

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