

# BIOANALYTISCHE EVALUIERUNG NEUER MDR-MODULATOREN

## DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Claudius Coburger

geboren am 02.06.1980 in Greiz

Gutachter:

1. PD Dr. A. Hilgeroth
2. Prof. Dr. A. Langner
3. Prof. Dr. H.-H. Borchert

Halle (Saale), 6. September 2010

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Januar 2011

Von dem, was du erkennen und messen willst,  
mußt du Abschied nehmen, wenigstens auf eine Zeit.

Erst wenn du die Stadt verlassen hast, siehst du,  
wie hoch sich ihre Türme über die Häuser erheben.

*Friedrich Wilhelm Nietzsche*

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Resistenzentstehung.....	4
1.2 ABC-Transporter .....	6
1.2.1 P-Glykoprotein (ABCB1).....	7
1.2.2 Multidrug resistance-associated proteins (MRPs) .....	13
1.2.2.1 MRP1 (ABCC1) .....	16
1.2.2.2 MRP2, MRP3 (ABCC2, ABCC3).....	16
1.2.2.3 MRP4, MRP5 (ABCC4, ABCC5).....	17
1.2.2.4 MRP6, MRP7 (ABCC6, ABCC10).....	18
1.2.2.5 MRP8, MRP9 (ABCC11, ABCC12).....	18
1.2.3 Breast cancer resistant protein (BCRP, ABCG2) .....	19
1.3 Multidrug-Resistance (MDR) .....	21
1.3.1 Resistenzentstehung durch induktive Effekte .....	21
1.3.2 Überwindung der MDR .....	23
1.4 MDR Modulatoren .....	24
1.4.1 Entwicklung von der ersten zur dritten Generation.....	24
1.4.2 Klinische Studien .....	27
1.5 Zielstellung der Arbeit.....	29
<b>2 Materialien und Methoden .....</b>	<b>30</b>
2.1 Materialien.....	30
2.1.1 Biologische Materialien.....	30
2.1.1.1 Zelllinien .....	30
2.1.1.2 Antikörper .....	31
2.1.1.3 Plasmide.....	31
2.1.2 Nukleinsäuren .....	31
2.1.3 Enzyme .....	32
2.1.4 Chemikalien und Fertiglösungen .....	32

---

2.1.5	Kits .....	34
2.1.6	Verbrauchsmaterialien.....	34
2.1.7	Testsubstanzen (Modulatoren) .....	35
2.1.8	Geräte .....	39
2.1.9	Software .....	40
2.2	Methoden .....	41
2.2.1	Eukaryotische Zellkultur.....	41
2.2.1.1	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	41
2.2.1.2	Zellkultivierung.....	41
2.2.2	Zytotoxizitätsassay (MTT-Test).....	42
2.2.2.1	Resistenzaufhebung .....	44
2.2.3	Durchflusszytometrie .....	44
2.2.3.1	P-Glykoprotein Hemmung.....	45
2.2.3.2	MRP1, MRP2 Hemmung .....	46
2.2.3.3	BCRP Hemmung .....	47
2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	48
2.2.4.1	Reverse-Transkription.....	48
2.2.4.2	RT-PCR.....	48
2.2.4.3	Real-Time quantitative PCR (RTQ-PCR) .....	49
2.2.4.4	Gel-Elektrophorese.....	51
2.2.5	Northern Blot Analyse.....	51
2.2.5.1	RNA Isolierung und Konzentrationsbestimmung .....	51
2.2.5.2	RNA Auftrennung und Transfer.....	52
2.2.5.3	Markierung von DNA-Sonden .....	53
2.2.5.4	Hybridisierung.....	53
2.2.6	Western Blot Analyse .....	53
2.2.6.1	Gesamtproteinisolierung .....	53
2.2.6.2	Proteinkonzentrationsbestimmung .....	54
2.2.6.3	Proteingel .....	55
2.2.6.4	Proteintransfer .....	56
2.2.6.5	Antikörper-Reaktion und Detektion .....	56
2.2.7	Transfektion von humanen Karzinomzellen .....	57
2.2.7.1	Plasmidisolierung.....	58
2.2.7.2	Plasmidverdau .....	59
2.2.7.3	Bestimmung der Plasmidkonzentration.....	60
2.2.7.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus Agarose-Gelen.....	60
2.2.7.5	Durchführung der Transfektion .....	60



---

<b>3 Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>62</b>
3.1 Diskutierte Verbindungen .....	62
3.2 Zytotoxizitäten .....	65
3.2.1 Untersuchung an HepG2 Zellen .....	65
3.2.2 Untersuchung an Jurkat Zellen .....	67
3.2.3 Untersuchung an EPG85-257 Zellen .....	68
3.3 Induktionsversuche .....	73
3.4 Etablierung eines Zellmodells mit MRP4-Überexpression .....	77
3.4.1 Auswahl geeigneter Zelllinien .....	77
3.4.2 Transfektion von MRP4 in die Zelllinien PA-I und OvCar3 .....	78
3.4.3 MRP4-Expression transfizierter PA-I und OvCar3 Zellen .....	80
3.4.4 Transfektion von MRP4 in die Zelllinie hepG2 .....	81
3.4.5 MRP4-Expression transfizierter hepG2 Zellen .....	82
3.4.5.1 Untersuchung mittels RTQ-PCR .....	82
3.4.5.2 Untersuchung mittels Funktionsassay .....	84
3.5 P-gp Hemmung .....	87
3.5.1 Struktur-Wirkungs-Beziehungen .....	91
3.6 BCRP Hemmung .....	94
3.6.1 Struktur-Wirkungs-Beziehung .....	96
3.7 MRP1 und MRP2 Hemmung .....	98
3.7.1 Struktur-Wirkungs-Beziehung .....	101
3.8 MRP4 Hemmung .....	105
<b>4 Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>108</b>
<b>5 Literatur .....</b>	<b>113</b>
Danksagung .....	125
Curriculum vitae .....	126
Publikationen .....	128
Selbständigkeitserklärung .....	129

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Ampère
Å	Ångström
ABC	ATP binding cassette
AML	akute myeloische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	breast cancer resistant protein
bp	Basenpaare
bzw	beziehungsweise
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CML	chronisch myeloische Leukämie
CSC	cancer stem cells, Krebsstammzellen
DHEAS	Dehydroepiandrosteron-3-sulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
E <sub>2</sub> 17βG	17-β-D-Estradiol-glucuronid
et. al.	et alii, und andere
FAR	Fluorescence Activity Ratio
FKS	Foetales Kälberserum
FTC	Fumitremorgin C
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
I.E.	Internationale Einheiten
IC <sub>50</sub>	halbmaximale zytotoxische/inhibitorische Konzentration
k	kilo
kb	Kilo-Basenpaare (= 1000 bp)
kDa	Kilodalton
M	Molar
m	mili
MDR	multidrug resistance
MDR1	multidrug resistance protein 1 (Genabschnitt des P-gp)
min	Minute
μ	mikro
MK571	3-([(3-(2-[7-chloro-2-quinoliny]ethenyl)phenyl)-((3-dimethyl-amino-3-oxopropyl)-thio)-metyhyl]thio)propanoic acid

---

ml	Milliliter
m-RNA	messenger-RNA
MRP	multidrug resistance-associated protein
MSD	membranspannende Domäne
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
n	nano
NBD	nukleotidbindende Domäne
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P-gp	P-Glykoprotein
PMEA	9-(2[bis(Pivaloyloxymethoxy)phosphorylmethoxy]ethyl)adenine (Adefovirdipivoxil)
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT-PCR	reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
TMD	transmembranäre Domäne
U	Unit (Enzymaktivität)
u. a.	unter anderem
V	Volt
%(v/v)	Volumenprozent
%(w/m)	Masseprozent
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des P-Glykoproteins .....	8
Abbildung 2: Pseudosymmetrische Anordnung der homologen P-gp Hälften .....	9
Abbildung 3: Schematische Anordnung der transmembranären Domänen des P-gp .....	9
Abbildung 4: P-gp Substrattransport .....	10
Abbildung 5: Modell einer einzelnen, großen hydrophoben Bindungstasche .....	13
Abbildung 6: Membrantopologie der verschiedenen ABC-Transporter .....	14
Abbildung 7: Struktur von Adefovir .....	18
Abbildung 8: Pipettierschema Resistenzaufhebung .....	44
Abbildung 9: MRP4 Expressionsvektor .....	58
Abbildung 10: Syntheseschritte zur Darstellung dimerer 1,4-Dihydropyridine .....	62
Abbildung 11: Grundstruktur der dimeren 1,4-Dihydropyridine .....	63
Abbildung 12: Beeinflussung der Vitalität humaner Hepatozyten .....	66
Abbildung 13: Beeinflussung der Vitalität humaner Lymphozyten .....	68
Abbildung 14: Beeinflussung der Vitalität humaner Magenkarzinomzellen .....	71
Abbildung 15: MDR1-mRNA Ausgangsmengen .....	73
Abbildung 16: WesternBlot (P-gp) zur Untersuchung möglicher induktiver Effekte .....	74
Abbildung 17: RTQ-PCR (MDR1) zur Untersuchung möglicher induktiver Effekte .....	76
Abbildung 18: RT-PCR Übersicht für ausgewählte ABC-Transporter .....	78
Abbildung 19: Restriktionsverdau des MRP4 Plasmids .....	79
Abbildung 20: RT-PCR von MRP4 transfizierten Zellklonen (PA-I, OvCar3) .....	80
Abbildung 21: NorthernBlot von MRP4 transfizierten Zellklonen (PA-I, OvCar3) .....	81
Abbildung 22: MTT-Test ausgewählter hepG2-MRP4-Klone .....	85
Abbildung 23: Steigerung der intrazellulären Fluoreszenz nach P-gp Hemmung .....	89
Abbildung 24: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der P-gp Hemmung .....	90
Abbildung 25: Leitstruktur und Substitution .....	91
Abbildung 26: Transporterscreening EPG85-257RNOV .....	94
Abbildung 27: Steigerung der intrazellulären Fluoreszenz nach BCRP Hemmung .....	97

---

Abbildung 28: MRP1 und MRP2 Expression in A2780 Zellen.....	99
Abbildung 29: Zytotoxizität von Cisplatin auf A2780 und A2780RCIS Zellen.....	99
Abbildung 30: Resistenzaufhebung von Adefovirdipivoxil.....	106

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifizierung humaner ABC-Transporter .....	6
Tabelle 2: Übersicht von Verbindungen mit P-gp Substrateigenschaften .....	12
Tabelle 3: Übersicht über die humanen ABC-Transporter MRP 1 – 9 .....	15
Tabelle 4: MDR Modulatoren der dritten Generation (Auswahl) .....	26
Tabelle 5: Übersicht klinischer Studien mit MDR Modulatoren .....	28
Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Karzinomzelllinien .....	31
Tabelle 7: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide für die PCR .....	32
Tabelle 8: Struktur und Bezeichnung der untersuchten Verbindungen .....	39
Tabelle 9: Zusammensetzung der Zellkulturmedien .....	42
Tabelle 10: Ausgangszellzahl für den MTT-Test .....	44
Tabelle 11: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe für die Durchflusszytometrie.....	48
Tabelle 12: Bedingungen für die RT-PCR und RTQ-PCR (*) .....	49
Tabelle 13: Substituenten R1 und R2 der Testsubstanzen.....	64
Tabelle 14: IC50-Werte der im MTT Assay untersuchten Substanzen .....	70
Tabelle 15: Steigerung der MRP4-cDNA Menge transfizierter hepG2-Zellen. ....	84
Tabelle 16: IC50-Werte der hepG2-MRP4-Klone .....	85
Tabelle 17: FAR-Werte zur Bestimmung der P-gp inhibitorischen Aktivität.....	88
Tabelle 18: <i>n</i> -Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient der Verbindungen (logP-Wert).....	93
Tabelle 19: FAR-Werte zur Bestimmung der BCRP-inhibitorischen Aktivität .....	95
Tabelle 20: FAR-Werte zur Bestimmung der MRP1-inhibitorischen Aktivität .....	102
Tabelle 21: FAR-Werte zur Bestimmung der MRP2-inhibitorischen Aktivität .....	104

# 1 Einleitung

Krebserkrankungen stellen in Deutschland die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislaufkrankungen dar. Zwar kann altersbereinigt ein Rückgang der Krebssterblichkeit bei Frauen und Männern beobachtet werden, jedoch steigt, durch die zunehmende Lebenserwartung, die Zahl der Krebstoten Jahr für Jahr an. Während bei Männern das Bronchialkarzinom an erster Stelle bei der Todesursache durch Krebserkrankungen steht, ist dies bei Frauen das Mammakarzinom. An zweiter Stelle folgt bei beiden Geschlechtern das Kolonkarzinom. Bei Männern kommt es weiterhin zu Tumoren der Bauchspeicheldrüse, Prostata und Magen, wohingegen bei Frauen weitere Krebserkrankungen vor allem der Eierstöcke und der Lunge auftreten [1].

Neben einer Vielzahl wichtiger Verbesserungen in der Therapie von Krebserkrankungen sind auch eine Reihe neuer Errungenschaften in den grundlegenden Vorgängen der Tumorentstehung gemacht wurden. Dazu zählt vor allem die Erkenntnis, dass nicht alle Krebszellen innerhalb eines Tumors gleich sind, sondern so genannte Krebsstammzellen (CSC, cancer stem cells) existieren. Erste Hinweise ergaben sich aus Experimenten Ende der 90er Jahre mit Zellen von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML). Wurden diese Zellen in immuninkompetente Mäuse übertragen, so konnten nur bestimmte Leukämiezellen einen neuen Tumor in den Mäusen auslösen [2]. Diese Eigenschaft wurde als wichtige Basis angesehen, um Krebsstammzellen von anderen Krebszellen zu unterscheiden. Hinzu kommt noch die Befähigung der Selbsterneuerung sowie ausdifferenzierte Zellabkömmlinge hervorbringen zu können (non-CSC) [3]. Als Ursache für das Auftreten der CSC wird eine durch z. B. Mutationen ausgelöste fehlerhafte Programmierung bei adulten Stammzellen angesehen. Weiterhin wird vermutet, dass CSC, wie auch normale Stammzellen in geschützten Nischen des Körpers bereitgehalten werden, um sie vor schädlichen Umwelteinflüssen zu schützen. Damit wird auch erklärbar, dass es nach einer erfolgreichen Chemotherapie nach Jahren zu einem Rückfall, durch die erneute Aktivierung der überlebten CSC kommen kann. Unterstützt werden diese Vermutungen durch eine 2009 in *Nature* erschienene Publikation einer Heidelberger Arbeitsgruppe über Zell- und Tierversuche mit Interferon-alpha, einem körpereigenen Botenstoff. Mäuse reagieren nach einer Interferon-alpha Behandlung äußerst empfindlich auf eine Chemotherapie, was vermutlich damit zusammenhängt, dass die Krebsstammzellen durch den Botenstoff ihre geschützten Bereiche verlassen und für Zytostatika zugänglich werden [4]. Aber auch die starke Expression bestimmter ABC-Transporter in adulten Stammzellen wird als eine Schutzfunktion angesehen. So wurde in hämatopoetischen Stammzellen die Expression hoher Level der ABC-Transporter „breast cancer resistant protein“ (BCRP) und

P-Glykoprotein nachgewiesen [5,6]. Während der weiteren Differenzierung wird die Expression der Transporter dann deutlich minimiert, so dass dies eine weitere Erklärung für die außerordentliche Resistenz und das Überleben der CSC nach einer Chemotherapie sein kann.

Die Therapie von Krebserkrankungen hat in den letzten Jahren deutliche Fortschritte gemacht. Allen voran stand dabei die Entwicklung von Hemmstoffen der Tyrosinkinase, welche als wichtige intrazelluläre Effektorenzyme von Rezeptortyrosinkinase fungieren. Im Allgemeinen haben alle Proteinkinase die Aufgabe, die  $\gamma$ -Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat (ATP) auf Proteine zu übertragen [7]. Die dafür notwendige Hydroxygruppe seitens der Proteine wird durch die Aminosäuren Tyrosin, Serin oder Threonin bereitgestellt. Dabei gibt es unterschiedliche Affinitäten der Proteinkinase zu den Aminosäuren. Während einige Kinase nur Threonin bevorzugen, gibt es ebenso welche, die nur Serin und Tyrosin phosphorylieren [7]. Als Folge der Phosphatübertragung werden intrazelluläre Signalkaskaden, wie der MAP-(mitogen-activated protein)-Kinase-Weg in Gang gesetzt, in dessen Folge es zu einer stufenartigen Aktivierung von hintereinander geschalteten Kinase kommt [8]. Rezeptoren für Wachstumsfaktoren wie den EGF (Epidermal growth factor), den PDGF (Platelet-derived growth factor) und den VEGF (Vascular endothelial growth factor) gehören zu Rezeptortyrosinkinase, welche als Target für die Tumorforschung eine bedeutende Rolle spielen. Im Gegensatz zu Zytostatika, welche direkt zytotoxisch wirken, kommt es bei Tyrosinkinaseinhibitoren zu einer Hemmung des Zellwachstums durch die Beeinflussung wichtiger Signaltransduktionen. Als erster Kinaseinhibitor wurde 2001 Imatinib mit einem beschleunigten Zulassungsverfahren in den Markt eingeführt. Insbesondere bei der Therapie einer neu diagnostizierter CML (chronisch myeloische Leukämie) wurde eine signifikante Verbesserung der Überlebensrate erzielt [9]. Es folgten eine Reihe von weiteren Tyrosinkinaseinhibitoren in den letzten Jahren, wie Sunitinib und Dasatinib, jedoch sind auch in dieser neuen Arzneistoffklasse starke Nebenwirkungen sowie Resistenzen limitierende Faktoren in der Anwendung bei der Therapie maligner Tumoren [10]. In *in vitro* Untersuchungen konnte beispielsweise die Resistenz von Leukämiezellen gegenüber Imatinib eindeutig mit der Überexpression des Membrantransporters P-Glykoprotein in Verbindung gebracht werden. Der Membrantransporter fungiert allgemein als Efflux-System, um die intrazelluläre Konzentration von Fremdstoffen abzusenken. Durch eine gezielte Hemmung des Transporters konnte die zelluläre Resistenz der Leukämiezellen jedoch wieder aufgehoben werden [11]. Somit wird deutlich, dass auch neue Angriffspunkte in der Tumorthherapie mit dem Problem der Resistenzentstehung konfrontiert sind und dabei die Expression von Effluxpumpen (Membrantransporter) eine bedeutende Rolle spielt.



Durch zunehmende Erkenntnisse in der Ursache und Entstehung von malignen Erkrankungen sollten vor allem präventive Maßnahmen an erster Stelle stehen. Epidemiologische Daten zu Lungenkrebs zeigen einen deutlichen Rückgang in der Mortalität in Abhängigkeit vom Tabakkonsum. Aber auch die sekundäre Prävention spielt eine wichtige Rolle, denn je eher eine Gewebeentartung durch geeignete Früherkennungsuntersuchungen diagnostiziert wird, desto besser sind die Heilungschancen vor allem bei Mammakarzinom, Zervixkarzinom, Kolonkarzinom und Melanomen der Haut [1].

## 1.1 Resistenzentstehung

Als Ursache von Resistenzen bei der Therapie maligner Erkrankungen kann man zwischen pharmakologischen und zellulären Mechanismen unterscheiden [12]. Bei den pharmakologischen Mechanismen haben vor allem folgende Faktoren wichtige Auswirkungen auf den Plasmaspiegel von Arzneistoffen:

- Metabolisierung von Prodrugs
- Beeinflussung der Pharmakokinetik durch Metabolisierung und Ausscheidung
- Ausmaß und Umfeld des Tumor (z. B. Vaskularisation)
- Beeinflussung der Bioverfügbarkeit durch Barrieren (Blut-Hirn-Schranke)

Werden zum Beispiel durch eine Hemmung des Cytochrom P450 Enzymsystems in der Leber nur geringe Mengen Cyclophosphamid in das aktive 4-Hydroxy-Derivat umgewandelt, werden keine ausreichenden Plasmaspiegel für eine Tumorbekämpfung erreicht. Bei den zellulären Mechanismen stehen vor allem folgende Ursachen im Vordergrund:

- Veränderungen in Signalwegen und dem Mechanismus des Zelltods
- Reparatur von DNA Schäden
- Expression membranständiger ABC-Transporter

Wichtig bei einer Resistenzausbildung ist die Tatsache, dass durch den primären zellulären Effekt von Arzneimittel auch Veränderungen im Zellzyklus entstehen können [12]. Diese sekundären Effekte können zum Beispiel Reparaturmechanismen von Primärschäden sein. Aber auch Änderungen in den Signalkaskaden für die Apoptose oder den nicht-apoptischen Zelltod (Nekrose) führen zu einer verminderten Wirkung von antineoplastischen Arzneistoffen. Beispielhaft kann hierfür die Familie der Bcl-2-Proteine genannt werden, welche in den ersten Schritten einer zellulären Apoptosekaskade eine Schlüsselrolle einnehmen. Kommt es zu einer „Down“-Regulation des pro-apoptischen Bcl-2-Proteins kann dies zu einem verminderten arzneistoffinduzierten Zelltod führen und die Wirksamkeit einer Krebschemotherapie gefährden [15].

Da auch die zelluläre DNA einen wichtigen Angriffspunkt von Arzneistoffen wie den Anthrazyklinen oder Alkylantien darstellt, gehören DNA-Reparaturmechanismen mit zu wichtigen Ursachen bei der Ausbildung einer Resistenz. Dabei kommt es verstärkt zu

einer Aktivierung von Reparaturkaskaden, in welche eine Vielzahl von Proteinen involviert sind (Übersicht in Lage, 2008 [12]). Als wichtigste Ursache in der Resistenzausbildung gegen alkylierende Substanzen gilt beispielsweise die erhöhte Expression von MGMT, einer O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase, im Tumorgewebe. Physiologisch wird von dieser Alkyltransferase die wichtige Aufgabe der Reparatur von DNA Schäden durch Demethylierung reguliert. Kommt es durch methylierende Arzneistoffe zu DNA Schäden wird eine Hochregulation der MGMT-Expression mit dem Resultat beobachtet, dass die zytotoxische Wirkung nicht mehr ausreicht [16].

Die Rolle der ABC-Transporter in der Resistenzentwicklung von Krebschemotherapeutika ist seit über 30 Jahren bekannt [13]. Bislang sind 15 verschiedene Transporter aus der ABC-Familie ursächlich mit dem Auftreten von Resistenzen in Verbindung gebracht worden, von denen das P-Glykoprotein (P-gp, ABCB1) zu dem Bedeutendsten gehört [14]. Aber auch Vertreter der multidrug resistance-associated proteins (MRPs), insbesondere MRP1 und MRP2, sowie das breast cancer resistant protein (BCRP, ABCG2) gehören heute mit zu den wichtigsten Transportern bei der Resistenzentstehung und werden im Kapitel 1.2 näher charakterisiert. Die Expression dieser Transporter führt dazu, dass die intrazelluläre Zytostatikakonzentration durch einen aktiven Auswärtstransport stark vermindert wird und damit keine toxische Wirkung mehr auf die Zelle realisiert werden kann. Oft kommt es in diesem Zusammenhang zu Resistenzen gegen eine Vielzahl von unterschiedlichen Zytostatika. Dieses Phänomen wird als Multidrug-Resistance (MDR) bezeichnet und im Kapitel 1.3 genauer erläutert.

## 1.2 ABC-Transporter

Der transmembranäre Transport der meisten kleinen Moleküle und Ionen wird überwiegend durch spezialisierte Membranproteine realisiert, welche auch als „Transporter“ bezeichnet werden. Dabei muss von zellulärer Seite auf den Transport einer Vielzahl von unterschiedlichsten Substraten eingegangen werden. In *E. coli* codieren beispielsweise ungefähr 10% des gesamten Genoms für Transportprozesse und insgesamt konnten über 550 verschiedene Transportertypen identifiziert werden [17; 18].

Eine der größten und wichtigsten Transporterklassen stellen die ABC-Transporter dar (*ATP-binding cassette*) [19]. Die Namensgebung beruht auf einem hochkonservierten Bereich aller Transporter, der ATP-Bindungsdomäne, nachfolgend als nukleotidbindende Domäne (NBD) bezeichnet. Durch die Bindung und Hydrolyse von ATP können eine Vielzahl von Substanzen aktiv durch die Zellmembran transportiert werden, auch gegen ein Konzentrationsgefälle. Dabei kann zwischen Transportern unterschieden werden, welche Substanzen importieren (Importers) und solche, welche Substanzen exportieren (Exporters). Das gleichzeitige Ausführen beider Funktionen von einem Transportprotein wurde bislang nicht nachgewiesen. Während die Importers nur für Prokaryoten beschrieben wurden, sind Exporter sowohl bei Prokaryoten als auch bei Eukaryoten zu finden [20]. Für den Menschen sind bislang 49 Gene, welche für ABC-Transporter codieren, identifiziert und aufgrund phylogenetischer Eigenschaften in 7 Klassen eingeteilt worden. Eine ausführliche Übersicht der humanen ABC-Transporter inklusive der jeweiligen Genlokation ist von Dean *et al.* 2005 beschrieben und in Tabelle 1 verkürzt zusammengefasst [21].

Klasse	Anzahl	Beispiele
ABCA	12	ABCA1
ABCB	11	ABCB1 (P-Glykoprotein)
ABCC	13	ABCC1 (MRP1), ABCC2 (MRP2), ABCC4 (MRP4)
ABCD	4	ADCD1 (ALD)
ABCE	1	ABCE1
ABCF	3	ABCF1
ABCG	5	ABCG2 (BCRP)

**Tabelle 1: Klassifizierung humaner ABC-Transporter**

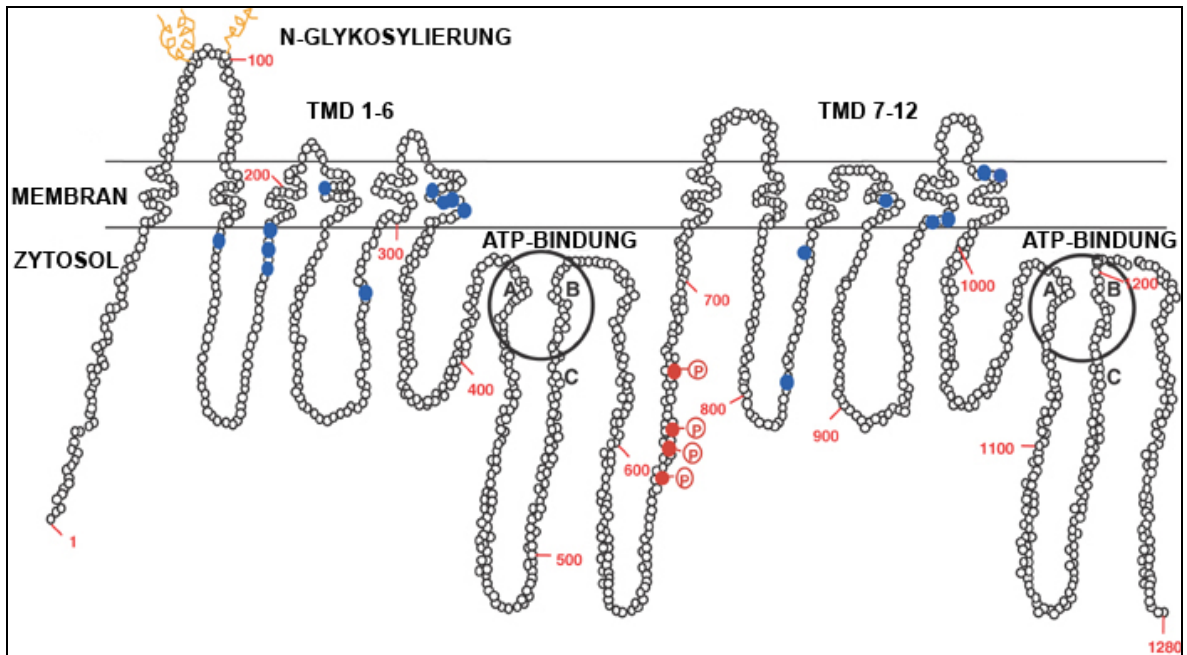
Die 49 humanen ABC-Transporter werden in 7 Klassen eingeteilt. In Spalte 2 ist die Anzahl der zur jeweiligen Klasse zugehörigen Transporter angegeben und in Spalte 3 sind die bekanntesten Vertreter aufgelistet.

Die nukleotidbindenden Domänen (NBD) der ABC-Transporter weisen 3 hochkonservierte Bereiche auf, welche für die ATP Bindung und Hydrolyse essentiell sind. Die sogenannten „Walker A“ und „Walker B“ Regionen, welche auch in anderen ATP oder GTP bindenden Proteinen vorhanden sind, sowie die dazwischenliegende „Walker C“ Region, welche ein typisches Charakteristikum für ABC-Transporter darstellt [22]. Der klassische Aufbau der Proteinstruktur eines ABC-Transporters weist neben 2 NBD noch eine verschiedene Anzahl, meist 12 oder 17, transmembranärer Domänen (TMD) auf, welche als  $\alpha$ -helikale Strukturen in die Membran eingebettet und für die Substratspezifität verantwortlich sind. In Kapitel 1.2.2 (Abbildung 6) sind die verschiedenen Membrantopologien der ABC-Transporter dargestellt, auf welche in den nachfolgenden Kapiteln näher eingegangen wird.

### 1.2.1 P-Glykoprotein (ABCB1)

Der wichtigste Vertreter der ABC-Transporter ist das P-Glykoprotein (P-gp). Es wurde als erster Transporter der ABC-Familie 1976 von Juliano und Ling beschrieben [23]. Knapp 35 Jahre später, sind in der Datenbank *PubMed* beim Stichwort „P-Glycoprotein“ über 13000 Einträge zu finden, womit sehr deutlich wird, welche Dimension und Bedeutung diese damalige Entdeckung bis heute hat.

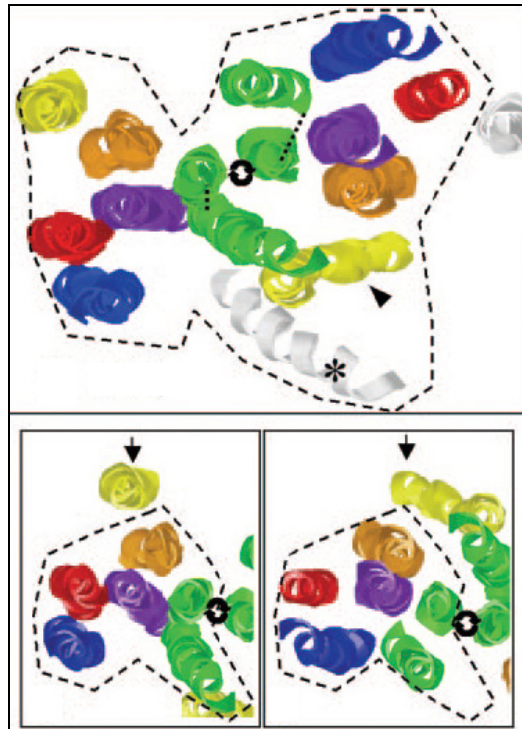
Das P-Glykoprotein besteht wie die meisten ABC-Transporter aus 2 homologen Hälften mit jeweils 6  $\alpha$ -helikalen transmembranären Domänen (TMD) und einer nukleotidbindenden Domäne. Es ist aus 1280 Aminosäuren aufgebaut, wird vom humanen MDR1 Gen codiert und hat in glykosylierter Form ein Molekulargewicht von 170 kDa. Die beiden homologen Hälften besitzen eine Sequenzübereinstimmung von 43 % und sind durch eine 60 Aminosäuren lange Linkerregion miteinander verbunden [24]. Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau des Membranproteins. An 3 Stellen (N91, N94, N99) in der ersten extrazellulären Schleife befinden sich Glykosylierungen, welche aber keinen Einfluss auf die Funktion des Transporters haben [25].



**Abbildung 1: Aufbau des P-Glykoproteins**

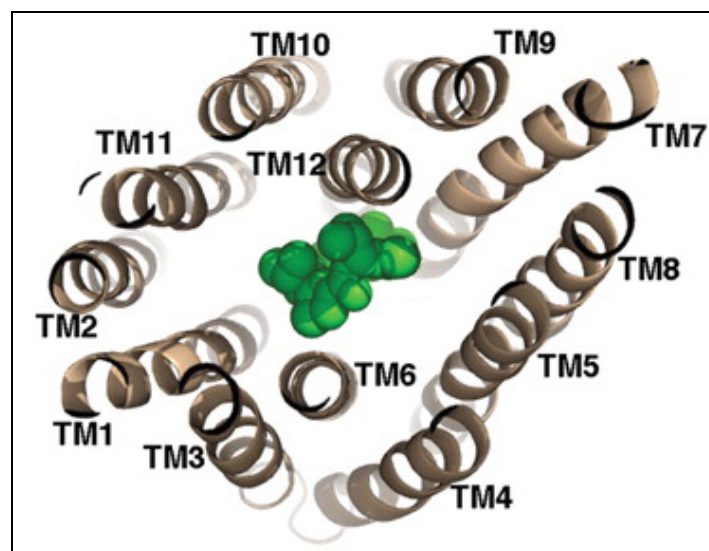
Zweidimensionale, schematische Darstellung des P-Glykoproteins mit 12 transmembranären Domänen (TMD), den beiden ATP-Bindungsstellen und den als Kreise dargestellten Aminosäuren. Dabei stellen blau gefüllte Kreise solche Aminosäuren dar, bei welchen es in Mutationsstudien zu einer veränderten Substratspezifität gekommen ist. Modifiziert nach Ambudkar *et al.*, 2003 [26].

Erste Röntgenstrukturen von bakteriellen ABC-Transportern konnten bereits 2001 von Chang *et al.* veröffentlicht werden, allerdings zeigen sich beachtliche Unterschiede zu eukaryotischen Transportern der gleichen Familie. [27] Zur Strukturaufklärung des humanen P-gp fehlen bis heute hochaufgelöste Strukturdaten. Rosenberg *et al.* publizierte 2005 die Struktur des humanen P-gp mit einer Auflösung von 8 Å [28]. Interessanterweise konnte für die beiden homologen Hälften des P-Glykoproteins eine C2-Pseudosymmetrie bei 10 von 12 transmembranären Domänen festgestellt werden (Abbildung 2). Erst kürzlich wurde in *Science* von Aller *et al.* eine Röntgenstrukturanalyse des murinen P-gp publiziert, welche eine deutlich bessere Auflösung von 3,8 Å besitzt [29]. Die Sequenzübereinstimmung zum humanen P-gp beträgt 87 %, so dass hiervon durchaus eine Vielzahl von Informationen abgeleitet werden können. Eine C2-Pseudosymmetrie der beiden homologen Hälften konnte in diesen Untersuchungen ebenfalls bestätigt werden (Abbildung 3).



**Abbildung 2: Pseudosymmetrische Anordnung der homologen P-gp Hälften**

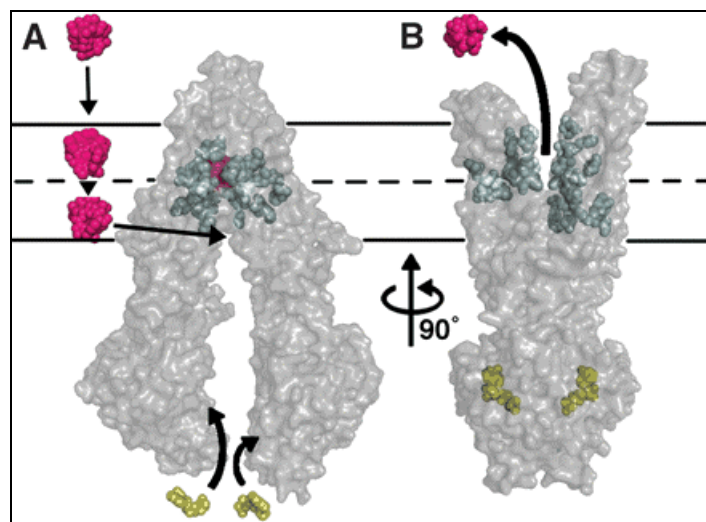
Schematische Darstellung der transmembranären Domänen (TMD) in der Aufsicht modifiziert nach Rosenberg *et al.*, 2005 [28]. Die nukleotidbindenden Domänen (NBD) sind violett und die TMD mit einer symmetrischen Beziehung zueinander sind in der gleichen Farbe dargestellt. Wird die rechte Transporterhälfte um 180° gedreht, lässt sich eine pseudosymmetrische Anordnung der TMD der beiden homologen Hälften beobachten (unterer Bildteil).



**Abbildung 3: Schematische Anordnung der transmembranären Domänen des P-gp**

Anordnung der 12 transmembranären Domänen (TMD) und eines Substrates (grün) aus der Sichtweise des Zytosols nach Aller *et al.*, 2009 [29]. Auch hier wird die Pseudosymmetrie der beiden homologen Hälften (TMD 1 - 6 und 7 - 12) deutlich.

Ebenso unterstützen die neuen Röntgenkristallstrukturen das P-gp Transportmodell des „hydrophobic vacuum-cleaner“, welches vereinfacht in Abbildung 4 dargestellt ist. Dabei werden lipophile Xenobiotika schon beim Diffusionsprozess durch die Doppelmembran durch Wechselwirkung mit hydrophoben Kavitäten gebunden und aufgrund einer substratinduzierten ATP-Bindung und Hydrolyse durch eine Konformationsänderung wieder in den Extrazellularraum transportiert, ohne Kontakt mit dem Zytosol gehabt zu haben [30]. Hervorzuheben ist, dass für die Substratbindung transmembranäre Abschnitte beider Hälften des P-gp essentiell sind, insbesondere die TMD 4, 5, 6 und die TMD 10, 11, 12. Dies konnte in Photoaffinitätsstudien, Mutationsstudien und Cross-Linking-Studien nachgewiesen werden [31-35]. Veränderungen der Aminosäuresequenz in diesen Bereichen führen zu einem deutlichen Verlust der Transporteraktivität [36].



#### Abbildung 4: P-gp Substrattransport

(A) Das lipophile Substrat (magenta) diffundiert durch die Zellmembran und interagiert mit der Substratbindungsregion. Es kommt zur Bindung und Hydrolyse von ATP (gelb) an den nukleotidbindenden Domänen (NBD). (B) Eine durch Dimerisierung der NBD resultierende Konformationsänderung bewirkt ein Öffnen der Substratbindungsregion in Richtung Extrazellularraum. Das gebundene Substrat wird in den Extrazellularraum abgegeben und das Protein nimmt wieder die Ausgangskonformation ein [29].

Das P-Glykoprotein spielt eine wichtige Rolle in vielen physiologischen Prozessen bei Mensch und Tier, vor allem bei der Exkretion von Xenobiotika und dem damit verbundenen Schutz der körpereigenen zellulären Systeme vor toxischen Fremdstoffen. Um dieser Schutzfunktion gerecht zu werden, wird das P-gp in einer Vielzahl von Organen exprimiert. Hierzu gehören die apikale Zellmembran der Leber, wo es durch die Aktivität des P-gp zu einem Auswärtstransport von Fremdstoffen in die Galle kommt, sowie die Zellmembran des proximalen Tubulus der Niere, wo eine Exkretion von Substanzen direkt in den Urin stattfindet. Im unteren Intestinum wird das P-gp in den



Mukosazellen exprimiert und transportiert Fremdstoffe zurück in den Darm, welche dann über die Faeces ausgeschieden werden [37]. Weiterhin werden auch Schutzfunktionen zwischen verschiedenen Organsystemen durch die Expression des P-gp geschaffen. Eine wichtige Rolle spielt der Transporter dabei in der apikalen Membran von endothelialen Zellen der Blut-Hirn-Schranke und der Plazenta. Innerhalb dieser körpereigenen Barrieren dient die Expression des P-gp für einen zusätzlichen Schutz des neuronalen und fetalen Gewebes [37]. Diese Schutzfunktion konnte sehr gut am Beispiel des nicht ZNS-gängigen Arzneistoffs Loperamid nachgewiesen werden. Bei gleichzeitiger Hemmung des P-gp kann Loperamid die Blut-Hirn-Schranke überwinden und es lassen sich die zentralen Nebenwirkungen des Opioids beobachten [38].

Die Charakterisierung von Substraten des P-gp gestaltet sich schwierig, da eine Vielzahl von strukturell sehr unterschiedlichen Verbindungen durch das Protein transportiert werden. Dazu gehören unter anderem Steroidhormone und eine Reihe von Arzneimitteln wie zahlreiche Krebschemotherapeutika und HIV-1 Proteasehemmer [31]. Gerade in der Therapie maligner Tumoren kann sich die Expression von P-gp nachteilig auf den Therapieverlauf auswirken, da durch die Effluxaktivität des Proteins keine ausreichenden Arzneistoffkonzentrationen mehr erreicht werden können und die Gefahr der Ausbildung einer Resistenz (MDR) besteht (Kapitel 1.3).

Ein Überblick über die wichtigsten Verbindungen, welche als Substrate für den Membrantransporter fungieren, ist in Tabelle 2 dargestellt. P-gp Substrate sollten ein Molekulargewicht von 200 – 1900 Da aufweisen und eine amphiphile Grundstruktur besitzen [39,40]. In den meisten Fällen zeigen anionische Verbindungen keine Rezeptoraffinität [40]. Aufgrund der strukturellen Vielfalt der Verbindungen wird davon ausgegangen, dass innerhalb der Proteinstruktur mehrere Bindungsstellen existieren. Shapiro *et al.* konnte durch Studien mit den P-gp Substraten Hoechst 33342 und Rhodamin 123 auf 2 Bindungsstellen schließen, welche als „H-Seite“ und „R-Seite“ bezeichnet wurden [41]. An der H-Seite binden neben dem Bisbenzimid Hoechst 33342 auch das strukturell verwandte Hoechst 33258 sowie das Pentahydroxyflavon Quercetin und Colchicin. Für die R-Seite charakteristisch waren neben dem Rhodamin 123 die Anthrazykline Daunorubicin und Doxorubicin. Affinitäten für beide Bindungsstellen konnte für Vinblastin, Etoposid und Actinomycin D beobachtet werden. Wenig später konnte von der gleichen Arbeitsgruppe eine zusätzliche Bindungsstelle für Prazosin und Progesteron nachgewiesen werden [42]. Die Bindung dieser Substanzen führte zu einem gesteigerten Transport von Rhodamin 123 nach Bindung an der R-Seite und Hoechst 33342 an der H-Seite und kann damit als positiv allosterischer Effekt in Bezug auf andere Bindungsstellen gesehen werden. Weitere Untersuchungen von Martin *et al.* ergaben

sogar den Hinweis für 4 und mehr Bindungsstellen, welche aufgrund der nachgewiesenen Wechselwirkungen namentlich nach den Substanzen Vinblastin, Hoechst 33342, Paclitaxel und Nicardipin eingeteilt wurden [43]. Für Rhodamin 123 konnte in den durchgeführten Radioligand-Bindungstudien wiederum keine eigene Bindungsstelle gefunden werden. Zusammenfassend kann man feststellen, dass bis heute keine exakte Aussage zur Anzahl und Gestalt der Bindungsstellen im P-gp getroffen werden kann, da sich zum Teil widersprüchliche Ergebnisse in der Literatur finden lassen.

---

### **Substrate des P-Glykoproteins**

---

#### *Krebschemotherapeutika*

Anthrazykline (Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin)

Vinkalalkaloide (Vincristin, Vinblastin)

Epipodophyllotoxine (Etoposid, Teniposid)

Actinomycin D

Paclitaxel

Topotecan

Mitomycin

#### *Weitere zytotoxische Verbindungen*

Colchicin

Ethidiumbromid

Puromycin

#### *HIV-1 Proteasehemmer*

Ritonavir

Indinavir

Saquinavir

#### *Sonstige Verbindungen*

Hoechst 33342

Rhodamin 123

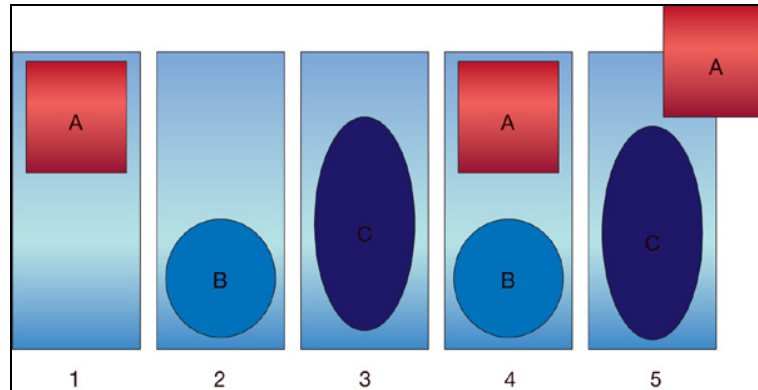
Calcein-AM

---

### **Tabelle 2: Übersicht von Verbindungen mit P-gp Substrateigenschaften**

Alternativ wird dazu ein Modell diskutiert, bei dem nicht viele spezifische Bindungsstellen sondern eine einzelne, flexible und geräumige hydrophobe Bindungstasche existiert [44]. Diese besteht zu einem großen Teil aus hydrophoben aromatische Aminosäuren und kann vorrangig über Van-der-Waals-Kräfte bis zu 2 Moleküle gleichzeitig binden. So kann

beispielsweise der MRP1 Transporter das Zytostatikum Vincristin und Glutathion einzeln oder als Konjugat binden und transportieren [36]. Veranschaulicht dargestellt wird das Modell in Abbildung 5 [44].

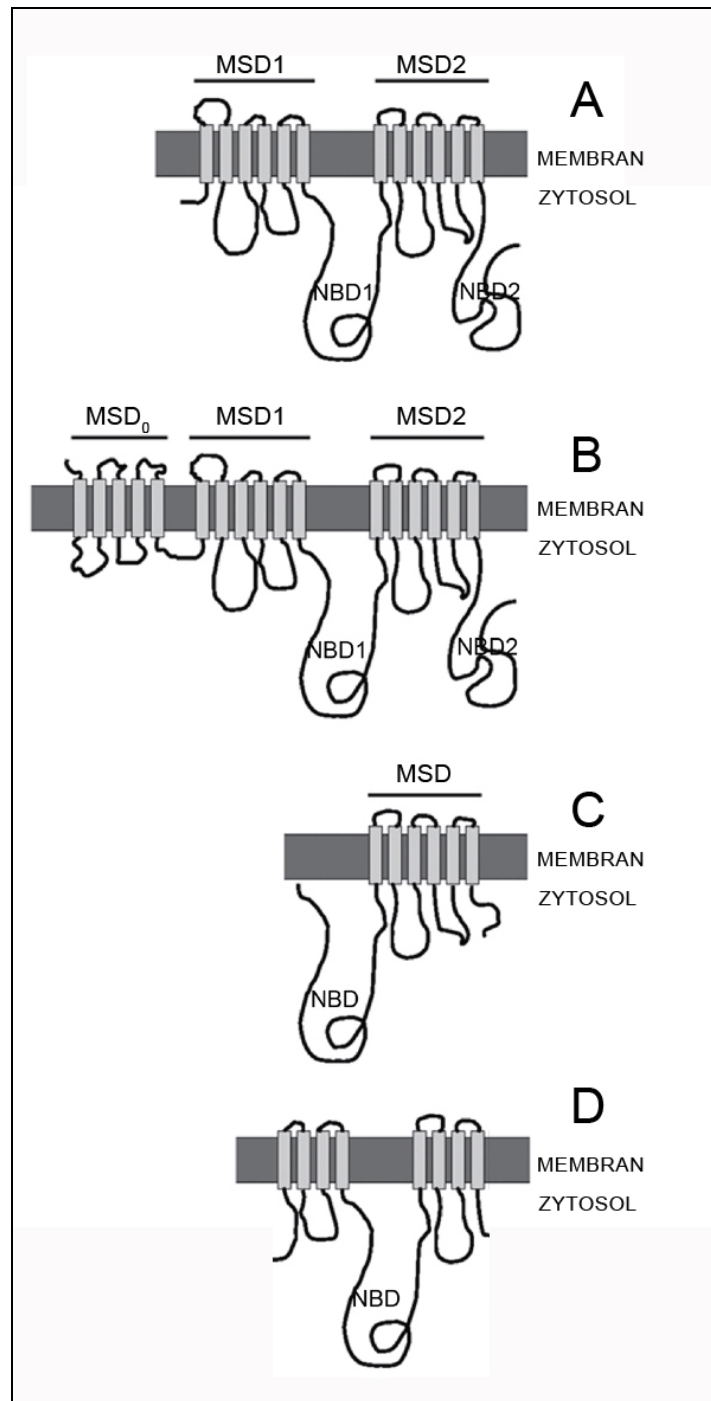


**Abbildung 5: Modell einer einzelnen, großen hydrophoben Bindungstasche**

Die Bindungstasche ist in der Lage, die Substanzen A, B und C einzeln (Nummer 1 - 3) oder Substanz A und Substanz B gleichzeitig zu binden (Nummer 4). Nicht möglich ist die simultane Bindung von Substanz A und Substanz C (Nummer 5).

### 1.2.2 Multidrug resistance-associated proteins (MRPs)

Ebenfalls zur Familie der ABC-Transporter gehören die Multidrug resistance-associated proteins (MRPs). Sie werden in die Untergruppe ABCC eingeordnet, wo bislang 13 Vertreter gefunden werden konnten [45]. Davon sind 9 Vertreter als MRP1-9 beschrieben, welche in Tabelle 3 aufgelistet und hinsichtlich ihrer Substrateigenschaften und Inhibitoren charakterisiert sind. Strukturelle Ähnlichkeiten zum P-Glykoprotein sind insbesondere bei MRP4, MRP5 und MRP8 ersichtlich. Der Aufbau der verschiedenen MRPs ist in Abbildung 6 zusammengefasst und wird in den nachfolgenden Kapiteln für die einzelnen Vertreter spezifiziert.



### Abbildung 6: Membrantopologie der verschiedenen ABC-Transporter

(A) Im oberen Teil der Abbildung bilden 2 membranspannende Domänen (MSD1, MSD2) und 2 nukleotidbindende Domänen (NBD) die Grundstruktur für die Form  $[\text{MSD-NBD}]_2$ . Proteine wie das P-gp, MRP4, MRP5 und MRP8 lassen sich dieser Struktur zuordnen. (B) Eine zusätzliche MSD ( $\text{MSD}_0$ ) mit 5 transmembranären  $\alpha$ -Helices weisen hingegen MRP1, MRP2, MRP3, MRP6 und MRP7 auf und ergeben eine Grundstruktur der Form  $[\text{MSD}_0(\text{MSD-NBD})_2]$ . (C) Aus nur einer MSD besteht die Struktur des BCRP, abgekürzt als  $[\text{NBD-MSD}]$ . (D) Eine andere Grundstruktur lässt sich für das MRP9 nachweisen. Hier sind nur 8 transmembranäre Domänen vorhanden und auch nur eine nukleotidbindende Domäne. Modifiziert nach Zhang *et al.*, 2007. [46]

Bezeichnung	Aminosäuren	Gewebe	Substrate (Arzneistoffe)	Substrate (physiologisch)	Hemmstoffe
MRP1 (ABCC1)	1531	ubiquitär	Doxorubicin, Vincristin, Methotrexat, Camptothecin, Cyclophosphamid, Etoposid	Glutathion, E <sub>2</sub> 17βG, Leukotrien C <sub>4</sub> , Gallensäuren, Bilirubin	MK571, Probenecid, Indomethacin, Verapamil
MRP2 (ABCC2)	1545	Leber, Niere, Gehirn, Darm	Cisplatin, Vinca- alkaloide, Anthrazykline, Camptothecin, Methotrexat	Glutathion, Leukotriene C <sub>4</sub> , D <sub>4</sub> , E <sub>4</sub> , Bilirubin, E <sub>2</sub> 17βG	MK571, Furosemid
MRP3 (ABCC3)	1527	Dünndarm, Pankreas, Kolon, Plazenta	Etoposid, Paracetamol, Vincristin, Methotrexat,	Glukuronide, Gallensalze	Etoposid, Methotrexat
MRP4 (ABCC4)	1325	Niere, u. a.	PMEA, Topotecan, 6-Mercaptopurin, Methotrexat, 6- Thioguanin	cGMP, cAMP, Prostaglandin E <sub>1</sub> , E <sub>2</sub> , DHEAS, E <sub>2</sub> 17βG	MK571, Celecoxib, Rofecoxib, Diclofenac
MRP5 (ABCC5)	1437	Leber, u. a.	PMEA, 6- Mercaptopurin, Methotrexat, 6- Thioguanin	cGMP, cAMP	Probenezid, Benzbromaron, MK571, Sulfinpyrazon
MRP6 (ABCC6)	1503	Leber, Niere	Doxorubicin, Daunorubicin, Cisplatin,		Probenezid, Benzbromaron, Indomethacin
MRP7 (ABCC10)	1464	nahezu ubiquitär	Taxane, Vincaalkaloide	E <sub>2</sub> 17βG	
MRP8 (ABCC11)	1382	Brust, Hoden	5-Fluoruracil, Methotrexat, PMEA	cGMP, cAMP, Leukotrien C <sub>4</sub> , DHEAS	
MRP9 (ABCC12)	1359	Brust, Hoden, Gehirn, Eierstock			

**Tabelle 3: Übersicht über die humanen ABC-Transporter MRP 1 – 9**

Aufgelistet sind Vorkommen, Substrate und Hemmstoffe der 9 Vertreter der humanen MRP-Familie. Es wurde jeweils nur eine Auswahl der wichtigsten Substanzen berücksichtigt [12,47,48].

### 1.2.2.1 MRP1 (ABCC1)

Das „Multidrug resistance-associated protein 1“ (MRP1) gehört zur Familie der ABC-Transporter und wurde 1992 von *Cole et al.* entdeckt [49]. Dabei konnte in einer Doxorubicin-resistenten aber P-gp-negativen Bronchialkarzinomzelllinie H69AR das MRP1 als verantwortliches Protein für die Resistenz identifiziert werden und stellte damit den ersten Vertreter der MRP-Familie dar. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte in weiteren meist P-gp-negativen Zelllinien mit MDR Ausprägung eine Überexpression von MRP1 nachgewiesen werden [50]. Somit ist die Expression von MRP1 neben dem P-gp die zweite wichtige Ursache für die Ausbildung einer MDR. Im Vergleich zum P-gp besitzt das MRP1 nur eine Homologie von 15%, hat ein Molekulargewicht von 190 kDa und besitzt 17 transmembranäre Domänen (Abbildung 6 B). Die 5 zusätzlichen Domänen werden als MSD<sub>0</sub> bezeichnet und scheinen für die Ausprägung der MDR nicht mit verantwortlich zu sein [51]. Physiologisch werden vor allem an Glucuronsäure, Glutathion und Sulfat konjugierte neutrale Verbindungen transportiert, wie zum Beispiel Glutathion konjugierte Leukotriene und Prostaglandine oder Steroide wie 17-β-D-Estradiol-glucuronid (E<sub>2</sub>17βG) [52]. Das MRP1 spielt damit unter anderem eine wichtige Rolle in der Detoxifikation von durch Biotransformationsprozesse erzeugten hydrophilen Verbindungen. Bei unkonjugierten Verbindungen konnte von *Loe et al.* festgestellt werden, dass ein Co-Transport mit reduziertem Glutathion stattfindet und die Transporteraktivität deutlich von der Glutathionkonzentration abhängt [36]. Das Membranprotein ist in zahlreichen Geweben zu finden, vor allem in der Lunge, Niere, Hoden, Herz und in der Plazenta. Interessanterweise wurden in der Leber nur sehr geringe Mengen nachgewiesen obwohl dieses Organ hauptverantwortlich ist für die Elimination und Biotransformation von Xenobiotika [53].

Viele in der Krebschemotherapie eingesetzte Arzneistoffe sind Substrate für das Membranprotein (Tabelle 3). Dazu gehören unter anderem die Vinkaalkaloide (Vincristin, Vinblastin), Anthrazykline (Daunorubicin, Doxorubicin), Taxane (Paclitaxel) und Camptothecinderivate (Irinotecan, Topotecan) [54].

### 1.2.2.2 MRP2, MRP3 (ABCC2, ABCC3)

Als zweiter Vertreter der MRP-Familie wurde 1996 von *Taniguchi et al.* das MRP2 aus einer Cisplatin-resistenten Zelllinie isoliert und als cMOAT (canalicular multispecific organic anion transporter) bezeichnet [55]. Der Aufbau des Membranproteins ist mit dem MRP1 vergleichbar. Mit einer Homologie in der Aminosäuresequenz von 49% zu MRP1 besitzt das MRP2 ebenso 5 zusätzliche Domänen (MSD<sub>0</sub>), besteht aus 1545 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 190 kDa (Abbildung 6 B) [56]. Es wird hauptsächlich in der apikalen Membran von Hepatozyten exprimiert und ist für einen

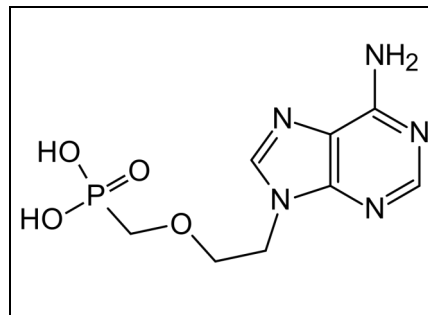
wichtigen physiologischen Prozess notwendig, dem Transport von glucuronidiertem Bilirubin in die Gallenkanälchen. Bilirubin entsteht durch Abbau von Hämoglobin, welches hauptsächlich durch gealterte Erythrozyten anfällt. Beim Menschen kann es in seltenen Fällen durch Mutationen im MRP2-Gen zu einer fehlerhaften Translation kommen, wodurch ein funktionsloses MRP2-Protein entsteht. Dieses Krankheitsbild wird als Dubin-Johnson-Syndrom bezeichnet und manifestiert sich als Ikterus mit milden intermittierenden Hyperbilirubinämien [57]. Ähnlich dem MRP1 werden aber auch andere an Glucuronsäure oder Glutathion konjugierte Verbindungen transportiert [56]. Weitere Arzneistoffe aus der Krebschemotherapie, wie Anthrazykline und Vinkaalkaloide fungieren, ähnlich wie bei MRP1 beobachtet, als Substrate und können somit die Ursache für eine Resistenzentstehung sein (Tabelle 3). Als deutlichen Unterschied zum MRP1 kann der Transport von Cisplatin angesehen werden. In MRP2-überexprimierten Zellen konnte die Cisplatin-Resistenz mit Hilfe von MRP2 „antisense-cDNA“ wieder aufgehoben werden [58].

Das MRP3 (ABCC3) weist mit 58 % in Bezug zum MRP1 die größte Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz innerhalb der MRP-Familie auf [59]. Dies spiegelt sich jedoch nicht in dem Substratspektrum des Transporters wieder. Lediglich Vincristin, Methotrexat und Etoposid sind als Substrate des Membrantransporters beschrieben, wobei die Resistenz bezüglich Vincristin (2-fach), Methotrexat (1,7-fach) und Etoposid (4-fach) deutlich geringer ausfällt, verglichen mit MRP1 [60]. Obwohl das ABCC3-Protein in Krebszellen von Eierstock, Brust, Bauchspeicheldrüse und Gehirn nachgewiesen wurde, konnte bis heute kein klinischer Zusammenhang in Bezug zu Arzneistoffresistenzen festgestellt werden [12].

### 1.2.2.3 MRP4, MRP5 (ABCC4, ABCC5)

Ebenfalls 1996 wurde das für MRP4 codierende Gen mit weiteren 20 neuen Genen der ABC-Familie von Allikmets *et al.* identifiziert [61]. Dabei erfolgte ein Sequenzvergleich von einer großen Anzahl exprimierter Gene einer Zelle aus einer EST (human expressed sequences tag)-Datenbank mit damals bekannten Sequenzen von ABC-Transportern. Mit einer Länge von 1325 Aminosäuren stellt es das kleinste Protein seiner Familie dar (Abbildung 6 A). In zahlreichen Geweben ist die m-RNA von ABCC4 nachweisbar, als Protein sind jedoch lediglich in der Niere größere Mengen gefunden worden [62]. Der Aufbau von MRP4 und MRP5 mit 12 transmembranären Domänen ähnelt dem des P-gp. Jedoch gibt es deutliche Unterschiede in der Substratspezifität. Im Gegensatz zu MRP1 und MRP2 transportieren MRP4 und MRP5 keine Anthrazykline, Vinkaalkaloide oder Epipodophyllotoxine sondern vorrangig Nukleosidanaloga wie cAMP, cGMP und antivirale

Substanzen mit einem Nucleosidgrundgerüst (Tabelle 3). Hier hat sich insbesondere das Virustatikum Adefovirdipivoxil (PMEA), welches klinisch bei chronischer Hepatitis B eingesetzt wird, als ein Substrat von MRP4 erwiesen [63,64]. Es fungiert als Prodrug und hemmt nach der Esterspaltung in Form des Nucleotidanalogs Adefovir die virale DNA-Polymerase (Abbildung 7). Wichtig für die Funktion von MRP4 ist die intrazelluläre Anwesenheit von Glutathion. Durch Hemmung der Glutathionsynthese mit BSO (DL-buthionin-(S,R)-sulphoximin) konnten MRP4 bedingte Resistenzen von Nucleosidanaloga wieder aufgehoben werden [64].



**Abbildung 7: Struktur von Adefovir**

#### **1.2.2.4 MRP6, MRP7 (ABCC6, ABCC10)**

Die Membranproteine MRP6 und MRP7 besitzen wie auch MRP1 eine zusätzliche membranspannende Domäne (MSD<sub>0</sub>, Abbildung 6 B). Während MRP6 hauptsächlich in der basolateralen Hepatozytenmembran und im proximalen Tubulus der Niere zu finden ist, sind von MRP7 in vielen Geweben nur schwache Expressionslevel nachgewiesen worden [65; 66]. Der Transport von Anthrazyklinen sowie die Hemmung durch Probenecid, Benzbromaron oder Indomethacin weist beim MRP6 Ähnlichkeiten zum MRP1 auf (Tabelle 3), allerdings werden keine so hohen Resistenzlevel bezüglich Krebschemotherapeutika erreicht. Über den Transport von physiologischen Substraten ist bei MRP6 und MRP7 nur wenig bekannt. Neben der allgemeinen Einstufung als sogenannte Anion-Transporter ist lediglich für MRP7 der Transport von 17-β-D-Estradiol-glucuronid (E<sub>2</sub>17βG) in der Literatur beschrieben [67].

#### **1.2.2.5 MRP8, MRP9 (ABCC11, ABCC12)**

MRP8 stellt einen amphiphilen Anion-Transporter dar und wird im Brustgewebe und im Hoden exprimiert [68]. Neben den Transport von physiologischen Nucleotiden wie cAMP und cGMP konnten auch Resistenzen gegenüber strukturähnlichen Krebschemotherapeutika wie 5-Fluoruracil, Adefovirdipivoxil (PMEA) und weiteren antiviralen Nucleosidanaloga beobachtet werden [69].



Eine ungewöhnliche Membrantopologie weist das von Bera *et al.* 2002 identifizierte MRP9 auf. Das Protein, welches hauptsächlich im Hodengewebe sowie Brustkrebsgewebe nachgewiesen wurde, besteht nur aus 8 statt 12  $\alpha$ -Helices (Abbildung 6 D). Im Vergleich zu anderen Mitgliedern der MRP-Familie fehlen die Helices 3 und 4 sowie 11 und 12. Zusätzlich konnte auch nur eine nukleotidbindende Domäne identifiziert werden. Vor allem interessant ist die Tatsache, dass das 4,5 kb Transkript von ABCC12 in hohen Expressionsraten in Brustkrebszellen nachgewiesen wurde und somit ein interessanter neuer Ansatzpunkt in der Therapie und Resistenzbekämpfung des Mammakarzinoms werden könnte [70].

### 1.2.3 Breast cancer resistant protein (BCRP, ABCG2)

Das BCRP (ABCG2) gehört zu der relativ jungen Familie ABCG der ABC-Transporter und wurde 1998 als zweites von 5 Mitgliedern dieser Familie identifiziert [71]. Ursache der Entdeckung waren Untersuchungen an der Brustkrebszelllinie MCF-7, welche unter einer Langzeitgabe von Doxorubicin und Verapamil kultiviert wurde. Die erhaltenen Doxorubicin-resistenten Zellen zeigten jedoch keine Expression von P-gp und MRP1 obwohl weitere Kreuzresistenzen gegenüber Daunorubicin und Mitoxantron vorlagen. Erst die genauere Untersuchung der Expressionsprofile der Zellen ergab die Hochregulation eines weiteren ATP-abhängigen Transporters, welcher als breast cancer resistant protein (BCRP) bezeichnet wurde [71]. Durch den Umstand der Entdeckung war auch schnell ein direkter Zusammenhang von der Expression des Transporters mit dem Auftreten von klinischen Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika gefunden. Zellen, welche mit dem Zytostatikum Mitoxantron inkubiert werden, entwickeln nach kurzer Zeit eine Resistenz, welche durch die Hochregulation von BCRP gekennzeichnet ist und keinen Einfluss auf die Expression anderer Transporter, wie P-gp oder MRP1 zeigt [72]. Ebenso haben Behandlungen mit Topotecan und Flavopiridol eine BCRP-bedingte Resistenz zur Folge, während für Paclitaxel, Cisplatin und den Vinkaalkaloiden keine Resistenzen beobachtet werden [73].

Allen 5 Proteinen der ABCG Familie ist gemeinsam, dass sie nur als so genannte Halbtransporter vorliegen und neben einer nukleotidbindenden Domäne auch nur eine membranspannende Domäne aufweisen (Abbildung 6 D). Für die Funktion des BCRP wurde in einem Modellsystem mit Sf9 Insektenzellen nachgewiesen, dass es jedoch sehr wahrscheinlich zur Ausbildung eines Homodimers bei Aktivierung des Transporters kommt [74]. Obwohl auch eine intrazelluläre Expression von BCRP in Vesikeln nachgewiesen wurde, ist die Plasmamembran der primäre Expressionsort für den Transporter. Menschliche Gewebesanalysen ergaben hohe mRNA Level in der Plazenta, Prostata, Gehirn, Kolon und Leber [71]. Die Expression in Krebszellen konnte ebenfalls

zahlreich belegt werden, jedoch ergaben sich bis heute nur selten Zusammenhänge zwischen einer Chemotherapieresistenz und erhöhten BCRP Expressionsraten. Bei einer Irinotecan-basierenden Kolonkarzinomtherapie wurden, verglichen mit der zuvor entnommenen unbehandelten Kontrolle, höhere ABCG2-mRNA Level in Lebermetastasen detektiert [75].

Als wichtigstes Substrat für das BCRP gilt der Topoisomerase-II-Hemmer Mitoxantron gefolgt von Camptothecin-derivaten, wie Topotecan, Irinotecan und SN-38, dem aktiven Metabolit von Irinotecan [73]. Aber auch physiologisch werden eine Reihe von Substanzen transportiert. Neben Sulfat-konjugierten Verbindungen sind dies auch Konjugate der Glucuronsäure, wie 17- $\beta$ -D-Estradiol-glucuronid ( $E_2$ 17 $\beta$ G) und Konjugate von Glutathion [76]. Im Laufe des letzten Jahrzehnts sind auch eine Reihe von BCRP Inhibitoren beschrieben worden. Neben Tariquidar, welcher auch schon als sehr potenter P-gp Inhibitor bekannt ist, haben sich vor allem bei Fumitremorgin C (FTC) mit IC<sub>50</sub> Werten von 1  $\mu$ M sehr gute BCRP inhibitorische Effekte gezeigt [77,78]. Der Naturstoff wird von dem Pilz *Aspergillus fumigatus* produziert und beeinflusst nicht die Transporteraktivität von P-gp und MRP1, sodass eine sehr selektive BCRP Hemmung vorliegt [79]. Der genaue Wirkmechanismus ist nicht bekannt, es konnte lediglich auch eine Hemmung der BCRP ATPase Aktivität nachgewiesen werden [80]. Durch eine starke Neurotoxizität ist FTC für klinische Versuche nicht geeignet, jedoch stellt es durch die selektive Hemmung eine gute Modellsubstanz für *in vitro* Versuche dar.

### 1.3 Multidrug-Resistance (MDR)

Der Einsatz von Arzneimitteln in der Chemotherapie ist häufig limitiert durch das Vorhandensein einer primären, intrinsischen Resistenz der Krebszellen oder der Ausbildung einer sekundären Resistenz im Laufe der Therapie. So sprechen ungefähr 50 % aller Krebserkrankungen nur gering oder überhaupt nicht auf eine antineoplastische Therapie an. Dazu gehören vor allem maligne Erkrankungen der Leber, der Niere, des Kolons und des Pankreas sowie maligne Melanome und Hirntumoren [81]. Ebenso kann bei Vorliegen einer sekundären Resistenz beobachtet werden, dass es trotz anfänglich guten Ansprechraten der Chemotherapie zu einer Wirkverminderung kommt und nach einigen Therapiezyklen keine Effekte mehr auf die Tumorzellen zu verzeichnen sind. Dabei kommt es neben der spezifischen Resistenz gegenüber einzelnen Arzneistoffen auch häufig zu Resistenzen gegenüber Substanzen mit unterschiedlichen chemischen Strukturen und Angriffspunkten [26]. Diese Form der Resistenz wird als Multidrug-Resistance (MDR) bezeichnet und ist der wichtigste Grund für das Scheitern einer Chemotherapie [26]. Als entscheidende Ursache gilt dabei die verminderte intrazelluläre Arzneistoffkonzentration, welche bedingt ist, durch die zelluläre Aktivität von ATP-abhängigen Transportsystemen, den ABC-Transportern. *In vitro* Studien zeigten, dass die Expression von P-gp mit dem Ausmaß von Resistenzen gegen Anthrazykline, Vinkalalkaloide, Taxane, Epipodophyllotoxine und weiteren Zytostatika korrelierte [82]. Klinisch betrachtet spielt die Expression des P-gp unter anderem bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) eine entscheidende Rolle [83]. Bei über 30 % der Patienten konnte zu Beginn der Diagnosestellung eine Expression des Transporters nachgewiesen werden und bei Auftreten eines Rezidivs lag die Nachweisrate sogar bei über 50 % [84]. Ebenso wurde die Expression der Transporter MRP1 und BCRP in AML Zellen nachgewiesen, jedoch konnte hier noch kein direkter Zusammenhang zwischen dem Krankheitsverlauf und dem Expressionslevel gefunden werden [84; 85]. Vor allem P-gp konnte in weiteren soliden Tumoren nachgewiesen werden. So ergaben Untersuchungen von Mammakarzinomen, dass in 41 % der Fälle eine P-gp Expression beobachtet werden konnte, welche nach der Therapie deutlich anstieg und direkt mit einem Therapieversagen korrelierte [86].

Schätzungen zufolge steht knapp jeder zweite durch Krebs verursachte Todesfall mit dem Auftreten einer MDR im Zusammenhang [87].

#### 1.3.1 Resistenzentstehung durch induktive Effekte

Für die Charakterisierung potentieller Arzneistoffe werden heutzutage auch Untersuchungen zur Induktion von verschiedensten Proteinfamilien durch die chemischen

Verbindungen als ein wichtiges Kriterium erachtet. Dabei spielen induktive Effekte auf die Proteine des Cytochrom P450 Systems und auf Membraneffluxpumpen eine wichtige Rolle [88]. Eine Aktivierung der transkriptionellen Phase in der Expression von Membrantransportern, wie P-gp ist beispielsweise eine häufige Ursache pleiotroper Resistenzen von Tumorzellen (Kapitel 1.1). Der Grund liegt meistens in dem applizierten Chemotherapeutikum, so dass die Effektivität der Therapie schon nach sehr kurzer Zeitdauer deutlich sinken kann [89,90]. Aber auch die unterstützende Therapie mit MDR Modulatoren (Kapitel 1.3.2) kann in den meisten Fällen noch nicht die gewünschte Wirkung erzielen, da die Modulatoren selber die Expression verschiedener Membrantransporter induzieren. Untersuchungen von Kolonkarzinomzellen mit P-gp Inhibitoren (Ciclosporin A, Verapamil) ergaben, dass bereits nach 8 h Inkubation ein Anstieg der MDR1-mRNA messbar war und mit steigender Inkubationsdauer die mRNA-Menge weiter zunahm [88,91]. Der HIV-1 Protease Hemmer Ritonavir ist ebenso bekannt für seine P-gp inhibitorische Aktivität und wird in der HIV-1 Therapie oft in Kombination mit anderen Wirkstoffen, wie Saquinavir eingesetzt [92-94]. Ziel ist es dabei, die Wirkstoffspiegel der HIV Therapeutika zu erhöhen, da viele der eingesetzten Protease-Hemmer als P-gp Substrate fungieren [95]. Um so interessanter sind Untersuchungen die festgestellt haben, dass unter Ritonavir Exposition ein starker Anstieg der P-gp- und MRP1-Proteinmengen schon nach 72 h zu verzeichnen war. Dabei wurden deutliche Effekte schon ab Konzentrationen von 3 µM Ritonavir beobachtet [96,97]. Damit wird der mögliche Vorteil höhere Wirkspiegel der Arzneistoffe in der Kombination mit einem P-gp Inhibitor zu erzielen durch die Induktion von Membraneffluxpumpen wieder relativiert. Der dadurch bedingte erhöhte Efflux von HIV Therapeutika, Zytostatika und MDR Modulatoren führt zu einer verminderten zytotoxischen Wirkung wodurch die Repression des Tumors nicht mehr gewährleistet ist.

Als molekulare Ursache einer durch Xenobiotika bedingten Expressionssteigerung wurde für das P-Glykoprotein vor allem ein enger Zusammenhang mit der Expression des PXR (pregnane X receptor) gefunden [98]. Der PXR ist unter anderem bekannt für die Regulierung der Expression des Cytochrom P450 Enzyms CYP3A4, welches eine wichtige Rolle in der metabolischen Inaktivierung von Fremdstoffen spielt [99]. Die Aktivierung des nukleären Rezeptors erfolgt durch eine Vielzahl unterschiedlichster Substanzen, wie z. B. Rifampicin, Hyperforin und Paclitaxel [89]. Durch die Wechselwirkung mit der PXR Ligandenbindungsdomäne erfolgt eine Wanderung des aktivierten Rezeptors in den Zellkern und es kommt zur Bindung an spezifische Nukleotidsequenzen der DNA, was wiederum eine Aktivierung der Genexpression für die Proteine der Cytochrom P450 Familie oder des P-gp zur Folge hat. Damit ist es dem

Organismus möglich, effektiv auf Umweltreize durch Aktivierung der passenden Gene zu reagieren.

### 1.3.2 Überwindung der MDR

Mit der Entdeckung, dass ABC-Transporter zu einem Großteil für die Resistenz gegenüber Zytostatika verantwortlich sind, wurden auch Strategien entwickelt, um die Resistenz wieder aufzuheben (Reversal). Es wurden Zellmodelle entwickelt, welche durch eine Transfektion oder Induktion bestimmte Membrantransporter in hohem Maße exprimieren und sich damit für Reversal-Studien sehr gut eignen. Die Untersuchungen wurden dabei verstärkt auf Substanzen fokussiert, welche direkt mit dem Membrantransporter interagieren und durch eine kompetitive oder allosterische Hemmung den Efflux von Substanzen unterbinden. Diese auch als MDR Modulatoren bezeichneten Substanzen wurden vorrangig gegen das P-gp entwickelt. Erst im Laufe der letzten Jahre rückten zunehmend auch andere Membraneffluxpumpen, wie zum Beispiel Vertreter der MRP-Familie in den Mittelpunkt. Ausführliche Informationen über die Entwicklung von MDR-Modulatoren werden in Kapitel 1.4 beschrieben.

Gleichzeitig kam es zur Erforschung von alternativen Wegen zur Aufhebung der MDR. Dazu zählen vor allem auf RNA-Technologie basierende Methoden, wie der Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden oder gegen MDR1 gerichtete Ribozyme, welche gezielt die mRNA-Expression modulieren [100,101]. Ebenso wurden posttranskriptionelle Methoden, wie die Interaktion von exogener RNA mit komplementärer, zellulärer mRNA untersucht, die als RNA-Interferenz bezeichnet wird [102]. Dabei kommt es zur Applikation doppelsträngiger RNA Moleküle (dsRNA), welche strukturell aus spezifischen Sequenzen des Transkripts bestehen, bei welchem eine „Down-Regulation“ gewünscht ist. Die dsRNA Moleküle werden anschließend durch so genannte „Dicer“ in kleinere Fragmente geschnitten (siRNA) und mittels Helicase-Aktivität in eine lineare Form überführt [103]. Der nun vorliegende antisense-Strang dient als Matrize zur Bindung der sequenzhomologen RNA des Gen-Transkripts und unterbindet damit die weitere ribosomale Translation. Problematisch sind jedoch hierbei die Applikationsform, die nicht regelbare Dauer und das Ausmaß der „Down-Regulation“ sowie der hohe Preis von synthetischen RNA Molekülen, so dass dies sicher eine interessante Strategie ist, aber nicht die alleinige Methode zur Modulation einer MDR sein kann.

## 1.4 MDR Modulatoren

Unter dem Begriff MDR Modulatoren werden Verbindungen zusammengefasst, welche die Transportfunktion des P-gp beeinflussen. Dabei können die Substanzen zum einen als Substrate fungieren und einen kompetitiven Wirkmechanismus aufweisen oder über eine allosterische Hemmung die Transporterfunktion unterbinden. Als eine weitere Bezeichnung für MDR Modulatoren ist in der Literatur der Begriff „Chemosensitizer“ zu finden. Dieser Begriff geht auf die Eigenschaft von Substanzen zurück, resistente Zelllinien durch Hemmung der P-gp Transporterfunktion wieder für ein Zytostatikum zu sensitivieren.

Durch zunehmende Erkenntnisse über die zellulären Resistenzursachen kann der Begriff „MDR Modulator“ heute ausgeweitet werden, da neben dem P-gp auch weitere Membrantransporter als Ursache einer MDR identifiziert wurden. Somit können auch die Verbindungen als MDR Modulatoren angesehen werden, welche die Funktion von Membraneffluxpumpen, wie MRP1, MRP2, MRP4 und BCRP beeinflussen können.

### 1.4.1 Entwicklung von der ersten zur dritten Generation

Die erste Generation von Substanzen mit MDR modulatorischer Wirkung wurde vor ungefähr 30 Jahren entdeckt und gehörte zu den verschiedensten Arzneistoffgruppen. Erste Effekte wurden unter dem Einsatz von Verapamil beobachtet, was eine Steigerung der Toxizität von Vincristin und Vinblastin auf Leukämiezellen zur Folge hatte [104]. Ebenso konnten Effekte von Cyclosporin A, einem starken Immunsuppressivum, auf die Transporteraktivität von P-gp nachgewiesen werden. Bedingt durch die pharmakologische Eigenwirkung der Substanzen stellten inakzeptable Nebenwirkungen das Hauptproblem dieser Generation dar [105]. Weiterhin wurden zytotoxische Effekte durch den Einsatz von hohen Konzentrationen dieser Substanzen festgestellt, da die untersuchten Verbindungen auch als P-gp Substrate fungierten und mit den Zytostatika kompetitiv um die Bindungsstelle konkurrierten [105].

Die zweite Generation zeichnete sich dadurch aus, dass Strukturanaloga der ersten Generation synthetisiert wurden, welche in der ursprünglichen pharmakologischen Wirkung inaktiv waren und somit deutlich weniger Nebenwirkungen aufwiesen. Vor allem Valspodar (PSC833) als Cyclosporin A Analogon, Toremifen als Tamoxifen Analogon und Dexverapamil als Verapamil Abkömmling wurden intensiv untersucht [106]. Valspodar zeigte eine um Faktor 20 gesteigerte MDR modulatorische Potenz im Vergleich zum Cyclosporin A bei gleichzeitig reduzierter Eigentoxizität [107]. In klinischen Studien konnten jedoch nur moderate Effekte erzielt werden, da vor allem auch

pharmakokinetische Interaktionen mit den Zytostatika durch Hemmung des Cytochrom P450 Systems Probleme bereiteten (siehe auch Kapitel 1.4.2) [108].

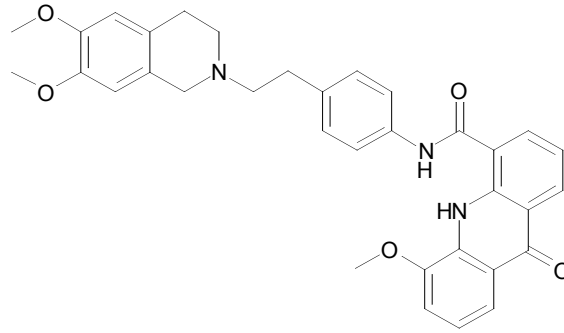
Durch eine gezielte Synthese von neuen Verbindungen entwickelte sich die dritte Generation von MDR Modulatoren. Folgende Anforderungen werden an diese Substanzen gestellt [109]:

- sehr gute MDR modulatorische Aktivität
- geringe Nebenwirkungsrate
- keine Beeinflussung von metabolischen Prozessen
- keine Substrateigenschaften
- keine induktiven Effekte auf Membrantransporter

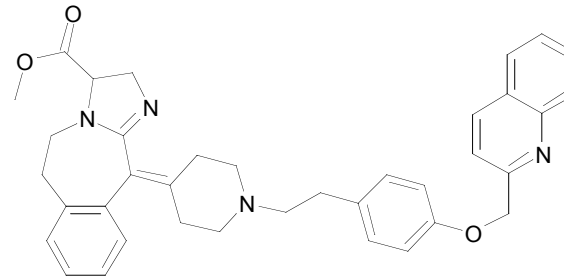
Die wichtigsten Modulatoren der letzten Jahre sind in Tabelle 4 aufgelistet [52]. Alle Substanzen zeichnen sich durch eine starke P-gp hemmende Wirkung aus und zeigen keine Beeinflussung des Cytochrom P450 Systems [110]. Bei vielen Substanzen wurde die Hemmung weiterer Membrantransporter beobachtet. So hemmen Tariquidar, Elacridar und Biricodar neben dem P-gp auch das BCRP. Dieses duale Wirkprinzip scheint auch für eine mögliche klinische Anwendung von Vorteil zu sein, da Resistenzentwicklungen häufig mit der Expression von mehreren Transportern einhergehen. Bei Modulatoren, wie Biricodar wurden sogar hemmende Effekte auf alle 3 wichtigen ABC-Transporter P-gp, BCRP und MRP1 nachgewiesen [111]. Eine Auflistung über weitere Inhibitoren ist dem Übersichtsartikel von *Baumert und Hilgeroth* (2009) zu entnehmen [109].

Verbindung	Struktur
Tariquidar (XR9576)	

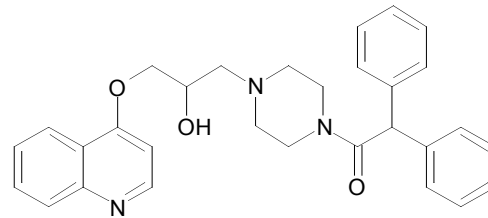
Elacridar (GF120918)



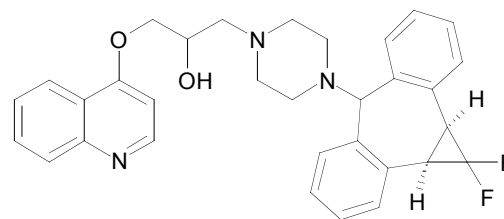
Laniquidar (R101933)



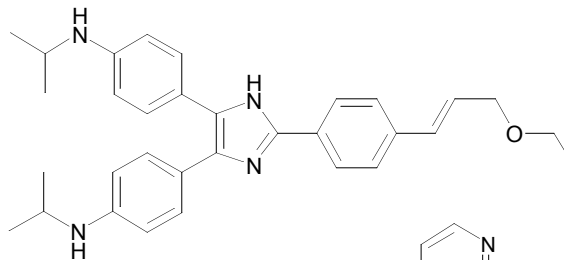
Dofequidar (MS-209)



Zosuquidar (LY-335979)



Ontogen (OC144-093)



Timcodar (VX-853)

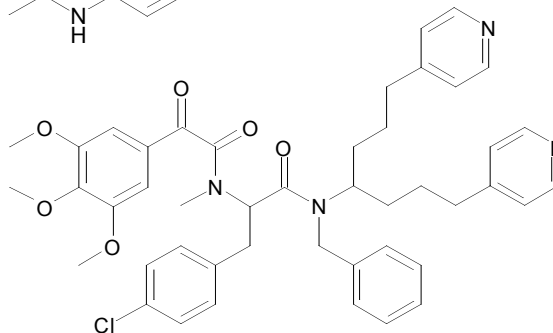


Tabelle 4: MDR Modulatoren der dritten Generation (Auswahl)



## 1.4.2 Klinische Studien

Mit der Entdeckung von Substanzen mit P-gp inhibitorischer Wirkung erfolgten wenig später auch erste Untersuchungen in klinischen Studien. Substanzen der ersten Generation von MDR Modulatoren wie Verapamil zeigten jedoch nur sehr geringe Ansätze zur Überwindung von Zytostatikaresistenzen [112]. Um eine Resensitivierung mit Verapamil erreichen zu können, waren sehr hohe Plasmaspiegel von 2-6 µmol/l Verapamil notwendig, was wiederum in starken kardialen Nebenwirkungen resultierte [37]. Aber auch Modulatoren der zweiten Generation, wie Valspodar (PSC-833) als Cyclosporin A Analogon, konnten keinen positiven Benefit in nachfolgenden klinischen Phase III Studien zeigen [113]. Trotz geringerer Nebenwirkungsraten wurden insbesondere pharmakokinetische Interaktionen beobachtet. Durch eine geringere Clearance und Metabolisierung der eingesetzten Zytostatika resultierten zu hohe Plasmaspiegel, was zu toxischen Effekten und einer damit verbundenen Dosisreduzierung mit geringerer Ansprechrate führte [37]. Lediglich eine von mehreren Phase III Studien zeigte eine signifikante Überlegenheit in der Überlebensrate bei der Coadministration mit Valspodar bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie [114]. Von der dritten P-gp Modulator Generation wurde insbesondere Tariquidar und Zosuquidar in verschiedenen Phase III Studien untersucht [115]. Studien mit Tariquidar bei der Behandlung des Bronchialkarzinoms und Mammakarzinoms wurden jedoch vorzeitig beendet, da bei den behandelten Patienten kein zusätzlicher Benefit und zum Teil eine Zunahme in der Nebenwirkungsrate zu beobachten war [92,115]. Auch eine kürzlich publizierte Phase II Studie gelangte zu keinem signifikanten Vorteil einer Docetaxel Therapie in Kombination mit Zosuquidar. Gegenüber der Docetaxel-Monotherapie gab es keine Verbesserung hinsichtlich Ansprechrate und Überlebensrate bei Patienten mit metastasierenden Mammakarzinom [116]. Tabelle 5 gibt einen Überblick über aktuelle klinische Studien mit MDR Modulatoren der dritten Generation.

<b>MDR Modulator</b>	<b>Laufende Studien</b>	<b>Erkrankung</b>	<b>Zytostatikum</b>
Tariquidar (XR9576)	Phase II	versch. Tumoren	Docetaxel
	Phase II	Nierentumor	Doxorubicin, Etoposid
	Phase I	versch. pädiatrische Tumoren	Doxorubicin, Vinorelbin, Docetaxel
Biricodar (VX-710)	Phase II	Lungenkrebs	Doxorubicin, Vincristin

Laniquidar (R101933)	Phase II	metastasierender Brustkrebs	Docetaxel, Paclitaxel
Zosuquidar (LY-335979)	Phase III	AML	Daunorubicin, Cytarabin
Timcodar (VX-853)	Phase I/II	versch. Tumoren	Doxorubicin
Dofequidar (MS-209)	Phase I	versch. Tumoren	Docetaxel

**Tabelle 5: Übersicht klinischer Studien mit MDR Modulatoren**

Aufgelistet sind nur die zur Zeit laufenden klinischen Studien. Stand Oktober 2009, Quelle: <http://www.clinicaltrials.gov> des U.S. National Institutes of Health (NIH).

Die Gründe für die bisher negativen Ergebnisse der klinischen Studien sind vielfältig. Die meisten Verbindungen, vor allem aus den ersten Studien, zeigen selbst noch zu hohe Nebenwirkungsraten, da sie meistens auch selber als P-gp Substrate fungieren und damit als Inhibitoren nur über eine kompetitive Hemmung eine Wirkung unter hoher Dosierung zeigen. Aber auch die mangelnde Selektivität der Verbindungen führt zu Problemen, vor allem hinsichtlich der Pharmakokinetik und Metabolisierung. Werden auch andere ABC-Transporter gehemmt oder das Cytochrom P450 Enzymsystem beeinflusst, kann dies zu gesteigerten Plasmaspiegelkonzentrationen der eingesetzten Zytostatika führen. Damit verbunden sind dann erhebliche Steigerungen in den Nebenwirkungsraten, wodurch bei einer anschließenden Dosisreduktion keine ausreichenden Ansprechraten auf Tumorzellen mehr erreicht werden [37]. Ein wichtiger Aspekt stellt auch das Auftreten von Polymorphismen des P-Glykoproteins dar. Zum Beispiel haben Patienten mit einem G1199A Polymorphismus nur eine durchschnittliche Überlebensrate von 2 Monaten bei einem diagnostizierten Ovarialkarzinom unter Standardtherapie. Patienten mit dem Wildtyp Allel haben dagegen eine durchschnittliche Überlebensrate von 19 Monaten [117].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass vor allem die neueren P-gp Modulatoren *in vitro* sehr gute Hemmwirkungen zeigen, aber in klinischen Studien noch kein Vorteil in der Kombinationstherapie festgestellt werden konnte.

## 1.5 Zielstellung der Arbeit

Für die antineoplastische Therapie sind geringe Ansprechraten sowie das Absinken der Ansprechraten im Laufe der Therapie ein großes Problem. Ein wirkungsvoller zellulärer Schutzmechanismus bei Zytostatikaexposition ist dabei die Expression von Membrantransportern, welche in der Lage sind, die intrazellulären Arzneistoffkonzentrationen in den subtherapeutischen Bereich abzusenken und damit eine Multidrug-Resistance (MDR) zu fördern. Eine anschließende Dosiserhöhung führt oft zu einer Zunahme von unerwünschten Nebenwirkungen, so dass die gesamte Therapie in eine kritische Phase geraten kann. Der gezielte Einsatz von MDR Modulatoren kann dabei helfen, die Ansprechraten bei einer Zytostatikatherapie wieder zu erhöhen und die zelluläre Resistenz gegenüber den Arzneistoffen aufzuheben. Durch Voruntersuchungen in der Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass käfigdimere 1,4-Dihydropyridine ein sehr gutes MDR modulatisches Potential besitzen. Darauf aufbauend wurde eine Reihe neuer symmetrischer Verbindungen synthetisiert, welche im Rahmen dieser Arbeit als mögliche MDR Modulatoren näher charakterisiert werden. Auf folgende Punkte soll dabei genauer eingegangen werden:

- Untersuchung der Zytotoxizität ausgewählter Vertreter an unterschiedlichen Zelllinien.
- Bestimmung der P-gp inhibitorischen Aktivität am etablierten Modell der Maus-T-Lymphomzellen.
- Lassen sich MDR1 induktive Effekte der Verbindungen nachweisen?
- Etablierung von Methoden zur Bestimmung der MRP1, MRP2, MRP4 und BCRP inhibitorischen Aktivität an geeigneten Zellmodellen.
- Bei fehlenden Zellmodellen soll die Möglichkeit einer gezielten Transfektion genutzt werden, um eine Zelllinie mit stabiler Überexpression des Membrantransporters zu erhalten und weiterführende Untersuchungen durchzuführen.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Biologische Materialien

##### 2.1.1.1 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden freundlicherweise von folgenden Institutionen bzw. Firmen zur Verfügung gestellt bzw. käuflich erworben:

- Institut für Pathologie, Charité Berlin: EPG85-257P / -RDB / -RNOV  
A2780P / -RCIS  
PA-I, OvCar3
- Institut für Medizinische Mikrobiologie  
Universität Szeged, Ungarn: L5178Y / -MDR, COLO-320
- Institut für Pharmazie, Halle: HepG2
- Deutsche Sammlung von Mikro-  
organismen und Zellkulturen GmbH: Jurkat

Bezeichnung	Ursprungsgewebe	Selektion	Referenz
<u>EPG85-257P</u>	Magenkarzinom		[118]
EPG85-257RDB	Magenkarzinom	Daunorubicin 2,5 µg / ml	[119]
EPG85-257RNOV	Magenkarzinom	Mitoxantron 0,2 µg / ml	[118]
<u>A2780P</u>	Ovarialkarzinom		[120]
A2780RCIS	Ovarialkarzinom	Cisplatin 10 µg / ml	[121]
<u>L5178Y</u>	murines T-Zell Lymphom		[122]
L5178vMDR	murines T-Zell Lymphom	Colchicin 60 ng / ml	[123]
Jurkat	humanes T-Zell Lymphom		[124]
HepG2	Leberkarzinom		[125]
HepG2-MRP4-Klone	Leberkarzinom	G418 400 µg / ml	nicht publiz.

Bezeichnung	Ursprungsgewebe	Selektion	Referenz
COLO-320	Kolonkarzinom		[126]
PA-I	Ovarialkarzinom		[127]
OvCar3	Ovarialkarzinom		[128]

### Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Karzinomzelllinien

Für eine unterstrichene Zelllinie existiert eine in bestimmten Eigenschaften veränderte Subzelllinie, welche darunter, leicht eingerückt platziert wurde und hinsichtlich ihrer Selektion beschrieben ist. Bis auf die Maus-T-Lymphom-Zellen L5178Y und ihrer Subzelllinie handelt es sich jeweils um humane Krebszelllinien.

#### 2.1.1.2 Antikörper

monoklonaler AK C219 (P-gp)	Alexis Biochemicals
monoklonaler AK mouse anti-Actin	Chemicon International, Inc.
ImmunoPure® Goat Anti-Mouse IgG (Peroxidase konjugiert)	Perbio Science GmbH

#### 2.1.1.3 Plasmide

IOH28052-pDEST26 (mit ABCC4 Genabschnitt)	ImaGenes GmbH
-------------------------------------------	---------------

#### 2.1.2 Nukleinsäuren

Oligonukleotide für die PCR (siehe Tabelle 7)	MWG Biotech AG
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder	Fermentas GmbH
Hyperladder™ I	Bioline
RNA Leiter (0,24 – 9,5 kb)	Life Technologies

Primer	Sequenz 5´- 3´
Aldolase-fwd	ATC CTG GCT GCA GAT GAG TC
Aldolase-rev	GCC CTT GTC TAC CTT TGA TGC
MRP1-rev	TCA CAC CAA GCC GGC GTC TTT
MRP2-fwd	GGA ACA ATT GTA GAG AAA GGA TC
MRP2-rev	CAC AAA CGC AAG GAT GAT GAA GAA
MRP3-fwd	GGA CCC TGC GCA TGA ACC TG
MRP3-rev	AGG CAA GTC CAG CAT CTC TGG
MRP4-fwd	GGA TCC AAG AAC TGA TGA GTT AAT
MRP4-rev	TCA CAG TGC TGT CTC GAA AAT AG

Primer	Sequenz 5'-3'
MRP5-fwd	GCT GTT CAG TGG CAC TGT CAG
MRP5-rev	TCA GCC CTT GAC AGC GAC CTT
MRP6-fwd	CAC TGC GCT CCA GGA TCA GC
MRP6-rev	CAG ACC AGG CCT GAC TCC TG
MRP7-fwd	AGG ACA GGG CCT TGT GGC AG
MRP7-rev	TCA GGG ACC TCC GAG TGA GG
MRP8-fwd	GAA GTC CTC CTT GGG CAT GGC
MRP8-rev	TTA TCT CAG TGA AGA AGT GGC TGT
MRP9-fwd	AGA GAC ACA ATA ATG AAA CTC CCA
MRP9-rev	CTA CAA TCT GAC TTC TGC TGC TA
MDR1-fwd	CAG CTA TTC GAA GAG TGG GC
MDR1-rev	CCT GAC TCA CCA CAC CAA TG
BCRP-fwd	CTT ACA GTT CTC AGC AGC TCT TCG
BCRP-rev	CGA GGC TGA TGA ATG GAG AAG
PBGD-fwd	GAG AAG AAT GAA GTG GAC CTG GTT
PBGD-rev	GCG GGA ACT TTC TCT GCA GC

**Tabelle 7: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide für die PCR**

### 2.1.3 Enzyme

Restriktionsenzym <i>SacI</i>	New England Biolabs
Restriktionsenzym <i>NheI</i>	New England Biolabs
Restriktionsenzym <i>KpnI</i>	New England Biolabs
TrueStart™ <i>Taq</i> (5 U/μl)	Fermentas GmbH

### 2.1.4 Chemikalien und Fertiglösungen

3-(n-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Merck KgaA
5-Carboxyfluoresceindiacetat	Sigma-Aldrich GmbH
Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)	Qbiogene
Adefovir dipivoxil	Sigma-Aldrich GmbH
Amidoschwarz	Sigma-Aldrich GmbH
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck KgaA
Bacto® Agar	Difco Laboratories

Bacto <sup>®</sup> Hefeextrakt	Difco Laboratories
Bacto <sup>®</sup> Trypton	Difco Laboratories
Blue/Orange 6 x Loading Dye	Promega GmbH
Bovines Serumalbumin	SERVA Electrophoresis
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich GmbH
Cis-Platinum-(II)-diammine dichloride	Sigma-Aldrich GmbH
Color Markers, Leiter (29 – 205 kDa)	Sigma-Aldrich GmbH
complete (Protease Inhibitor Cocktail Tablets)	Roche
D(+)-Glukose-Lösung (45 %)	Sigma-Aldrich GmbH
Diethylpyrokarbonat (DEPC)	Serva Electrophoresis
Dimethylsulphoxide sterile filtered	Sigma-Aldrich GmbH
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich GmbH
DMSO 99,5 %	Carl Roth GmbH & Co KG
D-PBS (10x)	Invitrogen GmbH
Essigsäure	J. T. Baker
Ethanol	J. T. Baker
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich GmbH
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich GmbH
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (EDTA)	SERVA Electrophoresis
Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-	Merck KgaA
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom AG
Fetuin	Sigma-Aldrich GmbH
Formaldehyd (37 %)	J. T. Baker
Formamid	Merck KgaA
Fumitremorgin C	Sigma-Aldrich GmbH
G418 Disulphate Salt Solution 50 mg/ml	Sigma-Aldrich GmbH
Glyzerin	SERVA Electrophoresis
Glyzin	SERVA Electrophoresis
Hepes Lösung 1 mM	Sigma-Aldrich GmbH
Insulin (40IE/ml), Insuman <sup>®</sup> Rapid	Sanofi-Aventis
Leibovitz L-15 Medium ohne L-Glutamin	BioWhittaker Europe
Mc Coy's 5A Medium ohne L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH
MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x)	Biochrom AG
MEM with Earle's Salts Medium ohne L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH
Methanol	J. T. Baker
Mitoxantrone dihydrochloride	Sigma-Aldrich GmbH
MK-571 sodium salt hydrate	Sigma-Aldrich GmbH

N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich GmbH
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich GmbH
Natriumazetat	Merck KgaA
Natriumbikarbonat 7,5 % (w/v)	Biochrom AG
Natriumchlorid	Merck KgaA
Natriumchlorid	Merck KgaA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KgaA
Natriumhydroxid	Merck KgaA
Nuclease free water	New England Biolabs
Restriktionspuffer	New England Biolabs
Rhodamine 123	Sigma-Aldrich GmbH
RPMI 1640 Medium	PAA Laboratories GmbH
Sodium pyruvate solution 100mM	Sigma-Aldrich GmbH
Superfect®	Qiagen GmbH
Transferrin	Roche Diagnostics GmbH
Trasyol® 0,5 (Infusionslösung)	Bayer Vital
tri-Natriumzitraddihydrat (Na <sub>3</sub> -Citrat)	Merck KgaA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	Merck KgaA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl)	Merck KgaA
Triton X-100	Sigma-Aldrich GmbH
Trypsin-EDTA (0,05 % / 0,02 %)	PAA Laboratories GmbH
Ultraglutamin 200 mM in 0,85 % NaCl	Biochrom AG

### 2.1.5 Kits

ECL-Kit™ Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics GmbH
SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen GmbH
RNeasy® mini Kit	Qiagen GmbH
Megaprime™ Labelling System	Amersham Biosciences
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH

### 2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Einkanalpipetten Research Pro	Eppendorf AG
Mehrkanalpipetten Research Pro	Eppendorf AG
Pipettenspitzen epTIPS pipette tips	Eppendorf AG



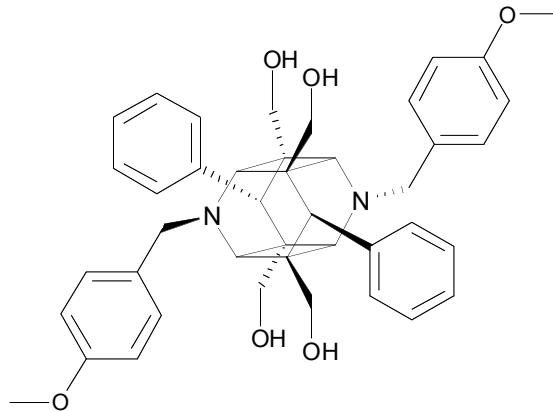
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf AG
Plastibran Einmal-Küvetten	Brand GmbH + Co KG
96-well-Platten Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH
24-well-Platten Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH
6-well-Platten Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH
Zellkulturschalen rund (10 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One GmbH
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One GmbH
Chromatographiepapier 3MM CHR	Whatman
Hyperfilm™ ECL	Amersham Biosciences
Blotmembran Hybond N <sup>+</sup>	Amersham Biosciences
Kodak BioMax MR Film	Eastman Kodak Company

### 2.1.7 Testsubstanzen (Modulatoren)

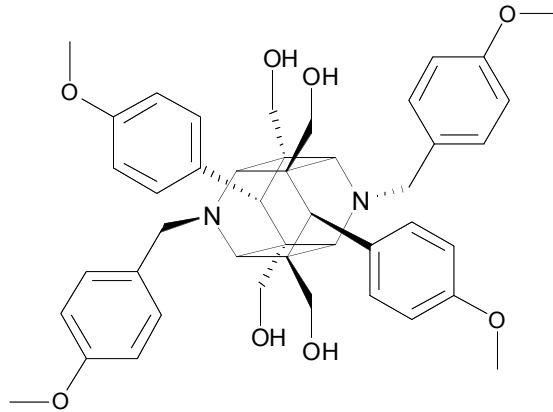
Die untersuchten Substanzen wurden aus unserer Arbeitsgruppe von PD Dr. Andreas Hilgeroth und Dr. Jörg Wollmann zur Verfügung gestellt [129]. Dabei handelt es sich um dimere 1,4-Dihydropyridine, welche ursprünglich als eine neue Klasse nicht-peptidischer HIV-1 Proteaseinhibitoren entwickelt wurden (Tabelle 8) [130]. Jedoch zeigten sich in Untersuchungen erster Strukturen auch sehr gute inhibitorische Effekte auf die Funktion von Membranefluxpumpen, so dass weitere Untersuchungen auf diesem Forschungsfeld beschlossen wurden [131].

Verbindung	Bezeichnung und Struktur
H17	3,9-Dibenzyl-1,5,7,11-tetrakis(1-hydroxyethyl)-6,12-diphenyl-3,9-diazapentacyclo[6.4.0.0 <sup>2,7</sup> .0 <sup>4,11</sup> .0 <sup>5,10</sup> ]dodecan

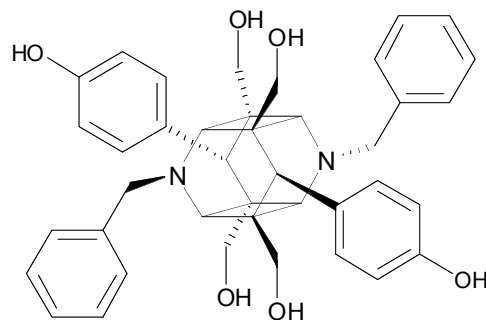
JW41

3,9-bis(4-methoxybenzyl)-1,5,7,11-Tetrakis(4-hydroxymethyl)-6,12-diphenyl-3,9-diazapentacyclo[6.4.0.0<sup>2,7</sup>.0<sup>4,11</sup>.0<sup>5,10</sup>]dodecan

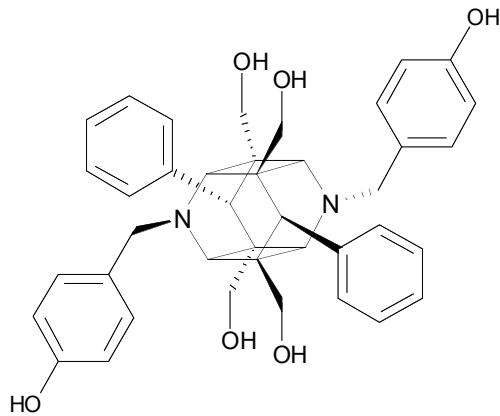
JW33

3,9-bis(4-methoxybenzyl)-1,5,7,11-Tetrakis(4-methoxyphenyl)-6,12-bis(4-methoxyphenyl)-3,9-diazapentacyclo[6.4.0.0<sup>2,7</sup>.0<sup>4,11</sup>.0<sup>5,10</sup>]dodecan

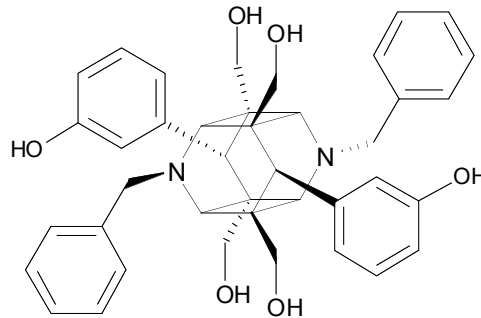
JW59

3,9-Dibenzyl-1,5,7,11-tetrakis(4-hydroxyphenyl)-6,12-bis(4-hydroxyphenyl)-3,9-diazapentacyclo[6.4.0.0<sup>2,7</sup>.0<sup>4,11</sup>.0<sup>5,10</sup>]dodecan

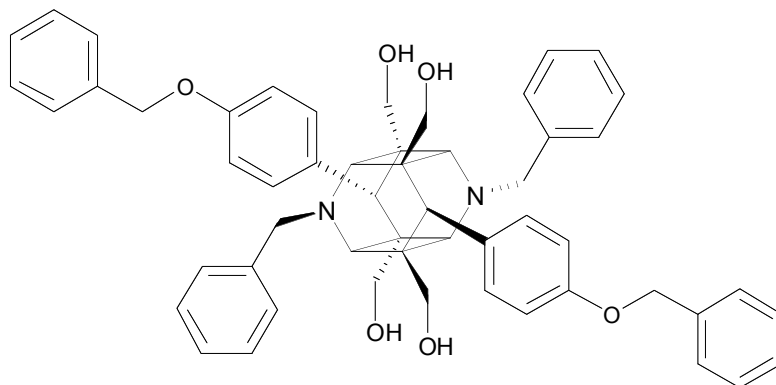
JW64A 3,9-Bis(4-hydroxybenzyl)-1,5,7,11-tetrakis(4-hydroxymethyl)-6,12-diphenyl-3,9-diazapentacyclo[6.4.0.0<sup>2,7</sup>.0<sup>4,11</sup>.0<sup>5,10</sup>]dodecan



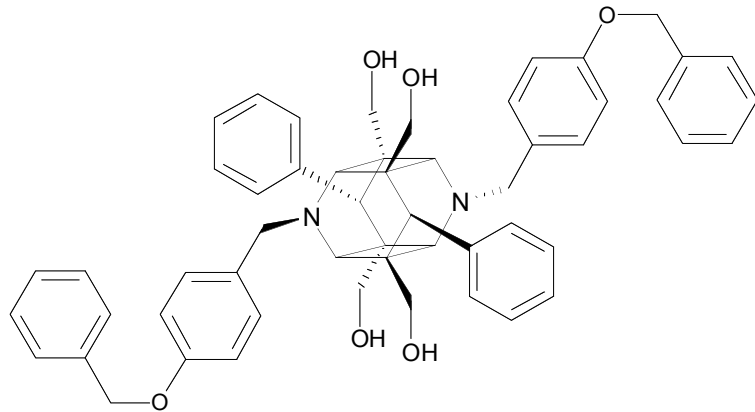
JW53B 3,9-Dibenzyl-1,5,7,11-tetrakis(3-hydroxyphenylmethyl)-6,12-bis(3-hydroxyphenyl)-3,9-diazapentacyclo[6.4.0.0<sup>2,7</sup>.0<sup>4,11</sup>.0<sup>5,10</sup>]dodecan



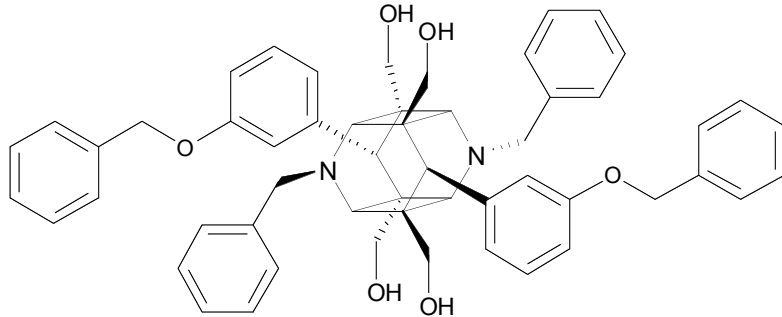
JW46 3,9-Dibenzyl-1,5,7,11-tetrakis(4-benzyloxyphenylmethyl)-6,12-bis(4-benzyloxyphenyl)-3,9-diazapentacyclo[6.4.0.0<sup>2,7</sup>.0<sup>4,11</sup>.0<sup>5,10</sup>]dodecan



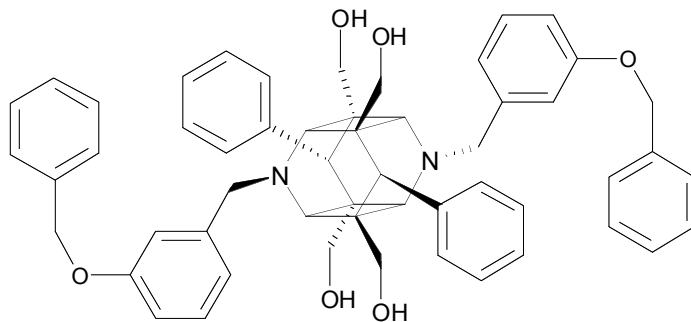
JW64B 3,9-Bis(4-benzyloxybenzyl)-1,5,7,11-tetrakis(4-hydroxymethyl)-6,12-diphenyl-3,9-diazapentacyclo[6.4.0.0<sup>2,7</sup>.0<sup>4,11</sup>.0<sup>5,10</sup>]dodecan



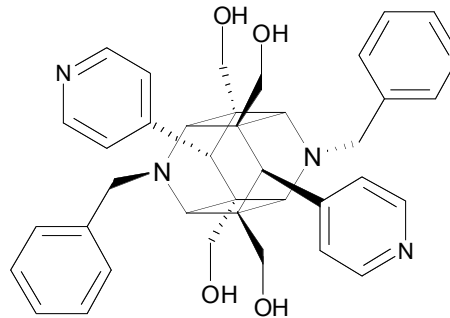
JW53A 3,9-Dibenzyl-1,5,7,11-tetrakis(4-hydroxymethyl)-6,12-bis(3-benzyloxyphenyl)-3,9-diazapentacyclo[6.4.0.0<sup>2,7</sup>.0<sup>4,11</sup>.0<sup>5,10</sup>]dodecan



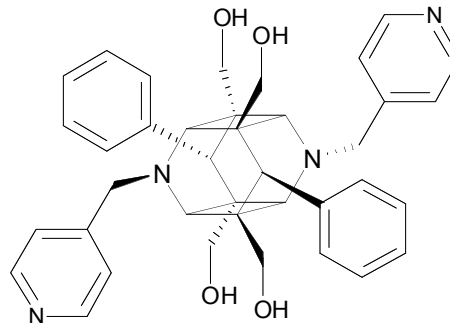
JW24 3,9-Bis(3-benzyloxybenzyl)-1,5,7,11-tetrakis(4-hydroxymethyl)-6,12-diphenyl-3,9-diazapentacyclo[6.4.0.0<sup>2,7</sup>.0<sup>4,11</sup>.0<sup>5,10</sup>]dodecan



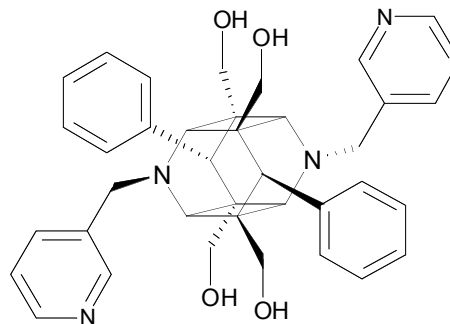
JW65 3,9-Dibenzyl-1,5,7,11-tetrakis(4-hydroxymethyl)-6,12-bis(4-pyridyl)-3,9-diazapentacyclo[6.4.0.0<sup>2,7</sup>.0<sup>4,11</sup>.0<sup>5,10</sup>]dodecan



JW63 3,9-bis(4-picolyl)-1,5,7,11-Tetrakis(4-hydroxymethyl)-6,12-diphenyl--3,9-diazapentacyclo[6.4.0.0<sup>2,7</sup>.0<sup>4,11</sup>.0<sup>5,10</sup>]dodecan



JW50 3,9-bis(3-picolyl)-1,5,7,11-Tetrakis(4-hydroxymethyl)-6,12-diphenyl-3,9-diazapentacyclo[6.4.0.0<sup>2,7</sup>.0<sup>4,11</sup>.0<sup>5,10</sup>]dodecan



**Tabelle 8: Struktur und Bezeichnung der untersuchten Verbindungen**

### 2.1.8 Geräte

Auflichtfluoreszenzmodul G 475-545	Olympus GmbH
Begasungsbrutschrank HeraCell 150	Heraeus
Digital Printer UP-D860E Gel Print 2000i	Sony
Digitalkamera Olympus C3030	Olympus GmbH
Druckerpapier Typ II UPP-110 HD	Sony

Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson
Elektrophoresekammer Mini Sub Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH
Gelelektrophoreseapparatur	Bio-Rad Laboratories GmbH
Hybridisierungsöfen OV1	Biometra
Lampenverstärker Olympus U-RFLT50	Olympus GmbH
LightCycler™	Roche Diagnostics GmbH
Mikroskop Olympus CK40	Olympus GmbH
PolarStar Galaxy Microplate Reader	BMG Labtech GmbH
Power PAC 200	Bio-Rad Laboratories GmbH
Schüttelinkubator WT16	Biometra
Schüttelwasserbad	GFL
SmartSpec™ Plus Spectrophotometer	Bio-Rad Laboratories GmbH
Thermomixer 5436	Eppendorf AG
Tiefkühlschrank Hera freeze, -86 °C	Heraeus
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf AG
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH
Vortex VF 2	IKA-Labortechnik
Zellzählgerät Casy®1	Schärfe System GmbH
Zentrifuge J2-MC (Rotor JA14)	Beckmann Coulter

## 2.1.9 Software

### Light Cycler

LightCycler Software Version 3

Roche

RelQuant 1.01

Roche

### Durchflusszytometrie

CellQuest™Pro 4.02

Becton Dickinson

### Densitometrie

ImageJ 1.4

NIH (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)

### Plattenphotometer

FLUOstar Galaxy Version 4.02

BMG Labtech GmbH

### Textverarbeitung und Grafik

Office for Mac 2004

Microsoft

Origin 6.0

Microcal Software

GraphPad Prism® 3

GraphPad Software

Adobe Photoshop CS2

Adobe

### Mikroskopische Zellaufnahmen

Olympus DP-Soft 3.0

Olympus GmbH

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Eukaryotische Zellkultur**

#### **2.2.1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Die adhärennten Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70-90 % kultiviert, anschließend trypsiniert, in einer Mischung aus FKS und DMSO (90/10) aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Zellzahl wurde auf ca  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt. Nun erfolgte ein schrittweises Abkühlen in einer Styroporbox zuerst bei  $-20\text{ °C}$  für ca. 8 Stunden, anschließend bei  $-80\text{ °C}$  für mindestens 24 Stunden. Die dauerhafte Lagerung erfolgte bei  $-196\text{ °C}$  in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen wurden die Zellen sofort im Wasserbad auf  $37\text{ °C}$  temperiert und umgehend in frisches Medium in ein Zellkulturgefäß überführt. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 24 Stunden.

#### **2.2.1.2 Zellkultivierung**

Die Kultivierung der humanen und murinen Krebszelllinien erfolgte bei  $37\text{ °C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ -Begasung in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank. Die verwendeten Zellen sind in Tabelle 6 (Kapitel 2.1.1.1) aufgelistet. Bei allen Zellen erfolgte der Mediumwechsel dreimal wöchentlich. Zur Passagierung der adhärennt wachsenden Zellen wurde das alte Medium entfernt, mit 5 ml PBS gespült und zum Ablösen der Zellen 2 ml Trypsin-Lösung pro  $75\text{ cm}^2$  Kulturgefäß zugesetzt. Nach 3 bis 6 Minuten konnte je nach Zelllinie ein sichtbares Ablösen der Zellen vom Boden des Kulturgefäßes beobachtet werden. Die tryptische Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml Medium gestoppt und es erfolgte eine 1:12 Verdünnung der Zellsuspension mit frischem Medium. Die Passagierung erfolgte bei HepG2 und COLO-320 einmal wöchentlich, für die restlichen adhärennten Zellen zweimal wöchentlich. Die Suspensionszellen Jurkat und L5178 wurden dreimal pro Woche 1:20 mit frischem Medium verdünnt. Je nach Zelllinie wurde ein bestimmtes Kulturmedium verwendet. Die genaue Zusammensetzung des jeweiligen Mediums ist in Tabelle 9 aufgeführt.

Zelllinie	Basismedium	Zusätze
EPG85-257 P	Leibovitz L-15	FKS 10 %
EPG85-257 RDB	ohne Glutamin	L-Glutamin 1 mM
EPG85-257 RNOV	500 ml	1 × MEM Vitamine NaHCO <sub>3</sub> 0,1125 % (w/v)
A2780 P		Insulin 40 IE
A2780 RCIS		D(+)-Glukose-Lösung (45 %) 0,05 % (w/v) Fetuin 3,75 mg Transferrin 1,25 mg Trasylo <sup>®</sup> 0,002 % (v/v)
HepG2	MEM mit Earle's Salzen	FKS 10 %
HepG2-MRP4-Klone	ohne Glutamin 500ml	L-Glutamin 2 mM Sodium pyruvate solution 1 mM 1 × MEM Vitamine
Jurkat	RPMI 1640 mit Glutamin 2 mM	FKS 10 %
L5178Y	Mc Coy's 5A	FKS 10 %
L5178vMDR	ohne Glutamin	L-Glutamin 2 mM
COLO-320	RPMI 1640 ohne Glutamin	FKS 10 % L-Glutamin 2 mM Sodium pyruvate solution 1 mM Hepes Lösung 0,01 mM
PA-I	DMEM	FKS 10 %
OvCar3	ohne Glutamin	L-Glutamin 2 mM

**Tabelle 9: Zusammensetzung der Zellkulturmedien**

Für die resistenten Subzelllinien wurde die in Tabelle 6 angegebene Konzentration an Daunorubicin, Colchicin, Cisplatin, G418 bzw. Mitoxantron dem Zellkulturmedium zugesetzt. Während experimenteller Inkubationsphasen wurde auf diesen Selektionszusatz verzichtet.

### 2.2.2 Zytotoxizitätsassay (MTT-Test)

Um einen Überblick über die Toxizität der Käfigdimere zu bekommen, wurde ein Zytotoxizitätsassay durchgeführt. Der MTT-Test ist ein kolorimetrisches Messverfahren und wurde erstmals von Mosmann *et al.* (1983) beschrieben [132]. Der permeable schwach gelbe Farbstoff MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-



bromid] wird intrazellulär zum Formazan umgesetzt. Dies geschieht durch mitochondriale Dehydrogenasen vitaler Zellen. Der Tetrazolring wird dabei zum dunkelblauen Formazan reduziert. Die entstehenden Formazan-Kristalle akkumulieren in den Zellen und werden durch Zugabe eines MTT-Puffers gelöst bei gleichzeitiger Lyse der Zellen. Die anschließende Quantifizierung erfolgt photometrisch bei 570 nm in einem Plattenreader.

Der MTT-Test wurde in 96-well-Platten durchgeführt. Es wurden je nach Substanz bis zu 9 verschiedene Konzentrationen eingesetzt. Es wurden eine Kontrollreihe ohne Zellen für die Eigenabsorption des Mediums verwendet sowie eine weitere Kontrollreihe mit Zellen und 1 % DMSO als Lösungsmittelkontrolle. Diese DMSO-Konzentration wurde ebenfalls als finale Konzentration bei den zu untersuchenden Substanzen verwendet und hat noch keine toxischen Auswirkungen auf die Zellproliferation. Pro Plattenvertiefung (well) wurde die in Tabelle 7 aufgelistete Zellzahl ausgesät und nach 24 Stunden Inkubation das Medium vorsichtig abgeklopft. Die adhärent wachsenden Zellen wurden davon nicht beeinflusst. Bei den Suspensionzellen war diese Inkubationszeit nicht notwendig. Hier kam es sofort nach Einstellung der Zellzahl zur Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen. Es erfolgte nun die Zugabe von 100 µl frischen Mediums pro Vertiefung mit der gewünschten Substanzkonzentration. Bei diesem Medium wurde auf die Zugabe von Phenolrot als Indikator verzichtet, da es bei der photometrischen Vermessung zu Überlagerungen kommen kann. Es folgte eine Inkubationszeit von 24, 48 oder 72 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Bei der nun folgenden MTT-Zugabe von 10 µl pro Vertiefung schließt sich nochmals eine 4-stündige Inkubationszeit an, wobei die Reduktion des MTT je nach Vitalität der Zellen erfolgt. Abschließend wurden 100 µl pro well eines MTT-Puffers aus SDS, DMSO und Essigsäure zugegeben. Um ein optimale Auflösung der Zellen und der Formazan-Kristalle zu erreichen, wurden die 96-well Platten für 30 min mit einem Plattenschüttler (Stufe 6) behandelt. Die photometrische Bestimmung der Proben erfolgte bei 570 nm als Doppelmessung und gleichzeitiger Subtraktion des Absorptionswertes der Mediumkontrolle von der zu bestimmenden Probe. Pro Substanz und Konzentration wurde mindestens eine dreifache Bestimmung durchgeführt. Die erhaltenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden im Verhältnis zur DMSO Kontrolle (1 %), welche als 100 % Vitalität betrachtet wurde, berechnet und für die graphische Darstellung verwendet. IC50-Werte sind mit Hilfe des Programms GraphPad Prism, nach einem sigmoiden Kurvenfit berechnet worden.

#### MTT-Puffer:

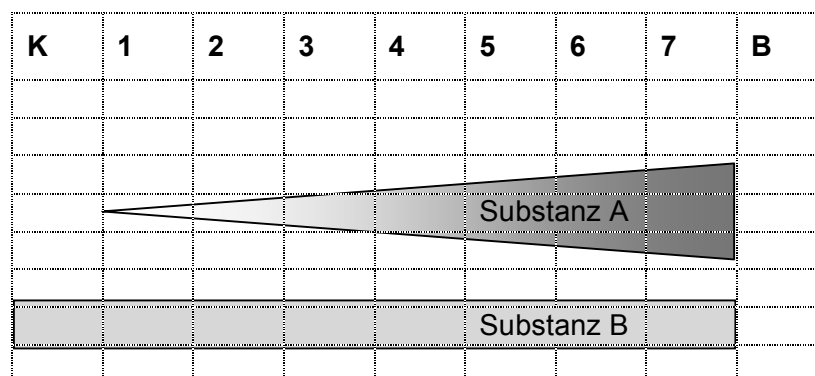
DMSO	375 ml
Essigsäure	125 ml
SDS	50 g

Inkubationszeit	Zellzahl pro well
24 Stunden	12.000
48 Stunden	10.000
72 Stunden	7.500

**Tabelle 10: Ausgangszellzahl für den MTT-Test**

### 2.2.2.1 Resistenzaufhebung

Resistente Zellen verfügen über einen deutlich höheren IC50 für eine bestimmte zytotoxische Substanz als die Stammzelllinien. Um das Potential von Testsubstanzen zur Aufhebung dieser Resistenz zu untersuchen, wurde der MTT-Test wie oben beschrieben durchgeführt. Jedoch erfolgte zusätzlich die Inkubation der Zellen mit einer konstanten Konzentration der zu untersuchenden Testsubstanzen, sodass sich folgendes Schema für eine 96-well Platte ergab:



**Abbildung 8: Pipettierschema Resistenzaufhebung**

Es wurden 7 verschiedene Konzentrationen (1-7) von der Substanz untersucht, gegen welche eine zelluläre Resistenz vorlag (Substanz A), beginnend mit der geringsten Konzentration (1). Zusätzlich wurde zum Testen der Resistenzaufhebung eine konstante Konzentration eines Modulators zugesetzt (Substanz B). Die Zellen der Kontrolle (K) wurden nur mit der Modulatorkonzentration inkubiert, während in Reihe B nur Medium zum Abgleich der Eigenabsorption vorhanden war.

### 2.2.3 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf dem Passieren eines Laserstrahls von Zellen in einer Detektorzelle. Die dadurch entstehenden Lichtstreuungen seitens der Zelle werden von Detektoren (Photomultiplier) erfasst und ermöglichen eine Charakterisierung der Zellen hinsichtlich Größe, Granularität und Zellaufbau. Dabei wird zwischen 2 verschiedenen Streuungen unterschieden. Die Vorwärtstreuung (FSC, Forward Scatter) gibt Hinweise auf das Volumen der Zelle durch Beugung des Lichts im flachen Winkel

während die Seitwärtstreuung (SSC, Sidewards Scatter) ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel darstellt und durch Granularität, Größe und Zellinhalt beeinflusst wird. Anhand dieser beiden Parameter lassen sich z. B. Zellen des Blutes sehr gut voneinander unterscheiden, da „glatte“ T-Zellen deutlich andere Lichtstreuungen hervorrufen als „rauhe“ Granulozyten. Neben dieser Charakterisierung von Zellen ist das Durchflusszytometer in der Lage die Emission von optischen Signalen einer z. B. intrazellulär fluoreszierenden Substanz oder von Fluorophoren eines gekoppelten Antikörpers zu erfassen. Dadurch lassen sich quantitative Aussagen je nach Ausmaß der gemessenen Fluoreszenz treffen.

Für die durchflusszytometrischen Arbeiten stand unserer Arbeitsgruppe ein Gerät der Firma Becton Dickinson (FACSCalibur) zur Verfügung. Die Anregung und Charakterisierung der Zellen erfolgte mit einem Argonlaser, welcher Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm emittierte. Die Emissionsmessung erfolgte über verschiedene Filter, sodass Bereiche von  $530 \pm 15$  nm (FL-1),  $585 \pm 21$  nm (FL-2) und  $> 670$  nm (FL-3) parallel erfasst werden konnten. In Tabelle 11 sind die Strukturen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe mit ihren Absorptions- und Emissionsmaxima dargestellt. Es wurden pro Messung 10.000 Zellen erfasst, welche hinsichtlich der FSC- und SSC-Charakterisierung einer Population zugeordnet wurden. Dies kann durch die Verwendung eines „gates“ sichergestellt werden. Abgestorbene oder beschädigte Zellen konnten mit dieser Methode ausgeschlossen werden. Zur weiteren Berechnung wurde von jeder Probe die mittlere Fluoreszenz (FL-mean) verwendet und ins Verhältnis zur Fluoreszenz der unbehandelten Kontrolle gesetzt. Der erhaltene Wert wurde als FAR-Wert bezeichnet (Fluorescence Activity Ratio).

### 2.2.3.1 P-Glykoprotein Hemmung

Zur Bestimmung der P-gp Aktivität wurden die Maus-T-Lymphom Zellen L5178Y und die MDR resistente Subzelllinie verwendet. Die kultivierten Zellen wurden auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen / ml eingestellt und für jede Probe 0,5 ml in ein Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert. Nun erfolgte die Zugabe der Testsubstanzen, so dass bei jeder Probe eine finale Konzentration des Lösungsmittels DMSO von 1 % vorlag. Als Kontrolle diente zusätzlich eine Probe, welche nur 1 % DMSO enthielt. Nach 20 min Inkubationszeit bei 37 °C erfolgte die Zugabe von Rhodamin 123 (5 µM finale Konzentration), welches als fluoreszierendes P-gp Substrat fungiert, für weitere 40 min bei 37 °C. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gesetzt, für 2 min bei 2000 rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Nach zwei Waschschritten mit PBS wurden die Proben in 0,5 ml PBS aufgenommen und bis zum Vermessen auf Eis gehalten, um eine weitere Transporteraktivität zu unterbinden. Die Fluoreszenz der Zellen wurde über den FL-1 Filter bestimmt und der FAR-Wert nach folgender Formel berechnet:

$$\text{FAR (P-gp)} = \frac{\text{FL-1}^{\text{Probe}} \text{ (MDRres-Zellen)} / \text{FL-1}^{\text{Kontrolle}} \text{ (MDRres-Zellen)}}{\text{FL-1}^{\text{Probe}} \text{ (P-Zellen)} / \text{FL-1}^{\text{Kontrolle}} \text{ (P-Zellen)}}$$

Zur Visualisierung der intrazellulären Rhodaminakkumulation wurden 2 ml pro Vertiefung einer Zellsuspension ( $1 \times 10^5$  Zellen / ml) von L5178YvMDR in einer 6-well Platte ausgesät und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µM JW33 oder 10 µM Tariquidar. Nach 20 min wurde 5 µl Rhodamin 123 zu jeder Vertiefung pipettiert (finale Konzentration 5 µM) und die Zellen für weitere 40 min bei 37 °C inkubiert. Es folgten 2 Spülschritte der semiadhärenten Zellen mit PBS nachdem das überstehende Medium entfernt worden war. Anschließend erfolgte die mikroskopische Analyse der Zellen unter Anregung des Rhodamin 123 durch ein Olympus Mikroskop mit Auflichtfluoreszenzeinheit.

### 2.2.3.2 MRP1, MRP2 Hemmung

Zur Bestimmung der MRP1 und MRP2 Aktivität wurden die adhärent wachsenden A2780P Zellen (MRP1) und die cisplatin-resistenten A2780RCIS Zellen (MRP2) verwendet. Die Zellen wurden in einer 24-well Platte mit einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung ausgesät und für 24 h in normalen Zellkulturmedium kultiviert. Danach erfolgte die Zugabe und Inkubation der Testsubstanzen analog den oben genannten Bedingungen zur P-gp Bestimmung. Um Effekte auf die Transporter MRP1 und MRP2 zu überprüfen, wurde Carboxyfluoresceindiacetat in einer finalen Konzentration von 2 µM eingesetzt. Durch intrazelluläre Esteraseaktivität wird während der Inkubationszeit das Diacetat abgespalten und das fluoreszierende MRP1 und MRP2 Substrat Carboxyfluorescein erhalten [133-136]. Der Zellüberstand wurde abgesaugt und die Zellen durch 250 µl Trypsin pro Vertiefung (Kapitel 2.2.1.2) vom Gefäßboden abgelöst. Die Zellen wurden sofort in kaltem PBS resuspendiert und nach einem weiteren Waschschrift in 0,5 ml PBS aufgenommen und bis zur Vermessung im Durchflusszytometer auf Eis gehalten. Die Fluoreszenz der Zellen wurde über den FL-1 Filter bestimmt. Zur Bestimmung der MRP2-Aktivität wurden die erhaltenen MRP2-Werte durch die Werte der MRP1-Aktivität dividiert, da die A2780RCIS Zellen neben dem MRP2 Transporter auch den MRP1 Transporter der Stammzelllinie A2780P exprimieren.

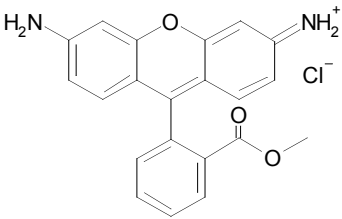
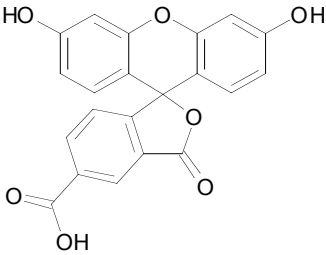
$$\text{FAR (MRP1)} = \text{FL-1}^{\text{Probe}} \text{ (A2780P)} / \text{FL-1}^{\text{Kontrolle}} \text{ (A2780P)}$$

$$\text{FAR (MRP2)} = \frac{\text{FL-1}^{\text{Probe}} \text{ (A2780RCIS)} / \text{FL-1}^{\text{Kontrolle}} \text{ (A2780PRCIS)}}{\text{FL-1}^{\text{Probe}} \text{ (A2780P)} / \text{FL-1}^{\text{Kontrolle}} \text{ (A2780P)}}$$

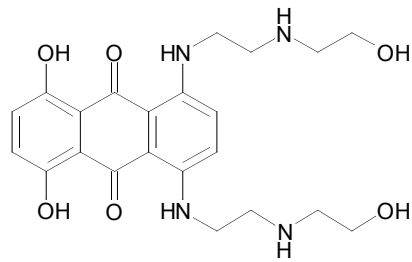
### 2.2.3.3 BCRP Hemmung

Die BCRP Aktivität konnte durch die Verwendung der EPG85-257RNOV Zellen bestimmt werden. Die Versuchsdurchführung war analog der Bestimmung von MRP1 und MRP2 Aktivität. Als fluoreszierendes Substrat für den BCRP Transporter diente Mitoxantron [138]. Das Absorptionsmaximum liegt bei 607 nm, so dass durch Nutzung eines Argonlasers (488 nm) nur eine Emission von 6 % im Vergleich zu einer Anregung bei 630 nm erreicht werden kann. Durch Untersuchungen von *Mindermann et al.* konnte jedoch gezeigt werden, dass bei einer Mitoxantronkonzentration oberhalb von 3  $\mu\text{M}$  keine Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität zwischen der Anregung bei 488 nm und 630 nm auftraten [137,138]. Deshalb wurde zur Sicherstellung einer ausreichenden Emission die Konzentration von Mitoxantron für jede Probe auf 20  $\mu\text{M}$  eingestellt. Die Vermessung erfolgte dann mittels des FL-3 Filters für Längenwellen oberhalb von 670 nm und aus den erhaltenen Werten wurde der FAR für die BCRP Hemmung bestimmt.

$$\text{FAR (BCRP)} = \text{FL-3}^{\text{Probe}} \text{ (BCRP)} / \text{FL-3}^{\text{Kontrolle}} \text{ (BCRP)}$$

Substrat	Struktur	Absorptionsmax.	Emissionsmax.
Rhodamin 123		507 nm	529 nm
Carboxyfluorescein		493 nm	515 nm

Mitoxantron



607 nm

684 nm

Tabelle 11: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe für die Durchflusszytometrie

## 2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

### 2.2.4.1 Reverse-Transkription

Nach der RNA-Isolierung (siehe Kapitel 2.2.5 Northern Blot Analyse) wurde das Umschreiben der isolierten Gesamt-RNA mit dem SuperScript™ First-Strand Synthesis System Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Ausgangsmenge waren jeweils 2 µg Gesamt-RNA. Die erhaltenen cDNAs wurden 1:10 für die weitere Quantifizierung im LigthCycler (RTQ-PCR) verdünnt. Für die RT-PCR wurden die Proben 1:50 weiter verarbeitet.

### 2.2.4.2 RT-PCR

Um spezifische DNA-Abschnitte nachzuweisen, wurde eine Polymerase-Kettenreaktion nach folgendem Schema für jede Probe durchgeführt:

TrueStart <i>Taq</i> (5 U/µl)		0,2 µl
5'-Oligonukleotidprimer (5 µM)		1,0 µl
3'-Oligonukleotidprimer (5 µM)		1,0 µl
10 × PCR-Puffer		2,5 µl
dNTPs (10 mM)		0,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)		1,5 µl
Aqua dest.	auf	23 µl
cDNA (1:10)		2,0 µl

Anschließend erfolgte die Amplifikation im Thermocycler nach folgendem Programm:

1. 95 °C 5 min Initiale Denaturierung
2. Amplifikation (36-49 Zyklen), wie folgt:
  - 2.1 94 °C 1 min Denaturierung der DNA
  - 2.2 x °C 1,5 min Primerhybridisierung (x: siehe Tabelle 12)

2.3	72 °C	1,5 min	Elongation
3.	72 °C	5 min	Extension
4.	4 °C		Abkühlung

5' und 3' Primer	Hybridisierungstemperatur	PCR-Produkt	Anzahl Zyklen
Aldolase fwd / rev	58 °C	258 bp	36, 40*
PBGD fwd / rev	60 °C	223 bp	40*
MRP1 fwd / rev	58 °C	353 bp	36
MRP2 fwd / rev	55 °C	452 bp	36
MRP3 fwd / rev	60 °C	450 bp	36
MRP4 fwd / rev	56 °C	358 bp	36, 40*
MRP5 fwd / rev	60 °C	481 bp	36
MRP6 fwd / rev	59 °C	502 bp	45
MRP7 fwd / rev	60 °C	437 bp	49
MRP8 fwd / rev	57 °C	610 bp	49
MRP9 fwd / rev	55 °C	375 bp	45
MDR1 fwd / rev	58 °C	298 bp	36, 40*
BCRP fwd / rev	55 °C	320 bp	36

**Tabelle 12: Bedingungen für die RT-PCR und RTQ-PCR (\*)**

### 2.2.4.3 Real-Time quantitative PCR (RTQ-PCR)

Die Durchführung einer Real-Time quantitativen PCR im LightCycler ermöglicht dem Anwender, quantitative Aussagen über Ausgangsmengen der zu untersuchenden Matrize zu treffen. Dazu können pro Lauf bis zu 32 PCRs parallel durchgeführt werden. Die Zusammensetzung für einen Ansatz ist unten dargestellt:

DNA Master SYBR Green I		2,0 µl
5'-Oligonukleotidprimer (10µM)		1,0 µl
3'-Oligonukleotidprimer (10µM)		1,0 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)		2,4 µl
Aqua bidest.	auf	18 µl
cDNA (1:10)		2,0 µl

Dabei befindet sich in der DNA-Master SYBR Green I Mischung neben dem fluoreszierenden SYBR Green I noch die *Taq* DNA Polymerase, der dNTP Mix und ein Puffer.

Bei der Untersuchung auf induktive Effekte wurde bei jedem Lauf eine Nullkontrolle und eine Standardreihe aus 9 Proben ( $10^0$  bis  $10^8$ ) der zu untersuchenden Matrix (P-gp) mit amplifiziert. Daraus konnte eine Standardkurve erstellt werden, um auf die Ausgangstemplatemengen der Proben zu schließen. Für die Untersuchung der MRP4-transfizierten hepG2 Zellen erfolgte die Bestimmung der Ausgangstemplatemengen nur „relativ“ in Bezug zu einem Standard. Dafür war lediglich eine Standardreihe notwendig, welche durch 15 Verdünnungsschritte einer beliebigen Probe erstellt wurde, ohne genaue Kenntnis der absoluten Menge an MRP4-cDNA. Parallel dazu wurde als Kontrolle die Matrizen der Aldolase und der Porphobilinogen deaminase (PBGD) amplifiziert. Hier sollten nur geringe Unterschiede in den Ausgangsmengen aufzuweisen sein, da beide als „housekeeping“-Gene unabhängig von exogenen Einflüssen stabil und gleichmäßig exprimiert werden. Änderungen sind durch die Probenvorbereitung bedingt und werden bei der Quantifizierung rechnerisch berücksichtigt. Die Durchführung der Fluoreszenzmessung erfolgte bei 84 °C (P-Glykoprotein) und bei 81 °C (MRP4). Diese Temperaturen liegen kurz vor dem Abschmelzen des PCR Produkts und haben den Vorteil, dass eventuell vorliegende Primer-Dimere dann bereits als DNA-Einzelstränge vorliegen und bei der Fluoreszenzmessung nicht mehr mit einfließen. Dieser spezifische Messpunkt wurde vor jedem PCR Lauf mit Hilfe einer Schmelzkurve bestimmt und ebenfalls bei den Kontrollen Aldolase und PBGD verwendet.

Die Amplifikation erfolgte in folgenden Schritten:

- |     |       |        |                                                                                                                 |
|-----|-------|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.  | 95 °C | 10 min | Initiale Denaturierung                                                                                          |
| 2.  |       |        | Amplifikation (40 Zyklen), wie folgt:                                                                           |
| 2.1 | 95 °C | 15 s   | <i>Denaturierung der DNA</i>                                                                                    |
| 2.2 | x °C  | 5 s    | <i>Primerhybridisierung (Tabelle 12)</i>                                                                        |
| 2.3 | 72 °C | 15 s   | <i>Elongation</i>                                                                                               |
| 2.4 | x °C  | 5 s    | <i>Fluoreszenzmessung x: 84 °C P-gp, PBGD</i><br><i>x: 81 °C MRP4, Aldolase</i>                                 |
| 3.  |       |        | Schmelzkurvenbestimmung (Temperaturanstieg um 0,1 °C/s von 65 °C auf 95 °C, kontinuierliche Fluoreszenzmessung) |
| 4.  | 40 °C | 30 s   | Abkühlung                                                                                                       |



Jede Probe wurde 3-fach bestimmt, so dass am Ende jeweils 3 Werte für das Zielgen und 3 Werte für das Kontrollgen vorlagen. Die Auswertung wurde so durchgeführt, dass Schwankungen der Aldolase- und PBGD-Templatmengen der Proben bei der Berechnung der MDR1 und MRP4 cDNA-Mengen Berücksichtigung fanden. Dies wurde für MDR1 manuell durchgeführt und für MRP4 durch das Programm RelQuant realisiert. Die erhaltenen Werte wurden für MRP4 in das Verhältnis zum Leervektor gesetzt und für MDR1 auf die unbehandelte Kontrolle bezogen.

#### **2.2.4.4 Gel-Elektrophorese**

Das durch die RT-PCR erhaltene PCR-Produkt wurde mit Hilfe eines Agarose-Gels (1%, 2%) elektrophoretisch bei 70 V für 70 bis 90 min in einer Gelapparatur von Biorad in 1 × TAE aufgetrennt. Weiterhin wurde den 20 µl jeder Probe 4 µl Blue/Orange-Ladepuffer der Firma Promega zugesetzt, um eine optimale Befüllung der Taschen zu garantieren sowie das Fortschreiten der Auftrennung zu kontrollieren. Als Größenstandard diente der 1 kb DNA-Marker Hyperladder I. Zur Visualisierung wurde dem Gel 0,2 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt, um nach der Auftrennung eine Auswertung durch UV-Bestrahlung bei 254 nm zu ermöglichen.

50 × TAE:

Tris-Acetat, pH 8	2 M
Na <sub>2</sub> EDTA	50 mM
Aqua dest.	

#### **2.2.5 Northern Blot Analyse**

##### **2.2.5.1 RNA Isolierung und Konzentrationsbestimmung**

Die adhärennten Zellen wurden bis zu einer Zelldichte von 80-90 % Konfluenz kultiviert, mit 1 × PBS gewaschen, trypsinisiert und unter Zusatz von 5 ml 1 × PBS für 5 min bei 900 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es erfolgte die Zugabe von 350 µl RLT-Puffer, welcher mit 1 % β-Mercaptoethanol versetzt war. Nach Resuspendierung des Zellpellets erfolgte die Lagerung bei -20 °C. Die Isolierung der RNA konnte mit Hilfe des RNeasy mini Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt werden. Das gewonnene RNA-haltige Eluat wurde bei -80 °C gelagert.

Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe eines Spektrophotometers. Dazu wurden die RNA-Proben 1:50 verdünnt und bei 260 nm vermessen.

### 2.2.5.2 RNA Auftrennung und Transfer

Für die Auftrennung wurden 10 µg RNA jeder Probe zu 20 µl Probenpuffer ergänzt. Die Proben wurden für 10 min bei 70 °C im Thermomixer denaturiert, kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt. Eine Probe mit 5 µl RNA-Leiter, welche, mit 1 µl Ethidiumbromidlösung versetzt, ebenfalls auf 20 µl mit Probenpuffer ergänzt wurde, sollte die spätere Zuordnung der Banden sicher stellen. Unter Verwendung eines 1 % Agarosegels mit 6 % Formaldehyd erfolgte die Auftrennung in 1 x MOPS Puffer bei 70 V für ca 120 min bis die Bromphenolbande  $\frac{3}{4}$  der Gelstrecke durchlaufen hatte.

#### Probenpuffer:

Formamid	100 µl
Formaldehyd (37 %)	35 µl
25 x MOPS	8 µl
DEPC-Wasser (0,1 %)	57 µl

#### 25 x MOPS:

MOPS	5 M
Natriumazetat	12,5 M
EDTA	0,25 M
Aqua bidest. pH 7,0	

Anschließend wurde das Gel für 30 bis 60 Minuten mit 20 x SSC gewaschen, um Formaldehydreste zu entfernen. Der RNA-Transfer erfolgte über Nacht auf eine Nylonmembran in Anlehnung an Sambrook *et al.*, 2001 [139]. Dabei wird über eine mit 20 x SSC gefüllten Wanne eine Glasscheibe gelegt, auf welcher ein Whatman-Papier liegt, dessen überhängende Enden in den Wannepuffer reichen. Darauf wird vorsichtig das Gel mit den Taschen nach unten gelegt und eventuelle Luftblasen vorsichtig entfernt. Es folgen die Nylonmembran, 2 Lagen angefeuchtetes Whatman-Papier und 4 Lagen trockenes Whatman-Papier sowie etwa 10 cm Zellstoff und eine mit Gewichten beschwerte Glasplatte. Durch die Sogwirkung wird die RNA auf die Membran transferiert und im Anschluss erfolgt im Vakuumtrockner bei 80 °C für 2 h eine verstärkte Fixierung der RNA auf der Membran.

#### 20 x SSC:

Natriumchlorid	3 M
Na <sub>3</sub> -Citrat	0,3 M
Aqua bidest. pH 7,0	

### 2.2.5.3 Markierung von DNA-Sonden

Um eine spätere Detektion der gebundenen Sonde zu ermöglichen, erfolgte eine radioaktive Markierung mit Hilfe des Megaprime™ DNA Labelling System. Dabei wurden 25 ng der zu markierenden DNA mit 27 µl DEPC-Wasser und 5 µl Random-Primern versetzt, 5 min bei 95 °C im Thermomixer denaturiert und auf Eis gesetzt. Nach Zugabe von 10 µl Labelling-Puffer, 5 µl <sup>32</sup>P-dCTP und 2 µl Klenow-Fragment (1U/µl) kam es zur Amplifikation unter Einbau von radioaktiv markierten dCTP für 60 min bei 37 °C. Zur erneuten Denaturierung wurde die Sonde für 5 min bei 95 °C behandelt und anschließend wieder auf Eis gesetzt, um eine erneute Zusammenlagerung der Einzelstränge zu verhindern.

### 2.2.5.4 Hybridisierung

Als erstes erfolgte eine Prähybridisierung in ExpressHyb™ Hybridisierungslösung für 60 min bei 58 °C im Hybridisierungssofen. Anschließend wurde die markierte Sonde zugegeben und über Nacht bei 58 °C auf der Membran belassen. Im Anschluss kam es zu mehreren Waschschritten. Als erstes wurde der Blot für 30 min bei Raumtemperatur zweimal mit Waschpuffer 1 gewaschen, danach zweimal für 30 min bei 58 °C mit Waschpuffer 2. Die anschließende Exposition erfolgte auf Kodak-Röntgenfilmen bei -80 °C.

#### Waschpuffer 1:

2 x SSC (s. o.) mit 0,1 % SDS

#### Waschpuffer 2:

0,1 % SSC (s. o.) mit 0,1 % SDS

## 2.2.6 Western Blot Analyse

### 2.2.6.1 Gesamtproteinisolierung

Die adhärenenten Kolon- und Magenkarzinomzellen wurden bis zu einer Zelldichte von  $5 \times 10^5$  Zellen / ml kultiviert. Nach Absaugen des Mediums wurde zweimal mit 1 x PBS gewaschen und die 6-well Platten auf Eis gesetzt. Nach Zugabe von 50 µl RIPA Puffer pro well erfolgte eine Inkubation von 30 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dies erfolgte mit Hilfe eines Zellschabers. Die Suspension wurde für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß, unter Zugabe von 15 µl 4 x Probenpuffer, überführt. Im Thermomixer kam es zur Denaturierung der Proteinlösung bei 95 °C für 10 min und im

Anschluss zur Zentrifugation (13000 rpm) für 10 min bei 4 °C. Der erhaltene Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bei –80 °C gelagert.

RIPA Puffer:

Complete (Proteaseinhibitor)	½ Tablette
Triton X-100	1 % (v/v)
EGTA	5 mM
NaCl	150 mM
Tris-Base	50 mM

4 x Probenpuffer:

Tris-HCl, pH 6,8	160 mM
DTT	100 mM
SDS	10 % (v/v)
Glycerin	2 % (v/v)
Bromphenolblau	Spatelspitze

### 2.2.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Auf eine Nitrozellulosemembran wurden von jeder Probe jeweils zweimal 1 µl pipettiert (Doppelbestimmung). Parallel dazu wurde mit einem Standard gearbeitet, welcher aus einer ansteigenden Konzentration von in 1 x PBS gelösten Rinderserumalbumin bestand. Nach Trocknung der Proben wurde die Membran für 2 min in Amidoschwarzlösung gefärbt. Dabei kommt es zum unspezifischen Anfärben aller Proteinbestandteile. Anschließend wurden die Proben 3 bis 4 mal in einer Entfärbelösung geschwenkt. Die verbliebenen blau gefärbten Proteinpunkte wurden gleichmäßig mit Hilfe eines Skalpell aus der Membran geschnitten und in ein, mit 1 ml Elutionslösung gefüllten, Reaktionsgefäß (2 ml) überführt. Die Proben wurden für 30 min im Thermomixer bei Raumtemperatur geschüttelt. Die nun gefärbte Elutionslösung wurde bei 630 nm photometrisch vermessen und die Absorption bestimmt. Zur Quantifizierung der Proteinlösungen dienten die Standardproben mit deren Hilfe eine Kalibriergerade erstellt werden konnte.

Elutionslösung:

Ethanol	50 % (v/v)
0,5 M EDTA, pH 8	500 µM
0,5 M NaOH	25 mM
Aqua dest.	

Entfärbelösung:

Essigsäure	45 % (v/v)
Methanol	1 % (v/v)
Aqua dest.	

Amidoschwarzlösung:

Amidoschwarz	0,1 % (w/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Methanol	45 % (v/v)
Aqua dest.	

**2.2.6.3 Proteingel**

Ausgehend von der nun bekannten Proteinkonzentration jeder Probe wurden 20 µg Protein auf 20 µl mit 2 x Probenpuffer (s. o. Gesamtproteinisolierung) ergänzt. Zusätzlich wurde eine Leiterprobe parallel mit verarbeitet. Es erfolgte eine Denaturierung der Proteine für 5 min bei 95 °C im Thermomixer. Die Proben wurden kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt. Die Trennung der Proteine erfolgte mit einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) in 1 x Laufpuffer bei 93 V für 90 bis 120 min bis kurz vor Rauslaufen der Bromphenolbande.

Sammelgel 4 %:

Acrylamid-Bisacrylamid (40%)	0,5 ml
APS 10 %	25 µl
SDS 10 %	50 µl
TEMED	5 µl
Tris-HCl, pH 6,8 (0,5 M)	1,25 ml
Aqua bidest.	3,2 ml

Trenngel 6 %:

Acrylamid-Bisacrylamid (40 %)	3 ml
APS 10 %	150 µl
SDS 10%	200 µl
TEMED	15 µl
Tris-HCl, pH 8,8 (1,5 M)	5 ml
Aqua bidest.	11,6 ml

Bis zur vollständigen Polymerisation wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet.

10 x Laufpuffer:

SDS		10 g
Tris-Base		30 g
Glyzin		144 g
Aqua bidest.	auf	1 l

**2.2.6.4 Proteintransfer**

Nach der Durchführung der PAGE wurde das Sammelgel verworfen. Das Trenngel, 2 Lagen Whatman-Papier und eine Zellulosenitratmembran gleicher Größe wurden in 1 x Transferpuffer äquilibriert. Es erfolgte der Transfer der Proteine auf die Membran mit Hilfe einer „semi-dry“ Blotapparatur bei 12 V für 60 min nach Angaben des Herstellers.

1 x Transferpuffer:

Methanol		20 %
Tris-Base		25 mM
Glyzin		150 mM
Aqua bidest.	auf	1 l

**2.2.6.5 Antikörper-Reaktion und Detektion**

Nach dem Transfer der Proteine auf die Zellulosemembran wurde der spezifische Nachweis von P-gp und als Kontrolle auch von Aktin angeschlossen. Dazu wurde im ersten Schritt die nach dem Blot erhaltene Membran 1 bis 2 min mit Ponceau-S-Lösung überschichtet und anschließend mit Aqua bidest. mehrmals gewaschen. Im zweiten Schritt wurde die Membran über Nacht mit 10 ml eines Blockingpuffers behandelt. Der Blockingpuffer wurde verworfen und es folgte die Inkubation der Membran für 2 Stunden mit der P-gp-Antikörperlösung unter langsamen Schwenken. Anschließend wurde die Antikörperlösung unter 4 mal 7 min Spülen wieder entfernt und die Membran einer weiteren Behandlung mit dem Peroxidase konjugierten sekundären Antikörper für eine Stunde unterzogen. Es folgten 4 mal 10 min Waschen mit TBST und 2 mal 5 min mit TBS. Die Waschschritte wurden unter Benutzung des Schüttelinkubators vollzogen.

Ponceau-S:

0,2 % (w/v) in 1 % (v/v) Essigsäure

Blockingpuffer:

5 % (w/v) Milchpulver in 1 x TBST

P-gp-Antikörperlösung:

C219 als 1:100 Verdünnung  
anti-Actin als 1:5000 Verdünnung  
in 1 % (w/v) Milchpulver in 1 x TBST

sekundärer Antikörper:

anti-mouse IgG als 1:10000 Verdünnung in 1 x TBS

TBST:

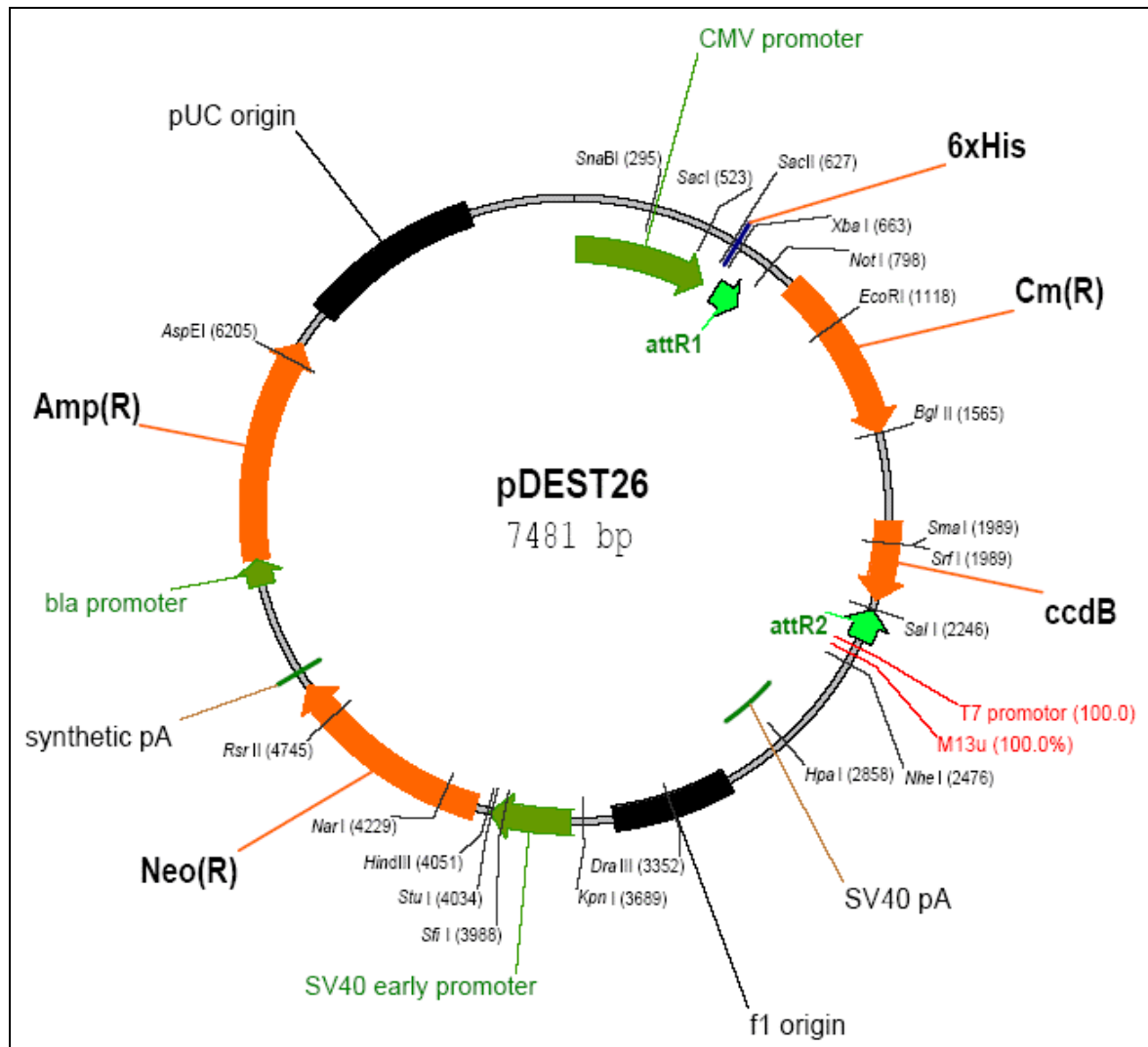
NaCl            150mM  
Tris-Base       7 mM  
Tris-HCl        43 mM  
Tween<sup>®</sup> 20    0,05 % (v/v)  
Aqua bidest.

Die Detektion erfolgte mit Hilfe des ECL<sup>™</sup>-Kits nach Angaben des Herstellers. Die Blotentwicklung wurde auf Hyperfilm ECL für 1 bis 60 min durchgeführt.

## 2.2.7 Transfektion von humanen Karzinomzellen

Für die Herstellung stabiler MRP4 überexprimierender Zellen wurde ein Expressionsvektor der Firma ImaGenes bestellt, welcher den für MRP4 codierenden Genabschnitt beinhaltet. Dieser wurde schon von Seiten der Firma in einem eukaryotischen Expressionvektor pDEST26 kloniert, welcher als so genannter Shuttlevektor fungiert. Dabei wird die DNA zunächst in Bakterien vermehrt und benötigt dazu Vektorelemente wie z. B. einen bakteriellen Replikationsursprung und ein Resistenzgen [140]. Bei der sich anschließenden Expression in eukaryotischen Zellen wird dann nur das gewünschte Gen abgelesen, wofür ein geeigneter eukaryotischer Promotor vorhanden sein muss. Abbildung 9 zeigt den Aufbau des verwendeten Expressionsvektors pDEST26. Für den bakteriellen Replikationsursprung dient der bla-Promotor und zur bakteriellen Selektion ist eine Ampicillinresistenz eingebaut. Für die Expression in eukaryotischen Zellen ist dagegen der CMV Promotor vorgesehen, welcher den Replikationsursprung aus dem humanen Cytomegalievirus darstellt und für eine starkes Ablesen und damit auch einer starken Expression der nachfolgenden Gene verantwortlich ist [141]. In der dargestellten Vektorkarte ist das gewünschte MRP4 Gen noch nicht implementiert. Dies wurde zwischen den Rekombinationsstellen attR1 und attR2 durchgeführt und der dazwischenliegende Abschnitt mit weiteren Selektionsgenen wurde damit durch den MRP4-Genabschnitt ersetzt. Für die Selektion in eukaryotischen

Zellen enthält das Konstrukt einen weiteren SV40 Promoter mit einem nachfolgenden Selektionsmarker APH (Aminoglykosid-Phosphotransferase). Die Expression dieses Resistenzgens wird als Neomycin/Geneticin-Resistenz bezeichnet und ermöglicht eine Selektion der transfizierten Zellen unter Geneticin (G418), das zur Gruppe der Aminoglykosidantibiotika gehört und neben einer guten antibakteriellen Wirkung auch die Proteinbiosynthese von Säugerzellen hemmt [142].



**Abbildung 9: MRP4 Expressionsvektor**

Dargestellt ist die Vektorkarte für den eukaryotische Expressionsvektor pDEST26, welcher eine Gesamtlänge von 7481 bp besitzt. Die vorhandenen Promotoren sind grün und die Resistenzgene (R) für Ampicillin (Amp), Neomycin (Neo), Chloramphenicol (Cm) und einem Selbstmordgen (ccdB) orange dargestellt. Das MRP4 Konstrukt wird zwischen attR1 und attR2 kloniert und unterliegt damit dem CMV Promotor mit einem vorgeschalteten Histidin Tag (6xHis). Zusätzlich sind Schnittstellen für Restriktionsenzyme angegeben und die jeweilige numerische Schnittstelle in Klammern gesetzt. (Quelle: www.imagenes-bio.de)

### 2.2.7.1 Plasmidisolierung

Um ausreichende Mengen des MRP4-Plasmids für die Transfektion zu erhalten, wird das MRP4-Konstrukt als so genannte „stab-culture“ geliefert. Dabei liegt der



Expressionsvektor inklusive des MRP4-Gens in transformierten *E. coli* Zellen vor und braucht lediglich in ein bakterielles Nährmedium überführt werden, um ausreichende Mengen an transformierten Zellen zu erhalten. Dafür wurde mit einem sterilen Zahnstocher eine kleine Menge an Bakterien in ein 15 ml Röhrchen überführt, welches mit 5 ml LB-Medium gefüllt war. Zusätzlich wurde Ampicillin mit einer finalen Konzentration von 100 µg/ml zugesetzt, damit eine bakterielle Selektion sichergestellt ist. Um ein ausreichendes Wachstum der Bakterien zu ermöglichen, wurde das Röhrchen bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Anschließend wurde mit einer sterilen Impföse die Bakteriensuspension auf 20 ml LB-Agar, supplementiert mit 100 µg/ml Ampicillin, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Um Unterschiede in dem Plasmidgehalt zwischen den transformierten Bakterien zu eliminieren, wurde am nächsten Tag von den gewachsenen Kolonien 3 Stück gepickt und mit einem sterilen Zahnstocher wieder in 5 ml LB-Medium überführt und bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Zur Plasmidisolierung wurde nun jeweils die Bakteriensuspension der 3 Kolonien für 10 min bei 5 °C und 3750 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden nun mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit nach Angaben des Herstellers lysiert und die Plasmid-DNA in 50 µl Elutionspuffer eluiert.

#### LB-Medium:

Bacto® Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
Bacto® Trypton	1,0 % (w/v)
NaCl	0,6 % (w/v)

#### LB-Agar:

LB-Medium	
Bacto® Agar	1,5 % (w/v)

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu isolieren, wurden in einem autoklavierten 1000 ml Rundkolben 200 ml LB-Medium vorgelegt und mit 50 µl der nach dem Picken der Kolonien über Nacht erhaltenen Bakteriensuspension (s. o.) ergänzt. Bei 37 °C wurde der Kolben wieder über Nacht geschüttelt, um am nächsten Tag die Bakteriensuspension bei 3750 rpm und 5 °C für 20 min zu zentrifugieren. Der Überstand wurde verworfen und aus dem Zellpellet mit Hilfe des Qiagen EndoFree® Plasmid Maxi Kit nach Gebrauchsanweisung die Plasmid-DNA in ausreichender Menge isoliert.

### **2.2.7.2 Plasmidverdau**

Der Plasmidverdau diente zum Linearisieren, Weiterklonieren oder einer ersten Kontrolle des isolierten Plasmids. Dazu werden spezifische Restriktionsenzyme eingesetzt

(Kapitel 2.1.3), welche an bestimmten Stellen in der Plasmid-DNA schneiden, und es wird geprüft, ob die theoretisch zu erwartenden Fragmente auch praktisch nachgewiesen werden können. Zur Durchführung wurde folgender Ansatz verwendet und für 1 h bei 37 °C inkubiert:

Plasmid-DNA	8 µl
Restriktionspuffer	2 µl
Restriktionsenzym I	1 µl
(Restriktionsenzym II)	1 µl
Nuclease free water auf	20 µl

Die anschließende Auftrennung und Visualisierung erfolgte mittels einer Agarose-Gelelektrophorese wie unter Abschnitt 2.2.4.4 beschrieben.

### **2.2.7.3 Bestimmung der Plasmidkonzentration**

Die Messung der Plasmid-DNA Konzentration erfolgte mit Hilfe eines Spektrophotometers. Dazu wurden die Proben 1:50 verdünnt und bei 260 nm vermessen.

### **2.2.7.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Agarose-Gelen**

Als Kontrolle bei einer Transfektion ist es notwendig, einen Leervektor parallel mit zu untersuchen, um mögliche Effekte eindeutig von dem integrierten MRP4 Gen abzuleiten. Dazu wurden 5 µg Plasmid-DNA wie unter Abschnitt 2.2.7.2 mit den Restriktionsenzymen *Nhe* und *SacI* verdaut, in einem Agarosegel aufgetrennt (Abschnitt 2.2.4.4) und zur Isolierung der aufgetrennten Fragmente aus dem Gel der QIAquick Gel Extraction Kit verwendet. Die aufgetrennten DNA-Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Es folgte die Extraktion der DNA aus dem Gel nach den Angaben des Herstellers und die anschließende Konzentrationsbestimmung wie unter Abschnitt 2.2.7.3 beschrieben.

### **2.2.7.5 Durchführung der Transfektion**

Für eine stabile Transfektion von adhärennten Zellen wurde mit dem Transfektionsreagenz Superfect® nach dem Protokoll von Qiagen gearbeitet [143]. Dabei handelt es sich um sphärische Dendrimere, welche durch positiv geladene Aminogruppen in Wechselwirkung mit negativen Ladungen von Phosphatgruppen der zu transfizierenden Nukleinsäure treten und durch eine unspezifische Endozytose in das Zellinnere aufgenommen werden [144].

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in 6-well Platten mit einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung ausgesät und für 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das mit dem Restriktionsenzym *Kpn* linearisierte Plasmid (Kapitel 2.2.7.2) sowie der Leervektor (Kapitel 2.2.7.4) wurden zu jeweils 75 µl serumfreien Zellkulturmedium pipettiert, so dass für jede Probe 2,5 µg Plasmid-DNA in 75 µl Medium eingesetzt wurde. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µl Superfect® zu jeder Probe und eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur. Währenddessen wurden die zu transfizierenden Zellen mit 2 ml PBS gespült. Nun erfolgte die Zugabe von 0,5 ml frischen Zellkulturmedium zu jeder Probe und nach kurzem Vortexen wurde der Probeninhalt zu je einer Plattenvertiefung auf die Zellen pipettiert. Bei 37 °C erfolgte nun eine Inkubationszeit von 2,5 Stunden, um eine endozytotische Aufnahme des Transfektionskomplexes zu ermöglichen. Es folgten 3 Waschschriffe mit jeweils 2 ml PBS nachdem der Zellüberstand entfernt wurde. Die Zellen wurden anschließend mit frischem Zellkulturmedium für 24 h inkubiert. Gemäß dem Herstellerprotokoll wurden die Zellen jeweils 1:15 in 10 cm<sup>2</sup> Schalen verdünnt, nachdem mit Hilfe von Trypsin eine proteolytische Spaltung der Zellkontakte zum Zellkulturgefäß erfolgt. Die Kultivierung erfolgte ab diesem Zeitpunkt mit Medium, welches mit G418 supplementiert wurde, um einen Selektionsdruck auf die Zellen zu erzeugen. Als geeignete Konzentration von G418 im Zellkulturmedium konnten 400 µg/ml ermittelt werden. Dazu wurden im Vorfeld Toxizitätsuntersuchungen mit einer Konzentrationsreihe von 200 µg/ml bis 800 µg/ml G418 für 1 Woche durchgeführt, ab 400 µg/ml ein komplettes Absterben der Zellen beobachtet und diese Konzentration für die weitere Kultivierung der transfizierten Zellen verwendet.

Nach 7 Tagen konnte das Absterben der nicht transfizierten Kontrollgruppe im Selektionsmedium festgestellt werden. Nach weiteren 5 bis 7 Tagen wurden 20 bis 30 der herangewachsenen Zellklone mit Hilfe einer Pipettenspitze „gepickt“ und in eine 24-well Platte zur Weiterkultivierung umgesetzt. Sobald ein ausreichendes Wachstum der einzelnen Zellklone vorlag, wurden diese in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturgefäße umgesetzt und bei 70–80 % Konfluenz für die RNA-Isolierung (Kapitel 2.2.5.1) und zum Einfrieren (Kapitel 2.2.1.1) geerntet.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Diskutierte Verbindungen

Die untersuchten Verbindungen, welche im Rahmen der Arbeiten von PD Dr. Andreas Hilgeroth und Dr. Jörg Wollmann entstanden, stellen käfigdimere 1,4-Dihydropyridine dar. Das ursprüngliche Synthesziel der Verbindungen war die Hemmung der HIV-1-Protease als neue Klasse nichtpeptidischer Inhibitoren [145]. Durch weitergehende Untersuchungen der ersten Vertreter wurden jedoch auch starke Effekte auf die Funktion von Membraneffluxpumpen wie P-gp und MRP nachgewiesen [131,146]. Dabei zeigten sich vor allem die symmetrisch substituierten Verbindungen am aktivsten. Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurde eine Reihe neuer symmetrischer dimerer 1,4-Dihydropyridine synthetisiert und für die Testungen in dieser Arbeit zur Verfügung gestellt [147]. Die Synthese beruht auf einem 3-Stufenkonzept, das ausführlich in der Dissertation von Dr. Jörg Wollmann beschrieben ist und in dieser Arbeit nur kurz zusammengefasst werden soll (Abbildung 10) [129].

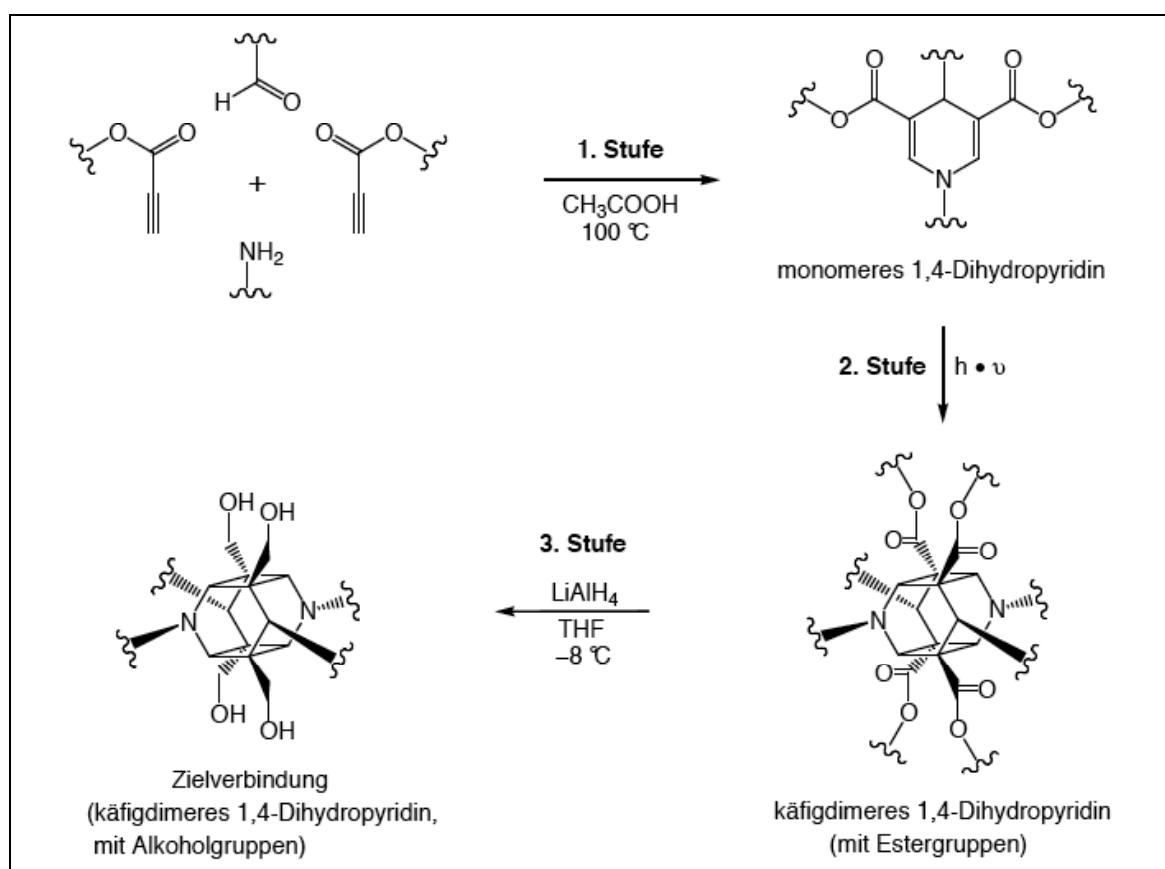


Abbildung 10: Syntheseschritte zur Darstellung dimerer 1,4-Dihydropyridine

In der ersten Stufe erfolgt die Synthese der 1,4-Dihydropyridine über eine Cyclokondensation von einem aromatischen Aldehyd, einem Propiolsäureester und einem Amin oder Ammoniumacetat. Im zweiten Schritt folgt die photochemische Umsetzung der erhaltenen 1,4-Dihydropyridine in der Festphase oder in Lösung. Dabei kommt es durch Bestrahlung mit *Ultravitalux*<sup>®</sup>-Lampen zu einer Dimerisierung und es entstehen photostabile käfigdimere Strukturen. In einem dritten Reaktionsschritt findet die Reduktion der Esterstrukturen zu Hydroxygruppen mit Hilfe von  $\text{LiAlH}_4$  statt. In Abbildung 10 sind die wesentlichen Schritte der Synthese zusammengefasst [129].

Als Grundstruktur für die untersuchten Verbindungen diente das käfigdimere 1,4-Dihydropyridin **H17**, dessen bekannte gute Wirkung durch symmetrische Substitution in den aromatischen Resten weiter verbessert werden sollte (Abbildung 11). Dabei erfolgte die Einführung einer neuen Gruppe entweder an beiden Phenylresten oder an den beiden Benzylresten. Für **JW33** erfolgte die Substitution an allen 4 aromatischen Substituenten.

Bei den ersten beiden Verbindungen wurden *para*-Methoxygruppen am Benzylrest (**JW41**) sowie am Benzyl- und Phenylrest eingeführt (**JW33**). Weiterhin kam es zur Einführung von Hydroxygruppen am Phenylrest in *para*-Stellung (**JW59**) und *meta*-Stellung (**JW53B**) sowie am Benzylrest in *para*-Stellung (**JW64A**). Ebenso wurden Verbindungen mit Benzyloxyresten synthetisiert. Dabei erfolgte die Substitution am Phenylring in *para*-Stellung bei **JW46** und in *meta*-Stellung bei **JW53A** sowie am Benzylring in *para*-Stellung (**JW64B**) und in *meta*-Stellung (**JW24**). Abschließend sollte noch der Einfluss von Heteroaromaten substituierten käfigdimeren 1,4-Dihydropyridinen untersucht werden. Dazu wurden die Phenylreste durch 4-Pyridylsubstituenten (**JW65**) und die Benzylreste durch 4-Picolyl- (**JW63**) und 3-Picolylsubstituenten (**JW50**) ersetzt. Eine kurze Übersicht der verwendeten Substituenten ist in Tabelle 13 dargestellt.

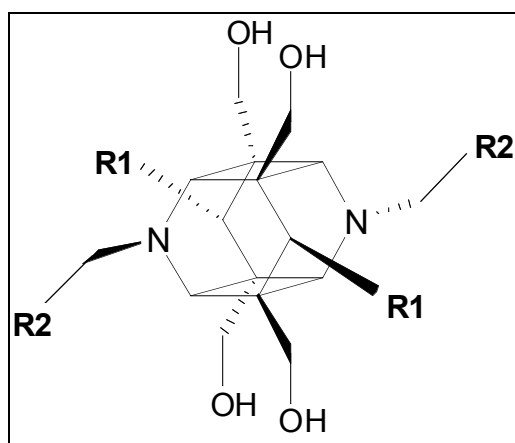


Abbildung 11: Grundstruktur der dimeren 1,4-Dihydropyridine

<b>Verbindung</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>
H17	Phenyl	Phenyl
JW41	Phenyl	4-Methoxyphenyl
JW33	4-Methoxyphenyl	4-Methoxyphenyl
JW46	4-Benzyloxyphenyl	Phenyl
JW24	Phenyl	3-Benzyloxyphenyl
JW50	Phenyl	3-Pyridyl
JW53A	3-Benzyloxyphenyl	Phenyl
JW53B	3-Hydroxyphenyl	Phenyl
JW59	4-Hydroxyphenyl	Phenyl
JW63	Phenyl	4-Pyridyl
JW64A	Phenyl	4-Hydroxyphenyl
JW64B	Phenyl	4-Benzyloxyphenyl
JW65	4-Pyridyl	Phenyl

**Tabelle 13: Substituenten R1 und R2 der Testsubstanzen**

## 3.2 Zytotoxizitäten

Die Zytotoxizität ist ein wichtiges Kriterium zur Charakterisierung potentieller Arzneistoffe. Voraussetzung dafür ist jedoch eine Testung an unterschiedlichen Zelllinien, da die Aussagekraft der Toxizität bei einer einzigen Zelllinie sehr begrenzt ist. Aus diesem Grund wurden für die Untersuchungen humane Hepatozyten, Lymphozyten und 2 Zelllinien eines Magenkarzinoms verwendet. Die Untersuchung an Hepatozyten kann aufgrund der Enzymausstattung im Vergleich zu anderen Zelllinien erste Aussagen zur Metabolisierung liefern. Bei den Lymphozyten zeigt sich hingegen nur eine sehr geringe Expression von metabolisierenden Enzymen. Sie weisen, als Suspensionszellen vorliegend, eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Fremdstoffen auf. Des Weiteren werden die dimeren 1,4-Dihydropyridine auch an murinen T-Lymphozyten auf ihr P-gp modulatorisches Potential untersucht, so dass die Toxizitätstestung an humanen Lymphozyten einen guten Überblick über den P-gp inhibitorischen Wirkungsbereich einerseits und den toxischen Auswirkungen der Verbindungen andererseits liefert. Die Auswahl der Magenkarzinomzellen erfolgte aus einem ähnlichen Grund. Auch hier wurden weitere Untersuchungen an Subzelllinien durchgeführt, so dass die Aussagen zu Wirkung und Zelltoxizität sehr gut vergleichbar sind.

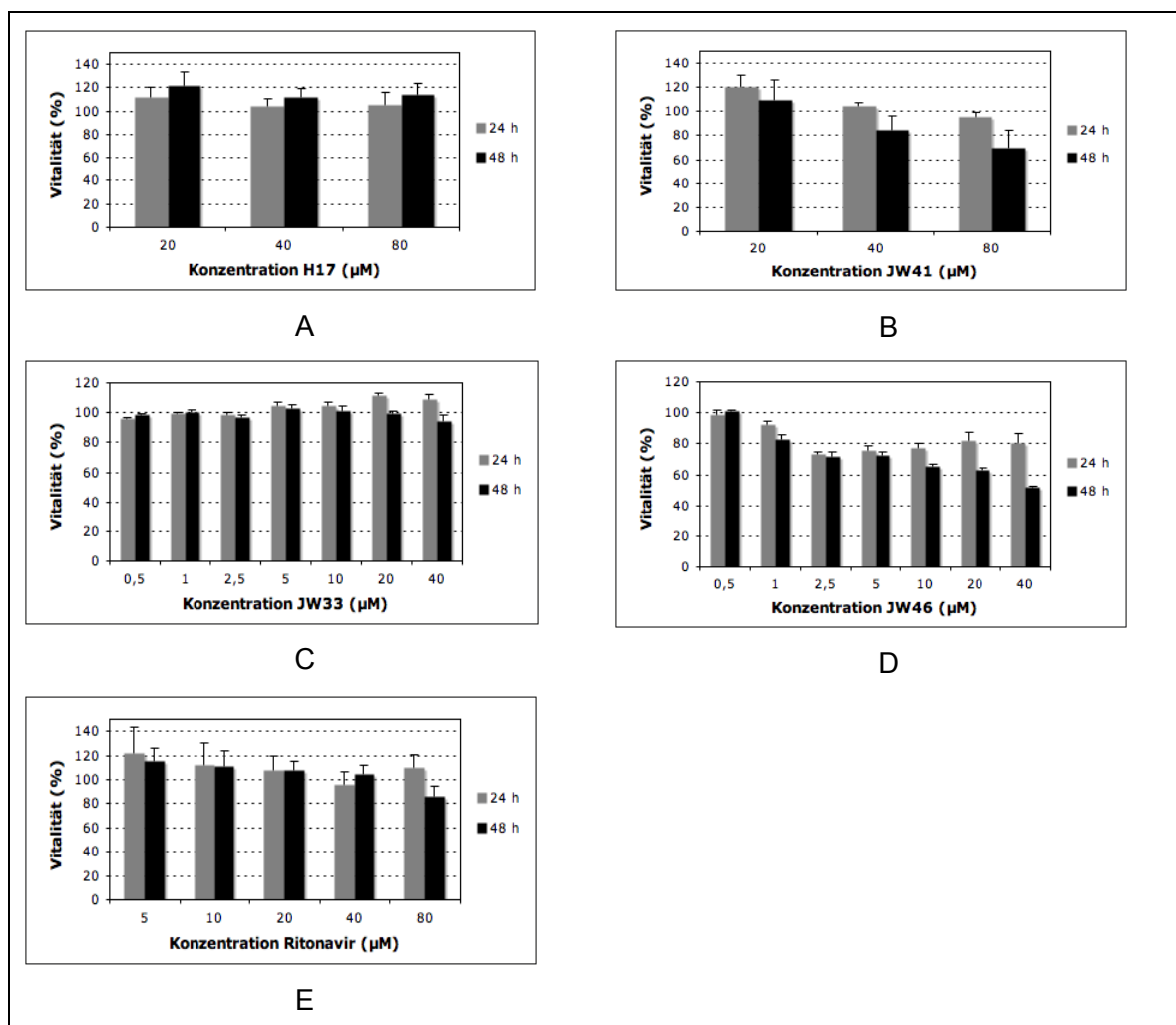
Die Inkubation der Zellen erfolgte für 24 h und 48 h mit verschiedenen Konzentrationen der käfigdimeren Dihydropyridine H17, JW41, JW33, JW46 und mit dem HIV-1 Proteaseinhibitor Ritonavir als Vergleichssubstanz. Neben der inhibitorischen Aktivität auf die HIV-1 Protease besitzt Ritonavir zudem P-gp modulatorische Effekte womit sich die Verbindung sehr gut als Vergleichssubstanz bei den Zytotoxizitätsuntersuchungen anbietet. Die anschließende Untersuchung der Vitalität der Zellen erfolgte mit den MTT-Test (Kapitel 2.2.2).

### 3.2.1 Untersuchung an HepG2 Zellen

Die verwendeten hepG2 Zellen stammen aus einem Leberkarzinom und besitzen eine deutlich geringere Cytochrom P450 und Phase II Enzymaktivität im Vergleich zu einer funktionsfähigen, gesunden Leber [148,149]. Allerdings können in Bezug zu den Ergebnissen an anderen Zelllinien erste Aussagen über Detoxifikationen oder über die Bildung toxischer Metabolite getroffen werden.

In Abbildung 12 sind die Ergebnisse der Untersuchungen graphisch dargestellt. Für die Verbindung H17 zeigte sich keine Beeinflussung der Zellvitalität bis zur maximal getesteten Konzentration von 80  $\mu\text{M}$ . Ebenso zeigte die Verbindung JW41 bei einer Inkubationszeit von 24 h keine toxischen Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel. Lediglich nach 48 h wurde ab einer Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  einer Reduktion der

Zellvitalität festgestellt. Zu einem ähnlich guten Ergebnis kam die Untersuchung der mit 4 Methoxygruppen substituierten Verbindung JW33. Bis zur maximal getesteten Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  zeigte sich auch nach 48 h keine Beeinflussung der Zellvitalität. Für die mit 2 Benzyloxygruppen substituierte Verbindung JW46 wurde nach 24 h eine moderate Toxizität für Konzentrationen über 1  $\mu\text{M}$  beobachtet, welche bei ungefähr 80 % Vitalität stagnierte. Erst bei der doppelten Inkubationszeit fiel die Zellvitalität bis auf 50 % ab. Der als Kontrolle dienende Arzneistoff und P-gp Inhibitor Ritonavir zeigte eine ähnlich gute Zellverträglichkeit. Erste Anzeichen einer zellulären Stoffwechselbeeinflussung konnten erst nach 48 h beobachtet werden. Hier sank die Zellvitalität bei der Konzentration von 80  $\mu\text{M}$  auf 85 %.



**Abbildung 12: Beeinflussung der Vitalität humaner Hepatozyten**

Die Beeinflussung der Zellvitalität wurde nach 24 h und 48 h mit Hilfe des MTT-Tests überprüft. Untersucht wurden dabei die Substanzen H17 (A), JW41 (B), JW33 (C), JW46 (D) und Ritonavir (E) in verschiedenen Konzentrationen. Die Absorptionswerte der behandelten Proben wurden im Verhältnis zur Lösungsmittelkontrolle (1 % DMSO) betrachtet. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von 3 unabhängigen Versuchen.

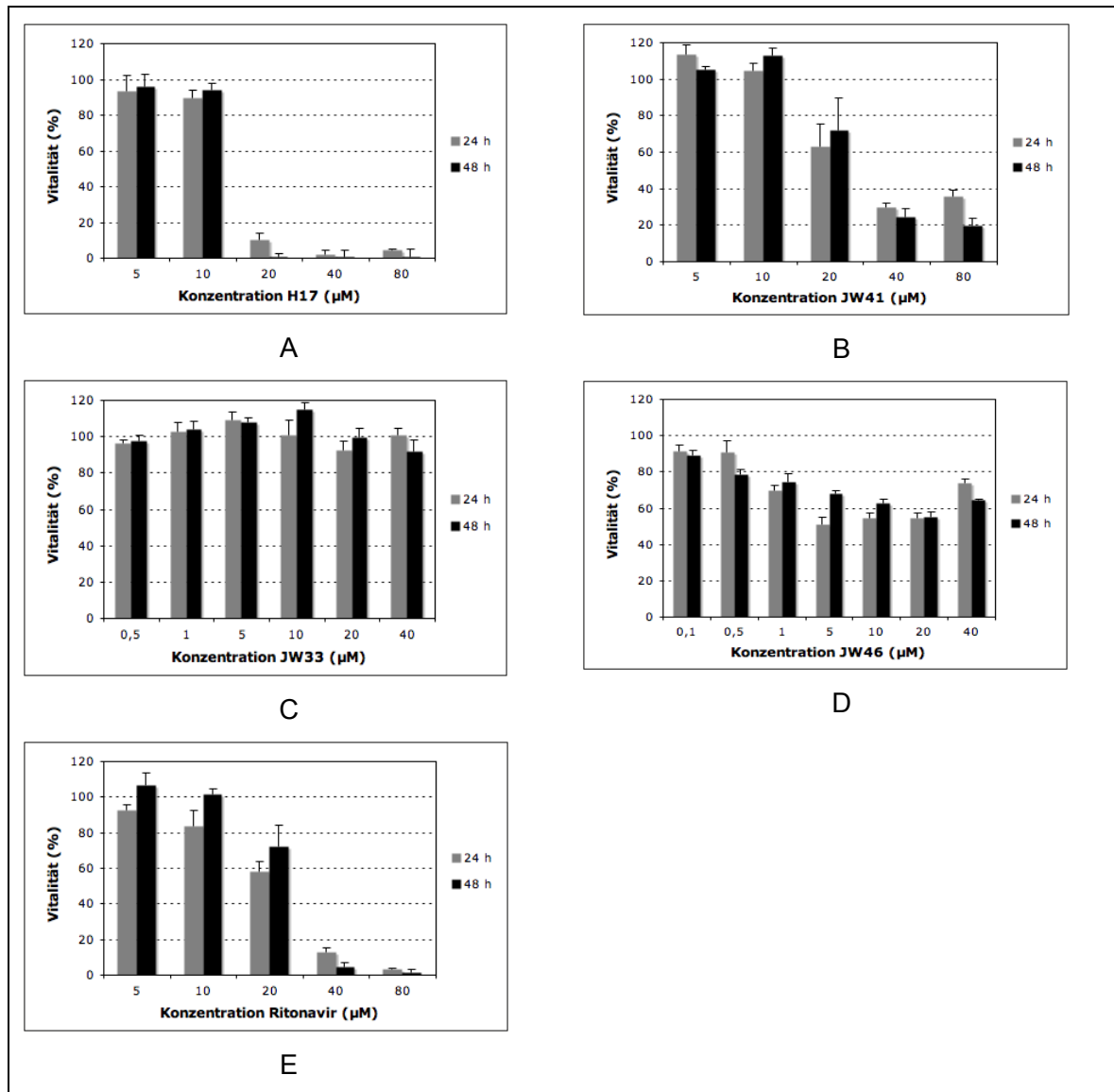


Somit zeigt sich insgesamt betrachtet eine sehr gute Zellverträglichkeit bei der hepG2 Linie. Vor allem die Verbindungen H17 und JW33 zeigen keine toxischen Auswirkungen und sind damit besser verträglich als die Kontrolle Ritonavir. Lediglich die Verbindung JW46, welche mit 2 Benzyloxygruppen substituiert ist, weist eine höhere Toxizität auf.

### 3.2.2 Untersuchung an Jurkat Zellen

Die Ergebnisse der Untersuchung an der T-Lymphozyten Zelllinie Jurkat sind in Abbildung 13 dargestellt. Bei der Inkubation mit dem unsubstituierten käfigdimeren Dihydropyridin H17 zeigten sich deutliche toxische Effekte ab einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$ . Dabei war die Inkubationsdauer von untergeordneter Bedeutung. Es kam zu einem nahezu vollständigen Absterben der Zellen. Auch für JW41 wurden ab 20  $\mu\text{M}$  toxische Effekte gemessen, welche jedoch nicht so ausgeprägt wie bei der Verbindung H17 ausfielen. Bei der maximal untersuchten Konzentration von 80  $\mu\text{M}$  reduzierte sich die Zellvitalität auf 20 %. Umso erstaunlicher waren die Ergebnisse der Verbindung JW33. Hier zeigte sich über den gesamten Konzentrationsbereich keine Vitalitätsbeeinflussung der Lymphozyten. Für die Verbindung JW46 wurden ähnliche Ergebnisse wie bei den Untersuchungen an hepG2 Zellen erzielt. Ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  wurde die Zellvitalität stärker beeinflusst, stagnierte jedoch bei ungefähr 50 %. Bei der höchsten Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  wurde mikroskopisch nach 48 h ein leichtes Ausfallen der Substanz im Zellmedium festgestellt, was das erneute Ansteigen der Zellvitalität bei 40  $\mu\text{M}$  erklärt und mit einer geringeren Löslichkeit der Substanz im Medium zusammenhängt. Die Vergleichssubstanz Ritonavir zeigte wie die ersten beiden Verbindungen H17 und JW41 stärkere toxische Effekt ab einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  und führte bei der maximal getesteten Konzentration von 80  $\mu\text{M}$  zu einem fast vollständigen Absterben der T-Lymphozyten.

Insgesamt betrachtet zeigte sich eine höhere Sensitivität der Lymphozyten Zelllinie unter der Behandlung mit den käfigdimeren Dihydropyridinen im Vergleich zur hepG2 Linie. Vor allem die Exposition der Zellen mit Konzentrationen  $> 20 \mu\text{M}$  zeigte eine starke vitalitätsmindernde Wirkung. Jedoch liegen die toxischen Konzentrationen deutlich über dem P-gp inhibitorischen Konzentrationsbereich und stellen somit keinen Nachteil der Verbindungen dar. Eine Ausnahme bildet die Verbindung JW33, bei welcher, wie schon bei der Untersuchung an hepG2 Zellen, auch bei der maximalen Testkonzentration keine toxischen Effekte auf die Zellen beobachtet werden konnte. Somit zeigt sich im Vergleich zur Kontrollsubstanz Ritonavir eine extrem gute Verträglichkeit von JW33, was für einen möglichen therapeutischen Einsatz einen großen Vorteil darstellt.



**Abbildung 13: Beeinflussung der Vitalität humaner Lymphozyten**

Die Beeinflussung der Zellvitalität wurde nach 24 h und 48 h mit Hilfe des MTT-Tests überprüft. Untersucht wurden dabei die Substanzen H17 (A), JW41 (B), JW33 (C), JW46 (D) und Ritonavir (E) in verschiedenen Konzentrationen. Die Absorptionswerte der behandelten Proben wurden im Verhältnis zur Lösungsmittelkontrolle (1 % DMSO) betrachtet. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von 3 unabhängigen Versuchen.

### 3.2.3 Untersuchung an EPG85-257 Zellen

Das Modell der Magenkarzinomzelllinie zeichnet sich durch die Besonderheit aus, dass neben der parentalen Zelllinie EPG85-257P eine Daunorubicin-resistente Sublinie EPG85-257RDB vorhanden ist, welche im Vergleich zur parentalen Linie eine starke Überexpression des Membrantransporters P-gp aufweist, um die dauerhafte Daunorubicin-Exposition zu tolerieren. Damit eignen sich die beiden Zelllinien sehr gut, um aus der ermittelten Toxizität der untersuchten Substanzen auch Aussagen bezüglich der P-gp Substrateigenschaften treffen zu können. Ist eine Substanz P-gp Substrat dann

sinkt die Toxizität bei den EPG85-257RDB Zellen durch einen aktiven Auswärtstransport im Vergleich zur Parentallinie, welche nur eine sehr geringe P-gp Expression aufweist.

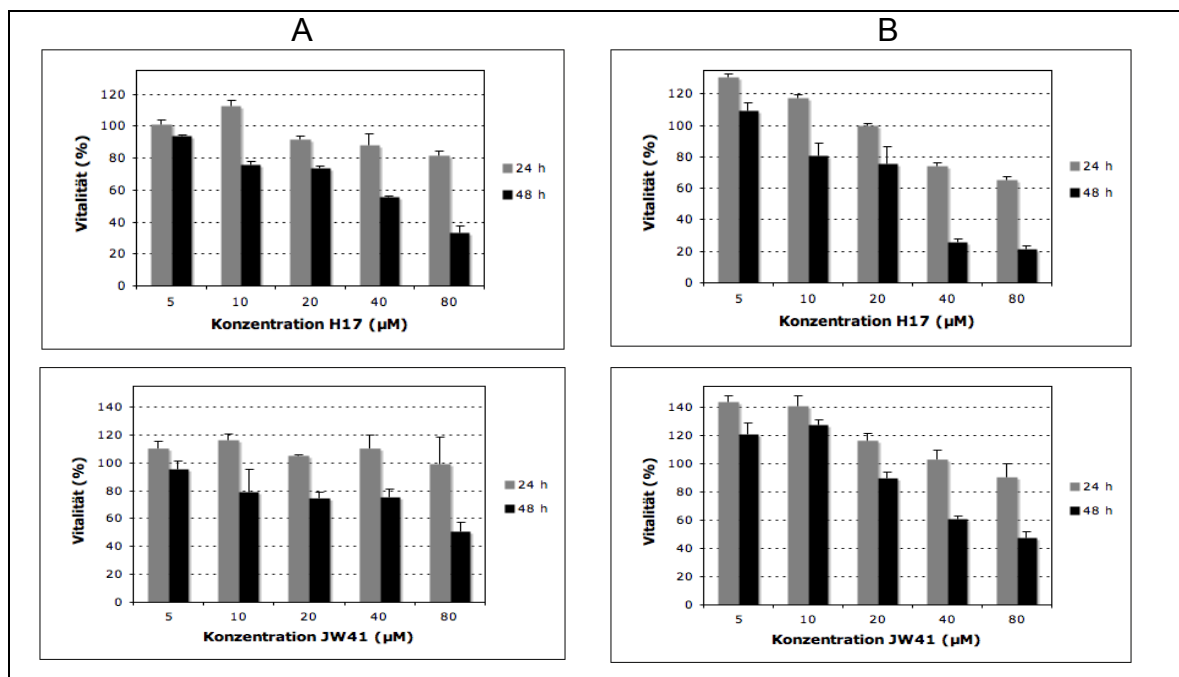
Für die untersuchten käfigdimeren Dihydropyridine sind die Ergebnisse in Abbildung 14 dargestellt. Bei der Untersuchung an den parentalen Magenkarzinomzellen (Abbildung 14 A) wurden für die Verbindungen H17 und JW41 keine Auswirkungen auf die Zellvitalität nach 24 h festgestellt. Erfolgte die Exposition der Zellen für 48 h, so sank die Vitalität der Zellen ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  unterhalb von 80 %. Für die mit 4 Methoxygruppen substituierte Verbindung JW33 konnten in diesem Zellmodell erstmals auch toxische Effekte nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine leichte Beeinflussung des Zellstoffwechsels ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  sowohl für 24 h wie auch für 48 h. Wie schon bei den Jurkat Zellen (Abbildung 13 D) zeigten sich die Magenkarzinomzellen sensitiver gegenüber der mit 2 Benzyloxygruppen substituierten Verbindung JW46. Erste negative Effekte wurden ab einer Konzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  nachgewiesen. Die Zellexposition mit der Kontrollsubstanz Ritonavir ergab eine Minderung der Vitalität für Konzentrationen oberhalb von 40  $\mu\text{M}$  bei 24 h Inkubation sowie oberhalb von 20  $\mu\text{M}$  bei 48 h Inkubation. Dies sich anschließende Untersuchung an der P-gp exprimierenden Subzelllinie ist im rechten Teil der Abbildung 14 dargestellt (B). Für H17 und JW41 wurden ähnliche toxische Effekte wie an der parentalen Zelllinie festgestellt. Zur Überprüfung auf P-gp Substrateigenschaften wurden zusätzlich die IC<sub>50</sub>-Werte berechnet (Tabelle 14) sofern eine ausreichende Toxizität die Berechnung ermöglichte. Werden signifikant höhere IC<sub>50</sub>-Werte bei der P-gp exprimierenden Linie EPG85-257RDB erhalten, so ist dies durch Substrateigenschaften der untersuchten Verbindung bedingt. Für H17 ergab sich nach 48 h ein niedrigerer IC<sub>50</sub>-Wert in der Subzelllinie (29,4  $\mu\text{M}$ ) im Vergleich zur Parentallinie (45,5  $\mu\text{M}$ ). Ebenso wurden für die übrigen IC<sub>50</sub>-Werte der Verbindungen H17 und JW41 keine höheren Werte in der Subzelllinie ermittelt, womit Substrateigenschaften ausgeschlossen werden können. Die Verbindung JW33 zeigte hingegen keine toxische Beeinflussung der Subzelllinie EPG85-257RDB. Der IC<sub>50</sub>-Wert liegt oberhalb der untersuchten maximalen Konzentration von 40  $\mu\text{M}$ . Damit zeigt sich für diese Verbindung eine mögliche P-gp Substrateigenschaft auf, da in der Parentallinie der IC<sub>50</sub>-Wert deutlich niedriger liegt (23,8  $\mu\text{M}$ ). Die gute Verträglichkeit in der Subzelllinie kann durch einen aktiven Transport des Membrantransporters P-gp erklärt werden (Tabelle 14). Nicht ganz so ausgeprägt ist der Substrateffekt bei der Verbindung JW46. Hier zeigte sich vor allem nach 48 h eine bessere Verträglichkeit der Substanz bei der P-gp exprimierenden Subzelllinie mit einem IC<sub>50</sub>-Wert oberhalb von 40  $\mu\text{M}$ . Bei der Parentallinie lag eine höhere Toxizität vor, was in einem niedrigeren IC<sub>50</sub>-Wert (18,6  $\mu\text{M}$ ) resultierte. Ebenso wurde für die Kontrollsubstanz Ritonavir P-gp Substrateffekte beobachtet. Während bei der Parentallinie ein IC<sub>50</sub>-Wert

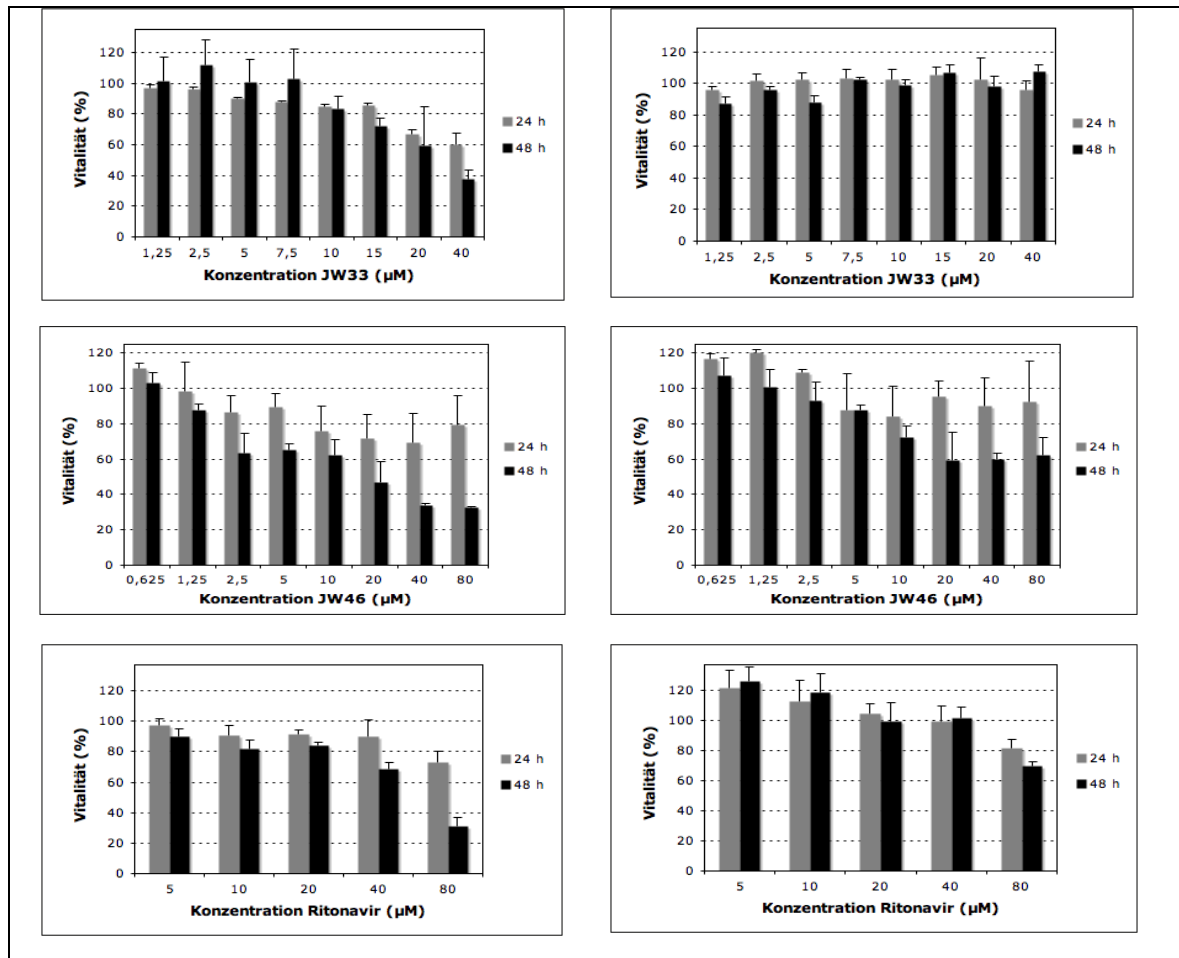
von 55  $\mu\text{M}$  bestimmt wurde, lag der  $\text{IC}_{50}$ -Wert durch eine geringere Toxizität in der P-gp exprimierenden Subzelllinie oberhalb der maximal getesteten Konzentration von 80  $\mu\text{M}$  (Tabelle 14). Die beobachteten Substrateigenschaften stehen damit auch in Übereinstimmung mit den Literaturdaten. Ergebnisse von Lee *et. al.* ergaben, dass neben Ritonavir auch weitere HIV-1 Proteasehemmer, wie Saquinavir und Indinavir Substrate für den Membrantransporter P-gp sind [159].

Verbindung	EPG85-275P		EPG85-275RDB	
	24 h	48 h	24 h	48 h
H17	> 80 $\mu\text{M}$	45,5 $\pm$ 18,9	> 80 $\mu\text{M}$	29,4 $\pm$ 17,1
JW41	> 80 $\mu\text{M}$	> 80 $\mu\text{M}$	> 80 $\mu\text{M}$	> 80 $\mu\text{M}$
JW33	> 40 $\mu\text{M}$	23,8 $\pm$ 7,1	> 40 $\mu\text{M}$	> 40 $\mu\text{M}$
JW46	> 40 $\mu\text{M}$	18,6 $\pm$ 8,9	> 40 $\mu\text{M}$	> 40 $\mu\text{M}$
Ritonavir	> 80 $\mu\text{M}$	55,0 $\pm$ 34,8	> 80 $\mu\text{M}$	> 80 $\mu\text{M}$

**Tabelle 14:  $\text{IC}_{50}$ -Werte der im MTT Assay untersuchten Substanzen**

Es wurde für jede Testsubstanz die Konzentration ermittelt, bei welcher nach Analyse im MTT Assay die Vitalität der Zellen im Vergleich zur Kontrolle (1 % DMSO) 50 % betrug. Die Exposition der Magenkarzinomzellen mit den Testsubstanzen erfolgte für 24 h oder 48 h. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von 3 unabhängigen Versuchen. Wenn keine toxischen Effekte beobachtet wurden, konnte für den untersuchten Konzentrationsbereich kein  $\text{IC}_{50}$ -Wert berechnet werden. In diesem Fall liegt der  $\text{IC}_{50}$ -Wert oberhalb der maximal untersuchten Konzentration (Symbol: >).





**Abbildung 14: Beeinflussung der Vitalität humaner Magenkarzinomzellen**

Die Beeinflussung der Zellvitalität wurde nach 24 h und 48 h mit Hilfe des MTT-Tests überprüft. Untersucht wurden dabei die Substanzen H17, JW41, JW33, JW46 und Ritonavir in verschiedenen Konzentrationen an der parentalen Zelllinie EPG85-257P (A) und an der P-gp exprimierenden Subzelllinie EPG85-257RDB (B). Die Absorptionswerte der behandelten Proben wurden im Verhältnis zur Lösungsmittelkontrolle (1% DMSO) betrachtet. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von 3 unabhängigen Versuchen.

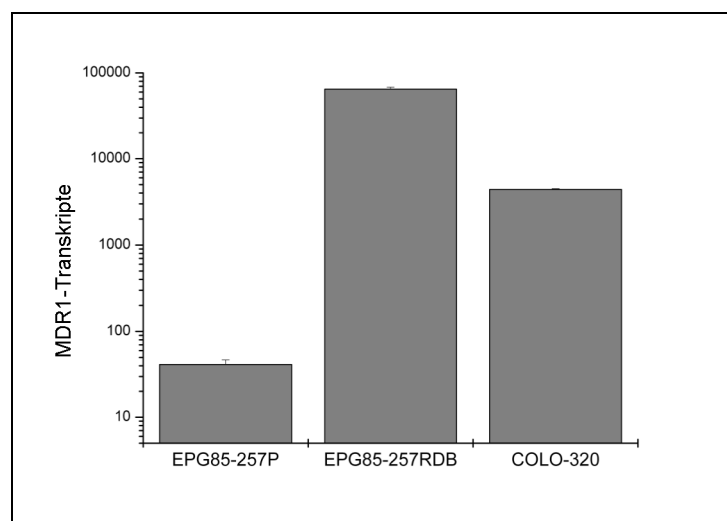
Zusammenfassend betrachtet waren die Zytotoxizitätsuntersuchungen durch die Verwendung von 4 Zelllinien sehr aufschlussreich. Die Verbindungen H17 und JW41 zeichnen sich durch eine geringe Toxizität aus und zeigen keine P-gp Substrateigenschaften. Die toxischen Effekte liegen deutlich oberhalb des P-gp inhibitorischen Effekts. Eine sehr gute Verträglichkeit zeigt die Verbindung JW33 vor allem an der sehr sensitiven T-Lymphozytenzelllinie Jurkat, bei der selbst bei 40 µM keine vitalitätsmindernden Effekte beobachtet werden. Dagegen führen leichte P-gp Substrateffekte zu einer besseren Verträglichkeit an der P-gp exprimierenden Zelllinien EPG85-257RDB im Vergleich zur Parentallinie EPG85-257P. Die gute Verträglichkeit von JW33 an den hepG2 Zellen könnte ebenfalls durch die Expression des Membrantransporters P-gp erklärt werden [150]. Jedoch wird die Expression des Transporters nicht für Jurkat Zellen beschrieben womit die sehr geringe Toxizität der

Verbindung nicht allein in der Substrateigenschaft für den Membrantransporter P-gp begründet liegt [151]. Eine höhere Toxizität konnte für die Verbindung JW46 festgestellt werden. Hier wurden bei allen untersuchten Zelllinien ähnliche Ergebnisse erhalten. Eine leichte Beeinflussung der Zellvitalität findet bereits im einstelligen mikromolaren Bereich statt. Jedoch ist die Toxizität auch bei ansteigender Konzentration nicht sehr ausgeprägt, was wahrscheinlich mit einer geringeren Löslichkeit der Verbindung bei hohen Konzentrationen in Zusammenhang steht. Durch den Vergleich mit den Toxizitätsdaten des Arzneistoffs Ritonavir konnte für alle untersuchten käfigdimeren Dihydropyridine die sehr gute Zellverträglichkeit bestätigt werden.

### 3.3 Induktionsversuche

Für die Untersuchung auf Membrantransporter-induzierende Effekte wurden die Verbindungen H17 und JW41 ausgewählt, da für diese Modulatoren die meisten Voruntersuchungen vorlagen und eine sehr gute und effektive P-gp Hemmung bekannt war. Interessant war nun die Fragestellung, ob die Applikation der beiden Substanzen in das Nährmedium maligner Zellen neben der Hemmung auch eine Induktion des P-Glykoproteins hervorrufen würde. Ausgangspunkt der Untersuchungen waren Arbeiten von Perloff *et. al.* mit dem HIV-1 Proteasehemmer und P-gp Modulator Ritonavir. Nach Zellexposition für 72 h zeigten sich deutlich höhere P-gp Expressionsraten in isolierten Endothelzellen [96]. Ritonavir war somit in der Lage innerhalb kurzer Zeit eine Induktion des P-gp zu bewirken und eine Resistenz gegenüber weiteren Arzneistoffen (P-gp Substraten) zu fördern.

Zur Klärung der Frage, ob auch Vertreter der käfigdimeren 1,4-Dihydropyridine eine P-gp Induktion bewirken, wurden die Magenkarzinomzellen EPG85-257P sowie die resistente Subzelllinie EPG85-257RDB verwendet, welche durch Exposition mit Daunorubicin den Membrantransporter P-Glykoprotein überexprimiert. Die Subzelllinie diente damit auch als Positivkontrolle, da die ausgeprägte P-gp Expression durch die Behandlung mit Daunorubicin induziert wurde. Als dritte Zelllinie wurden die humanen Kolonkarzinomzellen COLO-320, welche eine mittlere P-gp Expression aufweisen, verwendet. Die Untersuchung der jeweiligen Ausgangsmenge an MDR1-mRNA, welche für den Membrantransporter P-gp codiert, wurde mit Hilfe der RTQ-PCR (Kapitel 2.2.4.3) durchgeführt und ist in Abbildung 15 dargestellt.

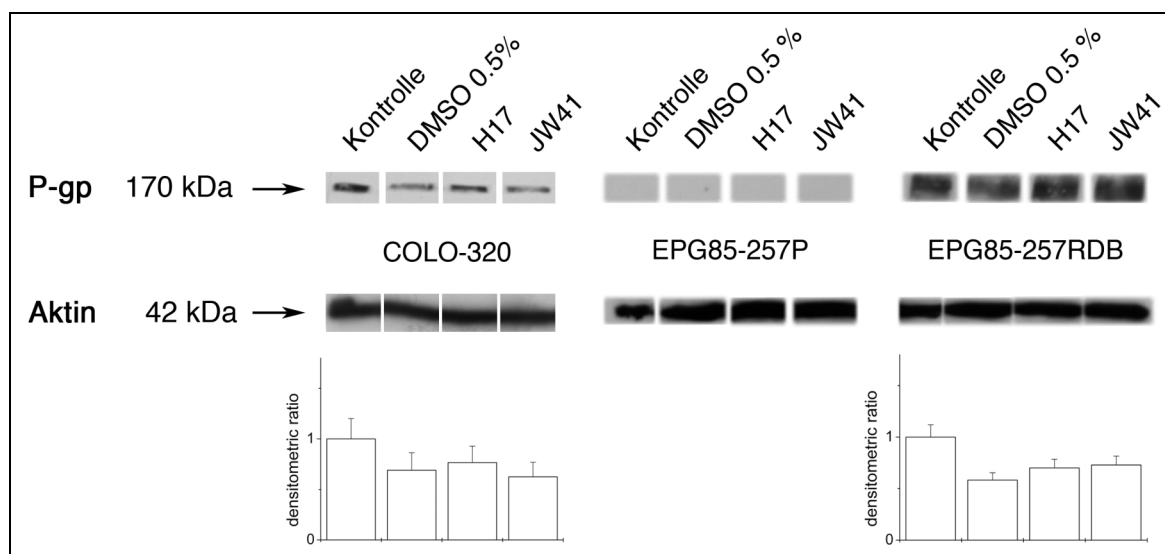


**Abbildung 15: MDR1-mRNA Ausgangsmengen**

Dargestellt sind die Mittelwerte + S.D. von 3 unabhängigen Versuchen.

Es ist sehr gut zu erkennen, dass die resistente Subzelllinie EPG85-257RDB um den Faktor 2000 höhere MDR1-mRNA Mengen im Vergleich zu den parentalen Zellen besitzt. Für die COLO-320 Zellen sind mittlere mRNA Level von MDR1 nachweisbar gewesen, was ungefähr ein zehntel der MDR1-mRNA der EPG85-257RDB Zellen entspricht.

Auf diesen Voruntersuchungen aufbauend wurden nun die beiden MDR-Modulatoren H17 und JW41 in 5  $\mu$ M finaler Konzentration zu dem Nährmedium der Zellen gegeben und für 72 h inkubiert. Dabei wurde für die Modulatoren eine Endkonzentration des Lösungsmittels DMSO von 0,5 % erreicht. Um Effekte von DMSO auf die Zellen auszuschließen, wurde parallel ein Kontrollversuch mit 0,5 % DMSO ohne Modulator angesetzt. Nach der Inkubation der Zellen erfolgte eine WesternBlot Analyse (Kapitel 2.2.6), um Unterschiede der Proteinmengen von P-gp zu analysieren. Dabei fungierte das Protein Aktin als Kontrolle für die korrekte Beladung der Geltaschen. Die Blots wurden anschließend densitometrisch ausgewertet und Schwankungen der Menge an Aktin auf die P-gp Menge nivelliert. Der densitometrische Wert für die Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt und die weiteren Proben dazu im Verhältnis betrachtet.



#### Abbildung 16: WesternBlot (P-gp) zur Untersuchung möglicher induktiver Effekte

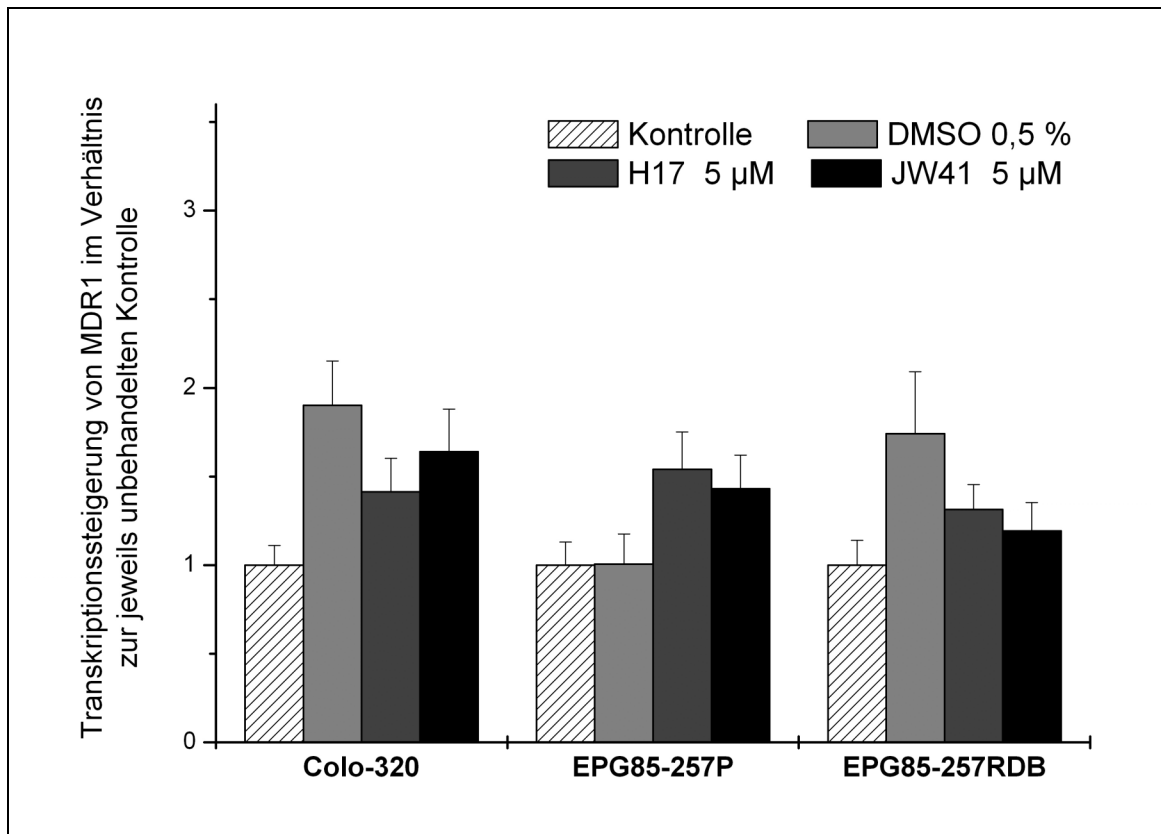
Analyse der Proteinmenge des P-Glykoproteins nach Inkubation mit den Modulatoren H17 und JW41 (5  $\mu$ M) für 72 h. Dabei wurden die Effekte bei den Zelllinien COLO-320, EPG85-257P und EPG85-257RDB untersucht und die Blots nach Antikörperdetektion im oberen Bildteil dargestellt. Als Kontrolle wurde das Protein Aktin verwendet. Die Blots wurden densitometrisch ausgewertet und das Verhältnis von P-gp zu Aktin im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle betrachtet (untere Bildteil). Bei der Zelllinie EPG85-257P konnte auch nach der Inkubation mit den Modulatoren kein P-gp detektiert werden.

In Abbildung 16 ist erkennbar, dass für die COLO-320 und EPG85-257RDB Zellen sehr hohe P-gp Proteinmengen detektierbar waren. Wobei die EPG85-257RDB Linie, wie schon durch die RTQ-PCR (Abbildung 15) festgestellt, mit Abstand die höchste



Expressionsrate an P-gp aufweist. Vergleicht man die Banden nach Inkubation mit den beiden MDR Modulatoren für 72 h, so lässt sich im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle keine Steigerung der Proteinmenge feststellen. Es kann sogar eher eine leichte Abnahme bei beiden Zelllinien beobachtet werden. Veranschaulicht werden diese Ergebnisse in Abbildung 16 durch die densitometrische Auswertung der Blots, bei welcher auch die Schwankungen der Aktinmenge mit berücksichtigt werden. Eine Induktion des P-gp durch die Modulatoren kann für eine Inkubationsdauer von 72 h eindeutig ausgeschlossen werden. Für die parentalen Magenkarzinomzellen (EPG85-257P) konnten keine P-gp Banden nach WesternBlot Analyse detektiert werden. Auch die Inkubation mit H17 und JW41 ergab nach 72 h keine detektierbaren Proteinmengen, so dass auch bei sehr geringen P-gp Ausgangsmengen die Exposition mit den Vertretern der käfigdimeren Dihydropyridine keine Erhöhung der Expression und der damit verbundenen Translation bewirken konnte.

Zur Bestätigung der erhaltenen Daten für die „Protein-Ebene“ sollten die Untersuchungen auf die „RNA-Ebene“ ausgeweitet werden, um eine mögliche Steigerung der Transkription von MDR1 zu untersuchen. Für diesen Ansatz wurden 3 unabhängige Versuche analog der WesternBlot Analyse durchgeführt und nach RNA Isolierung der Proben durch eine quantitative PCR (RTQ-PCR, Kapitel 2.2.4.2) ausgewertet. Dabei wurde als Kontrolle das Gen der Aldolase mit amplifiziert um Schwankungen der einzelnen Proben rechnerisch auszugleichen. Um einen Vergleich der Proben anschaulich darzustellen, wurden die erhaltenen Kontrollwerte für jede Zelllinie gleich 1 gesetzt und die weiteren Werte dazu im Verhältnis betrachtet (Abbildung 17). Im Vergleich zur WesternBlot Analyse, wo ein leichter Rückgang der Proteinmenge nach der Inkubation mit den MDR Modulatoren H17 und JW41 feststellbar war, ist auf der transkriptionellen Ebene eine leichte Steigerung an MDR1-mRNA zu beobachten. Dies trifft vor allem für die DMSO Kontrolle zu. Unter der Behandlung mit den käfigdimeren Dihydropyridinen H17 und JW41 war bei allen Zelllinien ein sehr moderater Anstieg der mRNA zu verzeichnen. Alle Effekte stellen aber keinen signifikanten Unterschied zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle dar. Eine mögliche Ursache des leichten Anstiegs ist die Verwendung von DMSO als Lösungsmittel. Untersuchungen konnten eine Induktion von MDR1 durch Exposition von Zellen mit DMSO nachweisen [152]. Obwohl die DMSO Konzentration von 2 % in diesen Studien um den Faktor 4 höher war, kann auch bei der Verwendung von 0,5 % DMSO von leichten induktiven Effekten ausgegangen werden. Eine Induktion von MDR1 durch die MDR Modulatoren H17 und JW41 kann demnach für eine Zellexposition bis 72 h ausgeschlossen werden.



**Abbildung 17: RTQ-PCR (MDR1) zur Untersuchung möglicher induktiver Effekte**

Dargestellt sind die Ergebnisse der RTQ-PCR von MDR1 nach 72 h Inkubation mit den MDR Modulatoren H17 und JW41 (5 µM). Für alle Zelllinien wurde eine leichte Steigerung der MDR1 mRNA Mengen detektiert. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ist dieser Unterschied jedoch bei allen Zelllinien nicht signifikant für  $P < 0,05$  (Kruskal-Wallis Test). Analysiert wurden 3 unabhängige Versuche, welche graphisch als Mittelwerte + SEM dargestellt wurden.

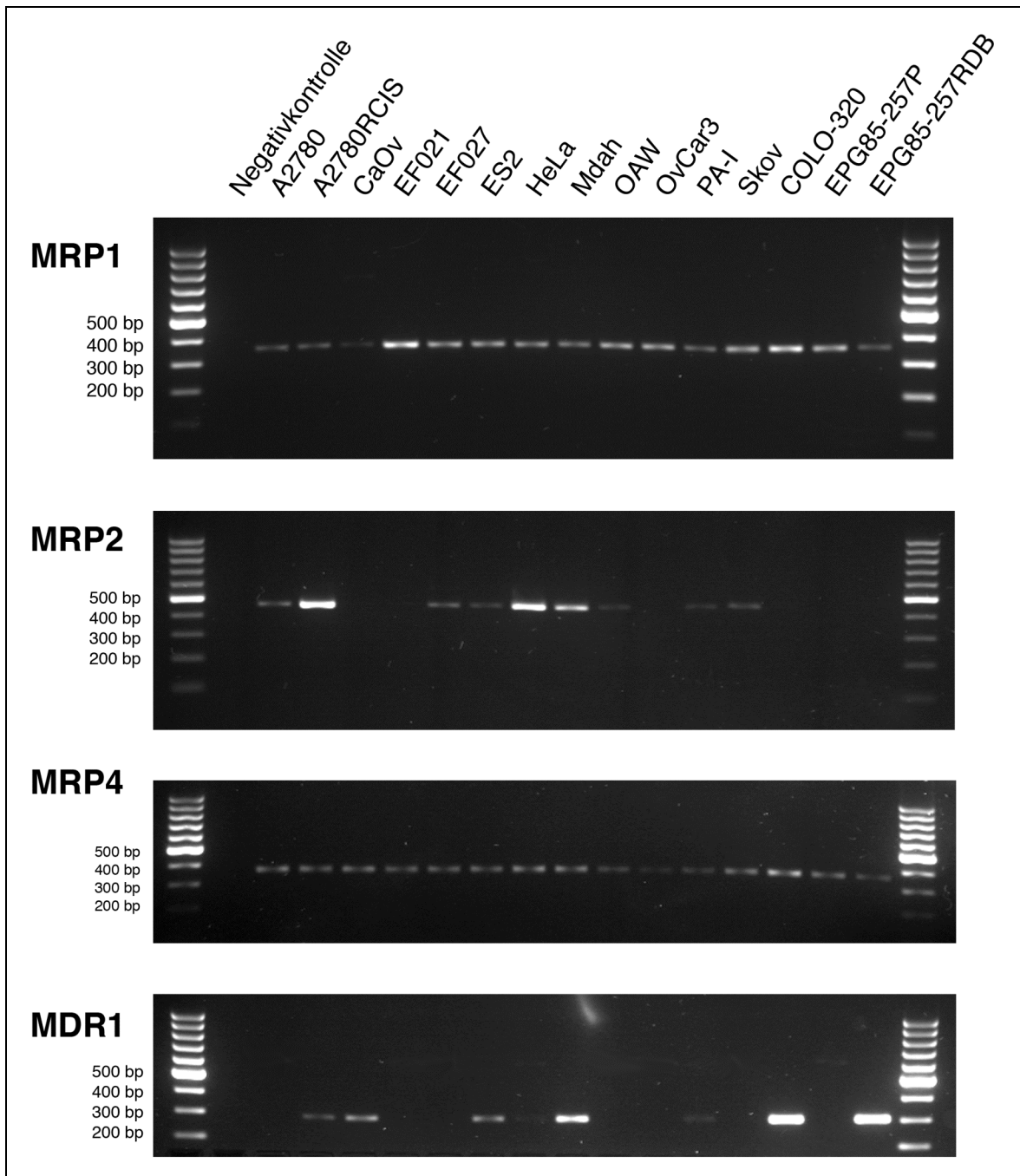
## 3.4 Etablierung eines Zellmodells mit MRP4-Überexpression

### 3.4.1 Auswahl geeigneter Zelllinien

Zur Etablierung eines Zellmodells, welches eine stabile Überexpression des Membrantransporters MRP4 aufweist, wurden zunächst mögliche Zelllinien auf Ihre Eignung untersucht. Idealerweise sollte die Transfektion an einer Zelllinie angewendet werden, welche keine, oder nur in einem geringen Ausmaß Membrantransporter der ABC-Familie exprimiert. Vom Pathologischen Institut der Charité wurden uns 11 verschiedene Ovarialkarzinomzelllinien zur Verfügung gestellt, welche auf die Expression von MDR1 (P-gp) und der MRP Transporter 1, 2 und 4 untersucht wurden. Bei der Auswahl der Zelllinien wurde ebenso berücksichtigt, dass schon Erfahrungen mit der Transfektion von Ovarialkarzinomzellen hinsichtlich Transfektionsreagenz und Durchführung durch die Zelllinie A2780RCIS vorlagen [121]. Um das Ausmaß der Expression der verschiedenen Transporter zu analysieren, wurden die Zelllinien mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht (Kapitel 2.2.4.2). Hierzu wurde zunächst die RNA in cDNA umgeschrieben (Kapitel 2.2.4.1). Für die PCR wurden die in Tabelle 7 (Kapitel 2.1.2) genannten Primersequenzen und die angegebenen PCR Bedingungen verwendet. Zusätzlich wurde bei jeder PCR eine Negativkontrolle ohne cDNA verwendet sowie verschiedene Positivkontrollen. Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse der untersuchten Zell-DNA nach erfolgter RT-PCR, Auftrennung der Fragmente und UV-Anregung des Ethidiumbromides nach DNA-Interkalation (Kapitel 2.2.4.4).

Für MRP1 ist eine moderate und bei allen Zelllinien gleichmäßige Expression erkennbar. Dies trifft ebenso für MRP4 zu, wobei hier die Expression bei allen Zellen noch schwächer ausfällt. Starke Unterschiede sind bei den Banden des MRP2-Transkripts erkennbar. Hier ist deutlich die MRP2-Bande der als Positivkontrolle eingesetzten A2780RCIS Zelllinie zu erkennen, was auf eine starke Expression des Transporters schließen lässt. Große Unterschiede ließen sich auch bei der Expression von MDR1 (P-gp) beobachten. Intensive Banden und damit eine gute Vergleichbarkeit gegenüber den anderen Zelllinien ergaben sich bei den Positivkontrollen COLO-320 und EPG85-257RDB.

Für eine Transfektion mit dem MRP4-Konstrukt wurden die beiden Zelllinien PA-I und OvCar3 in Betracht gezogen, da neben moderaten Expressionsraten von MRP1 auch nur sehr geringe beziehungsweise keine Banden für die restlichen Transporter detektiert wurden.



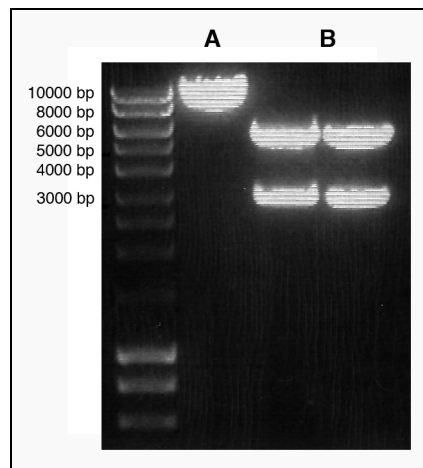
**Abbildung 18: RT-PCR Übersicht für ausgewählte ABC-Transporter**

Es wurden 11 verschiedene Ovarialkarzinomzelllinien auf das Ausmaß der Expression der Transporter P-gp sowie MRP1, MRP2 und MRP4 untersucht. Als Positivkontrollen dienen die Zelllinien A2780RCIS für MRP2, COLO-320 für MRP1 und MDR1 (P-gp), sowie EPG85-257RDB für MDR1 (P-gp).

### 3.4.2 Transfektion von MRP4 in die Zelllinien PA-I und OvCar3

In Vorbereitung auf die Transfektion wurde das MRP4-Plasmid der Firma ImaGenes durch einen Verdau (Kapitel 2.2.7.2) mit dem Restriktionsenzym *Kpn* linearisiert sowie in einem zweiten Verdauungsansatz mit *Nhe* und *SacI* ein Leervektor geschaffen, welcher kein MRP4-Konstrukt mehr enthält und als Negativkontrolle für die Transfektion zur Verfügung stand. Zuvor wurden die Schnittstellen der Restriktionsenzyme mit Hilfe der

Vektorkarte ermittelt und durch einen Sequenzabgleich sichergestellt, dass sich die Erkennungssequenzen der Enzyme nicht innerhalb der MRP4-Sequenz befinden. Nach dem Verdau von 5 µg Plasmid wurden die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt und nach Ethidiumbromid-Interkalation unter UV-Bestrahlung visualisiert (Kapitel 2.2.4.4). Durch die Schnittstellen der Enzyme *Nhe* und *SacI* sind Fragmente von 5528 bp (Leervektor) und von 2890 bp (MRP4-Konstrukt) zu erwarten und für die enzymatische Aktivität von *Kpn* sollte ein Fragment der Größe 8418 bp erkennbar sein. Durch den Vergleich mit einem Standard (Hyperladder I) konnten diese Fragmente nach der Gelaufentrennung einwandfrei zugeordnet werden (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Restriktionsverdau des MRP4 Plasmids**

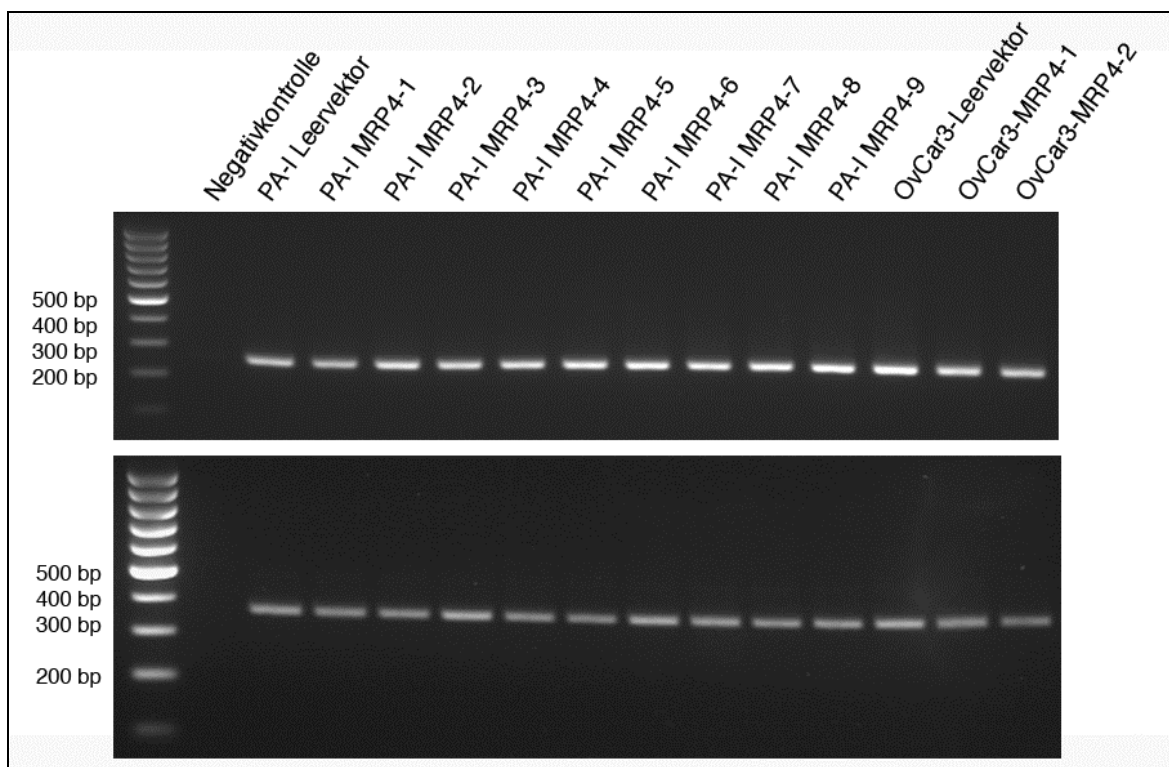
Um ausreichende Mengen des Leervektors zu erhalten, wurde der Verdau mit *Nhe* und *SacI* mit 5 µg Plasmid zweimal wiederholt und nach der Auftrennung im Agarosegel die Fragmente bei ungefähr  $5500 \pm 500$  bp aus dem Gel geschnitten. Zur Aufreinigung des Leervektors erfolgte eine Gel-Extraktion, wie im Kapitel 2.2.7.4 beschrieben.

Der Transfektionsansatz wurde mit 0,25 µg/µl linearisiertem Plasmid sowie in gleicher Konzentration mit dem Leervektor durchgeführt (Kapitel 2.2.7.5). Nach 2 bis 3 Wochen G418-Selektion konnten bei den PA-I-Zellen 12 Klone und bei den OvCar3-Zellen 8 Klone vereinzelt werden. Einige dieser Klone starben jedoch im Laufe der weiteren Kultivierung ab, da in diesem Fall wahrscheinlich nur ein transients Einbau des Plasmids und damit auch des G418-Resistenzgens stattgefunden hatte. Die Expression dieses Resistenzgens wird als Neomycin/Geneticin-Resistenz bezeichnet und ermöglicht eine Selektion der transfizierten Zellen unter Geneticin (G418). Kommt es zum fehlerhaften Einbau des Plasmids, fehlt das Resistenzgen und die Zellen sterben aufgrund der G418 Exposition nach kurzer Zeit ab.

Zur weiteren Analyse standen anschließend 9 Klone der PA-I-Zellen, 2 Klone der OvCar3-Zellen sowie die jeweiligen Leervektoren zur Verfügung.

### 3.4.3 MRP4-Expression transfizierter PA-I und OvCar3 Zellen

Von den 13 erhaltenen MRP4-Klonen wurde die RNA isoliert (Kapitel 2.2.5.1) und in cDNA umgeschrieben (Kapitel 2.2.4.1). Für eine erste Übersicht der erhaltenen Klone erfolgte die Analyse der MRP4 Expression mit Hilfe der RT-PCR (Kapitel 2.2.4.2) und MRP4 spezifischen Primern. Als Kontrolle für das gleichmäßige Auftragen der Proben wurde die Aldolase verwendet, welche als sogenanntes „housekeeping-Gen“ unabhängig vom Zelltyp und Zellstress konstante Expressionsraten aufweist. Neben der zu erwartenden konstanten Bande für die Aldolase wurden jedoch keine Unterschiede zwischen den Leervektoren von PA-I und OvCar3 zu den jeweiligen transfizierten MRP4-Klonen festgestellt (Abbildung 20). Bei einer erfolgreichen Transfektion sollten deutlich intensivere Banden für das MRP4-Produkt bei einzelnen Klone erkennbar sein.

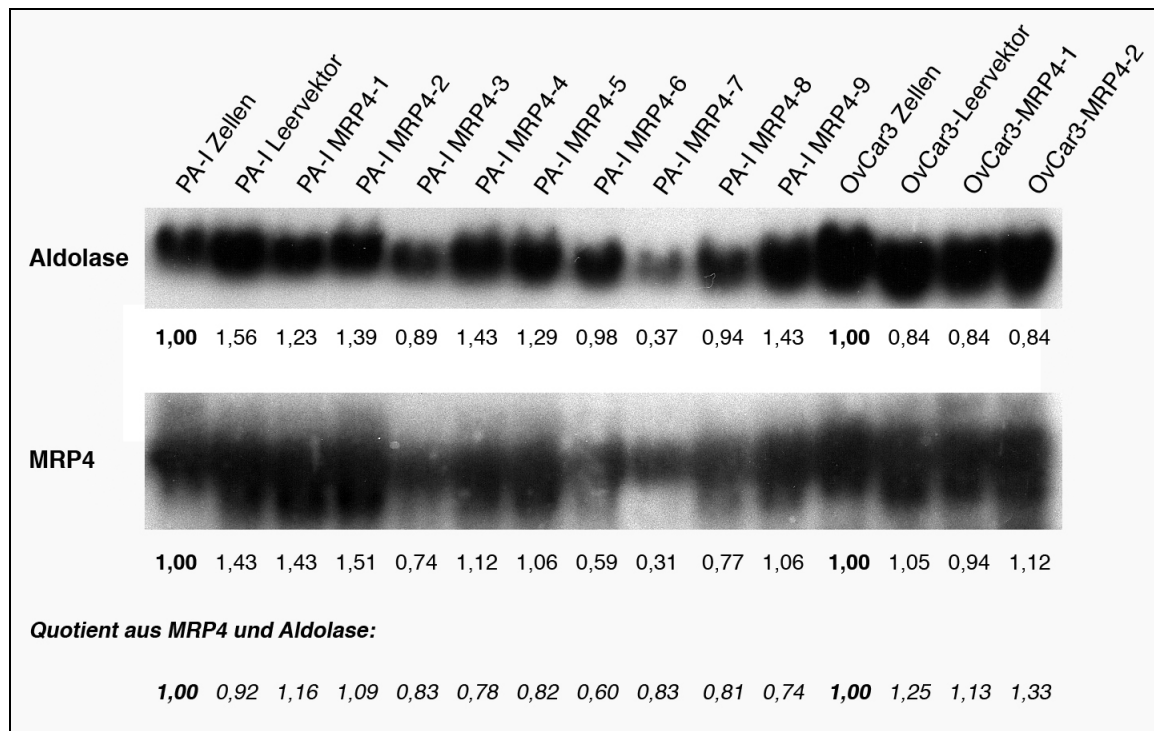


**Abbildung 20: RT-PCR von MRP4 transfizierten Zellklonen (PA-I, OvCar3)**

Im oberen Bild ist die Aldolase Kontrolle abgebildet, deren PCR Produkt eine Größe von 258 bp aufweist. Es ist eine gleichmäßige Stärke der Banden erkennbar. Im unteren Bild wurden die gleichen Proben auf das Ausmaß der MRP4-Expression untersucht. Das PCR-Produkt mit einer Größe von 358 bp zeigt kaum Unterschiede in der Bandenstärke. Vor allem im Vergleich zu den Leervektoren (Bande 1 und Bande 11) sollten bei einer erfolgreichen Überexpression des MRP4 deutliche Unterschiede in der Bandenstärke erkennbar sein.

Zur Sicherstellung der erhaltenen Ergebnisse wurde die isolierte RNA der Zellproben zusätzlich mit Hilfe der NorthernBlot Analyse untersucht (Kapitel 2.2.5). Die für Aldolase und MRP4 spezifischen Sonden wurden durch eine RT-PCR (Kapitel 2.2.4.2) und

anschließender Gel-Extraktion (Kapitel 2.2.7.4) des aufgetrennten PCR-Produkts erhalten. Die radioaktive Markierung der spezifischen Sonden erfolgte durch den Einbau des Phosphorisotops  $^{32}\text{P}$  (Kapitel 2.2.5.3). Das Ergebnis der sich anschließenden Hybridisierung und Exposition auf einen Röntgenfilm ist in Abbildung 21 dargestellt. Unterschiede in der Gelbeladung werden durch die Aldolase Kontrolle nivelliert, indem nach einer densitometrischen Analyse der Banden die erhaltenen Werte für MRP4 in das Verhältnis zur Aldolase gesetzt werden. Der Quotient sollte bei einer gesteigerten Expression von MRP4 deutlich über 1 liegen. Dies war bei keiner der untersuchten Proben der Fall. Es wurden häufig Werte kleiner 1 gefunden, was einer verminderten Expression des MRP4 entspricht. Lediglich bei den Transfektanten der OvCar3 Zellen konnte ein maximaler Wert von 1,33 erzielt werden, was jedoch nur eine äußerst geringe Expressionssteigerung widerspiegelt.



**Abbildung 21: NorthernBlot von MRP4 transfizierten Zellklonen (PA-I, OvCar3)**

Die Analyse der RNA Mengen der MRP4 Transfektanten wurde für die Aldolase als Ladekontrolle sowie für das transfizierte MRP4 Gen durchgeführt. Die durch die radioaktiv markierten Sonden erhaltenen Banden auf dem Röntgenfilm wurden densitometrisch analysiert und zu den jeweils unbehandelten Zellen ins Verhältnis gesetzt. Der Quotient aus MRP4 zu Aldolase ergibt bei einer gesteigerten Expression von MRP4 Werte größer 1. Es wurden nur sehr moderate Steigerungen von maximal 1,33 bei den Transfektanten festgestellt, was nicht für eine starke Überexpression von MRP4 spricht.

### 3.4.4 Transfektion von MRP4 in die Zelllinie hepG2

Aufgrund der schwachen Expressionssteigerung von MRP4 in den Zelllinien PA-I und OvCar3 wurde eine weitere Zelllinie für die Transfektion in Betracht gezogen. Auf Basis

einer Publikation von Tian *et al.* wurden humane Hepatozyten ausgewählt, welche unter dem Namen hepG2 erhältlich sind [153]. Für diese Zellen konnte Tian *et al.* eine erfolgreiche Überexpression des MRP4 nach einer Transfektion nachweisen. Die humanen Hepatomzellen zeigen nur eine sehr geringe bis keine Expression des Membrantransporters MRP4. Auch für weitere Vertreter der ABCC Familie (MRP1, MRP3, MRP5 und MRP6) ließen sich nur niedrige Expressionsraten bestimmen. Damit ist die humane Hepatozytenlinie hepG2 gut für eine MRP4 Transfektion und nachfolgende Transporterstudien geeignet [150,154].

Die Transfektion wurde unter den gleichen Bedingungen wie im Kapitel 3.4.2 beschrieben, durchgeführt. Nach 3 Wochen unter G418 Selektion (400 µg/ml) konnten 17 Klone mit erfolgter MRP4 Transfektion und 3 Klone als Kontrolle mit Leervektoren gepickt und in 24-well Platten ausgeeinzelnt werden. Die Zellklone wurden für weitere 10 bis 22 Tage bis zur Konfluenz im Selektionsmedium kultiviert und anschließend zur Untersuchung der MRP4 Expressionsprofile im Rahmen der RNA Isolierung lysiert (Kapitel 2.2.5.1).

### **3.4.5 MRP4-Expression transfizierter hepG2 Zellen**

#### **3.4.5.1 Untersuchung mittels RTQ-PCR**

Zur Analyse der 20 erhaltenen hepG2-MRP4 Zellklone wurde auf die semiquantitative RT-PCR verzichtet und eine RTQ-PCR (Real Time quantitative PCR) durchgeführt (Kapitel 2.2.4.3). Der Vorteil dieser Methode ist, dass quantitative Aussagen zur Ausgangsmenge des MRP4 in jedem Zellklon möglich sind. Grundlage hierfür ist die Messung der Fluoreszenz des interkalierenden Cyanin-Farbstoffs SYBR Green I nach jedem PCR-Zyklus und die Annahme, dass die Fluoreszenz proportional mit der Menge des PCR-Produkts zunimmt. Dies trifft für die exponentielle Phase einer PCR zu, welche nur wenige Zyklen dauert und die optimalen Reaktionsbedingungen besitzt. Die Quantifizierung des MRP4 Zielgens erfolgt in Bezug zu einem „housekeeping“-Gen, welches unter der Annahme betrachtet wird, in allen Proben konstant vorzuliegen. Jedoch können auch bei „housekeeping“-Genen Schwankungen durch die experimentelle Einflüsse auftreten, sodass für die Auswertung der MRP4 Expression auf 2 Kontrollgene zurückgegriffen wurde. Dabei handelt es sich wie auch schon bei der NorthernBlot Analyse um das Gen der Aldolase sowie das Gen der Porphobilinogen deaminase (PBGD). Die Aldolase zeichnet sich durch eine relativ starke zelluläre Expression aus, während PBGD deutlich geringer im humanen Zellhaushalt exprimiert wird [160].

In Tabelle 15 sind die Ergebnisse der RTQ-PCR Analyse dargestellt. Die Menge an MRP4-cDNA wurde im Verhältnis zu den bei der Transfektion identisch behandelten hepG2-MRP4-LV3 Zellen (Leervektor) betrachtet und auf Aldolase und PBGD normiert.



Die MRP4-Klone 3 und 6 zeigen eine besonders starke Expressionssteigerung des MRP4, mit einem maximalen Wert von 16,32 im Verhältnis zu den Zellen des Leervektors LV3. Aber auch die Klone 1, 7, 9, 10, 11 und 15 zeigen bis zu 8-fach höhere MRP4-cDNA Mengen als die Vergleichszelllinie. Die übrigen Klone zeigen keine Steigerung in der Expression, für die MRP4-Klone 16, 17 und dem Leervektor LV1 konnte kein erfolgreicher PCR Lauf durchgeführt werden. Vermutlich lag hier eine Kontamination schon bei der RNA-Isolierung vor, da diese sehr empfindlich gegenüber Ribonukleasen ist. Auch bei den Leervektoren wurde nur eine sehr moderate Erhöhung gegenüber den hepG2-Zellen festgestellt. Insgesamt zeigt die Normierung auf die beiden Kontrollgene eine übereinstimmende Tendenz bei allen MRP4-Klonen, wobei die Expression bei der Normierung auf PBGD durchschnittlich stärker ausfällt. Dies zeigt sich deutlich bei den Klonen 3, 5, 7, 11 und 15.

Für weitergehende Untersuchungen wurden die Zellklone 3, 6 und 15 ausgewählt, da hier die stärkste Expressionssteigerung im Vergleich zu beiden Kontrollgenen ermittelt wurde. Als MRP4-Leervektor wurde Klon LV3 ausgewählt, da hier die geringsten Unterschiede bei der Normierung auf Aldolase und PBGD bestanden.

Zelllinie	Expressionssteigerung (x-fach) normalisiert auf Aldolase	Expressionssteigerung (x-fach) normalisiert auf PBGD
hepG2	0,35	0,63
hepG2-MRP4-LV1	n. b.	n. b.
hepG2-MRP4-LV2	1,00	2,21
<b>hepG2-MRP4-LV3</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>
hepG2-MRP4-1	3,38	3,82
hepG2-MRP4-2	0,07	0,08
hepG2-MRP4-3	4,67	16,32
hepG2-MRP4-4	0,16	0,58
hepG2-MRP4-5	0,78	3,02
hepG2-MRP4-6	6,97	7,79
hepG2-MRP4-7	1,39	6,29
hepG2-MRP4-8	0,44	1,15
hepG2-MRP4-9	2,28	3,25
hepG2-MRP4-10	1,64	3,90

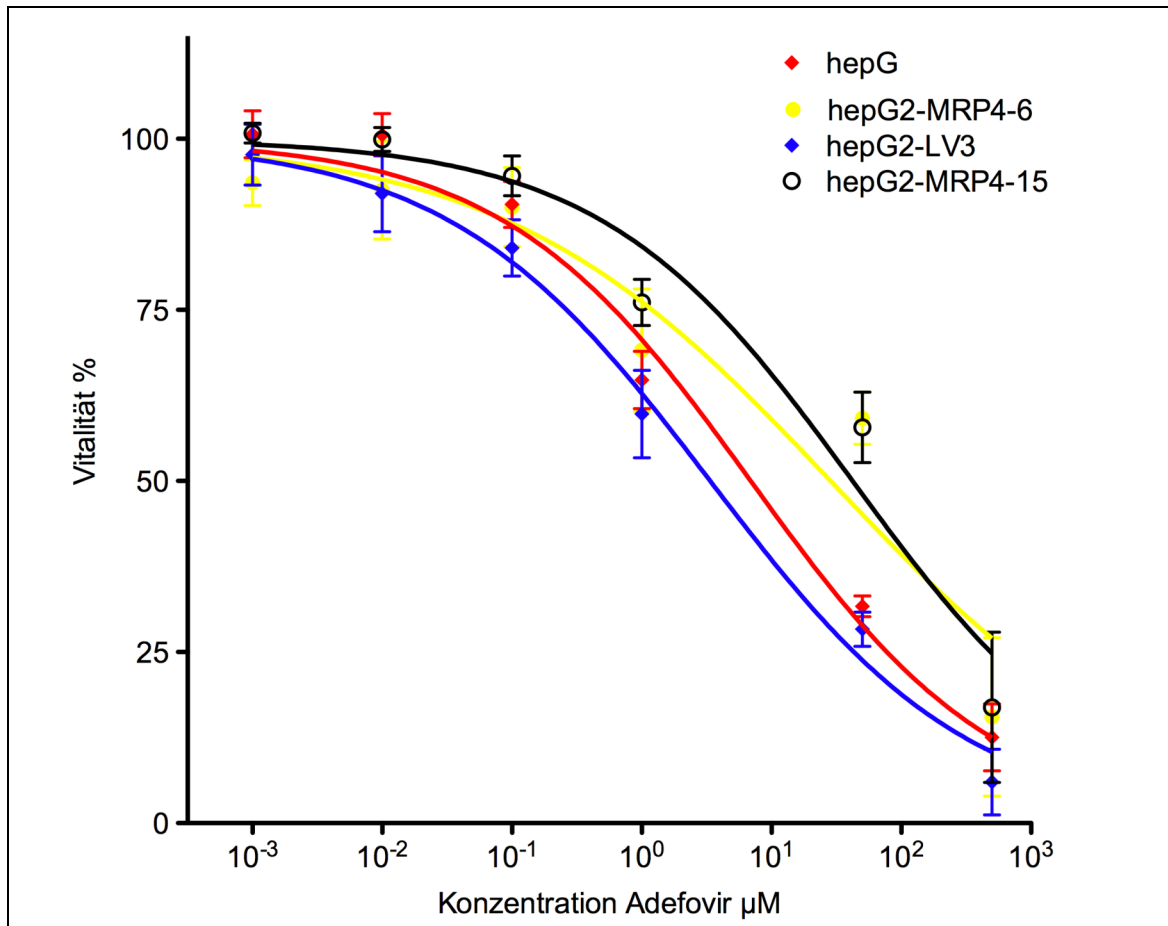
hepG2-MRP4-11	1,78	5,08
hepG2-MRP4-12	0,05	0,19
hepG2-MRP4-13	0,40	0,78
hepG2-MRP4-14	0,06	0,12
hepG2-MRP4-15	2,92	5,86
hepG2-MRP4-16	n. b.	n. b.
hepG2-MRP4-17	n. b.	n. b.

**Tabelle 15: Steigerung der MRP4-cDNA Menge transfizierter hepG2-Zellen.**

Die durch RTQ-PCR ermittelten cDNA Mengen des MRP4 wurden zu dem Leervektor hepG2-MRP4-LV3 ins Verhältnis gesetzt und die Expressionssteigerung berechnet. Dabei erfolgte die Bestimmung im Verhältnis zu zwei „housekeeping“-Genen (Aldolase, PBGD), bei denen eine konstante Expression vorausgesetzt wird. (n.b. = nicht bestimmbar)

### 3.4.5.2 Untersuchung mittels Funktionsassay

Nachdem durch die Analyse der cDNA indirekt die MRP4-mRNA Mengen bestimmt wurden, sollten nun weitere Untersuchungen mit den 4 ausgewählten Klonen bezüglich der Aktivität des MRP4 Transporters durchgeführt werden. Dazu bietet es sich an, Zytotoxizitätsuntersuchungen mit einem bekannten MRP4-Substrat durchzuführen und die IC50 Werte der transfizierten Zellklone mit dem Wert der unbehandelten Zellen zu vergleichen. Ein bekanntes Substrat für den Membrantransporter MRP4 ist das Virustatikum Adefovirdipivoxil [64,155]. Für die Testung der Toxizität des Adefovirdipivoxils wurde der MTT-Test durchgeführt (Kapitel 2.2.2). Dabei wurde ein Konzentrationsbereich von 500  $\mu\text{M}$  bis 0,001  $\mu\text{M}$  für das MRP4 Substrat ausgewählt und die Zellen für 48 h inkubiert (Abbildung 22). Für die Zelllinie hepG2-MRP4-3 konnte keine Zytotoxizitätsuntersuchung durchgeführt werden, da sich im Laufe der Zellkultur ein zunehmend schlechteres Wachstum der Zellen bemerkbar machte. Aus diesem Grund wurde diese Zelllinie für weitere Untersuchungen ausgeschlossen.



**Abbildung 22: MTT-Test ausgewählter hepG2-MRP4-Klone**

Toxizitätskurven der hepG2-Zellen (rot), des MRP4-Leervektors (blau) und der beiden MRP4-Klone (schwarz, gelb) nach Inkubation mit dem MRP4-Substrat Adefovirdipivoxil für 48 h. Für die beiden MRP4-Klone ist eine deutliche Resistenzsteigerung gegenüber der Leervektor-Kontrolle bzw. den hepG2 Zellen erkennbar. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung einer unabhängigen Dreifachbestimmung.

Zelllinie	IC50 Adefovir µM	Resistenzsteigerung im Vergleich zum Leervektor
hepG2	6,9 ± 2,9	---
hepG2-LV3	3,4 ± 1,7	1,0
hepG2-MRP4-6	28,5 ± 3,5 *	8,4
hepG2-MRP4-15	42,1 ± 7,1 *	12,4

**Tabelle 16: IC50-Werte der hepG2-MRP4-Klone**

Die IC50-Werte wurden aus den in Abbildung 22 erhaltenen Kurvenverläufen mit Hilfe von GraphPad PRISM ermittelt und die Resistenzsteigerung der beiden MRP4-Klone im Vergleich zum identisch behandelten Leervektor berechnet. Die statistische Signifikanz der Unterschiede (\*) wurde mit dem Student's T-Test für  $P < 0,05$  ermittelt.

Die durch den durchgeführten MTT-Test erhaltenen IC<sub>50</sub>-Werte für das MRP4-Substrat Adefovirdipivoxil zeigen eine deutliche und signifikante Erhöhung im Vergleich zu den unbehandelten hepG2-Zellen und dem MRP4-Leervektor (Tabelle 16). Dabei konnte eine 12,4-fache Steigerung des IC<sub>50</sub> für den MRP4-Klon 15 in Bezug zum Leervektor ermittelt werden. Der Vergleich zum Leervektor wurde ausgewählt, da diese Zellen bezüglich der Transfektion identisch wie die MRP4-Klone behandelt wurden und lediglich der Unterschied besteht, dass der transfizierte Vektor kein MRP4-Konstrukt enthält (Leervektor). Auch für den MRP4-Klon 6 wurde mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 28,5 µM eine 8,4-fache Steigerung der Resistenz gegenüber Adefovirdipivoxil erzielt.

Durch die Untersuchung der beiden Zelllinien hepG2-MRP4-6 und hepG2-MRP4-15 auf der funktionellen Ebene konnte gezeigt werden, dass die deutlich gesteigerte Resistenz gegenüber eines spezifischen MRP4 Substrats mit einer deutlich erhöhten Expression des MRP4 korreliert. Dabei konnten Resistenzsteigerungen für Adefovirdipivoxil von bis zu 12,4 gegenüber dem Leervektor erzielt werden. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch die Autoren Tian *et al.*, welche eine 10-fache Resistenzerhöhung gegenüber Adefovirdipivoxil mit MRP4-transfizierten hepG2 Zellen im Vergleich zum Leervektor erreichen konnten [153]. Unterstützt wurden diese Ergebnisse durch die Analyse der m-RNA, welche für MRP4 codiert. Durch spezifische Primer konnte mit Hilfe der Real-Time quantitativen PCR eine Aussage über die Verhältnisse der Ausgangsmengen an MRP4-cDNA der untersuchten Proben getroffen werden. Dabei zeigten die beiden Zelllinien hepG2-MRP4-6 und hepG2-MRP4-15 mit die höchsten Steigerungen in den Expressionsraten für MRP4 verglichen mit dem Leervektor LV3. Damit eignen sich beide Zelllinien sehr gut als Zellmodelle, um Effekte von MDR-Modulatoren auf den Membrantransporter MRP4 untersuchen zu können. Da die in der Arbeitsgruppe synthetisierten käfigdimeren 1,4-Dihydropyridine auch eine hemmende Wirkung auf die HIV-1 Protease besitzen, sind Aussagen zum MRP4 inhibitorischen Potential auch aus dem Grund interessant, weil Resistenzursachen bei der HIV Therapie auch auf die Aktivität des MRP4-Transporters zurückgehen [129,158]. Ein duales Wirkprinzip der käfigdimeren 1,4-Dihydropyridine wäre demnach ein interessantes Konzept, um mögliche Resistenzen vorzubeugen. Für weitere Untersuchungen sollte als Vergleich immer der Bezug zum Leervektor hepG2-MRP4-LV3 genutzt werden, da dieser auch in den voran gegangenen Untersuchungen (Funktionsassay, RTQ-PCR) als vergleichender Standard zum Einsatz gekommen ist.

### 3.5 P-gp Hemmung

Das Grundprinzip der Untersuchung der Testsubstanzen auf P-gp inhibitorische Eigenschaften besteht in der Verwendung von Rhodamin 123 als fluoreszierendes P-gp Substrat [41,156]. Dabei kommt es zur Aufnahme des Rhodamin 123 in den Intrazellularraum bei gleichzeitigem Efflux durch die Aktivität des P-gp Membrantransporters. Bei einer erfolgreichen Hemmung des P-gp erfolgt intrazellulär eine Akkumulation des fluoreszierenden Farbstoffs, welche durch die Verwendung eines Durchflusszytometers quantifiziert werden kann (Kapitel 2.2.3). Für die Untersuchungen wurde ein Maus-T-Lymphom Zellmodell verwendet. Dabei handelt es sich um eine Parentalzelllinie (L5178Y, Wildtyp), welche kein P-gp exprimiert sowie eine durch Retrovirusinfektion erhaltene Subzelllinie (L5178YvMDR), die eine starke Expression des humanen P-gp aufweist [122,123]. Zur Sicherstellung einer möglichst konstanten Expression erfolgt die Zugabe von 60 ng/ml Colchicin zum Nährmedium der Zellen. Das als Hemmstoff der Mitose bekannte P-gp Substrat führt in der P-gp negativen Parentalzelllinie zu einem Absterben der Zellen, in der transfizierten Sublinie hingegen sind die Zellen durch die starke Expressierung des P-Glykoproteins resistent gegenüber dieser Colchicinkonzentration. Für die experimentellen Untersuchungen liegen im Vergleich zum Wildtyp alle durchflusszytometrischen Beobachtungen einer veränderten Rhodamin 123 Akkumulation an der transfizierten Subzelllinie eindeutig der Aktivität des P-gp zu Grunde. Die zu testenden Substanzen wurden in Konzentrationen von 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M untersucht. Wurden bei der höheren Konzentration noch keine Effekte gemessen so zeigen die Substanzen entweder keine oder eine nur sehr geringe inhibitorische Aktivität. Als Positivkontrolle diente der schon länger bekannte P-gp Modulator Verapamil sowie Tariquidar, als Vertreter der neusten Generation. Das inhibitorische Potential der Verbindungen wurde durch die Berechnung des FAR-Werts (Fluorescence Activity Ratio) verdeutlicht, welcher das Verhältnis von behandelten Zellen zur unbehandelten Kontrolle beschreibt (Kapitel 2.2.3.1). Dabei sind Werte oberhalb von 1 durch die inhibitorische Aktivität einer Substanz bedingt, während bei Werten von  $\leq 1$  keine P-gp Hemmung vorliegt.

In Tabelle 17 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen dargestellt. Alle untersuchten Substanzen wurden für die Herstellung einer Stammlösung in DMSO gelöst. Nach Zugabe zum Zellmedium war bei jeder Probe eine Endkonzentration von 1 % DMSO vorhanden. Um mögliche DMSO Effekte auszuschließen, wurde eine DMSO Kontrolle bei allen Untersuchungen verwendet. Dabei konnten keine Effekte auf die P-gp Aktivität bei einer Konzentration von 1 % gemessen werden (FAR = 0,99).

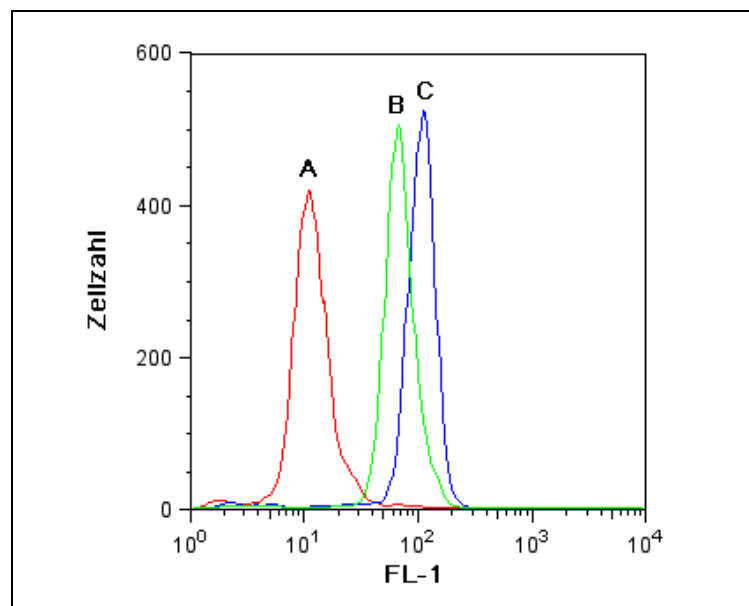
Verbindung	FAR – Mittelwert ± SD	
	1 µM	10 µM
H17	4,32 ± 2,10	6,64 ± 2,53
JW41	4,09 ± 1,84	4,73 ± 0,20
JW33	2,33 ± 0,37	8,25 ± 0,37
JW46	1,86 ± 0,62	6,14 ± 0,85
Verapamil	4,01 ± 1,40	6,07 ± 1,88
Tariquidar	8,43 ± 2,99	7,42 ± 1,42
JW24	2,54 ± 1,44	6,45 ± 2,15
JW50	0,76 ± 0,13	0,83 ± 0,28
JW53A	2,97 ± 1,28	10,89 ± 3,91
JW53B	0,83 ± 0,19	1,04 ± 0,11
JW59	0,73 ± 0,29	1,40 ± 0,59
JW63	1,39 ± 0,84	1,30 ± 1,24
JW64A	1,25 ± 1,13	1,12 ± 0,04
JW64B	1,25 ± 0,07	5,05 ± 1,99
JW65	1,54 ± 0,36	5,27 ± 1,95
<b>FAR – Mittelwert ± SD</b>		
DMSO 1 %	0,99 ± 0,10	

### **Tabelle 17: FAR-Werte zur Bestimmung der P-gp inhibitorischen Aktivität**

Für jede Zellprobe wurde nach der Zellinkubation mit 1 µM oder 10 µM der Testverbindungen die Intensität der intrazellulären Fluoreszenz von Rhodamin 123 im Durchflusszytometer bestimmt und das Verhältnis von behandelter Probe zur unbehandelten Kontrolle gebildet (FAR-Wert). Bei Werten größer 1 kann von einer inhibitorischen Aktivität der getesteten Verbindung ausgegangen werden. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen (SD) von 3 bis 5 unabhängigen Versuchen.

Bei den untersuchten käfigdimeren Dihydropyridinen konnte bei den meisten eine P-gp inhibitorische Aktivität gemessen werden. Bei der niedrigen Testkonzentration von 1 µM zeigten vor allem die Verbindungen H17 (FAR = 4,32) und JW41 (FAR = 4,09) eine gute P-gp modulatorische Aktivität. Im Vergleich dazu zeigte die Kontrollsubstanz Verapamil ebenfalls eine gute aber geringere Aktivität (FAR = 4,01). Lediglich bei der zweiten Kontrollsubstanz Tariquidar wurde ein besserer FAR-Wert von 8,43 ermittelt. Wurden die Maus-T-Lymphom Zellen mit der höheren Substanzkonzentration von 10 µM inkubiert, so

zeigten sich deutlich bessere P-gp modulatorische Aktivitäten vor allem für die Verbindungen JW33 (FAR = 8,25), JW46 (FAR = 6,14), JW24 (FAR = 5,45), JW53A (FAR = 10,89), JW64B (FAR = 5,05) und JW65 (FAR = 5,27). Für H17 ergab sich eine Steigerung des FAR auf 6,64, bei JW41 wurde im Vergleich zur Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  keine Steigerung der P-gp hemmenden Wirkung mehr festgestellt. Die Ergebnisse der Verapamilkontrolle ergaben einen etwas höheren FAR-Wert von 6,07, dieser lag aber deutlich unterhalb der inhibitorischen Wirkung der anderen Testsubstanzen. Für Tariquidar wurde sogar ein geringerer FAR-Wert im Vergleich zur 1  $\mu\text{M}$  Konzentration ermittelt (FAR = 7,42), was auf eine Sättigung der inhibitorischen Aktivität am Membrantransporter hindeutet. Von den untersuchten Verbindungen zeigten die 5 Substanzen JW50, JW53B, JW59, JW63 und JW64A nur eine sehr geringe oder gar keine hemmende Wirkung auf das P-Glykoprotein. Die daraus resultierende geringe intrazelluläre Akkumulation des Rhodamin 123 ergab einen FAR-Wert von ungefähr 1, da hier nur sehr geringe Fluoreszenzunterschiede zur unbehandelten Kontrolle messbar waren.



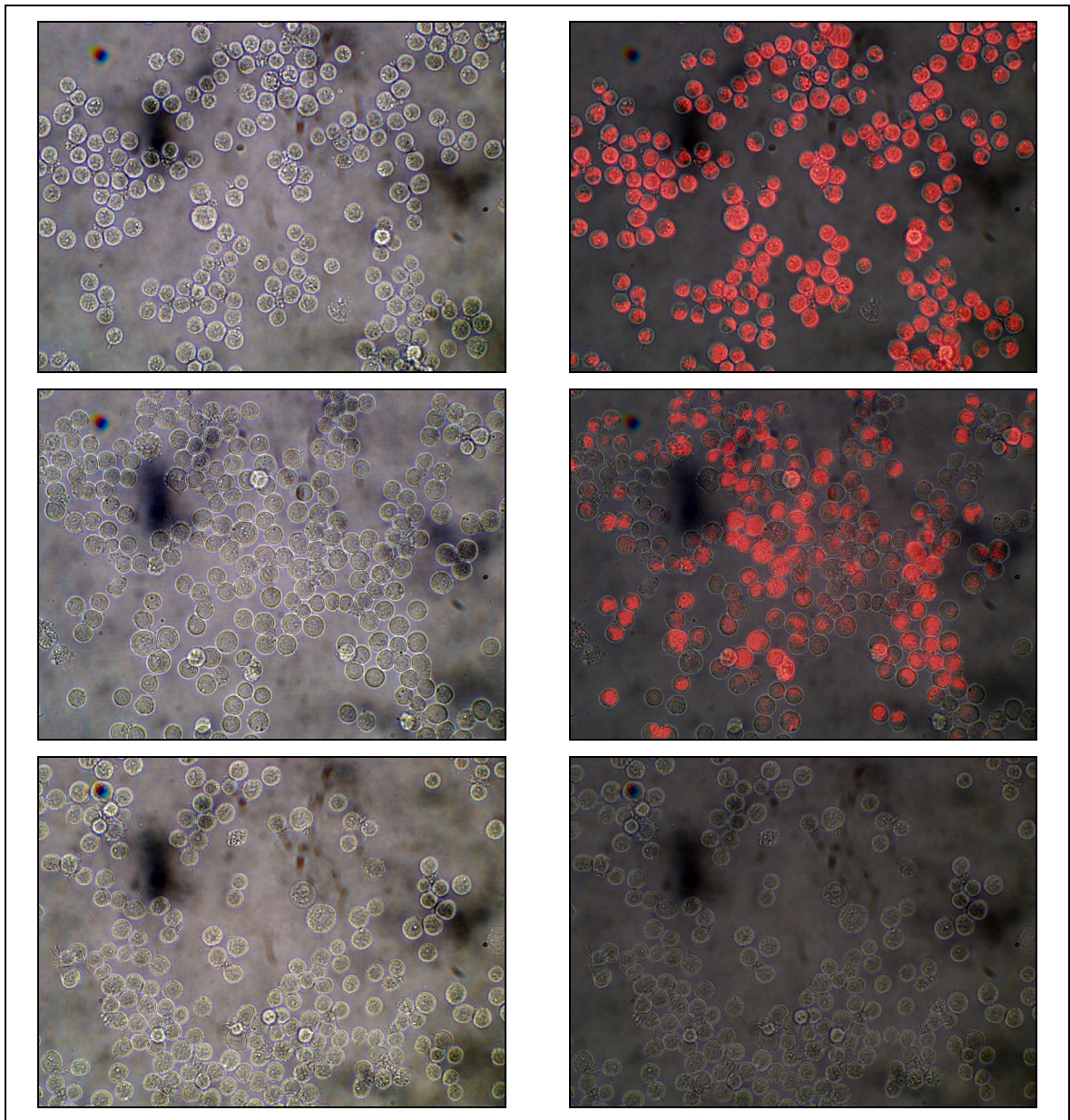
**Abbildung 23: Steigerung der intrazellulären Fluoreszenz nach P-gp Hemmung**

Deutlich erkennbar ist der im Durchflusszytometer gemessene Fluoreszenzshift zwischen den unbehandelten Maus-T-Lymphom Zellen (A) und den mit 10  $\mu\text{M}$  JW33 (B) oder 10  $\mu\text{M}$  Tariquidar (C) vorbehandelten Zellen.

Zur Visualisierung der intrazellulären Akkumulation von Rhodamin 123 wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt (Abbildung 24). Wie schon im Durchflusszytometer gemessen, zeigten die Substanzen JW33 und Tariquidar eine sehr gute P-gp Hemmung, was in einer starken intrazellulären Fluoreszenz resultiert. Ohne Inhibitor wird das als P-gp Substrat fungierende Rhodamin 123 durch einen aktiven



Transport wieder in den Extrazellularraum geschleust, wodurch keine zelluläre Fluoreszenz detektiert werden konnte.



#### Abbildung 24: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der P-gp Hemmung

Zur Visualisierung der, durch P-gp Hemmung bedingten intrazellulären Rhodamin 123 Akkumulation wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der P-gp exprimierenden Maus-T-Lymphoma Zellen L5178YvMDR angefertigt. Dabei wurden die Zellen im oberen Bildteil mit 10  $\mu\text{M}$  Tariquidar inkubiert (oben, links) und nach Zugabe von Rhodamin 123 die Fluoreszenz detektiert (oben, rechts). Im mittleren Bildabschnitt dargestellt, ist die Zellbehandlung mit 10  $\mu\text{M}$  JW33 (links) und mit zusätzlich Rhodamin 123 (rechts). Im unteren Bildteil sind die Zellen ohne Rhodamin 123 (unten, links) und mit Rhodamin 123 (unten, rechts) dargestellt. Es erfolgte hier keine Zugabe einer P-gp hemmenden Verbindung.



### 3.5.1 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Ausgehend von dem käfigdimeren Dihydropyridin H17 sollte der Einfluss unterschiedlicher funktioneller Gruppen am Phenyl- und Benzylrest sowie die Substitution durch Heteroaromaten auf die MDR modulatorische Aktivität untersucht werden (Abbildung 25). Dabei besitzen alle untersuchten Verbindungen einen symmetrischen Aufbau, da durch Voruntersuchungen gezeigt werden konnte, dass die Symmetrie der Verbindung eine deutliche Wirkverbesserung bringt, was vermutlich durch Bindung an eine P-gp Bindungsstelle mit C2-Pseudosymmetrie erklärbar ist [131].

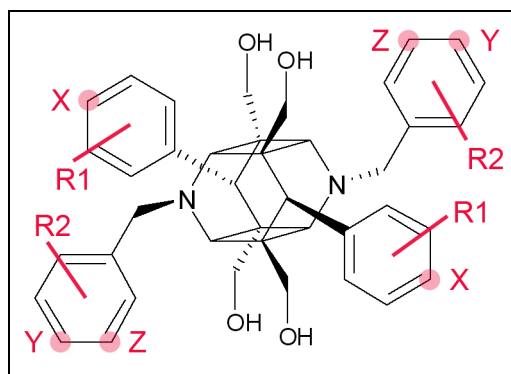


Abbildung 25: Leitstruktur und Substitution

Aber auch die Lipophilie der Verbindungen stellt eine wichtige Komponente für die Wechselwirkung mit hydrophoben Bereichen der Substrat-Bindungstasche dar und ist zudem entscheidend für die Membranpenetration der potentiellen MDR Modulatoren [52]. Aus diesem Grund wurden für die Struktur-Wirkungs-Beziehungen auch die logP-Werte (*n*-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient) der untersuchten Verbindungen betrachtet um einen möglichen Zusammenhang zwischen Lipophilie und inhibitorischer Wirkung zu ermitteln (Tabelle 18).

Ausgehend von dem käfigdimeren Dihydropyridin H17 führt die Substitution mit jeweils einer Methoxygruppe an den Benzylresten (JW41) zu keiner weiteren Steigerung der P-gp inhibitorischen Aktivität. Erfolgt hingegen eine zusätzliche Einführung der Methoxygruppen auch an den Phenylresten (JW33) so kann vor allem bei höheren Konzentrationen (10  $\mu$ M) eine bessere P-gp Hemmung im Vergleich zu H17 gefunden werden. Methoxygruppen als Wasserstoffbrückenakzeptoren scheinen damit eine wichtige Rolle für die P-gp Rezeptoraffinität einzunehmen. In Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen wird ebenfalls auf die Rolle von Methoxygruppen als Wasserstoffbrückenakzeptoren für Aminosäurereste des P-gp Proteingrundgerüsts hingewiesen [52,161,162]. Die Einführung der Methoxygruppen in das käfigdimere Grundgerüst bewirkt dabei keine Erhöhung der Lipophilie der Verbindungen, was im

Vergleich zu H17 durch den nahezu konstanten logP-Wert von 3,6 für JW33 ersichtlich wird (Tabelle 18). Damit ist die Steigerung der inhibitorischen Wirkung unter JW33 eindeutig auf die zusätzlichen Wechselwirkungen der Methoxygruppen an der P-gp Bindungsstelle zurückzuführen und nicht durch eine geänderte Membranpenetration bedingt. Um auch den Einfluss von funktionellen Gruppen mit Wasserstoffbrückendonator-Funktion zu untersuchen, erfolgte die Substitution mit Hydroxygruppen an den aromatischen Resten (JW53B, JW59, JW64A). Dabei bewirken die zusätzlichen Hydroxygruppen eine leichte Erniedrigung der Lipophilie der Verbindungen ( $\log P = 3$ ) und führen zu einem nahezu vollständigen Verlust der P-gp inhibitorischen Wirkung. Dabei ist es unerheblich, ob sich die Hydroxygruppen in para-Stellung (JW59) oder in meta-Stellung (JW53B) am Phenylrest befinden. Da es nur zu einem leichten Absenken der Lipophilie der Verbindungen gekommen ist, kann der Wirkverlust nicht durch eine verminderte Membranpenetration erklärt werden. Es scheint damit eindeutig, dass zusätzliche Hydroxygruppen als Wasserstoffbrückendonatoren nachteilig für die Wechselwirkungen mit den Aminosäuren des Proteingrundgerüsts sind. Im Vergleich dazu erzielen Benzyloxygruppen an den Phenyl- oder Benzylresten des käfigdimeren Grundgerüsts eine deutliche Wirkverbesserung. Die Einführung dieser lipophilen Gruppen in para-Stellung am Phenylrest (JW46) führt zu einer guten P-gp inhibitorischen Wirkung, welche bei 10  $\mu\text{M}$  mit der Wirkung von H17 vergleichbar ist. Erfolgt die Substitution in meta-Stellung (JW53A) kommt es zu einer deutlichen Steigerung der Bindungsaffinität. Mit einem FAR-Wert von 10,89 kann bei dieser Verbindung die beste inhibitorische Aktivität beobachtet werden, welche deutlich höher liegt als im Vergleich zur Kontrollsubstanz Tariquidar (FAR-Wert 7,42). Die Einführung von Benzyloxygruppen an den Benzylresten führt in para-Stellung (JW64B) zu einer guten inhibitorischen Wirkung, welche mit der Aktivität von JW46 vergleichbar ist. Auch hier erhöht sich die Affinität zur Bindungsstelle, wenn die Substitution in meta-Stellung (JW24) erfolgt. Allerdings wird bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  mit einem FAR-Wert von 6,45 keine so gute inhibitorische Wirkung wie mit JW53A erzielt. Die Lipophilie der Verbindungen wird durch die Einführung der Benzyloxygruppen mit logP-Werten von ungefähr 6,4 deutlich gesteigert. Aber auch hier ist die gute P-gp inhibitorische Wirkung nicht durch die verbesserte Membranpenetration bedingt. Dies wird bei Verbindung JW53A ersichtlich, welche im Vergleich zu Verbindung JW64B eine doppelt so starke P-gp Hemmung bei gleicher Lipophilie aufweist. Entscheidend ist eher die exakte Positionierung der lipophilen Reste, was durch Wechselwirkungen mit bestimmten hydrophoben Bereichen in der P-gp Bindungstasche erklärbar ist. Zu einem deutlichen Aktivitätsverlust führt jedoch die Substitution der Benzylreste mit Picolylgruppen (JW50, JW63). Dabei ist die Verbindung JW50 völlig inaktiv, während JW63 lediglich eine sehr schwache Hemmwirkung aufweist.

Überraschend ist die Erkenntnis, dass die P-gp inhibitorische Wirkung erhalten bleibt, wenn anstatt der Benzylreste die Phenylreste durch Pyridylgruppen ersetzt werden. Somit scheint ein Stickstoffatom in den Benzylresten zu einer deutlichen Erniedrigung der Rezeptoraffinität zu führen, während die Stickstoffsubstitution in den Phenylresten keine Auswirkung zeigt und in einer vergleichbaren Hemmwirkung wie bei H17 resultiert.

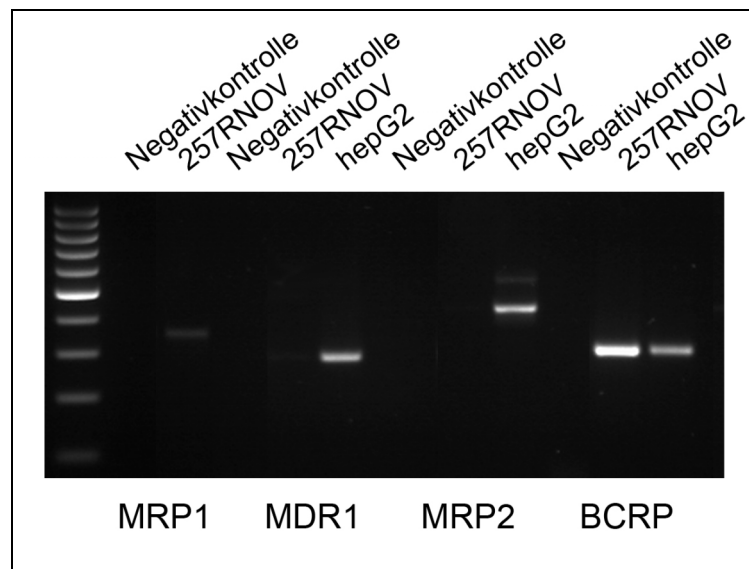
Verbindung	R1	R2	logP-Wert
H17	Phenyl	Phenyl	3,8 ± 0,3
JW41	Phenyl	4-Methoxyphenyl	3,6 ± 0,4
JW33	4-Methoxyphenyl	4-Methoxyphenyl	3,6 ± 0,6
JW46	4-Benzoyloxyphenyl	Phenyl	6,5 ± 1,0
JW24	Phenyl	3-Benzoyloxyphenyl	6,4 ± 1,0
JW50	Phenyl	3-Pyridyl	1,5 ± 0,4
JW53A	3-Benzoyloxyphenyl	Phenyl	6,4 ± 1,0
JW53B	3-Hydroxyphenyl	Phenyl	3,0 ± 0,2
JW59	4-Hydroxyphenyl	Phenyl	3,0 ± 0,2
JW63	Phenyl	4-Pyridyl	1,5 ± 0,4
JW64A	Phenyl	4-Hydroxyphenyl	3,0 ± 0,2
JW64B	Phenyl	4-Benzoyloxyphenyl	6,5 ± 1,0
JW65	4-Pyridyl	Phenyl	1,6 ± 0,3

**Tabelle 18: *n*-Oktanpol-Wasser-Verteilungskoeffizient der Verbindungen (logP-Wert)**

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die bisher bekannte gute P-gp inhibitorische Aktivität des käfigdimeren Dihydropyridins H17 weiter gesteigert werden kann. Dabei erhöhen lipophile Benzoyloxysubstituenten in meta-Stellung am Phenylrest die Bindungsaffinität am deutlichsten, während Substitutionen in para-Stellung oder am Benzylrest in einer gleich bleibenden Wirkstärke resultieren. Das Einbringen von hydrophilen Resten, wie Hydroxygruppen, führt zu einem nahezu völligen Verlust der Wirkaktivität und sollte für weitere Synthesevorhaben nicht mehr in Betracht gezogen werden.

### 3.6 BCRP Hemmung

Um weitere Informationen bezüglich der Transporterselectivität der käfigdimeren Dihydropyridine zu erhalten, sind ebenfalls Untersuchungen an BCRP exprimierenden Zellen (EPG85-257RNOV, Kapitel 2.2.3.3) durchgeführt worden. Dabei erfolgte die Kultivierung der Zellen mit dem bekannten Zytostatikum und BCRP Substrat Mitoxantron, wodurch eine konstante BCRP Expression sichergestellt werden konnte. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass andere Transporter wie P-gp, MRP1 und MRP2 nur äußerst gering in diesen Zellen exprimiert werden und damit keine Störfaktoren bei den Untersuchungen darstellen (Abbildung 26).



**Abbildung 26: Transporterscreening EPG85-257RNOV**

Die durch RT-PCR ermittelten Banden der Mitoxantron-resistenten EPG85-257RNOV Zellen zeigen eine äußerst schwache Expression des MRP1-Gens, keine Expression von MDR1 und des MRP2-Gens sowie eine starke Expression des für BCRP codierenden Genabschnitts. Als Positivkontrolle wurde die RNA von hepG2 Zellen verwendet.

Ein weiterer Vorteil in dem verwendeten Zellmodell ist die Tatsache, dass Mitoxantron als fluoreszierendes Substrat des BCRP Transporters fungiert und sich damit sehr gut für inhibitorische Untersuchungen im Durchflusszytometer anbietet. Als bekannter Inhibitor des BCRP eignet sich der schon im Kapitel 2.2.3.3 ausführlich beschriebene Naturstoff Fumitremorgin C. Analog den Untersuchungen auf P-gp Hemmung, kommt es bei BCRP inhibitorischen Effekten zu einer intrazellulären Akkumulation von Mitoxantron und damit zu einer verstärkten Fluoreszenzintensität der Zellen, was mit Hilfe eines Durchflusszytometers quantifiziert werden kann. Um das inhibitorische Potential der käfigdimeren Dihydropyridine zu bestimmen, wurden die Zellen mit unterschiedlichen

Substanzkonzentrationen inkubiert und anschließend die intrazelluläre Fluoreszenz bestimmt (Kapitel 2.2.3.3). In Tabelle 19 sind die Ergebnisse dargestellt.

Verbindung	FAR – Mittelwert $\pm$ SD	FAR – Mittelwert $\pm$ SD	FAR – Mittelwert $\pm$ SD
	0,1 $\mu$ M	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M
H17	1,13 $\pm$ 0,16	1,87 $\pm$ 0,17	7,04 $\pm$ 1,27
JW41	1,16 $\pm$ 0,22	3,20 $\pm$ 0,60	7,30 $\pm$ 1,21
JW33	1,45 $\pm$ 0,04	6,06 $\pm$ 1,66	8,25 $\pm$ 0,51
JW46	1,37 $\pm$ 0,29	3,47 $\pm$ 0,16	5,42 $\pm$ 0,86
Fumitremorgin C	1,91 $\pm$ 0,36	6,03 $\pm$ 1,06	6,86 $\pm$ 1,31
JW24	1,47 $\pm$ 0,12	4,18 $\pm$ 0,22	7,46 $\pm$ 0,81
JW50	n. B.	0,87 $\pm$ 0,14	0,89 $\pm$ 0,09
JW53A	1,30 $\pm$ 0,26	2,83 $\pm$ 0,30	6,01 $\pm$ 0,61
JW53B	n. B.	1,08 $\pm$ 0,15	2,96 $\pm$ 0,60
JW59	n. B.	1,04 $\pm$ 0,07	1,49 $\pm$ 0,16
JW63	n. B.	1,01 $\pm$ 0,01	1,33 $\pm$ 0,24
JW64A	n. B.	1,12 $\pm$ 0,08	1,96 $\pm$ 0,27
JW64B	n. B.	1,24 $\pm$ 0,11	3,30 $\pm$ 1,13
JW65	n. B.	1,24 $\pm$ 0,05	4,02 $\pm$ 1,51
<b>FAR – Mittelwert <math>\pm</math> SD</b>			
DMSO 1 %	0,96 $\pm$ 0,22		

**Tabelle 19: FAR-Werte zur Bestimmung der BCRP-inhibitorischen Aktivität**

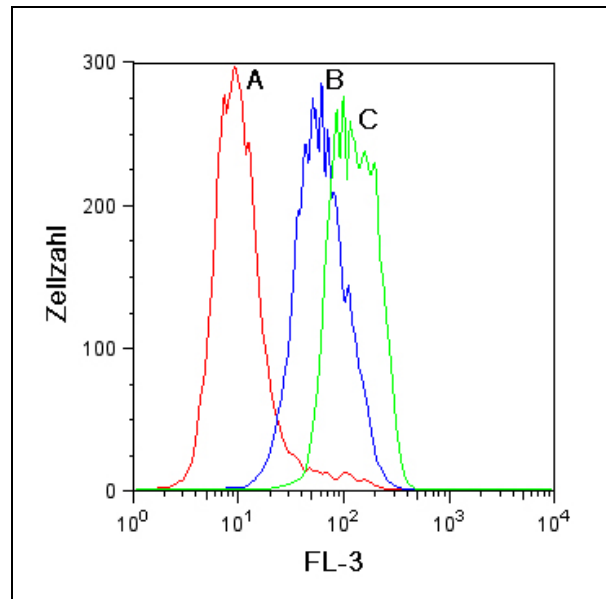
Für jede Zellprobe wurde nach der Zellinkubation mit verschiedenen Konzentrationen der Testverbindungen die Intensität der intrazellulären Fluoreszenz von Mitoxantron im Durchflusszytometer bestimmt und das Verhältnis von behandelter Probe zur unbehandelten Kontrolle gebildet (FAR-Wert). Bei Werten größer 1 kann von einer inhibitorischen Aktivität der getesteten Verbindung ausgegangen werden. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen (SD) von 3 unabhängigen Versuchen. (n. B. = nicht bestimmt)

Alle getesteten Verbindungen wurden mit einer finalen Lösungsmittelkonzentration von 1 % DMSO untersucht. Um Lösungsmittelleffekte auszuschließen, wurde eine 1 % DMSO Kontrolle verwendet, welche jedoch mit einem FAR-Wert von 0,96 keinen Einfluss auf die Transportaktivität des BCRP ausübt. Betrachtet man das käfigdimere 1,4-Dihydropyridin H17, so wurde vor allem bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M ein BCRP hemmender Effekt

(FAR-Wert = 7,04) beobachtet. In niedriger Konzentration zeigte sich ein nur schwaches inhibitorisches Potential. Ähnliche Aktivitäten zeigten auch die Verbindungen JW41, JW33, JW46 und JW53A, wobei die Verbindung JW33 bereits bei 1  $\mu$ M (FAR-Wert = 6,06) einen modulatorischen Effekt in Höhe der Vergleichssubstanz Fumitremorgin C aufweist. Bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M JW33 wurde mit einem FAR-Wert von 8,25 die stärkste Hemmwirkung auf die Transportaktivität des BCRP erzielt. Damit ist die inhibitorische Aktivität der Verbindung JW33 sogar besser als die Positivkontrolle Fumitremorgin C, welche für eine gute BCRP Hemmung bekannt ist. Weiterhin erzielte die Verbindung JW24 mit einem maximalen FAR-Wert von 7,46 eine gute modulatorische Wirkung, welche ebenfalls besser als die des Fumitremorgin C ist. Dagegen konnte bei den Verbindungen JW50, JW53B, JW59, JW63 und JW64A nur eine sehr schwache oder gar keine Wirkung gemessen werden. Und auch die käfigdimeren Verbindungen JW64B und JW65 zeigten nicht ganz so gute Hemmeffekte wie die als Leitstruktur fungierende Verbindung H17.

### 3.6.1 Struktur-Wirkungs-Beziehung

Für alle in der Arbeitsgruppe synthetisierten Verbindungen lagen bislang keine Daten zur modulatorischen Wirkung auf das BCRP vor. Umso erstaunlicher ist die Erkenntnis, dass bereits das käfigdimere Dihydropyridin H17 eine gute Hemmwirkung aufweist. Die Einführung von Methoxygruppen an den Benzylresten (JW41) führt dabei zu einer Wirkverstärkung. Werden auch an den Phenylresten Methoxygruppen substituiert (JW33), kann die BCRP inhibitorische Wirkung noch erhöht werden. Zu einer verminderten Bindungsstellenaffinität führt dagegen die Substitution von Hydroxygruppen an den Phenyl- oder Benzylresten (JW53B, JW59, JW64A). Somit zeigen hydrophile Reste, ähnlich den Ergebnissen der P-gp Hemmung, eine verminderte Affinität zur Substratbindungsregion wodurch die Aktivität des Membrantransporters erhalten bleibt. Voluminösere Substituenten, wie Benzyloxygruppen (JW46, JW64B, JW53A, JW24) führen zu einer guten Hemmwirkung. Vor allem die Einführung in meta-Stellung an den Benzylresten (JW24) zeigt schon bei der niedrigen Konzentration von 1  $\mu$ M sehr gute BCRP inhibitorische Effekte (Abbildung 27). Weiterhin wurde der Einfluss von Heteroaromaten durch das Einbringen von Picolylresten und Pyridylresten untersucht. Dabei kommt es durch Einführung eines Stickstoffs am Benzylrest (Picolylgruppe) zu einer fast vollständigen Aufhebung der Rezeptoraffinität (JW50, JW63). Auch die Pyridylreste führen nur zu einer schwachen inhibitorischen Wirkung (JW65), so dass insgesamt betrachtet ein als Wasserstoffbrückenakzeptor fungierender Stickstoff nachteilige Effekte auf die Affinität zur BCRP-Bindungsstelle ausübt und keine Steigerung der inhibitorischen Aktivität bewirkt.



**Abbildung 27: Steigerung der intrazellulären Fluoreszenz nach BCRP Hemmung**

Deutlich erkennbar ist der im Durchflusszytometer gemessene Fluoreszenzshift zwischen den unbehandelten Zellen (A) und den mit 1  $\mu\text{M}$  JW24 (B) oder 10  $\mu\text{M}$  JW24 (C) vorbehandelten Zellen. Die Hemmung des BCRP bewirkt eine intrazelluläre Akkumulation von Mitoxantron.

Für die Bindungsaffinität zum BCRP scheinen Strukturmerkmale, wie Methoxygruppen und Benzyloxygruppen günstig zu sein. Dabei ist vorstellbar, dass die Methoxygruppen über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Proteingrundgerüst des BCRP interagieren während die lipophilen Benzyloxygruppen Wechselwirkungen mit hydrophoben Kavitäten der Bindungsstelle eingehen. Bei den untersuchten käfigdimeren Dihydropyridinen führen hydrophile Substituenten und die Substitution mit Heteroaromaten dagegen jeweils zu einer Wirkverschlechterung.

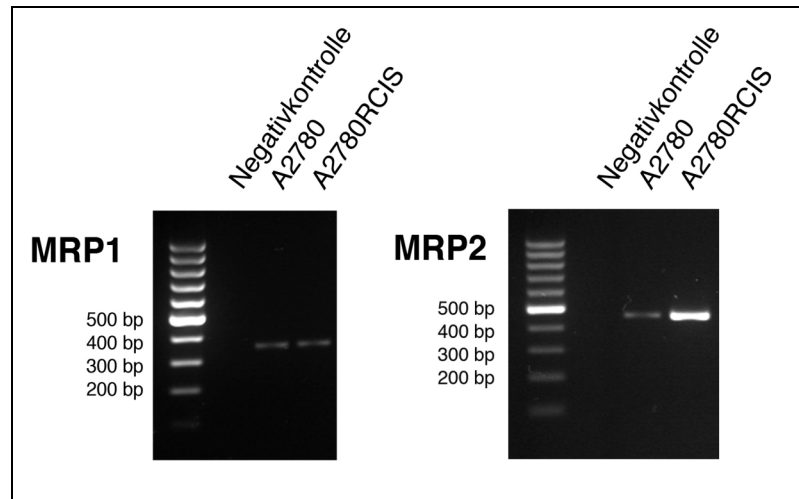
Im Vergleich mit den Ergebnissen der P-gp Hemmung wird deutlich, dass die käfigdimeren Dihydropyridine ein ähnliches inhibitorisches Potential gegenüber P-gp und BCRP besitzen. Dies wurde schon bei den als P-gp Hemmer bekannten Verbindungen Tariquidar, Elacridar und Cyclosporin A festgestellt, welche auch eine sehr gute BCRP hemmende Wirkung aufweisen [157]. Dieses „duale“ Wirkprinzip der käfigdimeren Dihydropyridine kann als äußerst positiv bewertet werden, da viele Arzneistoffe nicht nur P-gp Substrate sind, sondern auch alternativ über das BCRP transportiert werden können.

### 3.7 MRP1 und MRP2 Hemmung

Da neben dem P-Glykoprotein auch die Membrantransporter MRP1 (ABCC1) und MRP2 (ABCC2) für die Ausprägung der MDR verantwortlich sind, sollten weitere Untersuchungen an diesen Vertretern der ABCC Transporterfamilie durchgeführt werden. Wichtig war dabei die Fragestellung, ob die käfigdimeren Dihydropyridine neben der bekannten P-gp modulatorischen Aktivität auch diese Membrantransporter hinsichtlich ihrer Effluxaktivität beeinflussen können. Im Vergleich zum P-gp besitzen die Vertreter der ABCC Familie 5 zusätzliche transmembranäre  $\alpha$ -helikale Domänen und transportieren primär konjugierte, organische Anionen (Kapitel 1.2.2). Jedoch lassen sich auch viele Krebschemotherapeutika als Substrate finden. Das in zahlreichen Therapien eingesetzte Zytostatikum Doxorubicin wird als Substrat des MRP1 beschrieben und die Expression von MRP2 korreliert unter anderem mit der Ausbildung einer Cisplatinresistenz [54,58]. Eine gezielte Hemmung der Transporter würde vor allem als Begleitmedikation bei Arzneistoffen mit MRP Substrateigenschaften eine sinnvolle Ergänzung zur Arzneimitteltherapie darstellen. Als Zellmodell für die Untersuchungen wurde die Ovarialkarzinomlinie A2780 verwendet, welche sich durch eine MRP1 Expression auszeichnet. Zusätzlich stand eine Cisplatin-resistente Sublinie zur Verfügung, welche eine starke MRP2 Expression aufweist. Die Expression der Transporter wurde durch eine RT-PCR überprüft und ist in Abbildung 28 dargestellt. Dabei ist gut die ausgeprägte Überexpression des MRP2-Gens bei den A2780RCIS Zellen erkennbar, welche durch die Exposition der Zellen mit 1 % Cisplatin hervorgerufen wird und eine Steigerung des IC50 für Cisplatin um den Faktor 16 bewirkt [121]. Diese sehr geringe Sensitivität der Cisplatin-resistenten Zellen konnte ebenfalls im MTT-Assay bestätigt werden (Abbildung 29). Es zeigten sich erst nach längerer Exposition mit Cisplatin bei sehr hohen Konzentrationen vitalitätsbeeinflussende Effekte.

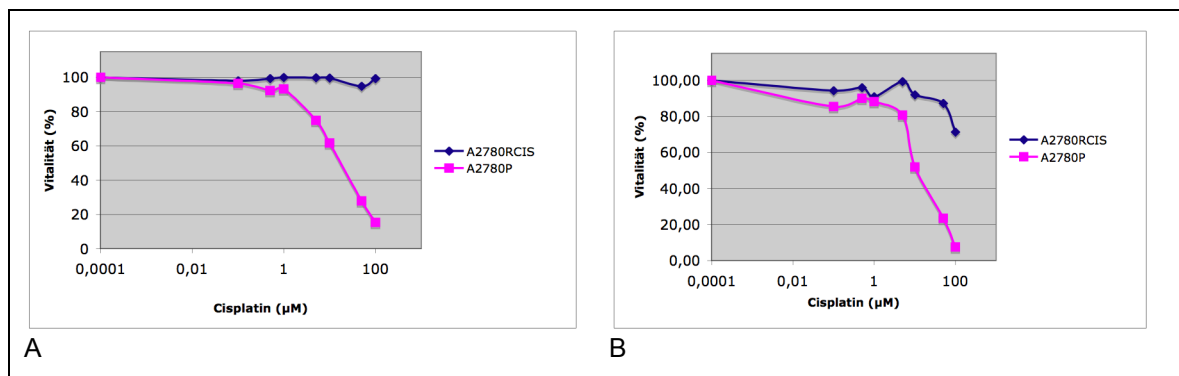
Um das inhibitorische Potential der käfigdimeren Dihydropyridine zu bestimmen, wurde das MRP1 und MRP2 spezifische Substrat Carboxyfluorescein (CBF) verwendet (Kapitel 2.2.3.2). Als Diacetat eingesetzt, wird es während der Zellinkubation von zellulären Esterasen gespalten und das fluoreszierende CBF freigesetzt. In Abhängigkeit der inhibitorischen Aktivität der Substanzen wurde nun der Anteil an intrazellulärem CBF durch die Verwendung eines Durchflusszytometers quantifiziert.





**Abbildung 28: MRP1 und MRP2 Expression in A2780 Zellen**

Die Ovarialkarzinomzelllinie A2780 zeichnet sich durch eine MRP1 Expression aus, welche mit Hilfe der RT-PCR in der Abbildung links dargestellt ist. Durch Exposition mit dem Zytostatikum Cisplatin entwickelt die Zelllinie eine Resistenz, welche durch die Überexpression von MRP2 hervorgerufen wird und im rechten Bild deutlich erkennbar ist (A2780RCIS).



**Abbildung 29: Zytotoxizität von Cisplatin auf A2780 und A2780RCIS Zellen**

Die im MTT-Test durch Cisplatin ermittelte Toxizität ist für die A2780P Zellen und die Cisplatin-resistenten A2780RCIS Zellen dargestellt. Als Inkubationszeit wurde ein Zeitraum von 48 h (A) und 96 h (B) gewählt. Sehr gut zu erkennen ist die deutlich höhere Sensitivität der parentalen Zelllinie, welche im Gegensatz zur Cisplatin-resistenten Linie nur sehr geringe MRP2-Mengen aufweist. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte einer Doppelmessung.

Für die Untersuchung auf das MRP1 inhibitorische Potential sind die Ergebnisse in Tabelle 20 dargestellt. Dabei wurden die Fluoreszenzwerte im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle betrachtet und als FAR-Werte dargestellt. Für die Lösungsmittelkontrolle mit 1 % DMSO ergaben sich mit einem FAR-Wert von 0,96 keine Effekte auf die MRP1 Transporteraktivität. Als Positivkontrolle wurde der bekannte MRP1 Inhibitor Indomethacin verwendet [97]. Bei einer Konzentration von 1 µM zeigten sich nur schwache inhibitorische Effekte (FAR-Wert = 1,16), welche aber deutlich stärker ausgeprägt waren bei der Verwendung von 10 µM Indomethacin (FAR-Wert = 4,22). Da in

der Literatur auch deutlich höhere Konzentrationen an Indomethacin verwendet werden, wurde auch eine 100  $\mu\text{M}$  Konzentration untersucht, was in einer knapp 10-fach höheren Akkumulation an CBF resultierte. Bei den untersuchten käfigdimeren Dihydropyridinen zeigte sich bei allen Verbindungen keine inhibitorische Aktivität bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$ . Erst die höhere Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zeigte Unterschiede in der MRP1 Transporterhemmung. Für die Verbindung H17 ergab sich dabei mit einem FAR-Wert von 2,31 nur eine schwache Hemmung des Membrantransporters. Eine bessere Hemmwirkung wurde für JW41 (FAR-Wert = 3,33) und JW33 (FAR-Wert = 4,96) beobachtet, während JW46 auch in höherer Konzentration keine Inhibition auf die MRP1 Aktivität ausübte. Weiterhin zeigten die Verbindungen JW24 (FAR-Wert = 2,83), JW53A (FAR-Wert = 1,87), JW59 (FAR-Wert = 1,78), JW64A (FAR-Wert = 1,63), JW64B (FAR-Wert = 2,61) und JW65 (FAR-Wert = 2,29) eine schwache bis mäßige inhibitorische Aktivität. Für die Verbindungen JW50, JW53B und JW63 konnte hingegen keine hemmende Wirkung auf die Funktion von MRP1 nachgewiesen werden.

Die sich nun anschließende Untersuchung mit den A2780RCIS Zellen sollte Aufschluß über die Beeinflussung der MRP2 Aktivität geben (Tabelle 21). Dabei trat jedoch die Besonderheit auf, dass die MRP2 überexprimierenden Zellen A2780RCIS auch das parentale MRP1 Protein exprimieren, welches für die Bestimmung der MRP1 Aktivität in den A2780P Zellen als Basis für die Messung diente. Um jeweils spezifische Aussagen treffen zu können, welcher Transporter einer Hemmung unterlag, wurden die erhaltenen FAR-Werte durch die FAR-Werte der MRP1 Messung dividiert. Die dadurch erhaltenen Quotienten (Tabelle 21) spiegeln bei Werten deutlich  $> 1$  eine fehlende MRP2 Hemmung bei gleichzeitiger MRP1 Hemmung wider. Ergibt der Quotient hingegen Werte, welche deutlich  $< 1$  sind, so liegt eine MRP2 Hemmung und eine fehlende MRP1 Hemmung vor. Bei Quotienten-Werten von ungefähr 1 werden entweder die Transporter MRP1 und MRP2 überhaupt nicht gehemmt oder für beide Transporter liegt eine Hemmung in annähernd gleicher Stärke vor. Dies kann unter Berücksichtigung der erhaltenen MRP1 Hemmdaten (Tabelle 20) eindeutig für jede untersuchte Substanz entschieden werden und ist in Tabelle 21 ersichtlich.

Für die DMSO Kontrollmessung ergab sich dabei wie erwartet keine Beeinflussung der MRP2 Transporteraktivität. Auch für den überwiegenden Teil der untersuchten Substanzen ist bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  kein Effekt nachweisbar. Erst bei der höheren Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  sind MRP2 hemmende Aktivitäten von einigen käfigdimeren Dihydropyridinen messbar. Die Verbindung H17 hemmt den MRP2 Transporter ungefähr in gleicher Höhe wie den MRP1 Transporter (Quotient = 0,98). Die Substitution mit 2 Methoxygruppen (JW41) sowie mit 4 Methoxygruppen (JW33) führt zu

einer weiteren Steigerung der MRP2 Hemmung. Dabei ist im Vergleich zum MRP1 eine stärkere Hemmung von MRP2 vorhanden, was durch die Quotienten-Werte von 0,88 und 0,81 ersichtlich wird. Von den restlichen untersuchten Substanzen ist lediglich für die Verbindungen JW24 und JW53A eine schwache MRP2 Hemmaktivität gemessen worden. Erstaunlich ist, dass Indomethacin (10  $\mu\text{M}$ ) mit einer guten MRP1 Hemmung (FAR = 4,22) keinen nennenswerten Hemmeffekt auf die MRP2 Transporter der Ovarialkarzinomzellen ausübt (Quotient = 0,36). Vermutlich ist die untersuchte Konzentration an Indomethacin zu gering um auch an der MRP2 überexprimierten A2780RCIS Linie eine vollständige Transporterhemmung zu bewirken. Erst der Einsatz hoher Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ ) zeigt mit einem FAR-Wert von 7,89 eine deutlich Akkumulation des Carboxyfluoresceins und damit eine sehr gute Hemmung der MRP1 und MRP2 Transporteraktivität.

### 3.7.1 Struktur-Wirkungs-Beziehung

Ein MRP1 inhibitorischer Effekt kann bei allen Verbindungen nur bei einer eingesetzten Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  beobachtet werden. Auch die Kontrollsubstanz Indomethacin zeigt erst in hohen Konzentrationen eine deutliche Hemmung des MRP1. Betrachtet man das Ausgangsderivat H17 so lässt sich ein leichte modulatorische Aktivität erkennen. Bei der Substitution mit 2 Methoxygruppen (JW41) kommt es zu einer Verbesserung der MRP1 Inhibition, welche durch 2 zusätzliche Methoxygruppen an den Phenylresten (JW33) weiter gesteigert werden kann. Damit scheinen Methoxygruppen als Wasserstoffbrückenakzeptoren wichtig zu sein für Wechselwirkung mit den Aminosäureresten der MRP1 Bindungsstelle. Die mit einer Benzyloxygruppe symmetrisch substituierten Verbindungen (JW46, JW64B, JW53A, JW24), welche eine sehr gute P-gp und BCRP Hemmung aufweisen, zeigen hingegen keine oder nur eine leichte Beeinflussung der MRP1 Transporteraktivität. Dabei werden bei den Verbindungen JW24 und JW64B, welche jeweils eine Benzyloxygruppe an den Benzylresten aufweisen, bessere Hemmwirkungen erzielt als bei den Benzyloxyresten an den Phenylresten (JW46, JW53A). Im Vergleich zu den P-gp inhibitorischen Aktivitäten der Substanzen, welche durch die Substitution mit lipophilen Benzyloxygruppen eine deutliche Steigerung der P-gp Rezeptoraffinität zeigten, kann von einer deutlich geringeren Lipophilie der MRP1 Bindungsregion ausgegangen werden, da hier nur sehr schwache Rezeptoraffinitäten durch die Benzyloxygruppen erreicht werden. Somit kann die Substitution mit Benzyloxygruppen als ein wichtiges strukturelles Merkmal angesehen werden, um eine ausgeprägte P-gp Hemmung bei minimaler MRP1- Aktivitätsbeeinflussung zu erzielen. Die jeweils am Phenylrest (JW59, JW53B) und Benzylrest (JW64A) eingeführte Hydroxygruppe weist nur eine geringe Affinität zur Bindungsstelle auf, was in einer maximalen Fluoreszenzsteigerung von 1,78 resultiert. Ebenfalls nur geringe Auswirkungen auf die Transporteraktivität zeigen die käfigdimeren Dihydropyridine mit

einem Heteroaromaten. Dabei zeigt die Verbindung JW65 mit 2 Pyridylgruppen eine leichte modulatorische Aktivität während die Verbindungen mit 2 Picolygruppen (JW50, JW63) keine Hemmwirkung auf die MRP1-Transporterfunktion aufweisen.

Verbindung	FAR – Mittelwert ± SD	FAR – Mittelwert ± SD	Inhibition von MRP1
	1 µM	10 µM	10 µM
H17	1,05 ± 0,09	2,31 ± 0,33	+
JW41	1,05 ± 0,11	3,33 ± 0,63	++
JW33	1,24 ± 0,26	4,96 ± 0,86	++
JW46	1,07 ± 0,10	1,11 ± 0,28	---
JW24	1,06 ± 0,05	2,83 ± 0,68	+
JW50	1,03 ± 0,13	1,11 ± 0,14	---
JW53A	1,13 ± 0,07	1,87 ± 0,53	+
JW53B	0,99 ± 0,05	1,28 ± 0,26	---
JW59	1,01 ± 0,04	1,78 ± 0,59	+
JW63	0,99 ± 0,03	1,17 ± 0,20	---
JW64A	1,02 ± 0,11	1,63 ± 0,34	+
JW64B	1,08 ± 0,04	2,61 ± 0,56	+
JW65	1,06 ± 0,15	2,29 ± 0,59	+
MK571	1,03 ± 0,07	1,67 ± 0,09	+
<b>FAR – Mittelwert ± SD</b>			
DMSO 1 %		0,96 ± 0,06	---
Indomethacin 1 µM		1,16 ± 0,11	---
Indomethacin 10 µM		4,22 ± 3,87	++
Indomethacin 100 µM		9,73 ± 3,17	+++

**Tabelle 20: FAR-Werte zur Bestimmung der MRP1-inhibitorischen Aktivität**

Für jede Zellprobe wurde nach der Zellinkubation mit verschiedenen Konzentrationen der Testverbindungen die Intensität der intrazellulären Fluoreszenz von Carboxyfluorescein im Durchflusszytometer bestimmt und das Verhältnis von behandelter Probe zur unbehandelten Kontrolle gebildet (FAR-Wert). Bei Werten größer 1 kann von einer inhibitorischen Aktivität der getesteten Verbindung ausgegangen werden. Für die Auswertung der inhibitorischen Aktivität wurde nur die höhere Substanzkonzentration von 10 µM berücksichtigt (hellgrauer Hintergrund). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen (SD) von 3 unabhängigen Versuchen. (--- keine Hemmung, + schwache Hemmung, ++ mittlere Hemmung, +++ starke Hemmung)

Die Ergebnisse der MRP2 Hemmung ergeben für die mit Methoxygruppen substituierten Verbindungen (H17, JW41, JW33) ein vergleichbares Resultat im Vergleich zur MRP1 Hemmung. Auch hier kommt es mit zunehmender Substitution von Methoxygruppen zu einer Steigerung der inhibitorischen Aktivität. Damit sind die Wasserstoffbrückenakzeptorfunktionen ebenfalls ein wichtiges strukturelles Merkmal für die Wechselwirkung mit der MRP2 Bindungsregion. Die Derivate mit Benzylgruppen (JW24, JW46, JW53A, JW64B) zeigen im Vergleich zur MRP1 Hemmung bis auf Verbindung JW46 eine noch schwächere MRP2 Hemmung. Dies ist gut am ermittelten Quotienten bei JW64B ersichtlich, welcher mit einem Wert von 0,69 deutlich unterhalb von 1 liegt und keine inhibitorische Wirkung auf den MRP2 Transporter erzielt. Die weiteren untersuchten Verbindungen mit Hydroxygruppen oder aromatischen Resten konnten ebenso keine Hemmung der Transportaktivität von MRP2 bewirken.

Damit ergibt sich ein ähnliches Bild der modulatorischen Aktivität der Verbindungen bezüglich der Membrantransporter MRP1 und MRP2. Eine steigende Anzahl von Methoxygruppen als Wasserstoffbrückenakzeptoren führt zu einer Verstärkung der hemmenden Wirkung, während insbesondere lipophile Benzyloxygruppen aber auch Hydroxyfunktionen, Pyridyl- und Picolylreste keine ausgeprägte inhibitorische Aktivität erzielen. Als entscheidender Unterscheid zu den Ergebnissen der P-gp Hemmung kann dabei die Bedeutung der Benzyloxyreste angesehen werden. Diese führen insbesondere bei Verbindung JW53A zu einer starken P-gp Hemmung, während diese lipophilen Gruppen nur eine sehr geringe Bedeutung für die Rezeptoraffinität von MRP1 und MRP2 spielen. Damit sind die Benzyloxy-substituierten Verbindungen Inhibitoren, welche selektiv die Funktion des P-gp unterbinden, ohne dabei die Transporter MRP1 und MRP2 zu beeinflussen.

Verbindung	FAR – Mittelwert	FAR – Mittelwert	Quotient zu	Quotient zu	Inhibition von MRP2
	± SD	± SD	FAR-MRP1	FAR-MRP1	
	1 µM	10 µM	1 µM	10 µM	
H17	1,13 ± 0,02	2,35 ± 0,64	1,08	1,02	+
JW41	1,10 ± 0,08	3,78 ± 1,23	1,05	1,14	++
JW33	1,11 ± 0,02	6,15 ± 2,25	0,89	1,24	++
JW46	1,02 ± 0,07	1,50 ± 0,30	0,96	1,35	+
JW24	1,11 ± 0,06	2,59 ± 0,60	1,05	0,92	+
JW50	1,06 ± 0,09	0,98 ± 0,21	1,03	0,88	---
JW53A	1,04 ± 0,01	1,73 ± 0,26	0,91	0,93	+
JW53B	0,90 ± 0,07	1,26 ± 0,26	0,91	0,99	---
JW59	1,06 ± 0,23	1,06 ± 0,22	1,05	0,59	---
JW63	1,09 ± 0,33	0,93 ± 0,25	1,10	0,79	---
JW64A	1,04 ± 0,29	1,29 ± 0,26	1,01	0,79	---
JW64B	1,10 ± 0,24	1,80 ± 0,44	1,02	0,69	---
JW65	1,00 ± 0,24	1,49 ± 0,31	0,94	0,65	---
	FAR – Mittelwert ± SD		Quotient zu FAR-MRP1		
DMSO 1 %	0,99 ± 0,04		1,03		---
Indomethacin 1 µM	1,13 ± 0,10		0,97		---
Indomethacin 10 µM	1,51 ± 0,15		0,36		---
Indomethacin 100 µM	7,88 ± 0,94		0,81		+++

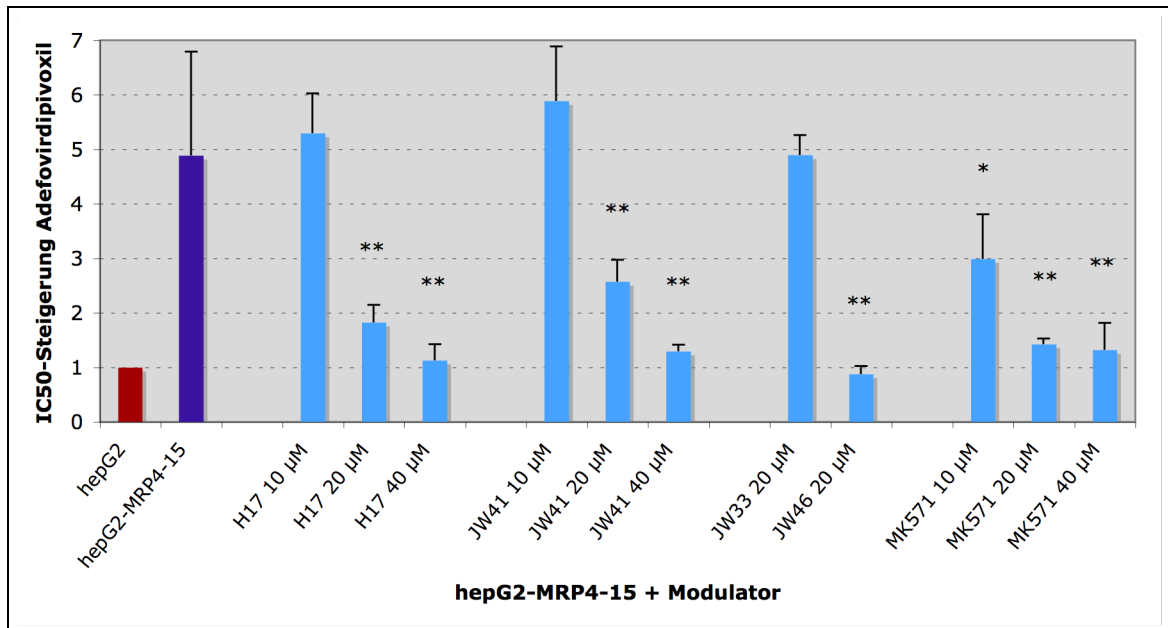
**Tabelle 21: FAR-Werte zur Bestimmung der MRP2-inhibitorischen Aktivität**

Für jede Zellprobe wurde nach der Zellinkubation mit verschiedenen Konzentrationen der Testverbindungen die Intensität der intrazellulären Fluoreszenz von Carboxyfluorescein im Durchflusszytometer bestimmt und das Verhältnis von behandelter Probe zur unbehandelten Kontrolle gebildet (FAR-Wert). Bei Werten größer 1 kann von einer inhibitorischen Aktivität der getesteten Verbindung ausgegangen werden. Um Effekte durch den ebenfalls vorhandenen MRP1 Transporter auszuschließen, wurden die in dieser Messung erhaltenen FAR-Werte durch die FAR-Werte der MRP1-Hemmung (Tabelle 20) dividiert und so die MRP2 spezifischen Hemmungen erhalten. Der Quotient ergibt bei Werten deutlich < 1 eine MRP1 spezifische Hemmung und keine MRP2-Hemmung. Bei Werten deutlich > 1 liegt eine MRP2 spezifische Hemmung vor und keine MRP1-Hemmung. Ergibt der Quotient einen Wert von ungefähr 1 so liegt im Fall einer MRP1 Hemmung auch eine MRP2 Hemmung in annähernd gleicher Höhe vor. Wird hingegen der MRP1 Transporter nicht gehemmt, so ergibt sich auch keine MRP2 Hemmung. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen (SD) von 3 unabhängigen Versuchen. (--- keine Hemmung, + schwache Hemmung, ++ mittlere Hemmung, +++ starke Hemmung)

### 3.8 MRP4 Hemmung

Der Membrantransporter MRP4 spielt eine zunehmende Bedeutung, vor allem in der Resistenzentstehung von HIV-Therapeutika [158]. Da unter physiologischen Bedingungen Nukleosidanaloga wie cAMP mit Hilfe des MRP4 transportiert werden ist es nicht überraschend, dass auch antivirale Arzneistoffe wie Zidovudin und Adefovirdipivoxil, welche ebenfalls ein Nukleosidgrundgerüst aufweisen, durch das Membranprotein zurück in den Extrazellularraum geschleust werden [63,64,158]. In *in vitro* Untersuchungen an der T-Lymphomzelllinie CEM-r1 konnte eine Resistenz gegenüber Zidovudin und Adefovirdipivoxil durch den Anstieg der mRNA und Proteinmenge von MRP4 beobachtet werden [158]. Um die Bedeutung des Transporters MRP4 weiter zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein Zellmodell etabliert, welches eine Überexpression des Transporters aufweist (Kapitel 2.2.7). Somit sind Untersuchungen von Testsubstanzen auf die Aktivität des MRP4 Membrantransporters möglich. Da für die inhibitorischen Testungen von MRP4 derzeit kein fluoreszierendes Substrat bekannt ist, konnten die Untersuchungen nicht wie beim P-gp, BCRP oder MRP am Durchflusszytometer durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurde die Toxizität des MRP4 Substrats Adefovirdipivoxil gegenüber hepG2 Zellen und den durch Transfektion des MRP4-Gens erhaltenen hepG2-MRP4-15 Zellen untersucht (Kapitel 3.4.4). Dabei lässt sich für die transfizierten Zellen ein 5- bis 10-fach höherer IC<sub>50</sub>-Wert von Adefovirdipivoxil nachweisen (Kapitel 3.4.5.2). Da diese Resistenz eindeutig MRP4 vermittelt ist, wird bei einer erfolgreichen MRP4 Hemmung in den transfizierten Zellen eine Resensitivierung gegenüber Adefovirdipivoxil stattfinden und der IC<sub>50</sub>-Wert wieder auf das Niveau der parentalen hepG2-Zellen absinken. Da die dimeren 1,4-Dihydropyridine ursprünglich auch als HIV-1 Proteaseinhibitor entwickelt wurden, ist ein interessanter Doppelleffekt aus MRP4- und Protease-Hemmung denkbar. Jedoch muss man untersuchen inwieweit die bestmögliche Hemmung für jedes Target durch die Verwendung von nur einem Wirkstoff realisiert werden kann.

Für die Untersuchungen wurde die Zellen mit Adefovirdipivoxil in einem Konzentrationsbereich von 250 µM bis 0,001 µM für 48 h inkubiert (Kapitel 2.2.2.1). Zusätzlich wurden die Modulatoren H17, JW41, JW33 und JW46 in verschiedenen Konzentrationen zu den Zellen gegeben, um diese auf eine MRP4-hemmende Wirkung zu untersuchen. Als Kontrolle diente der bekannte Leukotrien-Rezeptorantagonist und MRP4 Hemmer MK-571 [153]. Nach der photometrischen Auswertung erfolgte die Berechnung des IC<sub>50</sub>-Werts durch eine sigmoide Kurvenanalyse. Für die unbehandelten Kontrollzellen wurde der IC<sub>50</sub> auf den Wert 1,00 nivelliert und die weiteren IC<sub>50</sub>-Werte dazu im Verhältnis betrachtet.



**Abbildung 30: Resistenzaufhebung von Adefovirdipivoxil**

Die durch den MTT-Test ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte für Adefovirdipivoxil sind im Verhältnis zu den unbehandelten hepG2-Zellen (rot) dargestellt. Die MRP4 transfizierten hepG2-MRP4-15 Zellen haben einen deutlich höheren IC<sub>50</sub>-Wert (dunkelblau). Werden diese Zellen nun mit einem Modulator behandelt (hellblau), so ist konzentrationsabhängig ein Absinken des IC<sub>50</sub> auf den Kontrollwert (rot) zu beobachten, was einer Aufhebung der durch MRP4-Überexpression bedingten Resistenz gegenüber Adefovirdipivoxil entspricht. Als Kontrolle wurde MK-571 verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte + S.D. von 3 unabhängigen Versuchen sowie die Signifikanz für  $P < 0,01$  (\*\*) und  $P < 0,05$  (\*) im Vergleich zu den unbehandelten hepG2-MRP4-15 Zellen (dunkelblau).

In Abbildung 30 sind die Ergebnisse der Untersuchungen dargestellt. Der IC<sub>50</sub> von Adefovirdipivoxil ergibt bei den transfizierten hepG2-MRP4-15 Zellen einen 5-fach höheren Wert als bei den nicht-transfizierten, parentalen hepG2-Zellen. Die transfizierten Zellen sind somit in der Lage, die Toxizität von Adefovirdipivoxil durch den aktiven MRP4-vermittelten Transport in den Extrazellularraum zu senken, was in einem höheren IC<sub>50</sub>-Wert resultiert. Auch unter Verwendung von H17 und JW41 (10 µM) sowie für JW33 (20 µM) lässt sich dieser erhöhte IC<sub>50</sub>-Wert beobachten. Damit zeigen die Modulatoren in dieser Konzentration noch keinen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität des MRP4 Transporters. Erst ab höheren Konzentrationen sinken die IC<sub>50</sub>-Werte für Adefovirdipivoxil signifikant und erreichen nahezu den Wert wie bei den nicht-transfizierten hepG2-Zellen. Für H17 und JW41 zeigt sich dies bei einer Konzentration von 40 µM und für JW46 sogar schon bei 20 µM. Für JW33 konnte hingegen keine signifikante Erniedrigung des IC<sub>50</sub>-Werts gemessen werden. Höhere Konzentrationen der Modulatoren konnten nicht untersucht werden, da beginnende toxische Effekte der Modulatoren die exakte Ermittlung der Adefovirdipivoxil-Toxizität behindern. Die Positivkontrolle MK-571 zeigt schon bei 10 µM einen deutlichen MRP4-hemmenden



Effekt, was durch ein Absinken des IC<sub>50</sub>-Werts von Adefovirdipivoxil deutlich wird. Eine Aufhebung der MRP4-vermittelten Resistenz kann bei ungefähr 20 µM beobachtet werden. Unter Verwendung von 40 µM kann erwartungsgemäß kein weiteres Absinken des IC<sub>50</sub>-Werts mehr erzielt werden, da eine maximale Hemmung von MRP4 durch MK571 erreicht ist.

Die ersten wissenschaftlichen Untersuchungen mit der neu etablierten Zelllinie hepG2-MRP4-15 können als äußerst positiv bewertet werden. So kann eine Resistenzsteigerung gegenüber dem MRP4 Substrat Adefovirdipivoxil im Vergleich zur Parentalzelllinie beobachtet werden und diese Resistenz durch gezielte Hemmung wieder aufgehoben werden. Dies lässt sich sehr gut bei der Verwendung des bekannten MRP4-Inhibitors MK571 beobachten. Bei einer Konzentration von 10 µM zeigen sich deutliche Hemmeffekte auf die Aktivität des Membrantransporters. Für die untersuchten Vertreter der dimeren 1,4-Dihydropyridine lässt sich bei dieser Konzentration noch kein Effekt nachweisen. Erst ab höheren Konzentrationen (20 µM) zeigen sich bei H17 und JW41 erste MRP4-hemmende Effekte. Hingegen kann das Tetramethoxyderivat JW33, welches sehr gute P-gp und BCRP inhibitorische Aktivitäten aufweist, keine signifikante Senkung des IC<sub>50</sub>-Werts von Adefovirdipivoxil bewirken und scheint damit keine MRP4-Rezeptoraffinität zu besitzen. Die Verbindung JW46, welche 2 voluminöse Benzyloxygruppen besitzt, zeigt unter den untersuchten Dihydropyridinen die beste inhibitorische Wirkung und kann bei der eingesetzten Konzentration von 20 µM schon eine komplette Aufhebung der Adefovirdipivoxil-Resistenz erzielen. Somit scheinen lipophile, aromatische Substituenten einen positiven Einfluss auf die Wechselwirkungen an der Bindungsstelle auszuüben, während mit Methoxygruppen diese gute Affinität nur teilweise (JW41) oder gar nicht (JW33) erreicht werden kann.

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Expression von Membrantransportern spielt eine entscheidende Rolle in der Ausbildung einer MDR und stellt eine wichtige defensive Maßnahme von Krebszellen bei einer Chemotherapie dar. Allen voran steht dabei die Aktivität des P-Glykoproteins, welches seit über 3 Jahrzehnten intensiv erforscht wird. Trotz aller Bemühungen sind die bisherigen Strukturaufklärungen noch nicht ausreichend, um genaue Erkenntnisse über die Substratbindungstasche abzuleiten. Es wird vermutet, dass mehrere Substratbindungsstellen oder eine einzelne, große Bindungstasche existieren. Diese sind in der Lage strukturell sehr unterschiedliche Substanzen zu erkennen und zu transportieren. Somit können auch keine allgemeinen Strukturempfehlungen für P-gp Modulatoren gegeben werden, sondern lediglich die modulatorischen Aktivitäten für jede Substanzgruppe einzeln durch Variation der Substituenten ermittelt werden. P-gp Modulatoren der dritten Generation wie Tariquidar zeigen dabei gute inhibitorische Effekte, konnten in bisher durchgeführten klinischen Untersuchungen als Begleitmedikation jedoch nicht überzeugen. Auch die Aktivität weiterer Membrantransporter der ABC-Familie steht mit dem Auftreten von Arzneistoffresistenzen im Zusammenhang. Vor allem die Expression von MRP1 führt in P-gp negativen Zellen zur Resistenzentstehung gegenüber einer Reihe wichtiger Arzneistoffe, während für MRP2 vorrangig die Ausbildung einer Cisplatin Resistenz beobachtet wird. Weiterhin können die in der antiviralen Therapie häufig eingesetzten Nukleosidanaloga durch die Aktivität von MRP4 in ihrer Wirkung abgeschwächt werden. Auch die meisten HIV-1 Proteasehemmer werden durch P-gp Substrateigenschaften in ihrer Wirkung abgeschwächt. Dabei sind vor allem in der zytostatischen und antiviralen Therapie die intrazellulären Arzneistoffkonzentrationen von enormer Bedeutung, so dass der Einsatz von MDR Modulatoren einen wichtigen Beitrag zur Therapie von malignen und viralen Erkrankungen leisten kann.

Durch Voruntersuchungen in der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die käfigdimeren Dihydropyridine, ausgehend von Verbindung H17, ein hohes P-gp inhibitorisches Potential besitzen und vor allem die Symmetrie der Verbindung eine wichtige Rolle für die Affinität zur Bindungsstelle spielt [131]. Darauf aufbauend wurden eine Reihe neuer, symmetrischer käfigdimerer Dihydropyridine in der Arbeitsgruppe synthetisiert, um eine weitere Wirkverbesserung zu erzielen [129]. Dabei wurden lipophile Substituenten, wie Methoxygruppen oder voluminöse Benzyloxygruppen eingeführt aber auch der Einfluss von Heteroaromaten oder hydrophileren Gruppen untersucht. An erster Stelle der bioanalytischen Evaluierung stand dabei die Untersuchung der Zytotoxizität der Verbindungen nach einer Zelleexposition von 24 h und 48 h. Dafür wurden 4

unterschiedliche Zelllinien verwendet, um eine geeignete Aussage über das zytotoxische Potential treffen zu können. Durch den Vergleich zur Kontrollverbindung Ritonavir, welche als Proteasehemmer in der HIV-1 Therapie eingesetzt wird und ebenfalls P-gp hemmende Effekte aufweist, können für alle untersuchten Verbindungen sehr gute Zellverträglichkeiten festgestellt werden. Vor allem in der sehr sensitiven Lymphozytenlinie Jurkat zeigte das mit 4 Methoxygruppen substituierte Derivat JW33 in der maximal getesteten Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  keinerlei toxische Effekte auf den Zellstoffwechsel, während unter Ritonavirexposition ein vollständiges Absterben der Zellen beobachtet wurde. Die Verbindungen H17 und JW41 zeichnen sich ebenfalls durch eine sehr gute Zellverträglichkeit aus. Lediglich die Verbindung JW46 führt nach Zellexposition zu Schädigungen des Zellstoffwechsels bereits im einstelligen mikromolaren Bereich. Aus den Zytotoxizitätsuntersuchungen konnte durch die Verwendung eines P-gp überexprimierenden Zellmodells (EPG85-257) auch eine Aussage zu P-gp Substrateigenschaften der Verbindungen abgeleitet werden. Dabei zeigten die Verbindungen JW33, JW46 sowie Ritonavir leichte Substrateffekte während für die restlichen Verbindungen dieser Effekt nicht nachgewiesen wurde.

Neben der zu untersuchenden P-gp modulatorischen Aktivität der Verbindungen stand auch der inhibitorische Effekt auf weitere wichtige Membraneffluxpumpen im Fokus, wie die „multidrug-resistance Proteine“ MRP1, MRP2, MRP4 sowie das „breast cancer resistant protein“ BCRP, welche ebenfalls eine zunehmende Rolle in der Ausbildung einer MDR spielen. Da für die Untersuchungen auf MRP4 Hemmung kein geeignetes Zellmodell zur Verfügung stand, wurde durch Transfektion eines MRP4-Plasmids in Ovarialkarzinomzellen und hepG2 Zellen eine Überexpression des Transporters erzielt. Als Zellmodell für weitere Untersuchungen konnten dabei 2 transfizierte hepG2-Subzelllinien etabliert werden, da in diesen Fällen eine ausreichende und stabile MRP4 Überexpression erzielt wurde. Die Untersuchungen auf RNA Ebene ergaben dabei eine bis zu 16-fache Steigerungen der MRP4-cDNA Mengen im Vergleich zum Leervektor. Auch im Funktionsassay mit dem MRP4 Substrat Adefovir konnten für die MRP4-transfizierten hepG2 Zellen bis zu 12-fach höherer  $\text{IC}_{50}$ -Werte ermittelt werden. Da der Membrantransporter MRP4 eine zunehmende Rolle vor allem in der Resistenzentstehung von Nukleosidanaloga bei einer HIV-1 Therapie spielt, wurden weitere Untersuchungen an dem nun etablierten Zellmodell durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die durch MRP4 vermittelte Resistenz gegenüber dem MRP4 Substrat Adefovir durch die Inkubation mit Vertretern der käfigdimeren Dihydropyridine wieder aufgehoben werden kann. Vor allem die Verbindung JW46 zeigt eine gute inhibitorische Aktivität und führt damit zu einer signifikanten Resensitivierung der Zelllinien gegenüber Adefovir. Im Verhältnis zum bekannten MRP4 Modulator MK571 konnten dabei vergleichbare Ergebnisse erzielt

werden. Die Benzyloxygruppen der Verbindung JW46 sind dabei im Vergleich zu Methoxygruppen (JW41, JW33) vorteilhafter in der MRP4 inhibitorischen Wirkung. Damit ergibt sich eine interessante Einsatzmöglichkeit in der HIV-1 Therapie. Insbesondere bei einer MRP4 vermittelten Resistenz könnten durch die inhibitorische Aktivität der Verbindung wieder bessere Ansprechraten der eingesetzten Nukleosidanaloga erzielt werden. Gleichzeitig profitiert eine mögliche Anwendung von der inhibitorischen Wirkung der käfigdimeren 1,4-Dihydroxyridine auf die HIV-1 Protease, welche ausführlich in der Arbeitsgruppe untersucht wurde [129].

Die bisher bekannte gute inhibitorische Aktivität des käfigdimeren 1,4-Dihydropyridins H17 auf den Membrantransporter P-Glykoprotein konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Gleichzeitig wurden modulierende Effekte auch auf weitere Membrantransporter beobachtet. So bewirkt die Zellinkubation mit H17 ebenfalls eine gute Hemmung des BCRP sowie eine leichte Hemmung von MRP1 und MRP2. Durch die systematische Einführung verschiedener funktioneller Gruppen in die „Ausgangsverbindung“ H17 sollte eine weitere Verbesserung der modulatorischen Aktivität untersucht und Aussagen bezüglich Struktur-Wirkungs-Beziehungen für den jeweiligen Membrantransporter abgeleitet werden. Die Einführung von Methoxygruppen an den Benzyl- und Phenylresten führt dabei zu einer deutlichen Wirkverbesserung. Dabei zeigt die Verbindung JW33, trotz der leichten P-gp Substrateigenschaft, sehr gute P-gp und BCRP modulatorische Effekte, welche zum Teil deutlich besser sind als mit vergleichbaren Standardinhibitoren (Verapamil, Tariquidar). Methoxygruppen als Wasserstoffbrückenakzeptoren scheinen damit eine wichtige Rolle für die Wechselwirkungen mit Aminosäureresten der P-gp und BCRP Bindungstasche zu spielen. Die duale Hemmung der Membrantransporter ist nicht überraschend, da dieser Effekt auch bei einer Reihe weiterer Modulatoren (Tariquidar, Elacridar, Cyclosporin A) beobachtet wurde. Ebenso kann durch die Einführung von Methoxygruppen eine Steigerung der Affinität zum MRP1 und MRP2 Transporter nachgewiesen werden, jedoch nicht zum MRP4 Transporter, wo die Verbindungen keine oder nur schwache inhibitorische Wirkungen zeigen. Ein weiterer, wichtiger Vorteil von JW33 ist die sehr niedrige Toxizität der Verbindung, welche im Vergleich zum HIV-1 Proteasehemmer Ritonavir in allen untersuchten Zelllinien deutlich geringer ausfällt. Die Substitution mit voluminösen Benzyloxygruppen ist vor allem für die P-gp und BCRP Hemmung vorteilhaft. Herauszuheben ist dabei die Verbindung JW53A, welche jeweils in meta-Stellung an den Phenylresten mit einer Benzyloxygruppe substituiert ist. Dies führt vor allem bei der P-gp Hemmung zu einer ausgezeichneten Rezeptoraffinität. Dabei konnte die modulatorische Aktivität von Tariquidar noch übertroffen werden. Auch bei der untersuchten BCRP Hemmung zeigt die Verbindung gute inhibitorische Effekte, so dass

sich der Einsatz von JW53A vor allem als dualer Hemmer bei P-gp und BCRP Überexpression anbieten würde. Auf die Aktivität von MRP1 und MRP2 zeigen die Verbindungen mit einem Benzyloxysubstituenten hingegen keine oder nur sehr geringe inhibitorische Einflüsse. Somit kann die Substitution mit Benzyloxygruppen als ein wichtiges strukturelles Merkmal für eine P-gp und BCRP spezifische Hemmung angesehen werden, bei minimaler oder fehlender MRP1 und MRP2 Beeinflussung. Ein weiterer Ansatzpunkt im Synthesevorhaben der untersuchten dimeren 1,4-Dihydropyridine war das Einbringen von Heteroaromaten in die Grundverbindung H17. Dabei standen für die Testung Verbindungen mit Picolylgruppen zur Verfügung (JW50, JW63), welche jedoch keine inhibitorischen Aktivitäten auf die P-gp-Transporterfunktion aufweisen. Auch bei den Untersuchungen auf BCRP, MRP1 und MRP2 Hemmung zeigten sich bei den Verbindungen keine Effekte. Hingegen steigert die Verwendung von Pyridylgruppen die Rezeptoraffinität wieder deutlich (JW65). Dabei ist neben einer leichten MRP1 Affinität vor allem für die Membrantransporter P-gp und BCRP ein guter modulatorischer Effekt beobachtet worden. Vergleicht man jedoch die Ergebnisse mit dem Ausgangsderivat H17 so zeigt sich bis auf die untersuchte MRP1 Hemmung eine verminderte modulatorische Aktivität der mit Pyridylresten substituierten Käfige. Somit scheint ein Stickstoffatom in den Benzylresten zu einer deutlichen Erniedrigung der Rezeptoraffinität zu führen, während die Stickstoffsubstitution in den Phenylresten in einer dem H17 vergleichbaren Wirkstärke resultiert. Die Substitution der Grundverbindung H17 an den Benzyl- oder Phenylresten mit Hydroxygruppen führt dagegen zu einem nahezu völligen Wirkverlust auf die Transporterfunktion. Dies konnte bei allen untersuchten Membrantransportern beobachtet werden. Dabei kommt es nur zu einer moderaten Absenkung der Lipophilie der Verbindungen ( $\log P = 3$ ), so dass der Wirkverlust nicht durch eine verminderte Membranpenetration erklärt werden kann. Vielmehr scheint es, dass zusätzliche Hydroxygruppen als Wasserstoffbrückendonatoren nachteilig für die Wechselwirkungen mit Aminosäureresten in der Bindungstasche der Membrantransporter sind.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Substitution mit Benzyloxygruppen die größte Steigerung der P-gp modulatorischen Aktivität bewirkt während die Einführung von 4 Methoxygruppen in einer maximalen BCRP Hemmung resultiert. Bei beiden Transportern zeigt sich eine lipophile Substitution gegenüber hydrophilen Resten vorteilhafter. Bezüglich der Aktivitätsbeeinflussung von MRP1 und MRP2 zeigt die Verbindung H17 sehr schwache inhibitorische Effekte, welche nur durch die Einführung von Methoxygruppen gesteigert werden können. Heteroaromaten, Hydroxygruppen oder Benzyloxygruppen führen zu keiner signifikanten Steigerung der MRP1 und MRP2 Transporterhemmung. Die modulatorische Aktivität auf den Membrantransporter MRP4 wird hingegen am besten durch die Einführung von

Benzyloxygruppen erhöht, bedarf jedoch noch weiteren Untersuchungen um auch den Effekt von hydrophilen Substituenten und Heteroaromaten zu untersuchen.

Die Induktion von Membrantransportern spielt eine weitere wichtige Rolle zur Charakterisierung potentieller MDR Modulatoren. Für zahlreiche bekannte P-gp Inhibitoren konnte eine Induktionsfähigkeit auf das P-Glykoprotein nachgewiesen und nach kurzer Inkubationszeit signifikant höhere MDR1-mRNA Level gemessen werden (Kapitel 1.3.1). Damit eignen sich solche Substanzen nur bedingt als MDR Modulatoren. Um die dimeren 1,4-Dihydropyridine dahingehend zu charakterisieren, wurden 2 Vertreter auf ihr induktives Potential überprüft. Die Untersuchungen wurden mit den Verbindungen H17 und JW41 an 3 Zelllinien durchgeführt und nach 72 h Inkubationszeit eine Quantifizierung der MDR1-mRNA Mengen durch eine RTQ-PCR vorgenommen. Dabei zeigten sich keine signifikanten Steigerungen der MDR1 Transkripte unter der Behandlung mit H17 und JW41. Diese Ergebnisse konnten auch durch eine WesternBlot Analyse bestätigt werden. Hier ergaben sich nach densitometrischer Auswertung ebenfalls keine Steigerungen der P-gp Proteinmenge. Somit kann die fehlende Induktionsfähigkeit auf den Membrantransporter P-gp zumindest schon für 2 Vertreter der 1,4-Dihydropyridine als weiteres positives Kriterium evaluiert werden.

Die in dieser Arbeit untersuchten Vertreter der dimeren 1,4-Dihydropyridine zeigen teilweise sehr gute modulatorische Effekte auf Membraneffluxpumpen, wie P-gp, BCRP, und MRP4. Dabei ist neben der Symmetrie der Verbindung die Substitution mit Methoxygruppen oder Benzyloxygruppen vorteilhaft, um die Aktivität der Grundverbindung H17 weiter zu erhöhen. Zusätzliche können für die untersuchten Verbindungen nur sehr geringe Zytotoxizitäten nachgewiesen werden. Auch das induktive Potential auf den Membrantransporter P-gp kann für diese Substanzgruppe als äußerst gering eingestuft werden. Die durchgeführten Untersuchungen haben damit einen wichtigen Beitrag zur weiteren Charakterisierung der in dieser Arbeitsgruppe etablierten käfigdimeren 1,4-Dihydropyridine geleistet. Vor allem für die Verbindung JW33 können weitere klinische und tierexperimentelle Untersuchungen empfohlen werden, da neben der sehr guten inhibitorischen Aktivität bezüglich P-gp und BCRP eine sehr geringe Zelltoxizität nachgewiesen wurde. Im Einsatz als Comedikation hat die Verbindung das Potential, eingesetzte Zytostatikadosen zu senken beziehungsweise die Ansprechraten einer Chemotherapie deutlich zu erhöhen. Dabei ist es unerlässlich, die Tumorgewebe hinsichtlich ihrer Membrantransporter zu analysieren und entsprechende Expressionsprofile zu erstellen. Erst dann kann über eine sinnvolle Comedikation entschieden werden, um den Ziel einer erfolgreichen Krebschemotherapie mit möglichst geringen Nebenwirkungen gerecht zu werden.

## 5 Literatur

1. <http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/>.
2. Wang, J. C. & Dick, J. E.; Cancer stem cells: lessons from leukemia, *Trends Cell Biol* 15, 494-501 (2005).
3. Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H., Jones, D. L., Visvader, J., Weissman, I. L. & Wahl, G. M.; Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells, *Cancer Res* 66, 9339-9344 (2006).
4. Essers, M. A., Offner, S., Blanco-Bose, W. E., Waibler, Z., Kalinke, U., Duchosal, M. A. & Trumpp, A.; IFNalpha activates dormant haematopoietic stem cells in vivo, *Nature* 458, 904-908 (2009).
5. Gupta, P. B., Chaffer, C. L. & Weinberg, R. A.; Cancer stem cells: mirage or reality?, *Nat Med* 15, 1010-1012 (2009).
6. Kim, M., Turnquist, H., Jackson, J., Sgagias, M., Yan, Y., Gong, M., Dean, M., Sharp, J. G. & Cowan, K.; The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells, *Clin Cancer Res* 8, 22-28 (2002).
7. Winckler, T., Zundorf, I. & Dingermann, T.; [Protein tyrosine kinases as drug targets. An important group of intracellular regulators], *Pharm Unserer Zeit* 37, 370-380 (2008).
8. Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K. & Cobb, M. H.; Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions, *Endocr Rev* 22, 153-183 (2001).
9. Roy, L., Guilhot, J., Krahnke, T., Guerci-Bresler, A., Druker, B. J., Larson, R. A., O'Brien, S., So, C., Massimini, G. & Guilhot, F.; Survival advantage from imatinib compared with the combination interferon-alpha plus cytarabine in chronic-phase chronic myelogenous leukemia: historical comparison between two phase 3 trials, *Blood* 108, 1478-1484 (2006).
10. Kunick, C. & Egert-Schmidt, A. M.; [The short history of protein kinase inhibitors. New, competitive, successful], *Pharm Unserer Zeit* 37, 360-368 (2008).
11. Assef, Y., Rubio, F., Colo, G., del Monaco, S., Costas, M. A. & Kotsias, B. A.; Imatinib resistance in multidrug-resistant K562 human leukemic cells, *Leuk Res* 33, 710-716 (2009).
12. Lage, H.; An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem, *Cell Mol Life Sci* 65, 3145-3167 (2008).
13. Gottesman, M. M. & Ling, V.; The molecular basis of multidrug resistance in cancer: the early years of P-glycoprotein research, *FEBS Lett* 580, 998-1009 (2006).

14. Huang, Y. & Sadee, W.; Membrane transporters and channels in chemoresistance and -sensitivity of tumor cells, *Cancer Lett* 239, 168-182 (2006).
15. Buchholz, T. A., Davis, D. W., McConkey, D. J., Symmans, W. F., Valero, V., Jhingran, A., Tucker, S. L., Pusztai, L., Cristofanilli, M., Esteva, F. J., Hortobagyi, G. N. & Sahin, A. A.; Chemotherapy-induced apoptosis and Bcl-2 levels correlate with breast cancer response to chemotherapy, *Cancer J* 9, 33-41 (2003).
16. Kaina, B. & Christmann, M.; DNA repair in resistance to alkylating anticancer drugs, *Int J Clin Pharmacol Ther* 40, 354-367 (2002).
17. Blattner, F. R., Plunkett, G. r., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. & Shao, Y.; The complete genome sequence of Escherichia coli K-12, *Science* 277, 1453-1462 (1997).
18. Busch, W. & Saier, M. H. J.; The transporter classification (TC) system, 2002, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37, 287-337 (2002).
19. Higgins, C. F., Hiles, I. D., Salmond, G. P., Gill, D. R., Downie, J. A., Evans, I. J., Holland, I. B., Gray, L., Buckel, S. D., Bell, A. W. & et, a.; A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria, *Nature* 323, 448-450 (1986).
20. Rees, D. C., Johnson, E. & Lewinson, O.; ABC transporters: the power to change, *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 218-227 (2009).
21. Dean, M. & Annilo, T.; Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates, *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6, 123-142 (2005).
22. Frelet, A. & Klein, M.; Insight in eukaryotic ABC transporter function by mutation analysis, *FEBS Lett* 580, 1064-1084 (2006).
23. Juliano, R. L. & Ling, V.; A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants, *Biochim Biophys Acta* 455, 152-162 (1976).
24. Chen, C. J., Chin, J. E., Ueda, K., Clark, D. P., Pastan, I., Gottesman, M. M. & Roninson, I. B.; Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells, *Cell* 47, 381-389 (1986).
25. Gripar, J. J., Ramachandra, M., Hrycyna, C. A., Dey, S. & Ambudkar, S. V.; Functional characterization of glycosylation-deficient human P-glycoprotein using a vaccinia virus expression system, *J Membr Biol* 173, 203-214 (2000).
26. Ambudkar, S. V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z. E. & Gottesman, M. M.; P-glycoprotein: from genomics to mechanism, *Oncogene* 22, 7468-7485 (2003).
27. Chang, G. & Roth, C. B.; Structure of MsbA from E. coli: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters, *Science* 293, 1793-1800 (2001).
28. Rosenberg, M. F., Callaghan, R., Modok, S., Higgins, C. F. & Ford, R. C.; Three-dimensional structure of P-glycoprotein: the transmembrane regions adopt an asymmetric configuration in the nucleotide-bound state, *J Biol Chem* 280, 2857-2862 (2005).



29. Aller, S. G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., Harrell, P. M., Trinh, Y. T., Zhang, Q., Urbatsch, I. L. & Chang, G.; Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding, *Science* 323, 1718-1722 (2009).
30. 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, *J Biol Chem* 265, 3975-3980 (1990).
31. Ambudkar, S. V., Dey, S., Hrycyna, C. A., Ramachandra, M., Pastan, I. & Gottesman, M. M.; Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39, 361-398 (1999).
32. Bruggemann, E. P., Germann, U. A., Gottesman, M. M. & Pastan, I.; Two different regions of P-glycoprotein [corrected] are photoaffinity-labeled by azidopine, *J Biol Chem* 264, 15483-15488 (1989).
33. Dey, S., Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M. M. & Ambudkar, S. V.; Evidence for two nonidentical drug-interaction sites in the human P-glycoprotein, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10594-10599 (1997).
34. Loo, T. W. & Clarke, D. M.; Mutational analysis of ABC proteins, *Arch Biochem Biophys* 476, 51-64 (2008).
35. Pajeva, I. K., Globisch, C. & Wiese, M.; Comparison of the inward- and outward-open homology models and ligand binding of human P-glycoprotein, *FEBS J* 276, 7016-7026 (2009).
36. Loe, D. W., Deeley, R. G. & Cole, S. P.; Characterization of vincristine transport by the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione, *Cancer Res* 58, 5130-5136 (1998).
37. Kannan, P., John, C., Zoghbi, S. S., Halldin, C., Gottesman, M. M., Innis, R. B. & Hall, M. D.; Imaging the Function of P-Glycoprotein With Radiotracers: Pharmacokinetics and In Vivo Applications, *Clin Pharmacol Ther* (2009).
38. Graff, C. L. & Pollack, G. M.; Drug transport at the blood-brain barrier and the choroid plexus, *Curr Drug Metab* 5, 95-108 (2004).
39. Sarkadi, B., Homolya, L., Szakacs, G. & Varadi, A.; Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system, *Physiol Rev* 86, 1179-1236 (2006).
40. Schinkel, A. H. & Jonker, J. W.; Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview, *Adv Drug Deliv Rev* 55, 3-29 (2003).
41. Shapiro, A. B. & Ling, V.; The mechanism of ATP-dependent multidrug transport by P-glycoprotein, *Acta Physiol Scand Suppl* 643, 227-234 (1998).
42. Shapiro, A. B., Fox, K., Lam, P. & Ling, V.; Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. Evidence for a third drug-binding site, *Eur J Biochem* 259, 841-850 (1999).

43. Martin, C., Berridge, G., Higgins, C. F., Mistry, P., Charlton, P. & Callaghan, R.; Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein, *Mol Pharmacol* 58, 624-632 (2000).
44. Higgins, C. F.; Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters, *Nature* 446, 749-757 (2007).
45. Zhou, S. F., Wang, L. L., Di, Y. M., Xue, C. C., Duan, W., Li, C. G. & Li, Y.; Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development, *Curr Med Chem* 15, 1981-2039 (2008).
46. Zhang, J. T.; Use of arrays to investigate the contribution of ATP-binding cassette transporters to drug resistance in cancer chemotherapy and prediction of chemosensitivity, *Cell Res* 17, 311-323 (2007).
47. Borst, P. & Elferink, R. O.; Mammalian ABC transporters in health and disease, *Annu Rev Biochem* 71, 537-592 (2002).
48. Tian, Q., Zhang, J., Chan, E., Duan, W. & Zhou, S.; Multidrug Resistance Proteins (MRPs) and Implication in Drug Development, *Drug Dev Res* 64, 1-18 (2005).
49. Cole, S. P., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., Stewart, A. J., Kurz, E. U., Duncan, A. M. & Deeley, R. G.; Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line, *Science* 258, 1650-1654 (1992).
50. Slovak, M. L., Ho, J. P., Bhardwaj, G., Kurz, E. U., Deeley, R. G. & Cole, S. P.; Localization of a novel multidrug resistance-associated gene in the HT1080/DR4 and H69AR human tumor cell lines, *Cancer Res* 53, 3221-3225 (1993).
51. Bakos, E., Evers, R., Szakacs, G., Tusnady, G. E., Welker, E., Szabo, K., de Haas, M., van Deemter, L., Borst, P., Varadi, A. & Sarkadi, B.; Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain, *J Biol Chem* 273, 32167-32175 (1998).
52. Sharom, F. J.; ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance, *Pharmacogenomics* 9, 105-127 (2008).
53. Bakos, E. & Homolya, L.; Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1), *Pflugers Arch* 453, 621-641 (2007).
54. Leslie, E. M., Deeley, R. G. & Cole, S. P.; Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters, *Toxicology* 167, 3-23 (2001).
55. Taniguchi, K., Wada, M., Kohno, K., Nakamura, T., Kawabe, T., Kawakami, M., Kagotani, K., Okumura, K., Akiyama, S. & Kuwano, M.; 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).
56. Keppler, D., Leier, I. & Jedlitschky, G.; Transport of glutathione conjugates and glucuronides by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2, *Biol Chem* 378, 787-791 (1997).

57. Nisa, A. U. & Ahmad, Z.; Dubin-Johnson syndrome, *J Coll Physicians Surg Pak* 18, 188-189 (2008).
58. Folmer, Y., Schneider, M., Blum, H. E. & Hafkemeyer, P.; Reversal of drug resistance of hepatocellular carcinoma cells by adenoviral delivery of anti-ABCC2 antisense constructs, *Cancer Gene Ther* 14, 875-884 (2007).
59. Kiuchi, Y., Suzuki, H., Hirohashi, T., Tyson, C. A. & Sugiyama, Y.; cDNA cloning and inducible expression of human multidrug resistance associated protein 3 (MRP3), *FEBS Lett* 433, 149-152 (1998).
60. Zeng, H., Bain, L. J., Belinsky, M. G. & Kruh, G. D.; Expression of multidrug resistance protein-3 (multispecific organic anion transporter-D) in human embryonic kidney 293 cells confers resistance to anticancer agents, *Cancer Res* 59, 5964-5967 (1999).
61. Allikmets, R., Gerrard, B., Hutchinson, A. & Dean, M.; Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database, *Hum Mol Genet* 5, 1649-1655 (1996).
62. Kool, M., de Haas, M., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., van Eijk, M. J., Juijn, J. A., Baas, F. & Borst, P.; 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).
63. Ghany, M. G. & Doo, E. C.; Antiviral resistance and hepatitis B therapy, *Hepatology* 49, S174-84 (2009).
64. Lai, L. & Tan, T. M.; Role of glutathione in the multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4)-mediated efflux of cAMP and resistance to purine analogues, *Biochem J* 361, 497-503 (2002).
65. Hooper, E.; Experimental oral polio vaccines and acquired immune deficiency syndrome, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 803-814 (2001).
66. Sinko, E., Ilias, A., Ujhelly, O., Homolya, L., Scheffer, G. L., Bergen, A. A., Sarkadi, B. & Varadi, A.; Subcellular localization and N-glycosylation of human ABCC6, expressed in MDCKII cells, *Biochem Biophys Res Commun* 308, 263-269 (2003).
67. Chen, Z. S., Hopper-Borge, E., Belinsky, M. G., Shchavaleva, I., Kotova, E. & Kruh, G. D.; Characterization of the transport properties of human multidrug resistance protein 7 (MRP7, ABCC10), *Mol Pharmacol* 63, 351-358 (2003).
68. Bera, T. K., Lee, S., Salvatore, G., Lee, B. & Pastan, I.; MRP8, a new member of ABC transporter superfamily, identified by EST database mining and gene prediction program, is highly expressed in breast cancer, *Mol Med* 7, 509-516 (2001).
69. Guo, Y., Kotova, E., Chen, Z. S., Lee, K., Hopper-Borge, E., Belinsky, M. G. & Kruh, G. D.; MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)adenine, *J Biol Chem* 278, 29509-29514 (2003).
70. Bera, T. K., Iavarone, C., Kumar, V., Lee, S., Lee, B. & Pastan, I.; MRP9, an unusual truncated member of the ABC transporter superfamily, is highly expressed in breast cancer, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6997-7002 (2002).

71. Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K. & Ross, D. D.; A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15665-15670 (1998).
72. Ross, D. D., Yang, W., Abruzzo, L. V., Dalton, W. S., Schneider, E., Lage, H., Dietel, M., Greenberger, L., Cole, S. P. & Doyle, L. A.; Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines, *J Natl Cancer Inst* 91, 429-433 (1999).
73. Mao, Q. & Unadkat, J. D.; Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport, *AAPS J* 7, E118-33 (2005).
74. Ozvegy, C., Litman, T., Szakacs, G., Nagy, Z., Bates, S., Varadi, A. & Sarkadi, B.; Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells, *Biochem Biophys Res Commun* 285, 111-117 (2001).
75. Candeil, L., Gourdiere, I., Peyron, D., Vezzio, N., Copois, V., Bibeau, F., Orsetti, B., Scheffer, G. L., Ychou, M., Khan, Q. A., Pommier, Y., Pau, B., Martineau, P. & Del Rio, M.; ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases, *Int J Cancer* 109, 848-854 (2004).
76. Chen, Z. S., Robey, R. W., Belinsky, M. G., Shchavaleva, I., Ren, X. Q., Sugimoto, Y., Ross, D. D., Bates, S. E. & Kruh, G. D.; Transport of methotrexate, methotrexate polyglutamates, and 17beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) by ABCG2: effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport, *Cancer Res* 63, 4048-4054 (2003).
77. de Bruin, M., Miyake, K., Litman, T., Robey, R. & Bates, S. E.; Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR, *Cancer Lett* 146, 117-126 (1999).
78. Rabindran, S. K., Ross, D. D., Doyle, L. A., Yang, W. & Greenberger, L. M.; Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein, *Cancer Res* 60, 47-50 (2000).
79. Cui, C. B., Kakeya, H. & Osada, H.; Novel mammalian cell cycle inhibitors, tryprostatins A, B and other diketopiperazines produced by *Aspergillus fumigatus*. II. Physico-chemical properties and structures, *J Antibiot (Tokyo)* 49, 534-540 (1996).
80. Ozvegy, C., Varadi, A. & Sarkadi, B.; Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation, *J Biol Chem* 277, 47980-47990 (2002).
81. Lage, H.; Habilitation, Charité Berlin: Atypische, pleiotrope Zytostatikaresistenz (Multidrug-Resistenz) humaner Tumorzellen, (2001).
82. Scala, S., Akhmed, N., Rao, U. S., Paull, K., Lan, L. B., Dickstein, B., Lee, J. S., Elgemeie, G. H., Stein, W. D. & Bates, S. E.; P-glycoprotein substrates and antagonists cluster into two distinct groups, *Mol Pharmacol* 51, 1024-1033 (1997).
83. Gottesman, M. M., Fojo, T. & Bates, S. E.; Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters, *Nat Rev Cancer* 2, 48-58 (2002).
84. Leith, C. P., Kopecky, K. J., Chen, I. M., Eijdens, L., Slovak, M. L., McConnell, T. S., Head, D. R., Weick, J., Grever, M. R., Appelbaum, F. R. & Willman, C. L.; Frequency

- and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study, *Blood* 94, 1086-1099 (1999).
85. Ross, D. D., Karp, J. E., Chen, T. T. & Doyle, L. A.; Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia, *Blood* 96, 365-368 (2000).
  86. Trock, B. J., Leonessa, F. & Clarke, R.; Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance, *J Natl Cancer Inst* 89, 917-931 (1997).
  87. Sheps, J. A. & Ling, V.; Preface: the concept and consequences of multidrug resistance, *Pflugers Arch* 453, 545-553 (2007).
  88. Schuetz, E. G., Beck, W. T. & Schuetz, J. D.; Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells, *Mol Pharmacol* 49, 311-318 (1996).
  89. Harmsen, S., Meijerman, I., Febus, C. L., Maas-Bakker, R. F., Beijnen, J. H. & Schellens, J. H.; PXR-mediated induction of P-glycoprotein by anticancer drugs in a human colon adenocarcinoma-derived cell line, *Cancer Chemother Pharmacol* (2009).
  90. Shtil, A. A.; Signal transduction pathways and transcriptional mechanisms as targets for prevention of emergence of multidrug resistance in human cancer cells, *Curr Drug Targets* 2, 57-77 (2001).
  91. Herzog, C. E., Tsokos, M., Bates, S. E. & Fojo, A. T.; Increased mdr-1/P-glycoprotein expression after treatment of human colon carcinoma cells with P-glycoprotein antagonists, *J Biol Chem* 268, 2946-2952 (1993).
  92. Abraham, J., Edgerly, M., Wilson, R., Chen, C., Rutt, A., Bakke, S., Robey, R., Dwyer, A., Goldspiel, B., Balis, F., Van Tellingen, O., Bates, S. E. & Fojo, T.; A phase I study of the P-glycoprotein antagonist tariquidar in combination with vinorelbine, *Clin Cancer Res* 15, 3574-3582 (2009).
  93. Cameron, D. W., Japour, A. J., Xu, Y., Hsu, A., Mellors, J., Farthing, C., Cohen, C., Poretz, D., Markowitz, M., Follansbee, S., Angel, J. B., McMahon, D., Ho, D., Devanarayan, V., Rode, R., Salgo, M., Kempf, D. J., Granneman, R., Leonard, J. M. & Sun, E.; Ritonavir and saquinavir combination therapy for the treatment of HIV infection, *AIDS* 13, 213-224 (1999).
  94. Profit, L., Eagling, V. A. & Back, D. J.; Modulation of P-glycoprotein function in human lymphocytes and Caco-2 cell monolayers by HIV-1 protease inhibitors, *AIDS* 13, 1623-1627 (1999).
  95. Lee, C. G., Gottesman, M. M., Cardarelli, C. O., Ramachandra, M., Jeang, K. T., Ambudkar, S. V., Pastan, I. & Dey, S.; HIV-1 protease inhibitors are substrates for the MDR1 multidrug transporter, *Biochemistry* 37, 3594-3601 (1998).
  96. Perloff, M. D., von Moltke, L. L., Fahey, J. M. & Greenblatt, D. J.; Induction of P-glycoprotein expression and activity by ritonavir in bovine brain microvessel endothelial cells, *J Pharm Pharmacol* 59, 947-953 (2007).

97. Perloff, M. D., Von Moltke, L. L., Marchand, J. E. & Greenblatt, D. J.; Ritonavir induces P-glycoprotein expression, multidrug resistance-associated protein (MRP1) expression, and drug transporter-mediated activity in a human intestinal cell line, *J Pharm Sci* 90, 1829-1837 (2001).
98. Synold, T. W., Dussault, I. & Forman, B. M.; The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux, *Nat Med* 7, 584-590 (2001).
99. Staudinger, J. L., Goodwin, B., Jones, S. A., Hawkins-Brown, D., MacKenzie, K. I., LaTour, A., Liu, Y., Klaassen, C. D., Brown, K. K., Reinhard, J., Willson, T. M., Koller, B. H. & Kliewer, S. A.; The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3369-3374 (2001).
100. Kobayashi, H., Dorai, T., Holland, J. F. & Ohnuma, T.; Reversal of drug sensitivity in multidrug-resistant tumor cells by an MDR1 (PGY1) ribozyme, *Cancer Res* 54, 1271-1275 (1994).
101. Liu, C., Qureshi, I. A., Ding, X., Shan, Y., Huang, Y., Xie, Y. & Ji, M.; Modulation of multidrug resistance gene (mdr-1) with antisense oligodeoxynucleotides, *Clin Sci (Lond)* 91, 93-98 (1996).
102. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. & Mello, C. C.; Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature* 391, 806-811 (1998).
103. Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. & Zamore, P. D.; Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex, *Cell* 115, 199-208 (2003).
104. 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).
105. Tan, B., Piwnicka-Worms, D. & Ratner, L.; Multidrug resistance transporters and modulation, *Curr Opin Oncol* 12, 450-458 (2000).
106. Holtt, 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, *Biochem Pharmacol* 43, 2601-2608 (1992).
107. Twentyman, P. R. & Bleehen, N. M.; Resistance modification by PSC-833, a novel non-immunosuppressive cyclosporin [corrected], *Eur J Cancer* 27, 1639-1642 (1991).
108. Gillet, J. P., Efferth, T. & Remacle, J.; Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes, *Biochim Biophys Acta* 1775, 237-262 (2007).
109. Baumert, C. & Hilgeroth, A.; Recent advances in the development of P-gp inhibitors, *Anticancer Agents Med Chem* 9, 415-436 (2009).
110. Dantzig, A. H., Shepard, R. L., Law, K. L., Tabas, L., Pratt, S., Gillespie, J. S., Binkley, S. N., Kuhfeld, M. T., Starling, J. J. & Wrighton, S. A.; Selectivity of the multidrug resistance modulator, LY335979, for P-glycoprotein and effect on cytochrome P-450 activities, *J Pharmacol Exp Ther* 290, 854-862 (1999).

111. Minderman, H., O'Loughlin, K. L., Pendyala, L. & Baer, M. R.; VX-710 (biricodar) increases drug retention and enhances chemosensitivity in resistant cells overexpressing P-glycoprotein, multidrug resistance protein, and breast cancer resistance protein, *Clin Cancer Res* 10, 1826-1834 (2004).
112. Dalton, W. S., Crowley, J. J., Salmon, S. S., Grogan, T. M., Laufman, L. R., Weiss, G. R. & Bonnet, J. D.; A phase III randomized study of oral verapamil as a chemosensitizer to reverse drug resistance in patients with refractory myeloma. A Southwest Oncology Group study, *Cancer* 75, 815-820 (1995).
113. Sonneveld, P., Suci, S., Weijermans, P., Beksac, M., Neuwirtova, R., Solbu, G., Lokhorst, H., van der Lelie, J., Dohner, H., Gerhartz, H., Segeren, C. M., Willemze, R. & Lowenberg, B.; Cyclosporin A combined with vincristine, doxorubicin and dexamethasone (VAD) compared with VAD alone in patients with advanced refractory multiple myeloma: an EORTC-HOVON randomized phase III study (06914), *Br J Haematol* 115, 895-902 (2001).
114. Kolitz, J. E., George, S. L., Dodge, R. K., Hurd, D. D., Powell, B. L., Allen, S. L., Velez-Garcia, E., Moore, J. O., Shea, T. C., Hoke, E., Caligiuri, M. A., Vardiman, J. W., Bloomfield, C. D. & Larson, R. A.; Dose escalation studies of cytarabine, daunorubicin, and etoposide with and without multidrug resistance modulation with PSC-833 in untreated adults with acute myeloid leukemia younger than 60 years: final induction results of Cancer and Leukemia Group B Study 9621, *J Clin Oncol* 22, 4290-4301 (2004).
115. Fox, E. & Bates, S. E.; Tariquidar (XR9576): a P-glycoprotein drug efflux pump inhibitor, *Expert Rev Anticancer Ther* 7, 447-459 (2007).
116. Ruff, P., Vorobiof, D. A., Jordaan, J. P., Demetriou, G. S., Moodley, S. D., Nosworthy, A. L., Werner, I. D., Raats, J. & Burgess, L. J.; A randomized, placebo-controlled, double-blind phase 2 study of docetaxel compared to docetaxel plus zosuquidar (LY335979) in women with metastatic or locally recurrent breast cancer who have received one prior chemotherapy regimen, *Cancer Chemother Pharmacol* 64, 763-768 (2009).
117. Zhou, S. F.; Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition, *Xenobiotica* 38, 802-832 (2008).
118. 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).
119. Lage, H., Jordan, A., Scholz, R. & Dietel, M.; Thermosensitivity of multidrug-resistant human gastric and pancreatic carcinoma cells, *Int J Hyperthermia* 16, 291-303 (2000).
120. Eva, A., Robbins, K. C., Andersen, P. R., Srinivasan, A., Tronick, S. R., Reddy, E. P., Ellmore, N. W., Galen, A. T., Lautenberger, J. A., Papas, T. S., Westin, E. H., Wong-Staal, F., Gallo, R. C. & Aaronson, S. A.; Cellular genes analogous to retroviral onc genes are transcribed in human tumour cells, *Nature* 295, 116-119 (1982).
121. Materna, V.; Dissertation Charité Berlin, (2002).
122. Fischer, G. A.; Studies of the culture of leukemic cells in vitro, *Ann N Y Acad Sci* 76, 673-680 (1958).

123. Weaver, J. L., Szabo, G. J., Pine, P. S., Gottesman, M. M., Goldenberg, S. & Aszalos, A.; The effect of ion channel blockers, immunosuppressive agents, and other drugs on the activity of the multi-drug transporter, *Int J Cancer* 54, 456-461 (1993).
124. Schneider, U., Schwenk, H. U. & Bornkamm, G.; Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma, *Int J Cancer* 19, 621-626 (1977).
125. Knowles, B. B., Howe, C. C. & Aden, D. P.; Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen, *Science* 209, 497-499 (1980).
126. Quinn, L. A., Moore, G. E., Morgan, R. T. & Woods, L. K.; Cell lines from human colon carcinoma with unusual cell products, double minutes, and homogeneously staining regions, *Cancer Res* 39, 4914-4924 (1979).
127. Zeuthen, J., Norgaard, J. O., Avner, P., Fellous, M., Wartiovaara, J., Vaheri, A., Rosen, A. & Giovanella, B. C.; Characterization of a human ovarian teratocarcinoma-derived cell line, *Int J Cancer* 25, 19-32 (1980).
128. Hamilton, T. C., Young, R. C., McKoy, W. M., Grotzinger, K. R., Green, J. A., Chu, E. W., Whang-Peng, J., Rogan, A. M., Green, W. R. & Ozols, R. F.; Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors, *Cancer Res* 43, 5379-5389 (1983).
129. Wollmann, J.; Dissertation Martin-Luther-Universität, (2007).
130. Hilgeroth, A.; Dimeric 4-Aryl-1,4-dihydropyridines: development of a third class of nonpeptidic HIV-1 protease inhibitors, *Mini Rev Med Chem* 2, 235-245 (2002).
131. Richter, M.; Dissertation Martin-Luther-Universität, (2005).
132. Mosmann, T.; Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods* 65, 55-63 (1983).
133. Breeuwer, P., Drocourt, J. L., Rombouts, F. M. & Abee, T.; Energy-dependent, carrier-mediated extrusion of carboxyfluorescein from *Saccharomyces cerevisiae* allows rapid assessment of cell viability by flow cytometry, *Appl Environ Microbiol* 60, 1467-1472 (1994).
134. Cantz, T., Nies, A. T., Brom, M., Hofmann, A. F. & Keppler, D.; MRP2, a human conjugate export pump, is present and transports fluo 3 into apical vacuoles of Hep G2 cells, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278, G522-31 (2000).
135. Gedeon, C., Behravan, J., Koren, G. & Piquette-Miller, M.; Transport of glyburide by placental ABC transporters: implications in fetal drug exposure, *Placenta* 27, 1096-1102 (2006).
136. van der Kolk, D. M., de Vries, E. G., Koning, J. A., van den Berg, E., Muller, M. & Vellenga, E.; Activity and expression of the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 in acute myeloid leukemia cells, tumor cell lines, and normal hematopoietic CD34+ peripheral blood cells, *Clin Cancer Res* 4, 1727-1736 (1998).



137. Consoli, U., Van, N. T., Neamati, N., Mahadevia, R., Beran, M., Zhao, S. & Andreeff, M.; Cellular pharmacology of mitoxantrone in p-glycoprotein-positive and -negative human myeloid leukemic cell lines, *Leukemia* 11, 2066-2074 (1997).
138. Minderman, H., Suvannasankha, A., O'Loughlin, K. L., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Robey, R. W. & Baer, M. R.; Flow cytometric analysis of breast cancer resistance protein expression and function, *Cytometry* 48, 59-65 (2002).
139. Sambrook, J. & Russell, D. W.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, PP. 7.9~7.13, (2001).
140. Mülhardt, C. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics* (Spektrum Akademischer Verlag, 2008).
141. Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Hasler, K., Fleckenstein, B. & Schaffner, W.; A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus, *Cell* 41, 521-530 (1985).
142. Bar-Nun, S., Shneyour, Y. & Beckmann, J. S.; G-418, an elongation inhibitor of 80 S ribosomes, *Biochim Biophys Acta* 741, 123-127 (1983).
143. Qiagen.; SuperFect Transfection Reagent Handbook, (2002).
144. Tang, M. X., Redemann, C. T. & Szoka, F. C. J.; In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers, *Bioconjug Chem* 7, 703-714 (1996).
145. Hilgeroth, A. & Billich, A.; Cage dimeric N-acyl- and N-acyloxy-4-aryl-1,4-dihydropyridines as first representatives of a novel class of HIV-1 protease inhibitors, *Arch Pharm (Weinheim)* 332, 380-384 (1999).
146. Richter, M., Gyemant, N., Molnar, J. & Hilgeroth, A.; Comparative effects on intestinal absorption in situ by P-glycoprotein-modifying HIV protease inhibitors, *Pharm Res* 21, 1862-1866 (2004).
147. Wollmann, J., Baumert, C., Erenkamp, G., Sippl, W. & Hilgeroth, A.; Novel insight into inhibitor binding of highly symmetric HIV-1 protease, *Chembiochem* 9, 874-878 (2008).
148. Westerink, W. M. & Schoonen, W. G.; Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells, *Toxicol In Vitro* 21, 1592-1602 (2007).
149. Westerink, W. M. & Schoonen, W. G.; Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells, *Toxicol In Vitro* 21, 1581-1591 (2007).
150. Lee, G. & Piquette-Miller, M.; Influence of IL-6 on MDR and MRP-mediated multidrug resistance in human hepatoma cells, *Can J Physiol Pharmacol* 79, 876-884 (2001).
151. Labroille, G., Dumain, P., Lacombe, F. & Belloc, F.; Flow cytometric evaluation of fas expression in relation to response and resistance to anthracyclines in leukemic cells, *Cytometry* 39, 195-202 (2000).
152. Zhou, W. D., Zhang, H. Q., Fang, M., He, Q. Y., Pang, D. B. & Xue, S. B.; [Induction of expression of MDR 1 gene by retinoic acid and DMSO and effects on rhodamine-

- 123 efflux in HL-60 cell lines and resistant sublines], *Yao Xue Xue Bao* 31, 1-5 (1996).
153. Tian, Q., Zhang, J., Tan, T. M., Chan, E., Duan, W., Chan, S. Y., Boelsterli, U. A., Ho, P. C., Yang, H., Bian, J. S., Huang, M., Zhu, Y. Z., Xiong, W., Li, X. & Zhou, S.; Human multidrug resistance associated protein 4 confers resistance to camptothecins, *Pharm Res* 22, 1837-1853 (2005).
154. Lee, G. & Piquette-Miller, M.; Cytokines alter the expression and activity of the multidrug resistance transporters in human hepatoma cell lines; analysis using RT-PCR and cDNA microarrays, *J Pharm Sci* 92, 2152-2163 (2003).
155. Dallas, S., Schlichter, L. & Bendayan, R.; Multidrug resistance protein (MRP) 4- and MRP 5-mediated efflux of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine by microglia, *J Pharmacol Exp Ther* 309, 1221-1229 (2004).
156. Sharples, D., Hajos, G., Riedl, Z., Csanyi, D., Molnar, J. & Szabo, D.; Ellipticine analogues and related compounds as inhibitors of reverse transcriptase and as inhibitors of the efflux pump, *Arch Pharm (Weinheim)* 334, 269-274 (2001).
157. Pick, A., Muller, H. & Wiese, M.; Structure-activity relationships of new inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2), *Bioorg Med Chem* 16, 8224-8236 (2008).
158. Schuetz, J. D., Connelly, M. C., Sun, D., Paibir, S. G., Flynn, P. M., Srinivas, R. V., Kumar, A. & Fridland, A.; MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs, *Nat Med* 5, 1048-1051 (1999).
159. Lee, C. G., Gottesman, M. M., Cardarelli, C. O., Ramachandra, M., Jeang, K. T., Ambudkar, S. V., Pastan, I. & Dey, S.; HIV-1 protease inhibitors are substrates for the MDR1 multidrug transporter, *Biochemistry* 37, 3594-3601 (1998).
160. Bishop, J. O., Morton, J. G., Rosbash, M. & Richardson, M.; Three abundance classes in HeLa cell messenger RNA, *Nature* 250, 199-204 (1974).
161. Ferte, J., Kuhnel, J. M., Chapuis, G., Rolland, Y., Lewin, G. & Schwaller, M. A.; Flavonoid-related modulators of multidrug resistance: synthesis, pharmacological activity, and structure-activity relationships, *J Med Chem* 42, 478-489 (1999).
162. Seelig, A.; A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein, *Eur J Biochem* 251, 252-261 (1998).

## Danksagung

Für die Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit möchte ich an dieser Stelle den wichtigsten Personen für Ihre Unterstützung danken:

- PD Dr. Andreas Hilgeroth für das interessante, facettenreiche Thema, die freundschaftliche Zusammenarbeit, die vielen Diskussionen sowie die Möglichkeit der Forschungsaufenthalte in Berlin und Szeged.
- Prof. Dr. Hermann Lage und seiner Arbeitsgruppe am Pathologischen Institut der Charité in Berlin für die Möglichkeit der Durchführung der molekularbiologischen Arbeiten. Insbesondere gilt mein Dank Birgit Schäfer für das Anlernen vieler Techniken und der Zellkultur sowie Dr. Alexandra Stege für die wissenschaftlichen Diskussionen.
- Prof. Dr. Josef Molnár und seiner Arbeitsgruppe an der Universität in Szeged für die Forschungsaufenthalte und das Erlernen der Zellkulturtechniken.
- Prof. Dr. Andreas Langner und seiner Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und der Nutzung von Laborräumen und Geräten. Besonders bedanken möchte ich mich bei Martin Heinze für die vielen wissenschaftlichen Gespräche aber auch für den sportlichen Ausgleich am Feierabend und für die während der Promotionszeit entstandene Freundschaft.
- Meiner Arbeitsgruppe und den Kollegen der „Mittagsrunde“ für die angenehme Doktorandenzeit.

## Curriculum vitae

# Claudius Coburger

Apotheker

\*02. Juni 1980 in Greiz

Kermannstr. 35  
07973 Greiz

Email: cl.coburger@web.de

### Familienstand

verheiratet, 1 Tochter

### Schule

1987 - 1991

Grundschule Greiz-Irchwitz

1991 - 1999

1. Staatliches Gymnasium Greiz

### Zivildienst

08/1999 - 09/2000

Zivildienst in der Katholischen Kirche Zeulenroda

### Studium

10/2000 - 09/2004

Pharmaziestudium an der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg

### Praktisches Jahr

11/2004 - 04/2005

Lavendel-Apotheke Dresden

05/2005 - 11/2005

Wissenschaftliche Hilfskraftstelle in der Arbeitsgruppe von  
PD Dr. Hilgeroth am pharmazeutischen Institut der Martin-  
Luther-Universität Halle-Wittenberg

Forschungsaufenthalte in der Medizinischen Mikrobiologie,  
Universität Szeged (Ungarn) und am Pathologischen Institut,  
Charité Berlin

---

<b>12/2005</b>	<b>Approbation zum Apotheker</b>
<b>12/2005 - 12/2006</b>	Filialleiter der Apotheke Demitz-Thumitz (Bischofswerda)
<b>01/2007 - 10/2009</b>	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Hilgeroth am pharmazeutischen Institut der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (DFG finanziert)
	Forschungsaufenthalt am Pathologischen Institut der Charité Berlin in der Arbeitsgruppe „Zytostatikaresistenz“ von Prof. Dr. Herman Lage (6 Monate)
<b>11/2009 - 12/2009</b>	Elternzeit
<b>01/2010</b>	Angestellter Apotheker in der „stadt-Apotheke“ Triebes

**Sprachkenntnisse**

Englisch (gut)

Französisch (Grundkenntnisse)

**Private Interessen**

Literatur, Radsport, Fotografie

Greiz, 04.08.2010

## Publikationen

### Zeitschriftenbeiträge

1. Coburger, C., Wollmann J., Krug, M., Baumert, C., Seifert, M., Molnar J., Lange H., Hilgeroth A.; Novel structure-activity relationships and selectivity profiling of cage dimeric 1,4-dihydropyridines as multidrug resistance (MDR) modulators, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, angenommen (2010)
2. Coburger, C., Lage H., Molnar J., Langner A., Hilgeroth A.; MDR reversal properties and cytotoxic evaluation of representatives of a novel class of HIV-1 protease inhibitors, *J Pharm and Pharmacology*, angenommen (2010)
3. Coburger, C., Lage, H., Molnar, J. & Hilgeroth, A.; Impact of novel MDR modulators on human cancer cells: reversal activities and induction studies, *Pharm Res* 26, 182-188 (2009).
4. Coburger, C., Wollmann, J., Baumert, C., Krug, M., Molnar, J., Lage, H. & Hilgeroth, A.; Novel insight in structure-activity relationship and bioanalysis of P-glycoprotein targeting highly potent tetrakis-hydroxymethyl substituted 3,9-diazatetraasteranes, *J Med Chem* 51, 5871-5874 (2008).
5. Lage, H., Duarte, N., Coburger, C., Hilgeroth, A. & Ferreira, M. J.; Antitumor activity of terpenoids against classical and atypical multidrug resistant cancer cells, *Phytomedicine* 17, 441-448 (2009).
6. Voigt, B., Coburger, C., Monar, J. & Hilgeroth, A.; Structure-activity relationships of novel N-acyloxy-1,4-dihydropyridines as P-glycoprotein inhibitors, *Bioorg Med Chem* 15, 5110-5113 (2007).

### Vorträge & Posterbeiträge

1. Coburger, C., Molnár, J., Lage, H., Hilgeroth, A.; Novel MDR modulators do not induce P-Glycoprotein Expression in cancer cells (*Vortrag DPhG Tagung 2007*)
2. Coburger, C., Baumert, C., Hilgeroth, A.; Cytotoxic evaluation of novel MDR modulators (*Poster DPhG Tagung 2007*)
3. Coburger, C., Lage, H., Hilgeroth, A.; Cancer cell screening for ABC transporters (*Poster DPhG Tagung 2008*)
4. Coburger C., Wollmann J., Richter M., Hilgeroth A.; Application of Non-Substrate Transmembrane Efflux Pump Inhibitors with Potential Benefit for Combined Antiretroviral Therapies (*Poster SFB-Tagung Wien 2008*)
5. Coburger, C., Baumert, C., Wollmann, J., Lage, H., Molnár J., Hilgeroth A.; Selectivity profiling of novel MDR modulators (*Poster DPhG Tagung 2009*)
6. Otto, M., Coburger, C., Baumert, C., Krug, M., Hilgeroth, A.; 2-Pyridone als neue small-sized MDR-Modulatoren (*Poster DPhG Tagung 2009*)
7. Coburger, C., Baumert, C., Molnár J., Lage, H., Hilgeroth A.; Pharmacological Profiling of Novel HIV-1 Protease Inhibitors as Effective P-Glycoprotein Inhibitors for Combined Antiretroviral Therapies (*Poster Welt-AIDS Konferenz Wien 2010*)

## Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich gemäß §5 (2) b und (2) c der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften der Martin-Luther-Universität, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegeben Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Ich erkläre ferner, dass diese Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form bisher keiner anderen Prüfbehörde zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt wurde.