

UNTERSUCHUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON
INHIBITOREN DES P-GLYKOPROTEINS ZUR
ÜBERWINDUNG DER MULTIDRUG RESISTANCE

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 Herrn Tobias Brandt

geb. am 29.03.1977 in Bad Frankenhausen

Gutachter

1. Prof. Dr. A. Langner

2. Prof. Dr. W. Sippl

3. Prof. Dr. G. Ecker

Halle (Saale), 20.02.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000014046

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014046>]

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis.....	I
	Abkürzungsverzeichnis.....	III
	Abbildungsverzeichnis.....	V
	Tabellenverzeichnis.....	VII
1	Einleitung	1
2	Aufgabenstellung	3
3	Grundlagen	4
3.1	Prinzipien der Resistenzbildung.....	4
3.2	Multidrug Resistance.....	5
3.3	Stofftransport im Körper.....	6
3.4	Die Superfamilie der SLC-Transporter.....	7
3.5	Die Superfamilie der ABC-Transporter.....	8
3.5.1	Das P-Glykoprotein.....	11
3.5.2	Das multidrug resistance associated protein (MRP).....	16
3.5.3	Das mitoxantrone resistance protein.....	19
3.6	Modulation der MDR.....	20
3.6.1	MDR-Modulatoren.....	21
3.6.2	Struktur-Wirkungs-Beziehungen von MDR-Modulatoren.....	24
4	Materialien und Methoden	27
4.1	Methoden.....	27
4.1.1	Zellkultur.....	27
4.1.2	Western-Blot-Analyse.....	28
4.1.2.1	Probenvorbereitung.....	28
4.1.2.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	28
4.1.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	29
4.1.2.4	Proteintransfer durch Western-Blot.....	29
4.1.2.5	Detektion mit spezifischen Antikörpern.....	29
4.1.3	Bestimmung der Zellzahl.....	30
4.1.4	Testung auf Zytotoxizität und P-gp modulatorische Wirkung.....	31
4.1.4.1	Der Kristallviolett-Test.....	32
4.1.4.2	Der Neutralrot-Test.....	33
4.1.4.3	Der Sulforhodamin B-Test.....	34

4.1.4.4	Der MTT-Test.....	35
4.1.4.5	Berechnung der Wirkwerte.....	36
4.1.4.5.1	Der modulatorische Quotient.....	36
4.1.4.5.2	Fold Reversal.....	37
4.1.4.5.3	Berechnung der IC50.....	37
4.1.4.6	Durchflusszytometrische Bestimmungen.....	38
4.2	Materialien.....	40
4.2.1	Chemikalien.....	40
4.2.2	Zellkulturmedium, Supplements.....	41
4.2.3	Lösungen.....	42
4.2.4	Geräte.....	44
4.2.5	Statistik.....	46
4.2.6	Software.....	46
5	Ergebnisse.....	47
5.1	Ergebnisse der Western-Blot-Analysen.....	47
5.2	Voruntersuchungen.....	48
5.2.1	Zellzahl.....	48
5.2.2	Lösungsmittelkonzentration.....	49
5.3	Ergebnisse der Zytotoxizitätstests.....	50
5.3.1	Vergleich von Kristallviolett-Test und MTT-Test.....	50
5.3.2	Vergleich der Vitalfärbungstests.....	55
5.3.3	Darstellung der Ergebnisse.....	56
5.3.4	Struktur-Wirkungs-Beziehungen.....	63
5.3.4.1	Lipophiles Grundgerüst.....	63
5.3.4.2	Linker.....	67
5.3.4.3	Basische Reste	70
5.3.4.4	Vergleichssubstanzen.....	73
5.4	Modulatorischer Quotient und Fold Reversal.....	74
5.5	FACS-Analysen.....	75
6	Diskussion.....	76
7	Zusammenfassung.....	84
8	Literaturverzeichnis.....	87

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Å	Angström
ABC	ATP Binding Cassette
ABCP	ABC Transporter in Placenta
Ac	Acetyl
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
a[Bn]	Benzo-anneliert
c[Bn]	Benzo-anneliert
Bu(ac)	Butyryl
Bzl	Benzoyl
bzw.	beziehungsweise
CaCo2	Humane Kolonkarzinomzellen
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CHO	Chinese Hamster Ovary
cMOAT	canalicular Multispecific Anion Transporter
CYP	Cytochrom P 450
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FAR	Fluorescence Activity Ratio/ Fluoreszenz-Aktivitäts-Verhältnis
FBS	Fötale-Kälber-Serum
FR	Fold Reversal
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scattered light)
g	Erdbeschleunigung
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IC10	Konzentration, bei der 10 % der Zellen nicht überlebten
IC50	Halbmaximale Inhibitorische Konzentration
kDa	Kilodalton
KHP	Krebs-Hepes-Puffer
LLC-MDR1	Nierenepithelzelle vom Schwein, die humanes P-gp exprimiert
LLC-PK1	Nierenepithelzelle vom Schwein

LRP	Lung Resistance related Protein
M	Molar
m-RNS	messenger Ribonukleinsäure
mA	Milliampere
MCT	Monocarbonsäuretransporter
MDR	Multidrug Resistance
ml	Milliliter
MQ	modulatorischer Quotient
MRP	multidrug resistance associated protein
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MXR	mitoxantron resistance protein
NBD	Nukleotid-Bindende-Domäne
NKI	Nederlands Kanker Instituut
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OCT	Organischer-Kationen-Transporter
P-gp	P-Glykoprotein
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pH	potentia hydrogenii
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Prop(ac)	Propionyl
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPGP	Sister of P-gp
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scattered light)
TAP1/2	Transporter associated with antigen processing
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung / Tween
TM	Transmembranäre Helix
TMD	Transmembranäre Domäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
V	Volt
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Resistenzmechanismen der Zelle.....	4
Abbildung 2: Modellhafte, zweidimensionale Darstellung von P-gp.....	12
Abbildung 3: Modell des Stofftransports durch das P-Glykoprotein.....	13
Abbildung 4: Modell für die Substratbindung in P-gp.....	14
Abbildung 5: Schematische Darstellung von P-gp (Draufsicht).....	15
Abbildung 6: Schematische Darstellung von P-gp, MRP1 und MXR	19
Abbildung 7: Strukturformeln einiger ausgewählter MDR-Modulatoren.....	22
Abbildung 8: Pharmakophormodell der Verapamil-Bindungstasche.....	25
Abbildung 9: Pharmakophor-Modell der Hoechst 33342- Bindungstasche.....	25
Abbildung 10: Kristallviolett.....	32
Abbildung 11: Neutralrot.....	33
Abbildung 12: Sulforhodamin B.....	34
Abbildung 13: Umsetzung von MTT zum Formazan.....	35
Abbildung 14: Western-Blot Nachweis von P-Glykoprotein.....	47
Abbildung 15: Bestimmung der optimalen Zellzahl für die Zytotoxizitätstests.....	48
Abbildung 16: Überlebensfähigkeit von LLC-MDR1 Zellen bei unterschiedlichen DMSO Konzentrationen.....	49
Abbildung 17: Überlebensfähigkeit von LLC-MDR1-Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen Vincristinsulfat.....	53
Abbildung 18: Ermittlung von $IC_{50_{TOX}}$ und $IC_{50_{MOD}}$ von Verapamil mit dem Kristallviolett-, Neutralrot- bzw. dem Sulforhodamin B-Test.....	55
Abbildung 19: Einfluss des Phenothiazingrundkörpers auf die Wirksamkeit der 4-Methylpiperazin-Derivate.....	64
Abbildung 20: Einfluss der übrigen Grundstrukturen auf die Wirksamkeit der 4-Methylpiperazin-Derivate.....	65
Abbildung 21: Einfluss der übrigen Grundstrukturen auf die Wirksamkeit der 4-(Diphenylpentyl)-piperazin-Derivate.....	66
Abbildung 22: Einfluss des Linkers auf die Wirksamkeit der Phenothiazine mit 4-Methylpiperazin-Rest.....	67
Abbildung 23: Einfluss der Linkerlänge bei verschiedenen Phenothiazin- grundkörpern mit MP-Rest.....	68
Abbildung 24: Einfluss der übrigen Grundkörper mit konstantem C ₄ - bzw. -OC ₃ Linker auf die Wirksamkeit der 4-Methylpiperazin- und 4-(Diphenyl- pentyl)-piperazin-Derivate.....	68

Abbildung 25: Einfluss des basischen Restes auf die Wirksamkeit des Phenothiazin-Grundkörpers.....	70
Abbildung 26: Einfluss des basischen Restes auf die Wirksamkeit des 4,5-Diphenyl-1,3- dioxolan-Grundkörpers.....	71
Abbildung 27: Vergleich der Wirkung des 4-Methylpiperazin-Rests und des 4-(Diphenylpentyl)piperazin-Rests auf verschiedene Grundkörper.....	72
Abbildung 28: Vergleichssubstanzen.....	73
Abbildung 29: Strukturformeln der verwendeten Vergleichssubstanzen.....	73
Abbildung 30: Modellhafter Aufbau und durch Untersuchungen ermittelte optimale Eigenschaften der Modulatoren	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tabelle mit ausgewählten SLC-Transportern und ihren Liganden.....	7
Tabelle 2: Familie der ABC-Transporter: Kurzübersicht Subfamilien und Liganden.....	9
Tabelle 3: Übersicht über die drei ABC-Transporter-Subfamilien die vor allem mit der Entstehung von MDR in Verbindung gebracht werden.....	10
Tabelle 4: Erstantikörper	30
Tabelle 5: Übersicht über getestete Verbindungen und deren ermittelte Wirkwerte (MTT-Test) nach Ungvari.....	50
Tabelle 6: Übersicht über die getesteten Verbindungen inkl. Referenzen und die ermittelten Wirkwerte (Kristallviolett).....	54
Tabelle 7: Übersicht über die FAR-Werte der am Durchflusszytometer vermessenen Substanzen.....	62
Tabelle 8: Ergebnisse des Vergleiches aller Substanzen mit dem Hoechst 33342-Pharmakophormodell.....	80
Tabelle 9: Ergebnisse des Vergleiches aller Substanzen mit dem Verapamil-Pharmakophormodell.....	81

1 Einleitung

Bei der Chemotherapie zur Behandlung von malignen Tumoren beobachtet man sehr häufig das Auftreten von Kreuzresistenzen gegen viele strukturell nicht verwandte Substanzen. Dieses Phänomen der Multidrug Resistance (MDR) wurde das erste Mal Anfang der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts von *Keld Danø* beschrieben [Danø 1973]. Dafür verantwortlich zeigte sich ein 170 kDa großes Membranprotein, das die Permeabilität der Zellmembran veränderte, weshalb es den Namen P-Glykoprotein (P für permeability) erhielt [Juliano; Ling 1976]. Neben dem P-Glykoprotein (P-gp) sind heute eine Reihe weiterer Transportproteine bekannt, die für die Ausbildung körpereigener Resistenzen gegen Zytostatika, Antibiotika sowie HIV-Protease- und ReverseTranskriptase-Inhibitoren verantwortlich sind. Die MDR stellt somit als limitierender Faktor bei der Behandlung mit diesen Arzneistoffen eines der Hauptprobleme für eine erfolgreiche Therapie dar [Kartner et al. 1983]. Die Ursache für MDR ist hauptsächlich in der Überexpression von transmembranären sowie zellulären Transportsystemen zu sehen. Diese so genannten Effluxpumpen sind in der Lage, Xenobiotika unter Energieverbrauch aus den Zielzellen in den Extrazellularraum zu transportieren, was teilweise auch schon während der Diffusion von Substanzen durch die Zellmembran geschieht. In der Folge sinkt die Konzentration applizierter Pharmaka unter die wirksame Dosis, so dass sie für eine effektive Therapie nicht mehr ausreicht. Die für den Transport notwendige Energie wird durch Hydrolyse von ATP (Adenosintriphosphat) zur Verfügung gestellt [Horio et al. 1988] für die beteiligten Proteine eine charakteristische Bindungsstelle besitzen. Deshalb werden sie in der Gruppe der ABC-Transporter (ATP binding cassette) zusammengefasst [Walker et al. 1982]. Sie sind im Organismus weit verbreitet, werden aber besonders stark in Tumorzellen exprimiert.

Zwar sind die Transporter sättigbar, allerdings führen Dosiserhöhungen hier eher zu steigenden Nebenwirkungen als zum gewünschten Effekt, da das therapeutisch vertretbare Maß häufig überschritten wird. So ist es unter anderem Ziel der heutigen Forschung, Möglichkeiten zu finden die Transportprozesse zu beeinflussen, um die MDR zu überwinden und Resistenzentwicklungen einzugrenzen.

Zahlreiche unterschiedliche Arzneistoffe verfügen über gute MDR-modulatorische Eigenschaften bei *in vitro* Anwendung. Problematisch ist dagegen der Einsatz *in vivo*, da

die eigentliche Hauptwirkung der Pharmaka nun als unerwünschte Nebenwirkung auftritt. Hinzu kommt, dass eine Hemmung von Transportprozessen hoher Plasmaspiegel bedarf, die aber das vom Organismus tolerierte Maß an Arzneistoff überschreiten.

Aus diesen so genannten Modulatoren der I. Generation wurden durch strukturelle Modifikationen und Verwendung weiterer, neuartiger Strukturen Modulatoren der II. und III. Generation entwickelt, die sich durch eine deutlich verbesserte Wirksamkeit und verringerte Nebenwirkungen auszeichnen [Liskovitch; Lavie 2002]. Trotz intensiver Bemühungen sind bis heute keine Arzneistoffe mit MDR-modulatorischer Wirkung auf dem Markt, so dass weitere Untersuchungen und Forschungsarbeit nötig sind.

2 Aufgabenstellung

In der letzten Zeit sind für die Wirkstoffentwicklung P-Glykoprotein und verwandte ABC-Transporter im Zusammenhang mit der Zytostatika-Resistenz und Arzneistoff-Interaktionen außerordentlich interessant geworden. Die vorliegende Arbeit soll sich in diese Forschungsrichtung einordnen und einen Beitrag zur Entwicklung und Charakterisierung entsprechender MDR-Modulatoren leisten.

Am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität wurde in der Arbeitsgruppe *Dr. Schmidt / Prof. Büge* eine Reihe potentieller Wirkstoffe zur MDR-Modulation synthetisiert [Schmidt et al. 2002]. Ein Teil der Verbindungen mit Phenothiazin-Grundstruktur wurde bereits untersucht und Struktur-Wirkungs-Beziehungen konnten abgeleitet werden [Escobar Castillo 2000]. Neben den Phenothiazinen erfolgte die Synthese von Strukturen mit Hydantoin-, Carbazol- und Iminostilben-Grundkörpern sowie die Darstellung von neuartigen 1,3-Dioxolan- und 1,3-Dioxan-Derivaten [Ungvari 2005]. Die Zielstellung dieser Arbeit bestand in der Testung und Charakterisierung sämtlicher synthetisierter Verbindungen hinsichtlich ihrer MDR-modulatorischen Wirksamkeit, wobei die Phenothiazin-Derivate im Vordergrund standen.

Im Einzelnen ergaben sich folgende Teilaufgaben:

1. Die zentrale Aufgabe war die Testung der neu synthetisierten Verbindungen an einem geeigneten biologischen Testmodell und die Ermittlung der entsprechenden Wirkungsstärken.
2. Dafür musste zunächst ein geeignetes biologisches Testmodell gefunden und charakterisiert werden. Das beinhaltete die Auswahl und Testung einer geeigneten Zellkultur, die entsprechende Transport-Moleküle exprimiert.
3. Für die Ermittlung des MDR-modulatorischen Potentials wurden geeignete Zytotoxizitätstests verwendet und ihre Eignung als sichere Screeningmethode geprüft. Dazu gehörte auch die Auswahl und Verwendung eines Auswertesystems, mit dem vergleichbare Wirkwerte bestimmbar waren.
4. Auf der Basis der Wirkwerte und der vorliegenden Daten zu den Strukturen ergab sich die Fragestellung, ob durch Struktur-Wirkungs-Analysen eine optimale Molekülstruktur beschrieben werden kann, die zur weiteren Aufklärung der Struktur von Transportmolekülen beiträgt sowie die Beschreibung von Pharmakophoren zulässt.

3 Grundlagen

3.1 Prinzipien der Resistenzbildung

Resistenzentwicklungen gehören seit jeher zum natürlichen Entwicklungsprozess von Organismen, ohne den deren Überleben nicht möglich wäre. Das gerade in den letzten Jahren vermehrte Auftreten von multiresistenten Bakterienstämmen, das für viele Krankenhäuser eine ernsthafte Bedrohung darstellt, oder die abnehmende Wirkung von Arzneimitteln gegen Malariaerreger sind nur zwei Beispiele dafür. Auch bei der Krebschemotherapie stellt die zunehmende Resistenz von Tumoren gegen die eingesetzten Zytostatika ein ernstes Problem dar. Auf diese Verstärkung von körpereigenen Mechanismen zur Entfernung von Xenobiotika soll aufgrund der Zielstellung der Arbeit näher eingegangen werden. Auch wenn die molekularen Mechanismen, mit denen diese Resistenzen erreicht werden, bislang nur unzureichend verstanden werden [Rieger et al. 2000], sind die Möglichkeiten, derer sich Tumorzellen bedienen, vielfältig [Gottesmann et al. 2002].

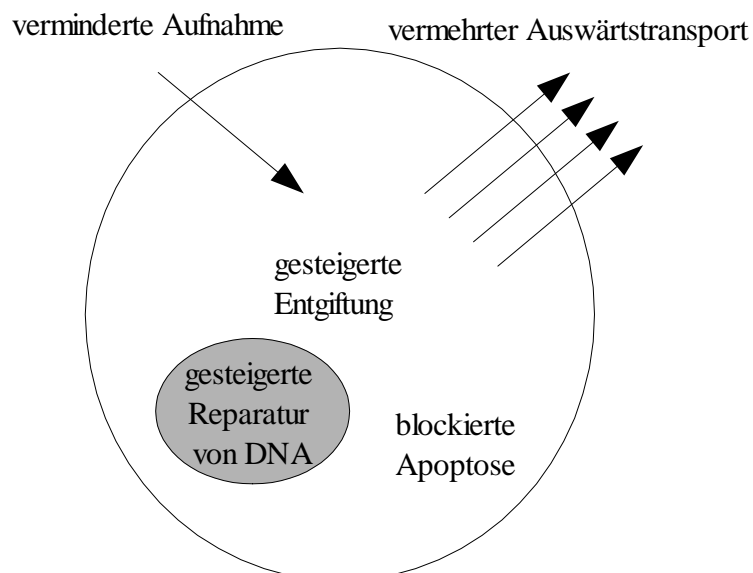


Abbildung 1: Resistenzmechanismen der Zelle nach Gottesman et al. [Gottesman et al. 2002]

So können zum Beispiel Xenobiotika und damit auch zur Chemotherapie eingesetzte Arzneistoffe eine Veränderung des Stofftransports durch die Zellmembran in die Zelle induzieren und somit ihr eigenes Eindringen erschweren. Des Weiteren kommen Defekte in den Apoptosesignalwegen oder ein Missverhältnis zwischen pro- und

antiapoptotischen Proteinen für eine Resistenz gegen strahlen- und / oder zytostatika-induzierte Apoptose in Frage. Ein weiterer Faktor kann die gesteigerte Funktion von DNA-Reparaturmechanismen oder Induktion von Enzymen zur Zytostatikametabolisierung sein.

Der bisher am ausgiebigsten untersuchte Resistenzmechanismus beruht auf der Expression von Membran-Effluxpumpen, den so genannten Multidrug-Transportern, die Substanzen unter Verbrauch von ATP gegen ein starkes Konzentrationsgefälle aus der Zelle entfernen. Die wichtigsten Vertreter der in der Gruppe der ABC-Transporter zusammengefassten Moleküle sind das P-Glykoprotein (P-gp), die multidrug resistance associated proteins (MRP) und das mitoxantron resistance protein (MXR).

3.2 Multidrug Resistance

Seit über 30 Jahren ist das Phänomen der Multidrug Resistance mittlerweile bekannt. Dessen Hauptursache ist die vermehrte Expression von körpereigenen, membranständigen Transportern, die unter Energieverbrauch in der Lage sind, ein breites Spektrum von Fremdstoffen gegen ein Konzentrationsgefälle aus Zellen oder Zellmembranen zu entfernen. Ihnen allen ist gemein, dass sie die zum Transport benötigte Energie aus der Hydrolyse von ATP gewinnen. Deshalb werden sie in der Familie der ABC-Transporter (ATP binding cassette) zusammengefasst. Als Folge dieses Transports sinken die Gewebe- und Plasmakonzentrationen der betroffenen Arzneistoffe auf ein unzureichendes Niveau, was häufig das Ende von notwendigen Therapien bedeutet. Auf den nächsten Seiten soll auf Transportvorgänge im allgemeinen und relevante Transporterfamilien, insbesondere die ABC-Transporter-Superfamilie, im speziellen eingegangen werden.

3.3 Stofftransport im Körper

Für den vielfältigen Stoffaustausch zwischen ihren Kompartimenten und besonders für den Austausch mit ihrer Umgebung verfügen Zellen je nach Art in ihren Biomembranen über zahlreiche Transportsysteme. Einige besonders kleine Moleküle wie Wasser oder Sauerstoff können Biomembranen durch freie Diffusion durchqueren. Im Gegensatz dazu steht der spezifische Transport, bei dem ganz bestimmte Moleküle oder Ionen durch ganz bestimmte Membranen transportiert werden.

Der spezifische Transport lässt sich durch bestimmte Kriterien von der freien Diffusion unterscheiden: - er ist um ein Vielfaches schneller

- er erfolgt über bestimmte in der Zellmembran integrale Transporter
- er ist substratspezifisch und absättigbar
- er ist häufig durch Analoga oder „Gifte“ hemmbar.

Prinzipiell existieren zwei unterschiedliche Formen für den spezifischen Transport: die katalysierte Diffusion, die ohne Energieverbrauch entlang eines Konzentrationsgefälles geschieht, und der aktive Transport, der Energie benötigt. Für beide Mechanismen gibt es die Möglichkeit, dass ein Molekül / Ion allein transportiert wird (Uniport) oder dass zwei verschiedene Moleküle gemeinsam in gleicher Richtung (Symport) oder in entgegengesetzter Richtung (Antiport) transportiert werden.

Der aktive Transport wird noch einmal unterschieden in primär aktiven Transport und sekundär aktiven Transport. Beim primär aktiven Transport erfolgt die Kopplung von Transport und Energieverbrauch direkt und stöchiometrisch. Dabei wird die benötigte Energie im Großteil aller Fälle durch Hydrolyse von ATP gewonnen. Eine weitere Möglichkeit ist die Ausnutzung von Redoxpotentialen, was allerdings nur in der Atmungskette, bzw. bei der Photosynthese der Fall ist.

Beim sekundär aktiven Transport erfolgt die Kopplung von Transport und Energieverbrauch indirekt, aber ebenfalls stöchiometrisch. Dabei gelangen die zu transportierenden Moleküle / Ionen mittels Symport oder Antiport mit H^+ bzw. Na^+ in die Zelle. Die hierfür benötigte Energie liefern elektrochemische Potentiale von H^+ - bzw. Na^+ -Gradienten, welche durch primär aktiven Transport aufgebaut worden sind. Die meisten für den spezifischen Transport verantwortlichen Proteine lassen sich in zwei Superfamilien einteilen, die „solute Carrier“ (SLC)-Familie und die „ATP binding cassette“ (ABC)-Familie.

3.4 Die Superfamilie der SLC-Transporter

Zur Zeit sind 298 Gene für die Familienmitglieder der SLC-Familie identifiziert [Hediger et al. 2004], 48 dagegen für ABC-Transporter [Dean 2002].

Von den momentan bekannten 43 Familien der SLC-Transporter sind ganze drei für den intrazellulären Stofftransport zuständig. Von den Übrigen in der Plasmamembran lokalisierten werden wiederum nur wenige mit dem Transport von Arzneistoffen in Verbindung gebracht. So zum Beispiel der Organische Kationentransporter oder der Organische Anionen- und Kationentransporter. Andere Mitglieder der SLC-Familie transportieren beispielsweise Aminosäuren (SLC 1, 3 und 7), Gallensalze (SLC 10) oder Zucker (SLC 5).

Tabelle 1: Tabelle mit ausgewählten SLC-Transportern und ihren Liganden [Hediger et al. 2004]

<i>Unterfamilie</i>	Anzahl der Transporter	Name	Liganden
SLC3	A1,A2	Aminosäuretransporter (neutral)	L-Dopa
SLC7	A1-A14	Aminosäuretransporter (kationisch)	
SLC15	A1-A4	Oligopeptid- und H ⁺ /Peptidtransporter	ACE-Hemmer, β -Lactamantibiotika
SLC16	A1-A14	Monocarbonsäuretransporter (MCT)	Benzoessäure, kurzkettige Fettsäuren, Milchsäure
SLC21/SLCO	A1-A11	Organischer Anionentransporter (OAT)	β -Lactamantibiotika, Fexofenadin, Prostaglandine
SLC22	A1-A18	Organischer Anionen- und Kationentransporter	Penicilline, Verapamil, Chinidin, Dopamin

3.5 Die Superfamilie der ABC-Transporter

Aus der Superfamilie der ABC-Transporter sind heute 48 Mitglieder bekannt, die sich auf sieben Unterfamilien aufteilen. Damit stellen sie die größte bekannte Gruppe von Membrantransportern dar [Dean 2002]. Diese Proteine gewinnen die für den Transport zahlreicher Stoffe durch die Zellmembran notwendige Energie durch Hydrolyse von ATP [Horio et al. 1988]. Die Klassifizierung als ABC-Transporter erfolgt aufgrund der Sequenz und Anordnung ihrer ATP-Bindungsstellen, die auch als Nukleotid-Bindungs-Domänen (NBD) bezeichnet werden. Die NBD enthalten charakteristische Abschnitte, die Walker A und Walker B genannt werden. Zwischen ihnen besteht ein Abstand von 90-120 Aminosäuren. Außerdem existiert bei den meisten Transportern zwischen Walker A und B ein dritter charakteristischer Abschnitt, die C-Region. Ein funktionierendes Protein ist typischerweise aus zwei NBD und zwei Transmembranären-Domänen (TMD) aufgebaut. Die Transmembranären-Domänen bestehen aus 6-11 in die Membran eingebetteten α -Helices und sorgen für Substratspezifität. Die hydrophilen NBD ragen in das Zytoplasma und übertragen die Energie, die benötigt wird, um Substrate durch die Zellmembran zu transportieren.

Die meisten bekannten ABC-Transporter funktionieren nur in eine Richtung. So sind sie in Bakterien in erster Linie für die Versorgung der Zellen mit essentiellen Verbindungen wie Zucker oder Vitaminen zuständig, da diese nicht über Diffusion aufgenommen werden können [Dean 2002]. In eukariotischen Zellen dagegen besteht ihre Aufgabe unter anderem darin, Substanzen aus dem Zytoplasma in den Interzellularraum oder in intrazelluläre Kompartimente wie Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum oder Peroxisomen zu befördern. Die ABC-Transporter treten entweder als Volltransporter mit zwei Transmembranären-Domänen und zwei Nukleotid-Bindungs-Domänen oder als Halbtransporter mit je nur eine TMD und einer NBD auf. Halbtransporter müssen Homo- oder Heterodimere formen um zu funktionieren. Die ATP-Bindungs-Kassette, die sich aus den beiden NBD formt, ist bei allen Mitgliedern der ABC-Transporter-Familie zu 30-50 % identisch. Diese hoch konservierten Bereiche lassen vermuten, dass die meisten Gene für diese Transporter seit Beginn der eukariotischen Evolution existieren. Die Einteilung in Unterfamilien erfolgt für die ABC-Transporter je nach Genstruktur, Ähnlichkeiten in den Sequenzen von NBD und TMD sowie deren Anordnung im Molekül. Eine kurze Übersicht über die Familie der ABC-Transporter gibt *Tabelle 2*.

Tabelle 2: Familie der ABC-Transporter: Kurzübersicht Subfamilien und Liganden
[Dean 2002]

<i>Symbol der Unterfamilie</i>	Bezeichnung der Transporter	<i>Liganden</i>
A	A1-10, A12-13	Estramustin, Lipide
B	B1-B11	Steroide; lipophile, basische Substanzen
C	C1-C12	anionische Konjugate z. B. mit Glutathion, Sulfat, Gallensäuren
D	D1-D4	langkettige Fettsäuren
E	E1	
F	F1-F3	
G	G1-G5, G8	Chemotherapeutika

Ein bekanntes Beispiel für einen in Säugetieren vorkommenden ABC-Transporter ist das Mukoviszidose-assoziierte CFTR-Protein (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) [Riordan et al. 1989]. Als Vertreter für intrazelluläre Transporter sind die am Golgi-Apparat befindlichen Halbtransporter TAP1 und TAP2 (transporter associated with antigen processing) [Trowsdale et al. 1990], die Peptide zur Antigenpräsentation in das endoplasmatische Retikulum transportieren [Higgins 1992], sowie das LRP (lung resistance related protein) zu nennen. Dieses, im Vergleich zu anderen Vertretern der ABC-Transporter relativ wenig erforschte Protein, ist in der Membran des Zellkerns lokalisiert, wo es aktiv Substanzen in das Zytoplasma befördert [Scheper et al. 1993]. Im Mittelpunkt des Interesses steht das P-Glykoprotein, das Proteinprodukt des MDR-1 Genes. Es ist wie die multidrug resistance associated Proteine (MRP) ein transmembranärer Transporter, der den Efflux von Xenobiotika aus der Zelle in den Extrazellularraum bewirkt. P-gp ist in der Lage, Stoffe noch vor ihrem Eintritt in die Zelle aus der Zellmembran zu entfernen.

Das „Schwesterprotein von P-gp“ (SPGP), welches erst vor wenigen Jahren charakterisiert wurde, zeigt zu gut 50 % Homologie mit der Sequenz des humanen MDR1-Genes [Gerloff et al. 1998]. Es ist für den Transport von Gallensalzen innerhalb der Hepatozyten verantwortlich.

Ein weiteres vor relativ kurzer Zeit entdecktes Protein ist MXR (mitoxantrone resistance protein), welches beinahe zeitgleich von drei Forschergruppen entdeckt wurde. *Doyle et al.* identifizierten es als BCRP (breast cancer resistance protein) bei der Untersuchung einer Multidrug-resistenten Brustkrebszelllinie, deren Resistenz nicht auf P-gp zurückzuführen war [Doyle et al. 1998]. Kurze Zeit später entdeckten *Allikmets et al.* MXR in der Plazenta und nannten es deshalb ABCP (ABC transporter in placenta) [Allikmets et al. 1998], während es am National Cancer Institute aus der stark Mitoxantron-resistenten Kolon-Karzinom-Zelllinie S1-M1-80 geklont wurde [Miyake et al. 1999]. MXR ist ein Halbtransporter, dessen Aufbau vom für ABC-Transporter Üblichen abweicht. Die Nukleotid-Bindungs-Domäne ist hier vor der

Tabelle 3: Übersicht über die drei ABC-Transporter-Subfamilien die vor allem mit der Entstehung von MDR in Verbindung gebracht werden [Litman et al. 2001]

Unterfamilie	HUGO Symbol	Synonym	Aminosäuren	Vorkommen	wichtige Substrate
MDR1	ABCB1	P-gp, PGY1	1280	Nebennierenrinde, renaler Tubulus, Blut-Hirn-Schranke, apikale intestinale Membran	zahlreiche lipophile und amphiphile Substanzen
MRP1	ABCC1	MRP, GS-X	1531	Lunge, Hoden, basolaterale Membranen, ubiquitär	organische Anionen, Glutathion-Konjugate (LTC ₄)
MRP2	ABCC2	cMOAT	1545	Leber, Intestinum, Nieren, apikale Membranen	organische Anionen, Cisplatin, Glucuronide (Bilirubin)
MRP3	ABCC3	cMOAT2, MLP2, MOAT-D	1527	Leber, Kolon, Pankreas, basolaterale Membranen	Glucuronide, Gallensalze, Methotrexat
MRP4	ABCC4	MOAT-B	1325	Prostata, Lunge, Pankreas, Hoden, Eierstöcke, Gallenblase, basolaterale Membranen	organische Anionen, Nukleosidanaloga
MRP5	ABCC5	SMRP, MOAT-C	1437	ubiquitär, basolaterale Membranen	organische Anionen, Nukleosidanaloga, Glutathion-Konjugate
MXR	ABCG2	BCRP/ABCP	655	Plazenta, Leber, Intestinum apikale Membranen	Mitoxantron, zahlreiche andere lipophile und amphiphile Substanzen

Transmembranären-Domäne angeordnet. *Tabelle 3* gibt einen kurzen Überblick über die drei Subfamilien der ABC-Transporter, die mit der Ausbildung der Multidrug Resistance in Verbindung gebracht werden.

Anhand der unterschiedlichen Benennung der Transporter, welche am Beispiel des MXR deutlich wird, das laut Human Gene Nomenclature Committee als ABCG2 bezeichnet wird, ist ersichtlich, dass die einheitliche Nomenklatur und Einteilung der ABC-Transporter notwendig und wünschenswert ist, auch wenn das noch nicht immer umfassend gelingt. Von den bis heute bekannten Genen für ABC-Transporter sind beim Menschen und bei Nagern drei in beinahe allen multidrug-resistenten Tumorzellen zu finden, P-gp, MRP1 und MXR [Dean 2002]. Die Transporter, die sie codieren, sollen im Folgenden näher charakterisiert werden.

3.5.1 Das P-Glykoprotein

P-Glykoprotein, das bekannteste Mitglied der ABC-Transporter-Superfamilie, ist ein Plasmamembranprotein, das erstmals 1976 von Ling und Mitarbeitern in multidrug-resistenten CHO (chinese hamster ovary) Zellen charakterisiert wurde [Juliano; Ling 1976]. Es zeigte sich, dass dieses Protein in der Lage ist, Zytostatika über einen ATP-verbrauchenden Mechanismus aus Tumorzellen zu entfernen und damit die intrazelluläre Konzentration auf ein untoxisches Maß zu senken. Die Palette der transportierten Zytostatika reicht von Anthracyclinen über Vincaalkaloide und Podophyllotoxine bis zu Taxanen. Des Weiteren akzeptiert P-gp auch HIV-1 Protease-Inhibitoren wie Ritonavir und Saquinavir [Lee et al. 1998] oder Fluorophore wie Calcein-AM [Holló et al. 1994] und Rhodamin 123 [Kessel et al. 1991] als Substrate. *Loo und Clarke* vermuten den Grund für die strukturelle Vielfalt der transportierten Substrate in der Existenz mehrerer Bindungsstellen im Molekül und der Möglichkeit des Proteins seine Konformation und damit seine Transporteigenschaften zu ändern [Loo; Clarke 1997].

Im menschlichen Organismus wurden bisher zwei MDR-Gene gefunden, MDR1 und MDR3 [Roninson et al. 1986]; [Van der Bliek et al. 1987]. In Mäusen hingegen sind drei Gene, *mdr1a*, *mdr1b* und *mdr2*, bekannt [Croop et al. 1989], von denen *mdr1a* und *mdr1b* in weiten Teilen dem humanen MDR1-Gen entsprechen. Über das humane MDR3 und das murine *mdr2* Gen sind bisher kaum Untersuchungen angestellt worden. Allerdings ist bekannt, dass die von ihnen kodierten Proteine eine Rolle beim Transport

von Phosphatidylcholin spielen [Ruetz; Gros 1994]; [van Helvoort et al. 1996].

Das Genprodukt des Multidrug Resistance Gens MDR1 ist das 170 kDa schwere P-Glykoprotein. Wie für ABC-Transporter beschrieben, ist es aus zwei Hälften, von denen jede aus sechs transmembranären α -Helices und einer ATP-Bindungsstelle besteht, aufgebaut. Beide Hälften weisen 43 % Sequenzhomologie untereinander auf und sind durch die für ABC-Transporter charakteristische Linker-Region miteinander verknüpft. An der ersten extrazellulären Schleife befinden sich drei Glykosylierungsstellen [Chen et al. 1986]. Insgesamt besteht P-gp aus 1280 Aminosäuren. Die beiden intrazellulären Nukleotid-Bindungs-Stellen weisen die unter 3.5 bereits erwähnten charakteristischen Walker A- und Walker B-Regionen auf. Die C-Region, ein hydrophobes Dodecapeptid, stellt den Linker zwischen den beiden dar [Sauna et al. 2001].

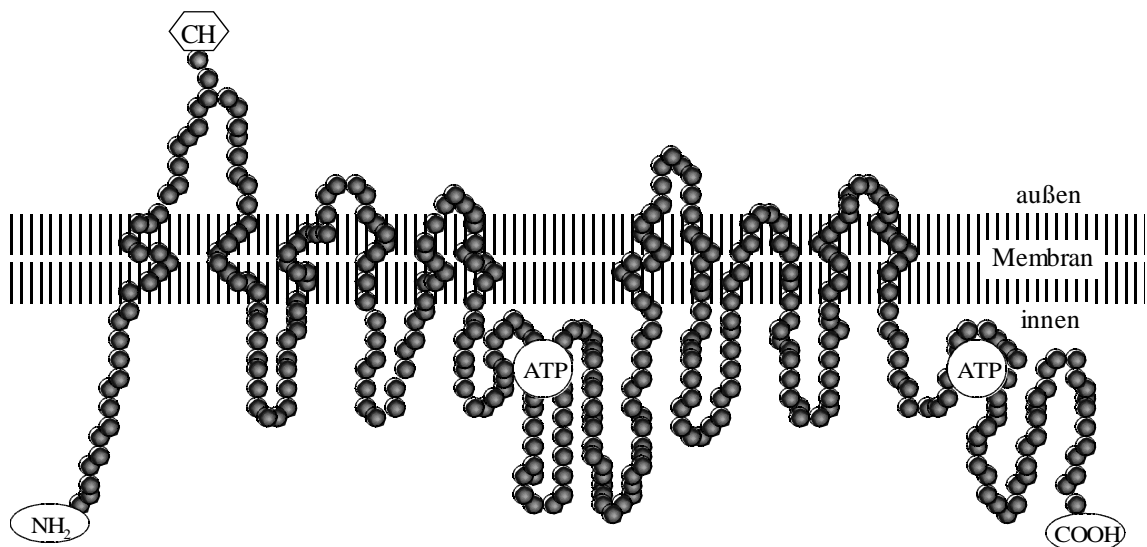


Abbildung 2: Modellhafte, zweidimensionale Darstellung von P-gp nach Wang et al. 2003

Die Energie für den Stofftransport bezieht P-gp aus der Hydrolyse von ATP. Durch die bereitgestellte Energie ist das Molekül in der Lage seine Konformation zu ändern. Diese Wandlungsfähigkeit ist essentiell für den Transport zahlreicher, strukturell völlig unterschiedlicher Stoffe. Bis heute ist der Mechanismus des Stofftransportes durch P-gp nicht genau geklärt. *Callaghan et al.* veröffentlichten vor kurzem ein Modell wie sich der Ablauf des Transportmechanismus gestalten könnte [Callaghan et al. 2006].

Dafür nannten sie vier Hauptschritte:

1. Beladung von P-gp mit Substrat und ATP
2. Umschalten von hochaffinem auf niedrigaffinen Zustand zur Substratfreisetzung
3. Energieverbrauch und
4. Wiederherstellung des Ausgangszustandes.

Abbildung 5 zeigt schematisch den gesamten Transportweg als Serie von Schritten, die Konformationsänderungen und Interaktionen mit Substraten und Nukleotiden beinhalten. Jeder Schritt besteht aus einer Gleichgewichtsreaktion, wobei alle möglichen Schritte dargestellt sind (durchgezogene Linien). Die Substratbindungsstelle in den TMD kann in einer zum Zellinneren gewandten hochaffinen (H) und einer zum Extrazellärraum gewandten niedrigaffinen (L) Konformation vorliegen. Die NBD befinden sich ebenfalls in einem Gleichgewicht zwischen zwei Konformationen in denen sie einzeln (n) oder mit einander verzahnt (N) vorliegen. Das „d“ markiert den transportierten Stoff. Der bevorzugte Ablauf des Transports ist mit Pfeilen markiert und alle dabei vorkommenden Übergangszustände sind gelb unterlegt.

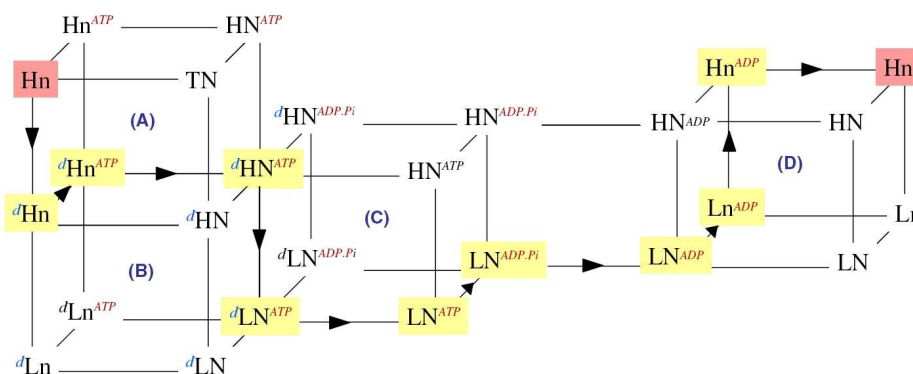


Abbildung 3: Modell des Stofftransports durch das P-Glykoprotein [Callaghan et al. 2006]

Am Beginn des Weges steht das freie Protein, ohne Substrat und ATP mit nicht verbundenen NBD und den TMD im hochaffinen Zustand (Hn). Die mit den Pfeilen markierten Linien geben den von Callaghan et al. als wahrscheinlichsten angesehenen Transportweg wieder. Würfel A gibt die Beladung von P-gp wieder, Würfel B den Wechsel von hochaffiner in die niedrigaffine Konformation, Würfel C stellt den energieverbrauchenden Schritt dar, und in Würfel D wird der Ausgangszustand wiederhergestellt.

Loo und Clarke fanden heraus, dass die transmembranären Regionen 4, 5, 6 der TMD1 und die Regionen 9, 10, 11 und 12 der TMD2 Teile zur Substratbindungsstelle beitragen [Loo; Clarke 2005]. Wobei Studien darauf hinweisen, dass P-gp über mehrere Substratbindungsstellen verfügt. So wurden Photoaffinitätsstudien durchgeführt, die darauf schließen lassen, dass bis zu vier verschiedene solcher Bindungsstellen existieren. Dabei wird vermutet, dass die Substrate unterschiedliche Bereiche während ihres Transports einnehmen oder dass jeder Substrattyp eine eigene Bindungsstelle besitzt [Dey et al. 1997]; [Shapiro; Ling 1997].

Alternativ haben andere Arbeitsgruppen QSAR (quantitative structure activity relationship) Studien durchgeführt, um eine bestimmte Region, in der P-gp verschiedene Substrate bindet, zu bestimmen [Seelig 1998]; [Wiese; Pajeva 2001]; [Ekins et al. 2002]; [Garrigues et al. 2002]. So konnten zwei sich zum Teil überlappende Pharmakophore charakterisiert werden [Garrigues et al. 2002]. Einige Substanzen, wie Verapamil, banden an die erste Stelle, während andere, wie Vinblastin, eine Affinität zur zweiten Stelle zeigten. Die Autoren postulierten dass es möglich sei, dass zwei relativ kleine Moleküle gleichzeitig binden, wogegen ein großes Substrat beide Stellen besetzen könnte.

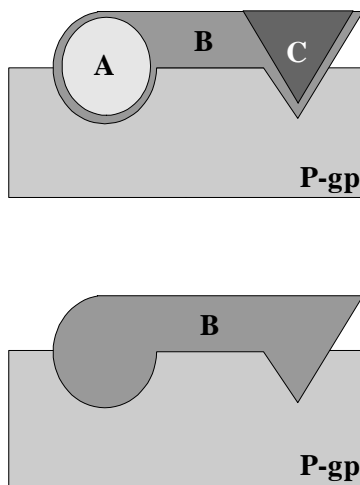


Abbildung 4: Modell für die Substratbindung in P-gp [Litman et al. 2001].

Ein relativ großes Molekül (B), wie Cyclosporin A oder PSC-833 besetzt die Bindungsstellen von zwei kleineren Molekülen (A und C). Obwohl B mit A und C um die Bindungsstelle konkurriert, muss das für A und C nicht zwangsläufig der Fall sein.

Zwei verschiedene Bindungsstellen sind nach den jeweiligen Substraten, die zu ihrer Entdeckung führten benannt, die Rhodamin123- oder Verapamil-Bindungsstelle (R-Bindungsstelle) und die Hoechst 33342-Bindungsstelle (H-Bindungsstelle) [Shapiro; Ling 1997]. Es ist aber auch denkbar, dass bedingt durch die Beweglichkeit der P-gp Bestandteile die Bindungsstellen entweder in unterschiedlichen Regionen des Moleküls oder als Teil einer großen Bindungstasche mit spezifischen einzelnen Domänen vorliegen können [Martin et al. 2000]. Zu transportierende Substanzen könnten sich dabei durch einen „Induced-fit“-Mechanismus in die Bindungsstelle einlagern. Die Poren, durch die Substrate in das Molekül eintreten, vermuten *Pleban et al.* an der Grenzfläche zwischen den beiden TMD innerhalb der Membran zwischen TM 2 (TMD1) und TM 11 (TMD2) bzw. TM 5 (TMD1) und TM 8 (TMD2) [Pleban et al. 2004].

Die Angaben über den Zustand der NBD während der Bindung von ATP sind widersprüchlich. Im Gegensatz zu *Callaghan et al.* kommen *Loo* und *Clarke* zum Schluss, dass die beiden NBD bereits ein Dimer bilden, wenn es zur Anlagerung von ATP kommt [Loo; Clarke 2005].

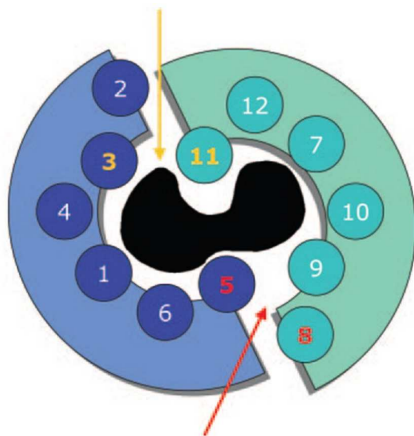


Abbildung 5: Schematische Darstellung von P-gp (Draufsicht) [Pleban et al. 2004].

Die C-terminale und die N-terminale Hälfte sind dunkel- bzw. hellblau dargestellt. Die nummerierten Kreise symbolisieren die TMs. Der gelbe und der rote Pfeil zeigen den vermuteten Weg der eintretenden Substanzen.

Fest steht, dass die NBD dimerisieren müssen, damit der Stofftransport durch P-gp stattfinden kann [Loo; Clarke 2005]; [Sauna; Ambudkar 2007]. Weiterhin wird diskutiert, wie groß der jeweilige Einfluss von ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse auf die Konformationsänderung der TMDs ist. So ist es denkbar, dass die Bindung von ATP gemeinsam mit der Einlagerung des Substrats, durch „Induced fit“, in seine Bindungsstelle deren Portale schließen könnte, wohingegen die Hydrolyse von ATP eine Umlagerung der TMs bewirken könnte, welche den Efflux des Substrats unterstützt [Loo; Clarke 2005]. Auch der Ort der Freisetzung von Substanzen aus dem P-Glykoprotein ist noch nicht aufgeklärt und wird nach wie vor widersprüchlich diskutiert. Manche Forscher gehen davon aus, dass Substrate direkt in den Extrazellularraum transportiert werden. Andere sind der Meinung, dass P-gp als eine „Flippase“ Stoffe vom inneren Teil der Lipiddoppelschicht in deren äußeren Teil transportiert [Higgins; Gottesman 1992]. Für beide Modelle gibt es experimentelle Hinweise [Omote; Al-Shawi 2002]; [Romsicki; Sharom 2001]; [Eckford; Sharom 2005].

Neben dem Cytochrom P450 spielt P-gp eine wichtige Rolle bei Metabolisierungs- und Exkretionsprozessen. Darauf lassen seine weite Verbreitung im Organismus und seine sehr breite Substratspezifität schließen [Chan et al. 2004].

Parallel zu seiner verstärkten Expression in Tumorzellen ist P-gp in zahlreichen körpereigenen Geweben zu finden. So weisen Nieren und Nebennieren hohe Konzentrationen, Leber, Dünndarm, Dickdarm und Lunge mittlere und Prostata, Haut, Milz, Herz, Skelettmuskulatur, Magen und Eierstöcke geringe Konzentrationen an P-gp auf [Fojo et al. 1987]; [Gatmaitan; Arias 1993]. Außerdem konnte es in der Plazenta und im Gehirn nachgewiesen werden. Die Lokalisation in den apikalen Membranen von exkretorischen Organen wie Leber, Darm, Nieren und in der Blut-Hirn-Schranke legen den Schluss auf eine physiologische Funktion zur Ausscheidung von toxischen

Substanzen und Xenobiotika in das intestinale Lumen, Galle, Urin und Blut nahe [Chan et al. 2004].

Tatsächlich ist P-gp durch seine Expression in den Darmzotten in unmittelbarer Nähe zum Lumen und seine breite Substratspezifität sehr gut in der Lage, die Aufnahme von oral applizierten Substanzen zu limitieren [Hunter et al. 1993].

Die ubiquitäre Verbreitung und die physiologische Funktion des P-Glykoproteins ist für die eventuelle Hemmung durch Modulatoren nicht unproblematisch. So zeigten Experimente an Knockout-Mäusen, in denen entweder das murine *mdr1a* oder das *mdr1b* Gen oder beide Gene nicht exprimiert bzw. nicht abgelesen wurden, dass dort erhebliche Mängel bei der Aufnahme, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung unterschiedlichster Substanzen auftraten. Vor allem die Blut-Hirn-Schranke zeigte eine erhöhte Durchlässigkeit, was sich in einer doppelt so hohen Konzentration von Vinblastin im Gehirn von Knockout-Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren äußerte. Für einen gesunden Zustand der Mäuse waren sowohl das *mdr1a* als auch das *mdr1b* Gen notwendig [Schinkel et al. 1997].

3.5.2 Das multidrug resistance associated protein (MRP)

Im Jahr 1992 wurde von *Cole et al.* in Doxorubicin-resistenten Lungenkarzinomzellen, deren Resistenz nicht auf das P-Glykoprotein zurückzuführen war, das multidrug resistance associated protein (MRP) entdeckt [Cole et al. 1992]. Dieser zweite für die Entstehung einer MDR bedeutende ABC-Transporter hat ein Molekulargewicht von 190 kDa und ist aus 1531 Aminosäuren aufgebaut. Mit nur 15 % Homologie zu P-gp steht er allerdings eher in Beziehung mit dem CFTR. Bis heute sind weitere acht Homologe von MRP beschrieben [Litman et al. 2001], wobei noch nicht für alle eine Bedeutung für die MDR gesichert ist [Chan et al. 2004]. Im Gegensatz zu P-gp besitzen MRP1-3 und MRP6 am N-Terminus fünf zusätzliche transmembranäre Helices, die als TMD₀ bezeichnet werden. Trotzdem sind nur zwei ATP-Bindungsstellen vorhanden. Der TMD₀ scheint Bedeutung für die Affinität der Transporter zu organischen Anionen zuzukommen, welche zu einem Großteil von diesen Transportern transportiert werden. MRP1 verfügt über zwölf potentielle Glykosylierungsstellen, welche für seine Funktion allerdings nicht von Belang zu sein scheinen [Almquist et al. 1995]. Andererseits erscheint die Phosphorylierung von MRP wichtig für die Transportfunktion [Feller et al. 1995].

MRP1 ist wie P-gp ubiquitär im Organismus verbreitet. So ist es in hohen Konzentrationen im Intestinum, im Gehirn, den Nieren, der Lunge und den Hoden zu finden. Geringere Konzentrationen finden sich in der Leber. Allerdings ist MRP1 an den basolateralen Membranen von Epithelzellen lokalisiert, was vermuten lässt, dass es die Zellen schützt, indem es seine Substrate ins Blut abgibt [Chan et al. 2004]. Zu den von MRP1 transportierten Substanzen gehören neben organischen Anionen zahlreiche konjugierte Metabolite. Besonders zu nennen sind jene mit Glutathion, wie Leukotrien C₄. Dazu kommen noch Glucuronide, Sulfate und Gallensalze. Die Art der Substrate weist darauf hin, dass MRP1 eine Rolle bei der Entgiftung von körpereigenen Substanzen spielt. Darüber hinaus hat sich an verschiedenen Krebszelllinien gezeigt, dass MRP1 in der Lage ist Zytostatika, wie Doxorubicin, Vinblastin, Etoposid oder Methotrexat zu transportieren [Litman et al. 2001].

MRP2 wurde ursprünglich als cMOAT (canalicular multispecific organic anion transporter) in der Hepatozytenmembran beschrieben [Paulusma et al. 1996] und wird hauptsächlich in der Leber, den Nieren und im Intestinum exprimiert. Es befindet sich genau wie P-gp an den apikalen Membranen dieser Organe. Seine Substratspezifität ist mit der von MRP1 vergleichbar. Zusätzlich trägt es zur Ausscheidung von Gallensäure durch die Hepatozyten bei und scheint über diesen Weg eine zentrale Rolle bei der Ausscheidung von Metaboliten in die Galle zu spielen. Auch das Resistenzspektrum von MRP2 entspricht in etwa dem von MRP1. Es ist zusätzlich in der Lage Mitoxantron und Cisplatin zu transportieren [Borst et al. 2000].

MRP3 zeigt mit 58 % identischer Aminosäuresequenz die größte Strukturäquivalenz zu MRP1 [Belinsky; Kruh et al. 1999]. Die höchsten Konzentrationen sind in der Leber, in den Hepatozyten, zu finden. Außerdem wird MRP3 auch in Dünndarm und Dickdarm exprimiert. Genau wie MRP1 ist es in der basolateralen Membran zu finden und ist ebenfalls ein Transporter für organische Anionen [Kool et al. 1999]. Im Gegensatz zu den beiden bereits beschriebenen Isoformen favorisiert MRP3 Konjugate mit Glucuronsäure als Substrate, transportiert aber auch eine Vielzahl von Gallensalzen [Hirohashi et al. 2000]. Über den Transport von Glutathion-Konjugaten gibt es widersprüchliche Aussagen [Chan et al. 2004]. Aufgrund der Lokalisation im Intestinum und der großen Affinität zu Gallensalzen wird für MRP3 ein Mitwirken im enterohepatischen Kreislauf vermutet. In der Leber stellt es wahrscheinlich einen zweiten Schutzmechanismus dar, wenn die normale Exkretion gestört ist. Darauf lassen Experimente mit choleostatischen Ratten schließen [Ortiz et al. 1999]. In einem geringen

Umfang ist MRP3 auch in der Lage Zytostatika wie Etoposid, Vincristin und Methotrexat zu transportieren [Kool et al. 1999]. Obwohl es zur Unterfamilie der MDR assoziierten Proteine gehört, ist MRP4 strukturell eher mit P-gp verwandt, da ihm die TMD₀ fehlt. Zu finden ist es unter anderem in den apikalen Membranen des proximalen Tubulus [van Aubel et al. 2002], sowie in den basolateralen Membranen der Prostata [Lee et al. 2000]. Zu den Substraten von MRP4 gehören Gallensäuren, cAMP und cGMP aber auch Folsäure und Methotrexat [Chen et al. 2002]. Als Transporter für Nucleosid-Analoga ist MRP4 in der Lage, Resistenzen gegen nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren aufzubauen [Schuetz et al. 1999]. Außerdem wurden Resistenzen gegen Purinanaloga beschrieben, darunter gegen die Zytostatika Thioguanin und 6-Mercaptopurin [Lai; Tan 2002] .

Wie MRP4 besitzt auch MRP5 keine TMD₀ [Belinsky et al. 1998]. Es wird unter anderem in Nieren, Leber und Gehirn exprimiert [Chan et al. 2004]. Seine physiologische Bedeutung ist noch nicht geklärt. Das Spektrum der von MRP5 transportierten Substanzen ist dem von MRP4 sehr ähnlich. Dazu gehören Nucleosid-Analoga, Purin-Analoga aber auch Glutathion-Konjugate und organische Anionen [Wijnholds et al. 2000] . Bis auf die erwähnten Thiopurine ist MRP5, wie auch MRP4, nicht in der Lage, Resistenzen gegen andere Zytostatika wie Vincaalkaloide oder Anthracycline aufzubauen [Reid et al. 2003].

MRP6 wird sehr stark in Leber und Nieren exprimiert. Darüber hinaus ist es auch in einer Reihe weiterer Organe, wie Gehirn, Dickdarm oder den Speicheldrüsen zu finden [Scheffer et al. 2002]. Es ist in der Lage, Resistenzen gegen Etoposid, Doxorubicin und Cisplatin aufzubauen, was für Vinblastin und Vincristin nicht gezeigt werden konnte. Außerdem transportiert MRP6 Glutathion-Konjugate, wie Leukotrien C₄. Es zeigt also bei den transportierten Substraten gewisse Übereinstimmungen mit MRP1-3.

Über die weiteren Mitglieder der Unterfamilie der MDR assoziierten Proteine MRP7-9 ist bis jetzt relativ wenig bekannt. Erste Studien zeigen, dass MRP7 in geringen Konzentrationen in Leber, Nieren, Magen und Dickdarm vorkommt [Hopper et al. 2001]. MRP8 zeigt mit 41% Strukturidentität enge Beziehungen zu MRP5. Seine Funktion ist noch nicht geklärt, aber sehr hohe Konzentrationen sind in Brustkrebszellen zu detektieren [Bera et al. 2001]. Das Selbe gilt für MRP9 [Bera et al. 2002]. Obwohl alle drei Transporter noch näher charakterisiert werden müssen, zeichnet sich für sie eine Beteiligung an Resistenz- und Effluxprozessen ab [Chan et al. 2004].

3.5.3 Das mitoxantrone resistance protein

MXR (mitoxantrone resistance protein) ist im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Mitgliedern der ABC-Transporter ein so genannter Halbtransporter. Das heißt, es verfügt nur über eine NBD und eine TMD. Diese sind zusätzlich in „verkehrter“ Reihenfolge angeordnet. Die NBD befindet sich am N-Terminus und die TMD am C-Terminus des Proteins. Die *Abbildung 6* zeigt schematisch den Aufbau der drei beschriebenen ABC-Transporter. MXR ist aus 655 Aminosäuren aufgebaut und sein Molekulargewicht beträgt etwa 72 kDa. Es wird vermutet, dass es Homodimere bildet, um als ABC-Transporter funktionieren zu können [Kage et al. 2002]. Große Mengen MXR sind in der Placenta und der Blut-Hirnschranke zu finden. Weiterhin ist es in Lunge, Leber und dem Intestinum zu finden [Leslie et al. 2005]. Zu den von MXR transportierten Substanzen gehören eine Reihe Zytostatika wie Mitoxantron, Doxorubicin, Daunorubicin und Topotecan. Vincaalkaloide werden allerdings nicht transportiert. Die bisher erhaltenen Daten über Lokalisation und überlappende Substratspezifität mit P-gp lassen den Schluss zu, dass MXR eine dem P-gp ähnliche Rolle bei der Regulation von Aufnahme und Verteilung von Xenobiotika hat.

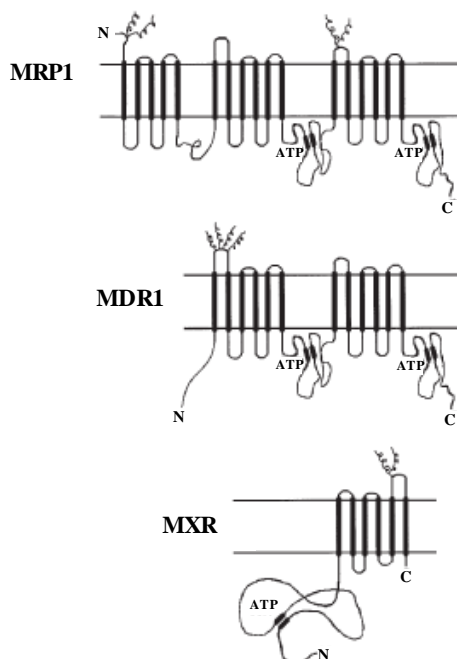


Abbildung 6: Schematische Darstellung von P-gp, MRP1 und MXR [Litman et al. 2001].

Im Gegensatz zu P-gp und MRP1 ist beim MXR die Nukleotid-Bindende-Domäne vor der Transmembran-Domäne angeordnet.

3.6 Modulation der MDR

Die Möglichkeiten Einfluss auf Resistenzerscheinungen in Tumorzellen zu nehmen sind vielfältig. Zu in klinischen Studien derzeit bevorzugten Möglichkeiten zur Überwindung bzw. Minimierung dieser Resistenzerscheinungen gehören neben der systematischen Kombination mehrerer Zytostatika der Einsatz von Substanzen, die den Reparatursignalweg von Tumorzellen beeinflussen (monoklonale Antikörper für Wachstumsfaktoren z. B. CP-31398; Tyrosinkinaseinhibitoren z. B. Gefitinib; Farnesyltransferaseinhibitoren z. B. FTI-277; Phosphoinositokinaseinhibitoren z. B. LY294002) [Perona; Sánchez-Pérez 2004]. Eine Reihe dieser monoklonalen Antikörper ist bereits in Deutschland zugelassen. Dazu gehören Cetuximab, der am epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) angreift oder Trastuzumab der sich gegen den humanen Wachstumsfaktor 2 (HER2) richtet. Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Blockade der Biosynthese von Transportproteinen durch antisense Oligonukleotide. Für die mRNA von MRP und P-gp wurden bereits eine Reihe solcher Oligonukleotide hergestellt, für die auch viel versprechende *in vitro* Testergebnisse vorliegen [Marthinet et al. 2000]. Neuere Untersuchungen beschäftigen sich mit der Anwendung von interference-RNA zur „Abschaltung“ bestimmter Genbereiche [Lage 2006]. Weitere Ansätze zur Bekämpfung der MDR stellen die Hemmung der Glukosylceramid-Synthase [Plo et al. 2002], die die Arzneistoff-induzierte Apoptose in Tumorzellen unterdrückt, Verbesserung des Targetings der Membrantransporter durch Einsatz von Nanopartikeln und Liposomen [Murthy; Shah 2007] dar. Trotz aller aufgeführten Möglichkeiten scheint aber die direkte Funktionsmodulation der Membran-Efflux-Pumpen auf molekularer Ebene nach wie vor eine viel versprechende Methode zu sein. Zumal die bisher außerordentlich schwierige Strukturaufklärung dieser Proteine über die Affinität der Modulatormoleküle erleichtert werden könnte.

3.6.1 MDR-Modulatoren

Der Einsatz von MDR-Modulatoren verfolgt das Ziel, die Bindungsstellen von Transportproteinen kompetitiv oder allosterisch zu besetzen, um so den aktiven Ausstrom von Zytostatika aus Tumorzellen zu unterbinden oder mindestens so zu drosseln, dass wirksame Konzentrationen in der Zelle erhalten bleiben. Idealerweise würde der hierfür optimale Chemosensitizer Transporter in gewünschten Regionen hemmen, ohne negative Einflüsse auf normale Gewebe auszuüben, in denen die Membrantransporter physiologischer Weise vorkommen. Außerdem würde der Modulator in seiner wirksamen Konzentration keine oder allenfalls eine sehr geringe Zytotoxizität besitzen, damit er effektiv während der Zytostatikatherapie eingesetzt werden kann [Robert; Jarry 2003]. Bis heute existiert allerdings keine Verbindung, die diesen Anforderungen in ausreichendem Maße entspricht. Deshalb gibt es auch noch keine klinischen Anwendungen von MDR-Modulatoren in Kombination mit Zytostatika [Robert; Jarry 2003].

Das P-Glykoprotein ist das am längsten bekannte und am besten untersuchte Mitglied der ABC-Transporter Familie, weshalb die meisten Erkenntnisse darüber existieren. Dies trifft natürlich auch auf seine Substrate bzw. Modulatoren zu. Aus diesem Grund erfolgt an dieser Stelle die Charakterisierung von MDR-Modulatoren, stellvertretend für alle relevanten Transporter, anhand der Modulatoren, die am P-gp angreifen.

Das Spektrum der Substanzen, die als Modulatoren wirksam sind, ist entsprechend der Substratvielfalt des P-gp außerordentlich breit. Dazu gehören Vertreter der Kalzium-Kanalblocker, Calmodulin-Antagonisten, Protein-Kinase C-Inhibitoren, Steroide, Flavonoide, Indolalkaloide, zyklische Peptide, Makrolide und HIV-Protease-Inhibitoren. Zusätzlich wurden zahlreiche Verbindungen synthetisiert, die keiner bestimmten Substanzklasse zugeordnet werden können [Wang et al. 2003].

Die ersten, auf MDR-modulatorische Wirkung untersuchten Verbindungen, waren Arzneistoffe, deren Einsatz mit anderer Indikation erfolgte. Zu diesen Modulatoren der ersten Generation gehören bspw. der Kalzium-Kanalblocker Verapamil oder das Immunsuppressivum Cyclosporin A. Deren Einsatz als Chemosensitizer ist problematisch, da bei klinisch relevanten Konzentrationen ihre pharmakologische Hauptwirkung als unerwünschte Nebenwirkung auftritt. Aufgrund dessen wurde bei Modulatoren der zweiten Generation versucht, durch strukturelle Modifikationen von bereits bekannten Substanzen Analoga zu erzeugen, die nicht über deren Nebenwirkungen verfügen. Hierzu

zählt das Dextroverapamil, eines der beiden Enantiomere des Verapamil. Im Gegensatz zum racemischen Verapamil besitzt es einen deutlich verringerten kardiovaskulären Effekt. Allerdings scheidet es, bedingt durch seine unakzeptabel hohe Toxizität, als MDR-Modulator aus [Warner et al. 1998]. Ein weiterer Vertreter ist PSC-388 (Valspodar®), ein Cyclosporin A-Analogon, ohne dessen immunsuppressive Wirkung [Twentyman; Bleehen 1991]. Eine MDR-modulatorische Wirkung konnte in Phase-III-Studien nachgewiesen werden. Allerdings zeigten Zytostatika auch in nicht von Tumoren befallenen Geweben eine deutlich gesteigerte Toxizität, da dort ebenfalls P-gp gehemmt wurde und keine ausreichende Schutzfunktion gewährleisten konnte [Baer et al. 2002].

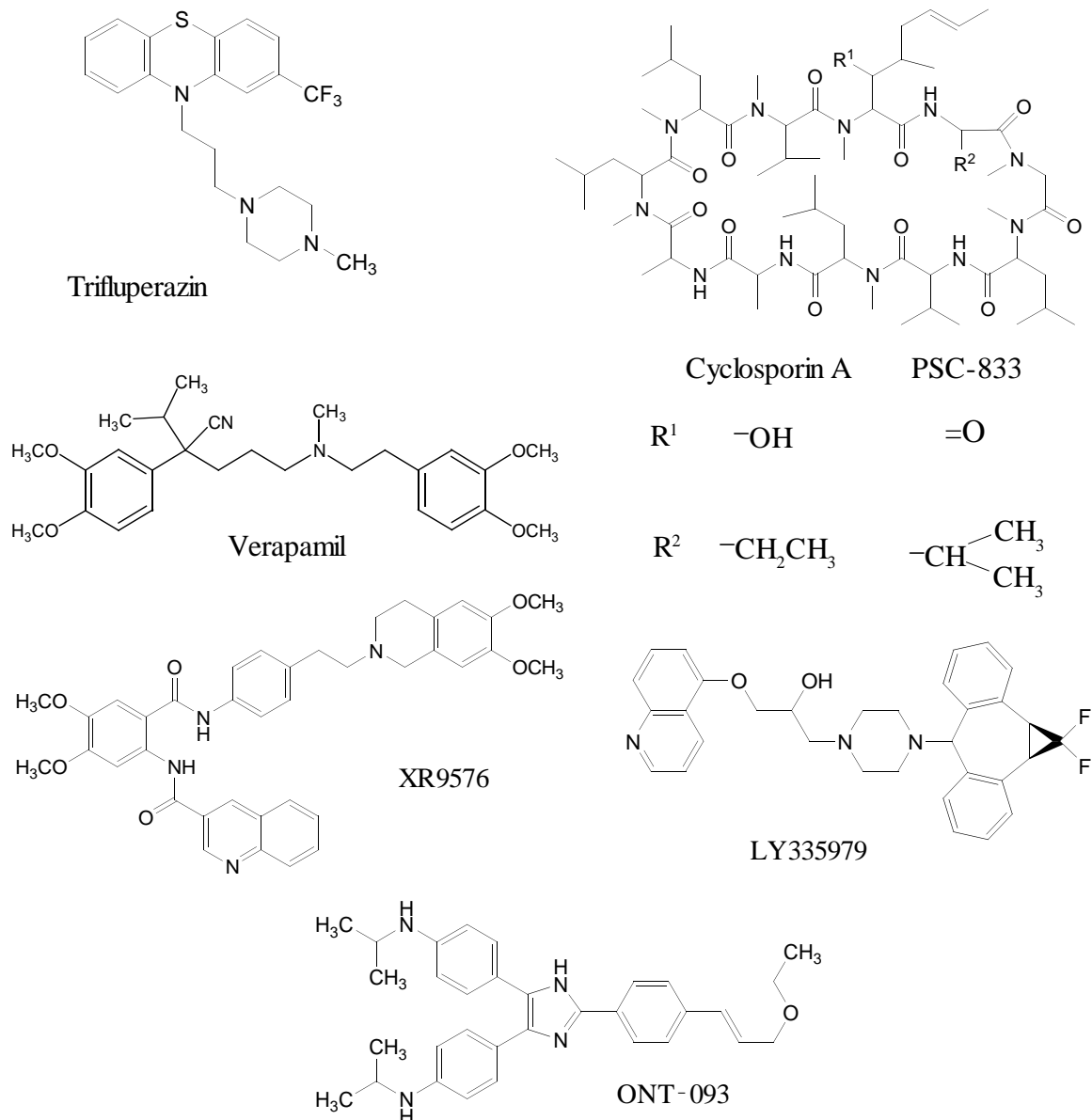


Abbildung 7: Strukturformeln einiger ausgewählter MDR-Modulatoren

Bei Modulatoren der dritten Generation handelt es sich um Verbindungen mit neuen Strukturen, welche auf Basis bekannter Struktureigenschaften von MDR-Modulatoren entwickelt wurden. Das Ziel hierbei war, eine Verringerung der Toxizität bei gleichzeitiger Zunahme der Wirksamkeit zu erreichen. Das Anthranilsäure-Derivat XR9576 (Tariquidar[®]) und das Difluorocyclopropyldibenzosuberan-Derivat LY-335979 (Zosuquidar[®]), sowie das Diarylimidazol-Derivat ONT-093 gehören zu bekanntesten Vertretern der Modulatoren der dritten Generation. Einige dieser neuen Strukturen zeigen *in vitro* sehr gute modulatorische Eigenschaften und werden derzeit in klinischen Studien getestet. Erste Ergebnisse zeigen, dass nur ausgewählte Patienten von einer Behandlung profitieren [Pusztai et al. 2005]. Trotzdem sehen Forschergruppen in den ersten verhaltenen Erfolgen der neuartigen Ansätze zur Überwindung der Multidrug Resistance einen Grund zu vorsichtigem Optimismus [Stein; Walther 2006]; [Fox; Bates 2007].

MDR-Modulatoren lassen sich ebenfalls nach ihrer Wirkungsweise einteilen. So gibt es neben hoch affinen Substraten der Efflux-Pumpe effiziente Inhibitoren der energieliefernden ATP Hydrolyse und partielle Substrate. Die Mechanismen reichen von direkter Bindung an P-gp über Verminderung der ATPase Aktivität bis zur Hemmung der Protein Kinase C [Wang et al. 2003].

3.6.2 Struktur-Wirkungs-Beziehungen von MDR-Modulatoren

Obwohl MDR-Modulatoren neben dem P-Glykoprotein auch andere Transporter beeinflussen, beziehen sich derzeitige Erkenntnisse über Struktur-Wirkungs-Beziehungen fast ausschließlich auf Wechselwirkungen mit dem P-gp. Aufgrund unzähliger Experimente mit einer Vielzahl unterschiedlicher Substanzen konnten strukturelle Voraussetzungen entdeckt werden, die für die Inhibition des P-Glykoproteins nötig sind. Ein wesentliches Merkmal von P-gp-Modulatoren ist deren hohe Lipophilie und das Vorhandensein von zwei oder mehr aromatischen Ringen. Außerdem besitzen sie, bedingt durch einen basischen Molekülteil, bei physiologischem pH-Wert meistens eine positive Ladung. Daraus resultiert ein amphiphiler Charakter [Zamora et al. 1988]. Tertiäre Aminstrukturen zeigen in diesem basischen Molekülteil Wirkungsvorteile gegenüber primären oder sekundären. Zusätzlich erweist sich der Einbau der tertiären Amine in zyklische Strukturen, wie Piperazin- und Piperidin-Derivate als vorteilhaft [Wiese; Pajeva 2001]; [Schmidt et al. 2002] was bereits *Pearce et al.* durch Bindungsmodelle mit Reserpin- und Yohimbin-Analoga bestätigten. Dabei schlugen sie zwei aromatische Domänen und einen basischen Stickstoff, verbunden durch einen aliphatischen Linker als essentielles Strukturmerkmal von MDR-Modulatoren vor [Pearce et al. 1989]. *Hait* und *Aftab* publizierten ein Modell für eine Phenothiazin-bindungsstelle am P-gp. Dabei interagiert das lipophile, aromatische Grundgerüst der Phenothiazine über π -Elektronenwechselwirkungen mit zwei Phenylalanin-Resten, während der stickstoffhaltige, protonierbare Teil des Moleküls Wechselwirkungen mit einer hydrophilen Bindungsdomäne eingeht, die aus drei Glutaminsäure-Resten aufgebaut ist.

Nicht nur die Anwesenheit von aromatischen Ringsystemen, sondern auch deren räumliche Anordnung spielt eine wichtige Rolle für das modulatorische Potential der Verbindungen. *Suzuki et al.* stellten bei Untersuchungen von MDR-Modulatoren mit Chinolin-Grundkörper fest, dass ein Winkel zwischen den Aromaten von $90-105^\circ$ optimal ist und der Abstand zwischen dem protonierbaren Stickstoff und dem Zentrum des hydrophoben Molekülteils mindestens 5 \AA betragen sollte [Suzuki et al. 1997].

Nach Analyse von MDR-Modulatoren auf strukturelle Gemeinsamkeiten schlug *Seelig* die Anwesenheit von zwei oder drei Elektronen-Donator-Gruppen (Wasserstoffbrückenbindungsakzeptoren) mit definiertem räumlichen Abstand als essentielles Merkmal vor. Dabei beträgt der Abstand bei TYP I $0,25 \pm 0,03 \text{ nm}$ und bei TYP II $0,46 \pm 0,06 \text{ nm}$.

Gleichzeitig soll die Stärke der Bindung an P-gp mit der Anzahl und Stärke der Elektronen-Donator-Gruppen zunehmen [Seelig 1998]. Tatsächlich besitzen die transmembranären Bereiche 4-6 und 11-12 verschiedene Aminosäuren mit Elektronen-Akzeptor-Gruppen (Wasserstoffbrückenbindungsdonatoren) [Seelig; Landwojtowicz 2000]. Bei den meisten dieser transmembranären Bereiche handelt es sich um genau die für Substratbindung und -transport verantwortlichen [Loo; Clarke 2005]. Mit Hilfe von *in vitro* Daten und der *Catalyst*-Software erstellten *Ekins et al.* 3D-QSAR-Modelle, anhand derer Vorhersagen über IC_{50} -Werte von P-gp Inhibitoren gemacht werden können [Ekins et al. 2002]. Die Daten dafür erhielten sie aus verschiedenen biologischen Testsystemen (Hemmung des Digoxintransports in Caco-2 Zellen, Vinblastin-Akkumulation, Vinblastin-Bindung an Plasmamembranvesikel). Damit erstellten sie ein Pharmakophor bestehend aus einem Wasserstoffbrückenbindungsakzeptor, einem aromatischem Ring und zwei hydrophoben Molekülbereichen.

Die beschriebenen Modelle überlagern sich nur zum Teil, was wiederum den Schluss auf unterschiedliche Substratbindungsstellen im P-Glykoprotein zulässt.

Abbildung 8 zeigt ein von *Pajeva* und *Wiese* erstelltes allgemeines Pharmakophor-Modell, welches sich auf nur eine Bindungsstelle des P-gp bezieht [Pajeva; Wiese 2002]. Es basiert auf der Untersuchung einer Reihe strukturell

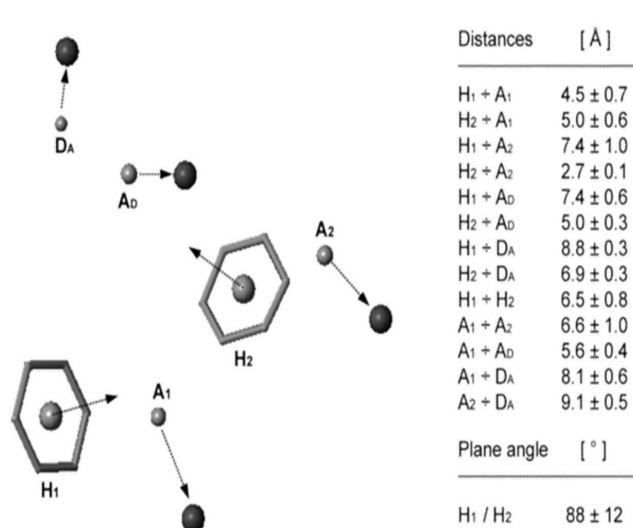


Abbildung 8:
Pharmakophormodell der Verapamil-Bindungstasche [Pajeva; Wiese 2002]

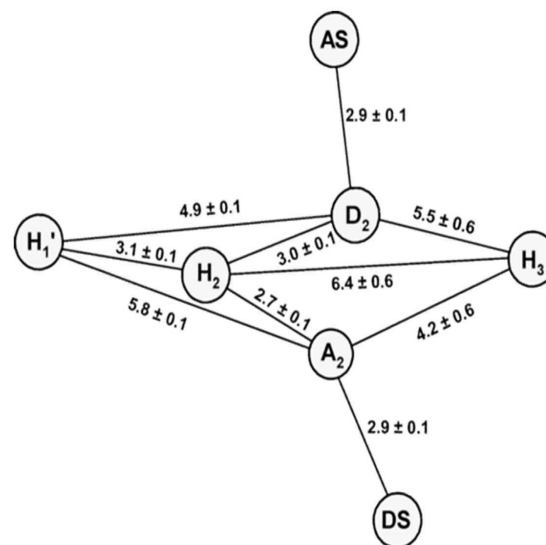


Abbildung 9:
Pharmakophor-Modell der Hoechst 33342-Bindungstasche [Pajeva et al. 2004]

unterschiedlicher Substanzen, die teilweise in enantiomerenreiner Form vorlagen, hinsichtlich ihrer Affinität zur Verapamilbindungsstelle [Döppenschmitt et al. 1998]. Ihr Modell widerspricht den bis dahin gemachten Strukturvorschlägen nicht, ist jedoch deutlich komplexer und somit in der Lage, genauere Informationen zur Entwicklung neuer MDR-Modulatoren zu liefern. Es beinhaltet zwei lipophile Bereiche, drei Wasserstoffbrückenbindungsakzeptoren und einen Wasserstoffbrückenbindungsdonator in räumlich definierter Anordnung. Außerdem lässt sich die Bindungsstelle in verschiedene Domänen einteilen, die Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen und hydrophobe Wechselwirkungen eingehen. Der Angriff der verschiedenen Substrate kann auf unterschiedliche Weise an unterschiedlichen Regionen der Bindungsstelle erfolgen.

Abbildung 9 zeigt ein weiteres Pharmakophor-Modell. Es wurde für die Bindungsstelle von Hoechst 33342 erstellt [Pajeva et al. 2004] und ist aus fünf aromatischen Zentren, vier Stellen für Wasserstoffbrückenbindungsakzeptoren und drei Stellen für Wasserstoffbrückenbindungsdonatoren aufgebaut. Der Stickstoff kann, je nachdem ob er protoniert vorliegt oder nicht, als Akzeptor oder Donator fungieren.

4 Materialien und Methoden

4.1 Methoden

4.1.1 Zellkultur

Für alle Versuche wurden die Nierenepithel-Zelllinien von Schwein LLC-PK1 (*porcine kidney epithelial cells*, ATCC 101) und LLC-MDR1 verwendet. LLC-MDR1 ging durch Transfektion von LLC-PK1 mit der DNA von humanem P-Glykoprotein hervor [Schinkel et al. 1995]. Beide Zelllinien stellen neben anderen ein etabliertes System zur Untersuchung von Transportvorgängen dar. LLC-PK1 Zellen wurden im Jahr 1976 von Hull et al. aus der Niere eines männlichen Schweins isoliert und in Kultur gebracht [Hull et al. 1976]. Als Nierenepithelzellen verfügen sie über ein breites Spektrum an Transportern, hauptsächlich aus der Familie der SLC-Transporter. Aber auch P-gp und MRP konnten nachgewiesen werden [Schlatter et al. 2006]. Im Verlauf der ersten Experimente mit LLC-PK1 Zellen zeigte sich, dass die Expression der ABC-Transporter durch Inkubation mit Vinblastin nicht erhöht werden konnte. Die Aktivität der Transporter erwies sich als sehr gering. Deshalb wurden die Versuche im Folgenden mit LLC-MDR1 Zellen durchgeführt. Diese wurden in den neunziger Jahren des vorigen Jahrhunderts am Nederlands Kanker Instituut, Amsterdam durch Einbringen des Gens für humanes P-gp in LLC-PK1 gewonnen [Schinkel et al. 1995]. Im Gegensatz zu LLC-PK1 tolerieren sie hohe Zytostatikakonzentrationen im Medium, was den Schluss auf eine deutlich erhöhte Transportaktivität, bedingt durch die Expression des eingefügten P-Glykoproteins, zulässt. Dessen Vorkommen konnte im Laufe der Experimente mit Hilfe von Western Blot Analysen immer wieder bestätigt werden. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden nur Zellen zwischen den Passagen 10 und 50 verwendet, obwohl LLC-PK1 für bis zu 300 Passagen als stabil beschrieben wurden [Hull et al. 1976]. Die Zellen wurden in Medium 199 mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Zusätzlich erhielt das Medium für die LLC-MDR1 Zellen 640 nM Vincristinsulfat um die Expression von P-gp aufrecht zu erhalten. Die Zellkultivierung fand bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte statt. Der Wechsel des Zellkulturmediums erfolgte alle zwei bis drei Tage, die Passage der Zellen ein- bis zweimal wöchentlich. Die Zellen wuchsen in 75 cm² Flaschen mit 12 ml Zellkulturmedium.

4.1.2 Western-Blot-Analyse

Beim Western-Blot-Verfahren werden Proteine mit immunochemischen Methoden detektiert [Towbin et al. 1979]. Dazu werden die Zellen nach der Inkubation lysiert und das Gesamtprotein mittels Gelelektrophorese aufgetrennt [Lämmli 1970]. Anschließend transferiert man die Proteine mit Blotting-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran. Die Detektion der Proteine erfolgt mit Hilfe spezifischer Antikörper.

4.1.2.1 Probenvorbereitung

Die Zellen wuchsen in 75 ml Flaschen bis zur Konfluenz. Zur Ernte wurde das Medium entfernt und Reste mit eiskaltem PBS abgespült. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Flasche gelöst und in eiskaltem PBS suspendiert. Es folgte eine zehnmünütige Zentrifugation bei 10.000 g und 4 °C. Das Pellet wurde in Lysispuffer resuspendiert und zum besseren Aufschluss der Zellmembranen mit dem Ultraschallstab für 5x5 Sekunden bei 60 % auf Eis behandelt. Anschließend wurden ungelöste Bestandteile durch Ultrazentrifugation abgetrennt. Aus dem Überstand wurde der Gehalt an Protein nach der Methode von *Bradford* bestimmt [Bradford 1976]. Die Proben (40-200 µg Protein) wurden mit vierfach konzentriertem Ladepuffer versetzt und zehn Minuten bei 95 °C denaturiert.

4.1.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von *Bradford* [Bradford 1976] mit Hilfe eines Kits der Firma Bio-Rad (München). Dabei bilden Proteine mit dem Farbstoff Coomassie-Brillantblau Komplexe, die über ihr Absorptionsmaximum bei 595 nm photometrisch quantifiziert werden können. Anschließend wird der Proteingehalt anhand einer Kalibriergeraden ermittelt. Diese wurde parallel mit Rinderserumalbumin (12,5-200 µg/ml) erstellt.

4.1.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) trennt Proteine der Größe nach auf. Diese binden an im Überschuss zugesetztes SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) und erhalten so eine negative Ladung. Da diese dem Molekulargewicht der Proteine proportional ist, können die SDS-Protein-Komplexe in der Gelmatrix ihrer Molmasse nach aufgetrennt werden [Sambrook et al. 1989].

Bei der verwendeten Methode nach *Lämmli* [Lämmli 1970] werden die Proben zunächst in einem Sammelgel mit 5 % Polyacrylamid konzentriert und danach in einem 7,5 % Trenngel aufgetrennt. Dafür wurde eine vertikale Minigel-Elektrophoresekammer verwendet. Die Proben wurden in Konzentrationen von 10-50 µg/ml aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 110 V über zwei Stunden in den mit Laufpuffer gefüllten und gekühlten Gelkammern. Als Molekulargewichtsmarker diente ein gefärbtes Proteingemisch bekannter Molekulargewichtsgröße.

4.1.2.4 Proteintransfer durch Western-Blot

Die Proteine wurden mit Hilfe des Semi-Dry-Verfahrens in einem horizontalen Puffertank (Eigenbau) aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgte bei 1 mA/cm² und 4 °C über zwei Stunden. Hierbei diente der vorgefärbte Molekulargewichtsmarker zur Kontrolle der Transfereffizienz [Sambrook et al. 1989]. Zur Kontrolle der Beladung wurden die Membranen mit Fast-Green[®] angefärbt und fotografiert.

4.1.2.5 Detektion mit spezifischen Antikörpern

Zur Detektion mit spezifischen Antikörpern wurden die mit Fast-Green[®] gefärbten Membranen in 0,2 M NaOH entfärbt und anschließend mit bidestilliertem Wasser gespült. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen eine Stunde bei Raumtemperatur mit Roti[®]-Block inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper über Nacht bei 4 °C [Georges et al. 1990]. Diese sind murinen Ursprungs und richten sich gegen verschiedene Epitope des humanen P-Glykoproteins. C219 bindet an MDR1- und MDR3-Isoformen [Chan et al. 1990], C494 nur an die MDR1-Isoform [Georges et al. 1990].

Nach viermaligem Waschen der Membranen mit TBS-T folgte die einstündige Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper. Im Anschluss wurden die

Membranen viermal zehn Minuten mit TBS-T und viermal zehn Minuten mit bidestilliertem Wasser gewaschen.

Tabelle 4: Erstantikörper

Antikörper	Inkubationszeit	Lösung	Hersteller
C-219	16 Stunden	1:2000 in Roti [®] -Block	Calbiochem [®]
C-494	16 Stunden	1:2000 in Roti [®] -Block	Calbiochem [®]

Zur Detektion der gebundenen Zweitantikörper wurde der ECL-Plus-Detektions-Kit der Firma Amersham (Freiburg) eingesetzt. Die Peroxidase oxidiert das Substrat Lumigen PS-3 zu einem Acridiniumester. Durch Reaktion mit Peroxiden entsteht eine intensive Chemolumineszenz mit einem Emissionsmaximum bei 430 nm. Diese kann durch die Exposition eines Autoradiographiefilms mit der Membran nachgewiesen werden. Die Expositionszeit lag zwischen einer und zehn Minuten.

4.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen für eine weitere Verwendung trypsiniert. Das Zellkulturmedium wurde dafür abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gespült. Nach dem erneuten Absaugen erfolgte über einen Zeitraum von 10 - 15 Minuten das Ablösen der Zellen mit Hilfe von Trypsin. Anschließend wurde auch das Trypsin entfernt und die Zellen durch vorsichtiges Schwenken der Zellkulturflasche von deren Boden abgelöst. Nach Resuspendierung in frischem Zellkulturmedium erfolgte die Bestimmung der Zellzahl aus einem 100 µl Aliquot, das mit 10 ml CasyTon gemischt wurde, am Zellzählgerät Casy[®]-1. Entsprechend der benötigten Zellzahl wurde die Zellsuspension mit Zellkulturmedium verdünnt und weiterverwendet.

4.1.4 Testung auf Zytotoxizität und P-gp modulatorische Wirkung

Die Kultivierung tierischer oder pflanzlicher Zellen außerhalb eines Organismus wird als Zellkultur bezeichnet.

Im Jahr 1885 gelang es *Wilhelm Roux* in Breslau embryonale Hühnerzellen für mehrere Tage in einer Salzlösung am Leben zu erhalten. Knapp 30 Jahre später konnte gezeigt werden, dass Zellen unter aseptischen Bedingungen auch länger in Kultur wachsen können, wenn sie mit Nährstoffen versorgt werden.

In den fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurde erstmals eine menschliche Zelllinie etabliert, die die Fähigkeit zur Apoptose verloren hatte. Diese aus einem Cervixkarzinom gewonnenen Zellen sind heute unter dem Namen HeLa weit verbreitet.

Bis auf einige aus Tumoren gewonnene Zellen besitzen die meisten Zelllinien nur eine eingeschränkte Lebensdauer und können sich nicht unbegrenzt oft teilen.

Jedoch sind viele der heute verwendeten Zelllinien immortalisiert, was bedeutet, dass sie im Gegensatz zu normalen menschlichen Zellen in der Lage sind, sich unendlich oft zu teilen. Diese Fähigkeit kann, bei Tumorzellen zum Beispiel, durch zufällige Mutation erlangt werden oder durch künstliche Expression des Telomerase-Gens verliehen werden. Im Gegensatz zu diesen Dauerkulturen stehen die direkt aus dem Gewebe gewonnenen Primärkulturen, die nur über eine begrenzte Lebensdauer verfügen.

Zellkulturversuche sind heute in Forschung und Entwicklung weit verbreitet und werden zur Untersuchung von Grundlagen zellulärer Prozesse eingesetzt. Aber auch zur Untersuchung der Wirkung verschiedenster Substanzen auf die Signaltransduktion und Viabilität eignen sich Zellkultursysteme in besonderer Weise, da sie unter Vermeidung aufwändiger Tierversuche rasche Quantifizierung einer großen Anzahl von Proben zulassen.

Zur Bestimmung der modulatorischen Potenz und der Zytotoxizität der untersuchten Verbindungen wurden verschiedene Viabilitätstests durchgeführt. Diese beruhen entweder auf der Anfärbbarkeit von lebenden Zellen mit Farbstoffen oder auf der Messung ihrer mitochondrialen Aktivität.

4.1.4.1 Der Kristallviolett-Test

Der Kristallviolett-Test ist ein spektralphotometrisches Verfahren, das auf der Anfärbbarkeit von Zellen mit dem Farbstoff Kristallviolett (Gentianaviolett) beruht [Flick; Gifford 1984]. Ähnlich wie bei der Gramfärbung zur Unterscheidung von grampositiven und gramnegativen Bakterien macht man sich bei diesem Test zu Nutze, dass von den Zellen festgehaltener Farbstoff nicht mit Wasser abgelöst werden kann. Die Zellen werden gefärbt, mehrmals mit Wasser gespült und anschließend wird der festgehaltene Farbstoff mit Hilfe von Ethanol in Lösung gebracht. Die Konzentration des Farbstoffes wird gegen die klare Lösung als Blindwert am Spektrophotometer vermessen und kann als Maß für die Anzahl lebensfähiger Zellen angesehen werden. Dabei besteht zwischen der vermessenen Absorption bei 620 nm und der Anzahl der Zellen über einen großen Bereich ein linearer Zusammenhang.

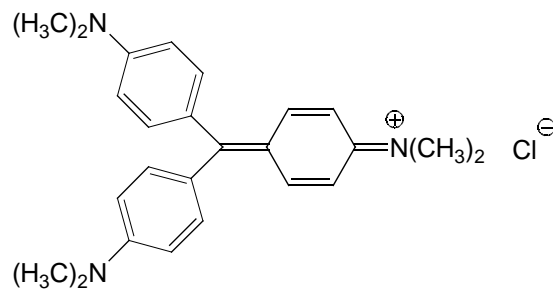


Abbildung 10: Kristallviolett

Die konfluenten Zellen werden trypsiniert und in eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (Wells) ausgesät (8000 Zellen in 120 µl Medium je Well). Dabei werden nur die 60 Wells im Inneren der Platte mit Zellen beschickt. Die Äußeren werden mit 280 µl destilliertem Wasser gefüllt. Bei ersten Experimenten zeigte sich, dass die Zellzahl in den äußeren Wells, bei gleicher Behandlung aller Proben, nach Beendigung eines Versuches deutlich niedriger lag als bei denen im Inneren der Platte. Deshalb wurden die äußeren Wells nicht für Versuche verwendet.

Vier Stunden nach der Aussaat erfolgte die Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen. Dabei wurden 120 µl einer vierfach konzentrierten Modulator- oder Zytostatikallösung in fünf Vertiefungen der ersten Spalte pipettiert. Aus dieser jetzt doppelt konzentrierten Lösung wurden 120 µl in die nächste Spalte pipettiert. Diese Verdünnung setzte sich bis in die letzte Spalte fort. Anschließend wurden mit 120 µl Zellkulturmedium, Modulator- oder Zytostatikallösung die gewünschte Konzentration eingestellt. Eine Reihe der Zellen blieb dabei immer als Kontrolle

unbehandelt. Nach 68 Stunden wurde die Viabilität der Zellen bestimmt. Dazu wurde der Überstand mit den toten Zellen entfernt und die am Boden haftenden, noch lebenden Zellen wurden mit 100 µl absolutem Methanol für zehn Minuten denaturiert und fixiert. Nach mehrmaligem Waschen unter fließendem Leitungswasser folgte für zehn Minuten die Zellfärbung mit 100 µl einer 0,1 % wässrigen Kristallviolett-Lösung. Daran schlossen sich erneut mehrere Waschschrte an. Am Ende wurde der aufgenommene Farbstoff mit 0,1 M ethanolischer Natriumcitratlösung auf dem Schüttler aus den Zellen gelöst. Die Absorption bei 620 nm wurde mit einem Mikrotiterplattenphotometer (POLARstar Galaxy, BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg) vermessen.

4.1.4.2 Der Neutralrot-Test

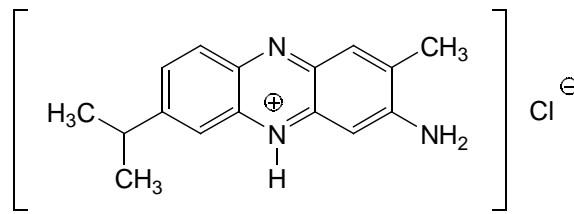


Abbildung 11: Neutralrot

Der Neutralrot-Test beruht wie der Kristallviolett-Test auf der Anfärbbarkeit von Zellen. Nur lebende Zellen sind in der Lage, den Farbstoff Neutralrot in ihre Lysosomen aufzunehmen und dort zu halten. Die Konzentration des aufgenommenen Farbstoffs wird nach einer bestimmten Zeit vermessen und ist der Anzahl der lebenden Zellen proportional [Borenfreund et al. 1988]. Die Aussaat und Inkubation der Zellen erfolgte analog zum Kristallviolett-Test. Beim Neutralrot-Test wurde der Überstand am Ende des Experiments verworfen und die Zellen zweimal mit 37 °C warmem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen für drei weitere Stunden mit 50 µl Neutralrotlösung (50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurde der Überstand erneut verworfen und es folgten zwei weitere Waschschrte mit warmem PBS. Daran schloss sich die Extraktion des Farbstoffs mit 100 µl einprozentiger Essigsäure über 15 Minuten am Schüttler an. Die Absorption der Lösung wurde bei 540 nm am Mikrotiterplattenphotometer bestimmt.

4.1.4.3 Der Sulforhodamin B-Test

Der Sulforhodamin B-Test basiert wie die beiden vorher beschriebenen auf der Anfärbbarkeit von Zellen mit einem Farbstoff. Es handelt sich dabei um eine empfindliche und einfach durchzuführende Methode zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts der untersuchten Zellen. Nach der sauren Fixierung der Zellen, werden diese mit Sulforhodamin B-Lösung inkubiert, gewaschen und der Farbstoff anschließend im Basischen extrahiert. Die Konzentration des aufgenommenen Farbstoffs ist proportional zur Anzahl der Zellen pro Well. Zwischen der Absorption bei 500 nm und der Zellzahl besteht über einen großen Bereich eine lineare Beziehung [Shekan et al. 1990]. Aussaat und Inkubation der Zellen erfolgte analog zum Kristallviolett-Test.

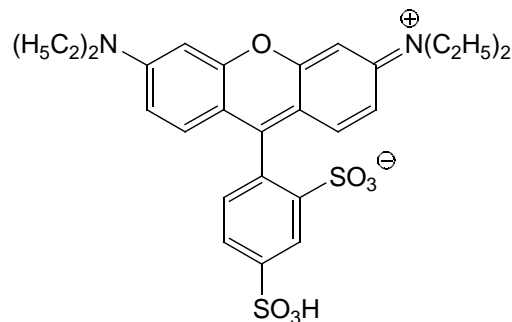


Abbildung 12: Sulforhodamin B

Insgesamt 72 Stunden nach Aussaat der Zellen wurde der Überstand mit den abgestorbenen Zellen verworfen. Nach einmaligem Spülen mit PBS erfolgte die Zellfixierung mit Trichloressigsäure (TCA). Dazu wurde vorsichtig 60 µl 10 % TCA in jedes Well pipettiert. Danach wurden die Mikrotiterplatten für eine Stunde bei 4 °C gelagert. Anschließend wurde fünfmal mit demineralisiertem Wasser gespült und die Platten über Nacht an der Luft getrocknet. Die Färbung erfolgte mit 100 µl 0,4 % SRB-Lösung (in 1 % Essigsäure) für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Um freies SRB herauszuwaschen, wurde fünfmal mit 1 % Essigsäure gespült. Mit 200 µl 10 mM TRIS wurde der Farbstoff aus den Zellen gelöst. Nach 30 Minuten auf dem Schüttler wurde die Absorption bei 490 nm am Mikrotiterplattenphotometer gemessen.

4.1.4.4 Der MTT-Test

Beim MTT-Test handelt es sich um einen häufig eingesetzten Standardtest zur Bestimmung der Zytotoxizität. Dabei wird das Maß lebensfähiger Zellen indirekt über deren enzymatische Aktivität ermittelt [Mosmann 1983]. Das schwach gelbe MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid wird von den Zellen aufgenommen und von deren mitochondrialen Dehydrogenasen durch Spaltung des Tetrazoliumrings in ein lilafarbiges wasserunlösliches Formazan reduziert. Nach Lösung der entstandenen Kristalle kann die Absorption am Spektrophotometer bestimmt werden. Da nur lebende Zellen zu dieser Umwandlung in der Lage sind, ist auf diesem Weg eine rasche Quantifizierung von Zellschädigungen möglich. Bei abgestorbenen Zellen bleibt die gelbe Farbe der Ausgangssubstanz bestehen. Auch dieser Test hat wie die bereits

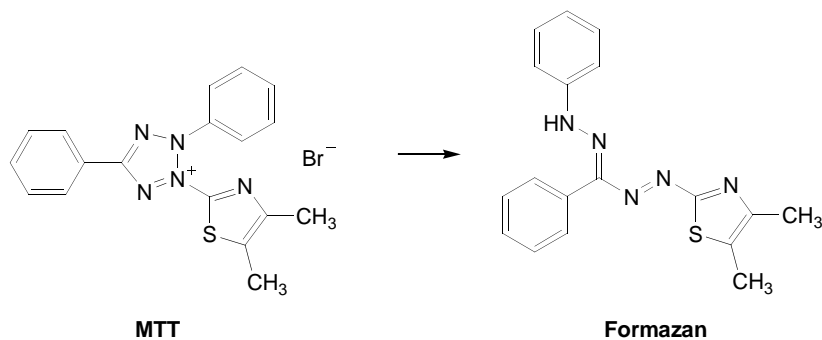


Abbildung 13: Umsetzung von MTT zum Formazan

erwähnten Anfärbetests den Vorteil, dass sich Zellwachstum und Überlebensrate und damit auch die Zytotoxizität schnell und mit großen Probenmengen ohne den Einsatz von radioaktiven Isotopen bestimmen lassen. Ein Problem, welches es bei der Anwendung des MTT-Tests zu berücksichtigen gilt, ist, dass die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen je nach Stärke der Noxen unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann.

Die Aussaat und Inkubation erfolgte analog zum Kristallviolett-Test.

Zum Ende des Experiments, 68 Stunden nach der Aussaat, wurde das Medium in den Wells bis auf 100 μ l abpipettiert. Danach erfolgte die Zugabe von 9 μ l MTT-Lösung (50 mg/ml) und eine weitere Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ von vier Stunden. Innerhalb dieser Spanne bildeten sich die Formazankristalle. Anschließend wurden in jedes Well 90 μ l MTT-Stopplösung gegeben und die Platten über Nacht im Brutschrank belassen, um die vollständige Auflösung der entstandenen Kristalle zu gewährleisten. Am nächsten Tag erfolgte nach 20 Minuten auf dem Schüttler die Messung der Absorption bei 570 nm am Mikrotiterplattenphotometer.

4.1.4.5 Berechnung der Wirkwerte

4.1.4.5.1 Der modulatorische Quotient

Um das modulatorische Potential der untersuchten Substanzen zu ermitteln, wurden verschiedene Wirkwerte bestimmt.

Die $IC_{50_{TOX}}$ stellt die Konzentration einer Substanz dar, bei der die Viabilität der Zellen 50 % beträgt. Sie ist ein Maß für die Eigentoxizität der untersuchten Verbindung. Die $IC_{50_{MOD}}$ dagegen gibt die Konzentration der Substanz wieder, bei der die Lebensfähigkeit der Zellen in Gegenwart einer fixen Konzentration an Zytostatikum 50 % beträgt. Bei den durchgeführten Experimenten handelte es sich dabei um 640 nM Vincristinsulfat, welches die LLC-MDR1-Zellen gut tolerierten. Mit dieser Konzentration wurden sie auch nach der Transfektion mit humanem P-gp selektiert und weiter kultiviert [Schinkel et al. 1995].

Der modulatorische Quotient, gebildet aus $IC_{50_{MOD}}$ und $IC_{50_{TOX}}$, wird als Maß für die modulatorische Aktivität einer Substanz angesehen.

$$\text{Modulatorischer Quotient} = \frac{IC_{50_{tox}}}{IC_{50_{mod}}} = \frac{IC_{50_{Modulator}}}{IC_{50_{Modulator+Zytostatikum}}}$$

Der Ausgangspunkt für die Berechnung des modulatorischen Quotienten war die folgende Grundannahme. Wenn die Zellen die niedrige Konzentration Vincristinsulfat aufgrund der starken Expression des P-Glykoproteins gut tolerieren, dann führt eine Hemmung des Transporters durch Modulatoren zu einer Verstärkung der toxischen Wirkung des Zytostatikums und damit zur Abnahme der Viabilität der Zellen.

4.1.4.5.2 Fold Reversal

Ein weiterer ermittelter Wirkwert ist die Fold Reversal. Sie wird aus dem Quotienten der IC50 eines Zytostatikums in Abwesenheit beziehungsweise Gegenwart einer relativ untoxischen Konzentration des untersuchten Modulators gebildet.

Im Fall dieser Arbeit war das Zytostatikum Vincristinsulfat, dessen IC50 für LLC-MDR1-Zellen mit $2,49 \pm 0,64 \mu\text{M}$ bestimmt wurde. Als relativ untoxische Konzentration der untersuchten Verbindungen wurde deren IC10 gewählt [Wiese; Pajeva 2001]. Diese lagen typischerweise zwischen zwei und zehn μM .

$$\text{Fold Reversal} = \frac{IC50_{\text{Zytostatikum}}}{IC50_{\text{Zytostatikum} + \text{Modulator}}}$$

4.1.4.5.3 Berechnung der IC50

Aus dem Inkubationsmuster der Zellen, ergab sich für die Auswertung der Messergebnisse bei halblogarithmischer Darstellung (x-Achse) des Graphen ein sigmoider Kurvenverlauf.

Daraus wurden mit Hilfe von Graph Pad Prism 3.0 die IC50 nach folgender Formel berechnet:

$$y = y_0 + \frac{a - y_0}{1 + 10^{(\log IC50 - x) \cdot b}}$$

y_0 Absorption bei minimaler Substanzkonzentration

a Absorption bei maximaler Substanzkonzentration

b Hillkoeffizient

x Logarithmus der Konzentration

Alle Experimente wurden dreimal an jeweils verschiedenen Tagen durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurden Mittelwert und Standardabweichung gebildet.

4.1.4.6 Durchflusszytometrische Bestimmungen

Bei der Durchflusszytometrie mit Hilfe des Fluorescence Activated Cell Sorters (FACS) senden Zellen bei der Passage eines Laserstrahls optische Signale aus, anhand derer man unterschiedliche Eigenschaften der Zellen ableiten kann [Herzenberg et al. 1976]. Zur Verstärkung und Erweiterung der Signale können Zellen zusätzlich mit Antikörpern oder Fluorophoren beladen sein. Die wichtigsten Parameter bei der Einteilung und Auftrennung der Zellen sind das Vorwärtsstreulicht FSC (Forward Scatter) als Maß für die Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht SSC (Side Scatter) als Maß für die Granularität (Größe und Struktur des Zellkerns). Die an die vermessenen Partikel gebundenen oder wie in dieser Arbeit in die Zellen aufgenommenen Fluoreszenzfarbstoffe werden durch Laserlicht entsprechender Wellenlänge angeregt und das emittierte Licht abgeleitet und vermessen.

Der Fluoreszenz-Aufnahme-Test mit Rhodamin 123 als fluoreszierendem P-gp Substrat ist eine etablierte Methode, um die P-Glykoprotein abhängige Sekretion von Substanzen an P-gp exprimierenden Zelllinien zu untersuchen. Daraus lassen sich Rückschlüsse auf die eventuelle inhibitorische Aktivität von Testsubstanzen ziehen [Lee et al. 1994].

Für den Test wurden LLC-PK1- bzw. LLC-MDR1-Zellen trypsinisiert und anschließend in Krebs-Hepes-Puffer (KHP) suspendiert. Danach erfolgte die zweimalige Zentrifugation bei 300 g für zwei Minuten. Die abgesetzten Zellen wurden dabei immer in KHP aufgenommen. Aus dieser Suspension wurde die Zellzahl bestimmt und auf 1×10^6 /ml eingestellt. Anschließend wurden davon je 0,5 ml in Eppendorfgefäße pipettiert und mit 55 μ l der zu untersuchenden Substanzlösung bzw. KHP versetzt. Die Endkonzentrationen der fertigen Proben betragen 10, 5 bzw. 1 μ M. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten wurden zu jeder Probe 30 μ l einer 15 μ M Rhodamin 123-Lösung pipettiert. Die Probe für die Eigenfluoreszenz erhielt nur KHP. Nach weiteren 30 Minuten Inkubation bei 37 °C wurden die Proben in BD Falcon™ Polystyrene Round Bottom Tubes überführt, für zwei Minuten bei 300 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Lagerung der Proben erfolgte ab jetzt auf Eis. Anschließend wurden die Zellen in 0,5 ml eiskalter Modulatorlösung der untersuchten Konzentration resuspendiert. Die Zentrifugation und das Spülen wiederholten sich zweimal, um alles nicht aufgenommene Rhodamin 123 von den Zellen zu entfernen. Zum Schluss wurden 5 μ l Propidiumiodid (50 μ g/ml) in jedes Röhrchen pipettiert. Dieses dient zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen, da es nur durch die beschädigte Zellmembran in die Zelle

aufgenommen wird. Während der Messung gibt Propidiumiodid bei allen geschädigten Zellen ein Fluoreszenzsignal. Danach erfolgte die Messung am FACScan-Durchflusszytometer (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg).

Als Maß für die modulatorische Aktivität der untersuchten Substanzen diente das Fluoreszenz-Aktivitätsverhältnis. Für dessen Bestimmung ist der in den Zellen akkumulierte Anteil Rhodamin 123 ausschlaggebend. Je nach Affinität und Stärke der Bindung der Testsubstanzen an P-gp kann Rhodamin 123 mehr oder weniger stark in den Extrazellulärraum gelangen. Blicke der Transporter ungehemmt, würde kaum oder gar kein Rhodamin 123 in der Zelle verbleiben.

Das Fluoreszenz-Aktivitäts-Verhältnis lässt sich nach folgender Gleichung berechnen:

$$FAR = \frac{MDRI_{(behandelt)} / MDRI_{(unbehandelt)}}{Wildtyp_{(behandelt)} / Wildtyp_{(unbehandelt)}}$$

Das Verhältnis aus Wildtyp (LLC-PK1-Zellen) behandelt und Wildtyp unbehandelte Kontrolle war annähernd eins. Bei jeder Messung wurde die Eigenfluoreszenz der Zellen bestimmt (unbehandelte Zellen in KHP). Des weiteren wurden LLC-MDR1-Zellen nur mit Rhodamin 123 inkubiert, als Maß für den ungehemmten Transport durch P-Glykoprotein. Außerdem dienten bei jeder Messung Verapamil und Trifluperazin als Vergleichssubstanzen.

Pro Probe wurden 10^4 Zellen vermessen und anhand der Parameter SSC und FSC nur die gut erhaltenen Zellen erfasst.

Für die Auswertung wurde von jedem Messwert die Eigenfluoreszenz abgezogen.

4.2 Materialien

4.2.1 Chemikalien

American Type Culture Collection (ATCC)	LLC-PK1 (ATCC CL 101)
Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland	ECL Western Blotting Reagent RPN2132, Hyperfilm ECL, NA931 Anti-Mouse IgG
BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland	Bradford Reagenz
Calbiochem [®] , Darmstadt, Deutschland	Anti-P-Glycoprotein mouse mAb (C219) Anti-P-Glycoprotein mouse mAb (C494)
Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Bromphenolblau, Mercaptoethanol, Polyacrylamid, Rotiphorese [®] , Roti [®] Block, Tris, Triton X-100, Tween 20
Gry-Pharma GmbH, Kirchzarten, Deutschland	Vincristinsulfat-GRY [®] 5 Injektionslösung
Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland	Doxorubicin 10 Hexal [®] Injektionslösung, Vinblastin 10 Hexal [®] Injektionslösung
Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland	BenchMark [™] Prestained Protein Ladder, PBS, Rinderserumalbumin, Trypsin/EDTA
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Essigsäure, Ethanol, Isopropanol, Methanol, Natriumhydroxid, Propidiumiodid, Salzsäure
SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Fast Green FCF
Schärfe System, Reutlingen, Deutschland	CasyTon [®] , Puffer zur Zellzahlbestimmung

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Taufkirchen, Deutschland

cis-(Z)-Flupentixol-2HCl, D-Glucose-H₂O,
DMSO, Glycin, HEPES, Kaliumchlorid,
Kaliumdihydrogenphosphat, Kristallviolett,
MTT, Natriumchlorid, Natriumcitrat, Natrium-
hydrogencarbonat, Neutralrot, PMSF,
Probenecid, Propafenon, Reserpin,
Rhodamin 123, Trichloressigsäure,
Sulforhodamin B, Trifluperazin-HCl, Tris-HCl,
Verapamil-HCl

4.2.2 Zellkulturmedium, Supplements

Invitrogen GmbH, Karlsruhe,
Deutschland

fötale Kälberserum (Kat.-Nr. 10270-106)
Glutamin 200 mM (Kat.-Nr. 25030-024)
Medium 199 (Kat.-Nr. 31150-030)
Penicillin/Streptomycin (Kat.-Nr. 15140-122)

Zusammensetzung Zellkulturmedium: 500 ml Medium 199
56 ml fötale Kälberserum
5 ml Glutamin 200 mM
5 ml Penicillin/Streptomycin
zusätzlich für LLC-MDR1: 340 µl Vincristinsulfat 1 g/ml

Zusammensetzung Einfriermedium: Zellkulturmedium
+ 10 % DMSO
+ 10 % fötale Kälberserum

4.2.3 Lösungen

Die bei den Versuchen verwendeten Lösungen hatten folgende Zusammensetzung:

Krebs-HEPES-Puffer :	0,35 g Kaliumchlorid, 0,21 g Kaliumdihydrogenphosphat, 6,93 g Natriumchlorid, 0,35g Natriumhydrogencarbonat, 2,31 g Glucose Monohydrat und 2,38 g HEPES wurden in 500 ml demineralisiertem Wasser gelöst; pH 7,4
Ladepuffer für SDS-PAGE (4x):	0,6 M Tris-HCl, 20 % Glycerol, 20 % SDS, 10% Mercaptoethanol, 0,1 % Bromphenolblau
Laufpuffer für SDS-PAGE:	50 mM Tris-HCl, 384 mM Glycin, 0,1 % SDS; pH 8,8
Lysispuffer zur Proteinisolation:	25 mM Tris, 5 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 1 mM PMSF; pH 7,5
Puffer für Western-Blot:	Blotting Puffer1: 20 % Methanol, 0,3 M Tris; pH 10,4 Blotting Puffer2: 20 % Methanol, 25 mM Tris; pH 10,4 Blotting Puffer3: 20 % Methanol, 25 mM Tris, 40 mM γ -Aminocapronsäure, 0,01% SDS; pH 10,4
TBS-T:	25 mM Tris, 0,05 % Tween 20; pH 7,4
Essigsäure (1 %):	1 ml Eisessig wurde mit demineralisiertem Wasser auf 100 ml verdünnt.
Fast Green-Lösung:	50 mg Fast Green wurden in 60 ml Eisessig gelöst mit 250ml Methanol versetzt und mit bidestilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt.
Kristallviolett (0,1 %):	0,5 g Kristallviolett wurden in 5 ml absolutem Ethanol gelöst und mit demineralisiertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt.
Natriumcitratlösung (0,1 M):	14,5 g Natriumcitrat wurden in 250 ml demineralisiertem Wasser gelöst und mit 250 ml absolutem Ethanol aufgefüllt.
Natriumhydroxidlg. (0,2 M):	8 g Natriumhydroxid wurden in einem Liter demineralisiertem Wasser gelöst.

Neutralrot (50 µg/ml):	0,5 ml Stammlösung (5 mg/ml in DMSO) wurden in 49,5 ml Zellkulturmedium verdünnt.
MTT-Lösung (5 mg/ml):	50 mg MTT wurden in 10 ml PBS gelöst.
MTT-Stopplösung:	50 g SDS wurden in 500 ml einer Mischung aus $\frac{3}{4}$ DMSO und $\frac{1}{4}$ Eisessig gelöst.
Propidiumiodid (5 %)	5 mg Propidiumiodid wurden in 100 ml PBS gelöst.
Rhodamin 123 (15 µM)	15 µl Rhodaminstammlösung (2 mM in DMSO) wurden in 1985 µl KHP gelöst.
Sulforhodamin B (0,4 %):	2 g Sulforhodamin B wurden in 500 ml 1 % Essigsäure gelöst.
Trichloressigsäure (10 %):	5 g Trichloressigsäure wurden vorsichtig in 45 ml demineralisiertem Wasser gelöst.

Zum Einstellen der pH-Werte diente 0,2 M Salzsäure bzw. 0,2 M Natriumhydroxid.

Die zu untersuchenden Substanzen wurden in DMSO gelöst und als Stammlösungen (100 mM) bei -20 °C gelagert. Vor Versuchsbeginn wurden sie soweit mit Zellkulturmedium oder Krebs-HEPES-Puffer verdünnt, dass die Endkonzentration an DMSO auf den Zellen 0,5 % nicht überstieg.

4.2.4 Geräte

Analysenwaage	Typ MC5-0CE, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Autoklav	GVA 460, Fritz Gössner GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland
BD Falcon™ Polystyrene Round Bottom Tube	VWR International GmbH, Dresden, Deutschland
Begasungsbrutschrank	WTB Binder, Labortechnik GmbH, Tuttlingen, Deutschland
CASY®-1 Zellzählgerät	Modell TT, Schärfe System, Reutlingen, Deutschland
Cellstar® Pipetten (15 ml, 25 ml)	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar® Polypropylen-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar® Zellkultur Multiwell Platten für adhärenente Zellkulturen (96 Well)	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Elektrophoresekammer	Mighty Small SE 260, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA
Eppendorf Research®Pro Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
epTIPS pipette tips	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
FACScan Durchflusszytometer	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Filter Top Zellkultur Flaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Gasbrenner	GasProfi 1 ^{SCS} IUL Instruments GmbH, Königswinter, Deutschland

Kühlzentrifuge	Centrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer	Variomag Elektronikrührer Monotherm, H + P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Mikrotiterplattenphotometer	POLARstar Galaxy, BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Deutschland
Mikroskop (Zellkultur)	Axiovert 25, Carl Zeiss Jena, Jena Deutschland
Nitrocellulosemembran	Protran [®] , Schleicher & Schuell, Microscience GmbH, Dassel, Deutschland
pH Meter	inoLab pH Level 1, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
Pipettierhilfe	Accujet [®] , Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Präzisionswaage	BP 2215, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Safe-Lock Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Schüttler	Heidolph, Titramax 1000, Heidolph Elektro GmbH & Co. KG., Kelheim, Deutschland
Sicherheitswerkbank Klasse 2	Hera Safe KS, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
Sterilfilter, CA-Membran, 0,2µM	Schleicher & Schuell Microscience GmbH, Dassel, Deutschland
Ultraschallbad	Transsonic T 660/H, Elma GmbH & Co. KG, Singen, Deutschland
Ultraschallstab	UW 70, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Ultrazentrifuge	TL 100, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Vakuumpumpe (Zellkultur)	Typ 120 00 02 VEB Reglerwerk Dresden, Dresden Deutschland

Vortexer	MS2 Minishaker, IKA Works Inc., Wilmington,USA
Wasserbad	GFL® Typ 1092, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Western-Blot-Apparatur	Eigenbau
Zellschaber	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifuge	Hettich Universal 30 F Typ 1400, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

4.2.5 Statistik

Alle Messdaten sind, wenn nicht anders gekennzeichnet, als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens $n = 3$ unabhängigen Experimenten angegeben. Alle Experimente wurden an Zellen unterschiedlicher Passagen in Mehrfachbestimmungen durchgeführt. Zur Prüfung auf signifikante Unterschiede von Gruppen wurden eine Varianzanalyse (Anova) und Bonferroni's multipler Vergleichstest angewendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit P von $\alpha \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

4.2.6 Software

CellQuest™ Software Version 3.1	1997 Becton Dickinson & Co.
FLUOstar Galaxy Version 4.02	1999 BMG Labtechnologies
GraphPad Prism® 3	1994-2000 GraphPad Software
Microsoft® Office 2000	1983-1999 Microsoft Corporation
WinMDI Version 2.8	1993-1998 Joseph Trotter

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse der Western-Blot-Analysen

LLC-MDR1-Zellen werden von zahlreichen Arbeitsgruppen zur Untersuchung von P-gp abhängigen Transportvorgängen eingesetzt. Da die Transfektion mit der DNA für humanes P-Glykoprotein schon 1995 erfolgte [Schinkel et al. 1995], wurde der Status der

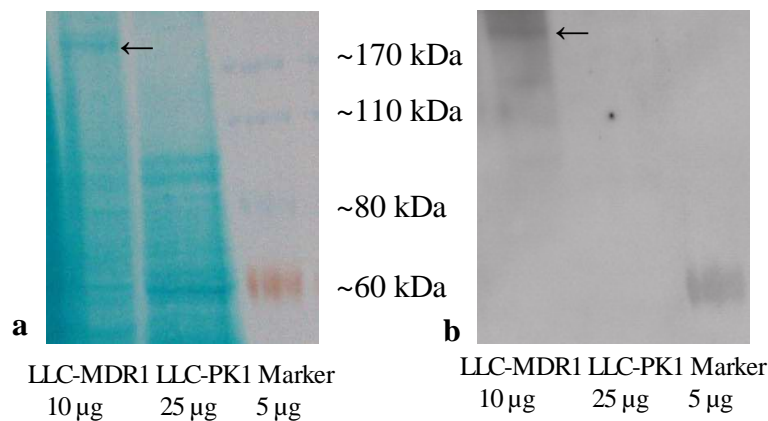


Abbildung 14: Western Blot Nachweis von P-Glykoprotein
a: Färbung mit Fast Green
b: Inkubation mit Antikörper C494 und Detektion mit ECL

Proteinexpression im Laufe der Experimente immer wieder kontrolliert. Dazu wurde ein aus den Zellen gewonnenes Proteingemisch mit Hilfe der SDS-PAGE getrennt, mittels Western-Blot auf eine Membran transferiert und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Dabei konnte im Zeitraum der Experimente immer P-gp nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde das Zellkulturmedium mit Vincristin in einer Endkonzentration von 0,64 µM supplementiert um den Selektionsdruck für P-gp aufrechtzuerhalten.

Abbildung 14 zeigt exemplarisch einen Western-Blot Nachweis für P-gp. Gut zu erkennen sind mehrere mit Fast Green eingefärbte Proteinbanden mit unterschiedlichem Molekulargewicht. Diese sind sowohl bei LLC-PK1 als auch bei LLC-MDR1 Zellen zu sehen. Nach der Inkubation mit einem spezifischen Antikörper und der Detektion ist nur noch eine Bande bei den transfizierten Zellen bei circa 170 kDa zu sehen. Das entspricht dem Molekulargewicht des P-Glykoproteins.

5.2 Voruntersuchungen

5.2.1 Zellzahl

Da sich die Versuche jeweils über 72 Stunden erstreckten und der Einfluss der untersuchten Substanzen auf das Zellwachstum untersucht werden sollte, war es wichtig, die Zahl der ausgesäten Zellen so zu wählen, dass diese erst zum Ende eines Experiments Konfluenz erreichten. Dazu wurden Zellen in unterschiedlicher Anzahl in 96-Well-Platten ausgesät und nach drei Tagen wurde ihre Konfluenz bestimmt. Das geschah mit Hilfe eines Mikroskops und durch die Bestimmung der Zellzahl. Aus den so ermittelten Werten konnte der für die durchzuführenden Experimente ideale Wert mit 8000 - 10000 Zellen pro Well bestimmt werden.

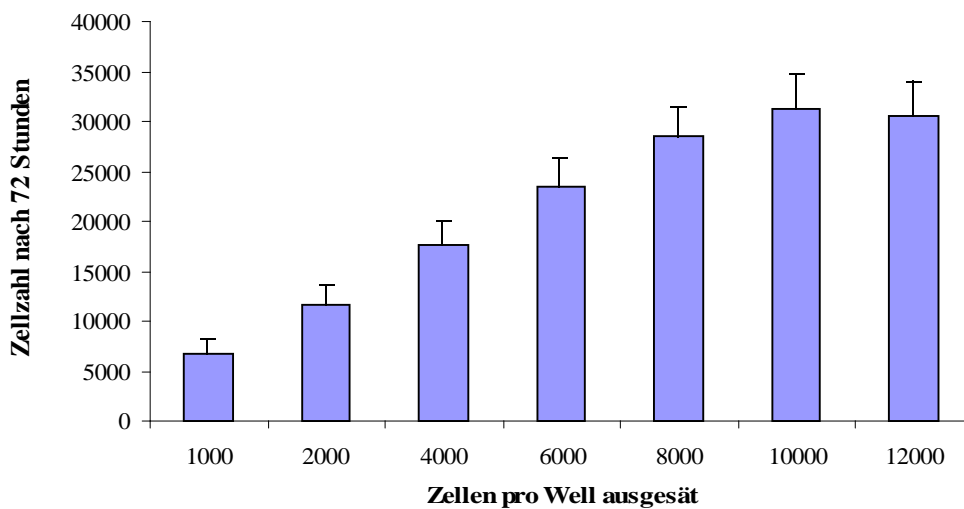


Abbildung 15: Bestimmung der optimalen Zellzahl für die Zytotoxizitätstests

LLC-MDR1 Zellen wurden in unterschiedlicher Anzahl ausgesät und wuchsen 72 Stunden. Danach erfolgte die Auswertung durch Bestimmung der Zellzahl und am Mikroskop. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD aus $n = 3$ Einzelexperimenten

5.2.2 Lösungsmittelkonzentration

Um den Einfluss des Lösungsmittels auf die Zellen so gering wie möglich zu halten, wurde die Toxizität verschiedener DMSO-Konzentrationen bestimmt. Eine maximale Endkonzentration von 0,5 % DMSO wurde aufgrund dieser Untersuchungen für alle Experimente gewählt.

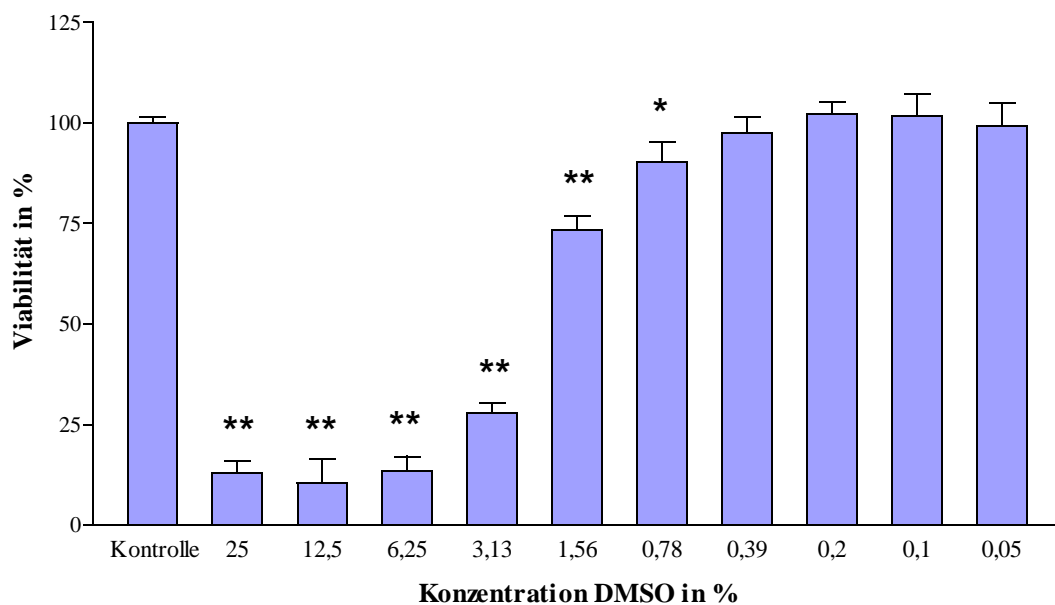


Abbildung 16: Überlebensfähigkeit von LLC-MDR1 Zellen bei unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen, bestimmt mit dem Kristallviolett-Test.

LLC-MDR1 Zellen wurden ausgesät und nach vier Stunden mit verschiedenen Konzentrationen DMSO inkubiert. Nach 72 Stunden erfolgte die Auswertung.

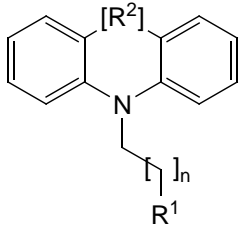
*) $p < 0,05$; **) $p < 0,001$: Inkubation vs. Kontrolle; einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SD aus $n = 3$ Einzelexperimenten

5.3 Ergebnisse der Zytotoxizitätstests

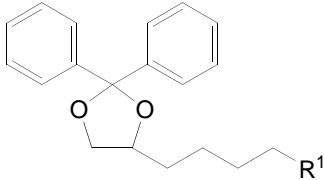
5.3.1 Vergleich von Kristallviolett-Test und MTT-Test

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Langner bereits eine Anzahl der hier untersuchten Verbindungen getestet. Dazu gehörten unter anderem die von Ungvari synthetisierten und beschriebenen 1,3-Dioxolane und 1,3-Dioxane sowie Hydantoin-, Dibenzazepin- und Carbazol-Derivate [Ungvari 2005]. Die Testung erfolgte mit dem MTT-Test an CaCo2-Zellen. Die Ergebnisse sind in *Tabelle 5* dargestellt.

Tabelle 5: Übersicht über getestete Verbindungen und deren ermittelte Wirkwerte (MTT-Test) nach Ungvari [Ungvari 2005]

Verbindung n	R ¹	R ²	IC ₅₀ _{MOD} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{MOD}	IC ₅₀ _{TOX} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{TOX}	MQ	
								
51	3	MP	-	5,97 ± 3,25	5,22	21,74 ± 3,51	4,66	3,64
53	3	DPh5P	-	10,07 ± 3,66	5,00	26,06 ± 3,61	4,58	2,59
54	3	DPh5P	CH=CH	11,94 ± 3,06	4,92	21,31 ± 3,51	4,67	1,78

MP = 4-Methylpiperazin; DPh5P = 4-(Diphenylpentyl)-piperazin

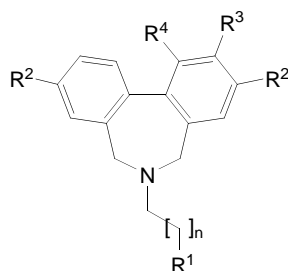
Verbindung	R ¹	IC ₅₀ _{MOD} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{MOD}	IC ₅₀ _{TOX} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{TOX}	MQ
						
55	MP	18,79 ± 4,74	4,73	42,84 ± 3,64	4,37	2,28
56	PIP	35,79 ± 3,92	4,45	81,69 ± 4,99	4,09	2,28
57	DPh5P	5,73 ± 3,57	5,24	17,32 ± 3,21	4,76	3,02

MP = 4-Methylpiperazin; PIP = Piperidin; DPh5P = 4-(Diphenylpentyl)-piperazin

Verbindung	n	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ _{MOD} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{MOD}	IC ₅₀ _{TOX} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{TOX}	MQ
58 cis	2	MP	H	H	14,38 ± 3,90	4,84	86,23 ± 5,13	4,06	6,00
58 trans	2	MP	H	H	13,51 ± 3,64	4,87	78,56 ± 4,80	4,10	5,81
58 RR	2	MP	H	H	9,39 ± 3,14	5,03	83,45 ± 4,80	4,08	8,89
58 SS	2	MP	H	H	7,03 ± 3,42	5,15	80,79 ± 5,23	4,09	11,49
60 cis	2	DPh5P	H	H	9,21 ± 3,14	5,04	66,51 ± 3,64	4,18	7,22
60 trans	2	DPh5P	H	H	12,52 ± 3,51	4,90	65,32 ± 3,80	4,18	5,22
60 RR	2	DPh5P	H	H	18,51 ± 3,62	4,73	66,12 ± 3,56	4,18	3,57
60 SS	2	DPh5P	H	H	17,06 ± 3,72	4,77	65,84 ± 3,84	4,18	3,86
61	2	PIP	H	H	13,76 ± 4,78	4,86	66,39 ± 4,57	4,18	4,82
62	2	HEP	H	H	207,81 ± 6,12	3,68	289,31 ± 7,12	3,54	1,39
63	2	DPh1P	H	H	64,32 ± 5,12	4,19	73,67 ± 4,63	4,13	1,15
64	2	DPh2P	H	H	9,12 ± 5,02	5,04	18,32 ± 3,94	4,74	2,01
65	2	DPh3P	H	H	69,62 ± 4,99	4,16	79,38 ± 4,21	4,10	1,14
66	2	DPh4P	H	H	34,27 ± 4,17	4,47	43,73 ± 3,41	4,36	1,28
68	2	DFPh1P	H	H	50,64 ± 4,66	4,30	98,56 ± 5,21	4,01	1,95
69	1	MP	H	H	8,66 ± 3,23	5,06	33,22 ± 3,50	4,48	3,84
70	3	MP	H	H	25,41 ± 5,82	4,59	55,21 ± 5,19	4,26	2,17
71	1	DPh5P	H	H	19,91 ± 4,29	4,70	58,55 ± 3,98	4,23	2,94
72	3	DPh5P	H	H	27,36 ± 3,99	4,56	64,23 ± 3,97	4,19	2,35

MP = 4-Methylpiperazin; PIP = Piperidin; HEP = 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin; DPh1P = 4-(Diphenylmethyl)-piperazin; DPh2P = 4-(Diphenylethyl)-piperazin; DPh3P = 4-(Diphenylpropyl)-piperazin; DPh4P = 4-(Diphenylbutyl)-piperazin; DPh5P = 4-(Diphenylpentyl)-piperazin; DFPh1P = 4-(Bis-(4-fluorphenyl)-methyl)-piperazin

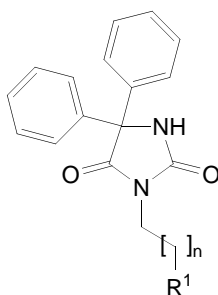
Verbindung	n	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	IC ₅₀ _{MOD} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{MOD}	IC ₅₀ _{TOX} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{TOX}	MQ
------------	---	----------------	----------------	----------------	----------------	--	----------------------------------	--	----------------------------------	----



77 3 DPh5P H H H 14,26 ± 3,54 4,85 20,24 ± 3,26 4,69 1,42

DPh5P = 4-(Diphenylpentyl)-piperazin

Verbindung	n	R ¹	IC ₅₀ _{MOD} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{MOD}	IC ₅₀ _{TOX} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{TOX}	MQ
------------	---	----------------	--	----------------------------------	--	----------------------------------	----

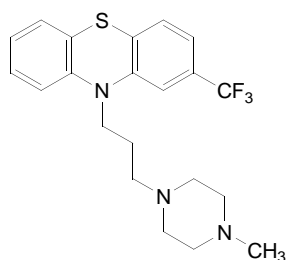


78 3 MP 20,04 ± 3,54 4,70 118,72 ± 7,23 3,93 5,92

79 3 DPh5P 3,42 ± 2,98 5,47 15,09 ± 3,19 4,82 4,41

MP = 4-Methylpiperazin; DPh5P = 4-(Diphenylpentyl)-piperazin

Verbindung	IC ₅₀ _{MOD} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{MOD}	IC ₅₀ _{TOX} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{TOX}	MQ
------------	--	----------------------------------	--	----------------------------------	----



TFP 16,05 ± 3,52 4,79 43,28 ± 3,31 4,36 2,70

TFP = Trifluperazin

Da die Erfahrungen mit dem MTT-Test in der Arbeitsgruppe überwiegend positiv waren, sollten sich damit weitere Untersuchungen der Verbindungen an LLC-MDR1-Zellen anschließen. Das galt auch für die Phenothiazin-Derivate. Allerdings kam es im Verlauf erster Experimente zu teilweise abweichenden Ergebnissen, für die zunächst keine plausible Erklärung gefunden werden konnte. Wurden zum Beispiel LLC-MDR1-Zellen mit Zytostatika wie Vinblastin, Vincristin oder Doxorubicin inkubiert, entsprach die am Plattenphotometer gemessene Absorption nicht der unter dem Mikroskop zu beobachtenden, tatsächlichen Dichte des Zellrasens (vgl. *Abbildung 17*). Die Ergebnisse des MTT-Tests ließen den Schluss auf eine höhere Viabilität und damit eine größere Anzahl Zellen als tatsächlich im Untersuchungsgefäß vorhanden waren zu. Die verstärkte Reduktion des Formazanfarbstoffs unter wachstumshemmenden Bedingungen wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen beobachtet [Bernhard et al. 2003]; [Pagliacci et al. 1993]. Aufgrund dieses Phänomens wurden weitere Zytotoxizitätstests als mögliche Alternative zum MTT-Test durchgeführt und verglichen. Der Kristallviolett-Test zeigte dabei eine gute Übereinstimmung zwischen tatsächlicher Zellzahl und gemessener Absorption.

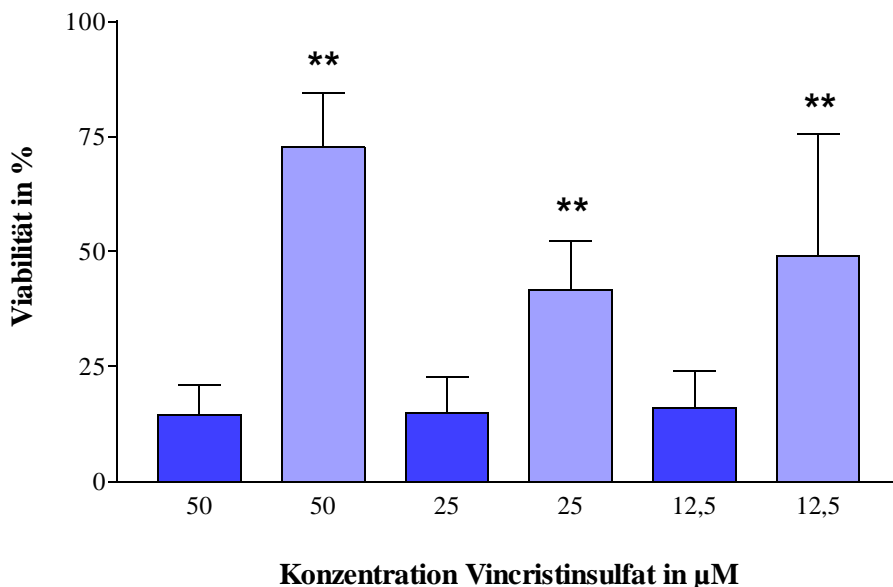


Abbildung 17: Überlebensfähigkeit von LLC-MDR1-Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen Vincristinsulfat. Kristallviolett-Test (dunkelblau), MTT-Test (hellblau)

LLC-MDR1 Zellen wurden ausgesät und nach vier Stunden mit Vincristinsulfat inkubiert.

Nach insgesamt 72 Stunden erfolgte die Auswertung.

** $p < 0,001$: gleiche Konz. Vincristinsulfat, Kristallviolett vs. MTT; einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SD aus $n = 3$ Einzelexperimenten.

Die Arbeit mit dem Kristallviolett-Test erwies sich auch im Folgenden für die Aufgabenstellung dieser Arbeit als reproduzierbarer, unkomplizierter und unabhängiger von äußeren Einflüssen, wie Umgebungstemperatur oder Dauer der Inkubation mit der Reagenzlösung.

Deshalb wurde, obwohl es sich beim MTT-Test um einen etablierten und in der Laborpraxis bewährten Zellkulturtest handelt, dem Kristallviolett-Test in diesem Fall der Vorzug gegeben. Dieser ist für die Fragestellung nach der Quantifizierung des Zellwachstums als einfach, schnell und preiswert durchzuführender Test ausreichend, gerade wenn eine größere Anzahl von Experimenten durchzuführen ist.

Der Grund für die teilweise abweichenden Ergebnisse des MTT-Tests könnte in einer erhöhten mitochondrialen Aktivität der mit Zytostatika behandelten Zellen gesehen werden. Diese könnten in der selben Zeit mehr Formazan umsetzen als unbehandelte Zellen. Eine weitere Erklärung wäre nach *Vellonen et al.* die Möglichkeit, dass MTT als Substrat für P-gp mit anderen Substraten, wie den verwendeten Zytostatika, in Konkurrenz um den Transporter tritt [Vellonen et al. 2004]. In Folge des verminderten Effluxes, würden die mit Zytostatikum inkubierten Zellen in der selben Zeit mehr MTT umsetzen als die gleiche Anzahl unbehandelter Kontrollzellen.

5.3.2 Vergleich der Vitalfärbungstests

Neben dem Kristallviolett-Test wurden für einige Substanzen auch weitere Tests wie der Neutralrot-Test und der Sulforhodamin B-Test durchgeführt. Zwischen den ermittelten IC_{50} Werten ließen sich keine signifikanten Unterschiede erkennen. Exemplarisch sind in *Abbildung 18* die Ergebnisse für Verapamil dargestellt. Aus arbeitsorganisatorischen Gründen wurden im Folgenden alle anderen Experimente mit dem Kristallviolett-Test ausgewertet.

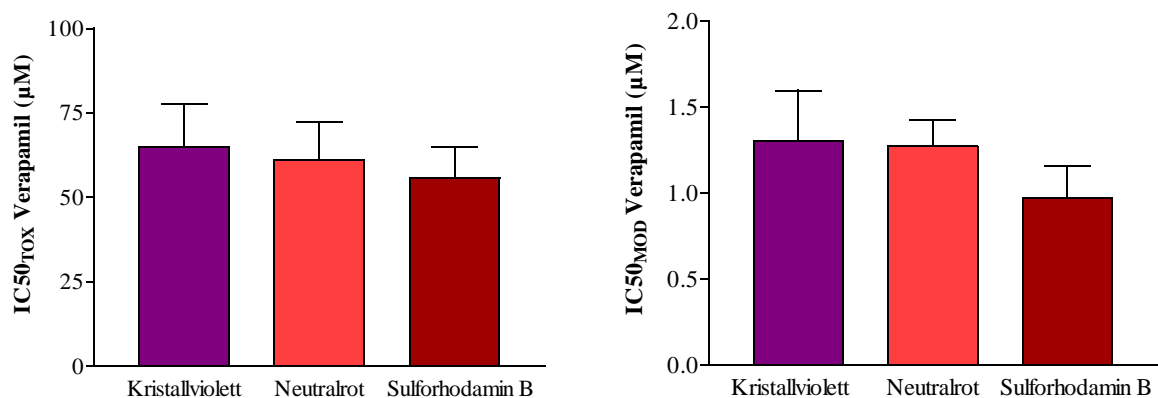


Abbildung 18: Ermittlung von $IC_{50_{TOX}}$ und $IC_{50_{MOD}}$ von Verapamil mit dem Kristallviolett-, Neutralrot- bzw. dem Sulforhodamin B-Test.

LLC-MDR1 Zellen wurden ausgesät und nach vier Stunden mit Verapamil bzw. Verapamil/Vincristinsulfat inkubiert. Nach insgesamt 72 Stunden erfolgte die Auswertung.

Kristallviolett vs. Neutralrot vs. Sulforhodamin B; einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

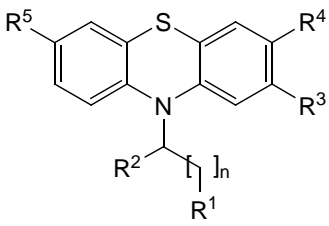
Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SD aus $n = 3$ Einzelexperimenten. Es konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden ($p \leq 0,05$).

5.3.3 Darstellung der Ergebnisse

Für die Auswertung der Messergebnisse aus den Zytotoxizitätstests wurden die benötigten Werte mit Hilfe von *GraphPadPrism 3* ermittelt. Dabei konnte mit dem $IC_{50_{TOX}}$ -Wert zunächst eine Aussage über die Toxizität sowohl der jeweils untersuchten Verbindung als auch der Zytostatika gemacht werden. Ebenfalls wurden IC_{50} -Werte der Verbindungen in Gegenwart einer fixen Zytostatikakonzentration ($IC_{50_{MOD}}$), sowie IC_{50} -Werte für das Zytostatikum Vincristin in Gegenwart einer fixen Konzentration des jeweils untersuchten Modulators ($IC_{50_{VCR+}}$) bestimmt. Mit diesen Werten erfolgte die Bestimmung des modulatorischen Quotienten und der Fold Reversal. Eine Übersicht über die getesteten Verbindungen und die dazugehörigen Messwerte gibt *Tabelle 6*.

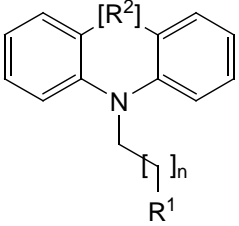
Die Messungen am FACS wurden mit WinMDI Version 2.8 ausgewertet. Die FAR-Werte sind in *Tabelle 7* aufgeführt.

Tabelle 6: Übersicht über die ermittelten Wirkwerte der getesteten Verbindungen und Referenzsubstanzen (Kristallviolett)

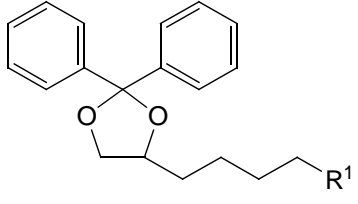
Verbindung	n	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	$IC_{50_{MOD}}$ [$\mu M \pm SD$]	$pIC_{50_{MOD}}$	$IC_{50_{TOX}}$ [$\mu M \pm SD$]	$pIC_{50_{TOX}}$	MQ
											
1	2	MP	H	H	H	H	2,26±0,42	5,65	16,55±2,53	4,78	7,33
2	2	MP	H	Me	H	H	1,73±0,19	5,76	14,87±0,26	4,83	8,60
3	2	MP	H	Ac	H	H	1,50±0,06	5,82	25,41±5,94	4,60	16,97
4	2	MP	H	Prop(ac)	H	H	0,49±0,08	6,31	13,18±2,06	4,88	26,89
5	2	MP	H	Bu(ac)	H	H	0,72±0,02	6,14	15,77±1,30	4,80	21,88
6	2	MP	H	Bzl	H	H	0,22±0,04	6,66	6,31±0,39	5,20	28,79
7	2	MP	H	[a]Bn	H	H	0,40±0,14	6,40	7,91±1,08	5,10	19,93
8	2	MP	H	H	[c]Bn	H	0,41±0,13	6,39	8,33±1,85	5,08	20,31
9	2	MP	H	H	OMe	H	0,91±0,22	6,04	14,25±0,62	4,85	15,71
10	2	MP	H	H	OEt	H	0,46±0,18	6,34	7,64±0,39	5,12	16,53
11	2	MP	H	H	tBu	tBu	1,24±0,39	5,91	6,13±1,05	5,21	4,95
12	3	MP	H	H	H	H	6,25±1,10	5,20	15,21±3,26	4,82	2,43

Verbindung	n	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	IC ₅₀ _{MOD} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{MOD}	IC ₅₀ _{TOX} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{TOX}	MQ
13	3	MP	H	Ac	H	H	1,88±0,26	5,73	22,47±5,58	4,65	11,92
14	3	MP	H	Prop(ac)	H	H	0,76±0,11	6,12	11,53±3,40	4,94	15,16
15	3	MP	H	Bu(ac)	H	H	0,36±0,01	6,44	7,32±0,18	5,14	20,19
16	3	MP	H	Bzl	H	H	0,20±0,01	6,70	7,66±0,58	5,12	38,37
17	3	MP	H	SMe	H	H	3,07±0,35	5,51	15,73±0,75	4,80	5,12
18	3	MP	H	[a]Bn	H	H	1,17±0,17	5,93	10,32±2,33	4,99	8,85
19	3	MP	H	H	[c]Bn	H	1,89±0,39	5,72	10,24±2,05	4,99	5,40
20	3	MP	H	H	Me	H	9,82±1,42	5,01	47,43±3,05	4,32	4,83
21	3	MP	H	H	Ph	H	3,06±0,36	5,51	13,32±1,21	4,88	4,35
22	3	MP	H	H	OBu	H	4,61±0,10	5,34	21,97±0,61	4,66	4,77
23	3	MP	H	H	Bu	H	5,17±0,97	5,29	14,66±0,66	4,83	2,84
24	3	MP	H	H	iBu	H	5,99±0,55	5,22	21,78±2,98	4,66	3,63
25	3	MP	H	H	tBu	H	5,42±1,55	5,27	21,44±3,16	4,67	3,96
26	3	MP	H	H	tBu	tBu	1,97±0,40	5,71	5,42±0,58	5,27	2,75
27	7	MP	H	H	H	H	4,87±1,27	5,31	12,00±3,81	4,92	2,46
28	7	MP	H	Prop(ac)	H	H	0,62±0,14	6,21	8,01±0,74	5,10	12,86
29	7	MP	H	Bu(ac)	H	H	2,29±0,46	5,64	27,74±1,55	4,56	12,10
30	7	MP	H	Bzl	H	H	1,22±0,13	5,91	8,43±0,62	5,07	6,92
31	1	O2MP	H	H	H	H	3,15±0,67	5,50	17,72±0,71	4,75	5,62
32	2	MP	H	H	H	H	2,26±0,42	5,65	16,55±2,53	4,78	7,33
33	2	MP	=O	H	H	H	7,64±0,67	5,12	119,67±8,21	3,92	15,67
34	4	MP	H	H	H	H	1,27±0,25	5,90	7,83±0,49	5,11	6,18
35	5	MP	H	H	H	H	4,32±1,06	5,37	17,58±1,88	4,76	4,07
36	6	MP	H	H	H	H	1,96±0,47	5,71	8,91±1,24	5,05	4,54
37	9	MP	H	H	H	H	1,09±0,19	5,96	4,44±1,03	5,35	4,09
38	11	MP	H	H	H	H	2,52±0,21	5,60	7,57±0,91	5,12	3,01

MP = 4-Methylpiperazin; O2MP = 2-(4-Methylpiperazin)-ethoxyl

Verbindung	n	R ¹	R ²	IC ₅₀ _{MOD} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{MOD}	IC ₅₀ _{TOX} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{TOX}	MQ
								
39	2	DPh2P	S	1,75 ± 0,18	5,76	29,66 ± 1,98	4,53	16,98
40	2	DPh3P	S	0,91 ± 0,07	6,04	22,70 ± 0,61	4,64	24,84
41	3	DPh1P	S	1,99 ± 0,14	5,70	24,09 ± 2,04	4,62	12,14
42	3	DPh2P	S	1,68 ± 0,17	5,78	24,04 ± 1,68	4,62	14,28
43	3	DPh3P	S	1,72 ± 0,20	5,76	22,82 ± 2,44	4,64	13,26
44	3	DPh4P	S	0,58 ± 0,07	6,24	9,17 ± 1,06	5,04	15,79
45	3	DPh5P	S	0,70 ± 0,08	6,16	10,55 ± 0,88	4,98	15,16
46	3	DFPh1P	S	4,77 ± 0,31	5,32	57,07 ± 2,91	4,24	11,96
47	3	ClPhPh1P	S	5,25 ± 0,65	5,28	43,33 ± 1,44	4,36	8,26
48	3	DPhOH1Pip	S	28,22 ± 3,71	4,55	62,41 ± 2,95	4,21	2,21
49	3	DPh1A	S	35,27 ± 5,37	4,45	308 ± 18,21	3,51	8,73
50	3	DPh2A	S	2,62 ± 0,26	5,58	19,28 ± 2,72	4,72	7,36
51	3	MP	-	4,53 ± 0,44	5,34	14,81 ± 0,44	4,83	3,27
52	3	MP	CH=CH	1,12 ± 0,23	5,95	15,65 ± 1,29	4,81	13,95
53	3	DPh5P	-	0,63 ± 0,06	6,20	13,64 ± 0,47	4,87	21,70
54	3	DPh5P	CH=CH	5,96 ± 1,08	5,23	53,83 ± 8,49	4,27	9,03

MP = 4-Methylpiperazin; DPh1P = 4-(Diphenylmethyl)-piperazin; DPh2P = 4-(Diphenylethyl)-piperazin; DPh3P = 4-(Diphenylpropyl)-piperazin; DPh4P = 4-(Diphenylbutyl)-piperazin; DPh5P = 4-(Diphenylpentyl)-piperazin; DFPh1P = 4-(Bis-(4-fluorphenyl)-methyl)-piperazin; ClPhPh1P = 4-(4-chlorphenyl-phenylmethyl)-piperazin; DPhOH1Pip = 4-(Diphenylhydroxymethyl)-piperidin; DPh1A = Diphenylmethylamin; DPh2A = Diphenylethylamin

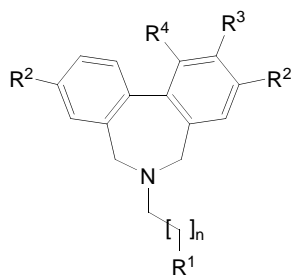
Verbindung	R ¹	IC ₅₀ _{MOD} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{MOD}	IC ₅₀ _{TOX} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{TOX}	MQ
						
55	MP	9,65 ± 0,10	5,02	28,48 ± 2,76	4,55	2,95
56	PIP	6,43 ± 1,31	5,19	32,76 ± 2,72	4,49	5,10
57	DPh5P	1,72 ± 0,02	5,76	8,58 ± 0,34	5,07	5,00

MP = 4-Methylpiperazin; PIP = Piperidin; DPh5P = 4-(Diphenylpentyl)-piperazin

Verbindung	n	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ _{MOD} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{MOD}	IC ₅₀ _{TOX} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{TOX}	MQ
58 cis	2	MP	H	H	5,70 ± 0,65	5,24	14,18 ± 2,46	4,85	2,49
58 trans	2	MP	H	H	4,55 ± 0,05	5,34	9,67 ± 1,40	5,02	2,13
58 RR	2	MP	H	H	4,95 ± 0,16	5,31	15,33 ± 0,37	4,81	3,09
58 SS	2	MP	H	H	4,33 ± 1,21	5,36	16,60 ± 4,85	4,78	3,83
59	2	MP	Cl	H	1,35 ± 0,06	5,87	4,13 ± 0,02	5,38	3,07
60 cis	2	DPh5P	H	H	2,04 ± 0,22	5,69	10,70 ± 1,04	4,97	5,24
60 trans	2	DPh5P	H	H	2,53 ± 0,57	5,60	11,96 ± 0,22	4,92	4,72
60 RR	2	DPh5P	H	H	2,29 ± 0,60	5,64	17,52 ± 4,56	4,76	7,67
60 SS	2	DPh5P	H	H	2,04 ± 0,24	5,69	14,79 ± 1,33	4,83	7,26
61	2	PIP	H	H	4,16 ± 0,57	5,38	19,29 ± 1,73	4,72	4,64
62	2	HEP	H	H	14,30 ± 3,82	4,85	28,90 ± 3,50	4,54	2,02
63	2	DPh1P	H	H	58,70 ± 8,19	4,23	91,13 ± 19,48	4,04	1,55
64	2	DPh2P	H	H	3,40 ± 0,50	5,47	3,62 ± 0,43	5,44	1,07
65	2	DPh3P	H	H	2,05 ± 0,74	5,69	10,01 ± 1,99	5,00	4,88
66	2	DPh4P	H	H	4,44 ± 0,11	5,35	13,10 ± 0,63	4,88	2,95
67	2	DPh5P	H	H	4,55 ± 0,73	5,34	17,17 ± 3,09	4,77	3,78
68	2	DFPh1P	H	H	2,52 ± 0,22	5,60	9,26 ± 0,05	5,03	3,68
69	1	MP	H	H	9,62 ± 1,90	5,02	17,84 ± 1,19	4,75	1,85
70	3	MP	H	H	4,31 ± 0,25	5,37	9,12 ± 0,61	5,04	2,12
71	1	DPh5P	H	H	3,68 ± 0,73	5,43	18,80 ± 0,76	4,73	5,11
72	3	DPh5P	H	H	17,60 ± 5,72	4,75	48,37 ± 9,91	4,32	2,75
73	2	PP	H	H	15,42 ± 4,31	4,81			
74	2	MPhP	H	H	48,75 ± 6,37	4,31			
75	2	CNPh	H	H	n.b.				
76	2	BzlP	H	H	46,29 ± 5,98	4,33			

MP = 4-Methylpiperazin; PIP = Piperidin; HEP = 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin; DPh1P = 4-(Diphenylmethyl)-piperazin; DPh2P = 4-(Diphenylethyl)-piperazin; DPh3P = 4-(Diphenylpropyl)-piperazin; DPh4P = 4-(Diphenylbutyl)-piperazin; DPh5P = 4-(Diphenylpentyl)-piperazin; DFPh1P = 4-(Bis-(4-fluorphenyl)-methyl)-piperazin; PP = 4-(2-Pyrimidyl)-piperazin; MPhP = 4-(2-Methylphenyl)-piperazin; CNPh = 4-(2-Cyanophenyl)-piperazin; BzlP = 4-Benzoylpiperazin; n.b. = nicht bestimmbar

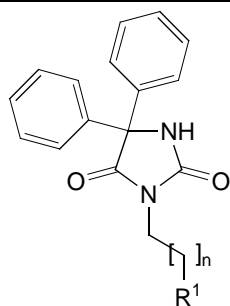
Verbindung	n	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	IC ₅₀ _{MOD} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{MOD}	IC ₅₀ _{TOX} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{TOX}	MQ
------------	---	----------------	----------------	----------------	----------------	--	----------------------------------	--	----------------------------------	----



77	3	DPh5P	H	H	H	2,85 ± 0,35	5,55	8,38 ± 0,28	5,08	2,95
-----------	---	-------	---	---	---	-------------	------	-------------	------	------

DPh5P = 4-(Diphenylpentyl)-piperazin

Verbindung	n	R ¹	IC ₅₀ _{MOD} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{MOD}	IC ₅₀ _{TOX} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{TOX}	MQ
------------	---	----------------	--	----------------------------------	--	----------------------------------	----



78	3	MP	45,48 ± 2,80	4,34	130,93 ± 2,29	3,88	2,88
79	3	DPh5P	1,99 ± 0,16	5,70	6,61 ± 0,51	5,18	3,32

MP = 4-Methylpiperazin; DPh5P = 4-(Diphenylpentyl)-piperazin

Verbindung	IC50 _{MOD} [$\mu\text{M} \pm \text{SD}$]	pIC50 _{MOD}	IC50 _{TOX} [$\mu\text{M} \pm \text{SD}$]	pIC50 _{TOX}	MQ
FPX	0,45 \pm 0,12	6,35	9,67 \pm 0,56	5,02	21,71
FPH	1,22 \pm 0,13	5,91	10,58 \pm 1,11	4,98	8,68
NCD	0,68 \pm 0,06	6,17	20,96 \pm 0,42	4,68	30,83
PF	1,30 \pm 0,27	5,89	25,10 \pm 2,4	4,60	19,28
RES	0,35 \pm 0,03	6,46	8,186 \pm 1,28	5,09	23,56
TFP	1,20 \pm 0,48	5,92	9,41 \pm 1,23	5,03	7,84
VER	1,30 \pm 0,24	5,89	65,03 \pm 10,33	4,19	50,00
VCR	--- ---	---	2,49 \pm 0,64	5,60	---

TFP = Trifluperazin; FPX = *cis*-Flupentixol; FPH = Fluphenazin; NCD = Nicardipin; VER = Verapamil; PF = Propafenon; RES = Reserpin; VCR = Vincristin

Verbindung	IC50 _{VCR+} [$\mu\text{M} \pm \text{SD}$]	Fold Reversal	Verbindung	IC50 _{VCR+} [$\mu\text{M} \pm \text{SD}$]	Fold Reversal	Verbindung	IC50 _{VCR+} [$\mu\text{M} \pm \text{SD}$]	Fold Reversal
				*[nM \pm SD]			*[nM \pm SD]	
18	0,34 \pm 0,06	7,31	37	2,59 \pm 0,09	0,96	60 cis	1,58 \pm 0,04	1,58
19	0,74 \pm 0,11	3,37	41	*260 \pm 17	9,51	73	*42 \pm 4	58,84
21	0,55 \pm 0,01	4,56	42	*35 \pm 3	71,02	74	*49 \pm 5	50,19
22	0,77 \pm 0,04	3,24	43	*33 \pm 2	74,60	77	1,83 \pm 0,11	1,36
23	0,62 \pm 0,05	4,00	44	*61 \pm 5	40,62	79	1,14 \pm 0,92	2,18
24	0,98 \pm 0,11	2,54	45	*58 \pm 3	42,59	FPX	*72 \pm 8	34,23
26	1,62 \pm 0,03	1,54	46	*273 \pm 14	9,12	FPH	*366 \pm 18	6,79
31	0,68 \pm 0,09	3,66	50	*430 \pm 135	5,74	NCD	*24 \pm 1	104,05
32	0,85 \pm 0,18	2,94	54	*131 \pm 20	18,99	PF	*236 \pm 17	10,52
34	1,23 \pm 0,30	2,03	55	0,31 \pm 0,02	8,12	RES	*20 \pm 1	122,24
35	1,01 \pm 0,12	2,46	58 cis	1,99 \pm 0,20	1,25	TFP	*685 \pm 64	3,63
36	1,03 \pm 0,12	2,42	59	1,01 \pm 0,28	2,46			

Tabelle 7: Übersicht über die FAR-Werte der am Durchflusszytometer vermessenen Substanzen

Verbindung	FAR ± SD	Verbindung	FAR	Verbindung	FAR
7	37,04 ± 12,28	2	4,13	31	0,97
8	34,56 ± 17,95	3	8,91	32	1,33
18	14,58 ± 9,01	4	21,51	33	0,91
19	9,26 ± 6,23	5	19,36	34	6,66
27	24,42 ± 8,40	6	29,83	39	4,57
36	15,52 ± 8,59	9	4,89	40	7,22
37	29,91 ± 19,00	10	13,61	41	2,02
53	26,71 ± 10,10	11	3,40	42	8,86
59	29,26 ± 6,18	13	3,08	43	14,02
60 cis	10,5 ± 5,51	14	19,78	44	23,39
60 trans	2,98 ± 0,84	15	9,85	45	9,94
60 RR	3,96 ± 0,99	16	88,19	46	0,93
60 SS	4,11 ± 1,01	20	0,91	50	9,23
77	22,27 ± 11,43	21	2,69	51	1,69
79	55,98 ± 13,81	25	1,02	52	4,21
VER	33,91 ± 16,55	26	13,84	CSP	105,53
TFP	15,46 ± 8,46	28	5,86		
FPX	23,22 ± 2,86	29	1,25		
NCD	24,8 ± 13,96	30	13,54		

VER = Verapamil; TFP = Trifluoperazin, FPX = *cis*-Flupentixol; NCD = Nicardipin; CSP = Cyclosporin

Substanzen, für deren FAR-Werte eine Standardabweichung angegeben ist, wurden dreimal an verschiedenen Tagen vermessen. Die übrigen Substanzen wurden lediglich einmal im Rahmen eines Screenings vermessen.

Bedeutung der Abkürzungen der Tabellen:

IC50_{MOD}: Konzentration an Modulator, bei der in Gegenwart einer bestimmten Zytostatikakonzentration 50 % aller behandelten Zellen nicht überlebten.

IC50_{TOX}: Konzentration an Modulator bei der 50 % aller Zellen nicht überlebten

IC50_{VCR+}: Konzentration an Vincristin, bei der in Gegenwart einer bestimmten Modulatorkonzentration (IC10) 50 % aller Zellen nicht überlebten

IC10: Konzentration des Modulators, bei der 10 % der Zellen nicht überlebten

MQ: modulatorischer Quotient

FR: Fold Reversal

FAR: Fluorescence Activity Ratio

SD: Standardabweichung

5.3.4 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Anhand der Ergebnisse der Zellversuche können durch systematische Variation und Kombination von Moleküldomänen (lipophiles Grundgerüst, Linker, basischer Rest) neben allgemeinen Struktur-Wirkungs-Beziehungen auch gezielt Rückschlüsse auf die Wirksamkeit einzelner Teilbereiche der Verbindungen gezogen werden. Zur Veranschaulichung werden in den folgenden Diagrammen die ermittelten Wirkwerte ausgewählter Endverbindungen mit jeweils zwei identischen und einer variablen Moleküldomäne dargestellt. Es werden die jeweils wirksamsten Verbindungen betrachtet. Die Zahl auf der Abszisse kennzeichnet die jeweilige Substanz, die Ordinate gibt den ermittelten modulatorischen Quotienten an.

5.3.4.1 Lipophiles Grundgerüst

Phenothiazine

Die *Abbildung 19* zeigt die modulatorischen Quotienten von Verbindungen mit PhenothiazinGrundkörpern. Dabei wurde ausgehend von Trifluperazin bei konstanter Linkerlänge (C_3) und einheitlichem 4-Methylpiperazin-Rest am Linker zuerst die Substitution am PhenothiazinGrundgerüst variiert. Es zeigte sich, dass in 2-Stellung die Acylreste Benzoyl (**6**), Propionyl (**4**), Butyryl (**5**) und Acetyl (**3**) am besten wirksam sind. Ebenfalls gut wirksam erwiesen sich neben Verbindungen mit ankondensiertem Benzolring in [a] (**8**) und in [c] Stellung (**7**) auch Ethoxy- (**10**) bzw. Methoxygruppen (**9**) in 3-Stellung. Weniger gut wirksam war Verbindung **11** die mit voluminösen Tertiärbutyl-Resten in 3 und 7 Position substituiert wurde. Da neben der MDR-modulatorischen Komponente der Phenothiazine deren eigentliche neuroleptische Hauptwirkung durch Blockade von Dopaminrezeptoren und weitere pharmakologische Wirkungen unter Blockade von Muscarin- oder Histaminrezeptoren den Einsatz als MDR-Modulatoren limitiert, wurde versucht, über Modifizierung der Länge des Linkers die neuroleptische Wirksamkeit abzuschwächen. Der erste Schritt war eine Verlängerung des Linkers auf vier Kohlenstoffatome (**12-26**), zumal aus der vorangegangenen Arbeit von *Ungvari* bekannt war, dass ein vierzähliger Linker eine dem dreizähligen vergleichbare Wirksamkeit besitzt [Ungvari 2005]. Auch bei diesen Verbindungen ist eine gute Wirksamkeit der in 2-Stellung acylierten Substanzen zu beobachten. Substanz

16 (Benzoyl-Rest) weist den höchsten modulatorischen Quotient aller synthetisierten Verbindungen auf. Allerdings ändert sich im Vergleich zu den Verbindungen mit dreizähligen Linker die Reihenfolge der Wirkstärke für die übrigen Reste (Butyryl (**15**) > Propionyl (**14**) > Acetyl (**13**)). Auch die Verbindungen **18** und **19**, mit den ankondensierten Ringen folgen in ihrer Wirkstärke. Anzumerken ist, dass die modulatorischen Quotienten für die Verbindungen mit C₄-Linker mit einer Ausnahme niedriger sind als bei den entsprechenden Verbindungen mit C₃-Linker. Die Alkylierung in 3-Stellung bringt nur eine geringe Wirkverstärkung im Vergleich zu Trifluoperazin.

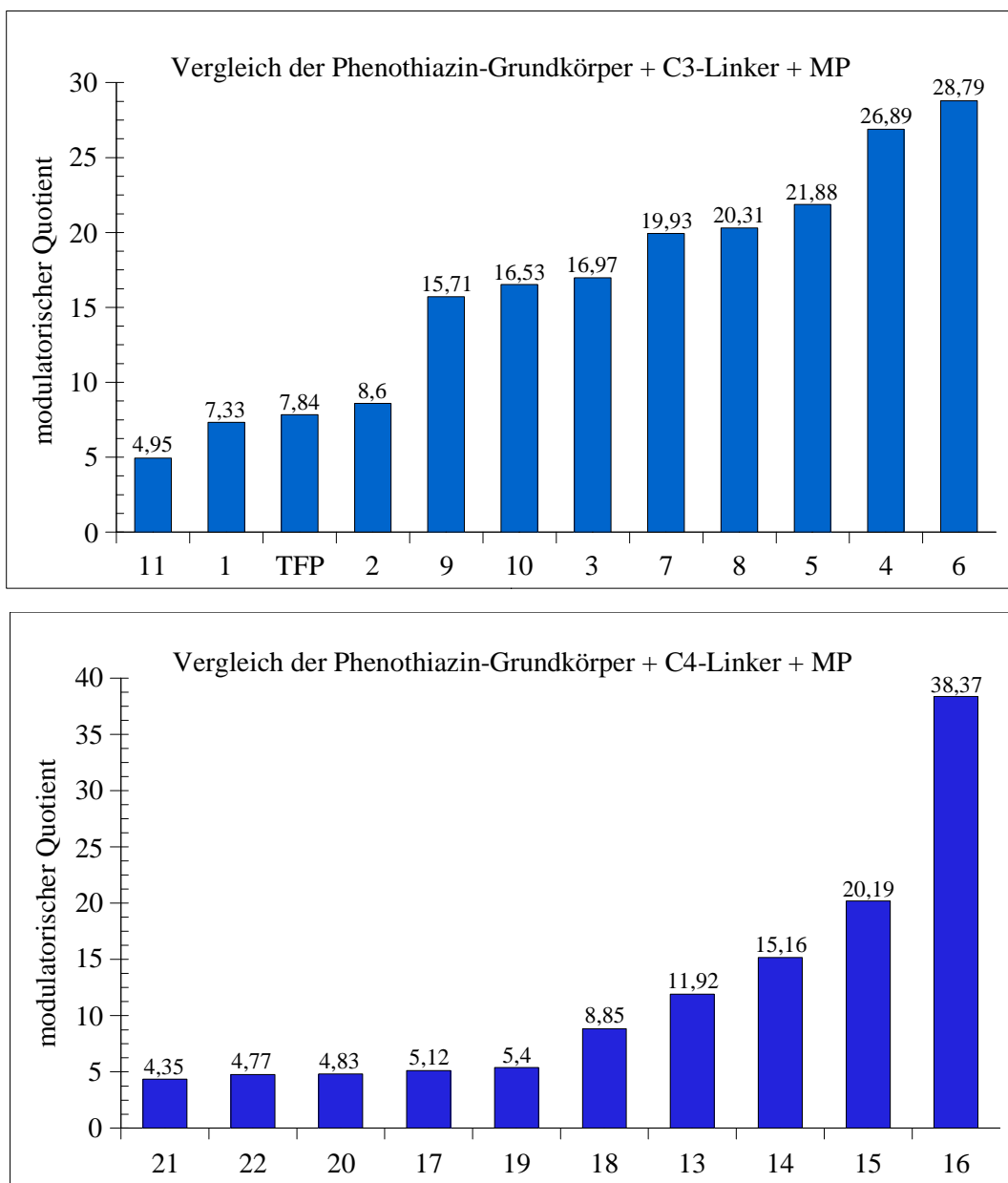


Abbildung 19: Einfluss des Phenothiazingrundkörpers auf die Wirksamkeit der 4-Methylpiperazin-Derivate (Formeln s. Seiten 56 und 57)

Übrige Grundkörper

Bereits vor der Synthese der Phenothiazinverbindungen wurde eine Reihe weiterer Substanzen synthetisiert und untersucht [Ungvari 2005]. Der Wirkungsvergleich dieser übrigen lipophilen Grundstrukturen erfolgt durch Substanzen mit jeweils einheitlicher Linkerlänge und 4-Methylpiperazin-Rest, da dieser als basischer Standardrest bei allen verwendeten Grundstrukturen substituiert wurde.

Wie in *Abbildung 20* zu erkennen, ist die Wirkstärke der übrigen Substanzen allgemein geringer als bei den Phenothiazin-Derivaten. Die beste Wirksamkeit zeigt Substanz **52** mit einer trizyklischen Iminostilben-Grundstruktur. Eine Korrelation zwischen modulatorischem Effekt und der Struktur zeigen die 4,5-Diphenyl-1,3-dioxolane, bei denen es sich um bis dahin als MDR-Modulatoren unbekannte Verbindungen handelt [Ungvari 2005]. Die zwischen den einzelnen Strukturisomeren feststellbaren Unterschiede lassen eine bessere Wirksamkeit der optisch aktiven Formen gegenüber den *meso*-Formen erkennen (**54/SS** > **54/RR** > **54/cis** > **54/trans**).

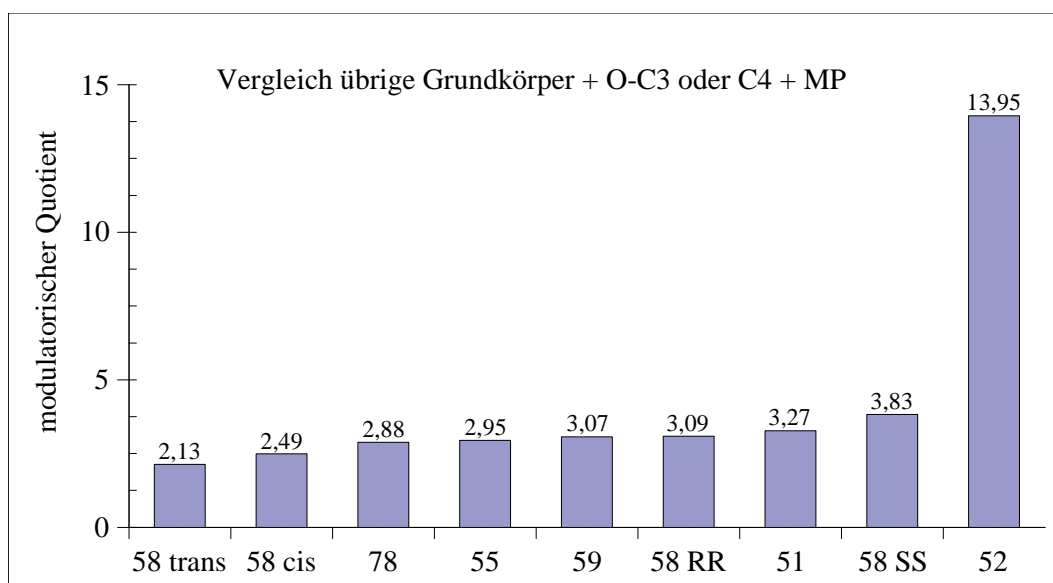


Abbildung 20: Einfluss der übrigen Grundstrukturen auf die Wirksamkeit der 4-Methylpiperazin-Derivate (Formeln s. Seite 58 und 59)

Dieses Ergebnis bleibt auch bestehen wenn, wie in *Abbildung 21* dargestellt, der 4-Methylpiperazin-Rest gegen 4-(Diphenylpentyl)-piperazin ausgetauscht wird. Lediglich das SS-Isomer **60 SS** tauscht mit dem RR-Isomer **60 RR** bei ähnlicher Wirkstärke die Position. Obwohl die Iminostilben-Verbindung **54** nach wie vor gute Wirksamkeit besitzt, zeigt nun das Carbazol-Derivat (**53**) den größten modulatorischen Effekt. Auch die Reihenfolge von 2,2-Diphenyl-1,3-dioxolan (**57**) und Hydantoin-Grundkörper (**79**) bleibt erhalten. Auf die Tatsache, dass der modulatorische Quotient größer ist als bei den Verbindungen mit 4-Methylpiperazin-Rest, wird an späterer Stelle eingegangen.

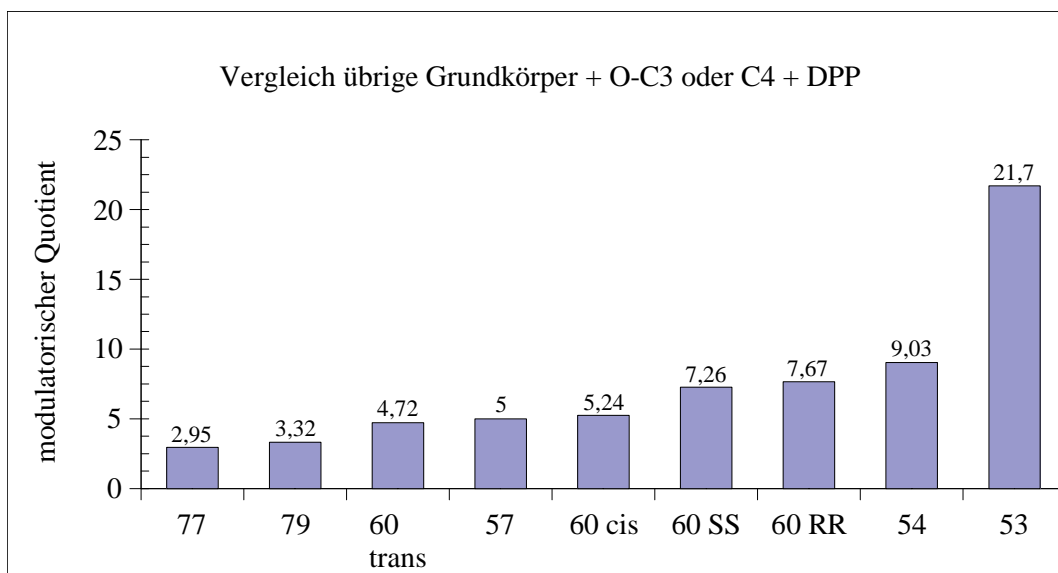


Abbildung 21: Einfluss der übrigen Grundstrukturen auf die Wirksamkeit der 4-(Diphenylpentyl)-piperazin-Derivate (Formeln s. Seiten 58, 59 und 60)

5.3.4.2 Linker

Phenothiazine

Abbildung 22 zeigt den Einfluss von unterschiedlichen Kettenlängen des Linkers auf die Wirksamkeit der Phenothiazine bei gleichem Grundkörper und 4-Methylpiperazin-Rest. Hier zeigt der Linker mit Carbonylfunktion in α -Stellung (**33**) eine höhere Wirkstärke als die Alkyl-Linker. Bei diesen ist zu beobachten, dass Verbindungen deren Linker aus einer ungeraden Anzahl Atome besteht, wirksamer sind als solche bei denen der Linker aus einer geraden Anzahl besteht. Innerhalb der Gruppe mit ungerader Anzahl nimmt die Wirkstärke mit steigender Kettenlänge ab (**32** > **34** > **31** > **36**). Bei den Verbindungen mit gerader Anzahl Kohlenstoffatome ist dieser Trend nicht zu beobachten. Das unsubstituierte Phenothiazin **12** mit vierzähligen Linker erweist sich im Vergleich zu den übrigen Strukturen als relativ schwach.

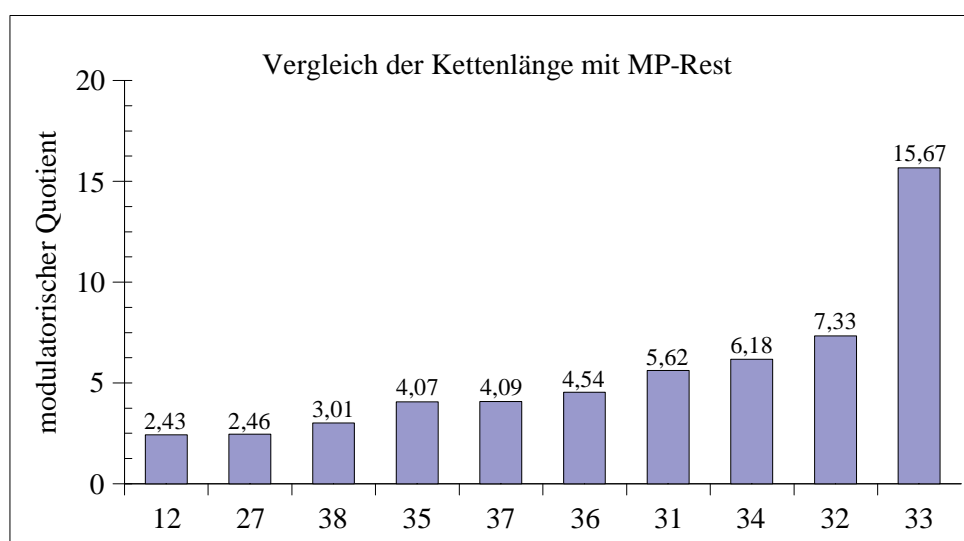


Abbildung 22: Einfluss des Linkers auf die Wirksamkeit der Phenothiazine mit 4-Methylpiperazin-Rest (Formeln s. Seiten 56 und 57)

In Abbildung 23 ist der Einfluss der Kettenlänge auf die Wirksamkeit von verschiedenen Phenothiazin-Derivaten dargestellt. Es handelt sich um die jeweils wirksamsten Verbindungen, die alle in 2-Stellung acyliert sind. Wiederum ist mit der Ausnahme des Benzoyl-Substituenten der dreizählige Linker dem vier- bzw. achtzähligen überlegen.

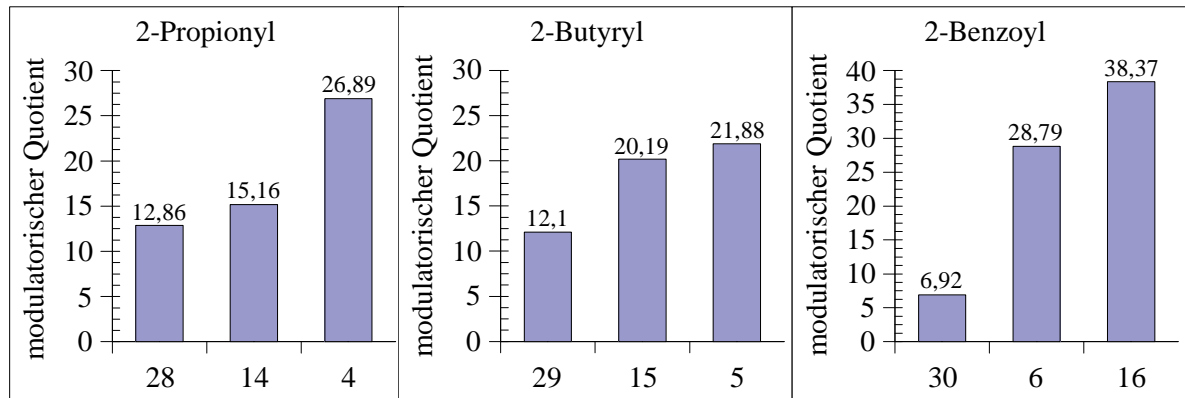


Abbildung 23: Einfluss der Linkerlänge bei verschiedenen PhenothiazinGrundkörpern mit MP-Rest (Formeln s. Seiten 56 und 57)

Übrige Grundkörper

Da es sich bei den im Vorfeld der Synthese und Testung der Phenothiazin-Derivate untersuchten 4,5-Diphenyl-1,3-dioxolanen um neuartige Strukturen handelt, existierten zunächst keine Erkenntnisse über die optimale Länge des Linkers. Dieser besteht aus den C-Atomen der Alkylkette und dem Ethersauerstoff des bei der Synthese eingesetzten 4-Hydroxybenzaldehyds.

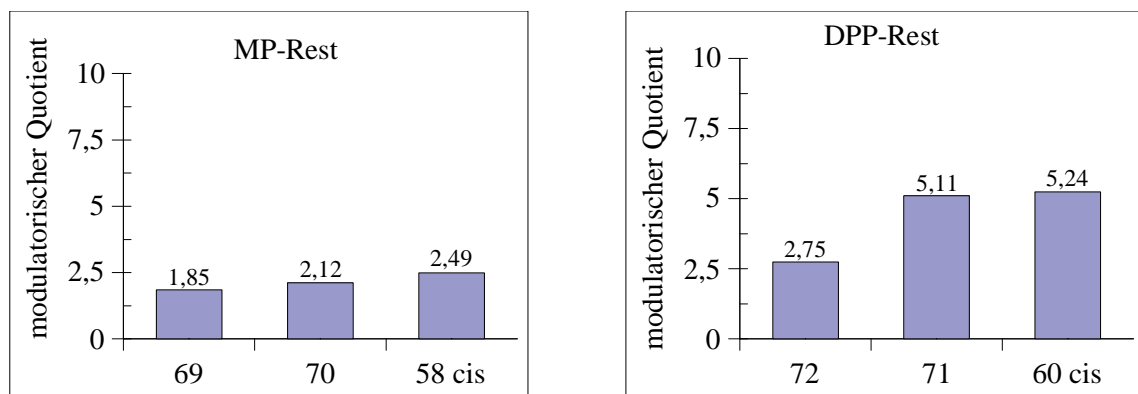


Abbildung 24: Einfluss der Linkerlänge auf die Wirksamkeit der 4,5-Diphenyl-1,3-dioxolane mit 4-Methylpiperazin- bzw. 4-(Diphenylpentyl)-piperazinrest (Formeln s. Seite 59)

Abbildung 24 zeigt den Einfluss der Linker-Länge auf die Wirksamkeit der 4,5-Diphenyl-1,3-dioxolane. Dargestellt ist der modulatorische Quotient der Verbindungen mit den beiden wirksamsten basischen Resten (MP, DPP) mit dreizähligen (OC_2), vierzähligen (OC_3) und fünfzähligen Linker (OC_4). Es zeigte sich, dass für beide basischen Reste der vierzählige Linker eine geringfügig bessere

Wirksamkeit aufweist. Damit stellt dieser eine für diese Substanzklasse günstige Entfernung zwischen dem lipophilen Molekülteil und dem basischen Rest dar. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden für die Phenothiazine, wie bereits erwähnt, als erster Schritt zur Modifikation der Kettenlänge Substanzen mit vierzähliger Linker synthetisiert. Bei diesen wurde davon ausgegangen, dass sie die übrigen pharmakologischen Wirkungen der Verbindungen mit dreizähliger Linker nicht in dem bekannten Maße aufweisen.

5.3.4.3 Basische Reste

Phenothiazine

Die in *Abbildung 25* dargestellten modulatorischen Quotienten geben den Einfluss von verschiedenen basischen Resten auf die Wirksamkeit der Phenothiazine wieder. Der Grundkörper aller Verbindungen ist das unsubstituierte Phenothiazin mit vierzähligem Linker. Allgemein kann festgestellt werden, dass die 4-(Diphenylalkyl)-piperazin-Reste (**41-50**) besser wirksam sind als der 4-Methylpiperazin-Rest (**12**). Auffällig ist, dass Verbindungen mit nur einer Aminogruppe im Linker (**48-50**) einen geringeren modulatorischen Quotienten aufweisen als die Piperazin-Derivate. Verbindung **48** ist bedingt durch die erhöhte Hydrophilie aufgrund der Hydroxylgruppe in unmittelbarer Nähe der Phenyl-Reste die schwächste der hier aufgeführten Substanzen.

Bei den übrigen Resten scheint ein Abstand von vier (**44**) oder fünf (**45**) Kohlenstoffatomen zwischen Piperazin und den Phenylringen günstig für die Wirksamkeit zu sein. Dieser Abstand entspricht etwa dem Abstand zwischen Piperazin und Grundkörper. Innerhalb dieser Gruppe kann ein allgemeiner Zusammenhang zwischen Basizität und Wirkstärke festgestellt werden. Die Basizitäten von **44** und **45** sind aufgrund der Kettenlänge ungefähr gleich. Gleichzeitig sind es die höchsten der hier verwendeten Substituenten, was sich in der guten Wirksamkeit der Verbindungen widerspiegelt. Kürzere Kettenlängen (**41-43**) führen zu geringerer Wirksamkeit und die Einführung elektronenziehender Substituenten in die Phenylringe (**46, 47**) verringert die Wirkung zusätzlich.

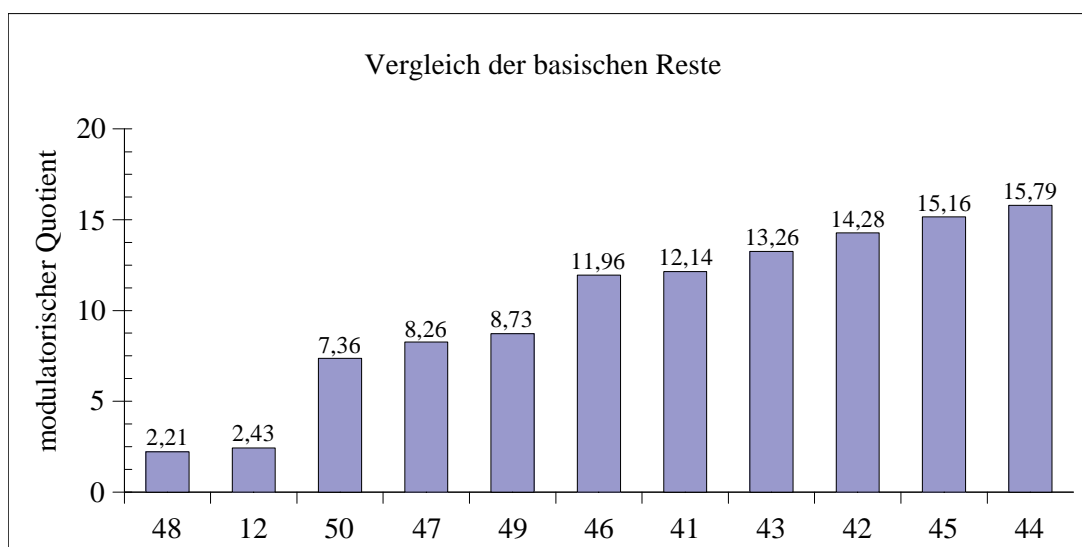


Abbildung 25: Einfluss des basischen Restes auf die Wirksamkeit des Phenothiazin-Grundkörpers (Formeln s. Seite 56 und 58)

Übrige Grundkörper

Abbildung 26 zeigt den modulatorischen Quotienten von Verbindungen mit unterschiedlichen basischen Resten. Die hier verglichenen Substanzen besitzen als einheitlichen Grundkörper alle einen 4,5-Diphenyl-1,3-dioxolanring (*cis*-Isomer) mit vierzähligem Linker (O-C₃).

Allgemein ist zu erkennen, dass die 4,5-Diphenyl-1,3-dioxolane im Vergleich zu den Phenothiazin-Derivaten eine geringere Wirksamkeit aufweisen. Im Vergleich zum Phenothiazin-Grundkörper bewirken die unsubstituierten 4-(Diphenylalkyl)-piperazin-Reste gegenüber der 4-Methylpiperazin-Verbindung **58** hierbei erst eine Wirkungsverstärkung, wenn die Länge der Alkylkette mindestens drei Kohlenstoffatome beträgt (**60 cis**, **65**, **66**). Weiterhin fällt auf, dass so der Austausch des 4-Methylpiperazins gegen Piperidin (**61**) zur Wirkungsverstärkung führt, obwohl damit das zweite basische Zentrum wegfällt. Die *para*-Fluorsubstitution der Phenylringe (**68**) bewirkt ebenfalls eine Erhöhung des modulatorischen Quotienten im Vergleich zur unsubstituierten Verbindung **63**. Die beiden letzten genannten Ergebnisse stehen überraschenderweise im Gegensatz zu den Beobachtungen bei den Phenothiazin-Verbindungen. Der 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-Substituent (**62**) erhöht die Hydrophilie des Moleküls und senkt erwartungsgemäß die Wirksamkeit der Verbindung.

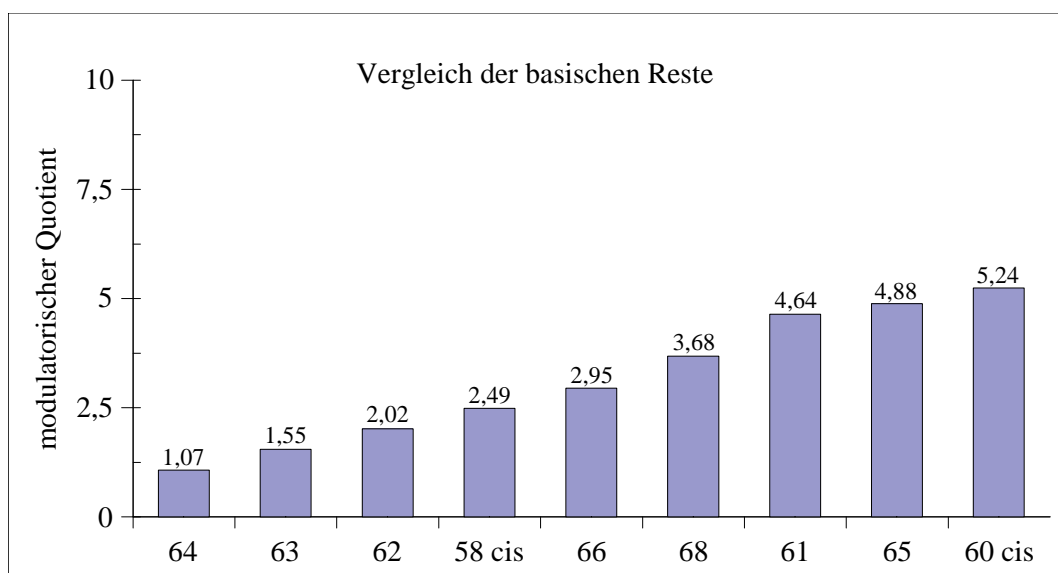


Abbildung 26: Einfluss des basischen Restes auf die Wirksamkeit des 4,5-Diphenyl-1,3-dioxolan-Grundkörpers

Der 4-(Diphenylpentyl)-piperazin-Rest zeigt bei allen untersuchten Verbindungen eine bessere Wirksamkeit als der 4-Methylpiperazin-Rest; einzige Ausnahme stellt der Iminostilben-Grundkörper (**52**, **54**) dar.

Abbildung 27 zeigt den Vergleich zwischen jeweils gleichen Grundkörpern mit vierzähligem Linker, bei denen einmal 4-Methylpiperazin und einmal 4-(Diphenylpentyl)-piperazin als basischer Rest substituiert wurde.

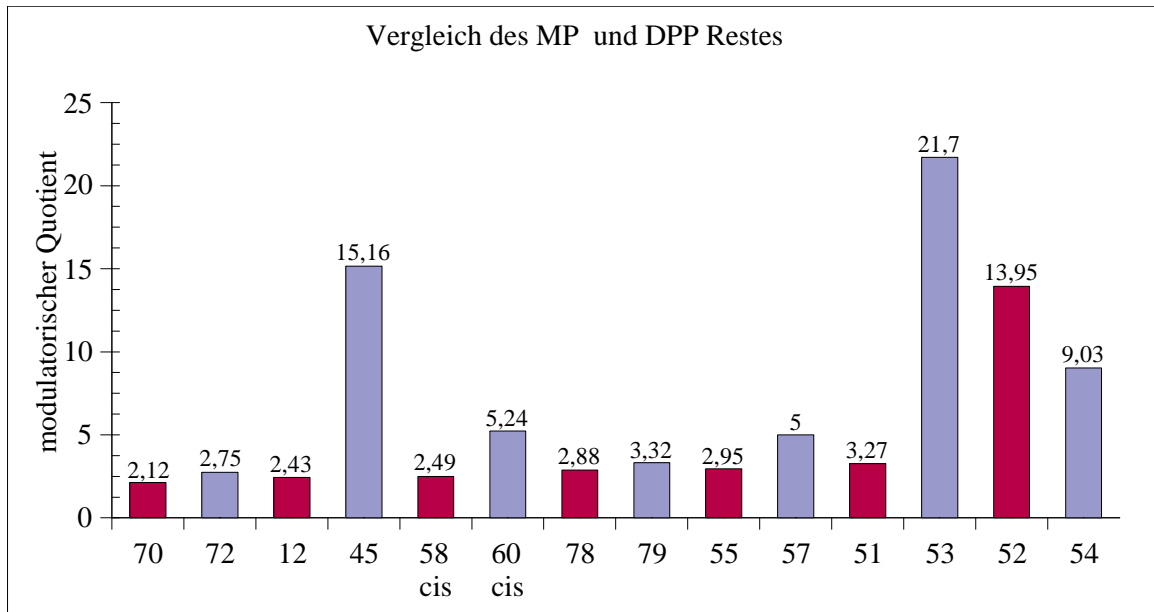


Abbildung 27: Vergleich der Wirkung des 4-Methylpiperazin-Rests (rot) und des 4-(Diphenylpentyl)-piperazin-Rests (blau) auf verschiedene Grundkörper

5.3.4.4 Vergleichssubstanzen

Abbildung 28 zeigt die modulatorischen Quotienten der verwendeten Vergleichssubstanzen. Es handelt sich dabei um Arzneistoffe mit bekannter modulatorischer Wirkung am P-Glykoprotein. Am besten wirksam zeigten sich hier die Calciumantagonisten Verapamil (**VER**) und Nicardipin (**NCD**). Der potenteste Vertreter bei den Phenothiazinen ist cis-Flupentixol (**FPX**). Trifluperazin (**TFP**) und Fluphenazin (**FPH**) entsprechen sich in etwa in ihrer Wirkstärke.

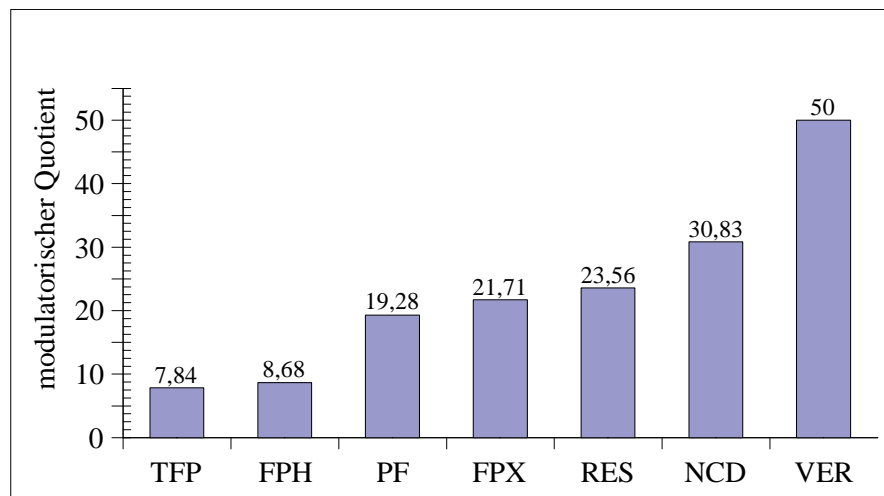


Abbildung 28: Vergleichssubstanzen

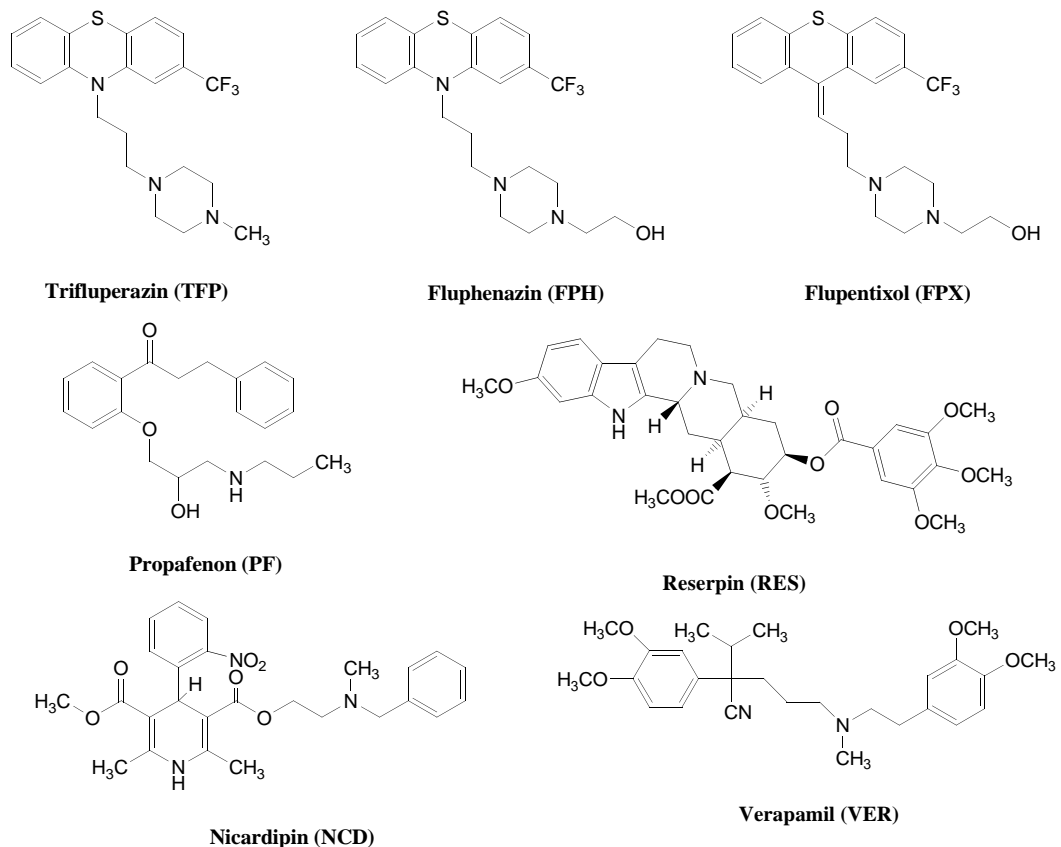


Abbildung 29: Strukturformeln der verwendeten Vergleichssubstanzen

5.4 Modulatorischer Quotient und Fold Reversal

Zur Bestimmung der modulatorischen Potenz einer Substanz mit Hilfe von Zytotoxizitätstests können unterschiedliche Werte herangezogen werden. Diese Einzelwerte sind idelaer Weise nicht isoliert, sondern im Zusammenhang zu betrachten. Betrachtet man alleine die $IC_{50_{MOD}}$, die Konzentration des Modulators, bei der in Gegenwart einer definierten, untoxischen Konzentration des verwendeten Zytostatikums nur 50 % der Zellen im Vergleich zur Kontrolle überleben, kann man noch keine Aussage zur Toxizität der untersuchten Verbindung machen. Die Bestimmung der $IC_{50_{TOX}}$, die Konzentration des Modulators bei der 50 % der Zellen im Vergleich zur Kontrolle überleben, wiederum sagt nichts zur Wirksamkeit einer Substanz aus. Eine gute Möglichkeit beide in ein Verhältnis zu setzen ist die Ermittlung des modulatorischen Quotienten (s. 4.1.4.5.1). Ein Nachteil dieser Bestimmung ist, dass geringe Toxizitäten und geringe Schwankungen bei kleinen $IC_{50_{MOD}}$ -Werten zu starken Schwankungen des Quotienten führen können.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Berechnung der Fold Reversal (s. 4.1.4.5.2). Sie ist definiert als Quotient aus der IC_{50} des eingesetzten Zytostatikums in Abwesenheit bzw. Gegenwart einer relativ untoxischen Konzentration des Modulators.

Dieser Wert variiert in der Praxis allerdings, da einige Arbeitsgruppen äquimolare, andere dagegen äquitoxische Konzentrationen, üblicherweise die IC_{10} , verwenden. Untersuchungen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen werden bevorzugt mit Daten gleicher molarer Konzentrationen der verglichenen Modulatoren durchgeführt [Wiese, Pajeva 2001]. Das hat den Nachteil, dass Substanzen, die bei höheren Konzentrationen immer noch untoxisch sind, „übersehen“ werden können

Zusätzlich ist anzumerken, dass bei dieser Methode die Konzentration des Zytostatikums variiert, während die Therapieschemata in der klinischen Praxis vorwiegend fixe Konzentrationen vorgeben. Hinzu kommt, dass es für die praktische Anwendung und effiziente Durchführung der Experimente günstiger ist, bei konstanter Konzentration des Zytostatikums die Konzentration des Modulators zu verändern. Deshalb lag bei dieser Arbeit der Schwerpunkt auf der Bestimmung des modulatorischen Quotienten.

Für eine Reihe von ausgewählten Verbindungen wurden trotzdem Werte für Fold Reversal bestimmt (vgl. *Tabelle 6, S.61*). Es zeigte sich, dass Substanzen mit einem geringen modulatorischen Quotienten auch geringe Fold Reversal Werte aufwiesen. Dementsprechend wurden für Verbindungen mit hohem modulatorischen Quotienten

hohe Fold Reversal Werte ermittelt. So zeigte zum Beispiel die Substanz mit dem höchsten modulatorischen Quotienten (**16**) den höchsten Wert für Fold Reversal von allen synthetisierten Substanzen .

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die gute Wirksamkeit der Phenothiazine mit DiphenylpiperazinResten mit unterschiedlichen Kettenlängen (**42–45**). Wobei überrascht, dass die Verbindungen **42** und **43** mit kürzeren Abständen zwischen Piperazin und Diphenylrest besser wirksam sind als die Verbindungen die dort Kettenlängen von vier bzw. fünf Kohlenstoffatomen aufweisen (**44, 45**). Aufgrund deren Basizität, wäre das Ergebnis in umgekehrter Reihenfolge zu erwarten gewesen.

5.5 FACS-Analysen

Ergänzende Experimente am Durchflusszytometer bestätigten die gewonnenen Erkenntnisse. Auch hier zeigte sich, dass die Substanzen mit hohen Werten für modulatorischen Quotient und Fold Reversal in der Lage sind, das P-Glykoprotein wirksam zu hemmen. Die durchflusszytometrische Bestimmung unterscheidet sich von den vorangegangenen Versuchen dadurch, dass kürzere Zeiträume betrachtet werden, in denen die Aktivität der zu untersuchenden Transporter anhand des Effluxes von Fluoreszenzfarbstoffen aus den Zellen beurteilt wird. Demgegenüber steht die Auswertung des Wachstums von Zellen nach 72 Stunden, bei der die Wirkung des Modulators indirekt über die Zunahme der Toxizität des gleichzeitig vorhandenen Zytostatikums im Vergleich zu un- bzw. monobehandelten Kontrollen gemessen wird.

Von den am FACS vermessenen Substanzen zeigten sich wiederum jene mit 4-(Diphenylalkyl)-piperazin-Rest als wirksam (**43, 44, 53, 77, 79**). Des Weiteren fällt auf, dass von den Phenothiazinen die Verbindungen mit dreizähligen Linker hohe FAR-Werte aufweisen (**4, 5, 6, 7, 8**), was deren gute Wirksamkeit bestätigt (vgl. *Tabelle 7*). Für die Phenothiazine mit vierzähligen Linker bestätigt sich die in den Zytotoxizitätstests ermittelte Wirksamkeit ebenfalls. Die in 2-Stellung benzylierte Verbindung **16** scheint auch hier ein hohes MDR-modulatorisches Potential zu besitzen.

6 Diskussion

Die Entwicklung und Charakterisierung von Wirkstoffen mit MDR-modulierenden Eigenschaften ohne pharmakologische Eigeneffekte ist im Zusammenhang mit der Überwindung von Resistenzprozessen beim Einsatz von Zytostatika und Chemotherapeutika sowie im Rahmen der Optimierung der Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen von großer Bedeutung. Daher ist die Suche nach neuen potenten Verbindungen ein aktuelles Forschungsgebiet. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Vielzahl von neu synthetisierten Wirkstoffen an geeigneten Testsystemen untersucht und die MDR-modulierende Wirksamkeit ermittelt. Weiterhin erfolgt die Analyse von Struktur-Wirkungs-Beziehungen.

Als biologisches Testsystem dienten die Nierenepithel-Zelllinien von Schwein LLC-PK1 und LLC-MDR1. Für ihre biologische Funktion als Nierenzellen ist die Expression verschiedenster Transportproteine essentiell. So konnten neben zahlreichen SLC-Transportern auch MRP und P-Glykoprotein detektiert werden [Schlatter et al. 2006]. Die biologische Aktivität bzw. Expression dieser konstitutiven Transporter ist im Vergleich zu jener des, im Fall der LLC-MDR1-Zellen, überexprimierten humanen P-Glykoproteins zu gering, um in nennenswertem Umfang für die untersuchten Transportvorgänge verantwortlich zu sein.

Die Aktivität der zelleigenen ABC-Transporter konnte im Zeitraum der Untersuchungen auch nicht durch Exposition mit Vinblastin erhöht werden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit, mit Medium 199, das zusätzlich 10 % FKS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µM/ml Streptomycin enthielt. Das Nährmedium der LLC-MDR1-Zellen enthielt darüber hinaus noch 640 nM Vincristinsulfat um die Expression des eingebrachten P-gp aufrecht zu erhalten.

Der Wechsel des Zellkulturmediums erfolgte alle zwei bis drei Tage, die Passage der Zellen ein- bis zweimal wöchentlich. Die Zellen wuchsen in 75cm² Flaschen mit 12ml Zellkulturmedium bis zur Konfluenz.

Die durch die *in-vitro* Testungen erhaltenen Messergebnisse zeigen, dass eine Vielzahl der untersuchten Verbindungen ein MDR-modulatorisches Potential besitzt. Allerdings variieren die Ergebnisse für die einzelnen Substanzen aufgrund der unterschiedlichen Untersuchungsmethoden teilweise recht deutlich.

So zeigen zum Beispiel das Dibenzazepin-Derivat mit vierzähligem Linker und 4-(Diphenylpentyl)-piperazin-Rest (**77**) und das entsprechende Hydantoin-Derivat (**79**) sehr gute Ergebnisse bei den Experimenten am Durchflusszytometer, obwohl sie nur geringe Werte für den modulatorischen Quotienten und Fold Reversal aufweisen. Demgegenüber steht die Iminostilbenverbindung mit vierzähligem Linker und 4-Methylpiperazin-Rest (**52**), die relativ hohe Werte für den modulatorischen Quotienten aufweist, dafür aber bei den Ergebnissen der Fluoreszenzmessung nur eine schwache Wirksamkeit besitzt.

Es sind aber auch Übereinstimmungen zu beobachten. Stellvertretend dafür stehen die Verbindungen mit Phenothiazingrundkörper und daran ankondensierten Aromaten. Hier erweisen sich jeweils die Verbindungen mit dreizähligem Linker (**7, 8**) wirksamer als die Verbindungen mit vierzähligem Linker (**18, 19**). Genauso verhält es sich mit den in 2-Stellung acylierten Phenothiazinen (**3-6, 13-16, 28-30**). Auch hier bestätigten die FACS-Messungen die Ergebnisse der Zytotoxizitätstests, nach denen die benzoilylierten Verbindungen (**6, 16, 30**) jeweils die wirksamsten darstellen und der dreizählige Linker dem vier- bzw. achtzähligen überlegen ist. Substanz **16**, als stärkste aller getesteten Verbindungen, stellt hier erneut eine Ausnahme dar.

Von den Vergleichssubstanzen erweist sich Verapamil im Rahmen der Zytotoxizitätsversuche am potentesten. Bei den durchflusszytometrischen Messungen zeigen einige Verbindungen Wirkwerte, die denen von Verapamil ähneln oder teilweise sogar besser sind (**7, 8, 16, 79**).

Der Grund für die abweichenden Ergebnisse ist im unterschiedlichen Ansatz der Methoden zur Bestimmung der biologischen Wirksamkeit zu suchen. Bei den Messungen am Durchflusszytometer steht der Transport von Fluoreszenzfarbstoffen aus dem Zellinneren, bzw. der Zellmembran im Mittelpunkt. Er dient als Maß für die Aktivität vorhandener Transporter, welche durch Modulatoren beeinflusst werden können. Die Wirksamkeit einer Verbindung wird hier indirekt über ihre Fähigkeit zur Hemmung des Transports von Fluoreszenzfarbstoffen gemessen.

Dem gegenüber stehen die Zytotoxizitätstests, bei denen das Wachstum von Zellen über einen bestimmten Zeitraum ausgewertet wird. Das Verhältnis der Überlebensraten in Gegenwart beziehungsweise in Abwesenheit eines Zytostatikums respektive Modulators oder deren Kombination, im Bezug auf unbehandelte Kontrollzellen, gibt dabei Aufschluss auf die Wirksamkeit der betrachteten Verbindungen.

Da sich die für die Auswertung zur Verfügung stehenden Methoden ähneln, kam aus

Gründen der Praktikabilität der relativ einfache Kristallviolett-Test zur Anwendung. Dieser bietet den Vorteil, dass durch das Anfärben von Zellstrukturen die Proliferationsrate der eingesetzten Zellen unabhängig von deren biologischer Aktivität bestimmbar ist.

Der Einfluss der untersuchten Verbindungen auf den Stoffwechsel der Zelle, etwa hinsichtlich Membranschädigung oder Induktion von oxidativem Stress, war nicht Gegenstand der Untersuchungen und kann mit dieser Methode nicht erfasst werden.

Die ermittelten Werte für den modulatorischen Quotienten und Fold Reversal liegen je nach Substanz zwischen 1 und 50 bzw. zwischen 1 und 120. Eine mögliche gegenseitige Verstärkung zytotoxischer Effekte der untersuchten Substanz und des Zytostatikums ist hierbei denkbar. Allerdings lassen die bei manchen Verbindungen ermittelten niedrigen Werte dieser Quotienten den Schluss zu, dass dieser Effekt eine untergeordnete Rolle spielt.

Bei niedrigen Werten für den modulatorischen Quotienten liegen $IC_{50_{TOX}}$ und $IC_{50_{MOD}}$ nahe beieinander. Der Grund für diesen geringen Unterschied könnte, bei ähnlicher Toxizität der untersuchten Konzentration, entweder eine nur sehr schwach ausgeprägte modulatorische Wirkung auf P-gp sein, in deren Folge Vincristin nur schwach toxisch in der Zelle wirken könnte oder bei gänzlich fehlender Hemmung des Transporters eine eventuell vorhandene geringe Toxizität von Vincristin. Bei niedrigen Werten für Fold Reversal reicht die untoxische Konzentration des untersuchten Modulators ebenfalls nicht aus, um die Wirksamkeit von Vincristin zu erhöhen.

Trotz der unterschiedlichen Herangehensweisen lässt sich festhalten, dass es sich bei den wirksamsten Substanzen ausnahmslos um lipophile Moleküle handelt. Eine Erniedrigung der Lipophilie zieht einen deutlichen Wirkungsverlust nach sich (**48, 62**).

Beim Vergleich der basischen Reste korrelieren die Ergebnisse mit den aus der Literatur bekannten Anforderungen an diesen Molekülteil [Wiese; Pajeva 2001]; [Schmidt et al. 2002], wobei sich mehrere protonierbare, tertiäre Amine, integriert in zyklische Strukturen, positiv auf die Wirksamkeit der Moleküle auswirken. Die wirksamsten Reste stellen dabei Piperazin-Derivate mit zwei basischen Zentren dar.

Der Abstand von mindestens 5 Å oder vier Kohlenstoffatomen zwischen lipophiler Grundstruktur und dem basischen Rest, der in verschiedenen Literaturangaben favorisiert wird [Schmidt et al. 2002]; [Suzuki et al. 1997], konnte nur für die 4,5-Diphenyl-1,3-dioxolane bestätigt werden. Bei den Phenothiazinen erwiesen sich drei- oder fünfzählige Linker als wirksamer.



Abbildung 30: Modellhafter Aufbau und durch Untersuchungen ermittelte optimale Eigenschaften der Modulatoren

Abbildung 30 gibt einen Überblick, über die als optimal ermittelten Eigenschaften der potentiellen MDR-Modulatoren.

Die literaturbekannten, allgemeinen Anforderungen an die lipophile Grundstruktur der MDR-Modulatoren [Pearce et al. 1989] werden durch die Ergebnisse der durchgeführten Experimente bestätigt. Die verwendeten lipophilen Grundstrukturen werden von zyklischen Systemen mit zwei oder mehr Aromaten gebildet. Bei den am besten wirksamen Strukturen sind die Aromaten gewinkelt angeordnet und entsprechen damit den Angaben von *Suzuki et al.* [Suzuki et al. 1997]. Dem scheint offensichtlich die sehr gute modulatorische Wirksamkeit des planaren Carbazol-Derivats (**53**) zu widersprechen. Der Grund dafür ist in dem bereits erwähnten positiven Effekt des Diphenylpentyl-Restes am Piperazin zu suchen. Dieser Substituent könnte dabei selbst die Rolle der lipophilen Grundstruktur übernehmen oder als zusätzlicher lipophiler Molekülbereich agieren. Diese Annahme, dass der Diphenylpentyl-Rest als weitere lipophile Grundstruktur fungiert, könnte eine Erklärung für die gute Wirksamkeit von Verbindungen sein, deren Grundstrukturen ohne diesen Rest eine deutlich schlechtere Wirksamkeit aufweisen (vgl. *Abbildung 27*).

Dieses Phänomen und die oben erwähnten Unterschiede bei der Bestimmung der

optimalen Linkerlänge zeigen die Grenzen und Schwierigkeiten bei der Erstellung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen auf. So können zwar allgemeine Strukturanforderungen erkannt und definiert werden, diese lassen sich aber nicht auf einen konkreten Angriffspunkt bzw. Bindungsmodus festlegen und können innerhalb bestimmter Grenzen variieren. Das ist vor allem der Tatsache geschuldet, dass von den hier untersuchten ABC-Transportern bis heute detaillierte Kenntnisse über ihre räumliche Anordnung fehlen, da sie als transmembranäre Proteine der Bestimmung ihrer Kristallstruktur nur schwer zugänglich sind. *Chang et al.* veröffentlichten im Jahr 2001 die erste Kristallstruktur eines bakteriellen ABC-Transporters [Chang; Roth 2001], mussten diese allerdings wieder zurückziehen, da durch Softwarefehler die Struktur nur ungenau berechnet wurde.

Mittlerweile existieren durch Röntgen-Kristallanalysen für mehrere bakterielle ABC-Transporter immer bessere dreidimensionale Modelle [Hollenstein et al. 2007], von denen durch Homologien auf die Struktur von P-gp geschlossen werden kann. Trotzdem bleiben bis zur endgültigen Aufklärung dessen eigener Struktur letztendlich nur hypothetische Modelle die Grundlage für theoretische Auswertungen.

Nach Beendigung der Zytotoxizitätstests ergab sich die Frage, inwieweit die untersuchten Verbindungen Übereinstimmungen mit den bekannten Pharmakophormodellen aufweisen. Dafür wurden mit *SYBIL* energieminierte Strukturen der Substanzen in die bekannten Modelle von Hoechst 33342 [Pajeva et al. 2004] und Verapamil [Pajeva; Wiese 2002] eingepasst. In den *Tabellen 8 und 9* sind übersichtsartig die Ergebnisse der Berechnungen wiedergegeben.

Tabelle 8: Ergebnisse des Vergleiches aller Substanzen mit dem Hoechst 33342-Pharmakophormodell (vgl. Abbildung 9)

Features	Anzahl der Treffer	Anzahl der Treffer pro Kombination	F1-Hyd	F2-Don2	F3-Acc2	F4-Hyd	F5-Hyd	F6-Acc2	F7-Don2	Substanz-Nr.
7	0									
6	1									
		1x	X	X	X	X	X	X		PF
5	23									
		1x	X	X	X	X	X			48
		1x	X	X	X		X	X		PF
		18x	X		X	X	X	X		3-6; 9; 10; 13-16; 20; 22; 24; 30; 31; 33; VER
		3x		X	X	X	X	X		62; FPH; Pro

Es ist zu erkennen, dass keine der getesteten Substanzen alle der sieben Features des Hoechst-Modells abdeckt. Bei sechs Features gibt es allein für Propafenon Übereinstimmungen. Wenn man sich auf fünf Features beschränkt, lassen sich 23 Verbindungen in das Modell einpassen. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Phenothiazine. Ein analoges Bild ergibt sich für die Untersuchung des Verapamil-Modells. Auch hier ist keine Substanz in der Lage, sämtliche Bindungsdomänen zu bedienen. Reduziert man die möglichen Features um eines auf fünf, dann ergibt sich für 18 Substanzen eine Übereinstimmung. Wenn man nur noch vier Features in Betracht zieht, ergibt sich ein positives Ergebnis für 58 der untersuchten Verbindungen.

Tabelle 9: Ergebnisse des Vergleiches aller Substanzen mit dem Verapamil-Pharmakophormodell (vgl. Abbildung 8)

Features	Anzahl der Treffer	Anzahl der Treffer pro Kombination	F1-Hyd	F2-Aro2	F3-Acc2	F4-Acc2	F5-Acc2	F6-Don2	
6	0								
5	19								
		1x	X	X	X		X	X	Pro
		1x		X	X	X	X	X	TMP
		17x	X	X	X	X	X		55; 58RR; 58trans; 60cis; 60RR; 61; 62; 63; 64; 65; 66; 68; 73; 74;75; 76;NCD
4	58								
		8x	X	X	X	X			
		13x	X	X	X		X		
		23x	X	X		X	X		
		7x	X		X	X	X		
		1x	X		X		X	X	
		4x		X	X	X	X		
		2x		X	X		X	X	

Auffallend ist, dass die gut wirksamen Phenothiazine im Verapamil-Modell bei lediglich vier Features Übereinstimmungen mit dem Modell zeigen.

Beim Hoechst-Modell lassen sich Phenothiazine in das Modell einpassen, wenn man nur fünf von sieben Features berücksichtigt. Die Verbindungen mit Diphenylpentyl-Rest lassen sich allerdings erst bei weiterer Reduktion der Bindungsdomänen in das Modell einpassen.

Bei manchen Verbindungen kann die Wirksamkeit anhand der Übereinstimmung mit den untersuchten Modellen erklärt werden, bei anderen ist das nicht möglich. Diese Unstimmigkeit legt die Vermutung nahe, dass eventuell weitere noch nicht näher charakterisierte Bindungsstellen existieren könnten.

An die Untersuchungen zu den Pharmakophormodellen schlossen sich Berechnungen zur Korrelation zwischen Aktivitätsdaten der Verbindungen ($pIC_{50_{MOD}}$) und einzelnen Deskriptoren an. Als Deskriptoren dienten der $\log P$ -Wert (der dekadische Logarithmus des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten), der Radius der Moleküle und der Q_{VSA_POL} -Wert (total polar positive van-der-waals surface area). Die Korrelation erfolgte zunächst für alle Substanzen, brachte für diese inhomogene Gruppe jedoch keine zufriedenstellend zu verwertenden Ergebnisse. Deshalb wurden kleinere Gruppen von strukturähnlichen Verbindungen definiert. Diese entsprachen den unter 5.3.4 beschriebenen Gruppen. Allgemein ist festzustellen, dass je enger die Gruppen gefasst werden, die Korrelationskoeffizienten umso größer werden. Die durch die Zytotoxizitätstests ermittelten Wirkwerte können dennoch nur zu einem gewissen Teil bestätigt werden. Über diese Problematik bei der Verwendung unterschiedlicher Untersuchungsmethoden berichten auch andere Arbeitsgruppen [Stouch; Gudmundsson 2002].

Deshalb kam es zu einer weiteren Modifizierung des Vorgehens. Neue Gruppen wurden anhand von Ähnlichkeiten mit Referenzsubstanzen gebildet. Diese M.O.E. Ähnlichkeitsuche machte für 15 Moleküle eine 85 prozentige Übereinstimmung mit Trifluperazin aus. Für diese 15 Verbindungen wurden erneut verschiedenen Deskriptoren berechnet und mit den ermittelten Wirkwerten korreliert. Die Ergebnisse lieferten wiederum nur für einen Teil der Verbindungen befriedigende Erklärungen der Wirksamkeit. Das gleiche Bild ergab sich auch bei Gruppen für die anderen Referenzsubstanzen (Verapamil, Propafenon, Fluphenazin, Flupentixol, Phenothiazine mit C_3 - bzw. C_4 -Linker).

So erweist sich der Versuch, mit computergestützten Methoden Aussagen über Struktur-Wirkungsbeziehungen zu gewinnen, als äußerst komplexes Unterfangen, bei dem ganz allgemeine Aussagen, ausgehend von einer großen Gruppe inhomogener Verbindungen, schwierig zu erhalten sind. Je kleiner und homogener die betrachteten Gruppen werden, umso größer ist die Korrelation zwischen experimentell und computergestützt ermittelten Wirkwerten. Allerdings nimmt die allgemeine Aussagekraft der Ergebnisse bei immer spezieller werdenden Gruppen in einem entsprechenden Maß ab.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass mit geeigneten Methoden und Modellen ein Wirksamkeitsscreening von Verbindungen mit MDR-modulierender Wirkung vorgenommen werden kann. Auch wenn berücksichtigt werden muss, dass Ergebnisse die mit Hilfe von unterschiedlichen Testsystemen erzielt wurden, teilweise voneinander abweichen, ebenso wie der Einsatz computergestützter Methoden sehr von der Auswahl der betrachteten Deskriptoren abhängig ist, bleibt trotzdem festzustellen, dass die Synthese neuartiger Verbindungen und deren Testung nach wie vor ein aktueller und lohnender Ansatz ist, auf der Suche nach neuen Wirkstoffen zur Beeinflussung der Aktivität von MDR-Effluxpumpen und Werkzeugen zur Aufklärung deren Struktur.

7 Zusammenfassung

Nach dem erfolgreichen Einsatz der ersten Chemotherapien gegen Krebs musste man Mitte des letzten Jahrhunderts bald zu der Erkenntnis gelangen, dass Tumoren unter der Behandlung Resistenz gegen die eingesetzten Wirkstoffe entwickelten. Die Kombination von verschiedenen Zytostatika mit dem Ziel, diese Resistenz zu überwinden, führte nur zur Entwicklung der Kreuzresistenzen dieser Tumoren. Als verantwortlich für diesen Phänotyp der Multidrug Resistance wurde ein membranständiges Transportprotein, das P-Glykoprotein, identifiziert. Nach über 30 Jahren intensiver Forschungen ist die Familie der bekannten humanen ABC-Transporter, zu denen P-gp gehört, auf 48 Mitglieder gewachsen. Darunter sind auch weitere für die Multidrug Resistance verantwortliche Transporter. Die zahlreichen Untersuchungen der ABC-Transporter von Säugetier- und Bakterienzellen führten zu einem grundlegendem Verständnis der molekularen Basis der Multidrug Resistance. Mittlerweile stehen die Kristallstrukturen von bakteriellen ABC-Transportern zur Verfügung, mit deren Hilfe sich auch Rückschlüsse auf den Ablauf von Transportvorgängen durch P-gp ziehen lassen.

Neben verschiedenen Ansätzen zur Überwindung der Multidrug Resistance gibt es nach wie vor die Bestrebung, durch den Einsatz von Modulatoren oder Inhibitoren die Aktivität der verantwortlichen Transportproteine zu mindern. Die erste Generation dieser Verbindungen, bekannte Arzneistoffe, schied als direkte Chemosensitizer jedoch aus, da sie alle über eine pharmakologische Eigenwirksamkeit verfügen. Die Weiterentwicklung dieser Verbindungen durch Variationen und die Entwicklung neuer Strukturen, führte bis heute trotz viel versprechender Ansätze nicht zur Einführung als Therapeutika. Das liegt nicht zuletzt an der Zytotoxizität der Substanzen, sowie nach wie vor an ihrer pharmakologischen Eigenwirksamkeit.

Aus diesen Gründen ist das Interesse an Verbindungen, deren Wirkung sich auf die Aufhebung der Resistenz beschränkt, nach wie vor sehr hoch. Auch zur Aufklärung der Struktur und genauen Funktion der Transporter können neue MDR-Modulatoren beitragen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Verbindungen untersucht, die ausgehend von bekannten Struktur-Wirkungs-Beziehungen im Institut für Pharmazie in der Arbeitsgruppe von *Dr. Schmidt / Prof. Büge* synthetisiert wurden. Die Intention war,

neue MDR-Modulatoren zu charakterisieren und neue Erkenntnisse über Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu erhalten. Die Basis dafür lieferte die Synthese von modulatorisch wirksamen Phenothiazinen, die aus einem aromatischen Grundgerüst aufgebaut sind, welches über einen Alkyl-Linker mit einer basischen Moleküldomäne verbunden ist. Als weitere Grundkörper dienten verschiedene aromatische Trizyklen, die als Bestandteile von Arzneistoffen bereits bekannt sind wie Carbazol, 5,5-Diphenylhydantoin und verschiedene Dibenazepin-Derivate. Hinzu kam mit den 2,2-Diphenyl-1,3-dioxanen, den 2,2-Diphenyl-1,3-dioxolanen und den 4,5-Diphenyl-1,3-dioxolanen eine Reihe von zyklischen Acetalen, die eine als Arzneistoff bisher unbekanntes Stoffklasse darstellen.

Als Zellmodell dienten Epithelzelllinien aus der Schweineniere, LLC-PK1 und LLC-MDR1, die im Fall der letztgenannten in die Lage versetzt wurden, humanes P-Glykoprotein zu exprimieren. Dass dieses über den gesamten Zeitraum der Untersuchungen stabil exprimiert wurde, konnte mit Hilfe von regelmäßig durchgeführten Western-Blot-Analysen nachgewiesen werden. Das Zellmodell konnte erfolgreich sowohl für die Durchführung der Zytotoxizitätstests als auch für die Experimente am Durchflusszytometer eingesetzt werden.

Die synthetisierten Verbindungen wurden mit diesen verschiedenen Methoden auf ihre modulatorische Aktivität untersucht. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf der Bestimmung des modulatorischen Quotienten, der mit Hilfe von Zytotoxizitätstests ermittelt wurde. Für deren Auswertung wurden verschiedene Methoden miteinander verglichen, von denen sich die Vitalfärbung mit Kristallviolett am geeignetsten erwies.

Die sich anschließende zweite Methode, die Bestimmung der Fluoreszenz-Aktivitäts-Verhältnisse der potentiellen Modulatoren mit Hilfe der Durchflusszytometrie, konnte die wesentlichen Erkenntnisse aus den vorangegangenen Experimenten bestätigen. Von den zahlreichen so gescreenten Verbindungen zeigte eine große Zahl einen MDR-modulatorischen Effekt. Dieser war bei den meisten Verbindungen sogar stärker ausgeprägt als bei der Referenzsubstanz Trifluperazin. Im Vergleich zu Verapamil wies Substanz **16** als einzige in beiden Untersuchungsmethoden ein höheres modulatorisches Potential auf.

Beim Vergleich der Grundkörper erwiesen sich die Verbindungen mit trizyklischem Grundgerüst und gewinkelt angeordneten Aromaten als gut wirksam. Zusätzlich zeigt

sich, dass bei den Phenothiazinen sowohl eine Substitution mit Acyl-Resten in 2-Stellung als auch die Erweiterung des Ringsystems mit zusätzlichen Aromaten vorteilhaft für die Verstärkung der Wirksamkeit ist. Besonders hervorzuheben ist hierbei der Benzoyl-Rest, der beide Eigenschaften vereint..

Von den verglichenen basischen Resten zeigten sich vor allem die Piperazin-Derivate effektiv, von denen besonders die Moleküle mit zusätzlicher lipophiler, aromatischer Diphenylalkyl-Struktur als hochpotente Strukturen identifiziert wurden. Die hierzu gefundenen Ergebnisse der guten Wirksamkeit bei den Zytotoxizitätstests und am Durchflusszytometer, im Vergleich zu der geringen Übereinstimmung mit den zwei bekannten Pharmakophormodellen [Pajeva; Wiese 2002]; [Pajeva et al. 2004] lassen die alleinige Existenz dieser Bindungsstellen als eher unwahrscheinlich erscheinen. Da das Bindungsgeschehen ein komplexer Vorgang mit verschiedenen Angriffspunkten ist, [Litman et al. 2001] rückt die Existenz weiterer Bindungsstellen, als Erklärungsversuch für die gute Wirksamkeit der Verbindungen mit Diphenylalkyl-Resten, in den Bereich des Möglichen.

Zusätzliche computergestützte Berechnungen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen ermöglichen derzeit nur Aussagen über sehr eng gefasste Substanzgruppen. Eine allgemeine Aussage über den optimalen MDR-Modulator ist nicht möglich, da die Voraussagekraft dieser Methoden umso ungenauer wird, je komplexer die betrachteten Vorgänge und Strukturen sind.

Die vorliegende Arbeit leistet einen weiteren Beitrag zur Entwicklung von Molekülen zur Überwindung der Multidrug Resistance. Dabei zeigen sich die zur Anwendung gekommenen Methoden in ihrer Kombination geeignet, um Aussagen zum Aufbau von MDR-Modulatoren zu treffen. Trotzdem sollte im Blick behalten werden, dass es bedingt durch die zugrunde liegenden komplexen Vorgänge nicht möglich ist, Ergebnisse die mit diesem Zellmodell und diesen Analysenmethoden gewonnen wurden, detailgetreu auf andere Modelle zu übertragen. Die Aussagen, die im Rahmen der angewendeten Methoden getroffen werden können, weisen daher eher die Richtung zum optimalen Modulator, statt dessen endgültige Struktur anzugeben.

8 Literaturverzeichnis

- Allikmets R., Schrim L. M., Hutchinson A., Romano-Spica V. Dean M., *Cancer Research* 58, **1998**, 5337-5339
- Almquist K. C., Loe D. W., Hipfner D. R., Mackie J. E., Cole S. P. C., Deeley R. G., *Cancer Research* 55, **1995**, 102-110
- Baer M., George S., Dodge R., O'Loughlin K., Minderman K. et al., *Blood* 100, **2002**, 1224-1232
- Belinsky M. G., Bain L. J., Balsara B. B., Testa J. R., Kruh G. D., *Journal of the National Cancer Institute* 90, **1998**, 1735-1741
- Belinsky M. G., Kruh G. D., *British Journal of Cancer* 80, **1999**, 1342-1349
- Bera T. K., Iavarone C., Kumar V., Lee S., Lee B., Pastan I., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99, **2002**, 6997-7002
- Bera T. K., Lee S., Salvatore G., Lee B., Pastan I., *Molecular Medicine* 7, **2001**, 509-516
- Bernhard D., Schwaiger W., Crazzolaro R., Tinhofer I., Kofler R., Csordas A., *Cancer letters* 195, **2003**, 193-199
- Borenfreund E., Babich H., Martin-Alguacil N., *Toxicology in vitro* 2, **1988**, 1-6
- Borst P., Evers R., Kool M., Wijnholds J., *Journal of the National Cancer Institute* 92, **2000**, 1295-1302
- Bradford M. M., *Analytical Biochemistry* 72, **1976**, 248-254
- Callaghan R., Ford R. F., Kerr I. D., *FEBS Letters* 580, **2006**, 1056-1063
- Chan H.S.L., Thorner P.S., Haddad G., Ling V., *Journal of Clinical Oncology* 8, **1990**, 689-704
- Chan L. M. S., Lowes S., Hirst B. H., *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 21, **2004**, 25-51
- Chang G., Roth C. B., *Science* 293, **2001**, 1793-1800
- Chen C. J., Chin J. E., Ueda K., Clark D. P., Pastan I., Gottesman M. M., Roninson I. B., *Cell* 47, **1986**, 381-389

- Chen Z. S., Lee K., Walther S., Raftogianis R. B., Kuwano M., Zeng H., Kruh G.,
Cancer Research 62, **2002**, 3144-3150
- Cole S. P. C., Bhardwaj G., Gerlach J. H., Mackie J. E., Grant C. E et al., *Science* 258,
1992, 1650-1654
- Croop J. M., Raymond M., Haber D., Devault A., Arcec R. J., Gros P., Housman D. E.,
Molecular Cell Biology 9, **1989**, 1346-1350
- Danø K., *Biochimica et Biophysica Acta* 323, **1973**, 466-483
- Dean M., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>, letzter Zugriff 20.09.2007
- Dey S., Ramachandra M., Pastan I., Gottesman M. M., Ambudkar S. V., *Proceedings of
the National Academy of Sciences USA* 94, **1997**, 10588-10593
- Döppenschmitt S., Spahn-Langguth H., Regårdh C., Langguth P., *Pharmaceutical
Research* 15, **1998**, 1001-1006
- Doyle L. A., Yang W., Abruzzo L. E., Krogmann T., Gao Y., Rishi A.K., Ross D.D.,
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 95, **1998**, 15665-15670
- Eckford P. D., Sharom F. J., *Biochemical Journal* 389, **2005**, 517-526
- Ekins S., Kim R. B., Leake B. F., Dantzig A. H., Schuetz E. G., Lan L. B. et al.,
Molecular Pharmacology 61, **2002**, 974-981
- Escobar Castillo M., *Dissertation*, **2000**, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Feller N., Kuiper C. M., Lankelma J., Ruhda J. K., Scheper R. J., Pinedo H. M. et al.,
British Journal of Cancer 72, **1995**, 543-549
- Flick D. A., Gifford G. E., *Journal of Immunological Methods* 68, **1984**, 167-175
- Fojo A. T., Ueda K., Slamon D. J., Poplack D. G., Gottesman M. M., Pastan I.,
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84, **1987**, 265-269
- Fox E., Bates S., *Expert Review of Anticancer Therapy* 7, **2007**, 449-459
- Garrigues A., Loiseau N., Delaforge M., Ferte J., Garrigos M., Andre F., Orlowski S.,
Molecular Pharmacology 62, **2002**, 1288-1298
- Gatmaitan Z. C., Arias I. M., *Advances in Pharmacology* 24, **1993**, 77-97
- Georges E., Bradley G., Garipey J., Ling V., *Proceedings of the National Academy of
Sciences USA* 87, **1990**, 152-156

- Gerloff T., Stieger B., Hagenbuch B., Madon J., Landmann L., Roth J., Hofman A.F., Meier P.J., *Journal of Biological Chemistry* 273, **1998**, 10046-10050
- Gottesman M. M., Fojo T., Bates S. E., *Nature Reviews Cancer* 2, **2002**, 48-58
- Hediger A. H., Romero M. F., Peng J. B., Rolfs A., Takanaga H., Bruford E. A., *European Journal of Physiology* 447, **2004**, 465-468
- Herzenberg L. A., Sweet R. G., Herzenberg L. A., *Scientific American* 234, **1976**, 108-117
- Higgins C. F., *Annual Review of Cell Biology* 8, **1992**, 67-113
- Higgins C. F., Gottesman M. M., *Trends in Biochemical Sciences* 17, **1992**, 18-21
- Hirohashi T., Suzuki H., Takikawa H., Sugiyama Y., *Journal of Biological Chemistry* 275, **2000**, 2905-2910
- Hollenstein K., Dawson R.J., Locher K.P., *Current Opinion in Structural Biology* 25, **2007**, 17:1-7 (Epub ahead of print)
- Holló Z., Homolya L., Davis C. W., Sarkadi B., *Journal of Biological Chemistry* 268, **1994**, 21493-21496
- Hopper E., Belinsky M. G., Zeng H., Tosolini A., Testa J. R., Kruh G. D., *Cancer Letters* 162, **2001**, 181-191
- Horio M., Gottesman M. M., Pastan I., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85, **1988**, 3580-3584
- Hull R. M., Cherry W. R., Weaver G. W., *In Vitro* 12, **1976**, 670-677
- Hunter J., Hirst B. H., Simmons N. L., *Pharmaceutical Research* 10, **1993**, 734-749
- Juliano R. L., Ling V., *Biochimica et Biophysica Acta* 455, **1976**, 152-162
- Kage K., Tsukahara S., Sugiyama T., Asada S., Ishikawa E., Tsuruo T., Sugimoto Y., *International Journal of Cancer* 97, **2002**, 626-630
- Kartner N., Riordan J. R., Ling V., *Science* 221, **1983**, 1285-1288
- Kessel D., Beck W. T., Kukuruga D., Schulz V., *Cancer Research* 51, **1991**, 4665-4670
- Kool M., Van Der Linden M., De Haas M., Scheffler G. L., De Vree J. M. et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96, **1999**, 6914-6919
- Lage H., *Current Drug Targets* 7, **2006**, 813-821

- Lai L., Tan T. M., *Biochemical Journal* 361, **2002**, 497-503
- Lämmlli U. K., *Nature* 227, **1970**, 680-685
- Lee C. G. L., Gottesman M. M., Cardarelli C. O., Ramachandra M., Jeang K.-T et al., *Biochemistry* 37, **1998**, 3594-3601
- Lee J. S., Paul K., Alvarez M., Hose C., Monks A., Grever M., Fojo A. T., Bates S. E., *Molecular Pharmacology* 46, **1994**, 1934-1940
- Lee K., Klein-Szanto A. J., Kruh G. D., *Journal of the National Cancer Institute* 92, **2000**, 1934-1940
- Leslie E. M., Deeley R. G., Cole S. P. C., *Toxicology and Applied Pharmacology* 204, **2005**, 216-237
- Liskovitch M., Lavie Y., *Drugs* 4, **2002**, 349-355
- Litman T., Druley T. E., Stein W. D., Bates S. E., *Cellular and Molecular Life Science* 58, **2001**, 931-959
- Loo T. W., Clarke D. M., *Journal of Membrane Biology* 206, **2005**, 173-185
- Loo T. W., Clarke D. M., *Journal of Biological Chemistry* 272, **1997**, 20986-20989
- Marthinet E., Divita G., Bernaud J., Rigal D., Baggetto L. G., *Gene Therapy* 7, **2000**, 1224-1233
- Martin C., Berridge G., Higgins C.F., Mistry P., Charlton P., Callaghan R., *Molecular Pharmacology* 58, **2000**, 624-632
- Miyake K., Mickley L. A., Litman T., Greenberger L., Zhan Z., Robey R. et al., *Cancer Research* 59, **1999**, 8-13
- Mosmann T., *Journal of Immunological Methods* 65, **1983**, 55-63
- Murthy R. S. R., Shah N. M., *Journal of Biomedical Nanotechnology* 3, **2007**, 1-17
- Omote H., Al-Shawi M. K., *Journal of Biological Chemistry* 277, **2002**, 45688-45694
- Ortiz D. F., Li S., Iyer A., Zhang X., Novikoff P., Arias I. M., *American Journal of Physiology* 276, **1999**, G1493-G1500
- Pagliacci M. C., Spinozzi F., Migliorati G., Fumi G., Smacchia M., Grignani Riccardi C., Nicoletti I., *European Journal of Cancer* 29A, **1993**, 1573-1577
- Pajeva I., Globisch C., Wiese M., *Journal of Medicinal Chemistry* 47, **2004**, 2523-2533

- Pajeva I., Wiese M., *Journal of Medicinal Chemistry* 45, **2002**, 5671-5686
- Paulusma C. C., Bosma P. J., Zaman G. J., Bakker C. T., Otter M., Scheffer G. L. et al., *Science* 271, **1996**, 1126-1128
- Pearce H., Safa A., Bach N., Winter M., Cirtain M., Beck W., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86, **1989**, 5128-5132
- Perona R., Sánchez-Pérez I., *British Journal of Cancer* 90, **2004**, 573-577
- Pleban K., Kopp S., Csaszar E., Peer M., Hrebicek T., Rizzi A., Ecker G.F., Chiba P., *Molecular Pharmacology* 67, **2004**, 365-374
- Plo I., Lehne G., Beckstrom K. J., Maestre N., Battaieb A., Laurent G., Lutier D., *Molecular Pharmacology* 62, **2002**, 304-312
- Pusztai L., Wagner P., Ibrahim N., Rivera E., Theriault R., Booser D. et al., *Cancer* 104, **2005**, 682-691
- Reid G., Wielinga P., Zelcer N., De Haas M., Van Deemter L., Wijnholds J. et al., *Molecular Pharmacology* 63, **2003**, 1094-1103
- Rieger L., Rieger J., Winter S., Streffer J., Esser P., Dichgans J., Meyermann R., Weller M., *Acta Neuropathologica* 99, **2000**, 555-562
- Riordan J. R., Rommens J. M., Kerem B., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z. et al., *Science* 245, **1989**, 1066-1073
- Robert J., Jarry C., *Journal of Medicinal Chemistry* 46, **2003**, 4805-4817
- Romsicki Y., Sharom F. J., *Biochemistry* 12, **2001**, 257-265
- Roninson I. B., Chin J. E., Choi K. G., Gros P., Housman D. E., Fojo A. T. et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 83, **1986**, 4538-4542
- Ruetz S., Gros P., *Cell* 77, **1994**, 1071-1081
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., *Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor*, **1989**, New York
- Sauna Z. E., Ambudkar S. V., *Molecular Cancer Therapeutics* 6, **2007**, 13-23
- Sauna Z. E., Smith M. M., Muller M., Kerr K. M., Ambudkar S.V., *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 33, **2001**, 481-491
- Scheffer G. L., Hu X., Pijnenborg A. C., Wijnholds J., Bergen A. A. et al., *Laboratory Investigation* 82, **2002**, 515-518

- Scheper R. J., Broxterman H. J., Scheffer G. L., Kaaijk P., Dalton W. S. et al., *Cancer Research* 53, **1993**, 1475-1479
- Schinkel A. H., Mayer U., Wagenaar E., Mol C. A., van Deemter L. et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94, **1997**, 4028-4033
- Schinkel A. H., Wagenaar E., van Deemter L., Mol C. A., Borst P., *Journal of Clinical Investigation* 96, **1995**, 1698-1705
- Schlatter P., Gutmann H., Drewe J., *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 28, **2006**, 141-154
- Schmidt M., Langner A., Büge A., *Archiv der Pharmazie Pharmaceutical and Medicinal Chemistry* 335, **2002**, Supplement 1, 98
- Schuetz J. D., Connelly M. C., Sun D., Paibir S. G., Flynn P. M., et al., *Nature Medicines* 5, **1999**, 1048-1051
- Seelig A., *European Journal of Biochemistry* 251, **1997**, 252-261
- Seelig A., Landwojtowicz E., *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 12, **2000**, 31-40
- Shapiro A., Ling V., *European Journal of Biochemistry* 250, **1997**, 122-129
- Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D. et al., *Journal of the National Cancer Institute* 82, **1990**, 1107-1112
- Stein U., Walther W., *American Journal of Cancer* 5, **2006**, 285-297
- Stouch T. R., Gudmundsson O., *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, **2002**, 315-328
- Suzuki T., Fukazawa N., San-nohe K., Sato W., Osamu Y., Tsuruo T., *Journal of Medicinal Chemistry* 40, **1997**, 2047-2052
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76, **1979**, 4350-4354
- Trowsdale J., Hanson I., Mockridge I., Beck S., Townsed A., Kelly A., *Nature* 348, **1990**, 741-744
- Twentyman P., Bleehen N., *European Journal of Cancer* 27, **1991**, 1639-1642
- Ungvari J., *Dissertation*, **2005**, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- van Aubel R. A., Smeets P. H., Peters J. G., Bindels R. J., Russel F. G., *Journal of the American Society of Nephrology* 13, **2002**, 595-603

- van der Blik A. M., Baas F., Ten Houte de Lange T., Kooiman P. M. et al., *EMBO J.* 6, **1987**, 3325-3331
- van Helvoort A., Smith A. J., Sprong H., Fritzsche I., Schinkel A.H., Borst P., van Meer G., *Cell* 87, **1996**, 507-517
- Vellonen K-S., Honkakoski P., Urtti A., *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 23, **2004**, 181-188
- Walker J. E., Saraste M., Runswick M. J., Gay N. J., *EMBO J.* 1, **1982**, 945-951
- Wang R. B., Kuo C. L., Lien L. L., Lien E. J., *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 28, **2003**, 203-228
- Warner E., Hedley D., Andrulis I., Myers R., Trudeau M., Warr D. et al, *Clinical Cancer Research* 4, **1998**, 1451-1457
- Wiese M, Pajeva I K, *Current Medicinal Chemistry* 8, **2001**, 685-713
- Wijnholds J., Mol C. A., van Deemter L., De Haas M., Scheffer G. L. et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97, **2000**, 7476-7481
- Zamora J., Pearse H., Beck W., *Molecular Pharmacology* 33, **1988**, 454-462

Anhang

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Tobias Brandt
Geburtsdatum: 29.03.1977
Geburtsort: Bad Frankenhausen
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

1983-1991: POS „Robert Uhrig“ in Bad Frankenhausen
1991-1995: Kyffhäuser-Gymnasium in Bad Frankenhausen
1995: Abitur

Wehrdienst

1995-1996: „Manniske-Krankenhaus“ in Bad Frankenhausen

Studium

1996-2000: Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg in Halle/Saale
September 1998: Abschluss des 1. Abschnitts der Pharmazeutischen Prüfung
September 2000: Abschluss des 2. Abschnitts der Pharmazeutischen Prüfung
November 2001: Abschluss des 3. Abschnitts der Pharmazeutischen Prüfung
Janur 2002: Erteilung der Approbation als Apotheker

Berufstätigkeit

Oktober-April 2001: Pharmaziepraktikant in der Paulus-Apotheke in Halle/Saale
April-Oktober 2001: Wissenschaftliche Hilfskraft an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Dr. Bernd Rattay

Dez. 2001-März 2006: Promotionsstudium an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr.
Langner

April-Juni 2006: Apotheker in der Apotheke „Thüringer Pforte“ Oldisleben

seit Juli 2006: Apothekenleiter der Krankenhausapotheke der
Klinikum-Bernburg gGmbH

Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß § 5 (2) der Promotionsordnung der Fakultät, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und alle aus anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche gekennzeichnet. Ich habe mich zu keinem früheren Zeitpunkt um einen Doktorgrad beworben.

Halle/Saale, Oktober 2007

Tobias Brandt

Danksagung

Meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Andreas Langner danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe, selbstständig anfertigen zu können. Außerdem danke ich ihm für die vertrauensvolle Zusammenarbeit und seine ständige Bereitschaft zur Diskussion.

Frau Dr. Ilka Knütter gilt mein Dank für die Einarbeitung in die Handhabung der Zellkulturen.

Herrn Dr. A. Schinkel danke ich für die großzügige Bereitstellung der LLC-MDR1-Zellen.

Ebenso gilt mein Dank Dr. Kati Erdmann und Marcus Buchheim für ihre Hilfestellung und Hinweise bei der Durchführung der Western-Blot-Analysen.

Für die Bereitstellung der Versuchssubstanzen bin ich Dr. Johannes Ungvari und Dr. Matthias Schmidt zu großem Dank verpflichtet. Letzterem bin ich sehr dankbar für seine ständige Bereitschaft zur Diskussion.

Für die Einarbeitung in den Umgang mit dem Durchflusszytometer und Hilfestellung bei der Auswertung der Ergebnisse danke ich Herrn Dr. T. Klapperstück.

Mein Dank gilt ebenso Frau B. Elsner für die Durchführung der Pharmakophorsuche und die Berechnung der Ähnlichkeitsanalysen.

Der Geschäftsführung der Klinikum Bernburg gGmbH möchte ich meinen großen Dank für das großzügige Gewähren zeitlicher Freiräume aussprechen, die maßgeblich zum Abschluss meiner Promotion beigetragen haben.

Für die gute Zeit im Labor und die freundschaftliche Zusammenarbeit möchte ich mich bei allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Abteilung „Biochemische Pharmazie“ von Herzen bedanken. Mein besonderer Dank gilt dabei Frau Munk für ihr Wirken als „gute Fee“ im Labor.

Den Doktoranden aus der dritten Etage danke ich sehr für die gute Zeit und das freundschaftliche Miteinander.

Für die große Unterstützung bei „Computerfragen“ und die kritische Durchsicht des Manuskripts gilt Herrn Dr. Burkhardt Voigt mein großer Dank

Meinen Eltern danke ich für ihr liebevolles und geduldiges Dasein für ihre Kinder.

Meiner Frau Anke danke ich für ihre beständige Ermutigung und unermüdliche Unterstützung. Danke für Deine Liebe und Dein Mittragen, ganz besonders in der Endphase.

Gott sei Dank für Bewahrung und Segen und so manchen „glücklichen Zufall“.