

Lena Welsch
Dr. sc. hum.

Einfluss des Histondeacetylase-Inhibitors 4-Phenylbutyrat auf die Clearance apoptotischer Pankreaskarzinomzellen durch Makrophagen

Promotionsfach: Chirurgie
Doktorvater: Prof. Dr. med. J. Werner, MBA

Die vorliegende Arbeit sollte zur Gewinnung neuer relevanter *in vitro*-Erkenntnisse über den Einsatz des HDAC-Inhibitors 4-PB zur Behandlung des duktales Pankreasadenokarzinoms (PDAC) und als Basis für nachfolgende *in vivo*-Studien dienen.

Die Wirkung von 4-PB auf die Apoptose und Nekrose der untersuchten PDAC-Tumorzelllinien T3M4, PANC-1 und AsPC-1, sowie die Phagozytose von apoptotischen Tumorzellen durch Makrophagen wurden alleine und in Kombination mit dem Standardchemotherapeutikum Gemcitabin *in vitro* analysiert. Die zeit- und konzentrationsabhängige Apoptose und Nekrose wurde durch Annexin V/PI-Markierung evaluiert und durch eine Expressionsanalyse der frühapoptotischen Apoptosemarker p21 und AnnexinA1 charakterisiert. Die Clearance von apoptotischen Zellen nach Behandlung mit 4-PB und 4-PB/Gemcitabin wurde mittels FACS-Analyse gemessen. Der Nachweis der Phagozytose der Tumorzellen erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Abschließend wurde der Einfluss von 4-PB auf die Freisetzung der Cytokine IL-8, 10 und TNF α durch Makrophagen nach der Phagozytose evaluiert. Somit konnten Informationen über die Tumor-Immunantwort durch Makrophagen nach der Phagozytose gewonnen werden.

Die Behandlung der untersuchten Karzinomzelllinien mit dem HDAC-Inhibitor 4-PB führte konzentrationsabhängig zu einer deutlichen Zunahme der apoptotischen und spätapoptotischen sowie zu einer geringeren Zunahme der nekrotischen Zellen im Vergleich zu nicht behandelten Zellen. Bei den beiden Karzinomzelllinien T3M4 und PANC-1 nahm der Anteil an apoptotischen Zellen mit zunehmender 4-PB-Konzentration statistisch signifikant zu, bei der Zelllinie AsPC-1 war der Anteil geringer. Die Kombinationstherapie aus 4-PB und Gemcitabin zeigte eine signifikante Zunahme der Apoptose bei den Zelllinien T3M4 und PANC-1. Bei der Zelllinie AsPC-1 konnte kein Vorteil gegenüber der Monotherapie beobachtet werden. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse somit eine Zelllinien-abhängige Induktion der Apoptose durch Behandlung mit 4-PB.

Die Behandlung mit 4-PB zeigte zudem eine deutliche Zunahme der Phagozytoserate *in vitro*. Analog der Apoptoserate konnte der größte Phagozytose-Anteil bei der Zelllinie T3M4 verzeichnet werden, gefolgt von PANC-1 und AsPC-1. Im Gegensatz zu dem Effekt auf die Apoptose brachte eine Kombinationstherapie mit Gemcitabin keinen Vorteil in Hinblick auf die Zunahme der Phagozytose durch Makrophagen. Die Behandlung der Probanden-Makrophagen mit 4-PB zeigte keine negative Auswirkung auf die Phagozytose. Die Phagozytoserate stieg sogar im Vergleich zu der von nicht behandelten Makrophagen an.

Die Behandlung mit 4-PB ging abhängig von der Konzentration und Expositionsdauer mit einer unterschiedlich starken Expression von p21 einher. Ein Maximum der Expression konnte in den ersten 24h verzeichnet werden, welches in den folgenden 48h abfiel (T3M4 und PANC-1). Bei AsPC-1 kam es erst nach 72h zu einer erhöhten Expression von p21. Die Expression des Apoptosemarkers AnnexinA1 zeigte nach der gewählten Versuchsdauer keine Abhängigkeit von der Behandlung mit 4-PB in den untersuchten Zelllinien. Demnach konnte die Expression von AnnexinA1 nicht zur Bewertung der antitumoralen Wirkung des HDAC-Inhibitors durch das Einleiten der Apoptose herangezogen werden.

Die Ergebnisse der Cytokin-Expression nach der Phagozytose der mit 4-PB behandelten Zellen spiegelten sowohl eine anti- (gesteigerte Freisetzung von IL-10) als auch eine pro-inflammatorische (verminderte Freisetzung von TNF α und gesteigerte Freisetzung von IL-8) Wirkung wieder. Die Behandlung der Karzinomzellen mit 4-PB führte folglich zu einer Änderung der Immunantwort durch aktivierte Makrophagen.

Zusammenfassend induziert die Behandlung mit 4-PB die Tumorzellapoptose, die konsekutiv die Makrophagen zur Phagozytose stimuliert. Die Phagozytose von Tumorzellen in Gegenwart von 4-PB hat einen immunmodulierenden Effekt und geht mit einer veränderten Freisetzung von Cytokinen aus Makrophagen einher.