

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern der
Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. K.-W. Jauch

**Anti-angiogenetische Therapie beim humanen Pankreaskarzinom
durch CXCR2-Inhibition im orthotopen Nacktmausmodell**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ulrike Albrecht
aus
Braunschweig

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Christiane J. Bruns

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Georg Enders
Priv. Doz. Dr. H.-J. Stemmler

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 17.04.2008

*Diese Promotion widme ich meinen Eltern,
die mich immer unterstützt haben*

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Pankreaskarzinom	1
1.2 Aktueller Stand der neo-/adjuvanten Therapie beim Pankreaskarzinom	3
1.3 Angiogenese	5
1.4 Anti-angiogenetische Therapie	8
1.5 Anti-angiogenetische Therapie durch CXCR2-Inhibition	8
2 Fragestellung	17
3 Material und Methoden	18
3.1 <i>In vitro</i> Versuche	18
3.1.1 Geräte, Apparaturen, Zubehör	18
3.1.2 Zelllinien und Zellkultur	19
3.1.3 Medikament	21
3.1.4 ELISA: IL-8-Produktion	22
3.1.5 FACS Analyse: CXCR2-Expression	23
3.1.6 Proliferations Assay	24
3.1.7 Spheroid Assay	24
3.2 Tierexperimentelle Studie	26
3.2.1 Versuchstiere	26
3.2.2 Orthotopes Tiermodell	26
3.2.3 Orthotope Injektionstechnik	29
3.2.4 Medikamente	31
3.2.5 Tierexperimentelles Studiendesign	31
3.3 Immunhistochemie	32
3.3.1 Formalin-Fixierung und Paraffin-Einbettung	32
3.3.2 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung	33
3.3.3 Ki67-Färbung	33
3.3.4 CD31-Färbung	34
3.4 Statistische Methoden	36
4 Ergebnisse	37

4.1 <i>In vitro</i> Ergebnisse	37
4.1.1 Ergebnisse IL-8 ELISA.....	37
4.1.2 Ergebnisse FACS Analyse.....	38
4.1.3 Ergebnisse Proliferations Assay	40
4.1.4 Ergebnisse Spheroid Assay.....	41
4.2 Tierexperimentelle Ergebnisse	43
4.2.1 Metastasierung und Tiergewicht	43
4.2.2 Tumorvolumen der Versuchsgruppe mit SB225002 Monotherapie.....	45
4.2.3 Tumorvolumen der Versuchsgruppe mit Gemcitabine Monotherapie ...	45
4.2.4 Tumorvolumen der Versuchsgruppe mit SB225002 und Gemcitabine ..	46
4.3 Immunhistochemische Ergebnisse.....	47
4.3.1 Immunhistochemische Analyse für Ki67	47
4.3.2 Immunhistochemische Analyse für CD31	49
5 Diskussion	50
6 Zusammenfassung	54
7 Literaturverzeichnis.....	56
8 Abkürzungen.....	63
9 Abbildungen.....	66
10 Tabellen	67
11 Danksagung.....	68
12 Lebenslauf	69

1 Einleitung

1.1 Pankreaskarzinom

Das Pankreasadenokarzinom besitzt unter allen Tumoren des Gastrointestinaltraktes die schlechteste Prognose mit einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von weniger als 5%⁹². Die Inzidenz beläuft sich in Deutschland zur Zeit auf etwa 12.000 Neuerkrankungen pro Jahr, 57% davon bei Frauen; aufgrund der hohen Letalität stellt das Pankreaskarzinom inzwischen die vierhäufigste Krebstodesursache dar²⁸. Als Risikofaktoren gelten Nikotinabusus und die familiäre chronische Pankreatitis, diskutiert werden außerdem Diabetes mellitus und Übergewicht^{28;57}. Ein bisher vermuteter Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und dem Pankreaskarzinom konnte nicht belegt werden⁸⁵. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 68, für Frauen bei 75 Jahren.

Ein Grund für die hohe Letalität des Pankreaskarzinoms ist die späte Diagnosestellung. Aufgrund fehlender klinischer Frühsymptome ist die Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei bereits 80% der Patienten über das Pankreas hinaus lokal fortgeschritten oder hat systemisch metastasiert. Die Therapie für diese Patienten besteht in einer Chemotherapie oder einer kombinierten Radiochemotherapie, die mediane Überlebenszeit kann hiermit jedoch nur geringfügig verlängert werden und liegt bei 6 bis 9 Monaten⁵⁹.

Die eigentlich kurative Behandlung des Pankreaskarzinoms besteht in der operativen Entfernung des Tumors, wobei die Resektion nur bei 15-20% der Fälle durchführbar ist und eine R0-Situation davon wiederum nur bei 50% der Patienten erreicht wird. Die Heilungsrate für R0-Resektionen liegt bei 10% und die mediane Überlebenszeit bei 14 Monaten³⁹.

Das Wissen über die Entstehung von Pankreastumoren, der Ursachen und das Verständnis der Tumorbiologie hat sich in den letzten Jahren deutlich verbessert und bietet Angriffspunkte für neue Therapiemöglichkeiten. So konnten an humanen Pankreaskarzinomzelllinien verschiedene biochemische und genetische Alterationen festgestellt werden. In 80% der Fälle wurde eine Aktivierung des K-ras Onkogens und in 60% eine Inaktivierung der Tumorsuppressorgene p16, p53 und DPC4 beobachtet²⁹. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten in humanen Pankreastumorpräparaten eine Überexpression von Rezeptor-Tyrosinkinasen wie

EGFR, c-erbB2, IGF-1 und FGFR nachweisen und es wurde aufgezeigt, dass fast alle Pankreastumorzelllinien weitere Wachstumsfaktoren und dazugehörige Rezeptoren vermehrt exprimieren. Dazu gehören vascular endothelial growth factor (VEGF), keratinocyte growth factor (KGF), Met/Hepatocyte growth factor (Met/HGF) und plateled-derived growth factor (PDGF). Gemeinsam beeinflussen diese Wachstumsfaktoren mit den dazugehörigen Rezeptoren Tumorzellwachstum, -differenzierung und -invasion sowie Metastasierung und Angiogenese und stellen bereits seit Jahren ein Forschungsgebiet für neue Therapiemöglichkeiten dar.

Neben wachstumsfördernden Effekten der Pankreastumorzellen selbst aufgrund von genetischen und biochemischen Alterationen ist die Interaktion mit normalen Wirtzellen unabdinglich für das Wachstum und die Metastasierung des Tumors. Eine besonders bedeutsame Tumor-Wirt-Interaktion stellt die Neovaskularisation des wachsenden Tumors dar²³. Erreichen Tumore eine Größe von 1-2mm³, so ist ein weiteres Wachstum nur möglich, wenn die Raumforderung in der Lage ist, ein eigenes Gefäßnetzwerk aufzubauen⁴⁵. Diese sogenannte Angiogenese hängt ab von der Balance zwischen pro-angiogenetischen und anti-angiogenetischen Faktoren, die sowohl von den Wirtzellen als auch Tumorzellen produziert werden. Neben dem vermehrt sezernierten wichtigen pro-angiogenetischen vascular endothelial growth factor (VEGF), produzieren verschiedene Pankreastumorzellen noch weitere gefäßinduzierende Moleküle, wie z.B. die Chemokine Interleukin-3, -5, -8, growth-related oncogene alpha (GRO-alpha) und basic fibroblast growth factor (bFGF) ^{21;69;82}.

So stellen Angiogenese-Inhibitoren neben konventioneller zytotoxischer und zytostatischer Behandlung eine neue Therapiegruppe im Kampf gegen das Pankreaskarzinom dar. Allerdings bedarf es in dieser Hinsicht noch einiger Forschungsarbeit, um einen solchen Therapieansatz letztendlich in der Klinik etablieren zu können^{18;36}.

Die vorliegende Doktorarbeit ist als Teil der Forschungsarbeit zu betrachten.

1.2 Aktueller Stand der neo-/adjuvanten Therapie beim Pankreaskarzinom

Die komplette chirurgische Tumorentfernung (R0-Resektion) gilt derzeit als einzige kurative Therapieoption, ist jedoch - aufgrund frühzeitiger Metastasierung, Gefäßinfiltration oder disseminiertem Lymphknotenbefall - nur in etwa 10-20% der Fälle möglich. Eine Resektion wird durchgeführt, wenn keine Fernmetastasierung besteht und der Tumor lokal resektabel ist; als gleichwertig anzusehen hinsichtlich onkologischer Radikalität, postoperativer Morbidität und Lebensqualität sind die pyloruserhaltende und die klassische Kausch-Whipple-Operation.

Mit dem Ziel der Reduktion der Lokalrezidivrate nach einer R0-Resektion des Pankreas werden adjuvant die Chemo- und Radiotherapie zur Prognoseverbesserung eingesetzt. In der Chemotherapie stellt Gemcitabine (2',2'-Difluor-2'-Desoxyzytidin) zur Zeit das Mittel der Wahl beim fortgeschrittenen und metastasierten Pankreaskarzinom dar. Gemcitabine ist ein Pyrimidin-Antimetabolit (Pyrimidin-Analogon), das durch Einbau in die DNA und Blockade der Ribonuklease die DNA-Synthese hemmt und damit zytotoxisch wirkt. Es besitzt ein breites Spektrum an Antitumoraktivität und weist in der Pankreastherapie derzeit die höchste Erfolgsquote auf^{1;19}.

5-FU (5-Fluoruracil), ein Fluorpyrimidin-Analogon, ist ein weiteres Chemotherapeutikum, das bis Ende der neunziger Jahre in der Behandlung des Pankreaskarzinoms zum Einsatz kam, jedoch mit unbefriedigenden Ansprechraten¹⁰. Seinen zytotoxischen Effekt vermittelt es über die Inhibition der Thymidylatsynthase¹⁴.

In den letzten Jahren konnte in mehreren Studien aufgezeigt werden, dass der Pyrimidin-Antimetabolit Gemcitabine erhebliche Vorteile gegenüber dem bisherigen Standardchemotherapeutikum 5-FU hat. So erreichte Gemcitabine eine signifikante Verbesserung der Ansprechraten, Lebensqualität und des medianen Überlebens^{13;15;86}. Andere seitdem getestete Monotherapien wie z.B. der Matrix Metalloproteinase-Inhibitor BAY 12-9566⁶³ und Marimastat⁷ oder der Topoisomerase I-Inhibitor Exacetan konnten im Vergleich zu Gemcitabine die mediane Überlebenszeit nicht verlängern.

Zahlreiche Phase-III-Studien haben den Stellenwert Gemcitabine-basierter Kombinationsregime untersucht^{42;49;79}. Zwar konnte im Vergleich zur Gemcitabine

Monotherapie oft eine Verbesserung der objektiven Ansprechraten oder des progressionsfreien Überlebens beobachtet werden, eine signifikante Auswirkung auf die mediane Überlebenszeit hatten die Kombinationstherapien allerdings nicht⁴⁸.

Als adjuvante Radiotherapie-Verfahren werden die perkutane Bestrahlungstechnik und die intraoperative Radiotherapie (ioRT) eingesetzt. In einer vergleichenden Studie bezüglich ioRT versus perkutaner Radiotherapie zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der Überlebenszeit, allerdings wurde eine bessere lokale Tumorkontrolle nach der ioRT beschrieben^{30;43}.

Neben den Monotherapien werden auch kombinierte Radiochemotherapien eingesetzt. Diesbezüglich konnte in einer randomisierten Studie eine verlängerte mediane Überlebenszeit nach einer Radiotherapie (40 Gray)+ 5-FU im Vergleich zu einer nur kurativ resezierten Patientengruppe festgestellt werden³¹. Seit einiger Zeit gibt es nun auch Studien, die den Effekt von Radiotherapie in Kombination mit anti-angiogenetischen Substanzen überprüfen⁶⁶.

Mehrere neue Medikamente aus der Gruppe der „targeted therapies“ befinden sich derzeit beim Pankreaskarzinom in der klinischen Prüfung und werden in Phase-II- und -III-Studien beurteilt⁴⁸. Diese neue Therapiekasse richtet sich spezifisch gegen molekulare Strukturen, die an der Ausbreitung und Metastasierung des Pankreaskarzinoms beteiligt sind. Aufgrund einer randomisierten Phase-III-Studie wurde der orale EGFR (epidermal growth factor receptor) Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib Ende 2005 in den USA bereits zur Therapie des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms (in Kombination mit Gemcitabine) zugelassen.

Neben Substanzen, die in den EGF-Signalweg eingreifen, lassen vor allem die Studien der Inhibitoren des vascular endothelial growth factor (VEGF) vielversprechende Resultate erwarten⁵⁰.

Substanz	Wirkungsmechanismus
Phase I	
PTK787/ZK2284	Blockade der VEGF-Rezeptor-Signalkaskade
Matuzumab	Monoklonaler EGFR1-Antikörper
Erlotinib	EGFR Kinase-Inhibitor
Vatalanib	VEGFR Kinase-Inhibitor
SU6668	Blockade der VEGF-, FGF-, PDGF-Rezeptor-Signalkaskade
Phase II	
Imatinib	PDGFR Kinase-Inhibitor
Cetuximab	Monoklonaler EGFR1-Antikörper
Erlotinib	EGFR Kinase-Inhibitor
Phase III	
SU5416	Blockade der VEGF-Rezeptor-Signalkaskade
Thalidomide	Unbekannt
AG3340	Synthetischer MMP-Inhibitor
Interferon alpha	Inhibition der bFGF- und VEGF-Produktion
IM862	Unbekannt
Marimastat	Synthetischer MMP-Inhibitor

Tab. 1.1 Anti-angiogenetische Substanzen in klinischen Phase-I, -II, -III-Studien

Neben der Erprobung alternativer Dosierungsschemata von Gemcitabine oder weiterer Kombinationstherapien von Gemcitabine mit anderen chemotherapeutischen Medikamenten ist es von hoher Priorität, neue Therapieansätze auf der Basis eines besseren Verständnisses der molekularbiologischen Hintergründe dieser Tumorerkrankung zu entwickeln.

1.3 Angiogenese

Physiologische Gefäßneubildung während der Embryogenese kann auf zwei verschiedenen Wegen ablaufen: Zum einen durch die Vaskulogenese, bei der Endothelzellen aus nicht differenzierten Zellen, den Hämangioblasten, entstehen und zum anderen durch Angiogenese, bei der es zur Neubildung von Gefäßkapillaren aus bereits bestehenden Blutgefäßen kommt^{22;24;33}.

Um die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff zu gewährleisten, ist der menschliche Körper mit einem System von Blutgefäßen, den Kapillaren durchzogen.

Da sich die auskleidenden Zellen, die Endothelzellen, unter physiologischen Umständen beim Erwachsenen kaum noch teilen, verändert sich dieses Gefäßnetz nur sehr wenig. Ausnahmen sind die Neubildung von Kapillaren im Rahmen der Wundheilung, einer Schwangerschaft und der Embryonalentwicklung. Diese Aussprossung von neuen Gefäßen wird als Angiogenese bezeichnet. Bei einigen Krankheitszuständen tritt eine pathologisch gesteigerte Gefäßneubildung auf. Dazu gehören die Psoriasis, rheumatoide Arthritis, diabetische Retinopathie und Hämangiome ³⁸. Die dafür notwendige Teilung der Endothelzellen wird über ein komplexes System aus stimulierenden und inhibitorischen Faktoren reguliert.

Neben diesen nicht neoplastischen Prozessen spielt der Vorgang der Angiogenese eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung, da erst mit Anschluss an das Gefäßsystem die Versorgung mit Nährstoffen und die Möglichkeit zur Ausbreitung gewährleistet sind ²². Überschreitet ein Tumor eine Größe von 1-2mm³, kann er nicht mehr durch Diffusion allein versorgt werden und die Tumorzellen beginnen, Signalstoffe in Form von Wachstumsfaktoren auszuschütten. Diese Botenstoffe diffundieren zu den benachbarten Endothelzellen und veranlassen dort eine Veränderung des Zytoskeletts und Auflösung der Basalmembran. Angelockte T-Lymphozyten, Mastzellen und Makrophagen setzen weitere pro-angiogene Mediatoren frei ³⁸ und stimulieren damit die Endothelzellen, sich zu teilen und in Richtung des Tumors zu wandern. Die neu entstandenen Tumorkapillaren enthalten mehr Endothelzellen als physiologische Kapillaren ²⁶; sie können nach Ummantelung durch Perizyten in größere Gefäße umgewandelt werden und erhalten dann Anschluss an das bestehende Gefäßnetz ⁵³.

Mit dem Anschluss an das Gefäßsystem geht der Tumor von einem avaskulären in ein vaskuläres Stadium über, wodurch dem Tumor neben einer Größenzunahme auch die Möglichkeit zur hämatogenen Metastasierung eröffnet wird ⁴⁰. Damit es zu dieser Gefäßneubildung im Tumor kommt, müssen von den Zellen sowohl pro-angiogenetische Faktoren sezerniert als auch anti-angiogenetische Faktoren unterdrückt werden. Es kommt laut Folkman zum sogenannten „angiogenetic switch“ ³³; der auslösende Reiz für diesen Prozess ist hauptsächlich Hypoxie und Hypoglykämie des Gewebes ^{34;35}.

Aktivatoren	Funktion
VEGF Familie	Stimulieren Angiogenese und Permeabilität
VEGFR, NRP-1	Vermitteln Angiogenese- und Überlebens-Signale
Ang1, Tie2	Stabilisieren Gefäße, inhibieren Permeabilität
PDGF-BB und Rezeptoren	Rekrutieren smooth muscle cells
TGFbeta und Rezeptoren	Stimulieren extrazelluläre Matrixproduktion
FGF, HGF	Stimulieren Angiogenese
Integrine	Rezeptoren für Matrixmoleküle und Proteininasen
Plasminogenaktivatoren, MMPs	Freisetzung und Aktivierung von Wachstumsfaktoren
Interleukine-1,-6,-8,-15	Stimulieren Endothelzellproliferation und Angiogenese
Inhibitoren	Funktion
VEGFR-1, löslicher VEGFR-1	Senken VEGF- und VEGF-B-Spiegel
Ang2	Antagonist von Ang1
TSP1,2	Inhibieren Endothelzellmigration,-wachstum,-überleben
Angiostatin	Inhibieren Tumorangiogenese
Endostatin	Inhibieren Endothelzellmigration und –überleben
Platelet factor 4	Inhibiert die Bindung von bFGF und VEGF
Prolaktin	Inhibiert bFGF und VEGF
Interferone, Interleukine-4,-10,-12	Inhibieren Endothelzellmigration, senken bFGF Spiegel

Tab. 1.2 Aktivatoren und Inhibitoren der Angiogenese und ihre Funktionen

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden eine große Anzahl sowohl pro- als auch anti-angiogener Faktoren entdeckt. Zu den Angiogenese-Stimulatoren gehören Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren (z.B. VEGF, FGF, PDGF und TGFbeta)²⁰, welche spezifisch auf Endothelzellen wirken, aber auch Enzyme wie Angiopoetine und Proteasen zum Abbau der extrazellulären Matrix. Interleukine (IL- 1, -6, -8, -15), TNF-alpha (tumor necrosis factor-alpha) sowie den Zell-Zell und Zell-Matrix-Kontakt vermittelnde Adhäsionsmoleküle wie beispielsweise Integrin alphaV-beta3 stellen ebenfalls pro-angiogene Proteine dar⁸⁰. Zu den aktivierenden genetischen Faktoren gehören Proto-Onkogene wie Src und Ras.

Anti-angiogene Eigenschaften besitzen dagegen Angiostatin oder Endostatin, TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases), Interferon-alpha und die Interleukine-4, -10 und -12^{25;67;87}. Inhibitorische Gene sind zum Beispiel p53 und das von Hippel-Lindau-Gen.

1.4 Anti-angiogenetische Therapie

Die medikamentöse Unterdrückung der tumorbedingten Gefäßneubildung anstelle der direkten Zerstörung der Tumorzellen gewinnt zunehmend an Bedeutung als ein neuer Behandlungsansatz, um lokales Tumorwachstum und Metastasierung zu kontrollieren. Ein Vorteil dieses Therapieansatzes ist, dass eine Angiogenese in gesundem Gewebe normalerweise nicht vorkommt - ausgenommen bei der Wundheilung und wenigen Erkrankungen wie z.B. Psoriasis und rheumatoide Arthritis - und daher anti-angiogenetische Medikamente normale Gefäße nicht schädigen²³.

Zur Hemmung der Gefäßneubildung sind unterschiedliche Strategien denkbar:

- Einsatz natürlich vorkommender Inhibitoren der Angiogenese wie beispielsweise Angiostatin, Endostatin, Interferonen, Interleukinen-1 und -12
- Blockade angiogenesestimulierender Faktoren
- Inaktivierung proliferierender Endothelzellen
- Inhibition der Synthese und des Umbaus der Gefäßmembran und des Abbaus der extrazellulären Matrix (Metalloproteininasen)

1.5 Anti-angiogenetische Therapie durch CXCR2-Inhibition

Chemokine (chemotaktische Zytokine) sind eine Gruppe von Zytokinen, die ursprünglich im Zusammenhang mit Leukozytenadhäsion und -aktivierung entdeckt wurden^{3;60}. Neuere Studien belegen, dass sie auch eine große Rolle spielen im Hinblick auf z.B. Wundheilung, Steuerung von Immunantworten, Migration von Zellen, Entwicklung von lymphoiden Organen, Angiogenese wie auch Angiostase, aber auch Metastasierung maligner Erkrankungen^{68;84}. Ihre Effekte vermitteln die Chemokine durch die Interaktion mit Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen. Diese sogenannten Chemokinrezeptoren kommen auf vielen Zellen des Körpers vor, besonders auf Immunzellen wie T- oder B-Lymphozyten, dendritischen Zellen, Makrophagen, Monozyten aber auch gewebsständigen Zellen wie Endothelzellen oder Astrozyten. Bestimmte Chemokine können auf mehrere Rezeptoren wirken und durch diese auch unterschiedliche Reaktionen hervorrufen.

Basierend auf der bindenden Klasse der Chemokine werden die Chemokinrezeptoren unterteilt in z.B. CC- oder CXC-Rezeptoren. Für die CXC-

Chemokine sind die Rezeptoren CXCR1-5 verantwortlich, die alle zur Rhodopsin Superfamilie G-Protein gekoppelter Rezeptoren gehören. Charakteristisch für diese Rezeptorfamilie sind sieben transmembrane Domänen und die Kopplung der Signaltransduktion an G-Proteine⁸⁹. Die Tatsache, dass alle kernhaltigen Zellen im Körper (u.a. Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und Tumorzellen) Chemokine produzieren können, erklärt, dass diese Botenstoffe an einer Vielzahl von Prozessen und an der Tumorentwicklung beteiligt sind. Sobald die Liganden an die Rezeptoren binden, können verschiedene intrazelluläre Signalwege aktiviert werden.

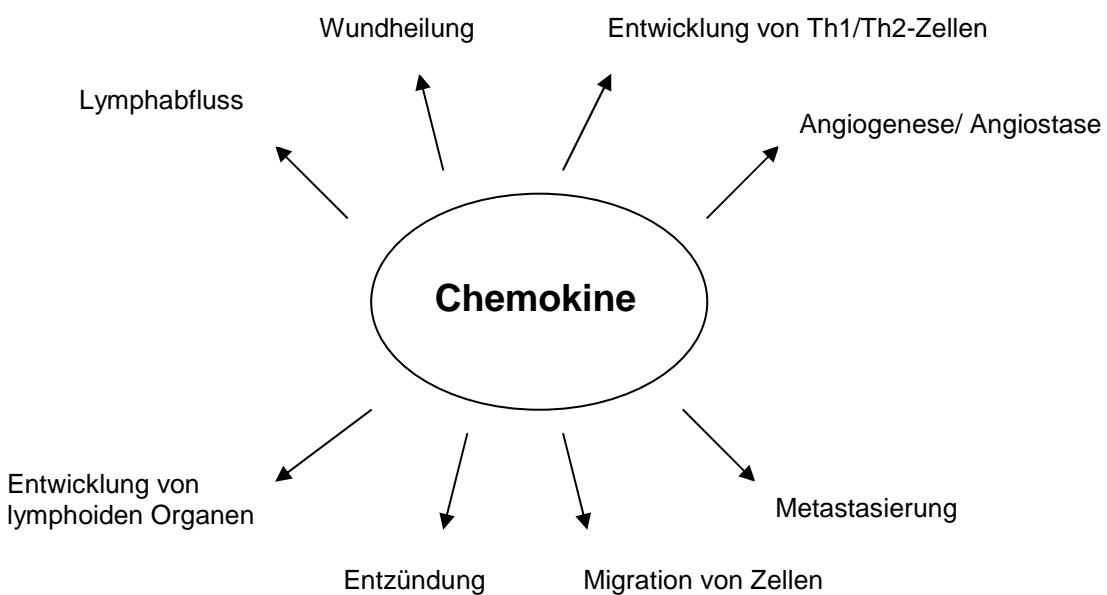


Abb. 1.1 Biologische Funktionen der Chemokine und Chemorezeptoren

Die für diese Studie relevante CXC- oder alpha-Chemokinklasse umfasst chemotaktische Proteine mit einem Molekulargewicht von 8-10kDa, die spezifische Cysteinmotive in ihrer Aminosäuresequenz präsentieren. Die CXC-Chemokine sind aus vier charakteristischen Cysteinbausteinen aufgebaut und haben zwischen den ersten beiden Cysteinbausteinen eine Aminosäure.

Die CXC-Chemokine werden in zwei große Gruppen unterteilt, in ELR⁺ und ELR⁻ Chemokine, abhängig davon, ob ein ELR (Glu-Leu-Arg)-Motiv zwischen dem N-Terminus und dem ersten konservierten Cystein vorhanden ist oder nicht. ELR⁺ Chemokine binden an die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 und wirken angiogen auf

Endothelzellen, während die angiostatischen ELR⁻ Chemokine an CXCR3, CXCR4 und CXCR5 binden^{70;81}.

Chemokinrezeptoren	Chemokinliganden
CC Chemokinrezeptoren	CC Chemokine
CCR1	MIP1alpha, RANTES, MCP3, HCC1, MPIFI1, MIP5
CCR2	MCP1, MCP2, MCP3, MCP4, MCP5
CCR3	Eotaxin, MCP2, MCP3, MCP4, RANTES, Eotaxin2, MIP5
CCR4	TARC, MDC
CCR5	MIP1alpha, MIP1beta, RANTES
CCR6	MIP3alpha
CCR7	MIP3beta, SLC
CCR8	I-309, TARC, MIP1beta
CCR9	TECK
CXC Chemokinrezeptoren	CXC Chemokine
CXCR1	IL-8, GCP-2
CXCR2	IL-8, GCP-2, GRO-alpha,-beta,-gamma, ENA78, PGP
CXCR3	IP10, MIG
CXCR4	SDF1
CXCR5	BLC
C Chemokinrezeptoren	C Chemokine
XCR1	Lymphotactin
CX₃C Chemokinrezeptoren	CX₃C Chemokine
CX ₃ CR1	Fractalkine

Tab. 1.3 Chemokinrezeptoren und ihre Liganden⁷²

Zu den pro-angiogenen Chemokinen zählen Interleukin-8, ENA78 (epithelial neutrophil activating protein 78), GRO-alpha, -beta und -gamma (growth-related oncogenes), GCP-2 (granulocyte chemotactic protein-2) und PBP (platelet basic protein).

Wichtige angiostatische Chemokine sind PF4 (platelet factor 4), MIG (monokine-induced by interferon-gamma), IP-10 (interferon-inducible protein 10) und SDF-1 (stromal cell-derived factor-1).

Chemokine	Angiogenetische Antwort im CMP Assay
IL-8	++++
ENA78	++++
GRO-alpha	++++
GRO-gamma	++++
GCP-2	++++
PF4	-
IP-10	-
MIG	-
SDF-1	-
IL-8+IP-10	-
IL-8+MIG	-
ENA78+IP-10	-
ENA78+MIG	-

Tab. 1.4 ELR⁺ und ELR⁻ CXC-Chemokine und ihre angiogenetische Antwort im CMP Assay (cornealmicropocket model of angiogenesis) allein und in Kombination⁶²

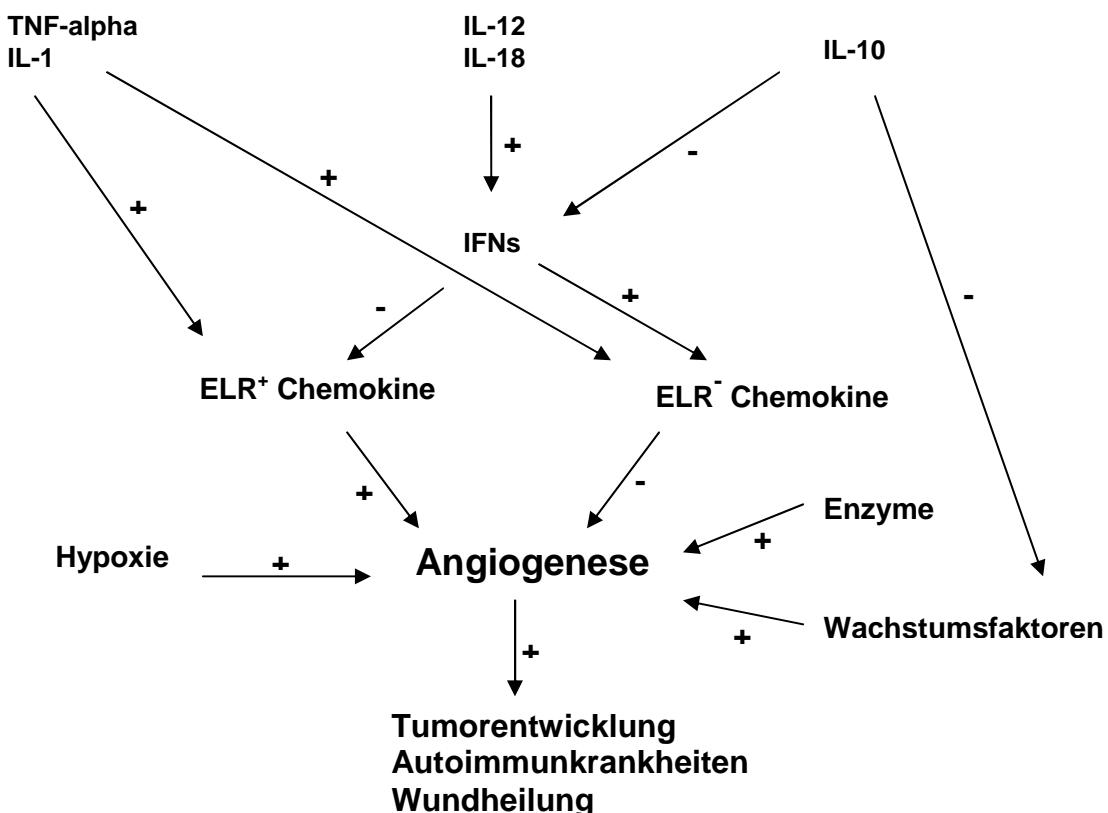


Abb. 1.2 Biologische Prozesse und Moleküle in der Regulation der Angiogenese

Das angiogene Chemokin CXCL-8 (IL-8) ist ein Zytokin mit einem niedrigen Molekulargewicht (ca. 8kDa). In seiner Aminosäuresequenz weist es vier konservierte Cysteinreste auf; zwei davon liegen in der Nähe des N-Terminus und sind durch eine Aminosäure voneinander getrennt. Zur Stabilisierung des Moleküls dienen Disulfidbrücken, die sich zwischen dem ersten und dritten sowie zwischen dem zweiten und vierten Cysteinrest bilden. Die Tertiärstruktur besteht aus einer NH₂-Domäne, auf die drei antiparallel angeordnete Beta-Stränge und eine Alpha-Helix folgen ^{5;17}. Das ELR-Motiv, eine Sequenz der Aminosäuren Glutamin-Leucin-Arginin, befindet sich direkt vor der N-terminalen CXC-Sequenz und dient der Bindung des Chemokins an den Rezeptor. Das für IL-8 kodierende Gen liegt auf Chromosom 4.

Interleukin-8 wird von den meisten Zellen des Körpers synthetisiert, insbesondere von Leukozyten, Endothelzellen und Fibroblasten nach Stimulation mit Endotoxin, CXCL-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor TNF-alpha. Entdeckt wurde es ursprünglich als ein auf Neutrophile chemotaktisch wirkendes Protein im Rahmen von Entzündungsvorgängen ³, bis 1992 seine pro-angiogene Eigenschaft festgestellt wurde ⁵¹. Rekombinant hergestelltes humanes IL-8 wurde hierfür in eine Rattenkornea implantiert und induzierte die Proliferation und Chemotaxis von HUVEC Zellen.

IL-8 konnte seitdem als angiogener Faktor für verschiedenste Tumorerkrankungen ausgemacht werden und gilt außerdem als verantwortlich für die Metastasierung ^{58;76;77}. Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte IL-8-Konzentrationen mit Angiogenese, Tumorwachstum und geringerer Überlebensrate einhergehen und CXCL-8 mitogen auf unterschiedliche Tumore wirkt wie z.B. Melanome ⁷⁴, Kolonkarzinome ⁹ und auch Pankreaskarzinome ⁶¹.

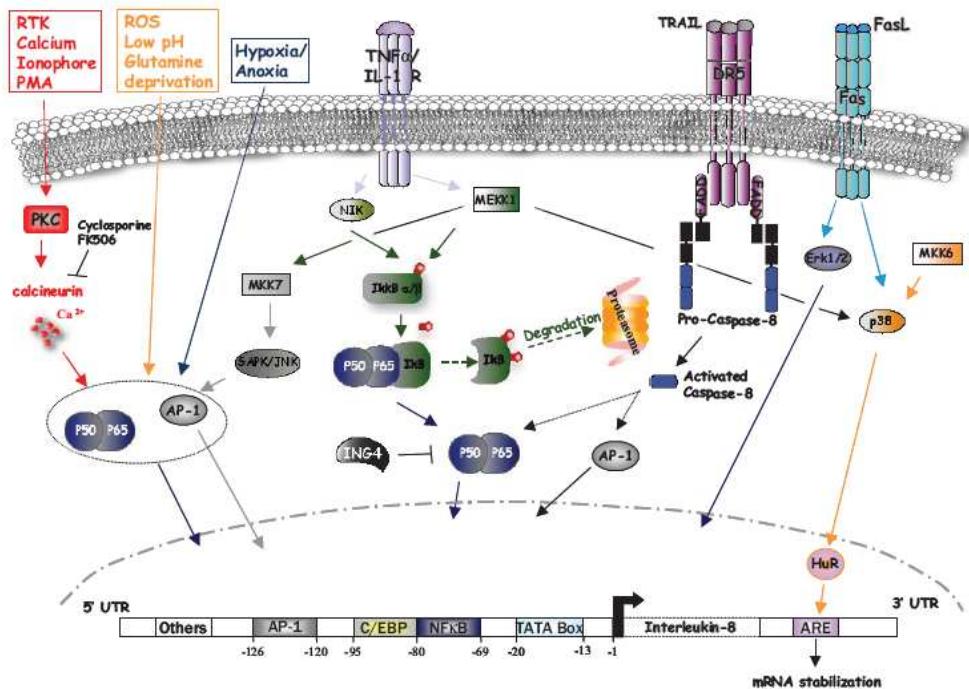


Abb. 1.3 Regulation der IL-8-Expression in Tumorzellen

Die IL-8-Expression ist in normalem Gewebe niedrig und kann durch verschiedene Stimuli induziert werden wie z.B. IL-1, TNF-alpha, Hypoxie, Fas/DR5-Rezeptoren und unterschiedlichsten zellulären Stress⁸.

Die Rezeptoren für IL-8, CXCR1 und CXCR2, werden sowohl auf normalen, u.a. Endothelzellen⁶⁴, als auch auf verschiedenen Tumorzellen exprimiert und binden IL-8 mit höchster Affinität^{16;56;93}. Der Chemokinrezeptor CXCR2 bindet alle bekannten angiogenen ELR⁺ CXC-Chemokine (IL-8, GRO-alpha etc.), CXCR1 hingegen bindet nur spezifisch IL-8 und GCP-2⁹¹. Beide Rezeptoren gehören zur Rhodopsin Superfamilie G-Protein gekoppelter Rezeptoren und stimmen in 78% der Aminosäuresequenz überein. In verschiedenen Studien konnte darüber hinaus festgestellt werden, dass insbesondere CXCR2 - und nicht CXCR1 - verantwortlich ist für die durch IL-8 induzierte Angiogenese in Endothelzellen^{2;37}.

Eigenschaft	CXCR1	CXCR2
Zellexpression	Neutrophile Monozyten/Makrophagen Basophile T-Lymphozyten Endothelzellen	Neutrophile Monozyten/Makrophagen Basophile T-Lymphozyten Endothelzellen ZNS Neurone
Biologische Funktion	Neutrophilen- Rekrutierung Angiogenese	Neutrophilen- Rekrutierung Makrophagen- Akkumulation Angiogenese
Liganden	IL-8, GCP-2	IL-8, ENA78, GROalpha,beta,gamma, NAP-2, GCP-2
Signalmerkmale	Gekoppelt an Gi, Galpha, Rho/Rho Kinase, Phospholipase D	Gekoppelt an Gi, Galpha, ERK 1/2, PI-3-K, Rac/PAK

Tab. 1.5 Eigenschaften der Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2 im Vergleich

Um die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor zu verdeutlichen, werden im Folgenden der strukturelle Aufbau des CXCR2 und die intrazelluläre Signalkaskade beschrieben. Der CXCR2-Rezeptor besteht aus sieben hydrophoben, transmembranösen Domänen, jeweils drei extra- und intrazellulären Loops, einem N-Terminus an der Zelloberfläche sowie einem C-Terminus innerhalb des zytoplasmatischen Kompartiments⁶⁵.

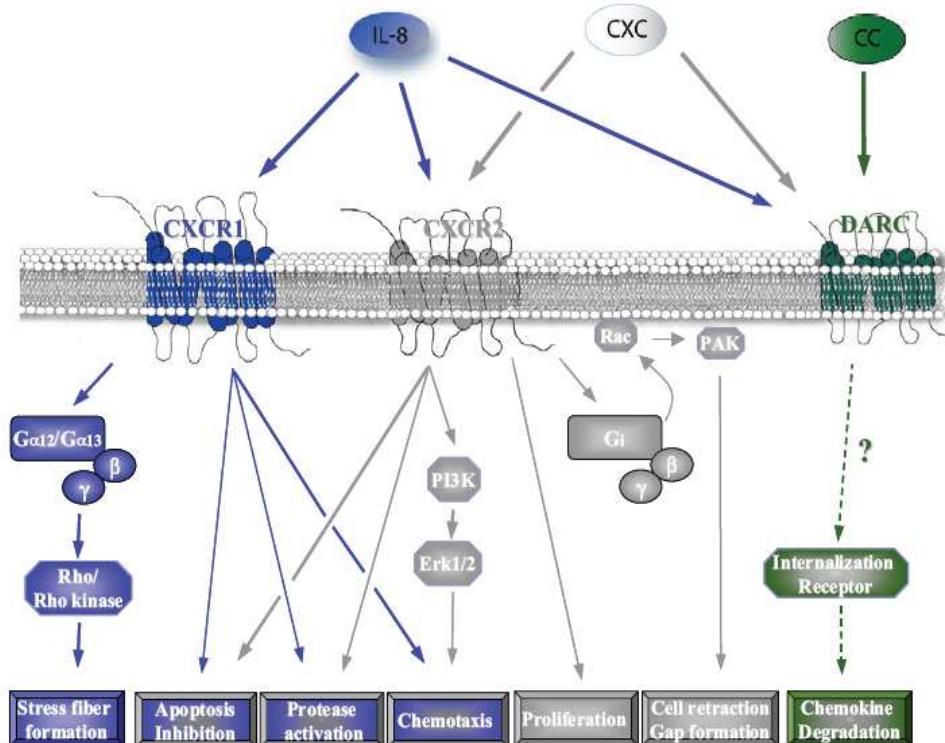


Abb. 1.4 Signalkaskaden und Funktionen der Chemokinrezeptoren CXCR1, CXCR2 und DARC

Bindet IL-8 an seinen Rezeptor, sprich CXCR2, so werden durch das sogenannte G-Protein intrazelluläre Signalübertragungsprozesse ausgelöst⁷⁵. Der Ligand (IL-8) heftet sich zunächst an die Bindungstasche des Sieben-Helix-Rezeptors an, welcher daraufhin eine Konformationsänderung durchläuft und das intrazellulär gelegene G-Protein aktiviert. Hierbei kommt es zu einem Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP), was wiederum eine Spaltung des G-Proteins in seine Untereinheiten Galpha-GTP und Gbeta/gamma-GTP nach sich zieht.

Die alpha-Untereinheit bindet nun die membranständige Adenylatcyclase und bewirkt somit die Bildung von zyklischem AMP (cAMP) aus ATP. Zirkulierendes cAMP aktiviert daraufhin die Proteinkinase A (PKA), die wiederum in der Lage ist, Transkriptionsfaktoren zu stimulieren.

Die beta/gamma-Untereinheiten induzieren die Hydrolyse von Phosphatidylinositolphosphat (PIP_2), wobei Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) entstehen. IP_3 bewirkt die Öffnung von Calciumkanälen, wodurch Calcium-Ionen aus intrazellulären Speichern freigesetzt werden und eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration erreicht wird. DAG hingegen

aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die zum einen durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kappaB und zum anderen über die ERK- (extracellular signal regulate) und die Jun-Kinase Einfluss auf die Transkription und Translation nehmen kann. Beide Schritte (IP₃- und DAG-Prozess) haben zur Folge, dass intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt werden und schließlich zu spezifischen Reaktionen der Zelle wie Migration und Enzymfreisetzung führen^{6;78}.

Die Rolle der Chemokine und ihrer Rezeptoren speziell in der Physiologie des Pankreas wurde in den letzten Jahren zunehmend untersucht. Es zeigte sich, dass normales humanes Pankreasgewebe diese Proteine nicht exprimiert, im Gegensatz dazu allerdings chronisch entzündetes Pankreasgewebe die angiogenen Chemokine IL-8, ENA78 und MIG/CXCL-9 produziert⁷³. In Bezug auf das Pankreaskarzinom wurden bisher verschiedenste Pankreaskarzinomzelllinien auf die Expression des IL-8 und seiner Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 untersucht. Die humane Pankreaskarzinomzelllinie Capan-1 z.B. produziert die Chemokine IL-8 und GRO-alpha und exprimiert den Chemokinrezeptor CXCR2; der durch IL-8 beobachtete autokrine Wachstumseffekt konnte durch Anti-IL-8- oder Anti-GRO-alpha-monoklonale Antikörper inhibiert werden⁸². Eine weitere Studie wies die IL-8- und CXCR1/2-Expression in drei anderen humanen Pankreaskarzinomzelllinien nach (PANC-1, MIAPaCa-2 und Capan-2) und die Behandlung mit rekombinantem IL-8 erhöhte die Invasivität der Pankreaskarzinomzellen⁵⁴.

Aufgrund der Tatsache, dass humane Pankreaskarzinomzelllinien den angiogenen Faktor IL-8 produzieren und die humanen Endothelzellen den für die Vermittlung des angiogenetischen Potentials benötigten Rezeptor CXCR2 besitzen, bietet die Blockade des Rezeptors einen Ansatz in der anti-angiogenetischen Therapie des Pankreaskarzinoms. Aktuelle Ergebnisse aus Daten von anderen Forschungsgruppen zeigen, dass in einem Rattenkornea-Modell die durch die Chemokin-exprimierende humane Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3 induzierte Angioneogenese mittels eines Anti-CXCR2-Antikörpers gehemmt werden konnte⁸⁸.

2 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung des selektiven CXCR2-Antagonisten SB225002 hinsichtlich seiner anti-angiogenetischen Wirkung in verschiedenen *in vitro* Experimenten und in einem etablierten orthotopen Pankreaskarzinom-Nacktmausmodell (Zelllinie L3.6pl) untersucht. Ergänzend wird die Effektivität von SB225002 in Kombination mit dem Pyrimidin-Antimetaboliten Gemcitabine, einem Standardchemotherapeutikum, evaluiert.

Um die potentielle Antitumoraktivität von SB225002 allein und in Kombination mit Gemcitabine zu analysieren, werden das Primärtumorgewicht gemessen und die Inzidenz von Metastasen festgehalten. Zusätzlich werden Begleiteffekte der Therapie wie Körpergewichtsveränderungen und Therapie-assoziierte Letalität erfasst.

Zur Klärung des Wirkmechanismus von SB225002 auf die Pankreaskarzinomzellen im Tiermodell wird an exzidierten Tumoren immunhistochemisch die Zellproliferation (Ki67) als Parameter für das Wachstumsverhalten sowie die Mikrogefäßdichte (CD31) als Parameter der Angiogenese untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 *In vitro* Versuche

3.1.1 Geräte, Apparaturen, Zubehör

- AxioCam Mikroskop (Carl Zeiss, Göttingen)
- BSA (Sigma, München)
- ELISA Photometer "Spectra Fluor" (Tecan, Schweiz)
- Entwässerungsmaschine (MDS Group, Buseck)
- Ethanol (70%, 96%, 100%) (Merck, Darmstadt)
- FACS Calibur Gerät (BD Biosciences, Belgien)
- 5ml FACS Röhrchen (BD Biosciences, Belgien)
- 96 well Falcon (BD, Belgien)
- 50ml Falcon Blue Max Röhrchen (BD Biosciences, Belgien)
- Inkubator (Heraeus, Rodenbach)
- 4°C Kühlenschrank (Siemens, München)
- -20°C Kühlenschrank (Siemens, München)
- Lamina flow (Heraeus, Hanau)
- Mikrotom (Leica Microsystems, Bensheim)
- Mikrowelle (Elektrolux, Nürnberg)
- 24 well Nunclon Surface (Nunc, Dänemark)
- 96 well Nunclon Surface (Nunc, Dänemark)
- Paraffin Einbettmaschine „Tissue Tek“ (Sakura Finetek, Niederlande)
- PBS (Dulbecco's, Life Technologies, Karlsruhe)
- pH-Meter (WTW, Weilheim)
- Pipetten (10,20,100,200,1000µl) (Eppendorf, Weseling)
- Spitzen Positive Replacement Pipette (Gilson, WI, USA)
- TBS (Sigma, München)
- -80°C Tiefkühlschrank (Heraeus, Hanau)
- Vakuumpumpe (Bio-RAD, CA, USA)
- Vortexer "MS2 Minishaker" (IKA Works, NC, USA)

- Waage (Kern+Sohn, Balingen)
- Wärmeblock (Biometria, Göttingen)
- 60°C Wärmeschrank (Memmert, Schwabach)
- Wasserbad (GFL, Burgwedel)
- WST Assay Photometer (Molecular Devices, CA, USA)
- Xylol (Merck, Darmstadt)
- Zählkammer (Neubauer, Marienfeld)
- Zellkulturflaschen 25, 75, 175cm³ (Nunc, Dänemark)
- Zentrifugen „Centrifuge 5417R“ (Eppendorf, Wesseling)
„Hettich Rotixa/RP“ (Hettich, Tuttlingen)
- 15ml Zentrifugenröhrchen (TPP, Schweiz)

3.1.2 Zelllinien und Zellkultur

Für die Durchführung der *in vitro* Versuche wurden verschiedene Zelllinien verwendet. Zur Kultivierung der Zellen wurde für jede Zelllinie ein eigenes Medium benutzt und mit Zusätzen angereichert.

In Zellkulturflaschen der Größe 75cm³ wurden 30ml der Nährlösung mit den jeweiligen Zellen aufgenommen. Diese wurden dann für ein optimales Zellwachstum in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zellen, die eine Konfluenz von 80-100% erreicht hatten, wurden vereinzelt. Das Wachstumsmedium wurde abgesaugt und der Zellrasen mit 10ml Pufferlösung (PBS) eine Minute gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA (Gibco, Karlsruhe) für fünf bis zehn Minuten überschichtet. Die Serin-Protease Trypsin spaltet Proteine an Serinresten und löst somit die Anheftung der Zellen an den Kulturflaschen und die Zell-Zell-Verbindungen. Die abgelösten Zellen wurden mit Wachstumsmedium vermischt, um die Enzymreaktion zu stoppen. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 800rpm fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, und die Zellen in 6ml Wachstumsmedium resuspendiert. Je nach Wachstumsverhalten wurden die verschiedenen Zelllinien im Verhältnis 1:2 bis 1:10 auf neue Flaschen mit vorgelegtem Medium verteilt.

FG und L3.6pl Zellen

COLO 357 ist eine humane, duktale Pankreasadenokarzinomzelllinie, die aus einer Lymphknotenmetastase eines lokal fortgeschrittenen Pankreaskopfkarzinoms isoliert wurde (Morgan et al., 1980). Daraus wurde von der Arbeitsgruppe Vezeridis *in vitro* eine schnell wachsende („fast growing“ FG) und eine langsam wachsende („slow growing“ SG) Pankreastumorzelllinie basierend auf COLO 357 generiert (Vezeridis et al., 1992). Nach Injektion der FG Zellen in die Milz von Nacktmäusen wurde aus den gebildeten Lebermetastasen die Zelllinie L3.3 isoliert, aus der dann die Arbeitsgruppe Bruns nach mehrfacher Injektion in den Pankreas und wiederum Isolation der Zellen aus entstandenen spontanen Lebermetastasen die hoch metastasierende Zelllinie L3.6pl entwickelte (Bruns et al., 1999). Im Vergleich zur Parenteralzelllinie FG ist bei diesen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Expression der pro-angiogenetischen Faktoren VEGF (vascular endothelial growth factor) und Interleukin-8 erhöht.

Medium: D-MEM (Gibco, Karlsruhe)

Mediumzusätze: 10% Fetal Bovine Serum (Biochrom, Berlin)
2% L-Glutamine (PAN Biotech, Aidenbach)
2% Vitamine (Gibco, Karlsruhe)
2% Nicht-essentielle Aminosäuren (PAN Biotech, Aidenbach)
1% Penicillin/Streptomycin (PAN Biotech, Aidenbach)

HUVEC

Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Herkunft: PromoCell (Heidelberg)

Medium: Endothelial Cell Growth Medium (PromoCell, Heidelberg)

Mediumzusätze: ECGM-Supplement Mix (PromoCell, Heidelberg)
0,5% Gentamycin (PAN Biotech, Aidenbach)

SMC

Smooth Muscle Cells

Herkunft: ATCC, USA

Medium: SMC Basal Medium 2 (PromoCell, Heidelberg)

Mediumzusätze: SMC Basal Medium 2-Supplement Pack (PromoCell, Heidelberg)

BxPC-3

Humane Pankreaskarzinomzelllinie

Herkunft: ATCC, USA

Medium: RPMI 1640 Medium (Gibco, Karlsruhe)

Mediumzusätze: 10% Fetal Bovine Serum (Biochrom, Berlin)

1% Hepes Buffer (PAN Biotech, Aidenbach)

1% Sodium Pyruvate (PAN Biotech, Aidenbach)

1% L-Glutamine (PAN Biotech, Aidenbach)

0,5% Gentamycin (PAN Biotech, Aidenbach)

AsPC

Humane Pankreaskarzinomzelllinie

Herkunft: ATCC, USA

Medium: siehe BxPC-3 Zelllinie

MIAPaCa-2

Humane Pankreaskarzinomzelllinie

Herkunft: ATCC, USA

Medium: D-MEM (Gibco, Karlsruhe)

Mediumzusätze: 10% Fetal Bovine Serum (Biochrom, Berlin)

2% L-Glutamine (PAN Biotech, Aidenbach)

1% Penicillin/Streptomycin (PAN Biotech, Aidenbach)

2% Donor horse serum (Biochrom, Berlin)

3.1.3 Medikament

Für die *in vitro* Versuche wurde folgendes Medikament verwendet:

CXCR2-Antagonist SB225002 (Calbiochem, Merck, Darmstadt)

Diese Substanz ist ein selektiver Antagonist des G-Protein gekoppelten Rezeptors CXCR2 (IL-8RB) und inhibiert reversibel die Bindung von Interleukin-8 an diesen Rezeptor. Entsprechend der Angaben des Herstellers liegt der IC₅₀ bei 22nM; *in vitro* wurde mit SB225002 bisher eine Inhibition der Mensch- und Kaninchen-artigen neutrophilen Chemoattraktion beobachtet. *In vivo* blockiert der Antagonist die durch

IL-8 induzierte neutrophile Margination in Kaninchen⁹⁰. Gelöst wird die Substanz in Dimethylsulfoxid (DMSO, 200mg/ml, Sigma, München).

3.1.4 ELISA: IL-8-Produktion

Um die quantitative Interleukin-8-Produktion von verschiedenen humanen Pankreaskarzinomzelllinien, von HUVEC und SMC Zellen nachzuweisen wurde das ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Verfahren verwendet. Der Assay wurde nach der Anleitung des humanen IL-8 Immunoassay Quantikine (R&D Systems, Minneapolis, USA) durchgeführt.

Zunächst wurden die Pankreaskarzinomzelllinien FG, L3.6pl, MIAPaCa-2, BxPC-3 und AsPC und die HUVEC und SMC Zellen bei 37°C und 5% CO₂ in 75cm³ Flaschen in Kultivation gebracht. Nach mehrmaliger Zellteilung und sichtbarem Zellwachstum wurden über fünf Tage hinweg der Überstand (Nährmedium) der Zellen gesammelt und die Proben bei -80°C im Tiefkühlschrank eingefroren.

Die verwendete ELISA Technik (Sandwich-ELISA) verwendet zwei Antikörper (AK), die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen (IL-8) binden. Der erste AK ist an eine feste Phase gebunden; in diesem Assay war dies eine 96 well-Platte, die mit einem monoklonalen Mausantikörper gegen IL-8 beschichtet war. Zuerst wurden die gesammelten Proben und eine Standard-IL-8-Verdünnungsreihe in die wells pipettiert (50µl/well) und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit bindet der an die Platte gebundene AK das IL-8 in den Proben. Nach Ablauf der Inkubationsphase wurde die Platte mit einem Waschpuffer gewaschen, um die ungebundenen Bestandteile der Probe zu entfernen. Im nächsten Schritt wurde ein sogenannter Detektions-AK, ein polyklonaler AK gegen IL-8 (100µl/well), zugegeben, an dessen Ende Meerrettichperoxidase (HRP) gebunden war. Die Platte wurde dann eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit band der zweite AK ebenfalls an das Antigen IL-8 und es entstand der AK-Ag-AK Komplex. Durch erneutes Waschen der Platte wurde überschüssiger zweiter AK weggeschwemmt und ein Chromogen (Hydrogenperoxid und Tetramethylbenzidine) zugegeben (200µl/well). Die Platte wurde dann 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, währenddessen konnte ein Farbumschlag von blau zu gelb beobachtet werden. (Die alkalische Phosphatase spaltet vom farblosen Nitrophenylphosphat den Phosphatrest ab und es entsteht schwach gelbes p-Nitrophenol.) Nach Ablauf der

Inkubationszeit wurde eine Stop-Lösung zugegeben (50µl/well) und die Auswertung in einem ELISA-Photometer vorgenommen. Dieser Photometer (540nm) misst die Intensität der Farbe, welche der Konzentration des entstandenen Nitrophenols und damit auch der Konzentration des IL-8 in der Probe proportional ist.

3.1.5 FACS Analyse: CXCR2-Expression

Der Name FACS steht für Fluorescence-activated cell sorting und dient der Messung von Zelleigenschaften; die allgemeine Bezeichnung des Verfahrens lautet Durchflusszytometrie.

Mit Hilfe der FACS Analyse sollten verschiedene Zelllinien auf die Expression des CXCR2-Rezeptors untersucht werden. Verwendet wurde hierzu ein monoklonaler „anti-human CXCR2-(IL-8RB)- FITC“ Antikörper (R+D Systems, MN, USA). Untersucht wurden die folgenden Zelllinien: FG, L3.6pl, BxPC-3, MIAPaCa-2, AsPC, HUVEC und SMC.

Die kultivierten Zellen wurden mit Hilfe von Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und gezählt. Etwa eine Million Zellen wurden in Medium gelöst und vier Minuten bei 800rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen in PBS 0,5% BSA gelöst und erneut zentrifugiert. Nach diesem sogenannten Waschvorgang wurde der Überstand wiederum abgesaugt, die Zellen in 200µl PBS aufgenommen und auf zwei FACS Röhrchen verteilt.

Als erstes wurden die Zellen nun einem Fc-Block unterzogen. Dafür wurde 10µl Phlebogamma in jedes Röhrchen pipettiert und diese 30 Minuten in einer dunklen Kammer inkubiert. Anschließend wurde in das eine FACS Röhrchen 25µl des Anti-CXCR2-Reagenz und in das andere 25µl eines Kontroll-Antikörpers (Mouse IgG_{2A} Isotype Control, fluorescein conjugated, R+D Systems, MN, USA) dazugegeben und diese 45 Minuten bei 4°C in der Dunkelkammer aufbewahrt. Dann wurden die Zellen in 4ml PBS ein- bis zweimal gewaschen und in 400µl PBS gelöst. Abschließend wurden je Röhrchen 200µl Formalin dazu pipettiert, um die Zellen zu fixieren; bis zur FACS Auswertung wurden die markierten Zellen bei 4°C in der Dunkelkammer aufbewahrt.

Die für die FACS Analyse verwendete Software war Cellquest Pro von Beckton Dickinson, San Jose, USA.

3.1.6 Proliferations Assay

Zur Überprüfung der anti-proliferativen Eigenschaften des CXCR2-Antagonisten SB225002 wurde der WST Proliferation Assay verwendet.

Zunächst wurde eine Gesamtmenge von 30 000 HUVEC Zellen in eine 96 well-Platte ausplattiert (500 Zellen in 100 μ l Medium pro well) und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurden das Medium verworfen und die Zellen mit unterschiedlichen Medikamentenkonzentrationen des CXCR2-Antagonisten SB225002 behandelt- eine Kontrollgruppe mit Medium sowie sieben verschiedene Konzentrationen des Medikaments.

Zwei Tage später wurden das Medium bzw. die Medikamentenkonzentrationen gewechselt, bevor nach insgesamt fünf Tagen die Auswertung mit dem Reagenz WST-1 (Roche, Grenzach) stattfand. Hierzu wurden in jedes well 10 μ l WST-1 Reagenz pipettiert und die Platte weitere vier Stunden inkubiert.

Die abschließende Messung wurde in einem ELISA Photometer bei einer Wellenlänge von 420-480nM vorgenommen.

3.1.7 Spheroid Assay

Um die anti-angiogene Möglichkeit von SB225002 zu testen, wurde der Spheroid Assay so angewandt, wie er von der Arbeitsgruppe Korff et al. entwickelt und beschrieben wurde⁵².

Die hierfür verwendeten HUVEC Zellen (Passagen 2-6) wurden in Endothelial Cell Growth Medium (ECGM) bei 37°C kultiviert. Eine 75cm³ Kulturflasche konfluenter HUVEC Zellen wurde trypsiniert und in 10ml ECGM suspendiert. Nun wurden die Zellen gezählt. Bei einer Spheroidgrösse von 1000 Zellen/Spheroid wurden für einen Spheroid Assay, sprich eine Platte mit 8 Gelen, 400 000 HUVEC Zellen benötigt. Diese wurden in 40ml eines Medium-Methocel-Gemisches (20% Methocel, 80% Kulturmedium) suspendiert und auf vier 96 well-Platten verteilt (100 μ l/well). Die Platten wurden über Nacht inkubiert; unter diesen Bedingungen lagerten sich die einzelnen Zellen in jedem well zu einem Spheroid zusammen und konnten nach 24 Stunden geerntet werden.

Das verwendete Methocel wurde aus 6g Methylcellulose (Sigma, München) und 500ml Endothelial Cell Growth Medium hergestellt. Dieses Gemisch wurde bei

4000rpm eine Stunde lang zentrifugiert und der Gel-artige Überstand für die Versuche verwendet. Das Methocel verhindert die Zelladhäsion und moduliert das Medium zu einer zähflüssigen Substanz, in der die Spheroide nicht absinken können. Am nächsten Tag wurden die Spheroide geerntet und bei 800rpm fünf Minuten zentrifugiert. Die Spheroide befanden sich dann am Boden, der Überstand wurde abgesaugt. Anschließend wurde das Pellet mit 4ml eines Methocel-Serum-Gemisches (95% Methocel, 5% Serum) überdeckt.

In einem 15ml Röhrchen auf Eis wurden 4ml Kollagen, das zuvor aus Rattenschwänzen hergestellt wurde, 500µl Medium 199 (Sigma, München) und etwa 300-500µl eisgekühltes 0,2M NaOH (Merck, Darmstadt) zusammengegeben, um den pH auf 7,4 einzustellen bzw. zu neutralisieren. Diese Suspension wurde dann mit den Spheroiden vermischt und schnell auf die bereits mit einem Wärmeblock vorgewärmte 24 well-Platte verteilt. In die mittleren 8 wells wurde je 1ml Gel pipettiert, in die äußeren wells je 1ml PBS. Die Platte wurde auf dem Wärmeblock wieder in den Inkubator gestellt, um ein Absinken der Spheroide zu verhindern.

Ca. 30 Minuten später wurden die verschiedenen Medikamentenkonzentrationen auf das Gel pipettiert (100µl/well) und VEGF dazugegeben (25ng/ml). Das VEGF diente dazu, das „Sprouting“ der Spheroide zu stimulieren. Die Gele wurden über Nacht im Inkubator bei 37°C aufbewahrt.

Am nächsten Tag wurden die Spheroide mit 4%-igem Formaldehyd (1ml/well) fixiert und konnten daraufhin unter dem Mikroskop abfotografiert werden. Zum Auswerten wurden zunächst alle „Sprouts“ eines jeden Spheroide vermessen und die kumulative Sproutlänge eines jeden Spheroide ermittelt. Pro Medikamentenkonzentration wurden aus den kumulativen Sproutlängen aller Spheroide (mindestens 10 Spheroide pro Konzentration) ein Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung berechnet.

3.2 Tierexperimentelle Studie

3.2.1 Versuchstiere

Für die tierexperimentellen Studien wurden acht Wochen alte Nacktmäuse (NMRI nu/nu, Harken Winkelmann, Borchsen), Gewicht 20-30g, ausgewählt. Die Tierhaltung und Fütterung erfolgte im Tierlabor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern der Universität München unter Einhaltung der Tierschutzverordnungen. Alle Tiere wurden in abgedeckten Käfigen unter spezieller pathogenfreier Umgebung in einem temperaturkontrollierten Raum gehalten. Eine Woche vor Studienbeginn wurden die Mäuse direkt in den Laborbereich zur Akklimatisation eingestellt. Die Mäuse erhielten während der gesamten Studie pelletierte Nahrung (ssniff, Soest) und Wasser ad libidum.

3.2.2 Orthotopes Tiermodell

Im Rahmen der Forschungsarbeiten am Klinikum München wurde ein orthotopes Pankreastumormodell entwickelt, welches die tumor- und molekularbiologischen Charakteristika des Pankreaskarzinoms möglichst realistisch wiederspiegelt. Bruns und Kollegen berichteten über ein orthotopes Tiermodell durch Implantation von humanen Pankreaskarzinomzellen in das Pankreas von Nacktmäusen mit reproduzierbarem Primärtumorwachstum und spontanen Leber- und Lymphknotenmetastasen¹².

Für die Entwicklung des Pankreaskarzinommodells wurden FG Zellen (fast growing, gering metastatisch), die sich von der humanen, duktalen Pankreasadenokarzinomzelllinie COLO 357 ableiten (Isolierung 1980 von Morgan et al.) in das Pankreas der Nacktmaus orthotop injiziert. Nach multiplen *in vivo* Pankreas-Leber-Selektionszyklen in der Nacktmaus wurde die hoch metastatische humane Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl generiert, die bei erneuter orthotoper Implantation in die Nacktmaus ein extrem aggressives Tumorwachstum und spontane Leber- und Lymphknotenmetastasierung zeigte. Nach orthotoper Injektion von 1×10^6 L3.6pl Zellen starben 50% der Tiere nach 36 Tagen, während über 60%

aller Tiere nach orthotoper Injektion der Parentalzellen COLO 357 bis 100 Tage überlebten¹².

Ein weiterer interessanter Unterschied zeigte sich hinsichtlich molekularer Parameter. So exprimieren L3.6pl Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* im Vergleich zu den Parentalzellen COLO 357 signifikant mehr pro-angiogenetische Faktoren wie VEGF, bFGF sowie Interleukin-8 mit konsekutiv höherer Mikrogefäßdichte im Pankreastumor. In experimentellen und klinischen Studien konnte beobachtet werden, dass beim Pankreaskarzinom das metastatische Potential eng mit dem angiogenen Potential korreliert und eine Überexpression insbesondere der pro-angiogenen Faktoren mit einer ungünstigeren Prognose einhergeht⁷¹.

Das orthotope Nacktmausmodell bietet sich demnach an, um die Effektivität anti-angiogenetischer Therapieansätze als neue molekularbiologische Behandlungsstrategien gegen das Primärwachstum und die Metastasierung beim humanen Pankreaskarzinom zu evaluieren.

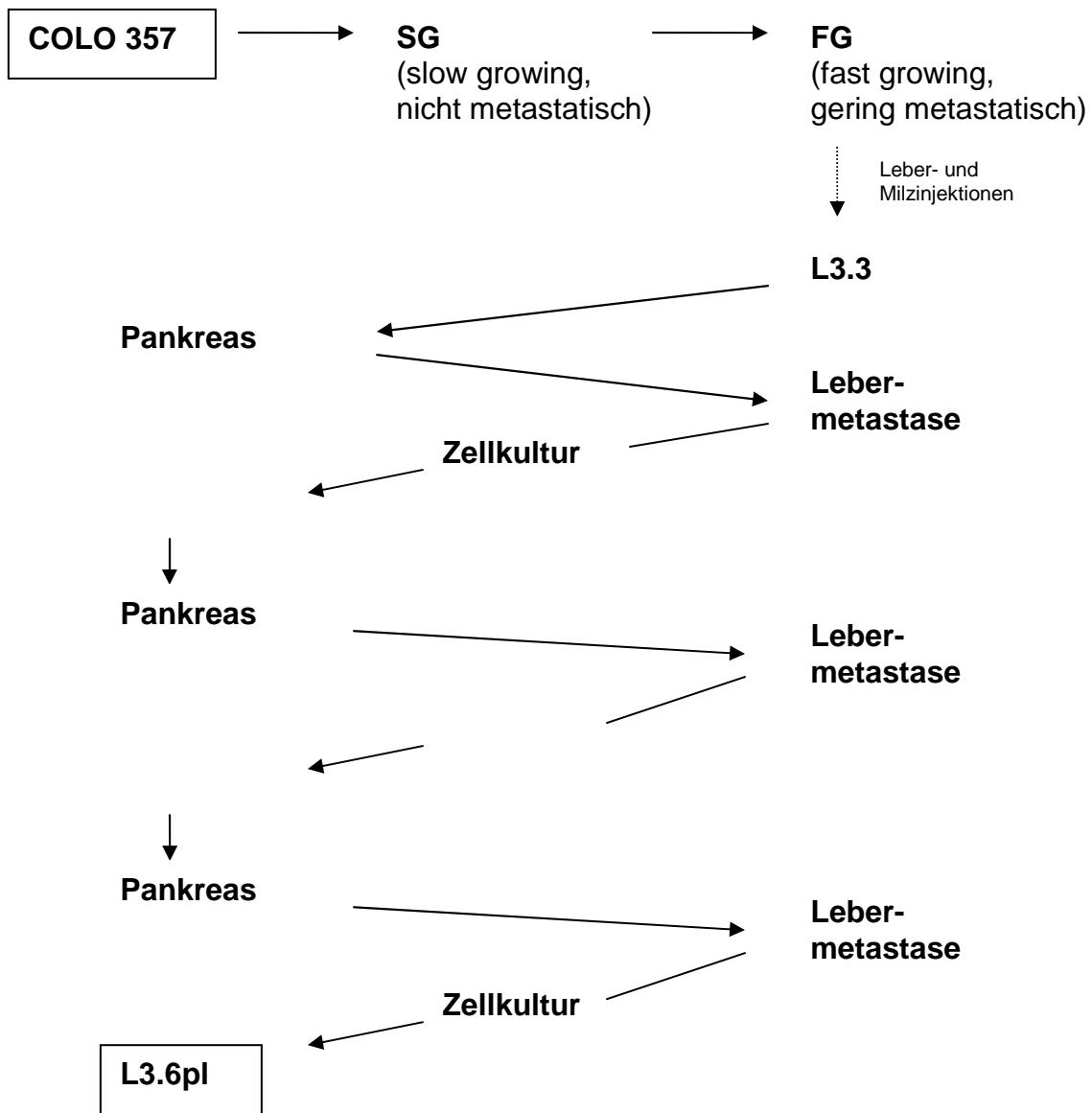


Abb. 3.1 *In vivo* Selektion der humanen Pankreasadenokarzinomzelllinie L3.6pl

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Dulbeccos modifiziertem Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, Karlsruhe) mit den folgenden Zusätzen: 10% fötales Kälberserum (Biochrom, Berlin), 2% L-Glutamin (PAN Biotech, Aidenhausen), 2% MEM Vitamine (Gibco, Karlsruhe), 2% nicht-essentielle Aminosäuren (PAN Biotech, Aidenhausen) und 1% Penicillin/Streptomycin (PAN Biotech, Aidenhausen). Die Zellen wurden mit 30ml dieses Nährmediums in Zellkulturflaschen aufgenommen und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Die Zellkultur war frei von Mykoplasmen und ebenfalls folgenden pathogenen Mausviren: Reovirus Typ 3, Pneumonievirus, K-Virus, Theiler's Encephalitisvirus,

Sendai Virus, Maus Adenovirus, Maus Hepatitisvirus, Lymphozyten-Choriomeningitis-Virus, Ectromeliaivirus und Laktatdehydrogenase-Virus (untersucht durch M.A. Bioproducts, Walkersville, MD, USA).

Die Passage der Zellen erfolgte zweimal pro Woche mit einem Split-Verhältnis von 1:10 in 175cm³ Kulturflaschen. Die Zellen wurden nicht länger als 12 Wochen nach dem Auftauen in Kultur gehalten.

3.2.3 Orthotope Injektionstechnik

Für die Tumorzellinjektion wurden semi-konfluente L3.6pl Zellkulturen mit 0,25% Trypsin und 0,02% EDTA behandelt. Die Trypsinierung wurde mit 10% FCS enthaltendem Medium beendet, anschließend wurden die Zellen in serumfreiem Medium gewaschen und in HBBS (Hanks' balanced salt solution) aufgenommen.

Die Tiere wurden anästhesiert durch intraperitoneale Verabreichung von Ketavet (100mg/ml, Pfizer, Karlsruhe) und Rompun (2%, Bayer, Leverkusen), wobei eine Dosis von 100mg Ketavet/kg und 5mg Rompun/kg erreicht wurde. Vorab erhielten die Mäuse Atropin (0,5mg/ml, Braun, Melsungen) in einer Verdünnung von 1:10 mit Natriumchlorid (Braun, Melsungen).

Nach Eintreten der Narkose wurde die Bauchhöhle lateral eröffnet, das Pankreas hervorpräpariert und in das Organ eine Zellsuspension von 8x10⁵ L3.6pl Zellen in 100µl HBBS injiziert. Anschließend wurde die Wunde mit Nähten verschlossen und die Tiere zur Erholung unter Beobachtung in den Käfig zurückgelegt.

A



B



C



Abb. 3.2 Orthotope Tumorzellinjektion

A Präparation des Pankreas **B** L3.6pl Zellinjektion in das Pankreas **C** Stillen der Blutung

3.2.4 Medikamente

Für das Tierexperiment wurden folgende Substanzen verwendet:

CXCR2-Antagonist SB225002 (Calbiochem, Merck, Darmstadt)

Diese Substanz ist ein selektiver Antagonist des G-Protein gekoppelten Rezeptors CXCR2 (IL-8RB) und inhibiert reversibel die Bindung von Interleukin-8 an diesen Rezeptor. Entsprechend der Angaben des Herstellers liegt der IC₅₀ bei 22nM; *in vitro* wurde mit SB225002 bisher eine Inhibition der neutrophilen Chemoattraktion beim Menschen und beim Kaninchen beobachtet. *In vivo* blockiert der Antagonist die durch IL-8 induzierte neutrophile Margination in Kaninchen ⁹⁰. Gelöst wird die Substanz in Dimethylsulfoxid (DMSO, 200mg/ml, Sigma, München).

Gemzar (Gemcitabinehydrochlorid, Lilly, Giessen)

Diese Substanz ist ein Desoxyzytidin-Derivat, welches als Pyrimidin antimetabolit durch Einbau in die DNA und Blockade der Ribonuklease die DNA-Synthese hemmt und damit zytotoxisch wirkt.

3.2.5 Tierexperimentelles Studiendesign

Nach orthotoper Tumorzellinjektion (8x10⁵ L3.6pl Zellen) in das Pankreas der Nacktmäuse erfolgte am 7. postoperativen Tag die Aufteilung der Tiere in die folgenden Behandlungsgruppen:

1. Kontrolle (Injektionsmittel DMSO/H ₂ O)	n=6
2. CXCR2-Inhibitor SB225002 (3,2mg/kg)	n=6
3. Gemcitabine (50mg/kg)	n=6
4. CXCR2-Inhibitor (3,2mg/kg) + Gemcitabine (50mg/kg)	n=6

Der CXCR2-Inhibitor wurde ab dem 7. postoperativen Tag täglich intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Gemcitabine erhielten die jeweiligen Mäuse zweimal in der Woche.

31 Tage nach erfolgter Tumorzellinjektion (24 Tage nach Therapiebeginn) wurde das Experiment mit der Tötung sämtlicher Mäuse beendet. Bei allen Tieren wurden das

Körpergewicht, Tumorgewicht und die Inzidenz von Lymphknoten- bzw. Lebermetastasen und Peritonealkarzinose evaluiert.

Für die immunhistochemischen Färbungen H&E und Ki67 wurden die Präparate in Formalin eingelegt und in Paraffin eingebettet. Das Gewebe für die immunhistochemischen Untersuchungen für CD31 wurde in eine Methylcarnoyslösung gelegt und ebenfalls in Paraffin eingebettet. Es wurden Paraffinschnitte mit einer Stärke von 4µm mit einem Mikrotom angefertigt und auf Objektträger aufgezogen.

3.3 Immunhistochemie

3.3.1 Formalin-Fixierung und Paraffin-Einbettung

Die Fixierung der entnommenen Tumore erfolgte bei Raumtemperatur (RT) für bis zu 12 Stunden in Formalin (SAV Liquid, Flintsbach) bzw. in einer selbst hergestellten Methylcarnoyslösung (Ethanol, Chloroform, Eisessig; 6:3:1). Anschließend wurden die Gewebeproben für eine Stunde mit fließendem Leitungswasser gespült. Währenddessen wurde die Entwässerungsmaschine vorbereitet, indem die folgenden Lösungen in der entsprechenden Reihenfolge in die Behälter gefüllt wurden: 3x 70% Ethanol, 2x 96% Ethanol, 3x absoluten Ethanol, 2x Xylol, 2x Paraffin (60°C). Die gewässerten Paraffinboxen wurden dann in einen runden Metallkorb geschichtet, der nach Programmstart die verschiedenen Stationen mit Lösungen durchlaufen ließ. Nach 24 Stunden war der Entwässerungsvorgang beendet und die Proben wurden in der letzten Station, dem Paraffin, bis zur Einbettung (max. 24 Stunden) aufbewahrt. Das Einbetten erfolgte in 60°C heißem Paraffin in der Einbettmaschine.

Nach dem Erkalten wurden die Paraffinblöcke weiter auf -20°C gekühlt. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden 4µm dicke Schnitte angefertigt. Die erhaltenen Schnitte wurden auf einem Heißwasserbad (40°C) gestreckt, um dann auf einen Objektträger aufgezogen werden zu können. Die aufgezogenen Schnitte mussten abschließend noch über Nacht bei 37°C getrocknet werden, damit sie dann für die Färbungen verwendet werden konnten.

3.3.2 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung stellt die Routinefärbung der Wahl dar. Mit ihr gelingt eine gute Darstellung des Gewebes bzw. der Tumormorphologie, wobei Zellkerne blau-violett und Zytoplasma rosa erscheinen.

Die Gewebeschnitte wurden zur Entparaffinierung 20 Minuten in Xylol, 10 Minuten in 100% Ethanol, je 3 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (96%, 90%, 80%, 70% Ethanol) inkubiert und 5 Minuten in destilliertem Wasser gespült. Dann wurden die Objekträger in ein Hämatoxylin-Bad (Mayers Hämalaun, Merck, Darmstadt) für 5 Minuten gestellt. Nach Spülen mit destilliertem Wasser und 5 Minuten Inkubation in warmem Leitungswasser färbten sich die Schnitte bläulich. Als nächster Schritt erfolgte die Behandlung des Zytoplasmas. Hierfür wurden die Objekträger für 8 Minuten in eine 0,1%-ige Eosinlösung (Sigma, München) gestellt und die Farbreaktion durch Spülen mit destilliertem Wasser gestoppt. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (90%, 96%, 100% Ethanol) und Xylol entwässert, ein Tropfen Eukitt (Kindler GmbH, Freiburg) auf jedes Präparat getropft und dieses dann mit einem Deckglas (Menzel-Gläser, Braunschweig) abgedeckt.

3.3.3 Ki67-Färbung

Der Antikörper Ki67 („Ki“ steht für das Institut für Pathologie der Kieler Universitätsklinik, „67“ für 1967) dient als spezifischer Marker für die Zellproliferation in Geweben. Er reagiert mit einem Antigen, das nur in den Kernen proliferierender Zellen exprimiert wird, jedoch nicht in ruhenden Zellen.

Zur Entparaffinierung wurden die Präparate bei 60°C für 15 Minuten erwärmt, 6 Minuten in Xylol und je 2 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96% und 70% Ethanol) inkubiert und 3 Minuten in destilliertem Wasser gespült. Anschließend erfolgte die Demaskierung durch 30-minütiges Kochen in der Mikrowelle. Um unspezifischen Hintergrund zu blocken, wurden die Präparate mit 10%-igem Normalserum der Spezies des sekundären Antikörpers, hier Goatserum (Sigma, München) in TBS 3% BSA eine Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Objekträger mit dem primären Antikörper Rabbit anti human Ki67 (Biomeda, CA, USA) in einer Verdünnung von

1:100 in TBS 3% BSA behandelt und über Nacht in der feuchten Kammer bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Am nächsten Tag wurden die Präparate 20 Minuten in 3%-igem Wasserstoffperoxid (Sigma, München) geschwenkt und 10 Minuten in TBS 0,1% Triton-X-100 (Sigma, München) und 5 Minuten in TBS gewaschen, um die Aktivität der endogenen Peroxidase zu hemmen. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper Goat anti rabbit-HRP (Jackson, Maine, USA) in einer Verdünnung von 1:100 in TBS 3% BSA auf die Schnitte aufgebracht und diese eine Stunde in der feuchten Kammer bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen für 10 Minuten in TBS 0,1% Triton X-100 und 5 Minuten in TBS folgte die Chromogen DAB–Färbung (Dako Cytomation, CA, USA) für 10 Minuten bis zu einer braunen Farbentwicklung. Daraufhin wurden die Präparate 5 Minuten in destilliertem Wasser gespült und eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin (Mayers Hämalaun, Merck, Darmstadt) für 2 Minuten vorgenommen. Die Farbentwicklung geschah unter fließendem Leitungswasser nach etwa 6 Minuten. Zum Abschluss wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96% und 100% Ethanol) und Xylol dehydriert und mit Eukitt (Kindler, Freiburg) und einem Deckglas (Menzel-Gläser, Braunschweig) bedeckt.

Für die Auswertung wurden die Präparate mikroskopisch untersucht und pro Schnitt in drei sogenannten „hot spots“ mit hoher Proliferationsrate die Anzahl der Ki67-positiv gefärbten Zellen ausgezählt (pro „hot spot“ 1000 Zellen, 20x Vergrößerung). Als positiv galten alle Zellen mit einer deutlich nukleären Braufärbung.

3.3.4 CD31-Färbung

Mit der immunhistologischen CD31 (PECAM-1)-Färbung wird über die Bindung eines Antikörpers an das Gefäßendothel-spezifische Oberflächenantigen CD31 (cluster determinant) die Mikrogefäßdichte eines Gewebeschnittes dargestellt.

Zur Entparaffinierung wurden die Präparate 10 Minuten bei 60°C erwärmt, 10 Minuten in Xylol, dann in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 70% Ethanol) jeweils 3 Minuten inkubiert und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Die Demaskierung des Gewebes erfolgte in 10mM Citratpuffer (pH 6,0) durch 15-minütiges Kochen in der Mikrowelle; nach dem Abkühlen der Schnitte wurden sie 15 Minuten in destilliertem Wasser gereinigt. Mit einer 3%-igen Wasserstoffperoxidlösung (Sigma, München) (10ml 30% Hydrogenperoxide mit 90ml

TBS) wurde die endogene Peroxidase blockiert. Dazu wurde die Lösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf die Präparate aufgebracht und die Objekträger durch zweimaliges Waschen mit TBS 0,025% Triton X-100 und reinem TBS gereinigt. Dann wurde das Gewebe mit einem PapPen umrandet.

Um unspezifischen Hintergrund zu blocken, wurde 10%-iges Donkeyserum (Sigma, München) in TBS 0,1% BSA aufgetragen und die Präparate 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Danach wurde der primäre Antikörper CD31/PECAM-1, Goat anti mouse (Santa Cruz, CA, USA) in einer Verdünnung von 1:50 in TBS 0,1% BSA aufpipettiert und die Schnitte für 2 Stunden in einer feuchten Kammer bei RT belassen.

Nach dem Waschen der Schnitte für 10 Minuten in TBS erfolgte die Behandlung der Schnitte mit einer Avidin/Biotin-Blocklösung; hierzu wurde das Gewebe 15 Minuten in einer feuchten Kammer bei RT mit einer Avidinlösung (Vector, CA, USA) und nach kurzem Waschen mit TBS 15 Minuten mit einer Biotinlösung (Vector, CA, USA) überschichtet.

Anschließend wurden die Schnitte 2 Minuten in TBS gespült und der biotinylierte sekundäre Antikörper Donkey anti goat (Santa Cruz, CA, USA) in einer Verdünnung von 1:100 in TBS aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde in einer feuchten Kammer bei RT, danach wurden die Präparate 6 Minuten in TBS und 3 Minuten in PBS gewaschen.

Als nächstes wurden die Schnitte mit einem ABC-Komplex (ABC-Kit, Vector, CA, USA) behandelt; dafür wurden jeweils ein Tropfen Avidin DH und biotinyliertes HRP-H mit 10ml PBS vermischt und die Präparate damit für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert.

Nach Waschen in PBS erfolgte die Färbung mit einer nach der beigefügten Beschreibung hergestellten Chromogen DAB Lösung (Dako Cytomation, CA, USA). Hierfür wurden die Objekträger mit jeweils 100µl der DAB Lösung überschichtet und bis zur gewünschten braunen Farbentwicklung belassen, max. 20 Minuten. Die Reaktion wurde durch Waschen mit destilliertem Wasser gestoppt.

Die Zellkerne wurden mit Mayers Hämalaunlösung (Merck, Darmstadt) für 30 Sekunden gegengefärbt. Anschließend wurden die Schnitte in warmem Leitungswasser 4 Minuten gebläut, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96% und 100% Ethanol) und Xylol dehydriert und mit Eukitt (Kindler, Freiburg) eingedeckt.

Für die Quantifizierung der Mikrogefäßdichte wurden pro Schnitt drei sogenannte „hot spots“ bei 20facher Vergrößerung ausgezählt.

3.4 Statistische Methoden

Die statistische Analyse der experimentellen *in vitro* Daten erfolgte mit Hilfe des Programms Origin 6,0, Microcal Software Inc, USA. Die Ergebnisse der Proliferations Assays und Spheroid Assays wurden mit dem paired Student's t-test ausgewertet. Für jede Analyse wurde bei einem p-Wert <0,05 ein Unterschied als statistisch signifikant gewertet.

Die Auswertung der experimentellen *in vivo* Daten wurde mittels des Mann-Whitney-Tests vorgenommen (MedCalc Software, Belgien); das Signifikanzniveau wurde bei einem p-Wert <0,05 festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 *In vitro* Ergebnisse

4.1.1 Ergebnisse IL-8 ELISA

Verschiedene humane Pankreaskarzinomzelllinien (FG, L3.6pl, BxPC-3, MIAPaCa-2 und AsPC), HUVEC und SMC Zellen wurden mit Hilfe des ELISA Verfahrens auf ihre Interleukin-8-Eigenproduktion untersucht.

Im Falle der L3.6pl Zellen zeigte sich eine signifikante IL-8-Produktion, die über die Versuchszeit von 5 Tagen stetig anstieg. Eine annähernd starke IL-8-Produktion wiesen die SMC Zellen und Pankreaskarzinomzelllinie MIAPaCa-2 auf. Die HUVEC Zellen zeigten an Tag 1 nur eine geringe IL-8-Konzentration im Überstand, steigerten aber täglich ihre IL-8-Produktion und erreichten an Tag 5 ebenso einen Höchstwert von 3ng/ml. Bei der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3 ließ sich ebenfalls eine ansteigende IL-8-Produktion nachweisen bis zu einem Wert von 1,39ng/ml. Eine deutlich geringere Produktion des IL-8 wiesen die FG und AsPC Zellen auf; die IL-8-Konzentration im Medium stieg nur geringfügig an, beide Höchstwerte lagen am Versuchsende unter 1ng/ml.

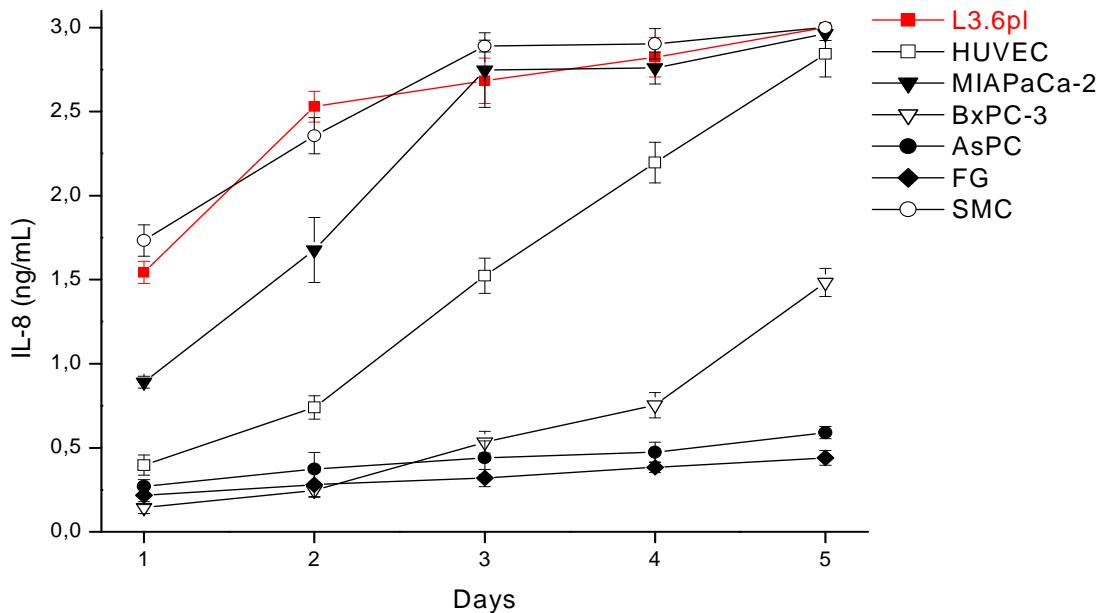


Abb. 4.1 Quantifizierung der IL-8-Produktion verschiedener Zelllinien im Verlauf von 5 Tagen mittels ELISA Verfahren

4.1.2 Ergebnisse FACS Analyse

Das Ziel der FACS Analyse bzw. Durchflusszytometrie war es, die verschiedenen Zelllinien (FG, L3.6pl, BxPC-3, MIAPaCa-2, AsPC und HUVEC) auf die Expression des Chemokinrezeptors CXCR2 zu untersuchen. Dazu wurden die Zellen mit einem monoklonalen humanen CXCR2-Antikörper inkubiert.

Interessanterweise fanden wir heraus, dass alle untersuchten Zelllinien den CXCR2-Rezeptor an ihrer Oberfläche exprimieren mit Ausnahme der humanen Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl.

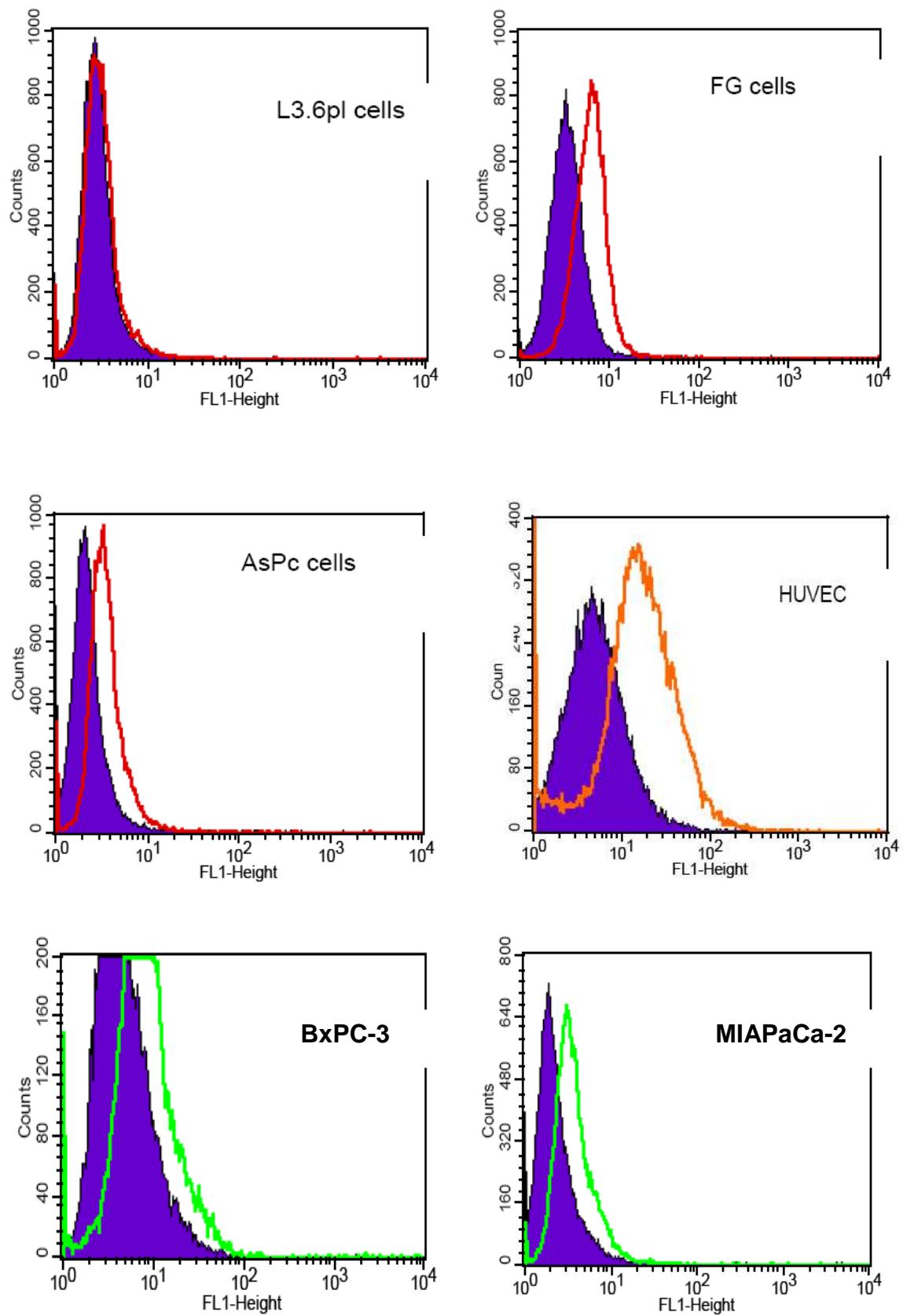


Abb. 4.2 CXCR2 Rezeptornachweis auf verschiedenen Zelllinien mittels FACS Analyse

4.1.3 Ergebnisse Proliferations Assay

Der Proliferations Assay für die HUVEC Zellen wurde mit dem Reagenz WST-1 durchgeführt. Die Behandlung der Zellen mit dem CXCR2-Inhibitor SB225002 in hohen Konzentrationen ($>0,2\mu\text{M}$) verursachte eine starke Abnahme der Zellproliferation, eine signifikante antiproliferative Aktivität von SB225002 auf die HUVEC Zellen konnte allerdings bereits ab einer Konzentration von $0,1\mu\text{M}$ oder höher beobachtet werden ($\text{IC}_{50}=0,15\mu\text{M}$).

Die Behandlung der L3.6pl Zellen mit SB225002 zeigte auch in hohen Konzentrationen keinen Effekt.

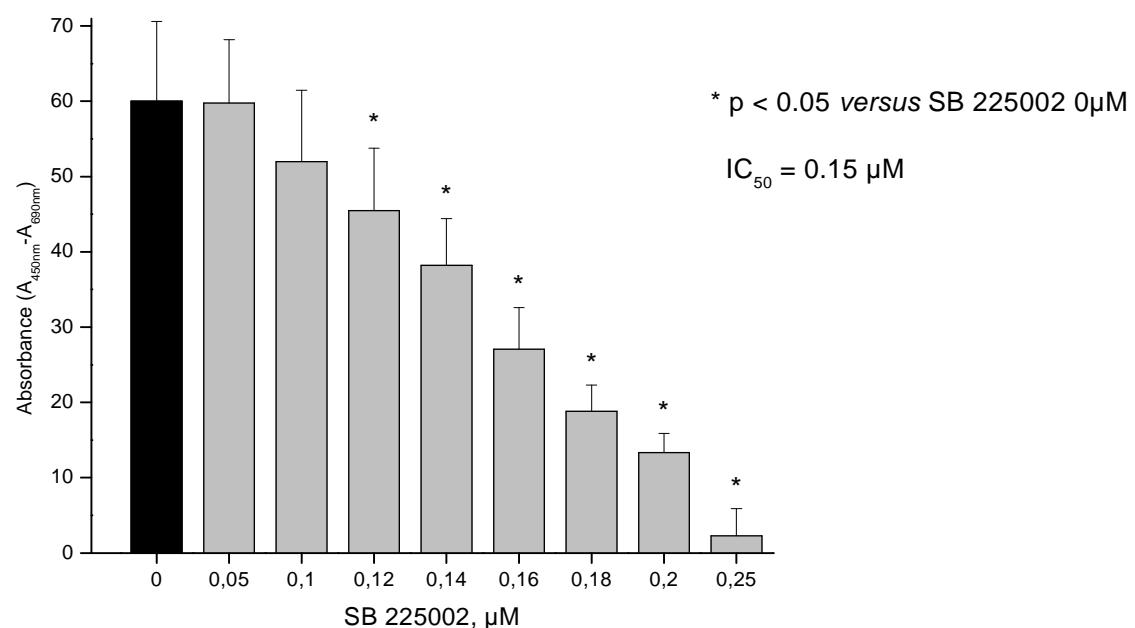


Abb. 4.3 Inhibition der Proliferation von Endothelzellen durch SB225002 im *in vitro* WST Proliferations Assay

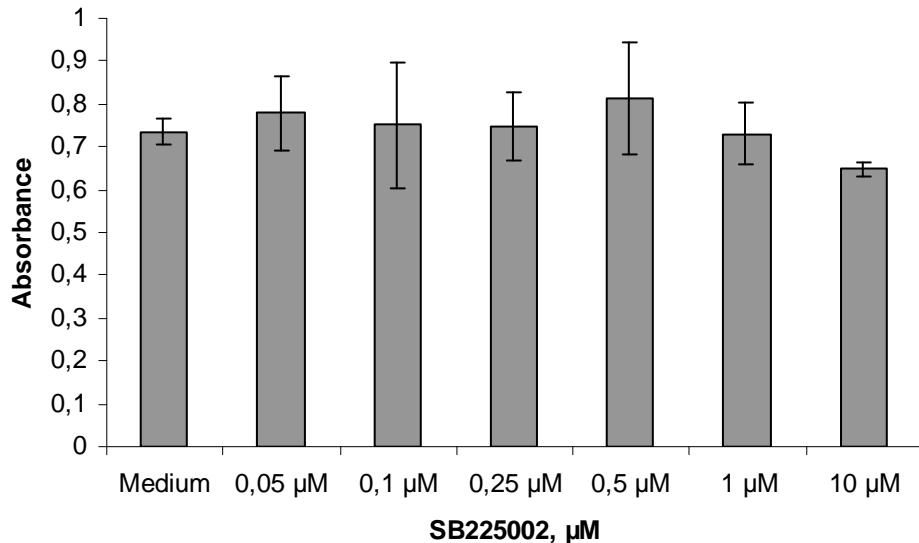


Abb. 4.4 Behandlung von L3.6pl Zellen mit SB225002 im *in vitro* WST Proliferations Assay

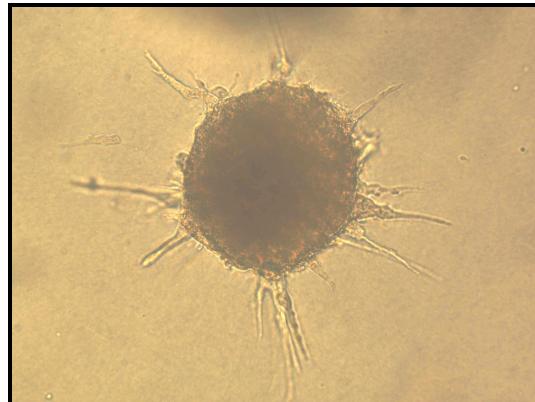
4.1.4 Ergebnisse Spheroid Assay

Um die komplexen Prozesse der Angiogenese *in vitro* zu untersuchen, verwendeten wir den Spheroid Assay. Untersucht wird die Fähigkeit der Endothelzellen - nach angiogener Stimulation - sogenannte „Sprouts“ zu formen. Dieses „Sprouting“ in einem Spheroid-Modell ist für Endothelzellen die Voraussetzung, um sich in ein Blutsystem zu integrieren.

Interessanterweise zeigte der CXCR2-Inhibitor SB225002 - verglichen mit den Ergebnissen des Proliferations Assays – bereits ab einer Konzentration von 0,025 μ M eine Inhibition des endothelialen Sproutings. Bei einer Konzentration von 1 μ M wurde das Sprouting der Spheroide komplett verhindert.



Medium



0,025 μ M



0,3 μ M



1 μ M

Abb. 4.5 *In vitro* Spheroid Angiogenese Modell nach Behandlung mit SB225002 in verschiedenen Konzentrationen

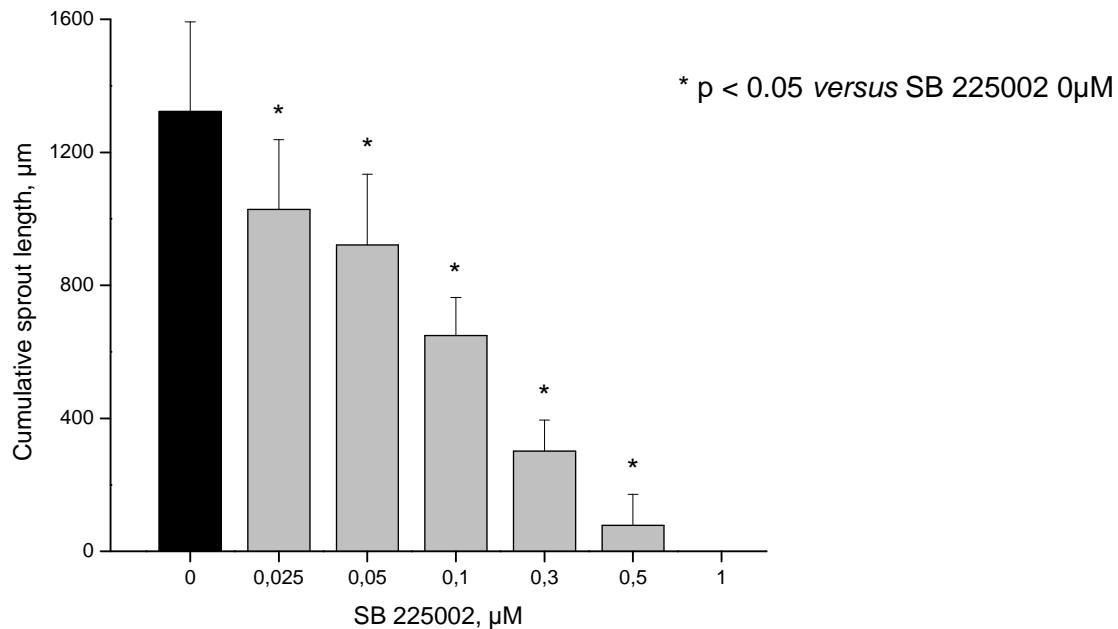


Abb. 4.6 In vitro Inhibition des endothelialen Sproutings nach Behandlung mit SB225002 im Spheroid Modell

4.2 Tierexperimentelle Ergebnisse

4.2.1 Metastasierung und Tiergewicht

Therapie	Inzidenz					Tumor-gewicht (g)	Tier-gewicht (g)
	Pankreas-tumor	Leber-metastasen	LN-Metastasen	Peritoneal-karzinose			
Kontrollgruppe	6/6	1/6	6/6	0/6		1,32	33,32
SB225002	6/6	1/6	6/6	0/6		0,49	34,18
Gemcitabine	6/6	0/6	6/6	0/6		0,75	35,22
SB225002+Gem	6/6	0/6	6/6	0/6		0,48	32,26

Tab. 4.1 Therapeutischer Effekt von SB225002 +/- Gemcitabine auf das Primärtumorwachstum und die Metastasierung beim humanen Pankreaskarzinom (L3.6pl) im orthotopen Nacktmausmodell

Alle am Tierversuch beteiligten Mäuse zeigten 13 Tage nach Tumorzellinjektion ein deutlich palpables Pankreaskarzinom. Lebermetastasen konnten bei jeweils einem Tier sowohl aus der Kontrollgruppe als auch aus der mit SB225002 Monotherapie behandelten Gruppe nachgewiesen werden. Lymphknotenmetastasen traten bei

allen Mäusen auf. Eine Peritonealkarzinose konnte weder in der Kontrollgruppe noch in den unterschiedlichen Behandlungsgruppen beobachtet werden.

Die Therapie mit SB225002 und/oder Gemcitabine veränderte nicht signifikant das Tiergewicht. Das durchschnittliche Mausgewicht der Kontrollgruppe lag am Versuchsende bei 33,3g, in der mit SB25002 behandelten Gruppe bei 34,2g und in der mit Gemcitabine therapierten Gruppe bei 35,2g. Ein etwas niedrigeres Tiergewicht erreichte die Kombinationsgruppe mit 32,3g.

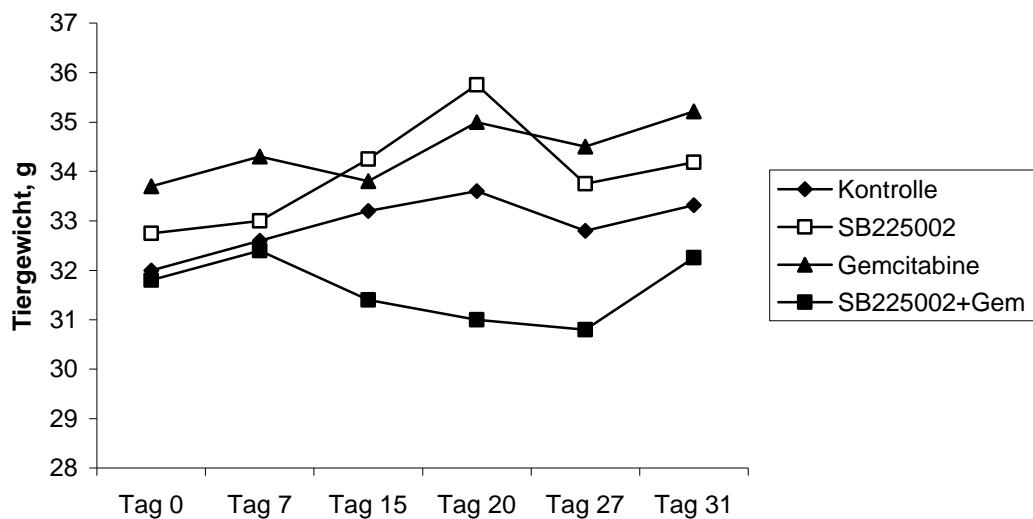


Abb. 4.7 Tiergewichtsverlauf im orthotopen Nacktmausmodell

4.2.2 Tumorvolumen der Versuchsgruppe mit SB225002 Monotherapie

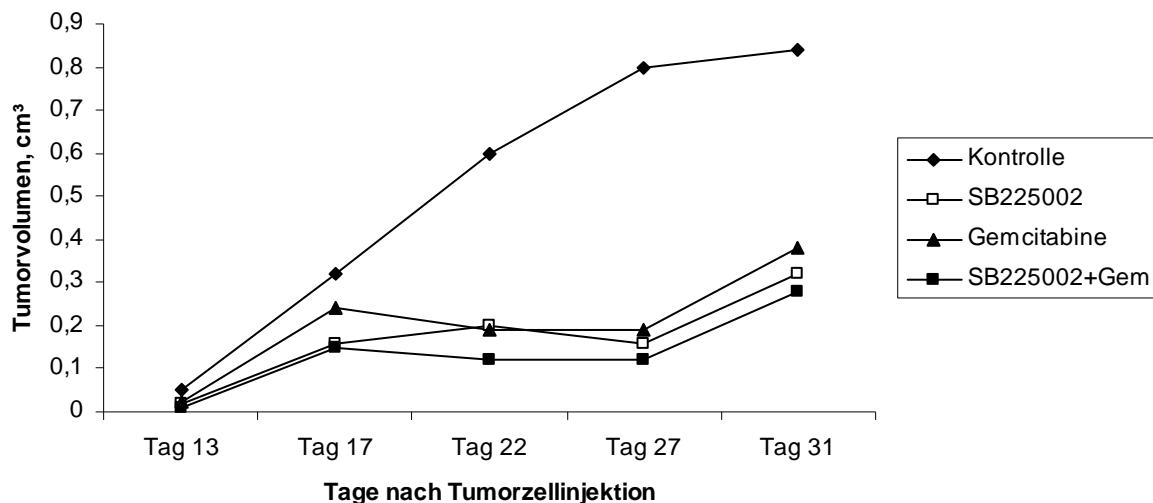


Abb. 4.8 Tumorvolumenverlauf im orthotopen Nacktmausmodell

Nach Behandlung mit SB225002 (täglich, i.p.) zeigte sich 31 Tage nach erfolgter Tumorzellinjektion (24 Tage nach Therapiebeginn) ein deutlicher Unterschied hinsichtlich des Pankreastumorgewichts. Während das durchschnittliche Tumorgewicht der Kontrollgruppe bei 1,32g lag, konnte ein Gewicht von 0,49g nach der Behandlung mit SB225002 festgestellt werden.

Das durchschnittliche Tumorvolumen der Kontrollgruppe betrug am Versuchsende $0,84\text{cm}^3$, das der mit SB225002 behandelten Gruppe $0,32\text{cm}^3$ ($p < 0,0001$).

Es ergab sich hierbei eine deutliche Wachstumsinhibition mit einer Tumorgröße von 38% verglichen mit der Größe der Kontrolltumore.

4.2.3 Tumorvolumen der Versuchsgruppe mit Gemcitabine Monotherapie

Bei der alleinigen Verabreichung von Gemcitabine (2x wöchentlich, i.p.) wurde ein durchschnittliches Tumorgewicht von 0,75g erreicht. Das Tumorvolumen betrug am Versuchsende $0,38\text{cm}^3$ und entsprach einer signifikanten Reduktion gegenüber dem Tumorvolumen der Kontrollgruppe ($p < 0,0043$).

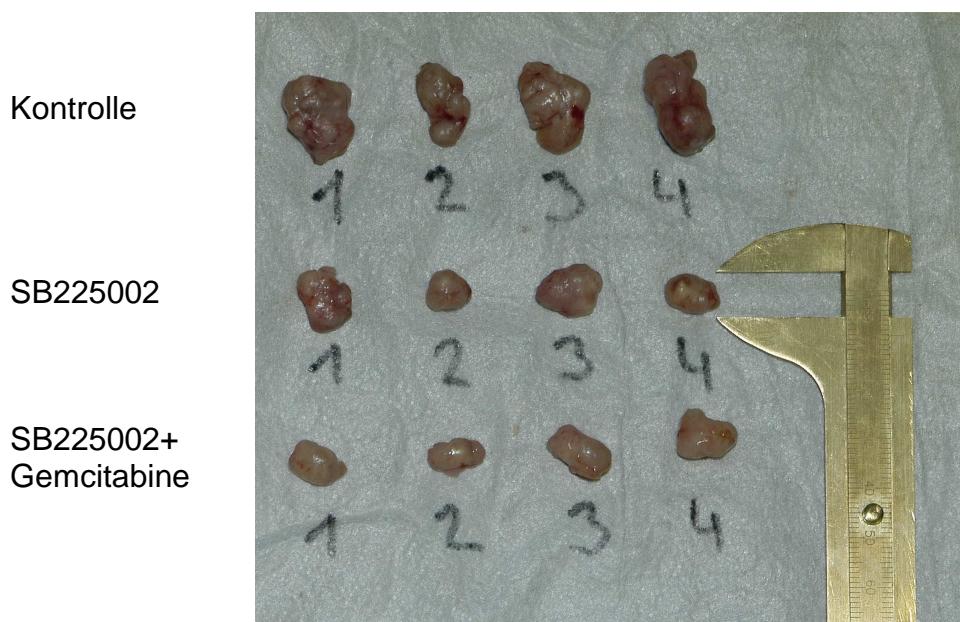
Auch in dieser Gruppe konnte demnach eine Inhibition des Tumorwachstums mit einer Größe von 45% im Vergleich zur Tumogröße der Kontrollgruppe beobachtet werden.

4.2.4 Tumorvolumen der Versuchsgruppe mit SB225002 und Gemcitabine Kombinationstherapie

In der mit SB225002 und Gemcitabine behandelten Gruppe (SB225002 täglich, i.p.; Gemcitabine 2x wöchentlich, i.p.) wurde ein durchschnittliches Tumorgewicht von 0,48g erreicht. Das Tumorvolumen dieser Gruppe betrug $0,28\text{cm}^3$. Dieser Wert entsprach einer signifikanten Reduktion des Tumorvolumens gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,0001$). Ein signifikanter Unterschied zum Tumorvolumen der mit SB225002 Monotherapie behandelten Gruppe wurde demnach allerdings nicht erreicht ($p=0,4127$).

Bezogen auf das Tumorwachstum ergab sich in der Kombinationsgruppe demnach eine Inhibition mit einer Tumogröße von 33% verglichen mit der Größe der Kontrolltumore.

Das unten abgebildete Foto zeigt einen Teil der Tumore, die an Tag 31 des Experiments den Mäusen entnommen wurden.



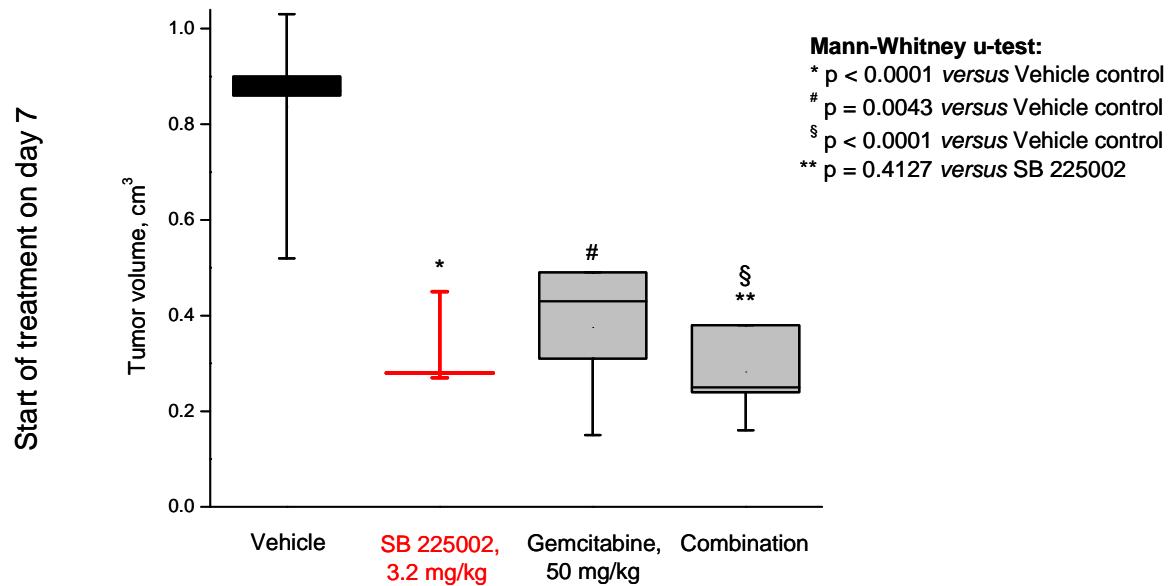
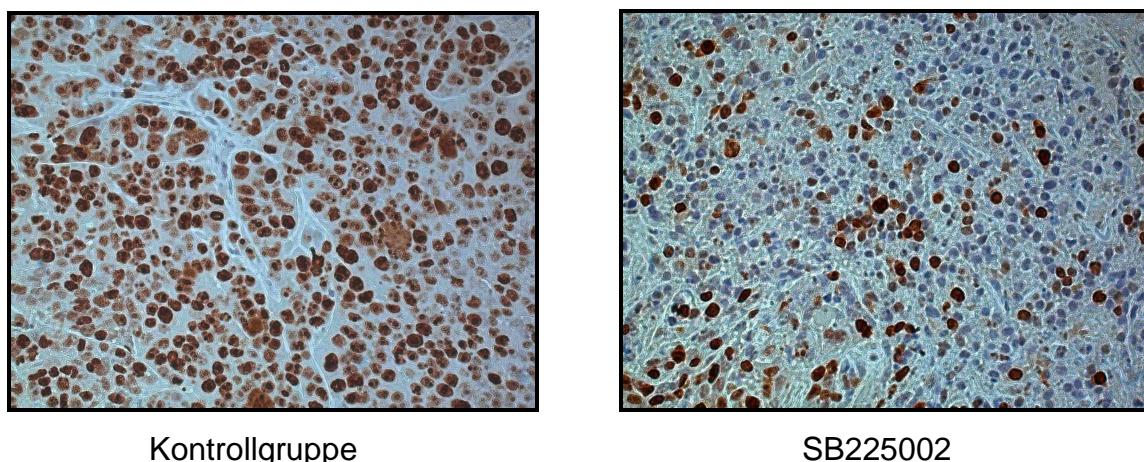


Abb. 4.9 *In vivo* Inhibition des L3.6pl Tumorvolumens nach SB225002 +/- Gemcitabine Therapie im orthotopen Nacktmausmodell

Die Box plots repräsentieren die Mittelwerte für jede Gruppe mit der Standardabweichung der Daten (min und max) und dem Standardfehler des Mittelwertes.

4.3 Immunhistochemische Ergebnisse

4.3.1 Immunhistochemische Analyse für Ki67



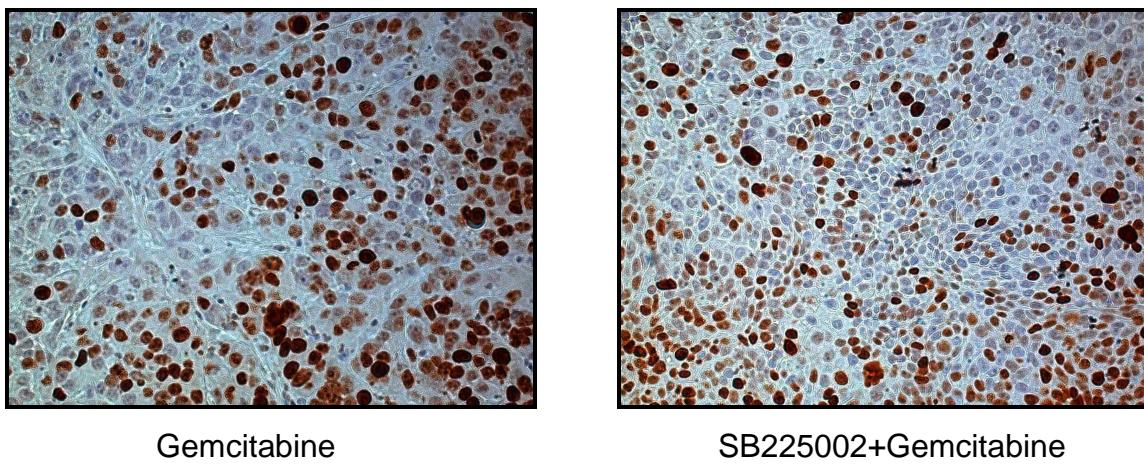


Abb. 4.10 Immunhistochemische Analyse proliferierender Zellen mittels Ki67- Färbung (Bilder 40x Vergrößerung)

Für die Quantifizierung der Ki67-Färbung wurden pro Tumorschnitt in drei sogenannten „hot spots“ mit hoher Proliferationsrate die Anzahl der positiv bzw. braun angefärbten Zellen ausgezählt (pro „hot spot“ 1000 Zellen, 20x Vergrößerung). In den Primärtumoren zeigte sich sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der mit Gemcitabine behandelten Gruppe eine hohe Anzahl mitotischer Zellen. Im Gegensatz dazu beobachteten wir einen deutlichen Rückgang proliferierender Tumorzellen nach der Behandlung mit SB225002 und auch mit der Kombinationstherapie SB225002 und Gemcitabine. Tumore, welche mit SB225002 therapiert wurden, zeigten die geringste Anzahl an Ki67 positiven Zellen und die somit geringste Proliferationsrate.

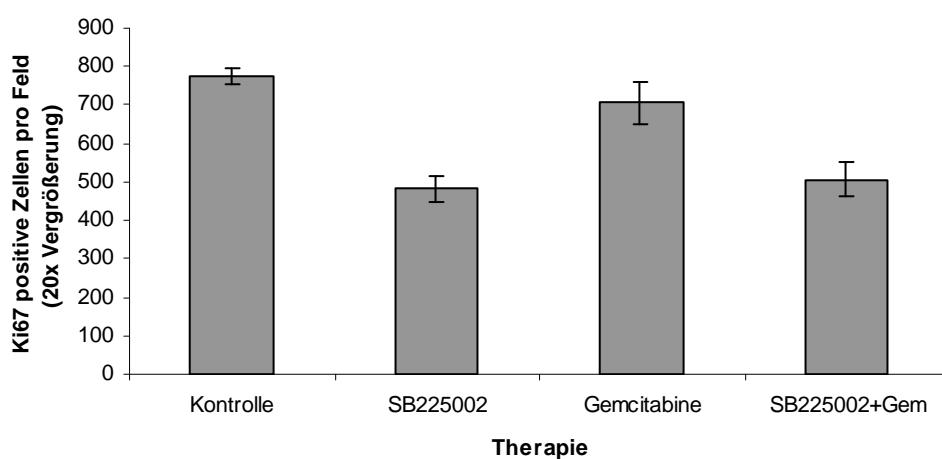


Abb. 4.11 Quantifizierung der proliferierenden Zellen nach Ki67-Färbung

4.3.2 Immunhistochemische Analyse für CD31

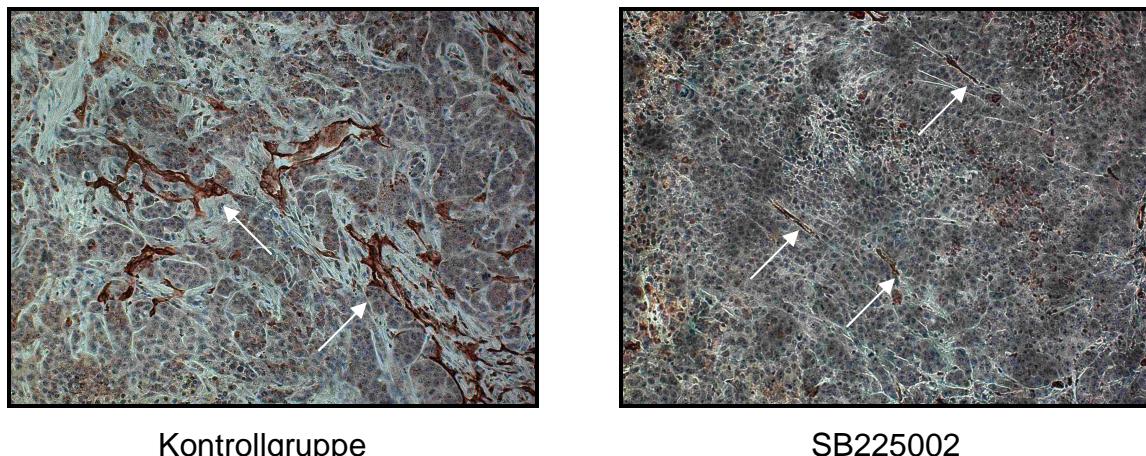


Abb. 4.12 Immunhistochemische Analyse der Mikrogefäßdichte mittels CD31-Färbung (Bilder 20x Vergrößerung)

Für die Auswertung der CD31-Färbung wurden pro Schnitt drei sogenannte „hot spots“ mit hoher Gefäßdichte bei 20facher Vergrößerung ausgezählt.

Während sich bei den Primärtumoren der Kontrollgruppe eine hohe Anzahl positiv gefärbter Gefäße nachweisen ließ, zeigte sich in allen drei therapierten Gruppen eine deutliche Abnahme der Mikrogefäßdichte. In der Kombinationsgruppe beobachteten wir das Minimum an gezählten Gefäßen und damit die geringste Mikrogefäßdichte.

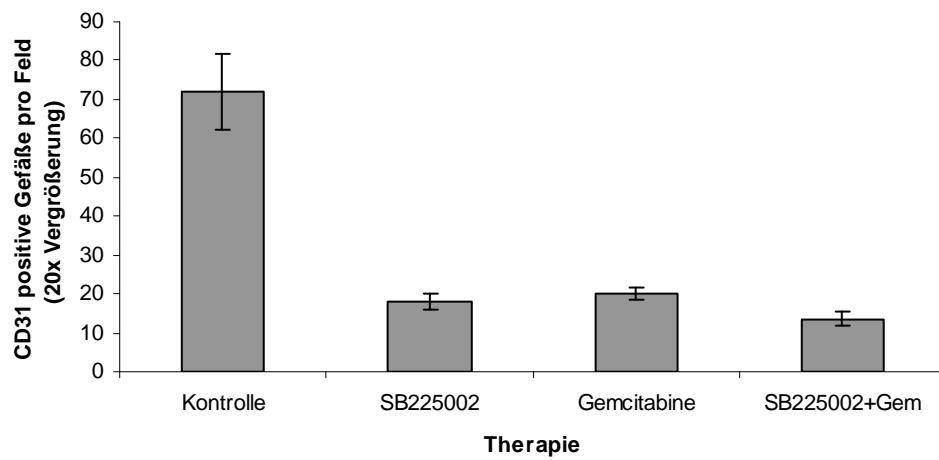


Abb. 4.13 Quantifizierung der Mikrogefäßdichte nach CD31-Färbung

5 Diskussion

Seit einigen Jahren wird in der Therapie des Pankreaskarzinoms eine große Auswahl an Chemotherapeutika eingesetzt, die sich als zytostatische oder zytotoxische Präparate direkt gegen die Tumorzelle richten. Leider zeigen viele Substanzen aufgrund einer Chemotherapieresistenzentwicklung in den Tumorzellen und dem starken Nebenwirkungsprofil nur einen mäßigen Effekt.

Aufgrund ihrer genetischen Instabilität und hohen Mutationsrate verändern sich Tumorzellen in hoher Geschwindigkeit und tragen damit zur Entwicklung therapieresistenter Tumorpopulationen bei⁴⁶. Die anti-angiogenetische Therapie bietet demnach eine alternative Behandlungsmöglichkeit, da sie sich nicht gegen die Tumorzellen, sondern gezielt gegen das proliferierende Tumorgefäßnetz richtet. Die dieser Therapie untergeordneten Zielzellen, die Endothelzellen, bieten durch ihre genetische Stabilität und geringe Mutationsrate eine bessere Angriffsfläche und sind mit systemischer Therapie gut zu erreichen.

Hinzu kommt, dass eine einzige Kapillare eine große Anzahl von Tumorzellen versorgt und somit die Inhibition einer kleinen Anzahl von Tumorgefäßen das Wachstum vieler Tumorzellen beeinflussen kann. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass das Tumorwachstum vom Einsetzen der Angiogenese abhängig ist und dass ein positiver Zusammenhang besteht zwischen der Mikrogefäßdichte im Tumor und dem Risiko der Metastasierung, des Tumorrezidivs und des Todes^{27;83}.

Das Ziel dieser Studie war zu evaluieren, ob die Blockade des pro-angiogenen Chemokins IL-8 durch CXCR2-Inhibition einen relevanten Einfluss auf die Angiogenese beim Pankreaskarzinom hat. IL-8 ist ein multifunktionales Protein, das sowohl im Rahmen von Entzündungsprozessen als auch als Wachstumsfaktor für verschiedene Tumore eine wichtige Rolle spielt^{3;9}. Außerdem induziert es die Proliferation und Chemotaxis von HUVEC Zellen⁵¹ und gilt somit als pro-angiogener Faktor für unterschiedliche Tumorerkrankungen wie z.B. Lungenkarzinom, Melanom, Prostatakarzinom und auch Pankreaskarzinom^{41;61;77}. Die Funktionen des IL-8 werden über die Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2 weitergegeben; seine speziell angiogene Funktion wird über den G-Protein gekoppelten Rezeptor CXCR2 vermittelt³⁷.

Um festzustellen, ob die für unsere Versuche relevanten Zelllinien - HUVEC und L3.6pl Zellen - das Chemokin IL-8 produzieren und/oder den Rezeptor CXCR2 an ihrer Zelloberfläche exprimieren, wurde zunächst eine IL-8 ELISA Messung und CXCR2 FACS Analyse durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die HUVEC Zellen eine über mehrere Tage ansteigende IL-8-Eigenproduktion aufweisen und außerdem CXCR2 an ihrer Zelloberfläche exprimieren. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit Arbeiten anderer Forschungsgruppen, die die IL-8-Produktion und CXCR2-Expression von verschiedenartigen Endothelzellen (HUVEC, HIMEC, DMEC) nachgewiesen haben^{32;55;64}. Die humane Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl wies ebenfalls eine über mehrere Tage ansteigende und von Beginn an starke IL-8-Produktion auf. Überraschenderweise konnten wir auf den L3.6pl Zellen keine Expression des CXCR2 Rezeptors feststellen. Im Gegensatz dazu stellte sich per FACS Analyse heraus, dass die L3.6pl-Vorläuferzelllinie FG den Chemokinrezeptor an ihrer Oberfläche besitzt; außerdem konnten wir eine IL-8-Produktion und CXCR2-Expression der humanen Pankreaskarzinomzelllinien AsPc, BxPc-3 und MIAPaCa-2 feststellen. In der Literatur lassen sich viele Studien finden, in denen bei verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien sowohl die IL-8-Produktion als auch die Expression des CXCR2 nachgewiesen wurde^{54;82}.

In einem *in vitro* Proliferations Assay konnte der durch CXCR2-Inhibition und damit IL-8-Blockade vermutete antiproliferative Effekt auf HUVEC Zellen gezeigt werden. Die Behandlung der Zellen mit dem CXCR2-Antagonist SB225002 (Calbiochem, Merck) in hohen Konzentrationen (>0,2µM) verursachte eine starke Abnahme der Zellproliferation, eine signifikante antiproliferative Aktivität von SB225002 auf die HUVEC Zellen konnte allerdings bereits ab einer Konzentration von 0,1µM beobachtet werden ($IC_{50}=0,15\mu M$). Keinerlei Effekt zeigte SB225002 auf die Proliferation von L3.6pl Zellen bedingt durch das Fehlen des CXCR2-Rezeptors auf der Zelloberfläche der L3.6pl Zellen. Diese *in vitro* Ergebnisse unterstützen unsere Theorie, dass die Tumorvolumeninhibition im unten näher erläuterten *in vivo* Nacktmausmodell durch einen direkten Effekt von SB225002 auf die Endothelzellen und nicht auf die Tumorzellen L3.6pl vermittelt wird.

Um mehr Informationen über die komplexen angiogenen Prozesse *in vitro* zu gewinnen, haben wir uns die Fähigkeit der Endothelzellen, nach angiogener Stimulation sogenannte „Sprouts“ zu formen, zu Nutze gemacht. Es ist bekannt, dass

Zellen, die in Form eines Spheroids in eine Kollagenmatrix eingebettet werden, viel sensitiver gegenüber sowohl pro-angiogenetischen als auch anti-angiogenetischen Substanzen sind als Zellen in Einzelkultur. Begründet liegt dies darin, dass Proliferation nur ein Teilespekt der Angiogenese ist und andere Punkte wie z.B. die Formbarkeit und Beweglichkeit von Zellen auch eine wichtige Rolle in angiogenen Prozessen einnehmen. Diese Feststellung war auch in unserem Spheroid Versuch zu erkennen; SB225002 zeigte - verglichen mit dem Proliferations Assay – bereits ab einer Konzentration von $0,025\mu\text{M}$ eine Inhibition des endothelialen „Sproutings“. Bei einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ wurde das „Sprouting“ der Spheroide komplett verhindert.

Um die Hypothese zu überprüfen, dass durch CXCR2-Inhibition eine Tumorwachstumsreduktion aufgrund von Angiogenese-Inhibition erreicht werden kann, haben wir ein *in vivo* Experiment durchgeführt, in dem Nacktmäuse mit einem orthotop implantierten L3.6pl Pankreastumor mit SB225002 und/oder Gemcitabine behandelt wurden. Nach 24 Tagen mit i.p. verabreichter SB225002 Monotherapie konnte eine signifikante Reduktion des Tumorvolumens von $0,84\text{cm}^3$ (Kontrollgruppe) auf $0,32\text{cm}^3$ festgestellt werden, vergleichbar mit dem Behandlungseffekt von Gemcitabine Monotherapie ($0,38\text{cm}^3$). Bei Kombination beider Medikamente ergab sich allerdings kein wesentlich additiver oder synergistischer Therapieeffekt am Primärtumor ($0,28\text{cm}^3$).

Hinsichtlich der systemischen Wirkung von SB225002 auf Metastasen bleibt festzustellen, dass in diesem Modell zum Untersuchungszeitpunkt noch nicht mit einer Lebermetastasierung oder Peritonealkarzinose zu rechnen war und wir deshalb keinen Unterschied zwischen Kontroll- und Versuchstieren beobachten konnten. Baker et al.⁴ beobachteten Lebermetastasen erst nach 35 Tagen; die Arbeitsgruppe von Bruns¹¹ konnte zeigen, dass die Lebermetastasen erst nach einer Beobachtungszeit von 45 Tagen auftraten.

Eine Reduktion der Inzidenz vergrößerter, befallener Lymphknoten wurde in unserem Experiment in keiner der Therapiegruppen erreicht. Zur Verträglichkeit von SB225002 lässt sich sagen, dass die tägliche intraperitoneale Applikation von allen Tieren gut toleriert wurde.

Die immunhistochemische Untersuchung des Proliferationsindex mittels Ki67-Färbung zeigte einen Rückgang proliferierender Zellen sowohl in der mit SB225002

Monotherapie behandelten Gruppe als auch in der Kombinationstherapie. Viel deutlicher allerdings stellten sich die Ergebnisse hinsichtlich der Mikrogefäßdichte mittels CD31-Färbung dar. Hier zeigte sich erwartungsgemäß ein ausgeprägter Rückgang der Mikrogefäßdichte in der Monotherapie mit SB225002 im Vergleich zur Kontrollgruppe (>50%); in den anderen beiden Behandlungsgruppen konnte eine ähnlich geringe Gefäßdichte ausgezählt werden. Zu allen mit SB225002 und/oder Gemcitabine therapierten Tumoren muss vermerkt werden, dass histologisch ein erhöhter Anteil an Nekrose im Vergleich zu den Kontrolltumoren zu erkennen war.

Unsere Ergebnisse bestätigen eine durch IL-8-Blockade mögliche Angiogenese-Inhibition und zeigen, dass durch CXCR2-Inhibition mit SB225002 eine Wachstumshemmung im orthotopen Pankreaskarzinommodell erreicht wird. Die Hypothese, dass die Reduktion des Tumorwachstums aufgrund anti-angiogenetischer - und nicht anti-proliferierender - Prozesse zustande kommt, wird durch den Fakt gestützt, dass nur die Endothelzellen bzw. HUVEC Zellen - und nicht die L3.6pl Tumorzellen selbst - den Rezeptor CXCR2 exprimieren. In diesem Punkt bietet unser Tumormodell einen Vorteil gegenüber den anti-angiogenetischen Tumormodellen anderer Arbeitsgruppen, in denen die Tumorzellen selbst auch den Rezeptor CXCR2 exprimieren und somit ein durch CXCR2-Inhibition hervorgerufener zusätzlicher anti-proliferativer Effekt nicht ausgeschlossen werden kann^{44;88}.

Auch wenn unsere Ergebnisse eine signifikante Reduktion der Tumogröße durch CXCR2-Inhibition zeigen, so haben wir außerdem in den mit SB225002 therapierten Tieren eine Zunahme der Tumornekrose festgestellt. Aus diesem Grund sollte die Tumogröße nicht als einziges Kriterium in der Beurteilung der Effektivität anti-angiogenetischer Therapie verwendet werden.

Neuere Studien zeigen, dass es durch bestimmte Mechanismen zu Resistenzentwicklungen selbst gegenüber anti-angiogener Therapie kommen kann und unterstreichen damit die Notwendigkeit zur Entwicklung neuer Strategien, die sich gegen mehrere Mediatoren der Angiogenese richten⁴⁷. Die Inhibition des CXCR2-Rezeptors erscheint uns aufgrund unserer Ergebnisse als potentielles Therapieverfahren in der Entwicklung neuer anti-angiogener Substanzen gegen Tumore im Allgemeinen und speziell im Kampf gegen das Pankreaskarzinom.

Weitere Untersuchungen sind allerdings notwendig, um die Effektivität der CXCR2-Inhibitoren in Kombination mit konventioneller Chemotherapie zu beurteilen.

6 Zusammenfassung

Das Pankreasadenokarzinom stellt aufgrund der hohen Letalität inzwischen die vierhäufigste Krebstodesursache dar. Charakteristisch für die Erkrankung ist eine frühzeitige lymphogene und hämatogene Metastasierung und die häufig späte Diagnosestellung aufgrund fehlender klinischer Frühsymptome. Die letztendlich schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms führte in den letzten Jahren dazu, neben der zytotoxischen oder zytostatischen Therapie von Neoplasien eine neue Strategie zur Behandlung von Tumorerkrankungen zu entwickeln.

Einen großen Forschungsbereich nimmt inzwischen die Entwicklung anti-angiogenetischer Therapie ein, bei der die Substanzen auf die Zerstörung bzw. Hemmung des die Neoplasie versorgenden Gefäßnetzwerkes abzielen.

Das Ziel dieser vorliegenden Arbeit war es, herauszufinden, ob eine CXCR2-Inhibition (und damit verbundene IL-8-Blockade) im orthotopen Pankreaskarzinom eine Wachstumsinhibition aufgrund von anti-angiogenetischen Prozessen bewirken kann. Um diese These zu beweisen, wurde die Wirksamkeit von dem CXCR2-Inhibitor SB225002 allein und in Kombination mit Gemcitabine auf die Angiogenese und das Tumorwachstum im orthotopen Nacktmausmodell der humanen Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl untersucht.

Vorbereitend für dieses *in vivo* Tumormodell wurde zunächst die IL-8-Produktion und CXCR2-Expression von verschiedenen humanen Pankreaskarzinomzelllinien (L3.6pl, FG, AsPc, BxPc-3, MIAPaCa-2), SMC Zellen und HUVEC Endothelzellen untersucht. Alle getesteten Zelllinien wiesen eine über mehrere Tage ansteigende IL-8-Eigenproduktion auf, wobei die L3.6pl, MIAPaCa-2 und SMC Zellen die im Vergleich stärkste IL-8-Produktion zeigten. Hinsichtlich CXCR2 konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Zelllinien den CXCR2-Rezeptor an ihrer Oberfläche exprimieren mit Ausnahme der in unserem Tumormodell verwendeten Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl.

Im *in vitro* WST Proliferations Assay konnte eine Inhibition der Proliferation von HUVEC Zellen nach Behandlung mit SB225002 nachgewiesen werden ($IC_{50}=0,15\mu M$). Außerdem wurde im *in vitro* Spheroid Assay das endotheliale „Sprouting“ der HUVEC Zellen mit SB225002 inhibiert.

In vivo zeigte sich durch die Behandlung der Mäuse mit SB225002 im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Wachstumsinhibition der orthotop implantierten

Pankreastumore. Mit Gemcitabine Monotherapie wurde eine ähnlich starke Reduktion der Tumorgröße erreicht; die Kombination von SB225002 und Gemcitabine zeigte allerdings keinen additiven Effekt.

In der immunhistochemischen Ki67-Färbung der Tumorpräparate war die Anzahl der proliferierenden Zellen (Ki67 positiv) nach Behandlung mit SB225002 bis zu 40% im Vergleich zu den Kontrolltieren reduziert. Die CD31-Färbung der Tumorpräparate zeigte eine deutliche Abnahme der Mikrogefäßdichte als Ausdruck der anti-angiogenen Wirkung von SB225002 in orthotopen Pankreaskarzinomen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die anti-angiogenetische Wirksamkeit des CXCR2-Inhibitors SB225002 auf das Tumorwachstum in einem orthotopen Pankreaskarzinom-Modell nachgewiesen. Unsere Ergebnisse zeigen übereinstimmend mit den Daten anderer Forschungsgruppen, dass die Blockierung von CXCR2 durch Antikörper zur Inhibition der Tumorangiogenese führt.

Die CXCR2-Inhibition scheint demnach ein vielversprechender Ansatz in der anti-angiogenetischen Therapie gegen das Pankreaskarzinom zu sein. SB225002 könnte, gegebenenfalls auch in Kombination mit konventioneller Chemotherapie, zur Entwicklung potentiell wirksamerer therapeutischer Verfahren in der Behandlung dieses prognostisch ungünstigen Tumors beitragen.

7 Literaturverzeichnis

Reference List

1. Abbruzzese JL. Phase I studies with the novel nucleoside analog gemcitabine. *Semin.Oncol.* 1996;23:25-31.
2. Addison CL, Daniel TO, Burdick MD et al. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J.Immunol.* 2000;165:5269-77.
3. Baggolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J.Clin.Invest* 1989;84:1045-9.
4. Baker CH, Solorzano CC, Fidler IJ. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor and epidermal growth factor receptor signaling for therapy of metastatic human pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2002;62:1996-2003.
5. Baldwin ET, Weber IT, St CR et al. Crystal structure of interleukin 8: symbiosis of NMR and crystallography. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991;88:502-6.
6. Ben-Baruch A, Bengali KM, Biragyn A et al. Interleukin-8 receptor beta. The role of the carboxyl terminus in signal transduction. *J.Biol.Chem.* 1995;270:9121-8.
7. Bramhall SR, Rosemurgy A, Brown PD et al. Marimastat as first-line therapy for patients with unresectable pancreatic cancer: a randomized trial. *J.Clin.Oncol.* 2001;19:3447-55.
8. Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro.-oncol.* 2005;7:122-33.
9. Brew R, Erikson JS, West DC et al. Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro. *Cytokine* 2000;12:78-85.
10. Brower V. Tumor angiogenesis--new drugs on the block. *Nat.Biotechnol.* 1999;17:963-8.
11. Bruns CJ, Harbison MT, Davis DW et al. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms. *Clin.Cancer Res.* 2000;6:1936-48.
12. Bruns CJ, Harbison MT, Kuniyasu H et al. In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice. *Neoplasia.* 1999;1:50-62.
13. Burris HA, III, Moore MJ, Andersen J et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J.Clin.Oncol.* 1997;15:2403-13.

14. Carreras CW, Santi DV. The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. *Annu.Rev.Biochem.* 1995;64:721-62.
15. Casper ES, Green MR, Kelsen DP et al. Phase II trial of gemcitabine (2,2'-difluorodeoxycytidine) in patients with adenocarcinoma of the pancreas. *Invest New Drugs* 1994;12:29-34.
16. Cerretti DP, Kozlosky CJ, Vanden BT et al. Molecular characterization of receptors for human interleukin-8, GRO/melanoma growth-stimulatory activity and neutrophil activating peptide-2. *Mol.Immunol.* 1993;30:359-67.
17. Clore GM, Appella E, Yamada M et al. Three-dimensional structure of interleukin 8 in solution. *Biochemistry* 1990;29:1689-96.
18. Cohen J. Behind the headlines of endostatin's ups and downs. *Science* 1999;283:1250-1.
19. El-Rayes BF, Shields AF, Vaitkevicius V et al. Developments in the systemic therapy of pancreatic cancer. *Cancer Invest* 2003;21:73-86.
20. Ferrara N, Houck K, Jakeman L et al. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr.Rev.* 1992;13:18-32.
21. Ferrara N, vis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr.Rev.* 1997;18:4-25.
22. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin.Cancer Biol.* 1992;3:65-71.
23. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat.Med.* 1995;1:27-31.
24. Folkman J, Hanahan D. Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. *Princess Takamatsu Symp.* 1991;22:339-47.
25. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987;235:442-7.
26. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J.Biol.Chem.* 1992;267:10931-4.
27. Fontanini G, Bigini D, Vignati S et al. Microvessel count predicts metastatic disease and survival in non-small cell lung cancer. *J.Pathol.* 1995;177:57-63.
28. Freelove R, Walling AD. Pancreatic cancer: diagnosis and management. *Am.Fam.Physician* 2006;73:485-92.
29. Garcea G, Neal CP, Pattenden CJ et al. Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: a systematic review. *Eur.J.Cancer* 2005;41:2213-36.
30. Gilly FN, Gerard JP, Braillon G et al. IORT in pancreatic adenocarcinoma. *Front Radiat.Ther.Oncol.* 1997;31:181-3.

31. Gunderson LL, Martin JK, Kvols LK et al. Intraoperative and external beam irradiation +/- 5-FU for locally advanced pancreatic cancer. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 1987;13:319-29.
32. Gupta SK, Lysko PG, Pillarisetti K et al. Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *J.Biol.Chem.* 1998;273:4282-7.
33. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-64.
34. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat.Rev.Cancer* 2002;2:38-47.
35. Harris AL. Antiangiogenesis for cancer therapy. *Lancet* 1997;349 Suppl 2:SII13-SII15.
36. Harris AL. Are angiostatin and endostatin cures for cancer? *Lancet* 1998;351:1598-9.
37. Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB et al. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J.Biol.Chem.* 2003;278:8508-15.
38. Heits F, Wiedemann GJ, Jelkmann W. [Vascular endothelial growth factor VEGF stimulates angiogenesis in good and bad situations]. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 1998;123:259-65.
39. Henne-Bruns D, Vogel I, Lutgjes J et al. Ductal adenocarcinoma of the pancreas head: survival after regional versus extended lymphadenectomy. *Hepatogastroenterology* 1998;45:855-66.
40. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat.Med.* 1995;1:149-53.
41. Inoue K, Slaton JW, Eve BY et al. Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastases in androgen-independent prostate cancer. *Clin.Cancer Res.* 2000;6:2104-19.
42. Jacobs AD. Gemcitabine-based therapy in pancreas cancer: gemcitabine-docetaxel and other novel combinations. *Cancer* 2002;95:923-7.
43. Kasperk R, Klever P, Andreopoulos D et al. Intraoperative radiotherapy for pancreatic carcinoma. *Br.J.Surg.* 1995;82:1259-61.
44. Keane MP, Belperio JA, Xue YY et al. Depletion of CXCR2 inhibits tumor growth and angiogenesis in a murine model of lung cancer. *J.Immunol.* 2004;172:2853-60.
45. Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat.Rev.Cancer* 2002;2:727-39.

46. Kerbel RS. A cancer therapy resistant to resistance. *Nature* 1997;390:335-6.
47. Kerbel RS, Yu J, Tran J et al. Possible mechanisms of acquired resistance to anti-angiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches. *Cancer Metastasis Rev.* 2001;20:79-86.
48. Kindler HL. Front-line therapy of advanced pancreatic cancer. *Semin.Oncol.* 2005;32:S33-S36.
49. Kindler HL. The pemetrexed/gemcitabine combination in pancreatic cancer. *Cancer* 2002;95:928-32.
50. Kindler HL, Friberg G, Singh DA et al. Phase II trial of bevacizumab plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J.Clin.Oncol.* 2005;23:8033-40.
51. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 1992;258:1798-801.
52. Korff T, Augustin HG. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J.Cell Biol.* 1998;143:1341-52.
53. Kroll J, Waltenberger J. [Regulation of the endothelial function and angiogenesis by vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A)]. *Z.Kardiol.* 2000;89:206-18.
54. Kuwada Y, Sasaki T, Morinaka K et al. Potential involvement of IL-8 and its receptors in the invasiveness of pancreatic cancer cells. *Int.J.Oncol.* 2003;22:765-71.
55. Li A, Dubey S, Varney ML et al. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J.Immunol.* 2003;170:3369-76.
56. Li A, Varney ML, Singh RK. Constitutive expression of growth regulated oncogene (gro) in human colon carcinoma cells with different metastatic potential and its role in regulating their metastatic phenotype. *Clin.Exp.Metastasis* 2004;21:571-9.
57. Lowenfels AB, Maisonneuve P. Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best.Pract.Res.Clin.Gastroenterol.* 2006;20:197-209.
58. Luca M, Huang S, Gershenwald JE et al. Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *Am.J.Pathol.* 1997;151:1105-13.
59. Mancuso A, Calabro F, Sternberg CN. Current therapies and advances in the treatment of pancreatic cancer. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* 2006;58:231-41.
60. Miller MD, Krangel MS. Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit Rev.Immunol.* 1992;12:17-46.

61. Miyamoto M, Shimizu Y, Okada K et al. Effect of interleukin-8 on production of tumor-associated substances and autocrine growth of human liver and pancreatic cancer cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 1998;47:47-57.
62. Moore BB, Arenberg DA, Addison CL et al. CXC chemokines mechanism of action in regulating tumor angiogenesis. *Angiogenesis.* 1998;2:123-34.
63. Moore MJ, Hamm J, Dancey J et al. Comparison of gemcitabine versus the matrix metalloproteinase inhibitor BAY 12-9566 in patients with advanced or metastatic adenocarcinoma of the pancreas: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J.Clin.Oncol.* 2003;21:3296-302.
64. Murdoch C, Monk PN, Finn A. Cxc chemokine receptor expression on human endothelial cells. *Cytokine* 1999;11:704-12.
65. Murphy PM. Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996;7:47-64.
66. O'Reilly MS. Radiation combined with antiangiogenic and antivascular agents. *Semin.Radiat.Oncol.* 2006;16:45-50.
67. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997;88:277-85.
68. Oberlin E, Amara A, Bachelerie F et al. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 1996;382:833-5.
69. Plate KH, Breier G, Millauer B et al. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 1993;53:5822-7.
70. Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 1997;90:909-28.
71. Rosen L. Antiangiogenic strategies and agents in clinical trials. *Oncologist.* 2000;5 Suppl 1:20-7.
72. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 2000;18:217-42.
73. Saurer L, Reber P, Schaffner T et al. Differential expression of chemokines in normal pancreas and in chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 2000;118:356-67.
74. Schadendorf D, Moller A, Algermissen B et al. IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor. *J.Immunol.* 1993;151:2667-75.
75. Schraufstatter IU, Chung J, Burger M. IL-8 activates endothelial cell CXCR1 and CXCR2 through Rho and Rac signaling pathways. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2001;280:L1094-L1103.

76. Singh RK, Gutman M, Radinsky R et al. Expression of interleukin 8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice. *Cancer Res.* 1994;54:3242-7.
77. Smith DR, Polverini PJ, Kunkel SL et al. Inhibition of interleukin 8 attenuates angiogenesis in bronchogenic carcinoma. *J.Exp.Med.* 1994;179:1409-15.
78. Sozzani S, Locati M, Zhou D et al. Receptors, signal transduction, and spectrum of action of monocyte chemotactic protein-1 and related chemokines. *J.Leukoc.Biol.* 1995;57:788-94.
79. Stathopoulos GP, Mavroudis D, Tsavaris N et al. Treatment of pancreatic cancer with a combination of docetaxel, gemcitabine and granulocyte colony-stimulating factor: a phase II study of the Greek Cooperative Group for Pancreatic Cancer. *Ann.Oncol.* 2001;12:101-3.
80. Strieter RM, Burdick MD, Mestas J et al. Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. *Eur.J.Cancer* 2006;42:768-78.
81. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J.Biol.Chem.* 1995;270:27348-57.
82. Takamori H, Oades ZG, Hoch OC et al. Autocrine growth effect of IL-8 and GROalpha on a human pancreatic cancer cell line, Capan-1. *Pancreas* 2000;21:52-6.
83. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M et al. Tumor angiogenesis and mode of metastasis in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* 1997;57:1043-6.
84. Taub DD, Oppenheim JJ. Chemokines, inflammation and the immune system. *Ther.Immunol.* 1994;1:229-46.
85. Tavani A, Pagnolato A, Negri E et al. Alcohol consumption and risk of pancreatic cancer. *Nutr.Cancer* 1997;27:157-61.
86. Touroutoglou N, Gravel D, Raber MN et al. Clinical results of a pharmacodynamically-based strategy for higher dosing of gemcitabine in patients with solid tumors. *Ann.Oncol.* 1998;9:1003-8.
87. Von MZ, Scholz A, Cramer T et al. Effects of interferon alpha on vascular endothelial growth factor gene transcription and tumor angiogenesis. *J.Natl.Cancer Inst.* 2003;95:437-48.
88. Wente MN, Keane MP, Burdick MD et al. Blockade of the chemokine receptor CXCR2 inhibits pancreatic cancer cell-induced angiogenesis. *Cancer Lett.* 2006;241:221-7.
89. Wess J. G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J.* 1997;11:346-54.

90. White JR, Lee JM, Young PR et al. Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. *J.Biol.Chem.* 1998;273:10095-8.
91. Wolf M, Delgado MB, Jones SA et al. Granulocyte chemotactic protein 2 acts via both IL-8 receptors, CXCR1 and CXCR2. *Eur.J.Immunol.* 1998;28:164-70.
92. Yang GY, Wagner TD, Fuss M et al. Multimodality approaches for pancreatic cancer. *CA Cancer J.Clin.* 2005;55:352-67.
93. Zhu YM, Webster SJ, Flower D et al. Interleukin-8/CXCL8 is a growth factor for human lung cancer cells. *Br.J.Cancer* 2004;91:1970-6.

8 Abkürzungen

Ag	Antigen
AK	Antikörper
Ang1	Angiopoetin-1
ATCC	American type culture collection
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BCA-1/BLC	B cell-attracting chemokine-1/B-lymphocyte chemoattractant
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD31 (PECAM-1)	Cluster determinant 31
	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
c-erbB2	Cellular avian erythroblastosis homologue B2
CXCR	CXC-Chemokin-Rezeptor
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF(R)	Epidermal growth factor (receptor)
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
ENA78	Epithelial neutrophil activating protein 78
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FGF(R)	Fibroblast growth factor (receptor)
5-FU	5-Fluoruracil
GCP-2	Granulocyte chemotactic protein-2
GDP	Guanosindiphosphat
Gem	Gemcitabine
GRO	Growth-related oncogene
GTP	Guanosintriphosphat
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HRP	Horseradish peroxidase
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells

IFN	Interferon
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IL	Interleukin
ioRT	intraoperative Radiotherapie
i.p.	intraperitoneal
IP ₃	Inositoltriphosphat
IP-10	Interferon-inducible protein 10
I-TAC	Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant
KGF	Keratinocyte growth factor
Met/HGF	Met/Hepatocyte growth factor
MIG	Monokine-induced by interferon-gamma
MMP	Matrix-Metalloproteinase
NF-kappaB	Nuclear factor-kappaB
NRP-1	Neuropilin-1
PDGF	Platelet-derived growth factor
PBP	Platelet basic protein
PBS	Phosphat-gepufferte Lösung (Phosphate buffered saline)
PF4	Platelet factor 4
PIP ₂	Phosphatidylinositolphosphat
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
R0	Makroskopisch und mikroskopisch kein Nachweis eines Residualtumors
R1	Mikroskopisch nachweisbarer Residualtumor
RAS	Proto-Onkogen
Rpm	Revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDF-1/PBSF	Stromal cell-derived factor-1/Pre-B cell growth-stimulating factor
Src	Tyrosinkinase, Proto-Onkogen
TBS	Tris-gepufferte Lösung (Tris buffered saline)
TGFbeta	Transforming growth factor beta
Tie2	Endothel-spezifischer Tyrosinkinase-Rezeptor
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase

TNF-alpha	Tumor necrosis factor alpha
TSP1,2	Thrombospondin-1,-2
VEGF(R)	Vascular endothelial growth factor (receptor)

9 Abbildungen

Abb. 1.1	Biologische Funktionen der Chemokine und Chemorezeptoren	9
Abb. 1.2	Biologische Prozesse und Moleküle in der Regulation der Angiogenese	11
Abb. 1.3	Regulation der IL-8-Expression in Tumorzellen	13
Abb. 1.4	Signalkaskaden und Funktionen der Chemokinrezeptoren CXCR1, CXCR2 und DARC.....	15
Abb. 3.1	<i>In vivo</i> Selektion der humanen Pankreasadenokarzinomzelllinie L3.6pl..	28
Abb. 3.2	Orthotope Tumorzellinjektion	30
Abb. 4.1	Quantifizierung der IL-8-Produktion verschiedener Zelllinien im Verlauf von 5 Tagen mittels ELISA Verfahren.....	38
Abb. 4.2	CXCR2 Rezeptornachweis auf verschiedenen Zelllinien mittels FACS Analyse	39
Abb. 4.3	Inhibition der Proliferation von Endothelzellen durch SB225002 im <i>in vitro</i> WST Proliferations Assay	40
Abb. 4.4	Behandlung von L3.6pl Zellen mit SB225002 im <i>in vitro</i> WST Proliferations Assay	41
Abb. 4.5	<i>In vitro</i> Spheroid Angiogenese Modell nach Behandlung mit SB225002 in verschiedenen Konzentrationen.....	42
Abb. 4.6	<i>In vitro</i> Inhibition des endothelialen Sproutings nach Behandlung mit SB225002 im Spheroid Modell.....	43
Abb. 4.7	Tiergewichtsverlauf im orthotopen Nacktmausmodell.....	44
Abb. 4.8	Tumorvolumenverlauf im orthotopen Nacktmausmodell	45
Abb. 4.9	<i>In vivo</i> Inhibition des L3.6pl Tumorvolumens nach SB225002 +/- Gemcitabine Therapie im orthotopen Nacktmausmodell	47
Abb. 4.10	Immunhistochemische Analyse proliferierender Zellen mittels Ki67- Färbung (Bilder 40x Vergrößerung)	48
Abb. 4.11	Quantifizierung der proliferierenden Zellen nach Ki67-Färbung.....	48
Abb. 4.12	Immunhistochemische Analyse der Mikrogefäßdichte mittels CD31- Färbung (Bilder 20x Vergrößerung)	49
Abb. 4.13	Quantifizierung der Mikrogefäßdichte nach CD31-Färbung	49

10 Tabellen

Tab. 1.1	Anti-angiogenetische Substanzen in klinischen Phase-I, -II, -III-Studien ...	5
Tab. 1.2	Aktivatoren und Inhibitoren der Angiogenese und ihre Funktionen.....	7
Tab. 1.3	Chemokinrezeptoren und ihre Liganden ⁸⁷	10
Tab. 1.4	ELR ⁺ und ELR ⁻ CXC-Chemokine und ihre angiogenetische Antwort im CMP Assay (cornealmicropocket model of angiogenesis) allein und in Kombination ⁷⁶	11
Tab. 1.5	Eigenschaften der Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2 im Vergleich.....	14
Tab. 4.1	Therapeutischer Effekt von SB225002 +/- Gemcitabine auf das Primärtumorwachstum und die Metastasierung beim humanen Pankreaskarzinom (L3.6pl) im orthotopen Nacktmausmodell.....	43

11 Danksagung

Mit dem Abschluss dieser Dissertation danke ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Karl-Walter Jauch, Direktor der Chirurgischen Klinik Großhadern, für die Möglichkeit, diese Arbeit an seiner Klinik erstellen zu dürfen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. Christiane J. Bruns für das Studiendesign, ihre vielen Anregungen und Hilfsbereitschaft bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Christopher Heeschen, Leiter der Experimentellen Forschung Chirurgie Großhadern, danke ich für seine Ideen und Ratschläge.

Ebenfalls gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Forschungslabors der Klinik und Poliklinik für Chirurgie für ihre fachliche Hilfe und emotionale Unterstützung.

Ganz besonders danke ich Sabine Schrepfer, Ivan Ischenko und Michael Brückel, die mir immer hilfreich zur Seite standen.

Außerdem möchte ich meinen Eltern und Schwestern einen großen Dank aussprechen, die mich immer unterstützen und ohne die mein Studium und die Dissertation so nie möglich gewesen wären. Ein großes Dankeschön gilt auch meinem Freund Michael, der meine Launen ertragen musste und mich immer wieder aufgefangen hat.

12 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Albrecht
Vorname: Ulrike
Geburtsdatum: 26.06.1978
Geburtsort: Braunschweig
Eltern: Irene Albrecht, geb. Thun
Wolfram Albrecht

Ausbildung

1984 – 1997	Grundschule, Orientierungsstufe und Gymnasium, Wolfenbüttel
1997 – 1998	Au Pair-Aufenthalt in den USA
1999 – 2005	Studium der Humanmedizin FU/HU Berlin Universitat de Barcelona, Spanien LMU München
2005 – 2006	Praktisches Jahr Innere Medizin, Klinikum Harlaching, LMU München Chirurgie, RNSH, University of Sydney, Australien Chirurgie, Klinikum Schwabing, LMU München Gynäkologie, 1.UFK Innenstadt, LMU München
Seit 08/2007	Assistenzärztin der Gynäkologie, Klinikum Traunstein