

Jannick Robert Clemens  
Dr. med.

## **Intrazelluläre Aufnahme von Bortezomib in Myelomzellen in Relation zur Wirksamkeit und dem Einfluss von Arzneistoff-Transportern**

Fach/Einrichtung: Klinische Pharmakologie  
Doktormutter: Prof. Dr. rer. nat. Johanna Weiß

Bortezomib ist ein seit etwa einem Jahrzehnt sehr erfolgreich in der Therapie des Multiplen Myeloms eingesetztes Chemotherapeutikum. Von dieser neoplastischen Erkrankung aus der Gruppe der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome, bei der es zu einer Vermehrung maligner entarteter Plasmazellen insbesondere im Knochenmark kommt, sind typischerweise Menschen des höheren Lebensalters betroffen. Obwohl Bortezomib als der erste klinisch zugelassene Vertreter der neuen Klasse der Proteasominhibitoren zu einer wesentlichen Verbesserung der Prognose daran erkrankter Patienten beigetragen hat, ist das Multiple Myelom eine in den meisten Fällen nach wie vor nicht heilbare Erkrankung. Verantwortlich dafür sind sowohl primär als auch sekundär auftretende Wirksamkeitsverluste des jeweils verwendeten Therapieregimens, deren klinische Ursachen auch im Falle von Bortezomib bislang noch nicht zufriedenstellend aufgeklärt werden konnten. Ohnehin ist nur sehr wenig über das konzentrationsabhängige intrazelluläre Verhalten von Bortezomib in Myelomzellen bekannt, während die Relevanz damit möglicherweise in Zusammenhang stehender Arzneistoff-Transporter weiterhin Gegenstand kontroverser Diskussionen ist.

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit bestand deshalb in der Entwicklung einer möglichst sensitiven und zugleich validen massenspektrometrischen Methode, mit der intrazelluläre Bortezomib-Konzentrationen quantifiziert werden können. Mit einer Kombination aus Flüssig-Flüssig-Extraktion, chromatographischer Auftrennung und massenspektrometrischer Analyse wurden Konzentrations-Zeit-Profile der intrazellulären Aufnahme von Bortezomib in neun Myelomzelllinien bestimmt. Um mögliche Einflüsse von Arzneistoff-Transportern auf die dabei gemessenen intrazellulären Konzentrationen aufzuklären, wurde Bortezomib zudem in überexprimierenden Modellzelllinien auf verschiedene Interaktionen mit Transportern getestet: Während die Substrateigenschaften von Bortezomib für diverse Arzneistoff-Transporter in Proliferationsversuchen untersucht wurden, erfolgte die Analyse auf Transporter-inhibitionen unter Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzverfahren. Um darüber hinaus die Relevanz etwaiger identifizierter Transporterinteraktionen für die untersuchten Myelomzelllinien einschätzen zu können, wurde in diesen sowohl die basale als auch die unter längerfristiger Bortezomib-Exposition auftretende Transporterexpression per *quantitative real-time polymerase chain reaction* und im Western Blot ermittelt. Ergänzende Informationen über die möglicherweise induzierende Wirkung von Bortezomib lieferte zudem die korrespondierende Analyse der Aktivität des Pregnan-X-Rezeptors. In weiteren Proliferationsversuchen erfolgte außerdem eine Bestimmung der Sensitivität der einzelnen Myelomzelllinien gegenüber Bortezomib. Die dabei ermittelten Sensitivitätswerte wurden dann per Korrelationsanalyse auf einen Zusammenhang mit der intrazellulären Bortezomib-Konzentration und der Arzneistoff-Transporterexpression hin untersucht.

Überraschenderweise kam es bereits während der Entwicklung der massenspektrometrischen Methode für die Quantifizierung von Bortezomib zu einem bemerkenswerten Befund, der über diese Arbeit hinaus von Relevanz für *in vitro* Studien mit Bortezomib ist: In aufwendigen Analysen konnte zweifelsfrei demonstriert werden, dass Bortezomib unter Standardkulturbedingungen kontinuierlich in Abhängigkeit vom pH-Wert zerfällt, so dass bereits nach eintägigen Inkubationszeiträumen in neutralem Kulturmedium nur noch ein Bruchteil der ursprünglich applizierten Menge nachgewiesen werden kann. Dies hat zur

Folge, dass nicht nur der Großteil der bisher für Bortezomib aus *in vitro* Versuchen stammenden theoretischen Konzentrationswerte mit einer gewissen Vorsicht interpretiert werden sollte, sondern dass aufgrund der zugleich mitunter deutlich variierenden Zerfallsraten auch die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Zelllinien erheblich eingeschränkt sein kann. Eine Lösung für dieses Problem stellt die in dieser Arbeit beschriebene gleichzeitige Kontrolle der extrazellulären Bortezomib-Konzentrationen dar, dank derer die Anreicherung in den Myelomzelllinien trotzdem zuverlässig untersucht werden kann. Dabei zeigte sich eine durchweg massive intrazelluläre Anreicherung von Bortezomib, die zwischen den einzelnen Zelllinien teilweise deutlich voneinander differierte. In der nachfolgenden umfassenden Abklärung der Bedeutung von Arzneistoff-Transportern für die beobachteten intrazellulären Konzentrationsunterschiede konnte für Bortezomib weder eine relevante Inhibition noch eine Induktion von Transportern festgestellt werden. Auch wenn erstmalig ein zumindest schwacher Influx über das *organic anion transporting peptide 1B1* gezeigt und der Auswärtstransport über P-Glykoprotein (P-gp) bestätigt werden konnten, schienen diese Transportprozesse von keiner großen Relevanz für die untersuchten Myelomzelllinien zu sein, da jene Arzneistoff-Transporter in diesen Zellen insgesamt betrachtet nur äußerst schwach exprimiert wurden. Obwohl in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen einer durch P-gp-Überexpression verringerten intrazellulären Bortezomib-Konzentration und einer dadurch verminderten zellulären Sensitivität grundsätzlich gezeigt werden konnte, ließ sich diese Dosis-Wirkungs-Beziehung interessanterweise nicht auf die untersuchten Myelomzelllinien übertragen. In diesen schienen die intrazellulären Konzentrationsunterschiede weder die Folge einer variablen Expression von Arzneistoff-Transportern zu sein, noch mit der Wirksamkeit von Bortezomib in einem relevanten Zusammenhang zu stehen. Als eine mögliche Erklärung für die letztgenannte Beobachtung kommt in Betracht, dass eine suffiziente Inhibition der zellulären Proteasomenaktivität, wie in anderen Studien gezeigt, bei bereits deutlich niedrigeren Bortezomib-Konzentrationen erreicht wird, die um ein Vielfaches unter der massiven Anreicherung in den Myelomzelllinien liegen. Demzufolge könnten eher konzentrationsunabhängige zelluläre Eigenschaften, wie beispielsweise das beim Modell der *proteostenosis* entscheidende Verhältnis zwischen der Proteasomenaktivität und der anfallenden Menge abzubauen Proteine, eine größere Rolle für die Wirksamkeit von Bortezomib in diesen Myelomzellen spielen.

In künftigen Untersuchungen wird es deshalb von großem Interesse sein, einerseits die Parameter der sogenannten *load/capacity ratio* mitzubestimmen und andererseits die generelle Übertragbarkeit der Befunde dieser Studie auf *in vivo* Systeme zu überprüfen. Außerdem wird weiter zu klären sein, ob und inwieweit sich die für Bortezomib ermittelten Ergebnisse auch auf andere Proteasominhibitoren, wie zum Beispiel Carfilzomib, oder aber auf andere ebenso von der Bortezomib-Wirkung betroffene Zellen, wie Osteoblasten und Osteoklasten im Knochenmilieu, übertragen lassen.