

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].

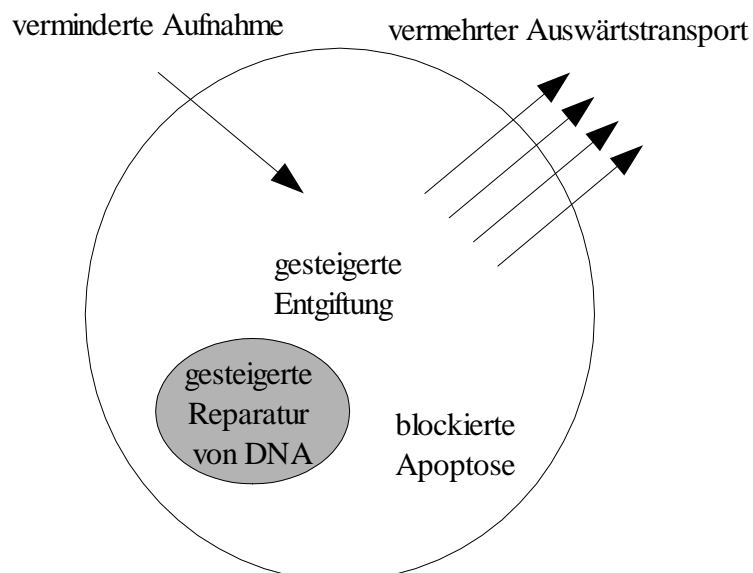


Abbildung 1: Resistenzmechanismen der Zelle nach Gottesman et al. [Gottesman et al. 2002]

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].

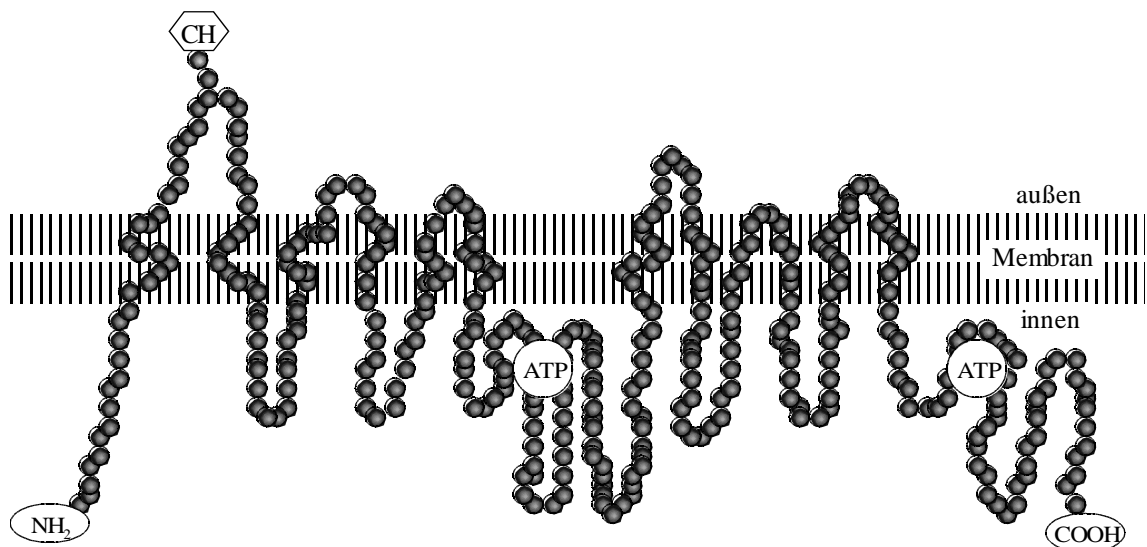


Abbildung 2: Modellhafte, zweidimensionale Darstellung von P-gp nach Wang et al. 2003

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.

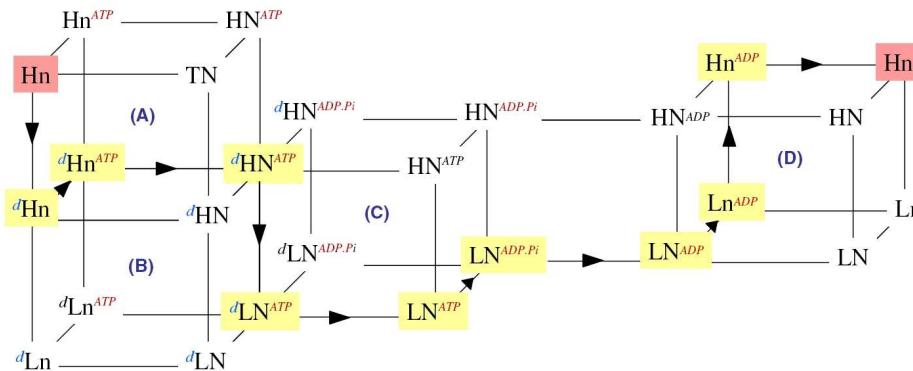


Abbildung 3: Modell des Stofftransports durch das P-Glykoprotein [Callaghan et al. 2006]

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.

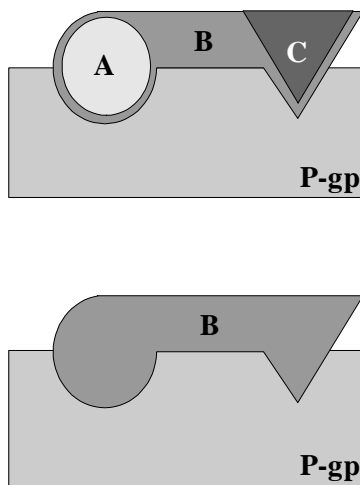


Abbildung 4: Modell für die Substratbindung in P-gp [Litman et al. 2001].

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].

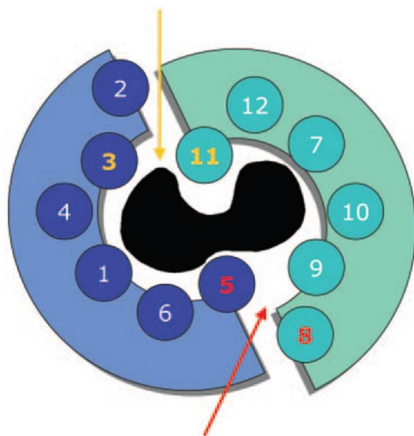


Abbildung 5: Schematische Darstellung von P-gp (Draufsicht) [Pleban et al. 2004].

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.

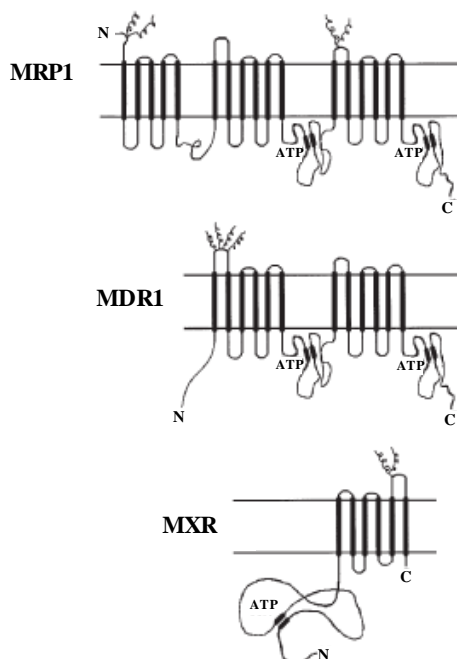


Abbildung 6: Schematische Darstellung von P-gp, MRP1 und MXR [Litman et al. 2001].

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

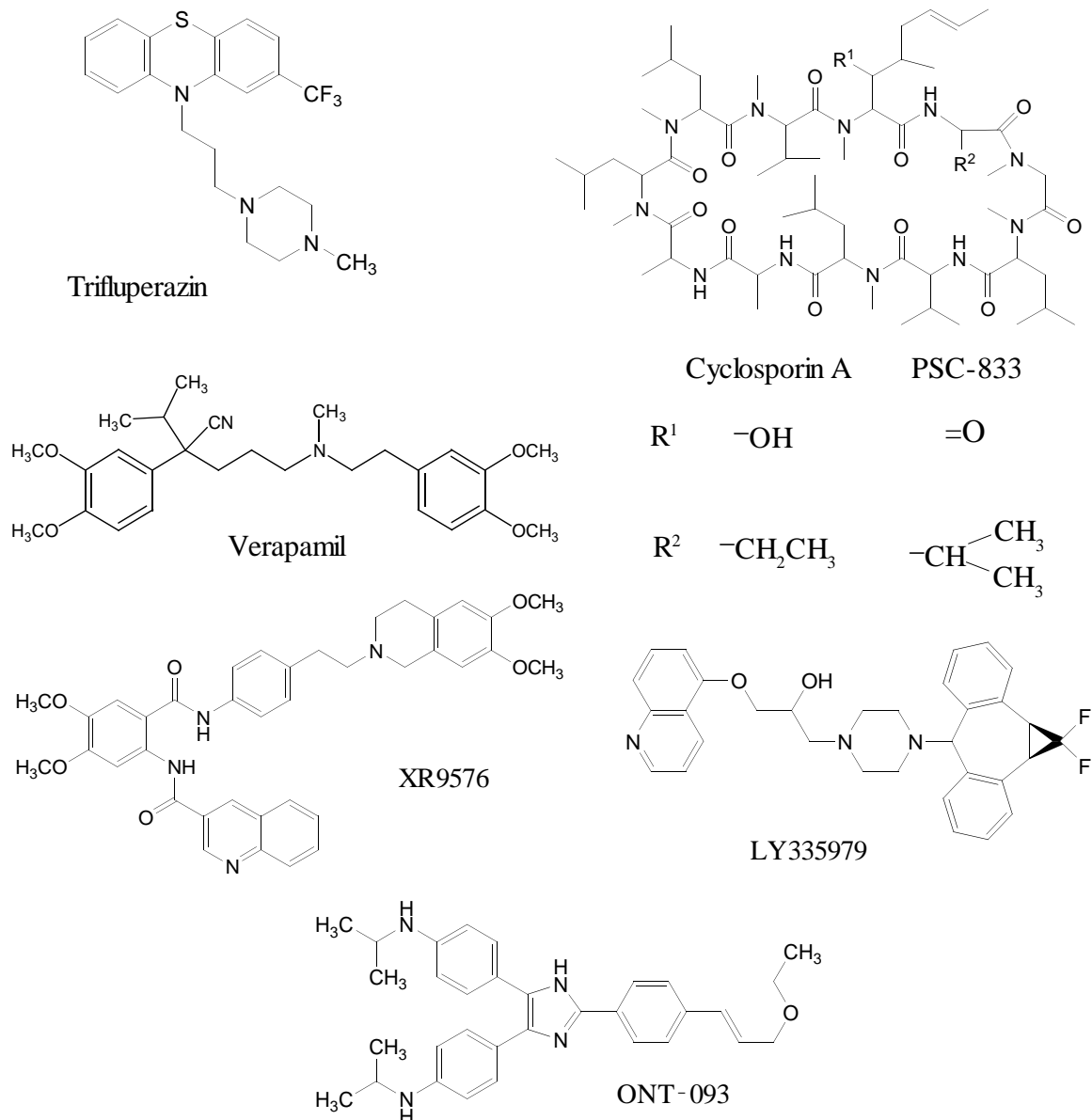


Abbildung 7: Strukturformeln einiger ausgewählter MDR-Modulatoren

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 Plasmamembran-vesikel). 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

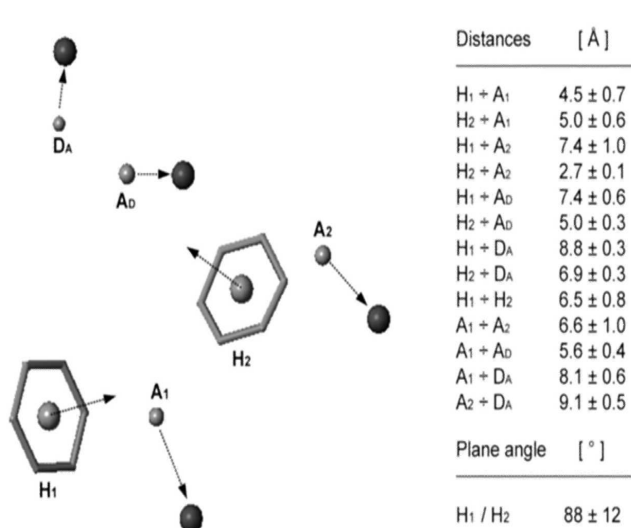


Abbildung 8:
Pharmakophormodell der Verapamil-Bindungstasche [Pajeva; Wiese 2002]

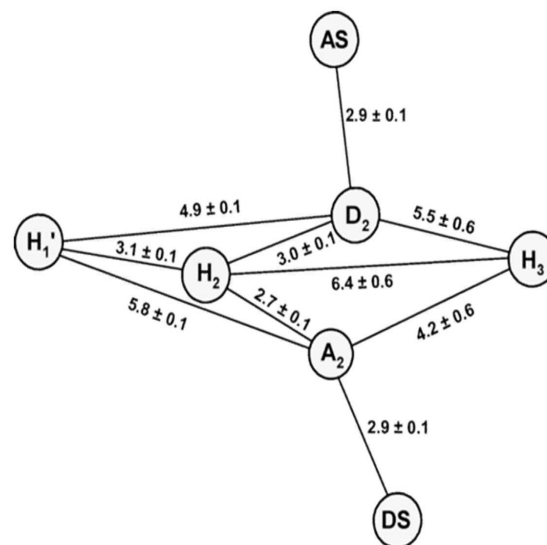


Abbildung 9:
Pharmakophor-Modell der Hoechst 33342-Bindungstasche [Pajeva et al. 2004]

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.