

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. achtzähligem 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.