. Zur Kontrolle wurden einige Wells ausschließlich mit Medium beladen, um den Absorptionswert des Mediums zu bestimmen. Des Weiteren wurde ebenfalls eine Kontrollreihe mit Zellen und DMSO (1 %ige Konzentration) bzw. nur Zellen zur Überprüfung des Einflusses von DMSO auf die Viabilität der jeweiligen Zellreihe erstellt. Die nun fertig beladene 96-well Platte wird als Nächstes im Brutschrank bei 37°C und 5 %iger CO₂-Begasung für 48 Stunden inkubiert. In dieser Zeit werden die Zellen aufgrund des Nichtvorhandenseins von P-gp bzw. durch die erfolgreiche Inhibition von P-gp durch Verapamil und die synthetisierten Verbindungen infolge der Zytotoxizität des Doxorubicins in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration in einem bestimmten Ausmaß absterben. Nach der Inkubation werden die Wells mit 10 μ l des Farbstoffs MTT (5 mg/ml Stammlösung in PBS) beladen (Ausnahme: nur mit Medium befüllte Kontrollreihe) und erneut für vier Stunden im Inkubator gelagert. Das MTT wird in der Zwischenzeit wie in der oben beschriebenen Reaktion in vitalen Zellen durch die mitochondrialen Dehydrogenasen zum Formazan umgewandelt, was sich durch einen Farbwechsel von gelb zu violett beobachten lässt. Im Anschluss wird die Platte aus dem Inkubationsschrank entnommen, 100 μ l DMSO pro Vertiefung addiert, um die entstandenen

Formazan-Kristalle, welche im Inneren der Zelle akkumulieren, aufzulösen und die Zelllyse einzuleiten, und für 30 Minuten auf einen Plattenschüttler geschüttelt. Die Absorptionswerte erhält man durch Messung mit einem Photometer, welches eine Messwellenlänge von 570 nm und eine Referenzwellenlänge von 630 nm besitzt. Alle ermittelten Werte werden, nachdem von diesen der Eigenabsorptionswert des Mediums subtrahiert wurde, ins Verhältnis zur DMSO-Kontrolle, welche als Wert für die 100 %ige Vitalität festgelegt wird, gesetzt.

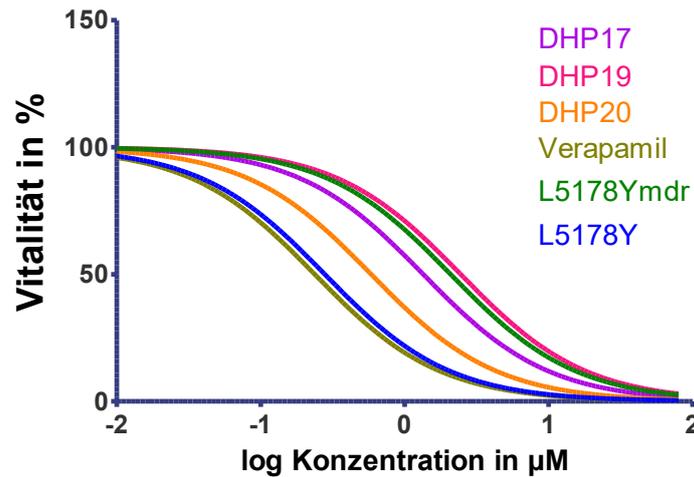


Abbildung 36: Resistenzüberwindung in L5178Ymdr Zellen mithilfe der synthetisierten 1,4-Dihydropyridin-Verbindungen und Verapamil

	IC ₅₀ (µM) ± SD
L5178Y	0,28 ± 0,32
L5178Ymdr	2,09 ± 0,24
DHP17	1,35 ± 0,21
DHP19	2,45 ± 0,22
DHP20	0,59 ± 0,27
Verapamil	0,24 ± 0,31

Tabelle 10: Ergebnisse Resistenzüberwindung 1,4-Dihydropyridine

Abbildung Nr. 40 und Tabelle Nr. 11 zeigen die Ergebnisse der Testung der Resistenzaufhebung mittels MTT-Assay. Es sei an dieser Stelle vermerkt, dass sich aufgrund der teilweisen hohen Standardabweichung bei den gewonnenen Werten nur eine bedingte Aussagekraft über das Potenzial der Resistenzüberwindung der untersuchten 1,4-Dihydropyridine ergibt.

Für die parenterale Zelllinie L5178Y wurde ein IC₅₀-Wert von 0,28 µM und für die resistente Zelllinie L5178Ymdr ein mehr als siebenfach größerer IC₅₀-Wert von 2,09 µM bestimmt. Der

Unterschied in den IC_{50} -Werten lässt sich durch die Überexpression von P-gp in der resistenten Zelllinie erklären, welche das Zytostatikum und P-gp Substrat Doxorubicin aktiv aus den Zellen ausschleust und resultierend daraus das Überleben der Zellen gegenüber hohen Doxorubicin-Konzentrationen steigert.

Als synthetisierte P-gp Inhibitoren wurden **DHP17**, **DHP19** und **DHP20** ausgewählt, welche die größten FAR-Werte im durchflusszytometrischen Assay aufwiesen. Unter den getesteten Verbindungen besitzt Verapamil den geringsten IC_{50} -Wert von 0,24 μ M, welcher in einer Größenordnung mit dem der parenteralen Zelllinie ist. Dies bedeutet, dass die Doxorubicin-Resistenz der Zelllinie L5178Y_{mdr} durch Verapamil vollständig aufgehoben wird und die ursprüngliche zytostatische Wirkung wiederhergestellt wurde. Unter den synthetisierten 1,4-Dihydropyridinen zeigt **DHP20** den geringsten IC_{50} -Wert von 0,59 μ M. Verglichen mit dem IC_{50} -Wert der resistenten Zelllinie ist der IC_{50} -Wert von **DHP20** deutlich reduziert und circa doppelt so groß wie der IC_{50} -Wert der parenteralen Zelllinie bzw. von Verapamil. Weniger inhibitorisch aktiv ist die Verbindung **DHP17**, welche einen IC_{50} -Wert von 1,35 μ M besitzt. **DHP19**, das einen IC_{50} -Wert von 2,45 μ M hat, ist unter den untersuchten 1,4-Dihydropyridinen die Verbindung mit dem höchsten IC_{50} -Wert. Verglichen mit dem IC_{50} -Wert der resistenten Zelllinie ist der IC_{50} -Wert von **DHP19** größer, was dafür spricht, dass **DHP19** keine P-gp inhibitorische Aktivität besitzt. Dies steht im Widerspruch mit den Erkenntnissen aus dem durchflusszytometrischen Assay, bei welchem **DHP19** den zweitgrößten FAR-Wert unter den getesteten 1,4-Dihydropyridinen hat. Ebenfalls fällt bei dem Vergleich der ermittelten IC_{50} -Werten mit den FAR-Werten auf, dass **DHP20**, welches den geringsten FAR-Wert unter den drei für die Testung der Resistenzüberwindung ausgewählten synthetisierten Verbindungen hat, den niedrigsten IC_{50} -Wert aufzeigt, also im MTT-Assay als wirksamster P-gp Inhibitor auftritt. **DHP17**, welches einen ähnlichen FAR-Wert wie Verapamil besitzt, hat einen deutlich höheren IC_{50} -Wert als Verapamil, was ebenfalls einen Widerspruch darstellt. Ein möglicher Erklärungsversuch für diesen beobachteten Widerspruch könnte, wie bereits im Abschnitt „ATP-Binding-Cassette Transporter (ABC-Transporter)“ beschrieben, das Vorliegen von verschiedenen Bindungsstellen in P-gp für die Verbindungen Verapamil, Doxorubicin, Rhodamin 123 und die untersuchten 1,4-Dihydropyridinen sein: **DHP17** und **DHP19** interagieren möglicherweise mit der Bindungsstelle für Rhodamin 123 und verhindern somit den Efflux dieses Fluoreszenzfarbstoffs, aber nicht (bzw. mit geringerer Affinität) mit der Bindungsstelle für Doxorubicin, wodurch dieses Zytostatikum vermehrt aus der Zelle translokalisiert wird und somit letztendlich zu erhöhten IC_{50} -Werten führt.

5.1.3 Bestimmung der zytotoxischen Wirkung der P-gp inhibierenden 1,4-Dihydropyridine mittels MTT-Assay

Neben der Untersuchung der Resistenzauflösung ist auch die Bestimmung der Zytotoxizität der Testverbindungen von entscheidender Bedeutung für ihre potentielle Anwendung als Arzneistoffe. Der Nachweis der Zytotoxizität wird mit einem MTT-Test erbracht, um den Einfluss auf die Zellvitalität photometrisch detektieren zu können. Im Unterschied zur Testung der Resistenzüberwindung sind die Ausgangsbedingungen leicht verändert: die zu untersuchenden Verbindungen einschließlich Verapamil als Vergleich werden nicht in konstanter Konzentration eingesetzt, sondern in finalen Konzentrationen von 0,01 μM bis 100 μM . Darüber hinaus ist kein Einsatz des Zytostatikums Doxorubicin notwendig. Aus Zeitgründen wurde ausschließlich an der P-gp überexprimierenden Zelllinie L5178Y_{mdr} und nicht an der parenteralen Zelllinie L5178Y getestet, wodurch sich durch die erzielten Ergebnisse nur eine eingeschränkte Aussagekraft ergibt. Somit lässt sich hiermit für eine Verbindung nicht erklären, ob sie einen toxischeren Effekt auf die nicht P-gp überexprimierende im Vergleich zur P-gp überexprimierenden Zelllinie besitzt. Würde die Testung ergeben, dass die ausgewählten 1,4-Dihydropyridine die Zellvitalität der Zelllinie L5178Y stärker beeinflussen würde, so könnte man schlussfolgern, dass die Verbindungen Substrate von P-gp sind. MDR-Modulatoren, welche selbst P-gp Substrate sind, müssen meist in hohen, teils zu Nebenwirkungen führenden Konzentrationen eingesetzt werden, um P-gp inhibieren zu können. Die weiteren Versuchsbedingungen entsprechen denen der Ermittlung der Resistenzüberwindung, siehe Abschnitt „Bestimmung des Potentials der P-gp inhibierenden Testverbindungen zur Resistenzüberwindung“. Je kleiner die am Ende der Messung eruierten IC_{50} -Werte, desto größer sind die toxischen Effekte der geprüften P-gp Inhibitoren.

Für die Untersuchung der Zytotoxizität wurden die drei 1,4-Dihydropyridine ausgesucht, welche im Fluoreszenz-Uptake-Assay zur Bestimmung der P-gp Transporteraffinität die größten FAR-Werte aufgezeigt haben: **DHP17**, **DHP19** und **DHP20**.

Keine der drei getesteten Verbindungen sowie Verapamil zeigten bis zu einer Konzentration von 100 μM toxische Effekte auf die Zelllinie L5178Y_{mdr}. Es konnten dementsprechend nur IC_{50} -Werte > 100 μM ermittelt werden. Die gewählten Verbindungen haben also keinen zusätzlichen zytotoxischen Effekt auf den gefundenen IC_{50} -Wert bei der Untersuchung der Resistenzentwicklung mit dem Zytostatikum Doxorubicin (bezogen auf die Zelllinie L5178Y_{mdr}).

5.1.4 Bestimmung der MRP-1 und MRP-2 Transporteraffinität mittels Fluoreszenz-Uptake-Assay

Die Inhibition der ABC-Transporter MRP-1 und MRP-2 kann durch dieselbe durchflusszytometrische Methode, welche zur Testung des P-gp hemmenden Potentials der synthetisierten Verbindungen eingesetzt wurde, untersucht werden. Zum Einsatz kommen die MRP-1 und MRP-2 exprimierenden Zelllinien A2780 und A2780cis und das Medium RPMI-1640. Als Fluoreszenzfarbstoff diente nicht das P-gp Substrat Rhodamin 123, sondern das MRP-1 und MRP-2 Substrat CFDA (5(6)-Carboxy-fluoresceindiacetat-acetoxymethylester). Das unpolare CFDA wird im Inneren der Zellen durch unspezifische Esterasen zu dem polareren 5(6)-Carboxyfluorescein prozessiert, welches durch den Verlust der Estergruppen nicht mehr befähigt ist aus der Zelle hinaus zu diffundieren.

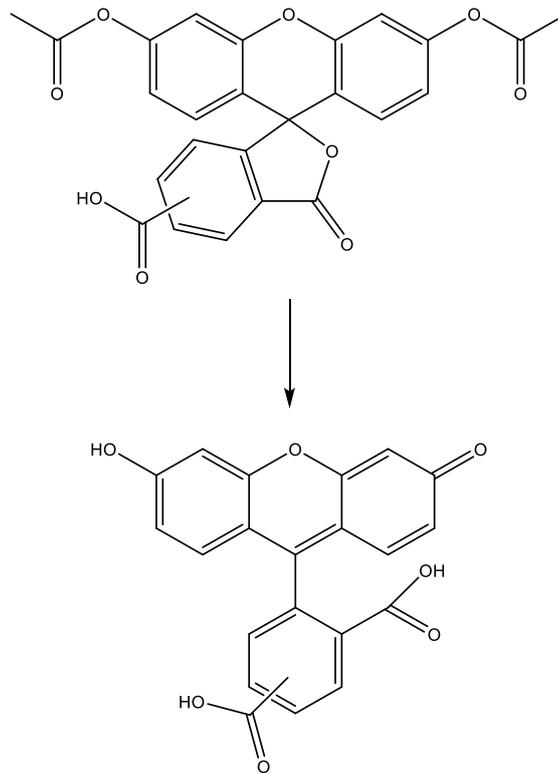


Abbildung 37: Reaktion CFDA zu CF

Für die beiden Zelllinien A2780 und A2780cis wurde ein BCA-Assay (BCA: Bicinchoninsäure) durchgeführt, um das Vorhandensein von Membranproteinen, insbesondere P-gp, MRP-1 und MRP-2, in diesen Zelllinien zu quantifizieren. Der BCA-Assay wurde am Institut für Pharmakologie, Universität Greifswald, unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. M. V. Tzvetkov und Prof. Dr. med. Stefan Engeli durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle Nr. 12 in pmol/mg angegeben (normalisierte Daten):

	A2780 [pmol/mg]	A2780cis [pmol/mg]
ABCB1 (P-gp)	-	-
ABCC1 (MRP-1)	0,50	0,30
ABCC2 (MRP-2)	0,79	0,61
ABCC3	0,31	0,16
MATE1	0,13	0,14
OCT1	0,13	0,04
OCT3	0,32	0,27
Na/K-ATPase	1,59	1,62

Tabelle 11: BCA-Assay

Die Ergebnisse des BCA-Assays zeigen, dass beide Zelllinien kein P-gp enthalten. Dies stellt sicher, dass die Ergebnisse unabhängig von den gewonnenen Erkenntnissen aus dem Abschnitt „Bestimmung der P-gp Transporteraffinität der 1,4-Dihydropyridine mittels Fluoreszenz-Uptake-Assay“ betrachtet werden können und ausschließlich die beiden Transporterproteine MRP-1 und -2 betrachtet werden. Ebenfalls konnte mit den BCA-Assay aufgezeigt werden, dass die Cisplatin-Resistenz von A2780cis nicht, wie vorab vermutet, durch eine Überexpression von MRP-2 vorhanden ist, da auch die Zelllinie A2780 MRP-2 exprimiert. Dementsprechend wird im Zuge dieses Abschnittes nicht einzeln zwischen der Expression von MRP-1 bzw. MRP-2 unterschieden, sondern für die beiden Zelllinien die gemeinsame MRP-1 und MRP-2 hemmende Aktivität angegeben und diskutiert.

Als Positivkontrolle findet der unspezifische MRP-Inhibitor Probenecid in einer Konzentration von 10 µM (gelöst in DMSO) Anwendung. Die Inkubationszeiten betragen für den ersten Beladungsschritt 20 Minuten und für den zweiten Beladungsschritt 15 Minuten. Die weiteren Versuchsbedingungen gleichen denen der oben bereits beschriebenen Methode aus dem Abschnitt „Bestimmung der P-gp Transporteraffinität der 1,4-Dihydropyridine mittels Fluoreszenz-Uptake-Assay“.

Die FAR-Werte für die Verbindungen sowie der Vergleich mit Probenecid berechnen sich mit folgenden Gleichungen:

Gleichung Nr. 3:
$$FAR = \frac{F_{A2780-Mod}}{F_{A2780}}$$

Gleichung Nr. 4:
$$FAR = \frac{F_{A2780cis-Mod}}{F_{A2780cis}}$$

Gleichung Nr. 5:
$$FAR_{Vergleich} = \frac{FAR_{Verbindung}}{FAR_{Probenecid}}$$

Tabelle Nr. 13 zeigt die Ergebnisse des durchflusszytometrischen Assays.

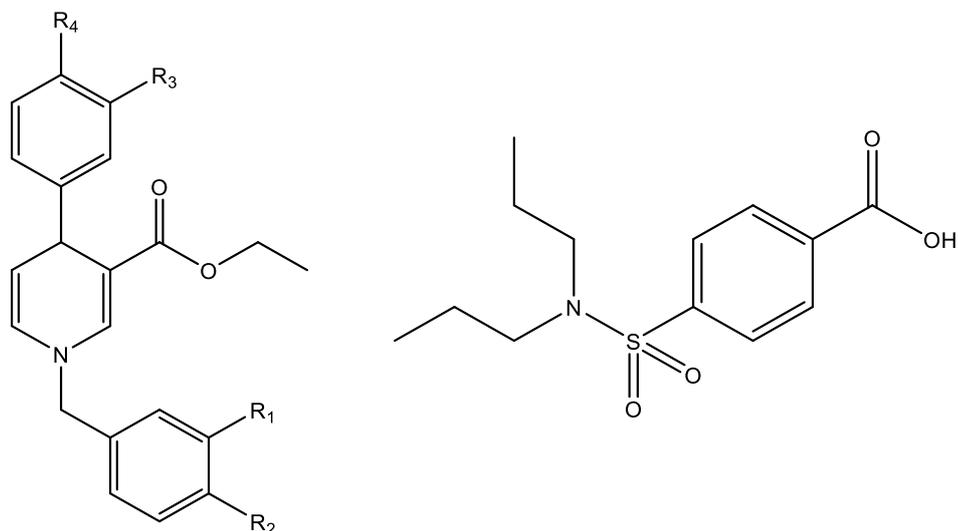


Abbildung 38: allgemeine Strukturformel der Zielverbindungen mit 1,4-Dihydropyridin Grundstruktur (links) und Probenecid (rechts)

Verbindung					A2780	A2780cis		
	-R1	-R2	-R3	-R4	FAR ± SD	FAR _{Vergleich}	FAR ± SD	FAR _{Vergleich}
DHP01	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	1,07 ± 0,17	1,16	2,27 ± 0,36	1,47
DHP02	-H	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	0,81 ± 0,15	0,88	1,47 ± 0,32	0,96
DHP03	-CH ₃	-H	-H	-OCH ₃	1,16 ± 0,18	1,25	1,45 ± 0,31	0,94
DHP04	-H	-CH ₃	-H	-OCH ₃	1,04 ± 0,11	1,13	1,89 ± 0,34	1,23
DHP05	-OCH ₃	-H	-H	-CH ₃	1,06 ± 0,19	1,15	1,62 ± 0,23	1,05
DHP06	-H	-OCH ₃	-H	-CH ₃	1,07 ± 0,34	1,15	1,57 ± 0,06	1,02
DHP07	-CH ₃	-H	-H	-CH ₃	1,66 ± 0,12	1,79	1,80 ± 0,28	1,17
DHP08	-H	-CH ₃	-H	-CH ₃	1,11 ± 0,16	1,20	1,64 ± 0,02	1,06
DHP09	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	1,35 ± 0,04	1,46	1,63 ± 0,12	1,05
DHP10	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	1,08 ± 0,13	1,17	1,77 ± 0,53	1,15
DHP11	-CH ₃	-H	-OCH ₃	-H	1,12 ± 0,12	1,20	1,57 ± 0,03	1,02
DHP12	-H	-CH ₃	-OCH ₃	-H	1,50 ± 0,19	1,62	1,79 ± 0,22	1,16
DHP13	-OCH ₃	-H	-CH ₃	-H	1,12 ± 0,30	1,21	1,24 ± 0,20	0,80

DHP14	-H	-OCH ₃	-CH ₃	-H	1,16 ± 0,15	1,25	1,44 ± 0,15	0,93
DHP15	-CH ₃	-H	-CH ₃	-H	1,09 ± 0,13	1,18	1,49 ± 0,26	0,96
DHP16	-H	-CH ₃	-CH ₃	-H	0,80 ± 0,10	0,86	1,29 ± 0,06	0,84
DHP17	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	1,32 ± 0,13	1,42	1,70 ± 0,39	1,10
DHP18	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	1,31 ± 0,17	1,41	1,22 ± 0,34	0,79
DHP19	-CH ₃	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	1,17 ± 0,39	1,26	2,07 ± 0,51	1,34
DHP20	-H	-CH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	1,00 ± 0,09	1,07	1,54 ± 0,47	1,00
Probenecid	-	-	-	-	0,93 ± 0,19	1,00	1,54 ± 0,28	1,00

Tabelle 12: Ergebnisse durchflusszytometrischer Assay 1,4-Dihydropyridine MRP-1/-2

Da sowohl die Zelllinie A2780 als auch die Cisplatin-resistente Subzelllinie A2780cis MRP-1 und -2 exprimieren, wurden für beide Zelllinien FAR-Werte bzw. FAR_{Vergleich}-Werte bestimmt. Aufgrund der Tatsache, dass der Fluoreszenzfarbstoff CFDA ein Substrat von MRP-1 und MRP-2 ist, lässt sich für die einzelne analysierte Verbindung nicht aussagen, ob diese spezifisch MRP-1 oder MRP-2 hemmt.

Unter den zwanzig getesteten 1,4-Dihydropyridine besitzen nicht sämtliche Verbindungen bei einer Konzentration von 10 µM einen FAR-Wert größer 1 und sind demzufolge nicht alle als MRP-1 bzw. -2 Inhibitoren geeignet. Für die Zelllinie A2780 besitzen die Verbindungen **DHP02**, **DHP16** und die Positivkontrolle Probenecid einen FAR-Wert kleiner 1 (entsprechende FAR-Werte: 0,81; 0,80 bzw. 0,93). Die Positivkontrolle Probenecid besitzt somit bei der Zelllinie A2780 in der eingesetzten Konzentration von 10 µM keine modulierende Wirkung. Bei der Zelllinie A2780cis besitzt keine der untersuchten Verbindung einen FAR-Wert kleiner 1; es sind somit alle MRP-1 bzw. MRP-2 inhibitorisch wirksam. Die drei stärksten MRP-1 bzw. -2 Inhibitoren sind auf den FAR-Wert bezogen bei der Zelllinie A2780 **DHP07**, **DHP09** und **DHP12** (entsprechende FAR-Werte: 1,66; 1,35 bzw. 1,50) und bei der Zelllinie A2780cis **DHP01**, **DHP04** und **DHP19** (entsprechende FAR-Werte: 2,27; 1,89 bzw. 2,07).

Im folgenden Abschnitt sollen, trotz der teilweise nur sehr geringen Unterschiede in den FAR-Werten, die synthetisierten 1,4-Dihydropyridine in ihren FAR-Werten untereinander verglichen werden, um Aussagen über ihre Aktivität gegenüber MRP-1 bzw. -2 und über Struktur-Wirkungs-Beziehungen treffen zu können. Die Verbindungen werden sowohl bezogen auf ihre Phenyl- als auch auf ihre Benzyl-Substituenten miteinander in Relation gesetzt. Verglichen werden für die jeweilige Verbindung ebenfalls die Unterschiede in den FAR-Werten bei den beiden verwendeten Zelllinien A2780 und A2780cis, um Gemeinsamkeiten und Abweichungen im inhibitorischen Potential zu erfassen. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass für einige Verbindungen der FAR-Wert unter Mitbetrachtung der entsprechenden Standardabweichung

keine genaue Aussage über MRP-1/-2 modulierende Eigenschaften zulässt. Dies betrifft vor allem Verbindungen, deren FAR-Wert knapp über bzw. unter 1 liegt. Für die Zelllinie A2780 betrifft dies die Verbindungen **DHP01**, **DHP03**, **DHP04**, **DHP05**, **DHP06**, **DHP08**, **DHP10**, **DHP11**, **DHP13**, **DHP15**, **DHP19** und Probenecid; für die Zelllinie A2780cis **DHP18**. Im nachfolgenden Text wird zur Interpretation von Struktur-Wirkungs-Beziehungen der FAR-Wert ohne Mitbetrachtung der Standardabweichungen verwendet.

Betrachtet man die Verbindungen **DHP01** bis **DHP04**, welche alle einen Methoxy-Substituenten in para-Position im Phenyl-Rest aufweisen, so lässt sich feststellen, dass ein Substituent in meta-Position im Benzyl-Ring bei **DHP01** und **DHP03** zu einem erhöhten FAR-Wert bei der Zelllinie A2780 führt (entsprechende FAR-Werte: 1,07 bzw. 1,16). **DHP04** besitzt im Vergleich dazu einen geringeren FAR-Wert von 1,04 und **DHP02** besitzt einen FAR-Wert von 0,81 und ist folglich nicht MRP-1 bzw. -2 hemmend. Bei der Zelllinie A2780cis führt der Methoxy-Substituent in meta-Stellung im Benzyl-Ring von **DHP01** zu der höchsten MRP-1 und -2 Inhibition unter den getesteten Verbindungen (inklusive Probenecid) für diese Zelllinie (FAR-Wert: 2,27; FAR_{Vergleich}: 1,47). In Relation dazu sind die anderen drei Verbindungen schwächer MRP-1 und -2 hemmend. Ein Blick auf die FAR_{Vergleich}-Werte zeigt, dass bei der Zelllinie A2780 die 1,4-Dihydropyridine **DHP01**, **DHP03** und **DHP04** und bei der Zelllinie A2780cis die 1,4-Dihydropyridine **DHP01** und **DHP04** stärker wirksam als Probenecid bei einer 10 µM Konzentration sind.

Als strukturelle Gemeinsamkeit besitzen die Verbindungen **DHP05** bis **DHP08** einen Methyl-Rest in Position 4 des 4-Phenyl-Rings. Für die Zelllinie A2780 zeigen **DHP05**, **DHP06** und **DHP08** einen ungefähr gleich großen FAR-Wert (FAR-Werte: 1,06; 1,07 bzw. 1,11). **DHP07** besitzt mit einem Methyl-Substituenten in Position 3 des N-Benzyl-Rests einen größeren FAR-Wert von 1,66 und ist mit einem FAR_{Vergleich}-Wert von 1,79 der stärkste MRP-1 und -2 Inhibitor bei der Zelllinie A2780. Bei der Zelllinie A2780cis lässt sich die Aussage treffen, dass ein Substituent in meta-Position zu höheren FAR-Werten führt als ein entsprechender Substituent in para-Position (entsprechende FAR-Werte: 1,62 und 1,80 bei **DHP05** und **DHP07** bzw. 1,57 und 1,64 bei **DHP06** und **DHP08**). Im Vergleich mit Probenecid ergeben bei der Zelllinie A2780cis alle vier Verbindungen (leicht) höhere FAR-Werte (entsprechende FAR_{Vergleich}-Werte: 1,05; 1,02; 1,17 bzw. 1,06).

Setzt man alle Verbindungen mit einem Substituenten in para-Position im Phenyl-Ring, also **DHP01** bis **DHP08**, in Relation, so lässt sich für die Zelllinie A2780 erkennen, dass, mit Ausnahme von **DHP05** und **DHP06**, sich ein höherer FAR-Wert durch Einfuhr eines Substituenten in meta-Position des Benzyl-Rings erreichen lässt. Gleiches gilt für die Zelllinie A2780cis, mit Ausnahme von **DHP03** und **DHP04**.

DHP09 bis **DHP12** verfügen über eine Methoxy-Gruppe in Position 3 des Phenyl-Rings. Vergleicht man die FAR-Werte der vier Verbindungen für die Zelllinie A2780, so lässt sich erkennen, dass ein

Methoxy-Substituent in meta-Stellung bei **DHP09** und ein Methyl-Substituent in para-Stellung bei **DHP12** im Benzyl-Ring zu hohen FAR-Werten führt (entsprechende FAR-Werte: 1,35 bzw. 1,50). Im Kontrast dazu führt bei der Zelllinie A2780cis ein Substituent in para-Stellung im Benzyl-Rest, vorhanden bei **DHP10** und **DHP12**, zu hohen FAR-Werten (FAR-Werte: 1,77 bzw. 1,79). Setzt man die Ergebnisse für die Untersuchung der Verbindungen **DHP09** und **DHP10** mit denen der Verbindungen **DHP01** und **DHP02** an der Zelllinie A2780 in Relation, so lässt sich schlussfolgern, dass ein Methoxy-Substituent im Phenyl-Ring in para-Stellung verglichen mit einem in meta-Stellung zu favorisieren ist.

Für die Verbindungen **DHP13** bis **DHP16**, welche alle eine Methyl-Gruppe in meta-Stellung im Phenyl-Ring aufweisen, wurden große FAR-Werte unabhängig von der verwendeten Zelllinie für die Verbindung **DHP14**, welche eine Methoxy-Gruppe in para-Position im Benzyl-Ring besitzt, und für die Verbindung **DHP15**, welche eine Methyl-Gruppe in meta-Position im Benzyl-Ring besitzt, erzielt werden (FAR-Werte für A2780: 1,16 bzw. 1,09; FAR-Werte für A2780cis: 1,44 bzw. 1,49). Die vier Verbindungen sind in der Zelllinie A2780cis alle schwächer MRP-1 bzw. -2 hemmend wirksam als Probenecid (FAR_{Vergleich}-Werte von **DHP13** bis **DHP16**: 0,80; 0,93; 0,96; 0,84).

Sowohl in meta- als auch in para-Position verfügen **DHP17** bis **DHP20** eine Methoxy-Gruppe im Phenyl-Ring. Ein meta-Substituent im Benzyl-Rest führt bei beiden Zelllinien zu höheren FAR-Werten als ein para-Substituent (FAR-Werte von **DHP17** und **DHP19** für A2780 bzw. A2780cis: 1,32 und 1,17 bzw. 1,70 und 2,07). Für die Verbindungen **DHP17** und **DHP18** ist der Unterschied zwischen den FAR-Werten bei der Zelllinie A2780 nur sehr geringfügig (entsprechende FAR-Werte: 1,32 und 1,31), sie gleichen beide dem FAR-Wert, welcher für die Verbindung **DHP09** gefunden werden konnte (FAR-Wert: 1,35). **DHP17** und **DHP19** sind bei den zwei Zelllinien stärker MRP-1 bzw. -2 inhibierend als Probenecid. Anders als bei der Bestimmung der P-gp Transporteraffinität, wo gezeigt werden konnte, dass die Verbindungen **DHP17**, **DHP19** und **DHP20** deutlich stärker aktiv waren als die anderen untersuchten Verbindungen, konnte dies für die Inhibition für MRP-1 und -2 nicht nachgewiesen werden.

Gemäß BCA-Assay besitzt die Zelllinie A2780 eine höhere Expression an MRP-1 und -2 als A2780cis. Vergleicht man sämtliche FAR-Werte und FAR_{Vergleich}-Werte miteinander, so fällt allerdings auf, dass die FAR-Werte einer Verbindung für die Zelllinie A2780cis meist größer ist als für die Zelllinie A2780 (Ausnahme: **DHP18**) und dass die FAR_{Vergleich}-Werte einer Verbindung für die Zelllinie A2780 meist höher ist als für die Zelllinie A2780cis (Ausnahme: **DHP01**, **DHP02**, **DHP04** und **DHP19**). Einzelne Dihydropyridin Verbindungen besitzen somit bei den beiden Zelllinien ein unterschiedliches Inhibitionspotential für 5(6)-Carboxyfluorescein. Dies deutet darauf hin, dass der Efflux des Farbstoffs CF nicht nur durch die Transporter MRP-1 und -2, sondern auch durch andere Transporter, welche mit den synthetisierten 1,4-Dihydropyridine interagieren, beeinflusst

wird, wodurch sich die unterschiedlichen FAR-Werte zwischen A2780 und A2780cis erklären lässt. Welcher Transporter hierfür in Frage kommt lässt sich anhand des BCA-Assays nicht aussagen. Bezogen auf die Substitution im N-Benzyl-Ring sollen nun die Verbindungen untereinander gegenübergestellt werden. Vergleicht man bei der Zelllinie A2780 die synthetisierten Verbindungen **DHP01** bis **DHP12**, so erkennt man, dass ein Austausch des Methoxy-Substituenten durch den Methyl-Substituenten im Benzyl-Rest, unabhängig ob in para- oder meta-Stellung, eine Erhöhung des FAR-Wertes zur Folge hat (Ausnahme: **DHP09** und **DHP11**). Für die Verbindungen **DHP13** bis **DHP20**, welche eine Methyl-Gruppe in Position 3 bzw. zwei Methoxy-Gruppen in den Positionen 3 und 4 im Phenyl-Ring besitzen, gilt bei der gleichen Zelllinie das Gegenteil: hier führt ein Austausch der Methoxy-Gruppe durch eine Methyl-Gruppe im Benzyl-Rest zu einer Erniedrigung des FAR-Wertes. Für die Zelllinie A2780cis lässt sich ein ähnlicher Trend beobachten. Mit Ausnahme von **DHP01** und **DHP03**, **DHP09** und **DHP11** bzw. **DHP14** und **DHP16** führt die Einführung einer Methyl-Gruppe anstelle einer Methoxy-Gruppe zu einer Erhöhung des FAR-Wertes.

5.2 Biologische Evaluierung der 9,10-Dihydroacridine

5.2.1 Bestimmung der P-gp Transporteraffinität der 9,10-Dihydroacridine mittels Fluoreszenz-Uptake-Assay

Neben den 1,4-Dihydropyridinen wurden auch die synthetisierten 9,10-Dihydroacridine auf ihr inhibitorisches Potential gegenüber der Effluxpumpe P-gp hin untersucht. Die Testung der 9,10-Dihydroacridine wurde an der Universität Szeged (Budapest, Ungarn) unter Leitung von Joseph Molnar, Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Immunbiologie, durchgeführt. Getestet wurden folgende elf Verbindungen: **DHA05, DHA07, DHA08, DHA09, DHA11, DHA13, DHA14, DHA15, DHA16, DHA17** und **DHA18**. Die Ergebnisse des P-gp Inhibitionsassays für die sieben Verbindungen **DHA01, DHA02, DHA03, DHA04, DHA06, DHA10** und **DHA12**, welche von Marc Hemmer synthetisiert, biologisch evaluiert und freundlicherweise für weiterführende Testungen zur Verfügung gestellt wurden, finden sich unter der genannten Literaturquelle²⁵⁰. Eine Interpretation der biologischen Testung und daraus abgeleitete Struktur-Wirkungs-Beziehungen beinhalten im Folgenden nur die genannten elf Verbindungen.

Zwischen der durchflusszytometrischen Testung der 1,4-Dihydropyridine (siehe Abschnitt „Bestimmung der P-gp Transporteraffinität der 1,4-Dihydropyridine mittels Fluoreszenz-Uptake-Assay“) und der 9,10-Dihydroacridine gibt es geringfügige Unterschiede in der Durchführung der Methode. Während bei den 1,4-Dihydropyridinen die eingesetzte Zellzahl 500.000 betrug, wurden für die 9,10-Dihydroacridine 1.000.000 Zellen eingesetzt. Ein weiterer Gegensatz zu den 1,4-Dihydropyridinen, welche alle bei einer Konzentration von 10 µM vermessen wurden, ist der Fakt, dass die 9,10-Dihydroacridine in den Konzentrationen 2 µM und 20 µM auf ihr P-gp inhibitorisches Potential hin analysiert wurden. Die Referenz Verapamil wurde in einer Konzentration von 20 µM eingesetzt. Eine Probe zur Bestimmung des Einflusses des 2 %igen Gehalts von DMSO auf die Zellviabilität wurde ebenfalls vermessen. Eine weitere Variation im Inhibitionsassay ergibt sich in den Inkubationszeiten: nach der Beladung mit den Testverbindungen wurde 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Rhodamin 123 in einer finalen Endkonzentration von 5,2 µM beladen und für 20 Minuten inkubiert. Das Durchflusszytometer Partec CyFlow der Firma Partec wurde für die Detektion der Fluoreszenzwerte benutzt. Aufgrund der vorliegenden Unterschiede zwischen der angewandten durchflusszytometrischen Methode bei den 1,4-Dihydropyridinen und den 9,10-Dihydropyridinen erfolgt im Rahmen dieser Arbeit kein direkter Vergleich der beiden Synthesereihen bezogen auf ihre P-gp modulierende Aktivität.

Die nachfolgende Tabelle Nr. 14 zeigt die Ergebnisse des durchflusszytometrischen Assays. Für jede untersuchte Verbindung sind der jeweilige FAR-Wert und der FAR_{Vergleich}-Wert angegeben.

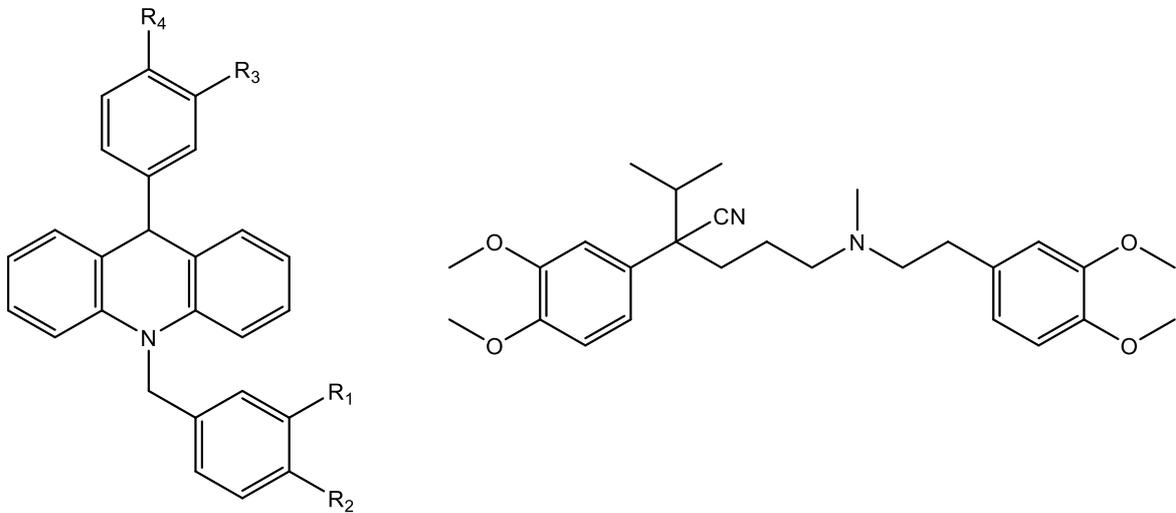


Abbildung 39: allgemeine Strukturformel der Zielverbindungen mit 9,10-Dihydroacridin Grundstruktur (links) und Verapamil (rechts)

Verbindung	Konzentration [μM]	-R1	-R2	-R3	-R4	FAR	FAR _{Vergleich} (20 μM)
DHA05	2					1,50	
	20	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	2,47	0,29
DHA07	2					0,90	
	20	-H	-H	-H	-CH ₃	1,07	0,13
DHA08	2					0,92	
	20	-OCH ₃	-H	-H	-CH ₃	1,41	0,17
DHA09	2					0,94	
	20	-H	-OCH ₃	-H	-CH ₃	1,24	0,15
DHA11	2					1,34	
	20	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	4,42	0,52
DHA13	2					1,04	
	20	-H	-H	-CH ₃	-H	1,21	0,14
DHA14	2					1,10	
	20	-OCH ₃	-H	-CH ₃	-H	1,64	0,19
DHA15	2					1,02	
	20	-H	-OCH ₃	-CH ₃	-H	1,70	0,20

DHA16	2					1,89	4,37
	20	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	37,05	
DHA17	2					0,87	0,98
	20	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	8,30	
DHA18	2					0,75	0,19
	20	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	1,58	
Verapamil	20	-	-	-	-	8,47	1,00

Tabelle 13: Ergebnisse durchflusszytometrischer Assay 9,10-Dihydroacridine P-gp

Alle synthetisierten 9,10-Dihydroacridin-Verbindungen besitzen bei einer Konzentration von 20 μM einen FAR-Wert > 1 und zeigen demzufolge eine P-gp modulierende Wirkung auf. Bei einer Konzentration von 2 μM konnten nur sechs der elf Testverbindungen einen FAR-Wert > 1 aufweisen.

Unter allen getesteten 9,10-Dihydroacridinen besitzt **DHA16** bei einer Konzentration von 20 μM den höchsten FAR-Wert mit 37,05 ($\text{FAR}_{\text{Vergleich}}$ von 4,37). Die zweit- und drittstärkste synthetisierte Verbindung, gleichfalls bei einer 20 μM Konzentration, sind **DHA17** und **DHA11** mit den FAR-Werten von 8,30 bzw. 4,42 ($\text{FAR}_{\text{Vergleich}}$ von 0,98 bzw. 0,52). Für die Konzentration von 2 μM haben die Verbindungen **DHA16**, **DHA05** und **DHA11** die höchsten FAR-Werte: 1,89; 1,50 bzw. 1,34. Die als Referenz eingesetzte Substanz Verapamil besitzt einen FAR-Wert von 8,47.

Die Testverbindungen mit den niedrigsten FAR-Werten sind bei einer 2 μM Konzentration **DHA18**, **DHA17** und **DHA07** mit 0,75; 0,87 bzw. 0,90 und bei einer 20 μM Konzentration **DHA07**, **DHA13** und **DHA09** mit 1,07; 1,21 bzw. 1,24. Die restlichen 9,10-Dihydroacridine reihen sich mit ihren FAR-Werten zwischen den Werten der genannten Verbindungen ein.

Die beiden Verbindungen **DHA05** und **DHA11** teilen sich als strukturelle Gemeinsamkeit im N-Benzyl-Ring in meta-Position eine Methoxy-Gruppe. Im Phenyl-Ring unterscheiden sie sich in der Position der Methoxy-Gruppe, in **DHA05** liegt diese in para-Stellung und in **DHA11** in meta-Stellung. Bei einer Konzentration von 2 μM weist **DHA05** einen höheren FAR-Wert als **DHA11** auf (FAR-Wert von **DHA05** und **DHA11**: 1,50 bzw. 1,34). Eine zehnfache Erhöhung der Konzentration der Verbindungen führt dazu, dass **DHA11** im Vergleich zu **DHA05** eine stärkere inhibitorische P-gp Aktivität besitzt (FAR-Wert von **DHA05** und **DHA11**: 2,47 bzw. 4,42). Eine Methoxy-Gruppe in meta-Substitution im Phenyl-Ring begünstigt demzufolge bei einer Konzentration von 20 μM die Akkumulation von Rhodamin 123 in der Zelle durch P-gp Inhibition. Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass **DHA05** bei niedrigen Konzentrationen eine höhere Affinität gegenüber P-gp als **DHA11** aufzeigt, aber bei hohen Konzentrationen schwächer aktiv ist.

Vergleicht man **DHA11** und Verapamil bei einer Konzentration von 20 μM , dann lässt sich feststellen, dass **DHA11** ungefähr die halbe inhibitorische Wirkung von Verapamil besitzt.

Die Verbindungen **DHA07**, **DHA08** und **DHA09** besitzen als strukturelle Gemeinsamkeit eine Methyl-Gruppe in Position 4 des Phenyl-Rests. Alle drei Verbindungen weisen bei einer Konzentration von 2 μM einen FAR-Wert < 1 auf, wodurch sie nicht P-gp inhibierend aktiv sind. Bei einer 20 μM Konzentration zeigen die drei Verbindungen einen FAR-Wert > 1 auf. Die Verbindung **DHA08**, welche eine Methoxy-Gruppe in meta-Stellung im Benzyl-Ring hat, verfügt mit einem FAR-Wert von 1,41 einen größeren FAR-Wert als die Verbindung **DHA09**, die die entsprechende Methoxy-Gruppe in para-Stellung besitzt. Die in para- und meta-Stellung unsubstituierte Verbindung **DHA07** weist den geringsten FAR-Wert dieser drei Verbindungen auf und ist demzufolge der am schwächsten wirksame P-gp Inhibitor. Eine Methoxy-Gruppe in meta-Stellung begünstigt die P-gp inhibitorische Aktivität gegenüber einer Methoxy-Gruppe in para-Stellung bzw. eines unsubstituierten Rings im Benzyl-Rests.

Die Verbindungen **DHA13**, **DHA14** und **DHA15** weisen im Gegensatz zu den vorherig genannten Verbindungen ihre Methyl-Gruppe in Position 3 des Phenyl-Rings auf. Im Vergleich zu **DHA07**, **DHA08** und **DHA09** zeigen die drei Verbindungen bereits bei einer Konzentration von 2 μM mit einem FAR-Wert > 1 eine geringe P-gp inhibitorische Wirkung (FAR-Werte von **DHA13**, **DHA14** und **DHA15** (2 μM): 1,04; 1,10 und 1,02). Für die zehnfach höhere Konzentration besitzt die im Benzyl-Ring unsubstituierte Verbindung **DHA13** ebenso wie die Verbindung **DHA07** den geringsten FAR-Wert unter den drei 9,10-Dihydroacridinen dieser Verbindungsreihe. Die Methoxy-Gruppe in para-Stellung im Benzyl-Ring von **DHA15** führt zu einem leicht erhöhten FAR-Wert im Vergleich zu der entsprechenden meta-Stellung der Methoxy-Gruppe von **DHA14** (FAR-Werte der Methoxy-Gruppen: 1,70 (para) bzw. 1,64 (meta)).

Zusammengefasst lässt sich an diesem Punkt für die Verbindungen **DHA07**, **DHA08**, **DHA09**, **DHA13**, **DHA14** und **DHA15** feststellen, dass die Verbindungen mit einer Substitution der Methyl-Gruppe im Phenyl-Ring in Position 4 und einer Methoxy-Gruppe im Benzyl-Ring in Position 3 sowie eine entsprechende Methyl-Gruppe in Position 3 mit einer Methoxy-Gruppe im Benzyl-Ring in Position 4 zu dem höchsten FAR-Werten führen. Stellt man die sechs Verbindungen den Verbindungen **DHA05** und **DHA11** gegenüber, so fällt auf, dass eine Substitution der Methyl-Gruppe gegen eine Methoxy-Gruppe im Phenyl-Ring unabhängig der eingesetzten Konzentration zu höheren FAR-Werten führt und demnach die stärkeren P-gp Inhibitoren darstellt.

Die letzten drei Verbindungen der 9,10-Dihydroacridine Verbindungsreihe, **DHA16**, **DHA17** und **DHA18**, teilen sich als gemeinsames Strukturelement eine Methoxy-Funktion in Position 3 und 4 des Phenyl-Rings. Bei einer Konzentration von 2 μM besitzt nur die im Benzyl-Rest unsubstituierte Verbindung **DHA16** einen FAR-Wert > 1 . Alle drei Verbindungen besitzen bei einer Konzentration

von 20 μM einen FAR-Wert > 1 und sind P-gp inhibierend. **DHA16** hat bei dieser Konzentration mit einem FAR-Wert von 37,05 die stärkste Effluxpumpen-blockierende Wirkung unter den 9,10-Dihydroacridinen und ist ungefähr viermal so aktiv wie die Vergleichskontrolle Verapamil. Dem gegenübergestellt weist **DHA17**, welches eine Methoxy-Funktion in meta-Position im Benzyl-Rest besitzt, mit einem FAR-Wert von 8,30 eine ungefähr gleich starke inhibierende Wirkung wie Verapamil ($\text{FAR}_{\text{Vergleich}}: 0,98$) auf. **DHA17** ist unter den getesteten 9,10-Dihydroacridinen der zweitaktivste P-gp Inhibitor. Die Testverbindung **DHA18**, welche die Methoxy-Gruppe analog zu **DHA17** in para-Stellung aufweist, ist mit einem FAR-Wert von 1,58 mit anderen 9,10-Dihydroacridinen bei der eingesetzten Konzentration vergleichbar. Unter den drei letztgenannten Verbindungen konnte sich ein unsubstituierter Benzyl-Rest als besonders vorteilhaft für die P-gp hemmende Wirkung erweisen. Eine Methoxy-Gruppe in Position 3 anstelle von Position 4 im Benzyl-Ring führt ebenfalls zu einer drastischen Erhöhung des FAR-Werts.

Wie bereits bei den Verbindungen **DHA05** und **DHA11** beobachtbar, führt ein Methoxy-Substituent im Phenyl-Ring im Vergleich zu einem Methyl-Substituenten zu einer gesteigerten P-gp Hemmung. Führt man in den Phenyl-Ring eine weitere Methoxy-Gruppe, so führt dies zu einem nochmals erhöhten P-gp inhibierenden Effekt.

Ergänzend soll an dieser Stelle noch erwähnt werden, dass sich eine weitere Erkenntnis durch die Einteilung der getesteten Verbindungen nach den Substituenten im N-Benzyl-Ring treffen lassen kann: ein Austausch der in para-Stellung befindlichen Methyl-Gruppe in die meta-Stellung führt zu einer leichten Erhöhung des FAR-Werts.

5.2.2 Bestimmung der zytotoxischen und antiproliferativen Wirkung der P-gp inhibierenden 9,10-Dihydroacridine mittels MTT-Assay

Parallel zu den 1,4-Dihydropyridinen wurde auch das zytotoxische Potential der 9,10-Dihydroacridine mithilfe eines MTT-Assays untersucht. Der Zytotoxizitätsassay der 9,10-Dihydroacridine unterscheidet sich in einigen Punkten vom dem der 1,4-Dihydropyridine, siehe Abschnitt „Bestimmung des zytotoxischen und antiproliferativen Effekts der Verbindungen mithilfe des IC_{50} -Werts (MTT-Test)“. Getestet wurde an den beiden Maus-T-Lymphom-Zelllinien L5178Y und L5178Ymdr. Eingesetzt wurden folgende elf Verbindungen: **DHA05**, **DHA07**, **DHA08**, **DHA09**, **DHA11**, **DHA13**, **DHA14**, **DHA15**, **DHA16**, **DHA17** und **DHA18**. Der IC_{50} -Wert der Verbindung **DHA12** wurde bereits an anderer Stelle untersucht, siehe Literaturquelle ²⁵⁰. Die Verbindungen wurden in Konzentrationen bis 100 μM verwendet. Je größer der ermittelte IC_{50} -Wert, desto weniger toxisch und mehr geeignet als potentiell einsetzbarer Wirkstoff ist die jeweilige 9,10-Dihydroacridin Verbindung.

Keine der elf getesteten Verbindungen zeigten bis zu einer Konzentration von 100 µM toxische Effekte auf die Zelllinien L5178Y bzw. L5178Ymdr. Es konnten dementsprechend nur IC₅₀-Werte > 100 µM ermittelt werden. Die Verbindung **DHA12** besitzt ebenfalls keine zelltoxischen Eigenschaften²⁵⁰.

Wie bereits im Abschnitt „Bestimmung der zytotoxischen Wirkung der P-gp inhibierenden 1,4-Dihydropyridine mittels MTT-Assay“ angesprochen, lässt sich bei der gleichzeitigen Untersuchung der Verbindungen an beiden Zelllinien eine Aussage über die Substrateigenschaften für P-gp treffen. Da unabhängig von der Zelllinie der IC₅₀-Wert größer als die höchste eingesetzte Konzentration von 100 µM ist, lässt sich an dieser Stelle nicht erkennen, ob die 9,10-Dihydroacridine Substrate von P-gp sind oder nicht.

Neben den zytotoxischen Eigenschaften der ausgewählten 9,10-Dihydroacridine wurde ebenfalls das antiproliferative Potentials der Verbindungen geprüft. Die Inhibition des Zellwachstums wurde auch unter Einsatz des IC₅₀-Werts ausgedrückt. Der IC₅₀-Wert gibt die hemmende Dosis an, welche das Wachstum der Zellen, die den synthetisierten Verbindungen ausgesetzt sind, um 50 % reduziert. Die Versuchsbedingungen gleichen denen des oben beschriebenen Zytotoxizitätsassays. Als Startkonzentration wurde 100 µM eingesetzt. Relevante Unterschiede sind die mit 6.000 Zellen geringere Zellzahl pro Well und der erhöhte Inkubationszeitraum von 72 Stunden.

Die folgende Tabelle Nr. 15 zeigt die Ergebnisse des antiproliferativen Assays:

Verbindung	L5178Y	L5178Ymdr
	IC ₅₀ ± SD (µM)	IC ₅₀ ± SD (µM)
DHA05	0,34 ± 0,05	5,08 ± 0,66
DHA07	2,68 ± 0,29	18,32 ± 1,53
DHA08	0,43 ± 0,05	5,77 ± 0,37
DHA09	0,15 ± 0,02	10,73 ± 1,44
DHA11	5,01 ± 0,84	26,94 ± 0,3
DHA13	7,25 ± 0,46	31,55 ± 3,84
DHA14	0,78 ± 0,02	8,16 ± 0,88
DHA15	0,2 ± 0,06	12,99 ± 0,49
DHA16	34,48 ± 1,04	63,11 ± 1,18
DHA17	8,88 ± 0,61	8,36 ± 0,19
DHA18	15,22 ± 1,15	18,34 ± 0,26

Tabelle 14: Ergebnisse antiproliferativer Assay 9,10-Dihydroacridine

Als eine erste Beobachtung lässt sich feststellen, dass die IC₅₀-Werte der jeweiligen Verbindungen für die resistente Zelllinie größer sind als die der entsprechenden parenteralen Zelllinie. Eine

Ausnahme davon ist für die Verbindung **DHA17** erkennbar, welche bei beiden Zelllinien ungefähr gleiche IC_{50} -Werte besitzt. Der Einfluss auf das Zellwachstum ist für diese Verbindung unabhängig von der Expression von P-gp. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass **DHA17** ein Substrat von P-gp ist und dadurch keine Auswirkung auf die Zellproliferation hat. Abgesehen von **DHA16** und **DHA18** liegen bei der Zelllinie L5178Y sämtliche IC_{50} -Werte unter 10 μ M. Dies bedeutet, dass bereits niedrige Konzentrationen der 9,10-Dihydroacridine ausreichen, um einen wesentlichen Einfluss auf das Wachstum der Zellen auszulösen. Die drei Verbindungen mit den größten IC_{50} -Werten für die Zelllinie L5178Y sind **DHA16**, **DHA17** und **DHA18**, welche alle im Phenyl-Substituenten eine 3,4-Dimethoxy-Funktion besitzen. **DHA16** und **DHA17** sind auch die beiden Verbindungen, welche im Fluoreszenz-Uptake-Assay das größte inhibitorische Potential gegenüber P-gp gezeigt haben.

Die Überexpression von P-gp in der resistenten Zelllinie L5178Y_{mdr} führt zu einem geringeren Einfluss der synthetisierten Testverbindungen gegenüber der Zellproliferation. Abgesehen von den Verbindungen **DHA05**, **DHA08**, **DHA14** und **DHA17** besitzen alle Verbindungen einen IC_{50} -Wert größer 10 μ M. Diese vier genannten Verbindungen können bereits bei einer geringen Konzentration das Wachstum der Zellen maßgeblich beeinträchtigen. Die größten IC_{50} -Werte besitzen die drei Verbindungen **DHA11**, **DHA13** und **DHA16**. Strukturell lassen sich bei diesen drei Verbindungen keine Gemeinsamkeiten im Substitutionsmuster ausmachen. **DHA16** besitzt sowohl für L5178Y als auch für L5178Y_{mdr} den größten gemessenen IC_{50} -Wert.

Als Fazit lässt sich aussagen, dass beim Einsatz der hergestellten 9,10-Dihydroacridine die Expression von P-gp einen erheblichen Einfluss auf die Zellproliferation hat.

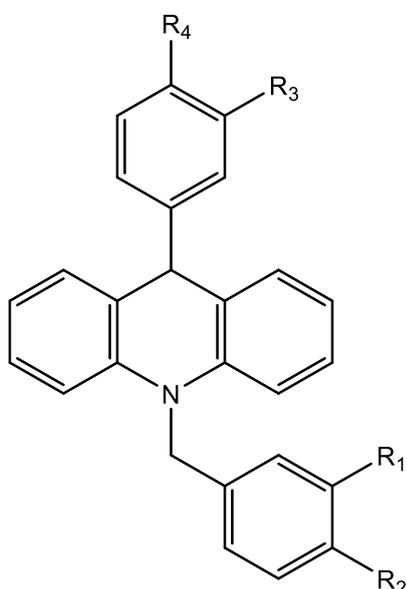
5.2.3 Bestimmung des antibakteriellen Effekts der 9,10-Dihydroacridine mithilfe der minimalen Hemm-Konzentration (MIC)

Um den antibakteriellen Effekt der 9,10-Dihydroacridine zu vermessen, wurde als Grundlage die „Broth Microdilution Method“, welche Bestandteil der Richtlinie des „Clinical and Laboratory Standard Institute“ (CLSI) ist, angewendet²⁵⁷. Der Vergleich der antibakteriellen Wirkung der Verbindungen erfolgte mithilfe der minimalen Hemm-Konzentration, kurz MIC. Die MIC gibt die geringste Konzentration in μ M an, bei welcher eine Substanz das Wachstum von Bakterienstämmen noch hemmen kann und dies mit bloßem Auge bestimmbar ist. Je kleiner der MIC-Wert, desto geringer ist die benötigte Konzentration der verwendeten 9,10-Dihydroacridine, um das Wachstum der Bakterienstämme zu inhibieren.

Im Abschnitt „Bestimmung der minimalen Hemm-Konzentration (MIC)“ befindet sich eine ausführliche Beschreibung der Methode, an dieser Stelle soll diese verkürzt zusammengefasst

werden: Die „Broth Microdilution Method“ ist in folgende drei Schritte unterteilt: Vorbereitung der Verdünnungsreihe der Testverbindungen, Inokulation und Inkubation. Folgende vier Bakterienstämme wurden für die Testung eingesetzt: *E. coli* AG100, *E. coli* AG100 A, *S. aureus* ATCC 25923 und *S. aureus* MRSA 272123. Diese Bakterienstämme wurden jeweils unter Einsatz von Müller-Hinton-Bouillon, auch Müller-Hinton-Broth, kultiviert. Unter Einsatz einer zweifachen Verdünnungsreihe wurden die Testverbindungen, beginnend mit einer Startkonzentration von 100 µM (hergestellt aus einer 10.000 µM Stammlösung in DMSO), den kultivierten Bakterienstämmen hinzugefügt. Abschließend wurden die eingesetzten 96-well Platten für 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Tabelle Nr. 16 zeigt die Ergebnisse dieser Messung:



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
DHA01	-H	-H	-H	-H
DHA02	-OCH3	-H	-H	-H
DHA03	-H	-OCH3	-H	-H
DHA04	-H	-H	-H	-OCH3
DHA05	-OCH3	-H	-H	-OCH3
DHA06	-H	-OCH3	-H	-OCH3
DHA07	-H	-H	-H	-CH3
DHA08	-OCH3	-H	-H	-CH3
DHA09	-H	-OCH3	-H	-CH3
DHA10	-H	-H	-OCH3	-H
DHA11	-OCH3	-H	-OCH3	-H
DHA12	-H	-OCH3	-OCH3	-H
DHA13	-H	-H	-CH3	-H
DHA14	-OCH3	-H	-CH3	-H
DHA15	-H	-OCH3	-CH3	-H
DHA16	-H	-H	-OCH3	-OCH3
DHA17	-OCH3	-H	-OCH3	-OCH3
DHA18	-H	-OCH3	-OCH3	-OCH3

Abbildung 40: allgemeine Strukturformel der Zielverbindungen mit 9,10-Dihydroacridin Grundstruktur

Verbindung	MIC [μM]			
	<i>E. coli</i> AG100	<i>E. coli</i> AG100 A	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> MRSA 272123
DHA01	>100	25	25	>100
DHA02	>100	12,5	6,25	25
DHA03	>100	50	12,5	>100
DHA04	>100	50	50	>100
DHA05	>100	>100	12,5	>100
DHA06	>100	50	12,5	>100
DHA07	>100	>100	25	>100
DHA08	>100	>100	6,25	>100
DHA09	>100	>100	12,5	>100
DHA10	>100	25	25	>100
DHA11	>100	>100	>100	>100
DHA12	>100	25	6,25	50
DHA13	>100	>100	50	>100
DHA14	>100	>100	6,25	>100
DHA15	>100	>100	6,25	>100
DHA16	>100	>100	>100	>100
DHA17	>100	25	3,125	25
DHA18	>100	25	3,125	25

Tabelle 15: antibakterieller Effekt 9,10-Dihydroacridine

Keine der 18 synthetisierten 9,10-Dihydroacridin-Verbindungen zeigt bis zu einer Konzentration von 100 μM eine antibakterielle Wirkung bei dem AcrAB-TolC Effluxpumpen exprimierenden Bakterienstamm *E. coli* AG100.

Neun Verbindungen weisen mit einer Konzentration unter 100 μM bei den gramnegativen Bakterienzellen von *E. coli* AG100 A, welche nicht das Effluxpumpen-System AcrAB-TolC exprimieren, einen antibakteriellen Effekt auf. Die wirksamste Verbindung ist **DHA02**, welche mit einem MIC-Wert von 12,5 μM den niedrigsten MIC-Wert aller 9,10-Dihydroacridine aufweist. **DHA02** enthält strukturell im N-Benzyl-Rest eine Methoxy-Gruppe in meta-Stellung und einen unsubstituierten Phenyl-Rest. Wechselt die Methoxy-Gruppe von der meta- in die para-Position, wie es bei **DHA03** gegeben ist, so vervierfacht sich der MIC-Wert auf 50 μM . **DHA01**, welche einen unsubstituierten Benzyl-Rest hat, zeigt einen MIC-Wert von 25 μM . Ein unsubstituierter Benzyl-Rest ist gegenüber einem mit einer Methoxy-Gruppe para-substituierten Benzyl-Rest für die antibakterielle Wirkung zu bevorzugen, unterliegt allerdings im Hinblick auf den MIC-Wert dem

meta-substituierten Benzyl-Rest von **DHA02**. Allgemein lässt sich sagen, dass sich ein unsubstituierter Phenyl-Rest bei den 9,10-Dihydroacridinen positiv auf die antibakterielle Wirkstärke auswirkt.

Die Verbindungen **DHA04** bis **DHA06** besitzen im Unterschied zu den Verbindungen **DHA01** bis **DHA03** eine Methoxy-Gruppe in Position 4 des Phenyl-Rings. Die Verbindung **DHA05** hat analog zu der Verbindung **DHA02** einen Methoxy-Substituenten in meta-Stellung im Benzyl-Ring, zeigt aber bis zu einer Konzentration von 100 µM keine antibakterielle Wirkung. **DHA04** und **DHA06** haben beide einen MIC-Wert von 50 µM. **DHA04** hat somit einen doppelt so hohen MIC-Wert wie **DHA01**. Zwischen **DHA03** und **DHA06** gibt es keinen Unterschied zwischen den MIC-Werten. Zusammengefasst lässt sich also sagen, dass im Allgemeinen die Einführung einer Methoxy-Gruppe in Position 4 des Phenyl-Rings, verglichen mit einem unsubstituierten Phenyl-Ring, zu höheren (bzw. unveränderten) MIC-Werten führt.

Die Verbindungen **DHA07** bis **DHA09**, welche eine Methyl-Gruppe in para-Stellung im Phenyl-Rest besitzen, weisen alle einen MIC-Wert größer 100 µM auf und sind dementsprechend nicht antibakteriell wirksam. Die strukturelle Gemeinsamkeit dieser drei Verbindungen ist also gegenüber derer der sechs vorherigen Verbindungen nicht zu bevorzugen, um einen antibakteriellen Effekt zu erreichen.

Die nächsten drei Verbindungen **DHA10** bis **DHA12** besitzen ihre Methoxy-Gruppe im Gegensatz zu den Verbindungen **DHA04** bis **DHA06** in Position 3. **DHA11** hat ebenso wie dessen strukturverwandten Verbindungen **DHA05** und **DHA08** einen MIC-Wert größer 100 µM. Dies weist daraufhin, dass in der Regel eine Methoxy-Gruppe in meta-Stellung im Benzyl-Ring die wachstumshemmende Wirkung der 9,10-Dihydroacridine auf die Bakterien des Stamms *E. coli* AG100 A negativ beeinträchtigt (Ausnahme: **DHA02**). Die Testverbindungen **DHA10** und **DHA12** besitzen beide einen MIC-Wert von 25 µM und sind somit wirksamer als ihre entsprechenden Strukturanaloga **DHA04** und **DHA06** bzw. **DHA07** und **DHA09**. Vergleicht man die beiden Verbindungen mit den im Phenyl-Ring unsubstituierten **DHA01** und **DHA03**, so fällt auf, dass **DHA12** im Gegensatz zu **DHA03** nur einen halb so großen MIC-Wert besitzt, während **DHA10** und **DHA01** einen gleich großen MIC-Wert haben. Insgesamt lässt sich feststellen, dass eine Methoxy-Gruppe in meta-Stellung im Phenyl-Rest zu einem geringeren MIC-Wert führt und dadurch zu antibakteriell wirksameren 9,10-Dihydroacridinen führt.

Die folgenden Verbindungen **DHA13** bis **DHA15**, welche im Phenyl-Ring eine Methyl-Gruppe in meta-Position haben, zeigen alle einen MIC-Wert größer 100 µM. Damit teilen sie sich ihre antibakterielle Unwirksamkeit mit den Verbindungen **DHA07** bis **DHA09**, welche ihre Methyl-Gruppe in para-Position haben und ebenfalls einen MIC-Wert größer 100 µM aufweisen. Aus den MIC-Werten dieser sechs Verbindungen lässt sich als Fazit feststellen, dass die Methyl-

Substituenten den Methoxy-Substituenten im Phenyl-Ring in ihrer antibakteriellen Wirkung deutlich unterlegen sind.

Die letzten drei getesteten Verbindungen sind die im Phenyl-Ring eine 3,4-Dimethoxy-Gruppe aufweisenden **DHA16** bis **DHA18**. **DHA16** besitzt einen MIC-Wert größer 100 μM und **DHA17** und **DHA18** besitzen jeweils einen MIC-Wert von 25 μM . Dies lässt darauf schließen, dass der unsubstituierte Benzyl-Rest von **DHA16** den mit einer Methoxy-Gruppe in Position 3 bzw. 4 substituierten Benzyl-Resten von **DHA17** respektive **DHA18** nicht zu bevorzugen ist, um einen antibakteriellen Effekt bei 9,10-Dihydroacridinen zu erzielen. Eine Aussage über den Einfluss der Position der Methoxy-Gruppe im Benzyl-Rest auf die antibakterielle Wirkung ist nicht treffbar, da die MIC-Werte von **DHA17** und **DHA18** gleich groß sind.

Als Resultat der Untersuchung lässt sich zusammenfassen, dass diejenigen 9,10-Dihydroacridine besonders aktiv eine Wachstumshemmung der gramnegativen Bakterien des Stamms *E. coli* AG100 A bewirkt haben, welche entweder einen unsubstituierten Phenyl-Rest (**DHA01** bis **DHA03**) oder eine 3,4-Dimethoxy-Gruppe im Phenyl-Rest (**DHA17** und **DHA18**) aufweisen. Ebenfalls konnten diejenigen Verbindungen überzeugen, welche eine Methoxy-Gruppe in meta- oder para-Stellung im Phenyl-Ring besitzen und entweder einen unsubstituierten Benzyl-Rest (**DHA04** und **DHA10**) oder eine Methoxy-Gruppe in Position 4 im Benzyl-Rest (**DHA06** und **DHA12**) bieten. Keine der synthetisierten Verbindungen hat allerdings einen Effekt auf den AcrAB-TolC exprimierenden resistenten Bakterienstamm *E. coli* AG100. Vergleicht man die MIC-Werte der beiden Bakterienstämme, so lässt sich erkennen, dass die MIC-Werte bei folgenden Verbindungen für den Bakterienstamm *E. coli* AG100 A kleiner sind als für *E. coli* AG100 A: **DHA01**, **DHA02**, **DHA03**, **DHA04**, **DHA06**, **DHA10**, **DHA12**, **DHA17** und **DHA18**. Dies lässt vermuten, dass diese Verbindungen Substrate der MDR-Effluxpumpe AcrAB-TolC sind und folglich das Wachstum dieser Bakterienzellen nicht beeinflussen können bzw. unwirksam sind bei diesem Stellvertreter eines resistenten *E. coli* Stamms. Zur Prüfung dieser Vermutung sei an dieser Stelle auf den Abschnitt „Bestimmung der Akkumulation von Ethidiumbromid der 9,10-Dihydroacridine mithilfe des relativen Fluoreszenzindex (RFI)“ verwiesen.

Neben den beiden gramnegativen Bakterienstämmen wurden auch Untersuchungen an den grampositiven Bakterien der Stämme *S. aureus* ATCC 25923 und *S. aureus* MRSA 272123 durchgeführt. *S. aureus* ATCC 25923 ist nicht resistent gegenüber Methicillin, besitzt allerdings ein intrinsisches Effluxpumpen-System, welches überexprimiert vorliegt^{258,259}. *S. aureus* MRSA 272123 besitzt eine Resistenz gegenüber Methicillin und Ofloxacin.

Mit Ausnahme der beiden Verbindungen **DHA11** und **DHA16** zeigten alle synthetisierten 9,10-Dihydroacridine eine inhibierende Wirkung auf die Proliferation der nicht resistenten

Bakterienzellen von *S. aureus* ATCC 25923. Die wirksamsten Verbindungen waren die beiden Verbindungen **DHA17** und **DHA18**, welche beide einen MIC-Wert von 3,125 μM besitzen.

Beginnend mit den ersten drei Verbindungen **DHA01** bis **DHA03** kann gesagt werden, dass unter diesen **DHA02** mit 6,25 μM den niedrigsten MIC-Wert besitzt. **DHA03** hat einen doppelt so großen und **DHA01** einen viermal so großen MIC-Wert. Eine Methoxy-Gruppe in meta-Stellung im Benzyl-Rest scheint sich also positiv und ein unsubstituierter Benzyl-Rest scheint sich negativ auf die antibakterielle Wirkung der 9,10-Dihydroacridine auszuwirken, wenn der Phenyl-Rest unsubstituiert ist.

Die Verbindungen **DHA05** und **DHA06** besitzen beide einen MIC-Wert von 12,5 μM und sind somit mit **DHA03** vergleichbar. **DHA04** hat einen MIC-Wert von 50 μM . Im Durchschnitt sind die MIC-Werte der drei Verbindungen also größer als die der vorher besprochenen Verbindungen. Der unsubstituierte Benzyl-Rest von **DHA04** verringert hier ähnlich wie bei **DHA01** beobachtet die antibakterielle Wirkung im Vergleich zu **DHA05** und **DHA06**.

Die MIC-Werte der Verbindungen **DHA07** bis **DHA09**, welche als gemeinsames Strukturelement eine Methyl-Gruppe in para-Position im Phenyl-Ring aufweisen, entsprechen ihren jeweiligen im Phenyl-Ring unsubstituierten Struktur-Analoga **DHA01** bis **DHA03**. Ebenfalls ist hier die im Benzyl-Rest in Position 3 eine Methoxy-Gruppe tragende Verbindung die antibakteriell aktivste Verbindung und diejenige mit dem unsubstituierten Benzyl-Rest die am wenigsten aktive Verbindung.

Unter den drei Verbindungen **DHA10** bis **DHA12** befindet sich mit **DHA11** eine der zwei untersuchten Verbindungen, die bei den getesteten Konzentrationen keinen antibakteriellen Effekt zeigten. Demgegenüber sind die Verbindungen **DHA10** und insbesondere **DHA12** aktiv. **DHA12** hat mit einem MIC-Wert von 6,25 μM den gleichen MIC-Wert wie **DHA02** und **DHA08**.

Ebenfalls einen MIC-Wert von 6,25 μM haben **DHA14** und **DHA15**, welche beide eine Methyl-Gruppe im Phenyl-Ring in Position 3 und eine Methoxy-Gruppe im Benzyl-Ring in Position 3 respektive Position 4 besitzen. Die Verbindungen **DHA12** und **DHA15** unterscheidet nur der Substituent im Phenyl-Ring in meta-Stellung, welcher keinen Einfluss auf die antibakterielle Aktivität hat. **DHA08** und **DHA14** unterscheiden sich wiederum nur in der Position der Methyl-Gruppe im Phenyl-Ring, ebenfalls ohne Einfluss auf die antibakterielle Aktivität. **DHA13**, welche einen unsubstituierten Benzyl-Ring besitzt, ist mit einem MIC-Wert von 50 μM erheblich schwächer wirksam bei der Wachstumsinhibition als die strukturell verwandten Verbindungen **DHA14** und **DHA15**.

Unter den letzten drei Verbindungen **DHA16** bis **DHA18** befinden sich die zwei wirksamsten Verbindungen bei dem Bakterienstamm *S. aureus* ATCC 25923: **DHA17** und **DHA18** mit einem MIC-Wert von 3,125 μM . Beide Verbindungen weisen zwei Methoxy-Gruppen im Phenyl-Ring auf,

eine in meta- und eine in para-Position. Dieser Dimethoxy-Substituent ist somit besonders geeignet für die Hemmung der Proliferation der Bakterienzellen des untersuchten Stammes. Die im Benzyl-Ring unsubstituierte Verbindung **DHA16** zeigte selbst bei einer Konzentration von 100 μM keine Wachstumshemmung; der MIC-Wert ist dementsprechend größer 100 μM .

Es lässt sich also zusammengefasst festhalten, dass die Verbindungsklasse der 9,10-Dihydroacridine wirksamer bei dem Bakterienstamm *S. aureus* ATCC 25923 als bei *E. coli* AG100 A ist. Mit anderen Worten ist die Fähigkeit der Verbindungen, das Wachstum bei dem Vertreter der grampositiven Bakterien zu inhibieren größer als bei dem Vertreter der gramnegativen Bakterien. Des Weiteren kann gesagt werden, dass ein unsubstituierter Benzyl-Ring generell zu schlechteren MIC-Werten führt als vergleichbare Verbindungen, die gemeinsame Strukturelemente teilen (Ausnahme: Verbindung **DHA10**, welche aktiver ist als **DHA11**). Der Einsatz von Verbindungen, die eine 3,4-Dimethoxy-Gruppe im Phenyl-Ring und eine Methoxy-Gruppe im Benzyl-Ring haben, führt zu besonders geringen MIC-Werten.

Der letzte Bakterienstamm, welcher für die Testung der antibakteriellen Eigenschaften der 9,10-Dihydroacridine eingesetzt wurde, ist *S. aureus* MRSA 272123, der eine Resistenz gegenüber Methicillin und Ofloxacin aufweisen. Vier der achtzehn synthetisierten Verbindungen zeigen bei den grampositiven Bakterien dieses Stamms eine wachstumshemmende Wirkung. Die drei Verbindungen **DHA02**, **DHA17** und **DHA18** besitzen einen MIC-Wert von 25 μM , die vierte Verbindung **DHA12** hat einen doppelt so großen MIC-Wert. **DHA17** und **DHA18** besitzen einen 3,4-Dimethoxy-Substituenten im Phenyl-Ring und eine Methoxy-Gruppe im Benzyl-Ring, entweder in meta- oder para-Position. **DHA02** besitzt nur eine Methoxy-Gruppe, welche sich in Position 3 des Benzyl-Rings befindet. Da zwei der vier aktiven Verbindungen eine 3,4-Dimethoxy-Gruppe im Phenyl-Ring besitzen, kann dieser Substituent als besonders geeignet für die Erzielung einer antibakteriellen Wirkung gesehen werden. Jede der vier genannten Testverbindungen zeigte bereits eine gute antibakterielle Wirkung bei dem Bakterienstamm *S. aureus* ATCC 25923, entweder mit einem MIC-Wert von 6,25 μM (**DHA02** und **DHA12**) oder einem MIC-Wert von 3,125 μM (**DHA17** und **DHA18**).

Es lässt sich beim direkten Vergleich der beiden Bakterienstämme feststellen, dass der MIC-Wert der jeweiligen Verbindung für den resistenten *S. aureus* Stamm größer ist als für den nicht resistenten *S. aureus* Stamm (Ausnahme: **DHA11** und **DHA16**). Es wird also eine größere Konzentration der Verbindungen benötigt, um einen wachstumshemmenden Effekt auszulösen. Die antibakterielle Wirkung der vier Verbindungen ist für den resistenten Stamm schwächer als für den nicht-resistenten Stamm, weswegen darauf geschlossen werden kann, dass der Mechanismus, welcher die Resistenz gegenüber Methicillin und Ofloxacin bei dem MRSA-Stamm

verursacht, ebenfalls die antibakterielle Wirkung der untersuchten 9,10-Dihydroacridine verringert.

Zusammengefasst lässt sich aussagen, dass im Hinblick auf die bei den nicht resistenten Bakterienstämmen ermittelten MIC-Werte die 9,10-Dihydroacridine wirksamer bei dem Wild-Typ *S. aureus* ATCC 25923 als bei dem Stamm *E. coli* AG100 A sind. Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse der resistenten Bakterienstämmen *E. coli* AG100 und *S. aureus* MRSA 272123 zeigt sich, dass eine antibakterielle Aktivität für einige der synthetisierten 9,10-Dihydroacridine nur bei den grampositiven Bakterien gemessen werden konnten. Eine Hemmung der Proliferation bei *E. coli* AG100 konnte keine der Testverbindungen bewirken.

5.2.4 Bestimmung der Akkumulation von Ethidiumbromid der 9,10-Dihydroacridine mithilfe des relativen Fluoreszenzindex (RFI)

Um die inhibitorischen Eigenschaften der synthetisierten 9,10-Dihydroacridine auf das Effluxpumpen-System AcrAB-TolC, welche von dem Bakterienstamm *E. coli* AG100 exprimiert wird, messen zu können wurde eine Methode verwendet, welche die intrazelluläre Akkumulation von Ethidiumbromid automatisiert, in Echtzeit erfasst und den Einsatz eines „LightCycler real-time thermocycler“ beinhaltet²⁶⁰.

Die quaternäre Verbindung Ethidiumbromid (EB), welche ein Substrat von zahlreichen bakteriellen Effluxpumpen ist, besitzt einige positive Eigenschaften, wodurch es sich für diese Methode besonders eignet: zum einen zeigt das Fluorochrom eine geringe Eigenfluoreszenz im wässrigen Milieu (außerhalb der Zellen) und zum anderen eine hohe Fluoreszenz in unpolaren, hydrophoben Umgebungen²⁶¹.

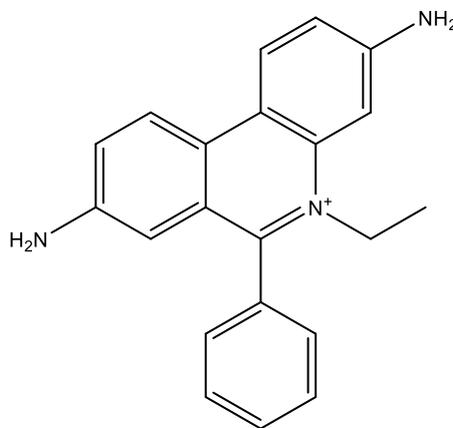


Abbildung 41: Strukturformel Ethidiumbromid

Die Methode wurde sowohl an dem Bakterienstamm *E. coli* AG100 als auch an *E. coli* AG100 A, welche nicht das Effluxpumpen-System AcrAB-TolC exprimiert, durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde das Neuroleptikum Promethazin eingesetzt.

Der relative Fluoreszenzindex (RFI) lässt sich mit folgender Gleichung ermitteln:

$$\text{Gleichung Nr. 6: } \text{RFI} = \frac{\text{RF}_{\text{treated}} - \text{RF}_{\text{untreated}}}{\text{RF}_{\text{untreated}}}$$

$\text{RF}_{\text{treated}}$ ist die relative Fluoreszenz zum letzten Zeitpunkt (Minute 30) der EB Retentionskurve in Anwesenheit des Inhibitors. $\text{RF}_{\text{untreated}}$ ist die relative Fluoreszenz zum letzten Zeitpunkt der EB Retentionskurve der Lösungsmittelkontrolle (DMSO), also in Abwesenheit des Inhibitors. Je größer die Differenz zwischen $\text{RF}_{\text{treated}}$ und $\text{RF}_{\text{untreated}}$, desto mehr EB wird akkumuliert und desto stärker inhibierend ist die jeweilige Testverbindung an dem Effluxpumpen-System AcrAB-TolC wirksam. Ein Ergebnis mit einem negativen Vorzeichen entsteht dadurch, dass der Wert von $\text{RF}_{\text{treated}}$ kleiner ist als der Wert von $\text{RF}_{\text{untreated}}$. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Testverbindung den Efflux von EB fördert.

Die Durchführung der Methode wird im Abschnitt „Bestimmung des relativen Fluoreszenzindex (RFI)“ detailliert beschrieben und soll an dieser Stelle kurz zusammengefasst werden. Die jeweiligen Bakterienstämme wurden bis zur Erreichung einer optischen Dichte (OD) von 0,6 bei 600 nm kultiviert. Es folgt ein Waschschrift mit PBS (pH 7,4). Parallel dazu wird 1 µl einer 1.000 µM Lösung der zu untersuchenden Verbindung zu 49 µl einer EB-Lösung (2 mg/l in PBS) hinzugefügt. In ein Glaskapillaren-Gefäß werden nun 10 µl dieser neu entstandenen Lösung mit 10 µl der Bakteriensuspension versetzt. Zum Abschluss erfolgt in Echtzeit alle 60 Sekunden die Messung der Fluoreszenz mithilfe des LightCyclers.

Die Testverbindungen wurden aus zeitlichen Gründen in zwei Versuchsreihen unterteilt. Die Tabellen Nr. 17 und 18 enthalten die Ergebnisse dieser Testung für die beiden Versuchsreihen:

Verbindung	Relativer Fluoreszenzindex	
	<i>E. coli</i> AG100	<i>E. coli</i> AG100 A
DHA05	-0,09	0,07
DHA07	-0,01	0,08
DHA08	0,02	0,02
DHA09	0,01	0,00
DHA11	0,02	0,01
DHA13	-0,02	0,01
DHA14	-0,02	0,06
DHA15	0,02	-0,04
DHA16	0,02	0,03

DHA17	-0,04	0,00
DHA18	-0,07	0,00
Promethazin	0,37	0,38

Tabelle 16: Ethidiumbromid-Akkumulation 9,10-Dihydroacridine (I)

Verbindung	Relativer Fluoreszenzindex	
	<i>E. coli</i> AG100	<i>E. coli</i> AG100 A
DHA01	-0,02	0,07
DHA02	-0,03	0,07
DHA03	-0,03	0,00
DHA04	-0,11	0,05
DHA06	-0,01	0,00
DHA10	-0,01	0,00
DHA12	-0,01	-0,01
Promethazin	0,24	0,37

Tabelle 17: Ethidiumbromid-Akkumulation 9,10-Dihydroacridine (II)

Es lässt sich beobachten, dass die Ergebnisse von *E. coli* AG100 A minimal höher sind, meist in der zweiten Nachkommastelle, als die Ergebnisse von *E. coli* AG100.

Stellt man die positive Vergleichskontrolle Promethazin den untersuchten Verbindungen gegenüber, so stellt man fest, dass die 9,10-Dihydroacridine bei der eingesetzten Konzentration keinen oder nur einen sehr geringen Effekt auf die intrazelluläre Akkumulation von EB besitzen, unabhängig davon, ob der verwendete gramnegative Bakterienstamm das Effluxpumpen-System AcrAB-ToIC exprimiert oder nicht. Eine Verbindung, welche eine modulierende Wirkung auf das Effluxpumpen-System AcrAB-ToIC hat, würde einen höheren RFI-Wert bei *E. coli* AG100 als bei *E. coli* AG100 A zur Folge haben, da durch die Hemmung des Effluxpumpen-Systems EB im Inneren der Bakterienzelle akkumuliert und dadurch höhere Fluoreszenzwerte entstehen. Ebenfalls sollte der erzielte RFI-Wert der jeweiligen Verbindung größer als der der positiven Vergleichskontrolle Promethazin sein, um als entsprechend fähiger Modulator von AcrAB-ToIC zu gelten.

5.2.5 Bestimmung der potenzierenden Wirkung der 9,10-Dihydroacridine in Kombination mit anderen Antibiotika

Um zu untersuchen, ob die synthetisierten 9,10-Dihydroacridine eine potenzierende Wirkung auf die antibakterielle Wirkung von Antibiotika besitzen, wurden die MIC-Werte von Antibiotika in An- und Abwesenheit der Testverbindungen bestimmt.

Die zu untersuchenden Verbindungen wurden in einer Konzentration von 1 μ M oder 10 μ M eingesetzt. Verwendet wurden die gramnegativen Bakterienstämme *E. coli* AG100 und *E. coli* AG100 A sowie die grampositiven Bakterienstämme *S. aureus* ATCC 25923 und *S. aureus* MRSA 272123. Als Antibiotika wurden Tetracyclin (TET), welches zu der Gruppe der Tetracycline gehört, und Ciprofloxacin (CIP), welches zu der Gruppe der Fluorchinolone gehört, genutzt. Beide Antibiotika sind sowohl gegen grampositive als auch gramnegative Erreger wirksam. Die Determination der MIC-Werte basiert auf der bereits im Abschnitt „Bestimmung des antibakteriellen Effekts der 9,10-Dihydroacridine mithilfe der minimalen Hemmkonzentration (MIC)“ genannten Methode „Broth Microdilution“. Hier wird allerdings nicht nur der MIC-Wert der Testverbindungen, sondern der der Antibiotika in Kombination mit den Testverbindungen determiniert. Eine ausführliche Beschreibung dieser Methode findet sich im Abschnitt „Potenzierende Wirkung der zu untersuchenden Verbindungen in Kombination mit anderen Antibiotika“.

Die Testverbindungen wurden aus zeitlichen Gründen in zwei Versuchsreihen unterteilt. Die Tabellen Nr. 19 und 20 enthalten die Ergebnisse dieser Testung für die beiden Versuchsreihen bei den Bakterienstämmen *E. coli* AG100 und *E. coli* AG100 A.

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
DHA01	-H	-H	-H	-H
DHA02	-OCH3	-H	-H	-H
DHA03	-H	-OCH3	-H	-H
DHA04	-H	-H	-H	-OCH3
DHA05	-OCH3	-H	-H	-OCH3
DHA06	-H	-OCH3	-H	-OCH3
DHA07	-H	-H	-H	-CH3
DHA08	-OCH3	-H	-H	-CH3
DHA09	-H	-OCH3	-H	-CH3
DHA10	-H	-H	-OCH3	-H
DHA11	-OCH3	-H	-OCH3	-H
DHA12	-H	-OCH3	-OCH3	-H
DHA13	-H	-H	-CH3	-H
DHA14	-OCH3	-H	-CH3	-H
DHA15	-H	-OCH3	-CH3	-H
DHA16	-H	-H	-OCH3	-OCH3
DHA17	-OCH3	-H	-OCH3	-OCH3
DHA18	-H	-OCH3	-OCH3	-OCH3

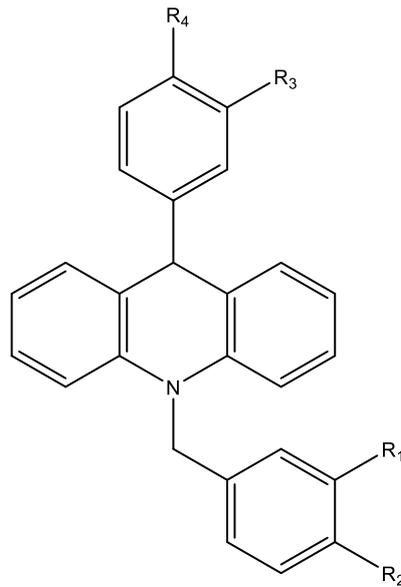


Abbildung 42: allgemeine Strukturformel der Zielverbindungen mit 9,10-Dihydroacridin Grundstruktur

Verbindung	MIC-Werte [$\mu\text{g/ml}$]			
	<i>E. coli</i> AG100		<i>E. coli</i> AG100 A	
	TET	CIP	TET	CIP
	1,56	0,024	0,625	0,005
DHA05	1,56	0,024	0,625	0,005
DHA07	1,56	0,024	0,625	0,005
DHA08	1,56	0,024	0,625	0,005
DHA09	1,56	0,024	0,625	0,0025
DHA11	1,56	0,024	0,625	0,005
DHA13	1,56	0,024	0,625	0,005
DHA14	1,56	0,024	0,625	0,005
DHA15	1,56	0,024	0,625	0,005
DHA16	1,56	0,024	0,625	0,005
DHA17	1,56	0,024	0,016	0,0025
DHA18	1,56	0,024	0,3125	0,0025

Tabelle 18: potenzierende Wirkung 9,10-Dihydroacridine *E. coli* AG100 und *E. coli* AG100 A (I)

Verbindung	MIC-Werte [$\mu\text{g/ml}$]			
	<i>E. coli</i> AG100		<i>E. coli</i> AG100 A	
	TET	CIP	TET	CIP
	2,0	0,016	0,8	0,003

DHA01	2,0	0,016	0,8	0,003
DHA02	2,0	0,016	0,8	0,003
DHA03	2,0	0,016	0,8	0,003
DHA04	2,0	0,016	0,8	0,003
DHA06	2,0	0,016	0,8	0,003
DHA10	2,0	0,016	0,8	0,003
DHA12	2,0	0,016	0,8	0,003

Tabelle 19: potenzierende Wirkung 9,10-Dihydroacridine *E. coli* AG100 und *E. coli* AG100 A (II)

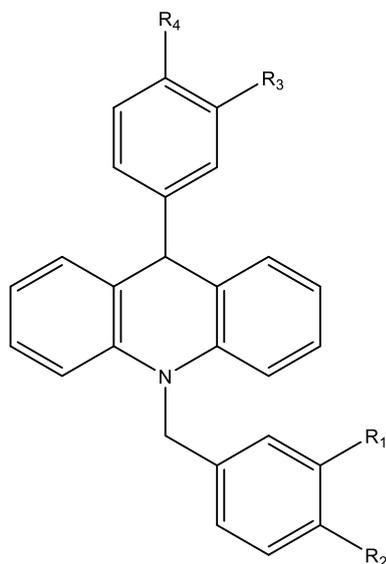
Wie aus den beiden Tabellen zu entnehmen ist, zeigt keine der 18 Verbindungen für den Bakterienstamm *E. coli* AG100 eine potenzierende Wirkung, weder für Tetracyclin noch für Ciprofloxacin. Die MIC-Werte der genannten Antibiotika sind für den AcrAB-TolC-exprimierenden Bakterienstamm *E. coli* AG100 höher als für *E. coli* AG100 A, welche das Effluxpumpen-System nicht exprimiert. Tetracyclin und Ciprofloxacin sind somit Substrate des Effluxpumpen-Systems. Eine Inhibition von AcrAB-TolC würde zu einer Anreicherung des jeweiligen Antibiotikums führen, wodurch die antibakterielle Wirkung gesteigert und der MIC-Wert vermindert wird. Die 9,10-Dihydroacridine stellen im Hinblick auf die Ergebnisse keine Modulatoren des Effluxpumpensystems dar. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Ergebnissen des Abschnittes „Bestimmung der Akkumulation von Ethidiumbromid der 9,10-Dihydroacridine mithilfe des relativen Fluoreszenzindex (RFI)“. In diesem Abschnitt konnte ebenfalls final festgehalten werden, dass die synthetisierten 9,10-Dihydroacridine keinen Einfluss auf das Effluxpumpensystem AcrAB-TolC haben.

Beim Bakterienstamm *E. coli* AG100 A konnten zwei Verbindungen den MIC-Wert des Antibiotikums Tetracyclin senken: **DHA17** und **DHA18**. Tetracyclin alleine hat einen MIC-Wert von 0,625 µg/ml, eine kombinierte Anwendung von **DHA17** und Tetracyclin führt zu einem deutlich geringeren MIC-Wert von 0,016 µg/ml. Dies stellt eine Verminderung des MIC-Wertes um den Faktor 40 dar. **DHA18** mindert den MIC-Wert von Tetracyclin weniger intensiv als **DHA17**. **DHA18** und Tetracyclin zusammen halbieren den MIC-Wert von Tetracyclin alleine, von 0,625 µg/ml zu 0,3125 µg/ml. Die Verbindungen **DHA17** und **DHA18** besitzen im Gegensatz zu den anderen 9,10-Dihydroacridinen beide eine für die antibakterielle Wirkung vorteilhafte 3,4-Dimethoxy-Gruppe in der Phenyl-Gruppe.

Verwendet man anstelle von Tetracyclin Ciprofloxacin, so können drei Verbindungen in gemeinsamer Applikation den antibakteriellen Effekt des Antibiotikums erhöhen: **DHA09**, **DHA17** und **DHA18**. Alle drei Verbindungen besitzen einen MIC-Wert von 0,0025 µg/ml. In nicht kombinierter Anwendung hat Ciprofloxacin einen doppelt so hohen MIC-Wert von 0,005 µg/ml.

Wie bereits erwähnt haben die Verbindungen **DHA17** und **DHA18** eine 3,4-Dimethoxy-Gruppe im Phenyl-Ring; **DHA09** besitzt eine Methyl-Gruppe in Position 4 im Phenyl-Ring und eine Methoxy-Gruppe in Position 4 im Benzyl-Ring. Diese strukturellen Gegebenheiten scheinen sich positiv auf die antibakterielle Effektsteigerung auszuwirken. **DHA17** und **DHA18** zeigten bereits bei der Bestimmung des antibakteriellen Effekts einen niedrigen MIC-Wert von 25 µM bei *E. coli* AG100 A. **DHA09** zeigte bei *E. coli* AG100 A keine antibakterielle Wirkung, wodurch das Vorliegen eines potenzierenden Effektes überrascht und nicht näher begründet werden kann.

Neben den gramnegativen Bakterienstämmen wurden die Testverbindungen auch bei der Untersuchung der potenzierenden Wirkung bei den Bakterienstämmen *S. aureus* ATCC 25923 und *S. aureus* MRSA 272123 eingesetzt. Aus zeitlichen Gründen ergab sich eine Unterteilung in zwei Versuchsreihen. Die Tabellen Nr. 21 und 22 enthalten die Ergebnisse dieser Testung für die beiden Versuchsreihen:



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
DHA01	-H	-H	-H	-H
DHA02	-OCH ₃	-H	-H	-H
DHA03	-H	-OCH ₃	-H	-H
DHA04	-H	-H	-H	-OCH ₃
DHA05	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃
DHA06	-H	-OCH ₃	-H	-OCH ₃
DHA07	-H	-H	-H	-CH ₃
DHA08	-OCH ₃	-H	-H	-CH ₃
DHA09	-H	-OCH ₃	-H	-CH ₃
DHA10	-H	-H	-OCH ₃	-H
DHA11	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H
DHA12	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H
DHA13	-H	-H	-CH ₃	-H
DHA14	-OCH ₃	-H	-CH ₃	-H
DHA15	-H	-OCH ₃	-CH ₃	-H
DHA16	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃
DHA17	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-OCH ₃
DHA18	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃

Abbildung 43: allgemeine Strukturformel der Zielverbindungen mit 9,10-Dihydroacridin Grundstruktur

Verbindung	MIC-Werte [µg/ml]			
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>S. aureus</i> MRSA 272123	
	TET	CIP	TET	CIP
	0,5	0,5	3,125	12,5
DHA05	0,5	0,5	1,56	12,5
DHA07	0,5	0,5	1,56	12,5
DHA08	0,5	0,5	1,56	12,5
DHA09	0,5	0,5	3,125	12,5
DHA11	0,125	0,5	3,125	12,5

Bioanalytische Evaluierung der neuartigen MDR-modulierenden und antibakteriellen Wirkstoffe

DHA13	0,5	0,5	3,125	12,5
DHA14	0,5	0,5	1,56	12,5
DHA15	0,5	0,5	1,56	12,5
DHA16	0,25	0,5	3,125	12,5
DHA17	0,5	0,5	0,78	3,125
DHA18	0,5	0,5	1,56	6,25

Tabelle 20: potenzierende Wirkung 9,10-Dihydroacridine *S. aureus* ATCC 25923 und *S. aureus* MRSA 272123 (I)

Verbindung	MIC-Werte [$\mu\text{g/ml}$]			
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>S. aureus</i> MRSA 272123	
	TET	CIP	TET	CIP
	0,39	0,3125	6,25	6,25
DHA01	0,39	0,3125	6,25	6,25
DHA02	<0,012	<0,0024	1,56	6,25
DHA03	<0,012	<0,0024	6,25	6,25
DHA04	0,195	0,039	6,25	6,25
DHA06	0,0975	0,3125	6,25	6,25
DHA10	0,195	0,3125	6,25	6,25
DHA12	0,39	0,3125	6,25	6,25

Tabelle 21: potenzierende Wirkung 9,10-Dihydroacridine *S. aureus* ATCC 25923 und *S. aureus* MRSA 272123 (II)

Die Verbindungen **DHA05**, **DHA08**, **DHA09**, **DHA14**, **DHA15**, **DHA17**, **DHA18** sowie **DHA02** und **DHA12** wurden nicht in einer Konzentration von 10 μM , sondern in einer Konzentration von 1 μM eingesetzt, da diese Verbindungen bei einer Konzentration von 10 μM einen eigenen antibakteriellen Effekt bei dem Stamm *S. aureus* ATCC 25923 zeigen würden, siehe auch Abschnitt „Bestimmung des antibakteriellen Effekts der 9,10-Dihydroacridine mithilfe der minimalen Hemm-Konzentration (MIC)“. Die anderen untersuchten 9,10-Dihydroacridine besitzen bei einer Konzentration von 10 μM keine antibakterielle Wirkung.

Betrachtet man den nicht multiresistenten Bakterienstamm *S. aureus* ATCC 25923 in Kombination mit dem Antibiotikum Tetracyclin, so zeigen die Verbindungen **DHA11** und **DHA16** sowie **DHA02**, **DHA03**, **DHA04**, **DHA06** und **DHA10** einen potenzierenden Effekt. **DHA16** halbiert den MIC-Wert von Tetracyclin von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ zu 0,25 $\mu\text{g/ml}$, welcher dann von **DHA11** nochmals halbiert wird. **DHA11** besitzt somit den stärksten potenzierenden Effekt in Kombination mit Tetracyclin in dieser Versuchsreihe. Beide Verbindungen besitzen zwei Methoxy-Gruppen: **DHA11** hat die beiden Methoxy-Gruppen jeweils in meta-Position des Phenyl- bzw. Benzyl-Rests, **DHA16** hat eine 3,4-Dimethoxy-Gruppe im Phenyl-Ring. Bei den sieben 9,10-Dihydroacridinen der zweiten Verbindungsreihe zeigen fünf der Verbindungen einen kombinatorischen Effekt mit Tetracyclin. Vergleicht man die im Phenyl-Ring unsubstituierten Verbindungen **DHA01** bis **DHA03**, so lässt sich feststellen, dass ein unsubstituierter Benzyl-Ring zu keinem potenzierenden Effekt führt. **DHA02** und **DHA03**, welche im Benzyl-Ring eine Methoxy-Gruppe in meta- bzw. para-Position aufweisen, besitzen beide einen MIC-Wert < 0,012 $\mu\text{g/ml}$ und stellen mit diesem Wert die Verbindungen mit dem stärksten kombinatorischen Effekt dar. **DHA02** zeigte mit einem MIC-Wert von 6,25 μM

bereits eine antibakterielle Wirkung bei dem untersuchten Bakterienstamm *S. aureus* ATCC 25923, siehe Abschnitt „Bestimmung des antibakteriellen Effekts der 9,10-Dihydroacridine mithilfe der minimalen Hemm-Konzentration (MIC)“. Dies deutet daraufhin, dass **DHA02** als einzige der untersuchten Verbindungen bei einer Konzentration von 1 μM , bei welcher diese keinen eigenen antibakteriellen Effekt ausübt, eine potenzierende Wirkung in Kombination mit Tetracyclin besitzt. **DHA06** hat mit 0,0975 $\mu\text{g/ml}$ einen kleineren MIC-Wert als das strukturverwandte **DHA04** mit 0,195 $\mu\text{g/ml}$. **DHA06** hat also einen doppelt so hohen potenzierenden Effekt als **DHA04**, keine der zwei Verbindungen ist aber stärker aktiv als **DHA02** und **DHA03**. Beide Verbindungen besitzen eine Methoxy-Gruppe in Position 4 im Phenyl-Ring. **DHA06** hat in Position 4 im Benzyl-Ring eine Methoxy-Gruppe, **DHA04** hat einen unsubstituierten Benzyl-Ring. **DHA10** und **DHA12** unterscheiden sich im Vergleich zu **DHA04** und **DHA06** nur in der Position der Methoxy-Gruppe im Phenyl-Ring, da die zwei Verbindungen in meta-Stellung substituiert sind. **DHA10** besitzt den gleichen MIC-Wert wie **DHA04**, die genaue Positionierung der Methoxy-Gruppe im Phenyl-Ring ist in diesem Fall für den gemeinsamen antibakteriellen Effekt mit Tetracyclin also irrelevant. **DHA12** besitzt bei einer eingesetzten Konzentration von 1 μM keinen potenzierenden Effekt.

Als Nächstes sollen die Ergebnisse der gemeinsamen Anwendung der synthetisierten 9,10-Dihydroacridine mit Ciprofloxacin für den Bakterienstamm *S. aureus* ATCC 25923 diskutiert werden und mit den Ergebnissen von Tetracyclin verglichen werden. Für die Verbindungen der ersten Verbindungsreihe konnte kein potenzierender Effekt gemessen werden. Jede dieser elf Verbindungen hat, ebenso wie Ciprofloxacin, einen MIC-Wert von 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Im Vergleich dazu konnten in Kombination mit Tetracyclin zwei Verbindungen der ersten Verbindungsreihe, **DHA11** und **DHA16**, eine potenzierende Wirkung bei dem gleichen Bakterienstamm verursachen. Für die sieben Verbindungen der zweiten Verbindungsreihe konnten drei Verbindungen einen kombinatorischen Effekt aufweisen: **DHA02**, **DHA03**, **DHA04**. **DHA02** und **DHA03** haben beide den gleichen MIC-Wert von < 0,0024 $\mu\text{g/ml}$. Diese beiden strukturverwandten Verbindungen zeigten bereits in Kombination mit Tetracyclin einen sehr niedrigen MIC-Wert. **DHA02** wurde im Gegensatz zu **DHA03** in einer 10-fach geringeren Konzentration eingesetzt, womit **DHA02** eine stärkere potenzierende Wirkung aufweist. **DHA04** hat im Vergleich dazu einen höheren MIC-Wert von 0,039 $\mu\text{g/ml}$ und zeigt auch gemeinsam mit Tetracyclin einen synergistischen Effekt.

Als zweiter Bakterienstamm wurde der multiresistente Bakterienstamm *S. aureus* MRSA 272123 eingesetzt. Im Allgemeinen kann beobachtet werden, dass sowohl die MIC-Werte der 9,10-Dihydroacridinen als auch die der angewendeten Antibiotika deutlich erhöht sind im Vergleich zu denen des nicht-multiresistenten *S. aureus* Bakterienstamm.

Zuerst sollen die MIC-Werte der synthetisierten Testverbindungen im Zusammenspiel mit Tetracyclin erörtert werden. Tetracyclin hat in der ersten Verbindungsreihe einen MIC-Wert von 3,125 µg/ml. Die Verbindung **DHA17** senkt unter all den getesteten Verbindungen den MIC-Wert am meisten und erreicht einen Wert von 0,78 µg/ml. Ebenfalls konnte die ähnlich substituierte Verbindung **DHA18** den MIC-Wert senken und im Vergleich zum MIC-Wert von Tetracyclin halbieren. **DHA17** besitzt drei Methoxy-Gruppen: zwei im Phenyl-Ring in Position 3 und 4 und eine im Benzyl-Ring in Position 3. Diese Substitution scheint verglichen mit der Methoxy-Gruppe im Benzyl-Ring in Position 4 von **DHA18** vorteilhaft. Des Weiteren besitzen die Verbindungen **DHA05**, **DHA07**, **DHA08**, **DHA14** und **DHA15** einen verminderten MIC-Wert von 1,56 µg/ml. Die Verbindungen **DHA07** und **DHA08** haben als strukturelle Gemeinsamkeit eine Methyl-Gruppe im Phenyl-Ring in Position 4. **DHA08** hat zusätzlich noch im Benzyl-Ring in meta-Stellung eine Methoxy-Gruppe. **DHA14** und **DHA15** haben beide ihre Methyl-Gruppe in Position 3 des Phenyl-Rings und jeweils eine Methoxy-Gruppe im Benzyl-Ring in meta- respektive para-Position. In der zweiten Verbindungsreihe besaß nur eine Verbindung in Kombination mit Tetracyclin die Fähigkeit den MIC-Wert zu senken: **DHA02**. **DHA02** war bereits bei dem Bakterienstamm *S. aureus* ATCC 25923 die wirksamste Verbindung.

In Kombination mit Ciprofloxacin konnten im Durchschnitt deutlich weniger Verbindungen einen potenzierenden Effekt induzieren. In der ersten Verbindungsreihe zeigen zwei Verbindungen, **DHA17** und **DHA18**, welche eine 3,4-Dimethoxy-Funktion im Phenyl-Ring enthalten, eine MIC-Wert mindernde Wirkung. **DHA18** halbiert den MIC-Wert von Ciprofloxacin, **DHA17** viertelt diesen MIC-Wert. Die meta-Substitution der Methoxy-Gruppe im Benzyl-Ring führt also zu einer stärkeren Auswirkung als eine para-Substitution. Für die zweite Verbindungsreihe konnte für keine Verbindung eine potenzierende Wirkung identifiziert werden.

Zusammengefasst lässt sich aussagen, dass eine Kombination der 9,10-Dihydroacridine mit Tetracyclin der Kombination mit Ciprofloxacin zu bevorzugen ist. Während die erste Verbindungsreihe vor allem bei dem Bakterienstamm *S. aureus* MRSA 272123 eine kombinatorische Wirkung bewirkt, zeigte die zweite Verbindungsreihe eher eine Minderung des MIC-Wertes für den Bakterienstamm *S. aureus* ATCC 25923. Besonders die Verbindungen **DHA02** und **DHA03**, welche beide einen unsubstituierten Phenyl-Ring besitzen, haben einen sehr starken Einfluss auf den MIC-Wert. Bei der ersten Verbindungsreihe haben vor allem die im Phenyl-Ring eine 3,4-Dimethoxy-Gruppe tragenden **DHA17** und **DHA18** einen stark potenzierenden Effekt.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Resistenzmechanismen können auf vielfältige Art und Weise die Therapie verschiedenster Erkrankungen erschweren, indem sie die Wirksamkeit von Arzneistoffen senken bzw. aufheben. Ein wesentlicher Faktor, welcher zur Entstehung von Resistenzen bei Krebs- bzw. Bakterienzellen beiträgt, ist die Überexpression von Effluxproteinen. Fokus dieser Arbeit waren die membranständigen Transporterproteine P-gp, MRP-1 und -2 und AcrAB-TolC, welche Therapeutika aus den Zielzellen ausschleusen können. Für die vier genannten Transporter wurden im Rahmen dieser Arbeit u.a. die Struktur und der Aufbau sowie der Transportmechanismus genauer beleuchtet. Des Weiteren wurden bekannte Substrate und Modulatoren der Effluxpumpen genannt. Die Entwicklung von Modulatoren, welche mit diesen Transportern wechselwirken und den Export von Wirkstoffen unterbinden können, ist Thema vieler wissenschaftlicher Arbeiten und für die Optimierung von therapeutischen Maßnahmen von hoher Relevanz.

Mit dem Ziel fähige MDR-Modulatoren zu gewinnen wurden neuartige 1,4-Dihydropyridine und 9,10-Dihydroacridine synthetisiert und mittels analytischer Methoden charakterisiert. Als Ausgangsverbindungen dienten zum einen Nicotinsäureethylester für die Dihydropyridin-Verbindungen und zum anderen Acridin für die Dihydroacridin-Verbindungen. Diese Verbindungen wurden mit verschiedensten Benzylhalogeniden und Grignard-Reagenzien versetzt, um in einer einfach durchzuführenden zweistufigen Synthese die gewünschten Endprodukte zu generieren. Die synthetisierten Derivate weisen variierende Substituenten in ihren Benzyl- bzw. Phenyl-Resten auf. Zu den eingesetzten Analyseverfahren, welche zur Bestimmung der Identität eingesetzt wurden, gehören NMR- und massenspektroskopische Methoden. Die Reinheit der Verbindungen wurde mittels HPLC determiniert. Die gewonnenen Testverbindungen wurden auf ihr MDR-modulierendes Potential hin untersucht. Der Einfluss der unterschiedlichen Substituenten auf die Aktivität und Selektivität bei den untersuchten Transportern wurde getestet und bewertet.

Die Dihydropyridin- und Dihydroacridin-Verbindungen wurden an unterschiedlichen Targets getestet. Zur Bestimmung der Affinität gegenüber P-gp wurden für die 20 synthetisierten 1,4-Dihydropyridine mittels Durchflusszytometrie Fluoreszenz-Uptake-Assays mit der Vergleichssubstanz Verapamil sowie dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 durchgeführt. Als Zelllinien kamen die Parenteralzelllinie L5178Y und deren Subzelllinie L5178Ymdr, welche humanes P-gp überexprimiert, zum Einsatz. Nach dem gleichen Prinzip wurde die MRP-1 bzw. -2 Transporteraffinität für die synthetisierten 1,4-Dihydropyridine charakterisiert. Als Vergleichssubstanz diente Probenecid und als Fluoreszenzfarbstoff CFDA. Die MRP-1 und MRP-2

exprimierenden Zelllinien A2780 und A2780cis wurden verwendet. Aus den Ergebnissen der Fluoreszenz-Uptake-Assays wurden die Verbindungen mit der höchsten Aktivität bestimmt und Struktur-Wirkungs-Beziehungen diskutiert. Die modulierende Aktivität der Verbindungen wurde durch die Berechnung des FAR-Wertes ermittelt.

Bei der Bestimmung der Aktivität gegenüber P-gp zeigen alle synthetisierten 1,4-Dihydropyridin-Verbindungen bei einer Konzentration von 10 μM mit einem FAR-Wert > 1 eine P-gp inhibitorische Aktivität. Die drei aktivsten Verbindungen sind **DHP17** (FAR-Wert: 2,75), **DHP19** (FAR-Wert: 2,69) und **DHP20** (FAR-Wert 1,91). Das verbindende Element bei diesen drei Verbindungen ist der 3,4-Dimethoxy-Substituent im Phenyl-Ring. Der 3,4-Dimethoxy-Substituent ist als maßgebliche Ursache für die erhöhte P-gp inhibitorische Wirkung der 1,4-Dihydropyridine verantwortlich.

Eine weitere Methode wurde zur Charakterisierung der P-gp modulierenden Eigenschaften der 1,4-Dihydropyridine eingesetzt. Mithilfe eines MTT-Assays wurde die Fähigkeit der Verbindungen **DHP17**, **DHP18** und **DHP20** zur Resistenzaufhebung untersucht. Als Zytostatikum wurde Doxorubicin und als Vergleichssubstanz wurde Verapamil benutzt. Der MTT-Assay zeigte, verglichen mit dem Fluoreszenz-Uptake-Assays, unterschiedliche Ergebnisse. Während beim Fluoreszenz-Uptake-Assay die 1,4-Dihydropyridine beinahe so wirksam waren wie die Vergleichssubstanz Verapamil, wurde beim MTT-Assay eine geringere Wirkung zur Resistenzaufhebung festgestellt. Eine mögliche Erklärung für diese Erkenntnis wird im Abschnitt „Bestimmung des Potentials der P-gp inhibierenden 1,4-Dihydropyridine zur Resistenzüberwindung mittels MTT-Assay“ geliefert.

Des Weiteren wurde zur Bestimmung der Zytotoxizität der 1,4-Dihydropyridine ein MTT-Assay mit den drei Verbindungen **DHP17**, **DHP19** und **DHP20** durchgeführt. Keine der drei getesteten Verbindungen zeigte bis zu einer Konzentration von 100 μM toxische Effekte bei der Zelllinie L5178Y^{mdr}. Es wurden nur IC_{50} -Werte $> 100 \mu\text{M}$ ermittelt. Die nicht vorhandene Zytotoxizität der Verbindungen spricht für die Verwendung dieser in weiterführenden Untersuchungen bei der Suche nach MDR-Modulatoren.

Neben P-gp wurden die Verbindungen auch mit den MRP-1 und -2 exprimierenden Zelllinien getestet. Ein FAR-Wert größer 1 wurde bei der Zelllinie A2780cis für alle, bei der Zelllinie A2780 bei fast allen untersuchten Verbindungen gefunden. Bei den Fluoreszenz-Uptake-Assays konnte folgendes Ergebnis erlangt werden: die drei stärksten MRP-1 bzw. -2 Inhibitoren sind bei der Zelllinie A2780 **DHP07**, **DHP09** und **DHP12** (FAR-Werte: 1,66; 1,35 bzw. 1,50) und bei der Zelllinie A2780cis **DHP01**, **DHP04** und **DHP19** (FAR-Werte: 2,27; 1,89 bzw. 2,07). Mehrere Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurden diskutiert für die 20 getesteten Verbindungen. Z.B. weisen die drei

Verbindungen **DHP01**, **DHP04** und **DHP19** als gemeinsames Strukturelement im Phenyl-Rest eine Methoxy-Gruppe als para-Substituenten auf.

Zur Bestimmung der P-gp Transporteraktivität der 9,10-Dihydroacridine wurde parallel zur Untersuchung bei den 1,4-Dihydropyridinen eine durchflusszytometrische Methode eingesetzt. Untersucht wurden elf der synthetisierten 9,10-Dihydroacridine in den Konzentrationen 2 μM und 20 μM . Alle synthetisierten Verbindungen zeigen bei einer Konzentration von 20 μM eine P-gp modulierende Wirkung auf. Bei einer Konzentration von 2 μM besitzen nur sechs der elf Testverbindungen einen FAR-Wert > 1 : **DHA05**, **DHA11**, **DHA13**, **DHA14**, **DHA15** und **DHA16**. Im Vergleich mit den anderen 9,10-Dihydroacridinen stellt **DHA16** bei einer Konzentration von 20 μM mit einem FAR-Wert von 37,05 ($\text{FAR}_{\text{Vergleich}}$ von 4,37) den aktivsten Effluxpumpen-Modulator dar. Verbindungen mit einer Substitution der Methoxy-Gruppe im Phenyl-Ring in Position 3 (und in Position 4) weisen die höchsten FAR-Werten auf.

Die elf getesteten 9,10-Dihydroacridine wurden auf ihr zytotoxisches Potenzial hin untersucht. Keine der elf Verbindungen zeigte bis zu einer Konzentration von 100 μM toxische Effekte bei den Zelllinien L5178Y bzw. L5178Ymdr.

Des Weiteren wurde das antiproliferative Potenzial der 9,10-Dihydroacridine getestet. Die drei Verbindungen mit den größten IC_{50} -Werten für die Zelllinie L5178Y sind **DHA16**, **DHA17** und **DHA18**, die im Phenyl-Teil eine 3,4-Dimethoxy-Funktion besitzen. Abgesehen von den Verbindungen **DHA05**, **DHA08**, **DHA14** und **DHA17** besitzen bei der resistenten Zelllinie L5178Ymdr alle Verbindungen einen IC_{50} -Wert größer 10 μM . Diese vier genannten Verbindungen beeinflussen bei einer geringen Konzentration das Zellwachstum maßgeblich.

Bei den 9,10-Dihydroacridinen wurde nicht die MRP-1/-2 modulierende Aktivität bestimmt. Stattdessen erfolgte eine Determinierung des antibakteriellen Effekts der 18 synthetisierten 9,10-Dihydroacridine bei den Bakterienstämmen *E. coli* AG100, *E. coli* AG100 A, *S. aureus* ATCC 25923 und *S. aureus* MRSA 272123. Der antibakterielle Effekt wurde mithilfe von MIC-Werten und der „Broth Microdilution Method“ bestimmt.

Keine der Verbindungen zeigt bis zu einer Konzentration von 100 μM eine antibakterielle Wirkung bei dem AcrAB-TolC Effluxpumpen exprimierenden Bakterienstamm *E. coli* AG100. Bei dem Bakterienstamm *E. coli* AG100 A stellt **DHA02** mit einem MIC-Wert von 12,5 μM die wirksamste Verbindung in der Untersuchung dar. Es konnte u.a. zusammenfassend festgestellt werden, dass ein unsubstituierter Phenyl-Rest sowie eine 3,4-Dimethoxy-Gruppe im Phenyl-Rest sich positiv und die Einführung einer Methoxy-Gruppe in Position 4 des Phenyl-Rings sich negativ auf die antibakterielle Wirkstärke bei dem Bakterienstamm *E. coli* AG100 A auswirkt.

Bei den anderen beiden Bakterienstämmen, *S. aureus* ATCC 25923 und *S. aureus* MRSA 272123, konnten folgende Ergebnisse erzielt werden: für *S. aureus* ATCC 25923 zeigten alle

9,10-Dihydroacridin-Verbindungen eine inhibitorische Aktivität (Ausnahme: **DHA11** und **DHA16**). Am aktivsten waren die Verbindungen **DHA17** und **DHA18** mit jeweils einem MIC-Wert von je 3,125 μM . Zwei Struktur-Wirkungs-Beziehungen konnten festgestellt werden: zum einen bedingt im Allgemeinen ein unsubstituierter Benzyl-Ring höhere MIC-Werte, zum anderen führt eine 3,4-Dimethoxy-Gruppe im Phenyl-Ring und eine Methoxy-Gruppe im Benzyl-Ring zu geringen MIC-Werten. Die vier Verbindungen **DHA02**, **DHA12**, **DHA17** und **DHA18** haben bei *S. aureus* MRSA 272123 einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation. **DHA02**, **DHA17** und **DHA18** haben einen MIC-Wert von 25 μM und **DHA12** einen MIC-Wert von 50 μM . Als relevantes Strukturelement für eine Wirkung auf das Bakterienwachstum konnte die 3,4-Dimethoxy-Gruppe im Phenyl-Ring identifiziert werden.

Mithilfe des relativen Fluoreszenzindex wurde geprüft, ob die 9,10-Dihydroacridine eine inhibitorische Wirkung auf das Effluxpumpen-System AcrAB-TolC bei dem Bakterienstamm *E. coli* AG100 besitzt. Die verwendete Methode basiert auf der intrazellulären Akkumulation von Ethidiumbromid. Als Vergleichssubstanz wurde Promethazin eingesetzt. Keine der 9,10-Dihydroacridin-Verbindungen konnte einen nennenswerten Effekt auf die Akkumulation von Ethidiumbromid bewirken. Somit kann zusammengefasst ausgesagt werden, dass die Testverbindungen keine inhibitorische Wirkung bei dem Effluxpumpen-System AcrAB-TolC haben. Als letztes wurde die potenzierende Wirkung der 9,10-Dihydroacridine in Kombination mit den Antibiotika Tetracyclin und Ciprofloxacin untersucht. Erneut wurden die Bakterienstämme *E. coli* AG100, *E. coli* AG100 A, *S. aureus* ATCC 25923 und *S. aureus* MRSA 272123 und die Methode „Broth Microdilution“ eingesetzt.

Keine der 18 Verbindungen wies für den Bakterienstamm *E. coli* AG100 eine potenzierende Wirkung auf, unabhängig von dem eingesetzten Antibiotikum. Dies bestätigt erneut, dass die 9,10-Dihydroacridine keine Modulatoren des Effluxpumpen-Systems AcrAB-TolC sind. Beim Bakterienstamm *E. coli* AG100 A haben **DHA17** und **DHA18**, welche beide eine 3,4-Dimethoxy-Gruppe in der Phenyl-Gruppe besitzen, den MIC-Wert des Antibiotikums Tetracyclin gesenkt, was auf eine potenzierende Wirkung hindeutet. Bei der Verwendung von Ciprofloxacin können drei Verbindungen den antibakteriellen Effekt des Antibiotikums erhöhen: **DHA09**, **DHA17** und **DHA18**. Der MIC-Wert betrug jeweils 0,0025 $\mu\text{g/ml}$.

Die Untersuchung des Bakterienstamms *S. aureus* ATCC 25923 in Kombination mit dem Antibiotikum Tetracyclin ergab, dass folgende Verbindungen eine potenzierende Wirkung aufweisen: **DHA11** und **DHA16** sowie **DHA02**, **DHA03**, **DHA04**, **DHA06** und **DHA10**. **DHA02** und **DHA03** sind unter den genannten Verbindungen diejenigen, welche den stärksten potenzierenden Effekt besitzen. Beide Verbindungen besitzen in Kombination mit Tetracyclin einen MIC-Wert von < 0,012 $\mu\text{g/ml}$. Sie senken somit den MIC-Wert von Tetracyclin (0,39 $\mu\text{g/ml}$) um den Faktor 30. In

Kombination mit Ciprofloxacin anstelle von Tetracyclin konnten drei Verbindungen einen kombinatorischen Effekt aufweisen: **DHA02**, **DHA03**, **DHA04**. **DHA02** und **DHA03** weisen im Benzyl-Ring beide eine Methoxy-Gruppe in meta- bzw. para-Position auf. **DHA04** besitzt eine Methoxy-Gruppe in para-Position im Phenyl-Ring. Für den Bakterienstamm *S. aureus* MRSA 272123 und das Antibiotikum Tetracyclin haben die Verbindungen **DHA17** und **DHA18** sowie **DHA02** die stärkste potenzierende Wirkung erzielt, in Kombination mit Ciprofloxacin zeigten **DHA17** und **DHA18** die effektivste Wirkung. Final lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass die 9,10-Dihydroacridine im Zusammenspiel mit Tetracyclin die höchste potenzierende Wirkung aufweisen und dass die Verbindungen **DHA17** und **DHA18** sowie **DHA02** und **DHA03** am wirksamsten sind.

Aufgrund der in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse sind weitere Testungen und Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe bzw. außerhalb angebracht, um die Eigenschaften der 1,4-Dihydropyridine und 9,10-Dihydroacridine genauer zu charakterisieren. So ist es erstrebenswert, die Verbindungen auch in biologischen Zellmodellen bei anderen Targets (Effluxpumpen), welche eine Rolle bei MDR spielen (z.B. BCRP), einzusetzen, um zusätzliche modulierende Eigenschaften der Verbindungen zu detektieren. Ebenso ist die Verwendung anderer Zelllinien, z.B. humane P-gp Zelllinien, zur Testung der Wirksamkeit der Testverbindungen ein attraktiver Prüfpunkt. Die Verwendung eines anderen Fluoreszenzfarbstoffs als Rhodamin 123 ermöglicht die Bestimmung, ob die synthetisierten P-gp Modulatoren eine unterschiedliche inhibierende Wirkung an verschiedenen Bindungsstellen aufweisen. Die vielversprechendsten und effektivsten Verbindungen könnten anschließend in weiteren präklinischen bzw. tierexperimentellen Studien genauer untersucht zu werden, z.B. beginnend mit in vivo Testungen. Generell ist ein besseres Verständnis über die Bindungsmechanismen von Verbindungen mit Transportern wie P-gp hilfreich, um gezielt Modulatoren entwickeln und synthetisieren zu können. Auch die Dauer der Wirkung der Modulatoren an den Effluxpumpen sowie der Zusammenhang zwischen Anwendung der Modulatoren und potenzieller Steigerung der Expression von Effluxtransportern stellen zu analysierende Ziele dar. Bei den 1,4-Dihydropyridinen ist des Weiteren ein Einfluss auf Calciumkanäle ein interessanter Untersuchungspunkt, da sich diese Verbindungen von Calciumkanal-Antagonisten wie Nifedipin ableiten und dementsprechend das Potenzial bieten zu kardiovaskulären Nebenwirkungen zu tendieren. Weitere relevante Untersuchungspunkte sind u.a. die Beeinflussung von Prozessen des Metabolismus bzw. der Elimination, wie es die P-gp Modulatoren der 2. Generation aufwiesen, und wie bereits erwähnt die potenzielle Induktion der Expression von P-gp bei Anwendung der Modulatoren.

Zusammenfassung und Ausblick

Eine sonstige sinnvolle Fortsetzung der hier dargelegten Arbeit ist die Erweiterung des Substitutionsmusters der synthetisierten Verbindungen mit Wasserstoffbrückendonatoren bzw. -akzeptoren, um mögliche Affinitätssteigerungen gegenüber den Zieltargets und ergänzende Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu ermitteln. Hierfür eignen sich z.B. Halogen-substituierte Benzyl- bzw. Phenylreste, sowohl bei den 1,4-Dihydropyridinen als auch bei den 9,10-Dihydroacridinen, anstelle der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Methyl- bzw. Methoxy-substituierten Verbindungen. Die Durchführung von Docking-Studien zur Bestimmung der Interaktion der MDR-Modulatoren mit dem Target kann außerdem zur Planung weiterer Synthesereihen, basierend auf den Verbindungen, welche im Rahmen dieser Arbeit vorgestellt wurden, herangezogen werden. Ferner sind auch Untersuchungen, welche die physikochemischen Eigenschaften genauer beleuchten, informativ: die Löslichkeit sowie der n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient können bereits erste Hinweise auf die Bioverfügbarkeit der Verbindungen liefern. Ein weiterer Punkt wären Syntheseoptimierungen, um die teils niedrigen Ausbeuten der Synthesen z.B. durch Modifizierung der Reaktionszeit oder -temperatur zu erhöhen. Ebenso kann insbesondere die Umsetzung der zähviskosen und flüssigen 1,4-Dihydropyridine zu den entsprechenden Hydrochloridsalzen die Aufreinigung der Verbindungen, z.B. durch Umkristallisation, erleichtern und verbessern. Auch die innerhalb der Arbeitsgruppe etablierte Umsetzung von 1,4-Dihydropyridinen zu den entsprechenden Käfigdimeren mit anschließender biologischer Evaluierung an Targets stellt eine aufschlussreiche Untersuchung dar.

Des Weiteren sind auch weiterführende Testungen für die 9,10-Dihydroacridine sinnvoll, um deren antibakterielles bzw. potenzierendes Potential ausführlicher zu beleuchten. Erstrebenswert ist u.a. die Untersuchung an weiteren Bakterienstämmen, sowohl grampositiven als auch -negativen. Im gleichen Zug stellt selbstverständlich auch die kombinierte Gabe von einem bereits etablierten Antibiotikum mit einem 9,10-Dihydroacridin zur Determination eines potenzierenden Effekts an alternativen Bakterienstämmen einen weiteren interessanten Punkt zur Erforschung dar. Darüber hinaus bietet die Testung an zusätzlichen bakteriellen Transporterproteinen zur Bestimmung von modulierenden Eigenschaften der 9,10-Dihydroacridine unter Umständen neue Wege zur Überwindung der MDR an.

Diverse potenzielle weiterführende Schritte sind also gegeben und können überdies in zu dieser Dissertation aufbauenden Arbeiten betrachtet werden.

7 Experimenteller Teil

7.1 Methoden und Materialien

7.1.1 Allgemeine Methode

7.1.1.1 Filtration

Zur Trennung von Stoffgemischen dienten Papierfilter der Firma Munktell & Filtrak GmbH mit einer Porengröße von 8 μm bis 12 μm (Gütegrad: 1289, Flächengewicht 84 g/m^2). Der Durchmesser der Filter wurde individuell angepasst.

7.1.1.2 Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzbereiche der synthetisierten Verbindungen, welche als Feststoffe gewonnen werden konnten, wurden an einem Boetius PHMK 05-Heiztischmikroskop der Firma VEB Wägetechnik Rapido Radebeul bestimmt. Das Heiztischmikroskop ist bis zu Temperaturen von 350 °C erhitzbar. Die jeweils angegebenen Schmelzbereiche stellen unkorrigierte Werte dar.

7.1.1.3 NMR-Spektroskopie

Die zur Identifizierung der synthetisierten Verbindungen gemessenen NMR-Spektren erfolgten an einem 400 MHz VNMRS (Software VNMRJ3.2) bzw. einem 500 MHz DD2 (Software VNMRJ4.2) der Firma Agilent Technologies. ^1H -NMR-Spektren wurden bei einer Arbeitsfrequenz von 400 MHz bzw. 500 MHz aufgenommen. ^{13}C -NMR-Spektren wurden bei einer Arbeitsfrequenz von 100 MHz bzw. 125 MHz aufgenommen. Die NMR-Spektren wurden bei einer Temperatur von 27 °C aufgenommen. Als innerer Standard dienen die jeweils angegebenen deuterierten Lösungsmittel. Die verwendeten deuterierten Lösungsmittel sind Aceton- d_6 , Methanol- d_4 und CDCl_3 (deuteriertes Chloroform). Zur Interpretation der NMR-Spektren diente das Programm *MestReNova* (Mestrelab Research S.L., Version 8.0.0-10524 und 14.2.2-28739), zur Simulation der NMR-Spektren wurde das Programm *ChemBioDraw Ultra* (CambridgeSoft, Version 13.0.0.3015) verwendet.

Gemessene ^1H -NMR-Spektren werden durch Angabe der Arbeitsfrequenz und des deuterierten Lösungsmittels charakterisiert. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm („parts per million“) angegeben, beginnend mit der größten chemischen Verschiebung in absteigender Reihenfolge. In Klammern folgt dann die Multiplizität, die Anzahl der integrierten Protonen, die Kopplungskonstante J in Hz und die strukturelle Zuordnung der Signale. Die Multiplizitäten sind wie folgt zu deuten: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett; Kombinationen von Multiplizitäten, wie z.B. dd = Dublett von Dublett, sind ebenfalls möglich.

Gemessene ^{13}C -NMR-Spektren wurden ^1H -Breitband-entkoppelt aufgenommen. Es sind ebenfalls die Arbeitsfrequenz und das jeweilige deuterierte Lösungsmittel sowie die chemische Verschiebung in ppm, in absteigender Reihenfolge, angegeben. In Klammern erfolgt die strukturelle Zuordnung der Signale.

7.1.1.4 *Massenspektrometrie*

Die Elektrosprayionisation (ESI)-Massenspektren wurden an einem Finnigan LCQ Classic der Firma Thermo Electron Corporation aufgenommen (Kapillartemperatur: 220 °C). Die Vermessung der Proben erfolgte in acetonischer Lösung. Die Injektion der Probe erfolgte über eine Spritzenpumpe. Das ESI-Spektrum wurde zwischen 50 Da und 1500 Da im positivem und negativem Ionisierungsmodus aufgezeichnet (Methode mit 5,0 kV; Messgenauigkeit: $\pm 0,1$ Da/z). Nachfolgend ist in den Monographien der einzelnen Verbindungen das Masse-zu-Ladungsverhältnis m/z , welches dem jeweiligen Fragment zugeordnet ist, angegeben.

7.1.1.5 *IR-Spektroskopie*

Zur Aufnahme der ATR-Spektren diente ein FT-IR Spektrometer IFS 28 der Firma Bruker Optik mit einem pyroelektrischen DTGS-Detektor (deuteriertes Triglycinsulfat). In den Monographien der einzelnen Verbindungen sind in absteigender Reihenfolge die Wellenzahlen ν in cm^{-1} und die Stärke der Signale angegeben. Die Abkürzungen sind dabei wie folgt zu deuten: w = weak (schwach), m = medium (mittel), s = strong (stark). In Klammern ist dann die strukturelle Zuordnung der Signale und die Art der Schwingung (ν = Valenzschwingung, δ = Deformationsschwingung) aufgezeigt.

7.1.1.6 Chromatographie

7.1.1.6.1 Dünnschichtchromatographie

Zur Bestimmung der Identität und Reinheit, zur Überprüfung des Reaktionsverlaufs und zur Messung des R_f -Werts von Zwischen-, Neben- und Endprodukten wurden dünnschichtchromatographische Methoden verwendet. Zum Einsatz kamen DC-Aluminiumplatten der Firmen Merck KGaA und Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, welche mit Kieselgel 60 und Fluoreszenz-Indikator UV₂₅₄ in einer Schichtdicke von 0,20 mm beschichtet sind. Die zu untersuchenden Verbindungen wurden in Aceton gelöst und mittels Glaskapillare in schmalen Banden auf die für eine angemessene Auftrennung zurechtgeschnittene DC-Platte aufgetragen. Zur Entwicklung wurden die DC-Platten in eine mit einem entsprechenden Lösungsmittelgemisch gesättigte Chromatographie-Kammer gestellt. Nach Beendigung der Trennung wurde die Platte aus der Kammer entfernt, getrocknet und mit einer UV-Lampe bei den Wellenlängen 254 nm bzw. 365 nm untersucht. Die Detektion der Chromatogramme erfolgte durch Fluoreszenzlöschung bzw. durch Eigenfluoreszenz der zu untersuchenden Proben.

R_f -Werte wurden bestimmt durch das Verhältnis der Laufhöhe der zu untersuchenden Substanz zur Höhe der Laufmittelfront. Die jeweils verwendeten Lösungsmittelgemische und ihre Volumenverhältnisse sind in den jeweiligen Monographien aufgeführt.

7.1.1.6.2 Säulenchromatographie

Für die Auftrennung der Reaktionsgemische und der Isolation der gewünschten Endprodukte von den Nebenprodukten diente die Säulenchromatographie unter Normaldruck. Als stationäre Phase diente Kieselgel 60 mit einer Korngröße von 0,063 mm bis 0,2 mm der Firma Macherey-Nagel GmbH & Co.KG. Die jeweils verwendeten Elutionsmittel sind in den Monographien angegeben. Der Durchmesser und die Länge der Säule wurden entsprechend der zu trennenden Substanzmenge sowie der Trennproblematik ausgewählt.

7.1.1.6.3 Analytische HPLC

Um die Reinheit der Endverbindungen zu überprüfen wurden zwei verschiedene HPLCs verwendet:

HPLC 1: HPLC-Gerät der Firma Shimadzu:

LC-10AD, SIL-HAT auto sampler

Experimenteller Teil

Als analytische Pumpe wurde LC-10AD verwendet, als Säule kam eine RP18-Säule zum Einsatz: Xterra RP-18 Säule (3,5 μM ; 3,9 x 100 mm) von Waters. Bei einer Wellenlänge von 254 nm wurden die Verbindungen mithilfe des UV-Vis-Detektors SPD—M10A VP PDA detektiert. Als Laufmittel wurde ein Gradient aus Wasser und Methanol verwendet, wobei der Methanol-Anteil über die Zeit kontinuierlich erhöht wurde. Zur Datenverarbeitung diente das Programm LabSolutions, Version: 5.54.

HPLC 2: HPLC-Gerät der Firma Jasco

PU-980, 851 AS

Als analytische Pumpe diente PU-98 und als Säule eine RP18-Säule: Lichrospher 100 von Merck KGaA. Bei einer Wellenlänge von 254 nm wurden die Verbindungen mithilfe des UV-Vis-Detektors UV-970 detektiert. Als Laufmittel diente ein isokratisches Laufmittelgemisch (Methanol: Wasser, 80:20). Zur Datenverarbeitung diente die Programme Borwin, Version 1.50 und OriginLab, Version 8.0.

Zur Probenvorbereitung wurde die zu untersuchende Substanz in einem geeigneten Glasvial in 100 μl Methanol gelöst. Falls die Substanz sich nicht vollständig in Methanol löste, wurden zusätzlich 40 μl DMSO hinzugefügt. Das Injektionsvolumen betrug 10 μl (HPLC 1) bzw. 20 μl (HPLC 2).

In den einzelnen Monographien der synthetisierten Verbindungen ist die Verwendung des jeweiligen HPLC-Geräts mit „HPLC 1“ bzw. „HPLC 2“ gekennzeichnet.

7.1.2 Biologische Methoden

7.1.2.1 Zelllinien und Bakterienstämme

Zur Bestimmung des P-gp inhibierenden Potentials der 1,4-Dihydropyridine wurden die Maus-T-Lymphom-Zelllinien L5178Y und L5178Y^{mdr} verwendet. Als Medium diente das McCoy's 5A Medium (modifiziert), dem 10 % FBS (fetal bovine serum, fetales Kälberserum) und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurden. FBS besitzt eine große Zahl an Wachstumsfaktoren, welche für die Kultivierung der Zellen unabdingbar sind. Der Zusatz von Penicillin und Streptomycin dient dem Schutz der Zelllinien vor einer bakteriellen Kontamination. Die P-gp Überexpression in der Zelllinie L5178Y^{mdr} wurde durch die Zugabe von 60 ng/ml Colchicin aufrechterhalten.

Experimenteller Teil

Den humanen Ovarialkarzinomzelllinien A2780 und A2780cis, welche zur Testung der potenziellen MRP-1 bzw. MRP-2 Inhibitoren verwendet wurden, wurde das Nährmedium RPMI-1640 beigelegt, welchem 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurde. Weiterhin wurde der Zelllinie A2780cis Cisplatin (Endkonzentration: 1 μ M) hinzugefügt.

Bei den Zelllinien A2780 und A2780cis handelt es sich um adhären wachsende Zellen, welche also am Boden der Zellkulturflasche wachsen. Die Zelllinien L5178Y und L5178Ymdr sind Suspensionszellen, welche suspendiert im Medium vorliegen.

Für die Testung der 9,10-Dihydroacridine, welche an der Universität Szeged (Budapest, Ungarn) unter Führung von Joseph Molnar, Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Immunbiologie, durchgeführt wurde, wurde für die Bestimmung der P-gp modulierenden Aktivität der Verbindungen ebenfalls die L5178Y Maus-T-Lymphom-Zelllinie (PAR, ECACC Cat. No. 87111908, erhalten von FDA, Silver Spring, MD, USA) und die durch Transfektion mit pHa MDR1/A Retrovirus erhaltene ABCB1-exprimierende Zelllinie L5178Ymdr eingesetzt. Zur Zellkultivierung wurde das McCoy's 5A Medium, welches ergänzt wurde mit 10 %igen hitze-inaktivierten Pferdeserum, 200 mM L-Glutamin und einem Zusatz von Penicillin/Streptomycin (100 U/L und 10 mg/l), verwendet. Zur Selektion der P-gp überexprimierenden Zellen wurde Colchicin benutzt.

Für die Analyse der 9,10-Dihydroacridine wurde der Bakterienstamm Wild-Typ *E. coli* K-12 AG100 [argE3 thi-1 rpsL xyl mtl Δ (gal-uvrB) supE44], welcher auf einer basalen Ebene die Effluxpumpe AcrAB-TolC exprimiert, und dessen Mutant *E. coli* AG100 A, welcher kein AcrAB-TolC exprimiert, verwendet. Die Bakterienstämme wurden von Hiroshi Nikaido, Abteilung für Molekulare und Zelluläre Biologie und Chemie, Universität von Kalifornien, Berkeley (Kalifornien, USA), bereitgestellt. Weitere eingesetzte Bakterienstämme sind zum einen *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, welches nicht resistent gegenüber Methicillin ist und von der ATCC (American Type Culture Collection) erhalten wurde, und zum anderen das klinische Isolat *S. aureus* 272123, welche eine Resistenz gegenüber Methicillin und Ofloxacin aufweist, verwendet. Dieser Bakterienstamm wurde von Prof. Dr. Leonard Amaral, Institut für Hygiene und Tropenmedizin, Lissabon (Portugal), bereitgestellt.

7.1.2.1.1 Zellkultivierung und Passagierung

Alle Zelllinien wurden im Inkubator bei 37°C und 5%iger CO₂-Begasung kultiviert und gelagert. Sämtliche Arbeiten mit den Zelllinien wurden unter einer Laminar Air Flow Bank durchgeführt. Die eingesetzten Medien beinhalten Natriumhydrogencarbonat als Puffersystem und den Farbstoffindikator Phenolrot, welcher bei einem neutralen pH-Wert rotviolett und bei einem sauren pH-Wert gelb erscheint. Ein Mediumwechsel wurde bei den adhären wachsenden

Experimenteller Teil

Zelllinien grundsätzlich alle drei Tage bzw. bei einer erfolgten Gelbfärbung des Mediums durchgeführt, damit für die Zellen ein kontinuierliches Angebot an Nährstoffen gegeben ist. Das alte Medium wurde mithilfe einer Pasteurpipette und einer Vakuumpumpe abgesaugt und neues, auf 37°C erwärmtes, Medium wurde hinzugefügt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Pasteurpipette nicht in direkten Kontakt mit dem Kulturflaschenboden und somit den dort wachsenden Zellen kommt. Dies wurde erreicht, indem das Medium an der gegenüberliegenden Seite der Flasche entfernt wurde. Die Menge des hinzugefügten neuen Mediums ist abhängig von der verwendeten Größe der Zellkulturflasche (25 cm² oder 75 cm²) und betrug entsprechend 10 ml bzw. 25 ml. Nach erfolgtem Mediumwechsel wird den Zellkulturen noch 1 % Penicillin/Streptomycin hinzugesetzt.

Ab einer Konfluenz von ungefähr 80 % wurden die adhären als Monolayer wachsenden Zellen passagiert, damit eine gleichmäßige Zelldichte erhalten bleiben kann. Dafür wurde zuerst das alte Medium abgesaugt und 5 ml auf 37°C erwärmtes PBS zum Waschen hinzugefügt. Nach Entfernen des PBS mittels Vakuumpumpe werden der Zellkulturflasche 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung, welche im Wasserbad auf 37°C erwärmt wurde, beigefügt und für zwei Minuten (A2780) bzw. zehn Minuten (A2780cis) im Brutschrank gelagert. Die Trypsin/EDTA-Lösung dient der Dissoziation der adhären Zellen vom Boden der Kulturflasche, indem Trypsin als Serinprotease mithilfe von EDTA die dafür zuständigen Proteine spaltet. Nach Ablauf der angegebenen Zeit werden die Zellkulturflaschen aus dem Inkubationsschrank genommen und mithilfe von leichtem Klopfen werden die von dem Flaschenboden gelösten Zellen in Suspension gebracht. Unter dem Mikroskop wird anschließend untersucht, ob die Zellen vollständig vom Boden gelöst sind. Falls nur eine unvollständige Dissoziation stattgefunden hat wurde die Kulturflasche erneut für weitere zwei Minuten im Brutschrank gelagert. Um die Reaktion des Trypsins nach erfolgreicher Dissoziation zu stoppen wird der Zellkulturflasche unter der Laminar Air Flow Box 7 ml Medium hinzugegeben. Die Zellsuspension wird nach mehrmaligen Durchspülen mithilfe einer Pipette innerhalb der Kulturflasche, um noch die restlichen undissoziierten Zellen in Suspension zu bringen, in ein 15 ml Falcontube überführt. Aus dieser Zellsuspension wird mit dem Medium eine 1:10 Verdünnung hergestellt, welche der Zellzählung mittels CASY CellCounter + Analyzer TT dient. Dafür werden 100 µl der 1:10 Verdünnung in ein CASYcup, welches mit 10 ml CASYton befüllt ist, gegeben und vermessen. Durch die Analyse erhält man die Zellzahl pro ml, womit sich eine neue Passage mit der gewünschten Zellzahl erstellen lässt. Das berechnete Volumen an Zellsuspension, welches für die neue Passage verwendet werden soll, wird nun zum Schluss in eine mit im Wasserbad erwärmten Medium (10 ml bzw. 25 ml, je nach Größe der Zellkulturflasche), 1 % Penicillin/Streptomycin und ggf. mit 1 % Cisplatin gefüllte neue Zellkulturflasche gegeben und im Brutschrank gelagert.

Für die Suspensionszellen entfällt der Schritt des Ablösens vom Kulturflaschenboden; hier wird direkt eine 1:10 Verdünnung hergestellt, mittels Zellzahlbestimmung analysiert und eine neue Passage erstellt. Der Zelllinie L5178Ymdr wird dabei 60 ng/ml Cisplatin zugefügt.

7.1.2.1.2 Auftauen und Kryokonservierung von Zelllinien

Sich nicht in Kultur befindliche Zelllinien werden über den gesamten Zeitraum in einer mit flüssigem Stickstoff gefüllten Kryobank in Kryoröhrchen tiefgefroren gelagert und zur Revitalisierung wieder aufgetaut. Hierfür wird das entsprechende Kryoröhrchen aus der Kryobank entnommen und im Wasserbad bei 37°C für kurze Zeit aufgetaut. Die aufgetaute Zellsuspension wird als Nächstes mittels Pipette in ein 15 ml Falcontube, welches vorher mit 10 ml auf 37°C erwärmten Medium befüllt wurde, überführt und vorsichtig durchmischt. Der Inhalt dieses Falconröhrchens wird nun für fünf Minuten bei 300g und 25°C zentrifugiert. Darauffolgend wird der Überstand mittels Pipette entfernt und das Zellpellet in circa 5 ml Medium resuspendiert. Es folgt eine anschließende Zellzahlbestimmung. Die gewünschte Zellzahl wird als letzter Schritt in eine vorbereitete Kulturflasche, welche das jeweilige Nährmedium und 1 % Penicillin/Streptomycin enthält, gegeben und in einem Inkubator mit einer Temperatur von 37°C und 5 %iger CO₂-Begasung gelagert. Nach einem Tag erfolgte für die adhärent wachsenden Zelllinien ein erster Mediumwechsel wie im Abschnitt „Zellkultivierung und Passagierung“ oben beschrieben. Bei den Suspensionszellen wurde eine Passagierung durchgeführt nach einem Tag. Die Zelllinien wurden für die Testung eingesetzt und verwendet, als die Zellzahl-Verdopplungszeit und somit die Wachstumsrate konstant waren.

Um Zelllinien für die Kryokonservierung einzufrieren werden die Zellen wie im Abschnitt „Zellkultivierung und Passagierung“ beschrieben bis zu dem Punkt der Zellsuspension-Überführung in das 15 ml Falcontube und der Zellzahlbestimmung passagiert. Die Zellsuspension im Falconröhrchen wird im Anschluss bei 400g für fünf Minuten zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstands wird dem Zellpellet das Einfriermedium in einer Menge hinzugefügt, dass sich eine Konzentration von 1.000.000 Zellen pro ml ergibt. Das Einfriermedium besteht aus 70 % Nährmedium, 20 % FCS und 10 % DMSO. Pro Kryoröhrchen wird mithilfe einer Pipette 1.000 µl der Zellsuspension überführt und für mindestens vier Stunden in einem mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter (Abkühlgeschwindigkeit: - 1°C pro Minute), welcher in einem Tiefkühlschrank bei -80°C steht, gelagert. Abschließend werden die Kryoröhrchen bis zur Revitalisierung im Stickstofftank deponiert.

7.1.2.2 *In vitro* Zellversuche zur Identifizierung der inhibitorischen und zytotoxischen Eigenschaften von MDR-Modulatoren

7.1.2.2.1 Durchflusszytometrische Untersuchungen (Fluoreszenz-Uptake-Assay)

7.1.2.2.1.1 *Durchflusszytometrische Untersuchungen zur Bestimmung des P-gp hemmenden Potentials der Testverbindungen*

Zur Bestimmung der P-gp hemmenden Wirkung der 1,4-Dihydropyridine wurden von der Zelllinie L5178Y bzw. L5178Y_{mdr} pro Probe 500.000 Zellen in ein Eppendorf-Gefäß abgefüllt. Die Proben wurden anschließend bei 4°C und 2.000 UpM für zwei Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde entfernt und für den Rest des Versuchs wurden die Proben auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Proben in McCoy's 5A Medium (modifiziert) resuspendiert und mit Testverbindungen bzw. der positiven Vergleichskontrolle Verapamil (Stammlösungskonzentration: 10.000 µM, Endkonzentration: 10 µM, gelöst in DMSO) beladen. Als weitere Proben wurden eine Eigenfluoreszenzkontrolle und eine Farbstoffkontrolle nur mit Medium und eine DMSO-Kontrolle mit DMSO beladen. Die Proben wurden daraufhin für 20 Minuten bei 37°C und 1.200 UpM im Thermomixer inkubiert. In einem zweiten Beladungsschritt wurden, abgesehen von der Eigenfluoreszenzprobe und der DMSO-Kontrolle, die Proben mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 (Endkonzentration: 5 µM, gelöst in PBS) beladen und erneut im Thermomixer für 40 Minuten bei 37°C und 1.200 UpM inkubiert. Danach wurden die Proben zentrifugiert, der Überstand entfernt, gekühltes PBS hinzugefügt und die Proben erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Am Ende wurden die Proben in PBS resuspendiert und mittels MACSQuant Analyzer 10 der Firma Miltenyi Biotec GmbH die Fluoreszenzwerte von 10.000 gezählten Zellen (sog. „Events“), welche sich alle in den Eigenschaften Zellgröße bzw. Granularität gleichen, was durch ein selbst festgelegtes „Gate“ vor Beginn der Messung definiert wurde, durchflusszytometrisch bestimmt. Die Anregungswellenlänge des Argonlasers am Durchflusszytometer beträgt 488 nm, die Emission wurde mithilfe des Filters B1 bei einer Wellenlänge von 525 nm detektiert. Diese Methode wurde für jede zu untersuchende Probe insgesamt dreimal durchgeführt. Die FAR-Werte wurden unter Verwendung der durch die Messung erhaltenen FL-mean Werte mithilfe folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Gleichung Nr.1: } FAR = \frac{F_{L5178Y_{mdr-Mod}}/F_{L5178Y_{mdr}}}{F_{L5178Y-Mod}/F_{L5178Y}}$$

(Mod = modulierende Verbindung)

Die Testung der 9,10-Dihydroacridine auf ihre P-gp modulierende Aktivität wurde ebenfalls mittels durchflusszytometrischer Methodik evaluiert. Der Versuchsablauf entspricht im

Allgemeinen der obengenannten Prozedur für die 1,4-Dihydropyridine. Es soll an dieser Stelle kurz auf die gewählten Unterschiede in der Methodenbeschreibung für die beiden Verbindungsreihen eingegangen werden. Ein erster Unterschied ergibt sich in der Anzahl der verwendeten Zellen, welche pro Probe in ein Eppendorf-Gefäß eingefüllt wurden. Für die 1,4-Dihydropyridine wurden 500.000 Zellen verwendet, für die 9,10-Dihydroacridine wurden 1.000.000 Zellen verwendet. Des Weiteren wurden die 9,10-Dihydroacridine in zwei verschiedenen Konzentrationen vermessen, nämlich 2 µM und 20 µM. Verapamil wurde als Referenz bei einer Konzentration von 20 µM vermessen. Nach der Beladung der Testverbindungen wurde eine Inkubationszeit von 10 Minuten anstelle von 20 Minuten gewählt. Im nächsten Beladungsschritt wurde Rhodamin 123 in einer finalen Konzentration von 5,2 µM eingesetzt und für 20 Minuten inkubiert. Zur Bestimmung der Fluoreszenzwerte von Zellpopulationen wurde das Durchflusszytometer Partec CyFlow (Partec, Münster, Deutschland) verwendet.

Statistik:

Im Rahmen der Auswertung und Interpretation der Daten wurden folgende statistische Kenngrößen eingesetzt:

1. Arithmetisches Mittel:

Jede Verbindung wurde dreimal getestet. Das arithmetische Mittel \bar{x} stellt den Durchschnittswert einer bestimmten Anzahl von n Messungen dar und wird wie folgt berechnet:

$$\text{Gleichung 7: } \bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

2. Standardabweichung (SD):

Die Standardabweichung ist ein Maß für die Streubreite der gemessenen Einzelwerte in einer Stichprobe bezogen auf deren arithmetisches Mittel und wird wie folgt berechnet:

$$\text{Gleichung 8: } SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

7.1.2.2.1.2 *Durchflusszytometrische Untersuchungen zur Bestimmung des MRP-1 bzw. MRP-2 hemmenden Potentials der Testverbindungen*

Die Bestimmung der MRP-1 und MRP-2 hemmenden Wirkung der Testverbindungen wurde nach dem gleichen Prinzip wie bei der Bestimmung der P-gp hemmenden Wirkung durchgeführt. Die Unterschiede ergeben sich durch die Verwendung der MRP-1 und MRP-2 exprimierenden Zelllinien A2780 und A2780cis, des Mediums RPMI-1640, der Positivkontrolle Probenecid

(Endkonzentration: 10 µM, gelöst in DMSO), die Dauer der Inkubationszeiten im Thermomixer (20 Minuten für den ersten Beladungsschritt und 15 Minuten für den zweiten Beladungsschritt) und der Fluoreszenzfarbstoff CFDA (Endkonzentration: 1 µM, gelöst in PBS). Für die Zelllinie A2780 wurden für die Berechnung der FAR-Werte drei Messreihen, für die Zelllinie A2780cis zwei Messreihen berücksichtigt. Die FAR-Werte wurden mithilfe folgender Gleichung berechnet:

Gleichung Nr. 3:
$$FAR = \frac{F_{A2780-Mod}}{F_{A2780}}$$

Gleichung Nr. 4:
$$FAR = \frac{F_{A2780cis-Mod}}{F_{A2780cis}}$$

(Mod = modulierende Verbindung)

7.1.2.2.2 Bestimmung des Potentials der P-gp inhibierenden Testverbindungen zur Resistenzüberwindung

Zur Bestimmung der Überwindung der Resistenz für die P-gp exprimierenden Zellen wurde das P-gp Substrat Doxorubicin, welches in Konzentrationen von 0,01 µM bis 80 µM eingesetzt wurde, die Testverbindungen und die Vergleichskontrolle Verapamil, welche jeweils in einer konstanten Konzentration von 10 µM eingesetzt wurden; und die Zelllinien L5178Y und L5178Ymdr, welche auf 100.000 Zellen/ml eingestellt wurden; verwendet. In eine 96-well Platte wurden pro Well insgesamt 10.000 Zellen gegeben und mit Doxorubicin in den Konzentrationen 0,01 µM; 0,1 µM; 1 µM; 2,5 µM; 5 µM; 10 µM und 80 µM und mit den Testverbindungen bzw. Verapamil beladen. Ebenfalls wurden Kontrollreihen für eine 1 %ige DMSO-Kontrolle und für die Bestimmung der Eigenabsorption der Zellen bzw. des Mediums beladen. Es erfolgt anschließend eine Inkubation für 48 Stunden im Brutschrank bei den bereits genannten Bedingungen. Danach wurde die Platte mit dem Farbstoff MTT (pro Well 10 µl einer 5 mg/ml Stammlösung (gelöst in PBS)) beladen und für weitere vier Stunden im Brutschrank gelagert. Anschließend wurden 100 µl DMSO pro Well zugegeben, für 30 Minuten bei 500 rpm auf den Plattenschüttler geschüttelt und am Ende mit dem Photometer infinite 200Pro die Absorption vermessen (Messwellenlänge: 570 nm, Referenzwellenlänge: 630 nm). Diese Methode wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Zur Ermittlung der IC50-Werte nach einem sigmoiden Kurvenfit wurden die gemessenen Absorptionswerte ins Verhältnis mit der DMSO-Kontrolle (100 % Vitalität) gesetzt. Zuvor wurde der Eigenabsorptionswert des Mediums von den Absorptionswerten der Proben subtrahiert.

7.1.2.2.3 Bestimmung des zytotoxischen und antiproliferativen Effekts der Verbindungen mithilfe des IC₅₀-Werts (MTT-Test)

Die Bestimmung des zytotoxischen Potentials der P-gp inhibierenden Probenverbindungen mit 1,4-Dihydropyridin-Grundgerüst läuft ähnlich wie die Prüfung der Resistenzüberwindung mithilfe eines MTT-Tests ab. Im Unterschied dazu wird die 96-well Platte nicht mit den Zytostatika Doxorubicin beladen und die Testverbindungen bzw. Verapamil werden nicht in einer konstanten Konzentration eingesetzt, sondern in sieben unterschiedlichen finalen Konzentrationen: 0,01 µM; 0,1 µM, 1 µM; 2,5 µM; 5 µM; 10 µM und 100 µM.

Es wurden die zytotoxischen und antiproliferativen Eigenschaften der 9,10-Dihydroacridine untersucht. Im Unterschied zu der Testung der 1,4-Dihydropyridinen wurde beim Zytotoxizitätsassay ein Inkubationszeitraum von 24 Stunden gewählt. Bei der Testung des antiproliferativen Effekts wurden pro Well 6.000 Zellen verwendet (Zytotoxizitätsassay: 10.000 Zellen) und ein Inkubationszeitraum von 72 Stunden gewählt. Danach erfolgte die Zugabe einer MTT-Lösung (20 µl einer 5 mg/ml Stammlösung). Zur Zelllyse wurde jedem Well 100 µl Sodiumdodecylsulfat-Lösung (SDS; 10 % in 0,01 M HCl) hinzugefügt und über Nacht bei 37°C gelagert. Das Zellwachstum bzw. dessen Inhibition wurde durch Messung der optischen Dichte (optical density, OD) bei 540/630 nm mit einem Multiscan EX ELISA Reader (Thermo Labsystems, Cheshire, WA, USA) bestimmt.

7.1.2.3 Identifizierung der antibakteriellen Eigenschaften der zu untersuchenden Verbindungen

7.1.2.3.1 Bestimmung der minimalen Hemm-Konzentration (MIC)

Die Bestimmung der MIC der synthetisierten Effluxpumpen-Inhibitoren wurde nach den Richtlinien der CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) durchgeführt²⁵⁷. Die zugrundeliegende Methode nennt sich „Broth Microdilution“. Bei der „Broth Microdilution“ werden kleine Mengen (100 µl) des Müller-Hinton-Bouillon (auch: Müller-Hinton-Broth), welches ein zur Kultivierung von Mikroorganismen genutztes Medium ist, in einer 96-well Platte verteilt. Verwendet wurden die Bakterienstämme *E. coli* AG100, *E. coli* AG100 A, *S. aureus* ATCC 25923 und *S. aureus* MRSA 272123. Die Kulturen erhält man durch Inkubation der Bakterienstämme in die Bouillon für 24 Stunden bei 37°C. Der eigentliche Test erfolgte in Müller-Hinton-Bouillon bei pH 7,4. Jedes Well wurde mit 100 µl der entsprechenden Testverbindungen versetzt. Eine Startkonzentration von 100 µM wurde für die Verbindungen eingesetzt. Hergestellt wurde diese aus einer 10.000 µM Stammlösung in DMSO. Eine zweifache Verdünnungsreihe wurde mithilfe

von Müller-Hinton-Bouillon generiert. Zur Kontrolle des Wachstums wurde ein Well nur mit inokulierter Bouillon gefüllt. Die endgültige Inokulumgröße betrug 500.000 KBE/ml. Im Anschluss an die Inokulation wurde die 96-well Platte für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Das letzte Well, welches kein Wachstum von Mikroorganismen aufwies, wurde durch visuelle Inspektion für die Repräsentation des MIC-Werts bestimmt und festgehalten. Die MIC wurde in µM angegeben.

7.1.2.3.2 Bestimmung des relativen Fluoreszenzindex (RFI)

Um die modulierende Aktivität der Verbindungen zu bestimmen wurde die sog. automatisierte Ethidiumbromid (EB) Methode unter Verwendung eines „LightCycler real-time thermocycler“ (LightCycler 1.5, Roche, Indianapolis, IN, USA) eingesetzt. Diese Methode detektiert in Echtzeit die Akkumulation von EB in die Bakterienzellen, wodurch sich der relative Fluoreszenzindex (RFI) mit folgender Gleichung ermitteln lässt:

$$\text{Gleichung Nr. 6: } RFI = \frac{RF_{\text{treated}} - RF_{\text{untreated}}}{RF_{\text{untreated}}}$$

RF_{treated} ist die relative Fluoreszenz zum letzten Zeitpunkt (Minute 30) der EB Retentionskurve in Anwesenheit des Inhibitors. $RF_{\text{untreated}}$ ist die relative Fluoreszenz zum letzten Zeitpunkt der EB Retentionskurve der Lösungsmittelkontrolle (DMSO), also in Abwesenheit des Inhibitors. Verwendet wurden die Bakterienstämme *E. coli* AG100 und *E. coli* AG100 A.

Zur Durchführung wurde ein Teil einer Kultur des Bakterienstamms, welche über Nacht in LB-Medium (LB: lysogeny broth) inkubiert wurde, in frisches LB-Medium überführt und inkubiert, bis eine optische Dichte (OD) von 0,6 bei 600 nm erreicht wurde. Im Anschluss folgt ein Waschschrift mit PBS (pH 7,4) und ein Zentrifugationsschritt bei 13.000g für drei Minuten. Die dadurch entstandenen Pellets werden in PBS (pH 7,4) resuspendiert und die OD wurde erneut auf 0,6 bei 600 nm eingestellt. In der Zwischenzeit werden 1 µl einer 1.000 µM Lösung der synthetisierten 9,10-Dihydroacridine zu 49 µl einer EB-Lösung (2 mg/l in PBS) hinzugefügt. Daraufhin werden 10 µl dieser neuentstandenen Lösung in ein Glaskapillaren-Gefäß (maximales Volumen: 20 µl; Roche, Indianapolis, IN, USA) überführt. In dieses Gefäß wird nun 10 µl der Bakterien enthaltenden Suspension hinzugefügt. Final werden die Proben in das Karussell des LightCyclers platziert und die Fluoreszenz wurde alle 60 Sekunden in Echtzeit unter Einsatz des FL-2 Kanals aufgezeichnet.

7.1.2.3.3 Potenzierende Wirkung der zu untersuchenden Verbindungen in Kombination mit anderen Antibiotika

Zur Bestimmung der sensibilisierenden Eigenschaften der synthetisierten 9,10-Dihydroacridine wurden die MIC-Werte von Antibiotika in Anwesenheit der untersuchten Verbindungen in einer Konzentration von 10 µM bestimmt. Verwendet wurden die gramnegativen Bakterienstämme *E. coli* AG100 und *E. coli* AG100 A sowie die grampositiven Bakterienstämme *S. aureus* ATCC 25923 und *S. aureus* MRSA 272123. Als Antibiotika wurden Tetracyclin, welches zu der Gruppe der Tetracycline gehört, und Ciprofloxacin, welches zu der Gruppe der Fluorchinolone gehört, genutzt. Zur Determination der MIC-Werte wurde die bereits im Abschnitt „Bestimmung der minimalen Hemm-Konzentration (MIC)“ beschriebene Methode „Broth Microdilution“ angewendet. Es wurde eine zweifache Verdünnungsreihe der Antibiotika hergestellt. Die Wells wurden zum einen mit Antibiotika und zum anderen mit Antibiotika und zu untersuchenden Testverbindungen gefüllt. Jedem Well wurde daraufhin 50 µl einer Bakterienkultur, welche über Nacht in Müller-Hinton-Bouillon inkubiert wurde, hinzugefügt (Ausnahme: Well, welches der Kontrolle des Mediums dient). Die 96-well Platte wird schließlich bei 37°C für 18 Stunden inkubiert. Die MIC-Werte der Antibiotika und die MIC-Werte der kombinierten Anwendung von Antibiotika und Testverbindungen wurden mittels visueller Inspektion bestimmt.

7.1.3 Materialien

7.1.3.1 Lösungsmittel und Reagenzien

Folgende Lösungsmittel, Reagenzien und Materialien, welche für die Synthesen verwendet wurden, wurden entweder aus dem Chemikalienbestand des Instituts für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bezogen oder kommerziell erworben:

Aceton

Acridin (Alfa Aesar)

Ammoniak, konz. (Grüssing)

Ammoniumchlorid (Grüssing)

Benzylbromid (Sigma-Aldrich Chemistry)

Calciumchlorid

Chloroform

Cyclohexan (Carl Roth GmbH & Co. KG)

Diethylether

Experimenteller Teil

3,4-Dimethoxyphenylmagnesiumbromid (Sigma-Aldrich Chemistry)

Essigsäureethylester

Ethanol

Kieselgel 60 (0,063 – 0,2 mm) (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG)

Kieselgel 60 F₂₅₄-Aluminiumfolien

Kupfer-I-iodid

Lithiumchlorid

Methanol

3-Methoxybenzylchlorid (Sigma-Aldrich Chemistry)

4-Methoxybenzylchlorid (Acros Organics)

3-Methoxyphenylmagnesiumbromid (Sigma-Aldrich Chemistry)

4-Methoxyphenylmagnesiumbromid (Acros Organics)

3-Methylbenzylbromid (Sigma-Aldrich Chemistry)

4-Methylbenzylchlorid (Sigma-Aldrich Chemistry)

Natriumchlorid (Grüssing)

Natriumsulfat, wasserfrei

Nicotinsäureethylester (Acros Organics)

Phenylmagnesiumchlorid (Sigma-Aldrich Chemistry)

Phosphorpentoxid

Salzsäure 36% (Grüssing)

Seesand (Grüssing)

Tetrahydrofuran, wasserfrei (≥ 99,9 %) (Sigma-Aldrich Chemistry)

Toluol (Grüssing, ORG Laborchemie)

m-Tolylmagnesiumchlorid (Sigma-Aldrich Chemistry)

p-Tolylmagnesiumbromid (Sigma-Aldrich Chemistry)

Folgende Lösungsmittel und Reagenzien, welche für die biologische Evaluation verwendet wurden, wurden entweder aus dem Chemikalienbestand des Instituts für Pharmazie der Universität Greifswald bezogen oder kommerziell erworben:

5(6)-Carboxyfluorescein-diacetat, ultra pure (Enzo Life Sciences Inc.)

Cisplatin (bzw. cis-Diammineplatinum(II)dichloride, kristallin) (Sigma-Aldrich Chemistry)

Colchicin (97 %) (Acros Organics)

DMSO (Dimethylsulfoxid, > 99,5 %) (Carl Roth GmbH & Co. KG)

Doxorubicin Hydrochlorid (Cayman Chemicals)

Experimenteller Teil

DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, modified, without calcium chloride and magnesium chloride, liquid, sterile-filtered, D8537) (Sigma-Aldrich Chemistry)

Ethanol

MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) (Sigma-Aldrich Chemistry)

Natriumhydroxid

Probenecid (Tocris Bioscience)

Rhodamin 123 (Sigma-Aldrich Chemistry)

Trypsin-EDTA Solution (sterile filtered, 0,5 g porcine trypsin and 0,2 g EDTA 4Na/L Hanks' Balanced Salt Solution with phenol red) (Sigma-Aldrich Chemistry)

Verapamil-HCl (Focus Biomolecules)

7.1.3.2 Zelllinien, Zellkulturmedien und Zusätze

A2780 (Campus Virchow-Klinikum, AG Experimentelle Pathologie, Prof. Dr. Dr. Hermann Lage, Charité – Universitätsmedizin Berlin)

A2780cis (Campus Virchow-Klinikum, AG Experimentelle Pathologie, Prof. Dr. Dr. Hermann Lage, Charité – Universitätsmedizin Berlin)

L5178Y (Institut für Pharmazie, Abteilung Wirkstoffentwicklung und –analytik, Prof. Dr. Hilgeroth, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)

L5178Ymdr (Institut für Pharmazie, Abteilung Wirkstoffentwicklung und –analytik, Prof. Dr. Hilgeroth, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)

FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco by life Technologies)

Penicillin-Streptomycin (10.000 Units Penicillin and 10 mg Streptomycin/ml) (Sigma-Aldrich Chemistry)

RPMI-1640 Medium (with L-glutamine and sodium bicarbonate, liquid, sterile-filtered, with phenol red) (Sigma-Aldrich Chemistry)

McCoy's 5A Medium (modified, with L-glutamine, sterile-filtered, with phenol red) (BioWhittaker)

7.1.3.3 Bakterienstämme

Wild-Typ *E. coli* K-12 AG100 [argE3 thi-1 rpsL xyl mtl Δ (gal-uvrB) supE44 (Hiroshi Nikaido, Department of Molecular and Cell Biology and Chemistry, University of California, Berkeley, CA, USA)

E. coli AG100 A (Hiroshi Nikaido, Department of Molecular and Cell Biology and Chemistry, University of California, Berkeley, CA, USA)

Staphylococcus aureus ATCC 25923 (Prof. Dr. Leonard Amaral, Institute of Hygiene and Tropical Medicine, Lisbon, Portugal)

Staphylococcus aureus MRSA 272123 (Prof. Dr. Leonard Amaral, Institute of Hygiene and Tropical Medicine, Lisbon, Portugal)

7.1.3.4 Geräte

Folgende Geräte wurden für die Synthesen und die Analysen am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg verwendet:

Boetius PHMK 05-Heiztischmikroskop (Firma: VEB Wägetechnik Rapido Radebeul)

400 MHz VNMRS (Firma: Agilent Technologies)

500 MHz DD2 (Firma: Agilent Technologies)

Finnigan LCQ Classic (Firma: Thermo Electron Corporation)

FT-IR Spektrometer IFS 28 (Firma: Bruker Optik, Ettlingen)

Analytische HPLC LC-10AD, SIL-HAT auto sampler (Firma: Shimadzu)

UV-Lampe

Tiefkühlschrank

Folgende Geräte und Materialien wurden für die biologische Evaluation am Institut für Pharmazie der Universität Greifswald verwendet:

Axio-Cam Erc5s (Firma: Carl Zeiss AG)

BioChem – VacuuCenter BVC basic (Firma: Vacuubrand GmbH + Co. KG)

BioChem – VacuuCenter BVC control (Firma: Vacuubrand GmbH + Co. KG)

CASY CellCounter + Analyzer TT (Firma: OLS Omni Life Science GmbH & Co. KG)

CASY cup (Firma: OLS Omni Life Science GmbH & Co. KG)

CASY rack (Firma: OLS Omni Life Science GmbH & Co. KG)

CASY ton (Firma: OLS Omni Life Science GmbH & Co. KG)

Experimenteller Teil

Ceramus Dispenser (Firma: Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG)
Eppendorf Research plus, 8-Kanal, 10 – 100 µl (Firma: Eppendorf AG)
Eppendorf Research plus Pipette 0,5 – 10 µl (Firma: Eppendorf AG)
Eppendorf Research plus Pipette 10 – 100 µl (Firma: Eppendorf AG)
Eppendorf Research plus Pipette 100 – 1000 µl (Firma: Eppendorf AG)
Falcontubes 15 ml bzw. 50 ml (Firma: Sarstedt AG & Co. KG)
Heraeus Multifuge X1R (Firma: Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG)
Inkubator CB 160 (Firma: Binder GmbH)
Kryoröhrchen 1,5 ml (Firma: Bioswisstec AG)
Laminar Flow Box Herasafe KS (Firma: Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG)
MACSQuant Analyzer 10 (Firma: Miltenyi Biotec GmbH)
MACSQuant Running Buffer (Firma: Miltenyi Biotec GmbH)
Mikroskop Primovert (Firma: Carl Zeiss AG)
Mikrotiterplatten-Schüttler TiMix 5 (Firma: Edmund Bühler GmbH)
Nalgene Mr. Frosty (Firma: Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG)
Pasteurpipetten (Firma: Paul Marienfeld GmbH & Co. KG)
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl (Firma: Sarstedt AG & Co. KG)
PIPETBOY pro (Firma: INTEGRA Biosciences GmbH)
Reagenzreservoir Trifill Mehrkanal (Firma: Carl Roth GmbH & Co. KG)
Reagiergefäß 0,5 ml, 1,5 ml (Firma: Sarstedt AG & Co. KG)
Reax top (Firma: Heidolph Instruments GmbH & Co. KG)
Rotizell Tissue-Tücher (Firma: Carl Roth GmbH & Co. KG)
Serologische Pipette 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml (Firma: Sarstedt AG & Co. KG)
TC-Flasche T-25 bzw. T-75 mit Belüftungskappe (Firma: Sarstedt AG & Co. KG)
TC-Platte 96 Well Standard F (Firma: Sarstedt AG & Co. KG)
Tecan infinite M200 pro (Firma: Tecan Group Ltd.)
Thermomixer comfort (Firma: Eppendorf AG)
TW 20 Wasserbad (Firma: Julabo GmbH)
Ultramikrowaage Cubis MSA mit Windschutz DI (Firma: Sartorius AG)
Vortex Genie 2 (Firma: Scientific Industries, Inc.)

7.1.3.5 Software

ChemDraw Ultra 13.0 (CambridgeSoft Corporation)

Citavi 6.4.0.35 (Swiss Academic Software)

GraphPad Prism 5.02 (Graphpad Software, Inc.)

MACSQuantify 2.6 (Miltenyi Biotec GmbH)

MestReNova 8.0.0-10524 und 14.2.2-28739 (Mestrelab Research S.L.)

Microsoft Office (Microsoft Corporation)

TECAN i-control 3.7.3.0 (Tecan Group Ltd.)

ZEN 2012 (blue edition) 1.1.1.0 (Carl Zeiss)

7.2 Synthese der Verbindungen

7.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1: N-Alkylierung von Nikotinsäureethylester

1,0 eq. Nikotinsäureethylester werden in einem Rundkolben geeigneter Größe im Silikonölbad unter Rückflusskühlung bei 80-90 °C erhitzt. Danach werden circa 1,5 eq. des entsprechenden Benzylhalogenids tropfenweise unter Rühren hinzugefügt. Der Reaktionsverlauf wird mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion wird der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt, in einem Methanol/Wasser-Gemisch im Volumenverhältnis 1:1 gelöst und dreimal mit Chloroform in einem Scheidetrichter extrahiert. Die Methanol/Wasser-Phase wird durch mehrmaligen Zusatz von Toluol unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer einrotiert. Unter Kühlung und Zugabe eines Lösungsmittels erfolgte bei manchen Nikotinsäureethylester-Derivaten die Auskristallisation zu einem weißen bis blassgelb gefärbten Feststoff. Abschließend wurde das Produkt über Phosphorpentoxid getrocknet.

AAV 2: Arylation des N-Benzylpyridiniums

1,0 eq. N-Benzylpyridiniums wird in einem Rundkolben geeigneter Größe in trockenem Tetrahydrofuran (5 – 10 ml) bei Raumtemperatur und unter Argonatmosphäre suspendiert. Nach der Zugabe von 0,1 eq. Kupfer(I)-iodid und 0,2 eq. trockenem Lithiumchlorid wird unter Rühren die jeweils angegebene Menge Grignardreagenz (gelöst in Tetrahydrofuran) solange tropfenweise hinzugefügt, bis es zu einem Farbwechsel von rot zu gelb-orange kommt. Der Reaktionsverlauf wird mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion wird eine 20%ige Ammoniumchlorid-Lösung hinzugefügt und dreimal mit Chloroform in einem Scheidetrichter extrahiert. Die vereinigten Chloroform-Phasen werden nacheinander mit einem Gemisch aus einer 20%igen Ammoniumchlorid-Lösung und einer konzentrierten Ammoniak-Lösung (1:1), einer 10%igen HCl-Lösung und einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Anschließend wird die Chloroform-Phase über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und die organische Phase unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer einrotiert. Das erhaltene ölige Produkt wird daraufhin auf Kieselgel gezogen und mit dem jeweils angegebenen Lösungsmittelgemisch säulenchromatographisch aufgearbeitet. Das erhaltene gelbgefärbte, ölige Endprodukt wird vor Licht und Sauerstoff geschützt im Tiefkühlschrank gelagert.

Experimenteller Teil

AAV3: N-Alkylierung von Acridin

1,0 eq. Acridin werden in einem Rundkolben geeigneter Größe im Silikonölbad unter Rückflusskühlung bei 105-115 °C geschmolzen. Danach werden 1,0 bzw. 1,5 eq. des entsprechenden (substituierten) Benzylhalogenids tropfenweise unter Rühren hinzugefügt. Der Reaktionsverlauf wird mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion wird der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt, Diethylether hinzugefügt und 1 h gerührt. Danach wird das Produkt mittels Büchnertrichter gefiltert und mit Diethylether gewaschen. Abschließend erfolgt eine Umkristallisation mit einem Methanol/Diethylether-Gemisch im Volumenverhältnis 1:1 und eine Trocknung über Phosphorpentoxid.

AAV4: 9-Arylation des N-Benzylacridiniums

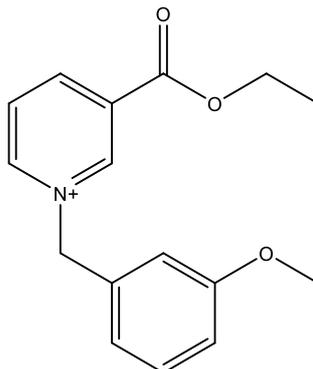
1,0 eq. N-Benzylacridiniums wird in einem Rundkolben geeigneter Größe in trockenem Tetrahydrofuran (5 – 10 ml) bei Raumtemperatur und unter Argonatmosphäre suspendiert. Nach der Zugabe von 0,1 eq. Kupfer(I)-iodid und 0,2 eq. trockenem Lithiumchlorid wird unter Rühren die jeweils angegebene Menge Grignardreagenz (gelöst in Tetrahydrofuran) solange tropfenweise hinzugefügt, bis es zu einem Farbwechsel von grün zu gelb-orange kommt. Der Reaktionsverlauf wird mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion wird eine 20%ige Ammoniumchlorid-Lösung hinzugefügt und dreimal mit Chloroform in einem Scheidetrichter extrahiert. Die vereinigten Chloroform-Phasen werden nacheinander mit einem Gemisch aus einer 20%igen Ammoniumchlorid-Lösung und einer konzentrierten Ammoniak-Lösung (1:1), einer 10%igen HCl-Lösung und einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Anschließend wird die Chloroform-Phase über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und die organische Phase unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer einrotiert. Das erhaltene ölige Produkt wird daraufhin auf Kieselgel gezogen und mit dem jeweils angegebenen Lösungsmittelgemisch säulenchromatographisch aufgearbeitet. Unter Kühlung und Zugabe eines Lösungsmittels bzw. eines Lösungsmittelgemisches erfolgt die Auskristallisation zu einem weißen Feststoff. Das erhaltene Endprodukt wird vor Licht und Sauerstoff geschützt im Tiefkühlschrank gelagert.

7.2.2 Beschreibung der Verbindungen

7.2.2.1 Synthese der 3-substituierten 1,4-Dihydropyridine

7.2.2.1.1 Synthese der Vorstufen

P01 = (3-Ethoxycarbonyl)-1-(3-methoxybenzyl)pyridinium



Darstellung:

2,06 g Nikotinsäureethylester (13,63 mmol; 1 eq.) wird mit 2,7 ml 3-Methoxybenzylchlorid (18,65 mmol; 1,37 eq.) nach AAV 1 bei 85 °C für 6 h erhitzt. Nach der darauf folgenden Extraktion wird Verbindung **P01** mit Aceton im Tiefkühlschrank auskristallisiert und über Phosphorpentoxid gelagert.

Ausbeute:

3,0161 g (11,08 mmol; η = 81 %)

Summenformel: C₁₆H₁₈NO₃⁺

Aussehen: weißes bis blassgelbes Pulver

Rf-Wert: 0,4 (Dichlormethan/Ethanol 50:50 (V/V))

Molare Masse: 272,32 g/mol

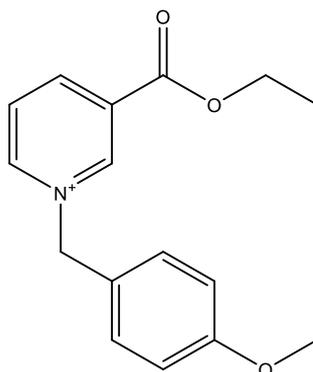
MS (ESI-positiv, m/z): 273,12 [M+H]⁺

Schmelzbereich: 75°C

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 9.61 (s, 1H, 2-H), 9.19 (dt, J = 6.2, 1.4 Hz, 1H, 6-H), 9.07 (dt, J = 8.1, 1.5 Hz, 1H, 4-H), 8.23 (dd, J = 8.2, 6.1 Hz, 1H, 5-H), 7.40 (t, J = 8.0 Hz, 1H, 5'-H), 7.13 – 7.02 (m, 3H, 2'-H, 4'-H, 6'-H), 5.89 (s, 2H, CH₂), 4.51 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH₂CH₃), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 1.44 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₂CH₃)

IR (ATR): ν (cm⁻¹) = 3006 (m, ν C-H arom.); 2938 (m, ν C-H aliph.); 2838 (m, ν C-H aliph.); 1730 (s, ν C=O); 1634 (w, ν C=N); 1600 (m, ν C=C), 1393 (w, δ CH₂)

P02 = (3-Ethoxycarbonyl)-1-(4-methoxybenzyl)pyridinium



Darstellung:

0,93 g Nikotinsäureethylester (6,15 mmol; 1 eq.) wird mit 1,3 ml 4-Methoxybenzylchlorid (9,62 mmol; 1,56 eq.) nach AAV 1 bei 90 °C für 6 h erhitzt. Nach der darauf folgenden Extraktion wird Verbindung **P02** über Phosphorpentoxid gelagert.

Ausbeute:

1,01 g (3,70 mmol; $\eta = 60\%$)

Summenformel: $C_{16}H_{18}NO_3^+$

Aussehen: zähviskose farblose Flüssigkeit

Rf-Wert: 0,4 (Dichlormethan/Ethanol 50:50 (V/V))

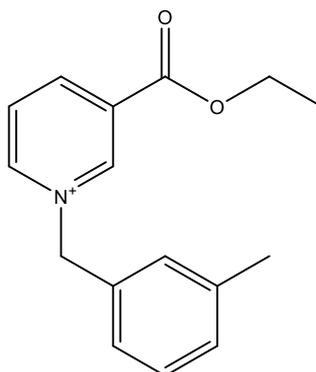
Molare Masse: 272,32 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 273,05 [M+H]⁺

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 9.56 (s, 1H, 2-H), 9.15 (dt, $J = 6.2, 1.4$ Hz, 1H, 6-H), 9.05 (dt, $J = 8.1, 1.5$ Hz, 1H, 4-H), 8.25 – 8.17 (m, 1H, 5-H), 7.49 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.03 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, 3'-H, 5'-H), 5.85 (s, 2H, CH₂), 4.51 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH₂CH₃), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 1.44 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₂CH₃)

IR (ATR): ν (cm⁻¹) = 3007 (m, ν C-H arom.); 2936 (m, ν C-H aliph.); 2838 (m, ν C-H aliph.); 1730 (s, ν C=O); 1633 (w, ν C=N); 1609 (m, ν C=C), 1394 (w, δ CH₂)

P03 = (3-Ethoxycarbonyl)-1-(3-methylbenzyl)pyridinium



Darstellung:

0,99 g Nikotinsäureethylester (6,55 mmol; 1 eq.) wird mit 1,4 ml 3-Methylbenzylchlorid (10,42 mmol; 1,59 eq.) nach AAV 1 bei 85 °C für 6 h erhitzt. Nach der darauf folgenden Extraktion wird Verbindung **P03** mit Aceton im Tiefkühlschrank auskristallisiert und über Phosphorpentoxid gelagert.

Ausbeute:

631,8 mg (2,46 mmol; $\eta = 38\%$)

Summenformel: $C_{16}H_{18}NO_2^+$

Aussehen: weißes Pulver

Rf-Wert: 0,27 (Dichlormethan/Ethanol 50/50 (V/V))

Molare Masse: 256,32 g/mol

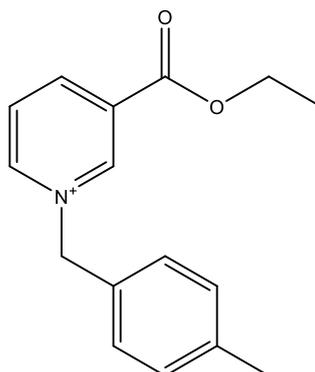
MS (ESI-positiv, m/z): 257,34 [M+H]⁺

Schmelzbereich: 169 – 171 °C

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Aceton-d₆] = 10.48 (dt, $J = 6.2, 1.3$ Hz, 1H, 6-H), 10.11 (s, 1H, 2-H), 9.06 (dt, $J = 8.1, 1.5$ Hz, 1H, 4-H), 8.42 – 8.33 (m, 1H, 5-H), 7.86 – 7.75 (m, 2H, 2'-H, 4'-H), 7.29 – 7.14 (m, 2H, 5'-H, 6'-H), 6.55 (s, 2H, CH₂), 4.47 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH₂CH₃), 2.32 (s, 3H, CH₃), 1.41 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₂CH₃)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 2985 w, 2938 w (aliphatic C-H, ν); 1729 s (C=O, ν); 1635 w (C=N, ν); 1590 w (aromatic C=C, ν); 1447 w, 1370 w (C-H, δ); 1295 m (C-N, ν)

P04 = (3-Ethoxycarbonyl)-1-(4-methylbenzyl)pyridinium



Darstellung:

1,0 g Nikotinsäureethylester (6,62 mmol; 1 eq.) wird mit 1,5 ml 4-Methylbenzylbromid (8,66 mmol; 1,31 eq.) nach AAV 1 bei 90 °C für 6 h erhitzt. Nach der darauf folgenden Extraktion wird Verbindung **P04** über Phosphorpentoxid gelagert.

Ausbeute:

1,12 g (4,37 mmol; $\eta = 66\%$)

Summenformel: C₁₆H₁₈NO₂⁺

Aussehen: zähviskose farblose Flüssigkeit

Rf-Wert: 0,27 (Dichlormethan/Ethanol 50/50 (V/V))

Molare Masse: 256,32 g/mol

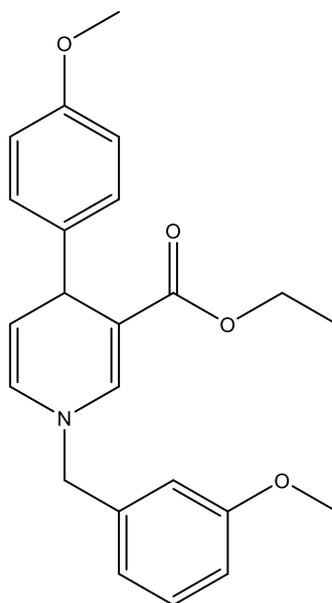
MS (ESI-positiv, m/z): 257,09 [M+H]⁺

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Aceton-d₆] = 10.03 (dt, $J = 6.3, 1.3$ Hz, 1H, 6-H), 9.96 (s, 1H, 2-H), 9.11 (dt, $J = 8.3, 1.6$ Hz, 1H, 4-H), 8.42 (dd, $J = 8.2, 6.2$ Hz, 1H, 5-H), 7.65 (d, $J = 13.4$ Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.37 – 7.23 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 6.42 (s, 2H, CH₂), 4.48 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH₂CH₃), 2.33 (d, $J = 0.9$ Hz, 3H, CH₃), 1.41 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₂CH₃)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 3027 w (arom. C-H, ν); 1728 s (C=O, ν); 1634 m (C=N, ν); 1591 w (arom. C=C, ν); 1446 w, 1370 w (C-H, δ); 1296 m (C-N, ν)

7.2.2.1.2 Synthese der 1,4-Dihydropyridine

DHP01 = Ethyl-1-(3-methoxybenzyl)-4-(4-methoxyphenyl)-1,4-dihydropyridin-3-carboxylat



Darstellung:

221,5 mg von Verbindung **P01** (0,81 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 2 mit 20,2 mg Kupfer(I)-iodid (0,11 mmol; 0,13 eq.), 8,9 mg Lithiumchlorid (0,21 mmol; 0,26 eq.) und 1,45 ml 4-Methoxyphenylmagnesiumbromid (1,0 M in THF; 6,60 mmol; 8,1 eq.) versetzt und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Essigsäureethylester 80/20 (V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

137,4 mg (0,36 mmol; $\eta = 45\%$)

Summenformel: C₂₃H₂₅NO₄

Aussehen: zähviskose gelbe Flüssigkeit

Rf-Wert: 0,22 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 80:20 (V/V))

Molare Masse: 379,46 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 402,47 [M+Na]⁺

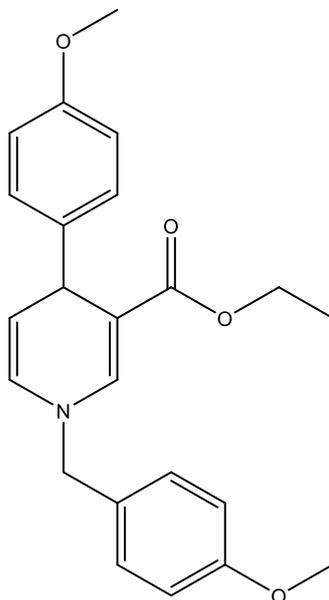
HPLC 1: 92% (Retentionszeit: 14,43 min)

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.28 – 7.23 (m, 1H, 5'-H), 7.15 – 7.09 (m, 2H, 2''-H, 6''-H), 6.86 (s, 1H, 2-H), 6.84 – 6.66 (m, 5H, 2'-H, 4'-H, 6'-H, 3''-H, 5''-H), 6.01 (ddd, $J = 7.8, 1.6, 0.8$ Hz, 1H, 6-H), 4.89 (dd, $J = 7.8, 4.9$ Hz, 1H, 5-H), 4.47 (s, 2H, CH₂), 4.38 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, 4-H), 4.00 (qd, $J = 7.1, 5.2$ Hz, 2H, CH₂CH₃), 3.80 (s, 3H, OCH₃ von Phenyl), 3.74 (s, 3H, OCH₃ von Benzyl), 1.13 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₂CH₃)

Experimenteller Teil

IR: ν (cm⁻¹) = 2926 (m, ν C-H aliph.); 2833 (m, ν C-H aliph.); 1680 (m, ν C=O); 1584 (s, ν C=C); 1391 (w, δ CH₂)

DHP02 = Ethyl-1-(4-methoxybenzyl)-4-(4-methoxyphenyl)-1,4-dihydropyridin-3-carboxylat



Darstellung:

226,1 mg von Verbindung **P02** (0,83 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 2 mit 19,7 mg Kupfer(I)-iodid (0,1 mmol; 0,12 eq.), 9,8 mg Lithiumchlorid (0,23 mmol; 0,28 eq.) und 1,45 ml 4-Methoxyphenylmagnesiumbromid (1,0 M in THF; 6,60 mmol; 8,0 eq.) versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Essigsäureethylester 80/20 (V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

89,6 mg (0,24 mmol, η = 29 %)

Summenformel: C₂₃H₂₅NO₄

Aussehen: zähviskose gelbe Flüssigkeit

Rf-Wert: 0,22 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 80:20 (V/V))

Molare Masse: 379,46 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 402,58 [M+Na]⁺

HPLC 1: 80% (Retentionszeit: 14,26 min)

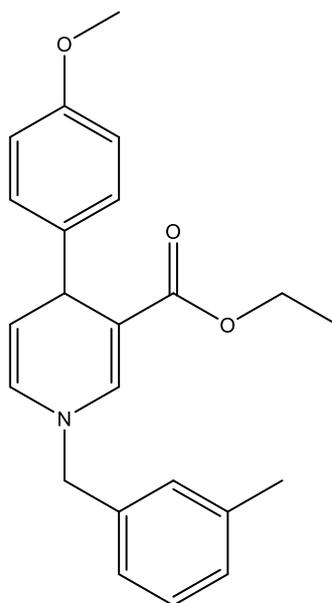
¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.24 (dd, J = 8.8, 2.9 Hz, 2H, 2''-H, 6''-H), 7.08 (d, J = 8.6 Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 6.93 (s, 1H, 2-H), 6.73 (d, J = 2.7 Hz, 4H, 3'-H, 5'-H, 3''-H, 5''-H), 6.00 (ddd, J = 7.9, 1.6, 0.8 Hz, 1H, 6-H), 4.87 (dd, J = 7.8, 4.9 Hz, 1H, 5-H), 4.42 (s, 2H, CH₂), 4.36 (d, J = 4.9 Hz,

Experimenteller Teil

1H, 4-H), 3.99 (qd, $J = 7.1, 4.7$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 3.80 (s, 3H, OCH_3 von Phenyl), 3.74 (s, 3H, OCH_3 von Benzyl), 1.13 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_2CH_3)

IR: ν (cm^{-1}) = 2929 (w, ν C-H aliph.); 2833 (w, ν C-H aliph.); 1686 (w, ν C=O); 1583 (w, ν C=C), 1391 (w, δ CH_2)

DHP03 = Ethyl-4-(4-methoxyphenyl)-1-(3-methylbenzyl)-1,4-dihydropyridin-3-carboxylat



Darstellung:

626,4 mg von Verbindung **P03** (2,44 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 2 mit 50,0 mg Kupfer(I)-iodid (0,26 mmol; 0,11 eq.), 27,0 mg Lithiumchlorid (0,64 mmol; 0,26 eq.) und 3,7 ml 4-Methoxyphenylmagnesiumbromid (1,0 M in THF; 16,83 mmol; 6,9 eq.) versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Essigsäureethylester 80/20 (V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

105,6 mg (0,2905 mmol; $\eta = 12$ %)

Summenformel: $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{NO}_3$

Aussehen: zähviskose gelbe Flüssigkeit

Rf-Wert: 0,34 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 80:20 (V/V))

Molare Masse: 363,46 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 386,81 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

HPLC 1: 96% (Retentionszeit: 14,42 min)

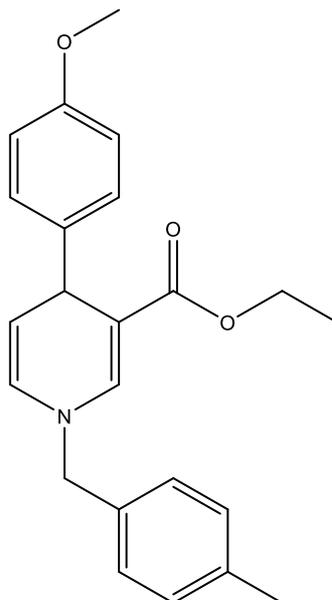
$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm, 400 MHz, Methanol- d_4] = 7.29 – 7.27 (m, 1H, 5'-H), 7.17 (ddd, $J = 8.7, 6.4, 3.1$ Hz, 5H, 2'-H, 4'-H, 6'-H, 2''-H, 6''-H), 7.08 – 7.04 (m, 1H, 2-H), 6.99 – 6.90 (m, 2H, 3''-H, 5''-H), 6.07

Experimenteller Teil

– 6.03 (m, 1H, 6-H), 4.93 (dd, $J = 7.8, 4.9$ Hz, 1H, 5-H), 4.51 (s, 2H, CH₂), 4.42 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, 4-H), 4.04 (qd, $J = 7.1, 5.0$ Hz, 2H, CH₂CH₃), 3.79 (s, 3H, OCH₃ von Phenyl), 2.40 (s, 3H, CH₃ von Benzyl), 1.18 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₂CH₃)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 2926 w (aliphatic C-H, ν); 2850 w (OCH₃, ν); 1680 m (Aryl-CO-R, ν); 1589 m (aromatic C=C, ν); 1443 w, 1367 w (C-H, δ); 1251 m (C-N, ν)

DHP04 = Ethyl-4-(4-methoxyphenyl)-1-(4-methylbenzyl)-1,4-dihydropyridin-3-carboxylat



Darstellung:

240,4 mg von Verbindung **P04** (1,45 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 2 mit 34,6 mg Kupfer(I)-iodid (0,18 mmol; 0,13 eq.), 12,9 mg Lithiumchlorid (0,30 mmol; 0,21 eq.) und 2,2 ml 4-Methoxyphenylmagnesiumbromid (1,0 M in THF; 10,00 mmol; 6,9 eq.) versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Essigsäureethylester 80/20 (V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

57,1 mg (0,16 mmol; $\eta = 11$ %)

Summenformel: C₂₃H₂₅NO₃

Aussehen: zähviskose gelbe Flüssigkeit

Rf-Wert: 0,34 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 80:20 (V/V))

Molare Masse: 363,46 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 386,85 [M+ Na]⁺

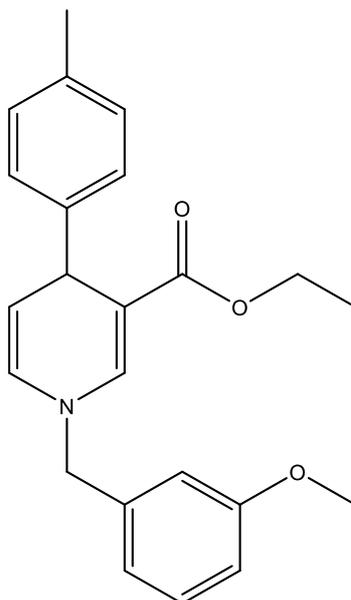
HPLC 1: 86% (Retentionszeit: 13,89 min)

Experimenteller Teil

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.24 (s, 4H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H), 7.16 – 7.13 (m, 2H, 2''-H, 6''-H), 6.95 – 6.89 (m, 1H, 2-H), 6.84 – 6.79 (m, 2H, 3''-H, 5''-H), 6.04 (ddd, $J = 7.9, 1.6, 0.8$ Hz, 1H, 6-H), 4.92 (dd, $J = 7.8, 4.9$ Hz, 1H, 5-H), 4.49 (s, 2H, CH₂), 4.41 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, 4-H), 4.04 (qd, $J = 7.1, 4.7$ Hz, 2H, CH₂CH₃), 3.79 (s, 3H, OCH₃ von Phenyl), 2.39 (s, 3H, CH₃ von Benzyl), 1.17 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₂CH₃)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 2929 w (aliph. C-H, ν); 1680 m (Aryl-CO-R, ν); 1585 m (arom. C=C, ν); 1442 w, 1366 w (C-H, δ); 1250 m (C-N, ν)

DHP05 = Ethyl-1-(3-methoxybenzyl)-4-(p-tolyl)-1,4-dihydropyridine-3-carboxylate



Darstellung:

602,5 mg von Verbindung **P01** (2,21 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 2 mit 45,4 mg Kupfer(I)-iodid (0,24 mmol; 0,11 eq.), 20,4 mg Lithiumchlorid (0,48 mmol; 0,22 eq.) und 3,3 ml p-Tolylmagnesiumbromid (1,0 M in THF; 17,05 mmol; 7,7 eq.) versetzt und für 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Essigsäureethylester 90/10 (V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

428,5 mg (1,18 mmol, $\eta = 53\%$)

Summenformel: C₂₃H₂₅NO₃

Aussehen: zähviskose gelbe Flüssigkeit

Rf-Wert: 0,32 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 80:20 (V/V))

Molare Masse: 363,18 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 362,69 [M]⁺

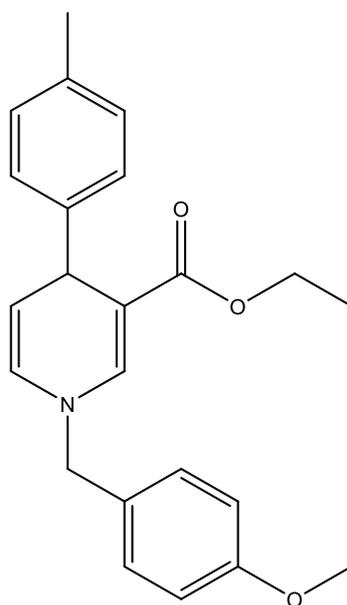
Experimenteller Teil

HPLC 2: 98 % (Retentionszeit: 9,35 min)

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.25 (t, J = 7.8 Hz, 1H, 5'-H), 7.16 – 7.12 (m, 2H, 2''-H, 6''-H), 7.09 – 7.05 (m, 2H, 3''-H, 5''-H), 6.95 – 6.83 (m, 4H, 2-H, 2'-H, 4'-H, 6'-H), 6.05 (ddd, J = 7.8, 1.6, 0.8 Hz, 1H, 6-H), 4.94 (dd, J = 7.8, 4.9 Hz, 1H, 5-H), 4.52 (s, 2H, CH₂), 4.44 (d, J = 4.9 Hz, 1H, 4-H), 4.03 (qd, J = 7.1, 5.5 Hz, 2H, CH₂CH₃), 3.84 (s, 3H, OCH₃ von Phenyl), 2.31 (s, 3H, CH₃ von Benzyl), 1.16 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₂CH₃)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 2924 m (aliph. C-H, ν); 2850 m (OCH₃, ν); 1685 s (Aryl-CO-R, ν); 1586 s (arom. C=C, ν); 1450 w, 1367 w (C-H, δ); 1286 m (C-N, ν)

DHP06 = Ethyl-1-(4-methoxybenzyl)-4-(p-Tolyl)-1,4-dihydropyridin-3-carboxylat



Darstellung:

796 mg von Verbindung **P02** (2,93 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 2 mit 61,6 mg Kupfer(I)-iodid (0,32 mmol; 0,11 eq.), 28,7 mg Lithiumchlorid (0,68 mmol; 0,23 eq.) und 4,4 ml p-Tolylmagnesiumbromid (1,0 M in THF; 22,73 mmol; 7,8 eq.) versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Essigsäureethylester 80/20 (V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

152,8 mg (0,42 mmol, η = 14 %)

Summenformel: C₂₃H₂₅NO₃

Aussehen: zähviskose gelbe Flüssigkeit

Rf-Wert: 0,34 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 80:20 (V/V))

Molare Masse: 363,46 g/mol

Experimenteller Teil

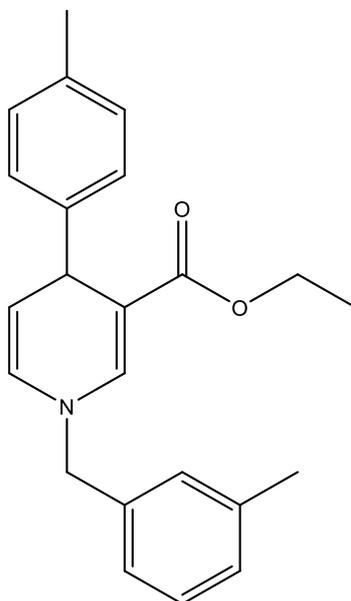
MS (ESI-positiv, m/z): 386,43 [M+Na]⁺

HPLC 2: 85% (Retentionszeit: 13,98 min)

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.31 – 7.26 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.00 (d, J = 8.3 Hz, 4H, 2''-H, 3''-H, 5''-H, 6''-H), 6.97 (s, 1H, 2-H), 6.69 (d, J = 8.4 Hz, 2H, 3'-H, 5'-H), 6.07 – 6.01 (m, 1H, 6-H), 4.91 (dd, J = 7.9, 4.9 Hz, 1H, 5-H), 4.47 (s, 2H, CH₂), 4.42 (d, J = 4.8 Hz, 1H, 4-H), 4.03 (dq, J = 7.1, 3.8 Hz, 2H, CH₂CH₃), 3.84 (s, 3H, OCH₃ von Benzyl), 2.30 (s, 3H, CH₃ von Phenyl), 1.16 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₂CH₃)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 2921 w (aliph. C-H, ν); 1671 m (Aryl-CO-R, ν); 1584 m (arom. C=C, ν); 1442 w, 1369 w (C-H, δ); 1247 m (C-N, ν)

DHP07 = Ethyl-1-(3-methylbenzyl)-4-(p-Tolyl)-1,4-dihydropyridin-3-carboxylat



Darstellung:

448,6 mg von Verbindung **P03** (1,75 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 2 mit 36,6 mg Kupfer(I)-iodid (0,19 mmol; 0,11 eq.), 16,4 mg Lithiumchlorid (0,39 mmol; 0,22 eq.) und 2,6 ml p-Tolylmagnesiumbromid (1,0 M in THF; 13,43 mmol; 7,7 eq.) versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Essigsäureethylester 90/10 (V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

268,7 mg (0,0007733 mol, 36 %)

Summenformel: C₂₃H₂₅NO₂

Aussehen: zähviskose gelbe Flüssigkeit

Rf-Wert: 0,43 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 80:20 (V/V))

Molare Masse: 347,46 g/mol

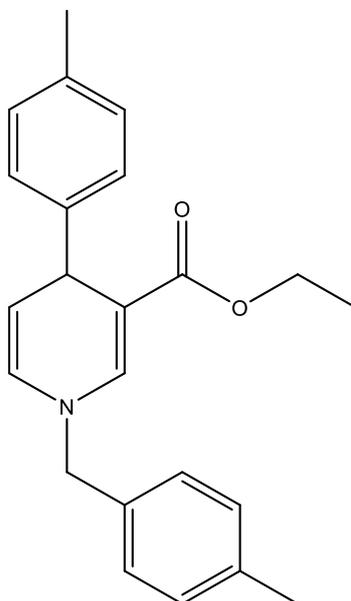
MS (ESI-positiv, m/z): 370,35 [M+Na]⁺

HPLC 2: 95 % (Retentionszeit: 8,48 min)

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.21 – 7.11 (m, 3H, 5'-H, 2''-H, 6''-H), 7.10 – 7.00 (m, 6H, 2-H, 2'-H, 4'-H, 6'-H, 3''-H, 5''-H), 6.02 – 5.97 (m, 1H, 6-H), 4.88 (dd, *J* = 7.8, 4.9 Hz, 1H, 5-H), 4.46 (s, 2H, CH₂), 4.39 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, 4-H), 3.99 (dq, *J* = 7.2, 3.5 Hz, 2H, CH₂CH₃), 2.35 (s, 3H, CH₃ von Benzyl), 2.26 (s, 3H, CH₃ von Phenyl), 1.12 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₂CH₃)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 2979 w, 2924 m (aliph. C-H, ν); 1687 m (Aryl-CO-R, ν); 1589 m (arom. C=C, ν); 1448 w, 1368 m (C-H, δ); 1259 w (C-N, ν)

DHP08 = Ethyl-1-(4-methylbenzyl)-4-(p-Tolyl)-1,4-dihydropyridin-3-carboxylat



Darstellung:

538 mg von Verbindung **P04** (2,10 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 2 mit 44,0 mg Kupfer(I)-iodid (0,23 mmol; 0,11 eq.), 22,3 mg Lithiumchlorid (0,53 mmol; 0,25 eq.) und 3,2 ml p-Tolylmagnesiumbromid (1,0 M in THF; 16,53 mmol; 7,9 eq.) versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Essigsäureethylester 90/10 (V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

136,6 mg (0,70 mmol; η = 33 %)

Summenformel: C₂₃H₂₅NO₂

Aussehen: zähviskose gelbe Flüssigkeit

Rf-Wert: 0,43 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 80:20 (V/V))

Experimenteller Teil

Molare Masse: 347,46 g/mol

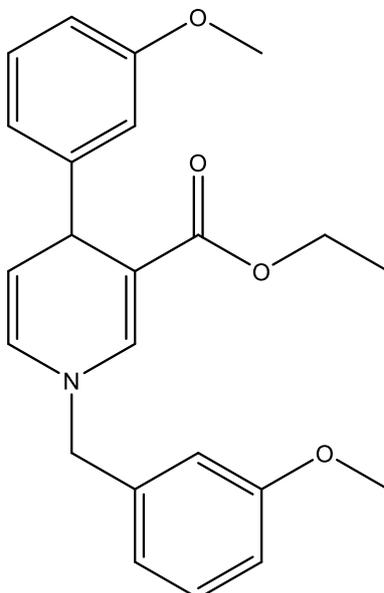
MS (ESI-positiv, m/z): 370,61 [M+Na]⁺

HPLC 2: 96 % (Retentionszeit: 7,71 min)

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.24 (s, 4H, 2'-H, 6'-H, 2''-H, 6''-H), 7.14 – 7.05 (m, 5H, 2-H, 3'-H, 5'-H, 3''-H, 5''-H), 6.04 (dd, *J* = 7.7, 1.6 Hz, 1H, 6-H), 4.92 (dd, *J* = 7.9, 5.0 Hz, 2H(!), 5-H), 4.50 (s, 2H, CH₂), 4.42 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, 4-H), 4.03 (qd, *J* = 7.1, 3.3 Hz, 2H, CH₂CH₃), 2.39 (s, 3H, CH₃ von Benzyl), 2.31 (s, 3H, CH₃ von Phenyl), 1.16 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₂CH₃)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 2977 w, 2924 m (aliph. C-H, ν); 1686 m (Aryl-CO-R, ν); 1587 m (arom. C=C, ν); 1448 w, 1367 w (C-H, δ); 1258 m (C-N, ν)

DHP09 = Ethyl-1-(3-methoxybenzyl)-4-(3-methoxyphenyl)-1,4-dihydropyridin-3-carboxylat



Darstellung:

301,6 mg von Verbindung **P01** (1,11 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 2 mit 24,0 mg Kupfer(I)-iodid (0,13 mmol; 0,11 eq.), 13,4 mg Lithiumchlorid (0,32 mmol; 0,28 eq.) und 1,9 ml 3-Methoxyphenylmagnesiumbromid (1,0 M in THF; 9,17 mmol; 8,3 eq.) versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Essigsäureethylester 80/20 (V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

256,6 mg (0,68 mmol, η = 61 %)

Summenformel: C₂₃H₂₅NO₄

Aussehen: zähviskose gelbe Flüssigkeit

Rf-Wert: 0,22 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 80:20 (V/V))

Molare Masse: 379,46 g/mol

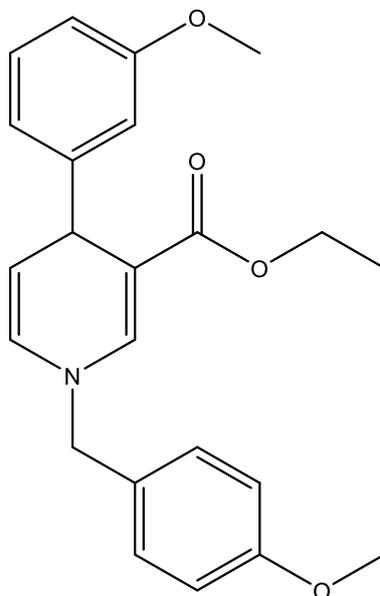
MS (ESI-positiv, m/z): 402,42 [M+Na]⁺

HPLC 1: 90% (Retentionszeit: 14,44 min)

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.29 – 7.22 (m, 1H, 5'-H), 7.12 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, 5''-H), 6.91 – 6.74 (m, 7H, 2-H, 2'-H, 4'-H, 6'-H, 2''-H, 4''-H, 6''-H), 6.03 (ddd, *J* = 7.9, 1.6, 0.7 Hz, 1H, 6-H), 4.91 (dd, *J* = 7.8, 4.9 Hz, 1H, 5-H), 4.50 – 4.46 (m, 2H, CH₂), 4.42 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, 4-H), 4.00 (qd, *J* = 7.1, 5.6 Hz, 2H, CH₂CH₃), 3.79 (s, 3H, OCH₃ von Phenyl), 3.70 (s, 3H, OCH₃ von Benzyl), 1.13 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₂CH₃)

IR: ν (cm⁻¹) = 2914 (m, ν C-H aliph.); 2848 (m, ν C-H aliph.); 1686 (s, ν C=O); 1586 (s, ν C=C); 1394 (w, δ CH₂)

DHP10 = Ethyl-1-(4-methoxybenzyl)-4-(3-methoxyphenyl)-1,4-dihydropyridin-3-carboxylat



Darstellung:

635,8 mg von Verbindung **P02** (2,33 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 2 mit 57,1 mg Kupfer(I)-iodid (0,30 mmol; 0,13 eq.), 21,1 mg Lithiumchlorid (0,50 mmol; 0,21 eq.) und 4,0 ml 3-Methoxyphenylmagnesiumbromid (1,0 M in THF; 18,19 mmol; 7,8 eq.) versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Essigsäureethylester 80/20 (V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

260,3 mg (0,69 mmol, η = 29 %)

Summenformel: C₂₃H₂₅NO₄

Aussehen: zähviskose gelbe Flüssigkeit

Experimenteller Teil

Rf-Wert: 0,22 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 80:20 (V/V))

Molare Masse: 379,46 g/mol

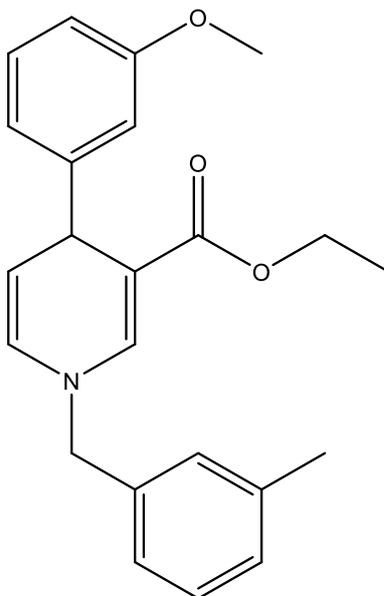
MS (ESI-positiv, m/z): 402,62 [M+Na]⁺

HPLC 1: 95% (Retentionszeit: 14,34 min)

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.29 – 7.20 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.14 – 7.10 (m, 1H, 5''-H), 6.94 (s, 1H, 2-H), 6.92 (d, $J = 1.9$ Hz, 2H, 3'-H, 5'-H), 6.80 – 6.65 (m, 3H, 2''-H, 4''-H, 6''-H), 6.02 (ddd, $J = 7.8, 1.6, 0.8$ Hz, 1H, 6-H), 4.89 (dd, $J = 7.8, 4.9$ Hz, 1H, 5-H), 4.43 (s, 2H, CH₂), 4.40 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, 4-H), 4.00 (qd, $J = 7.1, 5.2$ Hz, 2H, CH₂CH₃), 3.79 (s, 3H, OCH₃ von Phenyl), 3.69 (s, 3H, OCH₃ von Benzyl), 1.12 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₂CH₃)

IR: ν (cm⁻¹) = 2915 (m, ν C-H aliph.); 2849 (m, ν C-H aliph.); 1683 (s, ν C=O); 1584 (s, ν C=C); 1390 (w, δ CH₂)

DHP11 = Ethyl-4-(3-methoxyphenyl)-1-(3-methylbenzyl)-1,4-dihydropyridin-3-carboxylat



Darstellung:

240,4 mg von Verbindung **P03** (0,94 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 2 mit 20,7 mg Kupfer(I)-iodid (0,11 mmol; 0,12 eq.), 10,4 mg Lithiumchlorid (0,25 mmol; 0,26 eq.) und 1,4 ml 3-Methoxyphenylmagnesiumbromid (1,0 M in THF; 6,75 mmol; 7,2 eq.) versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Essigsäureethylester 80/20 (V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

58 mg (0,16 mmol; $\eta = 17$ %)

Summenformel: C₂₃H₂₅NO₃

Experimenteller Teil

Aussehen: zähviskose gelbe Flüssigkeit

Rf-Wert: 0,34 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 80:20 (V/V))

Molare Masse: 363,46 g/mol

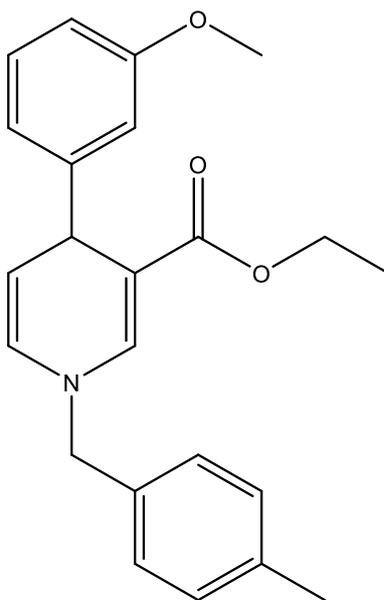
MS (ESI-positiv, m/z): 386,26 [M+Na]⁺

HPLC 1: 97% (Retentionszeit: 19,91 min)

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.25 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, 5'-H), 7.12 (ddd, *J* = 12.4, 5.4, 3.3 Hz, 4H, 2'-H, 4'-H, 6'-H, 5''-H), 6.93 – 6.86 (m, 1H, 2-H), 6.83 – 6.66 (m, 3H, 2''-H, 4''-H, 6''-H), 6.04 – 6.00 (m, 1H, 6-H), 4.90 (dd, *J* = 7.8, 4.9 Hz, 1H, 5-H), 4.47 (s, 2H, CH₂), 4.42 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, 4-H), 4.00 (qd, *J* = 7.1, 5.3 Hz, 2H, CH₂CH₃), 3.70 (s, 3H, OCH₃ von Phenyl), 2.35 (s, 3H, CH₃ von Benzyl), 1.13 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₂CH₃)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 2926 w (aliph. C-H, ν); 1682 m (Aryl-CO-R, ν); 1584 m (arom. C=C, ν); 1433 w, 1367 w (C-H, δ); 1257 m (C-N, ν)

DHP12 = Ethyl-4-(3-methoxyphenyl)-1-(4-methylbenzyl)-1,4-dihydropyridin-3-carboxylat



Darstellung:

626,9 mg von Verbindung **P04** (2,45 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 2 mit 48,9 mg Kupfer(I)-iodid (0,26 mmol; 0,1 eq.), 27,4 mg Lithiumchlorid (0,65 mmol; 0,26 eq.) und 3,7 ml 3-Methoxyphenylmagnesiumbromid (1,0 M in THF; 17,85 mmol; 7,3 eq.) versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Essigsäureethylester 80/20 (V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

354,8 mg (0,9762 mmol; η = 40 %)

Experimenteller Teil

Summenformel: $C_{23}H_{25}NO_3$

Aussehen: zähviskose gelbe Flüssigkeit

Rf-Wert: 0,34 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 80:20 (V/V))

Molare Masse: 363,46 g/mol

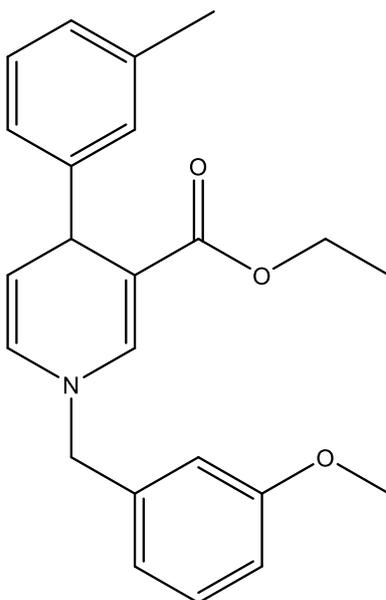
MS (ESI-positiv, m/z): 386,74 $[M+Na]^+$

HPLC 1: 94% (Retentionszeit: 19,96 min)

1H -NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol- d_4] = 7.24 (s, 3H, 2'-H, 6'-H, 5''-H), 7.19 – 7.13 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 6.93 – 6.89 (m, 1H, 2-H), 6.85 – 6.70 (m, 3H, 2''-H, 3''-H, 6''-H), 6.06 (ddd, $J = 7.8, 1.6, 0.8$ Hz, 1H, 6-H), 4.94 (dd, $J = 7.8, 4.9$ Hz, 1H, 5-H), 4.50 (s, 2H, CH_2), 4.46 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, 4-H), 4.05 (qd, $J = 7.1, 5.1$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 3.74 (s, 3H, OCH_3 von Phenyl), 2.38 (s, 3H, CH_3 von Benzyl), 1.17 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_2CH_3)

IR (ATR): KBr [ν in cm^{-1}]: 2926 w (aliphatic C-H, ν); 1683 m (Aryl-CO-R, ν); 1585 m (arom. C=C, ν); 1450 w, 1367 w (C-H, δ); 1257 m (C-N, ν)

DHP13 = Ethyl-1-(3-methoxybenzyl)-4-(m-tolyl)-1,4-dihydropyridine-3-carboxylate



Darstellung:

500,0 mg von Verbindung **P01** (1,84 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 2 mit 34,8 mg Kupfer(I)-iodid (0,18 mmol; 0,10 eq.), 20,9 mg Lithiumchlorid (0,49 mmol; 0,27 eq.) und 2,8 ml m-Tolylmagnesiumchlorid (1,0 M in THF; 17,84 mmol; 9,7 eq.) versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Essigsäureethylester 90/10 (V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

98,5 mg (0,27 mmol, η = 15%)

Summenformel: C₂₃H₂₅NO₃

Aussehen: zähviskose gelbe Flüssigkeit

Rf-Wert: 0,23 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 90:10 (V/V))

Molare Masse: 363,18 g/mol

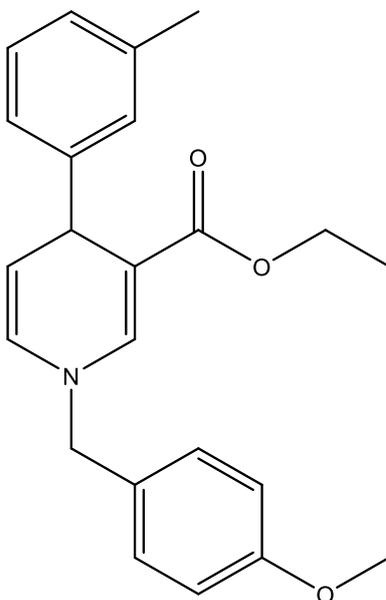
MS (ESI-positiv, m/z): 386,78 [M+Na]⁺

HPLC 1: 94% (Retentionszeit: 20,06 min)

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.32 (t, J = 3.9 Hz, 1H, 5''-H), 7.19 – 7.05 (m, 4H, 5'-H, 2''-H, 4''-H, 6''-H), 7.00 – 6.89 (m, 4H, 2-H, 2'-H, 4'-H, 6'-H), 6.06 (dd, J = 7.7, 2.2 Hz, 1H, 6-H), 4.94 (dd, J = 7.8, 4.9 Hz, 1H, 5-H), 4.53 (s, 2H, CH₂), 4.43 (d, J = 4.9 Hz, 1H, 4-H), 4.11 – 3.97 (m, 2H, CH₂CH₃), 3.83 (s, 3H, OCH₃ von Benzyl), 2.29 (s, 3H, CH₃ von Phenyl), 1.17 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₂CH₃)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 2923 2 (aliph. C-H, ν); 1682 m (Aryl-CO-R, ν); 1586 s (arom. C=C, ν); 1455 w, 1368 w (C-H, δ); 1286 m (C-N, ν)

DHP14 = Ethyl-1-(4-methoxybenzyl)-4-(m-tolyl)-1,4-dihydropyridine-3-carboxylate



Darstellung:

1,23 g von Verbindung **P02** (4,52 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 2 mit 87,2 mg Kupfer(I)-iodid (0,46 mmol; 0,10 eq.), 51,7 mg Lithiumchlorid (1,22 mmol; 0,27 eq.) und 6,7 ml m-Tolylmagnesiumbromid (1,0 M in THF; 42,70 mmol; 9,4 eq.) versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Essigsäureethylester 90/10 (V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

54,8 mg (0,15 mmol, η = 3%)

Summenformel: C₂₃H₂₅NO₃

Aussehen: zähviskose gelbe Flüssigkeit

Rf-Wert: 0,25 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 90:10 (V/V))

Molare Masse: 363,18 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 386,67 [M+Na]⁺

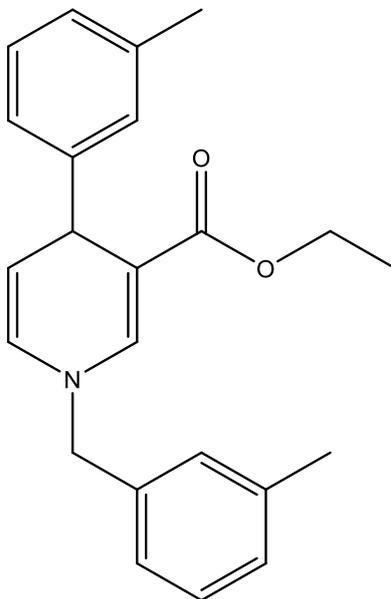
HPLC 1: 94% (Retentionszeit: 19,79 min)

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.12 (dd, J = 8.3, 7.1 Hz, 1H, 5''-H), 7.03 – 6.95 (m, 6H, 2-H, 2'-H, 6'-H, 2''-H, 4''-H, 6''-H), 6.70 – 6.56 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 6.09 – 6.02 (m, 1H, 6-H), 4.92 (dd, J = 7.8, 4.9 Hz, 1H, 5-H), 4.48 (s, 2H, CH₂), 4.41 (d, J = 4.9 Hz, 1H, 4-H), 4.10 – 3.96 (m, 2H, CH₂CH₃), 3.84 (s, 3H, OCH₃ von Benzyl), 2.29 (s, 5H(!), CH₃ von Phenyl), 1.16 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₂CH₃)

Experimenteller Teil

IR (ATR): KBr [ν in cm^{-1}]: 2932 w (aliphatic C-H, ν); 1679 m (Aryl-CO-R, ν); 1584 m (aromatic C=C, ν); 1442 w, 1370 w (C-H, δ); 1247 m (C-N, ν)

DHP15 = Ethyl-1-(3-methylbenzyl)-4-(m-tolyl)-1,4-dihydropyridine-3-carboxylate



Darstellung:

610,8 mg von Verbindung **P03** (2,41 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 2 mit 49,5 mg Kupfer(I)-iodid (0,26 mmol; 0,11 eq.), 22,7 mg Lithiumchlorid (0,54 mmol; 0,22 eq.) und 3,5 ml m-Tolylmagnesiumchlorid (1,0 M in THF; 6,75 mmol; 7,2 eq.) versetzt und für 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Essigsäureethylester 90/10 (V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

354,8 mg (1,02 mmol, $\eta = 42\%$)

Summenformel: $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{NO}_2$

Aussehen: zähviskose gelbe Flüssigkeit

Rf-Wert: 0,25 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 90:10 (V/V))

Molare Masse: 347,19 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 347,72 $[\text{M}]^+$

HPLC 1: 81% (Retentionszeit: 15,81 min)

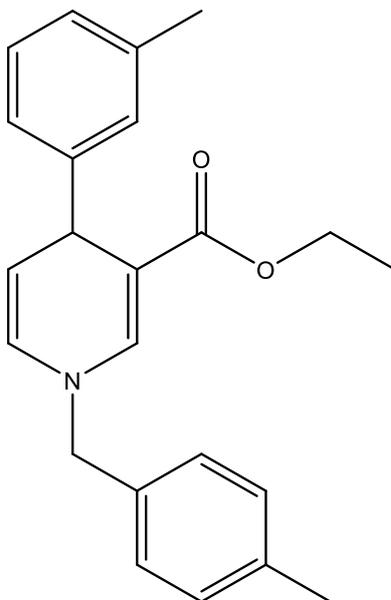
$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm, 400 MHz, Methanol- d_4] = 7.35 – 7.21 (m, 2H, 5'-H, 5''-H), 7.20 – 7.05 (m, 6H, 2'-H, 4'-H, 6'-H, 2''-H, 4''-H, 6''-H), 7.00 – 6.95 (m, 1H, 2-H), 6.05 (ddd, $J = 7.8, 1.5, 0.8$ Hz, 1H, 6-H), 4.93 (dd, $J = 7.8, 4.9$ Hz, 1H, 5-H), 4.51 (s, 2H, CH_2), 4.43 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, 4-H), 4.09 – 3.99 (m, 2H,

Experimenteller Teil

CH₂CH₃), 2.40 (d(!), $J = 0.8$ Hz, 3H, CH₃ von Phenyl), 2.30 (d(!), $J = 0.8$ Hz, 3H, CH₃ von Benzyl), 1.17 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₂CH₃)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 3021 w (arom. C-H, ν); 2923 m (aliph. C-H, ν); 1685 m (Aryl-CO-R, ν); 1586 m (arom. C=C, ν); 1449 w, 1376 w (C-H, δ); 1259 m (C-N, ν)

DHP16 = Ethyl-1-(4-methylbenzyl)-4-(m-tolyl)-1,4-dihydropyridine-3-carboxylate



Darstellung:

1,12 g von Verbindung **P04** (4,38 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 2 mit 83,0 mg Kupfer(I)-iodid (0,44 mmol; 0,10 eq.), 37,2 mg Lithiumchlorid (0,88 mmol; 0,20 eq.) und 6,6 ml m-Tolylmagnesiumchlorid (1,0 M in THF; 42,06 mmol; 9,6 eq.) versetzt und für 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Essigsäureethylester 90/10 (V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

612,4 mg (1,76 mmol, $\eta = 40\%$)

Summenformel: C₂₃H₂₅NO₂

Aussehen: zähviskose gelbe Flüssigkeit

Rf-Wert: 0,30 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 90:10 (V/V))

Molare Masse: 347,19 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 346,72 [M]⁺

HPLC 2: 86 % (Retentionszeit: 8,94 min)

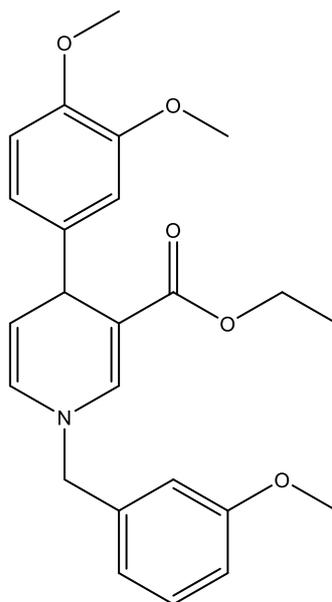
¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.25 (s, 4H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H), 7.20 – 7.00 (m, 4H, 2''-H, 4''-H, 5''-H, 6''-H), 6.99 – 6.95 (m, 1H, 2-H), 6.05 (ddd, $J = 7.9, 1.6, 0.8$ Hz, 1H, 6-H), 4.92 (dd,

Experimenteller Teil

$J = 7.8, 4.9$ Hz, 1H, 5-H), 4.50 (s, 2H, CH₂), 4.42 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, 4-H), 4.11 – 3.96 (m, 2H, CH₂CH₃), 2.39 (s, 3H, CH₃ von Phenyl), 2.29 (s, 3H, CH₃ von Benzyl), 1.17 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₂CH₃)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 2979 w, 2924 w (aliph. C-H, ν); 1685 s (Aryl-CO-R, ν); 1585 m (arom. C=C, ν); 1445 w, 1370 w (C-H, δ); 1259 m (C-N, ν)

DHP17 = Ethyl-4-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-(3-methoxybenzyl)-1,4-dihydropyridine-3-carboxylate



Darstellung:

600,0 mg von Verbindung **P01** (2,20 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 2 mit 44,8 mg Kupfer(I)-iodid (0,24 mmol; 0,11 eq.), 24,2 mg Lithiumchlorid (0,57 mmol; 0,26 eq.) und 6,6 ml 3,4-Dimethoxyphenylmagnesiumbromid (0,5 M in THF; 26,25 mmol; 11,9 eq.) versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Essigsäureethylester 70/30 (V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

171,9 mg (0,42 mmol, $\eta = 19\%$)

Summenformel: C₂₄H₂₇NO₅

Aussehen: zähviskose gelbe Flüssigkeit

Rf-Wert: 0,33 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 70:30 (V/V))

Molare Masse: 409,19 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 432,45 [M+Na]⁺

HPLC 1: 87% (Retentionszeit: 19,10 min)

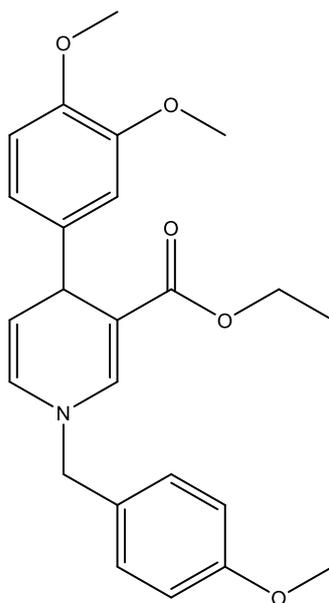
¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.34 (t, $J = 3.7$ Hz, 1H, 5'-H), 7.01 – 6.94 (m, 4H, 2-H, 2'-H, 4'-H, 6'-H), 6.82 – 6.77 (m, 3H, 2''-H, 5''-H, 6''-H), 6.13 – 6.07 (m, 1H, 6-H), 4.95 (dd, $J = 7.8,$

Experimenteller Teil

4.9 Hz, 1H, 5-H), 4.52 (d, $J = 2.7$ Hz, 2H, CH₂), 4.43 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, 4-H), 4.06 (qd, $J = 7.1, 5.2$ Hz, 2H, CH₂CH₃), 3.81 (s, 6H, 3-OCH₃ und 4-OCH₃ von Phenyl), 3.74 (s, 3H, OCH₃ von Benzyl), 1.19 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₂CH₃)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 2930 w (aliph. C-H, ν); 2835 w (OCH₃, ν); 1677 m (Aryl-CO-R, ν); 1586 m (arom. C=C, ν); 1463 w, 1365 w (C-H, δ); 1285 m (C-N, ν)

DHP18 = Ethyl-4-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-(4-methoxybenzyl)-1,4-dihydropyridine-3-carboxylate



Darstellung:

571,5 mg von Verbindung **P02** (2,10 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 2 mit 42,3 mg Kupfer(I)-iodid (0,22 mmol; 0,11 eq.), 25,1 mg Lithiumchlorid (0,59 mmol; 0,28 eq.) und 4,3 ml 3,4-Dimethoxyphenylmagnesiumbromid (0,5 M in THF; 17,10 mmol; 8,1 eq.) versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Essigsäureethylester 80/20 (V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

29,9 mg (0,07 mmol, $\eta = 3\%$)

Summenformel: C₂₄H₂₇NO₅

Aussehen: zähviskose gelbe Flüssigkeit

Rf-Wert: 0,20 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 80:20 (V/V))

Molare Masse: 409,19 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 432,88 [M+Na]⁺

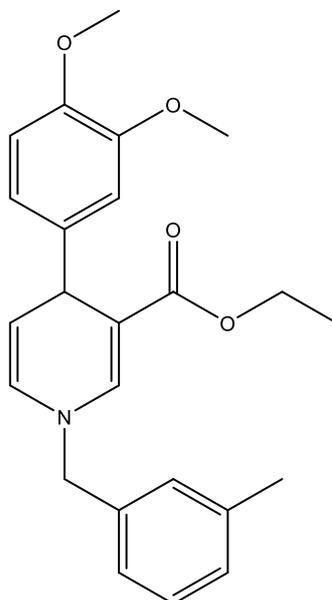
HPLC 2: 90 % (Retentionszeit: 3,57 min)

Experimenteller Teil

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm, 400 MHz, Methanol- d_4] = 7.30 (d, J = 8.5 Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.05 (s, 1H, 2-H), 6.95 – 6.72 (m, 5H, 3'-H, 5'-H, 2''-H, 5''-H, 6''-H), 6.12 – 6.06 (m, 1H, 6-H), 4.93 (dd, J = 7.8, 4.9 Hz, 1H, 5-H), 4.45 (s, 2H, CH_2), 4.41 (d, J = 4.9 Hz, 1H, 4-H), 4.05 (qd, J = 7.1, 4.1 Hz, 2H, CH_2CH_3), 3.88 (s, 6H, 3-OCH₃ und 4-OCH₃ von Phenyl), 3.71 (s, 3H, OCH₃ von Benzyl), 1.19 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH_2CH_3)

IR (ATR): KBr [ν in cm^{-1}]: 2936 w (aliph. C-H, ν); 2837 w (OCH₃, ν); 1668 m (Aryl-CO-R, ν); 1592 w (arom. C=C, ν); 1464 w, 1368 w (C-H, δ); 1285 m (C-N, ν)

DHP19 = Ethyl-4-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-(3-methylbenzyl)-1,4-dihydropyridine-3-carboxylate



Darstellung:

984,5 mg von Verbindung **P03** (3,84 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 2 mit 74,3 mg Kupfer(I)-iodid (0,39 mmol; 0,10 eq.), 36,7 mg Lithiumchlorid (0,87 mmol; 0,23 eq.) und 7,7 ml 3,4-Dimethoxyphenylmagnesiumbromid (0,5 M in THF; 30,63 mmol; 8,0 eq.) versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Essigsäureethylester 70/30 (V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

490,1 mg (1,25 mmol; 32 %)

Summenformel: C₂₄H₂₇NO₄

Aussehen: zähviskose gelbe Flüssigkeit

Rf-Wert: 0,17 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 80:20 (V/V))

Molare Masse: 393,19 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 393,64 [M]⁺

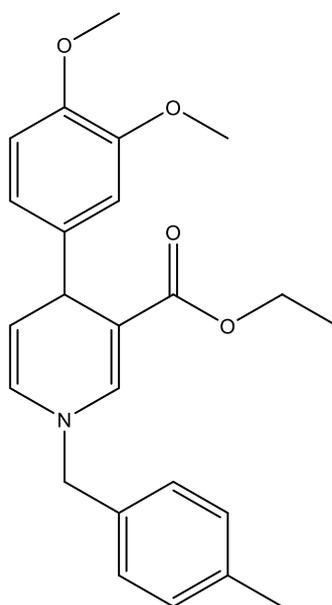
Experimenteller Teil

HPLC 1: 83% (Retentionszeit: 14,50 min)

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.32 – 7.29 (m, 1H, 5'-H), 7.06 (s, 3H, 2'-H, 4'-H, 6'-H), 6.97 (s, 1H, 2-H), 6.87 – 6.78 (m, 3H, 2''-H, 5''-H, 6''-H), 6.09 (ddd, $J = 7.9, 1.4, 0.7$ Hz, 1H, 6-H), 4.95 (dd, $J = 7.8, 4.9$ Hz, 1H, 5-H), 4.53 – 4.49 (m, 2H, CH₂), 4.42 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, 4-H), 4.09 – 4.03 (m, 2H, CH₂CH₃), 3.82 (s, 3H, 4-OCH₃ von Phenyl), 3.72 (s, 3H, 3-OCH₃ von Phenyl), 2.39 (s, 3H, CH₃ von Benzyl), 1.19 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₂CH₃)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 2925 m (aliph. C-H, ν); 2850 w (OCH₃, ν); 1680 m (Aryl-CO-R, ν); 1571 m (arom. C=C, ν); 1449 m, 1365 w (C-H, δ); 1256 m (C-N, ν);

DHP20 = Ethyl-4-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-(4-methylbenzyl)-1,4-dihydropyridine-3-carboxylate



Darstellung:

423,5 mg von Verbindung **P04** (1,65 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 2 mit 33,6 mg Kupfer(I)-iodid (0,18 mmol; 0,11 eq.), 17,8 mg Lithiumchlorid (0,42 mmol; 0,25 eq.) und 3,3 ml 3,4-Dimethoxyphenylmagnesiumbromid (0,5 M in THF; 13,13 mmol; 8,0 eq.) versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Essigsäureethylester 80/20 (V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

92,4 mg (0,24 mmol, $\eta = 14\%$)

Summenformel: C₂₄H₂₇NO₄

Aussehen: zähviskose gelbe Flüssigkeit

Rf-Wert: 0,14 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 80:20 (V/V))

Molare Masse: 393,19 g/mol

Experimenteller Teil

MS (ESI-positiv, m/z): 416,94 [M+Na]⁺

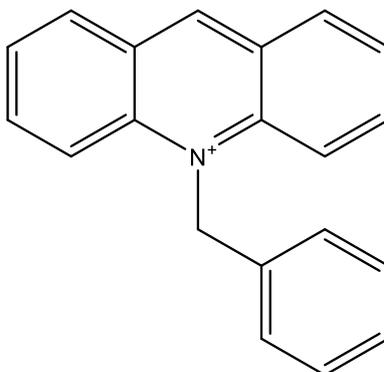
HPLC 2: 87 % (Retentionszeit: 3,42 min)

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.17 (dd, J = 8.0, 1.0 Hz, 4H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H), 6.91 (s, 1H, 2-H), 6.87 – 6.75 (m, 3H, 2''-H, 5''-H, 6''-H), 6.09 (dd, J = 7.8, 1.6 Hz, 1H, 6-H), 4.93 (dd, J = 7.8, 4.9 Hz, 1H, 5-H), 4.50 (d, J = 2.0 Hz, 2H, CH₂), 4.41 (d, J = 4.9 Hz, 1H, 4-H), 4.05 (qd, J = 7.1, 5.0 Hz, 2H, CH₂CH₃), 3.82 (s, 3H, 4-OCH₃ von Phenyl), 3.72 (s, 3H, 3-OCH₃ von Phenyl), 2.38 (s, 3H, CH₃ von Benzyl), 1.19 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₂CH₃)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 1926 m (aliph. C-H, ν); 2850 w (OCH₃, ν); 1680 m (Aryl-CO-R, ν); 1570 m (arom. C=C, ν); 1448 m, 1365 w (C-H, δ); 1256 m (C-N, ν)

7.2.2.2 *Synthese der Acridine*

7.2.2.2.1 Synthese der Vorstufen

A01 = 10-Benzylacridin-10-ium**Darstellung:**

0,99 g Acridin (5,53 mmol; 1 eq.) wird mit 1,0 ml Benzylbromid (8,42 mmol; 1,52 eq.) nach AAV 3 bei 115 °C für 30 min erhitzt. Nach dem anschließenden Waschen mit Diethylether wird **A01** mit einem Methanol/Diethylether-Gemisch im Volumenverhältnis 1:1 umkristallisiert.

Ausbeute:

624,2 mg (2,31 mmol; $\eta = 41\%$)

Summenformel: $C_{20}H_{16}N^+$

Aussehen: hellgrünes Pulver

Rf-Wert: 0,83 (Dichlormethan/Ethanol 10/90 (V/V))

Molare Masse: 270,13 g/mol

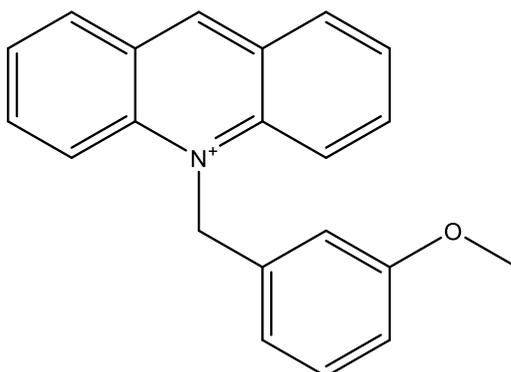
MS (ESI-positiv, m/z): 270,45 $[M]^+$

Schmelzbereich: 259-260°C

1H -NMR: δ [ppm, 400 MHz, Aceton- d_6] = 10,47 (s, 1H, 9-H); 8,74 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H, 4-H, 5-H), 8,58 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, 1-H, 8-H), 8,52 (ddd, $J = 8.9, 6.8, 1.5$ Hz, 2H, 2-H, 7-H), 8,01 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, 3-H, 6-H), 7,42 – 7,36 (m, 3H, 3'-H, 4'-H, 5'-H), 7,31 (d, $J = 3.9$ Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 6,95 (s, 2H, CH_2)

IR (ATR): KBr [ν in cm^{-1}]: 3047 w (arom. C-H, ν); 2986 w, 2945 w, 2907 w (aliph. C-H, ν); 1615 m (C=N, ν); 1573 m, 1513 m (arom. C=C, ν); 1460 m, 1390 m (C-H, δ); 1263 w (C-N, ν)

A02 = 10-(3-methoxybenzyl)acridin-10-ium



Darstellung:

1,45 g Acridin (8,13 mmol; 1 eq.) wird mit 2,16 g 3-Methoxybenzyljodid (8,71 mmol; 1,07 eq.) nach AAV 3 bei 115 °C für 5 min erhitzt. Nach dem anschließenden Waschen mit Diethylether wird **A02** mit einem Methanol/Diethylether-Gemisch im Volumenverhältnis 1:1 umkristallisiert.

Ausbeute:

1,78 g (5,93 mmol; $\eta = 71\%$)

Summenformel: C₂₁H₁₈NO⁺

Aussehen: rotschwarzer Feststoff

Rf-Wert: 0,83 (Dichlormethan/Ethanol 10/90 (V/V))

Molare Masse: 300,14 g/mol

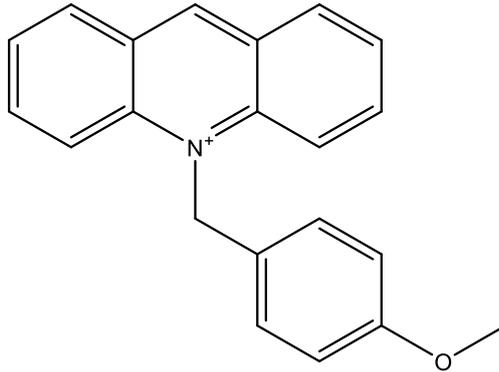
MS (ESI-positiv, m/z): 300,39 [M]⁺

Schmelzbereich: 228-230°C

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Aceton-d₆] = 10.36 (s, 1H, 9-H), 8.79 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, 4-H, 5-H), 8.72 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H, 1-H, 8-H), 8.56 – 8.51 (m, 2H, 2-H, 7-H), 8.13 (dd, $J = 8.4, 6.8$ Hz, 2H, 3-H, 6-H), 7.32 – 7.26 (m, 1H, 5'-H), 7.16 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, 6'-H), 6.96 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, 4'-H), 6.92 (s, 1H, 2'-H), 6.87 (s, 2H, CH₂), 3.75 (s, 3H, OCH₃)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 2943 w, 2897 m, 2870 m (aliph. C-H, ν); 2835 m (OCH₃, ν); 1636 m (C=N, ν); 1581 s, 1488 m (arom. C=C, ν); 1467 m, 1398 w (C-H, δ); 1263 m (C-N, ν)

A03 = 10-(4-methoxybenzyl)acridin-10-ium



Darstellung:

2,00 g Acridin (11,16 mmol; 1 eq.) wird mit 2,31 g 4-Methoxybenzylbromid (11,54 mmol; 1,03 eq.) nach AAV 3 bei 105 °C für 5 min erhitzt. Nach dem anschließenden Waschen mit Diethylether wird **A03** mit einem Methanol/Diethylether-Gemisch im Volumenverhältnis 1:1 umkristallisiert.

Ausbeute:

2,58 g (8,61 mmol; $\eta = 77\%$)

Summenformel: C₂₁H₁₈NO⁺

Aussehen: rotschwarzer Feststoff

Rf-Wert: 0,83 (Dichlormethan/Ethanol 10/90 (V/V))

Molare Masse: 300,14 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 300,23 [M]⁺

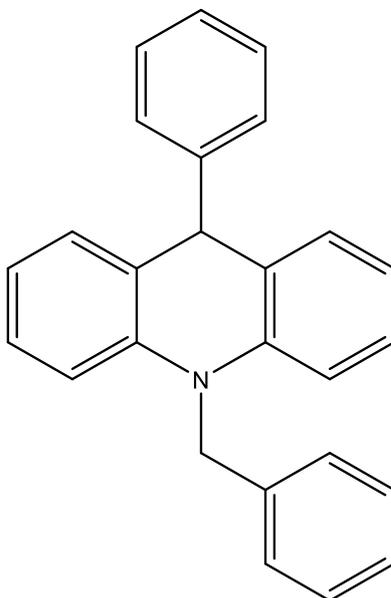
Schmelzbereich: 203-205°C

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Aceton-d₆] = 10.43 (s, 1H, 9-H), 8.82 – 8.79 (m, 2H, 4-H, 5-H), 8.77 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H, 1-H, 8-H), 8.50 – 8.46 (m, 2H, 2-H, 7-H), 8.12 (dd, $J = 8.2, 6.7$ Hz, 2H, 3-H, 6-H), 7.09 – 7.05 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 6.93 (d, $J = 2.5$ Hz, 2H, 3'-H, 5'-H), 6.91 (s, 2H, CH₂), 3.77 (s, 3H, OCH₃)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 2997 w, 2981 w, 2952 w, 2908 w (aliph. C-H, ν); 2832 w (OCH₃, ν); 1618 m (C=N, ν); 1574 m, 1505 m (arom. C=C, ν); 1461 m, 1395 m (C-H, δ); 1246 s (C-N, ν)

7.2.2.2.2 Synthese der 9,10-Dihydroacridine

DHA01 = 10-benzyl-9-phenyl-9,10-dihydroacridine



Darstellung:

1,02 g von **A01** (3,77 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 4 mit 83,1 mg Kupfer(I)-iodid (0,44 mmol; 0,12 eq.), 33,1 mg Lithiumchlorid (0,78 mmol; 0,21 eq.) und 3,7 ml Phenylmagnesiumchlorid (2,0 M in THF; 39,3 mmol; 10,4 eq.) versetzt und für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Chloroform 90/10 (V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

287,5 mg (0,8281 mmol, $\eta = 22\%$)

Summenformel: C₂₆H₂₁N

Aussehen: weißes Pulver

Rf-Wert: 0,18 (Cyclohexan/Chloroform 90/10 (V/V))

Molare Masse: 347,17 g/mol

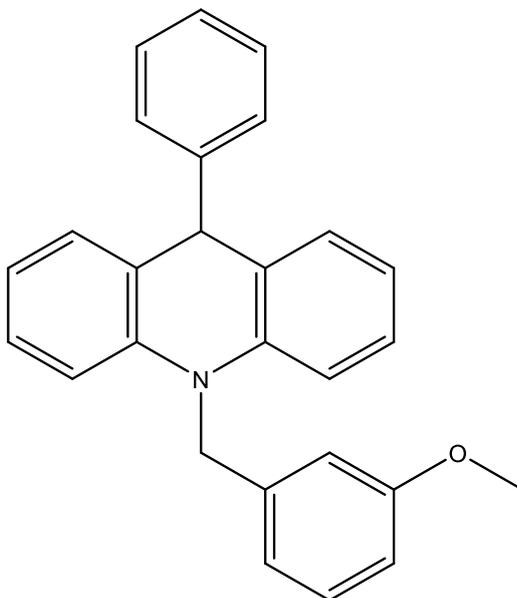
MS (ESI-positiv, m/z): 347,58 [M]⁺

Schmelzbereich: 132-133 °C

HPLC 1: 98 % (Retentionszeit: 17,00 min)

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.34 – 7.20 (m, 7H, 2'-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H, 3''-H, 5''-H), 7.20 – 7.11 (m, 7H, 2-H, 7-H, 4-H, 5-H, 2''-H, 4''-H, 6''-H), 6.92 (td, $J = 7.4, 1.1$ Hz, 2H, 1-H, 8-H), 6.84 (dd, $J = 8.3, 1.2$ Hz, 2H, 3-H, 6-H), 5.33 (s, 1H, 9-H), 5.25 (s, 2H, CH₂)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 3020 w (arom. C-H, ν); 2925 w (aliph. C-H, ν); 1591 m (arom. C=C, ν); 1462 m, 1375 m (C-H, δ); 1269 w (C-N, ν)

DHA02 = 10-(3-methoxybenzyl)-9-phenyl-9,10-dihydroacridine**Darstellung:**

1,02 g von **A02** (3,40 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 4 mit 63,8 mg Kupfer(I)-iodid (0,34 mmol; 0,1 eq.), 31,1 mg Lithiumchlorid (0,73 mmol; 0,22 eq.) und 1,7 ml Phenylmagnesiumchlorid (2,0 M in THF; 17,8 mmol; 5,3 eq.) versetzt und für 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Chloroform/Essigsäureethylester 90/10/1 (V/V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt. Es entsteht ein farbloses Öl, welches durch Zusatz des Lösungsmittelgemisches Methanol/Diethylether im Volumenverhältnis 5:1 im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute:

149,8 mg (0,3972 mmol, $\eta = 12\%$)

Summenformel: C₂₇H₂₃NO

Aussehen: weißes Pulver

Rf-Wert: 0,14 (Cyclohexan/Chloroform/Essigsäureethylester 90/10/1 (V/V/V))

Molare Masse: 377,18 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 377,35 [M]⁺

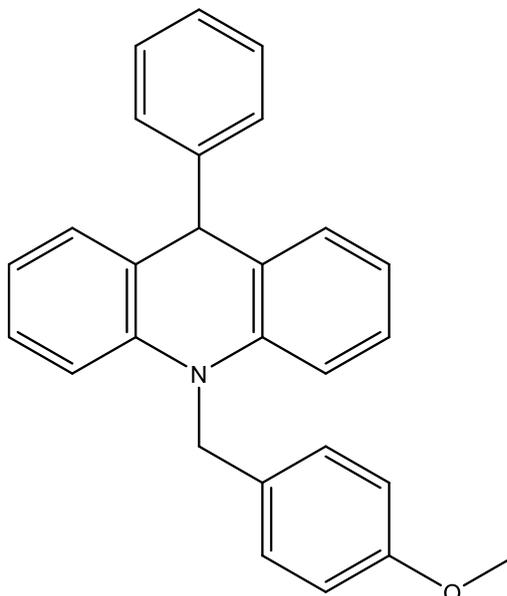
Schmelzbereich: 114-115 °C

HPLC 1: 94 % (Retentionszeit: 16,58 min)

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.28 – 7.18 (m, 5H, 5'-H, 2''-H, 3''-H, 5''-H, 6''-H), 7.17 – 7.09 (m, 5H, 2-H, 7-H, 4-H, 5-H, 4''-H), 6.92 (td, $J = 7.4, 1.1$ Hz, 2H, 1-H, 8-H), 6.88 – 6.83 (m, 3H, 2'-H, 4'-H, 6'-H), 6.80 – 6.75 (m, 2H, 3-H, 6-H), 5.34 (s, 1H, 9-H), 5.22 (s, 2H, CH₂), 3.71 (s, 3H, OCH₃)

IR (ATR): KBr [ν in cm^{-1}]: 3023 w (arom. C-H, ν); 2996 w, 2883 w (aliph. C-H, ν); 1592 w (arom. C=C, ν); 1462 m, 1374 m (C-H, δ); 1268 w (C-N, ν)

DHA03 = 10-(4-methoxybenzyl)-9-phenyl-9,10-dihydroacridine



Darstellung:

989,1 mg von **A03** (3,30 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 4 mit 63,7 mg Kupfer(I)-iodid (0,33 mmol; 0,1 eq.), 34,1 mg Lithiumchlorid (0,80 mmol; 0,24 eq.) und 1,7 ml Phenylmagnesiumchlorid (2,0 M in THF; 17,98 mmol; 5,4 eq.) versetzt und für 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Chloroform/Essigsäureethylester 90/10/1 (V/V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt. Es entsteht ein weiß gefärbtes Öl, welches durch Zusatz von Ethanol im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute:

802,2 mg (2,1268 mmol, $\eta = 65\%$)

Summenformel: $\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{NO}$

Aussehen: weißes Pulver

Rf-Wert: 0,18 (Cyclohexan/Chloroform/Essigsäureethylester 90/10/1 (V/V/V))

Molare Masse: 377,18 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 377,54 $[\text{M}]^+$

Schmelzbereich: 123-124 °C

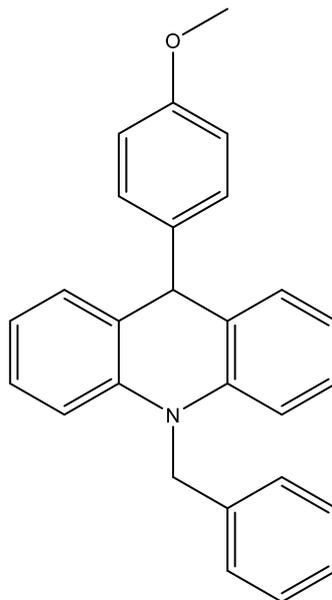
HPLC 1: 88 % (Retentionszeit: 16,80 min)

Experimenteller Teil

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm, 400 MHz, Methanol- d_4] = 7.27 – 7.18 (m, 4H, 2''-H, 3''-H, 5''-H, 6''-H), 7.15 – 7.07 (m, 7H, 2-H, 7-H, 4-H, 5-H, 2'-H, 6'-H, 4''-H), 6.92 (td, J = 7.5, 1.2 Hz, 2H, 1-H, 8-H), 6.87 (dd, J = 8.7, 1.7 Hz, 4H, 3-H, 6-H, 3'-H, 5'-H), 5.32 (s, 1H, 9-H), 5.18 (s, 2H, CH_2), 3.80 (s, 3H, OCH_3)

IR (ATR): KBr [ν in cm^{-1}]: 3025 w (arom. C-H, ν); 2933 w (aliphatic C-H, ν); 2835 (OCH_3 , ν); 1593 m (arom. C=C, ν); 1462 m, 1373 m (C-H, δ); 1268 m (C-N, ν)

DHA04 = 10-benzyl-9-(4-methoxyphenyl)-9,10-dihydroacridine



Darstellung:

945,5 mg von **A01** (3,50 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 4 mit 72,6 mg Kupfer(I)-iodid (0,38 mmol; 0,11 eq.), 32,9 mg Lithiumchlorid (0,78 mmol; 0,22 eq.) und 3,5 ml 4-Methoxyphenylmagnesiumbromid (1,0 M in THF; 15,9 mmol; 4,5 eq.) versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Chloroform/Essigsäureethylester 90/10/1 (V/V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

217,8 mg (0,5774 mmol, η = 16%)

Summenformel: $\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{NO}$

Aussehen: weißes Pulver

Rf-Wert: 0,15 (Cyclohexan/Chloroform/Essigsäureethylester 90/10/1 (V/V/V))

Molare Masse: 377,18 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 377,35 $[\text{M}]^+$

Schmelzbereich: 131-132 °C

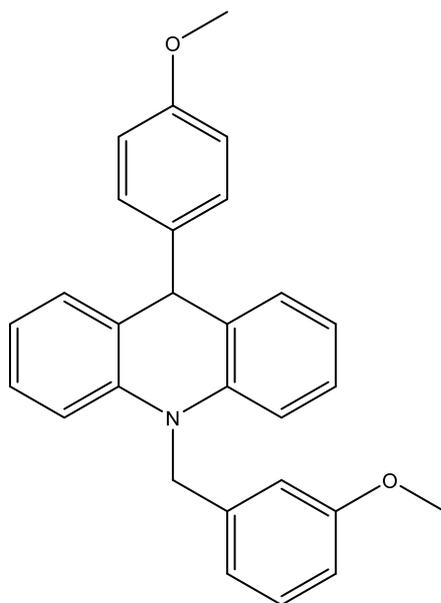
HPLC 1: 97 % (Retentionszeit: 16,39 min)

Experimenteller Teil

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm, 400 MHz, Methanol- d_4] = 7.31 – 7.22 (m, 5H, 2'-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H), 7.14 – 6.99 (m, 6H, 2-H, 7-H, 4-H, 5-H, 2''-H, 6''-H), 6.92 (td, J = 7.4, 1.1 Hz, 2H, 1-H, 8-H), 6.90 – 6.73 (m, 4H, 3-H, 6-H, 3''-H, 5''-H), 5.27 (s, 1H, 9-H), 5.24 (s, 2H, CH_2), 3.75 (s, 3H, OCH_3)

IR (ATR): KBr [ν in cm^{-1}]: 2973 w, 2934 w (aliph. C-H, ν); 2838 w (OCH_3 , ν); 1591 m (arom. C=C, ν); 1463 s, 1372 m (C-H, δ); 1265 m (C-N, ν)

DHA05 = 10-(3-methoxybenzyl)-9-(4-methoxyphenyl)-9,10-dihydroacridine



Darstellung:

596,2 mg von **A02** (1,99 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV4 mit 38,3 mg Kupfer(I)-iodid (0,20 mmol; 0,1 eq.), 18,8 mg Lithiumchlorid (0,44 mmol; 0,22 eq.) und 2,0 ml 4-Methoxyphenylmagnesiumbromid (1,0 M in THF; 9,1 mmol; 4,6 eq.) versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Chloroform/Essigsäureethylester 90/10/1 (V/V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt. Es entsteht ein weißliches Öl, welches nach kurzer Lagerung im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute:

78 mg (0,19 mmol; η = 10 %)

Summenformel: $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{NO}_2$

Aussehen: weißes Pulver

Rf-Wert: 0,33 (Cyclohexan/Chloroform/Essigester 90/10/1 (V/V/V))

Molare Masse: 407,19 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 407,50 [M] $^+$

Schmelzbereich: 132-135°C

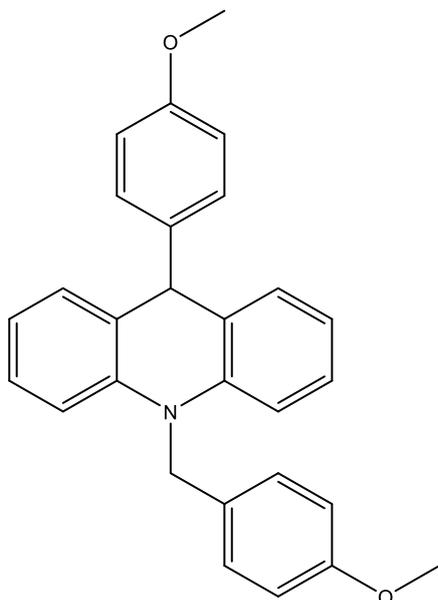
Experimenteller Teil

HPLC 1: 98 % (Retentionszeit: 16,60 min)

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.26 – 7.20 (m, 3H, 5'-H, 2''-H, 6''-H), 7.16 – 7.06 (m, 2H, 4-H, 5-H), 7.06 – 7.01 (m, 2H, 2-H, 7-H), 6.92 (td, $J = 7.4, 1.1$ Hz, 2H, 1-H, 8-H), 6.87 – 6.80 (m, 3H, 2'-H, 4'-H, 6'-H), 6.80 – 6.73 (m, 4H, 3-H, 6-H, 3''-H, 5''-H), 5.27 (s, 1H, 9-H), 5.21 (s, 2H, CH₂), 3.75 (s, 3H, OCH₃ des Phenylrests), 3.70 (s, 3H, OCH₃ des Benzylrests)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 2959 w, 2921 w (aliph. C-H, ν); 2833 w (OCH₃, ν); 1600 m (arom. C=C, ν); 1469 s, 1372 m (C-H, δ); 1272 m (C-N, ν)

DHA06 = 10-(4-methoxybenzyl)-9-(4-methoxyphenyl)-9,10-dihydroacridine



Darstellung:

750,6 mg von **A03** (2,50 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 4 mit 56,0 mg Kupfer(I)-iodid (0,29 mmol; 0,12 eq.), 21,2 mg Lithiumchlorid (0,50 mmol; 0,2 eq.) und 2,5 ml 4-Methoxyphenylmagnesiumbromid (1,0 M in THF; 11,4 mmol; 4,6 eq.) versetzt und für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Chloroform/Essigsäureethylester 90/10/1 (V/V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

326,9 mg (0,8028 mmol, $\eta = 32\%$)

Summenformel: C₂₈H₂₅NO₂

Aussehen: weißes Pulver

Rf-Wert: 0,15 (Cyclohexan/Chloroform/Essigsäureethylester 90/10/1 (V/V/V))

Molare Masse: 407,19 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 407,77 [M]⁺

Experimenteller Teil

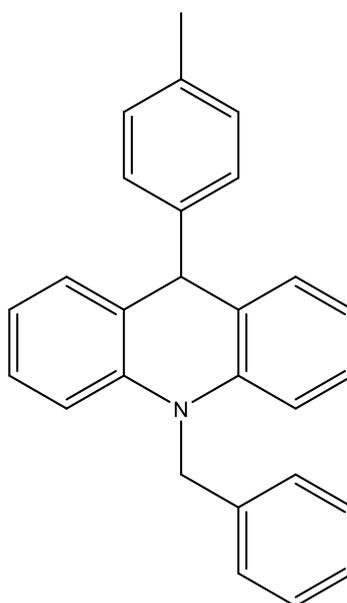
Schmelzbereich: 160-161 °C

HPLC 1: 98 % (Retentionszeit: 16,58 min)

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.24 (dd, *J* = 7.6, 1.6 Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.09 (ddd, *J* = 8.8, 7.1, 5.7 Hz, 4H, 2-H, 7-H, 4-H, 5-H), 7.05 – 7.00 (m, 2H, 2''-H, 6''-H), 6.91 (td, *J* = 7.4, 1.1 Hz, 2H, 1-H, 8-H), 6.88 – 6.84 (m, 4H, 3-H, 6-H, 3'-H, 5'-H), 6.79 – 6.74 (m, 2H, 3''-H, 5''-H), 5.25 (s, 1H, 9-H), 5.18 (s, 2H, CH₂), 3.80 (s, 3H, OCH₃ des Phenylrests), 3.75 (s, 3H, OCH₃ des Benzylrests)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 3000 w, 2930 w (aliph. C-H, ν); 2835 w (OCH₃, ν); 1592 m (arom. C=C, ν); 1461 m, 1356 m (C-H, δ); 1267 m (C-N, ν)

DHA07 = 10-benzyl-9-(p-tolyl)-9,10-dihydroacridine



Darstellung:

655,8 mg von **A01** (2,43 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV4 mit 46,6 mg Kupfer(I)-iodid (0,24 mmol; 0,1 eq.), 24,0 mg Lithiumchlorid (0,57 mmol; 0,23 eq.) und 3,6 ml p-Tolylmagnesiumbromid (1,0 M in THF; 18,6 mmol; 7,7 eq.) versetzt und für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/n-Heptan 90/10 (V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

24,8 mg (0,07 mmol; η = 2,8 %)

Summenformel: C₂₇H₂₃N

Aussehen: weißes Pulver

Rf-Wert: 0,25 (Cyclohexan/Heptan 90/10 (V/V))

Molare Masse: 361,18 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 361,60 [M]⁺

Experimenteller Teil

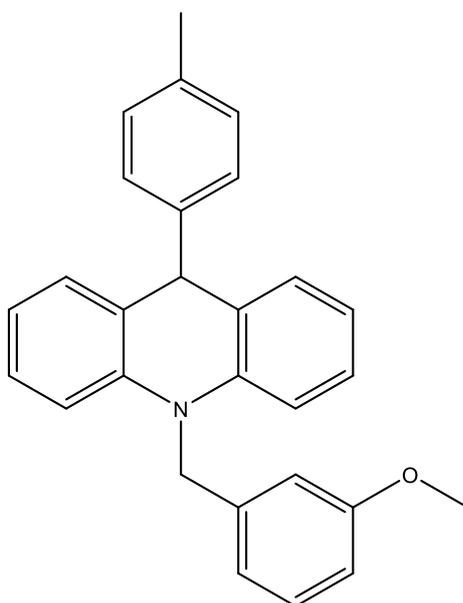
Schmelzbereich: 139-140°C

HPLC 1: 95 % (Retentionszeit: 17,45 min)

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.28 (dtd, *J* = 24.5, 7.9, 7.5, 1.7 Hz, 5H, 2'-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H), 7.17 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, 4-H, 5-H), 7.09 (ddd, *J* = 8.5, 7.4, 1.6 Hz, 2H, 2-H, 7-H), 7.01 (s, 4H, 2''-H, 3''-H, 5''-H, 6''-H), 6.91 (td, *J* = 7.4, 1.1 Hz, 2H, 1-H, 8-H), 6.85 – 6.81 (m, 2H, 3-H, 6-H), 5.28 (s, 1H, 9-H), 5.24 (s, 2H, CH₂), 2.27 (s, 3H, CH₃)

IR (ATR): KBr [*v* in cm⁻¹]: 3026 w (arom. C-H, *v*); 2922 w, 2853 w (aliph. C-H, *v*); 1592 m (arom. C=C, *v*); 1479 s, 1374 m (C-H, *δ*); 1263 m (C-N, *v*)

DHA08 = 10-(3-methoxybenzyl)-9-(*p*-tolyl)-9,10-dihydroacridine



Darstellung:

993,6 mg von **A02** (3,31 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV4 mit 69,8 mg Kupfer(I)-iodid (0,37 mmol; 0,11 eq.), 34,3 mg Lithiumchlorid (0,81 mmol; 0,24 eq.) und 5,0 ml *p*-Tolylmagnesiumbromid (1,0 M in THF; 25,8 mmol; 7,8 eq.) versetzt und für 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Chloroform/Essigsäureethylester 90/10/1 (V/V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt. Es entsteht ein weißliches Öl, welches nach kurzer Zeit durch Lagerung im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute:

83,2 mg (0,21 mmol; η = 6 %)

Summenformel: C₂₈H₂₅NO

Aussehen: weißes Pulver

Rf-Wert: 0,13 (Cyclohexan/Chloroform/Essigester 90/10/1 (V/V/V))

Molare Masse: 391,19 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 391,50 [M]⁺

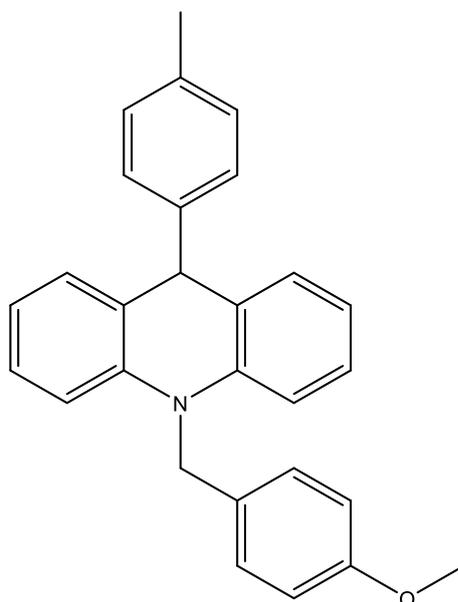
Schmelzbereich: 137-138°C

HPLC 1: 95 % (Retentionszeit: 17,27 min)

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.26 – 7.20 (m, 3H, 4-H, 5-H, 5'-H), 7.14 – 7.07 (m, 2H, 2-H, 7-H), 7.01 (s, 4H, 2''-H, 3''-H, 5''-H, 6''-H), 6.91 (td, J = 7.4, 1.1 Hz, 2H, 1-H, 8-H), 6.83 (td, J = 8.6, 1.5 Hz, 3H, 2'-H, 4'-H, 6'-H), 6.79 – 6.73 (m, 2H, 3-H, 6-H), 5.28 (s, 1H, 9-H), 5.20 (s, 2H, CH₂), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 2.26 (s, 3H, CH₃)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 3000 w, 2921 w (aliph. C-H, ν); 1591 m (arom. C=C, ν); 1463 m, 1374 s (C-H, δ); 1233 m (C-N, ν)

DHA09 = 9-(3,4-dimethoxyphenyl)-10-(4-methoxybenzyl)-9,10-dihydroacridine



Darstellung:

1,02 g von **A03** (3,39 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV4 mit 64,3 mg Kupfer(I)-iodid (0,34 mmol; 0,12 eq.), 28,3 mg Lithiumchlorid (0,67 mmol; 0,2 eq.) und 5,0 ml p-Tolylmagnesiumbromid (1,0 M in THF; 25,8 mmol; 7,6 eq.) versetzt und für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Chloroform/Essigsäureethylester 90/10/1 (V/V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

479,7 mg (1,23 mmol; η = 36%)

Summenformel: C₂₈H₂₅NO

Aussehen: weißes Pulver

Rf-Wert: 0,28 (Cyclohexan/Chloroform/Essigester 90/10/1 (V/V/V))

Molare Masse: 391,19 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 391,27 [M]⁺

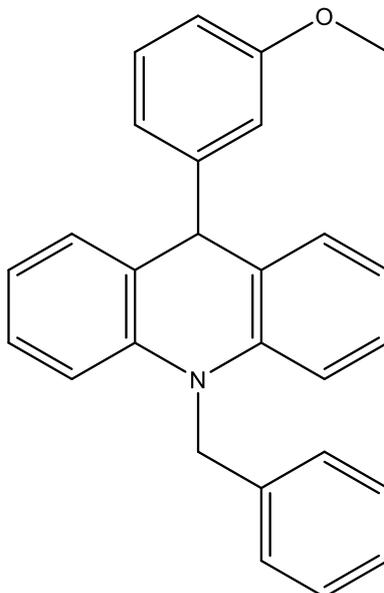
Schmelzbereich: 145-147°C

HPLC 1: 94 % (Retentionszeit: 17,19 min)

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.24 – 7.12 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.15 – 7.06 (m, 4H, 2-H, 7-H, 4-H, 5-H), 7.04 – 6.98 (m, 4H, 2''-H, 3''-H, 5''-H, 6''-H), 6.92 – 6.82 (m, 6H, 3-H, 6-H, 1-H, 8-H, 3'-H, 5'-H), 5.26 (s, 1H, 9-H), 5.17 (s, 2H, CH₂), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 2.27 (s, 3H, CH₃)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 3000 w (arom. C-H, ν); 2957 w (aliph. C-H, ν); 2834 w (OCH₃, ν); 1591 m (arom. C=C, ν); 1464 m, 1378 m (C-H, δ); 1271 m (C-N, ν)

DHA10 = 10-benzyl-9-(3-methoxyphenyl)-9,10-dihydroacridine



Darstellung:

1,02 g von **A01** (3,79 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 4 mit 83,2 mg Kupfer(I)-iodid (0,44 mmol; 0,12 eq.), 38,9 mg Lithiumchlorid (0,92 mmol; 0,24 eq.) und 3,7 ml 3-Methoxyphenylmagnesiumbromid (1,0 M in THF; 17,9 mmol; 4,7 eq.) versetzt und für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Chloroform/Essigsäureethylester 90/10/1 (V/V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

648 mg ($n = 1,718 \text{ mmol}$, $\eta = 45\%$)

Summenformel: $\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{NO}$

Aussehen: weißes Pulver

Rf-Wert: 0,21 (Cyclohexan/Chloroform/Essigsäureethylester 90/10/1 (V/V/V))

Molare Masse: 377,18 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 377,44 $[\text{M}]^+$

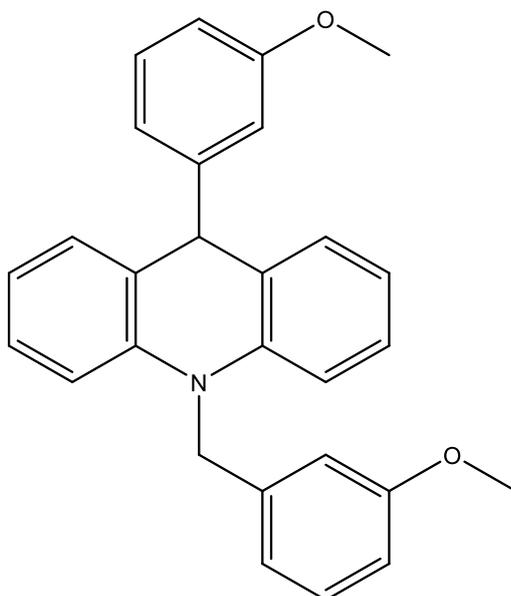
Schmelzbereich: 133-134 °C

HPLC 1: 91 % (Retentionszeit: 16,50 min)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm, 400 MHz, Methanol- d_4] = 7.34 – 7.24 (m, 5H, 2'-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H), 7.17 – 7.10 (m, 5H, 2-H, 7-H, 4-H, 5-H, 5''-H), 6.93 (t, $J = 1.2 \text{ Hz}$, 2H, 1-H, 8-H), 6.86 – 6.83 (m, 2H, 3-H, 6-H), 6.78 – 6.65 (m, 3H, 2''-H, 4''-H, 6''-H), 5.30 (s, 1H, 9-H), 5.25 (s, 2H, CH_2), 3.71 (s, 3H, OCH_3)

IR (ATR): KBr [ν in cm^{-1}]: 3008 w (arom. C-H, ν); 2948 w (aliph. C-H, ν); 2832 w (OCH_3 , ν); 1584 m (arom. C=C, ν); 1463 m, 1375 m (C-H, δ); 1269 m (C-N, ν)

DHA11 = 10-(3-methoxybenzyl)-9-(3-methoxyphenyl)-9,10-dihydroacridine



Darstellung:

844,1 mg von **A02** (2,81 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV4 mit 54,5 mg Kupfer(I)-iodid (0,29 mmol; 0,11 eq.), 32,0 mg Lithiumchlorid (0,75 mmol; 0,27 eq.) und 2,8 ml 3-Methoxyphenylmagnesiumbromid (1,0 M in THF; 13,5 mmol; 4,8 eq.) versetzt und für 7 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Chloroform/Essigsäureethylester 90/10/1 (V/V/V)

Experimenteller Teil

säulenchromatographisch aufgereinigt. Es entsteht ein weißlich-gelbes Öl, welches nach kurzer Lagerung im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute:

96,8 mg (0,24 mmol; $\eta = 8\%$)

Summenformel: $C_{28}H_{25}NO_2$

Aussehen: weißes Pulver

Rf-Wert: 0,29 (Cyclohexan/Chloroform/Essigester 90/10/1 (V/V/V))

Molare Masse: 407,19 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 407,74 $[M]^+$

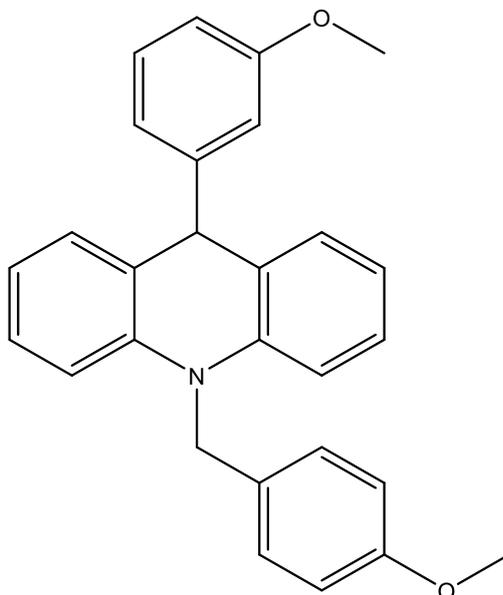
Schmelzbereich: 119-122°C

HPLC 1: 97 % (Retentionszeit: 16,35 min)

1H -NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol- d_4] = 7.30 – 7.25 (m, 2H, 5'-H, 5''-H), 7.16 – 7.04 (m, 4H, 2-H, 7-H, 4-H, 5-H), 6.93 (td, $J = 7.4, 1.1$ Hz, 2H, 1-H, 8-H), 6.87 – 6.74 (m, 6H, 2'-H, 4'-H, 6'-H, 2''-H, 4''-H, 6''-H), 6.72 – 6.66 (m, 2H, 3-H, 6-H), 5.30 (s, 1H, 9-H), 5.22 (s, 2H, CH_2), 3.71 (s, 3H, OCH_3 des Phenylrests), 3.71 (s, 3H, OCH_3 des Benzylrests)

IR (ATR): KBr [ν in cm^{-1}]: 3003 w (arom. C-H, ν); 2931 w (aliph. C-H, ν); 2831 w (OCH_3 , ν); 1590 m (arom. C=C, ν); 1479 s, 1374 m (C-H, δ); 1269 m (C-N, ν)

DHA12 = 10-(4-methoxybenzyl)-9-(3-methoxyphenyl)-9,10-dihydroacridine



Darstellung:

752,6 mg von **A03** (2,51 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV 4 mit 53,1 mg Kupfer(I)-iodid (0,28 mmol; 0,11 eq.), 27,1 mg Lithiumchlorid (0,64 mmol; 0,25 eq.) und 2,5 ml 3-Methoxyphenylmagnesiumbromid (1,0 M in THF; 12,1 mmol; 4,8 eq.) versetzt und für 18 h bei

Experimenteller Teil

Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Chloroform/Essigsäureethylester 90/10/1 (V/V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

669,4 mg (1,644 mmol, $\eta = 66\%$)

Summenformel: C₂₈H₂₅NO₂

Aussehen: weißes Pulver

Rf-Wert: 0,15 (Cyclohexan/Chloroform/Essigsäureethylester 90/10/1 (V/V/V))

Molare Masse: 407,19 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 408,08 [M+H]⁺

Schmelzbereich: 128-130 °C

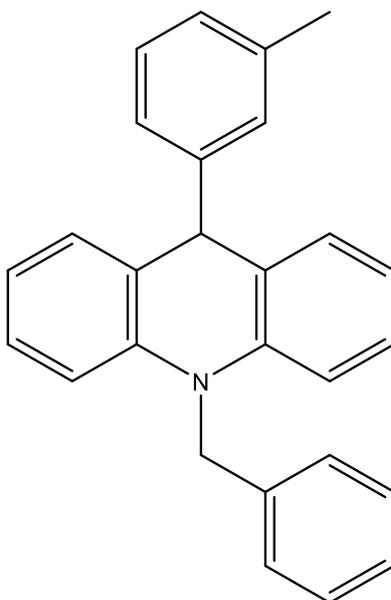
HPLC 1: 99 % (Retentionszeit: 16,63 min)

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.26 (dd, $J = 7.5, 1.6$ Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.15 – 7.07 (m, 5H, 2-H, 7-H, 4-H, 5-H, 5''-H), 6.92 (td, $J = 7.4, 1.1$ Hz, 2H, 1-H, 8-H), 6.89 – 6.84 (m, 4H, 3-H, 6-H, 3'-H, 5'-H), 6.77 – 6.64 (m, 3H, 2''-H, 4''-H, 6''-H), 5.28 (s, 1H, 9-H), 5.18 (s, 2H, CH₂), 3.80 (s, 3H, OCH₃ des Phenylrests), 3.70 (s, 3H, OCH₃ des Benzylrests)

¹³C-NMR: δ [ppm, 101 MHz, CDCl₃] = 159.82 (C-3'), 158.72 (C-4''), 148.08 (4a, 5a), 141.21 (C-1'), 129.59 (C-5'), 129.19 (C-3, C-6), 128.89 (C-1''), 127.51 (C-1, C-8), 127.48 (C-2'', C-6''), 126.35 (8a, 9a), 120.94 (C-4, C-5), 120.17 (C-6'), 114.35 (C-2, C-7), 113.95 (C-2'), 113.68 (C-3'', C-5''), 111.29 (C-4'), 55.40 (OCH₃ des Benzylrests), 55.19 (OCH₃ des Phenylrests), 50.38 (CH₂), 48.31 (9)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 2996 w, 2925 w, 2851 w (aliph. C-H, ν); 2830 w (OCH₃, ν); 1586 m (arom. C=C, ν); 1463 m, 1376 m (C-H; δ); 1271 m (C-N, ν)

DHA13 = 10-benzyl-9-(m-tolyl)-9,10-dihydroacridine



Darstellung:

363,0 mg von **A01** (1,34 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV4 mit 26,3 mg Kupfer(I)-iodid (0,14 mmol; 0,1 eq.), 13,1 mg Lithiumchlorid (0,31 mmol; 0,2 eq.) und 2,0 ml m-Tolylmagnesiumchlorid (1,0 M in THF; 12,7 mmol; 9,5 eq.) versetzt und für 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Chloroform 95/5 (V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

42,8 mg (0,12 mmol; $\eta = 9\%$)

Summenformel: C₂₇H₂₃N

Aussehen: weißes Pulver

Rf-Wert: 0,20 (Cyclohexan/Heptan 70/30 (V/V))

Molare Masse: 361,18 g/mol

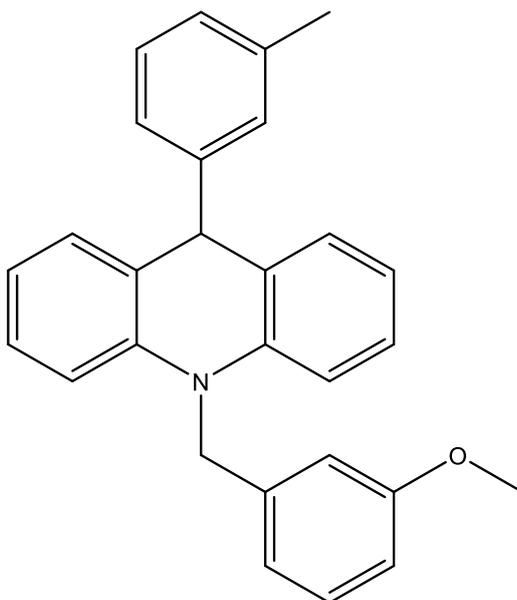
MS (ESI-positiv, m/z): 361,25 [M]⁺

Schmelzbereich: 153-155°C

HPLC 1: 98 % (Retentionszeit: 17,32 min)

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.34 – 7.22 (m, 5H, 2'-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H), 7.21 – 7.17 (m, 2H, 4-H, 5-H), 7.13 – 7.06 (m, 3H, 2-H, 7-H, 5''-H), 7.00 – 6.88 (m, 5H, 1-H, 8-H, 2''-H, 4''-H, 6''-H), 6.86 – 6.82 (m, 2H, 3-H, 6-H), 5.29 (s, 1H, 9-H), 5.25 (s, 2H, CH₂), 2.26 (s, 3H, CH₃)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 3024 w (arom. C-H, ν); 2922 w, 2853 w (aliph. C-H, ν); 1591 m (arom. C=C, ν); 1481 s, 1374 m (C-H, δ); 1269 w (C-N, ν)

DHA14 = 10-(3-methoxybenzyl)-9-(m-tolyl)-9,10-dihydroacridine**Darstellung:**

1,04 g von **A02** (3,46 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV4 mit 64,5 mg Kupfer(I)-iodid (0,34 mmol; 0,1 eq.), 33,5 mg Lithiumchlorid (0,79 mmol; 0,23 eq.) und 3,0 ml m-Tolylmagnesiumchlorid (1,0 M in THF; 19,1 mmol; 5,5 eq.) versetzt und für 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Chloroform/Essigsäureethylester 90/10/1 (V/V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt. Es entsteht ein weißliches Öl, welches nach kurzer Zeit durch Lagerung im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute:

54,6 mg (0,14 mmol; $\eta = 4\%$)

Summenformel: C₂₈H₂₅NO

Aussehen: weißes Pulver

Rf-Wert: 0,33 (Cyclohexan/Chloroform/Essigester 90/10/1 (V/V/V))

Molare Masse: 391,19 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 391,32 [M]⁺

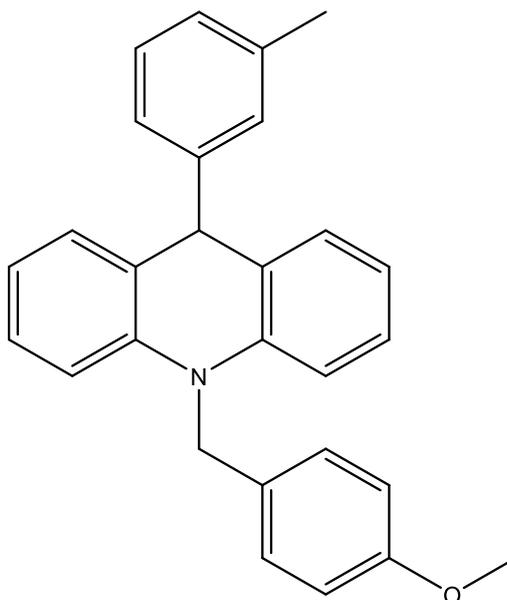
Schmelzbereich: 113-114°C

HPLC 1: 96 % (Retentionszeit: 16,71 min)

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.27 – 7.03 (m, 6H, 2-H, 7-H, 4-H, 5-H, 5'-H, 5''-H), 7.00 – 6.88 (m, 5H, 1-H, 8-H, 2''-H, 4''-H, 6''-H), 6.87 – 6.76 (m, 5H, 3-H, 6-H, 2'-H, 4'-H, 6'-H), 5.29 (s, 1H, 9-H), 5.21 (s, 2H, CH₂), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 2.25 (s, 3H, CH₃)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 3008 w (arom. C-H, ν); 2953 w, 2926 w (aliph. C-H, ν); 2829 w (OCH₃, ν); 1591 m (arom. C=C, ν); 1463 s, 1374 m (C-H, δ); 1269 m (C-N, ν)

DHA15 = 10-(4-methoxybenzyl)-9-(m-tolyl)-9,10-dihydroacridine



Darstellung:

1,02 g von **A03** (3,39 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV4 mit 78,1 mg Kupfer(I)-iodid (0,41 mmol; 0,12 eq.), 30,2 mg Lithiumchlorid (0,71 mmol; 0,21 eq.) und 3,4 ml m-Tolylmagnesiumchlorid (1,0 M in THF; 21,7 mmol; 6,4 eq.) versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Chloroform/Essigsäureethylester 80/15/5 (V/V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute:

456,4 mg (1,17 mmol; $\eta = 34\%$)

Summenformel: C₂₈H₂₅NO

Aussehen: weißes Pulver

Rf-Wert: 0,27 (Cyclohexan/Chloroform/Essigester 80/15/5 (V/V/V))

Molare Masse: 391,19 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 391,19 [M]⁺

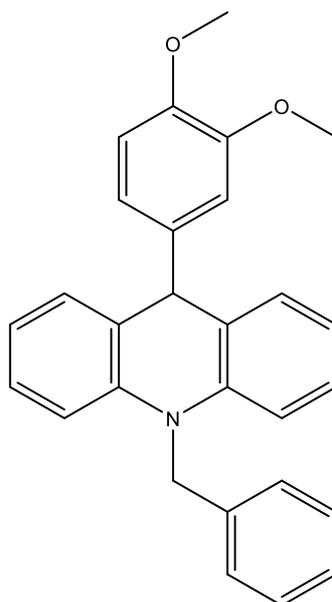
Schmelzbereich: 131-132°C

HPLC 1: 95 % (Retentionszeit: 17,02 min)

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.25 – 7.12 (m, 2H, 4-H, 5-H), 7.15 – 7.05 (m, 5H, 2-H, 7-H, 2'-H, 6'-H, 5''-H), 6.99 – 6.84 (m, 9H, 3-H, 6-H, 1-H, 8-H, 3'-H, 5'-H, 2''-H, 4''-H, 6''-H), 5.27 (s, 1H, 9-H), 5.18 (s, 2H, CH₂), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 2.25 (s, 3H, CH₃)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 2995 w, 2932 w (aliph. C-H, ν); 2833 w (OCH₃, ν); 1588 m (arom. C=C, ν); 1457 m, 1370 m (C-H, δ); 1267 m (C-N, ν)

DHA16 = 10-benzyl-9-(3,4-dimethoxyphenyl)-9,10-dihydroacridine



Darstellung:

546,7 mg von **A01** (2,02 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV4 mit 38,3 mg Kupfer(I)-iodid (0,20 mmol; 0,1 eq.), 17,2 mg Lithiumchlorid (0,41 mmol; 0,2 eq.) und 4,0 ml 3,4-Dimethoxyphenylmagnesiumbromid (0,5 M in THF; 15,91 mmol; 7,9 eq.) versetzt und für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Chloroform/Essigsäureethylester 80/15/5 (V/V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt. Es entsteht ein farbloses Öl, welches bei kurzer Lagerung im Tiefkühlschrank zu einem weißen Feststoff ausfällt.

Ausbeute:

346,5 mg (0,85 mmol; $\eta = 42\%$)

Summenformel: C₂₈H₂₅NO₂

Aussehen: weißes Pulver

Rf-Wert: 0,28 (Cyclohexan/Chloroform/Essigester 80/15/5 (V/V/V))

Molare Masse: 407,19 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 407,44 [M]⁺

Schmelzbereich: 124-126°C

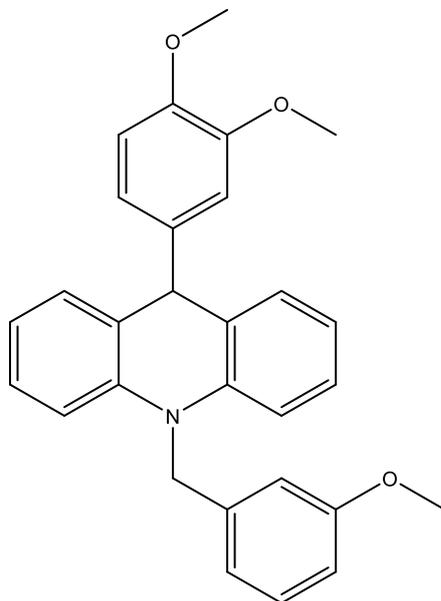
HPLC 1: 97 % (Retentionszeit: 16,05 min)

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.33 – 7.23 (m, 5H, 2'-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H), 7.19 – 7.15 (m, 2H, 4-H, 5-H), 7.11 (ddd, $J = 8.5, 7.3, 1.6$ Hz, 2H, 2-H, 7-H), 6.96 – 6.92 (m, 2H, 1-H, 8-H), 6.87 – 6.83 (m, 2H, 3-H, 6-H), 6.80 (s, 1H, 2''-H), 6.74 – 6.65 (m, 2H, 5''-H, 6''-H), 5.27 (s, 1H, 9-H), 5.25 (s, 2H, CH₂), 3.79 (s, 3H, OCH₃ in Position 4), 3.69 (s, 3H, OCH₃ in Position 3)

Experimenteller Teil

IR (ATR): KBr [ν in cm^{-1}]: 2997 w, 2930 w (aliphatic C-H, ν); 2835 w (OCH_3 , ν); 1588 m, 1496 s (aromatic C=C, ν); 1474 w, 1376 m (C-H, δ); 1257 m (C-N, ν)

DHA17 = 9-(3,4-dimethoxyphenyl)-10-(3-methoxybenzyl)-9,10-dihydroacridine



Darstellung:

677,5 mg von **A02** (2,26 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV4 mit 50,8 mg Kupfer(I)-iodid (0,24 mmol; 0,1 eq.), 23,4 mg Lithiumchlorid (0,57 mmol; 0,23 eq.) und 4,5 ml 3,4-Dimethoxyphenylmagnesiumbromid (0,5 M in THF; 18,6 mmol; 7,7 eq.) versetzt und für 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Chloroform/Essigsäureethylester 80/15/5 (V/V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt. Es entsteht ein weißlich-gelbes Öl, welches durch Zusatz von Methanol im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute:

51,2 mg (0,12 mmol; $\eta = 5\%$)

Summenformel: $\text{C}_{29}\text{H}_{27}\text{NO}_3$

Aussehen: weißes Pulver

Rf-Wert: 0,15 (Cyclohexan/Chloroform/Essigester 90/10/1 (V/V/V))

Molare Masse: 437,20 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 437,25 $[\text{M}]^+$

Schmelzbereich: 128-130°C

HPLC 1: 93 % (Retentionszeit: 16,30 min)

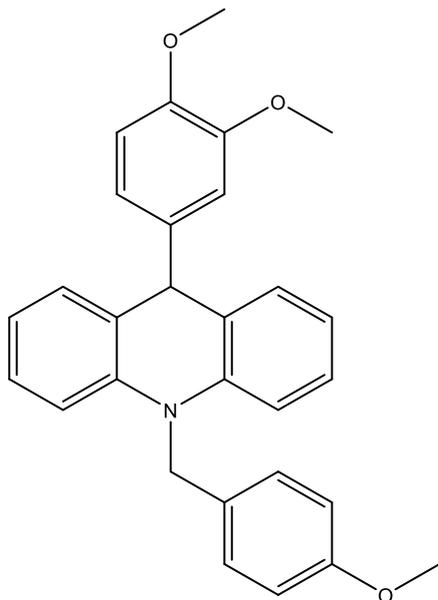
$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm, 400 MHz, Methanol- d_4] = 7.22 – 7.16 (m, 1H, 5''-H), 7.08 – 7.02 (m, 4H, 2-H, 7-H, 4-H, 5-H), 6.88 (td, $J = 7.2, 1.0$ Hz, 7H, 1-H, 8-H, 2'-H, 4'-H, 6'-H, 5''-H, 6''-H), 6.78 – 6.71 (m, 3H, 3-

Experimenteller Teil

H, 6-H, 2''-H), 5.14 (s, 3H, 9-H, CH₂), 4.04 (s, 3H, OCH₃ in Position 4 des Phenylrests), 3.80 (s, 6H, OCH₃ in Position 3 des Phenylrests, OCH₃ des Benzylrests)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 3005 w (arom. C-H, ν); 2838 w (OCH₃, ν); 1595 m (arom. C=C, ν); 1480 s, 1375 m (C-H, δ); 1268 m (C-N, ν)

DHA18 = 9-(3,4-dimethoxyphenyl)-10-(4-methoxybenzyl)-9,10-dihydroacridine



Darstellung:

1,15 g von **A03** (3,82 mmol; 1 eq.) werden gemäß AAV4 mit 68,7 mg Kupfer(I)-iodid (0,36 mmol; 0,09 eq.), 32,8 mg Lithiumchlorid (0,77 mmol; 0,20 eq.) und 6,6 ml 3,4-Dimethoxyphenylmagnesiumbromid (0,5 M in THF; 26,3 mmol; 6,9 eq.) versetzt und für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Extraktion wird das Rohprodukt mit dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Chloroform/Essigsäureethylester 90/10/1 (V/V/V) säulenchromatographisch aufgereinigt. Es entsteht ein farbloses Öl, welches nach kurzer Zeit durch Lagerung im Tiefkühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute:

79,8 mg (0,18 mmol; η = 5%)

Summenformel: C₂₉H₂₇NO₃

Aussehen: weißes Pulver

Rf-Wert: 0,24 (Cyclohexan/Chloroform/Essigester 90/10/1 (V/V/V))

Molare Masse: 437,20 g/mol

MS (ESI-positiv, m/z): 437,20 [M]⁺

Schmelzbereich: 123-124°C

HPLC 1: 93 % (Retentionszeit: 16,37 min)

Experimenteller Teil

¹H-NMR: δ [ppm, 400 MHz, Methanol-d₄] = 7.21 – 7.14 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.16 – 7.08 (m, 2H, 4-H, 5-H), 7.08 – 7.04 (m, 2H, 2-H, 7-H), 6.91 – 6.85 (m, 7H, 1-H, 8-H, 3'-H, 5'-H, 2''-H, 5''-H, 6''-H), 6.74 – 6.72 (m, 2H, 3-H, 6-H), 5.13 (s, 3H, 9-H, CH₂), 4.04 (s, 3H, OCH₃ in Position 4 des Phenylrests), 3.79 (s, 6H, OCH₃ in Position 3 des Phenylrests, OCH₃ des Benzylrests)

IR (ATR): KBr [ν in cm⁻¹]: 3005 w (arom. C-H, ν); 2912 w (aliph. C-H, ν); 2838 w (OCH₃, ν); 1596 m (arom. C=C, ν); 1466 m, 1375 m (C-H, δ); 1253 m (C-N, ν)

References

1. Exner, M. *et al.* Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria? *GMS hygiene and infection control* **12**, Doc05; 10.3205/dgkh000290 (2017).
2. Hamilton, W. L. *et al.* Evolution and expansion of multidrug-resistant malaria in southeast Asia: a genomic epidemiology study. *The Lancet Infectious Diseases* **19**, 943–951; 10.1016/s1473-3099(19)30392-5 (2019).
3. World Health Organization. Cancer. Available at <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (2021).
4. Statistisches Bundesamt. Krebs war 2019 für ein Viertel aller Todesfälle in Deutschland verantwortlich. Available at https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2021/02/PD21_N010_231.html (2021).
5. Teillant, A., Gandra, S., Barter, D., Morgan, D. J. & Laxminarayan, R. Potential burden of antibiotic resistance on surgery and cancer chemotherapy antibiotic prophylaxis in the USA: a literature review and modelling study. *The Lancet Infectious Diseases* **15**, 1429–1437; 10.1016/S1473-3099(15)00270-4 (2015).
6. Xu, Y. *et al.* Spread of MCR-3 Colistin Resistance in China: An Epidemiological, Genomic and Mechanistic Study. *EBioMedicine* **34**, 139–157; 10.1016/j.ebiom.2018.07.027 (2018).
7. World Health Organization. 10 global health issues to track in 2021. Available at <https://www.who.int/news-room/spotlight/10-global-health-issues-to-track-in-2021> (2021).
8. Higgins, C. F. ABC transporters. From microorganisms to man. *Annual review of cell biology* **8**, 67–113; 10.1146/annurev.cb.08.110192.000435 (1992).
9. Gottesman, M. M. & Ling, V. The molecular basis of multidrug resistance in cancer. The early years of P-glycoprotein research. *FEBS letters* **580**, 998–1009; 10.1016/j.febslet.2005.12.060 (2006).
10. Choi, C.-H. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell International* **5**, 30; 10.1186/1475-2867-5-30 (2005).
11. Lage, H. An overview of cancer multidrug resistance. A still unsolved problem. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 3145; 10.1007/s00018-008-8111-5 (2008).
12. Krishna, R. & Mayer, L. D. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* **11**, 265–283 (2000).
13. Jain, R. K. Transport of Molecules in the Tumor Interstitium: A Review. *Cancer Res* **47**, 3039–3051 (1987).
14. Demant, E. J., Sehested, M. & Jensen, P. B. A model for computer simulation of P-glycoprotein and transmembrane delta pH-mediated anthracycline transport in multidrug-resistant tumor cells. *Biochimica et biophysica acta* **1055**, 117–125; 10.1016/0167-4889(90)90111-p (1990).

15. Liu, J. *et al.* Overexpression of glutathione S-transferase II and multidrug resistance transport proteins is associated with acquired tolerance to inorganic arsenic. *Molecular pharmacology* **60**, 302–309; 10.1124/mol.60.2.302 (2001).
16. Ullah, M. F. Cancer multidrug resistance (MDR): a major impediment to effective chemotherapy. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* **9**, 1–6 (2008).
17. Drake, F. H. *et al.* Purification of topoisomerase II from amsacrine-resistant P388 leukemia cells. Evidence for two forms of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **262**, 16739–16747 (1987).
18. Gottesman, M. M. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual review of medicine* **53**, 615–627; 10.1146/annurev.med.53.082901.103929 (2002).
19. Eckford, P. D. W. & Sharom, F. J. ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs. *Chemical reviews* **109**, 2989–3011; 10.1021/cr9000226 (2009).
20. Szakács, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C. & Gottesman, M. M. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 219–234; 10.1038/nrd1984 (2006).
21. Dietel, M., Arps, H., Lage, H. & Niendorf, A. Membrane Vesicle Formation Due to Acquired Mitoxantrone Resistance in Human Gastric Carcinoma Cell Line EPG85-257. *Cancer Res* **50**, 6100–6106 (1990).
22. Ghebreyesus, T. A. Urgent health challenges for the next decade. Available at https://www.who.int/news-room/photo-story/photo-story-detail/urgent-health-challenges-for-the-next-decade?utm_source=STAT+Newsletters&utm_campaign=1931cb646b-MR_COPY_02&utm_medium=email&utm_term=0_8cab1d7961-1931cb646b-150708293 (2020).
23. Cassini, A. *et al.* Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases* **19**, 56–66; 10.1016/S1473-3099(18)30605-4 (2019).
24. Bundesministerium für Gesundheit. DART 2020 - Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie. Available at <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/antibiotika-resistenzen/antibiotika-resistenzstrategie.html> (2019).
25. Dyar, O. J., Huttner, B., Schouten, J. & Pulcini, C. What is antimicrobial stewardship? *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **23**, 793–798; 10.1016/j.cmi.2017.08.026 (2017).
26. Morehead, M. S. & Scarbrough, C. Emergence of Global Antibiotic Resistance. *Primary care* **45**, 467–484; 10.1016/j.pop.2018.05.006 (2018).
27. Watkins, R. R. & Bonomo, R. A. Overview: Global and Local Impact of Antibiotic Resistance. *Infectious disease clinics of North America* **30**, 313–322; 10.1016/j.idc.2016.02.001 (2016).
28. El-Sayed Ahmed, M. A. E.-G. *et al.* Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019). *Emerging microbes & infections* **9**, 868–885; 10.1080/22221751.2020.1754133 (2020).

29. van Hoek, A. H. A. M. *et al.* Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in microbiology* **2**, 203; 10.3389/fmicb.2011.00203 (2011).
30. Alekshun, M. N. & Levy, S. B. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* **128**, 1037–1050; 10.1016/j.cell.2007.03.004 (2007).
31. Munita, J. M. & Arias, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum* **4**; 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015 (2016).
32. Mlynarcik, P. & Kolar, M. Molecular mechanisms of polymyxin resistance and detection of mcr genes. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* **163**, 28–38; 10.5507/bp.2018.070 (2019).
33. Lubelski, J., Konings, W. N. & Driessen, A. J. M. Distribution and Physiology of ABC-Type Transporters Contributing to Multidrug Resistance in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 463–476; 10.1128/MMBR.00001-07 (2007).
34. van Veen, H. W. *et al.* Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 10668–10672; 10.1073/pnas.93.20.10668 (1996).
35. Higgins, C. F. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* **446**, 749–757; 10.1038/nature05630 (2007).
36. Nikaido, H. Multidrug resistance in bacteria. *Annual review of biochemistry* **78**, 119–146; 10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923 (2009).
37. Piddock, L. J. V. Multidrug-resistance efflux pumps ? not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* **4**, 629–636; 10.1038/nrmicro1464 (2006).
38. Kern, J. M. Multiresistente grampositive Erreger (MRSA, VRE). In *SpringerReference Innere Medizin*, edited by H. Lehnert, *et al.* (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2015), pp. 1–15.
39. JEVONS, M. P., COE, A. W. & PARKER, M. T. Methicillin resistance in staphylococci. *Lancet (London, England)* **1**, 904–907; 10.1016/s0140-6736(63)91687-8 (1963).
40. Hiramatsu, K., Asada, K., Suzuki, E., Okonogi, K. & Yokota, T. Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of mecA gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *FEBS Lett* **298**, 133–136; 10.1016/0014-5793(92)80039-J (1992).
41. Hayes, M. V., Curtis, N. A. C., Wyke, A. W. & Ward, J. B. Decreased affinity of a penicillin-binding protein for β -lactam antibiotics in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin. *FEMS Microbiology Letters* **10**, 119–122 (1981).
42. Zipperer, A. *et al.* Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature* **535**, 511–516; 10.1038/nature18634 (2016).
43. Bitschar, K. *et al.* Lugdunin amplifies innate immune responses in the skin in synergy with host- and microbiota-derived factors. *Nature Communications* **10**, 1–14; 10.1038/s41467-019-10646-7 (2019).

44. vfa. Neue Antibiotika und Impfstoffe gegen Bakterien in Entwicklung. Available at <https://www.vfa.de/de/arzneimittel-forschung/woran-wir-forschen/neue-antibiotika-den-vorsprung-wahren.html/antibakterielle-pipeline.html> (2020).
45. Al-Tawfiq, J. A. *et al.* Antibiotics in the pipeline: a literature review (2017-2020). *Infection* **50**, 553–564; 10.1007/s15010-021-01709-3 (2022).
46. Hyde, S. C. *et al.* Structural model of ATP-binding proteing associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* **346**, 362; 10.1038/346362a0 (1990).
47. Ames, G. F., Mimura, C. S. & Shyamala, V. Bacterial periplasmic permeases belong to a family of transport proteins operating from Escherichia coli to human: Traffic ATPases. *FEMS microbiology reviews* **6**, 429–446; 10.1111/j.1574-6968.1990.tb04110.x (1990).
48. Sharom, F. J. ABC multidrug transporters. Structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* **9**, 105–127; 10.2217/14622416.9.1.105 (2008).
49. Rees, D. C., Johnson, E. & Lewinson, O. ABC transporters. The power to change. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 218; 10.1038/nrm2646 (2009).
50. Döring, B. & Petzinger, E. Phase 0 and phase III transport in various organs. Combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism. *Drug metabolism reviews* **46**, 261–282; 10.3109/03602532.2014.882353 (2014).
51. Higgins, C. F. *et al.* A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* **323**, 448; 10.1038/323448a0 (1986).
52. Davidson, A. L. & Chen, J. ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annual review of biochemistry* **73**, 241–268; 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073626 (2004).
53. Dean, M., Hamon, Y. & Chimini, G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* **42**, 1007–1017 (2001).
54. Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. & Gay, N. J. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO journal* **1**, 945–951 (1982).
55. Shyamala, V., Baichwal, V., Beall, E. & Ames, G. F. Structure-function analysis of the histidine permease and comparison with cystic fibrosis mutations. *J. Biol. Chem.* **266**, 18714–18719 (1991).
56. Loo, T. W., Bartlett, M. C. & Clarke, D. M. The “LSGGQ” Motif in Each Nucleotide-binding Domain of Human P-glycoprotein Is Adjacent to the Opposing Walker A Sequence. *J. Biol. Chem.* **277**, 41303–41306; 10.1074/jbc.C200484200 (2002).
57. Gerlach, J. H. *et al.* Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature* **324**, 485–489; 10.1038/324485a0 (1986).
58. Raviv, Y., Pollard, H. B., Bruggemann, E. P., Pastan, I. & Gottesman, M. M. Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells. *The Journal of biological chemistry* **265**, 3975–3980 (1990).

59. Shapiro, A. B., Corder, A. B. & Ling, V. P-glycoprotein-mediated Hoechst 33342 transport out of the lipid bilayer. *European journal of biochemistry* **250**, 115–121; 10.1111/j.1432-1033.1997.00115.x (1997).
60. Shapiro, A. B. & Ling, V. Extraction of Hoechst 33342 from the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane by P-glycoprotein. *European journal of biochemistry* **250**, 122–129; 10.1111/j.1432-1033.1997.00122.x (1997).
61. Loo, T. W., Bartlett, M. C. & Clarke, D. M. The drug-binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein is accessible to the aqueous medium. *Biochemistry* **43**, 12081–12089; 10.1021/bi049045t (2004).
62. Lugo, M. R. & Sharom, F. J. Interaction of LDS-751 with P-glycoprotein and mapping of the location of the R drug binding site. *Biochemistry* **44**, 643–655; 10.1021/bi0485326 (2005).
63. Higgins, C. F. & Gottesman, M. M. Is the multidrug transporter a flippase? *Trends in Biochemical Sciences* **17**, 18–21; 10.1016/0968-0004(92)90419-A (1992).
64. Eytan, G. D., Regev, R., Oren, G. & Assaraf, Y. G. The Role of Passive Transbilayer Drug Movement in Multidrug Resistance and Its Modulation. *J. Biol. Chem.* **271**, 12897–12902; 10.1074/jbc.271.22.12897 (1996).
65. Regev, R., Yeheskely-Hayon, D., Katzir, H. & Eytan, G. D. Transport of anthracyclines and mitoxantrone across membranes by a flip-flop mechanism. *Biochemical Pharmacology* **70**, 161–169; 10.1016/j.bcp.2005.03.032 (2005).
66. Loo, T. W. & Clarke, D. M. Do drug substrates enter the common drug-binding pocket of P-glycoprotein through “gates”? *Biochemical and biophysical research communications* **329**, 419–422; 10.1016/j.bbrc.2005.01.134 (2005).
67. Loo, T. W., Bartlett, M. C. & Clarke, D. M. Substrate-induced Conformational Changes in the Transmembrane Segments of Human P-glycoprotein DIRECT EVIDENCE FOR THE SUBSTRATE-INDUCED FIT MECHANISM FOR DRUG BINDING. *J. Biol. Chem.* **278**, 13603–13606; 10.1074/jbc.C300073200 (2003).
68. Ozben, T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS letters* **580**, 2903–2909; 10.1016/j.febslet.2006.02.020 (2006).
69. Silva, R., Vilas-Boas, V., Carmo, H., Dinis-Oliveira, R. J. & Carvalho, F. Modulation of P-glycoprotein efflux pump. Induction and activation as a therapeutic strategy. *Pharmacology & Therapeutics* **149**, 1–123; 10.1016/j.pharmthera.2014.11.013 (2015).
70. Dean, M. & Annilo, T. EVOLUTION OF THE ATP-BINDING CASSETTE (ABC) TRANSPORTER SUPERFAMILY IN VERTEBRATES *. *Annual review of genomics and human genetics*, 123–146 (2005).
71. Ward, A., Reyes, C. L., Yu, J., Roth, C. B. & Chang, G. Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist. *PNAS* **104**, 19005–19010; 10.1073/pnas.0709388104 (2007).
72. Locher, K. P., Lee, A. T. & Rees, D. C. The E. coli BtuCD Structure: A Framework for ABC Transporter Architecture and Mechanism. *Science* **296**, 1091–1098; 10.1126/science.1071142 (2002).

73. Szöllősi, D., Rose-Sperling, D., Hellmich, U. A. & Stockner, T. Comparison of mechanistic transport cycle models of ABC exporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1860**, 818–832; 10.1016/j.bbamem.2017.10.028 (2018).
74. Higgins, C. F. & Linton, K. J. The ATP switch model for ABC transporters. *Nature structural & molecular biology* **11**, 918–926; 10.1038/nsmb836 (2004).
75. Chen, J., Lu, G., Lin, J., Davidson, A. L. & Quijcho, F. A. A Tweezers-like Motion of the ATP-Binding Cassette Dimer in an ABC Transport Cycle. *Molecular cell* **12**, 651–661; 10.1016/j.molcel.2003.08.004 (2003).
76. Janas, E. *et al.* The ATP hydrolysis cycle of the nucleotide-binding domain of the mitochondrial ATP-binding cassette transporter Mdl1p. *The Journal of biological chemistry* **278**, 26862–26869; 10.1074/jbc.M301227200 (2003).
77. Senior, A. E., al-Shawi, M. K. & Urbatsch, I. L. The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS letters* **377**, 285–289; 10.1016/0014-5793(95)01345-8 (1995).
78. George, A. M. & Jones, P. M. Perspectives on the structure–function of ABC transporters: The Switch and Constant Contact Models. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **109**, 95–107; 10.1016/j.pbiomolbio.2012.06.003 (2012).
79. Sauna, Z. E. & Ambudkar, S. V. About a switch: how P-glycoprotein (ABCB1) harnesses the energy of ATP binding and hydrolysis to do mechanical work. *Mol Cancer Ther* **6**, 13–23; 10.1158/1535-7163.MCT-06-0155 (2007).
80. Sauna, Z. E. *et al.* Catalytic cycle of ATP hydrolysis by P-glycoprotein: evidence for formation of the E.S reaction intermediate with ATP-gamma-S, a nonhydrolyzable analogue of ATP. *Biochemistry* **46**, 13787–13799; 10.1021/bi701385t (2007).
81. Siarheyeva, A., Liu, R. & Sharom, F. J. Characterization of an Asymmetric Occluded State of P-glycoprotein with Two Bound Nucleotides IMPLICATIONS FOR CATALYSIS. *J. Biol. Chem.* **285**, 7575–7586; 10.1074/jbc.M109.047290 (2010).
82. van Veen, H. W., Margolles, A., Müller, M., Higgins, C. F. & Konings, W. N. The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism. *The EMBO journal* **19**, 2503–2514; 10.1093/emboj/19.11.2503 (2000).
83. Jones, P. M. & George, A. M. A reciprocating twin-channel model for ABC transporters. *Quarterly Reviews of Biophysics* **47**, 189–220; 10.1017/S0033583514000031 (2014).
84. Smith, P. C. *et al.* ATP Binding to the Motor Domain from an ABC Transporter Drives Formation of a Nucleotide Sandwich Dimer. *Molecular cell* **10**, 139–149 (2002).
85. Rosenberg, M. F. *et al.* Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle. *The EMBO journal* **20**, 5615–5625; 10.1093/emboj/20.20.5615 (2001).
86. Al-Shawi, M. K., Polar, M. K., Omote, H. & Figler, R. A. Transition State Analysis of the Coupling of Drug Transport to ATP Hydrolysis by P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **278**, 52629–52640; 10.1074/jbc.M308175200 (2003).

87. Loo, T. W. & Clarke, D. M. Covalent Modification of Human P-glycoprotein Mutants Containing a Single Cysteine in Either Nucleotide-binding Fold Abolishes Drug-stimulated ATPase Activity. *J. Biol. Chem.* **270**, 22957–22961; 10.1074/jbc.270.39.22957 (1995).
88. Urbatsch, I. L., Beaudet, L., Carrier, I. & Gros, P. Mutations in either nucleotide-binding site of P-glycoprotein (Mdr3) prevent vanadate trapping of nucleotide at both sites. *Biochemistry* **37**, 4592–4602; 10.1021/bi9728001 (1998).
89. Urbatsch, I. L., Sankaran, B., Weber, J. & Senior, A. E. P-glycoprotein Is Stably Inhibited by Vanadate-induced Trapping of Nucleotide at a Single Catalytic Site. *J. Biol. Chem.* **270**, 19383–19390; 10.1074/jbc.270.33.19383 (1995).
90. Urbatsch, I. L., Sankaran, B., Bhagat, S. & Senior, A. E. Both P-glycoprotein Nucleotide-binding Sites Are Catalytically Active. *J. Biol. Chem.* **270**, 26956–26961; 10.1074/jbc.270.45.26956 (1995).
91. Shapiro, A. B. & Ling, V. Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities. *European journal of biochemistry* **250**, 130–137; 10.1111/j.1432-1033.1997.00130.x (1997).
92. Shapiro, A. B., Fox, K., Lam, P. & Ling, V. Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. *European journal of biochemistry* **259**, 841–850; 10.1046/j.1432-1327.1999.00098.x (1999).
93. Aller, S. G. *et al.* Structure of P-glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. *Science (New York, N.Y.)* **323**, 1718–1722; 10.1126/science.1168750 (2009).
94. Mitra, R. *et al.* Location of contact residues in pharmacologically distinct drug binding sites on P-glycoprotein. *Biochemical Pharmacology* **123**, 19–28; 10.1016/j.bcp.2016.10.002 (2017).
95. Jagodinsky, J. C. & Akgun, U. Characterizing the binding interactions between P-glycoprotein and eight known cardiovascular transport substrates. *Pharmacology Research & Perspectives* **3**; 10.1002/prp2.114 (2015).
96. Loo, T. W. & Clarke, D. M. Identification of residues within the drug-binding domain of the human multidrug resistance P-glycoprotein by cysteine-scanning mutagenesis and reaction with dibromobimane. *The Journal of biological chemistry* **275**, 39272–39278; 10.1074/jbc.M007741200 (2000).
97. Loo, T. W. & Clarke, D. M. The Packing of the Transmembrane Segments of Human Multidrug Resistance P-glycoprotein Is Revealed by Disulfide Cross-linking Analysis. *J. Biol. Chem.* **275**, 5253–5256; 10.1074/jbc.275.8.5253 (2000).
98. Ueda, K. *et al.* The human multidrug resistance (mdr1) gene. cDNA cloning and transcription initiation. *J. Biol. Chem.* **262**, 505–508 (1987).
99. Juliano, R. L. & Ling, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **455**, 152–162; 10.1016/0005-2736(76)90160-7 (1976).
100. Abolhoda, A. *et al.* Rapid Activation of MDR1 Gene Expression in Human Metastatic Sarcoma after in Vivo Exposure to Doxorubicin. *Clin Cancer Res* **5**, 3352–3356 (1999).

101. Goldstein, L. J. *et al.* Expression of Multidrug Resistance Gene in Human Cancers. *J Natl Cancer Inst* **81**, 116–124; 10.1093/jnci/81.2.116 (1989).
102. Chan, H. S. *et al.* P-Glycoprotein Expression as a Predictor of the Outcome of Therapy for Neuroblastoma. *New England Journal of Medicine* **325**, 1608–1614; 10.1056/NEJM199112053252304 (1991).
103. Thiebaut, F. *et al.* Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *PNAS* **84**, 7735–7738; 10.1073/pnas.84.21.7735 (1987).
104. Chaudhary, P. M., Mechetner, E. B. & Roninson, I. B. Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood* **80**, 2735–2739 (1992).
105. Thiebaut, F. *et al.* Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **37**, 159–164; 10.1177/37.2.2463300 (1989).
106. BEAULIEU, É., DEMEULE, M., GHITESCU, L. & BÉLIVEAU, R. P-glycoprotein is strongly expressed in the luminal membranes of the endothelium of blood vessels in the brain. *Biochem J* **326**, 539–544; 10.1042/bj3260539 (1997).
107. Melaine, N. *et al.* Multidrug Resistance Genes and P-Glycoprotein in the Testis of the Rat, Mouse, Guinea Pig, and Human. *Biol Reprod* **67**, 1699–1707; 10.1095/biolreprod.102.003558 (2002).
108. Saito, T. *et al.* Expression of P-glycoprotein in inner ear capillary endothelial cells of the guinea pig with special reference to blood–inner ear barrier. *Brain Research* **767**, 388–392; 10.1016/S0006-8993(97)00821-4 (1997).
109. Arceci, R. J., Croop, J. M., Horwitz, S. B. & Housman, D. The gene encoding multidrug resistance is induced and expressed at high levels during pregnancy in the secretory epithelium of the uterus. *PNAS* **85**, 4350–4354; 10.1073/pnas.85.12.4350 (1988).
110. Mylona, P., Glazier, J. D., Greenwood, S. L., Sides, M. K. & Sibley, C. P. Expression of the cystic fibrosis (CF) and multidrug resistance (MDR1) genes during development and differentiation in the human placenta. *Molecular human reproduction* **2**, 693–698; 10.1093/molehr/2.9.693 (1996).
111. Ceckova-Novotna, M., Pavek, P. & Staud, F. P-glycoprotein in the placenta: Expression, localization, regulation and function. *Reproductive Toxicology* **22**, 400–410; 10.1016/j.reprotox.2006.01.007 (2006).
112. Gil, S., Saura, R., Forestier, F. & Farinotti, R. P-glycoprotein expression of the human placenta during pregnancy. *Placenta* **26**, 268–270; 10.1016/j.placenta.2004.05.013 (2005).
113. Szaflarski, W. *et al.* Nuclear localization of P-glycoprotein is responsible for protection of the nucleus from doxorubicin in the resistant LoVo cell line. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **67**, 497–502; 10.1016/j.biopha.2013.03.011 (2013).

114. Babakhanian, K., Bendayan, M. & Bendayan, R. Localization of P-glycoprotein at the nuclear envelope of rat brain cells. *Biochemical and biophysical research communications* **361**, 301–306; 10.1016/j.bbrc.2007.06.176 (2007).
115. Molinari, A., Cianfriglia, M., Meschini, S., Calcabrini, A. & Arancia, G. P-glycoprotein expression in the Golgi apparatus of multidrug-resistant cells. *International Journal of Cancer* **59**, 789–795; 10.1002/ijc.2910590614 (1994).
116. Lown, K. S. *et al.* Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **62**, 248–260; 10.1016/S0009-9236(97)90027-8 (1997).
117. Wachter, V. J., Wu, C.-Y. & Benet, L. Z. Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: Implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Molecular Carcinogenesis* **13**, 129–134; 10.1002/mc.2940130302 (1995).
118. Benet, L. Z. & Cummins, C. L. The drug efflux–metabolism alliance: biochemical aspects. *Advanced Drug Delivery Reviews* **50**, S3-S11; 10.1016/S0169-409X(01)00178-8 (2001).
119. Esser, L. *et al.* Structures of the Multidrug Transporter P-glycoprotein Reveal Asymmetric ATP Binding and the Mechanism of Polyspecificity. *J. Biol. Chem.* **292**, 446–461; 10.1074/jbc.M116.755884 (2017).
120. Schneider, E. & Hunke, S. ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: Functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev* **22**, 1–20; 10.1111/j.1574-6976.1998.tb00358.x (1998).
121. Schmees, G., Stein, A., Hunke, S., Landmesser, H. & Schneider, E. Functional consequences of mutations in the conserved 'signature sequence' of the ATP-binding-cassette protein MALK. *European journal of biochemistry* **266**, 420–430; 10.1046/j.1432-1327.1999.00871.x (1999).
122. Ambudkar, S. V., Kim, I.-W., Di Xia & Sauna, Z. E. The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding. *FEBS letters* **580**, 1049–1055; 10.1016/j.febslet.2005.12.051 (2006).
123. Grossmann, N. *et al.* Mechanistic determinants of the directionality and energetics of active export by a heterodimeric ABC transporter. *Nature Communications* **5**; 10.1038/ncomms6419.
124. Linton, K. J. Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda, Md.)* **22**, 122–130; 10.1152/physiol.00046.2006 (2007).
125. Zaitseva, J., Jenewein, S., Jumpertz, T., Holland, I. B. & Schmitt, L. H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *The EMBO journal* **24**, 1901–1910; 10.1038/sj.emboj.7600657 (2005).
126. Kluth, M. *et al.* A Mutation within the Extended X Loop Abolished Substrate-induced ATPase Activity of the Human Liver ATP-binding Cassette (ABC) Transporter MDR3. *J. Biol. Chem.* **290**, 4896–4907; 10.1074/jbc.M114.588566 (2015).
127. Hrycyna, C. A. *et al.* Both ATP sites of human P-glycoprotein are essential but not symmetric. *Biochemistry* **38**, 13887–13899; 10.1021/bi991115m (1999).

128. Müller, M. *et al.* Altered Drug-stimulated ATPase Activity in Mutants of the Human Multidrug Resistance Protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 1877–1883; 10.1074/jbc.271.4.1877 (1996).
129. Azzaria, M., Schurr, E. & Gros, P. Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance. *Molecular and cellular biology* **9**, 5289–5297 (1989).
130. Wollmann, J., Richter, M., Molnár, J. & Hilgeroth, A. First Insight into the Symmetry and Flexibility of Membrane Efflux Pump P-Glycoprotein by Novel Bifunctional Modulators. *ChemBioChem* **6**, 1353–1356; 10.1002/cbic.200400401 (2005).
131. Ambudkar, S. V. *et al.* Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annual review of pharmacology and toxicology* **39**, 361–398; 10.1146/annurev.pharmtox.39.1.361 (1999).
132. Gameiro, M. *et al.* Cellular Models and In Vitro Assays for the Screening of modulators of P-gp, MRP1 and BCRP. *Molecules (Basel, Switzerland)* **22**; 10.3390/molecules22040600 (2017).
133. Wessler, J. D., Grip, L. T., Mendell, J. & Giugliano, R. P. The P-Glycoprotein Transport System and Cardiovascular Drugs. *Journal of the American College of Cardiology* **61**, 2495–2502; 10.1016/j.jacc.2013.02.058 (2013).
134. Lannoy, I. A. de & Silverman, M. The MDR1 gene product, P-glycoprotein, mediates the transport of the cardiac glycoside, digoxin. *Biochemical and biophysical research communications* **189**, 551–557; 10.1016/0006-291X(92)91593-F (1992).
135. Seelig, A. A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *European journal of biochemistry* **251**, 252–261; 10.1046/j.1432-1327.1998.2510252.x (1998).
136. Cianchetta, G. *et al.* A pharmacophore hypothesis for P-glycoprotein substrate recognition using GRIND-based 3D-QSAR. *J. Med. Chem.* **48**, 2927–2935; 10.1021/jm0491851 (2005).
137. Seelig, A. & Landwojtowicz, E. Structure–activity relationship of P-glycoprotein substrates and modifiers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **12**, 31–40; 10.1016/S0928-0987(00)00177-9 (2000).
138. Broxterman, H. J. *et al.* Induction by verapamil of a rapid increase in ATP consumption in multidrug-resistant tumor cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2**, 2278–2282; 10.1096/fasebj.2.7.3350243 (1988).
139. Varma, M. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacological research* **48**, 347–359; 10.1016/S1043-6618(03)00158-0 (2003).
140. Shapiro, A. B. & Ling, V. Effect of quercetin on Hoechst 33342 transport by purified and reconstituted P-glycoprotein. *Biochemical Pharmacology* **53**, 587–596; 10.1016/s0006-2952(96)00826-x (1997).
141. Sauna, Z. E., Peng, X.-H., Nandigama, K., Tekle, S. & Ambudkar, S. V. The molecular basis of the action of disulfiram as a modulator of the multidrug resistance-linked ATP binding cassette transporters MDR1 (ABCB1) and MRP1 (ABCC1). *Molecular pharmacology* **65**, 675–684; 10.1124/mol.65.3.675 (2004).

142. Drori, S., Eytan, G. D. & Assaraf, Y. G. Potentiation of Anticancer-Drug Cytotoxicity by Multidrug-Resistance Chemosensitizers Involves Alterations in Membrane Fluidity Leading to Increased Membrane Permeability. *European journal of biochemistry* **228**, 1020–1029; 10.1111/j.1432-1033.1995.1020m.x (1995).
143. Dong, J. *et al.* Medicinal chemistry strategies to discover P-glycoprotein inhibitors: An update. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* **49**; 10.1016/j.drug.2020.100681 (2020).
144. Palmeira, A., Sousa, E., Vasconcelos, M. H. & Pinto, M. M. Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds. *Current medicinal chemistry* **19**, 1946–2025; 10.2174/092986712800167392 (2012).
145. Wang, R. B., Kuo, C. L., Lien, L. L. & Lien, E. J. Structure-activity relationship: analyses of p-glycoprotein substrates and inhibitors. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics* **28**, 203–228; 10.1046/j.1365-2710.2003.00487.x (2003).
146. Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. & Sakurai, Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* **41**, 1967–1972 (1981).
147. Slater, L. M., Sweet, P., Stupecky, M. & Gupta, S. Cyclosporin A reverses vincristine and daunorubicin resistance in acute lymphatic leukemia in vitro. *J Clin Invest* **77**, 1405–1408; 10.1172/JCI112450 (1986).
148. Höllt, V., Kouba, M., Dietel, M. & Vogt, G. Stereoisomers of calcium antagonists which differ markedly in their potencies as calcium blockers are equally effective in modulating drug transport by P-glycoprotein. *Biochemical Pharmacology* **43**, 2601–2608; 10.1016/0006-2952(92)90149-d (1992).
149. Karthikeyan, S. & Hoti, S. L. Development of Fourth Generation ABC Inhibitors from Natural Products: A Novel Approach to Overcome Cancer Multidrug Resistance. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **15**, 605–615; 10.2174/1871520615666150113103439 (2015).
150. Coley, H. M. Overcoming multidrug resistance in cancer: clinical studies of p-glycoprotein inhibitors. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **596**, 341–358; 10.1007/978-1-60761-416-6_15 (2010).
151. Cripe, L. D. *et al.* Zosuquidar, a novel modulator of P-glycoprotein, does not improve the outcome of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a randomized, placebo-controlled trial of the Eastern Cooperative Oncology Group 3999. *Blood* **116**, 4077–4085; 10.1182/blood-2010-04-277269 (2010).
152. Chen, Z. *et al.* Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer letters* **370**, 153–164; 10.1016/j.canlet.2015.10.010. (2016).
153. Bai, J. *et al.* Inhibitory effects of flavonoids on P-glycoprotein in vitro and in vivo. Food/herb-drug interactions and structure-activity relationships. *Toxicology and applied pharmacology* **369**, 49–59; 10.1016/j.taap.2019.02.010 (2019).

154. Nakagawa-Goto, K. *et al.* Antitumor Agents 280. Multidrug Resistance-Selective Desmosdumotin B Analogues. *Journal of medicinal chemistry* **53**, 6699–6705; 10.1021/jm100846r (2010).
155. Apte, S. Selecting surfactants for the maximum inhibition of the activity of the multidrug resistance efflux pump transporter, P-glycoprotein: conceptual development. *Journal of Excipients and Food Chemicals* **1**, 51–59 (2010).
156. Iqbal, J., Hombach, J., Matuszczak, B. & Bernkop-Schnürch, A. Design and in vitro evaluation of a novel polymeric P-glycoprotein (P-gp) inhibitor. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **147**, 62–69; 10.1016/j.jconrel.2010.06.023 (2010).
157. Li, Y.-S. *et al.* Synthesis and biological evaluation of 2,5-disubstituted furan derivatives as P-glycoprotein inhibitors for Doxorubicin resistance in MCF-7/ADR cell. *European journal of medicinal chemistry* **151**, 546–556; 10.1016/j.ejmech.2018.04.012 (2018).
158. Li, L. *et al.* Inhibition of P-Glycoprotein Mediated Efflux in Caco-2 Cells by Phytic Acid. *Journal of agricultural and food chemistry* **66**, 988–998; 10.1021/acs.jafc.7b04307 (2018).
159. Aboutorabzadeh, S. M., Mosaffa, F., Hadizadeh, F. & Ghodsi, R. Design, synthesis, and biological evaluation of 6-methoxy-2-arylquinolines as potential P-glycoprotein inhibitors. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* **21**, 9–18; 10.22038/IJBMS.2017.21892.5616 (2018).
160. Baumert, C. *et al.* Development of small-molecule P-gp inhibitors of the N-benzyl 1,4-dihydropyridine type. Novel aspects in SAR and bioanalytical evaluation of multidrug resistance (MDR) reversal properties. *Bioorganic & medicinal chemistry* **21**, 166–177; 10.1016/j.bmc.2012.10.041 (2013).
161. Chaudhary, P. M. & Roninson, I. B. Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs. *J Natl Cancer Inst* **85**, 632–639; 10.1093/jnci/85.8.632 (1993).
162. Borst, P. & Elferink, R. O. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annual review of biochemistry* **71**, 537–592; 10.1146/annurev.biochem.71.102301.093055 (2002).
163. Polgar, O. & Bates, S. E. ABC transporters in the balance: is there a role in multidrug resistance? *Biochemical Society transactions* **33**, 241–245; 10.1042/BST0330241 (2005).
164. U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. In Vitro Metabolism- and Transporter- Mediated Drug-Drug Interaction Studies Guidance for Industry. Available at <https://www.fda.gov/files/drugs/published/In-Vitro-Metabolism--and-Transporter--Mediated-Drug-Drug-Interaction-Studies-Guidance-for-Industry.pdf> (2017).
165. Cole, S. P. *et al.* Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science (New York, N.Y.)* **258**, 1650–1654; 10.1126/science.1360704 (1992).
166. Hipfner, D. R., Deeley, R. G. & Cole, S. P. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1461**, 359–376; 10.1016/S0005-2736(99)00168-6 (1999).

167. Bakos, É. & Homolya, L. Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **453**, 621–641; 10.1007/s00424-006-0160-8 (2007).
168. Cole, S. P. C. Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1), a "multitasking" ATP-binding cassette (ABC) transporter. *The Journal of biological chemistry* **289**, 30880–30888; 10.1074/jbc.R114.609248 (2014).
169. Nagata, K. *et al.* Nonequivalent nucleotide trapping in the two nucleotide binding folds of the human multidrug resistance protein MRP1. *J. Biol. Chem.* **275**, 17626–17630; 10.1074/jbc.M000792200 (2000).
170. Johnson, Z. L. & Chen, J. Structural Basis of Substrate Recognition by the Multidrug Resistance Protein MRP1. *Cell* **168**, 1075–1085.e9; 10.1016/j.cell.2017.01.041 (2017).
171. Westlake, C. J., Cole, S. P. C. & Deeley, R. G. Role of the NH₂-terminal membrane spanning domain of multidrug resistance protein 1/ABCC1 in protein processing and trafficking. *Molecular biology of the cell* **16**, 2483–2492; 10.1091/mbc.e04-12-1113 (2005).
172. Rosenberg, M. F. *et al.* The structure of the multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). crystallization and single-particle analysis. *J. Biol. Chem.* **276**, 16076–16082; 10.1074/jbc.M100176200 (2001).
173. Leslie, E. M., Deeley, R. G. & Cole, S. P. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and applied pharmacology* **204**, 216–237; 10.1016/j.taap.2004.10.012 (2005).
174. Zaman, G. J. *et al.* Analysis of the expression of MRP, the gene for a new putative transmembrane drug transporter, in human multidrug resistant lung cancer cell lines. *Cancer Res* **53**, 1747–1750 (1993).
175. Roelofsen, H., Müller, M. & Jansen, P. L. Regulation of organic anion transport in the liver. *The Yale journal of biology and medicine* **70**, 435–445 (1997).
176. Evers, R. *et al.* Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein in polarized pig kidney cells. *J Clin Invest* **97**, 1211–1218; 10.1172/JCI118535 (1996).
177. Daoud, R., Julien, M., Gros, P. & Georges, E. Major photoaffinity drug binding sites in multidrug resistance protein 1 (MRP1) are within transmembrane domains 10–11 and 16–17. *J. Biol. Chem.* **276**, 12324–12330; 10.1074/jbc.M009782200 (2001).
178. Lu, J. F., Pokharel, D. & Bebawy, M. MRP1 and its role in anticancer drug resistance. *Drug metabolism reviews* **47**, 406–419; 10.3109/03602532.2015.1105253 (2015).
179. Peterson, B. G., Tan, K. W., Osa-Andrews, B. & Iram, S. H. High-content screening of clinically tested anticancer drugs identifies novel inhibitors of human MRP1 (ABCC1). *Pharmacological research* **119**, 313–326; 10.1016/j.phrs.2017.02.024 (2017).
180. Büchler, M. *et al.* cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J. Biol. Chem.* **271**, 15091–15098; 10.1074/jbc.271.25.15091 (1996).

181. Taniguchi, K. *et al.* A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res* **56**, 4124–4129 (1996).
182. Cui, Y. *et al.* Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Molecular pharmacology* **55**, 929–937 (1999).
183. Frelet, A. & Klein, M. Insight in eukaryotic ABC transporter function by mutation analysis. *FEBS Lett* **580**, 1064–1084; 10.1016/j.febslet.2006.01.024 (2006).
184. Surowiak, P. *et al.* ABCC2 (MRP2, cMOAT) Can Be Localized in the Nuclear Membrane of Ovarian Carcinomas and Correlates with Resistance to Cisplatin and Clinical Outcome. *Clin Cancer Res* **12**, 7149–7158; 10.1158/1078-0432.CCR-06-0564 (2006).
185. Nies, A. T. & Keppler, D. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **453**, 643–659; 10.1007/s00424-006-0109-y (2007).
186. Kool, M. *et al.* Analysis of Expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, Homologues of the Multidrug Resistance-associated Protein Gene (MRP1), in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Res* **57**, 3537–3547 (1997).
187. König, J., Nies, A. T., Cui, Y., Leier, I. & Keppler, D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1461**, 377–394; 10.1016/S0005-2736(99)00169-8 (1999).
188. Toh, S. *et al.* Genomic structure of the canalicular multispecific organic anion-transporter gene (MRP2/cMOAT) and mutations in the ATP-binding-cassette region in Dubin-Johnson syndrome. *American journal of human genetics* **64**, 739–746; 10.1086/302292 (1999).
189. Saier, M. H., Tam, R., Reizer, A. & Reizer, J. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Molecular Microbiology* **11**, 841–847; 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00362.x (1994).
190. Ma, D. *et al.* Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **175**, 6299–6313; 10.1128/jb.175.19.6299-6313.1993 (1993).
191. Colclough, A. L. *et al.* RND efflux pumps in Gram-negative bacteria; regulation, structure and role in antibiotic resistance. *Future microbiology* **15**, 143–157; 10.2217/fmb-2019-0235 (2020).
192. Blair, J. M. A. & Piddock, L. J. V. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Current opinion in microbiology* **12**, 512–519; 10.1016/j.mib.2009.07.003 (2009).
193. Cauilan, A., Ramos, K., Harmon, D. E. & Ruiz, C. Global effect of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump of *Escherichia coli* in cell metabolism revealed by untargeted metabolomics. *International journal of antimicrobial agents* **54**, 105–107; 10.1016/j.ijantimicag.2019.05.015 (2019).
194. Anes, J., McCusker, M. P., Fanning, S. & Martins, M. The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* **6**, 587; 10.3389/fmicb.2015.00587 (2015).

195. Li, X.-Z., Plésiat, P. & Nikaido, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical microbiology reviews* **28**, 337–418; 10.1128/CMR.00117-14 (2015).
196. Marshall, R. L. & Bavro, V. N. Mutations in the TolC Periplasmic Domain Affect Substrate Specificity of the AcrAB-TolC Pump. *Frontiers in molecular biosciences* **7**, 166; 10.3389/fmolb.2020.00166 (2020).
197. Nikaido, H. Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* **77**, 1–60; 10.1002/9780470920541.ch1 (2011).
198. Du, D. *et al.* Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature* **509**, 512–515; 10.1038/nature13205 (2014).
199. Nolvos, S. *et al.* Role of AcrAB-TolC multidrug efflux pump in drug-resistance acquisition by plasmid transfer. *Science* **364**, 778–782; 10.1126/science.aav6390 (2019).
200. Weston, N., Sharma, P., Ricci, V. & Piddock, L. J. V. Regulation of the AcrAB-TolC efflux pump in Enterobacteriaceae. *Research in Microbiology* **169**, 425–431; 10.1016/j.resmic.2017.10.005 (2018).
201. Hobbs, E. C., Yin, X., Paul, B. J., Astarita, J. L. & Storz, G. Conserved small protein associates with the multidrug efflux pump AcrB and differentially affects antibiotic resistance. *PNAS* **109**, 16696–16701; 10.1073/pnas.1210093109 (2012).
202. Hwang, D. & Lim, Y.-H. Resveratrol controls Escherichia coli growth by inhibiting the AcrAB-TolC efflux pump. *FEMS Microbiology Letters* **366**; 10.1093/femsle/fnz030 (2019).
203. Sturge, C. R. *et al.* AcrAB-TolC Inhibition by Peptide-Conjugated Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers Restores Antibiotic Activity in Vitro and in Vivo. *ACS infectious diseases* **5**, 1446–1455; 10.1021/acsinfecdis.9b00123 (2019).
204. Wang, Z. *et al.* An allosteric transport mechanism for the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *eLife* **6**; 10.7554/eLife.24905 (2017).
205. Seeger, M. A. *et al.* Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism. *Science* **313**, 1295–1298; 10.1126/science.1131542 (2006).
206. Sennhauser, G., Amstutz, P., Briand, C., Storchenegger, O. & Grütter, M. G. Drug export pathway of multidrug exporter AcrB revealed by DARPin inhibitors. *PLoS Biology* **5**, e7; 10.1371/journal.pbio.0050007 (2007).
207. Nikaido, H. & Takatsuka, Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochimica et biophysica acta* **1794**, 769–781; 10.1016/j.bbapap.2008.10.004 (2009).
208. Nakashima, R., Sakurai, K., Yamasaki, S., Nishino, K. & Yamaguchi, A. Structures of the multidrug exporter AcrB reveal a proximal multisite drug-binding pocket. *Nature* **480**, 565–569; 10.1038/nature10641 (2011).
209. Kobylka, J., Kuth, M. S., Müller, R. T., Geertsma, E. R. & Pos, K. M. *AcrB: a mean, keen, drug efflux machine* (2019).

210. Eicher, T. *et al.* Transport of drugs by the multidrug transporter AcrB involves an access and a deep binding pocket that are separated by a switch-loop. *PNAS* **109**, 5687–5692; 10.1073/pnas.1114944109 (2012).
211. Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E. & Yamaguchi, A. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* **419**, 587–593; 10.1038/nature01050 (2002).
212. Shi, X. *et al.* In situ structure and assembly of the multidrug efflux pump AcrAB-TolC. *Nature Communications* **10**, 2635; 10.1038/s41467-019-10512-6 (2019).
213. Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. & Hughes, C. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* **405**, 914–919; 10.1038/35016007 (2000).
214. Tsuruo, T., Iida, H., Nojiri, M., Tsukagoshi, S. & Sakurai, Y. Circumvention of vincristine and Adriamycin resistance in vitro and in vivo by calcium influx blockers. *Cancer Res* **43**, 2905–2910 (1983).
215. Viale, M. *et al.* Inhibition of MDR1 activity and induction of apoptosis by analogues of nifedipine and diltiazem: an in vitro analysis. *Investigational new drugs* **29**, 98–109; 10.1007/s10637-009-9340-7 (2011).
216. Hofmann, J. *et al.* Mechanism of action of dexniguldipine-HCl (B8509-035), a new potent modulator of multidrug resistance. *Biochemical Pharmacology* **49**, 603–609; 10.1016/0006-2952(94)00479-6 (1995).
217. Hantzsch, A. Ueber die synthese pyridinartiger verbindungen aus acetessigäther und aldehydammoniak. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **215**, 1–82 (1882).
218. Chekavichus, B. S., Sausin', A. & Dubur, G. Y. Effect of substituents in the dihydropyridine ring on the reactivity of the ester group of 3,5-dialkoxycarbonyl-1,4-dihydropyridines. *Chem Heterocycl Compd* **18**, 818–823; 10.1007/BF00506586 (1982).
219. Eisner, U. & Kuthan, J. Chemistry of dihydropyridines. *Chemical reviews* **72**, 1–42; 10.1021/cr60275a001 (1972).
220. Fowler, F. W. Synthesis of 1,2- and 1,4-dihydropyridines. *J. Org. Chem.* **37**, 1321–1323; 10.1021/jo00974a009 (1972).
221. Hemmer, M., Krawczyk, S., Simon, I., Lage, H. & Hilgeroth, A. Discovery of substituted 1,4-dihydroquinolines as novel class of ABCB1 modulators. *Bioorganic & medicinal chemistry* **23**, 5015–5021; 10.1016/j.bmc.2015.05.016 (2015).
222. Juvale, K., Stefan, K. & Wiese, M. Synthesis and biological evaluation of flavones and benzoflavones as inhibitors of BCRP/ABCG2. *European journal of medicinal chemistry* **67**, 115–126; 10.1016/j.ejmech.2013.06.035 (2013).
223. Mishnev, A. F. *et al.* Molecular and crystal structures and chemical properties of 2,6-dimethyl-4-phenyl-3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydropyridine. *Chem Heterocycl Compd* **13**, 991–995; 10.1007/BF00472454 (1977).
224. Baldwin, J. J. *et al.* Diethyl 3,6-dihydro-2,4-dimethyl-2,6-methano-1,3-benzothiazocine-5,11-dicarboxylates as calcium entry antagonists. New conformationally restrained analogs of

- Hantzsch 1,4-dihydropyridines related to nitrendipine as probes for receptor-site conformation. *J. Med. Chem.* **30**, 690–695; 10.1021/jm00387a019 (1987).
225. Hilgeroth, A. & Baumeister, U. Formation of Novel Photodimers from 4-Aryl-1,4-dihydropyridines. *Chem. Eur. J.* **7**, 4599–4603; 10.1002/1521-3765(20011105)7:21<4599::AID-CHEM4599>3.0.CO;2-U (2001).
226. Chennat, T. & Eisner, U. A new synthesis of 1,4-dihydropyridines. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 926; 10.1039/P19750000926 (1975).
227. Shishkin, O. V. Conformational flexibility of the 1,4-dihydropyridine ring in calcium channel agonists and antagonists molecules. *Journal of Molecular Structure* **385**, 209–214; 10.1016/S0022-2860(96)09332-5 (1996).
228. Karrer, P., Schwarzenbach, G., Benz, F. & Solmssen, U. Über Reduktionsprodukte des Nicotinsäure-amid-jodmethylats. *HCA* **19**, 811–828; 10.1002/hlca.193601901112 (1936).
229. Traber, W. & Karrer, P. Zur Kenntnis der Dihydro-pyridin-Verbindungen. *HCA* **41**, 2066–2094; 10.1002/hlca.19580410715 (1958).
230. Sueki, S. *et al.* Synthesis of 1,4-Dihydropyridines and Their Fluorescence Properties. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 5281–5301; 10.1002/ejoc.201402426 (2014).
231. Berson, J. A. & Brown, E. Studies on Dihydropyridines. II. The Photochemical Disproportionation of 4-(2'-Nitrophenyl)-1,4-dihydropyridines 1. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 447–450; 10.1021/ja01607a067 (1955).
232. Pietta, P., Rava, A. & Biondi, P. High-performance liquid chromatography of nifedipine, its metabolites and photochemical degradation products. *Journal of Chromatography A* **210**, 516–521; 10.1016/s0021-9673(00)80344-1 (1981).
233. Hayase, N. *et al.* Newly discovered photodegradation products of nifedipine in hospital prescriptions. *Journal of pharmaceutical sciences* **83**, 532–538; 10.1002/jps.2600830417 (1994).
234. Kreutzer, D., Döring, H., Werner, P., Ritter, C. A. & Hilgeroth, A. Novel Symmetrical Cage Compounds as Inhibitors of the Symmetrical MRP4-Efflux Pump for Anticancer Therapy. *IJMS* **22**, 5098; 10.3390/ijms22105098 (2021).
235. Reetz, M. T. & Kindler, A. The Kharasch reaction revisited: CuX₃Li₂-catalyzed conjugate addition reactions of Grignard reagents. *Journal of Organometallic Chemistry* **502**, C5–C7; 10.1016/0022-328X(95)05699-P (1995).
236. Comins, D. L. & Abdullah, A. H. Regioselective addition of Grignard reagents to 1-acylpyridinium salts. A convenient method for the synthesis of 4-alkyl(aryl)pyridines. *J. Org. Chem.* **47**, 4315–4319; 10.1021/jo00143a028 (1982).
237. Comins, D. L. & Mantlo, N. B. Regioselective arylation of 3-bromopyridine. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **20**, 1239–1243; 10.1002/jhet.5570200518 (1983).
238. Antonini, I. DNA-binding antitumor agents: from pyrimido5,6,1-deacridines to other intriguing classes of acridine derivatives. *Current medicinal chemistry* **9**, 1701–1716; 10.2174/0929867023369268 (2002).

239. Cholewiński, G., Dzierzbicka, K. & Kołodziejczyk, A. M. Natural and synthetic acridines/acridones as antitumor agents: their biological activities and methods of synthesis. *Pharmacological reports : PR* **63**, 305–336; 10.1016/s1734-1140(11)70499-6 (2011).
240. Gensicka-Kowalewska, M., Cholewiński, G. & Dzierzbicka, K. Recent developments in the synthesis and biological activity of acridine/acridone analogues. *RSC Adv.* **7**, 15776–15804; 10.1039/C7RA01026E (2017).
241. Zhang, B., Li, X., Li, B., Gao, C. & Jiang, Y. Acridine and its derivatives: a patent review (2009 - 2013). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **24**, 647–664; 10.1517/13543776.2014.902052 (2014).
242. Wainwright, M. Acridine-a neglected antibacterial chromophore. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **47**, 1–13; 10.1093/jac/47.1.1 (2001).
243. Norman, G. *et al.* Antiseptics for burns. *The Cochrane database of systematic reviews* **7**, CD011821; 10.1002/14651858.CD011821.pub2 (2017).
244. Browning, C.H., Cohen, J.B., Gaunt R., Gulbransen R. Relationships between antiseptic action and chemical constitution with special reference to compounds of the pyridine, quinoline, acridine and phenazine series. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **93**, 329–366; 10.1098/rspb.1922.0025 (1922).
245. Kaya, M., Yıldırım, Y. & Çelik, G. Y. Synthesis and antimicrobial activities of novel bisacridine-1,8-dione derivatives. *Med Chem Res* **20**, 293–299; 10.1007/s00044-010-9321-6 (2011).
246. Gündüz, M. G., Tahir, M. N., Armaković, S., Özkul Koçak, C. & Armaković, S. J. Design, synthesis and computational analysis of novel acridine-(sulfadiazine/sulfathiazole) hybrids as antibacterial agents. *Journal of Molecular Structure* **1186**, 39–49; 10.1016/j.molstruc.2019.03.010 (2019).
247. Chen, C.-C. *et al.* The study of 9,10-dihydroacridine derivatives as a new and effective molecular scaffold for antibacterial agent development. *Biochemical and biophysical research communications* **546**, 40–45; 10.1016/j.bbrc.2021.01.096 (2021).
248. Borowski, E., Bontemps-Gracz, M. M. & Piwkowska, A. Strategies for overcoming ABC-transporters-mediated multidrug resistance (MDR) of tumor cells. *Acta biochimica Polonica* **52**, 609–627 (2005).
249. Pleban, K. & Ecker, G. F. Inhibitors of p-glycoprotein--lead identification and optimisation. *Mini reviews in medicinal chemistry* **5**, 153–163; 10.2174/1389557053402729 (2005).
250. Hilgeroth, A., Hemmer, M., Neuber, S., Molnár, J. & Lage, H. Discovery of 9,10-Dihydroacridines as Novel Class of ABCB1 Inhibitors. *Medicinal chemistry (Shariqah (United Arab Emirates))* **11**, 329–335; 10.2174/1573406410666141111100720 (2015).
251. Cookson, R. C. & Wallis, S. R. Pyrolysis of allyl ethers. Unimolecular fragmentation to propenes and carbonyl compounds. *J. Chem. Soc., B;* 1245; 10.1039/J29660001245 (1966).
252. Brito-Arias, M., Ramirez, G., Rivas, R. E., Molins, E. & Maniukiewicz, W. 3,3,6,6-Tetramethyl-9-(2-nitrophenyl)-3,4,5,6,9,10-hexahydroacridine-1,8(2H,7H)-dione. *Acta Crystallogr C Cryst Struct Commun* **52**, 2811–2814; 10.1107/S0108270196008530 (1996).

253. Li, Y., Wang, X., Shi, D., Du, B. & Tu, S. 3,3,6,6-Tetramethyl-9-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-decahydroacridine-1,8-dione. *Acta Crystallogr E Struct Rep Online* **59**, o1446-o1448; 10.1107/S1600536803019378 (2003).
254. Wang, X.-S., Zhang, M.-M., Li, Q., Wu, J.-R. & Yao, C.-S. Three-Six-Membered Rings with Diverse Conformations in the Structure of 9-(4-Methoxyphenyl)-3,3-Dimethyl-10-(4-Methylphenyl)-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-Decahydroacridin-1,8-Dione. *J Chem Crystallogr* **41**, 439–442; 10.1007/s10870-010-9828-1 (2011).
255. Li, Z.-H. *et al.* Aromatization of 9,10-Dihydroacridine Derivatives: Discovering a Highly Selective and Rapid-Responding Fluorescent Probe for Peroxynitrite. *ACS sensors* **2**, 501–505; 10.1021/acssensors.7b00139 (2017).
256. Weaver, J. L. *et al.* The effect of ion channel blockers, immunosuppressive agents, and other drugs on the activity of the multi-drug transporter. *International Journal of Cancer* **54**, 456–461; 10.1002/ijc.2910540317 (1993).
257. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. M07-A10 ; approved standard (2015).
258. Dymek, A. *et al.* The activity of 16 new hydantoin compounds on the intrinsic and overexpressed efflux pump system of *Staphylococcus aureus*. *In vivo (Athens, Greece)* **26**, 223–229 (2012).
259. Nové, M. *et al.* Biofilm Eradication by Symmetrical Selenoesters for Food-Borne Pathogens. *Microorganisms* **8**; 10.3390/microorganisms8040566 (2020).
260. Martins, M. *et al.* An instrument-free method for the demonstration of efflux pump activity of bacteria. *In vivo (Athens, Greece)* **20**, 657–664 (2006).
261. Spengler, G. *et al.* Evaluation of cucurbitane-type triterpenoids from *Momordica balsamina* on P-glycoprotein (ABCB1) by flow cytometry and real-time fluorometry. *Anticancer research* **29**, 3989–3993 (2009).

Danksagungen

Der praktische Part der vorliegenden Arbeit wurde von Mai 2017, damals noch als Diplomand, bis Dezember 2019, am Ende als wissenschaftlicher Mitarbeiter, durchgeführt. Die Synthese und Charakterisierung der in der Arbeit beschriebenen Verbindungen wurden am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter Betreuung von Prof. Dr. Hilgeroth angefertigt. Prof. Dr. Hilgeroth danke ich besonders für die Bereitstellung der interessanten und vielseitigen Thematik, der Ermöglichung der selbständigen Bearbeitung dessen und der Hilfe und Unterstützung bei der Lösung von Herausforderungen im Rahmen der wissenschaftlichen Arbeit. Die letzten neun Monate des praktischen Teils dieser Arbeit erfolgte die biologische Evaluation der synthetisierten 1,4-Dihydropyridine am Institut für Pharmazie der Universität Greifswald unter Betreuung von Prof. Dr. Ritter. Prof. Dr. Ritter sei an dieser Stelle ebenfalls gedankt für die Hilfestellung, die Zusammenarbeit und die angenehme und konstruktive Diskussionsbereitschaft in Bezug auf die ermittelten Ergebnisse der biologischen Testung. Die Testung der 9,10-Dihydroacridine wurde an der Universität Szeged (Budapest, Ungarn) unter Führung von Joseph Molnar, Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Immunbiologie, durchgeführt. Ihm und seinen Mitarbeitern, insbesondere Frau Gabriella Spengler, sei hierfür gedankt.

Ein großer Dank gilt auch dem technischen Personal der beiden Institute, welche mich im Rahmen meiner täglichen Labortätigkeiten allumfassend unterstützt haben. Namentlich seien hier einige, aber nicht alle erwähnt: Frau Manuela Woigk (Massenspektrometrie), Herr Dr. Dieter Ströhl und dessen Mitarbeiter (NMR-Spektroskopie), Frau Heike Rudolf (IR-Spektroskopie). Besonderer Dank gebührt an dieser Stelle auch Herrn Dirk Stolzenhain und Herrn Jörg Lerche für die Bereitstellung der Chemikalien und der benötigten Gerätschaften. Für die Bestimmung der Reinheit mittels HPLC sei auch Herr PD Dr. habil. Matthias Schmidt und Frau Antje Herbrich-Peters gedankt.

Maßgeblichen Anteil an der erfolgreichen Umsetzung meiner praktischen Tätigkeit hatten ebenso die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hilgeroth bzw. Prof. Dr. Ritter, ohne die die Arbeit in ihrer hier vorliegenden Form nicht denkbar gewesen wäre, mir eine angenehme Zeit als Diplomand und Doktorand ermöglichten und bei welchen ich mich hiermit herzlich bedanke. Insbesondere gilt mein Dank Herrn Dr. Nico Schade für die Einarbeitung in die synthetischen Arbeiten in meiner Zeit als Diplomand. Nicht unerwähnt soll die Vorarbeit zweier Mitarbeiter der Arbeitsgruppe bleiben, welche den Einstieg im Zuge der Synthese erleichterten: Diplomand Herrn Laszlo Schlindwein (1,4-Dihydropyridine) und Post-Doc Herr Marc Hemmer (9,10-Dihydroacridine). Für die Synthese der 1,4-Dihydropyridin Verbindungen DHP13, DHP14,

Danksagungen

DHP17 und DHP18 danke ich Diplomandin Nour Madi, welche ich im Zeitraum April 2018 bis September 2018 betreuen durfte und mir bei der Synthese und Analytik der 1,4-Dihydropyridine sehr behilflich war. Ihre synthetisierten Verbindungen fanden Eingang in diese Doktorarbeit.

Es sei allen gedankt, welche sich als Lektoren die Zeit für das Korrekturlesen dieser Dissertation genommen und konstruktive Kritik erbracht haben, damit diese Arbeit erfolgreich fertiggestellt werden konnte.

Zu aller Letzt sei natürlich meiner Familie und meinen Freunden gedankt, welche mich während der Erstellung dieser Arbeit und darüber hinaus unterstützt und motiviert haben.

Danksagungen

Liste der Veröffentlichungen

Publikationen:

Kreutzer, D., Ritter, C. A. & Hilgeroth, A.

Novel Nonsymmetrical 1,4-Dihydropyridines as Inhibitors of Nonsymmetrical MRP-Efflux Pumps for Anticancer Therapy.

Pharmaceuticals 13, 146; 10.3390/ph13070146 (2020).

Kreutzer, D., Döring, H., Werner, P., Ritter, C. A. & Hilgeroth, A.

Novel Symmetrical Cage Compounds as Inhibitors of the Symmetrical MRP4-Efflux Pump for Anticancer Therapy.

IJMS 22, 5098; 10.3390/ijms22105098 (2021).

Döring, H., Kreutzer, D., Ritter, C. & Hilgeroth, A.

Discovery of Novel Symmetrical 1,4-Dihydropyridines as Inhibitors of Multidrug-Resistant Protein (MRP4) Efflux Pump for Anticancer Therapy.

Molecules (Basel, Switzerland) 26, 18; 10.3390/molecules26010018 (2021).

Kreutzer, D., Gehrman, R., Kincses, A., Szemerédi, N., Spengler, G., Molnár, J. & Hilgeroth, A.

Discovery of a novel class of small-molecule antibacterial agents against Staphylococcus aureus.

Future medicinal chemistry 14, 299-305; 10.4155/fmc-2021-0272 (2022).

Poster:

David Kreutzer, Arvid Solka, Henry Döring, Laszlo Schlindwein, Nour Madi, Andreas Hilgeroth, Christoph A. Ritter

Development of cellular test model systems to investigate novel inhibitors of drug transporters relevant for drug resistance in tumor therapy

12. – 14. September 2019, Oldenburg

CESAR Annual Meeting 2019

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertationsarbeit gemäß der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften – der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die, den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin erkläre ich, dass ich bisher keine vergeblichen Promotionsversuche unternommen habe. Diese Dissertationsschrift wurde ausschließlich der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt. Sie wurde an keiner anderen Einrichtung weder im In- noch Ausland zur Erlangung des Doktorgrades eingereicht.

Ort, Datum

David Kreutzer

