

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 unbekannte 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.