

Matthias Martin Gaida
Dr. med.

Die CXC-Chemokin-Rezeptorachse CXCL16-CXCR6 beim Pankreaskarzinom – eine Schaltstelle für Invasivität, Tumorprogression und Tumorzell-Immunzell-Interaktion

Geboren am 24.08.1982 in Traunstein
Staatsexamen am 28.10.2008 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Chirurgie
Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Helmut Friess

Das Pankreaskarzinom stellt mit ungefähr 30.000 Neuerkrankungen jährlich in Europa die fünfthäufigste Todesursache unter allen Krebserkrankungen dar. Die 5-Jahresüberlebensrate liegt gegenwärtig unter 4%. Als Faktoren für das aggressive Verhalten des Pankreaskarzinoms spielen sein sehr schnelles, invasives Wachstum sowie eine frühzeitig einsetzende Metastasierung eine essentielle Rolle. Diese Vorgänge sind nicht nur gesteuert durch eine Fehlregulation von Wachstumsfaktoren und chemotaktischen Mediatoren und deren Rezeptoren, sondern auch durch eine massive induzierte inflammatorische Reaktion in der Tumorumgebung. Aktuelle Behandlungskonzepte aus Chemotherapien haben noch keinen wesentlichen Durchbruch in der Verbesserung des Überlebens bei Patienten mit Pankreaskarzinom erbracht. Die einzig potentiell kurative Therapie stellt die radikale chirurgische Resektion dar. Somit ist die Suche nach neuen Therapieoptionen einhergehend mit der Entschlüsselung der Funktion neuer molekularer Strukturen und Mediatoren, wie beispielsweise die der Chemokine und ihrer Rezeptoren, eine Säule in der onkologischen Pankreasforschung zur Etablierung moderner multimodaler Therapiekonzepte.

Chemokine, ursprünglich in Entzündungsreaktionen beschriebene Mediatormoleküle, spielen bezüglich des Wachstums und der Invasivität von soliden Tumoren sowie in der Triggerung einer peritumoralen Entzündungsreaktion beziehungsweise einer Tumorzell-Immunzell-Interaktion eine essentielle Rolle. Bis dato gibt es noch keine Arbeiten darüber, welche Rolle das CXC-Chemokin CXCL16 und sein Rezeptor CXCR6 in der Pathophysiologie des Pankreaskarzinomes spielen.

Der erste Teil der Arbeit befasst sich mit Expressionsstudien auf mRNA- und Proteinebene von CXCL16 und CXCR6 in Pankreastumor- und Normalgeweben sowie Gewebe von chronischer Pankreatitis und in Tumorkulturzellen. Dabei kamen Verfahren wie QRT-PCR, Western Blot, Immunfluoreszenz, Immunhistochemie und FACS zur Anwendung. Funktionelle Versuche mittels Inkubation von Pankreastumorzellen mit rhCXCL16, wie Zytotoxizitätsstudien, dargestellt als MTT-Versuch und Kristallviolett-färbungen sowie Invasionsversuche sollten modellhaft mögliche biologische Funktionen von CXCL16 aufzeigen. Durch Schaffung eines artifiziellen Entzündungsumfeldes, im Sinne einer Inkubation von Tumorzellen mit proinflammatorischen Zytokinen, sollte eine gesteigerte Produktion des CXCL16 durch Tumorzellen untersucht werden. Regulative Einflüsse der Disintegrinähnlichen und Matrixproteinase ADAM10 auf eine zellgesteuerte CXCL16-Liberation sollten mittels siRNA Transfektion von Tumorzellen und anschließenden ELISA-Messungen untersucht werden. Schließlich wurde, mittels Serumdiagnostik durch ELISA und SELDI-TOF Massenspektrometrie, nach der löslichen Form von CXCL16 in Patientenseren gefahndet und diese mit Spenderseren korreliert.

Die zweite Säule dieser Arbeit stellt die Untersuchung der Interaktion von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) mit Pankreaskarzinomzellen über die Achse CXCL16-CXCR6. Hierbei wurden Immunfluoreszenzanalysen von Gewebe zur Detektion von CXCR6 positiven PMN im Tumorgewebe durchgeführt. Ebenso wurden periphere Blutzellen von Pankreaskarzinompatienten und Spendern in FACS-Analysen auf CXCR6-Expression untersucht. Als Vergleichskollektiv wurden zudem noch periphere Blut-PMN von Osteitispatienten und lokal infiltrierende PMN aus Wunddrainagen auf CXCR6-Expression getestet. Stimulationsversuche zur Aufregulation von CXCR6 auf PMN mit proinflammatorischen Zytokinen wurden durchgeführt und im FACS gemessen. Schließlich wurde die Migration von PMN in einem Boyden-Kammer-Versuch mit rhCXCL16 sowie Überständen von CXCL16 produzierenden Tumorzellen und ADAM10 siRNA transfizierten Tumorzellen untersucht.

Sowohl die membrangebundene Form von CXCL16 als auch der korrespondierende Rezeptor CXCR6 sind im Pankreaskarzinomgewebe und im Gewebe von chronischer Pankreatitis auf mRNA Ebene im Vergleich zu gesundem Gewebe signifikant überexprimiert. Zudem werden sowohl CXCL16 als auch CXCR6 auf Proteinebene exprimiert, wiederum deutlich stärker im Pankreaskarzinom und der chronischen Pankreatitis, verglichen zu gesundem Gewebe. In immunhistochemischen Untersuchungen wurden in 85% der Karzinomgewebsschnitte CXCL16 positive Tumorzellen und in sämtlichen Gewebeproben CXCR6 positive Tumorzellen gefunden. Besonders stark ausgeprägt war die immunhistochemische Reaktion für beide Moleküle in peritumoralem inflammatorisch verändertem Parenchym, wie beispielsweise tubulären Komplexen sowie an der invasiven Front des Tumors. Dies könnte dafür sprechen, dass das Rezeptor-Liganden-Paar Einflüsse auf Umbauvorgänge während der Karzinogenese hat. Ebenso enthielten alle getesteten Tumorzellen CXCL16 und CXCR6 mRNA. Die vier für in vitro Versuche benutzten Pankreaskarzinomzelllinien Capan-1, COLO-357, T3M4 und BxPC3 exprimierten sowohl CXCL16 als auch seinen Rezeptor auf Proteinebene und waren zudem in der Lage die lösliche Form von CXCL16 zu produzieren. Insbesondere sind Einflüsse auf eine Interaktion zwischen Entzündungsgeschehen und Tumor zu postulieren, da proinflammatorische Zytokine wie TNF α und IFN γ die Produktion von löslichem CXCL16 durch Tumorzellen steigern können. Einflüsse von löslichem CXCL16 auf das Wachstum von Tumorzellen konnten nicht festgestellt werden. Jedoch vermag CXCL16 Tumorzellen zu einer signifikanten Invasivitätssteigerung verhelfen. Ein durchschnittlich um den Faktor 2 signifikant erhöhter CXCL16-Serumspiegel bei Karzinompatienten lässt Schlüsse auf eine mögliche systemische Komponente des Tumors zu. Eine regulative Verminderung der Liberation von CXCL16 durch Tumorzellen konnte durch eine siRNA-vermittelte ADAM10 Blockade erreicht werden. Zudem konnte erstmalig gezeigt werden, dass polymorphkernige neutrophile Granulozyten den Chemokinrezeptor CXCR6 exprimieren. Diese Expression ist jedoch ausschließlich lokal im inflammatorisch veränderten Umfeld des Tumors nachweisbar, beziehungsweise in der akuten Entzündung. Auf peripheren PMN konnte CXCR6 nur marginal detektiert werden, sowohl bei Spendern als auch bei Patienten. Durch Entzündungsmediatoren ist CXCR6 auf PMN hochregulierbar. Durch Tumorzellen sezerniertes CXCL16 steigerte die Migrationsfähigkeit von PMN signifikant. Somit kann man dem von Tumorzellen freigesetzten CXCL16 sowohl autokrine Eigenschaften als auch Interaktionen mit dem peritumoralem Entzündungsumfeld zuschreiben.