

Sarah Anna Julia Adolph
Dr. med.

Antimikrobielles Peptid Defensin Alpha 1 als mögliche Verbindung zwischen chronischer Entzündung und duktalem Adenokarzinom des Pankreas

Fach/Einrichtung: Chirurgie
Doktorvater: Prof. Dr. med. Werner Hartwig

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas gehört auch heute noch zu den zehn häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland. Bedingt durch die im Vergleich zu vielen anderen Tumoren in den letzten Jahren gleichbleibend sehr schlechte Prognose mit einer 5 Jahres Überlebensrate von unter 5 % ist es von großer Bedeutung die Ursachen und Zusammenhänge der Karzinogenese bei dieser Erkrankung besser zu verstehen.

Bekannt ist, dass überdurchschnittlich häufig Patienten mit einer chronischen Entzündung des Pankreas ein Pankreaskarzinom entwickeln. Das Verständnis der molekularen Mechanismen am Übergang der chronischen Entzündung zur malignen Entartung erscheint deshalb von essenzieller Bedeutung um neue präventive und therapeutische Strategien entwickeln zu können.

Proteine der angeborenen Immunabwehr, sogenannte Defensine, werden bei akuten und chronischen Entzündungen von Entzündungszellen und Schleimhautepithelzellen sezerniert. Sie haben zahlreiche Funktionen bei der Bekämpfung mikrobieller Erreger der Körperzellen. Auf der anderen Seite wird ihnen jedoch auch eine wichtige Rolle in der Entstehung vieler maligner Tumoren auf dem Boden chronischer Entzündungen zugeschrieben, etwa im Nasenrachenraum, im Urogenital- oder Gastrointestinaltrakt. Dabei scheinen einige Defensine zur Karzinomentwicklung beizutragen, andere diese jedoch zu verhindern.

Durch immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten aus humanem gesundem Pankreasgewebe, chronischer Pankreatitis (CP) sowie duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) konnten eine differierende Defensin Alpha 1 Expression gezeigt werden. Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels Massenspektrometrie gezielt in Gewebeproben aus den genannten Geweben nach dem Vorhandensein von Defensin Alpha 1 gesucht und das Vorkommen miteinander verglichen. Dazu wurden aus unterschiedlichen menschlichen Gewebeproben, nach gründlicher Eingruppierung durch einen in der Beurteilung von Pankreasgewebe spezialisierten Pathologen Lysate gewonnen, welche mittels

Massenspektrometrie (SELDI-TOF-MS) qualitativ und quantitativ nach Defensin Alpha 1 untersucht wurden.

Zusätzlich wurde die Defensin Expression in vitro in einem Zellkultur-Modell mit drei unterschiedlichen Pankreas Karzinomzelllinien, sowie einer benignen immortalisierten Pankreas Epithelzelllinie (HPDE) untersucht. Diese wurden mit Entzündungsmediatoren wie TNF- α , IL-1 β und IFN- γ stimuliert und der Einfluss dieser Zytokine auf die Defensinproduktion gemessen.

In der immunhistochemischen Färbung der humanen Gewebeproben zeigte sich eine deutliche Überexpression in dem malignem Gewebe verglichen mit dem der chronischen Pankreatitis, und in diesem wiederum eine verstärkte Expression gegenüber dem gesunden Gewebe.

Die SELDI-TOF-Massenspektrometrie zeigte in vivo einen signifikant erhöhten Defensin Alpha 1 Gehalt in Pankreas Gewebeproben aus PDAC gegenüber Proben mit chronischer Pankreatitis ($p = 0,024$), sowie einen signifikant erhöhten Gehalt im PDAC verglichen mit gesundem Pankreasgewebe ($p = 0,003$).

In den in vitro Versuchen mit Lysaten und Überständen von Pankreas Karzinomzelllinien war der Defensin Alpha 1 Gehalt signifikant höher, verglichen mit den in benignen Pankreas Epithelzellen ($p = 0,05$ für Lysate, $p = 0,003$ für Überstände).

Die Inkubation von Pankreas Karzinomzelllinien mit proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β und IFN- γ) zeigte in allen Zellreihen einen signifikant erhöhten Gehalt von Defensin Alpha 1 in der Zellüberständen stimulierter Zellen, verglichen mit der unstimulierten Kontrolle (Bspw. Colo 357 mit IL-1 β nach 48 Stunden mit $p = 0,008$).

Im Zelllysat zeigte sich nach Stimulation in den ersten 24 Stunden ein tendenziell erniedrigter Gehalt mit anschließend leichtem Wiederanstieg im Vergleich mit den unstimulierten Zellen, bei denen es nach 48 Stunden zu einer weiteren signifikanten Abnahme kam (Panc-1 $p = 0,03$; T3M4 $p = 0,0002$).

Für die Stimulation mit TNF- α hingegen kam es in allen Tumorzelllinien zu einem Abfall der relativen Defensin Alpha 1 Konzentration im Lysat nach 48 Stunden, ohne signifikante Veränderung im Überstand. Im direkten Vergleich zwischen den Überständen und Lysaten kam es, mit einer Ausnahme für das Lysat der Zelllinie T3M4 ($p = 0,026$), zu keinen signifikanten Veränderungen nach 48 Stunden im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

Ohne Stimulation zeigte sich im zeitlichen Verlauf keine Veränderung in des Defensin Alpha 1 Gehaltes der gesunden Epithelzellen (HPDE). Mit Stimulation der gesunden Epithelzellen kam es zwar zu einer signifikanten Zunahme des Defensingehaltes im Überstand nach 48 Stunden im Vergleich zum Zeitpunkt 0 Stunden nach Stimulation mit IL-1 β ($p = 0,019$) und

IFN- γ ($p = 0,005$), sowie zu einem signifikanten Abfall im Lysat nach IL-1 β Stimulation ($p = 0,013$) jedoch mit einer wesentlich weniger starken Ausprägung im Vergleich zu den Tumorzellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl in Gewebeproben des PDAC und der CP sowie in Pankreas Karzinomzellen ein erhöhter Gehalt von Defensin Alpha 1 vorliegt. Gleichzeitig ließ sich die Freisetzung von Defensin Alpha 1 durch proinflammatorische Stimuli in den Pankreas Karzinomzellen und in den gesunden Pankreas Epithelzellen induzieren. Es zeigte sich jedoch ein wesentlich steilerer Anstieg des Defensingehaltes in den Karzinomzellen im Vergleich zu den gesunden Pankreas Epithelzellen. Dies deutet auf eine mögliche Beteiligung von Defensinen an der Verbindung zwischen chronischer Inflammation und maligner Transformation im Pankreas hin. In weiteren Untersuchungen gilt es die genaue Rolle, welche Defensine hierbei einnehmen, zu klären.