



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Einfluss von ABC-Transportern auf die Zytotoxizität der
Cyclohexadepsipeptide Destruxin A, B und E“

verfasst von

Harald Bernsteiner

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreut von: ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Rosa Lemmens-Gruber

DANKSAGUNG

In erster Linie möchte ich mich bei ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Rosa Lemmens-Gruber und o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Walter Berger für die Ermöglichung der Erstellung dieser Diplomarbeit danken. Ich habe dadurch viel gelernt und wertvolle Erfahrungen gemacht.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Rita Dornetshuber-Fleiss vom Department für Pharmakologie und Toxikologie für die ausgezeichnete Betreuung und die sehr sympathische Zusammenarbeit.

Weiters möchte ich noch den Kollegen vom Institut für das tolle Arbeitsklima danken, allen voran Dani, Walter M., Bea, Christian und Diana, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei meiner Familie für die Ermöglichung meines Studiums, bei meinen Freunden, die mich auf meinem Lebensweg begleiten und beim Schaf bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	7
1.1 ATP-bindende Kassetten (ABC)-Transporter.....	7
1.1.1 ABC-Transporter mit bedeutender Rolle bei der Entstehung einer „Multidrug Resistance“	11
1.1.1.1 ABCB1 = P-Glykoprotein (PgP) = „Multidrug-Resistance-Protein 1“ (MDR1)	11
1.1.1.2 ABCC1 = „Multidrug-Resistance-Associated-Protein 1“ (MRP1)	14
1.1.1.3 ABCG2 = „Breast Cancer Resistance Protein“ (BCRP).....	16
1.1.2 Pharmazeutische Bedeutung von ABC-Transportern aufgrund von Resistenzmechanismen	18
1.2 Destruxine – Vertreter der Gruppe der Cyclodepsipeptide mit vielfältigen biologischen Wirkungen.....	21
1.2.1 Cyclodepsipeptide.....	21
1.2.2 Destruxine (Dtx)	22
2 Material und Methoden.....	27
2.1 Zellkultur	27
2.2 Zytotoxizitätstest	29
2.2.1 Bestimmung der Zellzahl bzw Zelldichte.....	29
2.2.2 Zusatz von Destruxinen und ABC-Transporter-Inhibitoren	31
2.2.3 Zytotoxizitätsbestimmung mit Hilfe des XTT-Reduktionstests EZ4U („Easy for you“)	31
2.3 Kolonieformierungs Zellassay (Colony forming assay, Clonogenic assay)	32
2.3.1 Durchführung	33
2.3.2 Kristallviolettffärbung.....	33

2.4 Durchflusszytometrie – Grundlagen.....	33
2.4.1 Fluorophore.....	35
2.4.1.1 Rhodamin 123 (Rh 123)	36
2.4.1.2 Pheophorbid A (Pheo A)	37
2.4.2 Untersuchung eines möglichen Einflusses von Destruxinen auf den durch ABC- Transporter mediierten Efflux von Rhodamin 123 und Pheophorbid A	37
2.4.2.1 Rhodamin 123 Assay (Durchführung)	38
2.4.2.2 Pheophorbid A Assay	38
2.5 Statistik.....	39
3 Zielsetzung	40
4 Ergebnisse	41
4.1 Zytotoxizitätstests	41
4.1.1 MTT-Assays	41
4.1.2 Kolonieformierungs Zellassays.....	47
4.1.3 Modulator-Versuche	54
4.2 Efflux Assays	60
4.2.1 Rhodamin 123 Assay	60
4.2.2 Pheophorbid A Assay.....	62
5 Diskussion	63
6 Zusammenfassung	68
7 Abstract	70
8 Abkürzungsverzeichnis	72
9 Literatur- und Quellenverzeichnis.....	74
10Lebenslauf	78

1 Einleitung

1.1 ATP-bindende Kassetten (ABC)-Transporter

ABC-Transporter sind in Zellmembranen lokalisierte Transportproteine, welche unter anderem für den Export von Xenobiotika aus Zellen verantwortlich sind. Sie sind abhängig von ATP (Adenosintriphosphat) als Energielieferant, um Substanzen entgegen ihres elektrochemischen Gradienten transportieren zu können. ABC-Transporter sind in der Lage verschiedenste Substanzgruppen wie Kohlenhydrate, Aminosäuren, Peptide, Proteine, Metallionen und ein weites Spektrum an hydrophoben Verbindungen und Metaboliten zu transportieren. Neben diesen ABC-Transportern gibt es noch andere membrangebundene Transportproteine wie Ionenkanäle (spannungs- oder ligandengesteuert), aktive oder passive Transporter (Symporter und Antiporter) und Aquaporine. ABC-Transporter kommen ubiquitär in verschiedensten Lebewesen wie Prokaryoten und auch Eukaryoten wie Hefe, Pilzen, Pflanzen und Tieren vor. Sie werden auch als Pumpen bezeichnet, da sie in der Lage sind diverse Substanzen aus Zellen und Zellorganellen wie beispielsweise Mitochondrien oder dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) hinaus- (=“Efflux“) und auch hineinzutransportieren (=“Influx“). Dies spielt für die Überlebensfähigkeit von Organismen eine bedeutende Rolle, da sich Zellen dadurch toxischer Substanzen bzw Moleküle entledigen können. Die hierfür nötige Energie wird durch die Reaktion von ATP zu ADP (Adenosindiphosphat) bereitgestellt [1, 2, 3].

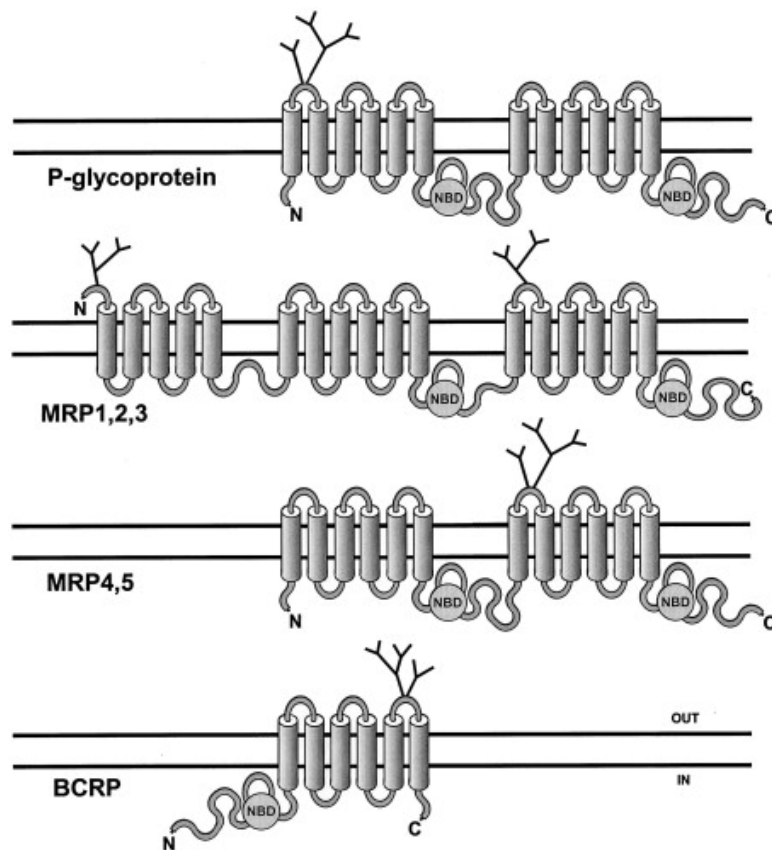


Abbildung 1: Aufbau von ABC-Transportern mit besonderer Bedeutung für den Transport von Arzneistoffen [4]

ABC-Transporter zeichnen sich durch eine gemeinsame molekulare Architektur aus (Abbildung 1). Sie besitzen sogenannte Nukleotidbindungsdomänen (NBD). Diese enthalten mehrere hochkonservierte Motive wie beispielsweise die für ATP-bindende Proteine typischen Walker A und Walker B Sequenzen, die voneinander getrennt sind und spezielle Schleifen („H-Loop“, „Q-Loop“) enthalten. Weiters besitzen sie ein Signaturmotiv, auch C Motiv genannt, das sie von anderen ABC-Transportern unterscheidet und eine spezifische ATP-Bindungsstelle, von der sich auch ihr Name ableitet (ATP-binding cassette). ABC-Transporter können entweder als Halb- oder als Volltransporter vorliegen. Halbtransporter bestehen aus einer Transmembran-Domäne (TMD) und einer NBD. Um funktionelle Einheiten zu bilden homo- oder heterodimerisieren sie mit anderen Halbtransportern (Beispiel: BCRP). Bei den Volltransportern liegen zwei halbe Strukturen in einem Gen zusammen. Die Kernheit des ABC-Transporters besteht also aus 4 Domänen, zwei TMDs und zwei NBDs. Die beiden NBDs binden gemeinsam ATP und hydrolysieren dieses, während die zwei TMDs, welche aus lipophilen α -Helices bestehen, einen Kanal mit hoher Substratselektivität bilden [1, 5, 6].

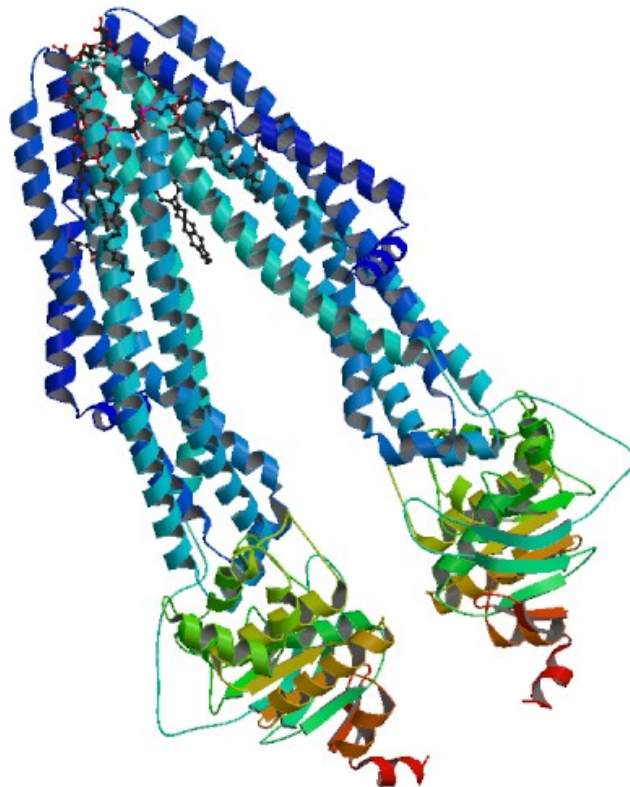


Abbildung 2: Kerneinheit von ABCB10 (Nachbau *in silico*) [7]

Durch moderne *in silico* Methoden versucht man heute die Struktur von Proteinen möglichst originalgetreu darzustellen. Dies wird ermöglicht durch die Kenntnis eines Teils oder der gesamten Aminosäuresequenz des betreffenden Proteins. Die Modellierung der dreidimensionalen Struktur erfolgt einerseits durch Orientierung an durch Röntgenstrukturanalyse erhaltene Kristallstrukturen und andererseits durch komplexe energetische Berechnungen, die eine große Rechenleistung von Computern erfordern. In Abbildung 2 ist die Kerneinheit des in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten ABCB10 ersichtlich. Dieser Transporter ist wichtig für die Erythropoese und für den Schutz der Mitochondrien vor oxidativem Stress. Das Proteingerüst ist nach innen hin offen und bereit ein Substrat und ATP zu binden [7].

Die verschiedenen ABC-Transporter zeichnen sich durch mehr oder weniger ausgeprägte extrazelluläre N-Glykosylierungen aus. Diese Zuckerketten scheinen jedoch für die Transportfunktion selbst nicht notwendig zu sein. Sie sollen eher eine wichtige Rolle für die Stabilität des Proteins und für zellbiologische Mechanismen spielen [4, 8].

Die meisten ABC-Transporter sind für den aktiven Transport von Phospholipiden, Ionen, Peptiden, Steroiden, Polysacchariden, Aminosäuren, Gallensäuren, Arzneimitteln und anderen xenobiotischen Stoffen verantwortlich. Im menschlichen Körper werden diese Transporter daher in sehr großer Zahl in beispielsweise der Leber, der Niere, dem Gastrointestinaltrakt, der Plazenta und der Blut-Hirn-Schranke exprimiert. Mutationen in ABC-Genen können zu sehr schwerwiegenden Erkrankungen wie Cystische Fibrose, altersabhängige Makuladegeneration, neurologischen Störungen, Anämie und auch Cholesterin- und Gallensalztransportstörungen führen. Bis heute konnte man im Menschen 49 ABC-Gene identifizieren, welche man in 7 Familien bzw Untergruppen einteilt (ABCA bis ABCG). Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der Subfamilien mit verschiedenen Vertretern und deren Funktion [1].

Tabelle 1: humane ABC-Transporter Gene mit Beispielen von Vertretern und deren Funktionen [1]

Subfamilie	Synonyme	Genanzahl	prominente Vertreter	Funktion (Beispiele)
ABCA	ABCI	12	ABCA1 ABCA3	Cholesterol Efflux Multidrug Resistance
ABCB	MDR	11	ABCB1 = PgP ABCB6 ABCB11	Multidrug Resistance Eisentransport Gallensalztransport
ABCC	MRP	13	ABCC1 ABCC2 ABCC7 (CFTR)	Arzneistoffresistenz Efflux organischer Anionen Chloridionen-Kanal (Bedeutung bei cystischer Fibrose)
ABCD	ALD	4	ABCD1	Transport langkettiger Fettsäuren
ABCE	OABP	1	ABCE1	RNase L Inhibitor
ABCF	GGN20	3	ABDF1	mit autoimmuner Pankreatitis in Verbindung gebracht
ABCG	White	5	ABCG2=BCRP	Efflux von Toxinen, Resistenz, BCRP = Breast Cancer Resistance Protein

ABC-Proteine haben einen bedeutenden Einfluss auf Pharmakodynamik und damit auch auf die Wirkung vieler Arzneimittel. Dies betrifft beispielsweise die orale Bioverfügbarkeit durch Beeinflussung der Exkretion von Arzneistoffen und deren Metaboliten bzw Konjugaten über Leber, Galle, Darm und Niere. Weiters wird das Eindringen von Wirkstoffen in bestimmte Kompartimente des Körpers durch ABC-Transporter stark limitiert. Bei Krebserkrankungen können Tumore durch Überexpression bestimmter ABC-Transporter eine Resistenz gegen multiple Chemotherapeutika aufweisen bzw entwickeln [4].

1.1.1 ABC-Transporter mit bedeutender Rolle bei der Entstehung einer „Multidrug Resistance“

1.1.1.1 ABCB1 = P-Glykoprotein (PgP) = „Multidrug-Resistance-Protein 1“ (MDR1)

ABCB1 ist ein glykosyliertes Membranprotein, welches aus 1280 Aminosäuren aufgebaut ist und wird vorwiegend im Gastrointestinaltrakt, der Leber und der Niere exprimiert. In den polarisierten Epithelzellen dieser Organe ist das Protein in der apikalen Membran lokalisiert. Aber auch in der Blut-Hirn-Schranke befindet sich eine besonders hohe Zahl dieses Transportproteins, welches das Gehirn vor Xenobiotika schützt. Dort wiederum wird ABCB1 auf der luminalen Seite exprimiert. Der Zusammenhang zwischen ABCB1 und der Arzneistoffresistenz von mutierten Ovarzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) wurde erstmals 1976 von Juliano und Ling entdeckt. Das Ausmaß der Resistenz korrelierte mit der Menge des vorhandenen P-Glykoproteins (PgP) [9, 10, 11, 12]. Aufgrund der breiten Substratspezifität des Transportproteins zeigte es eine Kreuzresistenz gegen viele verschiedene Zytostatika, wodurch der Name MDR1 („Multidrug-Resistance-Protein 1“) entstand. Die Substrate von ABCB1 unterscheiden sich sehr stark in ihrer chemischen Struktur und Funktion. Es handelt sich meist um organische Moleküle mit einer Größe von kleiner als 200 Da bis an die 1900 Da. Am besten transportiert werden ungeladene oder aber auch leicht basische Verbindungen. Einige saure Moleküle stellen jedoch ebenfalls Substrate dar. Die einzige Gemeinsamkeit des breiten Spektrums an Substraten besteht im Vorliegen einer gewissen amphiphilen

Natur. Dies hat möglicherweise mit dem Mechanismus der Translokation zu tun [4, 12].

P-Glykoprotein (Pgp) ist heute der am besten erforschte ABC-Transporter. Wie in Abbildung 1 ersichtlich besteht es aus zwei homologen Einheiten. Es handelt sich bei Pgp also um einen Vertreter der bereits erwähnten Volltransporter. Jede der beiden Einheiten besteht aus einer hydrophoben Transmembrandomäne (TMD) mit 6 vermutlich die Membran durchspannenden α -Helices am N-Terminus und einer im Zytosol lokalisierten hydrophilen Nukleotidbindungsdomäne (NBD) am C-Terminus. Das Protein weist außerdem an der ersten N-terminalen Schleife eine starke N-Glykosylierung auf [4, 12].

ABCB1 ist für etwa die Hälfte sekundärer Therapiemisserfolge in der Chemotherapie verantwortlich. Für die Pharmazie sind aber nicht nur die durch ABCB1 hervorgerufenen Zytostatikaresistenzen von Bedeutung, sondern es konnte außerdem festgestellt werden, dass einige Arzneistoffe mit diesem Transportprotein interagieren. Es konnten sowohl Substrate, als auch Induktoren und Inhibitoren identifiziert werden. Bei kombinierter Einnahme solcher Arzneimittel kann es bei Patienten zu schwerwiegenden Wechselwirkungen kommen. Dies funktioniert ähnlich wie bei Arzneimittelinteraktionen aufgrund der Einnahme verschiedener Modulatoren von CYP450 Enzymen, wie beispielsweise CYP3A4 als prominenter Vertreter. Oft sind Substrate von CYP3A4 sogar gleichzeitig Substrate von ABCB1. Johanniskrautextrakt etwa gilt sowohl als Induktor von CYP3A4 als auch von ABCB1 [13, 14].

Bei gleichzeitiger Einnahme von Chinidin und Digoxin kann es zu Digoxin-Vergiftungen mit Herzrhythmusstörungen kommen. Digoxin besitzt problematischerweise eine sehr geringe therapeutische Breite. Durch den ABCB1-Inhibitor Chinidin kommt es zu einer verringerten Digoxin-Clearance, weshalb die Konzentration von Digoxin im Blut sehr leicht in den toxischen Bereich steigen kann [14].

Loperamid ist ein Wirkstoff der bei Durchfall eingesetzt wird und ist ein Agonist am Opioid-Rezeptor und gleichzeitig auch Substrat von ABCB1. Opiode hätten eigentlich das Potential schwerwiegender Nebenwirkungen auf das ZNS, wie beispielsweise Atemdepression mit der Gefahr des Erstickens auszulösen. Aufgrund

von ABCB1 an der Blut-Hirn-Schranke erreicht Loperamid das Gehirn jedoch nicht, deshalb ist dieses Arzneimittel in Österreich sogar rezeptfrei erhältlich. Der Wirkstoff entfaltet somit seine Wirkung nur an peripheren Rezeptoren wie im Darm ohne die ZNS-abhängigen Nebenwirkungen auszulösen. Bei gleichzeitiger Einnahme von Medikamenten mit ABCB1-Inhibitor-Eigenschaft wie Chinidin kann es jedoch zur Entwicklung von Atemproblemen kommen. Tabelle 2 stellt eine Übersicht prominenter Arzneistoffe dar, welche bekanntermaßen Substrat- oder Modulatoreigenschaften von ABCB1 besitzen [14].

Tabelle 2: Substrate, Inhibitoren und Induktoren von ABCB1; eine Aufstellung prominenter Beispiele [13, 14]

Substrate	Inhibitoren	Induktoren
Zytostatika: Vinca-Alkaloide, Doxorubicin, Paclitaxel, Epipodophyllotoxine	Steroide: Ethinylestradiol, Norgestrel, Progesteron, Testosteron	Zytostatika: Vinca-Alkaloide, Doxorubicin
Ca-Antagonisten: Verapamil, Diltiazem, Nifedipin	Ca-Antagonisten: Verapamil, Diltiazem, Nifedipin	Sedativa, Antidepressiva: Nefazodon, Johanniskrautextrakt
Antiarrhythmika: Digoxin, Amiodaron, Propafenon	Antiarrhythmika: Chinidin, Amiodaron, Lidocain	Steroide: Dexamethason
Diuretika: Furosemid	Makrolidantibiotika: Erythromycin, Clarithromycin	weitere: Phenytoin, Phenobarbital, Flavonoide, Rifampicin
HIV-Protease-Hemmer: Ritonavir, Nelfinavir, Indinavir	HIV-Protease-Hemmer: Ritonavir, Indinavir, Nelfinavir	
weitere: Colchicin, Loperamid, Simvastatin, Midazolam	Antimykotika: Ketoconazol, Itraconazol	

Die Inhibitoren Verapamil (Calciumantagonist) und Ciclosporin A (Immunsuppressivum) werden häufig *in vitro* eingesetzt um beispielsweise deren Beeinflussung der Wirkung von Zytostatika nach Blockade von ABCB1 zu testen. Es stellte sich heraus, dass sie selbst Substrate für P-gP darstellen. Somit handelt es sich möglicherweise um kompetitive Inhibitoren. Bei anderen Inhibitoren konnte wiederum kein signifikanter Transport dieser und somit auch keine Substratfunktion festgestellt werden, weshalb bei diesen ein anderer Inhibitionsmechanismus

vermutet wird. Verapamil und Ciclosporin A zeigen *in vivo* jedoch nur einen relativ schwach ausgeprägten inhibitorischen Effekt. Aufgrund ihrer eigenen pharmakodynamischen Wirkungen könnte man zur Inhibierung von ABC-Transportern bei Patienten nur ein sehr eingeschränktes Dosenspektrum dieser Substanzen einsetzen. Aus diesem Grund wird schon seit einiger Zeit an der Entwicklung synthetischer Inhibitoren gearbeitet, welche möglichst keine Nebenwirkungen aufweisen. Ein Beispiel dafür wäre PSC 833, welches ein Ciclosporin A Analogon ohne immunsuppressive Wirkung darstellt. PSC 833 bindet mit hoher Affinität an ABCB1 und wird nur sehr langsam transportiert. Die Freisetzung vom Protein erfolgt ebenfalls sehr langsam. Dadurch kommt es zu einer effektiven Blockierung von PgP. Als Nebeneffekt wirkt PSC 833 jedoch auch inhibierend auf das Cytochrom P450 3A4. Da viele Zytostatika wie beispielsweise Doxorubicin von CYP 3A4 abgebaut werden, kann es bei Kombinationstherapie mit PSC 833 zu einer Verstärkung von Nebenwirkungen kommen [4].

Nicht nur Inhibitoren und Induktoren beeinflussen die Effizienz von Transportproteinen, denn es können außerdem noch verschiedene genetische Polymorphismen am ABCB1 auftreten, welche die Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln verändern. Durch Identifikation solcher bereits bekannter Polymorphismen am Patienten kann man beispielsweise die angepasste therapeutische Dosis für das Psychopharmakon Escitalopram berechnen [10].

ABCB1 hat jedenfalls einige für die Funktion des Organismus wichtige Aufgaben. Neben dem Schutz vor Xenobiotika zählen zum Beispiel die Beeinflussung von Immunfunktionen und des Cholesterin-Stoffwechsels, der Transport von Steroiden, die Regulation von Apoptose oder aber auch des CYP450-Systems zu wichtigen physiologischen Vorgängen [13]. Eine verminderte Aktivität des ABCB1 an der Blut-Hirn-Schranke führte in Mausmodellen zu einer erhöhten Konzentration von β -Amyloid im Gehirn, welches mit der Alzheimererkrankung im Zusammenhang steht [15].

1.1.1.2 ABCC1 = „Multidrug-Resistance-Associated-Protein 1“ (MRP1)

ABCC1 wird auch als Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) bezeichnet und setzt sich aus 1531 Aminosäuren zusammen [11]. Dieser ABC-Transporter wird ubiquitär in verschiedensten Geweben des Menschen exprimiert. Anders als PgP ist

ABCC1 auf der basolateralen Membran von Epithelzellen lokalisiert, mit Ausnahme der Placenta, wo sich das Protein auf der apikalen Seite befindet. MRP1 ist strukturell ähnlich aufgebaut wie Pgp. Wie in Abbildung 1 ersichtlich liegt zusätzlich zu den jeweils zwei TMDs und NBDs hier eine weitere TMD mit 5 transmembranären Segmenten am N-Terminus vor. Das N-terminale Ende liegt im Gegensatz zu PgP extrazellulär vor und ist ebenfalls glykolysiert [4, 12].

Dieses Protein wurde in einer Lungenkarzinomzelllinie entdeckt, die eine Zytostatikaresistenz aufwies, obwohl sie den ABCB1-Transporter nicht exprimiert hatte. ABCC1 ist verantwortlich für den Export organischer Anionen, antiviraler Wirkstoffe, Methotrexat und anderer Xenobiotika aus dem Cytoplasma. Außerdem ist es verantwortlich für den Transport des anorganischen Tripeptids Glutathion (GSH) und von Glutathion-Konjugaten, welche mit Hilfe der Glutathion-S-Transferase gebildet werden. Glucuronate und Sulfate von amphiphilen organischen Anionen werden ebenfalls transportiert [11, 16]. Das Zytostatikum Vincristin wird im menschlichen Metabolismus nicht konjugiert, aber es wird jedoch interessanterweise von ABCC1 mittels „Cotransport“ gemeinsam mit Glutathion durch Zellmembranen transportiert. Es werden also nicht nur kovalente Konjugate vom Transporter durch Membranen gepumpt. Für einen effizienten Export von unkonjugierten hydrophoben Verbindungen aus den Zellen ist aufgrund dieses Cotransport-Mechanismus eine ausreichende zelluläre Versorgung mit reduziertem Glutathion notwendig. Umgekehrt wird der Transport von Glutathion selbst wiederum von Substraten wie Vincristin stimuliert [4, 17]. Das für entzündliche und allergische Reaktionen verantwortliche Prostaglandin Leukotrien C4 ist ebenfalls ein Substrat von ABCC1. Knockout-Mäuse mit fehlendem MRP1 sind zwar überlebensfähig und fruchtbar, sie weisen jedoch Defizite bei der Entstehung von durch Leukotrien C4 verursachten entzündlichen Reaktionen auf [4].

Die Suche nach geeigneten Inhibitoren für ABCC1 gestaltet sich schwieriger als für PgP. Die Präferenz von ABCC1 für anionische Verbindungen als Substrate und Inhibitoren könnte ein Grund dafür sein. Da anionische Moleküle nur sehr schlecht durch die Membran in den intrazellulären Raum gelangen können, werden inhibitorische Konzentrationen nur sehr schwer erreicht. Beispiele für Inhibitoren wären S-Decylglutathion, Sulfinpyrazon, Benzbromaron, Probenecid und der Sulfonylharnstoff Glibenclamid. Das Leukotrien-C4-Analogon MK571 und Leukotrien

C4 selbst inhibieren ABCC1 ebenfalls [4]. Die Aktivität des Transportproteins konnte außerdem durch den Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden vermindert werden. Die Expression von MRP1 wurde um 46% reduziert, die Ausbildung der mRNA um 76% [18, 19].

Wie in Tabelle 1 ersichtlich beinhaltet die ABC-Transporter Subfamilie C 13 Gene. Mit der Ausbildung von Arzneistoffresistenzen werden neben ABCC1 noch die Proteine ABCC3, 10, 11 und 12 in Verbindung gebracht. Ein weiterer besonders erwähnenswerter Vertreter dieser Subfamilie ist ABCC7, welcher auch als CFTR bezeichnet wird. Mutationen im Gen dieses Chloridkanals können zur Ausbildung der autosomal rezessiv vererbten Cystischen Fibrose führen [1, 2].

1.1.1.3 ABCG2 = „Breast Cancer Resistance Protein“ (BCRP)

ABCG2 stellt eine Besonderheit in der Familie der ABC-Transporter dar, da es sich hierbei um einen Halbtransporter handelt (Abbildung 1). Er ist aus 655 Aminosäuren aufgebaut und somit nur etwa halb so groß wie die beiden anderen hier vorgestellten Vertreter. Zwei Homodimere, welche über Disulfidbrücken verbunden sind, bilden einen funktionsfähigen Transporter [11]. Die Dimerisierung erfolgt vermutlich im Endoplasmatischen Retikulum. Nach Passage des Golgi-Apparates und entsprechender posttranslationaler Modifizierungen wird das Protein zur Zellmembran transportiert [20]. Es wurden aber mittels Elektronenmikroskopie des kristallisierten ABCG2 auch noch weitere Multimere dieses Proteins, von Tetrameren bis Dodecameren, entdeckt. Die bisher veröffentlichten unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen könnten auf mehreren Faktoren, wie beispielsweise der Wahl des Detergens oder variierender Extraktionsbedingungen bei der Isolierung des Proteins, beruhen [20, 21]. Der Halbtransporter besteht aus einer TMD und einer NBD. Anders als bei den beiden bereits vorgestellten Transportern ist die NBD jedoch am N-Terminus lokalisiert. Die dritte (C-terminale) extrazelluläre Schleife liegt N-glykosyliert vor [4]. ABCG2 wird in der Plazenta in besonders hoher Zahl exprimiert und in geringerem Ausmaß im Intestinaltrakt und in der Leber. In Hirntumoren ist ABCG2 ebenfalls verstärkt aufzufinden [11].

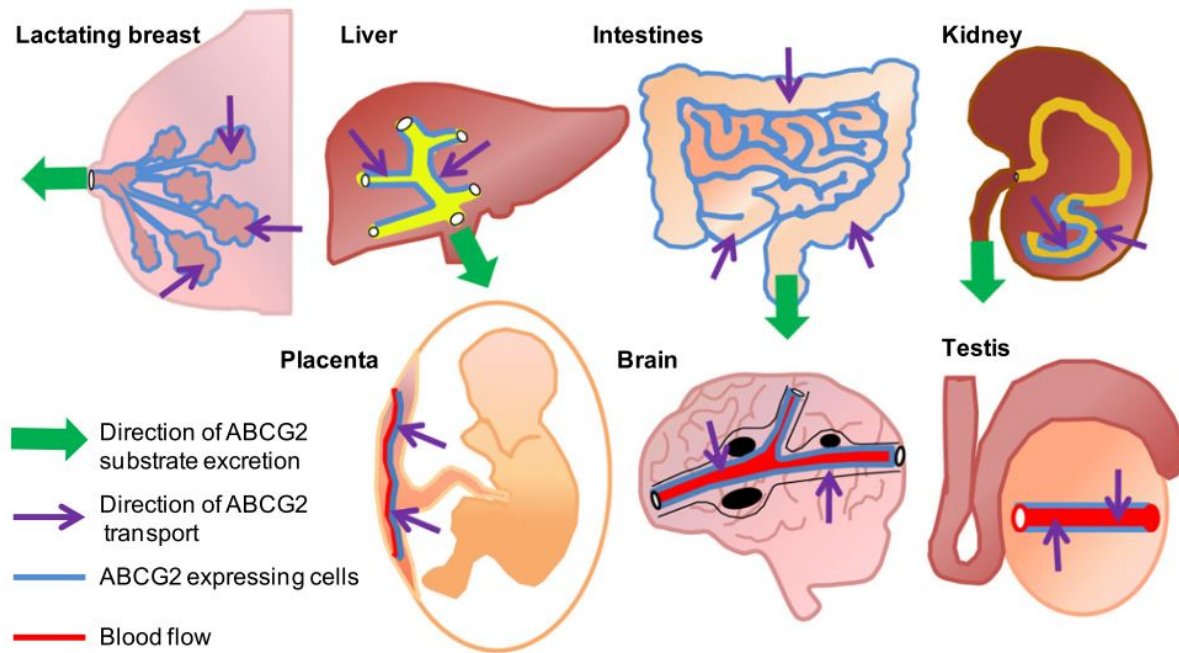


Abbildung 3: die Transportfunktion von ABCG2 in verschiedenen Organen [20]

Abbildung 3 verdeutlicht die Transportfunktion von ABCG2 in verschiedenen Organen. Die Transportrichtung der Substrate ist mit Hilfe von Pfeilen dargestellt [20]. In den meisten Geweben ist das Transportprotein in der apikalen Membran von polarisierten Zellen zu finden. So werden potentiell toxische Substanzen durch beispielsweise Transporter in den Zellen der Darmschleimhaut in das Darmlumen zurückgepumpt. ABCG2 in der Plazenta als weiteres Beispiel schützt das ungeborene Kind vor Toxinen, indem es diese zurück in den mütterlichen Kreislauf pumpt. Im Gehirn befindet sich ABCG2 jedoch auf der luminalen Seite und beschränkt somit den Durchtritt von Xenobiotika durch die Blut-Hirn-Schranke [12].

Verschiedenste Xenobiotika wie Doxorubicin, Daunorubicin, Topotecan, Methotrexat, Mitoxantron, Camptothecin, Cerivastatin und Antibiotika wie Erythromycin und Ciprofloxacin sind Substrate des Proteins [11, 22]. Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Gefitinib und Imatinib und Phosphodiesterase-5-Inhibitoren wie Sildenafil werden ebenfalls von ABCG2 transportiert. Diese Substanzen können außerdem noch als Inhibitoren eingesetzt werden. Substanzen, die das Transportprotein spezifischer inhibieren, wären GF120918, Fumitremorgin C und Tryprostatin A [23].

Stammzellen verschiedener Krebsarten teilen die Eigenschaft der starken Überexpression von ABCG2 und anderer Transporter. Diese Krebsstammzellen, welche die Fähigkeit zur Differenzierung und Vermehrung haben, sollen eine große

Bedeutung bei der Entstehung von Resistenzen gegenüber Chemotherapie spielen, da sie einerseits mit Hilfe der ABC-Transporter eine Zytostatikaexposition leichter überleben und andererseits totes Tumorgewebe ersetzen können. Die Kombinationstherapie konventioneller Chemotherapeutika mit Inhibitoren von ABCG2 (wie Tyrosinkinaseinhibitoren oder Phosphodiesterase-5-Hemmern) hat möglicherweise das Potential diese resistenten Stammzellen abzutöten und somit eine Neubildung von Tumorgewebe zu verhindern [20, 24].

Die Bezeichnungen MXR und BCRP („breast cancer resistance protein“) kommen daher, dass das Protein in der gegenüber Mitoxantron resistenten Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7/AdrVP entdeckt wurde [21]. Während der Laktation wird BCRP in den Brustdrüsenzellen verstärkt exprimiert, was für die Sekretion bestimmter Vitamine und Nährstoffe in der Muttermilch sorgt [12, 25]. Außerdem ist BCRP durch den Transport von Folsäure- und Steroidkonjugaten durch Zellmembranen in die intrazelluläre Folat- und Hormonhomöostase involviert [26, 27]. Die Hormone Progesteron und Estrogen besitzen „Responsive Elemente“, welche innerhalb des ABCG2-Promotors lokalisiert sind. Diese Hormone führen daher zu einer verstärkten Expression des ABC-Transporters. Außerdem kann die Expression des Transportproteins durch Hypoxie-Responsive-Elemente induziert werden. Der Hypoxie-induzierte Faktor 1 α (HIF-1 α) ist innerhalb solider Tumore besonders aktiv, da hier oft aufgrund von räumlichen Gegebenheiten nur eine schlechte Sauerstoffversorgung vorliegt [20].

1.1.2 Pharmazeutische Bedeutung von ABC-Transportern aufgrund von Resistenzmechanismen

Aufgrund ihrer Transportfunktionen können ABC-Transporter einen großen Einfluss auf die Pharmakokinetik von Arzneimitteln ausüben. *Plasmodium falciparum*, der gefährlichste Malaria-Erreger, entwickelte in den letzten Jahrzehnten Resistenzen gegenüber einer großen Zahl von Antimalariamitteln. Besonders Südostasien ist Brennpunkt immer wieder aufkommender Malariaresistenzen. Genetische Veränderungen in den ABC-Transportergenen von *Plasmodium falciparum* werden mit dem Aufkommen von Resistenzen gegenüber Antimalariamittel in Verbindung gebracht [28]. ABCB1, ABCC1 und ABCG2 führen zu einer signifikanten Verminderung des Eintritts von antiretroviralen Wirkstoffen in Organe, welche eine Barrierefunktion aufweisen, wie beispielsweise das Zentrale Nervensystem (Barriere:

Blut-Hirn-Schranke) oder der männliche Genitaltrakt. Virale Proteine von HIV-1 führen *in vitro* zu einer veränderten Expression dieser Transporter. Infolgedessen werden diese ABC-Transporter für eine bereits in der Klinik beobachtete veränderte Permeabilität von antiretroviralen Medikamenten ins ZNS bzw in den männlichen Genitaltrakt verantwortlich gemacht [29].

Bei der Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 spielt die Blockade eines für den Transport von Kaliumionen verantwortlichen ABC-Transporters der β -Zellen des Pankreas eine bedeutende Rolle: die Vertreter der Wirkstoffgruppe der Sulfonylharnstoffe (prominenter Vertreter wäre beispielsweise das Glibenclamid) greifen direkt an eine spezifische Bindungsstelle (SUR1) des Transporters ABCC8 an und vermindern so den Kaliumausstrom aus der Zelle, was in weiterer Folge zur Depolarisation der Zelle und zur Öffnung von Calciumkanälen und einem damit einhergehendem Calciumeinstrom führt. Das intrazellulär erhöhte Calcium führt nun zur Freisetzung von Insulin durch Exozytose, wodurch der Blutzuckerspiegel gesenkt wird [2, 30].

Bei der Chemotherapie stellt die bereits vorhandene oder erworbene Multidrug-Resistenz durch ABC-Transporter ein gravierendes Problem dar [31]. Bei metastasierenden Tumoren gelten Chemotherapeutika als effizienteste Behandlungsmöglichkeit, jedoch können insbesondere Tumorzellen durch Überexpression bestimmter ABC-Transportproteine eine Resistenz gegenüber Zytostatika entwickeln, was für eine erfolgreiche Therapie ein großes Hindernis darstellt [32].

Grundsätzlich unterscheidet man zwei Klassen von Resistenzen, nämlich einerseits die Beeinträchtigung des Transports von Wirkstoffen zu den Tumorzellen und andererseits Resistenzen, welche in der Zelle selbst aufgrund von genetischen und epigenetischen Veränderungen entstehen. Schlechte Absorption von oral verabreichten Medikamenten, erhöhter Metabolismus dieser, aber auch gesteigerte Exkretion führen zum Vorliegen einer verminderten Konzentration von Cytostatika im Blut und in weiterer Folge auch am gewünschten Zielort, dem Tumor. Das Fehlen eines entsprechenden Gefäßsystems, welches den Tumor mit dem Blut verbindet, kann ebenfalls verhindern, dass im Tumor der erwünschte Wirkstoffspiegel erreicht wird. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Tatsache, dass einige Krebszelllinien zwar in der *in vitro* Zellkultur (wo sie einzelschichtig vorliegen) sensitiv gegenüber

Chemotherapeutika sind, diese aber eine Resistenz aufweisen, wenn sie in Tiermodelle transplantiert werden. Hierfür dürfte die Geometrie des Tumors eine große Rolle spielen, da dieser *in vivo* dreidimensional wächst [32]. Auf intrazellulärer Ebene können wiederum Resistenzen entstehen, indem Krebszellen den Angriffspunkt (das „Target“) von Chemotherapeutika verändern oder indem sie Reparaturmechanismen in Gang setzen. Eine Methotrexatresistenz kann beispielsweise durch eine erhöhte Expression der Dihydrofolatreduktase entstehen, welche der Angriffsort für Methotrexat ist. Liegt eine sehr hohe Menge an Dihydrofolatreduktase vor, wirkt sich die durch Methotrexat verursachte Hemmung kaum aus und es liegt somit eine Resistenz vor [31].

Zusammenfassend kann man also einige Vorgänge unterscheiden, die auf zellulärer Ebene zur Entwicklung einer Resistenz führen:

- ein erhöhter Efflux der Cytostatika aufgrund überexprimierter ABC-Transporter
- ein verminderter Influx von Chemotherapeutika
- Aktivierung von entgiftenden bzw den Wirkstoff abbauenden Proteinen wie Cytochrom P450-Enzyme
- Aktivierung von Reparaturmechanismen, die DNA-Schäden beheben können
- Unterbrechung von Signaltransduktionswegen, die zu Apoptose führen würden [32]

Krebszellen entwickeln oft nicht nur gegen bestimmte einzelne Wirkstoffe bzw chemisch verwandte Wirkstoffe Resistenzen, sondern es können sehr oft auch Kreuzresistenzen gegenüber strukturell und vom Wirkmechanismus her komplett andersartige Verbindungen entstehen. Dieses Phänomen wird als „Multidrug resistance“ (MDR) bezeichnet [32].

1.2 Destruxine – Vertreter der Gruppe der Cyclodepsipeptide mit vielfältigen biologischen Wirkungen

1.2.1 Cyclodepsipeptide

Cyclodepsipeptide sind cyclische Peptide, bei denen per Definition eine oder mehrere Aminosäuren durch α -Hydroxysäuren ersetzt sind. Damit liegt mindestens eine Esterbindung in der Ringstruktur vor. Es handelt sich hier um Sekundärmetabolite von Pilzen, Pflanzen oder marinen Organismen [33]. Die ionophoren Eigenschaften sind ein besonderes Merkmal dieser cyclischen Verbindungen. Durch ihren lipophilen Charakter können sich diese Ionophore leicht in die Zellmembran einbauen und somit den Transport von Ionen durch die Phospholipid-Doppelmembran ermöglichen [34]. Es können ein- oder zweiwertige Kationen durch Membranen transportiert werden, wodurch das intrazelluläre Gleichgewicht dieser Ionen beeinflusst wird. Die beobachteten pharmakologischen Wirkungen der Cyclodepsipeptide scheinen jedoch nicht durch dieses Phänomen zustande zu kommen, sondern basieren eher auf Interaktionen mit Signaltransduktionswegen oder mit verschiedenen Zellkompartimenten. Bei sehr hohen Konzentrationen dieser Moleküle können deren ionophoren Eigenschaften aber sehr wohl auch für die Wirkung verantwortlich sein, nämlich bei Zelltod durch Calcium-Überladung. In verschiedenen Publikationen wurde auch gezeigt, dass die cyclische Struktur der Cyclodepsipeptide essentiell für deren Wirkung ist, da deren lineare Homologe keine Aktivität gezeigt haben [33, 35, 36].

Es wurden bereits viele verschiedene Gruppen von Cyclodepsipeptiden aus marinen Schwämmen oder Bakterien bzw Pilzen isoliert und strukturell analysiert. Diese weisen ein sehr breites Spektrum an biologischen Aktivitäten auf. Die Wirkungen reichen von potenten anthelmintischen Eigenschaften (gegen Wurmkrankheiten) bis hin zu insektiziden, cytotoxischen, antiproliferativen, immunsuppressiven, antiinflammatorischen, antiplasmodischen, antifungalen und antiviralen Eigenschaften, welche bereits *in vitro* und *in vivo* charakterisiert wurden. Weiters zeigen einige Vertreter dieser Gruppe eine Antimalariawirkung und zytoprotektive Wirkungen gegen HIV-1 Infektionen [33, 37]. Ob auch Patienten von einigen dieser vielfältigen Wirkungen profitieren können, muss in zukünftigen klinischen Studien

evaluiert werden. Die meisten Cyclodepsipeptide, welche sich zurzeit in klinischer Prüfung befinden, werden in der Krebstherapie in Kombination mit anderen cytotoxischen Chemotherapeutika erprobt [33]. Die Verbindung Kahalalide F wurde bereits klinisch geprüft und in den USA für die Indikation des peripheren T-Zell-Lymphoms zugelassen [38]. Vertreter dieser Gruppe von potentiellen Wirkstoffen könnten auch als Leitstrukturen für die Entwicklung von möglicherweise potenteren und betreffend Nebenwirkungen verträglicheren Verbindungen, unter Zuhilfenahme von beispielsweise EDV-gestützten Methoden wie Molecular Modeling, dienen.

1.2.2 Destruxine (Dtx)

Destruxine sind Sekundärmetabolite des entomopathogenen Pilzes *Metarhizium anisopliae*. Sie sind Cyclohexadepsipeptide und bestehen aus 5 Aminosäuren und einer α -Hydroxysäure. Verschiedene Vertreter der Destruxine unterscheiden sich einerseits durch die Reste der Aminosäuren bzw der α -Hydroxysäure und andererseits durch das Muster der N-Methylierung des an der Peptidbindung beteiligten Stickstoffs [39]. Destruxine besitzen eine Esterbindung, welche durch Reaktion der Hydroxylgruppe der α -Hydroxysäure mit der Carbonsäurefunktion einer der Aminosäuren unter Wasserabspaltung gebildet wird. Diese Esterbindung ist essentiell für die Wirksamkeit des Moleküls [40]. Man unterscheidet heute 39 verschiedene Destruxin-Derivate, benannt mit nachgestelltem Buchstaben [41]. Zu den bekanntesten Vertretern dieser Cyclohexadepsipeptide zählen Dtx A, B und E, die sich nur durch die Seitenkette der α -Hydroxysäure unterscheiden (Abbildung 4). DtxA besitzt einen Propenylrest, DtxB einen Isobutylrest und DtxE ein Propan-epoxid als Rest. Während sich die Destruxine A und B hinsichtlich ihrer Zytotoxizität nur wenig unterscheiden, ist DtxE um ein Vielfaches toxischer. So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass DtxE schon im nanomolaren Bereich sehr starke zytotoxische Wirkungen auf Krebszellen entfaltet, während die beiden anderen Derivate erst im μ M-Bereich aktiv waren. Grund für die wesentlich ausgeprägtere Aktivität von DtxE dürfte die vorhandene Epoxidgruppe sein. Da Epoxide in wässriger Umgebung sehr instabil und chemisch hoch reaktiv sind, wird vermutet, dass dies bei DtxE zu erhöhtem oxidativen Stress durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt. Weiters wurden Untersuchungen unter Zuhilfenahme des Superoxid-Indikators Dihydroethidium (DHE), des Radikalfängers N-Acetylcystein und des Glutathion-Synthese-Inhibitors Buthionin-Sulfoximin (BSO) durchgeführt, welche den stärkeren

Einfluss von DtxE auf die intrazelluläre Redoxbalance im Vergleich zu den anderen Destruxinen belegten [42].

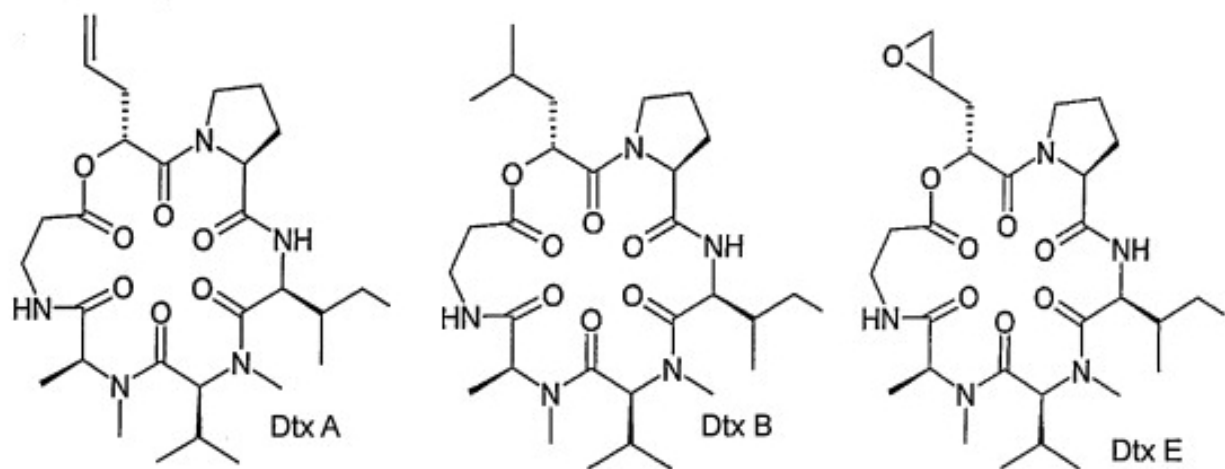


Abbildung 4: Strukturformeln der bekanntesten Destruxine [42]

Mittels Patch-Clamp –Technik wurden kürzlich die ionophoren Eigenschaften von Destruxinen untersucht. Destruxine bilden Poren, die mono- und divalente Kationen leiten können. Weiters beobachtete man eine dosisabhängige Veränderung intrazellulärer Ionenkonzentrationen. Im Vergleich zu anderen Cyclodepsipeptiden war der Effekt jedoch relativ schwach [42].



Abbildung 5: von *Metarhizium anisopliae* befallene Insekten: *Metarhizium anisopliae* wird als effizientes Insektizid zur Bekämpfung von beispielsweise Heuschrecken oder Termiten in der Landwirtschaft eingesetzt [43]

Metarhizium anisopliae hat sich in der Landwirtschaft als Insektizid zur Bekämpfung von beispielsweise Fransenflüglern und Termiten bewährt. Abbildung 5 zeigt, wie der parasitäre Pilz verschiedene Insekten befällt, die Cuticula färbt und einen Überzug bildet [44, 45, 46]. Werden Insekten Destruxine verabreicht, führt das aufgrund der

Öffnung von Calcium-Kanälen zu einer Membrandepolarisation und in weiterer Folge zu tetanischer Paralyse und zum Tod [47, 48]. Neben der insektiziden Wirkung konnten noch eine Vielzahl anderer biologischer Aktivitäten beobachtet werden. Destruxine wirken zytotoxisch auf Krebszellen [49, 50], antiproliferativ [50, 51], immunsuppressiv [52] und phytotoxisch [53]. Weiters zeigten sie antivirale Eigenschaften durch Suppression des Hepatitis B Oberflächenantigens [54]. Außerdem konnte ein selektiver inhibitorischer Effekt auf die vakuolare H^+ -ATPase (V-ATPase) von *Saccharomyces cerevisiae* festgestellt werden. Die V-ATPase gilt als potentiell Target für die medikamentöse Behandlung von Osteoporose. Die Destruxine zeigten einen hemmenden Effekt auf die durch Osteoklasten bewirkte Knochenresorption [41, 55, 56].

In mehreren aktuellen Arbeiten wurde die *in vitro* Wirkung von DtxB auf verschiedene Krebsarten untersucht und versucht dessen Wirkmechanismus aufzuklären. In menschlichen Kolorektalkarzinomzellen, Leberkarzinomzellen und Zellen von nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen führt DtxB zu einer Hemmung der Proliferation, einem Arrest des Zellzyklus und einer Induktion von Apoptose. In Westernblot Analysen konnte eine verminderte Expression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL festgestellt werden, während das proapoptotische Protein Bax stärker exprimiert wurde. Außerdem hemmt DtxB den „Wingless-and-Int“ (Wnt) Signalweg, welcher Zellproliferation, Differenzierung und Morphogenese von menschlichen Zellen reguliert. Dieser Signaltransduktionsweg ist wichtig für eine normale Embryonalentwicklung und wurde außerdem bei verschiedenen Krebsformen beobachtet. DtxB führt zur Inhibierung der im Wnt-Signalweg beteiligten Proteine β -catenin und Tcf4 deren gegenseitige Komplexbildung für die weitere Signaltransduktion notwendig ist. Ein weiterer Effekt der Inhibition von Wnt/ β -catenin ist eine verminderte Zellmigration und Invasion der untersuchten Krebszellen, was möglicherweise bei Patienten die Metastasenbildung verhindern könnte. Metastasen sind beispielsweise bei Leberkarzinomen die Haupttodesursache [57, 58, 59].

Wnt/ β -catenin besitzt eine große Anzahl an Targetgenen wie beispielsweise Survivin, c-myc und Cyclin D1. Das Zellzyklusprotein Cyclin D1 ist in Kolorektalkarzinomen sehr häufig überexprimiert und seine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Krebs ist bekannt. Sowohl Cyclin D1 als auch c-myc sind in die Zellproliferation involviert. Das antiapoptotische Molekül Survivin ist ebenfalls bei vielen Krebsarten

überexprimiert und führt dort oft zu einer Resistenz gegenüber Chemotherapie. Durch Verminderung der Konzentration von β -catenin nach Zugabe von DtxB werden als Folge auch die Konzentrationen dieser Proteine runterreguliert [58].

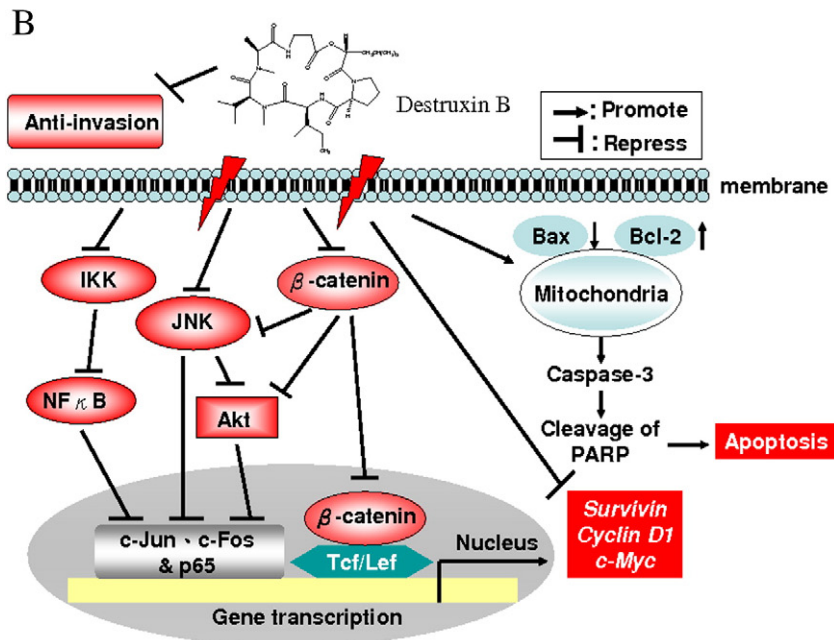


Abbildung 6: Wirkmechanismen von DtxB [58]

MAP-Kinase und Phosphoinositid-3-Kinase/ProteinkinaseB (=PI3K/Akt) sind wichtige onkogene Signaltransduktionswege und weisen in Kolorektalkarzinomen und anderen Krebsarten häufig eine Dysregulation auf. Nach Exposition dieser Zellen mit DtxB konnte wie in Abbildung 6 ersichtlich unter anderem eine verminderte Expression der Proteine Proteinkinase B (Akt), I kappa B Kinase (IKK), c-Jun N-terminale Proteinkinase (JNK) und des Transkriptorfaktors NF κ B beobachtet werden, welche Zwischenschritte bei der Signalweiterleitung darstellen. Eine Suppression von c-Jun und c-Fos wurde ebenfalls ermittelt, was in einer Hemmung von Wachstum und Metastasierung von Tumoren resultieren könnte [58].

Kürzlich konnte bei Exposition der nichtkleinzelligen Lungenkarzinomzelllinie A549 mit DtxB eine erhöhte Aktivität der Caspasen 9 und 3 beobachtet werden. Caspasen sind Cysteinproteasen, welche den Apoptoseprozess einleiten. Caspase 9 ist die wichtigste Initiatorcaspase bei der durch Mitochondrien vermittelten Apoptose. Caspase 9 aktiviert die Effektorcaspase 3, welche wiederum die zentrale Rolle bei Auslösung von Apoptose spielt. Die durch DtxB vermittelte Caspasekaskade konnte durch spezifische Caspaseinhibitoren blockiert werden, was die beschriebene These bezüglich des Wirkmechanismus bekräftigt [57].

Weiters konnte für DTX ein antiangiogenetisches Potential gezeigt werden. Angiogenese spielt eine große Rolle bei der Tumorentstehung und beschreibt die Organisation von Endothelzellen zu röhrenähnlichen Strukturen und in weiterer Folge zu Blutgefäßen. Dieser Vorgang spielt eine große Rolle bei der Versorgung von Tumoren mit Blut und somit auch Nährstoffen und fördert das Wachstum sowie die Metastasierung. In humanen Endothelzellen von Nabelschnurvenen (HUVEC-Zellen) konnte gezeigt werden, dass bereits subtoxische Destruxinkonzentrationen zu einer Hemmung der Migration und Röhrenbildung dieser Zellen führen [42].

Bei Kombination von DtxB mit dem Multi-Kinase-Inhibitor Sorafenib wurde ein Synergismus hinsichtlich ihrer zytotoxischen Wirkung auf Leberkarzinomzellen beobachtet. Die beiden Substanzen besitzen die Möglichkeit der Bildung von Redoxpaaren, was vermutlich zu einer effektiveren Entstehung von Einzel- oder Doppelstrangbrüchen in der DNA führen könnte. Die beobachtete synergistische Wirkung könnte möglicherweise bei Kombinationstherapie eine Senkung der notwendigen klinisch wirksamen Dosis des teuren Sorafenib und damit zu einer verbesserten Kosteneffizienz führen. Von noch größerer Bedeutung wäre das mögliche Potential einer Verminderung diverser Nebenwirkungen, welche die Lebensqualität negativ beeinflussen [59].

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden die in Tabelle 3 aufgelisteten Krebszellen und deren chemoresistenten Subzelllinien verwendet. Mit Ausnahme der Zelllinien HL-60 und HL-60 Vinc handelte es sich um Epithelzellen bzw adhärent wachsende Zellen.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Zelllinien

Zelllinie (parental)	Ursprungsgewebe	Morphologie	resistente Subzelllinie(n)
SW1573	Lunge, Alveolarzellkarzinom	Epithel	SW1573/2R120 SW1573/2R160
KB-3-1	Cervixkarzinom	Epithel	KB-C-1
A549	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom	Epithel	-
MDA-MB-231	Brust, Adenokarzinom	Epithel	MDA MB 231/BCRP
MCF-7	Brust, Adenokarzinom	Epithel	MCF-7-Adr
HL-60	Promyelocyten (Leukämie)	Blutzellen	HL-60/Vinc

Die Zelllinie SW1573 ist eine Lungenkrebszelllinie, genauer gesagt sind es entartete Zellen der Lungenalveolen. Diese Zellen wurden von einer 44-jährigen kaukasischen Frau durch Dr. A. Leibovitz 1977 erstmals isoliert [60]. Neben der parentalen Zelllinie kamen noch die MVP- und ABCC1-überexprimierende SW-1573/2R120 Subzelllinie und die ABCB1-überexprimierende SW-1573/2R160 Subzelllinie in Verwendung. MVP („Major Vault“) Proteine sind neben den bereits besprochenen ABC-Transportern für Resistenzen bei Lungenkrebs mitverantwortlich [61]. Die Zellen wurden bezogen von Dr. H. Broxterman (Amsterdam, Niederlande). Bei KB-3-1 handelt es sich um Cervixkarzinomzellen, die einen Subklon der HELA-Zellen (von

Henrietta Lacks 1951 entnommen) darstellen. Neben den parental KB-3-1-Zellen, wurde noch die den ABCB1 überexprimierende KB-C-1-Resistenzzelllinie für Versuche verwendet [60]. Diese Zelllinien wurden dankenswerterweise von Dr. D. W. Shen (Bethesda, Maryland) gespendet. Die Linie A549 stammt von einem nichtkleinzelligen Lungenkarzinom eines 58 jährigen kaukasischen Mannes [60] und zeichnet sich unter anderem durch eine Überexpression von ABCG2 und ABCC1 aus [42]. Sie wurden von der American Type Culture Collection in Manassas (Virginia) bezogen. Die Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 und deren ABCG2 überexprimierende Subklonzelllinie MDA-MB-231/BCRP (erhalten von Prof. Ross, University of Maryland, Greenbaum Cancer Center, Baltimore) bekamen stets RPMI1640 + 10% FKS als Nährmedium. Die Brustkrebszelllinie MCF-7 wurde 1970 aus amputiertem Brustgewebe einer 69 jährigen kaukasischen Frau isoliert. MCF-7 besitzt zytoplasmatische Estrogenrezeptoren und reagiert auf Aktivierung dieser Rezeptoren mit verstärkter Zellproliferation [60]. Die Subzelllinie MCF-7-Adr, weist als Besonderheit eine erhöhte Expression von ABCB1 auf (Herkunft der Zellen: CNRS Frankreich, S. Chouaib).

Die promyelocytische Leukämiezelllinie HL-60 stammt von einer 36 jährigen kaukasischen Frau. Die Zelllinie enthält das myc-Onkogen [60]. Beide Linien wurden dankenswerterweise von Dr. M. Center von der Kansas State University erhalten. Da es sich hierbei um Blutzellen handelt, zeigen diese bei der Zellkultur keine Adhärenz, sie lagern sich also nicht am Boden der Kulturgefäße an.

Die Kultivierung der Krebszellen erfolgte stets unter aseptischen Bedingungen in einer Reinraumwerkbank und meist in T25 Gewebekulturflaschen (T25 = 25 cm² Wachstumsfläche), oder für größere Versuchsansätze in T75 Gewebekulturflaschen (T75 = 75 cm² Fläche). Die SW1573 und MCF-7 Zelllinien wurde in DMEM (= Dulbecco's Modified Eagle Medium; Herkunft: Firma Sigma-Aldrich) kultiviert. Für die KB-3-1, A549 und HL60 Zellen wurde RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) als Nährmedium verwendet. Alle Nährlösungen enthielten 10% FKS (= fetales Kälberserum; Herkunft: PAA Pasching). Das Passagieren der Zellen erfolgte zwei mal wöchentlich. Die ABC-Transporter überexprimierenden Zellen KBC-1, SW1573, MDA/Bcrp, MCF-7-Adr und HL60/Vinc erhielten zusätzlich einmal wöchentlich das für sie entsprechende Selektionsgift Colchicin, Doxorubicin, Geneticin bzw Vincristin.

Die Zellen wurden zweimal pro Woche bei einer Konfluenz von etwa 80 bis 90% passagiert. Bei den adhärenenten Zelllinien wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 bis 2 ml einer Trypsin (0,05 %)/ Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (=EDTA, Komplexbildner; 0,02 %) gewaschen. Nach Entfernen der Waschflüssigkeit wurden die Zellen nochmals mit 1 bis 2 ml der gleichen Trypsin/EDTA-Lösung versetzt und je nach Bedarf der unterschiedlichen Zellarten für etwa 3 Minuten in den Brutschrank gestellt, um die adhärenenten Zellen vom Boden abzulösen. Daraufhin wurden die Zellkulturflaschen mit frischem Medium versetzt, wobei es hier zu einer Inaktivierung des Trypsins durch das im Medium enthaltene fetale Kälberserum kam. Nach dem Homogenisieren der Zellsuspension wurde diese je nach Teilungsrate der unterschiedlichen Zelllinien meist im Verhältnis von 1:5 bis 1:15 verdünnt, indem nur der entsprechende Bruchteil an Suspension in der Zellflasche zurückgelassen und mit Medium auf 5 ml (bezogen auf T25 Fläschchen) aufgefüllt wurde. Der Rest der Zellsuspension wurde entweder verworfen oder bei Bedarf für Versuche verwendet. Die Leukämiezelllinie HL-60 zeigt bei der Zellkultur keine Adhärenz und musste daher nicht mit Trypsin behandelt werden.

Alle Zelllinien wurden in einem Brutschrank unter physiologischen Bedingungen bei 37 Grad Celsius und in einer feuchten Atmosphäre mit einem Gehalt von 5% CO₂ aufbewahrt. Glasgefäße und Glaspipetten wurden für mindestens 2 Stunden bei 220° Celsius in einem Umlufttrockenschrank hitzesterilisiert. Relativ hitzeempfindliche Verbrauchsmaterialien wie Kunststoffe wurden im Autoklaven unter Druck (mit heißem gesättigten Wasserdampf) bei 121 °C sterilisiert.

2.2 Zytotoxizitätstest

2.2.1 Bestimmung der Zellzahl bzw Zelldichte

Als Vorbereitung zur Quantifizierung der Zellen wurde die Zellsuspension in einem Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit neuem Medium versetzt. Die Zellzahl wurde lichtmikroskopisch mit Hilfe einer Zählkammer (Abbildung 7) bestimmt. Hierfür wurde 10µl der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit einer Trypanblaulösung (0,5%) versetzt und anschließend mittels Pipette homogenisiert. Nach Befüllen der Zählkammer mit der gefärbten Suspension konnte die Anzahl der Zellen mittels Lichtmikroskop gezählt werden. Die verwendete

Zählkammer ist auf $X \text{ mal } 10^4$ Zellen pro ml Suspension geeicht. Durch Multiplikation des Zählergebnisses mit dem Faktor 2 (aufgrund der erfolgten Verdünnung mit Trypanblau) errechnet sich die Zelldichte.



Abbildung 7: Zählkammer (rechts Aufbau bei Blick durch das Mikroskop)

Für die Zytotoxizitätstests wurden adhärenente Zellen wie bereits beschrieben vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst und die Zelldichte mittels Zählkammer und Lichtmikroskop bestimmt. Pro Well wurden 100 μl Zellsuspension mit meist, je nach Vermehrungsgeschwindigkeit der jeweiligen Zelllinie, 2×10^4 Zellen ausgesät. Um die gewünschte Konzentration an Zellen zu erreichen, musste mit Medium entsprechend verdünnt werden. Der äußere Rand der Wellplatte (insgesamt 36 Wells) wurde nicht mit Zellen versetzt, da man hier generell mit Verdunstung und daher auch mit einer Verfälschung des Ergebnisses rechnen muss. Somit wurde die Menge an erforderlicher Zellsuspension für 60 Wells (pro Platte) berechnet. Pro Wellplatte wurden also 6 ml ($60 \times 100 \mu\text{l}$) verdünnter Zellsuspension mit entsprechender Zelldichte benötigt. Da mit einem gewissen Arbeitsverlust an Suspension zu rechnen war, wurde stets ein Überschuss in die Rechnung miteinbezogen. Daher wurde meist 8 ml verdünnte Zellsuspension pro Wellplatte hergestellt. Das Aussäen selbst erfolgte mit einer Multikanalpipette. Um für eine hohe Genauigkeit zu sorgen, wurde die Suspension zwischendurch wiederholt homogenisiert. Nach der Aussaat der Krebszellen wurden die Wellplatten für etwa 24 Stunden in den Brutschrank (37°C , 5% CO_2) gestellt, damit sie sich über Nacht am Boden anhaften konnten.

2.2.2 Zusatz von Destruxinen und ABC-Transporter-Inhibitoren

Nach mikroskopischer Kontrolle der Adhärenz der Zellen folgte am darauffolgenden Tag die Herstellung von Verdünnungsreihen der drei zu untersuchenden Destruxine (A, B und E). Die Inhibitorlösungen wurden ebenfalls in den benötigten Konzentrationen vorbereitet. Auf die pro Well bereits vorhandenen 100 µl Zellsuspension wurden jeweils 50 µl Destruxinlösung und 50 µl Inhibitorlösung pipettiert. Um Vergleichsstandards bezüglich des Zellwachstums ohne Zusatz von Zytostatikum und/oder Inhibitor zu erhalten, wurden bestimmte Wells teilweise oder nur mit Nährmedium versetzt. Zur Erleichterung und Verkürzung des Pipettiervorgangs wurde hierbei eine Finnpipette verwendet. Anschließend wurden die Zellen für 72 Stunden im Brutkasten kultiviert.

2.2.3 Zytotoxizitätsbestimmung mit Hilfe des XTT-Reduktionstests EZ4U („Easy for you“)

Das zytotoxische Potential von Substanzen gegenüber Zellen *in vitro* kann mithilfe von Tetrazoliumsalzen kolorimetrisch untersucht werden. Wie in Abb. 8 ersichtlich nützt man hierbei die Tatsache, dass gelbes Tetrazoliumsalz in lebenden Zellen zu Formazan umgewandelt wird. Diese biochemische Reaktion erfolgt durch die Succinatdehydrogenase, die nur in intakten Mitochondrien aktiv ist. Somit kann man zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden. Die Bestimmung erfolgt spektrophotometrisch, wobei sich die Anzahl der lebenden Zellen proportional zum Ausmaß der Absorption verhält. Lange Zeit verwendete man hierfür das Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid), dessen blau gefärbtes Formazan als Reduktionsprodukt jedoch nur sehr schwer wasserlöslich ist. Mittlerweile verwendet man zur Untersuchung der Zytotoxizität oft den Farbstoff XTT (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazoliumhydroxid), dessen ziegelrot gefärbtes Formazan-Reduktionsprodukt wasserlöslich und damit praktikabler in der Handhabung ist [62].

In dieser Arbeit wurde der EZ4U Kit von der Firma Biomedica Wien verwendet, der ebenfalls einen derartigen Farbstoff beinhaltet.

Nach 72-stündiger Giftinkubation der Zellen wurde das Medium mittels Multikanalpipette entfernt und durch 100 µl EZ4U-Reagens ersetzt. Dieses Reagens wurde durch Versetzen des pulverförmigen EZ4U-Substrats mit einer Aktivatorlösung und Verdünnen dieses Gemisches 1:10 mit Nährlösung (inklusive 10% FKS) hergestellt. Um die Absorption des Reagens selbst (=Nullwert) zu erhalten, wurde von drei zellfreien Wells ebenfalls das Medium abgesaugt und diese mit 100 µl Reagens versetzt. Nach 1-2 Stunden wurde die Absorption in einem Mikrotiterplatten Photometer (ASYS Expert Plus; Biochrom UK) bei 450 nm bestimmt. Als Referenzwert wurde noch zusätzlich die Absorption bei 620 nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge werden Zellbruchstücke und andere Störfaktoren gemessen, dessen Absorption als Leerwert abgezogen wird [63, 64]. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad PRISM 5.

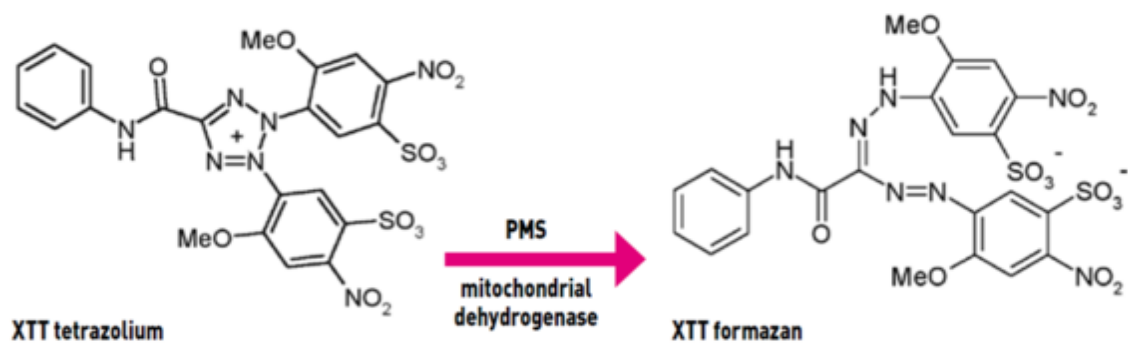


Abbildung 8: Umwandlung des Tetrazoliums Salzes in Formazan [65]

2.3 Kolonieformierungs Zellaassay (Colony forming assay, Clonogenic assay)

Clonogenic assays dienen zur Bestimmung der Proliferationsfähigkeit von Zellen *in vitro*. Man prüft die Fähigkeit von Einzelzellen nach Zugabe zytotoxischer Substanzen Kolonien zu bilden. In der Regel spricht man von einer Kolonie, wenn der Zellcluster aus mindestens 50 Zellen besteht. Man vergleicht die Anzahl der Kolonien, die mit Zellgift oder Strahlung exponierte Zellen bilden können mit der Anzahl gebildeter Kolonien von Zellen, die nicht behandelt wurden [66].

2.3.1 Durchführung

In dieser Arbeit wurden parentale und die entsprechenden ABC-Transporter überexprimierenden Subzelllinien in einer Zelldichte von $0,5 \times 10^3$ Zellen (KB-3-1, C!) bzw. $0,75 \times 10^3$ (der MCF-7- und Subzelllinie) in 24-well Platten ausgesät. Die Wellplatten wurden über Nacht in den Brutschrank (37°C , 5% CO_2) gestellt, damit die Zellen am Boden anhaften konnten. Am nächsten Tag wurden die Destruxine zugesetzt. Die Untersuchung der verschiedenen Destruxinkonzentrationen auf die unterschiedlichen Zelllinien wurde jeweils in Duplikaten durchgeführt und die Wellplatten für 7 Tage im Brutschrank gelagert.

2.3.2 Kristallviolett färbung

Nach Giftexposition der Zellen für eine Woche wurde das überstehende Medium abgesaugt und mit jeweils 0,5 bis 1 ml kalter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) pro Well gewaschen. Zur Fixierung der Zellen am Boden wurden nach Entfernen des PBS jeweils etwa 1 ml -20°C kaltes Methanol hinzugefügt und die Wellplatten bei dieser Temperatur für mindestens 15 Minuten gelagert. Danach wurde das Methanol abgesaugt und nochmals mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das PBS entfernt und die Zellen mit einer 1:1000-Verdünnung einer 10%igen Kristallviolettlösung gefärbt. Nach einer Einwirkzeit von etwa 5 Minuten wurden die Wellplatten mit Wasser gewaschen und die gebildeten Kolonien makroskopisch ausgezählt. Jeder Versuch wurde pro Zelllinie zweimal durchgeführt und die Mittelwerte der Einzelversuche zur Auswertung verwendet.

2.4 Durchflusszytometrie – Grundlagen

Die Durchflusszytometrie ist eine spektroskopische Methode, mit der man verschiedenste Eigenschaften von Einzelzellen oder Partikeln analysieren kann. Aus Zellsuspensionen werden einzelne Zellen hintereinander durch einen Kanal gesaugt und diese werden dann separat von der Seite mit einem Laserstrahl von bestimmter Wellenlänge bestrahlt. Der Strom von nacheinander fließenden Einzelzellen wird durch das Verfahren der „hydrodynamischen Fokussierung“ erreicht. Durch Lichtstreuung oder aber auch Fluoreszenzemission (bei Einsatz eines Fluorophors) kann man wertvolle Informationen über die untersuchten Zellen gewinnen. Die durchflusszytometrischen Geräte werden oft allgemein auch als FACS (=

fluorescence-activated cell sorting) bezeichnet, wobei es sich hier jedoch um eine geschützte Marke eines Geräteherstellers handelt [67].

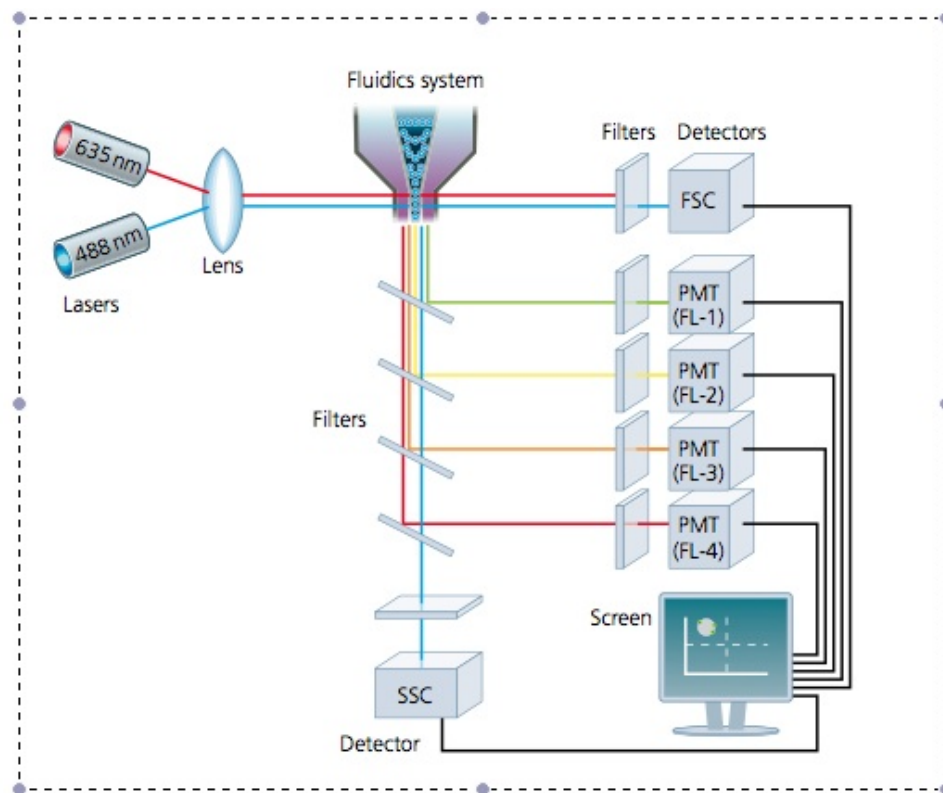


Abbildung 9: Funktionsprinzip eines Durchflusszytometers [67]

Wie man in Abbildung 9 sehen kann wird ein Laserstrahl zuerst durch eine Linse geschickt und dort um etwa 20 Grad gestreut. Anschließend trifft dieses Licht im 90 Grad Winkel auf die Einzelzellen. Die Zellen können das Licht ebenfalls streuen.

Man unterscheidet

- Vorwärtsstreulicht (FSC = forward scatter): dieses Signal gibt einen Hinweis auf die Größe der Partikel und man kann außerdem lebende Zellen von Zellresten toter Zellen unterscheiden.
- Seitwärtsstreulicht (SSC = side scatter): man misst hier Licht, das im rechten Winkel gestreut wurde und das Signal liefert Informationen über die Granularität der Einzelzellen.
- Fluoreszenz: Fluorophore werden durch den Laser angeregt und emittieren Licht, welches ebenfalls im 90 Grad Winkel gemessen wird. Um Fluoreszenz nach Wellenlänge filtern zu können, gibt es verschiedene sogenannte Fluoreszenzkanäle (FL-1 bis FL-4). Diese Kanäle erfassen jeweils einen bestimmten Wellenlängenbereich [67].

Trifft das gestreute Licht auf spezielle Photodetektoren, entsteht eine elektrische Spannung. Diese Spannung ist sehr schwach und deren Höhe ist abhängig von der Anzahl der eintreffenden Lichtphotonen. Diese analoge Spannung wird nun verstärkt und in ein digitales Signal umgewandelt. Die Messergebnisse der unterschiedlichen Detektoren werden als Parameter bezeichnet. Man erhält als Ergebnis die Zahl an Ereignissen (=“Events“), also die Anzahl an Zellen, welche die gewünschten physikalischen Eigenschaften oder Fluoreszenzmarker aufweisen [67].

Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht sind einzigartig für jedes Partikel und durch Kombination von diesen beiden Parametern kann man zwischen einzelnen Zelltypen in einer heterogenen Zellssuspension differenzieren. Man kann somit beispielsweise bei der Analyse von Blutproben problemlos zwischen Makrophagen, Monozyten und Lymphozyten unterscheiden. Durch Nutzung von Fluorophoren kann man qualitative und quantitative Daten gewinnen. Man kann sie sowohl intrazellulär als auch extrazellulär einsetzen. Unterschiedliche Zellen besitzen verschiedene Oberflächenproteine, was man durch selektive Markierung mit Fluorophoren zur Analyse nützen kann [67].

2.4.1 Fluorophore

Fluorophore bzw Fluorochrome sind Farbstoffe, welche Lichtenergie bestimmter Wellenlänge aufnehmen können (= Anregungsenergie) und unmittelbar danach Lichtenergie höherer Wellenlänge abgeben (=Emissionsenergie). Die Emissionsenergie ist etwas niedriger als die Anregungsenergie, da ein Teil in Form von Wärme verloren geht. Da allgemein ein niedrigerer Energiebetrag mit einer höheren Wellenlänge einhergeht, ist somit die Emissionswellenlänge bei allen Fluorophoren etwas höher als die Wellenlänge des anregenden Lichts [67].

2.4.1.1 Rhodamin 123 (Rh 123)

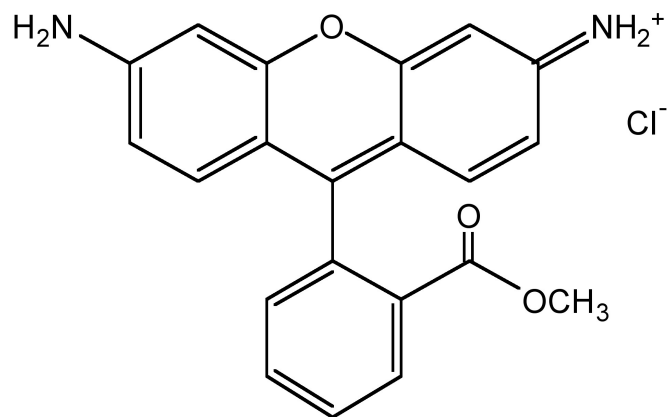


Abbildung 10: Rhodamin 123

Das kationische Fluorochrom Rhodamin 123 (Abbildung 10) ist chemisch gesehen ein Xanthen-Derivat und gleichzeitig ein Triphenylmethanfarbstoff. Rhodamin 123 (Herkunft: Sigma-Aldrich) wird selektiv in Mitochondrien mit intaktem Membranpotential angereichert. Außerdem ist es ein bekanntes Substrat für den ABCB1-Transporter, weshalb der Farbstoff zur Messung der Aktivität dieses Transportproteins eingesetzt werden kann. Die Fluoreszenz von in Zellen aufgenommenem Rhodamin 123 kann mittels Durchflusszytometrie erfasst werden. Die Anregungswellenlänge ($\lambda_{\text{ext.}}$) des Fluorochroms beträgt 507 nm, die Emissionswellenlänge ($\lambda_{\text{em.}}$) 529 nm [68, 69].

2.4.1.2 Pheophorbid A (Pheo A)

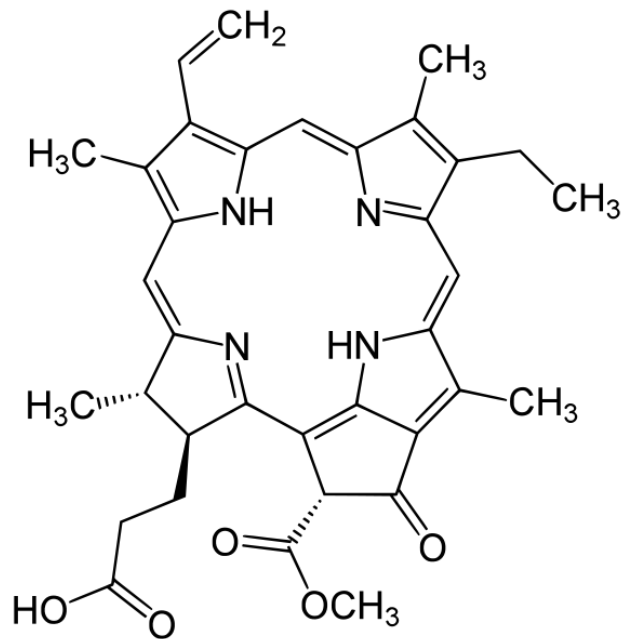


Abbildung 11: Pheophorbid A

Das Porphyrinderivat Pheophorbid A (Abbildung 11) ist ein Abbauprodukt des grünen Pflanzenfarbstoffs Chlorophyll. So wie Rhodamin 123 wird auch Pheophorbid A (Herkunft: Sigma-Aldrich) in Zellen angereichert. Es ist ein selektives Substrat für ABCG2, während es von den ABC-Transporter ABCB1 und ABCC1 nicht transportiert werden kann. Diese Tatsache kann man zur Differenzierung nutzen [70, 71].

2.4.2 Untersuchung eines möglichen Einflusses von Destruxinen auf den durch ABC-Transporter medierten Efflux von Rhodamin 123 und Pheophorbid A

Wie bereits erwähnt reichern sich die beiden Fluorophore Rhodamin 123 und Pheophorbid A in Zellen an, was man durchflusszytometrisch bestimmen kann. Da sie jedoch bekannterweise von bestimmten ABC-Transportern wieder aus diesen Zellen hinausgepumpt werden können, kann man diesen Vorgang zur Bestimmung der Aktivität der Transportproteine nutzen. Durch Zusatz von Inhibitor- oder Aktivatorsubstanzen kann man diese Transporttätigkeit modulieren. Bei Inhibition der ABC-Transporter erreicht man somit höhere intrazelluläre Konzentrationen von Rh 123 und Pheo A, durch Aktivierung der Transporter liegen entsprechend niedrigere

Konzentrationen vor. Diesen Mechanismus kann man sich zur Erforschung neuer Modulatoren von ABC-Transportern zunutze machen. Da Pheo A spezifisch von ABCG2 und Rh123 von ABCB1 transportiert wird, erhält man bei möglicher Modulation von nur einem der beiden Transporter einen konkreten Hinweis auf den Angriffsort neuer Substanzen. Dies wird bei sogenannten Efflux-Assays (Efflux = Ausstrom) getestet [69].

2.4.2.1 Rhodamin 123 Assay (Durchführung)

Da Rh 123 sehr pH sensitiv ist, wurde ein spezielles gepuffertes MOPS-Medium verwendet. Dieses bestand aus DMEM + HEPES (= Puffersubstanz 1; 25 mM) + MOPS (= Puffersubstanz 2; 209 mg/100ml). Zellsuspensionen von HL-60 und HL-60-Vinc Zellen wurden auf eine Dichte von 5×10^5 Zellen pro Probe eingestellt. Zur Durchführung eines Versuches mit 10 Proben wurden insgesamt 50×10^5 Zellen pro Zelllinie benötigt. Die auf 1 ml standardisierten Proben wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Destruinen bzw mit dem ABC-Transporter-Inhibitor Verapamil versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37 °C wurde in jedes Probenröhrchen (mit Ausnahme einer Autofluoreszenz-Probe) 50 µl einer gelb fluoreszierenden Rh123-Lösung (30 µg/ml) pipettiert. Nach einer weiteren Inkubationsphase (1 Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss) erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung des Gehaltes an Rh123 in den Zellen. Die Fluoreszenzanregung erfolgte mit dem Standard-Argon-Laser bei 488 nm. Gemessen wurde in speziellen FACS-Probenröhrchen im Kanal FL1, also bei 530 nm [67, 68].

2.4.2.2 Pheophorbid A Assay

Die Durchführung des Pheo A Assays erfolgte nach einem ähnlichen Schema wie der Rh123 Assay. Als Medium wurde serumfreies DMEM verwendet. Die Zellsuspensionen und Wirkstofflösungen wurden vergleichbar wie beim Rh123 Assay vorbereitet und ebenfalls auf ein Endvolumen von 1 ml pro Probenröhrchen standardisiert. Für diesen Efflux-Assay wurde die ABCG2 überexprimierende Zelllinie A549 verwendet. Nach 15 Minuten Inkubationszeit mit den Testsubstanzen wurde in alle Probenröhrchen mit Ausnahme der Autofluoreszenz 10 µl einer 1 mM ethanolischen Lösung von Pheophorbid A pipettiert. Nach weiteren 30 Minuten Inkubation bei 37 °C wurde die Efflux-Reaktion mit eiskaltem PBS (3 ml pro

Probenröhrchen) gestoppt. Danach wurde 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Messung erfolgte wieder in FACS-Probenröhrchen, jedoch bei 650 nm (=Kanal FL-3) [70, 71, 72].

2.5 Statistik

Alle Versuche wurden mit dem Programm GraphPad Prism® 5 statistisch ausgewertet. Um die statistische Signifikanz der Ergebnisse zu ermitteln, wurden t-Tests bzw ANOVA-Tests durchgeführt. In den Abbildungen wurden signifikante Unterschiede mit * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ oder *** für $p < 0,001$ markiert.

3 Zielsetzung

Die bereits beschriebenen vielfältigen biologischen Wirkungen von Cyclohexadepsipeptiden im Allgemeinen und von Destruxinen im Speziellen stellen ein großes Potential für die Entwicklung möglicher Arzneistoffe zur Behandlung verschiedener Erkrankungen dar. Damit diese Substanzen überhaupt am Patienten getestet werden können, bedarf es jedoch noch intensiver Grundlagenforschung zur genaueren Erfassung von deren Wirkpotential und zur Aufklärung der zugrunde liegenden Wirkmechanismen.

Die zytotoxische Wirkung von Destruxinen auf verschiedene humane Krebszelllinien *in vitro* wurde bereits in verschiedenen wissenschaftlichen Arbeiten untersucht [42, 57, 58, 73]. In einer aktuellen Arbeit wurde jedoch eine relative Resistenz der nichtkleinzelligen Lungenkarzinomzelllinie A549 gegenüber DtxA, DtxB und DtxE festgestellt. Diese Zelllinie zeichnet sich durch eine Überexpression der ABC-Transporter ABCC1, ABCC2 und ABCG2 aus. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese ABC-Transporter für die relative Resistenz von A549 gegenüber Destruxinen verantwortlich sein könnten, indem sie die Destruxine aus Zellen hinaustransportieren [42]. Ähnliches wurde für die zyklischen Hexadepsipeptid Enniatin und Beauvericin beschrieben, was den eventuellen protektiven Effekt von ABC-Transportern auf humane Zellen bekräftigt [61].

Das Ziel dieser Diplomarbeit war daher die Untersuchung des Einflusses von ABC-Transportern auf die Wirkung von Destruxinen. Zu diesem Zweck sollte die Zytotoxizität von DtxA, DtxB und DtxE auf verschiedene humane Krebszelllinien und deren ABC-Transporter überexprimierende Subzelllinien getestet werden. Dafür wurden Tests zur Bestimmung der Wirksamkeit nach Kurzzeitexposition (72 Stunden) und längerer Exposition (1 Woche) durchgeführt. Weiters sollte getestet werden, ob die verwendeten Destruxine Substrate für diese ABC-Transportproteine darstellen und ob sie spezifischen Substratcharakter besitzen. Zur Erreichung dieser Ziele wurden verschiedene bekannte teils spezifische ABC-Transporter-Inhibitoren in Kombination mit den Destruxinen eingesetzt. Außerdem wurden noch Tests mit den ABC-Transporter-Substraten Pheophorbid A und Rhodamin 123 durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Zytotoxizitätstests

4.1.1 MTT-Assays

Um den Einfluss von ABC-Transportern auf die Zytotoxizität von Destruxinen zu bestimmen, wurden MTT-Tests mit verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Es wurden jeweils Krebszellen vom Wildtyp (parentale Zelllinie) und deren Subzelllinien, welche sich durch Überexpression eines oder mehrerer ABC-Transportproteine auszeichnen, getestet. Nach 72 Stunden Exposition unterschiedlicher Zellkulturmodelle mit aufsteigenden Konzentrationen von DtxA, DtxB bzw DtxE wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt (Abbildungen 12-13) und daraus die jeweiligen inhibitorischen Konzentrationen, bei denen 50% der Zellen abgestorben sind (IC_{50} -Werte), errechnet (Tabellen 4-6). Wie auch schon in vorangehenden Studien [42], zeigte sich auch bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellen, dass DtxE bereits im nanomolaren Bereich eine potente zytotoxische Wirkung zeigt, während DtxA und DtxB im mikromolaren Bereich ihre Wirkung entfalten. Die IC_{50} -Werte für die Wildtypzelllinien lagen für DtxA zwischen 1,21 μ M (HL60 und SW1573) und 5,35 μ M (MCF-7), für DtxB zwischen 1,19 μ M (HL60) und mehr als 10 μ M (MCF-7) sowie für Dtx E zwischen 0,043 μ M (HL60) und 0,177 μ M (MDA-MB-231). Vergleicht man die Wirkung der Substanzen in Hinblick auf die unterschiedlichen parentalen Zelllinien, zeigt sich die Leukämiezelllinie HL60 als besonders sensitiv, während die Brustkrebszelllinie MCF-7 gegen alle drei Testsubstanzen wesentlich resistenter war. Bezogen auf den Einfluss von ABC-Transportern auf die zytotoxische Wirkung, bewirkten die in den Testzelllinien überexprimierten ABC-Transporter alle einen protektiven Effekt gegenüber der Zytotoxizität der drei Destruxinderivate. So zeigten beispielsweise die ABCB1 überexprimierenden Zellen HL-60-Vinc eine mehr als 8 fache Resistenz (Vergleich der IC_{50} -Werte) gegenüber DtxA und DtxB. Gegenüber DtxE war die relative Resistenz ebenfalls stark ausgeprägt (> 5,81 fach). Auch bei den Subzelllinien von SW1573, welche ABCC1 (SW1573/2R120) bzw ABCB1 (SW1573/2R160) überexprimieren, konnte eine starke Resistenz festgestellt werden (> 8,25 fach bezogen auf DtxA).

Besonders bezogen auf die zwei jeweils höchsten eingesetzten Destruixinkonzentrationen waren die Resultate statistisch signifikant. Signifikante Unterschiede sind in den Abbildungen 12 und 13 durch Sterne grafisch hervorgehoben.

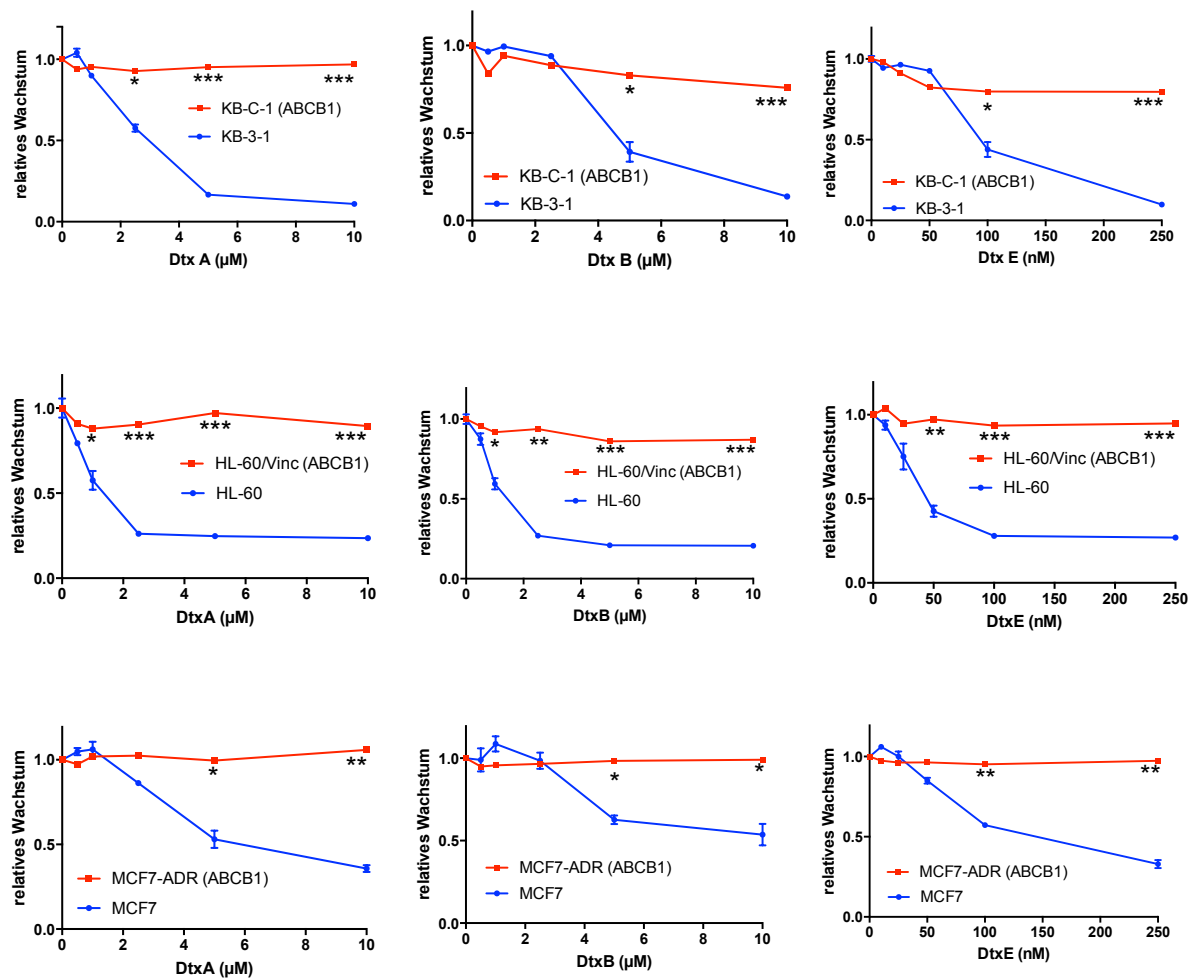


Abbildung 12: Dosis-Wirkungskurven: Einfluss einer Überexpression von ABCB1 auf die Zytotoxizität von Destruixinen; bei allen ABC-Transporter überexprimierenden Zelllinien ist ein stark protektiver Effekt zu erkennen; statistisch signifikante Unterschiede sind markiert mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$)

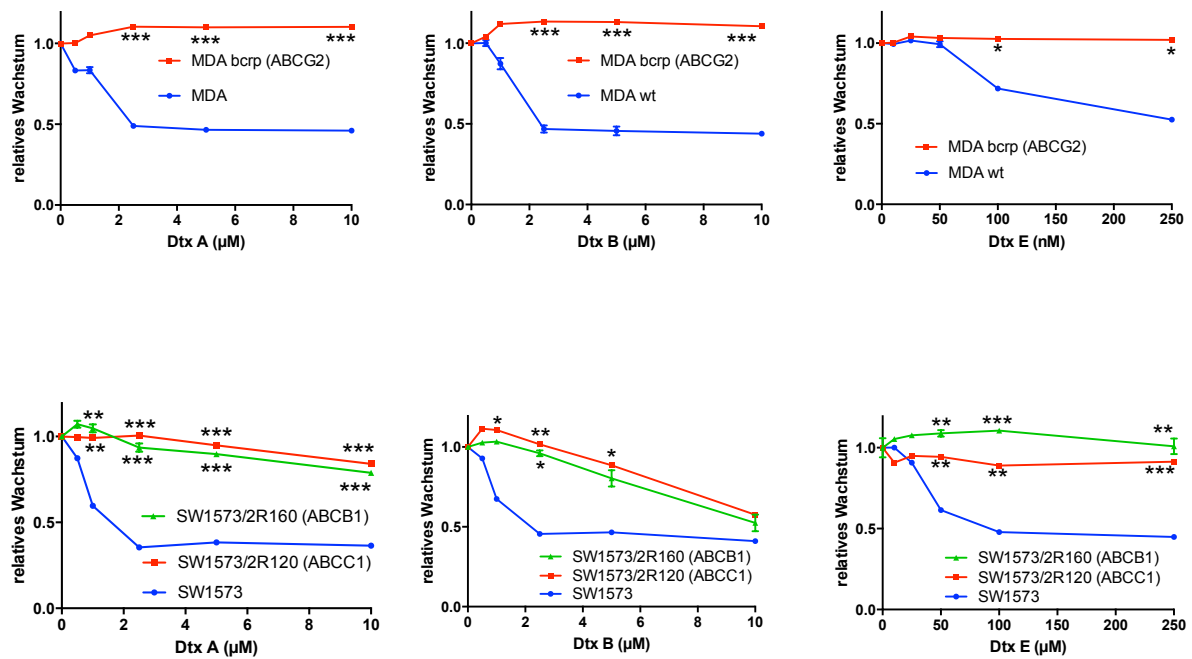


Abbildung 13: Dosis-Wirkungskurven: Einfluss einer Überexpression von ABCB1 bzw ABCC1 auf die Zytotoxizität von Destruxinen; bei allen ABC-Transporter überexprimierenden Zelllinien ist ein stark protektiver Effekt zu erkennen; statistisch signifikante Unterschiede sind markiert mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$)

Tabelle 4: Vergleich der zytotoxischen Aktivität von DtxA in chemoresistenten und chemosensitiven Krebszellmodellen (inklusive Standardfehler vom Mittelwert = SEM)

Zelllinie	Resistenzmechanismus (überexprimierter ABC- Transporter)	IC₅₀ von DtxA nach 72 h (μM)	SEM (μM)	relative Resistenz
HL-60	-	1,207	$\pm$ 0,089	
HL-60-Vinc	ABCB1	> 10		> 8,29 fach
MCF-7	-	5,354	$\pm$ 0,110	
MCF-7-Adr	ABCB1	>10		> 1,87 fach
SW1573	-	1,212	$\pm$ 0,074	
SW1573/2R120	ABCC1	>10		> 8,25 fach
SW1573/2R160	ABCB1	>10		> 8,25 fach
KB-3-1	-	2,944	$\pm$ 0,135	
KB-C-1	ABCB1	>10		>4,10 fach
MDA-MB-231	-	2,458	$\pm$ 0,069	
MDA-MB-231/BCRP	ABCG2	>10		>4,07 fach

Tabelle 5: Vergleich der zytotoxischen Aktivität von DtxB in chemoresistenten und chemosensitiven Krebszellmodellen (inklusive Standardfehler vom Mittelwert = SEM)

Zelllinie	Resistenzmechanismus (überexprimierter ABC- Transporter)	IC₅₀ von DtxB nach 72 h (μM)	SEM (μM)	relative Resistenz
HL-60	-	1,194	$\pm 0,122$	
HL-60-Vinc	ABCB1	> 10		>8,38
MCF-7	-	> 10	$\pm 0,075$	
MCF-7-Adr	ABCB1	>10		-
SW1573	-	1,525	$\pm 0,099$	
SW1573/2R120	ABCC1	>10		>6,56
SW1573/2R160	ABCB1	>10		>6,56
KB-3-1	-	4,509	$\pm 0,152$	
KB-C-1	ABCB1	>10		>2,22
MDA-MB-231	-	2,330	$\pm 0,077$	
MDA-MB-231/BCRP	ABCG2	>10		>4,29

Tabelle 6: Vergleich der zytotoxischen Aktivität von DtxE in chemoresistenten und chemosensitiven Krebszellmodellen (inklusive Standardfehler vom Mittelwert = SEM)

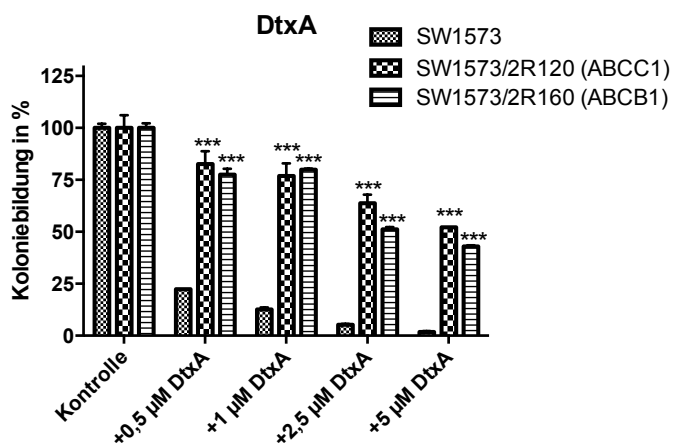
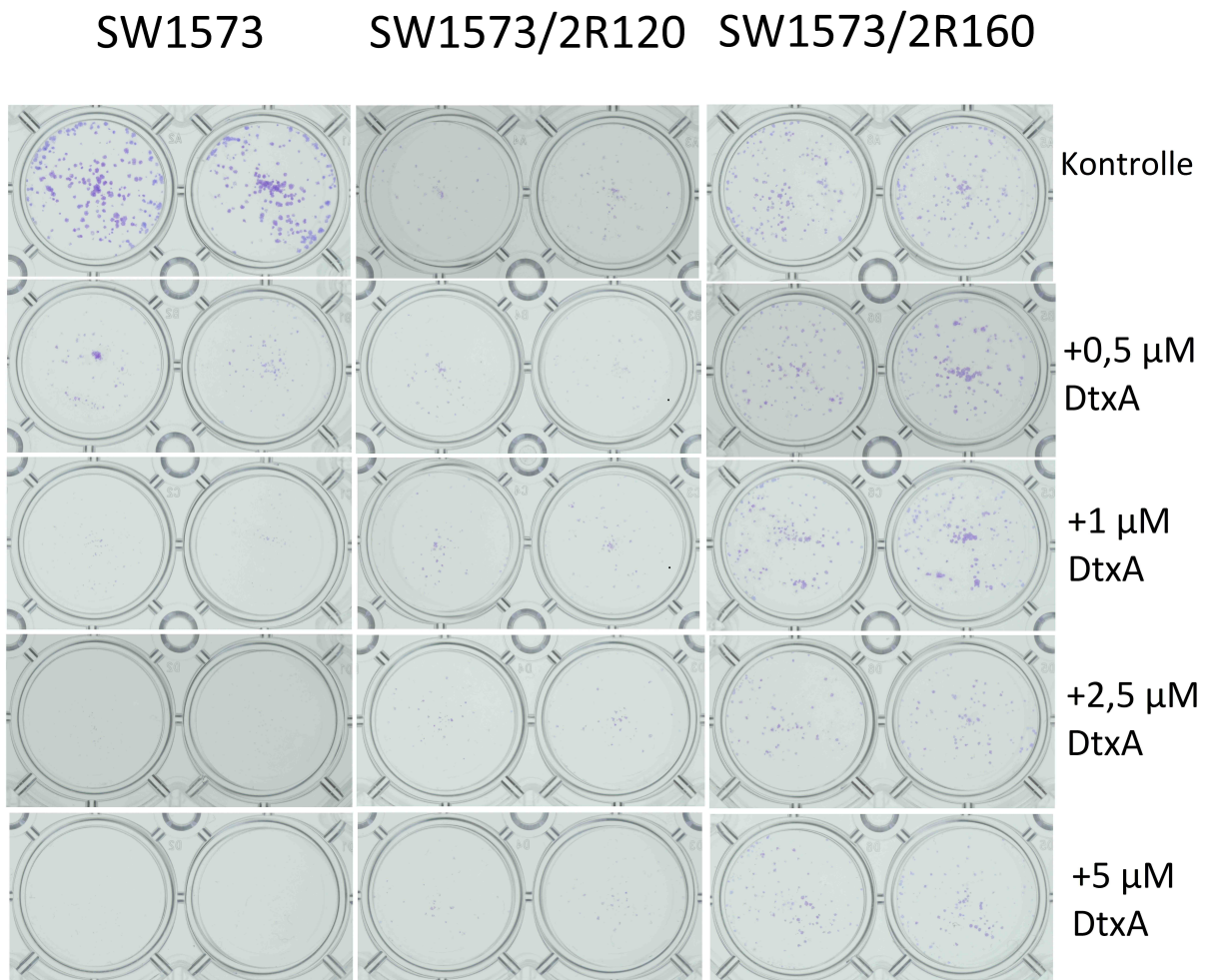
Zelllinie	Resistenzmechanismus (überexprimierter ABC- Transporter)	IC₅₀ von DtxE nach 72 h (µM)	SEM (µM)	relative Resistenz
HL-60	-	0,043	± 0,0001	>5,81
HL-60-Vinc	ABCB1	>0,25		
MCF-7	-	0,117	± 0,0001	>2,14
MCF-7-Adr	ABCB1	>0,25		
SW1573	-	0,067	± 0,0001	>3,73
SW1573/2R120	ABCC1	>0,25		
SW1573/2R160	ABCB1	>0,25		
KB-3-1	-	0,094	± 0,0002	>2,66
KB-C-1	ABCB1	>0,25		
MDA-MB-231	-	0,177	± 0,0001	>1,41
MDA-MB-231/BCRP	ABCG2	>0,25		

4.1.2 Kolonieformierungs-Zellassays

Neben dem 72h-MTT Assay wurde weiters die Überlebensfraktion einzelner Zellen bzw ihre Koloniebildungsfähigkeit nach längerer Destruxinexposition (7 Tage) getestet. Auch hier wurden wieder parentale Zelllinien mit den jeweils entsprechenden ABC-Transporter überexprimierenden Subzelllinien verglichen. Die Abbildungen 14 bis 19 zeigen die Ergebnisse der Kolonieformierungsassays. Bei Vergleich der Zelllinie SW1573 mit dessen Subzelllinien ist ein sehr deutlicher Unterschied in deren Fähigkeit, lebende Kolonien auszubilden, zu erkennen. Während das Koloniebildungsvermögen der parentalen Zellen durch Destruxinexposition stark eingeschränkt wurde (IC_{50} von DtxA = 0,279 μ M; IC_{50} von DtxB = 1,003 μ M; IC_{50} von DtxE = 33,1 nM), wiesen die beiden Subzelllinien eine sehr deutlich ausgeprägte Resistenz gegenüber den 3 verwendeten Destruxinen auf. Dies lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass die zytotoxischen Destruxine durch die vorhandenen ABC-Transporter aus den Krebszellen hinaus in das Medium transportiert werden und somit ihre Wirkung nicht entfalten können. Dies ist konform mit den bereits von den MTT-Tests erhaltenen Ergebnissen. SW1573/2R120 zeichnet sich durch eine Überexpression von ABCC1 aus, während bei SW1573/2R160 ABCB1 in hoher Konzentration vorliegt. Daher besteht die Möglichkeit, dass DtxA, DtxB und DtxE Substrate von diesen beiden ABC-Transportern darstellen.

Bezogen auf die Zelllinie MDA-MB-231 bzw dessen ABCG2 überexprimierende Subzelllinie MDA-MB-231/BCRP konnte dieses Ergebnis jedoch nicht bestätigt werden. Hier war kaum ein Unterschied im Koloniebildungsvermögen erkennbar. ABCG2 zeigte über diesen Zeitraum also keine Verminderung der Zytotoxizität der verwendeten Destruxine. Einzig bei der Konzentration von 5 μ M DtxB ist ein leicht protektiver Effekt zu erkennen, da hier auf Seiten von MDA-MB-231/BCRP noch einige wenige Kolonien zu erkennen sind, während bei der parentalen Zelllinie keine Kolonien mehr sichtbar sind (Abbildung 18). Während überexprimierte ABCG2-Transporter bei den Zytotoxizitätstest mit 72-stündiger Destruxin-Exposition noch zu einer Resistenz führten, konnte dieser schützende Einfluss beim Kolonieformierungstest mit 7-tägiger Exposition also nicht festgestellt werden.

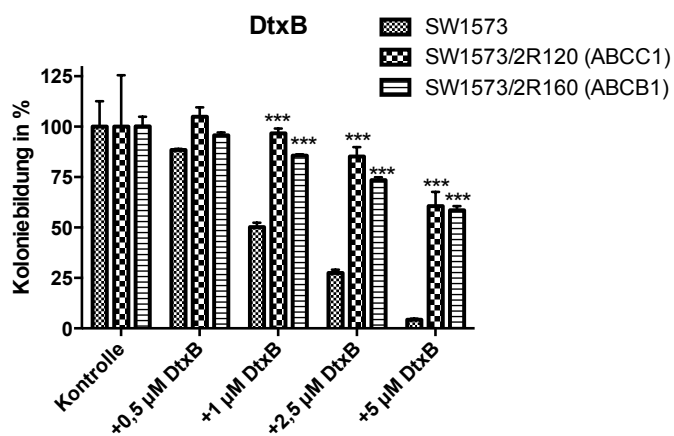
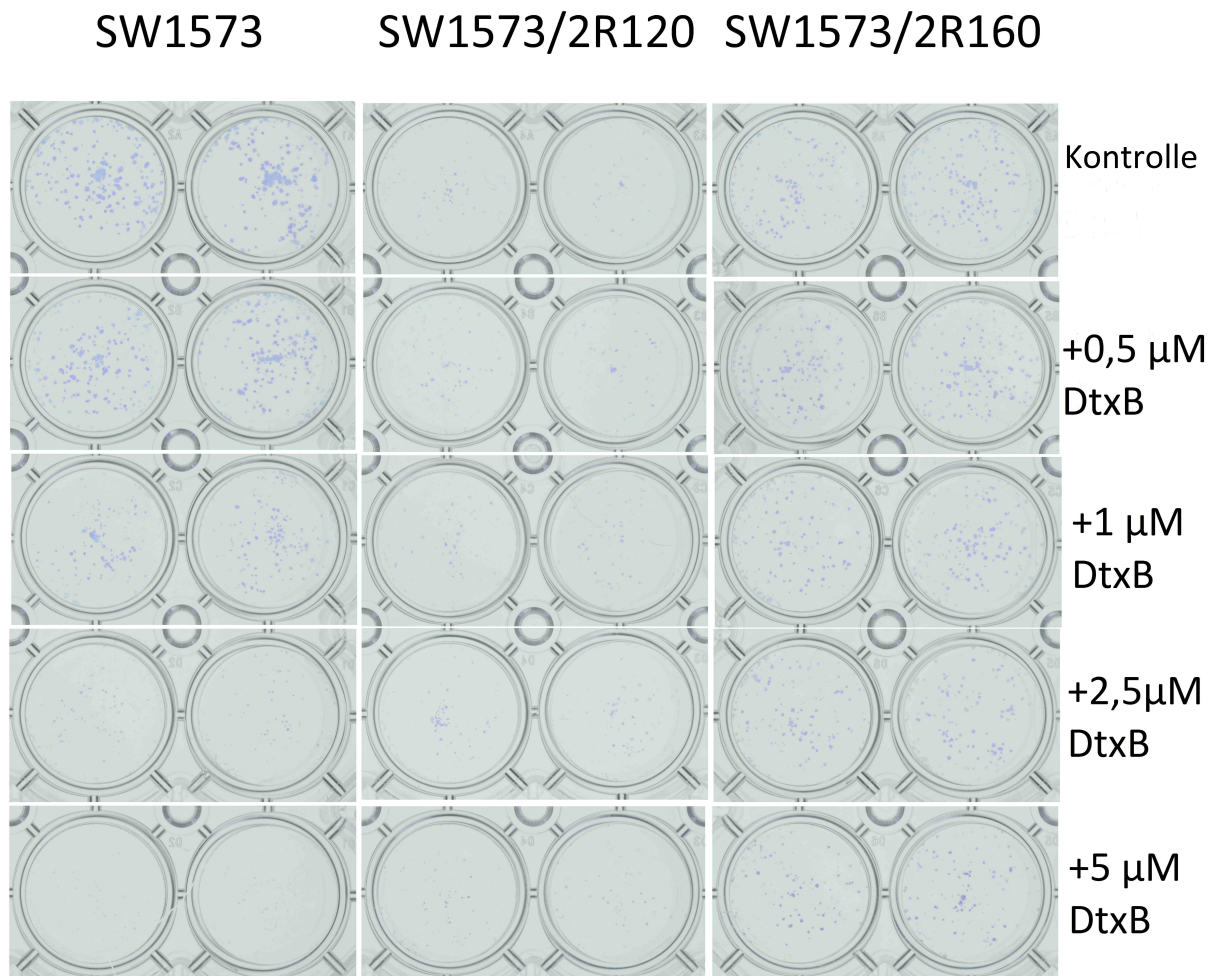
A.



B.

Abbildung 14: Einfluss von DtxA auf das Koloniebildungsvermögen von SW1573 Zellen bzw dessen Subzelllinien SW1573/2R120 und SW1573 2R160; A.: Fotografien, B.: Balkendiagramm; statistisch signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit: *** ($p < 0,001$)

A.



B.

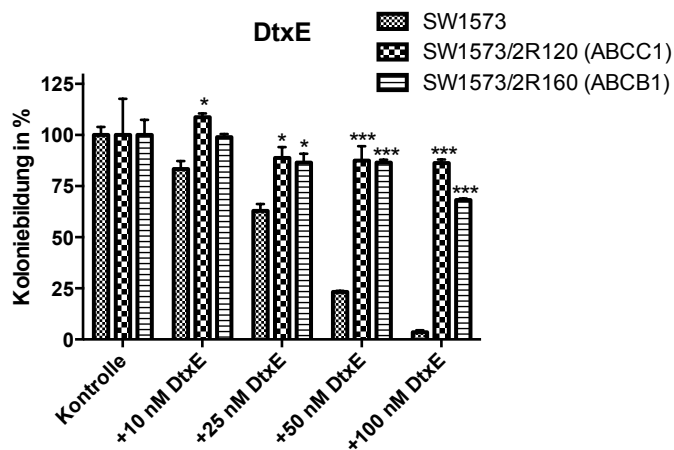
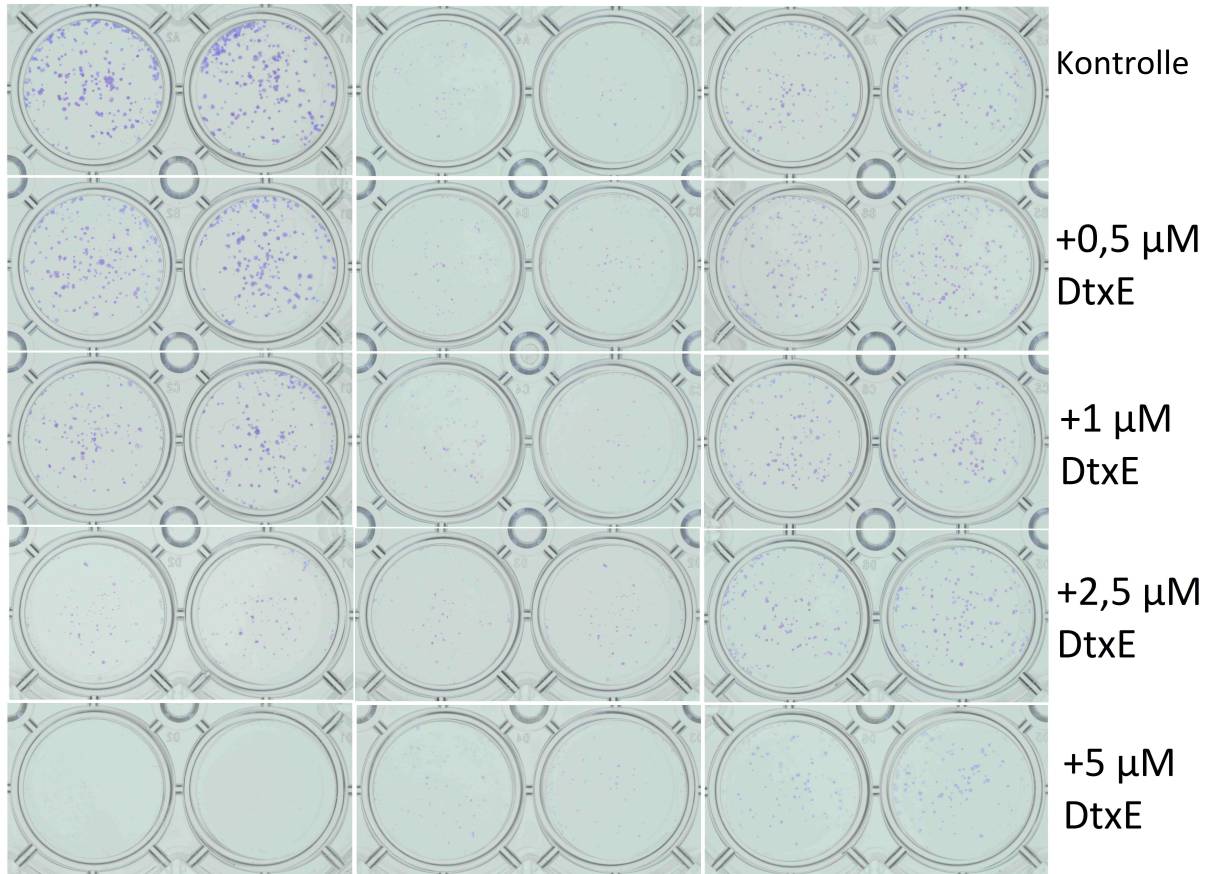
Abbildung 15: Einfluss von DtxB auf das Koloniebildungsvermögen von SW1573 Zellen bzw dessen Subzelllinien SW1573/2R120 und SW1573 2R160; A.: Fotografien, B.: Balkendiagramm; statistisch signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet mit: *** (p<0,001)

A.

SW1573

SW1573/2R120

SW1573/2R160

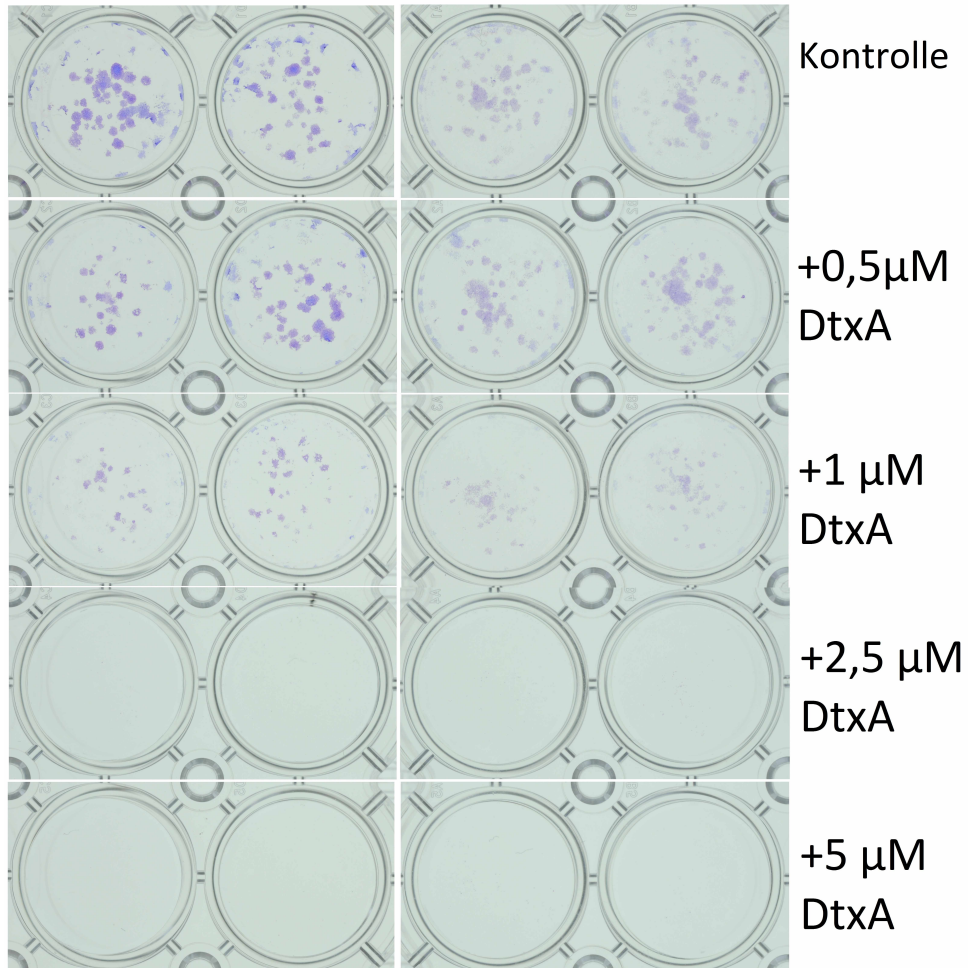


B.

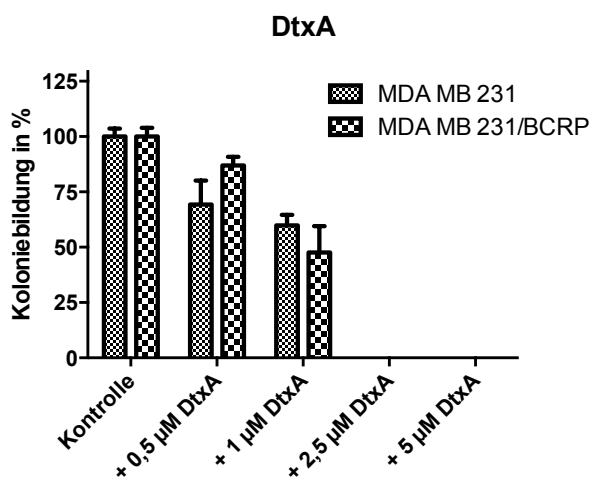
Abbildung 16: Einfluss von DtxE auf das Koloniebildungsvermögen von SW1573 Zellen bzw dessen Subzelllinien SW1573/2R120 und SW1573 2R160; A.: Fotografien, B.: Balkendiagramm; statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: * ($p < 0,05$), *** ($p < 0,001$)

MDA-MB-231

MDA-MB-231/BCRP



A.



B.

Abbildung 17: Einfluss von DtxA auf das Koloniebildungsvermögen von MDA-MB-231 und dessen ABCG2 überexprimierende Subzelllinie; A.: Fotografien, B.: Balkendiagramm

MDA-MB-231

MDA-MB-231/BCRP

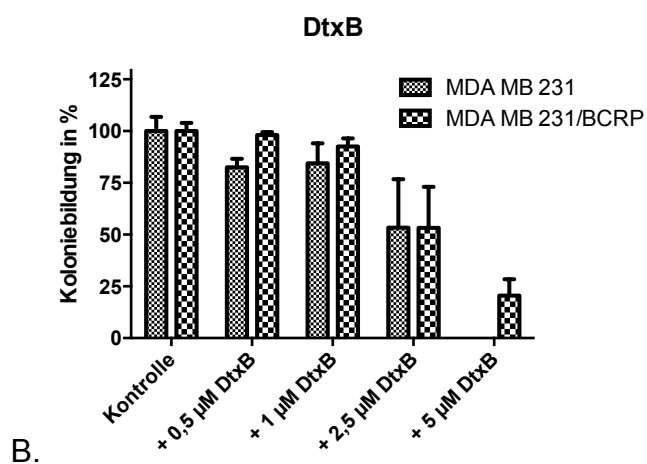
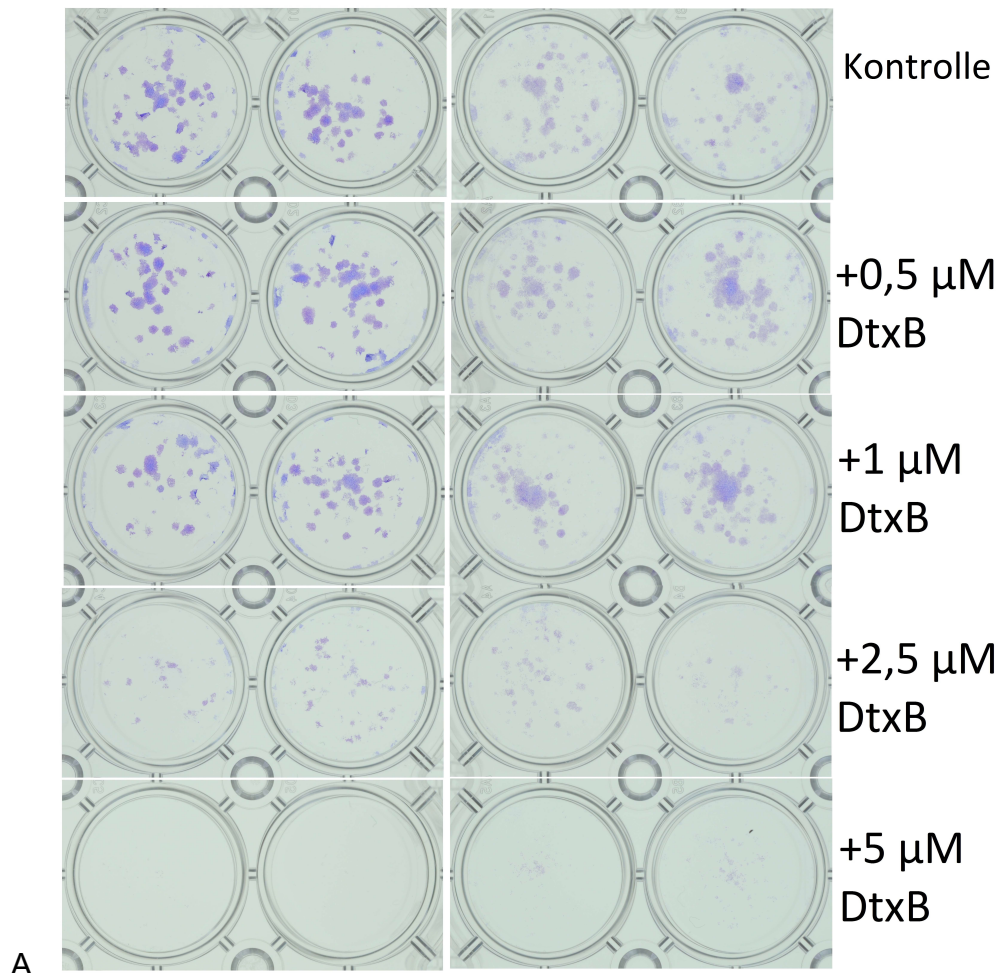
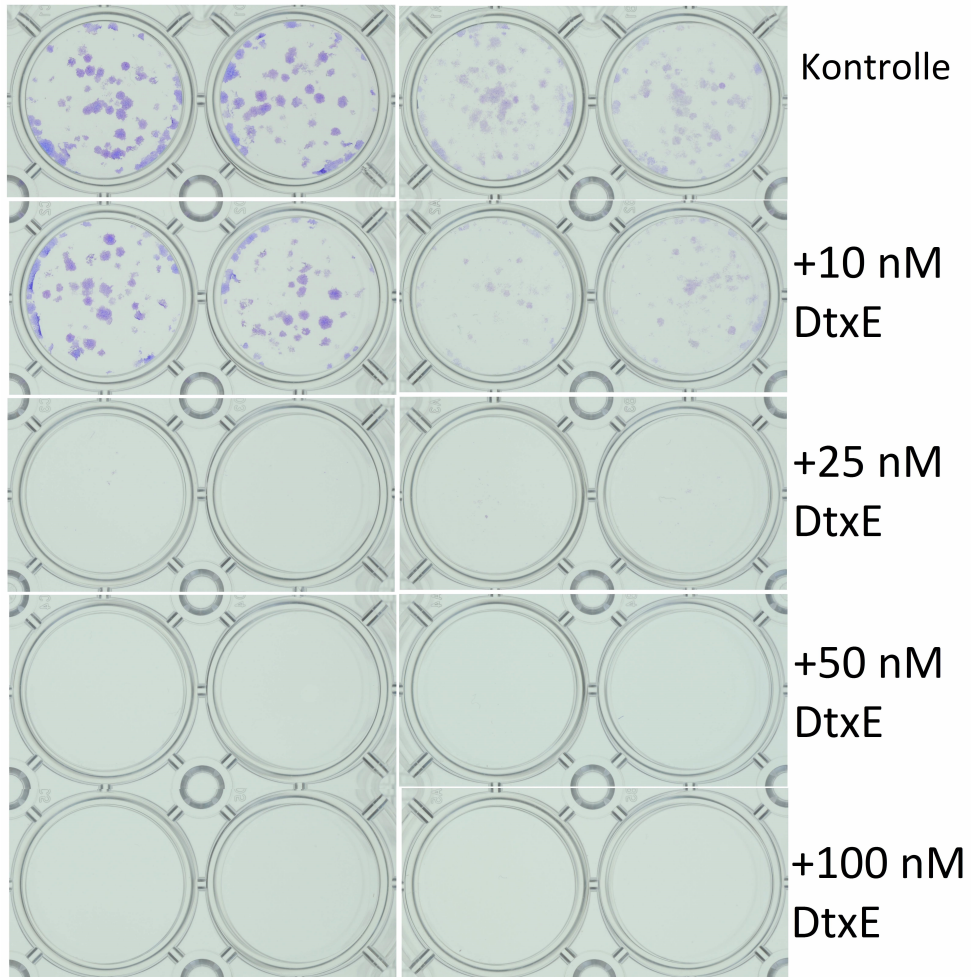


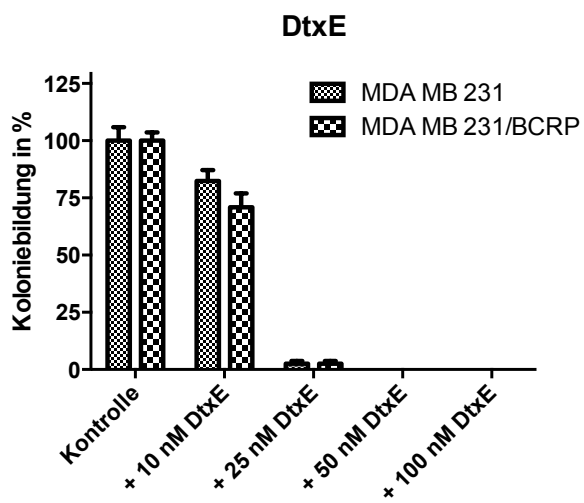
Abbildung 18: Einfluss von DtxB auf das Koloniebildungsvermögen von MDA-MB-231 und dessen ABCG2 überexprimierende Subzelllinie; A.: Fotografien, B.: Balkendiagramm

MDA-MB-231

MDA-MB-231/BCRP



A.



B.

Abbildung 19: Einfluss von DtxE auf das Koloniebildungsvermögen von MDA-MB-231 und dessen ABCG2 überexprimierende Subzelllinie; A.: Fotografien, B.: Balkendiagramm

4.1.3 Modulator-Versuche

Um zu untersuchen, ob Destruxine Substrate von ABC-Transportern darstellen, wurden sogenannte Modulator-Versuche durchgeführt. Dazu wurde die Kombination der Destruxinderivate mit teils spezifischen als auch unspezifischen ABC-Transporter-Inhibitoren in MTT-Tests untersucht. Diese sind in Tabelle 7 inklusive deren Zieltransporter angeführt. Die verwendeten Zelllinien sowie die erhaltenen IC₅₀-Werte werden in Tabelle 8 veranschaulicht.

Tabelle 7: im Rahmen der Modulator-Versuche verwendete ABC-Transporter-Inhibitoren

Modulator	Konzentration	inhibierter ABC-Transporter
Ciclosporin A (CSA)	1 µM	unspezifisch [74], aber besonders ABCB1 [75]
Verapamil	10 µM	ABCB1 [74, 76]
Probenecid	1 µM	ABCC1 [74]
Glibenclamid	50 bzw 100 µM	unspezifisch [77]
Imatinib	5 µM	ABCG2 [78], ABCB1 [79]
Gefitinib	5 µM	ABCG2 [80]

Während der ABCB1 Inhibitor Ciclosporin A keinen signifikanten Einfluss auf die zytotoxische Wirkung aller drei Dtx-Derivate in KB-3-1-Zellen zeigte, konnte in der ABCB1-Transporter-überexprimierenden Zelllinie KB-C-1 eine starke sensitivierende Wirkung beobachtet werden (Abbildung 20). Die IC₅₀-Werte lagen bei Kombination der Destruxine mit CSA bei 4,485 µM für DtxA, 2,576 µM für DtxB und 61,245 nM für DtxE (Tabelle 8) und damit in etwa im Bereich der Zytotoxizität, welche auf parentale Zellen ohne Inhibitorzusatz beobachtet wurden.

Eine ähnlich deutlich sensitivierende Wirkung von Ciclosporin A auf die Zytotoxizität der Cyclohexadepsipeptidsubstanzen wurde ebenso in der ABCB1 überexprimierenden Zelllinie SW1573/2R160 (DtxA: 3,64 µM, DtxB: 2,77 µM, DtxE: 199 nM) als auch in der ABCC1- und MVP überexprimierenden Zelllinie

SW1573/2R120 (DtxA: 7,4 μ M, DtxB: 4,59 μ M, DtxE: 147,9 nM) nachgewiesen (Tabelle 8). Im Gegensatz dazu wirkte der ABCC1-Modulator Probenecid in der gewählten Konzentration von 1 μ M auf die bereits genannten SW1573 Zelllinien nur schwach modulierend. Bei den SW1573-Zellen vom Wildtyp zeigten hingegen beide Inhibitoren (Ciclosporin A und Probenecid) keinen Effekt auf die Toxizität von Destruxinen.

Die MTT-Tests der Zellen MCF7 und deren den ABCB1-Transporter überexprimierende Subzelllinie MCF7-Adr lieferten etwas konträre Ergebnisse (Abbildung 21). Interessanterweise bewirkte Ciclosporin A bei den parental MCF7-Zellen eine deutlich gesteigerte zytotoxische Wirksamkeit der drei Destruxine, während dieser Inhibitor auf die Überlebensfähigkeit der Resistenzzelllinie MCF7-Adr keine Auswirkung hatte. Der ABCB1-Inhibitor Verapamil führte bei den parental Zellen ebenfalls zu einer Wirkungsverstärkung von Destruxinen. Hier war dieser Effekt jedoch nur bei DtxB und DtxE und in einem schwächeren Ausmaß zu beobachten. Bei Zusatz von Verapamil zur Resistenzzelllinie MCF7-Adr konnte die durch ABCB1-vermittelte Resistenz gegenüber DtxA und DtxB stark vermindert bzw aufgehoben werden, während die Kombination von Verapamil mit DtxE absolut keine Wirkung ergab. Dieses Ergebnis wurde durch eine Wiederholung des Versuchs bestätigt.

Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse der Modulator-Versuche mit den nicht adhären Zellen HL-60 und deren ABCB1 überexprimierenden Subzelllinie HL-60-Vinc. Während die beiden Modulatoren Ciclosporin A und Verapamil bei den parental Zellen wie erwartet keine Auswirkungen zeigten, konnten sie bei den Resistenzzelllinien den protektiven Effekt mindern.

Die ABCG2-Inhibitoren Imatinib und Gefitinib hatten kaum einen Einfluss auf die Zytotoxizität von DtxA, DtxB und DtxE gegenüber MDA-MB-231-Zellen und dessen ABCG2 überexprimierende Subzelllinie MDA-MB-231/BCRP.

Abbildung 22 stellt die erhaltenen Dosis-Wirkungs-Kurven bezogen auf A549-Zellen bei Kombination der Cyclohexadepsipeptide mit dem unspezifischen ABC-Transporter-Inhibitor Glibenclamid (in zwei Konzentrationen) dar. Die durch ABCG2, ABCC1 und ABCC2 vermittelte Resistenz konnte durch den Inhibitor gemeinsam mit DtxA und DtxB nur eher schwach gesenkt werden, während sie bei der Kombination

von 100 μM Glibenclamid mit DtxE statistisch signifikant verringert wurde (IC_{50} : 116,694 nM).

Tabelle 8: Einfluss von ABC-Transporter-Inhibitoren auf die Überlebensfähigkeit von Resistenzzelllinien (inkl. IC_{50} , SEM in μM)

Resistenzzelllinie	Inhibitor	DtxA $\text{IC}_{50}(\mu\text{M}) \pm \text{SEM}$	DtxB $\text{IC}_{50}(\mu\text{M}) \pm \text{SEM}$	DtxE $\text{IC}_{50}(\text{nM}) \pm \text{SEM}$
KB-C-1	-	>10	>10	>250
	CSA	4,485 $\pm$ 0,126	2,576 $\pm$ 0,106	61,245 $\pm$ 0,103
HL-60-Vinc	-	>10	>10	>250
	CSA	>10	9,529 $\pm$ 0,058	>250
	Verapamil	>10	>10	>250
MCF7-Adr	-	>10	>10	>250
	CSA	>10	9,858 $\pm$ 0,012	>250
	Verapamil	>10	>10	>250
SW1573/2R120	-	>10	>10	>250
	CSA	7,400 $\pm$ 0,073	4,587 $\pm$ 0,097	147,917 $\pm$ 0,091
	Probenecid	>10	6,766 $\pm$ 0,089	>250
SW1573/2R160	-	>10	>10	>250
	CSA	3,640 $\pm$ 0,141	2,771 $\pm$ 0,124	199,044 $\pm$ 0,092
	Probenecid	>10	8,930 $\pm$ 0,071	>250
MDA-MB-231/BCRP	-	>10	>10	>250
	Imatinib	>10	>10	>250
	Gefitinib	>10	>10	>250
A549	-	>10	>10	>250
	Glibenclamid 50 μM	>10	>10	116,793 $\pm$ 0,084
	Glibenclamid 100 μM	>10	>10	116,694 $\pm$ 0,089

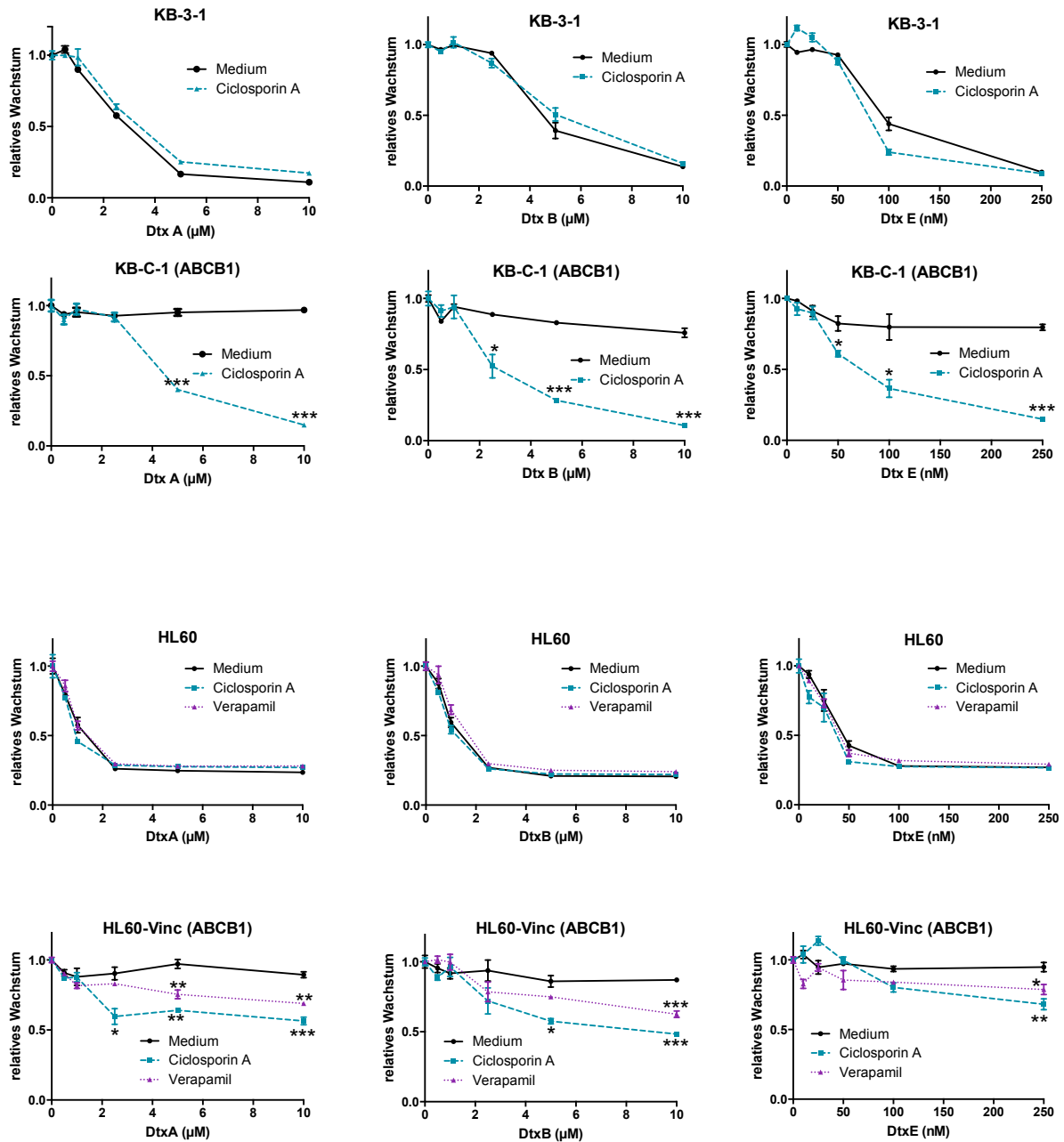


Abbildung 20: Dosis-Wirkungskurven: Einfluss von ABCB1-Inhibitoren auf die Zytotoxizität von Doxorubicin auf die Cervixkarzinomzellen KB-3-1 bzw die Leukämiezellen HL-60 und deren ABCB1 überexprimierenden Subzelllinien; statistisch signifikante Unterschiede beim Vergleich der Zellviabilität ohne (=Medium) bzw mit Inhibitorzusatz sind markiert mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$)

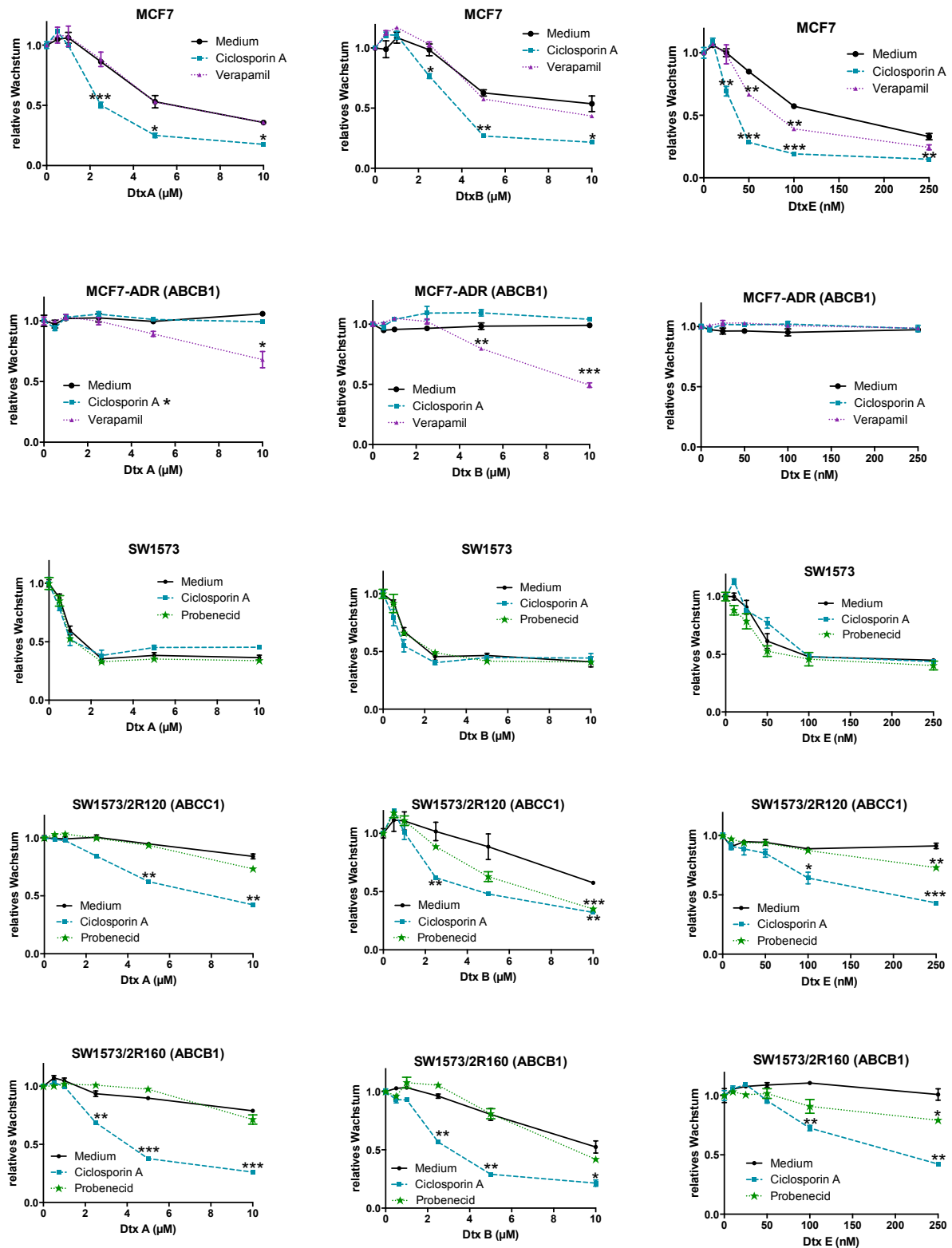


Abbildung 21: Dosis-Wirkungskurven: Einfluss von ABC-Transporter-Inhibitoren auf die Zytotoxizität von Destruxinen auf die Brustkrebszellen MCF-7 bzw die Lungenkarzinomzellen SW1573 und deren ABCB1 bzw ABCC1 überexprimierenden Subzelllinien; statistisch signifikante Unterschiede beim Vergleich der Zellviabilität ohne (=Medium) bzw mit Inhibitorzusatz sind markiert mit * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$), * ($p<0,001$)**

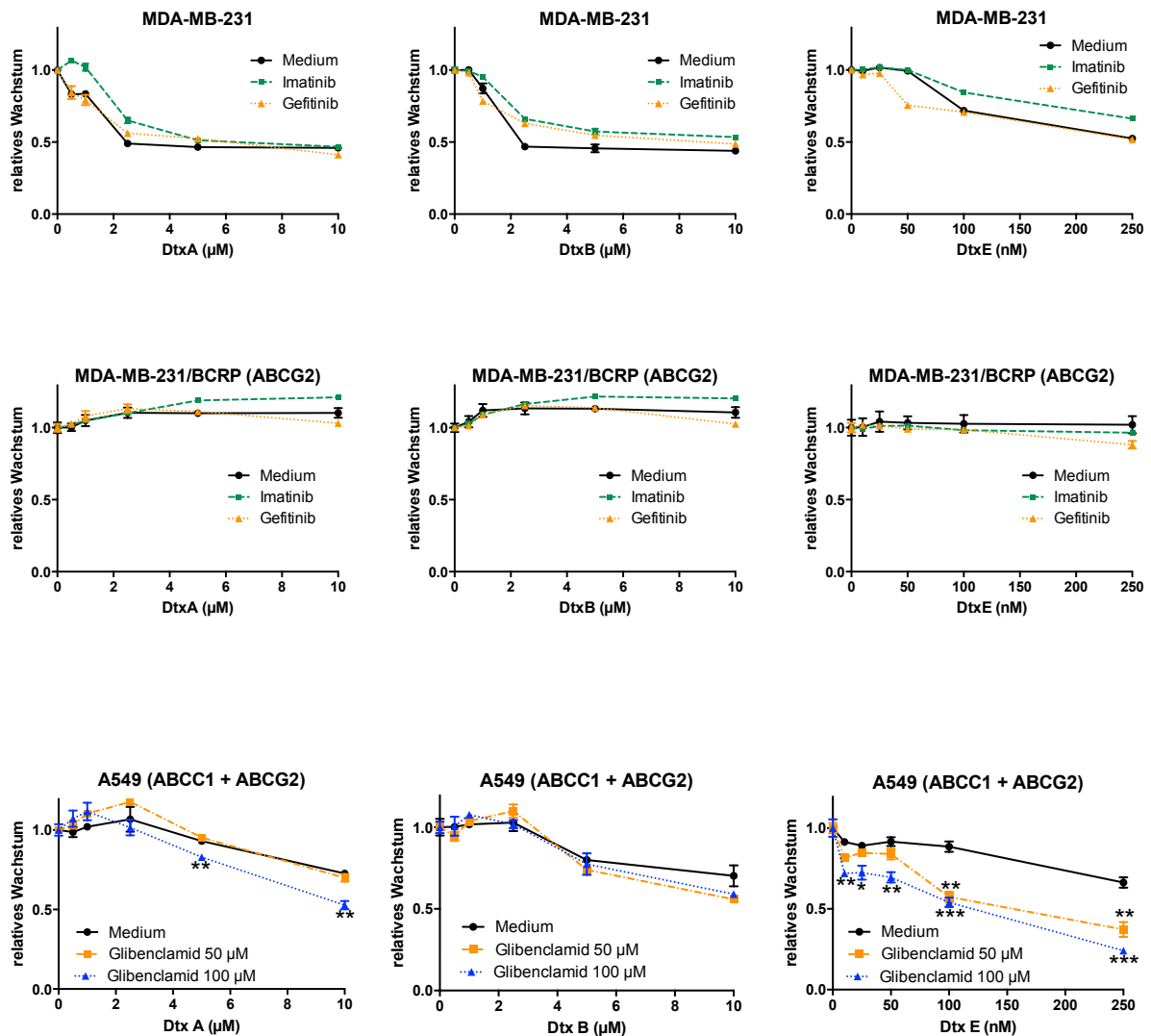


Abbildung 22: Dosis-Wirkungskurven: Einfluss von ABC-Transporter-Inhibitoren auf die Zytotoxizität von Destruxinen auf die Brustkrebszellen MDA-MB-231 bzw auf die Zellen des nicht kleinzelligen Lungenkarzinoms A549 und deren ABCG2 bzw ABCC1 überexprimierenden Subzelllinien; statistisch signifikante Unterschiede beim Vergleich der Zellviabilität ohne (=Medium) bzw mit Inhibitorzusatz sind markiert mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$)

4.2 Efflux Assays

4.2.1 Rhodamin 123 Assay

Wie bereits in einem vorangegangenen Kapitel erwähnt, kann man mittels Efflux-Assays den Ausstrom von Substanzen aus Zellen bestimmen. Rhodamin 123 stellt ein Substrat von ABCB1 dar und wird daher von diesem Transportprotein aus Zellen gepumpt. Das Ziel dieses Rhodamin 123 Assays war, einen möglichen Einfluss der Destruxine, welche ebenfalls Substratcharakter für ABC-Transporter besitzen, auf den durch ABCB1 vermittelten Transport des Fluorophors Rhodamin 123 zu ermitteln.

Abbildung 23 stellt die Ergebnisse des Rhodamin-Efflux-Assays unter Verwendung der Zelllinie HL-60 bzw HL-60-Vinc dar. Wie zu erwarten führte ein Hinzufügen von verschiedenen Destruxin-Konzentrationen bzw des ABCB1-Inhibitors Verapamil zu den parentalen HL-60-Zellen zu keiner Änderung des intrazellulären Rh123-Gehalts. Im Gegensatz dazu zeigte die Zugabe der Positivkontrolle Verapamil zu den ABCB1 überexprimierenden HL-60-Vinc-Zellen eine statistisch signifikante starke Erhöhung an intrazellulärem Rh123. Durch Blockade des genannten ABC-Transporters konnte also weit weniger Rh123 aus den Zellen transportiert werden, wodurch im Durchflusszytometer bei Verapamil wesentlich stärkere Signale des Farbstoffes Rh123 erhalten wurden. DtxA, DtxB und DtxE führten zu keiner Veränderung des intrazellulären Rh123 Gehaltes. Dies deutet darauf hin, dass die drei getesteten Destruxine, im Gegensatz zum kompetitiven Inhibitor Verapamil, gegenüber ABCB1 keine blockierende Funktion besitzen.

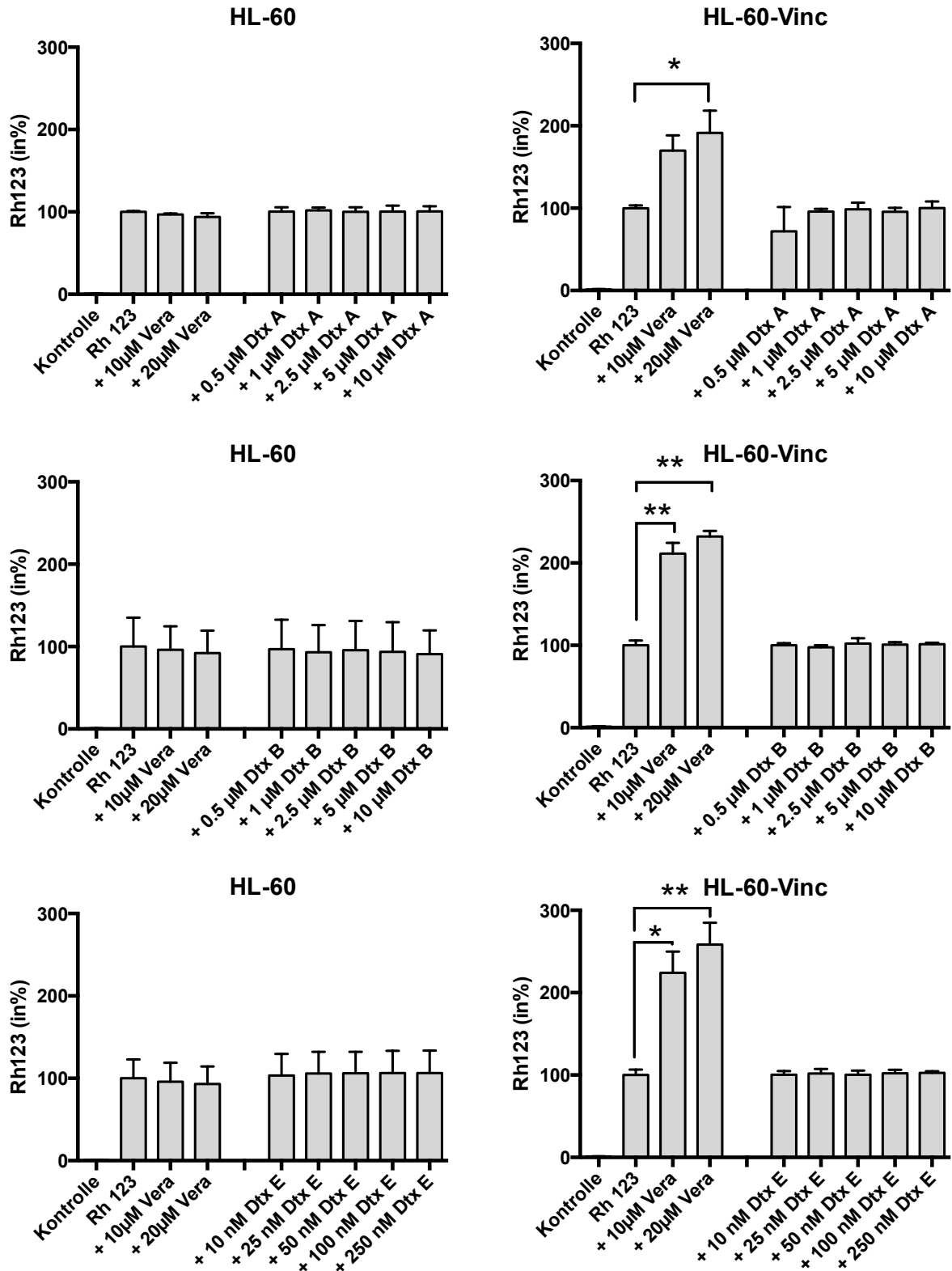


Abbildung 23: Rhodamin 123 Efflux Assay: Einfluss von Destruxinen bzw des ABC-Transporter-Inhibitors Verapamil (=Vera; Positivkontrolle) auf den durch ABCB1 vermittelten Ausstrom von Rhodamin 123 – Ermittlung des intrazellulären Gehalts mittels Durchflusszytometrie; verwendet wurde die Leukämiezelllinie HL-60 und dessen ABCB1 überexprimierende Subzelllinie HL-60-Vinc; nur die Positivkontrolle führte zu statistisch signifikanten Unterschieden (markiert mit * (p<0,05) bzw ** (p<0,01))

4.2.2 Pheophorbid A Assay

In Anlehnung an den Rh123 Assay wurde zur Erforschung eines möglichen Einflusses von Destruxinen auf die Transportfähigkeit von ABCG2 ebenfalls ein Efflux-Assay durchgeführt. Hierfür wurde das Fluorophor Pheophorbid A verwendet, welches ein Substrat von ABCG2 darstellt. Abbildung 24 zeigt die Auswirkungen unterschiedlicher Destruxin-Konzentrationen bzw des ABCG2-Inhibitors Imatinib [78] auf den Gehalt an PheoA in A549-Zellen, welche ABCC1, ABCC2 und ABCG2 überexprimieren. Während eine Blockade von ABCG2 durch Imatinib eine leichte Erhöhung der intrazellulären PheoA-Konzentration zur Folge hatte, bewirkten die Destruxine keine signifikanten Veränderungen des PheoA-Gehalts. DtxA, DtxB und DtxE stellen also *in vitro* laut diesem Ergebnis keine Inhibitoren von ABCG2 dar.

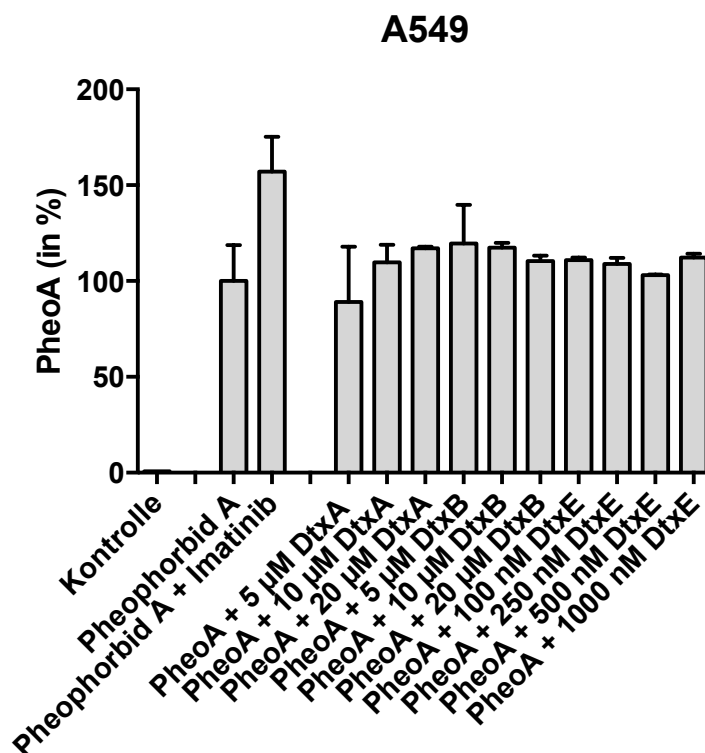


Abbildung 24: Pheophorbid A Efflux Assay: Einfluss von Destruxinen bzw des ABC-Transporter-Inhibitors Imatinib (=Positivkontrolle) auf den durch ABCG2 vermittelten Ausstrom von Pheophorbid A (=PheoA) – Ermittlung des intrazellulären Gehalts mittels Durchflusszytometrie; verwendet wurde die Lungenkarzinomzelllinie A549, welche ABCG2 (und ABCC1 + ABCC2) überexprimiert

5 Diskussion

Destruxine sind Cyclohexadepsipeptide, die zur Bekämpfung von Insekten eingesetzt werden. In den letzten Jahren erschienen auch einige Publikationen, die eine mögliche antikanzerogene Wirkung diskutieren. Eine antikanzerogene Wirkung von DtxA, B und E konnte auch in dieser Arbeit in verschiedenen Krebszellmodellen (KB-3-1, HL-60, MCF-7, SW1573, MDA-MB-231, A549) nachgewiesen werden. Vergleicht man die Toxizität der Destruxine anhand ihrer IC₅₀-Werte im MTT-Test, zeigen sich die einzelnen Zelllinien jedoch unterschiedlich empfindsam auf die Testsubstanzen (DtxA bzw DtxB: HL60>SW1573>MDA-MB-231>KB-3-1>MCF-7>A549; DtxE: HL-60>SW1573>KB-3-1>MCF-7>MDA-MB-231>A549). Die geringere Wirkung der Dtx bei den MCF-7 Zellen könnte daran liegen, dass diese Zelllinie keine Caspase 3 besitzt [81]. Caspase-3 ist eine sogenannte Effektorcaspase, die zum apoptotischen Tod der Zelle führt [57]. Da Dtx primär über Initiation von Apoptose zytotoxisch wirken [58], dürfte in den MCF-7 Zellen ein anderer Wirkmechanismus der Dtx zum Zelltod führen, der erst bei höheren Konzentrationen zum Tragen kommt. Dass die Lungenzelllinie A549 besonders resistent gegen Dtx zu sein scheint, wurde bereits in einer Arbeit von Dornetshuber et al. [42] gezeigt. Die Autoren gingen in ihrer Arbeit davon aus, dass diese vergleichsweise geringere Sensitivität dieser Zelllinie damit zusammenhängen könnte, dass sie die ABC-Transportproteine ABCC1, ABCC2 und ABCG2 in einem verstärkten Ausmaß exprimiert. Diese Transporter könnten möglicherweise für einen aktiven Transport der Dtx aus den Zellen hinaus verantwortlich sein.

Tatsächlich konnte in dieser Arbeit nun gezeigt werden, dass die getesteten Destruxine ein Substrat für ABC-Transporter darstellen. Dies verdeutlichen die durchgeführten MTT-Assays mit ABC-Transporter-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den entsprechenden parental Zellen, die keine ABC-Transporter besitzen. So zeigten die Testsubstanzen in allen parental Zellen eine mehr oder weniger stark ausgeprägte zytotoxische Wirkung, während die ABC-Transporter-überexprimierenden Zellen nur schwach bis gar nicht auf die Dtx-Exposition in den verwendeten Konzentrationen reagierten. Diese vorhandene Resistenz konnte wiederum durch Zugabe von teils spezifischen als auch unspezifischen Modulatoren, welche die ABC-Transporter in ihrer Wirkung einschränken, zum Teil stark reduziert werden. Der Zusatz des unspezifischen Inhibitors Ciclosporin A führte vor allem bei

den resistenten Krebszelllinien KB-C-1 (überexprimiert ABCB1) und SW1573/2R120 (ABCC1) bzw SW1573/2R160 (ABCB1) zu einer scheinbar vollständigen Aufhebung der Resistenz. Die Zytotoxizität lag nämlich bei diesen Zellen nach Zugabe des Inhibitors auf in etwa demselben Niveau wie bei den parentalen Zellen, vor allem bezogen auf die jeweils höchsten Destruxin-Konzentrationen. Die inhibitorische Wirkung von Probenecid (ABCC1) war bei den beiden resistenten Zelllinien von SW1573 etwas weniger stark bis nur schwach ausgeprägt. Auch bei den HL-60/Vinc (ABCB1) konnte die Resistenz in einem sehr starken Ausmaß durch Ciclosporin A gesenkt werden. Verapamil hatte einen etwas schwächeren Effekt auf diese Zellen. Interessanterweise hatte Ciclosporin A auf die ABCB1 überexprimierende Zelllinie MCF7-Adr keinerlei Auswirkungen, obwohl PgP durch diese Substanz bei den anderen getesteten Zelllinien sehr effektiv gehemmt wurde. Vermutlich hat Ciclosporin A in den MCF7-Adr-Zellen zu einem anderen Target eine höhere Affinität als zu den ABC-Transportern und kann somit sein inhibitorisches Potential auf ABCB1 nicht entfalten. Verapamil hingegen senkte die Resistenz gegenüber DtxB relativ stark, gegenüber DtxA nur geringfügig weniger stark und gegenüber DtxE hatte Verapamil keine Resistenzsenkung zur Folge. Bei den ABCC1, ABCC2 und ABCG2 überexprimierenden A549-Zellen bewirkte der unspezifische Inhibitor Glibenclamid in Kombination mit DtxA und DtxB bei A549-Zellen nur eine sehr schwache Erhöhung der Zytotoxizität. Zusammen mit DtxE war die Wirkung etwas stärker.

Einen ähnlichen Hinweis auf den Substratcharakter der Dtx zeigten auch die Kolonieformierungs-Zellassays. Hierfür wurden sowohl die parentale Zelllinie SW1573, als auch dessen ABC-Transporter überexprimierenden Resistenzzelllinien SW1573/2R120 (ABCC1) und SW1573/2R160 (ABCB1) verwendet. Während bei den parentalen Zellen die Anzahl an vorhandenen Kolonien mit steigenden Destruxin-Konzentrationen stark abnahm bzw keine mehr vorhanden waren, war bei den Subzelllinien ein stark protektiver Effekt zu erkennen. Die Anzahl der Kolonien sank bei den Resistenzzellen nur leicht. ABCC1 und ABCB1 führen also möglicherweise zu einem Transport von DtxA, DtxB und DtxE aus den Zellen hinaus in das umliegende Medium. Somit können diese Zellgifte die Vermehrung der Krebszellen nur in einem schwächeren Ausmaß beeinträchtigen. Derselbe Versuch wurde mit der Zelllinie MDA-MB-231 und dessen ABCG2 überexprimierender Zelllinie MDA-MB-231/BCRP durchgeführt. Hier wurde jedoch kein signifikanter

Unterschied im Ausbildungsvermögen von Zellkolonien registriert. Dieses Ergebnis ließe vermuten, dass Destruxine keinen Substratcharakter für ABCG2 besitzen. Die Resultate des MTT-Tests der MDA-MB-231/BCRP Zellen mit kürzerer Dtx-Exposition (72 Stunden) deuten aber auf das Gegenteil hin. Möglicherweise spielte hier die Versuchsdauer eine Rolle. Die Auswertung der Kolonieformierungstests bestätigt die Annahme, dass Destruxine Substrate von ABCB1 und ABCC1 darstellen. Für ABCG2 gilt dies womöglich in einem geringeren Ausmaß, da dies nur bei den MTT-Tests mit kürzerer Expositionszeit beobachtet werden konnte.

Um des weiteren festzustellen, ob die drei behandelten Destruxine nicht nur Substratcharakter von ABC-Transportern besitzen, sondern ähnlich wie Verapamil ebenfalls kompetitive Inhibitoren dieser Transportproteine darstellen, wurden im Rahmen dieser Diplomarbeit Effluxversuche mit Rh 123 und Pheo A durchgeführt. Kompetitive Inhibitoren besitzen hohe Affinität zu den Transportproteinen und wirken dadurch, dass sie mit anderen Substraten um Bindungsstellen konkurrieren, wodurch weniger andere Substanzen transportiert werden können [82]. Sowohl der durch ABCB1 vermittelte Transport von Rh123, als auch der Transport von PheoA durch ABCG2 konnte durch Zusatz von Destruxinen nicht beeinträchtigt werden. Die Cyclohexadepsipeptide bewirkten im Gegensatz zu bekannten Inhibitoren keine intrazelluläre Erhöhung der beiden Fluorophore. Die durchgeführten Versuche ließen also kein inhibitorisches Potential von DtxA, DtxB und DtxE erkennen.

In einer Arbeit von Dornetshuber et al. wurden die Cyclodepsipeptide Enniatin und Beauvericin ebenfalls auf mögliche Interaktionen mit ABC-Transportern untersucht. Bei Kurzzeitexpositionstests zeigten die untersuchten ABC-Transporter überexprimierenden Krebszelllinien nur eine sehr schwache Resistenz gegenüber diese Toxine im Vergleich zu den parental Krebszellen. Eine verstärkte Expression von ABC-Transportern wirkte sich hier also viel weniger aus als bei den in dieser Diplomarbeit getesteten Destruxinen. Bei Langzeitexposition konnte aber sehr wohl ein signifikant protektiver Effekt gegenüber Enniatin und Beauvericin festgestellt werden [61].

Laut der in dieser Arbeit erhaltenen Daten besitzen Dtx zwar ein ausgeprägtes antikanzerogenes Potential *in vitro*, ein Einsatz für die Chemotherapie könnte aber aufgrund einer möglichen Resistenzentwicklung beschränkt sein. Daher wäre eventuell eine Kombination mit bereits bekannten ABC-Transporter-Inhibitoren

denkbar. Der durch ABC-Proteine vermittelte Transport von Zytostatika und anderen Wirkstoffen kann durch verschiedene Substanzen gehemmt werden. Bei vielen Inhibitoren wie dem Ca-Antagonisten Verapamil oder dem Immunsuppressivum Ciclosporin A stellte sich heraus, dass diese selbst auch Substratcharakter besitzen, was auf einen kompetitiven Inhibitionsmechanismus hindeutet [4]. Während bei präklinischen Evaluierungen durch Zusatz von Inhibitoren eine Erhöhung der intrazellulären Konzentrationen von Zytostatika, welche Substrate darstellen, festgestellt werden konnte, schlug die effektive Anwendung solcher ABC-Blocker in der klinischen Praxis jedoch fehl. Bei Verapamil beispielsweise führte die für eine Hemmung von ABCB1 benötigte Konzentration in einer Phase 1 Studie zu einer Kardiotoxizität. Vermutlich aufgrund dessen Eigenschaft als Ca-Antagonist. Andere Inhibitoren zeigten in klinischen Studien entweder zu wenig Wirksamkeit, hatten schwerwiegende Nebenwirkungen oder interagierten mit Cytochrom P450 Enzymen, was wiederum die Pharmakokinetik von anderen Arzneistoffen negativ beeinflussen kann [12]. Man Yu et al. sahen diverse mögliche Gründe für den bislang fehlenden klinischen Erfolg:

- pharmakokinetische Interaktionen zwischen ABC-Transporter-Inhibitoren und Zytostatika
- Toxizität aufgrund der Hemmung von ABC-Transportern in gesundem Gewebe wie beispielsweise der Blut-Hirn-Schranke
- Wirkung der Inhibitoren auf verschiedenartige ABC-Transporter und den damit verbundenen Nebenwirkungen
- unzureichende präklinische Evaluierung
- genetische Polymorphismen von ABC-Transporter-Genen
- teils limitierte Penetration der Zytostatika bis zum festen Tumorgewebe gerade wegen der Hemmung der Transporter [12]

Um das Prinzip der Umgehung von Arzneimittelresistenzen aufgrund von ABC-Transportern für die Klinik anwendbar zu machen, bedarf es also noch intensiver Forschung bezüglich der Entwicklung neuer Behandlungsansätze und/oder neuer hochspezifischer und nebenwirkungsarmer Inhibitoren.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass Krebszellen durch Überexpression von ABC-Transportern auch gegenüber Destruxine Resistenzen bilden können. Anhand dieser Diplomarbeit konnte aber bewiesen werden, dass sich diese Resistenzen durch Kombination der Cyclohexadepsipeptide mit ABC-Transporter-Inhibitoren *in vitro* teilweise bis gänzlich aufheben lassen. Für die Zukunft bietet sich die Durchführung von *in vivo* Versuchen mit Destruxinen am Tiermodell an, um das Potential dieser Substanzen zur Behandlung von Krebs weiter zu erforschen. Eine weitere Möglichkeit wäre die Entwicklung von strukturähnlichen Destruxin-Derivaten, welche keine Substrate von ABC-Transportern darstellen und somit diesen Resistenzmechanismus umgehen.

6 Zusammenfassung

Für Cyclodepsipeptide wurden *in vitro* und *in vivo* vielfältige biologische Wirkungen beobachtet und beschrieben. In dieser Arbeit wird besonders auf das zytotoxische Potential der Cyclohexadepsipeptide Destruxin A (=DtxA), Destruxin B (=DtxB) und Destruxin E (=DtxE), welche aus dem entomopathogenen Pilz *Metarhizium anisopliae* isoliert wurden, eingegangen. Zytotoxische Substanzen werden zur Therapie von Krebserkrankungen eingesetzt. Leider stellt die Entwicklung von Resistenzen gegenüber Zytostatika ein Problem bei der Behandlung von an Krebs erkrankten Menschen dar. Krebszellen können sich vor Zellgiften unter anderem auch dadurch schützen, indem sie sogenannte ABC-Transportproteine in verstärktem Ausmaß exprimieren. Diese in Zellmembranen lokalisierten Proteine sind in der Lage Zellen vor toxischen Substanzen zu schützen, indem sie diese Verbindungen aus dem Zytoplasma hinaus in das umliegende Medium bzw Gewebe pumpen. Die 49 bisher identifizierten unterschiedlichen ABC-Transporter besitzen verschiedenste physiologische Funktionen. Für eine Entwicklung von Arzneistoffresistenzen werden vor allem drei Proteine, nämlich ABCB1, ABCC1 und ABCG2, verantwortlich gemacht.

Neben der Untersuchung der biologischen Aktivität von Destruxinen auf Krebszellen *in vitro*, war ein weiteres Ziel dieser Diplomarbeit den Einfluss einer Überexpression der drei erwähnten ABC-Transporter auf die Zytotoxizität der Cyclohexadepsipeptide zu testen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Zellkulturexperimente mit unterschiedlichen parental Krebszelllinien und deren ABC-Transporter überexprimierenden Subzelllinien durchgeführt. Die Aktivität der Destruxine wurde mittels Zellviabilitätstests (MTT-Tests) und Kolonieformierungstests bestimmt. Auf parentale Krebszellen zeigten die Destruxine eine stark ausgeprägte zytotoxische Wirkung. Vor allem DtxE hatte eine sehr potente Wirkung, da es die Zellen schon in nanomolaren Konzentrationen abtöten konnte. DtxA und DtxB waren im mikromolaren Bereich wirksam auf parentale Krebszelllinien. Die ABC-Transporter überexprimierenden Zellen wiesen jedoch eine weitgehende Resistenz gegenüber alle drei Cyclohexadepsipeptide auf.

Die erhaltenen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die untersuchten Destruxine Substrate von ABC-Transportern darstellen. Diese These wurde mit Hilfe

der Durchführung von Modulator-Versuchen bestätigt: durch Zusatz von ABC-Transporter-Inhibitoren konnten die Resistenzen der Subzelllinien teils bis gänzlich aufgehoben werden. Dies beweist nicht nur den Substratcharakter, sondern eröffnet auch neue Möglichkeiten um Resistenzen gegenüber Destruxinen durch Verabreichung einer Kombination dieser mit ABC-Transporter-Inhibitoren zu umgehen. Dafür bräuchte man jedoch einen Inhibitor, der möglichst spezifisch die ABC-Transporter im Tumorgewebe hemmt.

Da viele ABC-Transporter-Inhibitoren selbst auch Substrate darstellen und die Transportproteine somit kompetitiv hemmen, wurde mit Hilfe von Efflux-Versuchen eine mögliche inhibitorische Wirkung von Destruxinen auf den Ausstrom von Fluorophoren aus Krebszellen getestet. Wie erwartet hatten die verwendeten Destruxine jedoch keinen Einfluss auf den Efflux der Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 123 und Pheophorbid A.

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Diplomarbeit für die Destruxine A, B und E ein starkes zytotoxisches Potential auf mehrere Krebszelllinien *in vitro* nachgewiesen. Überexpression von ABC-Transportproteinen führte jedoch zu einer weitgehenden Resistenz gegenüber den drei Cyclohexadepsipeptiden. Die Destruxine besitzen somit einen Substratcharakter für diese Transporter. Eine Hemmung der ABC-Transporter mittels Inhibitoren wie Ciclosporin A führte aber zu einer teilweise bis gänzlichen Aufhebung der zuvor beobachteten Resistenz.

7 Abstract

Several biological effects have been characterized for cyclodepsipeptides *in vitro* and *in vivo*. In this thesis the focus was lying in the investigation of the cytotoxic properties of the destruxins Destruxin A (=DtxA), Destruxin B (=DtxB) and Destruxin E (=DtxE), which were isolated from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Cytotoxic substances are used for treatment of cancer disease. Unfortunately the development of resistances are impairing therapy results of patients suffering from cancer. Cancer cells can protect themselves from toxins by overexpressing so-called ABC transporter proteins. These proteins are localized in cell membranes and they are able to transport xenobiotics out of cells. Until now 49 different ABC transporter proteins have been characterized, which exert different physiological roles. The three ABC transporter proteins ABCB1, ABCC1 and ABCG2 are considered to play the main role for development of drug resistances.

Besides the investigation of the cytotoxic activity of destruxins on cancer cells, another main goal of this diploma thesis was to determine the impact of overexpressed ABC transporter proteins on the cytotoxicity of the three cyclohexadepsipeptides. Several cell culture tests have been performed with parental cancer cell lines and their ABC transporter overexpressing sub cell lines. The cytotoxicity of destruxins has been tested by a cell viability assay (MTT assay) and a colony forming assay. The destruxins showed a strong activity on the parental cell lines, especially DtxE which already had a cytotoxic effect in nanomolar range, whereas for DtxA and DtxB an activity at micromolar concentrations was observed. The ABC transporter overexpressing sub cell lines however showed a pronounced resistance against all three destruxins.

These results suggest that destruxins may be substrates of ABC transporter proteins. This assumption has been confirmed by modulator assays: adding ABC transporter inhibitors to MTT assays led to, depending on tested cell lines, partial or full removal of the resistances of the sub cell lines. These findings also suggest to combine destruxins with ABC transporter inhibitors for cancer treatment, however more research has to be done to find a proper specific inhibitor.

Because of the fact that many ABC transporter inhibitors act as a competitive inhibitor, efflux assays have been performed to investigate if destruxins also inhibit

these transporters. As expected the destruxins did not influence the efflux of the fluorophores Pheophorbide A and Rhodamine 123.

Summarizing, the three destruxins (DtxA, DtxB and DtxE) have a strong cytotoxic potential against several different cancer cell lines. Overexpression of ABC transporter proteins leads to a pronounced resistance against these cyclohexadepsipeptides. This suggests that destruxins are substrates of ABC transporter proteins. Blocking those transporters led to, depending on tested cell lines, partial or full removal of the resistances recognized before.

8 Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	ATP-bindende Cassetten-Transporter
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	Breast cancer resistance protein
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CHO-Zellen	Ovarzellen des chinesischen Hamsters
CSA	Ciclosporin A
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium, standardisiertes Nährmedium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Komplexbildner
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FKS	fetales Kälberserum
FSC	forward scatter, Vorwärtsstreuung
GSH	Glutathion
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure, Puffersubstanz
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter-Faktor 1 α
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IC ₅₀	inhibitorische Konzentration einer zytotoxischen Substanz, bei der 50% der Zellen abgestorben sind
MDR	Multidrug resistance protein (=PgP)
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure, Puffersubstanz

mRNA	Boten-RNA, Ribonucleotinsäure
MRP	Multidrug resistance related protein
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid, blauvioletter Farbstoff
MVP	major vault protein
NBD	Nucleotid bindende Domäne
PgP	P-Glykoprotein (=MDR1)
PheoA	Pheophorbid A
Rh123	Rhodamin 123
RPMI	standardisiertes Nährmedium, entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (Statistik)
SSC	side scatter, Seitwärtsstreuung
SUR1	Sulfonylharnstoffrezeptor 1
TMD	Transmembrandomäne
V-ATPase	vakuoläre ATPase, Hydrolyseenzyme von ATP
Wnt	„Wingless-and-Int“-Signaltransduktionsweg
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide, Farbstoff
ZNS	zentrales Nervensystem

9 Literatur- und Quellenverzeichnis

- [1] V. Vasiliou, K. Vasiliou, and D. W. Nebert, "Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family.," *Hum. Genomics*, vol. 3, no. 3, pp. 281–90, Apr. 2009.
- [2] M. Dean, Y. Hamon, and G. Chimini, "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily.," *J. Lipid Res.*, vol. 42, no. 7, pp. 1007–17, Jul. 2001.
- [3] "Müller Esterl Companionsite." [Online]. Available: <http://www.springer.com/springer+spektrum/biowissenschaften/biochemie+mueller-esterl?SGWID=0-161202-12-764404-0>. [Accessed: 24-Feb-2014].
- [4] A. H. Schinkel and J. W. Jonker, "Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 55, no. 1, pp. 3–29, Jan. 2003.
- [5] M. E. Zoghbi and G. A. Altenberg, "ATP binding to two sites is necessary for dimerization of nucleotide-binding domains of ABC proteins.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 443, no. 1, pp. 97–102, Jan. 2014.
- [6] J. E. Walker, M. Saraste, M. J. Runswick, and N. J. Gay, "Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold.," *EMBO J.*, vol. 1, no. 8, pp. 945–51, Jan. 1982.
- [7] "RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB - 4AYT Structure Summary." [Online]. Available: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4AYT>. [Accessed: 24-Feb-2014].
- [8] A. H. Schinkels, S. Kemp, M. Dolle, G. Rudenko, and E. Wagenaar, "N-Glycosylation and Deletion Mutants of the Human MDR1," vol. 268, no. 10, pp. 7474–7481, 1993.
- [9] R. L. Juliano and V. Ling, "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 455, no. 1, pp. 152–62, Nov. 1976.
- [10] A. B. Singh, C. A. Bousman, C. H. Ng, K. Byron, and M. Berk, "ABCB1 polymorphism predicts escitalopram dose needed for remission in major depression.," *Transl. Psychiatry*, vol. 2, p. e198, Jan. 2012.
- [11] "UniProt Protein Database; www.uniprot.org." [Online]. Available: <http://www.uniprot.org/>. [Accessed: 28-Feb-2014].
- [12] M. Yu, A. Ocana, and I. F. Tannock, "Reversal of ATP-binding cassette drug transporter activity to modulate chemoresistance: why has it failed to provide clinical benefit?," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 32, no. 1–2, pp. 211–27, Jun. 2013.
- [13] H. Gutmann and J. Drewe, "P-Glykoprotein: Bedeutung für die Arzneimitteltherapie, Pharmazie und Medizin; Journal suisse de pharmacie," 2002.
- [14] P. Zagermann-Muncke, "Pharmazeutische Zeitung online: Wenn Arzneistoffe Transportproteine beeinflussen," no. 50, pp. 1–5, 2006.
- [15] J. R. Cirrito, R. Deane, A. M. Fagan, M. L. Spinner, M. Parsadanian, M. B. Finn, H. Jiang, J. L. Prior, A. Sagare, K. R. Bales, S. M. Paul, B. V. Zlokovic, D. Piwnicka-worms, and D. M. Holtzman, "P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid- β deposition in an Alzheimer disease mouse model," vol. 115, no. 11, pp. 3285–3290, 2005.
- [16] S. P. Cole, G. Bhardwaj, J. H. Gerlach, J. E. Mackie, C. E. Grant, K. C. Almquist, A. J. Stewart, E. U. Kurz, A. M. Duncan, and R. G. Deeley, "Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line.," *Science*, vol. 258, no. 5088, pp. 1650–4, Dec. 1992.
- [17] D. W. Loe, R. G. Deeley, and S. P. Cole, "Characterization of vincristine transport by the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione.," *Cancer Res.*, vol. 58, no. 22, pp. 5130–6, Nov. 1998.
- [18] W. Niewiarowski, E. Gendaszewska, G. Rêbowski, M. Wójcik, B. Miko, W. Goss, M. Soszyński, and G. Bartosz, "Multidrug resistance-associated protein - reduction of expression in human leukaemia cells by antisense phosphorothioate," vol. 47, no. 4, pp. 1183–1188, 2000.
- [19] A. J. Stewart, Y. Canitrot, E. Baracchini, N. M. Dean, R. G. Deeley, and S. P. Cole, "Reduction of expression of the multidrug resistance protein (MRP) in human tumor cells by antisense phosphorothioate oligonucleotides.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 51, no. 4, pp. 461–9, Feb. 1996.
- [20] A. E. Stacy, P. J. Jansson, and D. R. Richardson, "Molecular pharmacology of ABCG2 and its role in chemoresistance.," *Mol. Pharmacol.*, vol. 84, no. 5, pp. 655–69, Nov. 2013.
- [21] K. Natarajan, Y. Xie, M. R. Baer, and D. D. Ross, "Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 83, no. 8, pp. 1084–103, Apr. 2012.

- [22] K. Kage, S. Tsukahara, T. Sugiyama, S. Asada, E. Ishikawa, T. Tsuruo, and Y. Sugimoto, "Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization.," *Int. J. Cancer*, vol. 97, no. 5, pp. 626–30, Feb. 2002.
- [23] J. G. Turner, J. L. Gump, C. Zhang, J. M. Cook, D. Marchion, L. Hazlehurst, P. Munster, M. J. Schell, W. S. Dalton, and D. M. Sullivan, "ABCG2 expression, function, and promoter methylation in human multiple myeloma.," *Blood*, vol. 108, no. 12, pp. 3881–9, Dec. 2006.
- [24] K. Noguchi, K. Katayama, and Y. Sugimoto, "Human ABC transporter ABCG2/BCRP expression in chemoresistance: basic and clinical perspectives for molecular cancer therapeutics.," *Pharmgenomics. Pers. Med.*, vol. 7, pp. 53–64, Jan. 2014.
- [25] A. E. van Herwaarden, E. Wagenaar, G. Merino, J. W. Jonker, H. Rosing, J. H. Beijnen, and A. H. Schinkel, "Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 27, no. 4, pp. 1247–53, Feb. 2007.
- [26] Y. G. Assaraf, "The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis.," *Drug Resist. Updat.*, vol. 9, no. 4–5, pp. 227–46.
- [27] M. Suzuki, H. Suzuki, Y. Sugimoto, and Y. Sugiyama, "ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics.," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 25, pp. 22644–9, Jun. 2003.
- [28] M. I. Veiga, P. E. Ferreira, L. Jörnham, M. Malmberg, A. Kone, B. A. Schmidt, M. Petzold, A. Björkman, F. Nosten, and J. P. Gil, "Novel polymorphisms in Plasmodium falciparum ABC transporter genes are associated with major ACT antimalarial drug resistance.," *PLoS One*, vol. 6, no. 5, p. e20212, Jan. 2011.
- [29] K. R. Robillard, T. Hoque, and R. Bendayan, "Expression of ATP-binding cassette membrane transporters in a HIV-1 transgenic rat model.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Jan. 2014.
- [30] M. a Burke, R. K. Mutharasan, and H. Ardehali, "The sulfonylurea receptor, an atypical ATP-binding cassette protein, and its regulation of the KATP channel.," *Circ. Res.*, vol. 102, no. 2, pp. 164–76, Feb. 2008.
- [31] H. R. Mellor and R. Callaghan, "Resistance to chemotherapy in cancer: a complex and integrated cellular response.," *Pharmacology*, vol. 81, no. 4, pp. 275–300, Jan. 2008.
- [32] M. M. Gottesman, T. Fojo, and S. E. Bates, "Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, no. 1, pp. 48–58, Jan. 2002.
- [33] R. Lemmens-Gruber, "Cyclodepsipeptides-Potential drugs and lead compounds in the drug development process.," *Curr. Med.*, 2009.
- [34] M. Hinaje, M. Ford, L. Banting, S. Arkle, and B. Khambay, "An investigation of the ionophoric characteristics of destruxin A.," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 405, no. 1, pp. 73–77, Sep. 2002.
- [35] M. Isaka, S. Palasarn, S. Lapanun, and K. Sriklung, "Paecilodepsipeptide A, an antimalarial and antitumor Cyclohexadepsipeptide from the insect pathogenic fungus Paecilomyces cinnamomeus BCC 9616.," *J. Nat. Prod.*, vol. 70, no. 4, pp. 675–8, Apr. 2007.
- [36] M. T. Hamann, C. S. Otto, P. J. Scheuer, and D. C. Dunbar, "Kahalalides: Bioactive Peptides from a Marine Mollusk Elysia rufescens and Its Algal Diet Bryopsis sp.(1).," *J. Org. Chem.*, vol. 61, no. 19, pp. 6594–6600, Sep. 1996.
- [37] F. Sarabia, S. Chammaa, A. S. Ruiz, L. M. Ortiz, and F. J. L. Herrera, "Chemistry and biology of cyclic depsipeptides of medicinal and biological interest.," *Curr. Med. Chem.*, vol. 11, no. 10, pp. 1309–32, May 2004.
- [38] B. Coiffier, B. Pro, H. M. Prince, F. Foss, L. Sokol, M. Greenwood, D. Caballero, P. Borchmann, F. Morschhauser, M. Wilhelm, L. Pinter-Brown, S. Padmanabhan, A. Shustov, J. Nichols, S. Carroll, J. Balser, B. Balser, and S. Horwitz, "Results from a pivotal, open-label, phase II study of romidepsin in relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma after prior systemic therapy.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 30, no. 6, pp. 631–6, Mar. 2012.
- [39] M. S. C. Pedras, L. Irina Zaharia, and D. E. Ward, "The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity.," *Phytochemistry*, vol. 59, no. 6, pp. 579–96, Mar. 2002.
- [40] F. Cavelier, R. Jacquier, J. L. Mercadier, J. Verducci, M. Traris, and A. Vey, "Destruxin analogs: variations of the alpha-hydroxy acid side chain.," *J. Pept. Res.*, vol. 50, no. 2, pp. 94–101, Aug. 1997.
- [41] B.-L. Liu and Y.-M. Tzeng, "Development and applications of destruxins: a review.," *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, no. 6, pp. 1242–54.
- [42] R. Dornetshuber-Fleiss, P. Heffeter, T. Mohr, P. Hazemi, K. Kryeziu, C. Seger, W. Berger, and R. Lemmens-Gruber, "Destruxins: fungal-derived cyclohexadepsipeptides with multifaceted anticancer and antiangiogenic activities.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 86, no. 3, pp. 361–77, Aug. 2013.
- [43] F. and F. Australien Government, Department of Agriculture, "Insecticide and Application Technology Research."
- [44] N. K. Maniania, S. Ekesi, B. Löhr, and F. Mwangi, "Prospects for biological control of the western flower thrips, Frankliniella occidentalis, with the entomopathogenic fungus, Metarhizium anisopliae, on chrysanthemum.," *Mycopathologia*, vol. 155, no. 4, pp. 229–35, Jan. 2002.

- [45] D. M. Hunter, R. J. Milner, and P. A. Spurgin, "Aerial treatment of the Australian plague locust, *Chortoicetes terminifera* (Orthoptera: Acrididae) with *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes).", *Bull. Entomol. Res.*, vol. 91, no. 2, pp. 93–9, Apr. 2001.
- [46] J. F. Bischoff, S. A. Rehner, and R. A. Humber, "A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage.", *Mycologia*, vol. 101, no. 4, pp. 512–30.
- [47] R. I. Samuels, S. E. Reynolds, and A. K. Charnley, "Calcium channel activation of insect muscle by destruxins, insecticidal compounds produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*," *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.*, vol. 90, no. 2, pp. 403–412, Jan. 1988.
- [48] A. Vey, V. Matha, and C. Dumas, "Effects of the peptide mycotoxin destruxin E on insect haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction.", *J. Invertebr. Pathol.*, vol. 80, no. 3, pp. 177–87, Jul. 2002.
- [49] C. Dumas, P. Robert, M. Pais, A. Vey, and J. M. Quiot, "Insecticidal and cytotoxic effects of natural and hemisynthetic destruxins.", *Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, vol. 108, no. 2, pp. 195–203, Jul. 1994.
- [50] E. Morel, M. Pais, M. Turpin, and M. Guyot, "Cytotoxicity of cyclodepsipeptides on murine lymphocytes and on L 1210 leukemia cells.", *Biomed. Pharmacother.*, vol. 37, no. 4, pp. 184–5, Jan. 1983.
- [51] F. Odier, A. Vey, and J. P. Bureau, "In vitro effect of fungal cyclodepsipeptides on leukemic cells: study of destruxins A, B and E.", *Biol. Cell*, vol. 74, no. 3, pp. 267–71, Jan. 1992.
- [52] S. Pal, R. J. St Leger, and L. P. Wu, "Fungal peptide Destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*.", *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 12, pp. 8969–77, Mar. 2007.
- [53] M. Pedras, C. Biesenthal, and I. Zaharia, "Comparison of the phytotoxic activity of the phytotoxin destruxin B and four natural analogs.", *Plant Sci.*, vol. 156, no. 2, pp. 185–192, Jul. 2000.
- [54] H. C. Chen, C. K. Chou, C. M. Sun, and S. F. Yeh, "Suppressive effects of destruxin B on hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells.", *Antiviral Res.*, vol. 34, no. 3, pp. 137–44, May 1997.
- [55] H. Nakagawa, M. Takami, N. Udagawa, Y. Sawae, K. Suda, T. Sasaki, N. Takahashi, M. Wachi, K. Nagai, and J. T. Woo, "Destruxins, cyclodepsipeptides, block the formation of actin rings and prominent clear zones and ruffled borders in osteoclasts.", *Bone*, vol. 33, no. 3, pp. 443–55, Sep. 2003.
- [56] J.-T. Woo, T. Yonezawa, B.-Y. Cha, T. Teruya, and K. Nagai, "Pharmacological topics of bone metabolism: antiresorptive microbial compounds that inhibit osteoclast differentiation, function, and survival.", *J. Pharmacol. Sci.*, vol. 106, no. 4, pp. 547–54, Apr. 2008.
- [57] C.-C. Wu, T.-H. Chen, B.-L. Liu, L.-C. Wu, Y.-C. Chen, Y.-M. Tzeng, and S.-L. Hsu, "Destruxin B Isolated from Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* Induces Apoptosis via a Bcl-2 Family-Dependent Mitochondrial Pathway in Human Nonsmall Cell Lung Cancer Cells.", *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, vol. 2013, p. 548929, Jan. 2013.
- [58] C.-T. Yeh, Y. K. Rao, M. Ye, W.-S. Wu, T.-C. Chang, L.-S. Wang, C.-H. Wu, A. T. H. Wu, and Y.-M. Tzeng, "Preclinical evaluation of destruxin B as a novel Wnt signaling target suppressing proliferation and metastasis of colorectal cancer using non-invasive bioluminescence imaging.", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 261, no. 1, pp. 31–41, May 2012.
- [59] T.-T. Huynh, Y. K. Rao, W.-H. Lee, H.-A. Chen, T. D.-Q. Le, D. T. W. Tzeng, L.-S. Wang, A. T. H. Wu, Y.-F. Lin, Y.-M. Tzeng, and C.-T. Yeh, "Destruxin B inhibits hepatocellular carcinoma cell growth through modulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway and epithelial-mesenchymal transition.", *Toxicol. In Vitro*, vol. 28, no. 4, pp. 552–61, Jun. 2014.
- [60] "ATCC: The Global Bioresource Center." [Online]. Available: http://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=at. [Accessed: 06-Apr-2014].
- [61] R. Dornetshuber, P. Heffeter, M. Sulyok, R. Schumacher, P. Chiba, S. Kopp, G. Koellensperger, M. Micksche, R. Lemmens-Gruber, and W. Berger, "Interactions between ABC-transport proteins and the secondary *Fusarium* metabolites enniatin and beauvericin.", *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 53, no. 7, pp. 904–20, Jul. 2009.
- [62] "EZ4U - the 4th generation non radioactive cell proliferation & cytotoxicity assay, Biomedica Wien, Quelle: biomedica.co.at; Gelesen am 12.03.2014," vol. 301004, no. 301004, pp. 1–12.
- [63] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.", *J. Immunol. Methods*, vol. 65, no. 1–2, pp. 55–63, Dec. 1983.
- [64] D. A. Scudiero, R. H. Shoemaker, K. D. Paull, D. A. Scudiere, K. D. Paul, A. Monks, S. Tierney, T. H. Nofziger, M. J. Currens, D. Seniff, and M. R. Boyd, "Evaluation of a Soluble Tetrazolium / Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines," pp. 4827–4833, 1988.

- [65] "Cell Proliferation Assay XTT: AppliChem - BioChemica.Chemica.Synthesis.Service; Quelle: appliChem.com." [Online]. Available: <https://www.appliChem.com/en/literature/applications/no-12-cell-proliferation-assay-xtt/>. [Accessed: 12-Mar-2014].
- [66] N. A. P. Franken, H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, and C. van Bree, "Clonogenic assay of cells in vitro.," *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 5, pp. 2315–9, Jan. 2006.
- [67] M. Rahman, "Introduction to Flow Cytometry; AbD Serotec; abdserotec.com."
- [68] Z. Darzynkiewicz and F. Traganos, "Interactions of Rhodamine 123 with Living Cells Studied by Flow Cytometry," pp. 799–806, 1982.
- [69] L. V Johnson, M. L. Walsh, and L. A. N. B. Chen, "Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123," vol. 77, no. 2, pp. 990–994, 1980.
- [70] J. W. Jonker, M. Buitelaar, E. Wagenaar, M. A. Van Der Valk, G. L. Scheffer, R. J. Scheper, F. Kuipers, R. P. J. O. Elferink, H. Rosing, J. H. Beijnen, and A. H. Schinkel, "The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria," vol. 99, no. 24, pp. 15649–15654, 2002.
- [71] R. W. Robey, K. Steadman, O. Polgar, K. Morisaki, M. Blayney, P. Mistry, and S. E. Bates, "Pheophorbide a Is a Specific Probe for ABCG2 Function and Inhibition," pp. 1242–1246, 2004.
- [72] A. Pick, H. Müller, and M. Wiese, "Structure-activity relationships of new inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2).," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 16, no. 17, pp. 8224–36, Sep. 2008.
- [73] Y.-P. Lee, C.-W. Wang, W.-C. Liao, C.-R. Yang, C.-T. Yeh, C.-H. Tsai, C.-C. Yang, and Y.-M. Tzeng, "In vitro and in vivo anticancer effects of destruxin B on human colorectal cancer.," *Anticancer Res.*, vol. 32, no. 7, pp. 2735–45, Jul. 2012.
- [74] "Probenecid - ALX-430-113 - Enzo Life Sciences." [Online]. Available: <http://www.enzolifesciences.com/ALX-430-113/probenecid/>. [Accessed: 30-Apr-2014].
- [75] F. Loor, F. Tiberghien, T. Wenandy, A. Didier, and R. Traber, "Cyclosporins: Structure–Activity Relationships for the Inhibition of the Human MDR1 P-Glycoprotein ABC Transporter," *J. Med. Chem.*, vol. 45, no. 21, pp. 4598–4612, Oct. 2002.
- [76] G. D. Leonard, T. Fojo, and S. E. Bates, "The Role of ABC Transporters in Clinical Practice," pp. 411–424, 2003.
- [77] L. Payen, L. Delugin, a Courtois, Y. Trinquart, a Guillouzo, and O. Fardel, "The sulphonylurea glibenclamide inhibits multidrug resistance protein (MRP1) activity in human lung cancer cells.," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 132, no. 3, pp. 778–84, Mar. 2001.
- [78] P. J. Houghton, G. S. Germain, F. C. Harwood, J. D. Schuetz, C. F. Stewart, E. Buchdunger, and P. Traxler, "Imatinib Mesylate Is a Potent Inhibitor of the ABCG2 (BCRP) Transporter and Reverses Resistance to Topotecan and SN-38 in Vitro," vol. 2, pp. 2333–2337, 2004.
- [79] M. Dohse, C. Scharenberg, S. Shukla, R. W. Robey, T. Volkmann, J. F. Deeken, C. Brendel, S. V. Ambudkar, A. Neubauer, and S. E. Bates, "Comparison of ATP-Binding Cassette Transporter Interactions with the Tyrosine Kinase Inhibitors Imatinib, Nilotinib, and Dasatinib," vol. 38, no. 8, pp. 1371–1380, 2010.
- [80] Y. Nakamura, M. Oka, H. Soda, K. Shiozawa, M. Yoshikawa, A. Itoh, Y. Ikegami, J. Tsurutani, K. Nakatomi, T. Kitazaki, S. Doi, H. Yoshida, and S. Kohno, "Gefitinib ('Iressa', ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, reverses breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated drug resistance.," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 4, pp. 1541–6, Mar. 2005.
- [81] Y. Liang, C. Yan, and N. F. Schor, "Apoptosis in the absence of caspase 3.," *Oncogene*, vol. 20, no. 45, pp. 6570–8, Oct. 2001.
- [82] "Kompaktlexikon der Biologie - kompetitive Hemmung." [Online]. Available: <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/kompetitive-hemmung/6556>. [Accessed: 04-Jun-2014].

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

10 Lebenslauf

Geburtsdatum	25.03.1987
Geburtsort	Oberpullendorf
Staatsbürgerschaft	Österreich
Schulbildung/Studium	Diplomarbeit am Institut für Krebsforschung der Medizinischen Universität Wien in Kooperation mit dem Department für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien (ab September 2013) Pharmaziestudium (ab 2007) Bundeshandelsakademie (BHAK) Oberpullendorf (2001-2006) Hauptschule Kirchschlag (1997-2001) Volksschule Kirchschlag (1993-1997)
Sprachen	Deutsch, Englisch, Französisch
Berufserfahrung	Schlangenapotheke (1020 Wien) ab April 2014 Team Santé Apotheke Schwenk (1120 Wien) Dezember 2009 bis Ende August 2012 Swarco Futurit Verkehrssignalsysteme GmbH (Neutal) Zeiträume zwischen Matura/Bundesheer/Studium und davor während der Oberstufe mehrmals in den Ferien Tätigkeit: Qualitätskontrolle, Einkauf und Produktion
zusätzliche Angaben	Präsenzdienst (November 2006 bis April 2007) Beginn des Aspirantenjahres (Praxisjahr zur Ausbildung als Apotheker) voraussichtlich ab Juli 2014