

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für pädiatrische Hämatologie und Onkologie
- Direktor: Univ. - Prof. Dr. med. H. Jürgens

Der Einfluss von Prostaglandin E₂ auf die Pgp -
abhängige Multidrug - Resistance in AML - Blasten
beim Kind

DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms – Universität Münster

vorgelegt von Schürmann, Peter

aus Werther / Westfalen

2007

Dekan: Univ. - Prof. Dr. V. Arolt

1. Berichterstatter: Univ. - Prof. Dr. E. Harms

2. Berichterstatter: Priv. - Doz. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 30.08.07

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für pädiatrische Hämatologie und Onkologie
- Direktor: Univ. - Prof. Dr. med. H. Jürgens
Referentin: Univ. - Prof. Dr. E. Harms
Koreferent: Priv. - Doz. Dr. D. Reinhardt

Zusammenfassung

Der Einfluss von Prostaglandin E₂ auf die Pgp - abhängige Multidrug-Resistance in
AML - Blasten beim Kind.
Peter Schürmann

Einen der wichtigsten Gründe für ein Therapieversagen von Kindern mit akuter myeloischer Leukämie (AML) stellt das Auftreten von Resistenzen dar. Ein „Multidrug Resistance“ (MDR)-Phänotyp der malignen Blasten beruht dabei meist auf der Überexpression von Transportproteinen, welche Zytostatika und andere Substrate aus dem Inneren der Zelle herauspumpen und so die intrazelluläre Konzentration auf ein nicht toxisches Maß reduzieren können. Das am besten charakterisierte und im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchte Transportprotein ist das durch das *MDR1*-Gen kodierte P-Glykoprotein (Pgp) vom Typ 1, dessen Expression und Funktion durch verschiedene Zytostatika induziert werden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass in AML-Blasten die Cyclooxygenase-2 (COX-2) als Schlüsselenzym des Arachidonsäurestoffwechsels eine wichtige Rolle bei der Anthracyclin-vermittelten Pgp-Überexpression spielt. Die Vorinkubation mit dem COX-2 präferentiellen Hemmstoff Meloxicam konnte die zytostatische Effizienz von Doxorubicin und liposomalem Daunorubicin verbessern. Für weitere COX-Inhibitoren war dieser Effekt weniger deutlich ausgeprägt. Als entscheidender Mediator scheint das COX-2 Produkt Prostaglandin E₂ (PGE₂) zu fungieren, da es einen deutlichen Anstieg der Pgp-Expression verursachte und den Pgp-abhängigen Efflux signifikant steigerte. Eine Induktion der Pgp-Expression über Prostaglandin bzw. Endoperoxid (EP)1- und EP2-Rezeptoren erscheint wahrscheinlich; die Bedeutung der Rezeptoren EP3 und EP4 ist hier aber noch nicht hinreichend geklärt. Die Abschwächung der Resistenzausprägung durch Vorinkubation mit AH6809, einem EP Rezeptor-Antagonist mit nahezu gleicher Affinität zu EP1, EP2 und EP3-III Rezeptoren, vermochte die Effektivität des Zytostatikums durch eine Hemmung des Doxorubicin-induzierten Effluxes zu erhöhen. Die Hemmung der Pgp-Expression durch COX-2-Inhibitoren sowie durch Antagonisten an EP-Rezeptoren stellt ein neues Prinzip der Resistenzintervention dar, welches die Therapie der AML im Vergleich zu kompetiven Pgp-Inhibitoren selektiver und nebenwirkungsärmer optimieren kann.

Tag der mündlichen Prüfung: 30.08.07

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Akute myeloische Leukämie	1
1.1.1	Ätiologie	1
1.1.2	Klassifikation	2
1.1.3	Therapie	4
1.1.4	Multidrug Resistance	5
1.2	P-Glykoproteine	6
1.2.1	Struktur und Topologie	6
1.2.2	Mechanismus und Regulation des MDR1-vermittelten Transports.....	8
1.2.3	Gewebeverteilung und physiologische Funktionen von P-Glykoproteinen ..	9
1.2.4	P-Glykoproteine als Resistenzdeterminanten.....	10
1.3	Möglichkeiten zur Modulation einer Pgp-vermittelten Mehrfachresistenz	10
1.3.1	Kompetitive Hemmstoffe	11
1.3.2	Assoziation von MDR1-vermittelter Multidrug Resistance und der Cyclooxygenase-2	12
1.4	Die Cyclooxygenase	13
1.4.1	Physiologische Funktionen der Cyclooxygenase	14
1.4.2	Regulation der COX-2 Expression	14
1.4.3	Bedeutung der Cyclooxygenase-2 bei malignen Erkrankungen	16
1.4.3.1	Bildung von Mutagenen durch die COX-2	16
1.4.3.2	Apoptose und COX-2.....	17
1.4.3.3	Entzündung und Immunsuppression	17
1.4.4	COX-2-Inhibitoren in der Krebsprävention und Krebstherapie	18
1.5	Zielsetzung der Arbeit	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Zelllinien	21
2.1.2	Patientenmaterial	21
2.1.3	Chemikalien und Biochemikalien.....	22

2.1.3.1	Zellkulturreagentien und Reagentien zur Gefrierpräparation	22
2.1.3.2	Zytostatika	22
2.1.3.3	Cyclooxygenase-Inhibitoren.....	22
2.1.3.4	Prednisolon.....	23
2.1.3.5	Inhibitoren und Aktivatoren des Prostaglandin-Stoffwechsels	23
2.1.3.6	Lösungsmittel.....	23
2.1.3.7	Pgp-Substrate.....	23
2.1.3.8	Antikörper	24
2.1.3.9	Chemikalien für die FACS-Analyse.....	24
2.1.3.10	Chemikalien für den MTT – Test.....	24
2.1.4	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	24
2.2	Methoden	26
2.2.1	Sterilisation von Materialien und Lösungen.....	26
2.2.2	Kultur von HL-60 Zellen.....	26
2.2.3	Isolierung von Lymphozyten und Monozyten aus Patientenmaterial.....	27
2.2.4	Durchflusszytometrie.....	28
2.2.4.1	Funktionsprinzip des Flowzytometers.....	28
2.2.4.2	Flowzytometrischer Nachweis von P-Glykoprotein, COX-2 und anderen Antigenen.....	32
2.2.4.3	Rhodamin 123 – Efflux Studien	33
2.2.4.3	Auswertung.....	34
2.2.5	MTT-Assay.....	35
2.2.5.1	Vorbereitung der Cyclooxygenase-Inhibitoren und von Prednisolon	35
2.2.5.2	Vorbereitung von Inhibitoren und Aktivatoren des Prostaglandin-Stoffwechsels.....	36
2.2.5.3	Durchführung des MTT-Assays	36
2.2.7	Auswertung der durchgeführten Experimente	41
3	Ergebnisse	43
3.1	Der Einfluss von Lösungsmitteln auf die Proliferation bei HL-60 Zellen	43
3.1.1	Ethanol	43
3.1.2	Dimethylformamid	44
3.1.3	DMSO	44
3.1.4	Chloroform/Methanol 1:1	45

3.2	Prednisolon als verstärkender Faktor des zytotoxischen Effekts von Doxorubicin.....	46
3.3	Meloxicam als verstärkender Faktor des zytotoxischen Effekts von Doxorubicin und liposomalem Daunorubicin	48
3.3.1	Ergebnisse in der HL-60 Zelllinie.....	49
3.3.2	Ergebnisse in primären Zellen.....	51
3.3.2.1	Patient 1, MTT-Assay unter liposomalem Daunorubicin und Meloxicam	52
3.3.2.2	Patient 1, MTT-Assay unter Doxorubicin und Meloxicam	54
3.3.2.3	Patient 2, MTT-Assay unter Doxorubicin und Meloxicam	56
3.3.2.4	Patient 3, MTT-Assay unter Doxorubicin und Meloxicam	59
3.4	Der Einfluss von COX-Inhibitoren auf die Proliferation unter Doxorubicin bei HL-60 Zellen.....	61
3.4.1	NS398	61
3.4.2	DFU	64
3.4.3	Tenoxicam.....	65
3.4.4	Weitere COX-Inhibitoren	67
3.5	Die Auswirkungen von Meloxicam auf die COX-2 Proteinexpression.....	68
3.6	Der Einfluss von Prostaglandin E₂ auf die MDR1-abhängige Multidrug-Resistance in HL-60 Zellen	69
3.6.1	Der Einfluss von Prostaglandin E ₂ auf die Zellproliferation unter Doxorubicin in der HL-60-Zelllinie	69
3.6.2	Der Einfluss von Prostaglandin E ₂ auf die MDR1-abhängige Transportaktivität in HL-60-Zellen	71
3.6.3	Der Einfluss von Prostaglandin E ₂ auf die Expression von P-Glykoprotein	72
3.6.4	Antagonisierung des Meloxicam-Effektes durch PGE ₂	73
3.7	Endoperoxidantagonisten als Modulatoren der Doxorubicin-Wirkung auf Zellproliferation und MDR1-abhängigen Transport bei HL-60 Zellen	74
3.7.1	Der Einfluss von AH6809 auf die Zellproliferation unter Doxorubicin bei HL-60 Zellen.....	74
3.7.2	Der Einfluss von AH6809 auf den MDR1-abhängigen Transport bei HL-60 Zellen.....	77
3.7.3	Der Einfluss von AH23848B auf die Zellproliferation unter Doxorubicin bei HL-60 Zellen.....	79

4	Diskussion	80
4.1	Induktion von Rho 123 – Efflux und Pgp-Expression durch Doxorubicin	80
4.2	Induktion der Prostaglandin E₂ – Freisetzung durch Anthracycline	80
4.3	Induktion von Rho 123 – Efflux und Pgp-Expression durch Prostaglandin E₂.....	81
4.4	Modulierung des Resistenzverhaltens.....	82
4.4.1	Steigerung der Effektivität von Anthracyclinen durch Cyclooxygenase-Inhibitoren	82
4.4.2	Steigerung der Effektivität von Anthracyclinen durch Prednisolon	84
4.4.3	Der protektive Effekt von Prostaglandin E ₂ auf Doxorubicin-behandelte HL-60 Zellen.....	84
4.4.4	Antagonisierung des Effektes von Meloxicam durch Prostaglandin E ₂	85
4.4.5	PGE ₂ -Rezeptorantagonisten als Modulatoren der DOX-Wirkung auf Zellproliferation und MDR1-abhängigen Transport bei HL-60 Zellen	85
4.4.6	Abschätzung der Toxizität	86
4.5	Cyclooxygenase-unabhängige Effekte von Cyclooxygenase-Inhibitoren	88
4.6	Prostaglandin E₂-vermittelte Regulation der MDR1-Expression	90
4.6.1	Mögliche Transduktionswege	90
4.6.2	NF κB	91
4.6.3	Phospholipase C	93
4.7	MDR1 - unabhängige Resistenzmechanismen.....	93
5	Zusammenfassung	96
6	Literaturverzeichnis	99
7	Abkürzungsverzeichnis	120
8	Danksagung	122
9	Lebenslauf	123

1 Einleitung

1.1 Akute myeloische Leukämie

Unter dem Begriff Leukämien werden verschiedene Erkrankungen zusammengefasst, die durch maligne Transformation hämatopoetischer oder lymphatischer Zellen entstehen. Die Unterteilung der Leukämien erfolgt nach dem transformierten Zelltyp in myeloisch oder lymphatisch sowie nach dem natürlichen Verlauf in akut oder chronisch.

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine klonale maligne Erkrankung der Knochenmarkvorstufen der myeloischen Reihe, bei der sich kaum differenzierte Vorläuferzellen im Knochenmark und oft auch in der Blutstrombahn ansammeln.

Die Prozesse der Zellproliferation und der Differenzierung im Knochenmark werden durch Faktoren wie zelluläre Interaktionen, der Aktivität von Glykoproteinen, verschiedenen Interleukinen, hämatopoetischen Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren reguliert^{54,141}. Die Akkumulation einer Population von unreifen Blasten führt zur Suppression der normalen Hämatopoese. Symptome entstehen durch eine fehlende Ausreifung von Zellen, die im physiologischen Knochenmark gebildet werden^{70,91}. Die Folgen sind u. a. Abgeschlagenheit, Blässe, Belastungsdyspnoe, Infektanfälligkeit und Blutungsneigung. Zusätzlich kann es beim Vorliegen großer Mengen unreifer, maligner Myeloblasten dazu kommen, dass verschiedene Organe infiltriert werden und zu entsprechenden Dysfunktionen führen.

1.1.1 Ätiologie

15% - 20% aller Leukämien im Kindesalter sind der AML zuzuordnen²³⁵. Die Ursache der AML ist letztlich noch weitgehend ungeklärt. Es gibt jedoch einige kongenitale prädisponierende Faktoren, die mit der Entstehung einer AML bei Kindern assoziiert sind^{45,115}. Es gehören hierzu die intrauterine Exposition mit Benzol, ionisierender Strahlung oder mit verschiedenen Medikamenten. Auch eine

vorausgegangene chemotherapeutische Behandlung mit Alkylantien oder Topoisomerase-Hemmern kann bei Kindern eine AML auslösen.

1.1.2 Klassifikation

FAB-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie					
Subtypen	Blastengröße	Zellkern	Zytoplasma	Zytochemie	spezielle Merkmale
M0: minimal differenzierte Leukämie	größenvariable Blasten	aufgelockerte Chromatinstruktur, unregelmäßig, runder Nukleolus mit Nukleoli	schmalem bis mittelweites, ungranuliertes schwach basophiles Zytoplasma	negativ	Immunologisch: CD13, CD33, CD 15
M1: AML ohne Ausreifung	Mittelgroß	aufgelockerte Chromatinstruktur, Kerneinbuchtungen, Nukleoli	mittelweit, teils granuliert, vereinzelt Auerstäbchen möglich	POX>3%	<10% Ausreifung der Granulopoese
M2: AML mit Ausreifung	Mittelgroß	Kerneinbuchtungen, Nucloli	granuliert, häufig Auerstäbchen	POX positiv	>10% Ausreifung der Granulopoese
M3: Hypergranuläre Promyelozyten-Leukämie	Mittelgroß	Kerneinbuchtung, tief-basophiles, aufgelockertes Chromatin	granuliert, "Auerbüschel"	POX positiv (bis 100%)	Auerstäbchen
M4: Akute myelomonozytäre Leukämie	mittelgroße Myeloblasten, große Monoblasten	Myeloblasten: unregelmäßig Monoblasten: gelappter Zellkern	Myeloblasten: granuliert, Auerstäbchen möglich Monoblasten ungranuliert	Myeloblasten POX positiv; Monoblasten Esterase positiv	>20% Monoblasten; >20% Myeloblasten
M4Eo: vermehrt anomale Eosinophilie	mittelgroße Myeloblasten, große Monoblasten	Myeloblasten: unregelmäßig Monoblasten: gelappter Zellkern	Myeloblasten: granuliert, Auerstäbchen möglich; Monoblasten ungranuliert	Myeloblasten POX positiv; Monoblasten Esterase positiv	atypische Eosinophile
M5 a): monoblastäre Leukämie	mittelgroß - groß	rund, feinstrukturiert, Nucleoli	mäßig bis deutlich basophil, azurophile Granulation möglich	Esterase positiv	>80% monozytär
M5 b): monozytäre Leukämie	groß	gelappt, feinstrukturiert	mäßig bis deutlich basophil	Esterase positiv	>80% monozytär
M6: Erythroleukämie	mittelgroß	aufgelockerte Chromatinstruktur, Kerneinbuchtungen, Nukleoli	gering granuliert, vereinzelt Auerstäbchen	Erythroid: PAS positiv; Myeloblasten POX positiv	Erythropoese >50% mit Dyserythropoese; Blasten mehr als 30% der Restmyelopoese
M7: Megakaryoblastische Leukämie	mittelgroß bis groß	rund, irregulär, Chromatin fein retikulär strukturiert	meist ungranuliert, Pseudopodien		PAS teils positiv; immunologisch: CD41, CD42b, CD61

Tab. 1: FAB-Klassifikation der AML

Die AML umfasst eine heterogene Gruppe von Phänotypen, welche sich durch unterschiedliche morphologische, immunphänotypische und genotypische Merkmale auszeichnen. Die am weitesten verbreitete Klassifikation ist die French American British (FAB) Klassifikation¹⁹. Die Einteilung erfolgt nach morphologischen, histochemischen und immunologischen Gesichtspunkten in die FAB-Typen M0 - M7 (Tab. 1).

Die aktuelle Einteilung der AML durch die World Health Organisation (WHO) bezieht zudem immunphänotypische und zytogenetische Kriterien mit ein⁹³ (Tab. 2).

AML mit typischen genetischen Aberrationen	Fusionsgen
AML mit t(8;21)(q22;q22)	AML1/ETO
AML mit inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13,q22)	CBFβ/MYH11
AML mit t(15;17)(q22;q12)	PML/RARα
AML mit 11q23	MLL/ XX-Rearrangement
AML mit einer Mehrliniendysplasie	
AML ohne vorangegangenes Myelodysplastisches Syndrom (MDS)	
AML nach MDS	
therapieassoziierte AML und MDS	
AML nach Alkylantien	
AML nach Topoisomeraseinhibitoren	
andere	
AML, die in den o.g. Gruppen nicht kategorisiert werden können	
minimal differenzierte AML	
AML ohne Reifung	
AML mit Reifung	
Akute myelomonozytäre Leukämie	
Akute monozytäre Leukämie	
Akute erythroide Leukämie	
Akute megakaryozytäre Leukämie	
Akute basophile Leukämie	
Akute Myelofibrose	
Myelosarkom / Extramedulläre Leukämie	
Akute Leukämien mit unklarer Linienzugehörigkeit	
Akute undifferenzierte Leukämie	
Akute bilineale Leukämie	
Akute biphänotypische Leukämie	

Tab. 2: WHO-Klassifikation der AML.

1.1.3 Therapie

Im Vergleich zur akuten lymphatischen Leukämie (ALL) zeichnet sich die AML durch eine höhere Chemotherapieresistenz aus. Bei 80% - 90% aller Kinder kann durch intensive Chemotherapie eine komplette Remission erreicht werden, die zu einem ereignisfreien Überleben (EFS) bei 50% - 60% der Patienten führt³⁹. Nach Rezidiv und zweiter CR überleben nur 20% - 30% der Kinder^{44,174}. Für die Prognose spielen klinische Faktoren wie Alter, periphere Leukozytenzahl, Therapieergebnis oder Remissionsdauer eine wichtige Rolle. Ohne Therapie beträgt die durchschnittliche Überlebensdauer eines AML-Patienten etwa 2 Monate.

Durch den Einsatz von Kombinationen verschiedener zytostatischer Substanzen wird eine Vernichtung aller malignen Zellen angestrebt^{62,234}, zum Teil folgt eine Stammzelltransplantation. Die typischen Phasen der Chemotherapie sind Induktion und Konsolidierung, gefolgt von einer Erhaltungstherapie über etwa 1 Jahr. Bei Kindern wird häufig zusätzlich zur systemischen Chemotherapie eine intrathekale prophylaktische Behandlung sowie eine Bestrahlung des zentralen Nervensystems durchgeführt.

Eine große Bedeutung für die Therapie kommt Anthracyclinen wie Daunorubicin, Idarubicin und Doxorubicin zu. Die zytotoxische Wirkung dieser aus Streptomyces-Arten isolierten Antibiotika ist in der S-Phase des Zellzyklus am stärksten ausgeprägt. Sie beruht u.a. auf der Interkalation in die DNA, die zur Hemmung der Nukleinsäuresynthese führt, der Induktion von Strangbrüchen durch Hemmung der Topoisomerase II, der Biotransformation zu freien Radikalen, welche ebenfalls Doppelstrangbrüche hervorrufen, sowie auf der Bindung an Bestandteile der Zellmembran, die die Membranfluidität und -permeabilität erhöhen. Auch Mitoxantron wirkt ähnlich wie die Anthracycline durch Interkalation in die DNA und durch Hemmung der Topoisomerase II zytotoxisch; Radikale tragen hingegen nicht wesentlich zur Wirkung bei¹⁴⁵.

Der Einsatz der Anthracycline wird allerdings durch ihre Kardiotoxizität eingeschränkt, die vermutlich im Wesentlichen auf der Bildung von Radikalen beruht. Sie ist mit der applizierten Gesamtdosis korreliert und häufig irreversibel. Eine

regelmäßige Untersuchung der Herzfunktion ist wegen der Gefahr einer späten Kardiotoxizität auch lange nach Beendigung der Therapie erforderlich ¹⁴⁵.

1.1.4 Multidrug Resistance

Eine der wichtigsten Gründe für ein Therapieversagen von Kindern mit AML stellt das Auftreten von Resistenzen dar, die entweder ein Ansprechen von vornherein auf die systemische Behandlung mit Zytostatika vermindern (primäre oder intrinsische Resistenz) oder im Verlauf der Therapie zur Unwirksamkeit der Chemotherapeutika führen (sekundäre Resistenz) ^{81,33}. Die Resistenz der leukämischen Blasten gegenüber der Chemotherapie kann innerhalb der FAB-Typen verschiedenartig ausgeprägt sein und betrifft oft ein breites Spektrum von Substanzgruppen ^{255,84,90,125,233,240}. Man spricht deshalb auch von einer „Multidrug Resistance“ (MDR). Tumorzellen können auch gegen Xenobiotika resistent werden, mit denen sie noch nicht in Kontakt gekommen sind ²². Zu den zytotoxischen Verbindungen, die einer MDR unterliegen können, gehören viele wichtige Substanzen mit großer Relevanz für die AML-Therapie wie Anthracycline, Vincaalkaloide und andere synthetische Analoga. Diese Substanzen unterscheiden sich in ihrer Größe und chemischen Struktur und verfügen über verschiedene Wirkmechanismen. Als gemeinsames Strukturmerkmal ist jedoch ein hydrophober bzw. amphiphiler Charakter, die Existenz planarer Molekülbereiche und oft eine bei physiologischem pH-Wert positiv geladene tertiäre Aminogruppe festzustellen ^{16,200}.

Ein entscheidender Resistenzmechanismus ist der gesteigerte Auswärtstransport der zytostatischen Substanzen durch Transportproteine aus der Zelle. Im Zusammenhang mit der Entstehung eines MDR-Phänotyps werden hier Transportproteine aus der von den Funktionen her äußerst vielfältigen ABC-Transporter-Superfamilie wie die Multidrug Resistance Related Proteins (MRPs) 1-6 oder das Breast Cancer Related Protein (BCRP) diskutiert ^{52,124,231}. In diesem Zusammenhang untersucht wird ebenfalls das Lung Resistance Protein (LRP), das kein Mitglied der ABC-Superfamilie und zwischen Kern und Zytoplasma lokalisiert ist ^{50,165}.

1.2 P-Glykoproteine

Die nach heutigem Stand der Forschung größte Bedeutung für eine Multidrug Resistance bei der AML kommt einer Überexpression von P-Glykoprotein (Pgp) zu, dem klassische Phänotyp einer Mehrfachresistenz. Häufig ist eine vermehrte Expression dieses Proteins mit einem schlechten Therapieergebnis, d.h. mit dem Nichterreichen einer kompletten Remission (CR) oder einem nur kurzem ereignisfreien Überleben (EFS) korreliert^{71,162,232}.

Die Familie der P-Glykoproteine, eine kleine Untergruppe der ABC-Transporter-Superfamilie, wurde erstmals 1976 von JULIANO und LING in Colchicin-resistenten Hamsterzellen beschrieben, die zusätzlich eine Kreuzresistenz gegenüber einer breiten Palette von amphiphilen, zytotoxischen Substanzen aufwiesen¹¹¹. Diese Mehrfachresistenz der Zellen beruhte auf der Expression eines in der Zytoplasmamembran lokalisierten Glykoproteins mit einem Molekulargewicht von 170kDa, das offensichtlich die Permeabilität der Zellmembran für zytotoxische Substrate beeinflusste. Da dieses Protein nur in Zellpopulationen auftrat, die eine veränderte Membranpermeabilität zeigten, nannten sie es P (permeability)-Glykoprotein.

P-Glykoproteine lassen sich aufgrund von Sequenzhomologien in der 3'-untranslatierten Region der zugehörigen Pgp- oder *MDR*-Gene in verschiedene Proteinklassen unterteilen. Im Menschen sind bisher zwei *MDR*-Gene identifiziert worden, welche der Klasse I (*MDR1*) und III (*MDR2*) zugeordnet werden. Für eine Mehrfachresistenz gegenüber zytotoxischen Verbindungen, die auf einem verstärkten auswärtsgerichteten Transport der Substrate beruht, sind P-Glykoproteine der Klasse I, also im Menschen das *MDR1*-Protein verantwortlich^{37,180}.

1.2.1 Struktur und Topologie

Das P-Glykoprotein ist ein membranständiges Protein mit einer Länge von ca. 1280 Aminosäuren, das aus 2 Hälften mit je 6 transmembranären Domänen besteht. In

jeder Hälfte ist im zytoplasmatischen Teil eine ATP-Bindungsstelle lokalisiert ³⁶. Zwischen den Hälften befindet sich die sogenannte „Linker Region“ ⁸⁵ (Abb. 1).

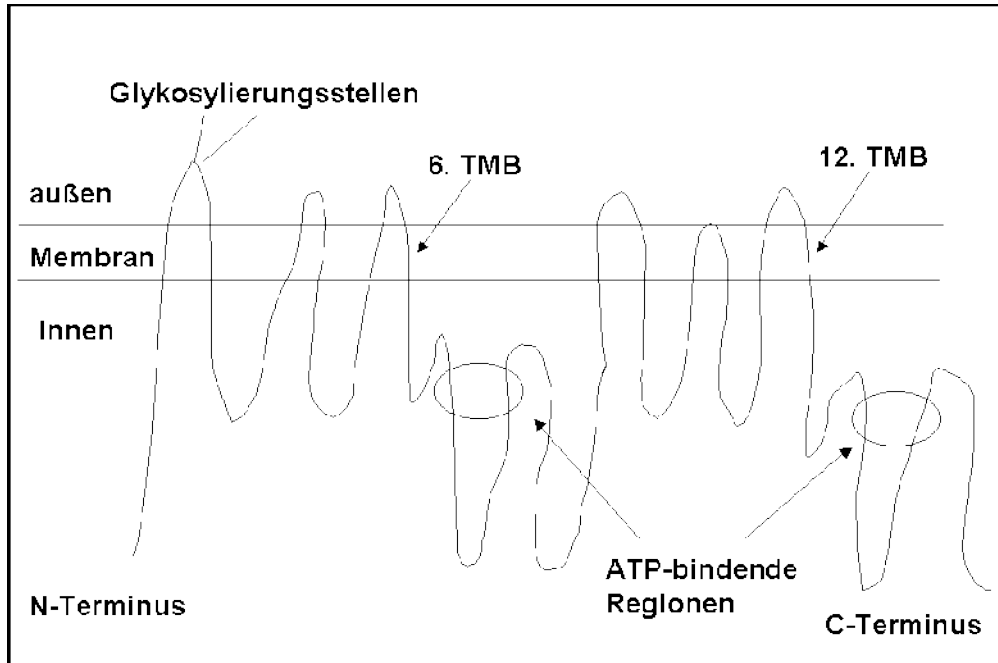


Abb. 1: Modell des humanen MDR1-P-Glykoproteins ⁸⁶. TMB = Transmembrandomäne.

Aufgrund ihres Intron- / Exonmusters geht man davon aus, dass die beiden Hälften wahrscheinlich nicht durch Genduplikation, sondern durch Fusion verwandter Gene entstanden sind ³⁸. Anhand von Photoaffinitätsstudien konnte gezeigt werden, dass Pgps zwei Substratbindungsregionen besitzen, die vermutlich im Bereich der sechsten und zwölften oder in den jeweils C-terminal folgenden zytoplasmatischen Domänen lokalisiert sind ^{23,89}. In Deletionsanalysen führten Mutationen der ersten zytoplasmatischen und der sechsten transmembranären Domäne zu einer Beeinflussung der Substratspezifität der Transportproteine, was für eine wichtige Rolle dieser Bereiche in der Substraterkennung spricht ^{46,53}. Neben zwei bis drei Glykosylierungsstellen im extrazellulären Bereich der N-terminalen Proteinhälfte weisen P-Glykoproteine in der Linker Region determinierte Phosphorylierungsstellen auf. An diesen Zielsequenzen können sie durch verschiedene Kinasen wie die Proteinkinase C und die cAMP-abhängige Proteinkinase A phosphoryliert und damit in ihrer Aktivität moduliert werden ⁹². Untersuchungen mit dem Phorbolester TPA, welcher die Pgp-Phosphorylierung stimuliert, zeigten, dass nach Inkubation verschiedener mehrfachresistenter Zelllinien das Resistenzniveau anstieg ⁷². Im

Gegensatz dazu vermochten Proteinkinase-Inhibitoren wie Staurosporin die Phosphorylierung zu vermindern und so den Transport negativ zu beeinflussen¹³.

1.2.2 Mechanismus und Regulation des MDR1-vermittelten Transports

Die klassische Vorstellung des P-Glykoproteins ist die eines in der Membran kanalartig angeordneten Proteins, welches in der Lage ist, Zytostatika und andere Substrate aus dem Inneren der Zelle herauszupumpen und so die Konzentration in der Zelle auf ein nicht toxisches Maß zu reduzieren⁶⁴. Das zur Zeit nach biochemischen und genetischen Studien favorisierte Modell für den MDR1-vermittelten Transport ist jedoch das des „hydrophoben Staubsaugers“⁸⁷. Es geht davon aus, dass amphiphile Substrate nach Insertion in der Zytoplasmamembran aus dieser durch Pgp ausgeschleust werden. Exogene Transportsubstrate könnten so einem Efflux unterliegen, ohne zuvor das Zytoplasma zu erreichen; sowohl der Substratinflux als auch der Substratefflux wäre vermindert. Determinanten der Substratspezifität sind in diesem Modell primär die Lipophilie und somit die Fähigkeit der Substanzen, in die Lipiddoppelschicht zu interkalieren und erst sekundär ihr Vermögen, mit der Substratbindungsregion des Transporters in Wechselwirkung zu treten. Sehr lipophile Moleküle wären hingegen dem Pgp-vermittelten Transport schwerer zugänglich, da sie die Membran zu schnell passieren⁶⁸.

Im „flippase“-Modell interagieren die Substrate an der inneren Seite der Plasmamembran mit den Pgps. Die Transporter klappen dann zur äußeren Seite, wo die Substrate in den Extrazellulärraum diffundieren⁹⁶.

Als gesichert gilt, dass der MDR1-vermittelte Substratefflux aktiv unter Hydrolyse von ATP erfolgt, da Mutationen im Bereich der ATP-Bindungsregionen zu einem Verlust der Transportfunktion führen¹⁰ und der Transport durch den ATP-ase Inhibitor Vandalat sowie durch nicht hydrolysierbare ATP-Analoga hemmbar ist¹⁰⁰.

1.2.3 Gewebeverteilung und physiologische Funktionen von P-Glykoproteinen

Im Menschen werden P-Glykoproteine der Klasse III, also des MDR2-Typs, in den Parenchymzellen der Leber exprimiert²⁰². Hier scheinen sie eine essentielle Bedeutung für die Exkretion von Phosphatidylcholin in die Galle zu besitzen¹⁸⁵. Ihre Funktion in anderen Organen ist bisher nicht geklärt worden.

MDR1-Pgps finden sich auf der luminalen Oberfläche von Epithelzellen verschiedener humaner Gewebe und Organe wie der Leber, Niere, Pankreas und dem Dünn- und Dickdarm⁶⁶. Darüber hinaus wurde bei der Maus eine MDR1-Expression in der Plazenta, in sekretorischen Drüsen und dem Endometrium nachgewiesen, was für eine Beteiligung an der physiologischen Steroidsekretion spricht⁴³. Zudem findet sich eine physiologische Pgp-Expression in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke²²². Hier könnte Pgp, wie auch in der Plazenta, eine wichtige physiologische Schutzfunktion wahrnehmen^{67,117}.

Pgps vom MDR1-Typ vermitteln nicht nur den Transport von Zytostatika. Zu ihren Substraten zählen verschiedene strukturell unterschiedliche Substanzen einschließlich toxischer Peptide wie Gramicidin D, Valinomycin und N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal (ALLN)¹⁹⁴, Digoxin²¹⁷, Opiaten²⁶ sowie polyzyklischen Kohlenwasserstoffen wie Benzo(a)pyren²⁴⁵. Dieses Substratspektrum spricht für eine physiologische Funktion des Pgp bei der Eliminierung von Xenobiotika und/oder einiger endogener Metaboliten. Zusätzlich werden der Transport von Nukleotiden¹³² und Peptiden¹⁹⁵ sowie die Regulation des epithelialen Zellvolumens durch eine postulierte Chloridkanalaktivität von Pgp diskutiert²³⁰.

Auch in humanen hämatopoetischen Stammzellen konnten Pgp-Expression und -Funktion nachgewiesen werden. Die Pgps tragen als physiologischer Schutzmechanismus maßgeblich zur Chemoresistenz dieser Zellen bei³¹. Einige mononukleäre Zellen wie T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen (NK Zellen) zeigten ebenfalls eine Pgp - Expression¹¹⁹.

1.2.4 P-Glykoproteine als Resistenzdeterminanten

Bei der AML korreliert eine hohe MDR1-Expression in vielen Fällen mit einer schlechten Prognose, da durch die erhöhte Pgp-Transportaktivität offensichtlich keine ausreichend hohen Konzentrationen an zytostatisch wirksamen Substanzen in den Tumorzellen mehr erreicht werden können^{29,28}. Nach initial erfolgreicher zytostatischer Behandlung erfolgt häufig eine Überexpression des Pgps, stimuliert durch den zytotoxischen Stress. In einigen Fällen wird aber auch eine intrinsische Zytostatikaresistenz beobachtet, obwohl sich die Leukämiezellen von physiologisch nicht oder nur wenig MDR1-exprimierenden Zelltypen ableiten⁸⁷. Hier wird diskutiert, ob die maligne Transformation selbst zu einer Aktivierung des MDR1-Genes führt⁸⁷. An einer transkriptionellen Regulation der MDR1-Genexpression sind dabei möglicherweise veränderte Suppressorgene und/oder Onkogene beteiligt⁴¹.

1.3 Möglichkeiten zur Modulation einer Pgp-vermittelten Mehrfachresistenz

Ziel vieler Studien zur Multidrug Resistance von Tumorzellen ist es, klinisch praktikable Möglichkeiten zu finden, die Mehrfachresistenz von malignen Tumoren therapeutisch zu umgehen. Einige Ansätze sind die alternierende Verwendung einer möglichst großen Anzahl verschiedener zytostatischer Verbindungen in höchstmöglicher Dosierung, der Einsatz von Hochdosis-Chemotherapien mit anschließender Knochenmarkstransplantation¹⁸ sowie die Verwendung von Zytostatika, welche in Liposomen²²³ oder über Nanospheren transportiert werden⁴⁷. Im experimentellen Stadium befinden sich *in vitro* Ansätze mit monoklonalen, Toxin-gekoppelten oder freien anti-MDR1 Antikörpern⁷³, eine Herabregulation der Resistenz durch Transfektion mehrfachresistenter Zellen mit MDR1-spezifischen Antisense-Oligonukleotiden oder eine enzymatische Spaltung der MDR1-mRNA^{60,116}. Der klinische Einsatz dieser Ansätze wird jedoch vor allem durch Wechselwirkungen mit der nicht-Tumor-assoziierten, physiologischen P-Glykoprotein-Expression limitiert.

1.3.1 Kompetitive Hemmstoffe

Viele von ihrer Struktur und pharmakologischen Wirksamkeit her sehr heterogene Substanzen sind in der Lage, die Pgp-Funktion zu hemmen und somit eine wirksame Akkumulation von Zytostatika in mehrfachresistenten Zellen zu ermöglichen^{201,128}. Diese auch als „Chemosensitizer“ bezeichneten Verbindungen verhindern zumeist als nicht-zytotoxische kompetitive Hemmstoffe die Interaktion der Zytostatika mit den Bindungsstellen des Transportproteins¹⁸⁶ (Tab. 3).

<u>Calciumkanalblocker</u>	<u>Immunsuppressiva</u>	<u>Quinoline</u>
Verapamil	Ciclosporin	Chloroquin
Nifedipin	Tacrolimus (FK506)	Quinidin
Bepriidil	Rapamycin	Quinin
Nicarpidin	PSC-833	
<u>Calmodulinantagonisten</u>	<u>Antibiotika</u>	<u>Andere</u>
Trifluoperazin	Rifampicin	Reserpin
Chlorpromazin	Tetracyclin	Yohimbin
trans-Flupenthixol	Cefoperazon	Amiodaron
		Dipyridamol
		Terfenadin
<u>Steroidale</u>	<u>Detergentien</u>	
Progesteron	Cremophor-EL	
Tamoxifen	Solutol HS 15	
RU-486		

Tab. 3: Substanzen, welche die Pgp-Funktion modulieren⁶⁵.

Trotz der Vielfalt an potentiellen Inhibitoren sind bisher nur wenige klinische Studien bekannt, in denen Chemosensitizer in vivo zu einer Modulation von mehrfachresistenter Tumoren geführt haben. In vielen Fällen begrenzten die starken systemischen Nebenwirkungen bei den notwendigen Hemmkonzentrationen den Einsatz. Verapamil beispielsweise zeigte in relevanter anti-MDR1 Konzentration eine starke Kardiotoxizität¹⁶⁴. Ein Lösungsansatz besteht nun in der Entwicklung von Substanzen, deren Wirkqualität sich auf die Pgp-Inhibition beschränkt und somit unerwünschte pharmakologische Effekte vermeidet. Zu der Gruppe neuerer Verbindungen gehört das Ciclosporin A -Analogon PSC-833, welches eine erheblich

geringere immunsuppressive Wirkung als die Muttersubstanz aufweist¹⁰⁸. Der klinische Einsatz von Chemosensitizern wird vor allem durch ihre Interaktion mit P-Glykoproteinen in gesunden Geweben begrenzt¹²⁶.

1.3.2 Assoziation von MDR1-vermittelter Multidrug Resistance und der Cyclooxygenase-2

Es gibt immer mehr Hinweise, dass die Regulation der MDR1-Expression mit einer verstärkten Expression der Cyclooxygenase 2 (COX 2) assoziiert sein könnte. Aktuelle Studien zeigen, dass es in frühen Phasen der Darm- und Leberkrebsentwicklung, wo in vielen Fällen eine intrinsische Aktivierung des MDR1-Gens und somit eine primäre Resistenzausprägung beobachtet wird, auch zu einer Überexpression der COX-2 kommt. RATNASINGHE et al. konnten 2001 eine Koexpression von MDR1- und COX-2-mRNA in einer immunhistochemischen Studie an humanen Brustkrebstumorproben nachweisen¹⁷¹.

In primären Rattenhepatozyten konnte 2002²⁵⁴ eine Assoziation zwischen COX-2-Aktivität und der Induktion einer funktionell aktiven *mdr1b* (als Homolog zur humanen MDR1-Isoform) -Überexpression gezeigt werden. Eine selektive Inhibition der COX-2 durch COX-2-präferentielle oder -spezifische Inhibitoren wie Meloxicam oder NS 398 reduzierte die *mdr1b*-mRNA-Expression sowie die *mdr1b*-abhängige Transportaktivität. Weiterhin war die *mdr1b*-Expression durch Arachidonsäure als Substrat und durch PGE₂ und PGF_{2α} als tumorrelevante Produkte des Arachidonsäuremetabolismus induzierbar (Abb. 2).

In Mesangiumzellen der Ratte kam es zu einer konzentrationsabhängigen Induktion der *mdr1b*-Genexpression und zur Steigerung der *mdr1*-abhängigen Transportaktivität nach einem Adenovirus-vermittelten Gentransfer des COX-2-Gens¹⁶³. Dieser Effekt war durch Behandlung der Zellen mit dem COX-2-spezifischen Inhibitor NS398 hemmbar, was wiederum für eine Assoziation zwischen COX-2-Expression und funktioneller MDR1-Expression spricht.

Auch in der AML-Zelllinie HL-60 sowie in primären AML-Blasten konnte in vorhergehenden Versuchen eine Coexpression von MDR1- und COX-2-mRNA nachgewiesen werden. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass eine Behandlung der Zellen mit Doxorubicin einen Anstieg der COX-2 mRNA-Expression, der COX-2 Protein-Expression und der PGE₂-Produktion als ein COX-2 Produkt verursachte. Eine 24-stündige Vorinkubation der Zellen mit Meloxicam konnte eine Induktion der Pgp-Expression und -Funktion durch DOX signifikant vermindern. MTT-Assays zeigten, dass die Vorinkubation mit Meloxicam die Effektivität von DOX deutlich verbessern konnte. Im Gegensatz zu HL-60 und primären Blasten zeigte Meloxicam in gesunden Lymphozyten und Monozyten bzw. gesunden CD34+ Stammzellen keinen modulierenden Effekt. Offensichtlich besteht eine Assoziation zwischen MDR1 und COX-2 bei der AML im Kindesalter¹⁶⁹.

1.4 Die Cyclooxygenase

Die Cyclooxygenase ist das Schlüsselenzym der Eicosanoid-Biosynthese. Sie katalysiert als Membranprotein die Umwandlung der aus Membranphospholipiden freigesetzten Arachidonsäure in cyclische Endoperoxide. Im ersten Schritt, der so genannten Cyclooxygenase-Reaktion, wird durch Bisoxigenierung von Arachidonsäure Prostaglandin G₂ (PGG₂) gebildet, welches im zweiten Schritt, der Peroxidase-Reaktion, zu dem Hydroxy-Endoperoxid Prostaglandin H₂ (PGH₂) reduziert wird. PGH₂ ist Ausgangssubstanz für Verbindungen mit mannigfaltigen physiologischen Funktionen wie Prostacycline, Prostaglandine und Thromboxane, welche wiederum durch spezifische Synthasen gebildet werden⁹⁷ (Abb. 2).

Seit etwa 15 Jahren bekannt sind zwei Isoenzyme der Cyclooxygenase, die Cyclooxygenase-1 (COX-1) und die Cyclooxygenase-2 (COX-2). Sie werden ergänzt durch die neuerdings beschriebene Cyclooxygenase-3 (COX-3), welche eine Variante der COX-1 darstellt und v.a. im cerebralen Cortex und im Herzen exprimiert wird³⁰. Die COX-Enzyme sind glykosylierte integrale Membranproteine, die in der luminalen Oberfläche des endoplasmatischen Reticulums (ER) und der inneren und äußeren Kernmembran lokalisiert sind. Die COX-2 ist vor allem in der Kernmembran zu finden²⁰⁵.

1.4.1 Physiologische Funktionen der Cyclooxygenase

Die COX-1 bewirkt als konstitutiv exprimiertes Enzym die physiologische Synthese von Prostanoiden z.B. in der Niere, dem Magen, glatten Muskelzellen und Blutplättchen¹⁵⁶. Sie wird auch als „housekeeping enzym“ bezeichnet und besitzt eine zentrale Funktion in der Protektion der Magen-Darm-Schleimhaut, der Regulation der Nierendurchblutung oder auch der Thrombozytenaggregation und Blutflussregulation durch direkten Einfluss auf die Gefäßweite⁷⁴.

Die COX-2 ist ein durch verschiedene Faktoren schnell induzierbares Enzym, dessen Expression unter pathophysiologischen Bedingungen wie Entzündungen, Schmerzreaktionen und anderen Gewebeschädigungen extrem hochreguliert wird^{122,204}. Darüber hinaus wird die COX-2 im Rahmen verschiedener physiologisch bedingter Adaptationsvorgänge, z.B. bei der Wundheilung oder im Uterus bei der Nidation, vermehrt gebildet. Es findet sich jedoch auch eine konstitutive Expression von COX-2, im Besonderen in Gehirn, Rückenmark¹⁷ und Niere⁹⁴ sowie in einer Vielzahl weiterer Organe^{243,157}. Die essentielle Bedeutung dieser Expression wurde durch die Tatsache untermauert, dass COX-2-Knockout Mäuse an Nierenversagen starben^{55,142}. Sie litten zudem an kardialer Fibrose und waren unfruchtbar⁵⁶. Die Funktion der COX-2 im Gehirn ist noch weitestgehend ungeklärt, es gibt Hinweise für einen steuernden Einfluss auf die synaptische Transmission und das „Remodelling“¹⁷⁷.

1.4.2 Regulation der COX-2 Expression

Die COX-2 reagiert sehr viel empfindlicher auf intrinsische und extrinsische Stimuli als die COX-1²⁴⁴. Die Promotorregionen des COX-2-Gens enthalten neben der TATA-Box eine E-Box und Bindungsstellen für Transkriptionsaktivatoren wie CRE (cAMP Response Element), NFκB und NF-IL6/CCAAT-Enhancer-Binding-Protein (NF-IL6/CEBP). Diese Sequenzen bewirken nachweislich eine Hochregulation der Gentranskription der COX-2 in den unterschiedlichsten Zelltypen¹⁰⁵.

Zytokine wie Tumornekrose-faktor α (TNF α), Interleukin (IL)-1, reaktive Sauerstoffspezies, Mitogene und Wachstumsfaktoren können im Rahmen von Gewebeschädigung und Entzündungen eine Hochregulation der COX-2-Expression induzieren (Abb. 2). Diese Induktion wird u.a. durch Glucocorticoide und antiinflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-10 und IL-13 gehemmt^{153,159}. Es wird vermutet, dass PGE₂ konzentrationsabhängig mittels eines cAMP-abhängigen Mechanismus eine Hochregulation von COX-2-mRNA-Expression in Makrophagen verursacht. Auch in Prostatakarzinomzellen wurde eine Hochregulation von COX-2 durch ihr Produkt PGE₂ beobachtet²²⁷. Somit könnte PGE₂ das Ausmaß der COX-2-Genexpression via eines autokrinen „feed-forward“ Mechanismus kontrollieren⁹⁸. Andererseits gibt es ebenfalls Hinweise darauf, dass PGE₂ antiinflammatorische Effekte in Makrophagen besitzt, beispielsweise durch die Verminderung der Produktion von zytotoxischen Stickoxid (NO)-Radikalen⁴⁸ und proinflammatorischer Zytokine wie TNF α und IL-1^{11,104}. Offensichtlich spielt hier die PGE₂-Konzentration eine entscheidende Rolle. Zusammenfassend scheint das COX-2-Produkt PGE₂ eher ein Modulator als ein Mediator von Entzündungsvorgängen zu sein²³⁷.

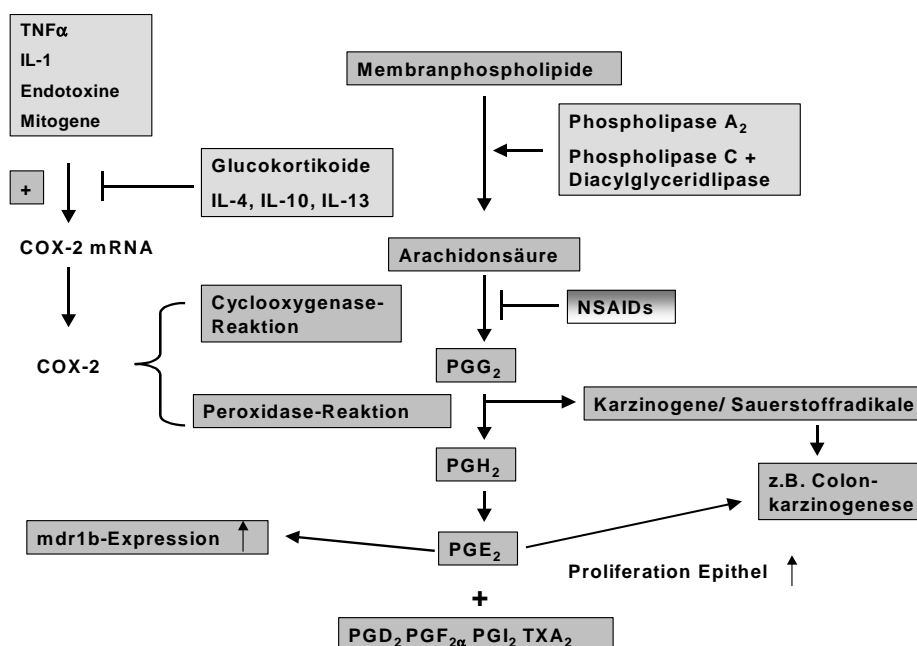


Abb.2: Regulationsmechanismen des COX-2 katalysierten Arachidonsäuremetabolismus.

1.4.3 Bedeutung der Cyclooxygenase-2 bei malignen Erkrankungen

Eine verstärkte Expression der COX-2 ist in einer großen Vielzahl von verschiedenen malignen soliden Tumoren sowie in vielen Präkanzerosen nachgewiesen worden^{199,158,176,187,51}. Sie wird mit der Karzinogenese, der Tumorinvasion, der Angiogenese, dem metastatischem Potential sowie der Proliferation und Differenzierung der Tumorzellen in Verbindung gebracht. Auch in Leukämien ist eine erhöhte COX-2-Expression nachgewiesen worden¹⁴⁶; Prostaglandine spielen hier eine wichtige Rolle für die Proliferation und Differenzierung der malignen Zellen. Diese Beobachtungen scheinen den Effekt von Onkogenen, Wachstumsfaktoren und Tumorpromotoren, welche alle als Induktoren der COX-2 gelten, widerzuspiegeln^{197,213,246}. Der Wildtyp des Tumorsuppressorgens p53 unterdrückt die Transkription von COX-2, was dafür spricht, dass der p53-Status ebenfalls eine Determinante der COX-2-Expression ist²¹¹. Dagegen scheint das Fehlen einer COX-2-Expression einen protektiven Effekt in der Karzinogenese zu haben. TIANO et al.²²⁶ zeigten, dass COX-2-Knockout Mäuse 75% weniger chemisch induzierte Hautpapillome entwickelten als die Kontrollgruppe.

1.4.3.1 Bildung von Mutagenen durch die COX-2

Durch die COX-2 können Prokarzinogene zu DNA-bindenden Karzinogenen aktiviert werden²³⁸. Die Peroxidase-Funktion der COX-2 ist im Gegensatz zur Cyclooxygenase-Reaktion relativ unspezifisch und kann daher auch Elektronendonatoren wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Aflatoxine, halogenierte Pestizide, aromatische Amine und Phenole in ihre karzinogene Form überführen¹²⁷. Dieses geschieht vor allem in Geweben mit geringer Expression von Cytochrom P 450 Enzymen wie dem Colon und wahrscheinlich auch in der Lunge und der Mundschleimhaut, welche Karzinogenen im Tabakrauch ausgesetzt sind. Darüber hinaus wird die COX-2-Expression durch einige Prokarzinogene induziert. Benzo[a]pyren beispielsweise ist in der Lage, die Transkription von COX-2 zu stimulieren¹¹⁴.

1.4.3.2 Apoptose und COX-2

In prämaligen und malignen Neoplasien ist die Apoptoserate vermindert. Einer der vielen an der Apoptose beteiligten Faktoren ist das BCL2-Gen, welches mit steigender Expression zur Inhibition der Apoptose führt. Intestinale Epithelzellen der Ratte, in denen eine Überexpression von COX-2 induziert wurde, zeigten gleichzeitig eine hohe BCL2-Expression und waren so resistent gegen Butyrat-induzierte Apoptose. Diese Resistenz konnte durch Behandlung mit dem „non-steroidal antiinflammatory drug“ (NSAID) Sulindacsulfid aufgehoben werden ²²⁹.

Das bei DNA-Schäden vermehrt synthetisierte p53 hat u.a. die Funktion, den Übergang in die S-Phase des Zellcyclus zu hemmen und über einen komplexen Signaltransduktionsweg zur Apoptose zu führen. Der Wildtyp dieses Tumorsuppressorgens unterdrückt auch die Transkription von COX-2, was dafür spricht, dass der p53 - Status ebenfalls eine Determinante der COX-2-Expression ist ²¹².

1.4.3.3 Entzündung und Immunsuppression

Das Wachstum maligner Tumoren führt sehr häufig zu einer Immunsuppression ¹². Die Koloniebildung stimulierende Faktoren, welche von den Tumorzellen freigesetzt werden, aktivieren die PGE₂-Synthese in Monozyten und Makrophagen, was die Produktion immunregulatorischer Lymphokine, T-Zell- und B-Zell-Proliferation und die Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen (NK Zellen) inhibiert. Auch die Produktion von Tumornekrose-faktor α (TNF α) kann durch PGE₂ gehemmt werden, während es die Produktion von Interleukin 10 (IL-10) induziert, welches immunsuppressive Wirkung besitzt ¹¹². Eine selektive Hemmung der COX-2 scheint zur Herstellung eines Gleichgewichtes zwischen IL-10 und IL-12 zu führen ²¹⁰. PLESCIA et al. ¹⁶⁶ zeigten bereits 1975, dass COX-Inhibitoren immunmodulierend wirken und eine Tumor-vermittelte Immunsuppression vermindern.

1.4.4 COX-2-Inhibitoren in der Krebsprävention und Krebstherapie

Verschiedene Studien konnten eine positive Wirkung von COX-2-Inhibitoren auf maligne Erkrankungen *in vitro* und *in vivo* nachweisen²²⁵ :

- Colonkarzinom²¹⁵ (Meloxicam)⁸²
- Adenomatöse Polyposis²⁰⁸
- Pankreaskarzinom¹²⁰
- Leukämie¹⁴⁷
- Prostatakarzinom^{101,206}
- Magenkarzinom²⁵⁰
- Karzinome im Mundraum²¹⁴

In diesem Zusammenhang werden auch COX-unabhängige Mechanismen der selektiven COX-2-Inhibitoren diskutiert^{135,247}. Es wurden jedoch in Tumorzellen, die keine COX-2 exprimieren, sehr hohe Konzentrationen eines selektiven COX-2-Inhibitors zur Hemmung des Wachstum benötigt, so dass eine therapeutische Relevanz von COX-unabhängigen Effekten der NSAIDs fraglich bleibt^{134,239}.

COX-2-Inhibitoren wirken sich nicht nur in Monotherapie günstig aus. In verschiedenen Studien zeigte sich, dass COX-2-Inhibitoren ein vorteilhafter Kombinationspartner für konventionelle Zytostatika sein können. JTE-522 zeigt *in vitro* und *in vivo* bereits allein eine signifikante Inhibition der Proliferation von humanen Lungenkrebszellen. Durch die Kombination mit Docetaxel und Vinorelbin wurde die IC50 dieser und weiterer getesteter Zytostatika *in vitro* um 70 % und *in vivo* um 65-55 % reduziert⁹⁵. Durch den Einsatz von Indomethacin konnte eine Wirkungsverstärkung von Vincristin (VCR) / Doxorubicin (DOX) in humanen Lungenkrebszellen erreicht werden¹¹⁸.

Bislang konnte nicht vollständig geklärt werden, welche Mechanismen diesen verstärkenden Effekten der COX-2-Inhibitoren auf die Zytostatika-Wirkung zugrunde liegen. Möglich sind u.a. eine direkte additive oder auch synergistische Wirkung der

COX-2-Aktivität auf Apoptose-induzierende Signaltransduktionswege, ein indirekter Effekt über höhere intrazelluläre Wirkspiegel der Chemotherapeutika durch Hemmung der MDR1-Expression oder auch ein COX-2-unabhängiger Effekt der Inhibitoren.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ein entscheidender Mechanismus, der bei Kindern mit einer akuten myeloischen Leukämie zu einem verminderten Therapieansprechen führt, ist die Ausprägung eines „Multidrug Resistance“ (MDR)-Phänotyps durch eine Überexpression von ABC-Transporterproteinen, v.a. dem MDR1-Protein. Das *MDR1*-Gen unterliegt einer Induktion durch die in der AML-Therapie verwendeten Anthracycline. Vorhergehende Studien demonstrierten eine regulative Verbindung zwischen der COX-2-Aktivität und der MDR1-vermittelten MDR in der AML-Zelllinie HL-60 und in primären Blasten. Obwohl zahlreiche Studien zeigen, dass es in malignen Erkrankungen mit einer intrinsischen Aktivierung des *MDR1*-Gens auch zu einer Überexpression der COX-2 kommt, ist über modulierende Faktoren der MDR1-Expression in Assoziation zur Prostaglandin-Synthese wenig bekannt.

Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es, weitere Daten bezüglich einer regulativen Beteiligung der COX-2 an der Ausprägung eines MDR1-Phänotyps in der AML zu sammeln und so mehr über den Signaltransduktionsweg einer möglichen COX-2-modulierten MDR-1-Expression zu erfahren. Eine Beteiligung der COX-2 an der MDR-1-Regulation ergäbe neue Möglichkeiten zur Resistenzintervention über COX-2-Inhibitoren.

Die vorliegenden Untersuchungen sollten Aufschluss geben über:

- Meloxicam als verstärkenden Faktor der zytostatischen Wirkung von Anthracyclinen in HL-60 Zellen sowie in primären Blasten
- die Modulationsmöglichkeiten des Resistenzverhaltens durch weitere COX-Inhibitoren

- die Wirkungen von Meloxicam auf die COX-2-Expression in HL-60 Zellen
- den Einfluss von PGE₂ auf die MDR1-Expression und -Transportaktivität
- Endoperoxidantagonisten als Modulatoren der DOX-Wirkung auf Zellproliferation und MDR1-abhängigen Transport bei HL-60 Zellen

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Die HL-60 Zelllinie wurde 1976 aus dem peripheren Blut einer 35 Jahre alten Frau etabliert, die an akuter myeloischer Leukämie FAB M2 litt ⁴⁹. Diese promyeloische AML-Zelllinie diente als Vergleichssystem für die Rhodamin 123 – Effluxstudien und die MTT-Tests.

2.1.2 Patientenmaterial

Aus zum Zeitpunkt der Diagnose bzw. zum Zeitpunkt eines Rezidivs frisch entnommenen bzw. aus eingesandtem, heparinisiertem Knochenmark und peripherem EDTA-Blut wurden die Lymphozyten und Monozyten isoliert. Die Proben wurden bis zu ihrer Untersuchung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Patient	1	2	3
Geschlecht	M	w	m
Alter (Jahre)	5,5	8,0	14,0
FAB-Klassifikation	M5	M2	M0
Zytogenetik	11q23-Aberration	kein Ergebnis	11q23-Aberration; 7q (+additional)
WBC/ μ l	238500	534600	130300
Blasten Knochenmark (%)	92	88	91
Risikogruppe	HR	SR	HR
Remission	CR	NR	NR
Rezidiv	Nein	ja	ja
Stammzelltransplantation	Allogen	allogen	nein
Overall-Survival (Jahre)	2,20	0,35	0,52

Tab. 4: Patientendaten. WBC = White Blood Cells, HR = Hoch-Risiko, SR = Standard-Risiko, CR = Complete Remission, NR = Nonresponder

2.1.3 Chemikalien und Biochemikalien

Alle im Folgenden nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Boehringer (Mannheim), Serva (Heidelberg) oder Pasel & Lorei (Frankfurt) mit dem Reinheitsgrad p.a., reinst oder ultrarein bezogen.

2.1.3.1 Zellkulturreagentien und Reagentien zur Gefrierpräparation

RPMI 1640 stammte von der Firma Life Technologies/Invitrogen GmbH (Karlsruhe), IMDM Kulturmedium von der Firma Bio Whittaker Europe (Verviers, Belgien). Fetales Kälberserum (FCS) wurde von der Firma Gibco/Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Das Dimethylsulfoxid (DMSO) „research grade“, welches für die Herstellung der Gefrierlösung verwendet wurde, stammte von der Firma Serva (Heidelberg).

2.1.3.2 Zytostatika

Doxorubicin (Adriblastin[®]) stammte von der Firma Pharmacia & Upjohn (Berlin), liposomales Daunorubicin (DaunoXome[®]) wurde von der Firma Gilead Sciences GmbH (Martinsried) bezogen.

2.1.3.3 Cyclooxygenase-Inhibitoren

NS 398 war von der Firma Calbiochem/Novabiochem (Darmstadt). Meloxicam wurde freundlicherweise von der Firma Boehringer (Mannheim) zur Verfügung gestellt.

Tenoxicam stammte von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim). DFU wurde von der Firma Merck and Co., Inc. (New Jersey, USA) bezogen.

2.1.3.4 Prednisolon

Prednisolon stammte von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim).

2.1.3.5 Inhibitoren und Aktivatoren des Prostaglandin-Stoffwechsels

Prostaglandin E2 und AH6809 waren von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim). Die Arbeiten mit AH23848B erfolgten in Kooperation mit Dr. Christina Ziemann (Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM), Hannover). AH23848B wurde freundlicherweise von der Firma GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG (München) zur Verfügung gestellt.

2.1.3.6 Lösungsmittel

Dimethylsulfoxid (DMSO) und Methanol waren von der Firma Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz). Ethanol wurde von der Firma Carl Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen. Dimethylformamid und Chloroform stammten von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim).

2.1.3.7 Pgp-Substrate

Zur Darstellung des MDR1-vermittelten Transports in den Efflux-Studien wurde der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 (Rho 123) von der Firma Sigma (Deisenhofen) eingesetzt. Das zur Modulation der Pgp-Funktion verwendete (\pm)-Verapamilhydrochlorid stammte von der Firma Sigma (Deisenhofen).

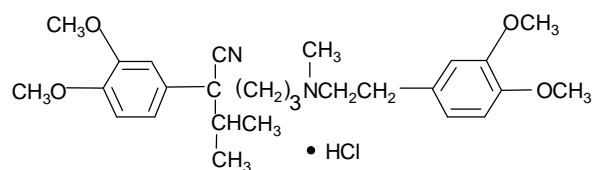


Abbildung 1: (\pm)-Verapamilhydrochlorid

2.1.3.8 Antikörper

Der monoklonale COX-2 Antikörper stammte von Cayman Chemical (Ann Arbor, USA). Syto-16 wurde von Molecular Probes Inc. (Leiden, Niederlande) bezogen. Die weiteren für die flowzytometrische (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorting) Analyse verwendeten Antikörper waren von der Firma Immunotech, Coulter Company Inc. (New Jersey, USA).

2.1.3.9 Chemikalien für die FACS-Analyse

Zum Betrieb des Flowzytometers wurde die FACS-Flüssigkeit FACSFlow™ der Firma Becton Dickinson (New Jersey, USA) eingesetzt. Die zum Spülen verwendete Natriumhypochlorid-Lösung stammte von der Firma Chemie-Vertrieb (Hannover). Aqua ad iniectabilia kam von der Apotheke der Universitätsklinik Münster.

2.1.3.10 Chemikalien für den MTT – Test

MTT (3-([4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dimethyltetrazoliumbromid)) wurde von der Firma Sigma (Deisenhofen) bezogen. PBS²⁻ Puffer (2-: ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) pH 7,4 stammte von der Firma Life Technologies GmbH (Karlsruhe). Für die Herstellung des Lysis Puffers wurden Dimethylformamid (DMF) und Natriumdodecylsulfat (SDS) von der Firma Sigma (Deisenhofen) sowie Aqua ad injectionem (Apotheke der Universitätsklinik Münster) verwendet.

2.1.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Zellkultur

Autoklav:	Vertikal-Autoklav: FV	Technomara (Fernwald)
Brutschrank:	Steri-Cult 3033	Forma Scientific (Marietta, USA)

Einwegartikel:	<u>Kulturflaschen</u> : 50ml, 250ml	Greiner Bio-One GmbH (Nürtingen)
	Röhre 15ml, steril	
	Röhre 50ml, steril 114x28mm	Sahrstedt (Nürnberg)
	<u>Pipetten serolog.:</u>	
	1ml, 5ml, 10ml, 25ml	Falcon (New Jersey, USA)
	<u>Kryoröhrchen</u> : 1,8 ml	Nunc (Kamstrup, Dänemark)
Mikroskope:	<u>Invertoskop</u> : ID 02	Zeiss (Oberkochen)
Pipetten:	Multipette	Eppendorf (Hamburg)
	<u>Pipette</u> :	
	Pasteurpipetten Glas 145mm	Brand
Sterilbank:	Biogard Hood B40-112	Baker Inc. (Sanford, Maine, USA)
Sterilfiltration:	<u>Filter</u> : 0,22µm	MembraPure (Bodenheim)
	<u>Spritze</u> : 5ml, 10ml	Dispomed (Gelnhausen)
Zählkammer:	Neubauer	Assistent
Zentrifuge:	Biofuge 15R Kühlzentrifuge	Heraeus Sepatech (Hannover)

FACS – Analyse

Messröhrchen:	12x7 mm, 5ml, Polystyrene	Falcon, BD (New Jersey, USA)
Flowzytometer:	FACS-Calibur	Becton Dickinson (USA)

MTT – Assay:

Einwegartikel:	<u>Zellkulturplatten:</u>	Falcon, BD (New Jersey, USA)
	96 Vertiefungen	
	<u>Combitips Plus:</u> 2,5ml, 5ml	Eppendorf (Hamburg)
ELISA-Reader:	Multiscan Ascent/35400588	ThermoLabsystems (Frankfurt)
Magnetrührer:	Ikamag [®] RLT	Janke & Kunkel, IKA – Werk (Staufen)

2.2 Methoden

2.2.1 Sterilisation von Materialien und Lösungen

Hitzebeständige Glas- und Plastikmaterialien sowie hitzebeständige Lösungen wurden im Autoklav für 25 Minuten bei 121°C sterilisiert. Nicht hitzestabile Lösungen wurden bei einer Porenweite von 0,22µm sterilfiltriert.

2.2.2 Kultur von HL-60 Zellen

Die Kultur der HL-60 Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Nach vorsichtigem Auftauen wurden sie mit einer Einmalpipette in ein Universaltube, das mit 30ml vorgewärmtem Zellkulturmedium (RPMI 1640 mit 10% FCS) gefüllt war, überführt. Das Tube wurde bei 200g und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand anschließend entfernt und die Zellen in Zellkulturmedium resuspendiert.

Bei unauffälligem Wachstumsverhalten und regelrechter Zellmorphologie konnten die Zellen nach etwa einer Woche den Experimenten zugeführt werden.

Die Generationszeit der HL-60-Zellen lag bei etwa 24h. Die Zellen wurden so geteilt, dass die Zelldichte während der Kultur 100.000 – 500.000/ml betrug. Kultivierte Zelllinien wurden alle 6-8 Wochen erneuert. Die Kultur wurde bei mycobakterieller Kontamination sowie bei nicht regelrechter Zellmorphologie verworfen.

Inkubator-Standardbedingungen waren eine Temperatur von 37°C bei 100% Luftfeuchte und 5% CO₂.

2.2.3 Isolierung von Lymphozyten und Monozyten aus Patientenmaterial

Die Isolierung von Lymphozyten und Monozyten erfolgte unter sterilen Bedingungen.

Zunächst wurde eine 1:3 Verdünnung mit IMDM (+ 10% FCS) vorgenommen und das Volumen u.U. soweit erhöht, dass es durch vier teilbar war. In einem 15ml-Tube wurden 4ml Blut-IMDM-Gemisch über 3ml Ficoll-Paque geschichtet. Anschließend wurde 20 Minuten bei 20°C und 450g ohne Bremse zentrifugiert. Die in der Interphase zwischen wässriger und organischer Phase angereicherten Monozyten und Lymphozyten wurden mit einer sterilen Pasteurpipette isoliert, mit IMDM (+ 10% FCS) auf 10ml aufgefüllt und ein weiteres Mal bei 20°C und 450g 10 Minuten mit Bremse zentrifugiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und das Pellet je nach Größe in 2 - 5ml IMDM (+ 10% FCS) resuspendiert. Anschließend wurde mit einer Neubauer-Kammer die Zellzahl bestimmt und der Zellgehalt der Suspension berechnet. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 20°C und 250g für 5 Minuten wurde der Überstand abgesaugt und die Zellzahl durch Resuspendierung in frischem Medium auf etwa 100 Mio./ml eingestellt.

Zur Herstellung der Gefrierlösung wurden 2 Teile IMDM mit 2 Teilen FCS und einem Teil DMSO (Dimethylsulfoxid) versetzt und anschließend durch einen Membranfilter mit der Porenweite 0,22µm sterilfiltriert.

In jedes Gefrierrohrchen mit 0,5ml Zellsuspension wurden 0,5ml Gefrierlösung pipettiert und die Röhren verschlossen. Zunächst wurden die Proben einige Tage bei -80°C , dann bis zur Bearbeitung in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.4 Durchflusszytometrie

2.2.4.1 Funktionsprinzip des Flowzytometers

Bei der Durchfluss- oder Flowzytometrie handelt es sich um ein Verfahren, das es ermöglicht, gleichzeitig physikalische und molekulare Parameter auf Einzelzellniveau zu messen.

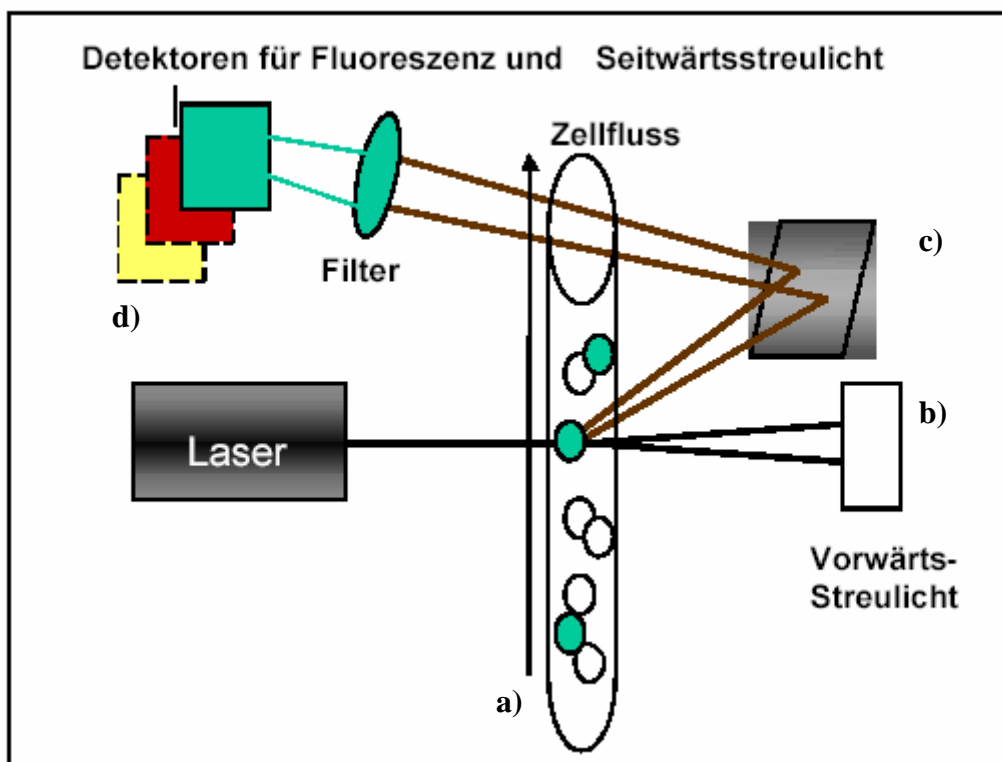


Abbildung 3: Prinzip der Flowzytometrie. a) Durchfluss von Zellen, die mit fluoreszierenden Antikörpern markiert wurden. b) Das Vorwärtsstreulicht gibt Informationen über die Zellgröße. c) Das totale Seitwärtsstreulicht liefert Informationen über die Granularität. d) Die Fluoreszenzdetektoren bestimmen die Fluoreszenz der einzelnen Zellen und damit die Bindung der fluoreszierenden Antikörper an das Antigen in oder auf der Zelle.

Durch den Einsatz von fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die gegen bestimmte Differenzierungsmoleküle auf der Zelloberfläche oder im Zytoplasma gerichtet sind, ist es möglich, die Expression von Molekülen auf oder in einer Zelle quantitativ zu bestimmen. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern in der Zelle. Für jede einzelne Zelle kann simultan die Laser-induzierte Fluoreszenz und auch die Lichtstreuung in Vorwärtsrichtung und seitlicher Richtung registriert werden. Anhand dieser Lichtstreuung werden sowohl Granularität als auch Größe der Zellen gemessen und die Signale in einem $x - y$ - Diagramm, dem Dotplot, dargestellt.

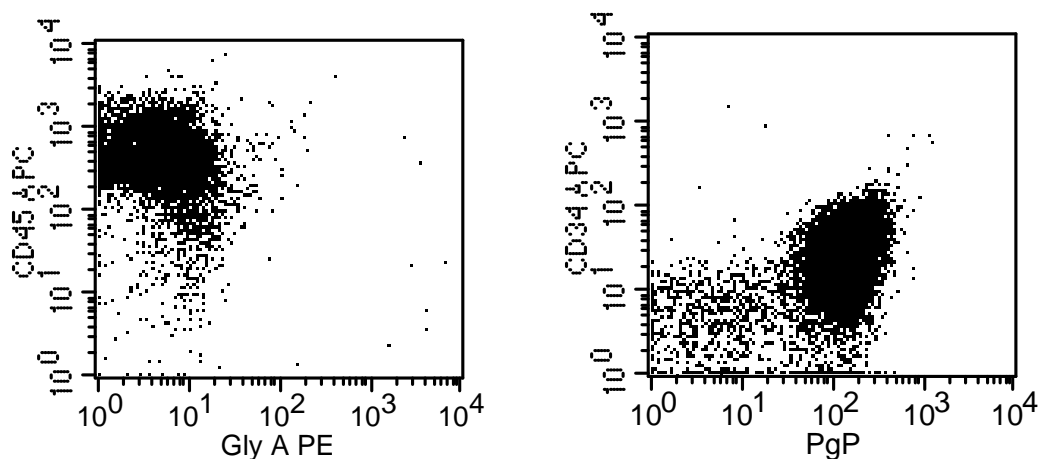
Eine gleichzeitige Messung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen. Das Analysegerät FACS-Calibur der Firma Becton Dickinson ist mit einem Argonlaser (488 nm) und einem zusätzlichen Laser zur APC-Bestimmung ausgestattet und ermöglicht die gleichzeitige Analyse von bis zu vier Farben.

Fluochrom	Absorptionsmaximum [nm]	Emmissionsmaximum [nm]	Abkürzung
Fluoreszein- Isothiozyanat	495	519	FITC
PE-Cy5	480; 565; 649	670	PCY5
PerCP	490	675	PerCP
Phytoerythrin	480; 565	578	PE
APC-Cy7	743	767	APC

Tab. 5: Absorptions- und Emmissionsmaxima von eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffen

Die Messung der Leukozyten-Differenzierungs-Antigene, welche nach dem CD-System (Cluster of Differentiation) festgelegt sind, erlaubt weitreichende Aussagen zu Funktion und Leistung der Zellen. Die Flowzytometrie ist ein grundlegender Bestandteil der Leukämie-Diagnostik. Durch sie können Krankheitstypen und Subtypen festgelegt sowie Blastenpopulationen identifiziert und quantifiziert werden. Ebenso erlaubt die Methode, Antigene verschiedener Proteine in oder auf den Zellen spezifisch nachzuweisen.

(a)



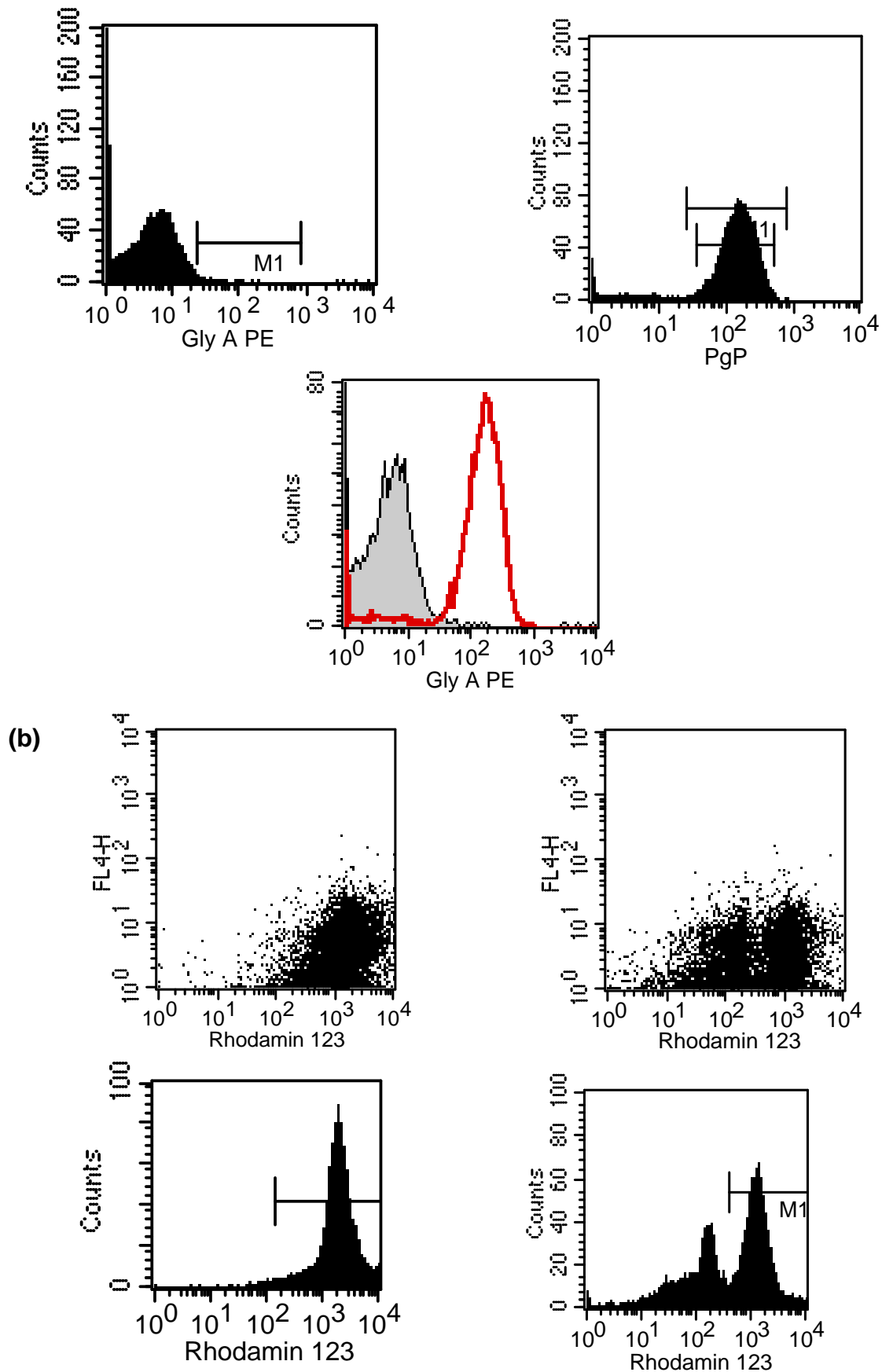


Abb. 4: (a) Darstellung einer flowzytometrischen Bestimmung des P-Glykoproteins. Darstellung im Dotplot und als Histogramm und Overlay gegen die Negativkontrolle (Glycophorin A). (b) Darstellung einer flowzytometrischen Bestimmung des Rho 123 – Effluxes. Darstellung im Dotplot und als Histogramm gegen den „Uptake“.

2.2.4.2 Flowzytometrischer Nachweis von P-Glykoprotein, COX-2 und anderen Antigenen

250µl Zellsuspension mit einer ungefähren Zelldichte von 2×10^6 /ml wurden mit Phytoerythrin gekoppeltem Pgp-Antikörper (moAB MRK 16) versetzt. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß wurde zweimal mit PBS-Puffer gewaschen.

Die Probe wurde anschließend mit dem FACS-Gerät FACS-Calibur der Firma Becton Dickinson gemessen, wobei pro Probe 10.000 Zellen erfasst wurden.

In gleicher Weise erfolgte der flowzytometrische Nachweis von COX-2 über den FITC gekoppelten COX-2-Antikörper.

PBS	
NaCl	136mM
KCl	2,68mM
Na ₂ HPO ₄	8,2mM
KH ₂ PO ₄	1,47mM
pH 7,4	

Für die Rhodamin 123-Efflux Studien wurden die Zellen in drei Röhrchen pro Messreihe mit folgenden zusätzlichen Antikörpern gefärbt, um die Rho 123 akkumulierenden, vitalen Zellen besser charakterisieren und die Blastenpopulationen identifizieren zu können:

- | | | | |
|-----------------|-----------------|--------------|-----------|
| 1.) Syto16 FITC | CD 7 PE | CD 45 PerCP | CD 34 APC |
| 2.) CD 36 FITC | GlycophorinA PE | Apo 2.7 PCY5 | CD 45 APC |
| 3.) | Pgp PE | CD 33 PCY5 | CD 34 APC |

Spezifität der Antikörper:

Syto 16: Vitalitätsmarker

CD 7: T-Zellantigen

CD 45: Leukozyten

CD 34: myeloische und lymphatische Vorläuferzellen

CD 36: Monozyten, Makrophagen, frühe erythroide Zellen

Glycophorin A: Erythropoese (dient hier als Negativkontrolle für die Pgp-Messung)

Apo 2.7: Marker zur Bestimmung später Apoptose

CD 33: Monozyten, myeloische Vorläuferzellen

2.2.4.3 Rhodamin 123 – Efflux Studien

Die MDR1-abhängige Transportaktivität wurde auf Grundlage des Auswärtstransportes von Rhodamin 123 (Rho 123) in Anlehnung an die Methode nach HUET et al. bestimmt ¹⁰³. Dieser Fluoreszenzfarbstoff, der sich spezifisch in Mitochondrien lebender Zellen anreichert, wurde erstmals von NEYFAKH (1988) als potentiell MDR1-Substrat beschrieben ¹⁵⁰. NARE et al. (1994) konnten anhand von Photoaffinitätsmarkierungsstudien mittels eines Azidosalicylsäurederivats des Rho 123 zeigen, dass Rho 123 direkt und spezifisch an P-Glykoproteine vom MDR1-Typ bindet ¹⁴⁸. Diese Bindung konnte durch Inkubation mit Verapamil als Hemmstoff des MDR1-vermittelten Transports unterbunden werden.

Zur Bestimmung der MDR1-abhängigen Transportaktivität wurde die Zellsuspension auf eine Konzentration von 2×10^6 /ml serumfreies RPMI 1640 eingestellt. Je 250µl dieser Suspension wurden auf folgende Ansätze verteilt: 2 Messröhrchen für die

„Uptake“-Kontrolle (UC) und die „Efflux“-Kontrolle (EC), 2 Röhrchen für den „Uptake“ von Rho 123 (UO) und den „Efflux“ von Rho 123 (EO) und 2 Röhrchen für den Rho 123-„Uptake“ unter Verapamil-Einfluss (UV) und den Rho 123-„Efflux“ unter Verapamil-Einfluss (EV).

Zunächst wurden 10µl PBS-Puffer in die Kontrollröhrchen UC und EC gegeben, 10 µl Verapamil-Lösung der jeweilig verwendeten Konzentration in die Tubes UV und EV. Danach wurden die Tubes UO, EO, UV und EV mit 5µl einer 5µM Rho 123-Lösung versetzt, homogenisiert und unter Lichtausschluß eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die „Uptake“ –Tubes UC, UO und UV bis zur Messung auf Eis gestellt. Gleichzeitig wurden die Tubes EC, EO und EV zweimal mit 4°C kaltem RPMI 1640 gewaschen und jeweils bei 4°C und 450g 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 250µl RPMI 1640 (37°C) aufgeschwemmt. Je 20µl PBS-Puffer wurden zu den Tubes EC und EO und nochmals Verapamil-Lösung zu dem Tube EV zugegeben und homogenisiert. Dann wurden diese Tubes eine weitere Stunde unter obigen Bedingungen inkubiert.

Parallel wurde immer ein Tube, welches neben anderen spezifischen Antikörpern Syto 16 enthielt, mit inkubiert, um nach der flowzytometrischen Messung die vitalen Zellen erfassen zu können (siehe 2.2.4.2)

2.2.4.3 Auswertung

Die Auswertung der flowzytometrischen Messungen erfolgte mit der Cellquest Pro[®] Software der Firma Becton Dickinson.

Die angegebenen Prozentwerte in den Ergebnissen der Protein-Bestimmung beziehen sich auf den Anteil der von allen in einer Messung erfassten, vitalen, also Syto 16-positiven Blasten, welche gleich 100% gesetzt wurden. Die quantitative Proteinexpression ergibt sich aus dem Anteil der vitalen Zellen, auf dem gebundene Fluoreszenz des Phytoerythrin (PE)-gekoppeltem Antikörpers nachgewiesen wurde. Als Negativkontrolle diente jeweils eine Färbung der gleichen Probe mit PE-

gekoppeltem Glycophorin A, welches Zellen der roten Reihe nachweist, die aber mittels der vorangegangenen Ficoll-Trennung ausgeschlossen waren.

Beim Rho 123-Efflux Assay wurden ebenfalls nur die vitalen, also Syto 16 positiven Zellen der Blastenpopulation in die Auswertung mit eingeschlossen. Der „Uptake“ von Rho 123 wurde so eingegrenzt, dass er mindestens 99% betrug. Der „Efflux“ war dementsprechend als 99% abzüglich dem nach der einstündigen „Efflux“-Zeit in den Blasten verbliebenen Teil des Rho 123 definiert.

2.2.5 MTT-Assay

Beim MTT-Assay handelt es sich um ein sensitives colorimetrisches Test-System, das auf der Reduktion eines gelben Tetrazoliumsalzes zu einem unlöslichem, blau-violetten Formazan-Farbstoffs in den Mitochondrien stoffwechselaktiver Zellen basiert.

Eine Vermehrung von vitalen Zellen bedingt einen Anstieg der Gesamtaktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen in der Probe. Diese Steigerung der Enzymaktivität führt zu einer wachsenden Menge von umgesetzten Formazan, die direkt mit der Zahl metabolisch aktiver Zellen in der Kultur korreliert. Der Farbstoff kann mit einem ELISA-Reader nach einer vorhergehenden Lyse gemessen werden.

2.2.5.1 Vorbereitung der Cyclooxygenase-Inhibitoren und von Prednisolon

Die verwendeten Cyclooxygenase-Inhibitoren und Prednisolon wurden in geeigneten Lösungsmitteln in entsprechenden Konzentrationen gelöst. Für das MTT-Assay wurde ein Eigeneffekt der Lösungsmittel durch Kontrolluntersuchungen ausgeschlossen (siehe 3.1).

Substanz	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung
DFU	DMSO	50mM
Etodolac	Ethanol	100mM
Indomethacin	DMSO	100mM
Meloxicam	DMSO	10mM
Nimesulid	Ethanol	100mM
NS 398	DMSO	318mM
Tenoxicam	Dimethylformamid	10mM
Prednisolon	Chloroform/Methanol 1:1	100mM

Tab. 6: Verwendete Cyclooxygenase-Inhibitoren und Prednisolon mit ihren Lösungsmitteln

2.2.5.2 Vorbereitung von Inhibitoren und Aktivatoren des Prostaglandin-Stoffwechsels

Prostaglandin E₂ wurde in Ethanol gelöst. Die Konzentration der Stammlösung betrug 15µg/µl. AH6809 wurde mit einer Konzentration von 10mM in DMSO gelöst. AH23848B wurde in DMSO gelöst. Die Konzentration der Stammlösung betrug 30mM.

2.2.5.3 Durchführung des MTT-Assays

Es wurden 3 Platten pro Test für die Messungen 24h, 48h und 72h nach Zugabe des Zytostatikums angesetzt.

Die Zellen wurden in Mikrotiterplatten mit der für die entsprechende Zelllinie bzw. den Patienten als optimal ermittelte Zellzahl pro Vertiefung ausgesät und unmittelbar darauf mit den unterschiedlichen Substanzen versetzt. Folgende Konzentrationen lagen in den Vertiefungen vor:

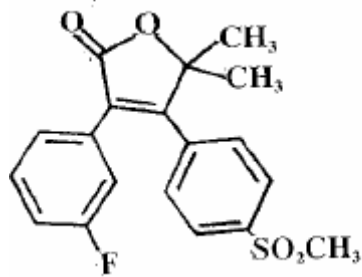


Abbildung 5: DFU

DFU: 0 μ M; 0,1 μ M; 1 μ M und 10 μ M

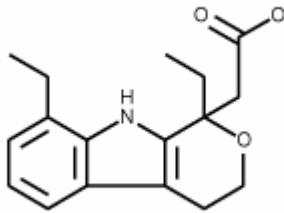


Abbildung 6: Etodolac

Etodolac: 0 μ M; 10 μ M; 30 μ M; 60 μ M und 100 μ M

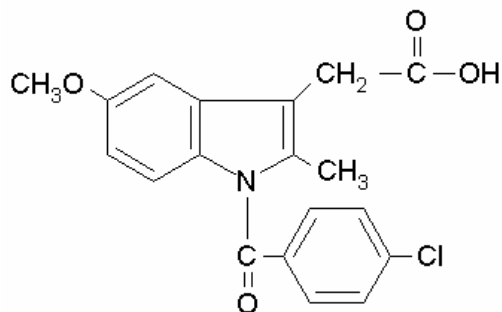


Abbildung 7: Indomethacin

Indomethacin: 0 μ M; 0,01 μ M; 0,05 μ M; 0,1 μ M und 1 μ M

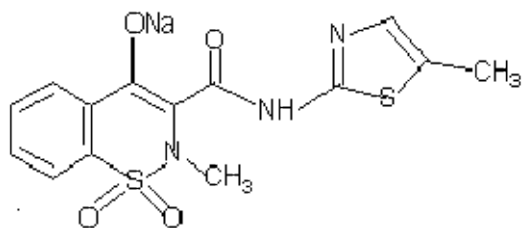


Abbildung 8: Meloxicam

Meloxicam: 0 μ M; 0,01 μ M; 0,1 μ M; 0,5 μ M und 1 μ M

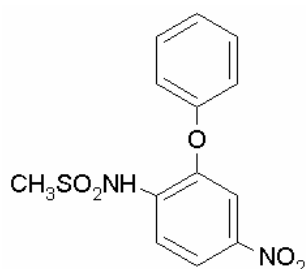


Abbildung 9: Nimesulid

Nimesulid: 0 μ M; 0,01 μ M; 0,1 μ M; 1 μ M; 10 μ M und 100 μ M

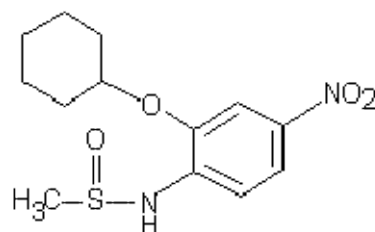


Abbildung 10: NS398

NS 398: 0 μ M; 20 μ M; 50 μ M und 100 μ M

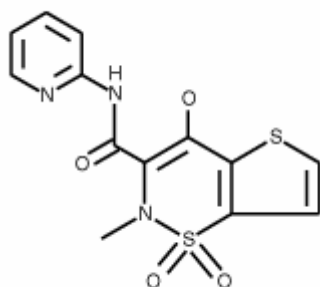


Abbildung 11: Tenoxicam

Tenoxicam: 0 μ M; 0,01 μ M; 0,1 μ M; 0,5 μ M und 1 μ M

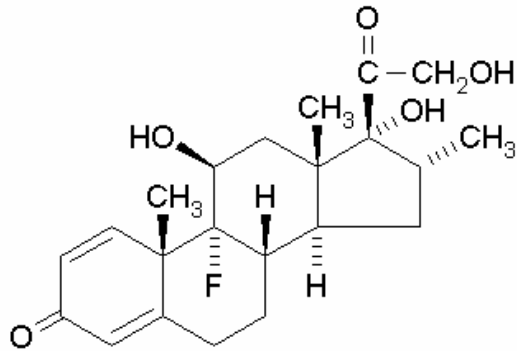


Abbildung 12: Prednisolon

Prednisolon: 0 μ M; 10 μ M; 50 μ M und 100 μ M

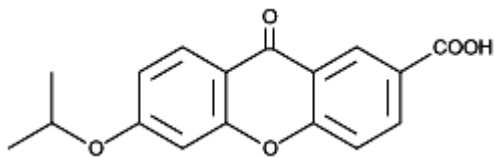


Abbildung 13: AH6809

AH6809: 0 μ M; 10 μ M; 20 μ M und 50 μ M. AH23848B: 1 μ M, 5 μ M und 10 μ M

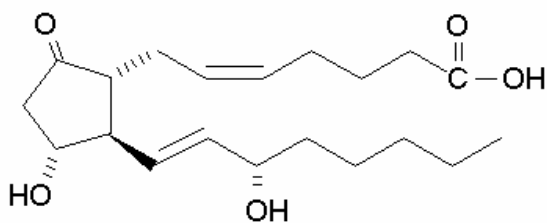


Abbildung 14: Prostaglandin E₂

Prostaglandin E₂: 0 μ g/ml und 3 μ g/ml

Nach 24 Stunden wurde das Zytostatikum zugegeben. Bei den Versuchen mit AH6809 erfolgte die Zugabe von Doxorubicin schon nach 2 Stunden.

Es wurden folgende Zytostatika-Konzentrationen eingesetzt:

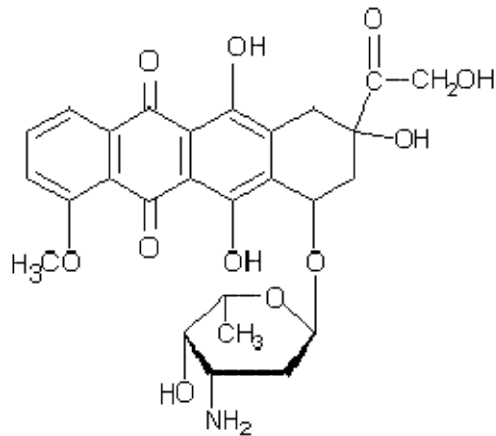


Abbildung 15: Doxorubicin (Adriablastin®). Doxorubicin wird in dieser Arbeit als DOX abgekürzt.

Doxorubicin (DOX): 0µg/ml; 0,0125µg/ml; 0,025µg/ml; 0,05µg/ml; 0,075µg/ml und 0,1µg/ml

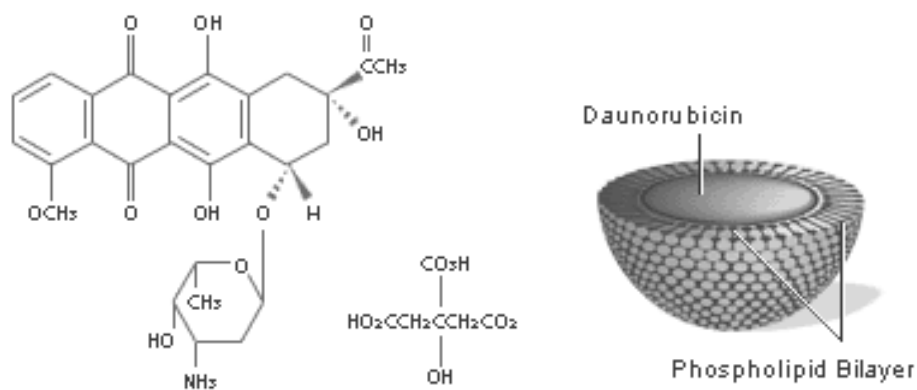


Abbildung 16: Liposomales Daunorubicin-Citrat (DaunoXome®). Liposomales Daunorubicin wird in dieser Arbeit als L-DNR abgekürzt.

Liposomales Daunorubicin (L-DNR): 0µg/ml; 0,0125µg/ml und 0,025µg/ml

Die Messungen erfolgten 24h, 48h und 72h nach Zugabe des Zytostatikums. Dazu wurde in jede Vertiefung 20µl MTT-Lösung zugegeben. Die Platten wurden dann für 3 Stunden wieder im Brutschrank inkubiert um die Reduktion des Tetrazoliums Salzes MTT zum wasserunlöslichen, blau-violetten Formazan-Farbstoff durch mitochondriale Dehydrogenasen zu ermöglichen. Dann erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 2500rpm. Anschließend wurde die MTT-Lösung vorsichtig abgesaugt und mit einer Multipipette 100µl Lyse-Reagenz pro Vertiefung eingebracht. Zur vollständigen Solubilisierung des in den Zellen präzipitierten Farbstoffes erfolgte eine mindestens

15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler bis unter dem Mikroskop keine Kristalle mehr erkennbar waren.

MTT-Lösung (50ml)		Lyse-Reagenz (500ml)	
MTT	250mg	SDS	100g
PBS-Puffer pH 7,4	50ml	H ₂ O (demineralisiert)	250ml
		Dimethylformamid	250ml

Die Messung erfolgte durch Bestimmung der optischen Dichte im ELISA-Reader Multiscan Ascent, ThermoLabsystems (Frankfurt) bei einer Testwellenlänge von 570nm und einer Referenzwellenlänge von 650nm.

Bei den Messungen nach 48 und nach 72 Stunden wurde ebenso verfahren.

2.2.7 Auswertung der durchgeführten Experimente

Alle Experimente wurden, wenn möglich, als Doppel- oder Dreifachbestimmung unabhängiger Kulturflaschen und MTT-Platten einer Zelllinie bzw. von primären Blasten oder aus voneinander unabhängigen Versuchen durchgeführt. Außer bei der Darstellung von repräsentativen Versuchen wurden die Ergebnisse als arithmetische Mittelwerte (\bar{x}) angegeben.

Arithmetischer Mittelwert:
$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

n = Anzahl der Einzelmessungen; x_i = Messwert einer Einzelmessung

Bei der Mittlung von Messwerten wurde zur Abschätzung des Messfehlers der Einzelmessungen die Standardabweichung (sd) bzw. der Standardfehler (se) angegeben.

Standardabweichung:
$$sd = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Standardfehler:
$$se = \frac{sd}{\sqrt{n}}$$

Die Signifikanz der erhaltenen Daten wurde unter Verwendung des t - Testes (nach Student) für ungepaarte Werte bzw. gepaarte Werte ermittelt. Hierbei wurden die Mittelwerte \bar{x}_1 und \bar{x}_2 zweier Vergleichsgruppen mit der Stichprobengröße n_1 und n_2 unter Berücksichtigung der Varianzen der Messergebnisse (Standardabweichung)² miteinander verglichen. Die errechneten t-Werte wurden mit den Werten aus einer Tabelle für die t-Verteilung verglichen. Waren die berechneten t-Werte größer als die für eine angenommene statistische Sicherheit von $P = 95 \%$ angegebenen t-Werte, wurde von signifikanten Ergebnissen ausgegangen. Waren die berechneten t-Werte größer als die für eine angenommene statistische Sicherheit von $P = 99\%$ bzw. $P = 99,9 \%$ aufgeführten t-Werte, wurde von hochsignifikanten Unterschieden der Messwerte ausgegangen. Als Signifikanzniveau, also die Wahrscheinlichkeit, mit der eine bestimmte Aussage nicht zutreffend ist, wurde $p = 1 - P$ angegeben. Bei der Darstellung der Ergebnisse wurden als Signifikanzniveaus *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ und ***, $p < 0,001$ unterschieden.

$$sd^2 = \frac{sd_1^2(n_1 - 1) + sd_2^2(n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}$$

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{sd} \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$$

3 Ergebnisse

3.1 Der Einfluss von Lösungsmitteln auf die Proliferation bei HL-60 Zellen

Um zu überprüfen, ob Lösungsmittel allein einen Einfluss auf die Proliferation von HL-60 Zellen nehmen, wurden gemäß 2.2.5 Messungen der Zellvitalität vorgenommen.

Hierbei wurden nicht alle später verwendeten Lösungsmittel-Konzentrationen getestet; die Höchstkonzentrationen waren hier aber mindestens so hoch wie diejenigen, die in den nachfolgenden Versuchen vorlagen.

3.1.1 Ethanol

Es war zu beobachten, dass Ethanol allein in den verwendeten Konzentrationen an allen Versuchstagen keinen vitalitätssenkenden Einfluss auf die HL-60 Zellen nahm (Signifikanzniveau: alle $p =$ nicht signifikant, t-Test für ungepaarte Werte) (Abb. 17).

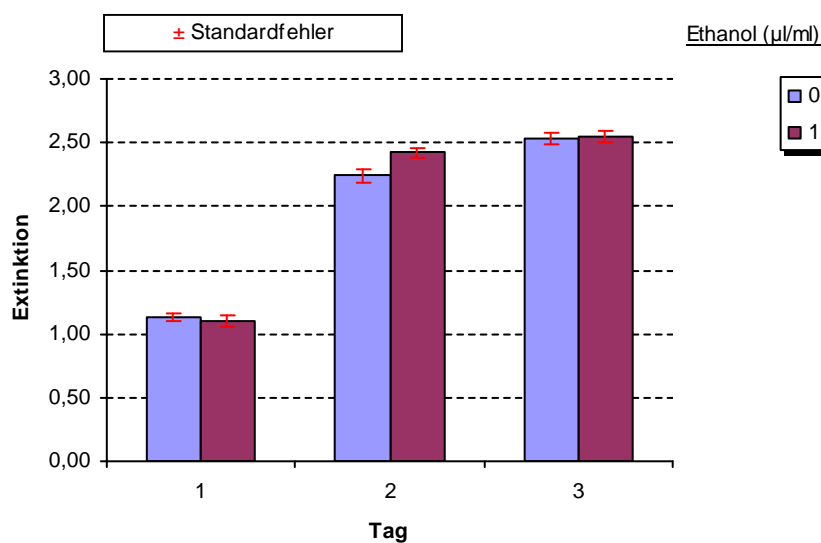


Abbildung 17: MTT-Assay der Zelllinie HL-60 nach Inkubation mit Ethanol. Die Zellzahl betrug 25 000 pro Vertiefung. Die Messungen erfolgten 48h (Tag 1), 72h (Tag 2) und 96h (Tag 3) nach Zugabe von Ethanol.

3.1.2 Dimethylformamid

Die Messungen der Zellvitalität an allen Versuchstagen ergaben, dass Dimethylformamid allein in den verwendeten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Zellproliferation nahm (Signifikanzniveau: alle $p =$ nicht signifikant; t-Test für ungepaarte Werte) (Abb. 18).

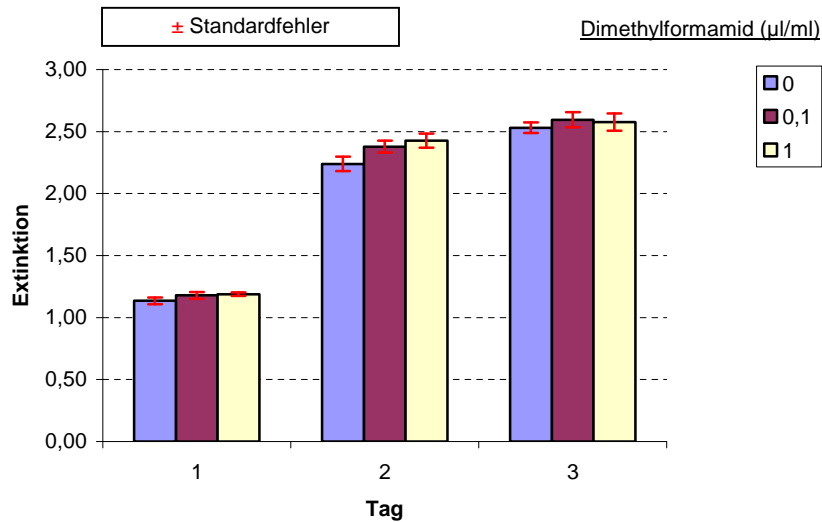


Abbildung 18: MTT-Assay mit HL-60 Zellen nach Inkubation mit Dimethylformamid. Die Zellzahl betrug 25 000 pro Vertiefung. Die Messungen erfolgten 48h (Tag 1), 72h (Tag 2) und 96h (Tag 3) nach Zugabe von Dimethylformamid.

3.1.3 DMSO

Die Messungen der Zellvitalität an allen Versuchstagen ergaben, dass DMSO allein in den verwendeten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Zellproliferation nahm (Signifikanzniveau: alle $p =$ nicht signifikant; t-Test für ungepaarte Werte) (Abb. 19).

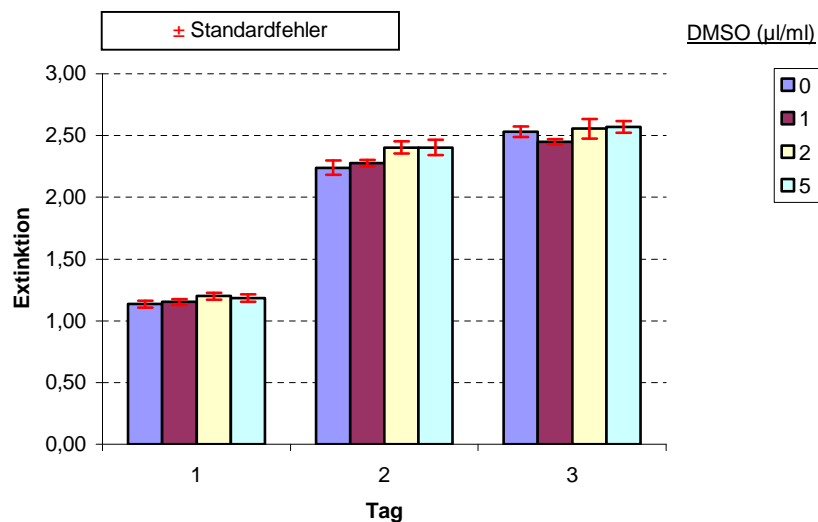


Abbildung 19: MTT-Assay der Zelllinie HL-60 nach Inkubation mit DMSO. Die Zellzahl betrug 25 000 pro Vertiefung. Die Messungen erfolgten 48h (Tag 1), 72h (Tag 2) und 96h (Tag 3) nach Zugabe von DMSO.

3.1.4 Chloroform/Methanol 1:1

Es war zu beobachten, dass Chloroform und Methanol im Verhältnis 1:1 allein in den verwendeten Konzentrationen an allen Versuchstagen keinen vitalitätssenkenden Einfluss auf die HL-60 Zellen nahm (Signifikanzniveau: alle p = nicht signifikant, t-Test für ungepaarte Werte) (Abb. 20).

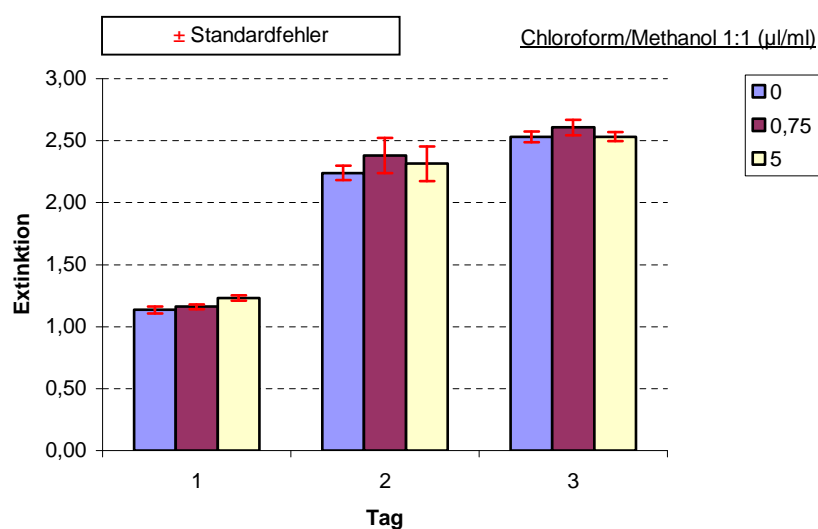


Abbildung 20: MTT-Assay mit HL-60 Zellen nach Inkubation mit Chloroform/Methanol 1:1. Die Zellzahl betrug 25 000 pro Vertiefung. Die Messungen erfolgten 48h (Tag 1), 72h (Tag 2) und 96h (Tag 3) nach Zugabe von Chloroform/Methanol 1:1.

3.2 Prednisolon als verstärkender Faktor des zytotoxischen Effekts von Doxorubicin

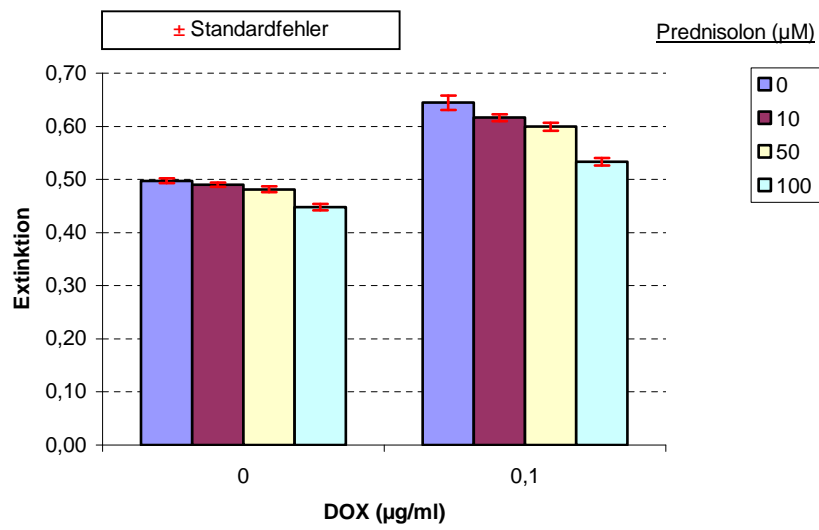
Um eine mögliche Prednisolon-abhängige Modulation der Behandlungseffizienz von HL-60 Zellen unter DOX zu untersuchen, wurden gemäß 2.2.5 Messungen der Zellvitalität vorgenommen.

Die Messung der Zellvitalität an Tag 1, also 48h nach Zugabe von Prednisolon und 24h nach Zugabe des Zytostatikums, ergab, dass Prednisolon allein einen vitalitätssenkenden Effekt auf die Zellen hatte. Hier kam es in Dosierungen von 50µM und 100µM zu einer signifikanten Abnahme der Extinktion um 3% und 10% (Signifikanzniveau *, $p = 0,036$ für 50µM; für 100µM ***; $p < 0,0001$; t-Test für ungepaarte Werte). Unter DOX = 0,1µg/ml war an Tag 1 allein noch kein zytostatischer Effekt zu erkennen. Auch hier kam es bei den Zellen, die mit Prednisolon vorinkubiert waren, in Dosierungen von 50µM und 100µM zu einer signifikanten Abnahme der Extinktion um 7% und 17% (Signifikanzniveau *, $p = 0,01$ für 50µM; für 100µM ***; $p < 0,0001$) (Abb. 21a).

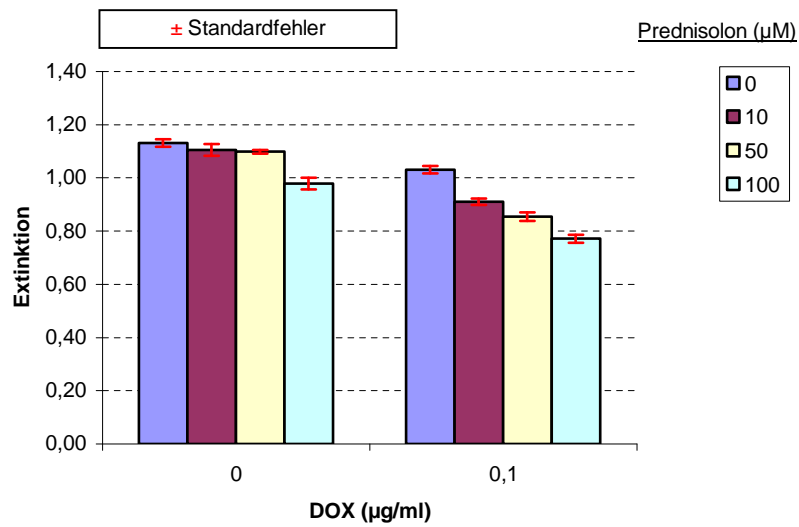
An Tag 2 kam es unter Prednisolon = 100µM allein zu einer signifikanten Abnahme der Extinktion um 13% (Signifikanzniveau ***, $p < 0,0001$ für 100µM). Unter 10 µM und 50 µM allein war dieser vitalitätssenkende Effekt von 2% und 3% nicht signifikant. Unter DOX = 0,1µg/ml zeigten Zellen, die mit Prednisolon vorinkubiert waren, eine dosisabhängige Wirkungsverstärkung des Zytostatikums (Signifikanzniveau ***, $p < 0,0001$ für 10µM; für 50µM ***, $p < 0,0001$ und für 100µM ***, $p < 0,0001$). Dieser Effekt bewegte sich zwischen 12% und 25% (Abb. 21b).

An Tag 3 war zu beobachten, dass hier Prednisolon allein in Dosierungen von 10µM und 50µM keinen hemmenden Einfluss auf die Zellproliferation nahm (Signifikanzniveau: $p =$ nicht signifikant). Prednisolon = 100µM allein bewirkte eine Abnahme der Extinktion um 13% (Signifikanzniveau **, $p = 0,0036$). Unter DOX = 0,1µg/ml kam es zu einer dosisabhängigen, signifikanten Wirkungsverstärkung des Zytostatikums durch Prednisolon (Signifikanzniveau *, $p = 0,025$ für 10µM; für 50 µM ***, $p = 0,00079$ und für 100µM ***, $p < 0,0001$). Dieser Effekt bewegte sich zwischen 11% und 24% (Abb. 21c).

(a) Tag 1



(b) Tag 2



(c) Tag 3

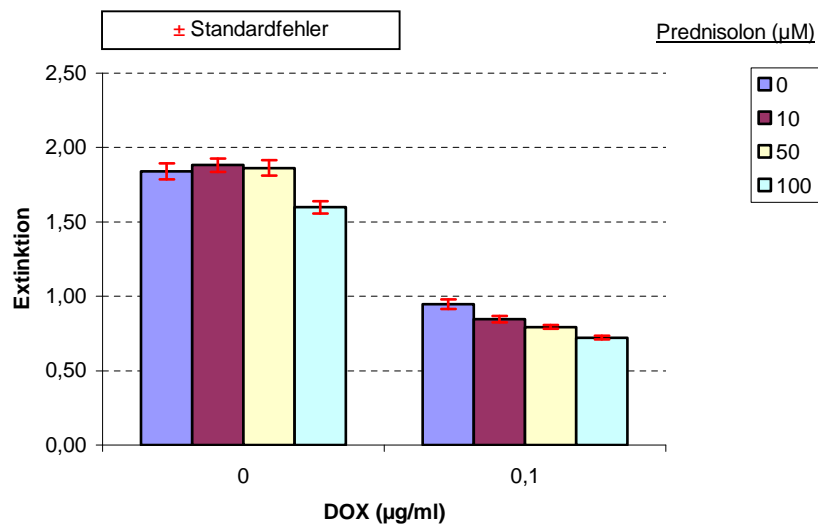


Abbildung 21: MTT-Assay mit HL-60 Zellen nach Vorinkubation mit Prednisolon in Anwesenheit von Doxorubicin (DOX). Die Zellzahl betrug 25 000 pro Vertiefung. (a) Messung der Zellvitalität an Tag 1, also 48h nach Zugabe von Prednisolon und 24h nach Zugabe des Zytostatikums. (b) Messung der Zellvitalität an Tag 2. (c) Messung der Zellvitalität an Tag 3.

3.3 Meloxicam als verstärkender Faktor des zytotoxischen Effekts von Doxorubicin und liposomalem Daunorubicin

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Meloxicam als möglicher Modulator der MDR in HL-60 Zellen den zytotoxischen Effekt von DOX verstärkt ¹⁶⁸. Meloxicam selbst nahm dabei in den verwendeten Dosierungen keinen vitalitätssenkenden Einfluss. In den folgenden Untersuchungen wurde nun überprüft, ob auch die zytostatische Wirkung von L-DNR, einem wichtigen Anthracyclin in der AML-Therapie ¹⁷⁵, durch Meloxicam verstärkt werden könnte. Weiterhin wurde getestet, ob dieser Effekt auch in primären Blasten zu beobachten sei.

3.3.1 Ergebnisse in der HL-60 Zelllinie

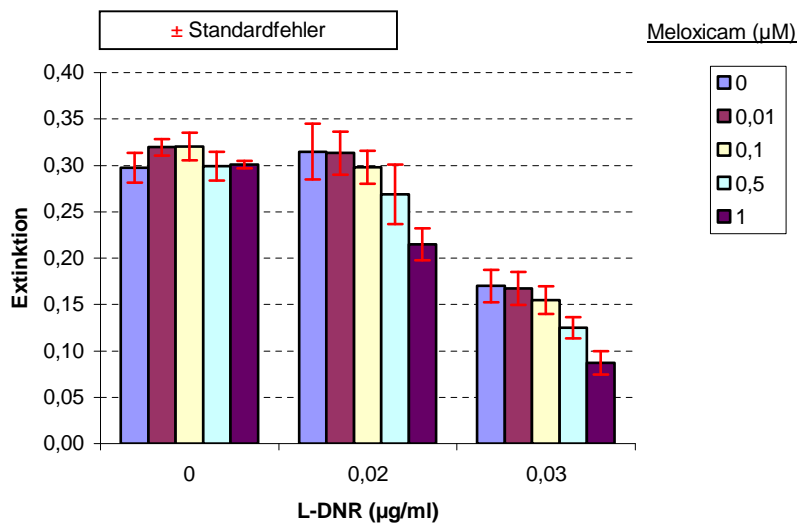
Um eine mögliche Meloxicam-abhängige Modulation der Behandlungseffizienz von HL-60 Zellen unter L-DNR zu untersuchen, wurden analog zu 3.2 Messungen der Zellvitalität vorgenommen.

Die Messung der Zellvitalität an Tag 1, 48h nach Zugabe von Meloxicam und 24h nach Zugabe des Zytostatikums, ergab, dass Meloxicam allein keinen signifikanten Effekt auf die Zellproliferation hatte (Signifikanzniveau: alle $p =$ nicht signifikant; t-Test für ungepaarte Werte). Unter L-DNR = 0,02 μ g/ml dagegen zeigten die Zellen, die mit 1 μ M Meloxicam vorbehandelt waren, eine signifikant niedrigere Vitalität (Signifikanzniveau: *, $p = 0,028$). Unter L-DNR = 0,03 μ g/ml war dieser Effekt ebenfalls zu beobachten (Signifikanzniveau für 1 μ M Meloxicam **, $p = 0,008$) (Abb. 22a).

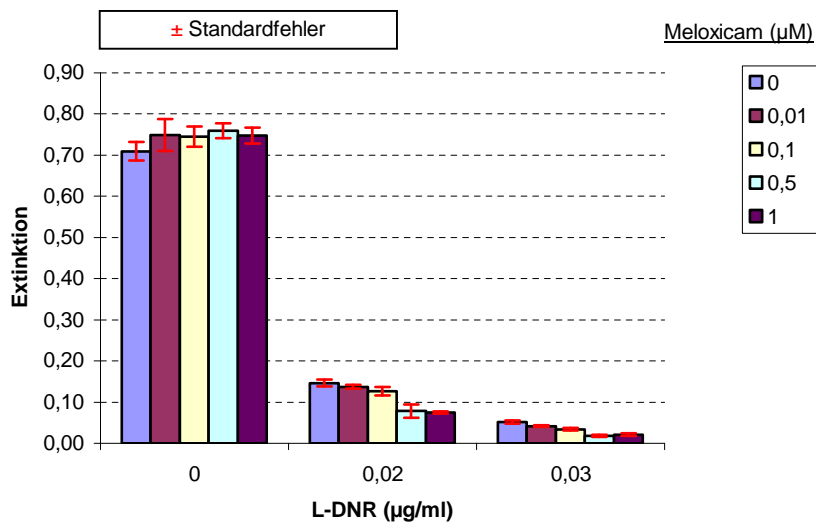
Die Messung der Zellvitalität an Tag 2 ergab, dass auch hier Meloxicam allein keinen signifikanten Effekt auf die Zellproliferation hatte. Bei L-DNR = 0,02 μ g/ml war eine hochsignifikante Wirkungsverstärkung des Zytostatikums in Anwesenheit von Meloxicam zu beobachten (Signifikanzniveau ***, $p = 0,00016$ für 1 μ M; für 0,5 μ M **, $p = 0,0097$). Unter L-DNR = 0,03 μ g/ml war dieser Effekt ebenfalls signifikant (Signifikanzniveau: **, $p = 0,0013$ für 1 μ M; für 0,5 μ M ***, $p = 0,00038$; für 0,1 μ M *, $p = 0,012$) (Abb. 22b).

An Tag 3 war für Meloxicam allein kein signifikanter Effekt auf die Zellproliferation zu beobachten. Unter L-DNR = 0,02 μ g/ml war die Wirkungsverstärkung des Zytostatikums durch Meloxicam hochsignifikant (Signifikanzniveau ***, $p = 0,00098$ für 1 μ M; für 0,5 μ M **, $p = 0,0032$). Auch bei L-DNR = 0,03 μ g/ml war dieser Effekt signifikant (Signifikanzniveau ***, $p = 0,00018$ für 1 μ M; für 0,5mM **, $p = 0,0016$) (Abb. 22c).

(a) Tag 1



(b) Tag 2



(c) Tag 3

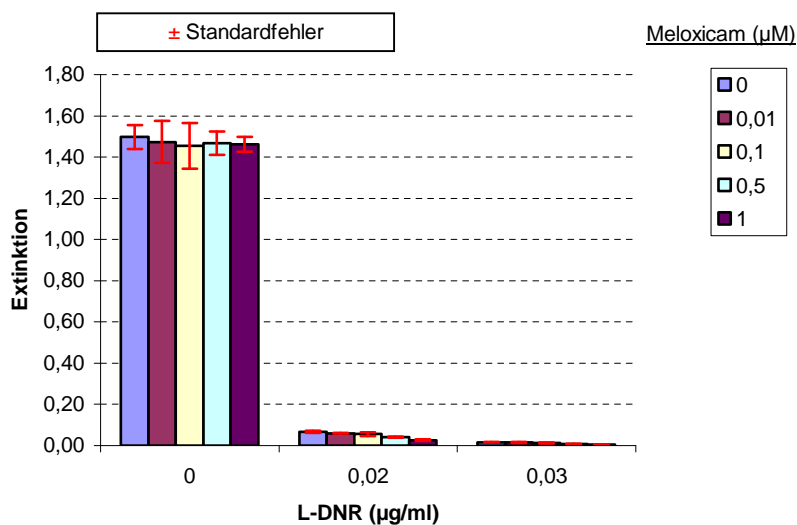


Abbildung 22: MTT-Assay der Zelllinie HL-60 nach Vorinkubation mit Meloxicam in Anwesenheit von liposomalem Daunorubicin (L-DNR). Die Zellzahl betrug 25 000 pro Vertiefung. (a) Messung der Zellvitalität an Tag 1, also 48h nach Zugabe von Meloxicam und 24h nach Zugabe des Zytostatikums. (b) Messung der Zellvitalität an Tag 2. (c) Messung der Zellvitalität an Tag 3.

Der zytostatische Effekt von L-DNR wurde durch Meloxicam dosisabhängig verstärkt. An Tag 1 bewegte sich dieser Effekt unter L-DNR = 0,02µg/ml zwischen 0% und 32% und unter L-DNR = 0,03µg/ml zwischen 2% und 49%, an Tag 2 zwischen 6% und 49% sowie zwischen 20% und 59%, an Tag 3 zwischen 10% und 60% und zwischen 12% und 70%.

3.3.2 Ergebnisse in primären Zellen

Um eine mögliche Modulation der zytostatischen Potenz von DOX und L-DNR durch Meloxicam in primären Blasten zu untersuchen, wurden analog zu 3.2 Messungen der Zellvitalität unternommen.

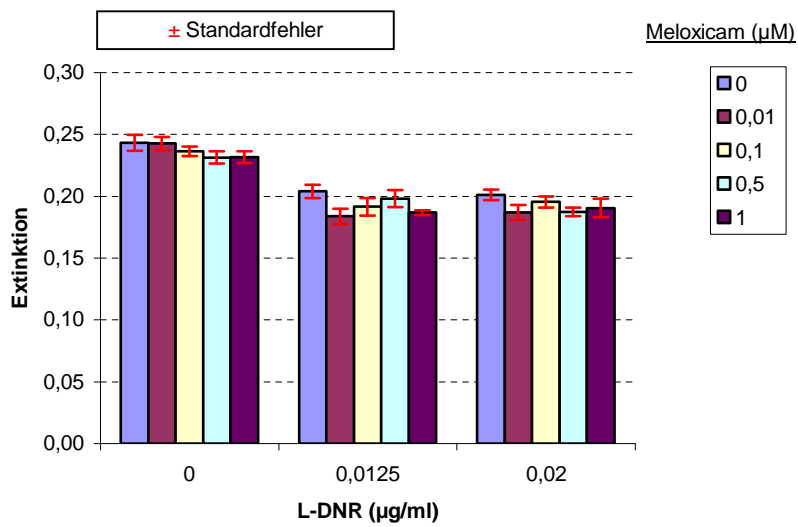
3.3.2.1 Patient 1, MTT-Assay unter liposomalem Daunorubicin und Meloxicam

Die Messung der Zellvitalität an Tag 1, also 48h nach Zugabe von Meloxicam und 24h nach Zugabe des Zytostatikums, ergab, dass Meloxicam allein keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation der Zellen hatte (Signifikanzniveau: alle $p =$ nicht signifikant; t-Test für ungepaarte Werte). Unter L-DNR = 0,0125 $\mu\text{g/ml}$ dagegen zeigten Zellen, die mit Meloxicam vorinkubiert waren eine niedrigere Vitalität (Signifikanzniveau *, $p = 0,022$ für 1 μM ; für 0,1 μM *, $p = 0,045$). Dieser Effekt bewegte sich zwischen 3% und 10%. Unter L-DNR = 0,02 $\mu\text{g/ml}$ war ebenfalls bei den Zellen, die mit Meloxicam vorinkubiert waren, eine Wirkungsverstärkung des Zytostatikums zu beobachten. Dieser Effekt lag zwischen 3% und 7% und war für Meloxicam = 0,5 μM signifikant (Signifikanzniveau *, $p = 0,048$) (Abb. 23a).

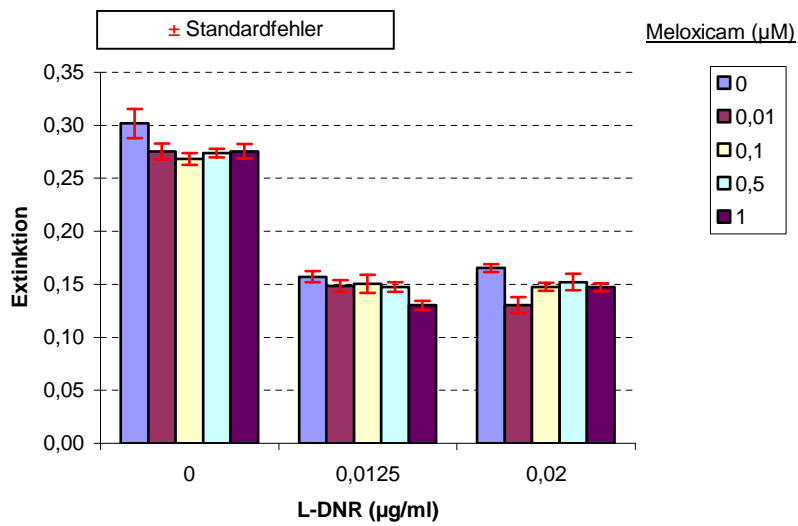
An Tag 2 war zu beobachten, dass hier Meloxicam allein Einfluss auf die Zellvitalität nahm; die Extinktion war bei den mit Meloxicam vorinkubierten Zellen zwischen 9% und 11% geringer als in der Kontrollpopulation (Signifikanzniveau: alle $p =$ nicht signifikant). Bei L-DNR = 0,0125 $\mu\text{g/ml}$ war eine signifikante Wirkungsverstärkung des Zytostatikums um 17% in Anwesenheit von 1 μM Meloxicam zu beobachten (Signifikanzniveau **, $p = 0,0077$). Unter L-DNR = 0,02 $\mu\text{g/ml}$ war dieser Effekt ebenfalls bei 0,01 μM , 0,1 μM und 1 μM Meloxicam signifikant (Signifikanzniveau **, $p = 0,0066$ für 0,01 μM ; für 0,1 μM *, $p = 0,017$ und für 1 μM *, $p = 0,015$). Es zeigte sich eine Verminderung der Zellvitalität von 8% bis 21% (Abb. 23b).

Meloxicam allein zeigte an Tag 3 keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation der Zellen (Signifikanzniveau: alle $p =$ nicht signifikant). Unter L-DNR = 0,0125 $\mu\text{g/ml}$ konnte eine signifikante Wirkungsverstärkung von 20% und 18% in Anwesenheit von 0,5 μM und 1 μM Meloxicam beobachtet werden (Signifikanzniveau *, $p = 0,025$ für 0,5 μM ; für 1 μM *, $p = 0,02$). Unter L-DNR = 0,02 $\mu\text{g/ml}$ war dieser Effekt nur für eine Meloxicam-Konzentration von 0,5 μM signifikant (Signifikanzniveau **, $p = 0,0081$). Die zytostatische Wirkung von L-DNR wurde hier durch Vorinkubation mit Meloxicam um 23% verstärkt (Abb. 23c).

(a) Tag 1



(b) Tag 2



(c) Tag 3

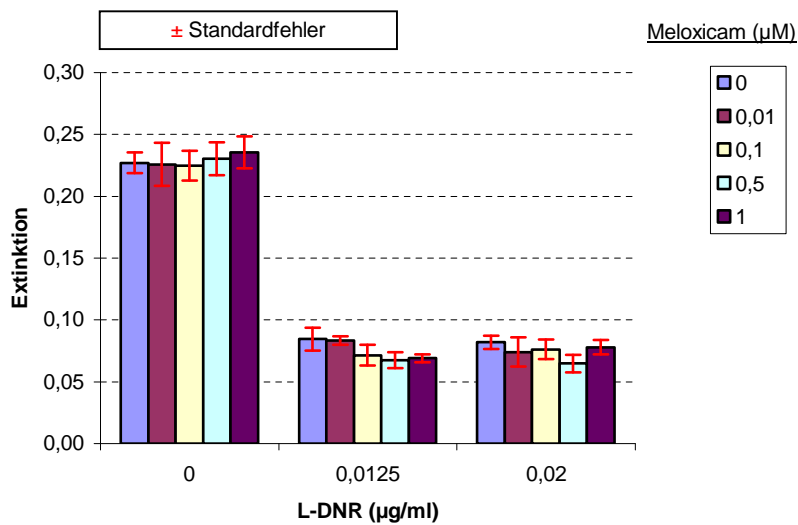


Abbildung 23: MTT-Assay mit primären Blasten (Patient 1) nach Vorinkubation mit Meloxicam in Anwesenheit von liposomalem Daunorubicin (L-DNR). Die Zellzahl betrug 75 000 pro Vertiefung. **(a)** Messung der Zellvitalität an Tag 1, also 48h nach Zugabe von Meloxicam und 24h nach Zugabe des Zytostatikums. **(b)** Messung der Zellvitalität an Tag 2. **(c)** Messung der Zellvitalität an Tag 3.

3.3.2.2 Patient 1, MTT-Assay unter Doxorubicin und Meloxicam

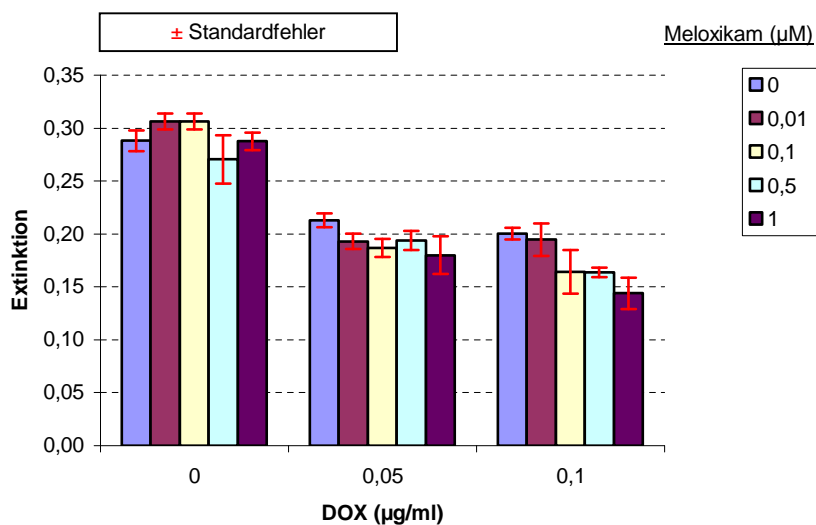
Die Messung der Zellvitalität an Tag 1, also 48h nach Zugabe von Meloxicam und 24h nach Zugabe des Zytostatikums, ergab, dass Meloxicam allein keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation der Zellen hatte (Signifikanzniveau: alle $p =$ nicht signifikant; t-Test für ungepaarte Werte). Unter $DOX = 0,05\mu\text{g/ml}$ zeigten Zellen, die mit Meloxicam vorinkubiert waren, eine geringe, dosisabhängige Wirkungsverstärkung des Zytostatikums (Signifikanzniveau *, $p = 0,048$ für $0,1\mu\text{M}$). Dieser Effekt bewegte sich zwischen 9% und 15%. Auch für $DOX = 0,1\mu\text{g/ml}$ war die Extinktion bei den mit Meloxicam vorinkubierten Zellen zwischen 3% und 28% geringer als in der Kontrollpopulation (Signifikanzniveau **, $p = 0,0024$ für $0,5\mu\text{M}$; für $1\mu\text{M}$ *, $p = 0,012$) (Abb. 24a).

An Tag 2 war zu beobachten, dass auch hier Meloxicam allein keinen Einfluss auf die Zellvitalität nahm (Signifikanzniveau: alle $p =$ nicht signifikant). Bei $DOX = 0,05\mu\text{g/ml}$ war eine dosisabhängige Wirkungsverstärkung des Zytostatikums um bis zu 25% in

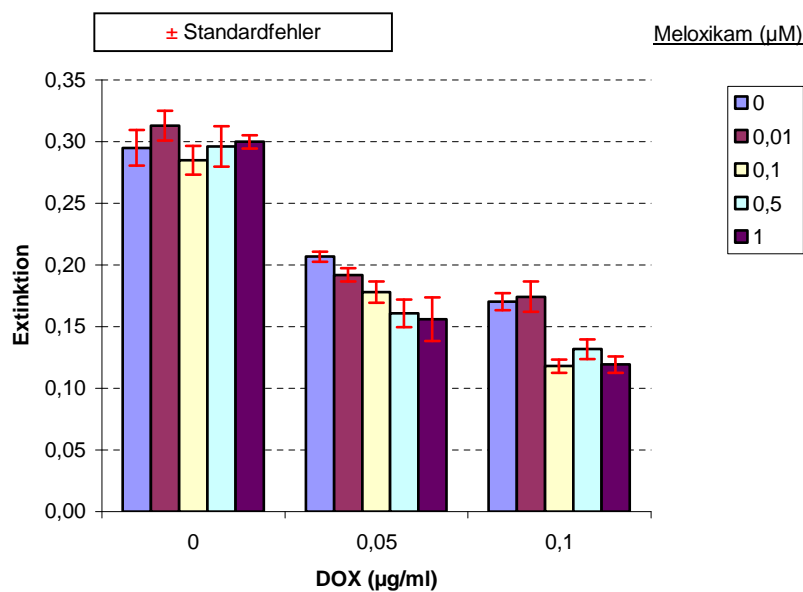
Anwesenheit von Meloxicam zu beobachten (Signifikanzniveau *, $p = 0,024$ für $0,1\mu\text{M}$; für $0,5\mu\text{M}$ **, $p = 0,0089$ und für $1\mu\text{M}$ *, $p = 0,032$). Unter $\text{DOX} = 0,1\mu\text{g/ml}$ war dieser Effekt ebenfalls bei $0,1\mu\text{M}$, $0,5\mu\text{M}$ und $1\mu\text{M}$ Meloxicam signifikant (Signifikanzniveau **, $p = 0,001$ für $0,1\mu\text{M}$; für $0,5\mu\text{M}$ *, $p = 0,011$ und für $1\mu\text{M}$ **, $p = 0,0019$). Es zeigte sich eine Verminderung der Zellvitalität zwischen 0% und 31% (Abb. 24b).

Meloxicam allein zeigte an Tag 3 keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation der Zellen (Signifikanzniveau: alle $p =$ nicht signifikant). Unter $\text{DOX} = 0,05\mu\text{g/ml}$ zeigten Zellen, die mit Meloxicam vorinkubiert waren, eine dosisabhängige Wirkungsverstärkung des Zytostatikums (Signifikanzniveau *, $p = 0,024$ für $0,1\mu\text{M}$; für $0,5\mu\text{M}$ **, $p = 0,0089$ und für $1\mu\text{M}$ *, $p = 0,032$). Dieser Effekt bewegte sich zwischen 7% und 25%. Unter $\text{DOX} = 0,1\mu\text{g/ml}$ war kein zusätzlicher Effekt durch Meloxicam auf die Zellvitalität zu erkennen (Abb. 24c).

(a) Tag 1



(b) Tag 2



(c) Tag 3

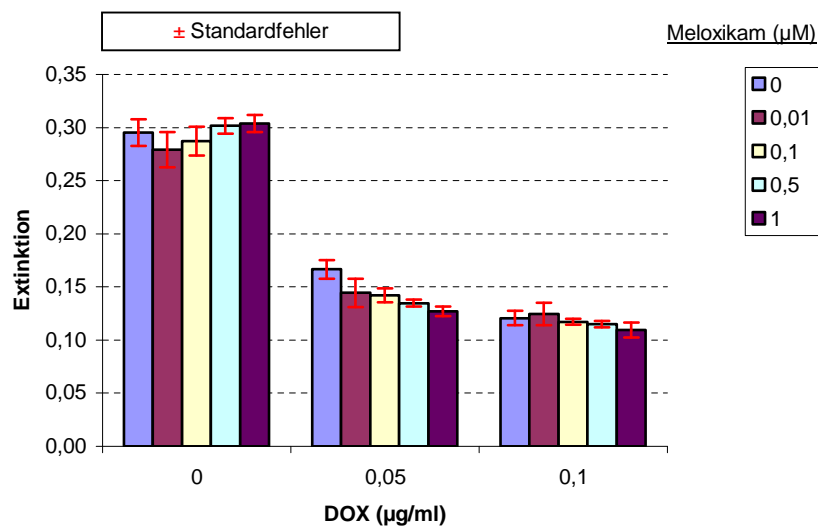


Abbildung 24: MTT-Assay mit primären Blasten (Patient 1) nach Vorinkubation mit Meloxicam in Anwesenheit von Doxorubicin (DOX). Die Zellzahl betrug 40 000 pro Vertiefung. (a) Messung der Zellvitalität an Tag 1, also 48h nach Zugabe von Meloxicam und 24h nach Zugabe des Zytostatikums. (b) Messung der Zellvitalität an Tag 2. (c) Messung der Zellvitalität an Tag 3.

3.3.2.3 Patient 2, MTT-Assay unter Doxorubicin und Meloxicam

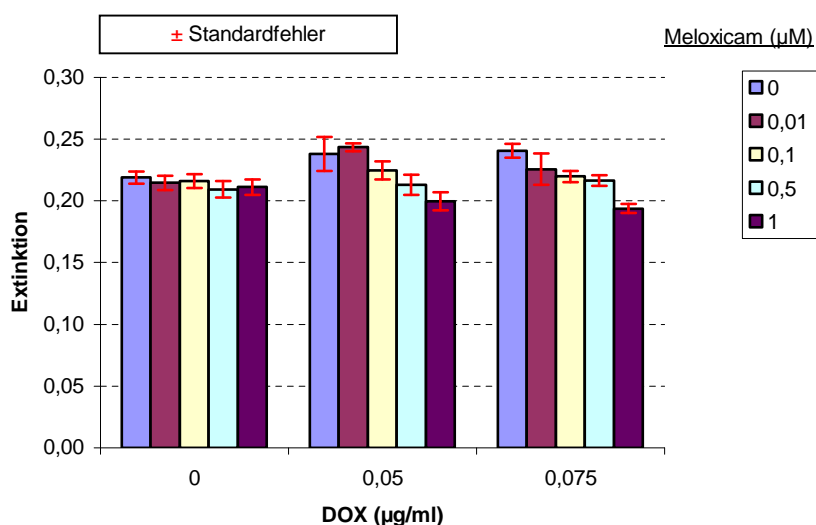
Die Messung der Zellvitalität an Tag 1, 48h nach Zugabe von Meloxicam und 24h nach Zugabe des Zytostatikums, ergab, dass Meloxicam allein keinen signifikanten

Effekt auf die Zellproliferation hatte (Signifikanzniveau: alle p = nicht signifikant; t-Test für ungepaarte Werte). Unter DOX = 0,05 $\mu\text{g/ml}$ war für Meloxicam-Konzentrationen von 0,1 μM , 0,5 μM und 1 μM eine nicht signifikante, dosisabhängige Wirkungssteigerung des Zytostatikums zu beobachten. Unter DOX = 0,075 $\mu\text{g/ml}$ war dieser Effekt hochsignifikant (Signifikanzniveau für 1 μM Meloxicam ***, p = 0,00043; für 0,5 μM *, p = 0,014 und für 0,1 μM *, p = 0,03) (Abb. 25a).

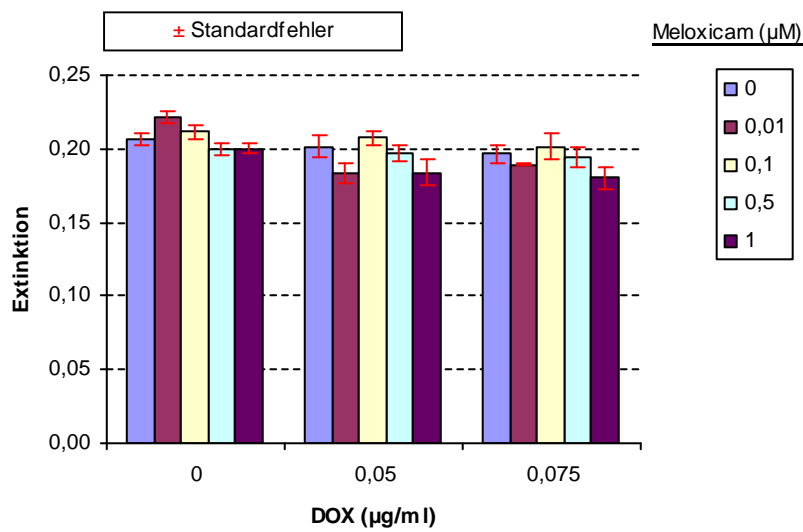
Die Messung der Zellvitalität an Tag 2 ergab, dass auch hier Meloxicam allein keinen signifikanten vitalitätssenkenden Effekt hatte. Für eine Meloxicam-Konzentration von 0,01 μM ist hier sogar eine signifikante Steigerung der Extinktion erkennbar (Signifikanzniveau *, p = 0,035). Bei DOX = 0,05 $\mu\text{g/ml}$ und bei DOX = 0,075 $\mu\text{g/ml}$ war der Einfluss von Meloxicam auf die Zellproliferation nicht signifikant. (Abb. 25b).

An Tag 3 war für Meloxicam allein kein Effekt auf die Zellproliferation zu beobachten (Signifikanzniveau: alle p = nicht signifikant). Unter DOX = 0,05 $\mu\text{g/ml}$ war die Wirkungsverstärkung des Zytostatikums durch Meloxicam hochsignifikant (Signifikanzniveau ***, p = 0,00032 für 1 μM). Auch bei DOX = 0,075 $\mu\text{g/ml}$ war dieser Effekt signifikant (Signifikanzniveau *, p = 0,013 für 1 μM ; für 0,5 μM **, p = 0,0099) (Abb. 25c).

(a) Tag 1



(b) Tag 2



(c) Tag 3

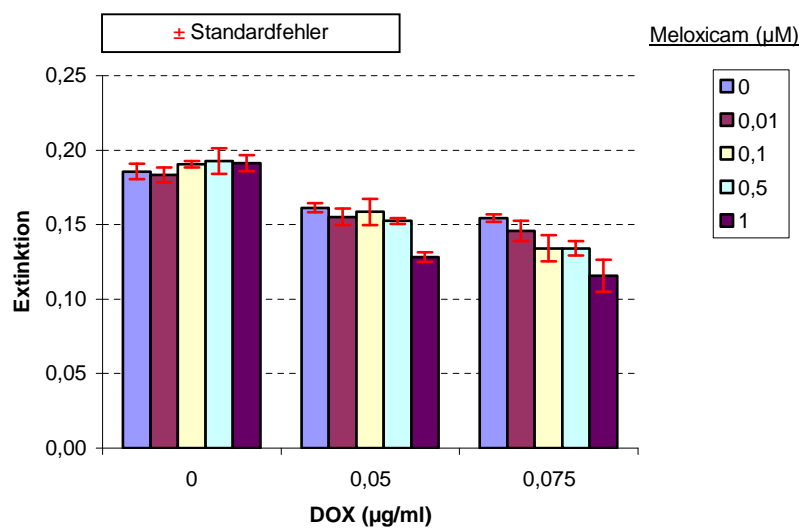


Abbildung 25: MTT-Assay mit primären Blasten (Patient 2) nach Vorinkubation mit Meloxicam in Anwesenheit von Doxorubicin (DOX). Die Zellzahl betrug 75 000 pro Vertiefung. (a) Messung der Zellvitalität an Tag 1, also 48h nach Zugabe von Meloxicam und 24h nach Zugabe des Zytostatikums. (b) Messung der Zellvitalität an Tag 2. (c) Messung der Zellvitalität an Tag 3.

Der zytostatische Effekt von DOX wurde durch Meloxicam verstärkt. An Tag 1 bewegte sich dieser Effekt unter DOX = 0,05µg/ml zwischen 0% und 16% und unter 0,075µg/ml zwischen 6% und 19%, an Tag 2 zwischen 0% und 9% sowie zwischen 0% und 8%, an Tag 3 zwischen 2% und 20% und zwischen 6% und 25%.

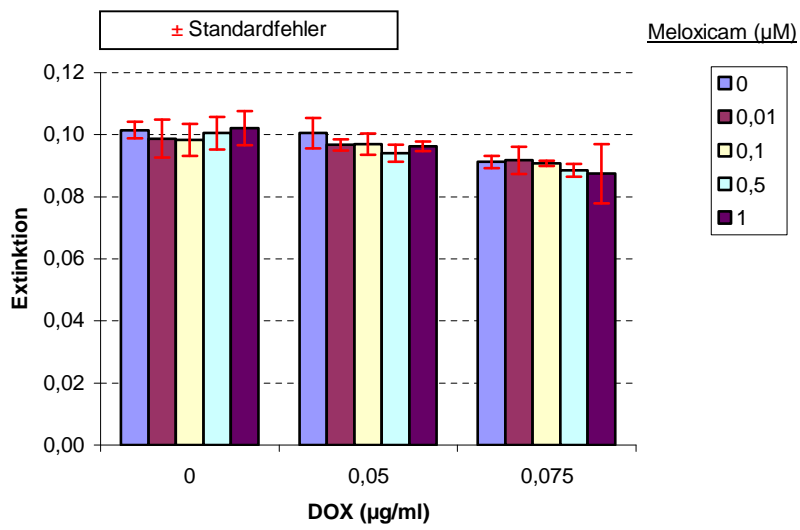
3.3.2.4 Patient 3, MTT-Assay unter Doxorubicin und Meloxicam

Die Messung der Zellvitalität an Tag 1, also 48h nach Zugabe von Meloxicam und 24h nach Zugabe des Zytostatikums, ergab, dass Meloxicam allein keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation der Zellen hatte (Signifikanzniveau: alle $p =$ nicht signifikant; t-Test für ungepaarte Werte). Unter DOX = 0,05 μ g/ml und DOX = 0,075 μ g/ml zeigten Zellen, die mit Meloxicam vorinkubiert waren, eine geringe, dosisabhängige Wirkungsverstärkung des Zytostatikums (Signifikanzniveau: alle $p =$ nicht signifikant). Dieser Effekt bewegte sich zwischen 3% und 6% sowie zwischen 0% und 4% (Abb. 26a).

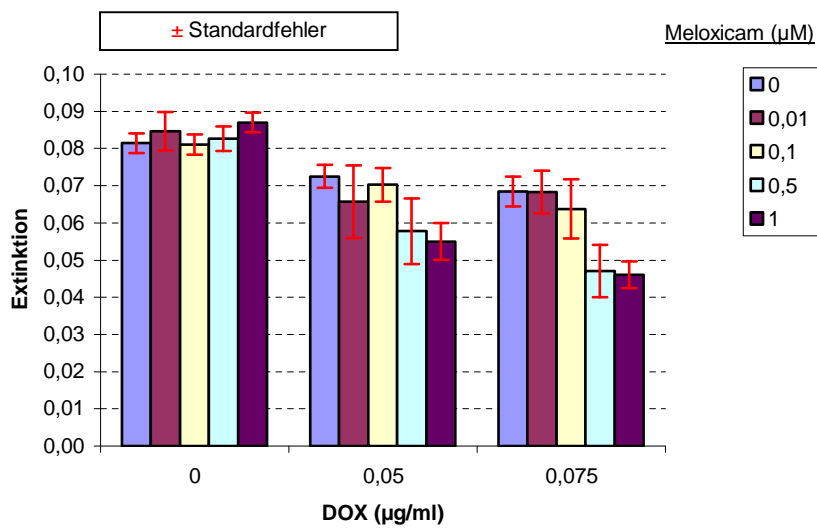
An Tag 2 war zu beobachten, dass auch hier Meloxicam allein keinen Einfluss auf die Zellvitalität nahm (Signifikanzniveau: alle $p =$ nicht signifikant). Bei DOX = 0,05 μ g/ml war eine signifikante Wirkungsverstärkung des Zytostatikums um 24% in Anwesenheit von 1 μ M Meloxicam zu beobachten (Signifikanzniveau *, $p = 0,023$). Unter DOX = 0,075 μ g/ml war dieser Effekt ebenfalls bei 0,5 μ M und 1 μ M Meloxicam signifikant (Signifikanzniveau *, $p = 0,038$ für 0,5 μ M; für 1 μ M **, $p = 0,0058$). Es zeigte sich eine Verminderung der Zellvitalität zwischen 0% und 33% (Abb. 26b).

Meloxicam allein zeigte an Tag 3 keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation der Zellen (Signifikanzniveau: alle $p =$ nicht signifikant). Unter DOX = 0,05 μ g/ml und DOX = 0,075 μ g/ml zeigten Zellen, die mit Meloxicam vorinkubiert waren, eine dosisabhängige Wirkungsverstärkung des Zytostatikums (Signifikanzniveau: alle $p =$ nicht signifikant). Dieser Effekt bewegte sich zwischen 0% und 7% sowie zwischen 0% und 24% (Abb. 26c).

(a) Tag 1



(b) Tag 2



(c) Tag 3

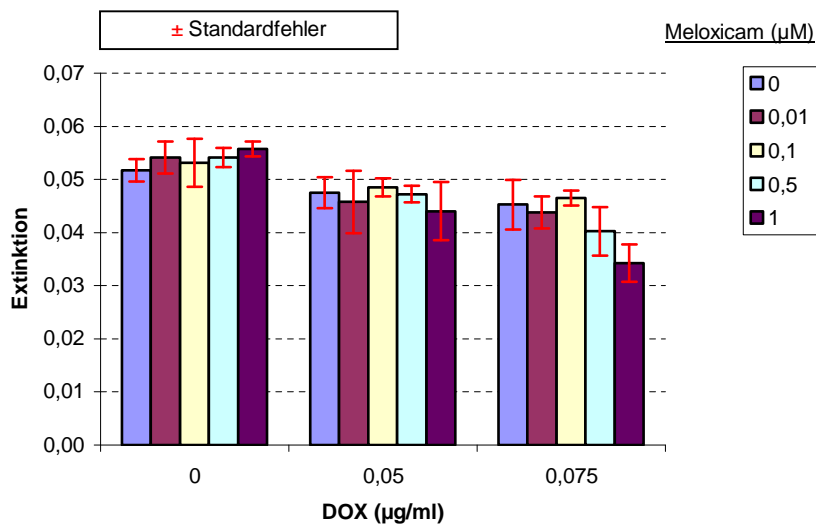


Abbildung 26: MTT-Assay mit primären Blasten (Patient 3) nach Vorinkubation mit Meloxicam in Anwesenheit von Doxorubicin (DOX). Die Zellzahl betrug 125 000 pro Vertiefung. (a) Messung der Zellvitalität an Tag 1, also 48h nach Zugabe von Meloxicam und 24h nach Zugabe des Zytostatikums. (b) Messung der Zellvitalität an Tag 2. (c) Messung der Zellvitalität an Tag 3.

3.4 Der Einfluss von COX-Inhibitoren auf die Proliferation unter Doxorubicin bei HL-60 Zellen

Um zu überprüfen, ob neben Meloxicam auch andere COX-Inhibitoren die zytostatische Potenz von DOX bei HL-60 Zellen verstärken können, wurden analog zu 3.1.1 MTT Assays unter der Einwirkung von DOX und verschiedenen COX-Inhibitoren durchgeführt.

3.4.1 NS398

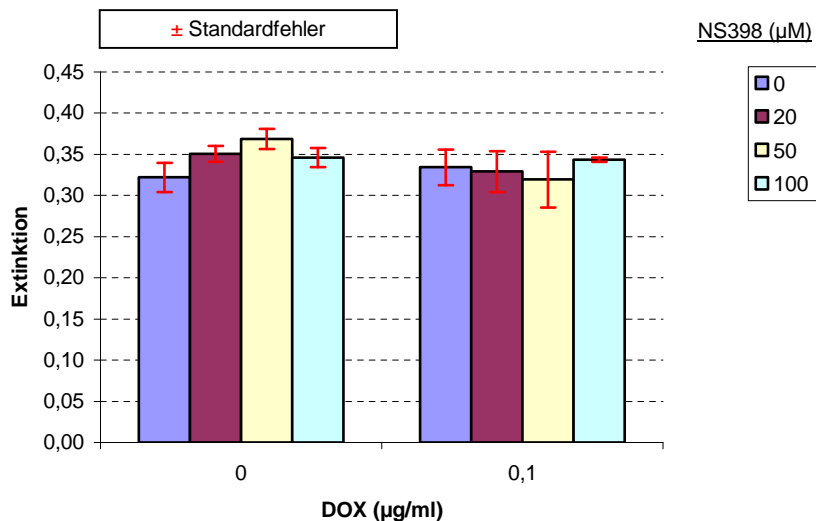
Die Messung der Zellvitalität an Tag 1, also 48h nach Zugabe von NS398 und 24h nach Zugabe des Zytostatikums, ergab, dass NS398 allein keinen vitalitätssenkenden Effekt auf die Zellen hatte (Signifikanzniveau: alle p = nicht signifikant; t-Test für ungepaarte Werte). Unter DOX = 0,1µg/ml war keine

signifikante Wirkungsverstärkung des Zytostatikums in Anwesenheit von NS398 zu beobachten (Signifikanzniveau: alle $p =$ nicht signifikant) (Abb. 27a).

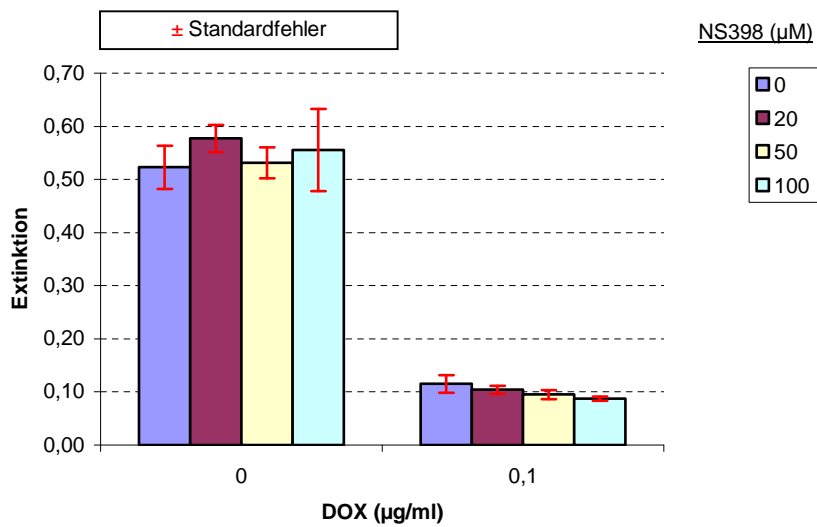
An Tag 2 war zu beobachten, dass auch hier NS398 allein keinen hemmenden Einfluss auf die Zellproliferation nahm (Signifikanzniveau: alle $p =$ nicht signifikant). Unter DOX = 0,1 $\mu\text{g/ml}$ zeigten Zellen, die mit NS398 vorinkubiert waren, eine geringe, dosisabhängige Wirkungsverstärkung des Zytostatikums (Signifikanzniveau: alle $p =$ nicht signifikant). Dieser Effekt bewegte sich zwischen 10% und 24% (Abb. 27b).

NS398 allein senkte an Tag 3 in Dosierungen von 50 μM und 100 μM die Vitalität um 8% und 9% (Signifikanzniveau: $p =$ nicht signifikant). Unter DOX = 0,1 $\mu\text{g/ml}$ kam es zu einer signifikanten Wirkungsverstärkung des Zytostatikums (Signifikanzniveau **, $p = 0,0014$ für 20 μM ; für 50 μM *, $p = 0,015$ und für 100 μM **, $p = 0,0089$). Dieser Effekt bewegte sich zwischen 16% und 26% (Abb. 27c).

(a) Tag 1



(b) Tag 2



(c) Tag 3

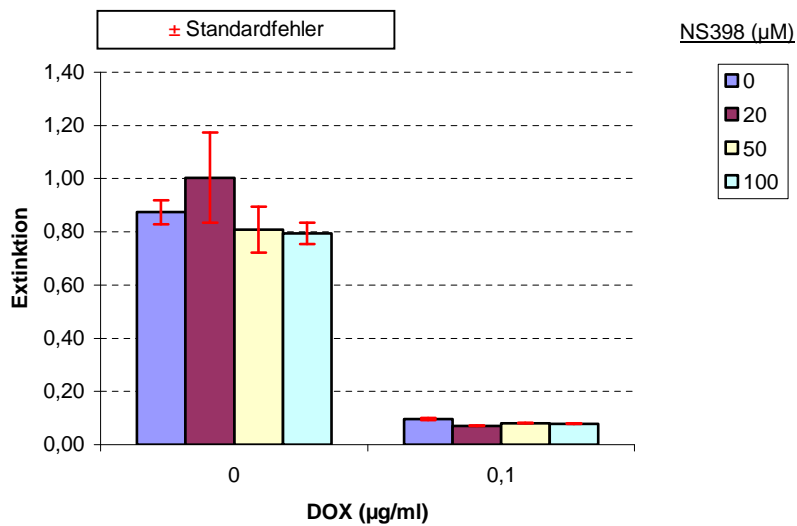


Abbildung 27: MTT-Assay mit HL-60 Zellen nach Vorinkubation mit NS398 in Anwesenheit von Doxorubicin (DOX). Die Zellzahl betrug 25 000 pro Vertiefung. (a) Messung der Zellvitalität an Tag 1, also 48h nach Zugabe von NS398 und 24h nach Zugabe des Zytostatikums. (b) Messung der Zellvitalität an Tag 2. (c) Messung der Zellvitalität an Tag 3.

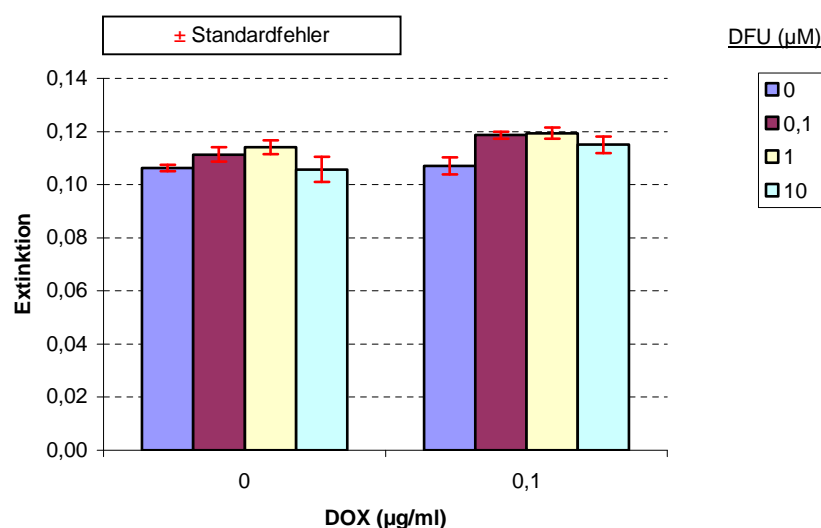
3.4.2 DFU

Die Messung der Zellvitalität an Tag 1, also 48h nach Zugabe von DFU und 24h nach Zugabe des Zytostatikums, ergab, dass DFU allein keinen vitalitätssenkenden Effekt auf die Zellen hatte. Unter DFU = 1 μ M kam es zu einem signifikanten Anstieg der Extinktion um 7% (Signifikanzniveau **, $p = 0,0047$; t-Test für ungepaarte Werte). Unter DOX = 0,1 μ g/ml war keine signifikante Wirkungsverstärkung des Zytostatikums in Anwesenheit von DFU zu beobachten; auch hier kam es in Dosierungen von DFU = 0,1 μ M und DFU = 1 μ M zu einem signifikanten Vitalitätsanstieg um 11% und 12% (Signifikanzniveau **, $p = 0,0049$ für 0,1 μ M; für 1 μ M **, $p = 0,006$) (Abb. 28a).

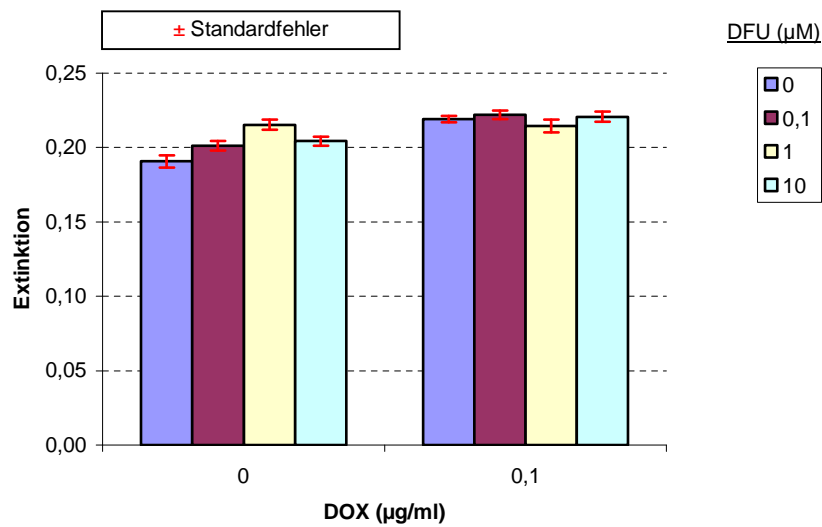
An Tag 2 kam es unter DFU = 1 μ M und DFU = 10 μ M allein zu einem signifikanten Anstieg der Extinktion um 13% und 7% (Signifikanzniveau ***, $p = 0,00078$ für 1 μ M; für 10 μ M *, $p = 0,04$). Unter DOX = 0,1 μ g/ml zeigten Zellen, die mit DFU vorinkubiert waren, keine Wirkungsverstärkung des Zytostatikums (Signifikanzniveau: alle $p =$ nicht signifikant) (Abb. 28b).

An Tag 3 war zu beobachten, dass hier DFU allein keinen hemmenden Einfluss auf die Zellproliferation nahm (Signifikanzniveau: $p =$ nicht signifikant). Unter DOX = 0,1 μ g/ml kam es zu einer dosisabhängigen, signifikanten Wirkungsverstärkung des Zytostatikums durch DFU (Signifikanzniveau *, $p = 0,016$ für 10 μ M). Dieser Effekt bewegte sich zwischen 2% und 17% (Abb. 28c).

(a) Tag 1



(b) Tag 2



(c) Tag 3

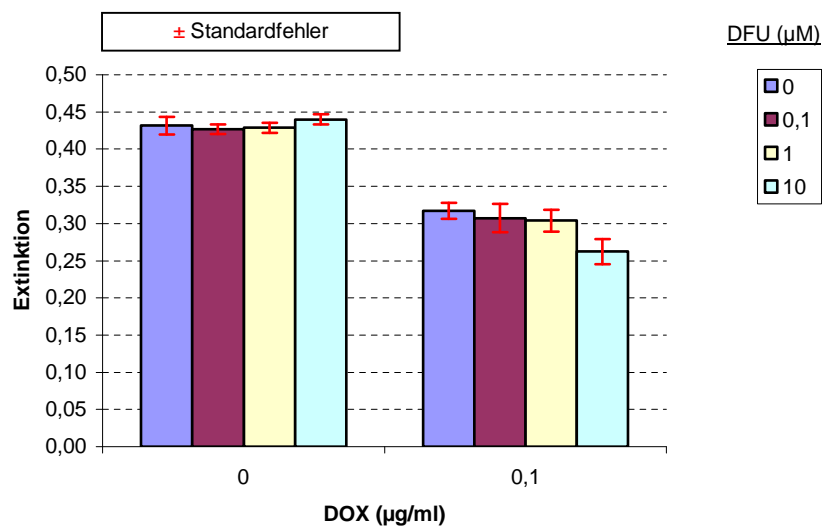


Abbildung 28: MTT-Assay mit HL-60 Zellen nach Vorinkubation mit DFU in Anwesenheit von Doxorubicin (DOX). Die Zellzahl betrug 25 000 pro Vertiefung. **(a)** Messung der Zellvitalität an Tag 1, also 48h nach Zugabe von DFU und 24h nach Zugabe des Zytostatikums. **(b)** Messung der Zellvitalität an Tag 2. **(c)** Messung der Zellvitalität an Tag 3.

3.4.3 Tenoxicam

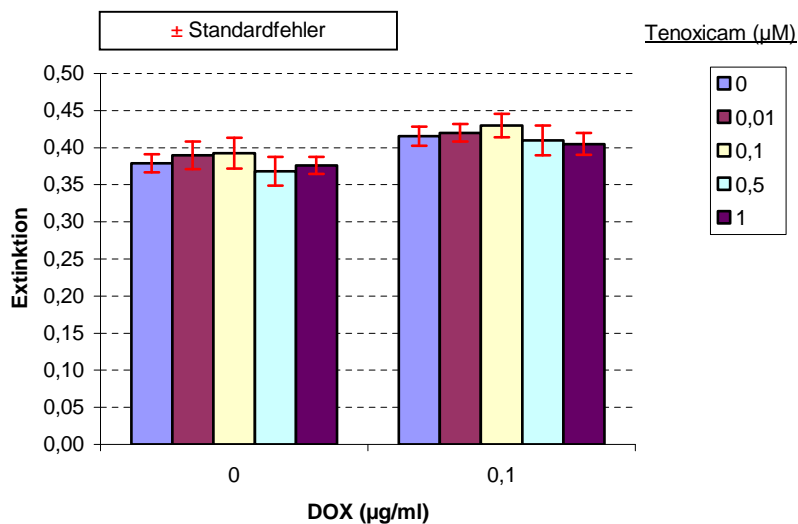
Die Messung der Zellvitalität an Tag 1, also 48h nach Zugabe von Tenoxicam und 24h nach Zugabe des Zytostatikums, ergab, dass Tenoxicam allein keinen

vitalitätssenkenden Effekt auf die Zellen hatte (Signifikanzniveau: alle $p =$ nicht signifikant; t-Test für ungepaarte Werte). Unter $\text{DOX} = 0,1\mu\text{g/ml}$ war keine Wirkungsverstärkung des Zytostatikums in Anwesenheit von Tenoxicam zu beobachten (Signifikanzniveau: alle $p =$ nicht signifikant) (Abb. 29a).

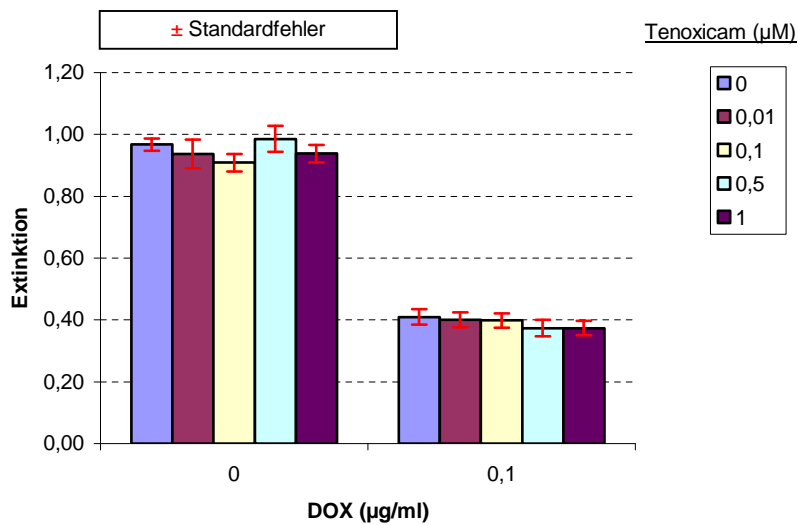
An Tag 2 war zu beobachten, dass auch hier Tenoxicam allein keinen hemmenden Einfluss auf die Zellproliferation nahm (Signifikanzniveau: alle $p =$ nicht signifikant). Unter $\text{DOX} = 0,1\mu\text{g/ml}$ zeigten Zellen, die mit Tenoxicam vorinkubiert waren, eine geringe, dosisabhängige Wirkungsverstärkung des Zytostatikums (Signifikanzniveau: alle $p =$ nicht signifikant). Dieser Effekt bewegte sich zwischen 2% und 9% (Abb. 29b).

An Tag 3 war für Tenoxicam allein kein signifikanter Effekt auf die Zellproliferation zu beobachten (Signifikanzniveau: alle $p =$ nicht signifikant). Unter $\text{DOX} = 0,1\mu\text{g/ml}$ kam es zu einer hochsignifikanten Wirkungsverstärkung des Zytostatikums durch Tenoxicam (Signifikanzniveau $***$, $p = 0,00023$ für $1\mu\text{M}$). Dieser Effekt bewegte sich zwischen 12% und 45% (Abb. 29c).

(a) Tag 1



(b) Tag 2



(c) Tag 3

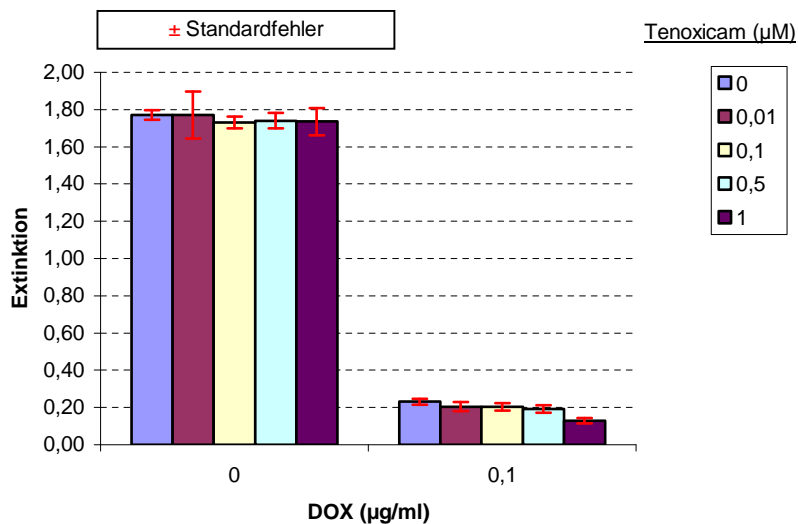


Abbildung 29: MTT-Assay mit HL-60 Zellen nach Vorinkubation mit Tenoxicam in Anwesenheit von Doxorubicin (DOX). Die Zellzahl betrug 25 000 pro Vertiefung. (a) Messung der Zellvitalität an Tag 1, also 48h nach Zugabe von Tenoxicam und 24h nach Zugabe des Zytostatikums. (b) Messung der Zellvitalität an Tag 2. (c) Messung der Zellvitalität an Tag 3.

3.4.4 Weitere COX-Inhibitoren

Analog zu 3.4.1 wurden MTT-Assays in HL-60 Zellen unter DOX mit Etodolac, Indomethacin und Nimesulid vorgenommen. Bei all diesen COX-Inhibitoren war in

Dosierungen, die allein noch keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen nahmen, keine Verstärkung des zytotoxischen Effekts von DOX zu beobachten.

3.5 Die Auswirkungen von Meloxicam auf die COX-2 Proteinexpression

Auch Cyclooxygenase-Inhibitoren mit einer höheren und spezifischeren Affinität zur COX-2 zeigten im Vergleich zu Meloxicam eine geringere Verstärkung des zytotoxischen Effekts von DOX. Um den Einfluss von Meloxicam auf die COX-2 Proteinexpression zu untersuchen wurden HL-60 Zellen 24h mit dem COX-2-Inhibitor Meloxicam inkubiert. Die flowzytometrische Bestimmung des COX-2 Proteins erfolgte nach 2.2.4.2.

Die Messung ergab, dass es unter Meloxicam allein zu einer signifikanten, dosisabhängigen Abnahme der COX-2 Expression kam (Signifikanzniveau *, $p = 0,019$ für $1\mu\text{M}$; t-Test für ungepaarte Werte). Für Meloxicam = $0,5\mu\text{M}$ war eine Abnahme um 11%, für Meloxicam = $1\mu\text{M}$ eine Abnahme um 18% zu beobachten (Abb. 30).

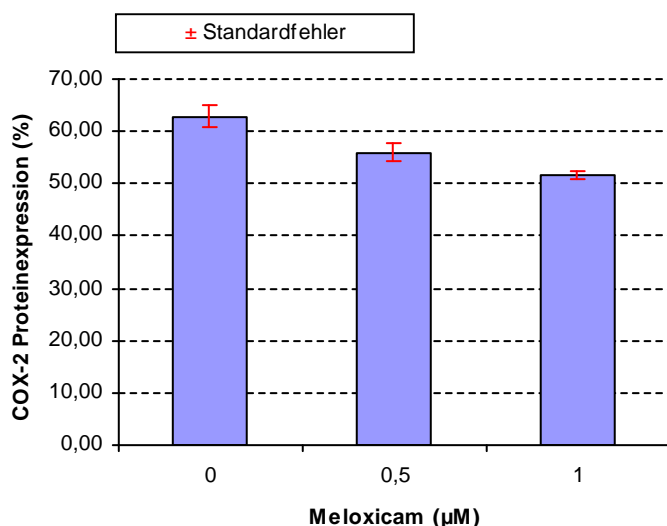


Abbildung 30: COX-2-Expression in HL-60 Zellen. Die Messung erfolgte 24h nach der Inkubation mit Meloxicam.

3.6 Der Einfluss von Prostaglandin E₂ auf die MDR1-abhängige Multidrug-Resistance in HL-60 Zellen

3.6.1 Der Einfluss von Prostaglandin E₂ auf die Zellproliferation unter Doxorubicin in der HL-60-Zelllinie

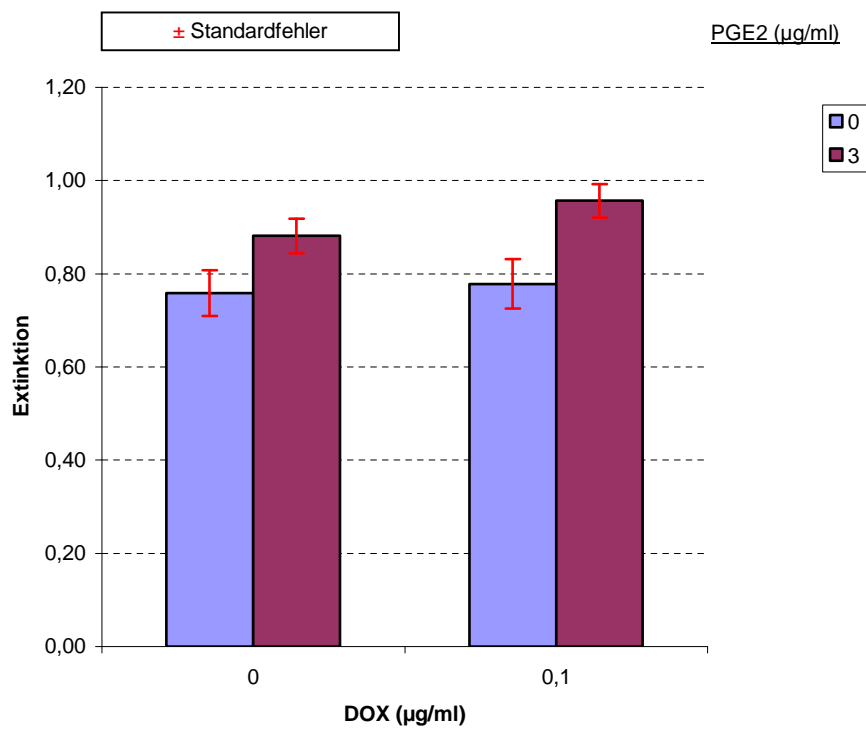
Um zu überprüfen, ob die Verstärkung der Zytotoxizität von DOX und L-DNR durch Meloxicam auf seiner Eigenschaft als COX-Inhibitor beruhte, wurde untersucht, ob mittels Zugabe von PGE₂ als COX-Produkt und möglichem Mediator der zytostatische Effekt von DOX abgeschwächt werden kann. Es wurde analog zu 3.2 ein MTT-Assay durchgeführt.

Die Messung der Zellvitalität an Tag 1, also 48h nach Zugabe von Prostaglandin E₂ und 24h nach Zugabe des Zytostatikums, ergab, dass Prostaglandin E₂ hier allein einen proliferationsfördernden Einfluss auf die Zellen hatte (Signifikanzniveau: $p =$ nicht signifikant; t-Test für ungepaarte Werte). Die Vitalität lag um 16% höher als in der Kontrollpopulation. Unter DOX = 0,1µg/ml zeigten Zellen, die mit Prostaglandin E₂ vorinkubiert waren, eine um 23% höhere Vitalität als diejenigen, die nur mit DOX inkubiert worden waren (Signifikanzniveau *, $p = 0,031$) (Abb. 31a).

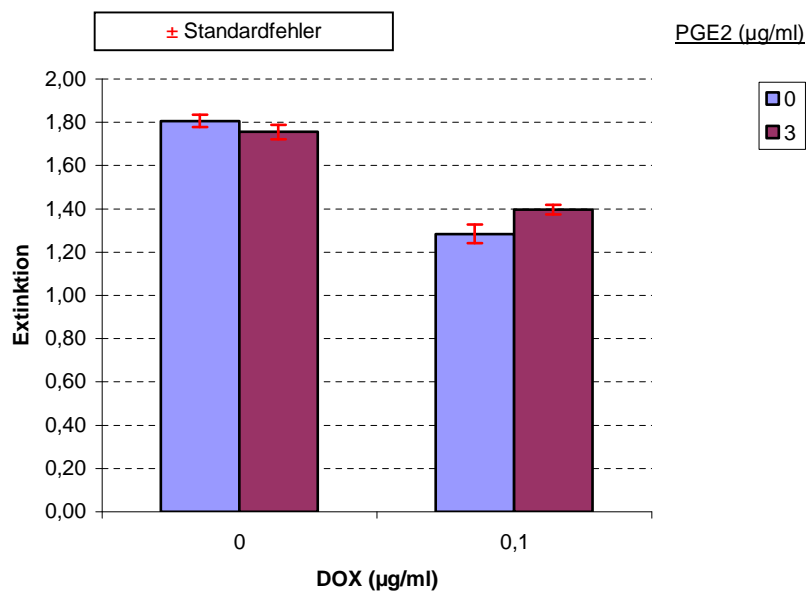
An Tag 2 war zu beobachten, dass Prostaglandin E₂ allein keinen fördernden Einfluss auf die Zellvitalität nahm (Signifikanzniveau: $p =$ nicht signifikant), die Extinktion war bei den mit PGE₂ vorinkubierten Zellen um 3% niedriger als in der Kontrollpopulation. Bei DOX = 0,1µg/ml war eine Wirkungsabschwächung des Zytostatikums um 9% in Anwesenheit von 3µg/ml PGE₂ zu beobachten (Signifikanzniveau: $p =$ nicht signifikant) (Abb. 31b).

Prostaglandin E₂ allein zeigte an Tag 3 keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation der Zellen (Signifikanzniveau: $p =$ nicht signifikant). Die Vitalität lag hier um 4% niedriger als in der Kontrollpopulation. Unter DOX = 0,1µg/ml zeigten Zellen, die mit PGE₂ vorinkubiert waren, eine um 43% höhere Vitalität (Signifikanzniveau ***, $p = 0,00049$) (Abb. 31c).

(a) Tag 1



(b) Tag 2



(c) Tag 3

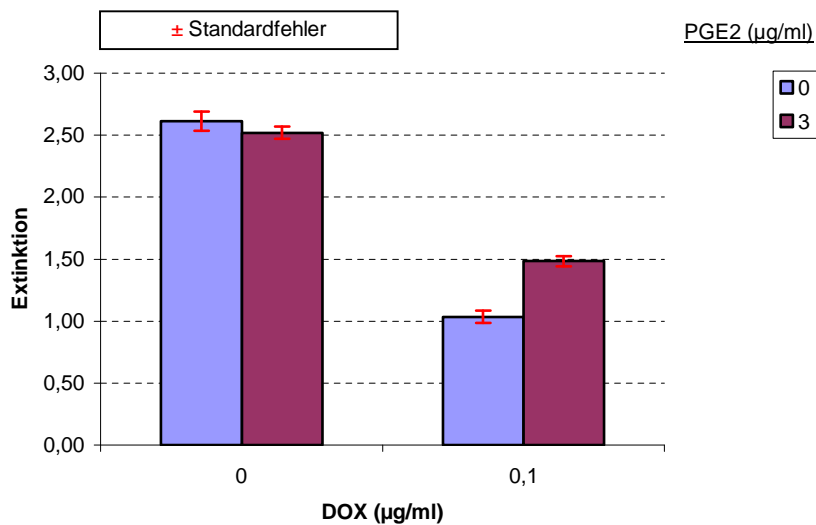


Abbildung 31: MTT-Assay der Zelllinie HL-60 nach Vorinkubation mit PGE₂ in Anwesenheit von Doxorubicin (DOX). Die Zellzahl betrug 25 000 pro Vertiefung. (a) Messung der Zellvitalität an Tag 1, also 48h nach Zugabe von PGE₂ und 24h nach Zugabe des Zytostatikums. (b) Messung der Zellvitalität an Tag 2. (c) Messung der Zellvitalität an Tag 3.

3.6.2 Der Einfluss von Prostaglandin E₂ auf die MDR1-abhängige Transportaktivität in HL-60-Zellen

Um zu überprüfen, ob die Abschwächung des zytostatischen Effekts von DOX durch PGE₂ im Zusammenhang steht mit einer Modulation der funktionellen Aktivität des P-Glykoproteins, wurde gemäß 2.2.4.3 ein Rho 123-Efflux-Assay durchgeführt. Hierzu wurden HL-60 Zellen, anders als in 3.2.1, alle 24h neu mit 3µg/ml PGE₂ versetzt. Die Messungen erfolgten 24h, 48h und 72h nach der ersten Inkubation mit PGE₂.

Nach 24h betrug der Rho 123-Efflux in der Kontrollpopulation 0,1% (Alle Angaben zum Rho 123-Efflux sind Mittelwerte). Der Efflux bei den Zellen, die mit PGE₂ vorinkubiert wurden, war hier mit 6,5% signifikant höher (Signifikanzniveau **, $p = 0,0060$; t-Test für ungepaarte Werte). Die Messung nach 48h ergab, dass auch hier der Efflux unter PGE₂ = 3µg/ml mit 13,1% signifikant höher war als in der Kontrollpopulation, wo der Efflux bei 1,6% lag (Signifikanzniveau *, $p = 0,016$).

Nach 72h war dieser Effekt am deutlichsten zu beobachten: Der Efflux betrug bei den unbehandelten Zellen 1,6% und unter $\text{PGE}_2 = 3\mu\text{g/ml}$ 99,1% (Signifikanzniveau ***, $p = 0,00022$) (Abb. 32).

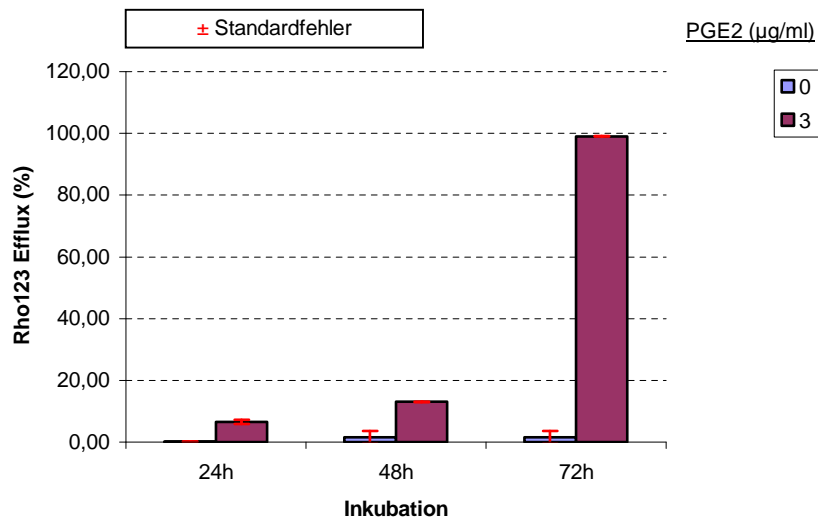


Abbildung 32: Rho 123-Efflux-Assay mit HL-60 Zellen unter täglicher Inkubation mit Prostaglandin E_2 . Die Messungen erfolgten 24h, 48h und 72h nach der ersten Inkubation mit PGE_2 .

3.6.3 Der Einfluss von Prostaglandin E_2 auf die Expression von P-Glykoprotein

Um zu untersuchen, ob der durch PGE_2 induzierte Rho 123-Efflux in HL-60 Zellen auch auf einer erhöhten Pgp-Funktion beruht, wurde nach 2.2.4.2 ein flowzytometrischer Nachweis von P-Glykoprotein durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen wie in 3.6.2 täglich mit $3\mu\text{g/ml}$ PGE_2 inkubiert.

In unbehandelten Zellen war die Pgp-Expression gering; sie blieb auch in den Messungen nach 24h, 48h und 72h in der unbehandelten Kontrollpopulation nahezu unverändert nachweisbar.

Die Zellen, die täglich neu mit $3\mu\text{g/ml}$ PGE_2 versetzt wurden, zeigten 24h und 48h nach der ersten Inkubation noch keinen Anstieg in der Pgp-Expression. Nach 72h war jedoch eine deutliche Induktion der Pgp-Expression zu beobachten (Abb. 33).

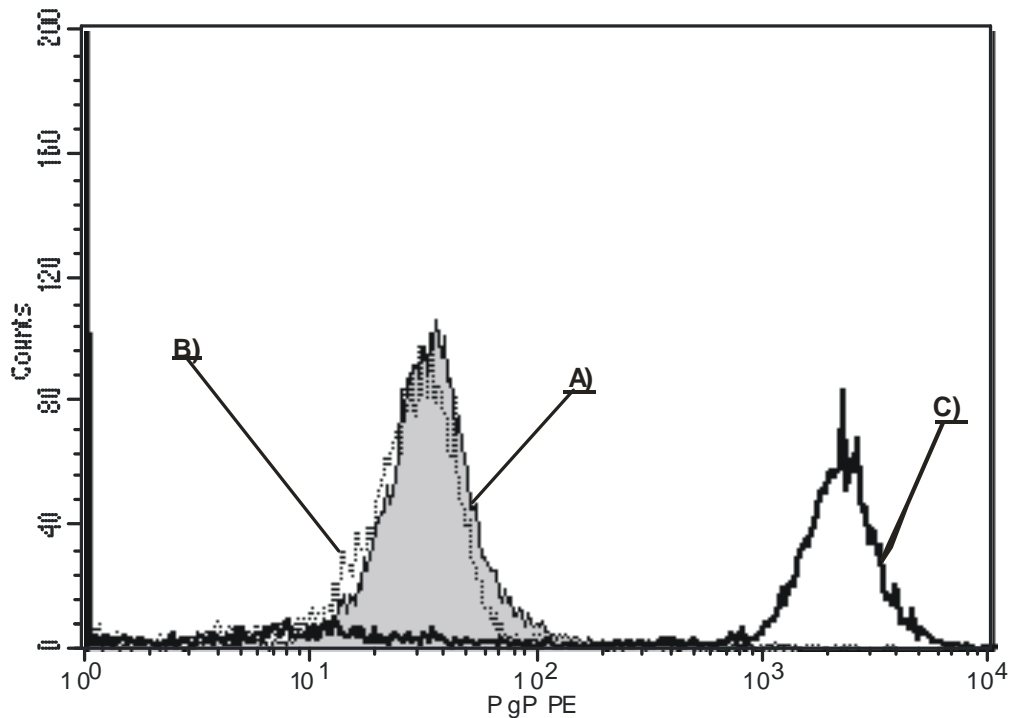


Abbildung 33: Flowzytometrische Bestimmung des P-Glykoproteins in HL-60 Zellen. A) Messung der Pgp-Expression nach 24h in unbehandelten Zellen. B) Messung der Pgp-Expression nach 72h in unbehandelten Zellen. C) Messung der Pgp-Expression nach 72h in Zellen, die täglich mit 3µg/ml PGE₂ inkubiert worden waren.

3.6.4 Antagonisierung des Meloxicam-Effektes durch PGE₂

Es wurde untersucht, ob mittels Zugabe von PGE₂ als COX-Produkt und möglichem Mediator der verstärkende Effekt von Meloxicam aufhebbar ist. Es wurde wiederum analog zu 3.2 ein MTT-Assay durchgeführt. Die Hälfte der Vertiefungen wurde dabei zusätzlich zu Meloxicam mit 3µg/ml PGE₂ versetzt. Besonders bei niedrigen Meloxicam-Konzentrationen bewirkte PGE₂ eine Aufhebung des wirkungsverstärkenden Effektes.

Bei höheren Meloxicam-Konzentrationen war die Antagonisierung des Meloxicam-Effektes nicht zu beobachten. Das Phänomen war jedoch erst nach 72h nachweisbar: Unter DOX = 0,1µg/ml war die Vitalität der Zellen, die mit 0,01µM Meloxicam vorinkubiert waren, um 13% geringer als die der nur mit DOX = 0,1µg/ml behandelten Zellen (Signifikanzniveau *, $p = 0,03$; t-Test für ungepaarte Werte).

Unter DOX = 0,1µg/ml und Meloxicam = 0,01µm war eine Steigerung der Extinktion um 23% für die Zellen zu beobachten, die noch zusätzlich mit PGE₂ = 3µg/ml vorinkubiert worden waren (Signifikanzniveau **, p = 0,0022) (Abb. 34).

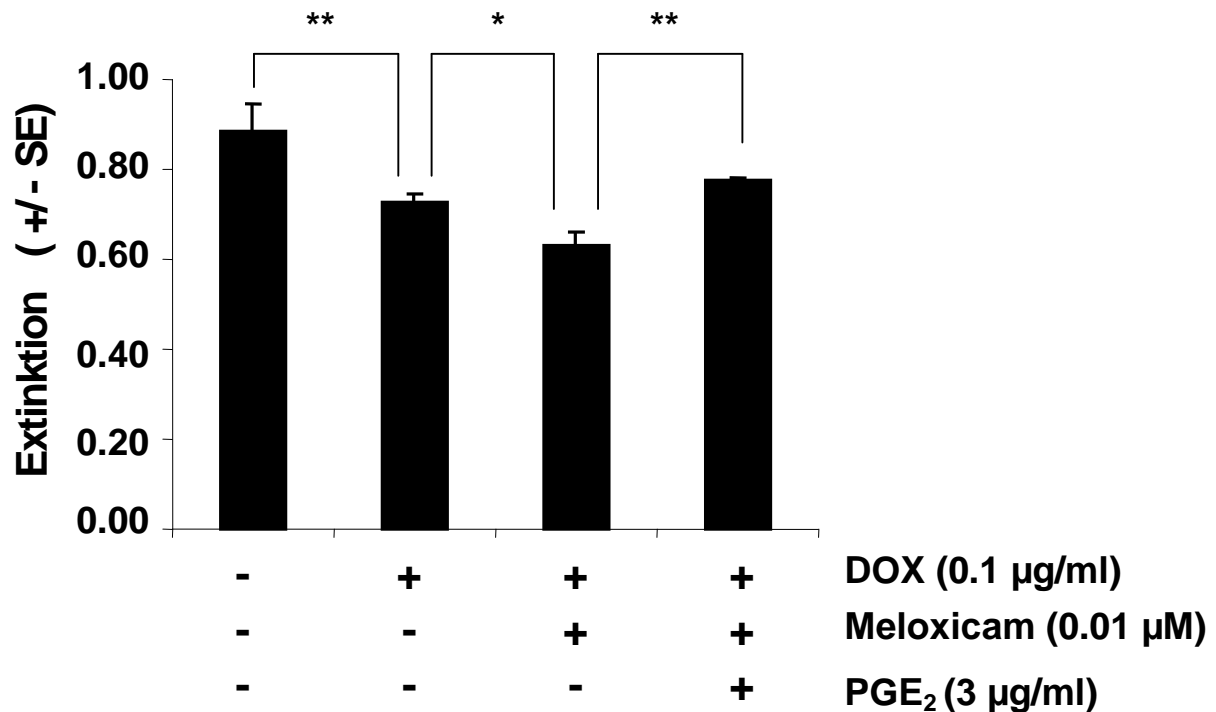


Abbildung 34: MTT-Assay der Zelllinie HL-60 nach Vorinkubation mit Meloxicam und PGE₂ in Anwesenheit von Doxorubicin. Die Messung der Zellvitalität erfolgte an Tag 3, also 96h nach Zugabe von Meloxicam und PGE₂ und 72h nach Zugabe des Zytostatikums

3.7 Endoperoxidantagonisten als Modulatoren der Doxorubicin-Wirkung auf Zellproliferation und MDR1-abhängigen Transport bei HL-60 Zellen

3.7.1 Der Einfluss von AH6809 auf die Zellproliferation unter Doxorubicin bei HL-60 Zellen

Um eine mögliche PGE₂-vermittelte Regulation der MDR1-Expression über spezifische Prostaglandin E (EP) -Rezeptoren zu überprüfen, wurde nach 2.2.5.3 ein

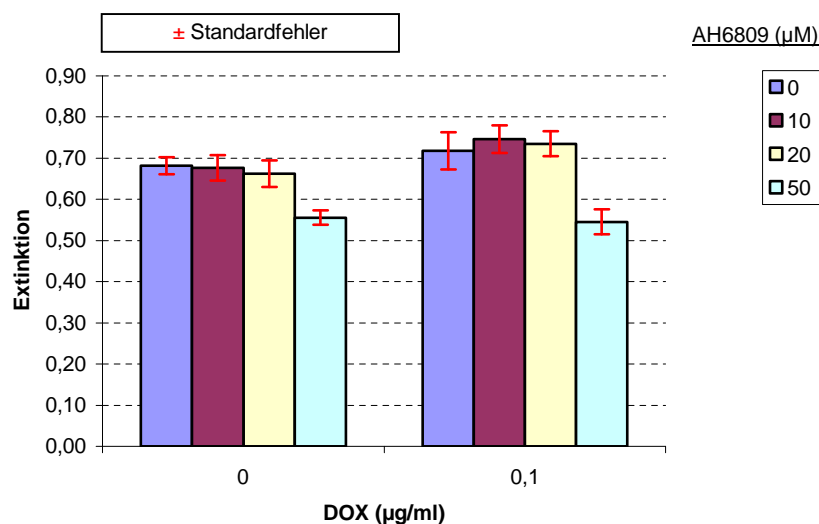
MTT-Assay mit AH6809 in der Anwesenheit von DOX durchgeführt. AH6809 ist ein EP und DP Rezeptor-Antagonist mit nahezu gleicher Affinität zu EP1, EP2, EP3-III und DP1 Rezeptoren³.

Die Messung der Zellvitalität an Tag 1, 26h nach Zugabe von AH6809 und 24h nach Zugabe des Zytostatikums, ergab, dass AH6809 hier allein in einer Dosierung von 50µM einen vitalitätssenkenden Einfluss auf die Zellproliferation nahm. (Signifikanzniveau ***, $p = 0,00062$; t-Test für ungepaarte Werte). Unter DOX = 0,1µg/ml zeigten die Zellen, die mit 50µM AH6809 vorbehandelt waren, eine signifikant niedrigere Vitalität (Signifikanzniveau: **, $p = 0,0065$) (Abb. 35a).

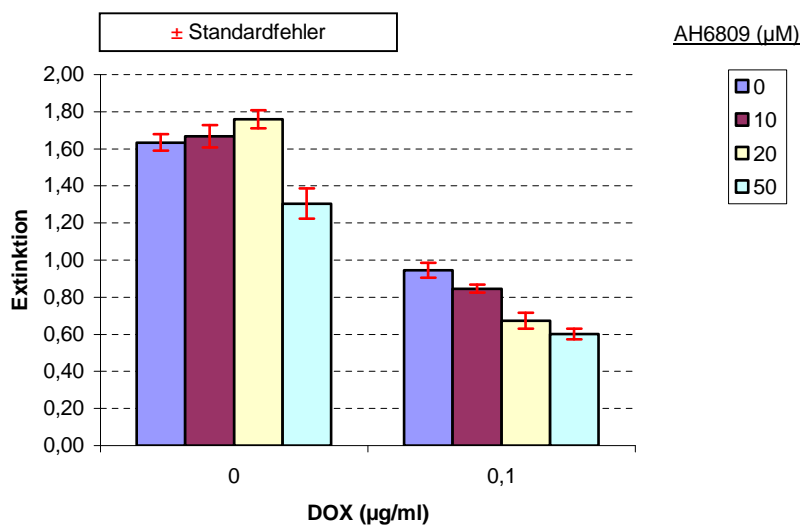
Die Messung der Zellvitalität an Tag 2 ergab, dass auch hier 50µM AH6808 allein einen signifikanten vitalitätssenkenden Effekt hatten (Signifikanzniveau ***, $p = 0,0007$). Bei DOX = 0,1µg/ml war eine hochsignifikante Wirkungsverstärkung des Zytostatikums in Anwesenheit von AH6809 zu beobachten (Signifikanzniveau ***, $p < 0,0001$ für 50µM; für 20µM ***, $p = 0,00036$ und für 10µM *, $p = 0,045$) (Abb. 35b).

An Tag 3 war für AH6809 allein kein signifikanter Effekt auf die Zellproliferation zu beobachten (Signifikanzniveau: alle $p =$ nicht signifikant). Unter DOX = 0,1µg/ml war die Wirkungsverstärkung des Zytostatikums durch AH6809 hochsignifikant (Signifikanzniveau ***, $p < 0,0001$ für 50µM; für 20µM ***, $p < 0,0001$ und für 10µM ***, $p < 0,0001$) (Abb. 35c).

(a) Tag 1



(b) Tag 2



(c) Tag 3

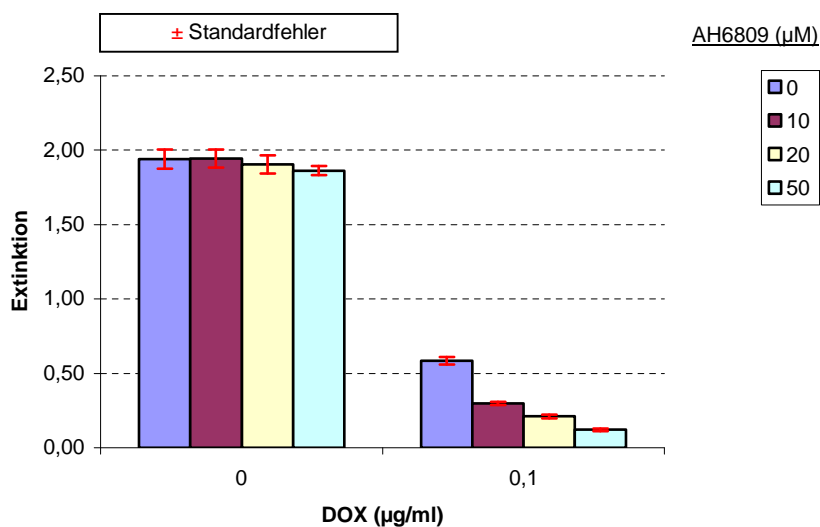


Abbildung 35: MTT-Assay der Zelllinie HL-60 nach Vorinkubation mit AH6809 in Anwesenheit von Doxorubicin (DOX). Die Zellzahl betrug 25 000 pro Vertiefung. (a) Messung der Zellvitalität an Tag 1, also 26h nach Zugabe von AH6809 und 24h nach Zugabe des Zytostatikums. (b) Messung der Zellvitalität an Tag 2. (c) Messung der Zellvitalität an Tag 3.

Der zytostatische Effekt von DOX wurde durch AH6809 dosisabhängig verstärkt. An Tag 1 bewegte sich dieser Effekt unter DOX = 0,1µg/ml zwischen 0% und 24%, an Tag 2 zwischen 10% und 36% und an Tag 3 zwischen 49% und 79%. 50µM AH6809 allein bewirkten eine Abnahme der Extinktion an Tag 1 um 19%, an Tag 2 um 20% und an Tag 3 um 4%.

3.7.2 Der Einfluss von AH6809 auf den MDR1-abhängigen Transport bei HL-60 Zellen

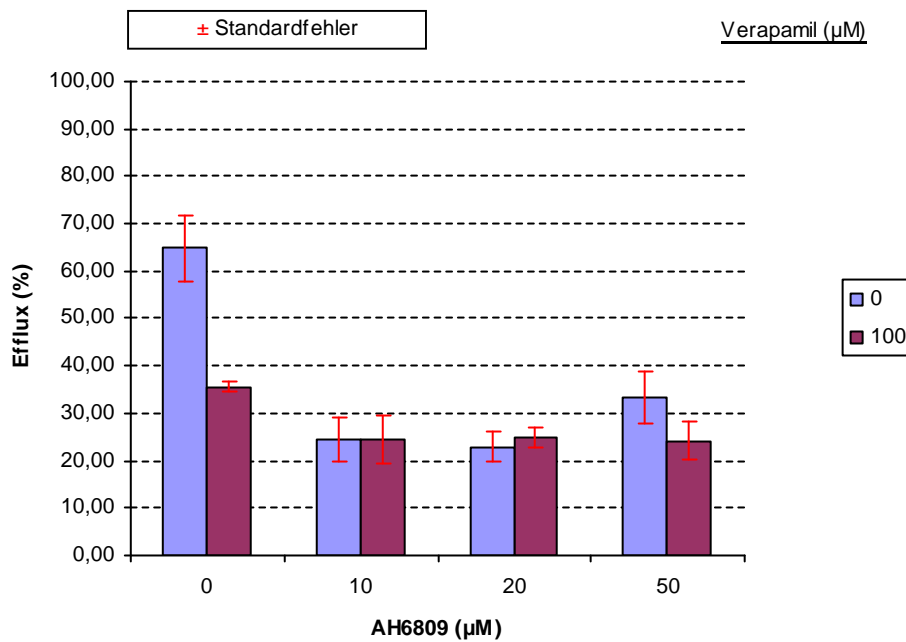
Um den Einfluss von AH6809 auf den durch DOX induzierten Efflux zu untersuchen, wurden HL-60 Zellen analog zu 3.7.1 mit verschiedenen AH6809-Konzentrationen versetzt und nach 2h DOX zugegeben. Anschließend wurde gemäß 2.2.4.3 ein Rho 123-Efflux-Assay an Tag 3 der DOX-Inkubation durchgeführt. Um zu untersuchen, ob der durch DOX induzierte Rho 123-Efflux in HL-60 auf einer erhöhten Pgp-Funktion beruht, wurde der Assay auch in Anwesenheit des kompetitiven Pgp-Inhibitors Verapamil ((±)-Verapamilhydrochlorid) durchgeführt.

Es war zu beobachten, dass DOX = 0,05µg/ml allein gegenüber der unbehandelten Kontrollpopulation eine Zunahme des Efflux um 240% induzierte. Dieser Efflux unter DOX allein konnte durch Verapamil deutlich gehemmt werden, es kam zu einer Verringerung um 45% unter 100µM Verapamil.

Unter DOX = 0,05µg/ml kam es in den mit AH6809 inkubierten Zellen zu einer Verringerung des Rho 123-Efflux (Signifikanzniveau *, $p = 0,04$ für 10µM; für 20 µM *, $p = 0,031$). Es wurde eine Verringerung des unter DOX allein hochregulierten Efflux unter 10µM AH6809 um 62%, unter 20µM um 65% und unter 50µM um 49% beobachtet. Dieser Efflux unter DOX und AH6809 zusammen war durch Verapamil kaum noch beeinflussbar, nur unter DOX = 0,05µg/ml und AH6809 = 50µM war eine Verringerung um 27% durch 100µM Verapamil zu erkennen (Abb. 36a).

Die Zellen, die nicht mit DOX inkubiert worden waren, zeigten einen deutlich geringeren Efflux. Hier konnte dieser vergleichsweise niedrige Efflux nicht durch Verapamil gehemmt werden, vielmehr kam es zu einem Anstieg des Efflux um 56% unter 100µM Verapamil. 50µM AH6809 allein bewirkten keine Effluxverringerng. Es kam zu einem Anstieg des Efflux um 127%, der durch 100µM Verapamil um 18% verringert werden konnte (Abb. 36b).

(a) DOX = 0,05µg/ml



(b) DOX = 0µg/ml

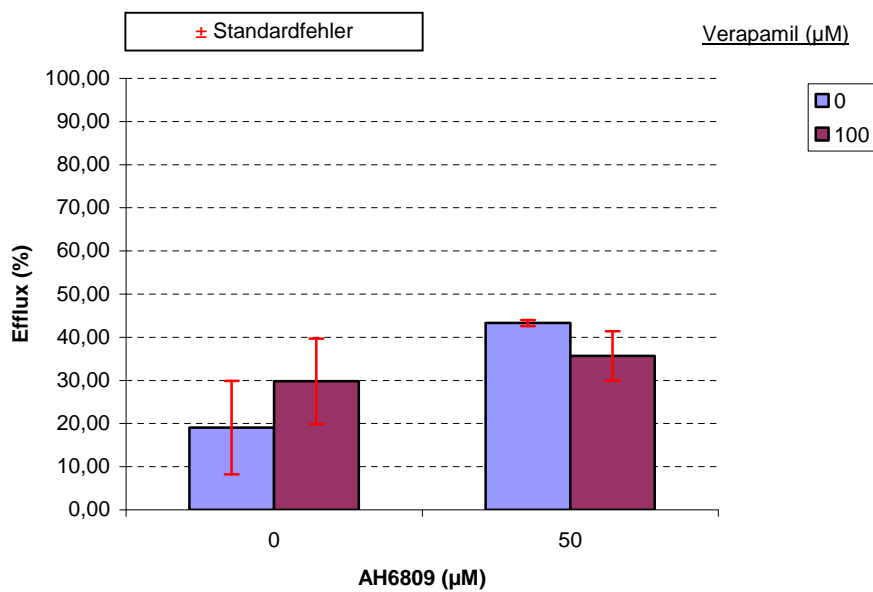


Abbildung 36: Rho 123-Efflux in HL-60 Zellen in Anwesenheit von AH6809. (a) Messung an Tag 3, also 74h nach Zugabe von AH6809 und 72h nach Zugabe des Zytostatikums. (b) Kontroll-Messung an Tag 3, also 74h nach Zugabe von AH6809.

3.7.3 Der Einfluss von AH23848B auf die Zellproliferation unter Doxorubicin bei HL-60 Zellen

Um eine mögliche PGE₂-vermittelte Regulation der MDR1-Expression über spezifische Prostaglandin E (EP) -Rezeptoren zu überprüfen, wurde nach 2.2.5.3 ein MTT-Assay mit AH23848B in der Anwesenheit von DOX durchgeführt. AH23848B ist ein Antagonist an EP4-Rezeptoren ¹. Hierbei war in Dosierungen, die allein noch keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen nahmen, keine Verstärkung des zytotoxischen Effekts von DOX zu beobachten.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte die Modulation der Multidrug Resistance bei akuten myeloischen Leukämien durch COX-2-Inhibitoren untersucht und spezifische Regulationsmechanismen analysiert werden.

4.1 Induktion von Rho 123 – Efflux und Pgp-Expression durch Doxorubicin

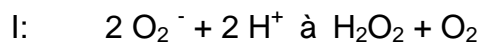
Die Inkubation mit dem Anthracyclin Doxorubicin verursachte eine Hochregulation des basal geringen Rho 123 - Efflux in HL-60 Zellen. Auch die Pgp-Expression wurde induziert. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Tatsache, dass Anthracycline als starke Induktoren der MDR1-Expression und -Aktivität gelten^{24,130,190}.

4.2 Induktion der Prostaglandin E₂ – Freisetzung durch Anthracycline

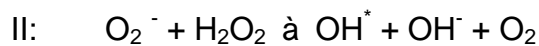
In der HL-60 Zelllinie und auch für primäre Blasten konnte bereits gezeigt werden, dass es unter Doxorubicin zu einer Aktivierung des Arachidonsäurestoffwechsels kommt. Die PGE₂-Freisetzung als Maß für die COX-2-Aktivität stieg jeweils um ein Vielfaches an.

Neben der Zytostase durch die Störung der Matrizenfunktion der DNA bewirken Anthracycline im Rahmen ihrer Metabolisierung durch Ausbildung von Semichinonradikalen und reaktiver Sauerstoffspezies zytotoxischen Stress¹⁴. Im ersten Schritt der enzymatischen Reduktion von Doxorubicin kommt es zu einer Cytochrom P 450 abhängigen Reduktion, die in der Mikrosomenfraktion von Leberzellen stattfindet und zur Bildung von reaktiven Semichinon-Radikalen führt. Durch deren weitere Metabolisierung können einerseits Metaboliten entstehen, die native DNS alkylieren können, andererseits kann in Gegenwart von Sauerstoff das Semichinon-Radikal wieder zum Chinon oxidiert werden, wobei es zur Bildung des

Ausgangsproduktes Doxorubicin und eines Peroxidations (O_2^-) kommt. Das Peroxidation kann nun zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff reagieren (I).



Ebenfalls kann das Peroxidation mit Wasserstoffperoxid Hydroxyradikale (OH^*) und OH^- - Anionen bilden (II).



Sowohl Wasserstoffperoxid als auch Hydroxyradikale sind stark zytotoxisch wirksame Agenzien, die in der Lage sind, Zellen zu zerstören bzw. oxidativen Stress auszulösen.

Die Cyclooxygenase 2 unterliegt einer Induktion durch diesen zytotoxischen Stress. Zahlreiche Studien zeigen, dass die COX-2 in vielen Tumoren überexprimiert wird (siehe 1.4.3) und COX-2-Produkte wie das PGE_2 fördernd in die Karzinogenese involviert sind^{113,143,224}. ZIEMANN et al. zeigten bereits, dass oxidativer Stress und die COX-2 eine Rolle bei der intrinsischen Überexpression der *mdr1b*-Isoform in Rattenhepatozyten spielen^{252,253}.

4.3 Induktion von Rho 123 – Efflux und Pgp-Expression durch Prostaglandin E2

HL-60 Zellen, die täglich mit $3\mu\text{g/ml}$ PGE_2 inkubiert worden waren, zeigten nach 24h, 48h und 72h einen Anstieg des MDR1-abhängigen Effluxes von 2% (unbehandelte Kontrollpopulation) auf 7%, 13% und 99% der initialen Akkumulation.

Das Ergebnis demonstriert, dass PGE_2 eine wichtige Rolle für die Anthracyclin-induzierte und COX-2-vermittelte Induktion von MDR1 in der AML einnimmt. In primären Rattenhepatozyten wurde bereits nachgewiesen, dass eine Cyclooxygenase-2-abhängige PGE_2 -Freisetzung zur intrinsischen *mdr1b*-Überexpression beiträgt²⁵¹.

4.4 Modulierung des Resistenzverhaltens

Die Ergebnisse unter 3.2 sprechen dafür, dass eine vermehrte PGE₂-Freisetzung an der MDR1-Induktion beteiligt ist. Diese sollte somit durch den Einsatz eines COX-Inhibitors modulierbar sein, was auch für Meloxicam, NS398, DFU und Tenoxicam zu beobachten war.

4.4.1 Steigerung der Effektivität von Anthracyclinen durch Cyclooxygenase-Inhibitoren

Die Ergebnisse der MTT-Assays von HL-60 Zellen zeigen deutlich, dass sich die Abschwächung der Resistenzausprägung mittels Verminderung der Hochregulation von Pgp-Expression und Rho 123-Efflux durch Vorinkubation mit Meloxicam günstig auf die Effektivität des Zytostatikums auswirkt. Die effektive Dosis, ED 50, von liposomalem Daunorubicin und Doxorubicin, bei der es nach 24-, 48- bzw. 72-stündiger Inkubation zu einer 50%-igen Verringerung der Zellvitalität kommt, war bei HL-60 ausgeprägt dosisabhängig vermindert. Das heißt, man würde zum Erreichen desselben zytotoxischen Effektes erheblich geringere Dosen der Zytostatika benötigen.

Auch in den primären Blasten konnte oben beschriebener Effekt nachgewiesen werden, allerdings war dieser nicht so ausgeprägt wie in der Zelllinie. Möglicherweise liegt dies an der höheren Empfindlichkeit und höherem Anspruch primärer Zellen an die Kulturbedingungen. Um Störgrößen zu minimieren, wurde ausschließlich FCS als Zusatz zum Kulturmedium verwendet, so dass die Kulturbedingungen u. U. nicht optimal waren. Die Vitalität war in allen primären Zellen deutlich geringer als in der HL-60-Zelllinie; zum Teil sank die Extinktion im MTT-Assay im Verlauf der Versuchstage auch in unbehandelten Kontrollpopulationen. Aufgrund der geringeren Teilungsaktivität der primären Blasten war hier vermutlich auch die Effektivität der eingesetzten Anthracycline herabgesetzt; bei vielen Tests war ein deutlicher zytostatischer Effekt erst an Tag 3 der Versuchsreihen sichtbar.

Bei einer Vorinkubation der HL-60 Zellen mit NS398, DFU und Tenoxicam war im Vergleich zu Meloxicam eine geringere Verstärkung des zytotoxischen Effekts von DOX zu beobachten. Unter Etodolac, Indomethacin und Nimesulid war in Dosierungen, die selbst keinen Einfluss auf die Vitalität nahmen, keine Verstärkung nachzuweisen.

Für Indomethacin, Tenoxicam und auch für Etodolac könnte dies in einer geringeren relativen Potenz ihrer COX-2-Hemmung begründet sein. Nimesulid, NS398 und DFU sind hingegen Stoffe, die eine höhere Affinität und Selektivität als Meloxicam zur COX-2 zeigen (Tab. 7).

Stoff	IC ₅₀ COX-1 (µM)	IC ₅₀ COX-2 (µM)	COX-2/COX-1-IC ₅₀ -Ratio
Indomethacin	0,028	1.68	60
Tenoxicam	0,0201	0,322	16
Etodolac	34	3.4	0,1
Meloxicam	4,8	0,43	0,090
Nimesulid	9,2	0,52	0,057
NS398	16,8	0,1	0,006
DFU	>50	0,04	<0,001

Tab. 7: Relative Potenz der verwendeten NSAIDs hinsichtlich ihrer COX-1- und COX-2-Hemmung¹⁹¹.

Unter Einwirkung von Meloxicam nahm die COX-2-Proteinexpression dosisabhängig ab, was dafür spricht, dass Meloxicam nicht allein eine hemmende Wirkung auf die Enzymfunktion ausübt, sondern bereits Einfluss auf die Transkription bzw. Translation von COX-2 hat. ENGELHARDT et al. zeigten 1996 *in vitro* in Makrophagen, dass Meloxicam im Gegensatz zu anderen NSAIDs effektiver ist, wenn es bereits vor oder während der COX-2-Induktionsphase statt nach der COX-2

-Induktion verabreicht wird. Dies ist ebenfalls ein Hinweis darauf, dass Meloxicam nicht nur die Enzymaktivität hemmt, sondern bereits die Induktion des Enzymsystems inhibieren kann ⁶¹.

4.4.2 Steigerung der Effektivität von Anthracyclinen durch Prednisolon

Eine Vorinkubation der HL-60 Zellen mit Prednisolon wirkte sich günstig auf die Effektivität des Zytostatikums aus. Auch in Dosierungen, die allein keinen Einfluss auf die Zellproliferation zeigten, war eine dosisabhängige Wirkungsverstärkung von Doxorubicin zu beobachten. Dieser Effekt könnte durch eine Hemmung der Prostaglandin-vermittelten Hochregulation von Pgp begründet sein. Prednisolon führt zu einer verminderten Prostaglandin-Synthese durch u. a. Blockade der COX-2 Induktion ¹⁴⁴. Glukokortikoide sind ein wichtiger Bestandteil der AML-Therapie bei Kindern ⁶³.

4.4.3 Der protektive Effekt von Prostaglandin E₂ auf Doxorubicin-behandelte HL-60 Zellen

Durch eine Vorinkubation mit PGE₂ konnte der zytostatische Effekt von DOX abgeschwächt werden. PGE₂ allein hingegen zeigte keinen proliferationsfördernden Einfluss auf die HL-60 Zellen.

Dieser protektive Einfluss von PGE₂ auf die Zellproliferation unter DOX lässt auf eine Rolle von PGE₂ im Signaltransduktionsweg der MDR in der HL-60 Zelllinie schließen.

4.4.4 Antagonisierung des Effektes von Meloxicam durch Prostaglandin E₂

Der wirkungsverstärkende Effekt von Meloxicam auf die Zytotoxizität von Doxorubicin in HL-60 Zellen ließ sich teilweise durch die gleichzeitige Gabe von COX-Inhibitor und dem COX-Produkt PGE₂ 24h vor Doxorubicingabe aufheben. Dies war besonders bei den niedrigen Meloxicam-Konzentrationen nachweisbar und spricht ebenfalls für eine COX-Abhängigkeit des wirkungsverstärkenden Effektes und für eine Rolle von PGE₂ als Modulator von MDR1.

4.4.5 PGE₂-Rezeptorantagonisten als Modulatoren der DOX-Wirkung auf Zellproliferation und MDR1-abhängigen Transport bei HL-60 Zellen

Die Ergebnisse in der HL-60-Zelllinie unter 3.3 zeigen, dass sich die Abschwächung der Resistenzausprägung durch Vorinkubation mit AH6809 günstig auf die Effektivität des Zytostatikums auswirkt. AH6809 ist ein EP und DP Rezeptor-Antagonist mit nahezu gleicher Affinität zu EP1, EP2, EP3-III und DP1 Rezeptoren². CASIBANG et al. zeigten bereits, dass AH6809 in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen den PGE₂ vermittelten cAMP-Anstieg antagonisieren und die Zellproliferation inhibieren konnte²⁷. Auch in Mammakarzinom-Zelllinien antagonisierte AH6809 die PGE₂-Bindung an die Zellen, senkte so den intrazellulären cAMP-Spiegel⁷⁵ und reduzierte die Migrations- und Invasionsfähigkeit der Tumorzellen¹⁸⁴.

Für AH23848B hingegen, ein Antagonist an EP4-Rezeptoren¹⁸³, war in Dosierungen, die allein noch keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen nahmen, keine Verstärkung des zytotoxischen Effektes von DOX zu beobachten.

AH6809 zeigte eine deutliche Hemmung des DOX-induzierten Rho 123-Efflux in HL-60 Zellen. Um zu untersuchen, ob der durch DOX induzierte Rho 123-Efflux in HL-60 auf einer erhöhten Pgp-Funktion beruht, wurde der Assay auch in Anwesenheit des kompetitiven Pgp-Inhibitors Verapamil ((±)-Verapamilhydrochlorid) durchgeführt. Es war zu beobachten, dass Verapamil in Zellen mit hohem Rho 123-Efflux eine

ausgeprägte Verminderung des Effluxes bewirken konnte, so dass dieser gesteigerte Efflux vermutlich aus einer vorhergehenden Induktion des P-Glykoproteins resultierte. In unbehandelten Zellen und in Zellen, die nach zusätzlicher Inkubation mit AH6809 einen geringen Efflux zeigten, war keine weitere Hemmung durch Verapamil möglich. Hier war sogar teilweise eine Efflux-Verstärkung durch Verapamil festzustellen. Eine Induktion des Efflux bzw. eine Verzögerung des Uptake durch Verapamil wurde in ähnlicher Form von HIRSCH-ERNST et al. beobachtet und zwar insbesondere bei Zellen mit niedriger Pgp-Expression⁹⁹. Möglicherweise entsteht dieser paradoxe Effekt dadurch, dass nur wenig des eingesetzten Verapamil an Pgp gebunden wird und im Sinne der Hormesis eine Induktion des Transporters erzeugt. Hormesis, ein Phänomen der Dosis-Wirkungs-Beziehung, welches durch Niedrigdosis-Stimulation und Hochdosis-Inhibition, also einen biphasischen Dosis-Wirkungs-Beziehungs-Verlauf, gekennzeichnet ist, scheint zahlreichen Untersuchungen zu Folge weitgehend unabhängig von der Art des chemischen bzw. physiologischen Agens oder des biologischen Modells zu sein und spielt im Besonderen für die toxikologische Einschätzung von Xenobiotika eine Rolle. Zu den Rezeptorsystemen, die einen biphasischen Verlauf der Dosis-Wirkungs-Beziehung zeigen, gehören die Prostaglandine und ebenfalls der COX-2-Induktor TNF α . Wird eine bestimmte Konzentration überschritten, kehrt sich der pharmakologische Effekt um²⁵. Die Beobachtung hormetischer Effekte von Chemotherapeutika spielen eine Rolle für die Peptidbiologie und deren Verbindung zum humanen Genom, da ebenfalls für viele Peptide Hormesis-ähnliche biphasische Dosis-Wirkungs-Beziehungen bestehen²⁵.

4.4.6 Abschätzung der Toxizität

Eine Steigerung der zytostatischen Wirkung durch Abschwächung der Pgp-Funktion und -Transportaktivität kann auch in gesunden Zellen eine erhöhte Toxizität bewirken^{35,216}.

Ein Risikofaktor bei dem gemeinsamen Einsatz von Doxorubicin und COX-2-Inhibitoren ist die Kardiotoxizität der Anthracycline. Diese wird in die Kategorien (I) eine subakute, innerhalb der ersten Woche nach Applikation auftretende

Symptomatik, (II) eine nach Monaten auftretende chronische kongestive Kardiomyopathie mit den Symptomen einer Herzinsuffizienz und (III) eine sehr spät auftretende Kardiotoxizität, die meist erst ein Jahr oder später nach Abschluss der Anthracyclin-haltigen Chemotherapie zu beobachten ist, eingeteilt^{88,209}. Obschon verschiedene Pathomechanismen für die Entstehung einer chronischen Anthracyclin-induzierten Kardiotoxizität diskutiert werden, gilt es als sehr wahrscheinlich, dass der Entstehung von reaktiven freien Radikalen in den Mitochondrien die größte Bedeutung zukommt. Wie schon unter 4.2 beschrieben, kommt es unter Einfluss der CYP 450-Reduktase auf das Anthracyclin zur Bildung eines instabilen Semichinons und im Folgenden zur Bildung von reaktiver Sauerstoffspezies und oxidativem Stress. Die Zahl der durch relativem Mangel an Katalase bzw. Superoxid-Dismutase besonders empfindlich reagierenden Myozyten reduziert sich unter allmählicher Ausbildung einer Kardiomyopathie⁷⁸.

In Rattenkardiozyten führte eine Inhibition der Cyclooxygenase-2 zu einer noch gesteigerten Kardiotoxizität von Anthracyclinen⁵⁷. Doxorubicin induziert die COX-2-Aktivität in den Zellen, was zu einer gesteigerten Prostaglandin- und Prostacyclin-Freisetzung führte. Wurde die COX-2 spezifisch gehemmt, kam es zu gesteigerter Zelltodrate der Kardiomyozyten. Durch den Einsatz des Prostacyclin-Analogons Iloprost wurde dieser Effekt aufgehoben⁴. MENDEZ et al. untersuchten die Effekte von PGE₂ auf das Wachstum von Kardiomyozyten. PGE₂ induzierte dabei eine vermehrte Protein-Synthese und führte zu einem Wachstum der Zellen. Sulproston, ein EP1/EP3 Agonist, nahm keinen Einfluss auf den intrazellulären cAMP-Spiegel, PGE₂ erhöhte ihn deutlich. AH6809 hatte keinen Effekt auf die PGE₂ induzierte Protein-Synthese¹⁴⁰. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass eine Steigerung der zytostatischen Wirkung von Anthracyclinen durch Abschwächung der Pgp-Funktion über Antagonisten an spezifischen EP-Rezeptoren zu einer vergleichsweise geringen Kardiotoxizität führen könnte.

4.5 Cyclooxygenase-unabhängige Effekte von Cyclooxygenase-Inhibitoren

Die antiinflammatorische und analgetische Wirkung von NSAIDs beruht hauptsächlich auf der Hemmung der Cyclooxygenasen. Die COX-2 agiert als „immediate early gene“⁵⁸ und ist somit Gegenstand schneller Regulation bzw. Induktion auf transkriptioneller Ebene. Auf diesem Weg kommt es zur exzessiven Produktion von Prostaglandinen, welche Nocizeptoren sensibilisieren und die Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren stimulieren. Es gibt immer mehr Hinweise, dass Prostaglandine ebenfalls zum Tumorwachstum beitragen, beispielsweise durch die Inhibition der Apoptose¹⁹⁸ und durch die Induktion der Bildung neuer Blutgefäße, welche die Versorgung und Wachstum der Tumorzellen gewährleisten¹³⁶. Dieses Phänomen erklärt teilweise die wachstumshemmende Wirkung bestimmter NSAIDs auf verschiedene Tumoren.

Einige NSAIDs zeigen eine protektive Wirkung gegenüber dem Colonkarzinom und anderen malignen Erkrankungen^{59,173}. Celecoxib, ein COX-2-selektiver Inhibitor, ist in der Lage, die Colonkarzinogenese in Tieren und Menschen zu reduzieren^{109,207}. In den USA wurde Celecoxib zur Prävention von Colonkarzinomen bei Patienten mit familiärer Polyposis coli zugelassen. Celecoxib unterscheidet sich chemisch von anderen NSAIDs, da es keine azide Verbindung ist. Weiterhin aktiviert es NF κB und NF κB - abhängige Gentranskription¹⁵², was dafür spricht, dass seine Cyclooxygenase-unabhängigen Effekte sich ebenfalls von denen nicht-selektiver Substanzen unterscheiden. NF κB-Aktivierung durch hohe Konzentrationen von Celecoxib führte zu einem kompletten Verlust der antiinflammatorischen Wirkung¹⁵¹. Inwieweit es sich hier um ein für Celecoxib spezifisches Phänomen handelt, ist nicht hinreichend geklärt.

Offensichtlich sind NSAIDs in der Lage, Cyclooxygenase-unabhängige Signaltransduktionswege zu modulieren, welche sowohl für die antiinflammatorische als auch für die Antitumorwirkung dieser Substanzen eine Rolle spielen^{138,248}. Beispielsweise reduzierte R-flurbiprofen, welches im Bezug auf die COX-Hemmung als nicht aktives Enantiomer von S-flurbiprofen eingeordnet wurde, in Studien von TEGEDER et al. und GEISSLINGER et al. Entzündungsaktivität²¹⁸, Hyperalgesie⁷⁶,

und durch Nozizeption induzierte Freisetzung von PGE₂ im Rückenmark⁷⁷. Zudem wurde für R-flurbiprofen eine Reduktion der Tumorbildung und -Progression in APC^{Min/+} und TRAMP Mäusen nachgewiesen, welche *in vivo* Modelle für Colon- und Prostatakarzinom darstellen²³⁶. Auch reine Salicylsäure ist in therapeutischen Dosen nicht wirksam als COX-Inhibitor, jedoch ist sie in der Lage, Entzündungsaktivität zu reduzieren¹⁶⁷.

Des Weiteren spricht für einen z. T. Cyclooxygenase-unabhängigen Wirkmechanismus die Tatsache, dass NSAIDs auch in Zelllinien, in denen keine COX-Expression nachgewiesen werden kann, Tumorbildung und -wachstum inhibieren²⁴⁹.

Es ist zu beachten, dass viele Effekte, welche zur Antitumorwirkung von NSAIDs beitragen könnten, erst in hohen Wirkstoffkonzentrationen, 100- bis 1000-fach höher als die, welche zur Inhibition der Prostaglandin-Synthese erforderlich waren, beobachtet wurden. Dazu gehören Mechanismen wie die Inhibition der Progression des Zellzyklus⁸⁰, Apoptoseinduktion^{79,192} und Inhibition der Angiogenese¹¹⁰. Diese Effekte werden möglicherweise durch eine direkte Inhibition bestimmter Transkriptionsfaktoren wie NF κB (Nuclear Factor κB) und AP-1 (Activator Protein 1) vermittelt, wahrscheinlich erscheint jedoch auch eine Modulation der Aktivität von zellulären Kinasen wie IKKβ (Inhibitor Kinase Komplex), Erk (Extracellular Signal-regulated Kinase), p38 MAPK (Mitogen-activated Kinase) oder Cdks (Cyclin dependent Kinase). Dieser Weg der Signaltransduktion wird nicht von allen NSAIDs in gleicher Weise beschriftet. So ist Indomethacin nicht in der Lage, NF κB, AP-1, Erk oder Cdk zu hemmen. Jedoch konnte Indomethacin den PPARγ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) aktivieren, welcher von Natriumsalicylat und Acetylsalicylsäure unbeeinflusst blieb²²⁰.

Die Komplexität dieses Netzwerkes erfordert weitere Aufklärung der genauen Wirkmechanismen. In den in dieser Arbeit dargestellten Versuchen mit NSAIDs erfolgte immer eine Kontrollmessung, um neben dem verstärkenden Effekt der zytostatischen Wirkung von Anthracyclinen auch einen möglichen vitalitätssenkenden Effekt der Cyclooxygenase-Inhibitoren selbst erkennen zu können.

4.6 Prostaglandin E₂-vermittelte Regulation der MDR1-Expression

4.6.1 Mögliche Transduktionswege

Die Prostaglandin E₂-vermittelte Regulation der MDR1-Expression könnte über spezifische Prostaglandin E (EP)-Rezeptoren transduziert werden. Vier verschiedene EP-Rezeptoren, EP1, EP2, EP3 und EP4, sind charakterisiert worden. EP2 und EP4 sind an stimulierende G-Proteine gekoppelt; der EP3-vermittelte Signaltransduktionsweg verläuft überwiegend über eine Inhibition der Adenylatcyclase und EP1 aktiviert die Phospholipase C⁶. Eine Aktivierung der Phospholipase C führt zu einer zunehmenden Produktion von Inositol-1,4,5-triphosphat und Diacylglycerin. Diacylglycerin aktiviert die Phosphokinase C, was eine Stimulation von AP1 und NF κB bewirkt. AP1 und NF κB sind jeweils in der Lage, den MDR1-²¹ und COX-2-Gen Promoter¹⁸⁹ zu stimulieren. Darüber hinaus ist gezeigt worden, dass Phospholipase C die MDR1-Expression über den raf-MAPK-Weg induzieren kann²⁴¹.

Eine Hemmung der Phosphodiesterase als cAMP-abbauendem Enzym mittels IBMX sowie die Gabe von 8-Br-cAMP führen zu einer Erhöhung der intrinsischen *mdr1b* Überexpression. Dies weist darauf hin, dass das *mdr1b*-Gen einer cAMP-abhängigen Regulation unterliegt. Zudem konnte bereits unter PGE₂ eine verstärkte cAMP-Produktion als second messenger in Hepatozyten nachgewiesen werden²²⁸, was dafür spricht, dass die G_s-gekoppelten Rezeptoren EP2 oder EP4 maßgeblich an der PGE₂-vermittelten *mdr1b*-Überexpression beteiligt sein könnten.

Der EP2-Rezeptor und zum Teil auch der EP1-Rezeptor scheinen die vorherrschenden Prostaglandin-Rezeptoren in HL-60 Zellen zu sein⁷ und könnten somit zur MDR1-Regulation beitragen. EP2-Rezeptoren sind an stimulierende G-Proteine gekoppelt und vermitteln auf diese Weise einen Anstieg von cAMP. Eine cAMP-abhängige Induktion der MDR1-Expression ist bereits nachgewiesen worden¹⁷⁹. Eine PGE₂-abhängige Induktion der MDR1-Expression über EP1 und EP2

erscheint wahrscheinlich; aber die Bedeutung von EP3 und EP4 ist hier noch nicht hinreichend geklärt. Es werden weitere Studien benötigt, um den Signaltransduktionsweg aufzuklären.

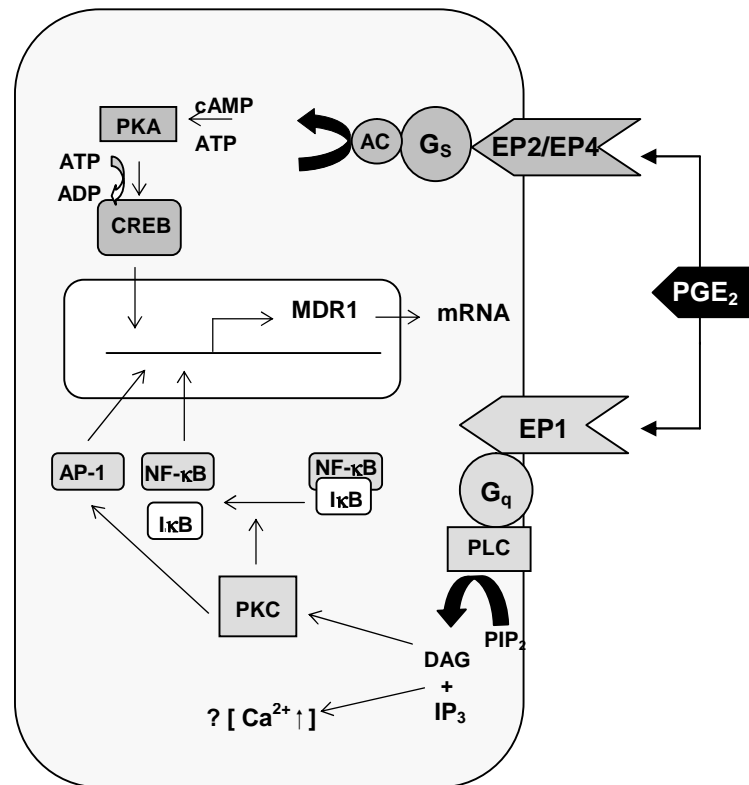


Abbildung 37: Mögliche Transduktionswege der PGE₂-vermittelten MDR1-Regulation

4.6.2 NF κB

Eine Schlüsselrolle scheint der Kernfaktor NF κB einzunehmen. NF κB reguliert die Expression proinflammatorischer Enzyme, Zytokine, Chemokine, Immunorezeptoren und Zelladhäsionsmolekülen und wird oft als zentraler Mediator der Immunantwort bezeichnet¹⁶⁰. KOPP et al. und BAYON et al. beschrieben eine Inhibition von NF κB durch Salicylate und Triflusal^{15,121}. NF κB konnte ebenfalls durch R- und in geringerem Maße durch S-flurbiprofen gehemmt werden, was mit einer verminderten NF κB - abhängigen Gentranskription einher ging²¹⁹.

Die Funktion von NF κ B beim Entzündungsgeschehen schließt die Regulation von Immunzellendifferenzierung und -überleben ein. So hängt die Reifung dendritischer Zellen z.T. von der Aktivierung von NF κ B ab¹⁹⁶. Nur reife Zellen sind in der Lage eine Immunantwort zu initiieren, z.B. die Proliferation von T-Zellen. Salicylate scheinen den Reifungs- bzw. Differenzierungsprozess *in vitro* zu inhibieren und zwar unabhängig von der Prostaglandin-Synthese¹³⁷.

NF κ B stellt ebenfalls einen Regulator der Stressantwort der Zelle dar. Er hat die Funktion als Regulator der Apoptose – als Induktor oder aber häufiger als Inhibitor. In vielen humanen malignen Zellen ist NF κ B aktiv¹⁷². Die persistierende Aktivierung von NF κ B macht diese Zellen widerstandsfähiger gegen Chemo- oder Strahlentherapie^{129,161} oder andere Apoptose-induzierende Reagenzien. Salicylat-vermittelte Inhibition von NF κ B scheint die Sensitivität dieser Krebszellen gegen Apoptose-induzierende Therapie wieder herzustellen¹³⁹ und somit zur Antitumorwirkung von Salicylaten beizutragen. NF κ B-Aktivität ist für die onkogene Transformation durch ras und raf erforderlich⁸. Eine Hemmung des Wachstums von v-ras transformierten Fibroblasten durch Salicylate war ebenfalls unabhängig von der Prostaglandin-Synthese¹³¹. In Darmepithelzellen der Ratte führte ras-induzierte Transformation zu einer Hochregulation der COX-2, welche in über 80% colorektaler Karzinome überexprimiert wird und an der Kanzerogenese teilzuhaben scheint.

NF κ B ist eine wichtige Komponente bei der MDR1-Gen – Expression in Krebszellen und somit der Multidrug Resistance. THEVENOUD et al. zeigten, dass eine Hochregulation des Pgp via NF κ B -Aktivierung verläuft und Nierenzellen des proximalen Tubulus vor durch Cadmium und reaktive Sauerstoffspezies induzierter Apoptose schützt²²¹. BENTIRES-ALJ et al. identifizierten in diesem Zusammenhang eine NF κ B Bindungsstelle im ersten Intron des humanen MDR1-Genes und zeigten, dass NF κ B-Komplexe hier in der Tat an das Intron binden und NF κ B ein MDR1-Promotor-Luciferase-Konstrukt transaktiviert. Eine Inhibition von NF κ B führte dagegen zu einer verminderten MDR1-mRNA- und Pgp-Expression in den untersuchten HCT15 (Human Colon Carcinoma) Zellen²⁰.

4.6.3 Phospholipase C

ASBOTH et al.⁹ zeigten, dass PGE₂ in myometrialen Zellen die Phospholipase C (PLC) aktiviert. Wäre dies auch in anderen Geweben, z.B. Blasten der Fall, so könnte eine Aktivierung von Phospholipase C die Expression von MDR1 induzieren wie YANG et al.²⁴² in NIH 3T3, einer Fibroblasten-Zelllinie der Maus, nachweisen konnten. CHAUDARY et al.³² zeigten, dass die Aktivierung von Phosphokinase C (PKC) durch das Diacylglycerolanalogon 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat MDR1-mRNA- und Pgp-Expression induziert. Hitzeschock⁴⁰, UV-Bestrahlung¹⁰², bestimmte Chemotherapeutika³⁴, Schwermetalle³⁹, Hormone⁵, Onkogene und Tumorsuppressorgene⁴² und Wachstumsfaktoren wie Epidermal Growth Factor (EGF)¹⁷⁸ sind bekannte Induktoren der MDR1-Expression. Jedoch ist nicht hinreichend geklärt auf welchem Weg die MDR1-Aktivierung erfolgt. Einige Stimuli, welche die MDR1-Expression erhöhen, werden über Signaltransduktionswege, welche durch PLC initiiert werden, vermittelt. Aktivierung von PLC ist einer der am meisten vorkommenden transmembranären Signaltransduktionsmechanismen mit einer breiten Auswahl an extrazellulären Liganden¹⁷⁰. PLC produziert zwei second messenger durch Katalysation der Umsetzung von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat zu Inositol-1,4,5-triphosphat und Diacylglycerol. Inositol-1,4,5-triphosphat stimuliert die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern, und Diacylglycerol aktiviert PKC. PLC ist in die Regulation vieler zellulären Aktivitäten wie Zellwachstum und -transformation einbezogen¹⁴⁹. Zudem ist die Aktivität von PLC in vielen humanen Tumoren erhöht¹⁵⁴. Dies alles zeigt eine regulative Beteiligung an der MDR1-Expression und könnte ebenfalls für eine Verknüpfung mit der PGE₂-Produktion sprechen.

4.7 MDR1 - unabhängige Resistenzmechanismen

Eine Multidrug Resistance stellt immer eine Mischung aus verschiedenen Resistenzmechanismen dar. Die Entstehung resistenter Phänotypen kann auf einer Vielzahl von Adaptationsprozessen beruhen. Neben einem verminderten Influx oder gesteigertem Auswärtstransport der Xenobiotika kann eine erhöhte Aktivität detoxifizierender Proteine wie Cytochrom P450 als „mixed function oxidases“,

vermehrt aktivierte Mechanismen zur Reparatur der durch Xenobiotika geschädigten DNA oder eine Unterbrechung apoptotischer Signaltransduktionswege (z.B. über p53 oder Ceramide) zur Ausbildung einer Resistenz führen⁸³.

Ebenso wie der Efflux kann die Kompartimentierung von Xenobiotika zur Resistenzausprägung beitragen. FERRAO et al.⁶⁹ zeigten die Expression von Pgp in intrazellulären Vesikeln bei bestimmten AML-Zelllinien und Lokalisation von Daunorubicin in ähnlichen subzellulären Kompartimenten. Pgp ist in der Lage auch große Mengen zweier verschiedener Xenobiotika, beispielsweise Hoechst 33342 und Daunorubicin, im Inneren eines zytoplasmatischen Kompartiments zu konzentrieren¹⁹³.

Neben Pgp spielen auch andere Transporter wie MRP, BCRP, LRP und einige weitere eine wichtige Rolle für die Entstehung einer MDR. Das in diesem Zusammenhang häufig untersuchte LRP gehört nicht wie MRP und BCRP zur ABC-Superfamilie, da es keinen energieabhängigen Xenobiotika-Efflux durch die Plasmamembran zeigt¹⁸⁸. LRP oder Major Vault Protein (MVP) ist der Hauptbestandteil eines Ribonucleinpartikels, dem Vault-Komplex. Diese Organellen finden sich im Nucleus der meisten eukaryontischen Zellen. In normalen Geweben scheint LRP/MVP eine Rolle bei Detoxifikationsprozessen zu spielen²⁰³, seine physiologische Funktion ist jedoch nicht vollständig geklärt. Beachtenswert ist, dass in verschiedenen Pharmaka-selektierten Zelllinien erhöhte Expression von LRP mit vermehrter Resistenz assoziiert ist^{107,106}.

Für eine Bedeutung von MRP in der Entstehung der MDR spricht, dass in Neuroblastomen die Expression von MRP bei Diagnose negativ mit dem Therapieergebnis korreliert¹⁵⁵. Ferner konnten KUSS et al.¹²³ eine Korrelation zwischen der Deletion des *MRP1* Gens und einem verbesserten Outcome von myelomonozytischer Leukämie aufzeigen.

In humanen Daunorubicin-, Mitoxantron- und Topotecan-selektierten Krebszelllinien wurde eine deutliche Überexpression von BCRP nachgewiesen^{133,182}. ROSS et al.¹⁸¹ untersuchten Proben primärer Zellen von 20 Patienten mit AML auf ihre BCRP-Expression hin, wovon bei der Hälfte kaum und einem Drittel relativ hohe Expression

nachgewiesen wurde. Diese korrelierte nicht mit einer hohen Pgp-Expression, so dass BCRP möglicherweise in Pgp-negativen Fällen Resistenz gegen bestimmte antileukämische Medikamente verursacht.

5 Zusammenfassung

Eine der wichtigsten Gründe für ein Therapieversagen von Kindern mit AML stellt das Auftreten von Resistenzen dar. Die Resistenz der leukämischen Blasten gegenüber der Chemotherapie kann innerhalb der FAB-Typen verschiedenartig ausgeprägt sein und betrifft oft ein breites Spektrum von Substanzgruppen, man spricht auch von einer „multidrug resistance“ (MDR). Die Entstehung einer MDR kann auf einer Vielzahl von zellulären Adaptationsprozessen beruhen; die Überexpression von MDR1-Proteinen in malignen Tumoren wird jedoch als der klassische Phänotyp einer Mehrfachresistenz angesehen. MDR1-Proteine, oder auch P-Glykoproteine, sind als ABC-Transporter in der Lage, Zytostatika und andere Substrate aus dem Inneren der Zelle herauszupumpen und so die Konzentration in der Zelle auf ein nicht toxisches Maß zu reduzieren. Zu den zytotoxischen Verbindungen, die einer MDR und einem MDR1-Transport unterliegen können, gehören viele wichtige Substanzen mit großer Relevanz für die AML-Therapie wie Anthracycline, Vincaalkaloide und andere synthetische Analoga.

Die Expression des Enzyms Cyclooxygenase-2 (COX-2) wird unter pathophysiologischen Bedingungen wie Entzündung und vielen malignen Erkrankungen schnell und stark induziert. In der AML-Zelllinie HL-60 sowie in primären AML-Blasten konnte in vorhergehenden Versuchen eine Coexpression von MDR1- und COX-2-mRNA nachgewiesen werden. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass eine Behandlung der Zellen mit Doxorubicin einen Anstieg der COX-2 mRNA-Expression, der COX-2 Protein-Expression und der PGE₂-Produktion als ein COX-2 Produkt verursachte. Eine 24-stündige Vorinkubation der Zellen mit Meloxicam konnte eine Induktion durch DOX bei der Pgp-Expression und -Funktion signifikant vermindern. MTT-Assays zeigten, dass die Vorinkubation mit Meloxicam die Effektivität von DOX deutlich verbessern konnte.

Die vorliegenden Untersuchungen sollten darüber Aufschluss geben, ob COX-2-Inhibitoren eine Möglichkeit zur MDR-Modulation in humanen AML-Blasten darstellen, wobei neben primären Patientenblasten die Zelllinie HL-60 als Modell für die Untersuchungen diene. Weiterhin wurde der Einfluss von PGE₂ und Endoperoxidantagonisten auf die Zytostatikaeffektivität und die MDR-1-Expression

und -Funktion untersucht, um so mehr über den Signaltransduktionsweg einer möglichen COX-2 modulierten MDR-1-Expression zu erfahren. Die relative Pgp-Expression und Rho123-Efflux wurden zu diesem Zwecke durch durchflusszytometrische Messung unter verschiedenen Bedingungen quantifiziert. Zur Bestimmung der Zytostatikaeffektivität wurde das MTT-Assay genutzt.

Die Ergebnisse der MTT-Assays zeigten, dass die Vorinkubation mit Meloxicam die Effektivität von DOX und L-DNR deutlich verbessern konnte und zwar in HL-60 Zellen um maximal 70% und in primären Zellen um bis zu 33%. Meloxicam allein zeigte hier keinen signifikanten Effekt auf die Zellproliferation. Für weitere COX-Inhibitoren war dieser Effekt in HL-60 Zellen weniger deutlich ausgeprägt. In Dosierungen, die selbst keinen Einfluss auf die Zellproliferation nahmen, war unter NS398 eine Wirkungsverstärkung von DOX um maximal 26%, unter DFU um maximal 17% und unter Tenoxicam um bis zu 45% zu beobachten. Prednisolon konnte die zytostatische Wirkung von DOX um bis zu 25% verstärken. Etodolac, Indomethacin und Nimesulid steigerten die Effektivität von DOX nicht.

Unter Einwirkung von Meloxicam nahm die COX-2-Proteinexpression dosisabhängig ab, was dafür spricht, dass Meloxicam nicht allein eine hemmende Wirkung auf die Enzymfunktion ausübt, sondern bereits Einfluss auf die Transkription bzw. Translation von COX-2 hat. Dieses könnte, neben der unterschiedlichen relativen Potenz der verwendeten Stoffe hinsichtlich ihrer COX-2-Hemmung, der im Vergleich zu Meloxicam geringeren Verstärkung des zytotoxischen Effekts von DOX durch weitere COX-2-Inhibitoren zugrunde liegen.

Durch eine Vorinkubation mit PGE₂ konnte der zytostatische Effekt von DOX um bis zu 43% abgeschwächt werden. HL-60 Zellen, die täglich mit 3µg/ml PGE₂ inkubiert worden waren, zeigten nach 24h, 48h und 72h einen Anstieg des MDR1-abhängigen Effluxes von 2% (unbehandelte Kontrollpopulation) auf 7%, 13% und 99% der initialen Akkumulation, weiterhin war nach 72h ein deutlicher Anstieg der MDR1-Expression zu erkennen. Für eine regulative Rolle der COX-2 über ihr Produkt PGE₂ spricht ferner, dass der Meloxicam-Effekt durch gleichzeitige Gabe von PGE₂ teilweise aufgehoben werden konnte.

Die Abschwächung der Resistenzausprägung durch Vorinkubation mit AH6809 wirkte sich günstig auf die Effektivität des Zytostatikums aus. Darüber hinaus zeigte AH6809 eine deutliche Hemmung des DOX-induzierten Rho 123-Efflux in HL-60 Zellen.

Offensichtlich besteht eine Assoziation zwischen MDR1 und COX-2 bei der AML im Kindesalter. Viele der vorliegenden Ergebnisse sprechen für eine Vermittlung über PGE₂. Eine Induktion der MDR1-Expression über EP1- und EP2-Rezeptoren erscheint wahrscheinlich; aber die Bedeutung von EP3 und EP4 ist hier noch nicht hinreichend geklärt. COX-Inhibitoren könnten als gut charakterisierte Pharmaka durch ihre zahlreichen positiven Wirkqualitäten auf maligne Zellen in schon geringen Dosen, ihre bei jungen Patienten relativ geringen Nebenwirkungen und ihre gute Steuerbarkeit eine viel versprechende Option zur Unterstützung der Behandlung der AML bei Kindern darstellen.

6

Literaturverzeichnis

1. **Abramovitz, M., Adam, M., Boie, Y., Carriere, M., Denis, D., Godbout, C., Lamontagne, S., Rochette, C., Sawyer, N., Tremblay, N. M., Belley, M., Gallant, M., Dufresne, C., Gareau, Y., Ruel, R., Juteau, H., Labelle, M., Ouimet, N., and Metters, K. M. (2000)** The utilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins and related analogs *Biochim.Biophys.Acta* **1483**: 285-293
2. **Abramovitz, M., Adam, M., Boie, Y., Carriere, M., Denis, D., Godbout, C., Lamontagne, S., Rochette, C., Sawyer, N., Tremblay, N. M., Belley, M., Gallant, M., Dufresne, C., Gareau, Y., Ruel, R., Juteau, H., Labelle, M., Ouimet, N., and Metters, K. M. (2000)** The utilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins and related analogs *Biochim.Biophys.Acta* **1483**: 285-293
3. **Abramovitz, M., Adam, M., Boie, Y., Carriere, M., Denis, D., Godbout, C., Lamontagne, S., Rochette, C., Sawyer, N., Tremblay, N. M., Belley, M., Gallant, M., Dufresne, C., Gareau, Y., Ruel, R., Juteau, H., Labelle, M., Ouimet, N., and Metters, K. M. (2000)** The utilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins and related analogs *Biochim.Biophys.Acta* **1483**: 285-293
4. **Adderley, S. R. and Fitzgerald, D. J. (1999)** Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular regulated kinases 1/2-mediated induction of cyclooxygenase-2 *J.Biol.Chem.* **274**: 5038-5046
5. **Altuvia, S., Stein, W. D., Goldenberg, S., Kane, S. E., Pastan, I., and Gottesman, M. M. (1993)** Targeted disruption of the mouse *mdr1b* gene reveals that steroid hormones enhance *mdr* gene expression *J.Biol.Chem.* **268**: 27127-27132
6. **Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P., and Karin, M. (1987)** Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor *Cell* **49**: 729-739
7. **Armstrong, R. A. and Talpain, E. (1994)** Comparison of the prostaglandin E (EP) receptor of human neutrophils and HL-60 cells differentiated with DMSO *Prostaglandins* **48**: 221-234
8. **Arsura, M., Mercurio, F., Oliver, A. L., Thorgeirsson, S. S., and Sonenshein, G. E. (2000)** Role of the I κ B kinase complex in oncogenic Ras- and Raf-mediated transformation of rat liver epithelial cells *Mol.Cell Biol.* **20**: 5381-5391
9. **Asboth, G., Phaneuf, S., Europe-Finner, G. N., Toth, M., and Bernal, A. L. (1996)** Prostaglandin E2 activates phospholipase C and elevates intracellular calcium in cultured myometrial cells: involvement of EP1 and EP3 receptor subtypes *Endocrinology* **137**: 2572-2579
10. **Azzaria, M., Schurr, E., and Gros, P. (1989)** Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance *Mol.Cell Biol.* **9**: 5289-5297

11. **Bailly, S., Ferrua, B., Fay, M., and Gougerot-Pocidallo, M. A. (1990)** Differential regulation of IL 6, IL 1 A, IL 1 beta and TNF alpha production in LPS-stimulated human monocytes: role of cyclic AMP *Cytokine* **2**: 205-210
12. **Balch, C. M., Dougherty, P. A., Cloud, G. A., and Tilden, A. B. (1984)** Prostaglandin E2-mediated suppression of cellular immunity in colon cancer patients *Surgery* **95**: 71-77
13. **Bates, S. E., Lee, J. S., Dickstein, B., Spolyar, M., and Fojo, A. T. (1993)** Differential modulation of P-glycoprotein transport by protein kinase inhibition *Biochemistry* **32**: 9156-9164
14. **Bauch, H. J. (1989)** [Cytostatic drugs. 1: Platinum compounds, alkylating and intercalating cytostatic drugs] *Med.Monatsschr.Pharm.* **12**: 8-20
15. **Bayon, Y., Alonso, A., and Sanchez, Crespo M. (1999)** 4-trifluoromethyl derivatives of salicylate, triflusal and its main metabolite 2-hydroxy-4-trifluoromethylbenzoic acid, are potent inhibitors of nuclear factor kappaB activation *Br.J.Pharmacol.* **126**: 1359-1366
16. **Beck, W. T. (1990)** Multidrug resistance and its circumvention *Eur.J.Cancer* **26**: 513-515
17. **Beiche, F., Scheuerer, S., Brune, K., Geisslinger, G., and Goppelt-Struebe, M. (1996)** Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation *FEBS Lett.* **390**: 165-169
18. **Bellamy, W. T. (1996)** P-glycoproteins and multidrug resistance *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **36**:161-83.: 161-183
19. **Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R., and Sultan, C. (1985)** Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group *Ann.Intern.Med.* **103**: 620-625
20. **Bentires-Alj, M., Barbu, V., Fillet, M., Chariot, A., Relic, B., Jacobs, N., Gielen, J., Merville, M. P., and Bours, V. (2003)** NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells *Oncogene* **22**: 90-97
21. **Bentires-Alj, M., Barbu, V., Fillet, M., Chariot, A., Relic, B., Jacobs, N., Gielen, J., Merville, M. P., and Bours, V. (2003)** NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells *Oncogene* **22**: 90-97
22. **Bradley, G., Juranka, P. F., and Ling, V. (1988)** Mechanism of multidrug resistance *Biochim.Biophys.Acta* **948**: 87-128
23. **Bruggemann, E. P., Currier, S. J., Gottesman, M. M., and Pastan, I. (1992)** Characterization of the azidopine and vinblastine binding site of P-glycoprotein *J.Biol.Chem.* **267**: 21020-21026

24. **Brugger, D., Brischwein, K., Liu, C., Bader, P., Niethammer, D., Gekeler, V., and Beck, J. F. (2002)** Induction of drug resistance and protein kinase C genes in A2780 ovarian cancer cells after incubation with antineoplastic agents at sublethal concentrations *Anticancer Res.* **22**: 4229-4232
25. **Calabrese, E. J. and Baldwin, L. A. (2003)** HORMESIS: The Dose-Response Revolution *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **43**:175-97.: 175-197
26. **Callaghan, R. and Riordan, J. R. (1993)** Synthetic and natural opiates interact with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells *J.Biol.Chem.* **268**: 16059-16064
27. **Casibang, M. and Moody, T. W. (2002)** AH6809 antagonizes non-small cell lung cancer prostaglandin receptors *Lung Cancer* **36**: 33-42
28. **Chan, H. S., Haddad, G., Thorner, P. S., DeBoer, G., Lin, Y. P., Ondrusek, N., Yeger, H., and Ling, V. (1991)** P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma *N.Engl.J.Med.* **325**: 1608-1614
29. **Chan, H. S., Thorner, P. S., Haddad, G., and Ling, V. (1990)** Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood *J.Clin.Oncol.* **8**: 689-704
30. **Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S., and Simmons, D. L. (2002)** COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**: 13926-13931
31. **Chaudhary, P. M. and Roninson, I. B. (1991)** Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells *Cell* **66**: 85-94
32. **Chaudhary, P. M. and Roninson, I. B. (1992)** Activation of MDR1 (P-glycoprotein) gene expression in human cells by protein kinase C agonists *Oncol.Res.* **4**: 281-290
33. **Chaudhary, P. M. and Roninson, I. B. (1993)** Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs *J.Natl.Cancer Inst.* **85**: 632-639
34. **Chaudhary, P. M. and Roninson, I. B. (1993)** Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs *J.Natl.Cancer Inst.* **85**: 632-639
35. **Chauncey, T. R. (2001)** Drug resistance mechanisms in acute leukemia *Curr.Opin.Oncol.* **13**: 21-26
36. **Chen, C. J., Chin, J. E., Ueda, K., Clark, D. P., Pastan, I., Gottesman, M. M., and Roninson, I. B. (1986)** Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells *Cell* **47**: 381-389

37. **Chen, C. J., Chin, J. E., Ueda, K., Clark, D. P., Pastan, I., Gottesman, M. M., and Roninson, I. B. (1986)** Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells *Cell* **47**: 381-389
38. **Chen, C. J., Clark, D., Ueda, K., Pastan, I., Gottesman, M. M., and Roninson, I. B. (1990)** Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins *J.Biol.Chem.* **265**: 506-514
39. **Chin, K. V., Tanaka, S., Darlington, G., Pastan, I., and Gottesman, M. M. (1990)** Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells *J.Biol.Chem.* **265**: 221-226
40. **Chin, K. V., Tanaka, S., Darlington, G., Pastan, I., and Gottesman, M. M. (1990)** Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells *J.Biol.Chem.* **265**: 221-226
41. **Chin, K. V., Ueda, K., Pastan, I., and Gottesman, M. M. (1992)** Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53 *Science* **255**: 459-462
42. **Chin, K. V., Ueda, K., Pastan, I., and Gottesman, M. M. (1992)** Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53 *Science* **255**: 459-462
43. **Cordon-Cardo, C., O'Brien, J. P., Boccia, J., Casals, D., Bertino, J. R., and Melamed, M. R. (1990)** Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues *J.Histochem.Cytochem.* **38**: 1277-1287
44. **Creutzig, U., Ritter, J., Zimmermann, M., Reinhardt, D., Hermann, J., Berthold, F., Henze, G., Jurgens, H., Kabisch, H., Havers, W., Reiter, A., Kluba, U., Niggli, F., and Gadner, H. (2001)** Improved treatment results in high-risk pediatric acute myeloid leukemia patients after intensification with high-dose cytarabine and mitoxantrone: results of Study Acute Myeloid Leukemia-Berlin-Frankfurt-Munster 93 *J.Clin.Oncol.* **19**: 2705-2713
45. **Creutzig, U. and Schrappe, M. (1996)** [Acute leukemia in childhood. Classification--diagnosis--therapy--prognosis] *Internist (Berl)* **37**: 982-993
46. **Currier, S. J., Kane, S. E., Willingham, M. C., Cardarelli, C. O., Pastan, I., and Gottesman, M. M. (1992)** Identification of residues in the first cytoplasmic loop of P-glycoprotein involved in the function of chimeric human MDR1-MDR2 transporters *J.Biol.Chem.* **267**: 25153-25159
47. **Cuvier, C., Roblot-Treupel, L., Millot, J. M., Lizard, G., Chevillard, S., Manfait, M., Couvreur, P., and Poupon, M. F. (1992)** Doxorubicin-loaded nanospheres bypass tumor cell multidrug resistance *Biochem.Pharmacol.* **44**: 509-517
48. **D'Acquisto, F., Sautebin, L., Iuvone, T., Di Rosa, M., and Carnuccio, R. (1998)** Prostaglandins prevent inducible nitric oxide synthase protein expression by inhibiting nuclear factor-kappaB activation in J774 macrophages *FEBS Lett.* **440**: 76-80

49. Dalton, W. T., Ahearn, M. J., McCreddie, K. B., Freireich, E. J., Stass, S. A., and Trujillo, J. M. (1988) HI-60 Cell-Line Was Derived from A Patient with Fab-M2 and Not Fab-M3 *Blood* **71**: 242-247
50. den Boer, M. L., Pieters, R., Kazemier, K. M., Janka-Schaub, G. E., Henze, G., and Veerman, A. J. (1999) Relationship between the intracellular daunorubicin concentration, expression of major vault protein/lung resistance protein and resistance to anthracyclines in childhood acute lymphoblastic leukemia *Leukemia* **13**: 2023-2030
51. Denkert, C., Kobel, M., Berger, S., Siegert, A., Leclere, A., Trefzer, U., and Hauptmann, S. (2001) Expression of cyclooxygenase 2 in human malignant melanoma *Cancer Res.* **61**: 303-308
52. Der Kolk, D. M., Vellenga, E., Der Veen, A. Y., Noordhoek, L., Timmer-Bosscha, H., Ossenkoppele, G. J., Raymakers, R. A., Muller, M., van den, Berg E., and de Vries, E. G. (2000) Deletion of the multidrug resistance protein MRP1 gene in acute myeloid leukemia: the impact on MRP activity *Blood* **95**: 3514-3519
53. Devine, S. E., Ling, V., and Melera, P. W. (1992) Amino acid substitutions in the sixth transmembrane domain of P-glycoprotein alter multidrug resistance *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**: 4564-4568
54. Dexter, T. M. (1989) Regulation of hemopoietic cell growth and development: experimental and clinical studies *Leukemia* **3**: 469-474
55. Dinchuk, J. E., Car, B. D., Focht, R. J., Johnston, J. J., Jaffee, B. D., Covington, M. B., Contel, N. R., Eng, V. M., Collins, R. J., Czerniak, P. M., and . (1995) Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II *Nature* **378**: 406-409
56. Dinchuk, J. E., Car, B. D., Focht, R. J., Johnston, J. J., Jaffee, B. D., Covington, M. B., Contel, N. R., Eng, V. M., Collins, R. J., Czerniak, P. M., and . (1995) Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II *Nature* **378**: 406-409
57. Dowd, N. P., Scully, M., Adderley, S. R., Cunningham, A. J., and Fitzgerald, D. J. (2001) Inhibition of cyclooxygenase-2 aggravates doxorubicin-mediated cardiac injury in vivo *J.Clin.Invest* **108**: 585-590
58. Dubois, R. N., Abramson, S. B., Crofford, L., Gupta, R. A., Simon, L. S., Van De Putte, L. B., and Lipsky, P. E. (1998) Cyclooxygenase in biology and disease *FASEB J.* **12**: 1063-1073
59. Dubois, R. N., Giardiello, F. M., and Smalley, W. E. (1996) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, eicosanoids, and colorectal cancer prevention *Gastroenterol.Clin.North Am.* **25**: 773-791
60. Efferth, T. and Volm, M. (1993) Modulation of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by monoclonal antibodies, immunotoxins or antisense oligodeoxynucleotides in kidney carcinoma and normal kidney cells *Oncology* **50**: 303-308

61. **Engelhardt, G., Bogel, R., Schnitzer, C., and Utzmann, R. (1996)** Meloxicam: influence on arachidonic acid metabolism. Part 1. In vitro findings *Biochem.Pharmacol.* **51**: 21-28
62. **Estey, E. H. (2001)** Therapeutic options for acute myelogenous leukemia *Cancer* **92**: 1059-1073
63. **Estey, E. H. (2001)** Therapeutic options for acute myelogenous leukemia *Cancer* **92**: 1059-1073
64. **Fardel, O., Lecureur, V., and Guillouzo, A. (1996)** The P-glycoprotein multidrug transporter *Gen.Pharmacol.* **27**: 1283-1291
65. **Fardel, O., Lecureur, V., and Guillouzo, A. (1996)** The P-glycoprotein multidrug transporter *Gen.Pharmacol.* **27**: 1283-1291
66. **Fardel, O., Lecureur, V., and Guillouzo, A. (1996)** The P-glycoprotein multidrug transporter *Gen.Pharmacol.* **27**: 1283-1291
67. **Fenart, L., Buee-Scherrer, V., Descamps, L., Duhem, C., Poullain, M. G., Cecchelli, R., and Dehouck, M. P. (1998)** Inhibition of P-glycoprotein: rapid assessment of its implication in blood-brain barrier integrity and drug transport to the brain by an in vitro model of the blood-brain barrier *Pharm.Res.* **15**: 993-1000
68. **Ferguson, L. R. and Baguley, B. C. (1993)** Multidrug resistance and mutagenesis *Mutat.Res.* **285**: 79-90
69. **Ferrao, P., Sincock, P., Cole, S., and Ashman, L. (2001)** Intracellular P-gp contributes to functional drug efflux and resistance in acute myeloid leukaemia *Leuk.Res.* **25**: 395-405
70. **Fialkow, P. J., Singer, J. W., Raskind, W. H., Adamson, J. W., Jacobson, R. J., Bernstein, I. D., Dow, L. W., Najfeld, V., and Veith, R. (1987)** Clonal development, stem-cell differentiation, and clinical remissions in acute nonlymphocytic leukemia *N.Engl.J.Med.* **317**: 468-473
71. **Filipits, M., Stranzl, T., Pohl, G., Heinzl, H., Jager, U., Geissler, K., Fonatsch, C., Haas, O. A., Lechner, K., and Pirker, R. (2000)** Drug resistance factors in acute myeloid leukemia: a comparative analysis *Leukemia* **14**: 68-76
72. **Fine, R. L., Patel, J., and Chabner, B. A. (1988)** Phorbol esters induce multidrug resistance in human breast cancer cells *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85**: 582-586
73. **Fogler, W. E., Pearson, J. W., Volker, K., Ariyoshi, K., Watabe, H., Riggs, C. W., Wiltrout, R. H., and Longo, D. L. (1995)** Enhancement by recombinant human interferon alfa of the reversal of multidrug resistance by MRK-16 monoclonal antibody *J.Natl.Cancer Inst.* **87**: 94-104

74. **Forth, W., Hentschler, D., Rummel, W., and Starke, K. (2003)** Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
75. **Fulton, A. M., Zhang, S. Z., and Chong, Y. C. (1991)** Role of the prostaglandin E2 receptor in mammary tumor metastasis *Cancer Res.* **51**: 2047-2050
76. **Geisslinger, G., Ferreira, S. H., Menzel, S., Schlott, D., and Brune, K. (1994)** Antinociceptive actions of R(-)-flurbiprofen--a non-cyclooxygenase inhibiting 2-arylpropionic acid--in rats *Life Sci.* **54**: L173-L177
77. **Geisslinger, G., Muth-Selbach, U., Coste, O., Vetter, G., Schrodter, A., Schaible, H. G., Brune, K., and Tegeder, I. (2000)** Inhibition of noxious stimulus-induced spinal prostaglandin E2 release by flurbiprofen enantiomers: a microdialysis study *J.Neurochem.* **74**: 2094-2100
78. **Giantris, A., Abdurrahman, L., Hinkle, A., Asselin, B., and Lipshultz, S. E. (1998)** Anthracycline-induced cardiotoxicity in children and young adults *Crit Rev.Oncol.Hematol.* **27**: 53-68
79. **Giardina, C., Boulares, H., and Inan, M. S. (1999)** NSAIDs and butyrate sensitize a human colorectal cancer cell line to TNF-alpha and Fas ligation: the role of reactive oxygen species *Biochim.Biophys.Acta* **1448**: 425-438
80. **Goldberg, Y., Nassif, I. I., Pittas, A., Tsai, L. L., Dynlacht, B. D., Rigas, B., and Shiff, S. J. (1996)** The anti-proliferative effect of sulindac and sulindac sulfide on HT-29 colon cancer cells: alterations in tumor suppressor and cell cycle-regulatory proteins *Oncogene* **12**: 893-901
81. **Goldie, J. H. and Coldman, A. J. (1983)** Quantitative model for multiple levels of drug resistance in clinical tumors *Cancer Treat.Rep.* **67**: 923-931
82. **Goldman, A. P., Williams, C. S., Sheng, H., Lamps, L. W., Williams, V. P., Pairet, M., Morrow, J. D., and Dubois, R. N. (1998)** Meloxicam inhibits the growth of colorectal cancer cells *Carcinogenesis* **19**: 2195-2199
83. **Gottesman, M. M., Fojo, T., and Bates, S. E. (2002)** Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters *Nat.Rev.Cancer* **2**: 48-58
84. **Gottesman, M. M. and Pastan, I. (1988)** Resistance to multiple chemotherapeutic agents in human cancer cells *Trends Pharmacol.Sci.* **9**: 54-58
85. **Gottesman, M. M. and Pastan, I. (1988)** The multidrug transporter, a double-edged sword *J.Biol.Chem.* **263**: 12163-12166
86. **Gottesman, M. M. and Pastan, I. (1988)** The multidrug transporter, a double-edged sword *J.Biol.Chem.* **263**: 12163-12166
87. **Gottesman, M. M. and Pastan, I. (1993)** Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter *Annu.Rev.Biochem.* **62**:385-427.: 385-427

88. **Green, M. (1998)** Anthracycline cardiotoxicity, no longer an issue? *Ann.Oncol.* **9**: 691-693
89. **Greenberger, L. M. (1993)** Major photoaffinity drug labeling sites for iodoaryl azidoprazosin in P-glycoprotein are within, or immediately C-terminal to, transmembrane domains 6 and 12 *J.Biol.Chem.* **268**: 11417-11425
90. **Gregory, J. and Arceci, R. (2002)** Acute myeloid leukemia in children: a review of risk factors and recent trials *Cancer Invest* **20**: 1027-1037
91. **Griffin, J. D. and Lowenberg, B. (1986)** Clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia *Blood* **68**: 1185-1195
92. **Hamada, H., Hagiwara, K., Nakajima, T., and Tsuruo, T. (1987)** Phosphorylation of the Mr 170,000 to 180,000 glycoprotein specific to multidrug-resistant tumor cells: effects of verapamil, trifluoperazine, and phorbol esters *Cancer Res.* **47**: 2860-2865
93. **Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H. K., Vardiman, J., Lister, T. A., and Bloomfield, C. D. (1999)** The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997 *Ann.Oncol.* **10**: 1419-1432
94. **Harris, R. C. and Breyer, M. D. (2001)** Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in the kidney *Am.J.Physiol Renal Physiol* **281**: F1-11
95. **Hida, T., Kozaki, K., Ito, H., Miyaishi, O., Tatematsu, Y., Suzuki, T., Matsuo, K., Sugiura, T., Ogawa, M., Takahashi, T., and Takahashi, T. (2002)** Significant growth inhibition of human lung cancer cells both in vitro and in vivo by the combined use of a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, JTE-522, and conventional anticancer agents *Clin.Cancer Res.* **8**: 2443-2447
96. **Higgins, C. F. and Gottesman, M. M. (1992)** Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem.Sci.* **17**: 18-21
97. **Hinz, B. and Brune, K. (1999)** [COX-1 and COX-2: functions and pharmacological effects] *Pharm.Unserer Zeit* **28**: 21-29
98. **Hinz, B., Brune, K., and Pahl, A. (2000)** Cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is modulated by cyclic AMP, prostaglandin E(2), and nonsteroidal anti-inflammatory drugs *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **278**: 790-796
99. **Hirsch-Ernst, K. I., Ziemann, C., Rustenbeck, I., and Kahl, G. F. (2001)** Inhibitors of mdr1-dependent transport activity delay accumulation of the mdr1 substrate rhodamine 123 in primary rat hepatocyte cultures *Toxicology* **167**: 47-57
100. **Horio, M., Gottesman, M. M., and Pastan, I. (1988)** ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85**: 3580-3584

101. **Hsu, A. L., Ching, T. T., Wang, D. S., Song, X., Rangnekar, V. M., and Chen, C. S. (2000)** The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2 *J.Biol.Chem.* **275**: 11397-11403
102. **Hu, Z., Jin, S., and Scotto, K. W. (2000)** Transcriptional activation of the MDR1 gene by UV irradiation. Role of NF-Y and Sp1 *J.Biol.Chem.* **275**: 2979-2985
103. **Huet, S., Marie, J. P., Gualde, N., and Robert, J. (1998)** Reference method for detection of Pgp mediated multidrug resistance in human hematological malignancies: a method validated by the laboratories of the French Drug Resistance Network *Cytometry* **34**: 248-256
104. **Hurme, M. (1990)** Modulation of interleukin-1 beta production by cyclic AMP in human monocytes *FEBS Lett.* **263**: 35-37
105. **Iniguez, M. A., Martinez-Martinez, S., Punzon, C., Redondo, J. M., and Fresno, M. (2000)** An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes *J.Biol.Chem.* **275**: 23627-23635
106. **Izquierdo, M. A., Scheffer, G. L., Flens, M. J., Giaccone, G., Broxterman, H. J., Meijer, C. J., van, der, V, and Scheper, R. J. (1996)** Broad distribution of the multidrug resistance-related vault lung resistance protein in normal human tissues and tumors *Am.J.Pathol.* **148**: 877-887
107. **Izquierdo, M. A., Scheffer, G. L., Flens, M. J., Schroeijers, A. B., van, der, V, and Scheper, R. J. (1996)** Major vault protein LRP-related multidrug resistance *Eur.J.Cancer* **32A**: 979-984
108. **Jachez, B., Nordmann, R., and Loor, F. (1993)** Restoration of taxol sensitivity of multidrug-resistant cells by the cyclosporine SDZ PSC 833 and the cyclopeptolide SDZ 280-446 *J.Natl.Cancer Inst.* **85**: 478-483
109. **Jacoby, R. F., Seibert, K., Cole, C. E., Kelloff, G., and Lubet, R. A. (2000)** The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent preventive and therapeutic agent in the min mouse model of adenomatous polyposis *Cancer Res.* **60**: 5040-5044
110. **Jones, M. K., Wang, H., Peskar, B. M., Levin, E., Itani, R. M., Sarfeh, I. J., and Tarnawski, A. S. (1999)** Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing *Nat.Med.* **5**: 1418-1423
111. **Juliano, R. L. and Ling, V. (1976)** A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants *Biochim.Biophys.Acta* **455**: 152-162
112. **Kambayashi, T., Alexander, H. R., Fong, M., and Strassmann, G. (1995)** Potential involvement of IL-10 in suppressing tumor-associated macrophages. Colon-26-derived prostaglandin E2 inhibits TNF-alpha release via a mechanism involving IL-10 *J.Immunol.* **154**: 3383-3390
113. **Kawamori, T. and Wakabayashi, K. (2002)** COX-2 and prostanoid receptors: good targets for chemoprevention *J.Environ.Pathol.Toxicol.Oncol.* **21**: 149-153

114. **Kelley, D. J., Mestre, J. R., Subbaramaiah, K., Sacks, P. G., Schantz, S. P., Tanabe, T., Inoue, H., Ramonetti, J. T., and Dannenberg, A. J. (1997)** Benzo[a]pyrene up-regulates cyclooxygenase-2 gene expression in oral epithelial cells *Carcinogenesis* **18**: 795-799
115. **Kern, W., Buchner, T., Wormann, B., Ritter, J., Creutzig, U., and Hiddemann, W. (1999)** *Internist (Berl)* **40**: 983-986
116. **Kiehntopf, M., Brach, M. A., Licht, T., Petschauer, S., Karawajew, L., Kirschning, C., and Herrmann, F. (1994)** Ribozyme-mediated cleavage of the MDR-1 transcript restores chemosensitivity in previously resistant cancer cells *EMBO J.* **13**: 4645-4652
117. **Kiehntopf, M., Brach, M. A., Licht, T., Petschauer, S., Karawajew, L., Kirschning, C., and Herrmann, F. (1994)** Ribozyme-mediated cleavage of the MDR-1 transcript restores chemosensitivity in previously resistant cancer cells *EMBO J.* **13**: 4645-4652
118. **Kobayashi, S., Okada, S., Yoshida, H., and Fujimura, S. (1997)** Indomethacin enhances the cytotoxicity of VCR and ADR in human pulmonary adenocarcinoma cells *Tohoku J.Exp.Med.* **181**: 361-370
119. **Kobayashi, Y., Yamashiro, T., Nagatake, H., Yamamoto, T., Watanabe, N., Tanaka, H., Shigenobu, K., and Tsuruo, T. (1994)** Expression and function of multidrug resistance P-glycoprotein in a cultured natural killer cell-rich population revealed by MRK16 monoclonal antibody and AHC-52 *Biochem.Pharmacol.* **48**: 1641-1646
120. **Kokawa, A., Kondo, H., Gotoda, T., Ono, H., Saito, D., Nakadaira, S., Kosuge, T., and Yoshida, S. (2001)** Increased expression of cyclooxygenase-2 in human pancreatic neoplasms and potential for chemoprevention by cyclooxygenase inhibitors *Cancer* **91**: 333-338
121. **Kopp, E. and Ghosh, S. (1994)** Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin *Science* **265**: 956-959
122. **Kujubu, D. A. and Herschman, H. R. (1992)** Dexamethasone inhibits mitogen induction of the TIS10 prostaglandin synthase/cyclooxygenase gene *J.Biol.Chem.* **267**: 7991-7994
123. **Kuss, B. J., Deeley, R. G., Cole, S. P., Willman, C. L., Kopecky, K. J., Wolman, S. R., Eyre, H. J., Lane, S. A., Nancarrow, J. K., Whitmore, S. A., and . (1994)** Deletion of gene for multidrug resistance in acute myeloid leukaemia with inversion in chromosome 16: prognostic implications *Lancet* **343**: 1531-1534
124. **Legrand, O., Zittoun, R., and Marie, J. P. (1999)** Role of MRP1 in multidrug resistance in acute myeloid leukemia *Leukemia* **13**: 578-584
125. **Leith, C. P., Kopecky, K. J., Chen, I. M., Eijdens, L., Slovak, M. L., McConnell, T. S., Head, D. R., Weick, J., Grever, M. R., Appelbaum, F. R., and Willman, C. L. (1999)** Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study *Blood* **94**: 1086-1099

126. **Leveque, D. and Jehl, F. (1995)** P-glycoprotein and pharmacokinetics *Anticancer Res.* **15**: 331-336
127. **Levy, G. N. (1997)** Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer *FASEB J.* **11**: 234-247
128. **List, A. F., Spier, C., Greer, J., Wolff, S., Hutter, J., Dorr, R., Salmon, S., Futscher, B., Baier, M., and Dalton, W. (1993)** Phase I/II trial of cyclosporine as a chemotherapy-resistance modifier in acute leukemia *J.Clin.Oncol.* **11**: 1652-1660
129. **Liu, Z. G., Hsu, H., Goeddel, D. V., and Karin, M. (1996)** Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death *Cell* **87**: 565-576
130. **Liu, Z. L., Onda, K., Tanaka, S., Toma, T., Hirano, T., and Oka, K. (2002)** Induction of multidrug resistance in MOLT-4 cells by anticancer agents is closely related to increased expression of functional P-glycoprotein and MDR1 mRNA *Cancer Chemother.Pharmacol.* **49**: 391-397
131. **Ljungdahl, S., Shoshan, M. C., and Linder, S. (1997)** Inhibition of the growth of 12V-ras-transformed rat fibroblasts by acetylsalicylic acid correlates with inhibition of NF-kappa B *Anticancer Drugs* **8**: 62-66
132. **Lomri, N., Fitz, J. G., and Scharschmidt, B. F. (1996)** Hepatocellular transport: role of ATP-binding cassette proteins *Semin.Liver Dis.* **16**: 201-210
133. **Maliepaard, M., van Gastelen, M. A., de Jong, L. A., Pluim, D., van Waardenburg, R. C., Ruevekamp-Helmers, M. C., Floot, B. G., and Schellens, J. H. (1999)** Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line *Cancer Res.* **59**: 4559-4563
134. **Marx, J. (2001)** Cancer research. Anti-inflammatories inhibit cancer growth--but how? *Science* **291**: 581-582
135. **Marx, J. (2001)** Cancer research. Anti-inflammatories inhibit cancer growth--but how? *Science* **291**: 581-582
136. **Masferrer, J. L., Leahy, K. M., Koki, A. T., Zweifel, B. S., Settle, S. L., Woerner, B. M., Edwards, D. A., Flickinger, A. G., Moore, R. J., and Seibert, K. (2000)** Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors *Cancer Res.* **60**: 1306-1311
137. **Matasic, R., Dietz, A. B., and Vuk-Pavlovic, S. (2000)** Cyclooxygenase-independent inhibition of dendritic cell maturation by aspirin *Immunology* **101**: 53-60
138. **McCracken, J. D., Wechter, W. J., Liu, Y., Chase, R. L., Kantoci, D., Murray, E. D., Jr., Quiggle, D. D., and Mineyama, Y. (1996)** Antiproliferative effects of the enantiomers of flurbiprofen *J.Clin.Pharmacol.* **36**: 540-545

139. **McDade, T. P., Perugini, R. A., Vittimberga, F. J., Jr., Carrigan, R. C., and Callery, M. P. (1999)** Salicylates inhibit NF-kappaB activation and enhance TNF-alpha-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells *J.Surg.Res.* **83**: 56-61
140. **Mendez, M. and LaPointe, M. C. (2002)** Trophic effects of the cyclooxygenase-2 product prostaglandin E(2) in cardiac myocytes *Hypertension* **39**: 382-388
141. **Metcalf, D. (1989)** The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells *Nature* **339**: 27-30
142. **Morham, S. G., Langenbach, R., Loftin, C. D., Tiano, H. F., Vouloumanos, N., Jennette, J. C., Mahler, J. F., Kluckman, K. D., Ledford, A., Lee, C. A., and . (1995)** Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse *Cell* **83**: 473-482
143. **Mutoh, M., Watanabe, K., Kitamura, T., Shoji, Y., Takahashi, M., Kawamori, T., Tani, K., Kobayashi, M., Maruyama, T., Kobayashi, K., Ohuchida, S., Sugimoto, Y., Narumiya, S., Sugimura, T., and Wakabayashi, K. (2002)** Involvement of prostaglandin E receptor subtype EP(4) in colon carcinogenesis *Cancer Res.* **62**: 28-32
144. **Mutschler E (2001)** Arzneimittelwirkungen **8. Auflage**: 419-429
145. **Mutschler E (2001)** Arzneimittelwirkungen **8. Auflage**: 873-899
146. **Nakanishi, Y., Kamijo, R., Takizawa, K., Hatori, M., and Nagumo, M. (2001)** Inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2) suppressed the proliferation and differentiation of human leukaemia cell lines *Eur.J.Cancer* **37**: 1570-1578
147. **Nakanishi, Y., Kamijo, R., Takizawa, K., Hatori, M., and Nagumo, M. (2001)** Inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2) suppressed the proliferation and differentiation of human leukaemia cell lines *Eur.J.Cancer* **37**: 1570-1578
148. **Nare, B., Prichard, R. K., and Georges, E. (1994)** Characterization of rhodamine 123 binding to P-glycoprotein in human multidrug-resistant cells *Mol.Pharmacol.* **45**: 1145-1152
149. **Nebigil, C. G. (1997)** Suppression of phospholipase C beta, gamma, and delta families alters cell growth and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels *Biochemistry* **36**: 15949-15958
150. **Neyfakh, A. A. (1988)** Use of fluorescent dyes as molecular probes for the study of multidrug resistance *Exp.Cell Res.* **174**: 168-176
151. **Niederberger, E., Tegeder, I., Vetter, G., Schmidtko, A., Schmidt, H., Euchenhofer, C., Brautigam, L., Grosch, S., and Geisslinger, G. (2001)** Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation of NF-kappaB *FASEB J.* **15**: 1622-1624
152. **Niederberger, E., Tegeder, I., Vetter, G., Schmidtko, A., Schmidt, H., Euchenhofer, C., Brautigam, L., Grosch, S., and Geisslinger, G. (2001)** Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation of NF-kappaB *FASEB J.* **15**: 1622-1624

153. Niiro, H., Otsuka, T., Izuhara, K., Yamaoka, K., Ohshima, K., Tanabe, T., Hara, S., Nemoto, Y., Tanaka, Y., Nakashima, H., and Niho, Y. (1997) Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils *Blood* **89**: 1621-1628
154. Noh, D. Y., Lee, Y. H., Kim, S. S., Kim, Y. I., Ryu, S. H., Suh, P. G., and Park, J. G. (1994) Elevated content of phospholipase C-gamma 1 in colorectal cancer tissues *Cancer* **73**: 36-41
155. Norris, M. D., Bordow, S. B., Marshall, G. M., Haber, P. S., Cohn, S. L., and Haber, M. (1996) Expression of the gene for multidrug-resistance-associated protein and outcome in patients with neuroblastoma *N.Engl.J.Med.* **334**: 231-238
156. O'Neill, G. P. and Ford-Hutchinson, A. W. (1993) Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues *FEBS Lett.* **330**: 156-160
157. O'Neill, G. P. and Ford-Hutchinson, A. W. (1993) Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues *FEBS Lett.* **330**: 156-160
158. Ohno, R., Yoshinaga, K., Fujita, T., Hasegawa, K., Iseki, H., Tsunozaki, H., Ichikawa, W., Nihei, Z., and Sugihara, K. (2001) Depth of invasion parallels increased cyclooxygenase-2 levels in patients with gastric carcinoma *Cancer* **91**: 1876-1881
159. Onoe, Y., Miyaura, C., Kaminakayashiki, T., Nagai, Y., Noguchi, K., Chen, Q. R., Seo, H., Ohta, H., Nozawa, S., Kudo, I., and Suda, T. (1996) IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts *J.Immunol.* **156**: 758-764
160. Pahl, H. L. (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors *Oncogene* **18**: 6853-6866
161. Paillard, F. (1999) Induction of apoptosis with I-kappaB, the inhibitor of NF-kappaB *Hum.Gene Ther.* **10**: 1-3
162. Pallis, M. and Russell, N. (2000) P-glycoprotein plays a drug-efflux-independent role in augmenting cell survival in acute myeloblastic leukemia and is associated with modulation of a sphingomyelin-ceramide apoptotic pathway *Blood* **95**: 2897-2904
163. Patel, V. A., Dunn, M. J., and Sorokin, A. (2002) Regulation of MDR-1 (P-glycoprotein) by cyclooxygenase-2 *J.Biol.Chem.* **277**: 38915-38920
164. Pennock, G. D., Dalton, W. S., Roeske, W. R., Appleton, C. P., Mosley, K., Plezia, P., Miller, T. P., and Salmon, S. E. (1991) Systemic toxic effects associated with high-dose verapamil infusion and chemotherapy administration *J.Natl.Cancer Inst.* **83**: 105-110
165. Pirker, R., Pohl, G., Stranzl, T., Suchomel, R. W., Scheper, R. J., Jager, U., Geissler, K., Lechner, K., and Filipits, M. (1999) The lung resistance protein (LRP) predicts poor outcome in acute myeloid leukemia *Adv.Exp.Med.Biol.* **457:133-9.**: 133-139

166. **Plescia, O. J., Smith, A. H., and Grinwich, K. (1975)** Subversion of immune system by tumor cells and role of prostaglandins *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **72**: 1848-1851
167. **Preston, S. J., Arnold, M. H., Beller, E. M., Brooks, P. M., and Buchanan, W. W. (1989)** Comparative analgesic and anti-inflammatory properties of sodium salicylate and acetylsalicylic acid (aspirin) in rheumatoid arthritis *Br.J.Clin.Pharmacol.* **27**: 607-611
168. **Puhlmann U, Reinhardt D, Vorwerk H, Schäfer D, and Ziemann C (2003)** Modulation of doxorubicin induced MDR1 overexpression in human myeloid AML blasts by cyclooxygenase-inhibitors *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* **367 Supplement 1**: R155
169. **Puhlmann, U. (2005)** Impact of the cyclooxygenase system on doxorubicin-induced functional multidrug resistance 1 overexpression and doxorubicin sensitivity in acute myeloid leukemic HL-60 cells
170. **Rana, R. S. and Hokin, L. E. (1990)** Role of phosphoinositides in transmembrane signaling *Physiol Rev.* **70**: 115-164
171. **Ratnasinghe, D., Daschner, P. J., Anver, M. R., Kasprzak, B. H., Taylor, P. R., Yeh, G. C., and Tangrea, J. A. (2001)** Cyclooxygenase-2, P-glycoprotein-170 and drug resistance; is chemoprevention against multidrug resistance possible? *Anticancer Res.* **21**: 2141-2147
172. **Rayet, B. and Gelinas, C. (1999)** Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer *Oncogene* **18**: 6938-6947
173. **Reddy, B. S., Rao, C. V., and Seibert, K. (1996)** Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitor for potential chemopreventive properties in colon carcinogenesis *Cancer Res.* **56**: 4566-4569
174. **Reinhardt, D., Hempel, G., Fleischhack, G., Schulz, A., Boos, J., and Creutzig, U. (2002)** [Liposomal daunorubicine combined with cytarabine in the treatment of relapsed/refractory acute myeloid leukemia in children] *Klin.Padiatr.* **214**: 188-194
175. **Reinhardt, D., Hempel, G., Schulz, A., Fleischhack, G., Ritter, J., Boos, J., and Creutzig, U. (2001)** Liposomal Daunorubicin Combined with Cytarabine in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia in Children *Blood* **98**
176. **Richards, J. A., Petrel, T. A., and Brueggemeier, R. W. (2002)** Signaling pathways regulating aromatase and cyclooxygenases in normal and malignant breast cells *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **80**: 203-212
177. **Rivest, S. (1999)** What is the cellular source of prostaglandins in the brain in response to systemic inflammation? Facts and controversies *Mol.Psychiatry* **4**: 500-507
178. **Rohlf, C. and Glazer, R. I. (1995)** Regulation of multidrug resistance through the cAMP and EGF signalling pathways *Cell Signal.* **7**: 431-443

179. **Rohlf, C. and Glazer, R. I. (1998)** Regulation of the MDR1 promoter by cyclic AMP-dependent protein kinase and transcription factor Sp1 *Int.J.Oncol.* **12**: 383-386
180. **Roninson, I. B., Chin, J. E., Choi, K. G., Gros, P., Housman, D. E., Fojo, A., Shen, D. W., Gottesman, M. M., and Pastan, I. (1986)** Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **83**: 4538-4542
181. **Ross, D. D., Karp, J. E., Chen, T. T., and Doyle, L. A. (2000)** Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia *Blood* **96**: 365-368
182. **Ross, D. D., Yang, W., Abruzzo, L. V., Dalton, W. S., Schneider, E., Lage, H., Dietel, M., Greenberger, L., Cole, S. P., and Doyle, L. A. (1999)** Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines *J.Natl.Cancer Inst.* **91**: 429-433
183. **Rozic, J. G., Chakraborty, C., and Lala, P. K. (2001)** Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis *Int.J.Cancer* **93**: 497-506
184. **Rozic, J. G., Chakraborty, C., and Lala, P. K. (2001)** Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis *Int.J.Cancer* **93**: 497-506
185. **Ruetz, S. and Gros, P. (1994)** Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the mdr2 gene *Cell* **77**: 1071-1081
186. **Safa, A. R., Glover, C. J., Sewell, J. L., Meyers, M. B., Biedler, J. L., and Felsted, R. L. (1987)** Identification of the multidrug resistance-related membrane glycoprotein as an acceptor for calcium channel blockers *J.Biol.Chem.* **262**: 7884-7888
187. **Sales, K. J., Katz, A. A., Davis, M., Hinz, S., Soeters, R. P., Hofmeyr, M. D., Millar, R. P., and Jabbour, H. N. (2001)** Cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E(2) synthesis are up-regulated in carcinomas of the cervix: a possible autocrine/paracrine regulation of neoplastic cell function via EP2/EP4 receptors *J.Clin.Endocrinol.Metab* **86**: 2243-2249
188. **Scheffer, G. L., Wijngaard, P. L., Flens, M. J., Izquierdo, M. A., Slovak, M. L., Pinedo, H. M., Meijer, C. J., Clevers, H. C., and Scheper, R. J. (1995)** The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein *Nat.Med.* **1**: 578-582
189. **Schmedtje, J. F., Jr., Ji, Y. S., Liu, W. L., DuBois, R. N., and Runge, M. S. (1997)** Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappaB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells *J.Biol.Chem.* **272**: 601-608
190. **Schondorf, T., Neumann, R., Benz, C., Becker, M., Riffelmann, M., Gohring, U. J., Sartorius, J., von Konig, C. H., Breidenbach, M., Valter, M. M., Hoopmann, M., Di Nicolantonio, F., and Kurbacher, C. M. (2003)** Cisplatin, doxorubicin and paclitaxel induce mdr1 gene transcription in ovarian cancer cell lines *Recent Results Cancer Res.* **161**:111-6.: 111-116

191. **Sengputa S. (1999)** Cyclooxygenase-2: A new therapeutic target *Indian Journal of Pharmacology* **31**: 322-332
192. **Shao, J., Fujiwara, T., Kadowaki, Y., Fukazawa, T., Waku, T., Itoshima, T., Yamatsuji, T., Nishizaki, M., Roth, J. A., and Tanaka, N. (2000)** Overexpression of the wild-type p53 gene inhibits NF-kappaB activity and synergizes with aspirin to induce apoptosis in human colon cancer cells *Oncogene* **19**: 726-736
193. **Shapiro, A. B., Fox, K., Lee, P., Yang, Y. D., and Ling, V. (1998)** Functional intracellular P-glycoprotein *Int.J.Cancer* **76**: 857-864
194. **Sharma, R. C., Inoue, S., Roitelman, J., Schimke, R. T., and Simoni, R. D. (1992)** Peptide transport by the multidrug resistance pump *J.Biol.Chem.* **267**: 5731-5734
195. **Sharma, R. C., Inoue, S., Roitelman, J., Schimke, R. T., and Simoni, R. D. (1992)** Peptide transport by the multidrug resistance pump *J.Biol.Chem.* **267**: 5731-5734
196. **Sharma, S., Stolina, M., Yang, S. C., Baratelli, F., Lin, J. F., Atianzar, K., Luo, J., Zhu, L., Lin, Y., Huang, M., Dohadwala, M., Batra, R. K., and Dubinett, S. M. (2003)** Tumor Cyclooxygenase 2-dependent Suppression of Dendritic Cell Function *Clin.Cancer Res.* **9**: 961-968
197. **Sheng, H., Shao, J., Dixon, D. A., Williams, C. S., Prescott, S. M., Dubois, R. N., and Beauchamp, R. D. (2000)** Transforming growth factor-beta1 enhances Ha-ras-induced expression of cyclooxygenase-2 in intestinal epithelial cells via stabilization of mRNA *J.Biol.Chem.* **275**: 6628-6635
198. **Sheng, H., Shao, J., Morrow, J. D., Beauchamp, R. D., and Dubois, R. N. (1998)** Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells *Cancer Res.* **58**: 362-366
199. **Sheng, H., Shao, J., Washington, M. K., and Dubois, R. N. (2001)** Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells *J.Biol.Chem.* **276**: 18075-18081
200. **Shustik, C., Dalton, W., and Gros, P. (1995)** P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumor cells: biochemistry, clinical relevance and modulation *Mol.Aspects Med.* **16**: 1-78
201. **Sikic, B. I. (1993)** Modulation of multidrug resistance: at the threshold *J.Clin.Oncol.* **11**: 1629-1635
202. **Silverman, J. A. and Thorgeirsson, S. S. (1995)** Regulation and function of the multidrug resistance genes in liver *Prog.Liver Dis.* **13:101-23.**: 101-123
203. **Simon, S. M. and Schindler, M. (1994)** Cell biological mechanisms of multidrug resistance in tumors *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**: 3497-3504

204. **Sirois, J. and Richards, J. S. (1992)** Purification and characterization of a novel, distinct isoform of prostaglandin endoperoxide synthase induced by human chorionic gonadotropin in granulosa cells of rat preovulatory follicles *J.Biol.Chem.* **267**: 6382-6388
205. **Smith, W. L., DeWitt, D. L., and Garavito, R. M. (2000)** Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology *Annu.Rev.Biochem.* **69**:145-82.: 145-182
206. **Song, X., Lin, H. P., Johnson, A. J., Tseng, P. H., Yang, Y. T., Kulp, S. K., and Chen, C. S. (2002)** Cyclooxygenase-2, player or spectator in cyclooxygenase-2 inhibitor-induced apoptosis in prostate cancer cells *J.Natl.Cancer Inst.* **94**: 585-591
207. **Steinbach, G., Lynch, P. M., Phillips, R. K., Wallace, M. H., Hawk, E., Gordon, G. B., Wakabayashi, N., Saunders, B., Shen, Y., Fujimura, T., Su, L. K., and Levin, B. (2000)** The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis *N.Engl.J.Med.* **342**: 1946-1952
208. **Steinbach, G., Lynch, P. M., Phillips, R. K., Wallace, M. H., Hawk, E., Gordon, G. B., Wakabayashi, N., Saunders, B., Shen, Y., Fujimura, T., Su, L. K., and Levin, B. (2000)** The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis *N.Engl.J.Med.* **342**: 1946-1952
209. **Steinherz, L. J., Steinherz, P. G., Tan, C. T., Heller, G., and Murphy, M. L. (1991)** Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy *JAMA* **266**: 1672-1677
210. **Stolina, M., Sharma, S., Lin, Y., Dohadwala, M., Gardner, B., Luo, J., Zhu, L., Kronenberg, M., Miller, P. W., Portanova, J., Lee, J. C., and Dubinett, S. M. (2000)** Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis *J.Immunol.* **164**: 361-370
211. **Subbaramaiah, K., Altorki, N., Chung, W. J., Mestre, J. R., Sampat, A., and Dannenberg, A. J. (1999)** Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53 *J.Biol.Chem.* **274**: 10911-10915
212. **Subbaramaiah, K., Altorki, N., Chung, W. J., Mestre, J. R., Sampat, A., and Dannenberg, A. J. (1999)** Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53 *J.Biol.Chem.* **274**: 10911-10915
213. **Subbaramaiah, K., Telang, N., Ramonetti, J. T., Araki, R., DeVito, B., Weksler, B. B., and Dannenberg, A. J. (1996)** Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells *Cancer Res.* **56**: 4424-4429
214. **Sumitani, K., Kamijo, R., Toyoshima, T., Nakanishi, Y., Takizawa, K., Hatori, M., and Nagumo, M. (2001)** Specific inhibition of cyclooxygenase-2 results in inhibition of proliferation of oral cancer cell lines via suppression of prostaglandin E2 production *J.Oral Pathol.Med.* **30**: 41-47
215. **Taketo, M. M. (1998)** Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (Part II) *J.Natl.Cancer Inst.* **90**: 1609-1620

216. **Tallman, M. S., Lee, S., Sikic, B. I., Paietta, E., Wiernik, P. H., Bennett, J. M., and Rowe, J. M. (1999)** Mitoxantrone, etoposide, and cytarabine plus cyclosporine for patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia: an Eastern Cooperative Oncology Group pilot study *Cancer* **85**: 358-367
217. **Tanigawara, Y., Okamura, N., Hirai, M., Yasuhara, M., Ueda, K., Kioka, N., Komano, T., and Hori, R. (1992)** Transport of digoxin by human P-glycoprotein expressed in a porcine kidney epithelial cell line (LLC-PK1) *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **263**: 840-845
218. **Tegeder, I., Niederberger, E., Israr, E., Guhring, H., Brune, K., Euchenhofer, C., Grosch, S., and Geisslinger, G. (2001)** Inhibition of NF-kappaB and AP-1 activation by R- and S-flurbiprofen *FASEB J.* **15**: 595-597
219. **Tegeder, I., Niederberger, E., Israr, E., Guhring, H., Brune, K., Euchenhofer, C., Grosch, S., and Geisslinger, G. (2001)** Inhibition of NF-kappaB and AP-1 activation by R- and S-flurbiprofen *FASEB J.* **15**: 595-597
220. **Tegeder, I., Pfeilschifter, J., and Geisslinger, G. (2001)** Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors *FASEB J.* **15**: 2057-2072
221. **Thevenod, F., Friedmann, J. M., Katsen, A. D., and Hauser, I. A. (2000)** Up-regulation of multidrug resistance P-glycoprotein via nuclear factor-kappaB activation protects kidney proximal tubule cells from cadmium- and reactive oxygen species-induced apoptosis *J.Biol.Chem.* **275**: 1887-1896
222. **Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M. M., Pastan, I., and Willingham, M. C. (1989)** Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein *J.Histochem.Cytochem.* **37**: 159-164
223. **Thierry, A. R., Vige, D., Coughlin, S. S., Belli, J. A., Dritschilo, A., and Rahman, A. (1993)** Modulation of doxorubicin resistance in multidrug-resistant cells by liposomes *FASEB J.* **7**: 572-579
224. **Thompson, E. J., Gupta, A., Vielhauer, G. A., Regan, J. W., and Bowden, G. T. (2001)** The growth of malignant keratinocytes depends on signaling through the PGE(2) receptor EP1 *Neoplasia.* **3**: 402-410
225. **Thun, M. J., Henley, S. J., and Patrono, C. (2002)** Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs as Anticancer Agents: Mechanistic, Pharmacologic, and Clinical Issues *J.Natl.Cancer Inst.* **94**: 252-266
226. **Tiano, H. F., Loftin, C. D., Akunda, J., Lee, C. A., Spalding, J., Sessoms, A., Dunson, D. B., Rogan, E. G., Morham, S. G., Smart, R. C., and Langenbach, R. (2002)** Deficiency of either cyclooxygenase (COX)-1 or COX-2 alters epidermal differentiation and reduces mouse skin tumorigenesis *Cancer Res.* **62**: 3395-3401
227. **Tjandrawinata, R. R. and Hughes-Fulford, M. (1997)** Up-regulation of cyclooxygenase-2 by product-prostaglandin E2 *Adv.Exp.Med.Biol.* **407:163-70.**: 163-170

228. **Tsuji, H., Okamoto, Y., Kikuchi, E., Matsumoto, M., and Nakano, H. (1993)** Prostaglandin E2 and rat liver regeneration *Gastroenterology* **105**: 495-499
229. **Tsuji, M. and Dubois, R. N. (1995)** Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2 *Cell* **83**: 493-501
230. **Valverde, M. A., Diaz, M., Sepulveda, F. V., Gill, D. R., Hyde, S. C., and Higgins, C. F. (1992)** Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein *Nature* **355**: 830-833
231. **van den Heuvel-Eibrink MM, Sonneveld, P., and Pieters, R. (2000)** The prognostic significance of membrane transport-associated multidrug resistance (MDR) proteins in leukemia *Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.* **38**: 94-110
232. **van den Heuvel-Eibrink MM, van der, Holt B., te Boekhorst, P. A., Pieters, R., Schoester, M., Lowenberg, B., and Sonneveld, P. (1997)** MDR 1 expression is an independent prognostic factor for response and survival in de novo acute myeloid leukaemia *Br.J.Haematol.* **99**: 76-83
233. **van der Kolk, D. M., de Vries, E. G., van Putten, W. J., Verdonck, L. F., Ossenkoppele, G. J., Verhoef, G. E., and Vellenga, E. (2000)** P-glycoprotein and multidrug resistance protein activities in relation to treatment outcome in acute myeloid leukemia *Clin.Cancer Res.* **6**: 3205-3214
234. **Vormoor, J., Boos, J., Stahnke, K., Jurgens, H., Ritter, J., and Creutzig, U. (1996)** Therapy of childhood acute myelogenous leukemias *Annals Hematology* **73**: 11-24
235. **Vormoor, J., Boos, J., Stahnke, K., Jurgens, H., Ritter, J., and Creutzig, U. (1996)** Therapy of childhood acute myelogenous leukemias *Annals Hematology* **73**: 11-24
236. **Wechter, W. J., Leipold, D. D., Murray, E. D., Jr., Quiggle, D., McCracken, J. D., Barrios, R. S., and Greenberg, N. M. (2000)** E-7869 (R-flurbiprofen) inhibits progression of prostate cancer in the TRAMP mouse *Cancer Res.* **60**: 2203-2208
237. **Weissmann, G. (1993)** Prostaglandins as modulators rather than mediators of inflammation *J.Lipid Mediat.* **6**: 275-286
238. **Wiese, F. W., Thompson, P. A., and Kadlubar, F. F. (2001)** Carcinogen substrate specificity of human COX-1 and COX-2 *Carcinogenesis* **22**: 5-10
239. **Williams, C. S., Watson, A. J., Sheng, H., Helou, R., Shao, J., and Dubois, R. N. (2000)** Celecoxib prevents tumor growth in vivo without toxicity to normal gut: lack of correlation between in vitro and in vivo models *Cancer Res.* **60**: 6045-6051
240. **Wuchter, C., Leonid, K., Ruppert, V., Schrappe, M., Buchner, T., Schoch, C., Haferlach, T., Harbott, J., Ratei, R., Dorken, B., and Ludwig, W. D. (2000)** Clinical significance of P-glycoprotein expression and function for response to induction chemotherapy, relapse rate and overall survival in acute leukemia *Haematologica* **85**: 711-721

241. **Yang, J. M., Vassil, A. D., and Hait, W. N. (2001)** Activation of phospholipase C induces the expression of the multidrug resistance (MDR1) gene through the Raf-MAPK pathway *Mol.Pharmacol.* **60**: 674-680
242. **Yang, J. M., Vassil, A. D., and Hait, W. N. (2001)** Activation of phospholipase C induces the expression of the multidrug resistance (MDR1) gene through the Raf-MAPK pathway *Mol.Pharmacol.* **60**: 674-680
243. **Yasojima, K., Schwab, C., McGeer, E. G., and McGeer, P. L. (1999)** Distribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNAs and proteins in human brain and peripheral organs *Brain Res.* **830**: 226-236
244. **Yasojima, K., Schwab, C., McGeer, E. G., and McGeer, P. L. (1999)** Distribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNAs and proteins in human brain and peripheral organs *Brain Res.* **830**: 226-236
245. **Yeh, G. C., Lopaczynska, J., Poore, C. M., and Phang, J. M. (1992)** A new functional role for P-glycoprotein: efflux pump for benzo(alpha)pyrene in human breast cancer MCF-7 cells *Cancer Res.* **52**: 6692-6695
246. **Zhang, F., Subbaramaiah, K., Altorki, N., and Dannenberg, A. J. (1998)** Dihydroxy bile acids activate the transcription of cyclooxygenase-2 *J.Biol.Chem.* **273**: 2424-2428
247. **Zhang, X., Morham, S. G., Langenbach, R., and Young, D. A. (1999)** Malignant transformation and antineoplastic actions of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) on cyclooxygenase-null embryo fibroblasts *J.Exp.Med.* **190**: 451-459
248. **Zhang, X., Morham, S. G., Langenbach, R., and Young, D. A. (1999)** Malignant transformation and antineoplastic actions of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) on cyclooxygenase-null embryo fibroblasts *J.Exp.Med.* **190**: 451-459
249. **Zhang, X., Morham, S. G., Langenbach, R., and Young, D. A. (1999)** Malignant transformation and antineoplastic actions of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) on cyclooxygenase-null embryo fibroblasts *J.Exp.Med.* **190**: 451-459
250. **Zhou, X. M., Wong, B. C., Fan, X. M., Zhang, H. B., Lin, M. C., Kung, H. F., Fan, D. M., and Lam, S. K. (2001)** Non-steroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in gastric cancer cells through up-regulation of bax and bak *Carcinogenesis* **22**: 1393-1397
251. **Ziemann C, Rüdell G, Riecke A, Steinfeldler HJ, Oetjen E, and Hirsch-Ernst KI (2003)** Contribution of the EP4-receptor, PKA and CREB to intrinsic mdr1b overexpression in rat hepatocytes cultures *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* **367 Supplement 1**: R155
252. **Ziemann, C., Burkle, A., Kahl, G. F., and Hirsch-Ernst, K. I. (1999)** Reactive oxygen species participate in mdr1b mRNA and P-glycoprotein overexpression in primary rat hepatocyte cultures *Carcinogenesis* **20**: 407-414

253. **Ziemann, C., Schafer, D., Rudell, G., Kahl, G. F., and Hirsch-Ernst, K. I. (2002)** The cyclooxygenase system participates in functional mdr1b overexpression in primary rat hepatocyte cultures *Hepatology* **35**: 579-588
254. **Ziemann, C., Schafer, D., Rudell, G., Kahl, G. F., and Hirsch-Ernst, K. I. (2002)** The cyclooxygenase system participates in functional mdr1b overexpression in primary rat hepatocyte cultures *Hepatology* **35**: 579-588
255. **Zwaan, C. M., Kaspers, G. J., Pieters, R., Ramakers-van Woerden, N. L., den Boer, M. L., Wunsche, R., Rottier, M. M., Hahlen, K., van Wering, E. R., Janka-Schaub, G. E., Creutzig, U., and Veerman, A. J. (2000)** Cellular drug resistance profiles in childhood acute myeloid leukemia: differences between FAB types and comparison with acute lymphoblastic leukemia *Blood* **96**: 2879-2886

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	"ATP-binding-cassette"
AC	Adenylatcyclase
ADP	Adenosindiphosphat
AML	Akute myeloische Leukämie
AP-1	Transriptionsfaktor (FOS,JUN)
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
BCRP	Breast Cancer Related Protein
bzw.	beziehungsweise
ca.	Circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation
COX	Cyclooxygenase
CR	Complete Remission
CRE	cAMP Response Element
DAG	Diacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOX	Doxorubicin
EC	Efflux Kontrolle
ED	Effektdosis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFS	Eventfree Survival (Ereignisfreies Überleben)
EIA	Enzyme Immuno Assay
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EO	Efflux ohne Verapamil
EP	Prostaglandin E
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EV	Efflux unter Verapamil
FAB	French American British
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
G	Erdbeschleunigung
HR	Hoch-Risiko
IC	inhibitory concentration
IκB	inhibitorisches Protein des Transkriptionsfaktors NFκB
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IP ₃	Inositol-(1,4,5)-Trisphosphat
kDa	kilo Dalton
L-DNR	liposomales Daunorubicin
LRP	Lung Resistance Protein
MDR	Multidrug Resistance
moAB	monoklonaler Antikörper
mRNA	messenger RNA
MRP	Multidrug Resistance Related Protein
MTT	(3-([4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dimethyl-tetrazoliumbromid))
NFκB	Kernfaktor κB
NR	Nonresponder
NSAID	Non-steroidal antiinflammatory drug
P	Signifikanzniveau
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phytoerythrin
Pgp	P – Glykoprotein
PG	Prostaglandin
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Phosphokinase A
PKC	Phosphokinase C
PLC	Phospholipase C
Rho 123	Rhodamin 123
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	rates per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
rRNA	ribosomale RNA
s.a.	siehe auch
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Standardfehler
SR	Standard-Risiko
Tab.	Tabelle
TNFα	Tumornekrose-faktor α
u.a.	unter anderem
UC	Uptake Kontrolle
UO	Uptake ohne Verapamil
u.U.	unter Umständen
UV	Uptake unter Verapamil
VCR	Vincristin
WBC	White Blood Cells
z.B.	Zum Beispiel

8 Danksagung

Zunächst danke ich Univ. - Prof. Dr. E. Harms für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Des Weiteren gilt mein aufrichtiger Dank Herrn PD Dr. Dirk Reinhardt, der mir jederzeit als Ansprechpartner zur Verfügung stand, für seine gute Betreuung und Unterstützung.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Ulrike Puhmann für alle Zeit und Energie bedanken, die sie in mich investiert hat. Danke für die großartige Einarbeitung, Anleitung, Motivation und die stete Begleitung meiner Arbeit!

Allen Mitarbeitern im Labor sei Dank für ihre große Hilfsbereitschaft, die freundliche Atmosphäre und die Einweisung in labortechnische Arbeitsmethoden.

Christian Wagner danke ich für die bereichernden Diskussionen, alle Ermutigungen sowie seine Anregungen zur elektronischen Datenverarbeitung.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie, die mir zu jeder Zeit zur Seite gestanden und mich gefördert hat. Besonders meiner Frau möchte ich von ganzem Herzen Danke sagen!

9 Lebenslauf

<u>Persönliche Daten</u>	Name:	Peter Schürmann
	Geburtsdatum:	07. Juni 1979
	Geburtsort:	Werther/Westf.
	Familienstand:	verheiratet
	Nationalität:	deutsch
<u>Schulbildung:</u>	1985 - 1989	Grundschule Langenheide
	1989 - 1991	Realschule Halle
	1991 - 1998	Kreisgymnasium Halle
<u>Zivildienst:</u>	1998 - 1999	Rettungsdienst des Kreises Gütersloh
<u>Hochschulstudium:</u>	1999 - 2006	Studium der Humanmedizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
	2001	Ärztliche Vorprüfung
	2002	Erstes Staatsexamen
	2005	Zweites Staatsexamen
	2005 - 2006	Praktisches Jahr
	2006	Drittes Staatsexamen
<u>Berufliche Tätigkeit:</u>	Seit 01.08.2006	Assistenzarzt zur Facharztausbildung Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin Allgemeine Pädiatrie Universitätsklinikum Münster