

Autokrine IL-1 β -Sekretion führt zu erhöhter NF- κ B-Aktivität und zu Chemoresistenz in Pankreaskarzinomzellen in vivo

Susanne Mürköster, Alexander Arlt, André Gehrz, Jens Vorndamm, Maike Witt, Frauke Grohmann, Ulrich R. Fölsch, Heiner Schäfer¹

ZUSAMMENFASSUNG

□ *Hintergrund und Ziel:* Das duktales Pankreaskarzinom (PDAC) ist durch einen hochmalignen Phänotyp und eine profunde Chemoresistenz charakterisiert. In der vorliegenden Studie wurde die autokrine Sekretion von Interleukin-(IL)1 β durch Pankreaskarzinomzellen in vivo als eine Ursache für einen chemoresistenten Phänotyp untersucht.

□ *Material und Methodik:* Zellen der humanen PDAC-Zelllinie PancTu1 mit ausgeprägter IL-1 β -Sekretion wurden subkutan in weibliche SCID-Mäuse inokuliert. Nach 10 Tagen wurden die Tiere randomisiert und entweder unbehandelt gelassen oder für 14 Tage mit einem IL-1 β -RI-Antikörper, mit Etoposid oder einer Kombination aus beidem behandelt. Anschließend wurden die Tumorgößen bestimmt und die Tumoren immunhistologisch auf Apoptose, Vaskularisierung sowie die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B untersucht.

□ *Ergebnisse:* Die Kombination aus IL-1 β -RI-Antikörper und Etoposid führte im Vergleich zu den entsprechenden Monotherapien bzw. keiner Behandlung zu einem deutlich verringerten Wachstum der PancTu1-Tumoren. Entsprechend konnte in Tumoren der Kombinationsbehandlung eine signifikant erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen detektiert werden. Nach der Behandlung mit dem IL-1 β -RI-Antikörper wiesen die Tumoren eine deutlich verminderte Präsenz von aktiviertem NF- κ B im Vergleich zu den Kontrolltumoren auf. Ferner war in den Tumoren nach Kombinationstherapie die Vaskularisierung (CD31-positive Zellen) weniger stark ausgeprägt.

□ *Schlussfolgerung:* Die autokrine Sekretion von IL-1 β ist an der Entstehung konstitutiver NF- κ B-Aktivität und einer dadurch vermittelten Chemoresistenz in Pankreaskarzinomzellen beteiligt.

Schlüsselwörter: Chemoresistenz · Duktales Pankreaskarzinom · NF- κ B · Interleukin-1 β

Med Klin 2004;99:185–90.
DOI 10.1007/s00063-004-1027-4

ABSTRACT

Autocrine IL-1 β Secretion Leads to NF- κ B-Mediated Chemoresistance in Pancreatic Carcinoma Cells in Vivo

□ *Background and Purpose:* The pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is characterized by a highly malignant phenotype and a profound chemoresistance. Thus, options for an effective treatment of this disease are still quite poor. In this study, it was investigated whether the autocrine secretion of interleukin-(IL)-1 β is related to a chemoresistant phenotype of PDAC cells in vivo.

Das exokrine Pankreaskarzinom stellt immer noch einen sehr schwierig und wenig erfolgreich therapierbaren Tumor dar, da es meist erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird [1, 2]. Mit einer 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von ca. 2% gehört das Pankreaskarzinom zu den bösartigsten Tumorerkrankungen und liegt in der Häufigkeit tumorbedingter Todesfälle an fünfter Stelle [3–5].

80% der Patienten erweisen sich zum Zeitpunkt der Diagnose als inoperabel und sind somit auf zusätzliche Therapieformen wie Strahlen- oder Chemotherapie angewiesen, welche zurzeit jedoch rein palliativ sind [5, 6]. Ein Problem, das sich neben der oft fortgeschrittenen Metastasierung in diesem Zusammenhang ergibt, ist die von vornherein bestehende oder im Verlauf der Therapie erworbene Resistenz der Tumoren gegenüber Chemotherapeutika. Ein wesentlicher Mechanismus dabei besteht in der Inhibition des programmierten Zelltods (Apoptose). Ein Ziel zur Verbesserung solcher Therapien ist folglich, diese Resistenz zu durchbrechen und die Tumoren sensitiver gegenüber Zytostatika zu machen.

Ein antiapoptotischer Faktor, der diesbezüglich mittlerweile große Bedeutung erlangt hat, ist der Transkriptionsfaktor „nuclear factor kappa B“ (NF- κ B). Er induziert sowohl Gene, die für Zytokine, Zytokinrezeptoren sowie Adhäsionsmoleküle kodieren, als auch Gene, die im Zusammenhang mit der Onkogenese, z.B. der Kontrolle von Apoptose, des Zellzyklus, der Differenzierung und der Zellmigration [7–9], von Bedeutung sind. Bei einer Vielzahl von Tumoren, darunter auch solchen des Gastrointestinaltrakts, scheint die konstitutive Aktivität von NF- κ B eine Resistenz gegenüber Zytostatika (Etoposid, Doxorubicin, Gemcitabin) zu bedingen. Entsprechend führt eine Inhibition von NF- κ B zu einer Sensitivierung gegenüber Zytostatika und somit

¹ Labor für Molekulare Gastroenterologie und Hepatologie, Klinik für Allgemeine Innere Medizin, UKSH – Campus Kiel, Kiel.

ORIGINALARBEIT

zu einer erhöhten Induktion von Apoptose, wie auch für Pankreaskarzinomzelllinien gezeigt werden konnte [7, 10]. Diese NF- κ B-bedingte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika kann in den Tumorzellen u.a. über autokrine Mechanismen wie die konstitutive Sekretion von Interleukin-(IL-)1 β [11] erfolgen. So führte die Behandlung von resistenten Pankreaskarzinomzellen mit einem IL-1 β -RI-Antikörper zu einer deutlich verminderten NF- κ B-Aktivität und damit zu einer deutlichen Sensitivierung gegenüber Zytostatika [11]. Um diesen Mechanismus auf seine Relevanz in vivo zu überprüfen, wurden humane chemoresistente und IL-1 β sezernierende PancTu1-Zellen subkutan in SCID-Mäuse appliziert und einer Behandlung mit einem IL-1 β -RI-Antikörper, mit dem Zytostatikum Etoposid oder einer Kombination aus beidem unterzogen.

Material und Methodik**Kultur von PancTu1-Zellen**

Die humane duktaile Pankreaskarzinomzelllinie PancTu1 wurde in RPMI 1640 (PAA Laboratories, Cölbe) mit 10% FCS (Biochrom KG, Berlin) und 1% L-Glutamin (Life Technologies, Eggenstein) kultiviert. Für die Inokulation in die SCID-Mäuse wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA (PAA Laboratories) abgelöst, einmal mit phosphatgepufferter Saline (PBS) gewaschen und in einer Zelldichte von 2×10^7 /ml in 0,9% NaCl (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) aufgenommen.

Tumormodell und Therapie

Weibliche SCID-Mäuse wurden von Harlan Winkelmann (Borchen) bezogen und unter pathogenfreien Bedingungen gehalten.

2×10^6 PancTu1-Zellen, resuspendiert in 0,1 ml 0,9% NaCl, wurden subkutan in die rasierte Flanke einer weiblichen SCID-Maus injiziert. Nach 14-tägigem Anwachsen wurden die Tiere in vier Gruppen ($n = 5$) randomisiert und unbehandelt belassen oder mit 1 mg/kg IL-1 β -RI-Antikörper (R&D Systems, Wiesbaden), mit 6,5 mg/kg Etoposid (Bristol-Myers Squibb, München) oder mit einer Kombination aus beiden Substanzen, jeweils in 0,2 ml

□ **Material and Methods:** Human PancTu1 PDAC cells were inoculated subcutaneously into female SCID mice. After 10 days of outgrowth, animals were randomized and left untreated or treated with an IL-1 β -RI antibody, etoposide, or a combination of both. After treatment for 14 days, tumor sizes were determined and each tumor was analyzed immunohistochemically for apoptosis (TUNEL), activated NF- κ B (p65), and vascularization (CD31 staining).

□ **Results:** The combination of IL-1 β -RI antibody and etoposide led to a significantly reduced outgrowth of PancTu1 tumors in comparison to the monotherapies or no treatment. Accordingly, the number of apoptotic cells was significantly elevated in tumors of the combination group. After treatment with the IL-1 β -RI antibody, less activated NF- κ B was present in tumors compared to the control group. Moreover, tumors of the combination group showed a clearly reduced vascularization.

□ **Conclusion:** The autocrine secretion of IL-1 β contributes to a constitutively increased NF- κ B activity in PDAC cells along with a chemoresistant phenotype.

Key Words: Chemoresistance · Pancreatic ductal adenocarcinoma · NF- κ B · Interleukin-1 β

Med Klin 2004;99:185–90.
DOI 10.1007/s00063-004-1027-4

0,9% NaCl intraperitoneal verabreicht, behandelt. Die Behandlung erfolgte 2×4 Tage, mit 7 Tagen Unterbrechung. Den Kontrolltieren, die unbehandelt blieben, wurden nach diesem Schema jeweils 0,2 ml 0,9% NaCl intraperitoneal verabreicht. Die Behandlung mit dem IL-1 β -RI-Antikörper erfolgte 30–60 min vor Zytostatikagabe. Die

Tumorgrößen wurden zweimal pro Woche gemessen und die Tiere an Tag 32 nach Tumoringokulation getötet.

Immunhistochemische Färbungen

Nach dem Töten der Tiere wurden die Tumoren sofort entfernt und in flüssigem Stickstoff konserviert. Mit einem

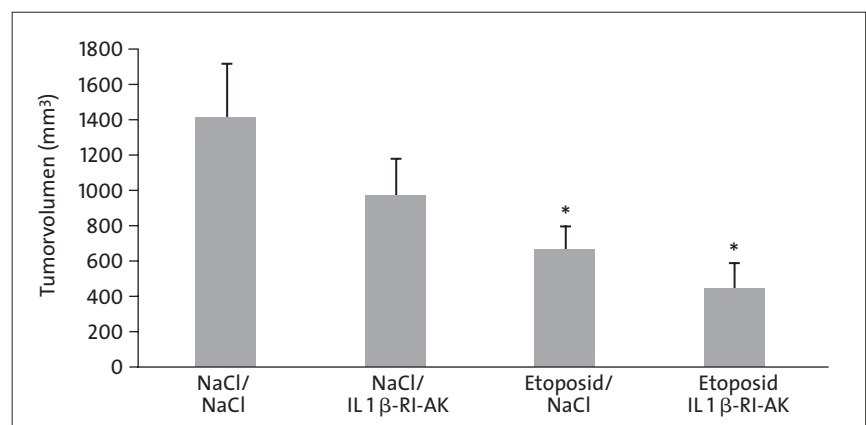


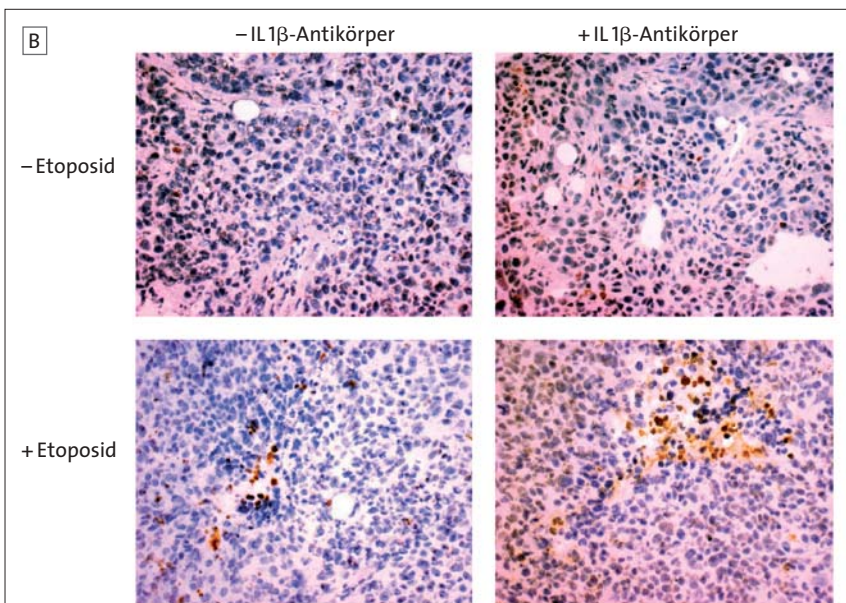
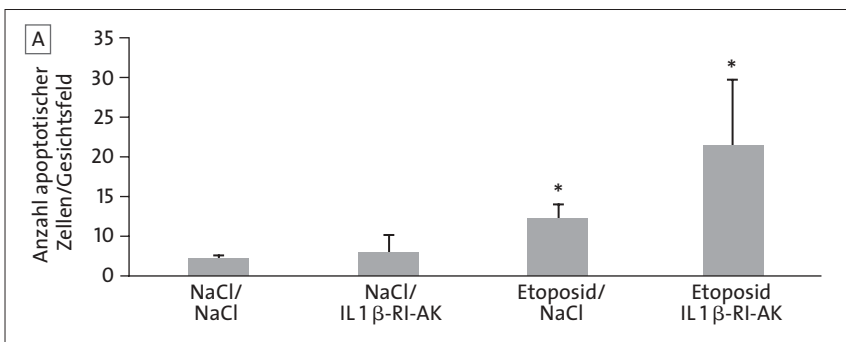
Abbildung 1. Die Behandlung mit dem IL-1 β -RI-Antikörper sensitiviert PancTu1-Tumoren gegenüber Etoposid. 2×10^6 PancTu1-Zellen wurden subkutan in weibliche SCID-Mäuse inokuliert. Nach 14-tägigem Wachstum wurden die Tiere in vier Gruppen ($n = 5$) randomisiert und über 2×4 Tage mit dem IL-1 β -RI-Antikörper allein (NaCl/IL-1 β -RI-AK), mit Etoposid (Etoposid/NaCl) oder mit einer Kombination aus Etoposid und IL-1 β -RI-Antikörper (Etoposid/IL-1 β -RI-AK) behandelt. Die Kontrollgruppe wurde mit NaCl/NaCl behandelt. Gezeigt ist das mittlere Tumolvolumen in mm³ mit Standardabweichungen eines repräsentativen Experiments. * $p < 0,05$ der beiden mit Etoposid behandelten Gruppen.

Kryostat wurden 6 μ m dicke serielle Schnitte auf Glasobjektträger gezogen, über Nacht an der Luft getrocknet, für 10 min in Aceton (Merck, Darmstadt) bei Raumtemperatur (RT) fixiert und erneut für 10 min an der Luft getrocknet. Danach wurden die Schnitte 10 min in PBS gewaschen und nachfolgend 20 min entweder mit 4% bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS (CD31) oder mit 2% normalem Kaninchenserum in PBS (NF- κ B) inkubiert. Die Inkuba-

tion mit dem Erstantikörper erfolgte 45 min bei RT. Zur Detektion von CD31 wurde ein monoklonaler Ratte-anti-Maus-CD31-Antikörper (BD Biosciences, Heidelberg) in einer Konzentration von 2 μ g/ml in 1% BSA/PBS eingesetzt, und der monoklonale Maus-Antikörper gegen die aktivierte NF- κ B-Untereinheit p65 (Chemicon, International, Hofheim/Taunus) wurde in einer Konzentration von 5 μ g/ml in 2% normalem Kaninchenserum/PBS

eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper für 45 min bei RT, entweder mit einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Ratte-Antikörper (Dianova, Hamburg) oder mit HRP-konjugiertem Envision (DAKO, Hamburg). Die Substratentwicklung erfolgte mit dem DAB-Peroxidase-Substratkit (Vector Laboratories über Alexis, Grünberg). Nach abschließendem Waschen mit PBS wurden die Schnitte in einer 50%igen Hämalaunlösung (Merck) gegengefärbt, anschließend in Wasser gebläut und mit Kaisers Glyceringelatine (Merck) eingedeckt. Dasselbe Protokoll wurde für die Negativkontrollen unter Verwendung des jeweiligen Isotypenkontrollantikörpers durchgeführt. Diese Kontrollen zeigten keine spezifische Färbung.

Zur Bestimmung der Blutgefäßdichte wurden vier bis fünf Bereiche jedes Tumors mit der höchsten Blutgefäßdichte zum Auszählen ausgewählt.



Abbildungen 2A und 2B. Die Kombinationstherapie aus IL-1 β -RI-Antikörper und Etoposid erhöht die Anzahl apoptotischer PancTu1-Zellen. Gewebeschnitte aller Tumoren wurden einer TUNEL-Färbung unterzogen. Pro Tumorschnitt wurden fünf Gesichtsfelder bei 250facher Vergrößerung gezählt und die Anzahl der apoptotischen Zellen bestimmt. A) Gezeigt sind die Mittelwerte aller Tumoren einer Behandlungsgruppe sowie die Standardabweichungen. * $p < 0,05$ der beiden mit Etoposid behandelten Gruppen. B) Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Ausschnitt bei 250facher Vergrößerung aus einem Tumor der Kontrollgruppe (-Etoposid/-IL-1 β -RI-Antikörper), der Gruppe mit alleiniger Zytostatikatherapie (+ Etoposid/-IL-1 β -RI-Antikörper), der Gruppe mit IL-1 β -RI-Antikörper-Behandlung (-Etoposid/+ IL-1 β -RI-Antikörper) sowie der Gruppe mit Kombinationstherapie (+ Etoposid/+ IL-1 β -RI-Antikörper). Positive Nuclei sind braun gefärbt.

TUNEL-Färbung

Zur Detektion von apoptotischen Zellen in den Tumoren wurde eine TUNEL-Färbung („TdT-mediated dUTP nick end labeling“) mit dem In situ cell death detection kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Detektion der markierten Nukleotide erfolgte über einen HRP-gekoppelten Antikörper und die Substratreaktion mit dem DAB-Peroxidase-Substratkit (Vector Laboratories). Zur Gegenfärbung wurde Hämalaun verwendet.

Ergebnisse

Die Behandlung mit dem IL-1 β -RI-Antikörper sensitiviert PancTu1-Tumoren gegenüber Etoposid

Da wir PancTu1-Zellen bereits in vitro mit Hilfe eines IL-1 β -RI-Antikörpers gegenüber Zytostatika sensitivieren konnten [11], sollte in vivo untersucht werden, wie sich die Kombinationstherapie aus IL-1 β -RI-Antikörper und Etoposid auf das Wachstum der PancTu1-Tumoren auswirkt. Durch die Behandlung mit dem IL-1 β -RI-Antikörper allein waren die PancTu1-Tumoren um 30% kleiner als die der Kontrollgruppe (976 mm³ vs. 1 406 mm³) und

ORIGINALARBEIT

durch die Behandlung mit Etoposid sogar um 53% kleiner (665 mm^3 vs. $1\,406 \text{ mm}^3$, Abbildung 1). Wurden die Tiere jedoch mit einer Kombination aus beiden Pharmaka behandelt, wurde das Tumorwachstum um 68% reduziert (450 mm^3 vs. $1\,406 \text{ mm}^3$), so dass die Kombinationstherapie zu einer signifikant besseren Ansprechrate der Tumoren führte als eine Monotherapie. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Unterbindung des IL-1 β -Signalweges in einer Sensitivierung der PancTu1-Tumoren gegenüber Etoposid resultiert.

Die Behandlung mit dem IL-1 β -RI-Antikörper und Etoposid erhöht die Anzahl apoptotischer Zellen in den PancTu1-Tumoren

Um zu überprüfen, ob die Kombinationstherapie zu einer erhöhten Apoptoserate führt, wurden Gefrierschnitte der PancTu1-Tumoren einer TUNEL-Färbung unterzogen. Wie in Abbildung 2 zu sehen ist, vermochte die Monotherapie mit Etoposid die Anzahl an apoptotischen Zellen im Tumor bereits

deutlich zu steigern (von 2 Zellen/Gesichtsfeld auf 8 Zellen/Gesichtsfeld). Die Behandlung mit dem IL-1 β -RI-Antikörper und Etoposid führte jedoch zu einer 2,5fachen Erhöhung der apoptotischen Zellen im Vergleich zur Monotherapie mit Etoposid. Die Behandlung mit dem IL-1 β -RI-Antikörper allein hatte jedoch keinen Effekt auf die Apoptoserate der Tumorzellen. Diese Daten zeigen, dass die Kombinationstherapie aus IL-1 β -RI-Antikörper und Etoposid zu einer signifikanten Erhöhung der apoptotischen Tumorzellen führt.

Die Behandlung mit dem IL-1 β -RI-Antikörper reduziert die NF- κ B-Aktivität in den PancTu1-Tumoren

In vitro führte die Behandlung mit dem IL-1 β -RI-Antikörper zu einer reduzierten NF- κ B-Aktivität [11]. Um zu untersuchen, ob die Behandlung mit dem IL-1 β -RI-Antikörper auch eine Verminderung der NF- κ B-Aktivität in den PancTu1-Tumoren induziert, wurde in Tumorgefrierschnitten die ak-

tivierte p65-Untereinheit von NF- κ B mittels eines spezifischen Antikörpers detektiert. Wie in Abbildung 3 gezeigt, konnte in Tumoren nach Behandlung mit dem IL-1 β -RI-Antikörper (mit und ohne Etoposid) signifikant weniger aktiviertes p65 erkannt werden als in PancTu1-Tumoren der Kontrollgruppe oder nach alleiniger Behandlung mit Etoposid. Diese Daten belegen, dass die Unterbindung des IL-1 β -Signalweges zu einer deutlichen Reduktion der NF- κ B-Aktivität führt.

Die Behandlung mit dem IL-1 β -RI-Antikörper reduziert die Vaskularisierung in den PancTu1-Tumoren

Da NF- κ B nicht nur in die Genregulation von pro- und antiapoptotischen Molekülen, sondern auch in die Regulation von proangiogenetischen Mediatoren [12, 13] involviert ist, wurde der Effekt des IL-1 β -RI-Antikörpers auf die Vaskularisierung in den PancTu1-Tumoren untersucht. Die Behandlung mit dem IL-1 β -RI-Antikörper führte allein sowie in Kombination mit Etoposid in den Tumoren zu einer signifikanten Reduktion der Mikrogefäßdichte (5,7 bzw. 5,6 CD31-positive Strukturen/Gesichtsfeld) im Vergleich zu den Tumoren der Kontrollgruppe (10 CD31-positive Strukturen/Gesichtsfeld, Abbildung 4). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Unterbindung des IL-1 β -Signalweges in den Tumoren zu einer deutlichen Reduktion der Mikrogefäße führt.

DISKUSSION

Da die nichtinvasive Behandlung von vielen malignen Erkrankungen wie dem exokrinen Pankreaskarzinom nach wie vor wenig erfolgreich und rein palliativ ist, werden intensive Bemühungen für effektivere und spezifische Therapiestrategien unternommen. Im Besonderen ist die Identifikation von molekularen Zielstrukturen, die für die Resistenz gegenüber Zytostatika verantwortlich sind, von großer Bedeutung. In diesem Zusammenhang konnten wir in diversen humanen Pankreaskarzinomzelllinien die Resistenz gegenüber Zytostatika wie Etoposid und Gemcitabin mit einer erhöhten Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B in Verbindung bringen [10, 14]. Die

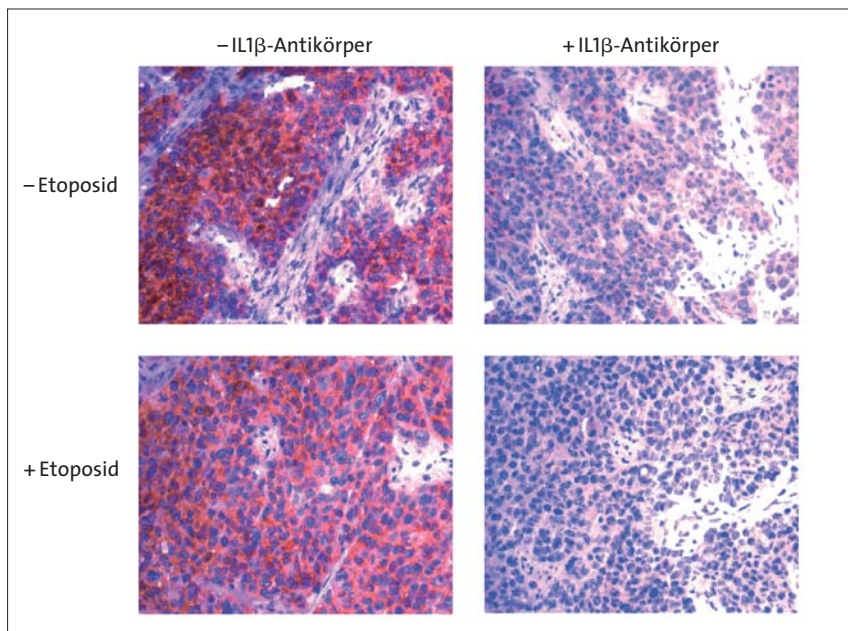
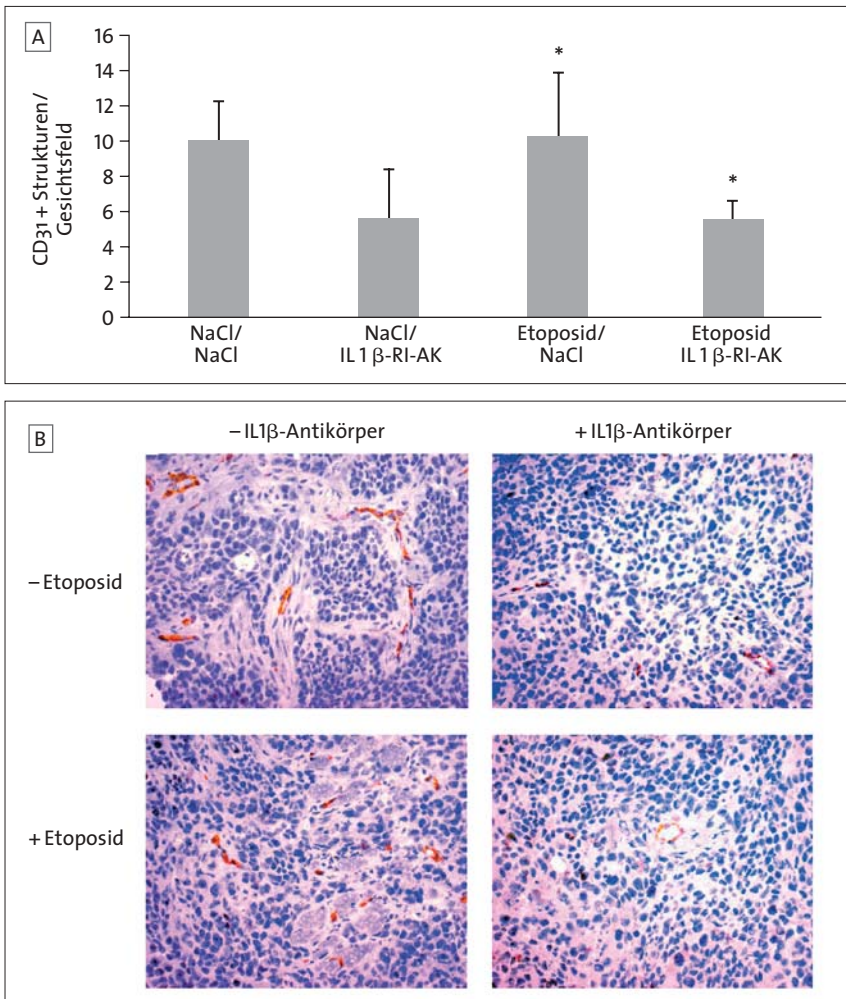


Abbildung 3. Die Behandlung mit dem IL-1 β -RI-Antikörper reduziert die NF- κ B-Aktivität in PancTu1-Tumoren. Gefrierschnitte aller Tumoren wurden einer Färbung mit einem spezifischen Antikörper gegen die aktivierte p65-Untereinheit von NF- κ B unterzogen. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Ausschnitt bei 250facher Vergrößerung aus einem Tumor der Kontrollgruppe (-Etoposid/-IL-1 β -RI-Antikörper), der Gruppe mit alleiniger Zytostatikatherapie (+Etoposid/-IL-1 β -RI-Antikörper), der Gruppe mit IL-1 β -RI-Antikörper-Behandlung (-Etoposid/+IL-1 β -RI-Antikörper) sowie der Gruppe mit Kombinationstherapie (+Etoposid/+IL-1 β -RI-Antikörper).

Inhibition dieser Aktivität mittels des Proteasominhibitors MG132 oder des nichtsteroidalen antiinflammatorischen Pharmakons Sulfasalazin führte zu einer deutlichen Sensitivierung gegenüber Etoposid und Gemcitabin *in vitro* wie auch *in vivo* [10, 15]. Des Weiteren konnten wir in verschiedenen Zelllinien die autokrine Sekretion von IL-1 β , welches zugleich Zielgen, aber auch Induktor von NF- κ B ist, als wichtigen

Faktor in der Aufrechterhaltung des chemoresistenten Phänotyps bestimmen [11]. Die Unterbindung dieses autokrinen Regelkreises mittels eines IL-1 β -RI-Antikörpers führte zu einer reduzierten NF- κ B-Aktivität, zu verminderten Spiegeln an sezerniertem IL-1 β sowie zu einer signifikanten Erhöhung apoptotischer Zellen nach Zytostatikabehandlung und damit zur Aufhebung des chemoresistenten Phänotyps [11].

Um die Relevanz dieses scheinbar wichtigen Regelkreises zu untermauern, sollte in einem SCID-Maus-Modell überprüft werden, ob die Behandlung von PancTu1-Tumoren mit einem IL-1 β -RI-Antikörper zu einer deutlichen Sensitivierung gegenüber dem Zytostatikum Etoposid und damit zu einer verbesserten Ansprechrate der Tumoren führt. Die Studie zeigt, dass diese Kombinationstherapie in einem signifikant reduzierten Wachstum der PancTu1-Tumoren im Vergleich zu Tumoren der Kontrollgruppe bzw. der monotherapierten Tiere resultiert (Abbildung 1). Entsprechend konnte in Tumoren der Kombinationstherapie eine deutlich erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen (Abbildung 2) detektiert werden. Wie in den *In-vitro*-Studien wurde durch die Inhibition des IL-1 β -Signalweges auch die NF- κ B-Aktivität signifikant reduziert (Abbildung 3), was zudem in einer verminderten Aktivierung der Genexpression resultiert. Bekanntermaßen ist NF- κ B in die Regulation von antiapoptotischen Signalmolekülen der Bcl-2- oder cIAP-Familie involviert [16, 17], aber möglicherweise auch in die Regulation von DNA-Reparaturenzymen der Xerodermapigmentosum-Gruppe, worauf erste von uns verzeichnete Ergebnisse hindeuten (unveröffentlichte Daten). Ferner konnten wir in dieser Studie zeigen, dass die Behandlung mit dem IL-1 β -RI-Antikörper eine signifikante Reduzierung der Mikroblutgefäßdichte bewirkt (Abbildung 4), was als Folge der verminderten NF- κ B-Aktivität zu sehen ist, da NF- κ B einen wichtigen Regulator in der Expression von proangiogenetischen Faktoren wie z.B. IL-8 und VEGF („vascular endothelial growth factor“) darstellt [12, 13, 18, 19]. Des Weiteren ist NF- κ B auch in die Regulation von Faktoren involviert, die eine Rolle bei der Metastasierung von Tumorzellen spielen. So konnte in Tumoren, die einer Behandlung mit einem NF- κ B-Inhibitor wie dem IL-1 β -RI-Antikörper unterzogen wurden, die Expression der Matrixmetalloproteinase 9 (MMP9) signifikant reduziert werden (Daten nicht gezeigt). *In vitro* konnten wir in einem Kokulturmodell aus humanen Pankreaskarzinomzellen und murinen Pankreasfibroblasten zeigen, dass auch das Tumorstroma eine bedeutende Rolle bei der Entstehung



Abbildungen 4A und 4B. Die Behandlung mit dem IL-1 β -RI-Antikörper reduziert die Vaskularisierung in den PancTu1-Tumoren. Um die Anzahl an Mikroblutgefäßen zu bestimmen, wurden Gefrierschnitte der PancTu1-Tumoren jeder Gruppe einer Färbung mit einem spezifischen Antikörper gegen CD31 unterzogen. A) Es wurden vier bis fünf Bereiche jedes Tumors mit der höchsten Blutgefäßdichte zum Auszählen ausgewählt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aller Tumoren jeder Behandlungsgruppe. * $p < 0,05$ der beiden mit Etoposid behandelten Gruppen. B) Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Ausschnitt bei 250facher Vergrößerung aus einem Tumor der Kontrollgruppe (-Etoposid/-IL-1 β -RI-Antikörper), der Gruppe mit alleiniger Zytostatikatherapie (+ Etoposid/-IL-1 β -RI-Antikörper), der Gruppe mit IL-1 β -RI-Antikörper-Behandlung (-Etoposid/+ IL-1 β -RI-Antikörper) sowie der Gruppe mit Kombinationstherapie (+ Etoposid/+ IL-1 β -RI-Antikörper). CD31-positive Strukturen sind braun gefärbt.

ORIGINALARBEIT

der autokrinen IL-1 β -Sekretion und damit der NF- κ B-vermittelten Chemoresistenz spielt [20].

Zusammenfassend untermauern diese Daten die Bedeutung der NF- κ B-vermittelten IL-1 β -Sekretion in der Entwicklung von Chemoresistenz in Pankreaskarzinomzellen. Die Inhibition von NF- κ B, z.B. durch Unterbindung des IL-1 β -Signalweges, stellt somit eine vielversprechende Zielstruktur dar, mit der eine Schädigung des Tumors auf mehreren Ebenen erzielt werden kann, einerseits durch Sensitivierung der Tumorzellen gegenüber einer zytostatischen Therapie sowie andererseits durch Verschlechterung der Tumorumgebung.

Danksagung

Wir danken Herrn Holger Kalthoff für die Benutzung der Tierräumlichkeiten der Forschungsgruppe für Molekulare Onkologie, Klinik für Allgemeine und Thoraxchirurgie der Universität Kiel. Ferner danken wir Frau Maik Großmann für ihre exzellente technische Unterstützung. Diese Arbeit wurde von der DFG (DFG-Scha 677/7-1; 677/7-2) sowie vom Interdisziplinären Zentrum für Klinische Krebsforschung Kiel (IZKF Kiel) gefördert.

Literatur

- Brand RE, Tempero MA. Pancreatic cancer. *Curr Opin Oncol* 1998;10:362–6.
- Lillemore KD. Palliative therapy for pancreatic cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 1998;7:199–216.
- Parker SL, Tong T, Bolden S, et al. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1997;47:5–27.
- Bramhal SR, Allum WH, Jones AG, et al. Treatment and survival in 13,560 patients with pancreatic cancer, and incidence of the disease, in the West Midlands: an epidemiological study. *Br J Surg* 1995; 82:111–5.
- Blaszukowsky L. Treatment of advanced and metastatic pancreatic cancer. *Front Biosci* 1998;3:214–25.
- Neoptolemos JP, Dunn JA, Stocken DD, et al. European Study Group for Pancreatic Cancer. Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 2001;358:1576–85.
- Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, et al. The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1999;5:119–27.
- Sovak MA, Bellas RE, Kim DW, et al. Aberrant nuclear factor-kappa B/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest* 1997;100: 2952–60.
- Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, et al. Constitutive nuclear factor-kappa B/RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 1997;100:2961–9.
- Arlt A, Vorndamm J, Breitenbroich M, et al. Inhibition of NF-kappaB sensitizes human pancreatic carcinoma cells to apoptosis induced by etoposide (VP16) or doxorubicin. *Oncogene* 2001;20:859–68.
- Arlt A, Vorndamm J, Müerköster S, et al. Autocrine production of interleukin-1-beta confers constitutive NFkB activity and chemoresistance in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer Res* 2002;62:910–6.
- Takeshita H, Yoshizaki T, Miller WE, et al. Matrix metalloproteinase 9 expression is induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 C-terminal activation regions 1 and 2. *J Virol* 1999; 73:5548–55.
- Vilarete LH, Remick DG. Transcriptional and post-transcriptional regulation of interleukin-8. *Am J Pathol* 1996;149:1685–93.
- Arlt A, Gehrz A, Müerköster S, et al. Role of NF- κ B and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death. *Oncogene* 2003;22:3243–51.
- Müerköster S, Arlt A, Witt M, et al. Usage of the NFkB inhibitor sulfasalazine as sensitizing agent in combined chemotherapy of pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2003;104:469–76.
- Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, et al. NF- κ B anti-apoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998;281:998–1001.
- Wang CY, Guttridge DC, Mayo MW, et al. NF- κ B induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1999;19:2690–8.
- Akiri G, Nahari D, Finkelstein Y, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. *Oncogene* 1998;17:227–36.
- Bancroft CC, Chen Z, Dong G, et al. Coexpression of proangiogenic factors IL-8 and VEGF by human head and neck squamous cell carcinoma involves coactivation by MEK-MAPK and IKK-NF- κ B signal pathways. *Clin Cancer Res* 2001;7:435–42.
- Müerköster S, Wegehenkel K, Arlt A, et al. Tumor-stroma-interactions induce chemoresistance in pancreatic carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of NO and IL1 β . *Cancer Res* 2004;64:1331–7.

Korrespondenzanschrift

Priv.-Doz. Dr. Heiner Schäfer
Labor für Molekulare Gastroenterologie
und Hepatologie
Klinik für Allgemeine Innere Medizin
UKSH – Campus Kiel
Schittenhelmstraße 12
24105 Kiel
Telefon (+49/431) 597-1266
Fax -1427
E-Mail: hschaef@1med.uni-kiel.de