Sonja Katharina König
Dr. med.

Einfluss von Arzneimittel-Transportproteinen auf die zelluläre Resistenz gegenüber Saquinavir und Darunavir

Promotionsfach: Klinische Pharmakologie
Doktormutter: Prof. Dr. rer. nat. Johanna Weiß

Komplikationen, die häufig während der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) gegen Infektionen mit dem humanen Immundefizienzvirus-1 (HIV-1) auftreten, sind Arzneimittelwechselwirkungen und die Entwicklung einer viralen Resistenz gegenüber den eingesetzten antiretroviralen Arzneistoffen.
Arzneistoffwechselwirkungen können auf Arzneimittel-Transportproteinen wie den Efflux-transportern der *ATP binding cassette* (ABC-) Familie sowie den *organic anion transporting polypeptides/ solute carrier organic anion* (OATP/ SLCO-) Aufnahme-Transportern beruhen, die erheblichen Einfluss auf die Pharmakokinetik zahlreicher antiretroviraler Wirkstoffe ausüben können.
ABC-Transporter können durch eine quantitative und funktionelle Hochregulation (Induktion) im Darm zu einer reduzierten oralen Bioverfügbarkeit führen. In den Zielzellen des HIV können sie die intrazelluläre Arzneimittelpenetration stark limitierten, so dass es zur Ausbildung einer zellulären Resistenz kommt. Im Gegensatz dazu verursacht eine Hemmung dieser Transporter erhöhte intrazelluläre Wirkstoffkonzentrationen, die mit verstärkter Toxizität einhergehen. Diese Effekte wurden bereits für mehrere PIs insbesondere im Hinblick auf P-Glykoprotein (P-gp/MDR1) als einen der bedeutsamsten ABC-Transporter im Arzneistofftransport beschrieben. Eine Induktion von OATPs wirkt sich im Vergleich zu den ABC-Transportern genau gegensätzlich auf die intrazellulären Arzneistoffkonzentrationen von Substraten aus. Allerdings bestehen bezüglich Substratspektrum und Induzierbarkeit dieser Aufnahme-Transporter bislang noch einige Unklarheiten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die beiden Protease-Inhibitoren (PIs) Saquinavir, der Prototyp dieser Substanzklasse, und Darunavir, der zuletzt zugelassene Vertreter seiner Gruppe, zu einer modifizierten Expression der wichtigsten Transportproteine führen und ob sich daraus funktionelle Auswirkungen auf die Zelle ergeben.
In der intestinalen Zelllinie LS180 verursachte die einwöchige Behandlung mit 10 µM Darunavir eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von *ABCB1* (als codierendes Gen für P-gp) um das 3,5-fache des Ausgangswertes und von *SLCO2B1* (als Gen für OATP2B1) um das 1,9-fache, bestimmt mittels RT-PCR (*reverse transcriptase real-time polymerase chain reaction*). Im Gegensatz dazu führten 10 µM Saquinavir zu einer Induktion sämtlicher untersuchter Transporter nach einer Woche Kultivierung. Auf mRNA-Ebene war *ABCB1* 5,7-fach, *ABCC1* (als Gen für das *multidrug resistance-associated protein 1/*MRP1) 2,3-fach, *ABCC2* 4,5-fach, *ABCC3* 2,0-fach, *ABCC4* 1,8-fach, *ABCC5* 3,8-fach, *ABCG2* (als Gen für das *breast cancer resistance protein*/BCRP) 4,1-fach, *SLCO1B1* 4,6-fach, *SLCO2B1* 1,8-fach und *SLCO3A1* 1,8-fach erhöht.
Mittels Western Blot wurde die Induktion von P-gp und MRP1 auf Proteinebene bestätigt. Darüber hinaus wurde eine Steigerung der P-gp-Funktion mittels P-gp-Funktionsassay (Rhodamin123-Efflux) nachgewiesen.
Die Darunavir-vermittelte Induktion von Transportproteinen führte zu einer gesteigerten zellulären Resistenz gegenüber Darunavir, welche mittels Proliferationsassay erhoben wurde.

Dies bedeutet, dass die Behandlung mit Darunavir den Darunavir-Efflux erhöht und folglich zu subtherapeutischen intrazellulären Konzentrationen führen kann.
Die Heraufregulierung von Transportproteinen durch Saquinavir übte im Gegensatz dazu keinen Einfluss auf die zelluläre Sensitivität gegenüber sich selbst aus, was auf eine in geringerem Maße reduzierte intrazelluläre Arzneistoffkonzentration hindeutete. Vermutlich wurde der Induktionseffekt der ABC-Transporter hier durch eine simultane Hochregulierung von Arzneimittel-Uptake-Transportern kompensiert. Der als Pilotversuch durchgeführte $^{2}H_{5}$-Saquinavir-Uptakeassay zeigte, dass die tatsächlichen intrazellulären Konzentrationen dennoch im Vergleich zur Negativkontrolle reduziert sind. Damit weist er für diese Fragestellung anscheinend eine höhere Sensitivität auf als die Proliferationsassays.

In der lymphozytären Jurkat-Zelllinie ergaben sich durch die Behandlung mit Saquinavir bis auf eine marginale *ABCG2*-Induktion auf mRNA-Ebene nach vierwöchiger Kultivierung keinerlei Auswirkungen sowohl auf die Transporterexpression als auch -funktion. Diese Diskrepanz zu den in LS180-Zellen erhobenen Daten beruht vermutlich auf einer unterschiedlichen Ausstattung an Transkriptionsfaktoren und abweichendem intrinsischen Expressionslevel der Arzneistoff-Transporter.
Schlussfolgernd ergaben die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten eine bedeutsame Induktion zahlreicher für den Arzneistofftransport wichtiger Transportproteine durch Saquinavir und Darunavir, die möglicherweise die Wirksamkeit dieser und weiterer HIV-Therapeutika sowie der Arzneimittel zur Behandlung der Komorbidität herabsetzen. Die unmittelbaren Auswirkungen der Induktion im Sinne von herabgesetzten intrazellulären Konzentrationen und konsekutiver zellulärer Resistenz wurden aufgezeigt. Zudem wurden die schwach inhibitorischen Eigenschaften von Darunavir dargestellt.