

Aus der

Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen  
Abteilung VIII, Medizinische Onkologie und Pneumologie

**Modulation von Oberflächenrezeptoren durch 6- und 8-  
Prenylnaringenin zur Steigerung der antitumoralen  
Aktivität humaner NK-Zellen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Fuchs, Holger Jürgen**

**2024**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. U. Lauer

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. F. Grünebach

Tag der Disputation: 28.08.2024

## Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>II.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>III.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Immunsystem</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Natürliche Killerzellen</b> .....	<b>3</b>
1.2.1	NK-Zellen und Krebs .....	10
1.2.2	Modulation der NK-Zell-Tumor-Interaktion .....	11
<b>1.3</b>	<b>Histon-Deacetylase-Inhibitoren</b> .....	<b>12</b>
<b>1.4</b>	<b>Flavonoide in der Tumorthherapie</b> .....	<b>14</b>
<b>1.5</b>	<b>Prenylflavonoide aus Hopfen und Bier</b> .....	<b>16</b>
<b>1.6</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Chemikalien und Verbrauchsmittel</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>Angesetzte Puffer und Lösungen</b> .....	<b>20</b>
<b>2.3</b>	<b>Zellkulturmaterialien</b> .....	<b>21</b>
<b>2.4</b>	<b>Enzyme</b> .....	<b>22</b>
<b>2.5</b>	<b>Antikörper</b> .....	<b>22</b>
<b>2.6</b>	<b>Assays und Kits</b> .....	<b>23</b>
<b>2.7</b>	<b>Zelllinien</b> .....	<b>23</b>
2.7.1	Primäre Lebertumore .....	23
2.7.2	Natürliche Killerzelllinien .....	24
<b>2.8</b>	<b>Geräte</b> .....	<b>25</b>
<b>2.9</b>	<b>Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>26</b>
<b>2.10</b>	<b>Software</b> .....	<b>28</b>
<b>2.11</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b> .....	<b>28</b>
2.11.1	Kultivieren von Zellen .....	28
2.11.2	Passagieren der Zellen .....	29
2.11.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	30
2.11.4	Zellzählung .....	31
2.11.5	Auslegen der Zellen .....	31
2.11.5.1	Auslegen der Leberzelllinien .....	32
2.11.5.2	Auslegen der NK-Zelllinien .....	32
2.11.6	Behandlung von Zellen .....	33
2.11.7	<i>Killing</i> der Tumorzellen .....	34
<b>2.12</b>	<b>Photometrische Methoden</b> .....	<b>36</b>
2.12.1	CellTiter-Blue®-Assay .....	36
2.12.2	Sulforhodamin B-Assay .....	36
2.12.3	Durchflusszytometrie .....	38
<b>2.13</b>	<b>Statistische Auswertung</b> .....	<b>41</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>42</b>
<b>3.1</b>	<b>Auswirkungen von 6-PN und 8-PN auf das Zellwachstum und das NK-Zell-vermittelte Tumorzell-Killing</b> .....	<b>43</b>

3.1.1	Hep3B nach 48 h <i>Killing</i> durch NK-92 Mi .....	43
3.1.1.1	E:T-Verhältnis 1,25:1 .....	44
3.1.1.2	E:T-Verhältnis 0,625:1 .....	46
3.1.2	Hep3B nach 48 h <i>Killing</i> durch NK-92.....	47
3.1.2.1	E:T-Verhältnis 1,25:1 .....	48
3.1.2.2	E:T-Verhältnis 0,625:1 .....	51
3.1.3	HepG2 nach 48 h <i>Killing</i> durch NK-92 Mi.....	53
3.1.3.1	E:T-Verhältnis 1,25:1 .....	54
3.1.3.2	E:T-Verhältnis 0,625:1 .....	57
3.1.4	HepG2 nach 48h <i>Killing</i> durch NK-92 .....	58
3.1.4.1	E:T-Verhältnis 1,25:1 .....	59
3.1.4.2	E:T-Verhältnis 0,625:1 .....	62
<b>3.2</b>	<b>Expression von MICA/B und verschiedenen ULBP auf Hep3B- bzw. HepG2-Zellen nach Behandlung mit 6-PN oder 8-PN .....</b>	<b>64</b>
3.2.1	Behandlungsabhängige Expression von NKG2D-Liganden auf Hep3B-Zellen.....	65
3.2.2	Behandlungsabhängige Expression von NKG2D-Liganden auf HepG2-Zellen .....	69
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>75</b>
4.1	<b>6-PN und 8-PN reduzieren die Tumorzellviabilität NK-Zell-unabhängig.....</b>	<b>75</b>
4.2	<b>Die Vorbehandlung der Tumorzellen mit 6-PN und 8-PN verbessert das NK-Zell-vermittelte Tumorzell-<i>Killing</i> .....</b>	<b>77</b>
4.3	<b>Alleinige Vorbehandlung der NK-Zellen mit den Prenylflavonoiden führt zu keinem vermehrten Tumorzell-<i>Killing</i>.....</b>	<b>81</b>
4.4	<b>6-PN ist in gleicher Dosierung insgesamt potenter als 8-PN.....</b>	<b>86</b>
4.5	<b>Schlussfolgerung und Ausblick .....</b>	<b>88</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>92</b>
<b>7</b>	<b>Erklärungen zum Eigenanteil.....</b>	<b>106</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>107</b>

# I. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung und Überblick über die Bestandteile des angeborenen und des adaptiven Immunsystems.....	3
<b>Abbildung 2:</b> Übersicht über die Funktionen der NK-Zellen.....	4
<b>Abbildung 3:</b> Bedeutung der NKG2D-Rezeptoren für die Aktivität der NK-Zelle. ....	8
<b>Abbildung 4:</b> Chemische Strukturformeln der untersuchten Prenylflavonoide .....	16
<b>Abbildung 5:</b> Pipettierschema 24-Well-Platte.....	32
<b>Abbildung 6:</b> Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs eines Experiments.....	33
<b>Abbildung 7:</b> Behandlungsschema NK-Zellen.....	34
<b>Abbildung 8:</b> Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Durchflusszytometers.....	39
<b>Abbildung 9:</b> CTB- und SRB-Assays – Hep3B; NK-92 Mi; 6-PN und 8-PN; 24 h Behandlung; 48 h <i>Killing</i> ; 25 000 Target-Zellen / Well; E:T = 1,25:1. ....	44
<b>Abbildung 10:</b> CTB- und SRB-Assays – Hep3B; NK-92 Mi; 6-PN und 8-PN; 24 h Behandlung; 48 h <i>Killing</i> ; 25 000 Target-Zellen / Well; E:T = 0,625:1. ....	46
<b>Abbildung 11:</b> CTB- und SRB-Assays – Hep3B; NK-92; 6-PN und 8-PN; 24 h Behandlung; 48 h <i>Killing</i> ; 20 000 Target-Zellen / Well; E:T = 1,25:1. ....	48
<b>Abbildung 12:</b> CTB- und SRB-Assays – Hep3B; NK-92; 6-PN und 8-PN; 24 h Behandlung; 48 h <i>Killing</i> ; 20 000 Target-Zellen / Well; E:T = 0,625:1. ....	51
<b>Abbildung 13:</b> CTB- und SRB-Assays – HepG2; NK-92 Mi; 6-PN und 8-PN; 24 h Behandlung; 48 h <i>Killing</i> ; 30 000 Target-Zellen / Well; E:T = 1,25:1. ....	54
<b>Abbildung 14:</b> CTB- und SRB-Assays – HepG2; NK-92 Mi; 6-PN und 8-PN; 24 h Behandlung; 48 h <i>Killing</i> ; 30 000 Target-Zellen / Well; E:T = 0,625:1. ....	57
<b>Abbildung 15:</b> CTB- und SRB-Assays – HepG2; NK-92; 6-PN und 8-PN; 24 h Behandlung; 48 h <i>Killing</i> ; 30 000 Target-Zellen / Well; E:T = 1,25:1. ....	59

<b>Abbildung 16:</b> CTB- und SRB-Assays – HepG2; NK-92; 6-PN und 8-PN; 24 h Behandlung; 48 h <i>Killing</i> ; 30 000 Target-Zellen / Well; E:T = 0,625:1. ....	62
<b>Abbildung 17:</b> Rate ULBP- bzw. MICA/B-exprimierender Hep3B-Zellen nach Behandlung mit 6- / 8-PN in der Durchflusszytometrie.....	65
<b>Abbildung 18:</b> Rate ULBP-exprimierender Hep3B-Zellen nach Behandlung mit 6- / 8-PN in der Durchflusszytometrie. ....	66
<b>Abbildung 19:</b> Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von MICA/B auf Hep3B-Zellen nach 24 h Behandlung mit 6- / 8-PN und 24 h Inkubation in Medium. ....	67
<b>Abbildung 20:</b> Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von MICA/B auf Hep3B-Zellen nach 48 h Behandlung mit 6- / 8-PN. ....	68
<b>Abbildung 21:</b> Rate ULBP- bzw. MICA/B-exprimierender HepG2-Zellen nach Behandlung mit 6- / 8-PN in der Durchflusszytometrie.....	70
<b>Abbildung 22:</b> Rate ULBP-exprimierender HepG2-Zellen nach Behandlung mit 6- / 8-PN in der Durchflusszytometrie. ....	71
<b>Abbildung 23:</b> Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von MICA/B auf HepG2-Zellen nach 24 h Behandlung mit 6- / 8-PN und 24 h Inkubation in Medium. ....	72
<b>Abbildung 24:</b> Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von MICA/B auf HepG2-Zellen nach 48 h Behandlung mit 6- / 8-PN.....	73

## II. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Einteilung der Leukozyten nach Zugehörigkeit zur lymphatischen oder myeloischen Zellreihe .....	2
<b>Tabelle 2:</b> Reagenzien und Verbrauchsmittel .....	19
<b>Tabelle 3:</b> Angesetzte Puffer und Lösungen.....	20
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete Zellkulturmaterialien.....	21
<b>Tabelle 5:</b> Verwendete Enzyme.....	22
<b>Tabelle 6:</b> Eingesetzte Antikörper.....	22
<b>Tabelle 7:</b> Verwendete Assays und Kits .....	23
<b>Tabelle 8:</b> Primäre Lebertumor-Zelllinien.....	23
<b>Tabelle 9:</b> Zelllinien der Natürlichen Killerzellen .....	24
<b>Tabelle 10:</b> Verwendete Geräte und Hersteller.....	25
<b>Tabelle 11:</b> Eingesetzte Verbrauchsmaterialien mit Herstellern .....	26
<b>Tabelle 12:</b> Verwendete Software.....	28
<b>Tabelle 13:</b> Übersicht über die pro Hep3B- / HepG2-Zelllinie ausgelegten Platten ..	35
<b>Tabelle 14:</b> Rahmendaten der Versuche .....	43

### III. Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -MEM	<i>minimum essential medium</i> (Variante des Minimalmediums nach Eagle)
% (w/v)	Gewichtsprozent
% (v/v)	Volumenprozent
2B4	<i>natural killer cell receptor 2B4</i>
6-PN	6-Prenylnaringenin
8-PN	8-Prenylnaringenin
ACT	<i>adoptive cell therapy</i> (adoptive Zelltransfer-Therapie)
ADCC	<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i> (antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität)
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
APO1	<i>apoptosis antigen 1</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CCL	<i>C-C motif ligand</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i> (Cyclin-abhängige Kinase)
CLP	<i>common lymphoid progenitor</i> (gemeinsame lymphatische Vorläuferzelle)
CTB	CellTiter-Blue <sup>®</sup>
CTL	<i>cytotoxic T lymphocyte</i> (zytotoxische T-Zelle)
CTLR	<i>C-type lectin-like receptor</i> (C-Typ Lektin-ähnlicher Rezeptor)
CXCL	<i>C-X-C motif ligand</i>
DAP10	<i>DNAX-activating protein 10</i> (DNAX-aktivierendes Protein 10)
DC	<i>dendritic cell</i> (dendritische Zelle)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNAM-1	<i>DNAX-accessory molecule-1</i>
DR	<i>death receptor</i> (Todesrezeptor)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E:T	<i>Effector-to-Target</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK 1/2	<i>extracellular signal-regulated kinases 1/2</i> (extrazellulär signalregulierte Kinasen 1/2)
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting / scanning</i>
FAS	<i>fragment apoptosis stimulating</i> (Rezeptor)
FASL	FAS-Ligand
Fc $\gamma$ RIII	Fc $\gamma$ -Rezeptor III
Fc $\alpha$ R1	Fc $\alpha$ -Rezeptor 1
FCS / FBS	<i>fetal calf serum / fetal bovine serum</i> (fötales Kälber- / Rinder-Serum)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSc	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i> (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor)
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	Wasser, doppelt destilliert
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HDACi	Histon-Deacetylase-Inhibitor / -en
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen



ICAM1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
ILC	<i>innate lymphoid cell</i> (angeborene lymphatische Zelle)
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
KIR	Killerzell-Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor
KLRG1	Killerzell-Lektin-ähnlicher Rezeptor G1
LAIR-1	Leukozyten-assoziiertes Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor 1
LFA-1	Lymphozytenfunktions-assoziiertes Antigen 1
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCM7	<i>minichromosome maintenance complex component 7</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIC	<i>MHC class I chain-related protein</i>
miR	MicroRNA
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NaB	Natrium-Butyrat
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
NaOH	Natriumhydroxid
NCAM	<i>neural cell adhesion molecule</i>
NCR	<i>natural cytotoxicity receptor</i> (natürlicher Zytotoxizitätsrezeptor)
NF- $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NKG2D	natural killer group 2, member D
NKp30/46	<i>natural killer cell p30/46-related protein</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
NOD	<i>nucleotide oligomerization domain</i>
ns	nicht signifikant
OD	optische Dichte
p50	Protein 50 (Untereinheit von NF- $\kappa$ B)
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PD	Photodiode
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PMT	<i>photomultiplier tube</i>
RG	Risikogruppe
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
RIG-I	<i>RNA helicase retinoic inducible gene 1</i>
RLR	RIG-I-like receptor
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
SAHA	<i>suberoylanilide hydroxamic acid</i> (Suberoylanilid-Hydroxamsäure)
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
sMIC	<i>soluble MHC class I chain-related protein</i>
SRB	Sulforhodamin B
SSc	<i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
TCA	<i>trichloroacetic acid</i> (Trichloressigsäure)

TCR	<i>T-cell receptor</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSA	Trichostatin A
UL 16	<i>unique long 16</i>
ULBP	UL16-bindendes Protein
v/v	<i>volume/volume</i>
VE	vollentsalzt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VPA	<i>valproic acid</i> (Valproat)
w/v	<i>weight/volume</i>
XCL	<i>X-C motif ligand</i>
YINM	Tyrosin-Isoleucin-Asparagin-Methionin (Tyrosin-basierte aktivierende Aminosäure-Sequenz)

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem lässt sich klassisch in zwei Teile gliedern. Zum einen in das angeborene oder unspezifische Immunsystem, welches auf bereits bei der Geburt vorhandenen physikalischen (z.B. Haut- / Schleimhäute), chemischen (z.B. Magensäure), zellulären sowie humoralen (z.B. Komplementsystem, Zytokine) Abwehrmechanismen gegen Krankheitserreger beruht. In dieser klassischen Einteilung werden zu den zellulären Bestandteilen des angeborenen Immunsystems Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs), neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, Mastzellen sowie die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) gezählt (Gulbins & Lang, 2019, S. 313 - 316). Das angeborene Immunsystem benötigt dabei keine Prägung oder Adaptation und ist somit direkt bei Kontakt zum Erreger bzw. körperfremden Zellen / Molekülen aktiv.

Zum anderen gibt es das erworbene Immunsystem bzw. die adaptive Immunantwort. Diese beruht auf Zellen, welche antigenspezifisch wirken, davor allerdings eine Aktivierung benötigen. Hierzu werden nach der klassischen Einteilung T- und B-Lymphozyten sowie Plasmazellen, welche aus B-Lymphozyten hervorgehen und Antikörper als humorale Komponente des adaptiven Immunsystems bilden, gezählt. Die Aktivierung erfolgt zu einem großen Teil durch Zellen des angeborenen Immunsystems mittels Prozessierung und Präsentation von Antigenen (Murphy & Weaver, 2018, S. 581 - 621) und es kommt zu einer spezifischen, auf den Erreger abgestimmten Immunreaktion (Gulbins & Lang, 2019, S. 316 - 321).

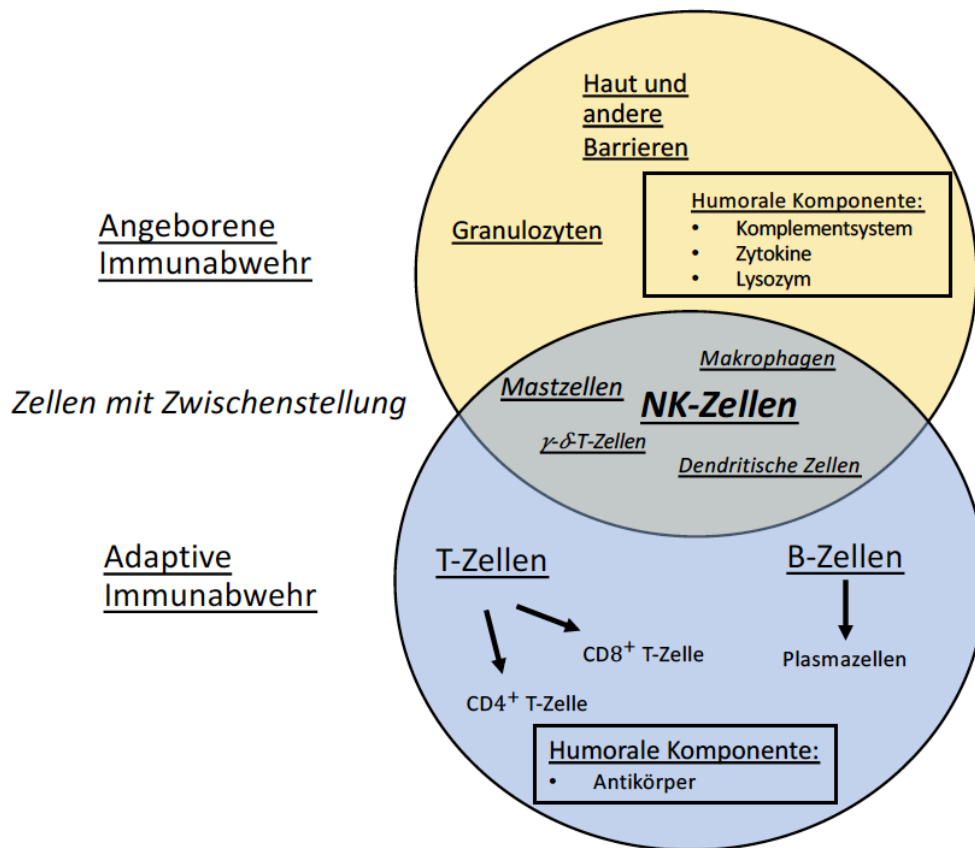
Leukozyten gehören beiden Teilen des Immunsystems an und werden je nach Herkunft in myeloische und lymphatische Zellen unterteilt (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Einteilung der Leukozyten nach Zugehörigkeit zur lymphatischen oder myeloischen Zellreihe.

In Anlehnung an Murphy & Weaver, 2018: „Janeway Immunologie“ (S. 6, Abb. 1.3) erfolgte die Einteilung der dendritischen Zellen zu beiden Zellreihen. Sie entwickeln sich überwiegend aus myeloischen Vorläuferzellen, eine Entwicklung aus gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzellen ist jedoch möglich. ILCs, *innate lymphoid cells* (angeborene lymphatische Zellen).

<b>Leukozyten</b>	
<b>Lymphatische Reihe</b>	<b>Myeloische Reihe</b>
B-Zellgruppe <ul style="list-style-type: none"><li>○ B-Lymphozyten</li><li>○ Plasmazellen</li><li>○ B-Gedächtniszellen</li></ul>	Monozyten (Vorläufer der Makrophagen)
T-Zellgruppe <ul style="list-style-type: none"><li>○ T-Helferzellen</li><li>○ T-Gedächtniszellen</li><li>○ Regulatorische T-Zellen</li><li>○ Zytotoxische T-Zellen</li></ul>	Granulozyten <ul style="list-style-type: none"><li>○ Neutrophile Granulozyten</li><li>○ Eosinophile Granulozyten</li><li>○ Basophile Granulozyten</li></ul>
Natürliche Killerzellen	Mastzellen
(Dendritische Zellen)	Dendritische Zellen
Angeborene lymphatische Zellen (ILCs)	

Nach klassischer Einteilung wurden die unterschiedlichen Zelltypen einem der beiden Teile des Immunsystems zugeteilt. Mit wachsendem Kenntnisstand über die Vielzahl der Funktionen der einzelnen Zelltypen, wird einigen Zellen mehr und mehr eine Zwischenstellung zwischen beiden Teilen des Immunsystems zugeschrieben.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung und Überblick über die Bestandteile des angeborenen und des adaptiven Immunsystems.

In Anlehnung

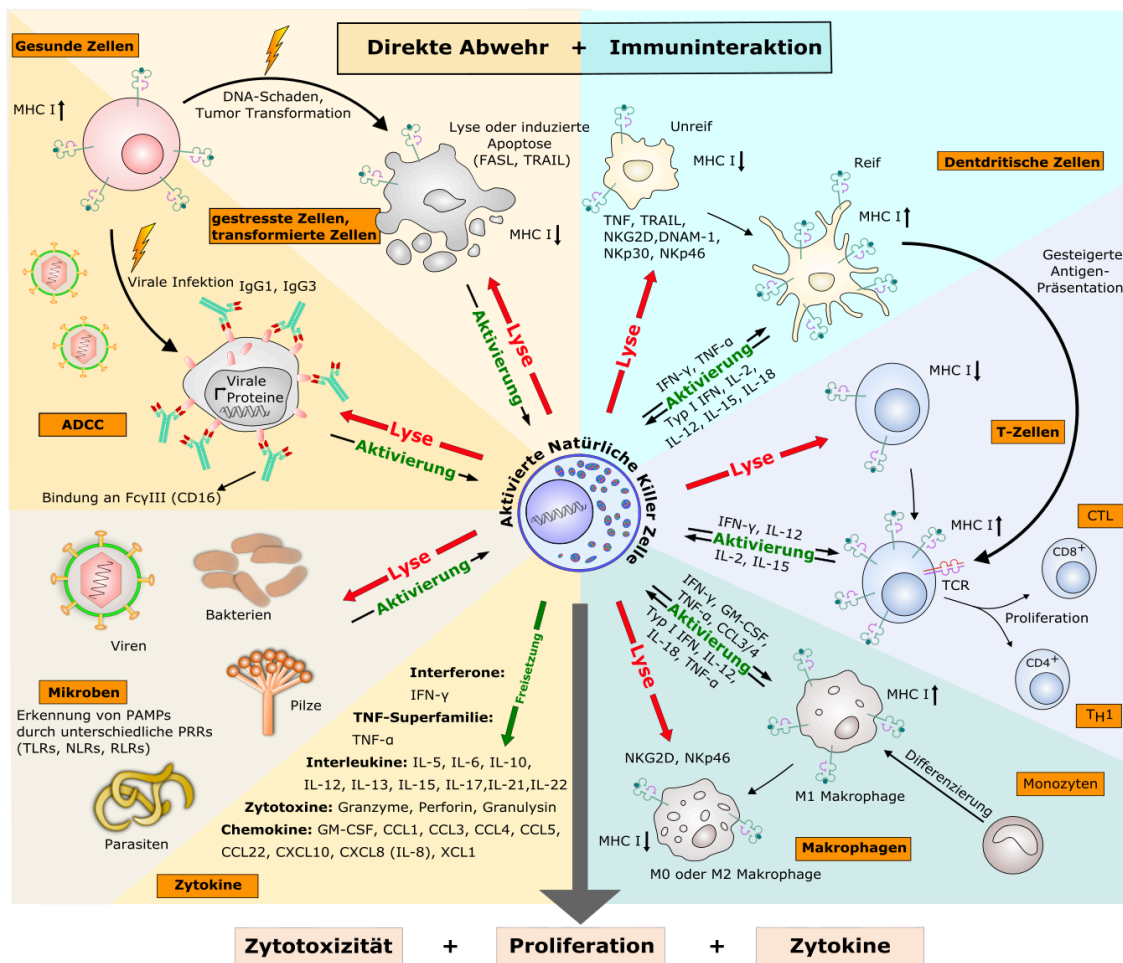
an: <https://viamedici.thieme.de/lernmodul/549574/subject/biochemie/immunsystem/angeborene+und+adaptive+immunantwort/angeborene+und+adaptive+immunantwort+ueberblick>, Stand: 27.07.2020; NK-Zellen, Natürliche Killerzellen; CD4 / CD8, *Cluster of Differentiation 4* bzw. *8*.

Aufgrund ihrer vielen unterschiedlichen Funktionen geraten vor allem NK-Zellen mehr und mehr in den Fokus und werden inzwischen als eine Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunantwort betrachtet (siehe Abbildung 1) (A. Moretta et al., 2008).

## 1.2 Natürliche Killerzellen

NK-Zellen wurden 1975 wegen ihrer Fähigkeit entdeckt, Tumorzellen *in vitro* ohne vorherige immunologische Sensibilisierung zu erkennen und abzutöten (Herberman et al., 1975; Kiessling et al., 1975). Sie entwickeln und differenzieren sich in Knochenmark, Lymphknoten, Milz, Tonsillen und Thymus (Blom & Spits, 2006; Iannello et al., 2008) und machen ca. 5–20 % der peripheren Lymphozyten

aus (Arina et al., 2007). Sie werden einer Gruppe von Immunzellen zugeordnet, die man als angeborene lymphatische Zellen (*innate lymphatic cells*, ILCs) bezeichnet. Zusammen gehen sie aus einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle (*common lymphoid progenitor*, CLP) hervor (Cortez et al., 2015; Spits et al., 2013). Abbildung 2 liefert einen Überblick über einige der verschiedenen Funktionen von NK-Zellen.



**Abbildung 2:** Übersicht über die Funktionen der NK-Zellen. Darstellung der vielfältigen Funktionen der NK-Zellen, insbesondere in der direkten Immunabwehr, aber auch der vielen Interaktionen mit anderen Immunzellen. NK-Zellen haben somit einen regulierenden Einfluss auf das adaptive Immunsystem. NK-Zellen können deshalb nicht nur als Killer-, sondern als „Verbindungszellen“ zwischen beiden Teilen des Immunsystems betrachtet werden. Modifiziert nach Leischner et al., 2016. ADCC, *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*; CCL, *C-C motif ligand*; CTL, *cytotoxic T lymphocyte*; CXCL, *C-X-C motif ligand*; DNAM-1, *DNAX accessory molecule-1*; FASL, *fragment apoptosis stimulating ligand*; GM-CSF, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*; IFN, Interferon; IL, Interleukin; MHC I, *major histocompatibility complex I*; NK-Zellen, Natürliche Killerzellen; NKG2D, *natural-killer group 2, member D*; NKp30/46, *natural killer cell p30/46-related protein*; NLR, *nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptor*; PAMP, *pathogen-associated molecular pattern*; PRR, *pattern recognition receptor*; RLR, *RNA helicase retinoic inducible gene 1 (RIG-I)-like receptor*; TCR, *T cell receptor*; TLR, *toll-like receptor*; TNF, Tumornekrosefaktor; TRAIL, *TNF-related apoptosis-inducing ligand*; XCL, *X-C motif ligand*.

NK-Zellen aktivieren Makrophagen durch Zytokinfreisetzung und unterstützen die Reifung von DCs. Sie regulieren zudem direkt oder indirekt die Entwicklung

und Aktivität von T-Lymphozyten. Indem sie weiterhin unreife DCs und T-Zellen abtöten, regulieren sie auch die Aktivität des angeborenen und des adaptiven Immunsystems (Biron, 1997; Biron et al., 1999; Cruz-Muñoz et al., 2019; Gerosa et al., 2002; Alessandro Moretta, 2003). Zur Hauptfunktion der NK-Zellen gehört nach ihrer Aktivierung die Immunantwort gegenüber Viren, intrazellulären Pathogenen, Protozoen, Pilzen und Bakterien sowie entarteten Zellen in der frühen Phase der Immunreaktion (Biron & Brossay, 2001; Lee et al., 2007; Vivier et al., 2008). Dafür produzieren sie eine Reihe von Signalmolekülen, insbesondere Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Perforin sowie Granzyme (Trapani et al., 2000). NK-Zellen werden durch die Expression des *cluster of differentiation 56* (CD56), einem Zelladhäsionsmolekül (*neural cell adhesion molecule*, NCAM) (Maness & Schachner, 2006) sowie durch das Fehlen von CD3, dem T-Zell Co-Rezeptor, definiert (L. L. Lanier et al., 1989; Ritz et al., 1988).

CD56 ist am stärksten mit NK-Zellen assoziiert, wird aber auch von bestimmten Subpopulationen von T-Zellen ( $\alpha\beta$ -T-Zellen,  $\gamma\delta$ -T-Zellen, aktivierten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen), sowie DCs und Monozyten exprimiert (Kelly-Rogers et al., 2006; Papewalis et al., 2011; Roothans et al., 2013; Van Acker et al., 2016; Van Acker et al., 2017) und wird insbesondere mit zytotoxischen Funktionen in Verbindung gebracht. Bekräftigt wird dies durch die Beobachtung, dass Exosomen der NK-Zellen, welche zytolytische Enzyme enthalten und in Kontakt mit Zielzellen treten, CD56 auf ihrer Oberfläche tragen (Lugini et al., 2012).

Die NK-Zellen werden darüber hinaus in zwei Subgruppen eingeteilt. CD56<sup>dim</sup>-Zellen (geringe Expressions-Dichte von CD56) machen ca. 90 % der NK-Zellen aus, befinden sich überwiegend im Blut und exprimieren hohe Konzentrationen CD16 (Fc $\gamma$ -Rezeptor III, Fc $\gamma$ RIII). Sie werden deshalb als CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> bezeichnet. Ihre Hauptaufgabe besteht in der schnellen Induktion der angeborenen Immunantwort und einer Entzündungsreaktion bei Infektionen oder gegenüber Tumoren. Mittels ihrer hohen Expressionslevel an CD16 können sie auch eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (*antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) einleiten (Romee et al., 2013). Dafür weisen sie dauerhaft hohe Konzentrationen an Perforin und Granzymen in ihren Granula auf, mit denen sie eine Lyse der Zielzelle induzieren können (Jacobs et al., 2001).

In Versuchen mit K562-Leukämie-Zellen wiesen sie im Vergleich zu CD56<sup>bright</sup>-Zellen weiterhin eine ungefähr doppelt so hohe Bindungsfähigkeit an diese Zielzellen auf (Jacobs et al., 2001). Das mit der Lymphozytenfunktion assoziierte Antigen 1 (*lymphocyte associated antigen 1*, LFA-1, auch CD11a / CD18), ein  $\beta_2$ -Integrin, welches für die Adhäsion an die Zielzelle wichtig ist, die Bildung einer Immunsynapse anstößt (Krzewski & Strominger, 2008), gleichzeitig aber auch Signale zur NK-Zell-Aktivierung initiieren kann (Barber et al., 2004), wird im Vergleich auf CD56<sup>dim</sup>-Zellen stärker exprimiert (Frey et al., 1998) und ist ein wesentlicher Grund für die gute Bindungsaffinität (Hoffmann et al., 2011; Urlaub et al., 2017). Neben der Expression von Mitgliedern aus der Familie der Tumornekrose-Faktoren (TNF), wie bspw. FAS-Ligand (FASL), mit denen sie bei den Zielzellen programmierten Zelltod (Apoptose) induzieren können, produzieren sie außerdem IFN- $\gamma$ . Wenngleich eine einzelne CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>-Zelle geringere Mengen IFN- $\gamma$  als CD56<sup>bright</sup>-Zellen produziert, kommt durch die hohe relative Menge dieses Subtyps und die schnelle Induktion der IFN- $\gamma$ -Freisetzung auch dieser Funktion eine große Bedeutung zu (Anfossi et al., 2006; De Maria et al., 2011).

Die anderen ca. 5–15 % werden als CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> (CD56<sup>bright</sup>: hohe CD56-Expressions-Level) definiert. Sie befinden sich überwiegend in Lymphknoten, Tonsillen oder auch placentarem Gewebe (Campbell & Hasegawa, 2013). Ihre Hauptaufgabe besteht in der Aktivierung von DCs, Makrophagen, Monozyten, Granulozyten aber auch T-Lymphozyten und sie spielen daher eine wichtige Rolle in der Regulation und Modulation der angeborenen und der adaptiven Immunantwort (siehe Abbildung 2). Zur Aktivierung dieser Zellen setzen sie eine Reihe von Zytokinen, wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und Granulozyten-Monozyten-Koloniestimulierender Faktor (*granulocyte-monocyte colony-stimulating factor*, GM-CSF) frei. Für die Kommunikation und das Akkumulieren mit den anderen Immunzellen im Zielgewebe exprimieren sie Chemokin-Rezeptoren und produzieren Interleukine und Chemokine (Kubin et al., 2001; Walzer et al., 2005). Nach Stimulation mit Interleukin-2 (IL-2) produzieren und exprimieren sie Perforin und Rezeptoren wie zum Beispiel CD16, Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (*killer cell immunoglobulin-like receptors*, KIRs) und natürliche

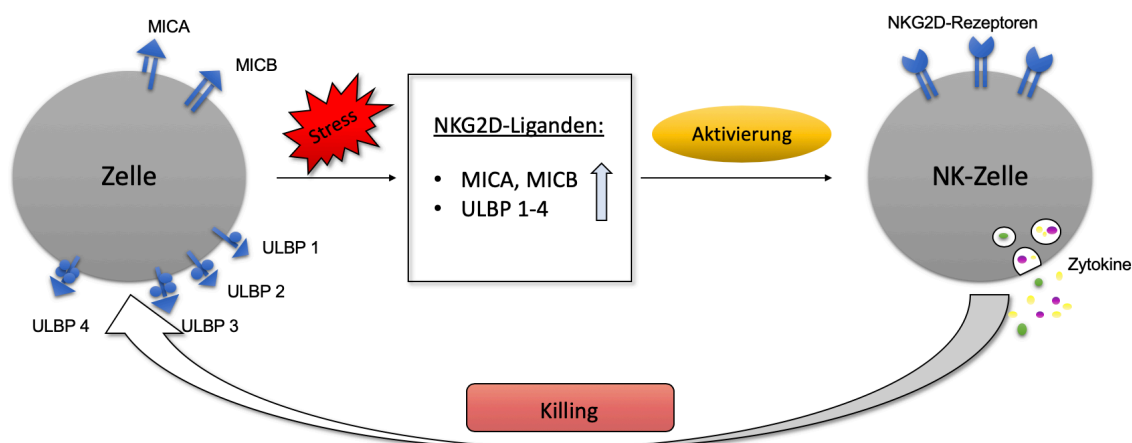


Zytotoxizitätsrezeptoren (*natural cytotoxicity receptors*, NCRs), wodurch auch sie gleichermaßen zytolytische Kapazität erlangen (Ferlazzo et al., 2004).

Um ihre Zielzellen zu erkennen, besitzen NK-Zellen ein breites Spektrum an aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren, die bei Bildung sogenannter Immunsynapsen in Kontakt mit der potenziellen Zielzelle treten (Krzewski & Strominger, 2008).

Als „Verbindungszellen“ und vor allem nach der klassischen Einteilung Zellen des angeborenen Immunsystems exprimieren NK-Zellen v.a. keimbahnkodierte Rezeptoren unterschiedlicher Gruppen, die eine Immunantwort innerhalb von Minuten ermöglichen. Die aktivierenden Rezeptoren erlauben den NK-Zellen dabei neben der Erkennung typischer pathogener Oberflächenmoleküle (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) durch *pattern recognition receptors* (PRRs) bei Erregern wie Viren, Bakterien, Pilzen oder Parasiten (Leischner et al., 2016), insbesondere auch die Detektion von Zellen, deren Expression der Oberflächenmoleküle sich aufgrund von metabolischem Stress verändert. Diese veränderte Expression, auch *dysregulated self* oder *stress-induced self* bezeichnet, tritt v.a. bei infizierten oder maligne transformierten Zellen auf (Murphy & Weaver, 2018, S. 156-157). Neben aktivierenden Rezeptoren aus der Gruppe der KIRs (KIR2DS, KIR3DS u.a.), den NCRs NKp30, NKp44 und NKp46 und anderen aktivierenden Rezeptoren, wie z.B. *DNAX-accessory molecule-1* (DNAM-1), spielt für die Erkennung dieser Zellen und damit für die Tumorerkennung insbesondere der *natural killer group 2, member D*-Rezeptor (NKG2D-Rezeptor) aus der Gruppe der C-Typ Lektin-ähnlichen Rezeptoren (*c-type lectin-like receptors*, CTLR) eine Rolle (Wu et al., 1999; Zingoni et al., 2018). Der NKG2D-Rezeptor kommt außerdem auf CD8<sup>+</sup> αβ-T-Zellen, aktivierten Makrophagen, γδ-T-Zellen, sowie autoreaktiven oder immunsuppressiven CD4<sup>+</sup> Zellen vor (Bauer et al., 1999; Wu et al., 1999). Während viele andere aktivierende Rezeptoren an ein Adaptorprotein mit einem *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) (Cambier, 1995; Reth, 1989) gekoppelt sind (bspw. CD16, NKp30, NKp44 oder NKp46), ist an den NKG2D-Rezeptor das Adapterprotein DNAX-aktivierendes Protein 10 (*DNAX-activating protein 10*, DAP10) gebunden, welches eine Tyrosin-basierte

aktivierende Aminosäure-Sequenz (Tyrosin-Isoleucin-Asparagin-Methionin, YINM) enthält (Watzl & Urlaub, 2012). Im Gegensatz zu seiner Funktion als Co-Rezeptor auf T-Zellen, kann bei NK-Zellen eine alleinige Aktivierung durch ihn die Zytotoxizität gegenüber einer Zielzelle induzieren (Billadeau et al., 2003).



**Abbildung 3:** Bedeutung der NKG2D-Rezeptoren für die Aktivität der NK-Zelle. Durch zellulären Stress wie bspw. UV-Strahlung, Karzinogene, Infektionen oder Transformation kommt es zu einer vermehrten Expression der NKG2D-Liganden MICA, MICB und ULBP1-4. Die Bindung an den passenden NKG2D-Rezeptor auf NK-Zellen führt zu einem starken Aktivierungssignal. Es kommt zum *Killing* der Zielzelle. Gleichzeitig werden Produktion und Freisetzung von Zytokinen gesteigert. NK-Zelle, Natürliche Killerzelle; NKG2D, *natural killer group 2, member D* (aktivierender Rezeptor); MICA/B, *MHC class I chain-related protein A/B*; ULBP1–4, *UL16 binding protein 1–4*.

Wie in Abbildung 3 schematisch dargestellt, erkennt der Rezeptor *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-Klasse I-Molekül-ähnliche Strukturen, die bei Zellstress, der beispielsweise durch Infektionen oder Tumoren ausgelöst wird, verstärkt exprimiert werden. Zu diesen gehören unter anderem das *MHC class I chain-related protein A* und *B* (MICA/B) als starke Aktivatoren, sowie die UL16-bindenden Proteine 1–4 (*UL16-binding proteins*, ULBPs) (Billadeau et al., 2003; Cosman et al., 2001; Huergo-Zapico et al., 2014; H.-G. Ljunggren & Malmberg, 2007; Steinle et al., 2001).

Dem gegenüber exprimieren NK-Zellen auch inhibitorische Rezeptoren. Diese erkennen körpereigene Zellen durch Bindung an unterschiedliche Strukturen und wirken einer Aktivierung der NK-Zellen entgegen. Sie binden an Kollagen (über den Leukozyten-assoziierten Immunglobulin-ähnlichen Rezeptor 1, LAIR-1, CD305), Cadherine (über den *Killer cell lectin-like receptor G1*, KLRG1) und insbesondere an MHC-Klasse I-Moleküle, die konstitutiv von fast allen

Körperzellen exprimiert werden. Für die Bindung an die MHC-Klasse I-Rezeptoren sind vor allem Mitglieder zweier Rezeptor-Familien von Bedeutung. Inhibitorische KIR-Rezeptoren, wie KIR2DL oder KIR3DL, binden an die typischen MHC-Klasse I-Rezeptoren, deren  $\alpha$ -Ketten die Genprodukte der Humanen Leukozyten-Antigen-Komplexe (*human leukocyte antigen*, HLA) -A, -B und -C enthalten. Inhibitorische Vertreter aus der Familie der CTLR, z.B. die als Heterodimere mit CD94 vorkommenden CD94/NKG2A und CD94/NKG2B, binden dagegen an die nicht-klassischen MHC-Klasse I-Rezeptoren des HLA-E-Gens. Diese inhibitorischen Rezeptoren tragen eine *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM)-Sequenz in ihrer zytoplasmatischen Domäne (Colonna et al., 1999; Lewis L. Lanier, 2005; Watzl & Urlaub, 2012). Ihr inhibitorisches Signal ist wesentlicher Bestandteil des in den 1980er Jahren entdeckten *Missing-self*-Mechanismus. Exprimieren Zellen demnach im Zuge einer viralen Infektion, Entartung oder Zellstress weniger MHC-Klasse I-Moleküle, wird die NK-Zelle weniger inhibiert. Die Wahrscheinlichkeit für ein NK-Zell vermitteltes *Killing* steigt dadurch (Kärre et al., 1986; H. G. Ljunggren & Kärre, 1990).

Inhibitorische Rezeptoren spielen zusätzlich eine Rolle in einem unter dem Begriff *Education* zusammengefassten Prozess. Sie sind bei der Entwicklung von Effektorfunktionen und Toleranz der NK-Zellen gegenüber körpereigenen Zellen eminent wichtig. Dies geschieht zum einen MHC-abhängig. Nach Elliot und Yokoyama müssen unreife NK-Zellen dabei durch MHC-abhängiges *Licensing* zunächst aktiviert werden (Elliott & Yokoyama, 2011; Yokoyama & Kim, 2006a, 2006b). Nach Raulet und Kollegen werden NK-Zellen je nach Vorhandensein bestimmter inhibitorischer Rezeptoren aktiviert oder deaktiviert (Raulet & Vance, 2006). Zum anderen geschieht dies über MHC-unabhängige Prozesse, bspw. über MHC-unabhängige Rezeptoren oder Zytokine (Cruz-Muñoz et al., 2019; Elliott & Yokoyama, 2011; Höglund & Brodin, 2010; Orr & Lanier, 2010). Dieses fein abgestimmte Netzwerk an Rezeptoren und die Integration der diversen, durch sie vermittelten, Signale reguliert den Aktivitätszustand der NK-Zellen (Watzl & Urlaub, 2012). Kommt es zur Aktivierung, vermittelt die NK-Zelle ihre zytotoxische Aktivität über verschiedene Mechanismen.

Zum einen induzieren NK-Zellen ihre zytotoxische Aktivität sekretorisch. In ihren Granula befinden sich unterschiedliche Proteine. Neben Perforin, das sich in die Zielmembran einlagert und dort eine Pore bildet, induzieren u.a. auch Granulysin und Granzyme (Serinproteasen, z.B. Granzym A, Granzym B, Granzym C) nach Ausschüttung der Granula im Zytosol der Zielzelle Caspase-abhängig oder -unabhängig Apoptose (Lieberman, 2003). Zum anderen vermitteln sie die Zytotoxizität nichtsekretorisch. Durch sie exprimierte oder freigesetzte Liganden aus der TNF-Familie, wie z.B. FASL, TNF- $\alpha$  oder *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL), binden an komplementäre Rezeptoren aus der TNF-Familie, darunter die Todesrezeptoren 4 und 5 (*death receptor 4 und 5*, DR4 und DR5, auch als TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 bezeichnet). Diese Bindung führt zur Induktion von Apoptose über den extrinsischen Weg (Clancy et al., 2005; Kashii et al., 1999). Eine Aktivierung von NK-Zellen führt durch Freisetzung von Zytokinen aber auch indirekt zur Rekrutierung und Aktivierung weiterer Immunzellen, sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems (Kubin et al., 2001). Bereits in Abbildung 2 wurden die unterschiedlichen Wirkungen bzw. Interaktionen von NK-Zellen dargestellt. Aus diesen vielfältigen Funktionen ergibt sich ihre bedeutende Rolle als „Verbindungszellen“ zwischen beiden Teilen des Immunsystems (siehe Abbildung 1) (A. Moretta et al., 2008).

### 1.2.1 NK-Zellen und Krebs

NK-Zellen spielen also als Effektoren der angeborenen und Mitinitiatoren der adaptiven Immunantwort eine wichtige Rolle in der Abwehr von Tumorzellen. Da es Tumorarten gibt, die ausgeprägte Resistenz gegenüber konventionellen Zytostatika zeigen, stellen insbesondere allogene NK-Zellen eine potenzielle Alternative in der Anti-Tumor-Therapie dar. In der adoptiven Zelltransfer-Therapie (*adoptive cell transfer*, ACT) wird ein gezieltes *Mismatch* inhibitorischer KIR-Rezeptoren der NK-Zellen des Spenders zu HLA-Klasse-I-Molekülen des Empfängers genutzt, um ein *Killing* insbesondere von Tumorzellen des Empfängers zu erreichen (W. Leung, 2014).

Eine Reihe von Studien zeigte allerdings, dass Tumorzellen Methoden entwickeln, um sich der Kontrolle durch NK-Zellen und des angeborenen sowie

erworbenen Immunsystems zu entziehen. Es findet sich teilweise eine drastisch reduzierte Anzahl von NK-Zellen in Tumorgewebe (Esendagli et al., 2008; Gulubova et al., 2009). Zudem verschiebt sich je nach Tumorentität der Anteil der Subpopulationen von NK-Zellen in Tumorgewebe hin zu weniger zytotoxischen Formen und außerdem nimmt die Bindungsfähigkeit an Tumorzellen ab (Carrega et al., 2008). Des Weiteren wird die NK-Zell Aktivität durch reduzierte Expression aktivierender Rezeptoren negativ beeinflusst, u.a. der für die Zytotoxizität wichtigen NKG2D-Rezeptoren (Carlsten et al., 2009; Konjević et al., 2007). Die Freisetzung löslicher MICA/B-Proteine (*soluble MICA/MICB*, sMICA/sMICB) durch Tumore führt außerdem zu einer verminderten MICA-Expression auf Tumorzellen selbst (Salih et al., 2002), zum anderen aber auch zu einer verminderten NKG2D-Expression auf NK-Zellen und damit verminderter NKG2D-vermittelter Aktivierung und reduzierter Zytotoxizität von NK-Zellen (Jinushi et al., 2005; Luo et al., 2020). Zusätzlich werden NK-Zell-vermittelte Einflüsse auf andere Zellen des Immunsystems, wie z.B. auf DCs, inhibiert (Jinushi et al., 2005). Über verschiedene Mechanismen entziehen sich Tumorzellen so der antitumoralen Wirkung der NK-Zellen, was in einer verminderten Degranulation und somit zytotoxischen Aktivität resultiert (Carlsten et al., 2009; Esendagli et al., 2008).

### 1.2.2 Modulation der NK-Zell-Tumor-Interaktion

Um dem Problem, dass sich Tumorzellen dem NK-Zell-vermittelten *Killing* entziehen, entgegenzuwirken, wird intensiv an Wirkstoffen geforscht, die das NK-Zell-vermittelte *Killing* erhöhen. Zytokine haben einen immunstimulierenden Effekt. IL-2 erhöht die Zytotoxizität von NK-Zellen und ist in der antitumoralen Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms und metastasierten Melanoms bereits von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen (Choudhry et al., 2018; Konjević et al., 2007; E Lotzová et al., 1987; Eva Lotzová et al., 1987; Robinson & Morstyn, 1987; Rosenberg et al., 1987; Rosenberg et al., 1985). In niedrigen subkutanen Gaben ist es gut verträglich (Lissoni, 2017) und wird außerdem, gemeinsam mit IL-15, beim ACT *in vitro* zur Vermehrung und Aktivierung der Spender-NK-Zellen eingesetzt (Sutlu & Alici, 2009). Auch

medikamentöse Immunmodulatoren wie Lenalidomid und Thalidomid oder Zytostatika wie Etoposid, Melphalan, Doxorubicin und Bortezomib führen schon in niedriger Dosierung zu einer Proliferationshemmung von Tumorzellen, erhöhter NK-Zellzahl sowie durch erhöhte Expression von Liganden aktivierender NK-Rezeptoren wie NKG2D oder DNAM-1 zu gesteigerter Sensibilität für NK-vermitteltes *Killing* (Armeanu et al., 2008; Davies et al., 2001; Soriani et al., 2009; Tai et al., 2005).

### 1.3 Histon-Deacetylase-Inhibitoren

Ein weiterer Ansatz, der in den letzten Jahren mehr in den Forschungsfokus rückt, sind die sogenannten Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi). Die von ihnen inhibierten HDACs spielen in der Epigenetik im Zusammenspiel mit ihren Gegenenzymen, den Histon-Acetyltransferasen (HATs), über Acetylierung bzw. Deacetylierung von Histonen eine wichtige Rolle in der Regulation der Transkription von Genabschnitten und damit der Genexpression. Erreicht wird dies durch Änderungen der Chromatinstruktur und damit der Ablesbarkeit der verschiedenen DNA-Abschnitte (Y. Li & Seto, 2016; Vaissière et al., 2008). Über Deacetylierung diverser Proteine spielen sie zudem posttranslational eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose (durch Änderung der Expression pro- und antiapoptotischer Proteine), der Reaktion auf DNA-Schädigung (Miller et al., 2010) sowie bei der Metastasierung, Angiogenese, Autophagie und weiteren zellulären Prozessen (Jing Zhang & Zhong, 2014).

HDACs werden in vier Klassen (I-IV) eingeteilt. Die Klassen I, II und IV arbeiten Zn<sup>2+</sup>-abhängig, Klasse III benötigt die oxidierte Form von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) als Kofaktor zur Ausübung ihrer Funktionen (Minucci & Pelicci, 2006; Rettig et al., 2015; Weichert et al., 2008). Unterschiede sowohl in der Expressionsrate als auch in enzymkinetischen Daten der verschiedenen HDACs spielen eine Rolle im Verlauf hämatologischer Erkrankungen sowie solider Tumore und haben dabei Einfluss auf *Outcome* und Gesamtüberleben der Patienten (Mithraprabhu et al., 2014; Oehme et al., 2009; Rettig et al., 2015; Sudo et al., 2011; Weichert et al., 2008; West & Johnstone, 2014; Z. Zhang et al., 2004). Es gibt entsprechend selektive (Inhibition bestimmter HDACs) und

nicht-selektive (Inhibition mehrerer HDAC-Isoformen) HDACi (Bieliauskas & Pflum, 2008). Über Bindung bzw. Blockade des katalytischen Zentrums wirken sie den Auswirkungen fehlregulierter HDACs in Tumorzellen, wie bspw. einem abnormen Acetylierungsstatus von Histon-Proteinen, entgegen und reaktivieren die Expression von Tumorsuppressorgenen. Durch Hochregulierung von Cyclin-abhängiger Kinase (*cyclin-dependent kinases*, CDK)-Inhibitoren bzw. Herunterregulierung von CDKs und Cyclinen können sie außerdem einen Zellzyklus-Arrest induzieren (Chun, 2015). Des Weiteren aktivieren HDACi Apoptose in Tumorzellen, sowohl über den intrinsischen (mitochondrialen), als auch den extrinsischen Weg (Jing Zhang & Zhong, 2014). Unter ihrem Einfluss werden weiterhin Todesrezeptoren, wie z.B. FAS / APO1, TNF-Rezeptoren und TRAIL-Rezeptoren bzw. deren Liganden, wie FASL, TNF und TRAIL vermehrt exprimiert, deren Interaktion schließlich Apoptose auslösen kann. Außerdem erhöhen sie – im Vergleich zu normalen Körperzellen – die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Apoptose-Induktion (Jazirehi et al., 2014; Ungerstedt et al., 2005; Jing Zhang & Zhong, 2014) und inhibieren die tumorale Angiogenese (M. S. Kim et al., 2001; Pili et al., 2001; Qian et al., 2006) sowie Metastasierung (Coradini et al., 2004; M. S. Kim et al., 2001; Zhou et al., 2014).

Eine weitere sehr interessante Wirkung von HDACi ist ihr immunmodulierender Effekt. Sie erhöhen die Immunogenität (Eigenschaft eine Immunantwort auszulösen) von Tumorzellen und machen diese anfälliger für immunvermitteltes *Killing*. HDACi führen dabei zu einer Hochregulierung von MHC Klasse I- und II-Proteinen, den Co-Stimulations- bzw. Adhäsionsmolekülen CD40, CD80 und CD86 sowie des interzellulären Adhäsionsmoleküls 1 (*intercellular adhesion molecule 1*, ICAM1) (Maeda et al., 2000; Magner et al., 2000). Von besonderem Interesse ist, dass HDACi auf Tumorzellen die Expression von Liganden des aktivierenden NKG2D-Rezeptors (NKG2D-L), insbesondere MICA und MICB, induzieren (Armeanu et al., 2005; Diermayr et al., 2008; Poggi et al., 2009; Schmudde et al., 2008). Dies geschieht unabhängig von oxidativem Stress auch bei jenen Tumorzellen, die eine direkte Induktion von Apoptose durch HDACi überleben (Skov et al., 2005).

Für die Behandlung verschiedener Tumorerkrankungen sind bereits einige HDACi durch die FDA zugelassen. Aus der Gruppe der nicht-selektiven HDACi sind dies Vorinostat (Suberoylanilid-Hydroxamsäure (*suberoylanilide hydroxamic acid*, SAHA)) zur Behandlung des kutanen T-Zell Lymphoms (Mann et al., 2007), Belinostat zur Behandlung des peripheren T-Zell Lymphoms (McDermott & Jimeno, 2014) sowie Panobinostat zur Behandlung des Multiplen Myeloms (Richardson et al., 2015). Aus der Gruppe der selektiven HDACi ist Romidepsin selektiv gegenüber Klasse I HDACs (Petrich & Nabhan, 2016) und zur Behandlung des kutanen und des peripheren T-Zell Lymphoms (Frye et al., 2012; Furumai et al., 2002) zugelassen.

Nachteile vieler bisheriger Arzneistoffe, seien es Immunmodulatoren, Zytostatika oder auch HDACi, sind neben teils erheblichen Kosten auch schwere oder für den Patienten unangenehme Nebenwirkungen (Y. Li & Seto, 2016; Shahzad et al., 2017).

Ein vielversprechender Ansatz ist daher die Suche nach Wirkstoffkandidaten, die in der Natur vorkommen und in der Therapie gegen Krebs mit einem niedrigen Nebenwirkungsspektrum eingesetzt werden können. Insbesondere Pflanzenstoffen, darunter Flavonoiden, werden in einigen Studien potenziell krebsverhindernde und therapeutische Eigenschaften bei gleichzeitig leichter Zugänglichkeit und niedrigen Kosten zugeschrieben (Burkard et al., 2017; Venturelli et al., 2016).

### 1.4 Flavonoide in der Tumorthherapie

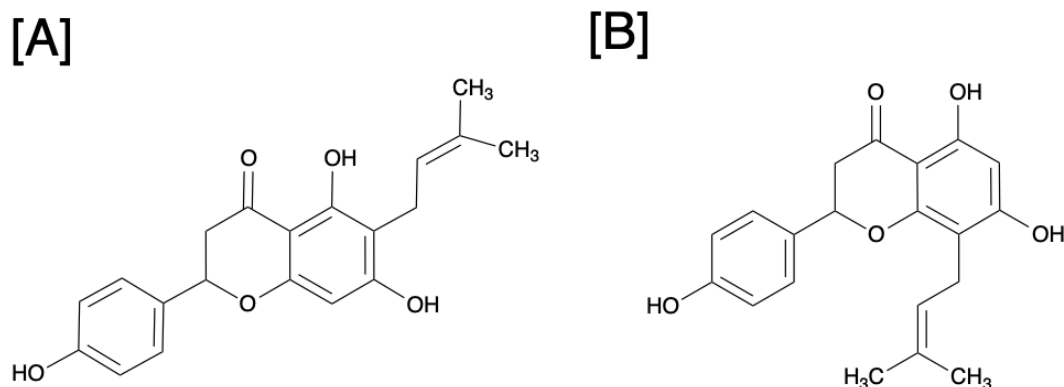
Flavonoide sind sekundäre Pflanzenstoffe, die überall im Pflanzenreich vorkommen und diese natürlicherweise vor Mikroorganismen und Schädlingen schützen (Hodek et al., 2002). Sie werden nach ihrer chemischen Struktur in sechs Untergruppen eingeteilt: Flavanole (Flavan-3-ole bzw. Catechine), Flavonole, Flavone, Flavanone, Isoflavone und Anthocyanidine (Haslam, 1998). Neben den allgemein bekannten antioxidativen Eigenschaften (Pietta, 2000) werden in den letzten Jahren mehr und mehr vielversprechende direkte sowie indirekte, durch Immunmodulation ausgelöste, antikanzerogene Eigenschaften bei verschiedenen Vertretern dieser Familie nachgewiesen. So können sie die



NK-Zell-Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen steigern (Lin et al., 2012), erhöhen Protein- und mRNA-Level von IFN- $\gamma$ , sowie mRNA-Level von Perforin, Granzym A und Granzym B (Saito et al., 2015). Sie verbessern die ADCC, die mit erhöhter IL-2- und IFN- $\gamma$ -Produktion einhergeht (Guruvayoorappan & Kuttan, 2007). Weiterhin ist interessant, dass bspw. Naringenin aber auch Quercetin die Expression der aktivierenden NKG2D-Liganden MICA, MICB, ULBP1 und ULBP2 erhöhen (Bae et al., 2010; J. H. Kim & Lee, 2015). Resveratrol, ein Polyphenol, wurde als HDACi charakterisiert, für das eine direkte dosisabhängige Proliferationshemmung maligner Zellen gezeigt werden konnte (Venturelli et al., 2013). Resveratrol verstärkt zudem die antikanzerogene Wirkung von NK-Zellen und anderen Immunzellen (Falchetti et al., 2001), u.a. durch gesteigerte IFN- $\gamma$ - und Perforin-Produktion sowie vermehrte Expression von NKG2D-Rezeptoren bzw. deren Liganden auf malignen Zellen (Hu et al., 2012; Q. Li et al., 2014). Gleichzeitig erhöht es die Aktivität der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK), extrazelluläre signalregulierte Kinase 1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*, ERK 1/2) sowie c-Jun-N-terminale Kinase (JNK), die an NKG2D-vermittelter Zytotoxizität beteiligt sind (Chen et al., 2007; Lu & Chen, 2010).

Auf der Suche nach neuartigen Therapieansätzen in der Tumorthherapie ergaben unter anderem auch die Versuche der Arbeitsgruppen um Herrn Prof. Dr. Dr. Sascha Venturelli und Herrn PD Dr. Christian Busch in ihren Arbeiten mit zwei Naturstoffen aus der Gruppe der Prenylnaringenine, nämlich 6-Prenylnaringenin (6-PN) und 8-Prenylnaringenin (8-PN) (siehe Abbildung 4), sehr vielversprechende Ergebnisse.

## 1.5 Prenylflavonoide aus Hopfen und Bier



**Abbildung 4:** Chemische Strukturformeln der untersuchten Prenylflavonoide  
Dargestellt sind die chemischen Strukturen von [A] 6-Prenylnaringenin (5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxy-phenyl)-6-(3-methyl-but-2-enyl)-chroman-4-on), sowie [B] 8-Prenylnaringenin (5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxy-phenyl)-8-(3-methyl-but-2-enyl)-chroman-4-on).

Strukturell leiten sich 6-PN und 8-PN vom 2-Phenylchroman-4-on, einem Flavanon, ab und unterscheiden sich durch die unterschiedliche Lokalisation der Prenylgruppe (Venturelli et al., 2018). 6-PN und 8-PN kommen, wie auch andere sekundäre Pflanzenstoffe, in niedrigen Konzentrationen vor allem in Hopfen (*Humulus lupulus*, Familie: Hanfgewächse (*Cannabaceae*)) vor. Als wichtiger Bestandteil in der Herstellung von Bier erfolgt die Aufnahme von 6- und 8-PN über die Ernährung dementsprechend hauptsächlich über dessen Verzehr (Calvo-Castro et al., 2018; Stevens et al., 1999). Die Konzentrationen von 6-PN und 8-PN in Bier variieren je nach Brauverfahren, Hopfengehalt und Biersorte und liegen maximal bei 0,24 mg/L Bier für 6-PN und 0,56 mg/L Bier für 8-PN (amerikanisches Porter Bier, Nordwesten, US Microbrews) (Stevens et al., 1999). Bei einer durchgeführten Humanstudie wies 8-PN nach einmaliger oraler Gabe von 500 mg der jeweiligen Stoffe eine bessere Bioverfügbarkeit als 6-PN auf (Calvo-Castro et al., 2018). Die maximal gemessene Plasmakonzentration, auf alle Studienteilnehmer (n = 16) gemittelt, war mit  $2833,7 \pm 3071,8$  nmol/L für 8-PN im Vergleich zu  $542,7 \pm 295,7$  nmol/L für 6-PN (Mittelwert  $\pm$  SD) dementsprechend geschlechtsabhängig im Schnitt bis zu 5,2-fach (Frauen: 3,7-fach; Männer: 7,1-fach) höher und signifikant schneller (6-PN nach 2,3 h; 8-PN nach 1,6 h) erreicht. Trotz deutlich erhöhter Dosierung im Vergleich zur beispielsweise durch Bierkonsum erreichbaren Aufnahmemenge, zeigten die

gesunden Probanden keinerlei Zeichen einer Toxizität (Calvo-Castro et al., 2018).

Interessant sind neben einigen der oben genannten positiven Eigenschaften der beiden Prenylflavonoide und neben einer potenten estrogenen Aktivität von 8-PN (Milligan et al., 1999), insbesondere die antitumoralen sowie die immunmodulierenden Effekte dieser beiden Stoffe. Sowohl 6- als auch 8-PN führten zu einer erhöhten Viabilität von Immunzellen, genauer gesagt mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs), bei Exposition *ex vivo / in vitro* (Calvo-Castro et al., 2018). 6- und 8-PN wirkten dosisabhängig bis zu 100 µmol/L wachstumshemmend auf Tumorzellen von Prostatakarzinom-Zelllinien (PC-3 und DU145) (Delmulle et al., 2006). Auch in einer anderen Arbeit wirkten sie in ähnlichen Konzentrationen innerhalb von 24h – 8-PN etwas weniger potent als 6-PN – antiproliferativ gegenüber PC-3-Prostata- und UO.31-Nierenzellkarzinom-Zellen (Busch, Noor, et al., 2015). In Dosierungen bis zu 200 µmol/L induzierten sie weiterhin Caspase-unabhängigen Zelltod, wobei die betroffenen Zellen eine auf Autophagie hindeutende Morphologie zeigten (Delmulle et al., 2008). 8-PN hemmte weiterhin die durch den *basic fibroblast growth factor* (bFGF) und den *vascular endothelial growth factor* (VEGF) induzierte Angiogenese *in vitro* und *in vivo* (Pepper et al., 2004). Durch Absenkung der reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS)-Level wirkte es zudem antioxidativ (Blanquer-Rosselló et al., 2013).

Neben den oben genannten Eigenschaften wurde zuletzt auch eine starke HDACi-Aktivität für 6- und 8-PN nachgewiesen. Da HDACi unkontrollierte Zellproliferation hemmen können, Zelldifferenzierung fördern und Apoptose induzieren (Glozak & Seto, 2007), lassen sich die bereits oben erwähnten antiproliferativen Effekte von 6- und 8-PN damit in Zusammenhang bringen. In diesem Zuge wurden bei einer Behandlung von SK-MEL-28- (malignes Melanom) und BLM-Zellen (metastasiertes amelanotisches Melanom) schon mit 20 µmol/L 6-PN und 8-PN deutliche antiproliferative Effekte beobachtet. In höheren Dosierungen (50 µmol/L, 100 µmol/L) hemmten 6- und 8-PN die Zellproliferation um bis zu 90 %. Dieselbe Studie konnte die reduzierte

Proliferationsrate auf Caspase- bzw. Apoptose-unabhängige Mechanismen durch Induktion von G2-Arrest und Nekrose zurückführen (Venturelli et al., 2018). Durch ihre HDACi-Aktivität könnten diese Stoffe daher auch beim Einsatz der NK-Zellen in der Tumortherapie interessant sein. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass NK-Zellen mit HDACi vorbehandelte Tumorzellen verstärkt abtöten. Dies wurde insbesondere auf eine erhöhte Expression von MICA/B auf den Tumorzellen zurückgeführt, wohingegen die Expressionsraten von ULBP1–3 als alternative Liganden der NKG2D-Rezeptoren dabei unverändert blieben (Armeanu et al., 2005). Die isolierte Vorbehandlung von NK-Zellen mit den HDACi SAHA und Valproat (*valproic acid*, VPA) führte in Studien zu einer verminderten zytolytischen Aktivität, die entweder auf eine inhibierte Aktivierung von NFκB mit konsekutiv reduzierter Expression der aktivierenden Rezeptoren NKp46 und NKp30 zurückgeführt wurde (Ogbomo et al., 2007) oder auf einer verminderten Expression von NKG2D durch Hemmung des *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) und der HDAC3 beruhte (Ni et al., 2017). Demgegenüber konnte, wie oben beschrieben, für Resveratrol neben der HDACi-Aktivität auch eine Erhöhung der NK-Zell-Zytotoxizität gezeigt werden (Chen et al., 2007; Lu & Chen, 2010).

### 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Wie bereits angedeutet gibt es in der Zwischenzeit einige neue vielversprechende Ansätze in der Tumortherapie. Die Forschungsschwerpunkte von Herrn Prof. Dr. Sascha Venturelli sowie Herrn PD Dr. Christian Busch liegen in der Evaluierung direkt in der Natur vorkommender und möglichst nebenwirkungsarmer Wirkstoffkandidaten. Zuletzt konnten sie für die Stoffe 6- und 8-PN eine HDACi-Aktivität sowie eine antiproliferative Wirkung gegenüber Tumorzellen aufzeigen. Für potenziell nebenwirkungsreiche, medikamentöse HDACi wie VPA, das zu Elektrolytstörungen, Hepatotoxizität, Tachykardien und Atemdepression bis hin zu einer Enzephalopathie mit Koma und Tod führen kann (Patel & Nagalli, 2020), wurde nach Behandlung der Lebertumorzelllinien HepG2 und Hep3B eine Erhöhung des NK-Zell-vermittelten Tumorzell-Killings festgestellt, das durch eine Steigerung der MICA/B-Expression, aber ohne eine

erhöhte ULBP1-3 Expression erklärt werden konnte (Armeanu et al., 2005). Auch durch die Vorbehandlung mit 6- oder 8-PN verbesserte sich in Vorversuchen der AG Venturelli das NK-Zell vermittelte Tumorzell-Killing (AG Venturelli, persönliche Mitteilung).

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war deshalb die Beantwortung der Fragen, ob die HDACi Wirkstoffe 6-PN und 8-PN das NK-Zell-vermittelte Tumorzell-Killing beeinflussen und inwiefern sie die Expression aktivierender NK-Zell-Rezeptoren bzw. deren Liganden beeinflussen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Verbrauchsmittel

**Tabelle 2:** Reagenzien und Verbrauchsmittel

Reagenz	Hersteller
<b>Attune™ Focusing Fluid</b>	Life technologies Corp. by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
<b>Attune™ Shutdown Solution</b>	Life technologies Corp. by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
<b>Attune™ Wash Solution</b>	Life technologies Corp. by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
<b>Bovines Serum Albumin (BSA) 10 mg/ml</b>	Promega GmbH, Walldorf
<b>β-Mercaptoethanol</b>	Life technologies Corp. by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
<b>Descosept</b>	Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Essigsäure</b>	Carl Roth, Karlsruhe
<b>Ethanol</b>	Honeywell, Charlotte, North Carolina, USA
<b>Formaldehyd-Lösung (37 %)</b>	Carl Roth, Karlsruhe
<b>Isopropanol (70 %)</b>	SAV Liquid Production, Flintsbach am Inn
<b>Methanol</b>	Honeywell, Charlotte, North Carolina, USA
<b>Natriumhydroxid (98 %)</b>	Carl Roth, Karlsruhe
<b>Propidiumiodid (PI)</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA / Merck KGaA, Darmstadt

Reagenz	Hersteller
Secusept	ECOLAB, Saint Paul, Minnesota, USA
Sulforhodamin B (SRB, Natriumsalz)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA / Merck KGaA, Darmstadt
Trichloressigsäure ( <i>trichloroacetic acid</i> , TCA, 99 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris; 99 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Carl Roth, Karlsruhe
Trizma® base (Tris-Base)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA / Merck KGaA, Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA / Merck KGaA, Darmstadt

## 2.2 Angesetzte Puffer und Lösungen

**Tabelle 3:** Angesetzte Puffer und Lösungen

Aufgelistet sind die angesetzten Puffer und Lösungen mit ihren jeweiligen Arbeitslösungen und ggf. Ansätzen; H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, doppelt destilliertes Wasser; % (v/v), Volumenprozent; % (w/v), Gewichtsprozent.

Puffer / Lösung	Arbeitslösung	Ansatz
<b>Einfriermedium</b>	DMEM 20 % (v/v) fötales Kälberserum (fetal calf serum, FCS) 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)	
<b>Essigsäure</b>	Essigsäure (1 %)	Essigsäure (100 %): 20 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> : aufgefüllt auf 2 L
<b>FACS-Puffer</b>	PBS, 10 % (v/v) FCS	Für 50 ml: PBS: 45 ml FCS: 5 ml
<b>Fixierlösung</b>	0,5 % (v/v) Formaldehyd (37 %) in FACS-Puffer	

<b>Puffer / Lösung</b>	<b>Arbeitslösung</b>	<b>Ansatz</b>
<b>Folsäure 0,02 mM für NK-Medium</b>	Als 100-fach Stock 2 mM	441 mg in 10 ml NaOH → 100 mM → 1 : 50 -Verdünnung herstellen für NK-Medium: 0,5 ml (100 mM) + 24,5 ml α-MEM = 25 ml 2 mM als 100-fach Stock
<b>Inositol 0,2 mM für NK-Medium</b>	als 100-fach Stock: 20 mM	Für 0,2 mM in 100 ml: 100-fach angesetzt: 20 mM in 1 ml-Portionen 180 mg/ml $\cong$ 1 M (20 mM entsprechen 1/50 davon)  ⇒ 180 mg in 50 ml PBS
<b>SRB-Färbelösung</b>	0,4 % (w/v) in 1%iger Essigsäure	SRB: 4 g Essigsäure (1 %): 10 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> : aufgefüllt auf 1 L
<b>Trichloressigsäure</b>	TCA, 10 %	TCA (< 99 %): 100 g H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> : aufgefüllt auf 1 L
<b>Tris Base (pH 10,5)</b>		Tris 10 mM: 1,21 g H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> : aufgefüllt auf 1 L

### 2.3 Zellkulturmaterialien

**Tabelle 4:** Verwendete Zellkulturmaterialien

<b>Material für Zellkultur</b>	<b>Hersteller</b>
<b>α-MEM (minimum essential medium)</b>	Life technologies Corp. by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
<b>DMEM – Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (High glucose + 10 % FCS)</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA / Merck KGaA, Darmstadt
<b>DMEM – Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (Low glucose + 10 % FCS + 1 % 200 mM Glutamin (<math>\cong</math> 2 mM))</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA / Merck KGaA, Darmstadt
<b>Dulbecco´s Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (modifiziert, ohne Ca<sup>2+</sup>,</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA / Merck KGaA, Darmstadt

Material für Zellkultur	Hersteller
Cl <sup>-</sup> , Mg <sup>2+</sup> ; flüssig, steril-gefiltert geeignet für Zellkultur) (PBS)	
Fötales Kälber- / Rinder-Serum (FCS / fetal bovine serum, FBS), bei 56 °C hitzeinaktiviert	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA / Merck KGaA, Darmstadt
Pferde-Serum	Life technologies Corp. by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Trypanblau-Lösung (0,4 %; 0,81 % NaCl; 0,06 % K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA / Merck KGaA, Darmstadt

## 2.4 Enzyme

**Tabelle 5:** Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
Accutase	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA / Merck KGaA, Darmstadt
Trypsin-EDTA (0,25 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA / Merck KGaA, Darmstadt

## 2.5 Antikörper

**Tabelle 6:** Eingesetzte Antikörper

PE, Phycoerythrin (Exzitation = 488 nm, Emission = 565–605 nm).

Antikörper (AK)	Hersteller	Details
Anti-hMICA/B PE-AK (Catalog # FAB13001P)	R&D Systems, Minneapolis, MN 55413, USA	Monoklonaler Maus-IgG <sub>2A</sub> Klon # 159207, PE-konjugiert
Anti-hULBP-1 PE-AK (Catalog # FAB1380P)	R&D Systems, Minneapolis, MN 55413, USA	Monoklonaler Maus-IgG <sub>2A</sub> Klon # 170818, PE-konjugiert
Anti-hULBP-2/5/6 PE-AK (Catalog # FAB1298P)	R&D Systems, Minneapolis, MN 55413, USA	Monoklonaler Maus-IgG <sub>2A</sub> Klon # 165903, PE-konjugiert
Anti-hULBP-3 PE-AK (Catalog # FAB1517P)	R&D Systems, Minneapolis, MN 55413, USA	Monoklonaler Maus-IgG <sub>2A</sub> Klon # 166510, PE-konjugiert



Antikörper (AK)	Hersteller	Details
<b>Fc-Blocker (Gamunex® 10 %)</b>	Talecris Biotherapeutics GmbH, Frankfurt am Main	Immunglobulin G (IgG, human)
<b>PE Mouse IgG2a, κ Isotype Ctrl (FC) Antibody (Catalog # 400214)</b>	BioLegend®, San Diego, USA	Monoklonaler Maus-IgG <sub>2A</sub> Klon MOPC-173, PE-konjugiert

## 2.6 Assays und Kits

**Tabelle 7:** Verwendete Assays und Kits

Verwendetes Kit	Hersteller
<b>CellTiter-Blue® Cell Viability Assay</b>	Promega, Madison, Wisconsin, USA

## 2.7 Zelllinien

### 2.7.1 Primäre Lebertumore

**Tabelle 8:** Primäre Lebertumor-Zelllinien

RG, Risikogruppe; DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen.

Zelllinie	RG	Tumorentität	Herkunft	Anbieter
<b>HepG2</b>	1	Primäres Hepatoblastom	Homo sapiens (15 J., männlich, 1975)	DSMZ, Braunschweig
<b>Hep3B</b>	1	Hepatozelluläres Karzinom	Homo sapiens (8 J., männlich, 1976)	DSMZ, Braunschweig

Diese beiden, aus primären Lebertumoren von Patienten unterschiedlicher Ethnizität stammenden, Zelllinien vereinen hohe Proliferationsraten und einfache Handhabung. Unter anderem wegen ihrer ähnlichen Eigenschaften und daher hoher Vergleichbarkeit sowie ihrem Ursprung als Zellen primärer Lebertumore (Hepatoblastom und Hepatozelluläres Karzinom), die in hoher Inzidenz weltweit vorkommen und eine häufige Todesursache darstellen (Calvisi et al., 2006), sind sie Standardzelllinien in der Zellkultur der Tumorforschung sowie in der pharmazeutischen Forschung (Aden et al., 1979; Donato et al., 2015; Knowles et

al., 1980; Qiu et al., 2015). Gleichzeitig existieren auch einige Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien. Zum Beispiel bildet HepG2 das Protein p53 als Wildtyp, wohingegen dieses bei der Hep3B-Zelllinie fehlt (Qiu et al., 2015). Für die Fragestellung und den Versuchseinsatz entscheidend sind vor allem aber Ergebnisse aus Studien, die eine Reaktion dieser Zelllinien auf die Behandlung mit verschiedenen HDACi nachweisen. Zum einen stieg dabei die Expression von NKG2DL wie MICA und MICB, zum anderen wurde durch die verschiedenen HDACi aber auch die Zellproliferation direkt gehemmt und der Anteil vitaler Zellen sank (Busch, Burkard, et al., 2015; J. H. Kim & Lee, 2015; Leischner et al., 2016; Venturelli et al., 2013).

### 2.7.2 Natürliche Killerzelllinien

**Tabelle 9:** Zelllinien der Natürlichen Killerzellen

RG, Risikogruppe; ATCC, American type culture collection.

Zelllinie	RG	Tumorentität	Ursprung/Herkunft	Anbieter
<b>NK-92</b>	2	NK-Zell Lymphom (malignes Non-Hodgkin-Lymphom)	Homo sapiens (50 J., männlich, 1992)	ATCC®, Manassas, Virginia, USA
<b>NK-92 Mi</b>	2	NK-Zell Lymphom (malignes Non-Hodgkin Lymphom)	Homo sapiens (50 J., männlich, 1992)	ATCC®, Manassas, Virginia, USA

Die NK-92-Zelllinie stammt aus einem 50-jährigen Patienten aus dem Jahr 1992, der an einem NK-Zell-Lymphom erkrankt war. Sie ist dabei diejenige NK-Zelllinie, zu der es die meisten Untersuchungen gibt. So fand sie in mehreren abgeschlossenen Phase I-Studien bereits klinische Anwendung und ist durch die FDA zu Phase II-Studien zugelassen (Arai et al., 2008; Boyiadzis et al., 2017; Gong et al., 1994; Klingemann et al., 2016; T. Tonn et al., 2001; Torsten Tonn et al., 2013; Williams et al., 2017; J. Zhang et al., 2019). Proliferation und Zytotoxizität sind abhängig von IL-2, welches deshalb in regelmäßigen zeitlichen Abständen in das Kulturmedium hinzugegeben werden muss. NK-92-Zellen exprimieren wenige inhibitorische Rezeptoren, dagegen aber ein großes Spektrum aktivierender Rezeptoren, ausgenommen CD16, darunter auch

solche, die für die zytolytischen Eigenschaften via Perforin- und Granzymfreisetzung essentiell sind. Sie produzieren außerdem für die zytotoxischen Eigenschaften wichtige Signalmoleküle wie bspw. FASL, TRAIL, TNF- $\alpha$ , sowie Moleküle, die der Immun-Effektorzell-Regulation dienen (Maki et al., 2001).

Die Zelllinie NK-92 Mi ist eine rekombinante NK-92-Linie, in welche das humane IL-2-Gen (*hIL-2*) stabil transfiziert wurde, wodurch die Zellen selbst endoplasmatisches Retikulum-ständiges IL-2 bilden (Klingemann et al., 2016). Die Zellen proliferieren daher auch ohne externe Zugabe von IL-2 bei vergleichbaren zytotoxischen Eigenschaften (Tam et al., 1999).

## 2.8 Geräte

**Tabelle 10:** Verwendete Geräte und Hersteller

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Autoklav Systec V-150</b>	Systec GmbH, Linden
<b>Biofuge, Biofuge 13</b>	Heraeus Instruments / Kendro Laboratory Products, Hanau
<b>Biofuge, Biofuge fresco</b>	Heraeus Instruments / Kendro Laboratory Products, Hanau
<b>Brutschrank 10-05868 (37,0 °C; 4,9 % CO<sub>2</sub>)</b>	Binder GmbH, Tuttlingen
<b>Elisa Reader 1 / Photometer GENios Plus</b>	Tecan Group Ltd., Männedorf / Biotek AG, Schaffhausen, Schweiz
<b>Elisa Reader 2 Synergy HT</b>	BioTek Instruments; Winooski, VT, USA
<b>FACS-Gerät Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer</b>	Life technologies Corp. by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
<b>Kühlschränke (-18 °C, -80 °C, -120 °C)</b>	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen
<b>Laminar Flow Sicherheitswerkbank HERAsafe Kendro</b>	Heraeus Holding GmbH, Hanau
<b>Lichtmikroskop IMT-2</b>	Olympus, Shinjuku, Tokio, Japan
<b>Mehrfachdispenser BRAND® HandyStep® S manual repetitive pipette</b>	Brand GMBH + CO KG, Wertheim
<b>Mehrkanal-Pipette Eppendorf Xplorer®, 8-Kanal</b>	Eppendorf AG, Hamburg

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Neubauer – Zählkammer (Kammertiefe 0,1 mm, Großquadrat 1 mm<sup>2</sup>)</b>	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim vor der Rhön
<b>Pipetboy acu</b>	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
<b>Pipetten Eppendorf Research Plus (10, 100, 200, 1000 µl)</b>	Eppendorf AG, Hamburg
<b>Plattformschüttler Rotamax 120</b>	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
<b>Präzisionswaage MC1 Analytic AC 210S</b>	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co.KG, Göttingen
<b>Schüttelmaschine Vibrofix VF1 Electronic</b>	Janke + Kunkel IKA Labortechnik, Staufen
<b>Schüttelwasserbad GFL 1086 (37 °C)</b>	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
<b>Trockenschrank (40 °C)</b>	Binder GmbH, Tuttlingen
<b>Vakuum-Absaugpumpe PC 2004 VARIO</b>	VACUUBRAND GMBH + CO KG, Wertheim
<b>Countess II FL</b>	Life technologies Corp. by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
<b>Zentrifugen Megafuge 2.0R, Biofuge 13, 15R</b>	Heraeus Holding GmbH, Hanau

## 2.9 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 11:** Eingesetzte Verbrauchsmaterialien mit Herstellern

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
<b>24-Well-Platten</b>	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
<b>6-Well-Platten</b>	Corning Incorporated, Corning, New York, USA
<b>96-Well-Platten</b>	Corning Incorporated, Corning, New York, USA
<b>96-Well-Platten (Polypropylen)</b>	Greiner Bio-One, Frickenhausen
<b>Automation Reservoir, 50 ml, steril</b>	Biotix, San Diego, USA
<b>Cellstar® Polypropylen Röhrchen (15 ml)</b>	Greiner Bio-One, Frickenhausen

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Combitips (5 ml; 12,5 ml)</b>	Eppendorf AG, Hamburg
<b>Corning® Costar® Stripette® (Stabpipette; 5, 10, 25 und 50 ml)</b>	Corning Incorporated, Corning, New York, USA
<b>EASYstrainer™ 40 µm – steril (Filter für HepG2-Zellen)</b>	Greiner Bio-One, Frickenhausen
<b>Einweg-Pasteurpipetten aus Glas</b>	Corning Incorporated, Corning, New York, USA
<b>Einweghandschuhe</b>	Abena A/S, AAbenraa, Dänemark
<b>Eppendorf Safe Lock Tubes (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)</b>	Eppendorf AG, Hamburg
<b>Falcon® 5 ml Round Bottom Polystyrene Test-Tube</b>	Corning Inc., Corning, New York, USA
<b>Falcon® konische Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)</b>	Corning Inc., Corning, New York, USA
<b>Kryoröhrchen 1,2 ml, 2 ml (Polypropylen)</b>	Corning Inc., Corning, New York, USA
<b>Pipettenspitzen SafeSeal® SurPhob® Filterspitzen 1250 µl, steril</b>	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
<b>Pipettenspitzen, 1000 µl TipOne® Filterspitzen (steril)</b>	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg
<b>Pipettenspitzen, 200 µl TipOne® Filterspitzen graduert (steril)</b>	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg
<b>Pipettenspitzen, SafeSeal® Tips Premium 100 µl, steril</b>	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
<b>Pipettenspitzen, steril, 10 µl</b>	PEQLAB / VWR International, Darmstadt
<b>Reagenz- und Zentrifugenröhrchen (5 ml, PS mit Rundboden)</b>	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht
<b>Schraubbecher, 100 ml, steril</b>	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht
<b>Sekusept™ PLUS</b>	Ecolab Deutschland GmbH, Monheim am Rhein
<b>Vernichtungsbeutel (Polyamid)</b>	Brand GMBH + CO KG, Wertheim
<b>Zählkammern automatisiert, Invitrogen™ Countess™ Zellzählungs-Kammerobjektträger</b>	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

Produkt	Hersteller
Zählkammern manuell, C-Chip (System Neubauer Improved), Einweg	NanoEnTek, Guro-gu, Seoul, Südkorea
Zellkulturflaschen mit Filter (175 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflaschen mit Filter (75 cm <sup>2</sup> )	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

### 2.9.1 Software

Tabelle 12: Verwendete Software

Software	Hersteller
CellQuest™ Version 3.1f (FACS)	BD Biosciences, Heidelberg
Endnote X9.3.3	Clarivate Analytics, Boston, USA
Attune™ NxT v2.6	Life technologies Corp. by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Graphpad Prism 4 und 9	GraphPad Software, Inc., San Diego, USA
LEGENDplex™	BioLegend®, San Diego, USA
Magellan™, V 5.00	Tecan Group Ltd., Crailsheim
Microsoft® Office 2013 (Microsoft® Excel für Mac, Version 16.16.27; Microsoft® Word für Mac, Version 16.16.27; Microsoft® PowerPoint für Mac, Version 16.16.27)	Microsoft Corporation, Redmond, USA
XFluor4	Tecan Group Ltd., Crailsheim

## 2.10 Zellbiologische Methoden

### 2.10.1 Kultivieren von Zellen

Die Zellen der verschiedenen Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen mit einer Grundfläche von 75 cm<sup>2</sup> in einem Begasungsbrutschrank (Binder) bei 37,5 °C und 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> kultiviert. Nährstoffquellen für die jeweiligen Zellreihen stellten dabei folgende Nährmedien dar:

<u>Hep3B:</u>	DMEM, high glucose + 10 % FCS
<u>HepG2:</u>	DMEM, low glucose + 10 % FCS + 1 % L-Glutamin (200 mM/5 ml in 500 ml → 2 mM)
<u>NK-92 Mi:</u>	NK-Zell-Medium

- 72 %  $\alpha$ -MEM
- + 12,5 % FBS
- + 12,5 % Pferdeserum
- + 0,2 mM Inositol
- + 0,1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol
- + 0,02 mM Folsäure

NK-92: NK-Zell-Medium + IL-2 (je 0,5 ml 100-fach Stock in 50 ml bei Einsatz von 100 U/ml für Zellen)

Die Zellreihen Hep3B und HepG2 wurden dabei in 13 ml Nährmedium pro 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche kultiviert. Das Zellwachstum wurde durch tägliche Begutachtung hinsichtlich Zelldichte, Morphologie aber auch Kontamination makroskopisch und mikroskopisch kontrolliert. In regelmäßigen Abständen wurde nach diesen Kriterien entweder nur das Medium gewechselt oder die Zellen bei zu hoher Dichte (ab einer Konfluenz > 70 %) gesplittet. Alle Nährmedien, Lösungen oder Enzyme wurden dabei vor Kontakt mit den Zellen im 37 °C warmen Wasserbad ausreichend erwärmt.

### 2.10.2 Passagieren der Zellen

Zum Passagieren der Leberkrebszelllinien wurde zunächst aus den Zellkulturflaschen jeweils das Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 5–8 ml PBS gewaschen. Dies wurde erneut abgesaugt, um eventuelle Rückstände des Mediums herauszuwaschen, da enthaltenes FCS Proteinaseinhibitoren (insbesondere  $\alpha$ -1-Antitrypsin) enthält, welche das im nächsten Schritt benötigte Trypsin hemmen. Danach erfolgte das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden mit Trypsin. Diese Endopeptidase spaltet als Serin-Protease Proteine an bestimmten Stellen und löst in der Zellkultur die Adhärenz der Tumor-Zellen auf. Dafür wurden 1–1,5 ml Trypsin in die Flasche pipettiert.

Nach kurzer Inkubation im Brutschrank lösten sich die Zellen spätestens durch leichtes Klopfen gegen die Flasche. Zu den nun abgelösten Zellen wurde anschließend eine definierte Menge des entsprechenden Mediums (i.d.R. 10 ml) pipettiert. Die Zellen konnten dadurch nach mehrmaligem Resuspendieren mit Hilfe einer Pipette, um die insbesondere bei den HepG2-Zellen auftretenden Zellaggregate durch Scherkräfte zu vereinzeln, gesplittet werden. Dabei wurde ein Teil der Zellsuspension in der Flasche belassen und nach Zugabe ausreichender Menge des entsprechenden Nährmediums zur weiteren Kultivierung wieder in den Brutschrank gelegt. Nach jeweils drei bis vier Passagen wurden die Zellen in eine neue Zellkulturflasche überführt.

Die NK-Zellen wurden in 6-Well-Platten in jeweils 3–5 ml NK-Medium / Well kultiviert. Die Zellen bilden dabei mit der Zeit größere Zellaggregate. Um die Zellen zu passagieren wurde jeweils 2–3 ml NK-Medium / Well in eine neue 6-Well-Platte vorgelegt. Anschließend wurde je 1 ml NK-Zellsuspension / Well durch Abpipettieren der NK-Zell-Aggregate mit einer 1000 µl-Pipette entnommen und in die vorbereitete neue 6-Well-Platte pipettiert.

### 2.10.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen aus den Kulturflaschen nach Waschen mit PBS mittels Trypsin vereinzelt, in ein konisches Zentrifugenröhrchen gegeben und 3 min bei 302 g (1200 rpm) zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in speziellem Einfriermedium (DMEM, 20 % FCS, 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)) resuspendiert und je 1 ml in Kryoröhrchen pipettiert. Die Kryoröhrchen wurden bei einer kontrollierten Einfriereschwindigkeit von -1 °C/min im Gefrierbehälter (Nalgene Cryo 1 °C Freezing Container, Sigma-Aldrich) mit 100 % Isopropanol auf -80 °C abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Um die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wieder aufzutauen, wurden diese im 37 °C warmen Wasserbad erwärmt und anschließend im entsprechenden Medium aufgenommen. Nach anschließendem 3-minütigen Zentrifugieren bei 302 g (1200 rpm) wurde der Überstand verworfen, um das zytotoxische DMSO zu entfernen und die Zellen erneut im entsprechenden Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in Kulturflaschen ausgelegt und weiter kultiviert.



### 2.10.4 Zellzählung

Nach Entnahme von Zellen in Falcon-Röhrchen wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau in einem 96-Well ausreichend vermischt. Trypanblau, ein Azofarbstoff, gelangt hierbei nur in tote Zellen, welche stark angefärbt werden. 10 µl dieser Mischung wurden dann auf einen Zählobjektträger pipettiert und anschließend mit dem automatisierten Zellzählgerät (Countess II FL) gemessen. Zu berücksichtigen ist dabei, dass bei Zellzahlen von  $> 2 \times 10^6$  die Messwerte des Gerätes nicht mehr genau sind. In diesem Fall wurde die Zellsuspension mit Medium verdünnt und erneut vermessen.

Alternativ wurde die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dabei wurden ebenfalls 10 µl der Mischung aus Zellsuspension und Trypanblau auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und anschließend mindestens zwei Großquadrate (Fläche: 1 mm<sup>2</sup>, Tiefe: 0,1 mm) manuell ausgezählt und nach folgendem Schema ausgewertet:

$$\frac{\emptyset \text{ Zellzahl}}{\text{Großquadrat}} \times 2 (\text{Verdünnungsfaktor}) \times 10^4 = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$

### 2.10.5 Auslegen der Zellen

Das Auslegen der Zellen, die anschließende Behandlung und das *Killing* erfolgten nach folgendem Schema (siehe Abbildung 5). Die Erläuterung zum Auslegen der Zellen folgt im anschließenden Fließtext.

T	T	K	K	M	M
U + U	U + U	U + 12,5 µM	U + 12,5 µM	U + 25 µM	U + 25 µM
12,5 µM + /	12,5 µM + /	12,5 µM + U	12,5 µM + U	12,5 µM + 12,5 µM	12,5 µM + 12,5 µM
25 µM + /	25 µM + /	25 µM + U	25 µM + U	25 µM + 25 µM	25 µM + 25 µM

**Abbildung 5:** Pipettierschema 24-Well-Platte.

Nach diesem Schema wurden die Hep3B- / HepG2-Zellen ausgelegt. Dabei wurden je vier Platten für Hep3B-Zellen (25 000 Zellen / Well für das *Killing* mit NK-92 Mi-Zellen und 20 000 Zellen / Well für das *Killing* mit NK-92-Zellen) und HepG2-Zellen (30 000 Zellen / Well) ausgelegt. Davon je zwei Platten für die Behandlung mit 6-PN und je zwei Platten für die Behandlung mit 8-PN in den E:T-Verhältnissen 1,25:1 und 0,625:1. Einzige komplett zellfreie Wells blieben die Medium-Kontroll-Wells (orangefarben hinterlegt), in den Kontroll-Wells wurden Tumorzellen ohne Zugabe NK-Zellen oder 6- / 8-PN kultiviert (blau hinterlegt), die Triton-Totkontrolle diente als Referenz für eine 100%ige Zytotoxizität (grau hinterlegt). Erstgenannt sind jeweils die Behandlungen der Hep3B- / Hep-G2-Zellen, zweitgenannt jeweils die Behandlung der NK-Zellen; bei einem Schrägstrich erfolgte keine Zugabe von NK-Zellen, die Hep3B- / HepG2-Zellen wurden dabei alleinig mit 6- / 8-PN behandelt. T, Triton-Totkontrolle; K, Kontrolle aus unbehandelten Hep3B- / HepG2-Zellen ohne Zugabe von NK-Zellen; M, Medium-Kontroll-Well; U, unbehandelt; E:T-Verhältnis, *Effector-to-Target*-Verhältnis.

### 2.10.5.1 Auslegen der Leberzelllinien

Die Tumorzelllinien wurden in 24-Well-Platten ausgelegt. Dabei wurden bei den Hep3B-Zellen je 25 000 oder 20 000 Zellen / Well ausgelegt, bei den HepG2-Zellen je 30 000 Zellen / Well. Diese Zellzahlen wurden jeweils in 500 µl des entsprechenden Mediums pro Well ausgelegt. Dazu wurden die vereinzelt Zellen gezählt, in entsprechender Gesamtmenge im Medium im richtigen Verhältnis angesetzt und anschließend nach Pipettierschema (siehe Abbildung 5) mit dem Combitip / Multistepper in die Wells pipettiert.

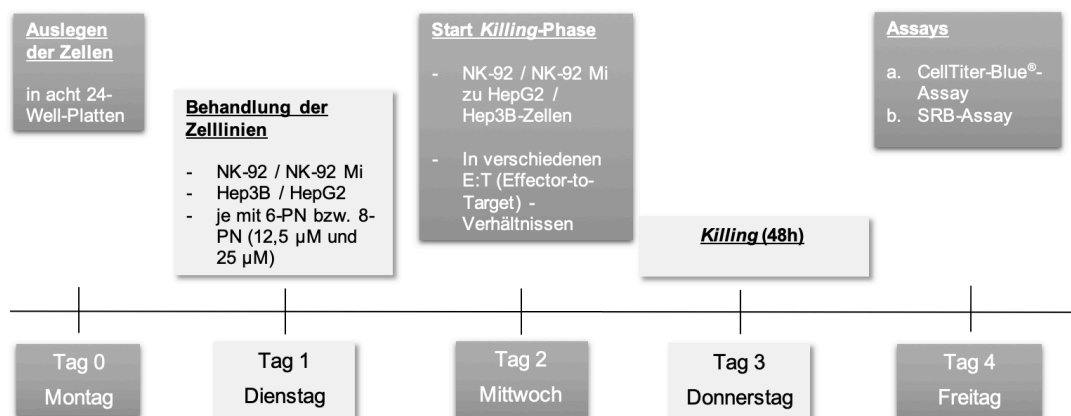
### 2.10.5.2 Auslegen der NK-Zelllinien

Zur Behandlung in den entsprechenden Dosierungen vor dem anschließenden *Killing* wurden die NK-Zellen zunächst separat auf 6-Well-Platten ausgelegt. Das Auslegen der NK-Zelllinien erfolgte grundsätzlich in ähnlicher Weise wie das Passagieren. Zunächst wurde je 1 ml der NK-Zell Aggregate pro Well in ein

Falcon-Röhrchen entnommen. Nachdem die Zellen gezählt wurden, wurde eine Zellsuspension in gewünschter Zellzahl auf eine definierte Menge Medium hergestellt. In diesem Verhältnis wurden anschließend die Zellen in 6-Well-Platten ausgelegt, sodass jedes Well eine definierte Zellzahl enthielt (z.B.  $2 \times 10^6$  Zellen in 4 ml).

### 2.10.6 Behandlung von Zellen

24 h nach Auslegen der Zellen erfolgte die Behandlung der jeweiligen Zelllinien. Die Dauer der Behandlung betrug 24 h. Dazu wurden zunächst aus den vorhandenen Stocklösungen von 6-PN und 8-PN (100 mM) die entsprechenden Verdünnungen hergestellt. Bei den Tumorzelllinien wurde hierbei die Behandlung in 250  $\mu$ l Medium angesetzt und zu bereits auf die Zellen gegebenen 250  $\mu$ l Medium hinzupipettiert. Aufgrund dieser zusätzlichen 1:2 - Verdünnung wurden die Behandlungskonzentrationen von 6- / 8-PN doppelt so hoch angesetzt (25  $\mu$ M und 50  $\mu$ M). Abbildung 6 zeigt schematisch den zeitlichen Ablauf eines Experiments.

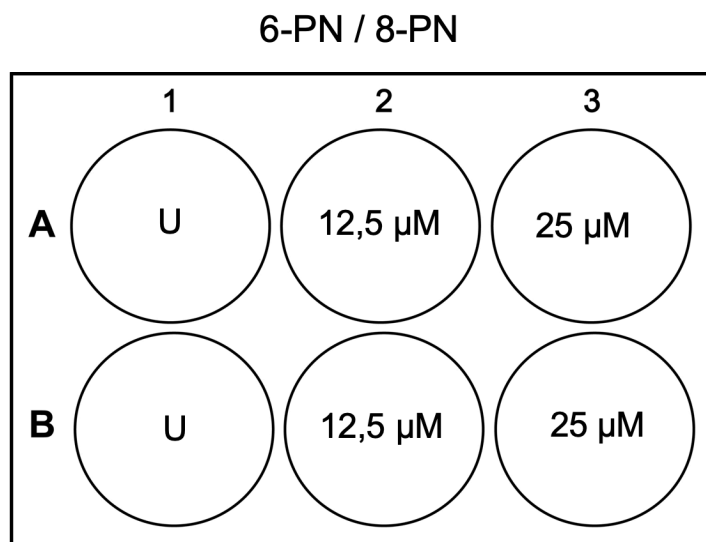


**Abbildung 6:** Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs eines Experiments.

24 h nach Auslegen der definierten Zellzahlen erfolgte der Beginn der 24-stündigen Behandlung mit jeweils 12,5  $\mu$ M und 25  $\mu$ M 6- oder 8-PN. Nach 24 h Behandlung wurde diese beendet und die NK-Zellen in definierten *Effector-to-Target*-Verhältnissen (E:T-Verhältnisse) 1,25:1 und 0,625:1 zu den Hep3B- bzw. HepG2-Zellen hinzugegeben. Nach einer *Killing*-Phase von 48 h erfolgten die Messungen / Assays; NK-Zellen, Natürliche Killerzellen; 6-PN, 6-Prenylaringenin; 8-PN, 8-Prenylaringenin; SRB, Sulforhodamin B.

Bei den ausgelegten NK-Zellen verhielt es sich ähnlich. Hier wurde die Behandlung im Verhältnis 1:5 zu den ausgelegten Zellen pipettiert. Daher war

hier eine Herstellung der fünffachen Konzentration der Behandlung notwendig. Es wurden also 62,5  $\mu\text{M}$  für die 12,5  $\mu\text{M}$ -Behandlung und 125  $\mu\text{M}$  für die 25  $\mu\text{M}$ -Behandlung hergestellt. Jeweils 1 ml davon wurde anschließend zu den 4 ml ausgelegter NK-Zellsuspension / Well pipettiert. Für 6- und 8-PN wurde nach Behandlungsschema (siehe Abbildung 7) je eine 6-Well-Platte benutzt und die unterschiedlichen Konzentrationen jeweils als Duplikate angelegt.



NK-92 Zellen / NK-92 Mi-Zellen ( $2 \times 10^6$  Zellen/ Well)

**Abbildung 7:** Behandlungsschema NK-Zellen.

Die ausgelegten NK-Zellen wurden für 24 h mit den definierten Konzentrationen 12,5  $\mu\text{M}$  und 25  $\mu\text{M}$  6- bzw. 8-PN nach folgendem Schema behandelt. Anschließend erfolgte eine 48-stündige *Killing*-Phase unter Hinzugabe der NK-Zellen zu den Hep3B- bzw. HepG2-Zellen. U, unbehandelt; NK-Zellen, Natürliche Killerzellen; 6-PN, 6-Prenylningenin; 8-PN, 8-Prenylningenin.

In beiden Fällen wurde die letztendliche Verdünnung über den Zwischenschritt der Herstellung einer 1:100-Verdünnung der Stocklösung ( $\cong 1 \text{ mM}$ ) im jeweiligen Nährmedium und anschließender Verdünnung auf die gewünschte Endkonzentration und Menge erreicht.

### 2.10.7 *Killing* der Tumorzellen

Die Zugabe der NK-Zellen zu den Tumorzellen in den Wells erfolgte 48 h nach Auslegen der Zellen und nach 24-h Behandlung der Zellen in den jeweiligen Konzentrationen (siehe Abbildung 6). Dafür wurden zunächst die 24-Well-Platten abgesaugt und anschließend 250  $\mu\text{l}$  des entsprechenden frischen Nährmediums zupipettiert. Für die Zugabe der NK-Zellen zu den Tumorzellen in den *Effector-to-Target*-Verhältnissen (E:T-Verhältnisse) 1,25:1 sowie 0,625:1 wurde für die

ausgelegten Tumorzellen unter mikroskopischer Kontrolle eine annähernd konstante Zellzahl angenommen. Die behandelten NK-Zellen wurden demnach entsprechend ihrer Behandlung in separate Zentrifugengefäße überführt, zweimal zentrifugiert und in Medium resuspendiert, um 6- / 8-PN zu entfernen und anschließend gezählt. Ausgehend von den gemessenen Zellzahlen wurden dann Verdünnungen in den unterschiedlichen E:T-Verhältnissen mit den folgenden Zielzellzahlen pro 250 µl NK-Medium für die jeweiligen Zelllinien hergestellt und zu den Tumorzellen auf die 24-Well-Platten pipettiert:

### Hep3B:

- 25 000 Zellen pro Well ausgelegt:
  - 1,25:1 → **31 250** NK-92 Mi / NK-92
  - 0,625:1 → **15 625** NK-92 Mi / NK-92
- 20 000 Zellen pro Well ausgelegt:
  - 1,25:1 → **25 000** NK-92 Mi / NK-92
  - 0,625:1 → **12 500** NK-92 Mi / NK-92

### HepG2:

- 30 000 Zellen pro Well ausgelegt:
  - 1,25:1 → **37 500** NK-92 Mi / NK-92
  - 0,625:1 → **18 750** NK-92 Mi / NK-92

Somit gab es pro Zelllinie Hep3B / HepG2 jeweils vier Platten:

**Tabelle 13:** Übersicht über die pro Hep3B- / HepG2-Zelllinie ausgelegten Platten

Für jede Zelllinie (Hep3B / HepG2) wurden jeweils vier Platten ausgelegt. Davon jeweils zwei Platten für die Behandlungen mit 6-PN und jeweils zwei für die Behandlungen mit 8-PN. Innerhalb der jeweiligen Behandlungen mit 6-PN oder 8-PN wurden schließlich NK-Zellen in den E:T-Verhältnissen 1,25:1 oder 0,625:1 hinzugegeben und für 48 h inkubieren gelassen. E:T, *Effector-to-Target*; 6-PN, 6-Prenylningenin; 8-PN, 8-Prenylningenin.

Platte	Stoff	E:T-Verhältnis
1	6-PN	1,25:1
2	6-PN	0,625:1
3	8-PN	1,25:1
4	8-PN	0,625:1

Diese wurden anschließend für den Killing-Assay 48 h im Brutschrank inkubiert.

### 2.11 Photometrische Methoden

Sulforhodamin B (SRB)- und CellTiter-Blue® (CTB)- Assays sollen durch verschiedene Messparameter eine differenzierte Darstellung des Tumorzell-*Killings* durch die NK-Zellen bieten. Die Messungen wurden nach 48 h *Killing*-Zeitraum durchgeführt.

#### 2.11.1 CellTiter-Blue®-Assay

Mit dem CTB-Viabilitäts-Assay kann man fluorometrisch den relativen Anteil viabler Zellen bestimmen.

Nur lebenden Zellen ist es möglich, das hier verwendete Reagenz Resazurin zu reduzieren, wobei Resorufin, ein fluoreszierender Farbstoff entsteht, welchen man im Anschluss fluorometrisch detektieren kann. Von toten Zellen bzw. Medium alleine wird Resazurin kaum reduziert, sodass hier nur eine minimale Fluoreszenz entsteht, weswegen die Hintergrundfluoreszenz der Blank-Werte jedoch bei der Auswertung abgezogen wurde.

Nach 48 h Inkubation mit den NK-Zellen wurde das Medium der 24-Well-Platten verworfen und anschließend 300 µl Gesamtvolumen, bestehend aus NK-Medium sowie dem jeweiligen Tumorzellmedium im Verhältnis 1:1, mit dem Multistepper wieder zupipettiert. Im Anschluss wurden in jedes Well 60 µl CTB-Reagenz zugegeben und die Platten anschließend zur Inkubation in den Brutschrank gestellt.

Nach einer definierten Inkubationszeit (HepG2: 2 h nach CTB-Reagenz-Zugabe, Hep3B: 4 h nach Zugabe) wurden die 24-Well-Platten mit dem Elisa-Reader Genios Plus von TECAN mit dem Programm xFluor4 gemessen und die Fluoreszenz bei 550<sub>Exzitation</sub>/595<sub>Emission</sub> nm bestimmt.

#### 2.11.2 Sulforhodamin B-Assay

Beim SRB-Assay wird der Gesamtproteingehalt durch unspezifische Anfärbung der Zellproteine bestimmt. Dieser steigt linear v.a. mit der Zellzahl und kann damit als Surrogatparameter für etwaige Veränderungen im Zellwachstum herangezogen werden. Dabei befinden sich die Messergebnisse in einem weiten

Zellzahlintervall im linearen Messbereich (Skehan et al., 1990; Vichai & Kirtikara, 2006).

Der anionische Farbstoff SRB bindet bei saurem pH-Wert an die Seitenketten der basischen Aminosäuren bzw. löst sich in basischem Milieu wieder von diesen. Die photometrische Bestimmung der optischen Dichte (OD) des gelösten Farbstoffs lässt dann Rückschlüsse auf die Zellkonzentration zu.

Nach CTB-Messung wurde zunächst der Überstand der 24-Well-Platten verworfen. Anschließend wurden die einzelnen Wells mit ca. 0,5 ml eiskaltem PBS gewaschen, danach ca. 250 µl 10%ige TCA zupipettiert und anschließend für mindestens 30 min bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. TCA verringert dabei die hydrophoben Wechselwirkungen der gefalteten Proteine, wodurch diese denaturieren.

Im Anschluss wurde das TCA in eine Stuhlschale verworfen und die Platten fünfmal in einem 5-Liter-Messbecher mit vollentsalztem (VE-) Wasser gewaschen. Danach wurden die Platten über Nacht zum Trocknen in den Trockenschrank (40 °C) gelegt.

Die Proteine der fixierten Zellen wurden im Folgenden mit 250 µl zugegebener SRB-Lösung (0,4 % SRB in 1%iger Essigsäure) pro Well angefärbt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten je drei Mal mit 1%iger Essigsäure gewaschen, Flüssigkeitsreste auf Zellstoff abgeklopft und erneut für ca. 6 h in den Trockenschrank (40 °C) gelegt.

Nach Trocknen der Platten wurden 500 µl 10 mM Tris (pH 10,5) in jedes Well pipettiert und auf dem Schüttler für 10–15 min inkubiert. Dabei löst sich durch den basischen pH-Wert der SRB-Farbstoff wieder von den anionischen Seitenketten und ist nun proportional zum Proteingehalt und damit annähernd der Zellzahl pro Well gelöst.

Von den 24-Well Platten wurden anschließend aus jedem Well zweimal 80 µl auf eine 96-Well-Platte entsprechend umpipettiert und die OD / Extinktion anschließend im Elisa-Reader (TECAN; GENios Plus) bei einer Wellenlänge von 550 nm (Referenz-Wellenlänge: 620 nm) gemessen. Dabei sollten die maximalen Messwerte unter einem Wert von 1,8 liegen, damit der lineare Messbereich gemäß Lambert-Beerschem Gesetz nicht verlassen wird. Daher

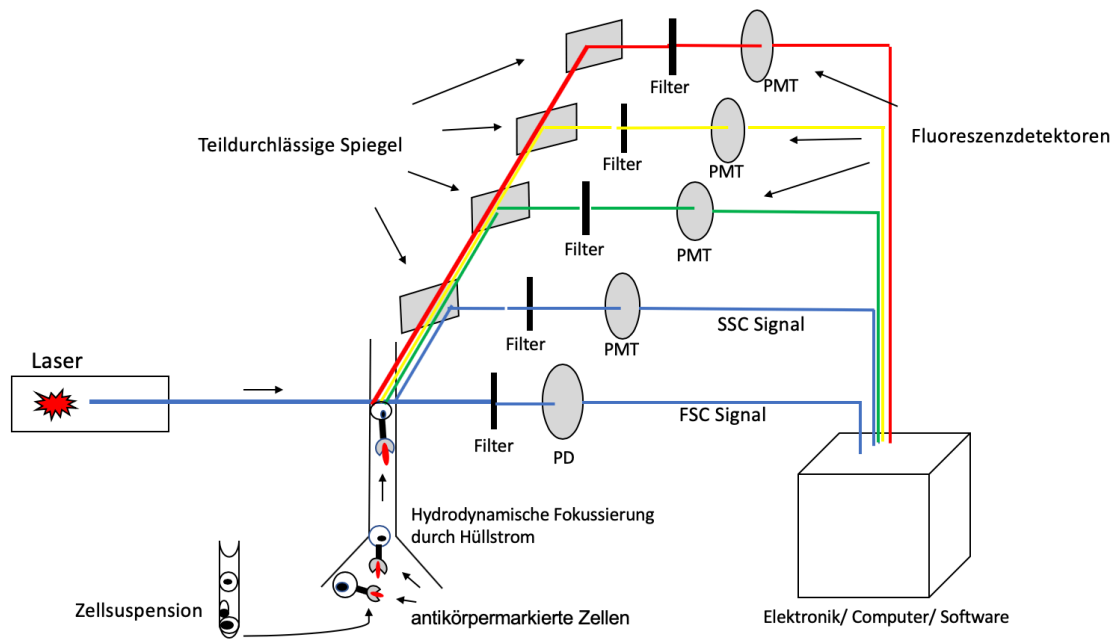
wurde immer zunächst bei einem Kontroll-Well, bei welchem die höchste OD erwartet wurde, 500 µl Tris hinzugegeben, auf dem Schüttler inkubiert und anschließend zur Probe gemessen, bevor alle anderen Wells mit 500 µl Tris befüllt wurden.

### 2.11.3 Durchflusszytometrie

Um mögliche Veränderungen in der Expression von Oberflächenproteinen durch 6-PN bzw. 8-PN nachzuweisen, wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung fluoreszenzmarkierter Zellen. Damit können unter anderem Zelleigenschaften wie Granularität, Größe, Expression von Oberflächenproteinen und weitere Parameter untersucht werden.

Technische Grundlage ist dabei, dass Zellen beim Passieren eines Laserstrahls optische Signale emittieren, die Rückschlüsse auf ihre Beschaffenheit zulassen. Dabei korreliert die Menge bzw. die Beschaffenheit des gestreuten Lichts mit der Beschaffenheit der Zelle (Größe, Konstitution, Fluoreszenzmarkierung). Durch einen Hüllstrom bzw. die beim verwendeten Gerät Attune Nxt Flow Cytometer zusätzlich integrierte akustische Fokussierung (*acoustic focusing*) werden die Zellen stark beschleunigt, fließen anschließend durch den Mikrokanal einer Küvette, sodass sich etwaige Zellaggregate auftrennen und die Zellen einzeln an einen Messpunkt gelangen, an dem sie durch einen bzw. mehrere Laser bestrahlt werden. Dabei entsteht zum einen Vorwärtsstreulicht / *Forward-Scatter* (FSc, geringer Streuwinkel: 3–10°), welches ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel darstellt und hauptsächlich abhängig vom Volumen der Zelle ist. Zum anderen entsteht das etwas schwächere Seitwärtsstreulicht / *Sideward-* oder auch *Orthogonal-Scatter* (SSc, Streuwinkel: 90°), ein Maß für die Brechung im rechten Winkel, welches vor allem von der inneren Struktur der Zelle abhängt bzw. je nach Konstitution der Zellen (Komplexität oder Granularität von Zellen) entsteht und von Photoelektronenvervielfachern (*photomultiplier tubes, PMTs*) gemessen und ausgewertet wird (siehe Abbildung 8) (Herzenberg et al., 1976; Krefeld, 1991).





**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Durchflusszytometers.

Die mit Antikörpern markierten Zellen werden zunächst durch einen Hüllstrom so zusammengeführt, dass sie nur einzeln an einen Messpunkt gelangen, an dem sie von mehreren Laserstrahlen unterschiedlicher Wellenlängen (hier der Einfachheit nicht differiert dargestellt) bestrahlt werden. Dabei entsteht Vorwärtsstreulicht als Maß für die Größe der Zellen sowie das schwächere Seitwärtsstreulicht als Maß für die Granularität / innere Beschaffenheit der Zellen. Diese Streustrahlung wird von Detektoren aufgefangen und kann dadurch ausgewertet werden. Fluorochrommarkierte Zellen emittieren weiterhin Fluoreszenzlicht, die mittels weiterer Fluoreszenzdetektoren gemessen werden. *Photomultiplier Tubes* (PMTs) dienen der Messung der schwächeren Strahlung, die Photodiode (PD) dient als Detektor für das Vorwärtsstreulicht. SSC, *Sideward-Scatter* (Seitwärtsstreulicht); FSC, *Forward-Scatter* (Vorwärtsstreulicht); PMT, *Photomultiplier Tube*; PD, Photodiode.

Es besteht die Möglichkeit bestimmte Oberflächenmoleküle mit spezifisch bindenden monoklonalen Antikörpern zu detektieren, welche mit einem Fluorophor gekoppelt sind. Wird dieser Farbstoff von dem Laserstrahl angeregt, werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffs auf ein energetisch höheres Level gehoben und geben anschließend Energie in Form von Photonen ab, um auf das ursprüngliche Energieniveau zu fallen. Diese Menge an Photonen wird von Detektoren ermittelt und ist proportional zur Antikörpermenge pro Zelle bzw. damit zur Menge der Oberflächenmoleküle, an die diese gekoppelt sind. Auf einem Punktdiagramm (*dot plot*) wird zur Auswertung schließlich jede Zelle mit einem Punkt dargestellt. Je nach Größe und Granularität sind die einzelnen Zellen auf dem Diagramm unterschiedlich lokalisiert, wodurch sich Aussagen über ihre Eigenschaften bzw. die Menge gebundener Antikörper und damit der exprimierten Oberflächenmoleküle treffen lassen.

Für die Durchführung der Durchflusszytometrie wurden die Zellen zunächst ausgelegt (Hep 3B: drei 6-Well-Platten mit je  $3 \times 10^5$  Zellen / Well und je 2 ml / Well, dadurch kumulativ  $5,4 \times 10^6$  Zellen in 36 ml; HepG2: drei 6-Well-Platten mit je  $5 \times 10^5$  Zellen / Well und je 2 ml / Well, dadurch kumulativ  $9 \times 10^6$  Zellen in 36 ml). Pro Behandlung wurden drei bis vier Wells mit einem Volumen von 2 ml ausgelegt. Nach 24 h Inkubation wurde zunächst das Nährmedium abgesaugt und die Zellen anschließend für die nächsten 24 h mit 6-PN bzw. 8-PN in den Konzentrationen 12,5  $\mu$ M und 25  $\mu$ M behandelt. Dafür wurde aus der 100 mM Stammlösung zunächst eine 1:100-Verdünnung hergestellt und diese mit der entsprechenden Menge Nährmedium im jeweiligen Verhältnis auf 2 ml für jedes Well aufgefüllt. Nach 24 h Inkubation erfolgte das Ablösen der Zellen mit Accutase (Medium abgesaugt, mit 2 ml PBS gewaschen, abgesaugt, Zugabe von 0,7 ml Accutase und finales Ablösen mit 1,5 ml FACS-Puffer), anschließendes Abzentrifugieren (350 g, 5 min, RT) und Resuspendieren der Zellen in 1 ml FACS-Puffer. Nach Bestimmung der genauen Zellzahl wurde die Zellzahl auf  $5 \times 10^5$  Zellen in 300  $\mu$ l pro Färbung eingestellt und die Zellen für die verschiedenen Färbungen aufgeteilt und mit 3 ml FACS-Puffer in FACS-Röhrchen aufgefüllt. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 350 g, 4 °C) wurde der Überstand abgegossen und das verbleibende Pellet in 50  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert. Um eine ungewollte Bindung der Antikörper an Fc-Rezeptoren, wie bspw. an Fc $\alpha$ R1 (CD89) auf HepG2-Zellen (J. C. K. Leung et al., 2000) zu verhindern, wurden 10  $\mu$ l Fc-Block (Gamunex<sup>®</sup> 10 %, Talecris Biotherapeutics GmbH) hinzugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Im nächsten Schritt wurden bei  $5 \times 10^5$  Zellen je 5  $\mu$ l Antikörper zupipettiert. Als Negativkontrolle dienten ungefärbte Zellen, als Isotypkontrolle wurden PE-Maus-IgG Antikörper (Biolegend) verwendet, um das Ausmaß an unspezifischer Bindung zu beurteilen. Des Weiteren wurden die Zellen mit den Antikörpern anti-hULBP-1 (human, PE-konjugiert), anti-hULBP-2/5/6 (PE-konjugiert), anti-hULBP-3 (PE-konjugiert) sowie anti-hMICA/B (PE-konjugiert) 30 min lang bei 4 °C inkubiert. Danach wurden nichtgebundene Antikörper durch Waschen mit 3 ml FACS-Puffer entfernt. Im letzten Schritt wurde der Überstand nach Zentrifugation bei 350 g, 5 min, Raumtemperatur verworfen und die Zellen in 300–400  $\mu$ L FACS-

Puffer resuspendiert oder alternativ 0,5 ml Fixierlösung bis zur Messung zupipettiert.

Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung mit 20 000 Ereignissen / Messung. Hierfür wurde die Attune™ NxT Software verwendet, im *dot plot* auf CD46 als Positivkontrolle im PE-Kanal *gagatet* und schließlich die prozentualen Anteile der unterschiedlichen Behandlungen mit den diversen FACS-Antikörpern als Balkendiagramme aufgetragen.

### 2.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte zunächst mit Hilfe von Microsoft Excel (Microsoft® Excel für Mac, Version 16.16.27). Hierbei wurden die Mittelwerte der Messergebnisse aus je drei Versuchen in Duplikaten ermittelt und diese in Prozent zur Lebendkontrolle angegeben. Aufgrund einer gewissen Basisfluoreszenz des verwendeten Mediums wurde bei den CTB-Ergebnissen der Mittelwert der Messergebnisse aus den Medium-Wells abgezogen und schließlich in Prozent zur Lebendkontrolle angegeben.

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software Graphpad Prism 4 bzw. 9. Mittels one-way ANOVA Dunnett's multiplen Vergleichstest wurde jeweils eine mögliche Signifikanz der gemessenen Werte für die Ergebnisse der CTB- und SRB-Assays ermittelt. Dabei gab es zwei verschiedene Referenzwerte. Für die reine Behandlung der Tumorzellen mit 6- und 8-PN ohne Zugabe von NK-Zellen wurde die Signifikanz gegenüber der reinen Lebendkontrolle berechnet. Für alle weiteren Versuchsansätze, in denen 6- oder 8-PN eingesetzt wurden, wurde die Signifikanz gegenüber der Kontrolle aus unbehandelten Hep3B- / HepG2-Zellen und *Killing* durch unbehandelte NK-Zellen berechnet. Mittels two-way ANOVA Tukey's multiplen Vergleichstest wurde eine mögliche Signifikanz der durchflusszytometrischen Ergebnisse berechnet.

### 3 Ergebnisse

Um im ersten Schritt zu untersuchen, ob 6-PN bzw. 8-PN das NK-Zell-vermittelte Tumorzell-*Killing* beeinflussen oder die Proliferation von Tumorzellen hemmen, wurde mit beiden Hepatom-Zelllinien ein CTB- und SRB-Assay durchgeführt.

Es wurden je drei unabhängige Versuchsdurchgänge mit dem gleichen Behandlungsschema durchgeführt ( $n = 3$ ). Pro Versuchsansatz wurden jeweils Duplikate der unterschiedlichen Behandlungsvarianten angesetzt (siehe Abbildung 5). Als Lebendkontrolle diente die reine Zugabe von Medium zu ausgelegten Tumorzellen. Alle Ergebnisse der Assays werden als prozentualer Anteil der unbehandelten Kontrolle dargestellt. Die Zugabe von Triton (Endkonzentration im Well 1 % (v/v)) diente als Totkontrolle. Um den durch das Medium vorhandenen Messhintergrund herausrechnen zu können, wurden zusätzlich Medium-Kontroll-Well ohne Zellen angesetzt. Eingesetzte Zelllinien waren die Hepatom-Linien Hep3B, HepG2 (*Targets*) sowie für das *Killing* die humanen NK-Zelllinien NK-92 und NK-92 Mi (*Effectors*). Die NK-Zelllinien wurden in den zwei E:T-Verhältnissen 1,25:1 und 0,625:1 hinzugegeben. Gemessen wurde nach einer Behandlungsdauer von 24 h und einer anschließenden Inkubationszeit mit NK-Zellen von 48 h (Abbildung 6). Um den tatsächlichen Effekt der Behandlung von 6- / 8-PN messen zu können, dienten Wells mit unbehandelten Tumorzellen, zu denen unbehandelte NK-Zellen gegeben wurden, als Kontrolle. Tabelle 14 stellt die Rahmendaten der Versuche nochmals zusammenfassend dar.

**Tabelle 14:** Rahmendaten der Versuche

Parameter	Umsetzung
<b>Zelllinien</b>	Hep3B, HepG2, NK-92, NK-92 Mi
<b>Eingesetzte Konzentrationen (6- / 8-PN)</b>	12,5 µM, 25 µM
<b>Effector-to-Target-Verhältnisse</b>	1,25:1; 0,625:1
<b>Behandlungsdauer</b>	24 h
<b>Inkubationszeit / Killing</b>	48 h
<b>Lebendkontrolle</b>	Medium
<b>Totkontrolle</b>	Triton 1%ig (v/v)
<b>Kontrolle</b>	Hep3B- / HepG2-Zellen, unbehandelt + NK-92- / NK-92 Mi-Zellen, unbehandelt

Im Anschluss an die CTB- und SRB-Assays wurde dann eine Durchflusszytometrie durchgeführt, um zu untersuchen, ob und inwiefern sich durch die Behandlung mit 6- / 8-PN die Expression aktivierender Oberflächenmoleküle auf den Hepatom-Zellen änderte.

### 3.1 Auswirkungen von 6-PN und 8-PN auf das Zellwachstum und das NK-Zell-vermittelte Tumorzell-Killing

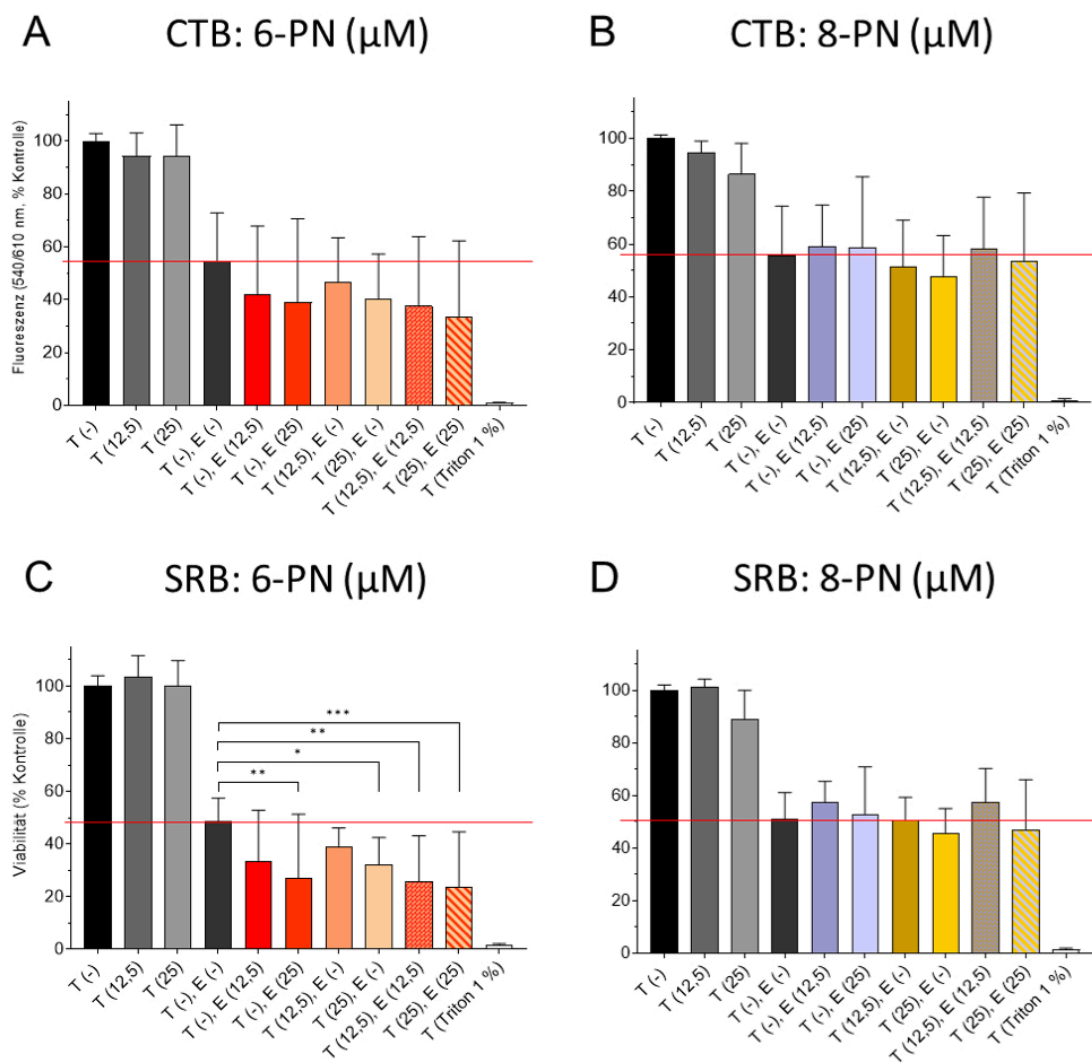
In den folgenden Abbildungen sind vergleichend jeweils CTB- und SRB-Ergebnisse von Behandlungen mit 6-PN und 8-PN dargestellt.

#### 3.1.1 Hep3B nach 48 h Killing durch NK-92 Mi

Für die Versuchsreihen mit NK-92 Mi wurden jeweils 25 000 Hep3B-Zellen pro Well ausgelegt.

3.1.1.1 E:T-Verhältnis 1,25:1

**Hep3B (T), NK-92 Mi (E), E:T 1,25:1, CTB + SRB, 6-/ 8-PN, 24 h, 25 000 Zellen / Well**



**Abbildung 9:** CTB- und SRB-Assays – Hep3B; NK-92 Mi; 6-PN und 8-PN; 24 h Behandlung; 48 h Killing; 25 000 Target-Zellen / Well; E:T = 1,25:1.

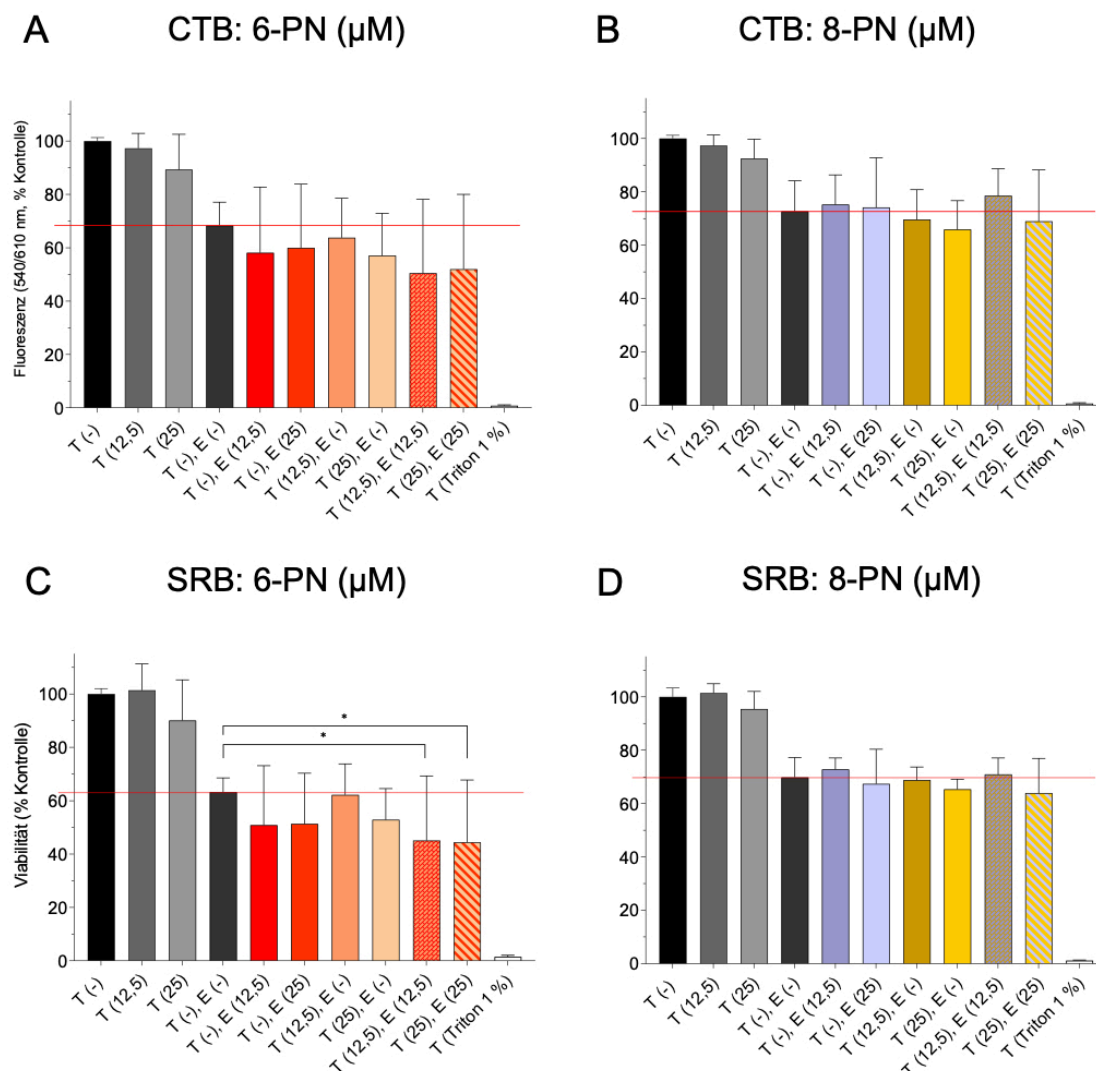
(A) und (B) zeigen die CTB-Ergebnisse, (C) und (D) die SRB-Ergebnisse mit 0–25 μM 6-PN (A, C) bzw. 0–25 μM 8-PN (B, D). Target-Zellen (T) waren Hep3B-Zellen, als Effektor-Zellen (E) dienten NK-92 Mi-Zellen. Für die CTB-Assays ist die Viabilität in % der Kontrolle auf Basis der Fluoreszenzwerte als Surrogat-Parameter auf der y-Achse dargestellt. Es sind jeweils die Mittelwerte ± SD aus je drei Versuchen, gemessen in Duplikaten, abzüglich des Medium-Hintergrunds, in % der Lebendkontrolle angegeben. Für die SRB-Assays ist die Viabilität in % der Lebendkontrolle dargestellt. Die rote Linie zeigt jeweils den Mittelwert der Kontrollen aus unbehandelten Tumor- und unbehandelten NK-92 Mi-Zellen. Die Behandlung über 24 h erfolgte vor Killing. Die anschließende Inkubationszeit mit NK-92 Mi für das Killing betrug 48 h. Als Totkontrolle diente die Zugabe von Triton (1 % v/v). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD dreier unabhängiger Versuche, durchgeführt in Duplikaten. Die jeweils eingesetzte Konzentration von 6-PN oder 8-PN in μM ist in Klammer hinter der Zugehörigkeitsangabe zu Target- oder Effektor-Zellen angegeben. Statistik: one-way ANOVA Dunnett's multipler Vergleichstest, Konfidenzintervall 95 %, ns:  $p > 0,05$ , ns sowie Signifikanz bei der Totkontrolle sind nicht dargestellt; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ . 6-PN, 6-Prenylaringenin; 8-PN, 8-Prenylaringenin; CTB, CellTiter-Blue®, E, Effektor-Zellen (hier: NK-92 Mi); T, Target-Zellen (hier: Hep3B); E:T, Effector-to-Target; NK-Zellen, natürliche Killerzellen; ns, not significant; SD, Standardabweichung (standard deviation); SRB, Sulforhodamin B; unbeh., unbehandelt.

Wie Abbildung 9 zeigt, hatte 6-PN einen positiven Effekt auf das NK-Zell-vermittelte Tumorzell-*Killing* und führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Viabilität der Hep3B-Zellen. Die kombinierte Vorbehandlung sowohl der Hep3B- als auch der NK-92 Mi-Zellen mit 25  $\mu\text{M}$  6-PN hatte den stärksten Effekt. Beim CTB-Assay sank die Viabilität, ohne statistisch signifikant zu sein, im Mittel auf 21,3 % unter die der Kontrolle. Beim entsprechenden SRB-Assay sank sie im Mittel auf 24,7 % unterhalb der Kontrolle und war dabei hoch signifikant ( $p = 0,0003$ ). Auch die Vorbehandlung von jeweils NK-92 Mi- oder Hep3B-Zellen alleine reduzierte die Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle beim CTB-Assay im Mittel um bis zu 15,6 % (NK-92 Mi 25  $\mu\text{M}$  6-PN + Hep3B unbehandelt), ohne dabei statistisch signifikant zu sein. Beim SRB-Assay dagegen waren die erniedrigten Viabilitätswerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant: Für die Vorbehandlung der NK-92 Mi-Zellen mit 25  $\mu\text{M}$  6-PN im Mittel um 21,6 % ( $p = 0,0023$ ), für die Vorbehandlung der Hep3B-Zellen mit 25  $\mu\text{M}$  im Mittel um 16,5 % ( $p = 0,037$ ) und für die Vorbehandlung beider Zelllinien mit je 12,5  $\mu\text{M}$  im Mittel um 22,6 % ( $p = 0,0012$ ) sowie 25  $\mu\text{M}$  6-PN um 24,7 % (siehe Abbildung 9, C).

Unter gleichen Versuchsbedingungen ließ sich durch 8-PN (Abbildung 9, B und D) die Viabilität der Tumorzellen deutlich weniger reduzieren. Bei vergleichbarer Zellviabilität in den Kontrollansätzen führte 8-PN beim CTB-Assay zu einer maximalen Reduktion der Zellviabilität im Mittel um 8,4 % im Vergleich zur Kontrolle. Den stärksten Effekt hatte bei CTB- und SRB-Assays die Vorbehandlung der Hep3B-Zellen und Zugabe von unbehandelten NK-92 Mi-Zellen, die jedoch statistisch nicht signifikant war. Die reine Vorbehandlung der NK-92 Mi-Zellen mit 8-PN hatte insgesamt einen negativen Effekt auf das NK-vermittelte Tumorzell-*Killing*.

3.1.1.2 E:T-Verhältnis 0,625:1

Hep3B (T), NK-92 Mi (E), E:T 0,625:1, CTB + SRB, 6-/ 8-PN, 24 h,  
25 000 Zellen / Well



**Abbildung 10:** CTB- und SRB-Assays – Hep3B; NK-92 Mi; 6-PN und 8-PN; 24 h Behandlung; 48 h Killing; 25 000 Target-Zellen / Well; E:T = 0,625:1.

(A) und (B) zeigen die CTB-Ergebnisse, (C) und (D) die SRB-Ergebnisse mit 0–25 µM 6-PN (A, C) bzw. 0–25 µM 8-PN (B, D). Target-Zellen (T) waren Hep3B-Zellen, als Effektor-Zellen (E) dienten NK-92 Mi-Zellen. Für die CTB-Assays ist die Viabilität in % der Kontrolle auf Basis der Fluoreszenzwerte als Surrogat-Parameter auf der y-Achse dargestellt. Es sind jeweils die Mittelwerte ± SD aus je drei Versuchen, gemessen in Duplikaten, abzüglich des Medium-Hintergrunds, in % der Lebendkontrolle angegeben. Für die SRB-Assays ist die Viabilität in % der Lebendkontrolle dargestellt. Die rote Linie zeigt jeweils den Mittelwert der Kontrollen aus unbehandelten Tumor- und unbehandelten NK-92 Mi-Zellen. Die Behandlung über 24 h erfolgte vor Killing. Die anschließende Inkubationszeit mit NK-92 Mi für das Killing betrug 48 h. Als Totkontrolle diente die Zugabe von Triton (1 % v/v). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD dreier unabhängiger Versuche, durchgeführt in Duplikaten. Die jeweils eingesetzte Konzentration von 6-PN oder 8-PN ist in Klammer hinter der Zugehörigkeitsangabe zu Target- oder Effektor-Zellen angegeben, die entsprechende Maßeinheit ist µM. Statistik: one-way ANOVA Dunnett's multipler Vergleichstest, Konfidenzintervall 95 %, ns:  $p > 0,05$ , ns sowie Signifikanz bei der Totkontrolle sind nicht dargestellt; \*:  $p \leq 0,05$ . 6-PN, 6-Prenylnaringenin; 8-PN, 8-Prenylnaringenin; CTB, CellTiter-Blue®; E, Effektor-Zellen (hier: NK-92 Mi); T, Target-Zellen (hier: Hep3B); E:T, Effector-to-Target; NK-Zellen, natürliche Killerzellen; ns, not significant; SD, Standardabweichung (standard deviation); SRB, Sulforhodamin B; unbeh., unbehandelt.



Abbildung 10 zeigt im Vergleich zu Abbildung 9, dass im kleineren E:T-Verhältnis von 0,625:1 eingesetzte NK-92 Mi-Zellen auch zu einer geringeren Reduktion der Viabilität von Hep3B-Zellen führten. Im beispielhaften Vergleich der unbehandelten Kontrollen der CTB-Ergebnisse für 6-PN wurde die Zellviabilität im Mittel auf 68,3 % (54,6 % bei E:T-Verhältnis von 1,25:1) reduziert. Dennoch führte die Vorbehandlung der unterschiedlichen Zellreihen auch bei einem E:T-Verhältnis von 0,625:1 zu einer relevanten Reduktion der Zellviabilität. Für 6-PN war sie sowohl beim CTB- als auch SRB-Assay nach kombinierter Vorbehandlung am stärksten. Beim CTB-Assay führte die kombinierte Behandlung mit 12,5 µM 6-PN zu der stärksten Reduktion mit einer im Mittel 17,8 % geringeren Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle. Beim SRB-Assay waren die kombinierten Vorbehandlungen im Vergleich zur Kontrolle bei beiden Konzentrationen statistisch signifikant reduziert (18,2 % bei 12,5 µM 6-PN ( $p = 0,0358$ ) und 18,9 % bei 25 µM 6-PN ( $p = 0,0265$ )).

Die Behandlung mit 8-PN zeigte auch beim E:T-Verhältnis 0,625:1 einen schwächeren Effekt als 6-PN und führte beim CTB-Assay im Mittel zu einer maximalen Viabilitätsreduktion um 6,8 % im Vergleich zur Kontrolle (Hep3B 25 µM 8-PN + NK-92 Mi unbehandelt), beim SRB-Assay um 5,8 % (Hep3B 25 µM + NK-92 Mi 25 µM 8-PN), jeweils ohne statistische Signifikanz.

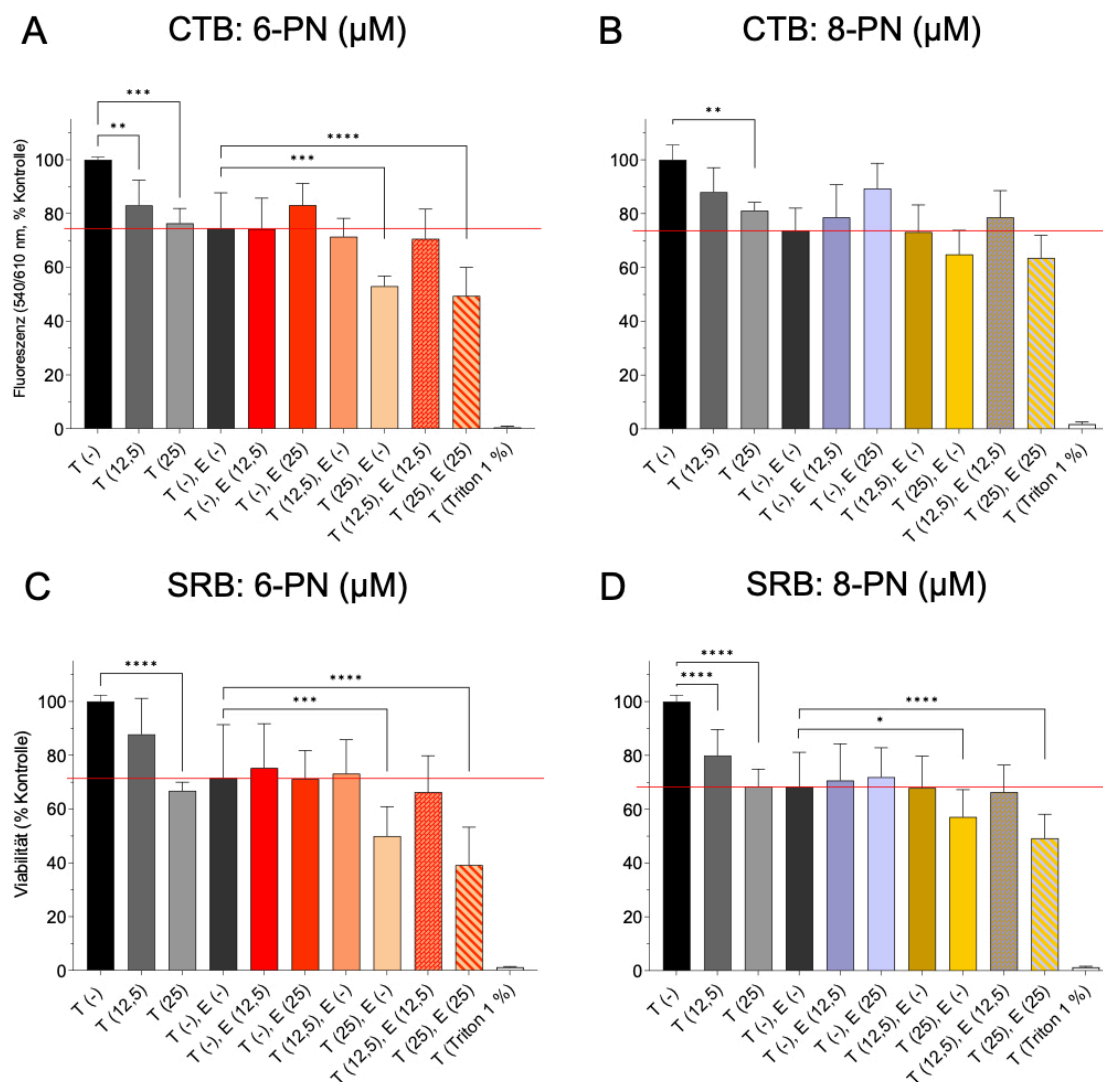
Die Abbildungen 9 und 10 zeigen weiterhin NK-Zell-unabhängig und damit auch unabhängig von den E:T-Verhältnissen eine konzentrationsabhängige Abnahme der Viabilität der Hep3B-Linie durch Behandlung mit 12,5 µM sowie 25 µM 6-PN und 8-PN über einen Zeitraum von 24 h.

### 3.1.2 Hep3B nach 48 h *Killing* durch NK-92

Dieselben Versuchsreihen wurden ebenfalls mit der NK-Zell-Linie NK-92 durchgeführt. Im Gegensatz zu der NK-92 Mi-Linie musste hierfür IL-2 zu deren Aktivierung mit dem NK-Medium in regelmäßigen Abständen zugeführt werden. Für die Versuche mit der NK-92-Linie wurden 20.000 Hep3B-Zellen / Well ausgelegt.

3.1.2.1 E:T-Verhältnis 1,25:1

Hep3B (T), NK-92 (E), E:T 1,25:1, CTB + SRB, 6-/ 8-PN, 24 h,  
20 000 Zellen / Well



**Abbildung 11:** CTB- und SRB-Assays – Hep3B; NK-92; 6-PN und 8-PN; 24 h Behandlung; 48 h Killing; 20 000 Target-Zellen / Well; E:T = 1,25:1.

(A) und (B) zeigen die CTB-Ergebnisse, (C) und (D) die SRB-Ergebnisse mit 0–25 µM 6-PN (A, C) bzw. 0–25 µM 8-PN (B, D). Target-Zellen (T) waren Hep3B-Zellen, als Effektor-Zellen (E) dienten NK-92-Zellen. Für die CTB-Assays ist die Viabilität in % der Kontrolle auf Basis der Fluoreszenzwerte als Surrogat-Parameter auf der y-Achse dargestellt. Es sind jeweils die Mittelwerte ± SD aus je drei Versuchen, gemessen in Duplikaten, abzüglich des Medium-Hintergrunds, in % der Lebendkontrolle angegeben. Für die SRB-Assays ist die Viabilität in % der Lebendkontrolle dargestellt. Die rote Linie zeigt jeweils den Mittelwert der Kontrollen aus unbehandelten Tumor- und unbehandelten NK-92-Zellen. Die Behandlung über 24 h erfolgte vor Killing. Die anschließende Inkubationszeit mit NK-92 für das Killing betrug 48 h. Als Totkontrolle diente die Zugabe von Triton (1 % v/v). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD dreier unabhängiger Versuche, durchgeführt in Duplikaten. Die jeweils eingesetzte Konzentration von 6-PN oder 8-PN ist in Klammer hinter der Zugehörigkeitsangabe zu Target- oder Effektor-Zellen angegeben, die entsprechende Maßeinheit ist µM. Statistik: one-way ANOVA Dunnett's multipler Vergleichstest, Konfidenzintervall 95 %, ns: p > 0,05, ns sowie Signifikanz bei der Totkontrolle sind nicht dargestellt; \*; p ≤ 0,05; \*\*, p ≤ 0,01; \*\*\*, p ≤ 0,001; \*\*\*\*; p ≤ 0,0001. 6-PN, 6-Prenylningenin; 8-PN, 8-Prenylningenin; CTB, CellTiter-Blue®; E, Effektor-Zellen (hier: NK-92); T, Target-Zellen (hier: Hep3B); E:T, Effector-to-Target; NK-Zellen, natürliche Killerzellen; ns, not significant; SD, Standardabweichung (standard deviation); SRB, Sulforhodamin B; unbeh., unbehandelt.

Bei den CTB-Assays führte die 24-stündige Behandlung mit 6-PN zu einer konzentrationsabhängigen, hochsignifikanten und im Vergleich zur Kontrolle im Mittel um 25,1 % reduzierten Zellviabilität nach kombinierter Vorbehandlung beider Zelllinien mit 25  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,0001$ ) (siehe Abbildung 11). Einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Reduktion der Zellviabilität hatte außerdem die Vorbehandlung der Hep3B-Zellen mit 25  $\mu\text{M}$  6-PN nach Zugabe unbehandelter NK-92-Zellen. Nach Behandlung mit 25  $\mu\text{M}$  6-PN sank die Viabilität im Mittel statistisch hoch signifikant auf 21,5 % unter die der Kontrolle ( $p = 0,0005$ ).

Die alleinige Behandlung der Hep3B-Zellen mit 6-PN oder 8-PN zeigte ebenfalls einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Zellviabilität. Nach Behandlung mit 12,5  $\mu\text{M}$  6-PN sank die Viabilität im Mittel um 17 % ( $p = 0,0084$ ), nach Vorbehandlung mit 25  $\mu\text{M}$  6-PN um 23,7 % ( $p = 0,0001$ ) im Vergleich zur Lebendkontrolle.

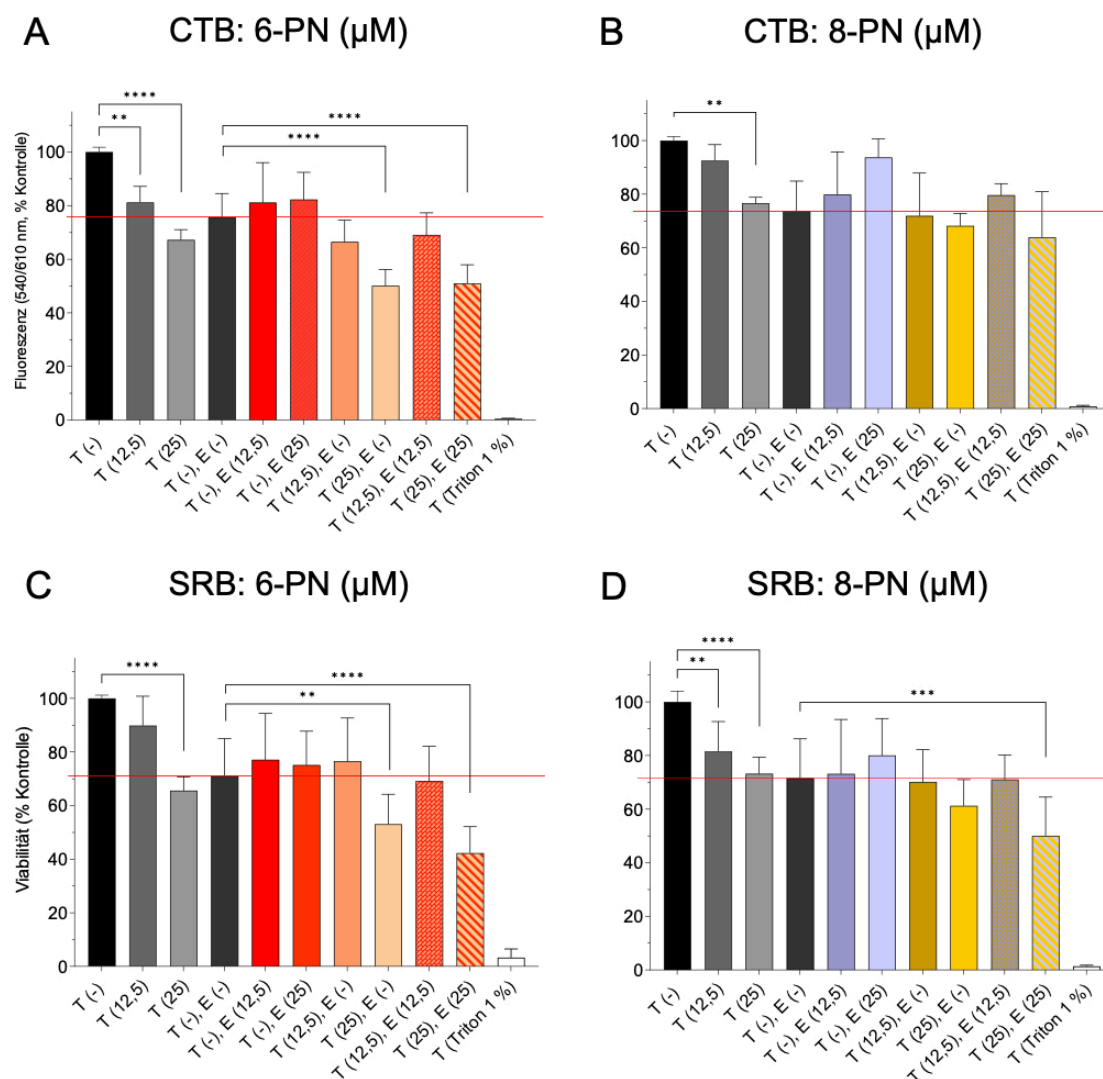
Auch beim SRB-Assay zeigten die Vorbehandlungen der Hep3B-Zellen mit 25  $\mu\text{M}$  6-PN statistisch signifikante Reduktionen der Zellviabilität. Die Zugabe unbehandelter NK-92-Zellen führte im Mittel zu einer Reduktion um 21,5 % ( $p = 0,0003$ ), die Zugabe ebenfalls mit 25  $\mu\text{M}$  6-PN vorbehandelter NK-92-Zellen zu einer Reduktion um 32,3 % ( $p < 0,0001$ ) im Vergleich zur Kontrolle. Auch NK-Zell-unabhängig führte die Behandlung der Hep3B-Zellen mit 25  $\mu\text{M}$  6-PN zu einer hoch signifikanten Viabilitätsreduktion im Vergleich zur Lebendkontrolle ( $p < 0,0001$ ).

Die Behandlung mit 8-PN (siehe Abbildung 11 B und D) zeigte nach Vorbehandlung der Hep3B-Zellen ebenfalls konzentrationsabhängig positive Effekte auf die Reduktion der Zellviabilität der Tumorzellen, die insgesamt aber schwächer ausfielen als mit 6-PN. Die stärksten Effekte erzielte die Vorbehandlung der Hep3B-Zellen mit 25  $\mu\text{M}$  8-PN. Die Viabilität sank nach Zugabe unbehandelter NK-92-Zellen beim CTB-Assay im Mittel um 8,9 % unter die Werte der Kontrolle. Beim SRB-Assay sank sie um 11,3 % ( $p = 0,0397$ ). Nach Zugabe ebenfalls mit 25  $\mu\text{M}$  8-PN vorbehandelter NK-92-Zellen sank die Viabilität beim CTB-Assay im Mittel um 10,2 % im Vergleich zur Kontrolle, beim SRB-Assay um 19,2 % ( $p < 0,0001$ ). NK-Zell-unabhängig führte die Behandlung

mit 8-PN beim CTB-Assay bei 25  $\mu$ M zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität um 18,9 % im Vergleich zur Lebendkontrolle ( $p = 0,0024$ ). Beim SRB-Assay führte die Behandlung mit 8-PN in beiden verwendeten Konzentrationen zu einer hoch-signifikanten Viabilitätsreduktion ( $p < 0,0001$ ). Die bloße Behandlung der NK-92-Zellen führte sowohl nach Behandlung mit 6-PN als auch mit 8-PN zu keiner relevanten Reduktion der Viabilität, sondern schien teilweise sogar einen konzentrationsabhängig negativen Effekt auf das *Killing* zu haben.

3.1.2.2 E:T-Verhältnis 0,625:1

Hep3B (T), NK-92 (E), E:T 0,625:1, CTB + SRB, 6-/ 8-PN, 24 h,  
20 000 Zellen / Well



**Abbildung 12:** CTB- und SRB-Assays – Hep3B; NK-92; 6-PN und 8-PN; 24 h Behandlung; 48 h Killing; 20 000 Target-Zellen / Well; E:T = 0,625:1.

(A) und (B) zeigen die CTB-Ergebnisse, (C) und (D) die SRB-Ergebnisse mit 0–25 μM 6-PN (A, C) bzw. 0–25 μM 8-PN (B, D). Target-Zellen (T) waren Hep3B-Zellen, als Effektor-Zellen (E) dienten NK-92-Zellen. Für die CTB-Assays ist die Viabilität in % der Kontrolle auf Basis der Fluoreszenzwerte als Surrogat-Parameter auf der y-Achse dargestellt. Es sind jeweils die Mittelwerte ± SD aus je drei Versuchen, gemessen in Duplikaten, abzüglich des Medium-Hintergrunds, in % der Lebendkontrolle angegeben. Für die SRB-Assays ist die Viabilität in % der Lebendkontrolle dargestellt. Die rote Linie zeigt jeweils den Mittelwert der Kontrollen aus unbehandelten Tumor- und unbehandelten NK-92-Zellen. Die Behandlung über 24 h erfolgte vor Killing. Die anschließende Inkubationszeit mit NK-92 für das Killing betrug 48 h. Als Totkontrolle diente die Zugabe von Triton (1 % v/v). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD dreier unabhängiger Versuche, durchgeführt in Duplikaten. Die jeweils eingesetzte Konzentration von 6-PN oder 8-PN ist in Klammer hinter der Zugehörigkeitsangabe zu Target- oder Effektor-Zellen angegeben, die entsprechende Maßeinheit ist μM. Statistik: one-way ANOVA Dunnett's multipler Vergleichstest, Konfidenzintervall 95 %, ns:  $p > 0,05$ , ns sowie Signifikanz bei der Totkontrolle sind nicht dargestellt; \*\*,  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ . 6-PN, 6-Prenylnaringenin; 8-PN, 8-Prenylnaringenin; CTB, CellTiter-Blue®; E, Effektor-Zellen (hier: NK-92); T, Target-Zellen (hier: Hep3B); E:T, Effector-to-Target; NK-Zellen, natürliche Killerzellen; ns, not significant; SD, Standardabweichung (standard deviation); SRB, Sulforhodamin B; unbeh., unbehandelt.

Die Versuchsreihen mit einem E:T-Verhältnis von 0,625:1 ergaben sehr ähnliche Ergebnisse wie die mit einem E:T-Verhältnis von 1,25:1. Die Reduktion der Viabilität war nach Behandlung mit 6-PN stärker ausgeprägt als mit 8-PN. Insgesamt zeigte sich bei allen Assays eine konzentrationsabhängige Wirkung von 6- und 8-PN mit Reduktion der Zellviabilität nach Vorbehandlung der Hep3B-Linie (siehe Abbildung 12).

NK-Zell-unabhängig führte 6-PN im CTB-Assay sowohl in einer Konzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,0011$ ) als auch 25  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,0001$ ) zu hoch signifikanten Reduktionen der Viabilität im Vergleich zur Lebendkontrolle. Auch beim SRB-Assay war die Behandlung mit 25  $\mu\text{M}$  6-PN hierbei hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ). 8-PN führte beim CTB-Assay nur nach Behandlung mit 25  $\mu\text{M}$  zu einer signifikanten Reduktion der Viabilität auf 76,6 % im Vergleich zur Lebendkontrolle ( $p = 0,0011$ ). Beim SRB-Assay senkten dagegen die Behandlungen in beiden Konzentrationen die Zellviabilität signifikant (12,5  $\mu\text{M}$ ,  $p = 0,0077$ ; 25  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0,0001$ ).

NK-Zell-abhängig führte 6-PN sowohl nach alleiniger Vorbehandlung der Hep3B-Zellen als auch nach kombinierter Behandlung zu einer konzentrationsabhängig stärkeren Reduktion der Viabilität. Die CTB-Ergebnisse zeigten nach Zugabe unbehandelter NK-92-Zellen eine Reduktion um 25,6 % ( $p < 0,0001$ ). Wurden die zugegebenen NK-92-Zellen ebenfalls mit 25  $\mu\text{M}$  6-PN vorbehandelt, zeigte sich in den CTB-Ergebnissen eine ähnlich ausgeprägte Reduktion um 24,8 % ( $p < 0,0001$ ) im Vergleich zur Kontrolle. Im entsprechenden SRB-Assay differierten die Ergebnisse zwischen alleiniger Hep3B-Zell-Vorbehandlung und kombinierter Vorbehandlung jedoch stärker. Nach Zugabe unbehandelter NK-92-Zellen zeigten die Hep3B-Zellen eine um 18 % geringere Viabilität als in der Kontrolle ( $p = 0,0019$ ), nach Zugabe ebenfalls vorbehandelter NK-92-Zellen (25  $\mu\text{M}$  6-PN) war diese um 28,8 % geringer ( $p < 0,0001$ ). Die Ergebnisse des SRB-Assays der Behandlung mit 8-PN zeigten nur für die kombinierte Vorbehandlung mit 25  $\mu\text{M}$  eine signifikante Reduktion der Viabilität um 21,5 % im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,0002$ ). Die Vorbehandlung der NK-92-Zellen hatte einen negativen Einfluss auf das *Killing*. Insbesondere für 8-PN war dieser stark

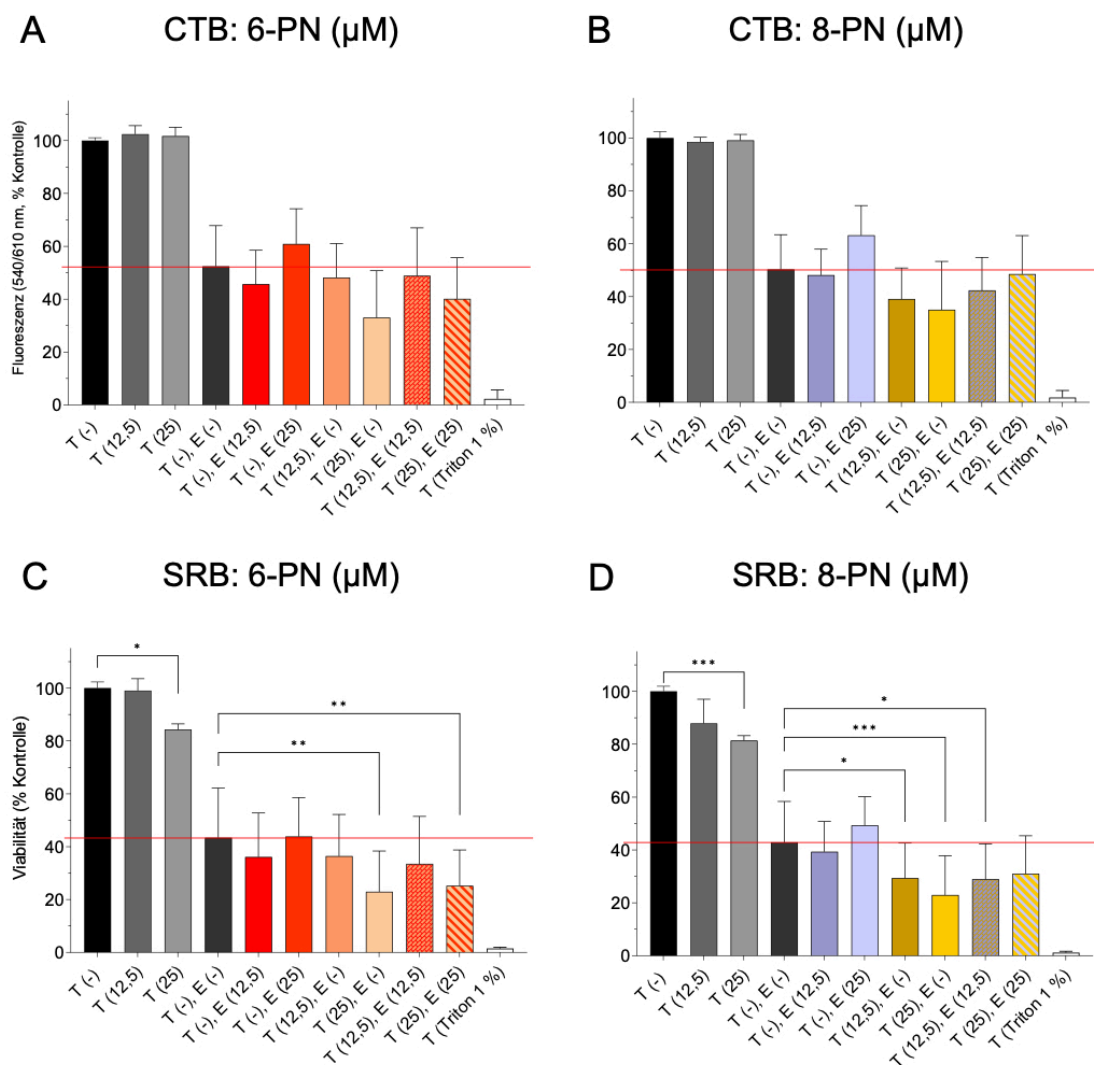
konzentrationsabhängig und führte zu erhöhten Viabilitätswerten im Vergleich zur Kontrolle.

### 3.1.3 HepG2 nach 48 h *Killing* durch NK-92 Mi

Um neben der Hep3B-Linie die Wirkung von 6- und 8-PN auf eine weitere etablierte Zelllinie zu untersuchen, wurden entsprechende Versuchsreihen auch mit der HepG2-Linie durchgeführt. Für diese Zelllinie wurden jeweils 30 000 Zellen pro Well ausgelegt. Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Versuche mit NK-92 Mi-Zellen dargestellt.

3.1.3.1 E:T-Verhältnis 1,25:1

HepG2 (T), NK-92 Mi (E), E:T 1,25:1, CTB + SRB, 6-/ 8-PN, 24 h, 30 000 Zellen / Well



**Abbildung 13:** CTB- und SRB-Assays – HepG2; NK-92 Mi; 6-PN und 8-PN; 24 h Behandlung; 48 h Killing; 30 000 Target-Zellen / Well; E:T = 1,25:1.

(A) und (B) zeigen die CTB-Ergebnisse, (C) und (D) die SRB-Ergebnisse mit 0–25 µM 6-PN (A, C) bzw. 0–25 µM 8-PN (B, D). Target-Zellen (T) waren HepG2-Zellen, als Effektor-Zellen (E) dienten NK-92 Mi-Zellen. Für die CTB-Assays ist die Viabilität in % der Kontrolle auf Basis der Fluoreszenzwerte als Surrogat-Parameter auf der y-Achse dargestellt. Es sind jeweils die Mittelwerte ± SD aus je drei Versuchen, gemessen in Duplikaten, abzüglich des Medium-Hintergrunds, in % der Lebendkontrolle angegeben. Für die SRB-Assays ist die Viabilität in % der Lebendkontrolle dargestellt. Die rote Linie zeigt jeweils den Mittelwert der Kontrollen aus unbehandelten Tumor- und unbehandelten NK-92 Mi-Zellen. Die Behandlung über 24 h erfolgte vor Killing. Die anschließende Inkubationszeit mit NK-92 Mi für das Killing betrug 48 h. Als Totkontrolle diente die Zugabe von Triton (1 % v/v). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD dreier unabhängiger Versuche, durchgeführt in Duplikaten. Die jeweils eingesetzte Konzentration von 6-PN oder 8-PN ist in Klammer hinter der Zugehörigkeitsangabe zu Target- oder Effektor-Zellen angegeben, die entsprechende Maßeinheit ist µM. Statistik: one-way ANOVA Dunnett's multipler Vergleichstest, Konfidenzintervall 95 %, ns:  $p > 0,05$ , ns sowie Signifikanz bei der Totkontrolle sind nicht dargestellt; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ . 6-PN, 6-Prenylnaringenin; 8-PN, 8-Prenylnaringenin; CTB, CellTiter-Blue®; E, Effektor-Zellen (hier: NK-92 Mi); T, Target-Zellen (hier: HepG2); E:T, Effector-to-Target; NK-Zellen, natürliche Killerzellen; ns, not significant; SD, Standardabweichung (standard deviation); SRB, Sulforhodamin B; unbeh., unbehandelt.



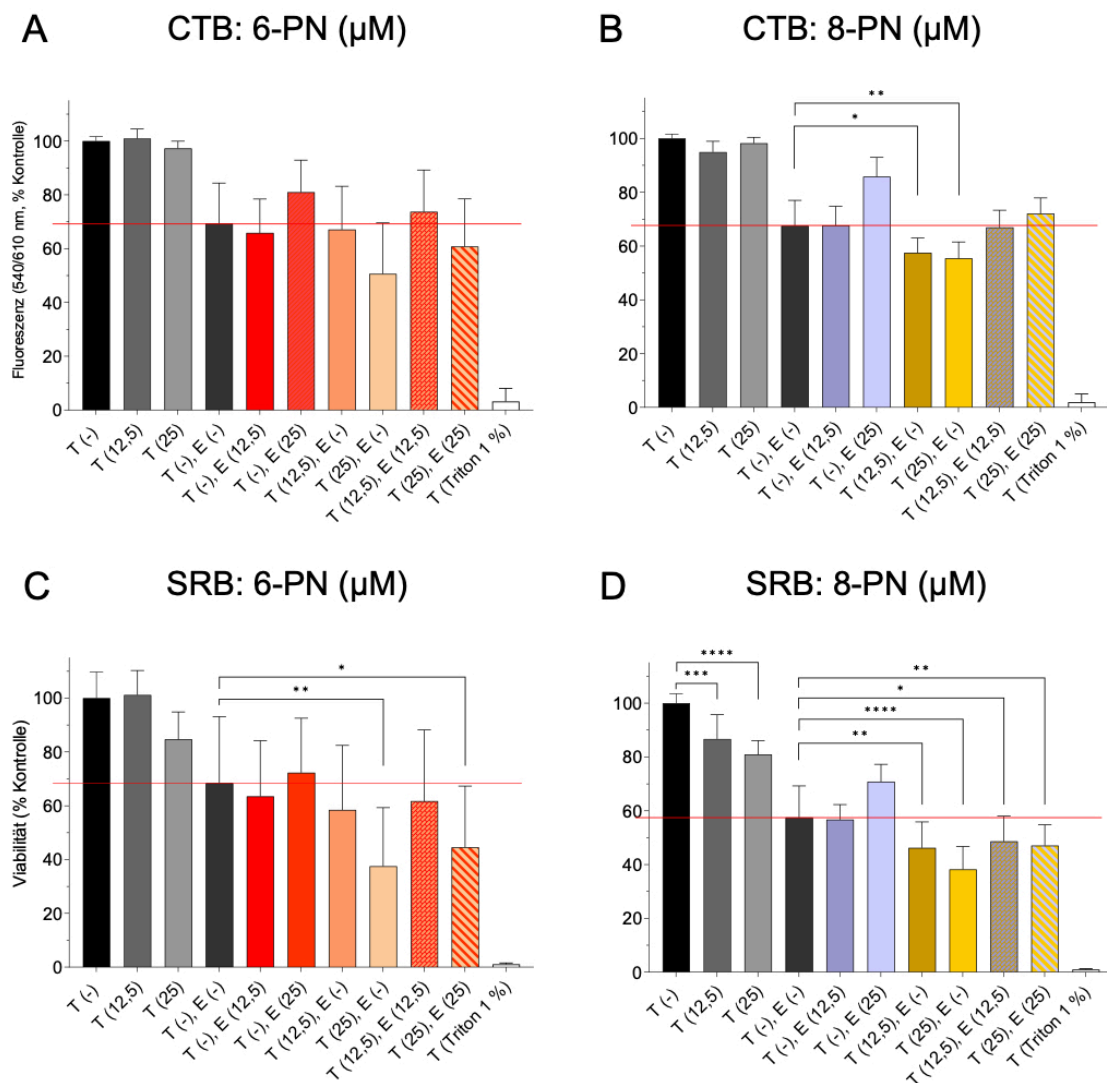
Bei den CTB-Assays zeigte sich eine starke NK-Zell-abhängige Reduktion der Viabilität nach Vorbehandlung der HepG2-Zellen mit 6-PN und 8-PN (siehe Abbildung 13, A und B). Die alleinige Vorbehandlung der NK-92 Mi-Zellen führte sowohl bei 6-PN als auch bei 8-PN jeweils nur bei der geringeren Konzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  zu einer leichten Reduktion der Viabilität im Vergleich zur Kontrolle, eine Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  dagegen führte zu einem schlechteren *Killing* mit im Vergleich zur Kontrolle höheren Viabilitätswerten. Die stärkste Viabilitätsreduktion ergab die Vorbehandlung der HepG2-Zellen mit 25  $\mu\text{M}$  6-PN oder 8-PN und Zugabe unbehandelter NK-92 Mi-Zellen. Die Viabilitätswerte lagen dabei nach Behandlung mit 6-PN 19,4 %, mit 8-PN 15,3 % unter denen der Kontrolle, ohne jeweils statistisch signifikant zu sein. Die Zugabe vorbehandelter NK-92 Mi-Zellen zeigte nach Vorbehandlung der HepG2-Zellen mit 6-PN einen konzentrationsabhängigen positiven Effekt auf das *Killing*. Bei dieser kombinierten Vorbehandlung führte eine Konzentration von jeweils 12,5  $\mu\text{M}$  zu einer Viabilitätsreduktion von 3,5 %, jeweils 25  $\mu\text{M}$  zu einer Reduktion von 12,3 % im Vergleich zur Kontrolle. Die kombinierte Vorbehandlung mit 8-PN dagegen zeigte in der Tendenz denselben konzentrationsabhängig negativen Effekt auf das *Killing*, den die alleinige Vorbehandlung der NK-92 Mi-Zellen mit 25  $\mu\text{M}$  6-PN oder 8-PN brachte (s.o.). Zwar senkte sie ebenfalls die Viabilität im Vergleich zur Kontrolle, jedoch wurde der Effekt bei höheren Konzentrationen schwächer. Somit führte die Vorbehandlung mit jeweils 12,5  $\mu\text{M}$  8-PN im Vergleich zu 6-PN noch zu einer stärkeren Reduktion der Viabilität um 7,9 % (gegenüber 3,5 % bei 12,5  $\mu\text{M}$  6-PN) im Vergleich zur Kontrolle, bei der Vorbehandlung mit jeweils 25  $\mu\text{M}$  sank der viabilitätsreduzierende Effekt aber auf 1,8 % bei 8-PN (gegenüber 12,3 % bei 25  $\mu\text{M}$  6-PN).

Die Ergebnisse des SRB-Assays zeigten dieselben Verhältnisse der unterschiedlichen Behandlungen. Die Viabilität sank nach Behandlung der HepG2-Zellen mit 25  $\mu\text{M}$  6-PN und Zugabe unbehandelter NK-92 Mi-Zellen auf 20,4 % unter die der Kontrolle ( $p = 0,0020$ ), die Zugabe von ebenfalls mit 25  $\mu\text{M}$  6-PN behandelten NK-92 Mi-Zellen führte zu einer Reduktion um 18,2 % im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,0083$ ). NK-Zell-unabhängig führte die Behandlung der HepG2-Zellen mit einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  6-PN zu einer

Viabilitätsreduktion von 15,7 % im Vergleich zur Lebendkontrolle ( $p = 0,0448$ ), auch 8-PN senkte bei einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  NK-Zell-unabhängig die Viabilität der HepG2-Zellen um 18,6 % ( $p = 0,0007$ ). 8-PN führte außerdem NK-Zell-abhängig im SRB-Assay zu zusätzlich statistisch signifikanten Viabilitätsreduktionen im Vergleich zu 6-PN. Mit 12,5  $\mu\text{M}$  8-PN vorbehandelte HepG2-Zellen zeigten nach Zugabe unbehandelter NK-92 Mi-Zellen eine Viabilität von 13,5 % unterhalb der Werte der Kontrolle ( $p = 0,0275$ ), die Vorbehandlung mit 25  $\mu\text{M}$  und Zugabe unbehandelter NK-92 Mi-Zellen eine Viabilität von 19,9 % unter den Kontrollwerten ( $p = 0,0003$ ). Statistisch signifikant senkte auch die kombinierte Vorbehandlung mit 12,5  $\mu\text{M}$  8-PN die Viabilität um 13,9 % ( $p = 0,0213$ ).

3.1.3.2 E:T-Verhältnis 0,625:1

HepG2 (T), NK-92 Mi (E), E:T 0,625:1, CTB + SRB, 6-/ 8-PN, 24 h,  
30 000 Zellen / Well



**Abbildung 14:** CTB- und SRB-Assays – HepG2; NK-92 Mi; 6-PN und 8-PN; 24 h Behandlung; 48 h Killing; 30 000 Target-Zellen / Well; E:T = 0,625:1.

(A) und (B) zeigen die CTB-Ergebnisse, (C) und (D) die SRB-Ergebnisse mit 0–25 µM 6-PN (A, C) bzw. 0–25 µM 8-PN (B, D). Target-Zellen (T) waren HepG2-Zellen, als Effektor-Zellen (E) dienten NK-92 Mi-Zellen. Für die CTB-Assays ist die Viabilität in % der Kontrolle auf Basis der Fluoreszenzwerte als Surrogat-Parameter auf der y-Achse dargestellt. Es sind jeweils die Mittelwerte ± SD aus je drei Versuchen, gemessen in Duplikaten, abzüglich des Medium-Hintergrunds, in % der Lebendkontrolle angegeben. Für die SRB-Assays ist die Viabilität in % der Lebendkontrolle dargestellt. Die rote Linie zeigt jeweils den Mittelwert der Kontrollen aus unbehandelten Tumor- und unbehandelten NK-92 Mi-Zellen. Die Behandlung über 24 h erfolgte vor Killing. Die anschließende Inkubationszeit mit NK-92 Mi für das Killing betrug 48 h. Als Totkontrolle diente die Zugabe von Triton (1 % v/v). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD dreier unabhängiger Versuche, durchgeführt in Duplikaten. Die jeweils eingesetzte Konzentration von 6-PN oder 8-PN ist in Klammer hinter der Zugehörigkeitsangabe zu Target- oder Effektor-Zellen angegeben, die entsprechende Maßeinheit ist µM. Statistik: one-way ANOVA Dunnett's multipler Vergleichstest, Konfidenzintervall 95 %, ns:  $p > 0,05$ , ns sowie Signifikanz bei der Totkontrolle sind nicht dargestellt; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ . 6-PN, 6-Prenylningenin; 8-PN, 8-Prenylningenin; CTB, CellTiter-Blue®, E, Effektor-Zellen (hier: NK-92 Mi); T, Target-Zellen (hier: HepG2); E:T, Effector-to-Target; NK-Zellen, natürliche Killerzellen; ns, not significant; SD, Standardabweichung (standard deviation); SRB, Sulforhodamin B; unbeh., unbehandelt.

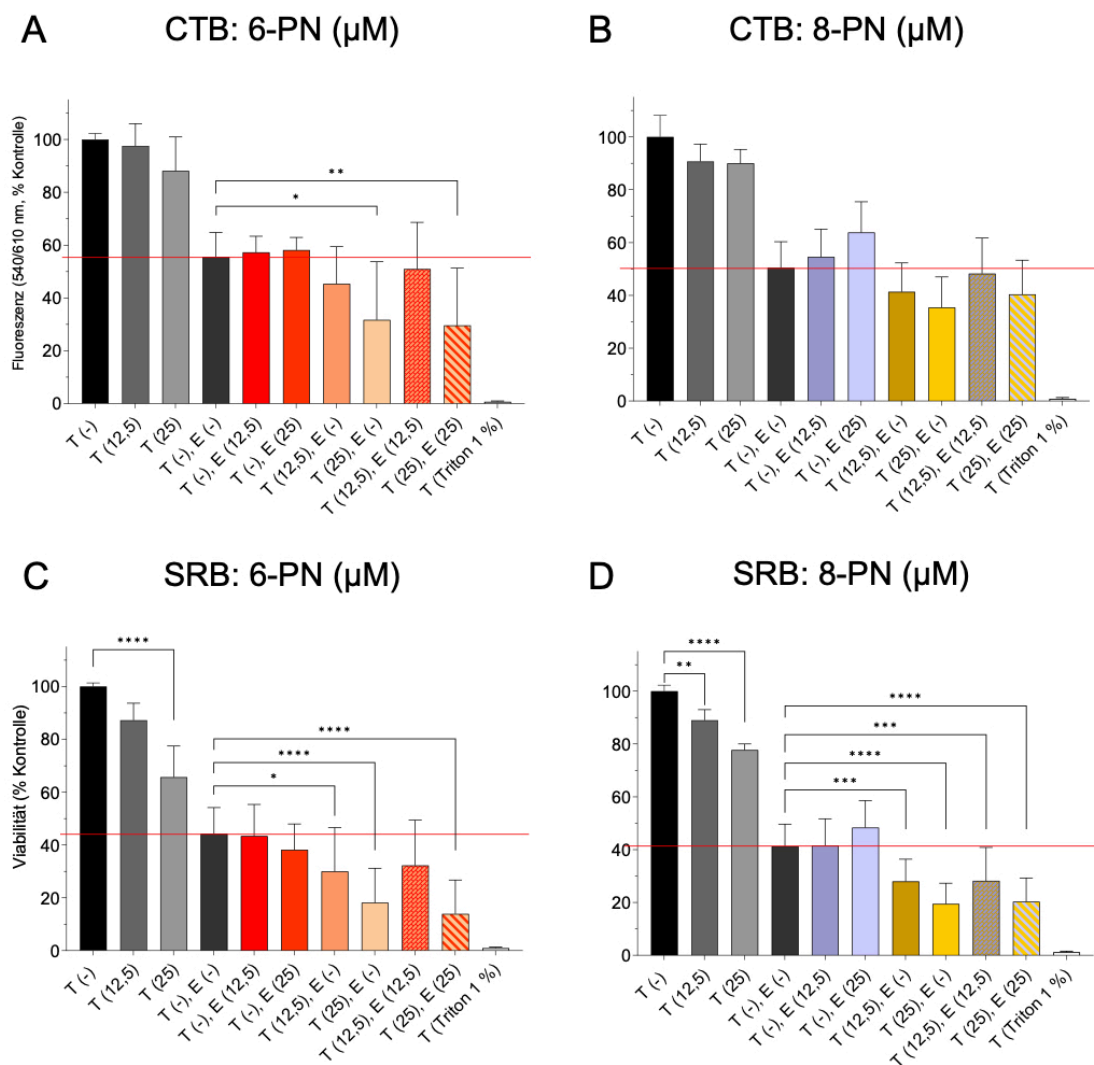
In den in Abbildung 14 dargestellten Versuchsansätzen mit einem E:T-Verhältnis von 0,625:1 ließen sich die gleichen Tendenzen wie in den Versuchen mit einem E:T-Verhältnis von 1,25:1 erkennen, insgesamt waren die Viabilitätswerte bei den niedrigeren eingesetzten NK-Zellzahlen aber höher. Wie auch beim E:T-Verhältnis von 1,25:1 führte die Vorbehandlung der HepG2-Zellen mit 25 µM 6-PN oder 8-PN und Inkubation mit unbehandelten NK-92 Mi-Zellen zur stärksten Viabilitätsreduktion. In den CTB-Assays zeigte diese Behandlung für 8-PN eine statistisch signifikante Viabilitätsreduktion. In Konzentration von 12,5 µM führte 8-PN zu einer Reduktion der Viabilität um 10,1 % im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,0289$ ), die Konzentration 25 µM zu einer Reduktion um 12,2 % im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,0050$ ). In den SRB-Assays zeigte die Vorbehandlung der HepG2-Zellen mit 25 µM 6-PN nach Zugabe unbehandelter NK-92 Mi-Zellen eine Reduktion der Viabilität um 30,9 % im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,0011$ ), nach Zugabe ebenfalls mit 25 µM 6-PN vorbehandelter NK-92 Mi-Zellen sank die Viabilität auf 23,9 % unterhalb der Werte der Kontrolle ( $p = 0,0214$ ). Die Behandlung der HepG2-Zellen mit 8-PN führte in allen Ansätzen zu einer signifikanten Reduktion der Viabilität. Nach Zugabe unbehandelter NK-92 Mi-Zellen zeigte sich für die Vorbehandlung mit 12,5 µM 8-PN eine Reduktion der Viabilität um 11,3 % im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,0038$ ) sowie für die Konzentration 25 µM eine Reduktion um 19,3 % ( $p < 0,0001$ ). Nach kombinierter Vorbehandlung mit jeweils 12,5 µM 8-PN sank die Viabilität um 8,8 % im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,0415$ ), nach kombinierter Behandlung mit jeweils 25 µM 8-PN um 10,4 % ( $p = 0,0094$ ). Auch NK-Zell-unabhängig sank die Viabilität nach Vorbehandlung mit 8-PN signifikant. Die Behandlung mit 12,5 µM 8-PN senkte die Viabilität um 13,3 % ( $p = 0,0004$ ), die Behandlung mit 25 µM 8-PN um 19,1 % im Vergleich zur Lebendkontrolle ( $p < 0,0001$ ).

### 3.1.4 HepG2 nach 48h *Killing* durch NK-92

Auch für die NK-92-Zelllinie wurde die Wirkung von 6-PN und 8-PN auf das durch sie vermittelte Tumorzell-*Killing* gegenüber der HepG2-Linie untersucht. Hierbei erfolgte in regelmäßigen Abständen die Zugabe von IL-2, um die NK-92-Zellen in aktiviertem Zustand zu halten.

3.1.4.1 E:T-Verhältnis 1,25:1

HepG2 (T), NK-92 (E), E:T 1,25:1, CTB + SRB, 6-/ 8-PN, 24 h,  
30 000 Zellen / Well



**Abbildung 15:** CTB- und SRB-Assays – HepG2; NK-92; 6-PN und 8-PN; 24 h Behandlung; 48 h Killing; 30 000 Target-Zellen / Well; E:T = 1,25:1.

(A) und (B) zeigen die CTB-Ergebnisse, (C) und (D) die SRB-Ergebnisse mit 0–25 µM 6-PN (A, C) bzw. 0–25 µM 8-PN (B, D). Target-Zellen (T) waren HepG2-Zellen, als Effektor-Zellen (E) dienten NK-92-Zellen. Für die CTB-Assays ist die Viabilität in % der Kontrolle auf Basis der Fluoreszenzwerte als Surrogat-Parameter auf der y-Achse dargestellt. Es sind jeweils die Mittelwerte ± SD aus je drei Versuchen, gemessen in Duplikaten, abzüglich des Medium-Hintergrunds, in % der Lebendkontrolle angegeben. Für die SRB-Assays ist die Viabilität in % der Lebendkontrolle dargestellt. Die rote Linie zeigt jeweils den Mittelwert der Kontrollen aus unbehandelten Tumor- und unbehandelten NK-92-Zellen. Die Behandlung über 24 h erfolgte vor Killing. Die anschließende Inkubationszeit mit NK-92 für das Killing betrug 48 h. Als Totkontrolle diente die Zugabe von Triton (1 % v/v). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD dreier unabhängiger Versuche, durchgeführt in Duplikaten. Die jeweils eingesetzte Konzentration von 6-PN oder 8-PN ist in Klammer hinter der Zugehörigkeitsangabe zu Target- oder Effektor-Zellen angegeben, die entsprechende Maßeinheit ist µM. Statistik: one-way ANOVA Dunnett's multipler Vergleichstest, Konfidenzintervall 95 %, ns:  $p > 0,05$ , ns sowie Signifikanz bei der Totkontrolle sind nicht dargestellt; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ . 6-PN, 6-Prenylnaringenin; 8-PN, 8-Prenylnaringenin; CTB, CellTiter-Blue®; E, Effektor-Zellen (hier: NK-92); T, Target-Zellen (hier: HepG2); E:T, Effector-to-Target; NK-Zellen, natürliche Killerzellen; ns, not significant; SD, Standardabweichung (standard deviation); SRB, Sulforhodamin B; unbeh., unbehandelt.

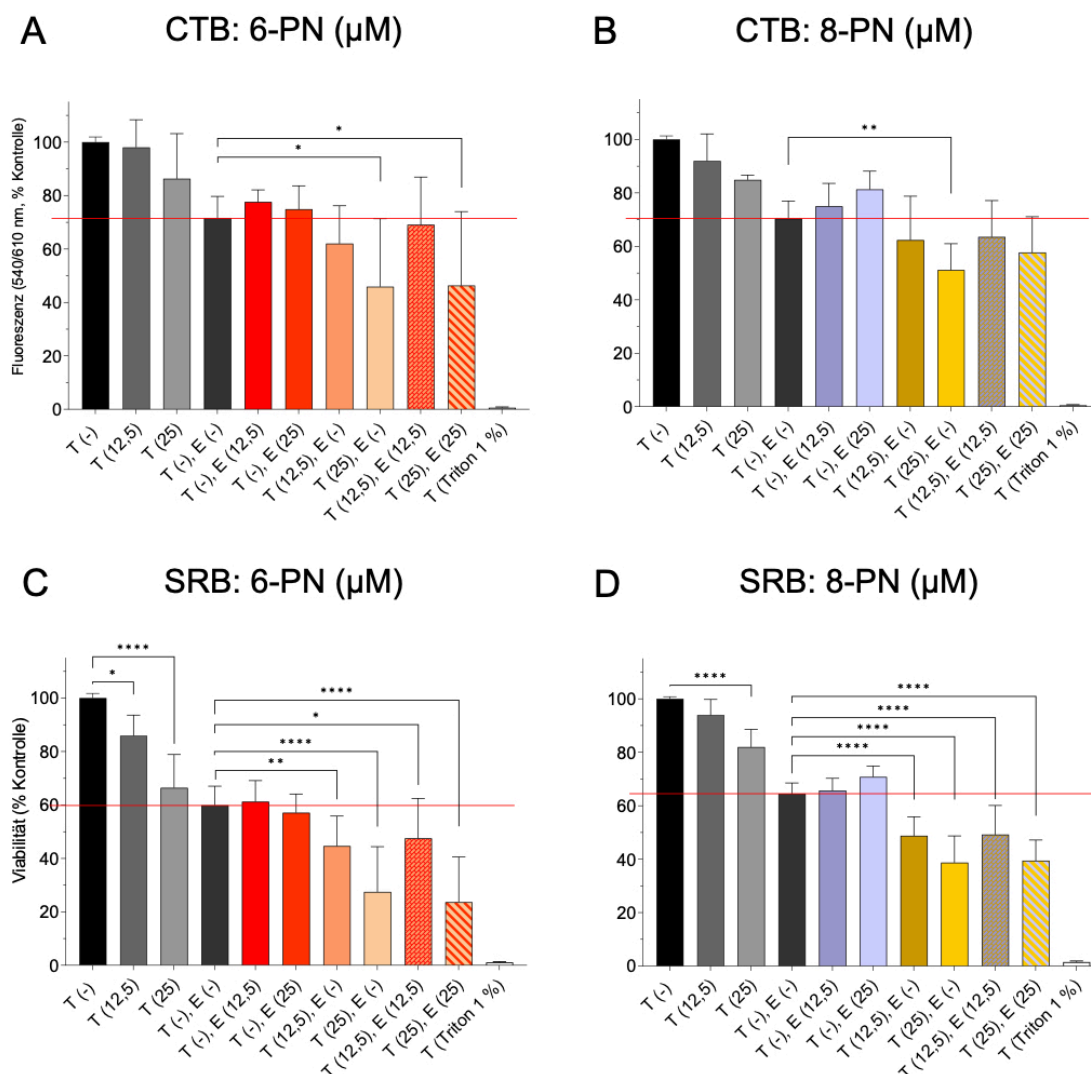
Die Ergebnisse des CTB-Assays zeigten für die Behandlung der NK-92-Zellen mit 6-PN keinen wesentlichen Effekt auf das *Killing* bzw. für 8-PN einen konzentrationsabhängigen negativen Effekt auf das NK-vermittelte *Killing* mit bis zu 13,4 % höheren Viabilitätswerten nach Vorbehandlung der NK-92-Zellen mit 25  $\mu$ M 8-PN im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 15, A und B). Die Behandlung der HepG2-Zellen dagegen hatte bei jeder Konzentration – NK-Zell-abhängig sowie -unabhängig – einen positiven Effekt auf die Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle. Für 6-PN war dieser signifikant in der Behandlung mit 25  $\mu$ M und Zugabe unbehandelter NK-92-Zellen (Reduktion um 23,9 % im Vergleich zur Kontrolle,  $p = 0,0188$ ) sowie für die kombinierte Behandlung mit jeweils 25  $\mu$ M 6-PN (Reduktion um 25,9 % im Vergleich zur Kontrolle,  $p = 0,0087$ ). Für 8-PN zeigte sich die stärkste Viabilitätsreduktion nach Behandlung der HepG2-Zellen mit 25  $\mu$ M und Zugabe unbehandelter NK-92-Zellen (15 % im Vergleich zur Kontrolle), diese war jedoch statistisch nicht signifikant.

Die zugehörigen SRB-Assays zeigten vergleichbare Ergebnisse. Die Behandlung der HepG2-Zellen mit 6-PN führte nach Zugabe unbehandelter NK-92-Zellen bereits bei einer Konzentration von 12,5  $\mu$ M zu einer signifikanten Viabilitätsreduktion um 14,3 % im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,0210$ ), die Behandlung mit 25  $\mu$ M 6-PN führte zu einer Reduktion um 26,2 % ( $p < 0,0001$ ). Auch die Reduktion der Zellviabilität nach kombinierter Behandlung mit jeweils 25  $\mu$ M 6-PN um 30,4 % im Vergleich zur Kontrolle war mit einem  $p$ -Wert  $< 0,0001$  hoch-signifikant. Vergleichend führten dieselben Behandlungen mit 8-PN ebenfalls zu einer signifikanten, wenn auch etwas schwächeren Reduktion der Zellviabilität. Die Vorbehandlung der HepG2-Zellen mit 8-PN und Zugabe unbehandelter NK-92-Zellen führte bei einer Konzentration von 12,5  $\mu$ M zu einer Reduktion um 13,2 % im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,0006$ ), bei einer Konzentration von 25  $\mu$ M zu einer Reduktion um 21,8 % ( $p < 0,0001$ ). Auch die kombinierte Behandlung mit 8-PN senkte bereits bei einer Konzentration von jeweils 12,5  $\mu$ M die Viabilität um 13 % unterhalb der Kontrollwerte ( $p = 0,0008$ ), in einer Konzentration von jeweils 25  $\mu$ M sank die Viabilität auf 20,9 % unterhalb der Kontrollwerte ( $p < 0,0001$ ).

NK-Zell-unabhängig führten die Behandlungen mit 6-PN und 8-PN zusätzlich zu einer konzentrationsabhängigen Proliferationshemmung der HepG2-Zellen. In den Ergebnissen des SRB-Assays war diese sowohl für 6-PN als auch für 8-PN bei einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  statistisch hoch signifikant (6-PN: 34,3 %, 8-PN: 22,3 %;  $p < 0,0001$ ). Bei einer Konzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  führte 6-PN zu einer Reduktion der Viabilität um 12,7 % im Vergleich zur Lebendkontrolle, 8-PN zu einer Reduktion um 11 % ( $p = 0,0068$ ).

3.1.4.2 E:T-Verhältnis 0,625:1

**HepG2 (T), NK-92 (E), E:T 0,625:1, CTB + SRB, 6-/ 8-PN, 24 h,  
30 000 Zellen / Well**



**Abbildung 16:** CTB- und SRB-Assays – HepG2; NK-92; 6-PN und 8-PN; 24 h Behandlung; 48 h Killing; 30 000 Target-Zellen / Well; E:T = 0,625:1.

(A) und (B) zeigen die CTB-Ergebnisse, (C) und (D) die SRB-Ergebnisse mit 0–25 µM 6-PN (A, C) bzw. 0–25 µM 8-PN (B, D). Target-Zellen (T) waren HepG2-Zellen, als Effektor-Zellen (E) dienten NK-92-Zellen. Für die CTB-Assays ist die Viabilität in % der Kontrolle auf Basis der Fluoreszenzwerte als Surrogat-Parameter auf der y-Achse dargestellt. Es sind jeweils die Mittelwerte ± SD aus je drei Versuchen, gemessen in Duplikaten, abzüglich des Medium-Hintergrunds, in % der Lebendkontrolle angegeben. Für die SRB-Assays ist die Viabilität in % der Lebendkontrolle dargestellt. Die rote Linie zeigt jeweils den Mittelwert der Kontrollen aus unbehandelten Tumor- und unbehandelten NK-92-Zellen. Die Behandlung über 24 h erfolgte vor Killing. Die anschließende Inkubationszeit mit NK-92 für das Killing betrug 48 h. Als Totkontrolle diente die Zugabe von Triton (1 % v/v). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD dreier unabhängiger Versuche, durchgeführt in Duplikaten. Die jeweils eingesetzte Konzentration von 6-PN oder 8-PN ist in Klammer hinter der Zugehörigkeitsangabe zu Target- oder Effektor-Zellen angegeben, die entsprechende Maßeinheit ist µM. Statistik: one-way ANOVA Dunnett's multipler Vergleichstest, Konfidenzintervall 95 %, ns: p > 0,05, ns sowie Signifikanz bei der Totkontrolle sind nicht dargestellt; \*, p ≤ 0,05; \*\*, p ≤ 0,01; \*\*\*\*: p ≤ 0,0001. 6-PN, 6-Prenylnarigenin; 8-PN, 8-Prenylnarigenin; CTB, CellTiter-Blue®, E, Effektor-Zellen (hier: NK-92); T, Target-Zellen (hier: HepG2); E:T, Effector-to-Target; NK-Zellen, natürliche Killerzellen; ns, not significant; SD, Standardabweichung (standard deviation); SRB, Sulforhodamin B; unbeh., unbehandelt.



Wie in Abbildung 16 zu sehen, zeigte die Behandlung der HepG2-Zellen mit 6-PN und 8-PN auch in den Ansätzen mit einem E:T-Verhältnis von 0,625:1 konzentrationsabhängig positive Effekte auf die Reduktion der Zellviabilität. In den Versuchen mit 6-PN waren diese am stärksten nach Behandlung der HepG2-Zellen mit 25  $\mu\text{M}$  ausgeprägt. Nach Zugabe unbehandelter NK-92-Zellen sank die Viabilität im CTB-Assay um 25,8 % im Vergleich zur Kontrolle ( $p = 0,0337$ ). Die kombinierte Behandlung sowohl der HepG2- als auch der NK-92-Zellen mit 25  $\mu\text{M}$  führte zu im Vergleich zur Kontrolle um 25,3 % geringeren Viabilitätswerten ( $p = 0,0388$ ). Beim zugehörigen SRB-Assay zeigten alle Ansätze mit Behandlung der HepG2-Zellen signifikante Reduktionen der Zellviabilität. Die Zugabe unbehandelter NK-92-Zellen führte nach Behandlung der HepG2-Zellen mit 12,5  $\mu\text{M}$  6-PN zu einer 15,3 % geringeren Viabilität als die der Kontrolle ( $p = 0,0071$ ), mit 25  $\mu\text{M}$  6-PN zu einer 32,4 % geringeren Viabilität ( $p < 0,0001$ ). Bei kombinierter Behandlung mit jeweils 12,5  $\mu\text{M}$  6-PN sank die Viabilität um 12,4 % ( $p = 0,0471$ ) und bei kombinierter Behandlung mit jeweils 25  $\mu\text{M}$  um 36,2 % im Vergleich zur Kontrolle ( $p < 0,0001$ ). Auch NK-Zell-unabhängig kam es bereits nach Behandlung der HepG2-Zellen mit 12,5  $\mu\text{M}$  6-PN zu einer Reduktion der Zellviabilität um 14,1 % im Vergleich zur Lebendkontrolle ( $p = 0,0159$ ), nach Behandlung mit 25  $\mu\text{M}$  6-PN zu einer Reduktion um 33,6 % ( $p < 0,0001$ ).

Vergleichend führte die Behandlung der HepG2-Zellen mit 8-PN beim CTB-Assay nur in einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  mit anschließender Zugabe unbehandelter NK-92-Zellen zu einer statistisch signifikanten Viabilitätsreduktion ( $p = 0,0077$ ). Im SRB-Assay wurden für alle NK-Zell-abhängigen Versuchsansätze nach Behandlung mit 8-PN hoch signifikante Viabilitätsreduktionen im Vergleich zur Kontrolle mit  $p < 0,0001$  gemessen. NK-Zell-unabhängig zeigte sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation nach Behandlung der HepG2-Zellen mit 8-PN, welche bei einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  statistisch signifikant war ( $p < 0,0001$ ).

Die alleinige Behandlung der NK-92-Zellen mit 6-PN zeigte in den hier eingesetzten Konzentrationen keinen wesentlichen positiven Effekt auf die Reduktion der Zellviabilität der Target-Zellen, die alleinige Behandlung mit 8-PN

zeigte darüber hinaus konzentrationsabhängig gestiegene Viabilitätswerte zum Messzeitpunkt.

Aus den oben dargestellten Ergebnissen der CTB- und SRB-Assays ist ersichtlich, dass die Behandlung der beiden Hepatom-Zelllinien mit 6-PN und 8-PN das NK-Zell-vermittelte Tumorzell-*Killing* positiv beeinflusst. Außerdem besitzen 6-PN und 8-PN einen NK-Zell-unabhängigen, proliferationshemmenden Effekt auf die Hepatom-Zellen. Der viabilitätsreduzierende Effekt war nach Behandlung mit 6-PN etwas stärker ausgeprägt als nach Behandlung mit 8-PN. Für beide Stoffe gilt aber, dass die höhere Konzentration (25  $\mu\text{M}$ ) zu einer stärkeren Reduktion der Zellviabilität führte.

Die alleinige Behandlung der NK-Zellreihen hatte keinen oder sogar einen negativen Effekt auf das durch sie vermittelte Tumorzell-*Killing*. Insbesondere die Behandlung der NK-Zellen mit 8-PN führte konzentrationsabhängig zu einem schlechteren *Killing* mit höheren Viabilitätsraten der Tumorzellen als die unbehandelte Kontrolle.

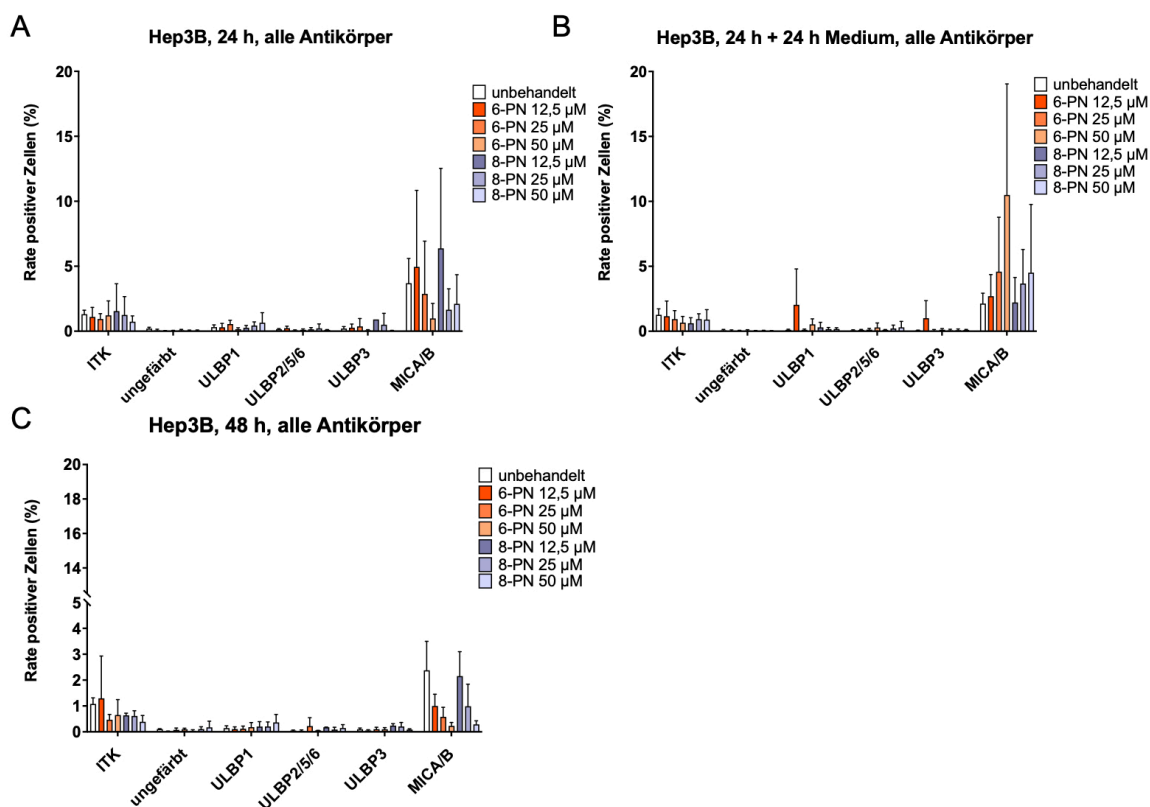
### 3.2 Expression von MICA/B und verschiedenen ULBP auf Hep3B- bzw. HepG2-Zellen nach Behandlung mit 6-PN oder 8-PN

Nachdem in den CTB- und SRB-Assays ein positiver Einfluss auf das NK-Zell-vermittelte Tumorzell-*Killing* nach Behandlung der Hepatom-Zellen festgestellt wurde, ging es im zweiten Teil der Versuche darum, potenziell ursächliche zelluläre Mechanismen zu detektieren. Hierfür wurde untersucht, ob sich durch Behandlung mit 6-PN und 8-PN die Expression bestimmter Liganden der für das NK-Zell-vermittelte *Killing* wichtigen NKG2D-Rezeptoren auf den Tumorzellen ändert. Dafür wurden die Tumorzellen mit 6-PN bzw. 8-PN in den Konzentrationen 12,5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  entweder 24 h oder 48 h lang behandelt. Das Behandlungsschema wurde nach einer Behandlungszeit von 24 h zusätzlich mit einer anschließenden 24-stündigen Inkubation in Medium erweitert. Dadurch sollte die Liganden-Expression nach der 24-stündigen Behandlung mit 6-PN oder 8-PN nach einer Gesamtversuchsdauer von 48 h in einem Zeitraum objektiviert werden, in dem in den CTB- und SRB-Assays unter entsprechendem Versuchsaufbau die Target-Zellen dem *Killing* durch die NK-

## Ergebnisse

Zellen ausgesetzt waren. Mithilfe monoklonaler, fluoreszenzmarkierter Antikörper wurden nach diesen Behandlungszeiträumen die Oberflächenproteine und Stressliganden ULBP1, ULBP2/5/6 und ULBP3 sowie MICA/B markiert und anschließend die Zellen durchflusszytometrisch gemessen.

### 3.2.1 Behandlungsabhängige Expression von NKG2D-Liganden auf Hep3B-Zellen



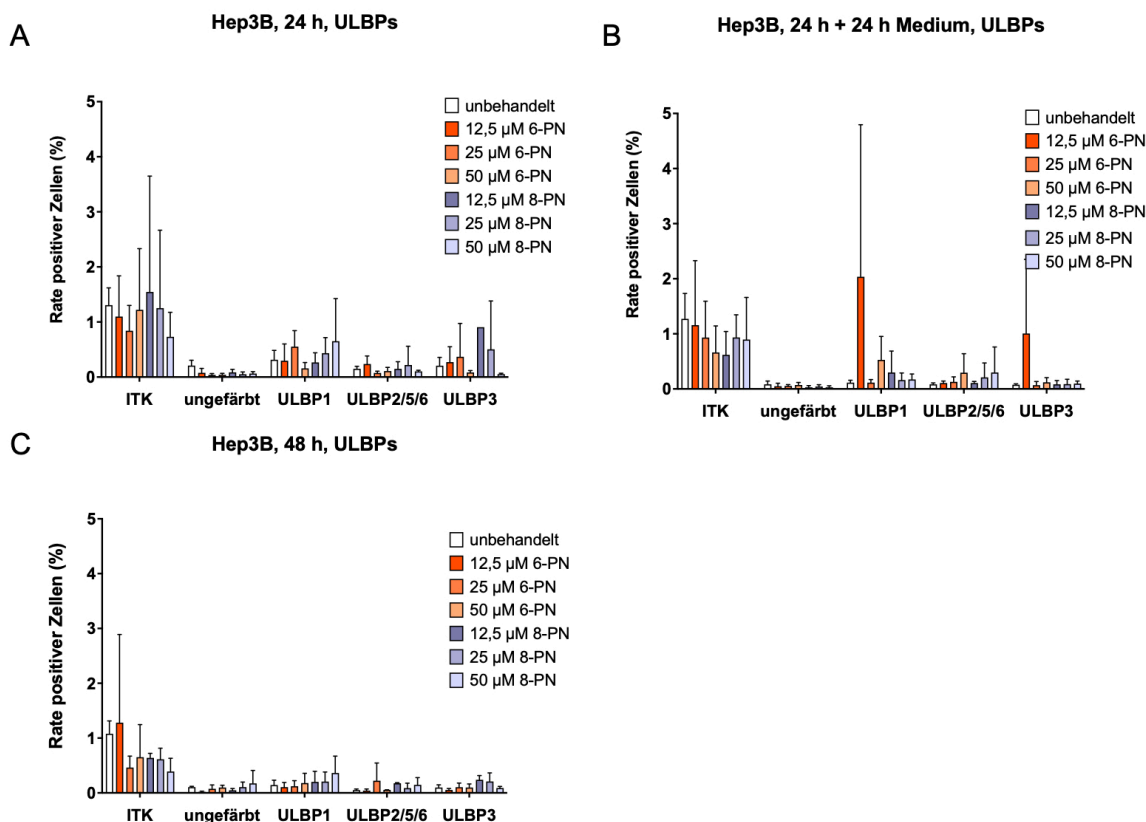
**Abbildung 17:** Rate ULBP- bzw. MICA/B-exprimierender Hep3B-Zellen nach Behandlung mit 6- / 8-PN in der Durchflusszytometrie.

Messzeitpunkte waren nach einer Behandlungsdauer von 24 h (A), 24 h + 24 h Inkubation in Medium (B) und 48 h (C). Die eingesetzten Konzentrationen waren jeweils 12,5 µM, 25 µM und 50 µM 6-PN und 8-PN. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Als Negativkontrolle für die Antikörperfärbung dienten ungefärbte Zellen. Mittels Isotypkontrolle (IgG2a) wurde die Rate einer unspezifischen Antikörperbindung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus jeweils bis zu vier unabhängigen Versuchsreihen. Die y-Achse gibt die Rate positiver Zellen in % an. Zur besseren Darstellung auch geringer Expressionsraten wurde in (C) die y-Achse unterbrochen. Entlang der x-Achse sind die unterschiedlichen NKG2D-Liganden sowie die Negativkontrolle für die jeweiligen Behandlungskonzentrationen dargestellt. 6-PN, 6-Prenylningenin; 8-PN, 8-Prenylningenin; ULBP, *UL 16-binding protein*; MICA/B, *MHC class I chain-related protein A and B*; ITK, Isotypkontrolle; SD, Standardabweichung (*standard deviation*).

Abbildung 17 stellt in einer Übersicht dar, wie hoch der prozentuale Anteil der Zellen war, die die jeweiligen Oberflächenmoleküle exprimiert haben. Im Vergleich zu der von MICA/B, war eine Expression von ULBPs kaum

## Ergebnisse

nachweisbar. Abbildung 18 stellt deshalb nochmals genauer die Anteile ULBP-positiver Zellen dar.



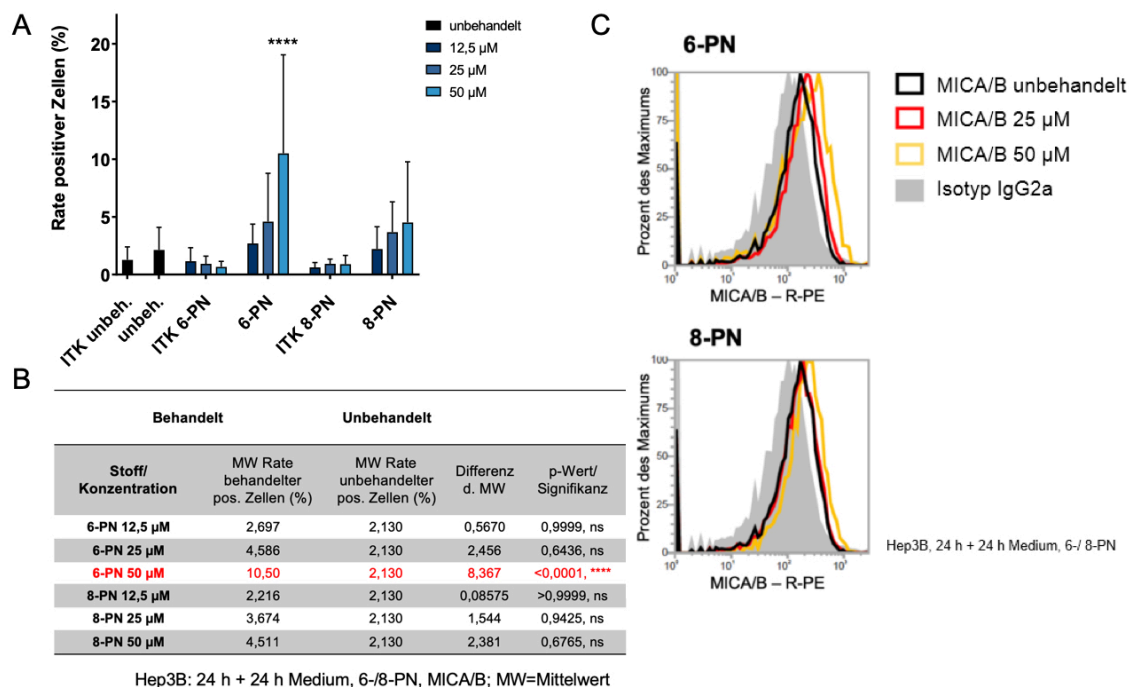
**Abbildung 18:** Rate ULBP-exprimierender Hep3B-Zellen nach Behandlung mit 6- / 8-PN in der Durchflusszytometrie. Messzeitpunkte waren nach einer Behandlungsdauer von 24 h (A), 24 h + 24 h Inkubation in Medium (B) und 48 h (C). Die eingesetzten Konzentrationen waren jeweils 12,5 µM, 25 µM und 50 µM 6-PN und 8-PN. Als Kontrolle dienen unbehandelte Zellen. Als Negativkontrolle für die Antikörperfärbung dienten ungefärbte Zellen. Mittels Isotypkontrolle (IgG2a) wurde die Rate einer unspezifischen Antikörperbindung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus jeweils bis zu vier unabhängigen Versuchsreihen. Die y-Achse gibt die Rate positiver Zellen in % an. Entlang der x-Achse sind die unterschiedlichen NKG2D-Liganden sowie die Negativkontrolle für die jeweiligen Behandlungskonzentrationen dargestellt. 6-PN, 6-Prenylningarinin; 8-PN, 8-Prenylningarinin; ULBP, *UL 16-binding protein*; ITK, Isotypkontrolle; SD, Standardabweichung (*standard deviation*).

In den meisten Fällen lag die Rate ULBP-positiver Zellen unter der unspezifischen Kontrollfärbung der Isotypkontrolle. So führte auch keine der Behandlungen in den Versuchen zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Expressionsraten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Lediglich nach Behandlung mit 12,5 µM 6-PN (24 h + 24 h) ließ sich ein Anstieg der Expressionsrate von ULBP1 und ULBP3 feststellen. Bei sehr hoher Standardabweichung muss dieses Ergebnis jedoch kritisch betrachtet werden. Abbildung 17 zeigt für die Oberflächenmoleküle MICA/B insbesondere nach 24 h Behandlung und anschließender 24-stündiger Inkubation in Medium einen

## Ergebnisse

konzentrationsabhängigen Anstieg der Expressionsrate bei den Hep3B-Zellen. Nach den Behandlungszeiträumen 24 h und 48 h fiel die Expressionsrate dagegen konzentrationsabhängig ab. Die genaueren Ergebnisse dazu sind in Abbildung 19 und 20 dargestellt.

### Hep3B, 24 h + 24 h Medium, 6-/8-PN, MICA/B

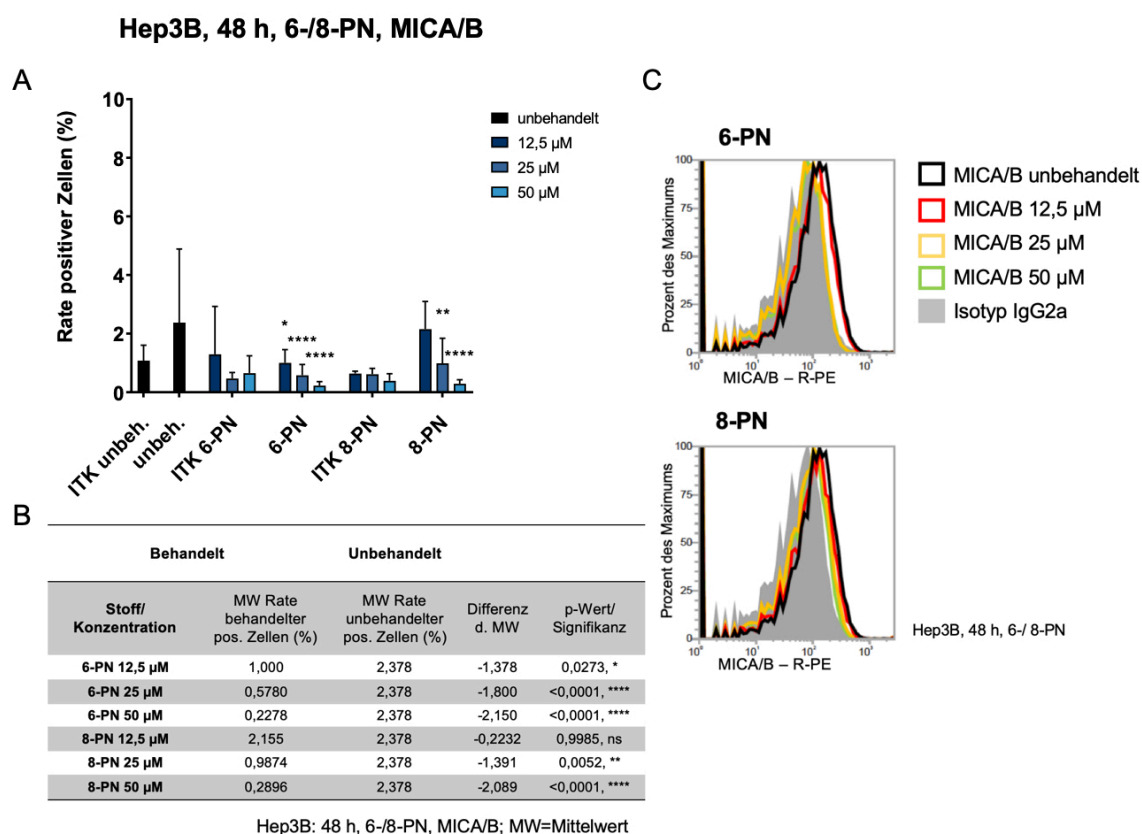


**Abbildung 19:** Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von MICA/B auf Hep3B-Zellen nach 24 h Behandlung mit 6- / 8-PN und 24 h Inkubation in Medium.

Unter (A) sind die MICA/B-positiven Zellen in % in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Verwendete Behandlungskonzentrationen waren 12,5 µM, 25 µM und 50 µM 6-PN und 8-PN. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus mindestens drei unterschiedlichen Experimenten. Die y-Achse gibt die Rate positiver Zellen in % an. Auf der x-Achse sind die unterschiedlichen Behandlungen aufgetragen. Die Tabelle unter (B) zeigt die Mittelwerte der Rate der positiv gemessenen Zellen der Behandelten, der unbehandelten Kontrolle (mittlere Spalte) sowie die p-Werte und damit die Signifikanz. Signifikante Steigerungen der Expressionsrate sind farblich in Rot hervorgehoben. (C) zeigt die Histogramm-Overlays der Versuche mit 6-PN und 8-PN (25 µM und 50 µM). Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten sind in Prozent des Maximums dargestellt. Mittels Isotypkontrolle (IgG2a) wurde die Rate einer unspezifischen Antikörperbindung gemessen. Statistik: two-way ANOVA Tukey's multipler Vergleichstest, ns:  $p > 0,05$ , ns nicht in der Grafik unter (A) angegeben, aus Gründen der Übersichtlichkeit nur Signifikanzen dargestellt; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ . 6-PN, 6-Prenylningarinin; 8-PN, 8-Prenylningarinin; MICA/B, *MHC class I chain-related protein A and B*; MW, Mittelwert; ITK, Isotypkontrolle; R-PE, R-Phycoerythrin; SD, Standardabweichung (*standard deviation*).

Sowohl für 6-PN als auch für 8-PN zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg des Anteils MICA/B-exprimierender Zellen (siehe Abbildung 19, A). Dieser war nach Behandlung mit 50 µM 6-PN statistisch hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ). In den *Overlays* (siehe Abbildung 19, C) zeigte sich für 6-PN eine konzentrationsabhängige Rechtsverlagerung der Histogramme im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Diesen Rechtsverlagerungen liegen höhere

gemessene Fluoreszenzintensitäten zugrunde. Die Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen, daher konnte auch hieraus graphisch eine konzentrationsabhängig gesteigerte Expression von MICA/B abgeleitet werden. Im unteren Histogramm-*Overlay* sind die Kurven für die Behandlung mit 8-PN dargestellt. Eine deutlich sichtbare Steigerung der Signalintensität konnte graphisch nur für die verwendete Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  8-PN (gelbe Kurve) dargestellt werden. Der Anstieg der MICA/B-Expression durch die Behandlung mit 8-PN war statistisch aber in keiner der verwendeten Konzentrationen signifikant (siehe Abbildung 19, B).



**Abbildung 20:** Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von MICA/B auf Hep3B-Zellen nach 48 h Behandlung mit 6- / 8-PN.

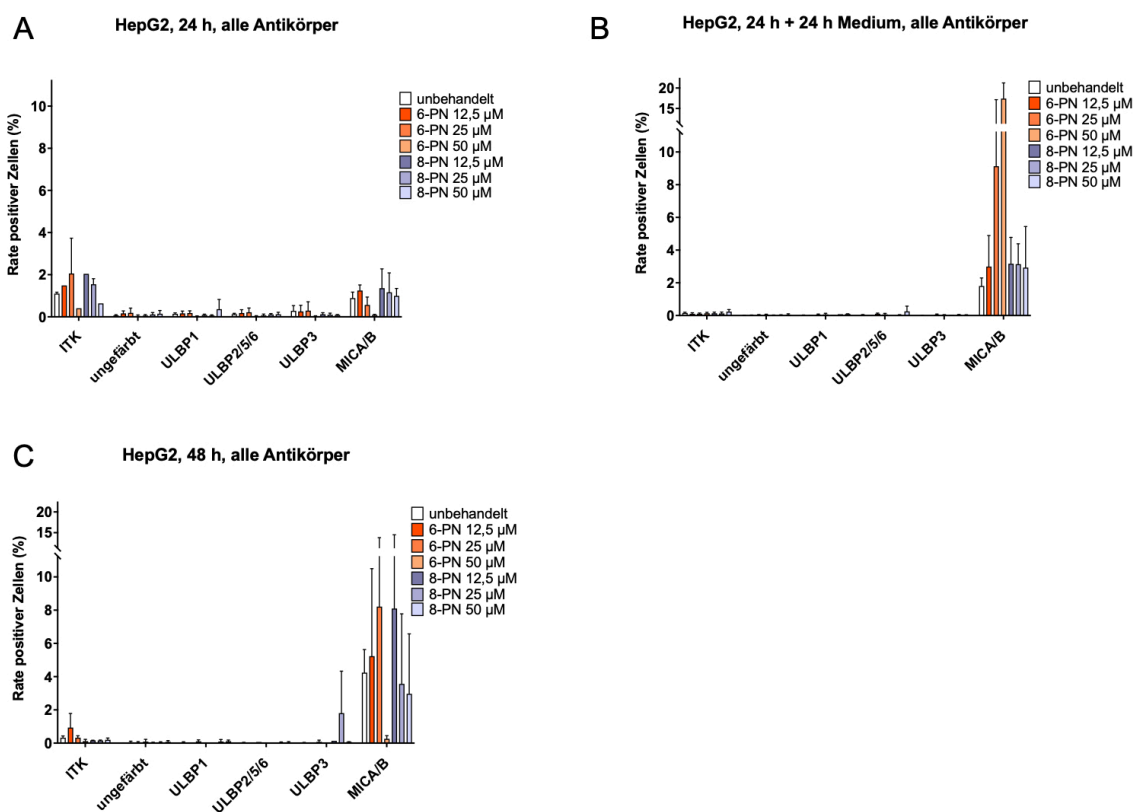
Unter (A) sind die MICA/B-positiven Zellen in % in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Als Kontrolle dienen unbehandelte Zellen. Verwendete Behandlungskonzentrationen waren 12,5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  6-PN und 8-PN. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus mindestens drei unterschiedlichen Experimenten. Die y-Achse gibt die Rate positiver Zellen in % an. Auf der x-Achse sind die unterschiedlichen Behandlungen aufgetragen. Die Tabelle unter (B) zeigt die Mittelwerte der Rate der positiven Zellen der Behandlungen, der unbehandelten Kontrolle (mittlere Spalte) sowie die p-Werte und damit die Signifikanz. (C) zeigt die Histogramm-*Overlays* der Versuche mit 6-PN und 8-PN. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten sind in Prozent des Maximums dargestellt. Mittels Isotypkontrolle (IgG2a) wurde die Rate einer unspezifischen Antikörperbindung gemessen. Statistik: two-way ANOVA Tukey's multipler Vergleichstest, ns:  $p > 0,05$ , ns nicht in der Grafik unter A angegeben, aus Gründen der Übersichtlichkeit nur Signifikanzan dargestellt; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ . 6-PN, 6-Prenylningenin; 8-PN, 8-Prenylningenin; MICA/B, *MHC class I chain-related protein A and B*; MW, Mittelwert; ITK, Isotypkontrolle; R-PE, R-Phycoerythrin; SD, Standardabweichung (*standard deviation*).

Um zu untersuchen, ob eine konzentrationsabhängige Expressionssteigerung auch nach längerer Behandlung nachzuweisen war, wurde eine Durchflusszytometrie nach 48 h durchgeführt. Die Ergebnisse der Markierung mit monoklonalen MICA/B-Antikörpern sind in Abbildung 20 dargestellt. Die Histogramme (siehe Abbildung 20, C) zeigten bei den verwendeten Konzentrationen 12,5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  weder bei 6-PN noch bei 8-PN eine erkennbare Rechtsverschiebung und damit keinen Hinweis auf einen Anstieg der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (schwarze Kurve). Vielmehr führte die 48-stündige Behandlung mit 6-PN in jeder eingesetzten Konzentration, mit 8-PN in den Konzentrationen 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$ , statistisch zu einer signifikant verminderten Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (siehe Abbildung 20, A und B).

### 3.2.2 Behandlungsabhängige Expression von NKG2D-Liganden auf HepG2-Zellen

Auch mit HepG2-Zellen wurden durchflusszytometrische Messungen der Expression der Liganden und Oberflächenproteine ULBP1, ULBP2/5/6, ULBP3 und MICA/B nach Behandlung und Inkubation mit 6-PN und 8-PN in denselben Konzentrationen über dieselben Zeiträume durchgeführt.

# Ergebnisse

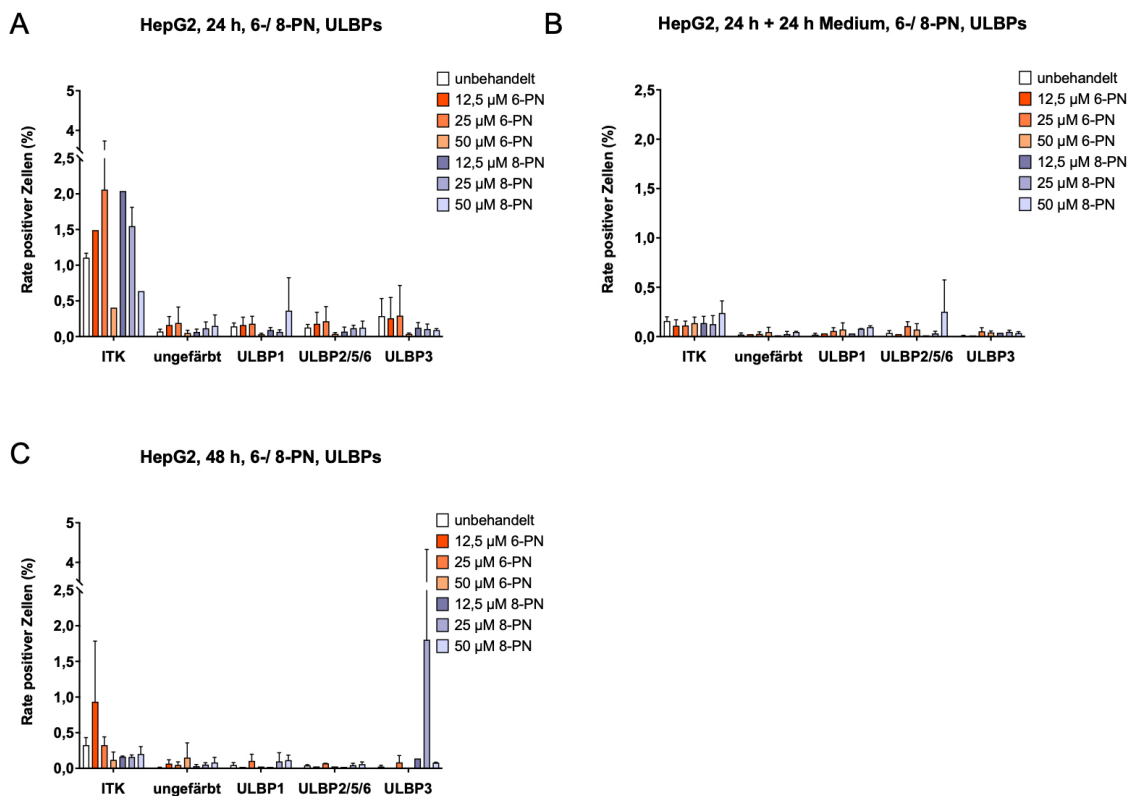


**Abbildung 21:** Rate ULBP- bzw. MICA/B-expressierender HepG2-Zellen nach Behandlung mit 6- / 8-PN in der Durchflusszytometrie. Messzeitpunkte waren nach einer Behandlungsdauer von 24 h (A), 24 h + 24 h Inkubation in Medium (B) und 48 h (C). Die eingesetzten Konzentrationen waren jeweils 12,5 µM, 25 µM und 50 µM 6-PN und 8-PN. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Als Negativkontrolle für die Antikörperfärbung dienten ungefärbte Zellen. Mittels Isotypkontrolle (IgG2a) wurde die Rate einer unspezifischen Antikörperbindung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus jeweils bis zu vier unabhängigen Versuchsreihen. Die y-Achse gibt die Rate positiver Zellen in % an. Zur besseren Darstellung auch hoher Expressionsraten wurde in (B) und (C) die y-Achse unterbrochen. Entlang der x-Achse sind die unterschiedlichen NKG2D-Liganden sowie die Negativkontrolle für die jeweiligen Behandlungskonzentrationen dargestellt. 6-PN, 6-Prenylnaringenin; 8-PN, 8-Prenylnaringenin; ULBP, *UL 16-binding protein*; MICA/B, *MHC class I chain-related protein A and B*; ITK, Isotypkontrolle; SD, Standardabweichung (*standard deviation*).

Wie bei den Hep3B-Zellen, war auf den HepG2-Zellen nach den unterschiedlichen Behandlungszeiträumen im Vergleich zu MICA/B eine Expression von ULBPs kaum nachweisbar (siehe Abbildung 21). Abbildung 22 stellt gesondert die Expressionsraten nur der ULBPs im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sowie der Isotypkontrolle dar.



## Ergebnisse

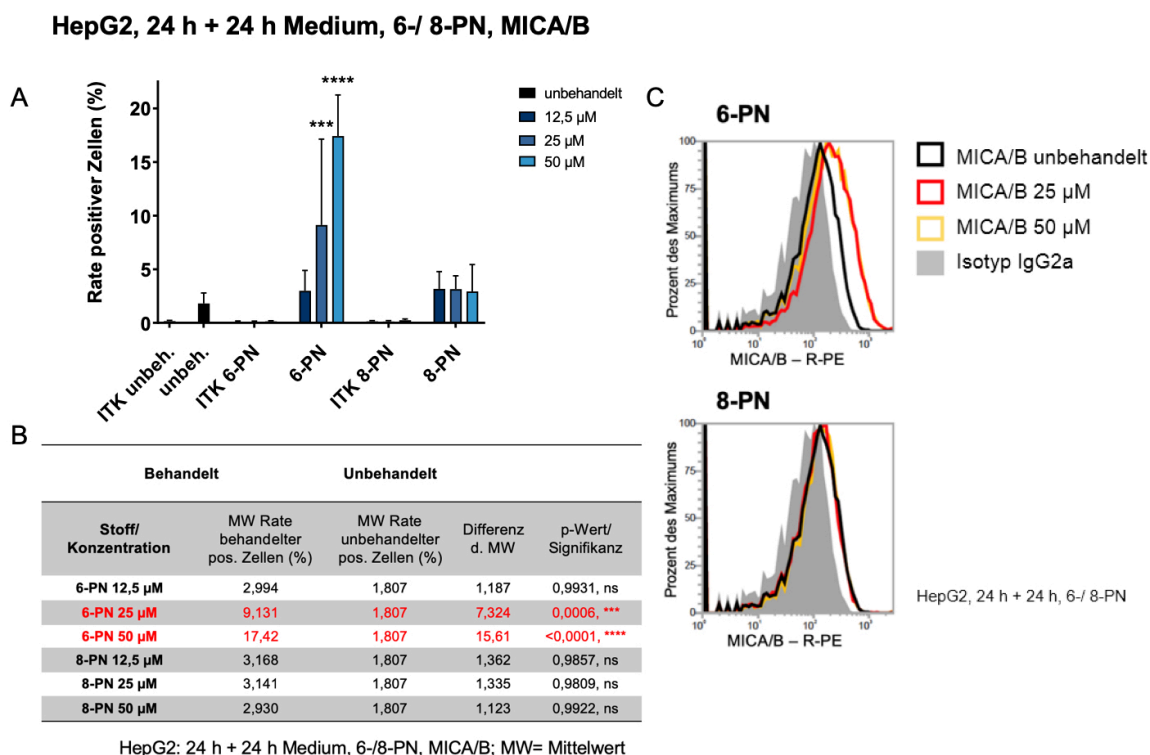


**Abbildung 22:** Rate ULBP-exprimierender HepG2-Zellen nach Behandlung mit 6- / 8-PN in der Durchflusszytometrie. Messzeitpunkte waren nach einer Behandlungsdauer von 24 h (A), 24 h + 24 h Inkubation in Medium (B) und 48 h (C). Die eingesetzten Konzentrationen waren jeweils 12,5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M und 50  $\mu$ M 6-PN und 8-PN. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Als Negativkontrolle für die Antikörperfärbung dienten ungefärbte Zellen. Mittels Isotypkontrolle (IgG2a) wurde die Rate einer unspezifischen Antikörperbindung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus jeweils bis zu vier unabhängigen Versuchsreihen. Die y-Achse gibt die Rate positiver Zellen in % an. Zur besseren Darstellung auch geringer Expressionsraten wurde in (A) und (C) die y-Achse unterbrochen. Entlang der x-Achse sind die unterschiedlichen NKG2D-Liganden sowie die Negativkontrolle für die jeweiligen Behandlungskonzentrationen dargestellt. 6-PN, 6-Prenylningarinin; 8-PN, 8-Prenylningarinin; ULBP, *UL 16-binding protein*; ITK, Isotypkontrolle; SD, Standardabweichung (*standard deviation*).

Bezogen auf die Expressionsrate der ULBPs fällt auf, dass es einzig bei einer Behandlung mit 25  $\mu$ M 8-PN über 48 h zu einem Anstieg kommt (siehe Abbildung 22, C). Dieser war statistisch nicht signifikant und sollte unter Betrachtung der übrigen Messergebnisse bei 6-PN und 8-PN über die verschiedenen Zeiträume ohne wesentlichen Anstieg der Expression von ULBPs kritisch betrachtet werden. Insgesamt jedoch blieb Expression der ULBPs geringer als die Messwerte der unspezifischen Bindung mittels Isotypkontrolle.

Die Expressionsrate von MICA/B unterschied sich dagegen, wie bei den Hep3B-Zellen, deutlich von der der ULBPs. In Abbildung 21 wird deutlich, dass es insbesondere nach 24 h Behandlung und 24 h Inkubation in Medium sowie nach 48 h Behandlung zu einem Anstieg der MICA/B-Expression auf HepG2-Zellen

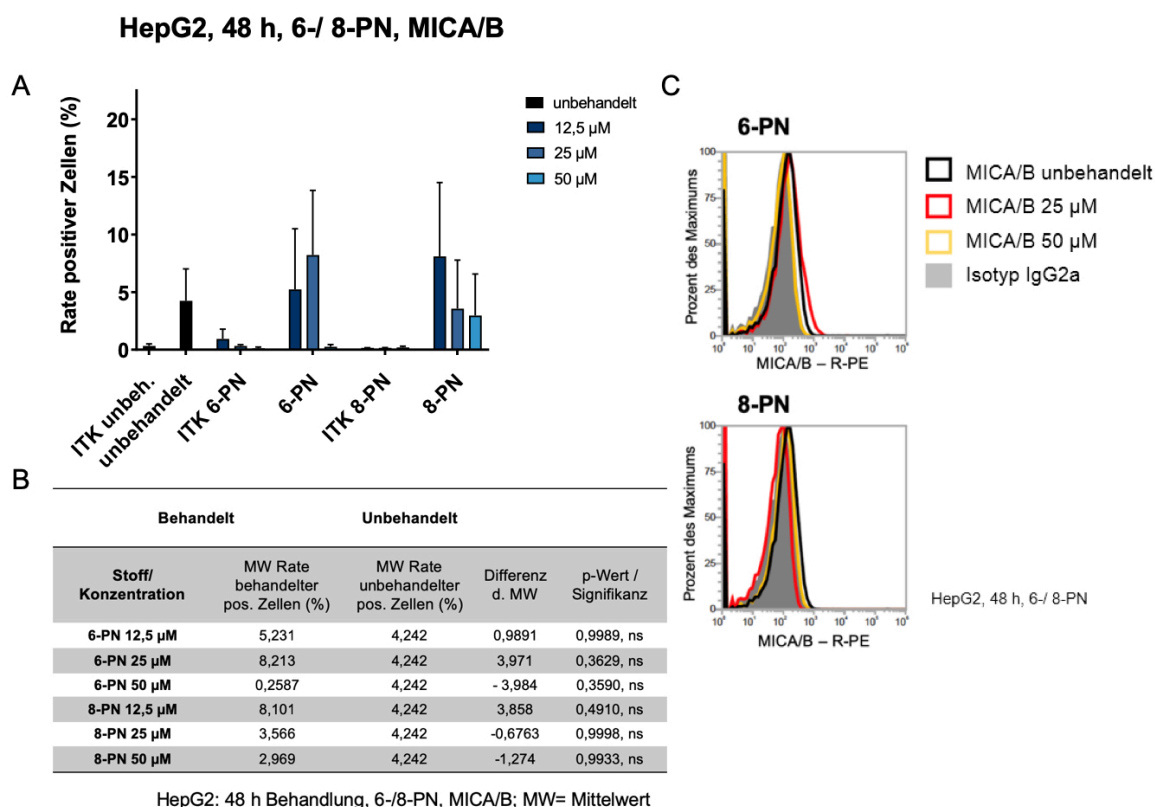
kam. Im Folgenden soll deshalb genauer auf diese Ergebnisse eingegangen werden.



**Abbildung 23:** Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von MICA/B auf HepG2-Zellen nach 24 h Behandlung mit 6- / 8-PN und 24 h Inkubation in Medium. Unter (A) sind die MICA/B-positiven Zellen in % in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Als Kontrolle dienen unbehandelte Zellen. Verwendete Behandlungskonzentrationen waren 12,5 µM, 25 µM und 50 µM 6-PN und 8-PN. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SD aus mindestens drei unterschiedlichen Experimenten. Die y-Achse gibt die Rate positiver Zellen in % an. Auf der x-Achse sind die unterschiedlichen Behandlungen aufgetragen. Die Tabelle unter (B) zeigt die Mittelwerte der Rate der positiven Zellen der Behandlungen, der unbehandelten Kontrolle (mittlere Spalte) sowie die p-Werte und damit die Signifikanz. Signifikante Steigerungen der Expressionsrate sind farblich in Rot hervorgehoben. (C) zeigt die Histogramm-Overlays der Versuche mit 6-PN und 8-PN (25 µM und 50 µM). Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten sind in Prozent des Maximums dargestellt. Mittels Isotypkontrolle (IgG2a) wurde die Rate einer unspezifischen Antikörperbindung gemessen. Statistik: two-way ANOVA Tukey's multipler Vergleichstest, ns:  $p > 0,05$ , ns nicht in der Grafik unter A angegeben, aus Gründen der Übersichtlichkeit nur Signifikanzen dargestellt; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ . 6-PN, 6-Prenylaringenin; 8-PN, 8-Prenylaringenin; MICA/B, MHC class I chain-related protein A and B; MW, Mittelwert; ITK, Isotypkontrolle; R-PE, R-Phycoerythrin; SD, Standardabweichung (standard deviation).

6-PN führte nach 24-stündiger Behandlung und anschließender 24-stündiger Inkubation in Medium zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Expression (siehe Abbildung 23, A). Dieser war bei den Behandlungskonzentrationen 25 µM sehr signifikant und 50 µM hoch signifikant, wie die Tabelle der Mittelwerte und p-Werte zeigt (25 µM,  $p = 0,0006$ ; 50 µM,  $p < 0,0005$ ; Abbildung 23, B). Auch das Overlay der Histogramme zeigte nach Behandlung mit 6-PN eine Rechtsverschiebung der Kurve (siehe Abbildung 23, C). Dieser Anstieg der Fluoreszenzintensität ist Ausdruck einer vermehrten

MICA/B-Expression und war sowohl für die Behandlung mit 25  $\mu\text{M}$  (rote Kurve), als auch mit 50  $\mu\text{M}$  (gelbe Kurve) deutlich zu erkennen. 8-PN führte ebenfalls zu einem Anstieg der MICA/B-Expression. Dieser war allerdings nicht signifikant. Außerdem konnte keine vermehrte Expression in Abhängigkeit von der Stoffkonzentration festgestellt werden. So zeigte sich auch im *Overlay* der Einzel-Histogramme (Abbildung 23, C) kein Anstieg der Fluoreszenzintensität der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (schwarze Kurve).



**Abbildung 24:** Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von MICA/B auf HepG2-Zellen nach 48 h Behandlung mit 6- / 8-PN.

Unter (A) sind die MICA/B-positiven Zellen in % in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Als Kontrolle dienen unbehandelte Zellen. Verwendete Behandlungskonzentrationen waren 12,5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  6-PN und 8-PN. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus mindestens drei unterschiedlichen Experimenten. Die y-Achse gibt die Rate positiver Zellen in % an. Auf der x-Achse sind die unterschiedlichen Behandlungen aufgetragen. Die Tabelle unter (B) zeigt die Mittelwerte der Rate der positiven Zellen der Behandlungen, der unbehandelten Kontrolle (mittlere Spalte) sowie die p-Werte und damit die Signifikanz. (C) zeigt die Histogramm-Overlays der Versuche mit 6-PN und 8-PN (25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$ ). Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten sind in Prozent des Maximums dargestellt. Mittels Isotypkontrolle (IgG2a) wurde die Rate einer unspezifischen Antikörperbindung gemessen. Statistik: two-way ANOVA Tukey's multipler Vergleichstest, ns:  $p > 0,05$ , ns nicht in der Grafik unter A angegeben. 6-PN, 6-Prenylaringenin; 8-PN, 8-Prenylaringenin; MICA/B, *MHC class I chain-related protein A and B*; MW, Mittelwert; ITK, Isotypkontrolle; R-PE, R-Phycoerythrin; SD, Standardabweichung (*standard deviation*).

Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen nach 48 h Behandlung. Die Expression von MICA/B stieg nach Behandlung mit 6-PN in den Konzentrationen 12,5  $\mu\text{M}$  und 25  $\mu\text{M}$  über diesen Zeitraum

konzentrationsabhängig an. Nach einer Behandlungskonzentration von 50  $\mu\text{M}$  über 48 h konnten dagegen keine positiv gefärbten Zellen zytometrisch gemessen werden (siehe Abbildung 24, A). Im Histogramm-*Overlay* ließen sich diese Ergebnisse ebenfalls gut darstellen (siehe Abbildung 24, C). Während die rote Kurve (25  $\mu\text{M}$  6-PN) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach rechts verlagert war und damit eine höhere Fluoreszenzintensität und damit höhere Expression bestätigte, war die gelbe Kurve (50  $\mu\text{M}$  6-PN) im Vergleich zur Kontrolle nach links verlagert. Statistisch war die Expression von MICA/B allerdings durch keine der Behandlungen signifikant verändert (siehe Abbildung 24, B).

8-PN führte bei Hep3B- und HepG2-Zellen nach einer Behandlungsdauer von 48 h zu einer konzentrationsabhängig abnehmenden Expression von MICA/B. Wenngleich eine Konzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  bei HepG2-Zellen jedoch eine, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, gestiegene Expressionsrate bewirkte (in Abbildung 24, C nicht dargestellt), sank der Anteil MICA/B-positiver Zellen bei den Konzentrationen 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  unter den der Kontrolle. Passend dazu zeigten auch die Kurven im Histogramm-*Overlay* unter C bei den Konzentrationen 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  8-PN eine Linksverschiebung und damit niedrigere Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontrolle auf. Keine der Behandlungen mit 8-PN über den Zeitraum von 48 h führte zu einer statistisch signifikanten Expressionsänderung von MICA/B.

Insgesamt lässt sich sagen, dass durch die Behandlung mit 6-PN und 8-PN keine erhöhte Expression der ULBPs auf den Tumorzelllinien zu beobachten war. Dagegen wurde MICA/B nach Behandlung mit 6-PN oder 8-PN über einen Zeitraum von 24 h mit anschließender Latenzzeit von 24 h in Medium auf Hep3B-Zellen konzentrationsabhängig und in hoher Konzentration (50  $\mu\text{M}$  6-PN) statistisch signifikant stärker exprimiert (siehe Abbildung 19, A und B). Auf HepG2-Zellen führte die Behandlung mit 6-PN über den genannten Zeitraum ebenfalls zu einer konzentrationsabhängigen und bei 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  statistisch signifikanten Steigerung der MICA/B-Expression, die Behandlung mit 8-PN blieb dagegen ohne nennenswerten Effekt (siehe Abbildung 23, A und B). Nach einem Behandlungszeitraum über 48 h zeigte sich bei Behandlung der

Hep3B-Zellen sowohl mit 6-PN als auch mit 8-PN in allen Konzentrationen eine verminderte Expression von MICA/B (siehe Abbildung 20). Bei Behandlung der HepG2-Zellen führte 50  $\mu$ M 6-PN zu einer kaum messbaren Rate MICA/B-positiver Zellen, 8-PN führte in den Konzentrationen 25  $\mu$ M und 50  $\mu$ M zu einer reduzierten Expression (siehe Abbildung 24).

## 4 Diskussion

Tumoren verlieren im Rahmen ihrer fortschreitenden Entdifferenzierung zunehmend ihre Immunogenität, unter anderem durch verminderte Expression aktivierender NKG2D-Liganden, wie MICA und MICB, welche einen großen Einfluss auf NK-Zell-vermitteltes *Killing* haben (Jinushi et al., 2005; Salih et al., 2002). HDACi, die ihre Wirkung gegenüber Tumorzellen über epigenetische Modifikationen vermitteln (Johnstone, 2002), führen zu gesteigerter MICA/B-Expression und erhöhter Immunogenität (Armeanu et al., 2005; Diermayr et al., 2008; Maeda et al., 2000; Magner et al., 2000; Schmutte et al., 2008). Auf der Suche nach kostengünstigeren und nebenwirkungsärmeren Alternativen zu den bislang als Arzneimittel zugelassenen HDACi wurden für die Prenylflavonoide 6-PN und 8-PN HDACi-Aktivität sowie antiproliferative Effekte gegenüber Tumorzellen nachgewiesen (Venturelli et al., 2018).

Wenig ist bisher aber darüber bekannt, ob und wie sie das NK-Zell-vermittelte Tumorzell-*Killing* beeinflussen. In dieser Arbeit wurde deshalb im ersten Schritt die Wirkung von 6-PN und 8-PN auf Tumorzellen sowie auf das NK-Zell-vermittelte Tumorzell-*Killing* untersucht, im zweiten Schritt wurde ermittelt, ob sich die Expression der NKG2D-Liganden MICA/B sowie der ULBPs 1–6 auf Tumorzellen nach Behandlung mit 6-PN bzw. 8-PN ändert, da ihre erhöhte Expression einen möglichen Grund eines verstärkten NK-Zell-*Killings* darstellt.

### 4.1 6-PN und 8-PN reduzieren die Tumorzellviabilität NK-Zell-unabhängig

Um den Beitrag der NK-Zellen bei der Beseitigung von Tumorzellen im Vergleich zum rein antiproliferativen Effekt der beiden Prenylflavonoide bestimmen zu können, wurde zunächst der alleinige Effekt von 6-PN und 8-PN auf die Viabilität

der Tumorzellen untersucht. Einige Studien konnten bereits konzentrationsabhängige antiproliferative Effekte bzw. viabilitätsreduzierende Eigenschaften der beiden Stoffe gegenüber verschiedenen Tumorentitäten nachweisen (Brunelli et al., 2007; Brunelli et al., 2009; Busch, Noor, et al., 2015; Delmulle et al., 2006; Venturelli et al., 2018). Zum Teil gelang dies beginnend bereits in geringen Konzentrationen ab 6,25  $\mu\text{M}$  (Busch, Noor, et al., 2015; Venturelli et al., 2018). Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich auch in dieser Arbeit mit Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms. Direkte antiproliferative Effekte waren insbesondere in den SRB-Assays nach Behandlung der Tumorzellen mit 25  $\mu\text{M}$  6-PN oder 8-PN ersichtlich (siehe Abbildungen 11 und 12). Im Vergleich zur jeweiligen Lebendkontrolle waren sie jedoch nicht in allen Versuchsdurchgängen statistisch signifikant. In diesem Zusammenhang fiel ein tendenziell stärkerer Rückgang der Viabilität von Hep3B- und HepG2-Zellen nach alleiniger Behandlung mit 6-PN oder 8-PN (ohne NK-Zell-Killing) in den Versuchsreihen auf, die mit NK-92-Zellen durchgeführt wurden, im Vergleich zu jenen, die mit NK-92 Mi-Zellen durchgeführt wurden (siehe beispielhaft Abbildung 9 gegenüber 11). Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass in den kompletten Versuchsreihen, die mit NK-92-Zellen durchgeführt werden sollten, zu deren Aktivierung IL-2 in das NK-Zell-Medium zupipettiert wurde. Interessant ist das deshalb, weil neben der oben beschriebenen Steigerung der antitumoralen Aktivität von NK-Zellen durch die Behandlung mit IL-2 in der Literatur ebenfalls eine direkte Hemmung der Viabilität und Proliferation von HepG2- und Hep3B-Zellen (Ji et al., 2018) sowie anderer Tumorzellen, z.B. von Zervixkarzinom- und Nierenzellkarzinomzellen (Amato et al., 2007; Valle-Mendiola et al., 2014), beschrieben ist. Aus diesem Grund könnte in den genannten Versuchsreihen die stärkere Viabilitätsabnahme eine Summe der Effekte der Prenylnaringenine und von IL-2 sein. Bzgl. einer direkten konzentrations- und zeitabhängigen proliferationshemmenden und zytotoxischen Wirkung der Prenylnaringenine zeigt sich ein weiterer Hinweis im teils starken Abfall MICA/B-positiver Hep3B- und HepG2-Zellen in den durchflusszytometrischen Messungen nach 48-stündiger Behandlung mit 6-PN und 8-PN (siehe Abbildungen 20 und 24). Dieser ist vermutlich nicht nur durch

eine bloße Verringerung der MICA/B-Expression auf Hep3B- und HepG2-Zellen erklärbar, sondern scheint vielmehr Ausdruck der von Venturelli et al. ebenfalls für 6-PN und 8-PN charakterisierten Fähigkeit zur Reduktion von Zellproliferation und Viabilität gegenüber SK-MEL-28- (malignes Melanom) und BLM-Zellen (metastasiertes amelanotisches Melanom) zu sein. In Versuchen mit SK-MEL-28-Zellen wurde außerdem die Induktion eines G2-Zellzyklusarrests sowie Erhöhung des prozentualen Anteils nekrotischer Zellen, ohne Hinweis auf die Induktion von Apoptose beschrieben (Venturelli et al., 2018). In Zusammenhang mit der aufgezeigten HDACi-Aktivität wurde in der genannten Arbeit eine mögliche Fähigkeit zur Induktion einer Nekroptose (programmierte Form der Nekrose) diskutiert (Venturelli et al., 2018), was mit weiteren Studien übereinstimmt, in denen bereits eine Induktion von Nekroptose durch HDACi bei malignen Zellen (MCF-7 Zellen, Brustkrebs; NB4-, Molm-13-, MV4-11- und OCI-AML3-Zelllinien, Akute myeloide Leukämie) nachgewiesen wurde (Natarajan et al., 2019; Steinwascher et al., 2015). Es existieren jedoch auch widersprüchliche Ergebnisse und es wird durch HDACi sowohl eine Steigerung der Nekroptose (PC12-Zellen, Phäochromozytom) (Bollino et al., 2015) als auch eine Verhinderung bei differenzierten und nicht als maligne einzustufenden Zelllinien (L-929, murine Bindegewebszellen) beschrieben (Wang et al., 2013), sodass die genauen Mechanismen und Wirkungsweisen der HDACi nicht endgültig geklärt sind. Ein weiterer in der Literatur für 6-PN und 8-PN diskutierter Mechanismus ist die Induktion von Autophagie (Delmulle et al., 2008), welche ebenfalls bereits für den bekannten HDACi SAHA vorbeschrieben ist und häufig begleitend zur Nekroptose bei Tumorzellen zu beobachten ist (Natarajan et al., 2019).

#### 4.2 Die Vorbehandlung der Tumorzellen mit 6-PN und 8-PN verbessert das NK-Zell-vermittelte Tumorzell-*Killing*

Warum Therapieverfahren mit NK-Zellen eine wirklich interessante Alternative in der Tumorbehandlung darstellen, wird auch aus den Ergebnissen dieser Arbeit deutlich. Bereits die unbehandelten NK-Zellen führten abhängig vom E:T-Verhältnis *in vitro* zu einer Viabilitätsreduktion unbehandelter Tumorzellen von 40–60 % (siehe Abbildungen 9, 13 und 15).

Ziel dieser Arbeit war es im ersten Schritt herauszufinden, ob 6-PN und 8-PN das NK-Zell-vermittelte Tumorzell-*Killing* beeinflussen.

Nach Vorbehandlung der Tumorzellen zeigte sich hierbei sowohl für 6-PN als auch für 8-PN gegenüber Hep3B- und HepG2-Zellen eine konzentrationsabhängige Steigerung des NK-Zell-vermittelten *Killings*. Insgesamt ergänzten sich die CTB- und SRB-Assays hinsichtlich der Ergebnisse. Die Reduktion der Zellviabilität war aber bei den SRB- im Vergleich zu den CTB-Assays tendenziell stärker ausgeprägt und die Ergebnisse häufiger statistisch signifikant (für Hep3B siehe beispielhaft Abbildung 9, A vs. C; für HepG2 siehe Abbildung 15, A vs. C und B vs. D). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass während des zunächst durchgeführten CTB-Assays sich bereits im Absterben befindende Zellen, die im Anschluss bei der Durchführung des SRB-Assays in mehreren Waschschrritten entfernt worden sein können, den Farbstoff Resazurin noch umgesetzt haben und damit eine höhere Zellviabilität beim CTB-Assay suggerieren. Eine weitere Möglichkeit ist, dass absterbende Zellen durch einen vorübergehend gesteigerten Metabolismus vermehrt Resazurin umsetzen. Solch eine präfinale Steigerung des Stoffwechsels in Tumorzellen ist allerdings bisher in der Literatur nicht explizit beschrieben, sodass dies spekulativ bleibt.

Im zweiten Schritt wurde untersucht, welche Ursache das verstärkte *Killing* nach Vorbehandlung der Hep3B- und HepG2-Zellen haben könnte. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Hep3B- und HepG2-Zellen mit 6-PN und 8-PN (siehe Abbildungen 19 und 20 sowie 23 und 24) zu einer Expressionssteigerung von MICA/B führt, wohingegen sich die Expressionsrate der ULBPs nicht wesentlich ändert.

Dies stimmt unter Berücksichtigung der bereits in der Literatur beschriebenen HDACi-Aktivität von 6-PN und 8-PN (Venturelli et al., 2018) mit einer durch Behandlung mit bekannten HDACi, wie z.B. VPA, beschriebenen Expressionsinduktion der NKG2D-Liganden MICA/B überein (Armeanu et al., 2005; Diermayr et al., 2008; Schmutte et al., 2008). Auch bei Armeanu et al. konnte neben der verstärkten Expression von MICA/B keine vermehrte Expression der ULBPs nachgewiesen werden (Armeanu et al., 2005).



Die verstärkte Expression von MICA/B, als Liganden des stark aktivierenden NK-Zell-Rezeptors NKG2D, könnte demnach einer der wesentlichen Gründe für das gesteigerte *Killing* der Hep3B- / HepG2-Zellen durch die unbehandelten NK-Zellen sein.

Warum die Behandlung mit 8-PN vorwiegend bei Hep3B- und in nur deutlich geringerem Ausmaß bei HepG2-Zellen zu einem Anstieg der MICA/B-Expression führte, ist aber unklar.

Eine mögliche Ursache könnte das unterschiedliche Differenzierungsstadium der beiden Zelllinien sein. Den HepG2-Zellen wird in der Literatur eine hepatozytenähnlichere Differenzierung im Vergleich zu den etwas stärker entdifferenzierten bzw. fibroblastenähnlicheren Hep3B-Zellen zugeschrieben (Slany et al., 2010). Die Zelllinien unterscheiden sich darüber hinaus in ihrer Genexpression und der Reaktion auf unterschiedliche Wirkstoffe oder auch NK-Zellen. So wurde beispielsweise für Hep3B-Zellen unter Inkubation mit NK-Zellen eine Caspase-3-Aktivierung sowie Apoptose, also eine stärkere Anfälligkeit für NK-Zell-vermitteltes *Killing*, festgestellt, während dies für HepG2-Zellen nicht beobachtet wurde (H. R. Kim et al., 2004; Qiu et al., 2015). Dies wäre ein möglicher Erklärungsansatz, der ohne Kenntnis der ursächlichen Stoffwechselwege allerdings hypothetisch bleibt. Dagegen spricht jedoch, dass die Behandlung mit 6-PN über denselben Zeitraum auf HepG2-Zellen die MICA/B-Expression steigerte. Zum einen kann dies als Ausdruck einer stärkeren Wirkung von 6-PN im Vergleich zu 8-PN interpretiert werden. Zum anderen führte auch 8-PN nach 48 h zu einer Steigerung der MICA/B-Expression (siehe Abbildung 24), weshalb eine noch höhere Wirksamkeit zu einem anderen Messzeitpunkt nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann.

In Zusammenschau mit der deutlichen Abnahme MICA/B-exprimierender HepG2-Zellen nach 48 h Behandlung mit 6-PN oder 8-PN, kann die stärkere MICA/B-Expression als Ausdruck eines durch die beiden Stoffe hervorgerufenen, starken Zellstress interpretiert werden und die Abnahme der Zellzahl schließlich als Ausdruck der oben genannten direkten zytotoxischen bzw. proliferationshemmenden Wirkungen (Venturelli et al., 2018).

Von besonderem Interesse, jedoch bisher ungeklärt, ist aber, durch welche Mechanismen 6-PN und 8-PN zu einer verstärkten MICA/B-Expression auf Tumorzellen führen. Für medikamentöse HDACi konnten erste Erklärungsansätze gefunden werden. Beispielsweise bewirkte SAHA über unterschiedliche Mechanismen eine gesteigerte MICA/B-Expression. Zum einen führte die Acetylierung von Histonen, die mit der MICA-Promotorregion assoziiert sind, zu einer gesteigerten Transkription der entsprechenden Genabschnitte. Zum anderen verminderte SAHA durch Unterdrückung der Host Gene *minichromosome maintenance complex component 7* (MCM7) und *micro RNA* (miR)-17-92 Cluster die Transkription von miRNAs (z.B. miR-17, miR-18a, miR-20a, miR-93 und miR-106b), die zu einer Suppression der MICA/B-Expression führen. MCM7 wird dabei direkt durch Deacetylierung von Histonen gehemmt, das miR-17-92 Cluster wiederum durch Dephosphorylierung von Transkriptionsfaktor STAT3, welcher normalerweise zur Aktivierung dieses Clusters führt (Yang et al., 2015). Auch bei Behandlung mit Resveratrol, einem Polyphenol mit HDACi-Aktivität, konnte eine gesteigerte MICA/B-Expression bei Brustkrebszellen gezeigt werden. Als zugrunde liegender Mechanismus konnte eine Hemmung der Expression des Transkriptionsfaktors c-Myc und dadurch eine Inhibierung der Transkription des miR-17-92 Clusters festgestellt werden, wodurch auch miR-17, die direkt an die 3'-untranslatierten Regionen der mRNA von MICA und MICB bindet und deren Expression hemmt, herunterreguliert wurde (Pan et al., 2017). VPA, als weiterer HDACi, führte über eine Suppression von miR-889, welche die Expression von MICB verhindert, zu einer gesteigerten MICB-Expression und verstärktem NK-Zell vermitteltem *Killing* von Tumorzellen (Xie et al., 2018).

Diese Beispiele zeigen mögliche Mechanismen der MICA/B-expressionssteigernden Wirkung der beiden Prenylflavonoide, deren genaue Aufklärung allerdings weitere Untersuchungen notwendig macht. Unklar ist auch, ob die HDACi-Aktivität der entscheidende Faktor für die Effekte der beiden Prenylflavonoide ist. Unabhängig davon demonstrieren oben beschriebene HDACi-Aktivitäten der unterschiedlichen Stoffe aber, wie vielfältig und komplex die dysregulierten Stoffwechselwege in Tumorzellen und unterschiedlichen

Tumorentitäten sein können und wie variabel daher die möglichen Angriffspunkte und Wirkweisen unterschiedlicher HDACi sind.

### 4.3 Alleinige Vorbehandlung der NK-Zellen mit den Prenylflavonoiden führt zu keinem vermehrten Tumorzell-*Killing*

Bisherige Arbeiten mit 6- und 8-PN untersuchten insbesondere deren Wirkung auf Tumorzellen. Wenig ist deshalb bekannt über ihre Wirkung gegenüber NK-Zellen. In dieser Arbeit wurden deshalb gezielt Versuche durchgeführt, die das NK-Zell-vermittelte Tumorzell-*Killing* sowohl unbehandelter als auch behandelter Hep3B- / HepG2-Zellen nach Vorbehandlung der NK-Zellen mit jeweils 6-PN oder 8-PN untersuchten.

Betrachtet man zunächst das *Killing* behandelter Tumorzellen nach Vorbehandlung der NK-Zellen im Vergleich zu unbehandelten NK-Zellen, zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse. Es ließ sich feststellen, dass eine Vorbehandlung der NK-Zellen zu teilweise verbessertem *Killing* führt. Dies geschah insbesondere bei gesteigerter MICA/B-Expression auf Tumorzellen nach Behandlung mit 6-PN oder 8-PN (für 6-PN siehe Abbildungen 9–12, 15, 16; für 8-PN siehe Abbildungen 11, 12). Die Verschlechterung des NK-Zell-vermittelten *Killings* durch die NK-Zell-Vorbehandlung bei nicht bzw. nicht signifikant gesteigerter MICA/B-Expression (8-PN: Hep3B- + NK-92 Mi-Zellen, HepG2- + NK-92- oder NK-92 Mi-Zellen; siehe Abbildungen 9, 10, 13–16) sowie die teilweise trotz gesteigerter MICA/B-Expression unter 6-PN-Behandlung ausbleibende Verbesserung oder sogar Verschlechterung des *Killings* (siehe Abbildungen 13, 14), weisen jedoch auf weitere, andere Wirkmechanismen der beiden Prenylflavonoide gegenüber NK-Zellen hin.

Dies wird auch deutlich, wenn man weiterhin die Ergebnisse der alleinigen Vorbehandlung der NK-Zellen mit 6-PN oder 8-PN gegenüber unbehandelten Hep3B- / HepG2-Zellen betrachtet, welche überwiegend keinen positiven Effekt auf das NK-Zell-vermittelte *Killing* hat. Vielmehr zeigte sich in den meisten Versuchsreihen ein im Vergleich zur Kontrolle negativer Effekt auf das *Killing* (für 6-PN siehe Abbildungen 11–16; für 8-PN Abbildungen 9–16), das insbesondere bei 8-PN konzentrationsabhängig abnahm (siehe Abbildungen 11–16).

Die alleinige Vorbehandlung der NK-Zellen scheint also einen negativen Effekt auf das *Killing* der Tumorzellen, wenn unbehandelt, zu haben. Es bleibt jedoch unklar, welche Mechanismen dem zugrunde liegen, inwieweit eine zusätzliche Vorbehandlung der Tumorzellen diesen negativen Effekt relativiert und ob es sogar zu einem synergistisch-positiven Effekt auf das *Killing* kommen kann.

Außerdem bleibt unklar, ob niedrigere Konzentrationen 6-PN und 8-PN einen stärkeren Effekt auf das NK-Zell-vermittelte *Killing* haben. Einen Hinweis hierfür liefert die Beobachtung eines schwach positiven Effektes der Behandlung von NK-92 Mi-Zellen mit 12,5  $\mu\text{M}$  6-PN bzw. 8-PN gegenüber HepG2-Zellen (12,5  $\mu\text{M}$  6-PN und 8-PN bei einem E:T-Verhältnis von 1,25 : 1 – Abbildung 13; 12,5  $\mu\text{M}$  6-PN bei einem E:T-Verhältnis von 0,625 : 1 – Abbildung 14), wohingegen die jeweils höhere Konzentration negative Effekte auf das *Killing* aufwies.

Legt man diesen Ergebnissen Beobachtungen aus der Literatur über ein konzentrationsabhängiges Wirkspektrum zugrunde, die für Resveratrol, einen weiteren Naturstoff mit HDACi-Aktivität (Venturelli et al., 2013) aus der Gruppe der Polyphenole, gemacht wurden (Falchetti et al., 2001; Q. Li et al., 2014), könnte man daraus andererseits einen ähnlichen biphasischen Effekt für die beiden Prenylnaringenine ableiten, der gleichzeitig eine Erklärung für den negativen Effekt auf das NK-Zell-vermittelte *Killing* in höheren Konzentrationen liefert. Resveratrol erhöhte in sehr niedrigen Konzentrationen (1,56  $\mu\text{M}$ –3,13  $\mu\text{M}$ ) die zytotoxische Kapazität von NK-Zellen durch Hochregulierung von NKG2D sowie IFN- $\gamma$ . In höheren Konzentrationen (50  $\mu\text{M}$ ) dagegen wirkte es inhibierend auf die NK-Zell-Viabilität bzw. führte zur Apoptose (Q. Li et al., 2014). Bereits 2001 wiesen Falchetti et al. diesen biphasischen Effekt für Resveratrol nach, wobei sie von einer „dosisabhängigen Inhibition der lytischen Aktivität“ von NK-Zellen in einem Konzentrationsbereich von 21,92–87,68  $\mu\text{M}$  berichteten (Falchetti et al., 2001). Die Arbeiten von Falchetti et al. 2001 sowie von Li et al. 2014 geben außerdem eine mögliche Erklärung für die in dieser Arbeit gemessenen negativen Effekte einer Vorbehandlung der NK-Zellen auf das Tumorzell-*Killing*. Eine Verminderung der NK-Zell-Viabilität bzw. eine dosisabhängige Apoptose-Induktion bei NK-Zellen durch 6-PN und 8-PN wären ein möglicher Grund für die verminderten *Killing*-Eigenschaften der NK-Zellen.

Solch ein Effekt wurde für die bekannten HDACi Trichostatin A (TSA), VPA und Natrium-Butyrat (NaB) beobachtet, die in einer Arbeit von Rossi et al. in geringem Maß zu einer Apoptose der NK-Zellen (Steigerung des Anteils apoptotischer Zellen nach 24 h TSA-Behandlung um ca. 30 %, nach 24 h VPA- bzw. NaB-Behandlung um ca. 10 % über Kontrollniveau) führten (Rossi et al., 2012). Viel bedeutender waren in dieser Arbeit jedoch die Beobachtungen, dass die HDACi zu einer reduzierten Expression der aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren NKp46 und NKG2D bei ruhenden sowie NKp44, NKp46 und NKG2D bei IL-aktivierten (IL-12, IL-15 und IL-18) NK-Zellen führten. Weiterhin kam es zu einer deutlich reduzierten IFN- $\gamma$ -Freisetzung aus NK-Zellen, welches zusätzlich eine Reifung von DCs sowie eine weitere reziproke NK-Zell-Aktivierung fördert. In Zusammenhang gebracht wurden diese reduzierten NK-Zell-Effektorfunktionen mit einer HDACi-abhängigen Hemmung vom *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B) durch Hemmung der Mobilisation der Untereinheit p50. Welche genauen Stoffwechselwege involviert sein könnten, blieb jedoch unbeantwortet (Rossi et al., 2012). Vergleichend kann man die Ergebnisse von Ogbomo et al. hinzuziehen, die in ihren Versuchen ebenfalls die Wirkung der bekannten HDACi SAHA und VPA auf das NK-Zell-vermittelte *Killing* untersuchten (Ogbomo et al., 2007). Für diese wurden positive Effekte nach Behandlung der Tumorzellen und eine eher negative Wirkung durch Vorbehandlung der NK-Zellen beschrieben, was sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit deckt. In höheren Konzentrationen zeigte sich eine toxische Wirkung der HDACi gegenüber NK-Zellen. Die Studie von Ogbomo zeigte weiterhin aber, dass sich die Zytotoxizität IL-2-aktivierter NK-Zellen nach Behandlung mit nicht-toxischen Konzentrationen reduzierte und führte sie ebenfalls auf eine Inhibition von NF- $\kappa$ B mit reduzierter Expression aktivierender Rezeptoren, hauptsächlich NKp30 und NKp46, zurück, ohne dass die intrazelluläre Perforin- oder Granzym B-Expression davon beeinträchtigt war (Ogbomo et al., 2007). Auch die Expression von NKG2D-Rezeptoren auf NK-Zellen sank, wenn auch nicht signifikant, durch die Behandlung mit den HDACi (Ogbomo et al., 2007). Es gibt weitere Studien, die eine Hemmung von NF- $\kappa$ B als möglichen Mechanismus vermuten lassen. Kortikosteroide wie z.B. Methylprednisolon, welche hemmend

auf NF- $\kappa$ B wirken (Barnes, 2006), führen ebenfalls zu einer verminderten Expression aktivierender Rezeptoren auf NK-Zellen (Vitale et al., 2004). Für sie konnte als weiterer Signalweg, der zu einer gehemmten Perforin-Freisetzung führt, wenn diese über die Rezeptoren NKp46, NKG2D oder 2B4 vermittelt wird, eine Phosphorylierung von ERK1/2 gezeigt werden (Chiossone et al., 2007). Auch bei anderen medikamentösen Behandlungen oder im Rahmen genetischer Erkrankungen, in deren Folge es zu einer gestörten NF- $\kappa$ B-Aktivierung kommt, wurde eine verminderte NK-Zell-Zytotoxizität festgestellt (K. Y. Kim et al., 2006; Orange et al., 2002). Ein weiterer Signalweg, über den es zu einer Hemmung der NK-Zell-Zytotoxizität kam, wurde durch Ni et al. herausgearbeitet. In ihrer Arbeit beschreiben die Autoren eine durch VPA induzierte selektive Inhibierung der Phosphorylierung von Tyrosin705 von STAT3 gefolgt von einer Hemmung von HDAC3 als ursächlich für eine Inhibition der NKG2D-Expression (Ni et al., 2017; Zhu et al., 2014). Interessanterweise führte Entinostat, ein selektiverer HDACi, welcher die STAT3-Phosphorylierung nicht beeinflusst und vorwiegend HDAC1, kaum HDAC3 und nur marginal HDAC8 hemmt, gegenteilig zu einer gesteigerten NKG2D-Expression (Ni et al., 2017; Zhu et al., 2015; Zhu et al., 2014).

Im Kontext mit den Ergebnissen dieser Arbeit liegt die Vermutung nahe, dass auch 6-PN und 8-PN, als pan-HDACi (Venturelli et al., 2018) über noch unbekannte Stoffwechselwege hemmend auf die NKG2D-Expression sowie auf die Freisetzung für die Zytotoxizität wichtiger Stoffe (Interferone, Granzyme, Perforin) wirken und somit die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität senken. Auch ein viabilitätsreduzierender Einfluss gegenüber NK-Zellen wäre als Ursache der erzielten Ergebnisse dieser Arbeit denkbar. Letztgenannter möglicher zytotoxischer Effekt von 6-PN oder 8-PN auf NK-Zellen wurde in Vorversuchen der AG Venturelli an humanen Spender-NK-Zellen und NK-92 Mi-Zellen jedoch erst ab Konzentrationen von 100  $\mu$ M 6-PN bzw. 8-PN beobachtet (AG Venturelli, persönliche Mitteilung) und kann somit nicht als Erklärung der Ergebnisse dieser Arbeit dienen. Bzgl. einer möglichen Hemmung der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität durch 6-PN oder 8-PN zeigen noch unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Venturelli zunächst widersprüchlich eine stärkere Expression zytotoxischer Proteine und damit eine gesteigerte zytotoxische Kapazität von NK-

Zellen als Reaktion auf die Behandlung mit 6-PN bzw. 8-PN, weshalb zunächst ein gesteigertes NK-Zell-vermitteltes *Killing* gegenüber unbehandelten Tumorzellen vermutet wurde. Die erhöhte Expression zytotoxischer Proteine allein bedingt jedoch nicht zwingend auch deren Freisetzung. Eine mögliche Inhibition der NKG2D-Expression durch 6-PN und 8-PN könnte die Freisetzung der zytotoxischen Proteine gegenüber unbehandelten Hep3B- / HepG2-Zellen ohne gesteigerte MICA/B-Expression bereits so stark reduziert haben, dass es zu einem insgesamt geringeren *Killing* im Vergleich zur Kontrolle aus unbehandelten NK-Zellen und unbehandelten Hep3B- / HepG2-Zellen kam. Ein nicht vollständiger Expressionsverlust von NKG2D-Rezeptoren nach Vorbehandlung bei gleichzeitig gesteigerter MICA/B-Expression auf Hep3B- / HepG2-Zellen durch deren Vorbehandlung könnte jedoch eine Aktivierung der NK-Zellen bedingen. Somit könnte eine durch die Prenylflavonoide gesteigerte zytotoxische Kapazität der NK-Zellen ebenso auch als mögliche Erklärung für den ähnlichen und zum Teil besseren *Killing*-Effekt bei kombinierter Vorbehandlung (vorbehandelte NK-Zellen gegenüber vorbehandelten Hep3B- / HepG2-Zellen) im Vergleich zum *Killing* durch unbehandelte NK-Zellen dienen. Aufgrund der bereits durch Venturelli et al. festgestellten HDACi-Aktivität der Prenylnaringenine 6-PN und 8-PN (Venturelli et al., 2018), den Beobachtungen aus oben genannten Studien mit anderen bekannten HDACi (Ni et al., 2017; Ogbomo et al., 2007; Rossi et al., 2012) und unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit, ergeben sich folgende weiteren Fragen: (i.) Wodurch ist die verminderte Zytotoxizität der NK-Zellen durch die Behandlung mit 6-PN und 8-PN in den hier eingesetzten Konzentrationen bedingt? (ii.) Senken 6-PN und 8-PN in den hier eingesetzten Konzentrationen die Expression aktivierender Rezeptoren auf NK-Zellen? (iii.) Gibt es für die beiden Prenylflavonoide einen ähnlichen biphasischen Effekt gegenüber NK-Zellen wie er für Resveratrol beobachtet wurde? (iv.) Über welche Signalwege wird die Wirkung vermittelt und (v.) spielen ebenfalls eine Hemmung von NF- $\kappa$ B oder HDAC3 und STAT3 eine Rolle? In Anlehnung an diese Arbeit sind deshalb weitere Untersuchungen nötig, um ein umfassenderes Bild der Effekte von 6-PN und 8-PN auf NK-Zellen und

deren Zytotoxizität zu erlangen und damit ihr gesamtes Wirkspektrum zu erfassen.

### 4.4 6-PN ist in gleicher Dosierung insgesamt potenter als 8-PN

Bereits aus verschiedenen Arbeiten ist ersichtlich, dass die beiden Prenylflavonoide, obwohl sie sich lediglich in der Position ihrer Prenylgruppe unterscheiden, unterschiedliche Wirkungen aufweisen. Während 8-PN beispielsweise eines der stärksten Phytoöstrogene ist, besitzt 6-PN kaum eine östrogene Wirkung (Milligan et al., 1999; Milligan et al., 2000; Zierau et al., 2003). Gemeinsam ist Ihnen jedoch eine HDACi-Aktivität sowie eine antiproliferative Wirkung gegenüber Tumorzellen *in vitro* (Venturelli et al., 2018) bei gleichzeitig guter Verträglichkeit ohne schwerwiegende Nebenwirkungen *in vivo* (Calvo-Castro et al., 2018). Für die praktische Anwendung spielen neben der Verträglichkeit außerdem insbesondere die orale Bioverfügbarkeit und die Wirksamkeit eine große Rolle. In einer ersten Humanstudie konnte gezeigt werden, dass 8-PN nach oraler Gabe bis zu fünfmal höhere Plasmaspiegel erreicht als 6-PN ( $2833,7 \pm 3071,8$  nmol/L für 8-PN im Vergleich zu  $542,7 \pm 295,7$  nmol/L für 6-PN nach oraler Einnahme von jeweils 500 mg; Mittelwert  $\pm$  SD) (Calvo-Castro et al., 2018). Interessant ist deshalb die Frage, inwieweit sich die Prenylflavonoide auch in ihrer Wirksamkeit unterscheiden. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden in dieser Arbeit daher alle Versuche mit gleichen Konzentrationen von 6-PN und 8-PN durchgeführt. Die Behandlung mit 6-PN zeigte dabei in den Viabilitäts-Assays einen stärkeren Effekt auf die Reduktion der Tumorzell-Viabilität durch NK-Zellen als 8-PN. Dieser war gegenüber Hep3B-Zellen (siehe beispielhaft Abbildung 11) stärker ausgeprägt als gegenüber HepG2-Zellen (siehe beispielhaft Abbildung 15). Auch bezüglich der Induktion einer erhöhten MICA/B-Expression bei Hep3B- und HepG2-Zellen zeigte sich 6-PN, insbesondere nach einer Behandlungsdauer von 24 h und anschließend 24 h Inkubation in Medium, potenter als 8-PN (siehe Abbildungen 19 und 23). Aufgrund der stark aktivierenden Wirkung von MICA/B gegenüber NK-Zellen über die Bindung an den NKG2D-Rezeptor, lässt sich die durch 6-PN



gesteigerte Expression als wichtiger Grund für das ausgeprägtere Tumorzell-*Killing* durch die NK-Zellen betrachten.

Bezüglich eines Unterschieds in der direkten, NK-Zell-unabhängigen, antiproliferativen bzw. zytotoxischen Wirkung zwischen 6-PN oder 8-PN gegenüber Tumorzellen, wie oben beschrieben, ließen sich nach erneuter Prüfung der Ergebnisse der CTB- und SRB-Assays in den eingesetzten Konzentrationen 12,5  $\mu\text{M}$  oder 25  $\mu\text{M}$  keine Aussagen treffen (siehe Abbildungen 9–16, dunkel- und hellgraue Balken), die Wirkung war also vergleichbar. Jedoch zeigten die Behandlungen mit jeweils 25  $\mu\text{M}$  größere Effekte als mit 12,5  $\mu\text{M}$ . Der starke Rückgang der MICA/B-Expression nach einem längeren Behandlungszeitraum über 48 h und in höheren Konzentrationen von 6-PN oder 8-PN (50  $\mu\text{M}$ , siehe Abbildungen 20 und 24) ließe sich jedoch durch eine direkte zytotoxische Wirkung gegenüber Hep3B- / HepG2-Zellen erklären. Dieser war für nach Behandlung mit 6-PN stärker ausgeprägt als mit 8-PN.

Übereinstimmen würde dies mit Versuchen von Busch et al., die bei Zellen des Prostata- und Nierenzellkarzinoms für 6-PN eine stärkere wachstumshemmende Wirkung als für 8-PN zeigten (Busch, Noor, et al., 2015). Versuche von Venturelli et al. mit Melanom-Zelllinien lassen ebenfalls eine stärker wachstumshemmende Wirkung von 6-PN vermuten, wobei die Messergebnisse bei den verwendeten Konzentrationen von 12,5  $\mu\text{M}$  und 25  $\mu\text{M}$  bei einer Behandlungsdauer von 24 h ebenfalls keine eindeutige Aussage diesbezüglich zuließen (Venturelli et al., 2018). Jedoch führte auch in der genannten Arbeit ein längerer Behandlungszeitraum und eine höhere Behandlungskonzentration ( $\geq 50 \mu\text{M}$ ) zu einer stärkeren Inhibition des Tumorzellwachstums, welche nach Behandlung mit 6-PN stärker ausgeprägt war. Insgesamt kann man daher von einer stärkeren antiproliferativen Wirkung von 6-PN ausgehen, das außerdem bei gleicher Konzentration zytotoxischer wirkt als 8-PN.

Neben den jeweiligen antiproliferativen Effekten gegenüber Hep3B- / HepG2-Zellen, ist weiterhin unklar, ob sich 6-PN und 8-PN auch in ihrer Wirkung gegenüber NK-Zellen unterscheiden. In den Ergebnissen der Viabilitäts-Assays zeigte sich bei isolierter Vorbehandlung der NK-Zellen ein im Vergleich zur Kontrolle unerheblicher oder sogar negativer Effekt auf die Reduktion der

Tumorzell-Viabilität (siehe beispielhaft Abbildung 14). Dieser negative Effekt war für 8-PN stärker ausgeprägt als für 6-PN. Bezüglich der Induktion zugrundeliegender Mechanismen oder beeinflusster Stoffwechselwege, die zu einem negativen Effekt auf das NK-Zell-vermittelte *Killing* führen (z.B. Inhibition der NKG2D-Expression oder eine zytotoxische Wirkung gegenüber NK-Zellen), kann 8-PN, entgegen der sonst stärkeren Wirkung von 6-PN, als potenter betrachtet werden. Deshalb und wegen der unterschiedlichen oralen Bioverfügbarkeit werden mit Blick auf die potenzielle Bedeutung der beiden Prenylflavonoide für die antitumorale Therapie weitere Untersuchungen benötigt, um ein möglichst genaues Bild ihrer Wirkung gegenüber NK-Zellen, Tumorzellen und deren Interaktion zu erhalten.

### 4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

6-PN und 8-PN zeigen vielversprechende Eigenschaften für einen potenziellen Einsatz im Rahmen von NK-Zell-Therapien sowie auch im Hinblick auf die Stärkung des Immunsystems im Kampf gegen Tumorzellen und die Steigerung der Immunogenität von Tumoren.

Eine durch die beiden Prenylflavonoide verstärkte Expression von Stressliganden auf der Oberfläche von Tumorzellen fördert das NK-Zell-vermittelte *Killing*. Wie es zur gesteigerten Expression von MICA/B kommt und welche epigenetischen Prozesse dabei eine Rolle spielen, ist Gegenstand zukünftiger Arbeiten. Dabei wäre mit Blick auf einen klinischen Einsatz unter anderem eine Erweiterung des untersuchten Konzentrationsbereiches auf sehr kleine Konzentrationen (z.B. 0,5  $\mu\text{M}$  - entsprechend der erwarteten oralen Bioverfügbarkeit von 6-PN) sinnvoll.

Aber auch bezüglich der Wirkung der Prenylflavonoide gegenüber NK-Zellen ergeben sich weitere Fragen.

Der festgestellte negative Effekt einer NK-Zell-Vorbehandlung auf das *Killing* un behandelter Tumorzellen wirkt zunächst widersprüchlich zu noch unveröffentlichten Daten der Arbeitsgruppe Venturelli, die eine durch 6-PN und 8-PN gesteigerte intrazelluläre Expression zytotoxischer Proteine

(Expressionsprofil je nach Prenylflavonoid und Effektorzelllinie etwas unterschiedlich) feststellen.

Es sind deshalb weitere Untersuchungen nötig, um einen möglicherweise hemmenden Einfluss der beiden Prenylflavonoide auf die NK-Zell-Aktivierung zu untersuchen.

Dafür sind außerdem Versuche mit primären humanen NK-Zellen aus gesunden Individuen erforderlich, um einen durch den malignen Ursprung der verwendeten NK-Zelllinien entstandenen Effekt auszuschließen. Schließlich sollte zunächst ein genaues Bild über das Wirkspektrum der beiden Prenylflavonoide gegenüber NK-Zellen gewonnen werden. Um einen, wie für Resveratrol beschriebenen, biphasischen Effektverlauf gegenüber NK-Zellen mit positiver Wirkung in niedrigeren und negativer Wirkung in höheren Konzentrationen, erfassen zu können, scheint auch hier zunächst eine Erweiterung des untersuchten Konzentrationsspektrums sinnvoll. Um die Auswirkungen der Behandlung mit den beiden Prenylflavonoiden auf die NK- / Tumorzell-Interaktion besser verstehen zu können, könnten umfangreiche durchflusszytometrische Untersuchungen mit Blick auf die Expression aktivierender, aber auch inhibierender Rezeptoren auf der Oberfläche von NK-Zellen einen wichtigen Beitrag leisten. Unter Berücksichtigung der bereits für andere HDACi gezeigten Expressionsreduktion von NKG2D auf NK-Zellen über Hemmung von STAT3 und HDAC3 wäre es interessant, ob 6-PN und 8-PN ebenfalls eine Reduktion der NKG2D-Expression auf NK-Zellen bewirken. Im sehr komplexen und noch inhomogen wirkenden Feld der unterschiedlichen HDACi wäre bei einer solchen Wirkung außerdem interessant, über welche zellulären Prozesse 6-PN und 8-PN eine Expressionsänderung von Oberflächenrezeptoren auf NK-Zellen bewirken und welche HDACs dabei gegebenenfalls gehemmt werden. Gleichzeitig könnte eine NF $\kappa$ B-Inhibition und damit ein weiterer möglicher Mechanismus für eine verminderte NK-Zell-Zytotoxizität durch Reduktion aktivierender Rezeptoren abgeklärt werden. Auch weil eine Hemmung von NK-Zellen aufgrund ihrer für die physiologische Tumorprävention wichtigen regulatorischen und zytotoxischen Funktionen negative Konsequenzen für ihre klinische Langzeitanwendung *in vivo* hätte, ist eine genaue Kenntnis über die Wirkweise von 6-PN und 8-PN

gegenüber diesen von großer Wichtigkeit. Studien zeigen bereits neben der Wirksamkeit gegenüber malignen Zellen eine sehr gute Verträglichkeit nach oraler Aufnahme. Um auch die Unbedenklichkeit in der Langzeitanwendung zu ermitteln, sind ergänzende Arbeiten zum Ausschluss negativer Effekte, insbesondere gegenüber NK-Zellen, wichtig. Damit könnten die jetzt bereits vielversprechenden Wirkstoffkandidaten eines Tages tatsächlich Anwendung in einem kombinierten klinischen Einsatz finden.

## 5 Zusammenfassung

Neue Therapieansätze wie beispielsweise die Stärkung des Immunsystems, die Steigerung der Immunogenität von Tumorzellen oder der Einsatz rekombinanter humaner natürlicher Killerzellen (NK-Zellen), gewinnen in der Krebstherapie zunehmend an Bedeutung. Vielversprechende Vordaten der Arbeitsgruppe Venturelli für die Prenylflavonoide 6-Prenylnaringenin (6-PN) und 8-Prenylnaringenin (8-PN) zeigen ausgeprägte antiproliferative Effekte gegenüber malignen Zelllinien sowie eine Hemmung von Histondeacetylasen. In weiteren Experimenten der Arbeitsgruppe konnte außerdem gezeigt werden, dass 6-PN und 8-PN die intrazelluläre Expression zytotoxischer Proteine in NK-Zellen erhöhen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher zu untersuchen, ob und in welcher Weise die beiden Prenylflavonoide das NK-Zell-vermittelte *Killing* von Tumorzellen beeinflussen. Mit Viabilitäts-Assays konnte gezeigt werden, dass vor allem eine **Vorbehandlung der Tumorzellen** (12,5 und 25  $\mu$ M 6-PN bzw. 8-PN) einen positiven Effekt auf das *Killing* hat. Als mögliche Ursache konnte durchflusszytometrisch eine konzentrationsabhängige Steigerung der Expression der NK-Zell-aktivierenden „Stressliganden“ MICA/B (*MHC class I chain-related protein A* und *B*) auf der Oberfläche von Hep3B- und HepG2-Zellen durch 6-PN bzw. 8-PN (12,5, 25 und 50  $\mu$ M) nachgewiesen werden. 6-PN zeigte dabei bezüglich der MICA/B-Expression und dem NK-Zell-vermittelten *Killing* der Tumorzellen deutlichere Effekte als 8-PN. Bei beiden Substanzen kam es zeit- und konzentrationsabhängig auch zu einer direkten Toxizität gegenüber den Tumorzellen.

Eine **Vorbehandlung der NK-Zellen zusätzlich zur Vorbehandlung der Tumorzellen** (12,5 und 25  $\mu\text{M}$  6-PN bzw. 8-PN) zeigte heterogene Ergebnisse, bei denen 6-PN tendenziell einen günstigeren Effekt auf das NK-Zell-vermittelte *Killing* der Tumorzellen ausübte als 8-PN. Dieser Trend bestätigte sich jedoch nicht für alle Einsatzkonzentrationen.

Die **alleinige Vorbehandlung der NK-Zellen** (12,5 und 25  $\mu\text{M}$  6-PN bzw. 8-PN) hatte auf das *Killing* unbehandelter Tumorzellen mehrheitlich sogar einen negativen Effekt. Dieser war bei 8-PN stärker ausgeprägt als bei 6-PN. Trotz des scheinbaren Widerspruchs, decken sich diese Ergebnisse mit Beobachtungen bei anderen Histondeacetylase-Inhibitoren und unterstreichen, dass die beiden Prenylflavonoide in den evaluierten Konzentrationen über bisher unbekannte Signalwege eine hemmende Wirkung gegenüber NK-Zellen auszuüben scheinen.

Insgesamt konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass 6-PN und 8-PN zusätzlich zu ihren direkten zytotoxischen Effekten gegenüber Tumorzellen auch das NK-Zell-vermittelte *Killing* verbessern, indem sie die MICA/B-Expression auf der Oberfläche der Tumorzellen erhöhen und damit deren Erkennbarkeit als Zielzellen steigern. Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit stellen die beiden Prenylflavonoide somit vielversprechende Wirkstoffkandidaten zur weiteren Charakterisierung für einen therapeutischen Einsatz beim hepatozellulären Karzinom dar, auch wenn, mit Blick auf die hemmenden Effekte einer alleinigen NK-Zell-Behandlung, weitere Untersuchungen notwendig sind, um optimale Einsatzkonzentrationen und -zeitpunkte für einen potenziellen klinischen Einsatz zu erhalten.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., & Knowles, B. B. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, *282*(5739), 615-616. doi:10.1038/282615a0
- Amato, R., Menniti, M., Agosti, V., Boito, R., Costa, N., Bond, H. M., Perrotti, N. (2007). IL-2 signals through Sgk1 and inhibits proliferation and apoptosis in kidney cancer cells. *Journal of Molecular Medicine*, *85*(7), 707-721. doi:10.1007/s00109-007-0205-2
- Anfossi, N., André, P., Guia, S., Falk, C. S., Roetyncck, S., Stewart, C. A., . . . Vivier, E. (2006). Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*, *25*(2), 331-342. doi:10.1016/j.immuni.2006.06.013
- Arai, S., Meagher, R., Swearingen, M., Myint, H., Rich, E., Martinson, J., & Klingemann, H. (2008). Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial. *Cytotherapy*, *10*(6), 625-632. doi:10.1080/14653240802301872
- Arina, A., Murillo, O., Dubrot, J., Azpilikueta, A., Alfaro, C., Pérez-Gracia, J. L., . . . Melero, I. (2007). Cellular liaisons of natural killer lymphocytes in immunology and immunotherapy of cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*, *7*(5), 599-615. doi:10.1517/14712598.7.5.599
- Armeanu, S., Bitzer, M., Lauer, U. M., Venturelli, S., Pathil, A., Krusch, M., . . . Salih, H. R. (2005). Natural Killer Cell-Mediated Lysis of Hepatoma Cells via Specific Induction of NKG2D Ligands by the Histone Deacetylase Inhibitor Sodium Valproate. *Cancer Research*, *65*(14), 6321-6329. doi:10.1158/0008-5472.Can-04-4252
- Armeanu, S., Krusch, M., Baltz, K. M., Weiss, T. S., Smirnow, I., Steinle, A., . . . Salih, H. R. (2008). Direct and Natural Killer Cell-Mediated Antitumor Effects of Low-Dose Bortezomib in Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, *14*(11), 3520-3528. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-07-4744
- Bae, J., Kim, J.-Y., Kim, M.-J., Chang, S.-H., Park, Y.-S., Son, C.-H., . . . Kang, C.-D. (2010). Quercetin Enhances Susceptibility to NK Cell-mediated Lysis of Tumor Cells Through Induction of NKG2D Ligands and Suppression of HSP70. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, *33*, 391-401. doi:10.1097/CJI.0b013e3181d32f22
- Barber, D. F., Faure, M., & Long, E. O. (2004). LFA-1 Contributes an Early Signal for NK Cell Cytotoxicity. *The Journal of Immunology*, *173*(6), 3653-3659. doi:10.4049/jimmunol.173.6.3653
- Barnes, P. J. (2006). Corticosteroid effects on cell signalling. *Eur Respir J*, *27*(2), 413-426. doi:10.1183/09031936.06.00125404
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., & Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, *285*(5428), 727-729. doi:10.1126/science.285.5428.727
- Bieliauskas, A. V., & Pflum, M. K. H. (2008). Isoform-selective histone deacetylase inhibitors. *Chemical Society reviews*, *37*(7), 1402-1413. doi:10.1039/b703830p
- Billadeau, D. D., Upshaw, J. L., Schoon, R. A., Dick, C. J., & Leibson, P. J. (2003). NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway. *Nature Immunology*, *4*(6), 557-564. doi:10.1038/ni929
- Biron, C. A. (1997). Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Current Opinion in Immunology*, *9*(1), 24-34. doi:https://doi.org/10.1016/S0952-7915(97)80155-0

- Biron, C. A., & Brossay, L. (2001). NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Current Opinion in Immunology*, 13(4), 458-464. doi:https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00241-7
- Biron, C. A., Khuong B. Nguyen, Gary C. Pien, Leslie P. Cousens, a., & Salazar-Mather, T. P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: Function and Regulation by Innate Cytokines. *Annual Review of Immunology*, 17(1), 189-220. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.189
- Blanquer-Rosselló, M. M., Oliver, J., Valle, A., & Roca, P. (2013). Effect of xanthohumol and 8-prenylnaringenin on MCF-7 breast cancer cells oxidative stress and mitochondrial complexes expression. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(12), 2785-2794. doi:10.1002/jcb.24627
- Blom, B., & Spits, H. (2006). Development of human lymphoid cells. *Annual Review of Immunology*, 24(1), 287-320. doi:10.1146/annurev.immunol.24.021605.090612
- Bollino, D., Balan, I., & Aurelian, L. (2015). Valproic acid induces neuronal cell death through a novel calpain-dependent necroptosis pathway. *J Neurochem*, 133(2), 174-186. doi:10.1111/jnc.13029
- Boyiadzis, M., Agha, M., Redner, R. L., Sehgal, A., Im, A., Hou, J. Z., . . . Whiteside, T. L. (2017). Phase 1 clinical trial of adoptive immunotherapy using "off-the-shelf" activated natural killer cells in patients with refractory and relapsed acute myeloid leukemia. *Cytotherapy*, 19(10), 1225-1232. doi:10.1016/j.jcyt.2017.07.008
- Brunelli, E., Minassi, A., Appendino, G., & Moro, L. (2007). 8-Prenylnaringenin, inhibits estrogen receptor- $\alpha$  mediated cell growth and induces apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 107(3), 140-148. doi:https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2007.04.003
- Brunelli, E., Pinton, G., Chianale, F., Graziani, A., Appendino, G., & Moro, L. (2009). 8-Prenylnaringenin inhibits epidermal growth factor-induced MCF-7 breast cancer cell proliferation by targeting phosphatidylinositol-3-OH kinase activity. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 113(3-5), 163-170. doi:10.1016/j.jsbmb.2008.11.013
- Burkard, M., Leischner, C., Lauer, U. M., Busch, C., Venturelli, S., & Frank, J. (2017). Dietary flavonoids and modulation of natural killer cells: implications in malignant and viral diseases. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 46, 1-12. doi:https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.01.006
- Busch, C., Burkard, M., Leischner, C., Lauer, U. M., Frank, J., & Venturelli, S. (2015). Epigenetic activities of flavonoids in the prevention and treatment of cancer. *Clinical epigenetics*, 7(1), 64-64. doi:10.1186/s13148-015-0095-z
- Busch, C., Noor, S., Leischner, C., Burkard, M., Lauer, U. M., & Venturelli, S. (2015). Anti-proliferative activity of hop-derived prenylflavonoids against human cancer cell lines. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 165(11), 258-261. doi:10.1007/s10354-015-0355-8
- Calvisi, D. F., Ladu, S., Gorden, A., Farina, M., Conner, E. A., Lee, J. S., . . . Thorgeirsson, S. S. (2006). Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology*, 130(4), 1117-1128. doi:10.1053/j.gastro.2006.01.006
- Calvo-Castro, L. A., Burkard, M., Sus, N., Scheubeck, G., Leischner, C., Lauer, U. M., . . . Frank, J. (2018). The Oral Bioavailability of 8-Prenylnaringenin from Hops (*Humulus Lupulus* L.) in Healthy Women and Men is Significantly Higher than that of its Positional Isomer 6-Prenylnaringenin in a Randomized Crossover Trial. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(7), 1700838. doi:10.1002/mnfr.201700838
- Cambier, J. C. (1995). New nomenclature for the Reth motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL). *Immunology Today*, 16(2), 110. doi:https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80105-7

- Campbell, K. S., & Hasegawa, J. (2013). Natural killer cell biology: an update and future directions. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *132*(3), 536-544. doi:10.1016/j.jaci.2013.07.006
- Carlsten, M., Norell, H., Bryceson, Y. T., Poschke, I., Schedvins, K., Ljunggren, H.-G., . . . Malmberg, K.-J. (2009). Primary Human Tumor Cells Expressing CD155 Impair Tumor Targeting by Down-Regulating DNAM-1 on NK Cells. *The Journal of Immunology*, *183*(8), 4921-4930. doi:10.4049/jimmunol.0901226
- Carrega, P., Morandi, B., Costa, R., Frumento, G., Forte, G., Altavilla, G., . . . Ferlazzo, G. (2008). Natural killer cells infiltrating human nonsmall-cell lung cancer are enriched in CD56brightCD16<sup>-</sup> cells and display an impaired capability to kill tumor cells. *Cancer*, *112*(4), 863-875. doi:10.1002/cncr.23239
- Chen, X., Trivedi, P. P., Ge, B., Krzewski, K., & Strominger, J. L. (2007). Many NK cell receptors activate ERK2 and JNK1 to trigger microtubule organizing center and granule polarization and cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(15), 6329-6334. doi:10.1073/pnas.0611655104
- Chiossone, L., Vitale, C., Cottalasso, F., Moretti, S., Azzarone, B., Moretta, L., & Mingari, M. C. (2007). Molecular analysis of the methylprednisolone-mediated inhibition of NK-cell function: evidence for different susceptibility of IL-2- versus IL-15-activated NK cells. *Blood*, *109*(9), 3767-3775. doi:10.1182/blood-2006-07-037846
- Choudhry, H., Helmi, N., Abdulaal, W. H., Zeyadi, M., Zamzami, M. A., Wu, W., . . . Jamal, M. S. (2018). Prospects of IL-2 in Cancer Immunotherapy. *BioMed research international*, *2018*, 9056173-9056173. doi:10.1155/2018/9056173
- Chun, P. (2015). Histone deacetylase inhibitors in hematological malignancies and solid tumors. *Archives of Pharmacal Research*, *38*(6), 933-949. doi:10.1007/s12272-015-0571-1
- Clancy, L., Mruk, K., Archer, K., Woelfel, M., Mongkolsapaya, J., Screaton, G., . . . Chan, F. K.-M. (2005). Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(50), 18099-18104. doi:10.1073/pnas.0507329102
- Colonna, M., Nakajima, H., & Cella, M. (1999). Inhibitory and activating receptors involved in immune surveillance by human NK and myeloid cells. *Journal of Leukocyte Biology*, *66*(5), 718-722. doi:https://doi.org/10.1002/jlb.66.5.718
- Coradini, D., Zorzet, S., Rossin, R., Scarlata, I., Pellizzaro, C., Turrin, C., . . . Perbellini, A. (2004). Inhibition of Hepatocellular Carcinomas *in vitro* and Hepatic Metastases *in vivo* in Mice by the Histone Deacetylase Inhibitor HA-But. *Clinical Cancer Research*, *10*(14), 4822-4830. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-04-0349
- Cortez, V. S., Robinette, M. L., & Colonna, M. (2015). Innate lymphoid cells: new insights into function and development. *Current Opinion in Immunology*, *32*, 71-77. doi:https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.01.004
- Cosman, D., Müllberg, J., Sutherland, C. L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., . . . Chalupny, N. J. (2001). ULBPs, Novel MHC Class I-Related Molecules, Bind to CMV Glycoprotein UL16 and Stimulate NK Cytotoxicity through the NKG2D Receptor. *Immunity*, *14*(2), 123-133. doi:https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00095-4
- Cruz-Muñoz, M. E., Valenzuela-Vázquez, L., Sánchez-Herrera, J., & Santa-Olalla Tapia, J. (2019). From the "missing self" hypothesis to adaptive NK cells: Insights of NK cell-mediated effector functions in immune surveillance. *J Leukoc Biol*, *105*(5), 955-971. doi:10.1002/jlb.Mr0618-224r



- Davies, F. E., Raje, N., Hideshima, T., Lentzsch, S., Young, G., Tai, Y.-T., . . . Anderson, K. C. (2001). Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood*, *98*(1), 210-216. doi:10.1182/blood.V98.1.210
- De Maria, A., Bozzano, F., Cantoni, C., & Moretta, L. (2011). Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(2), 728-732. doi:10.1073/pnas.1012356108
- Delmulle, L., Bellahcène, A., Dhooge, W., Comhaire, F., Roelens, F., Huvaere, K., . . . De Keukeleire, D. (2006). Anti-proliferative properties of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.) in human prostate cancer cell lines. *Phytomedicine*, *13*(9), 732-734. doi:https://doi.org/10.1016/j.phymed.2006.01.001
- Delmulle, L., Berghe, T. V., Keukeleire, D. D., & Vandenabeele, P. (2008). Treatment of PC-3 and DU145 prostate cancer cells by prenylflavonoids from hop (*Humulus lupulus* L.) induces a caspase-independent form of cell death. *Phytotherapy Research*, *22*(2), 197-203. doi:10.1002/ptr.2286
- Diermayr, S., Himmelreich, H., Durovic, B., Mathys-Schneeberger, A., Siegler, U., Langenkamp, U., . . . Wodnar-Filipowicz, A. (2008). NKG2D ligand expression in AML increases in response to HDAC inhibitor valproic acid and contributes to allorecognition by NK-cell lines with single KIR-HLA class I specificities. *Blood*, *111*(3), 1428-1436. doi:10.1182/blood-2007-07-101311
- Donato, M. T., Tolosa, L., & Gómez-Lechón, M. J. (2015). Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. In M. Vinken & V. Rogiers (Eds.), *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research* (pp. 77-93). New York, NY: Springer New York.
- Elliott, J. M., & Yokoyama, W. M. (2011). Unifying concepts of MHC-dependent natural killer cell education. *Trends Immunol*, *32*(8), 364-372. doi:10.1016/j.it.2011.06.001
- Esendagli, G., Bruderek, K., Goldmann, T., Busche, A., Branscheid, D., Vollmer, E., & Brandau, S. (2008). Malignant and non-malignant lung tissue areas are differentially populated by natural killer cells and regulatory T cells in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, *59*(1), 32-40. doi:https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2007.07.022
- Falchetti, R., Fuggetta, M. P., Lanzilli, G., Tricarico, M., & Ravagnan, G. (2001). Effects of resveratrol on human immune cell function. *Life Sciences*, *70*(1), 81-96. doi:https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01367-4
- Ferlazzo, G., Thomas, D., Lin, S.-L., Goodman, K., Morandi, B., Muller, W. A., . . . Münz, C. (2004). The Abundant NK Cells in Human Secondary Lymphoid Tissues Require Activation to Express Killer Cell Ig-Like Receptors and Become Cytolytic. *The Journal of Immunology*, *172*(3), 1455-1462. doi:10.4049/jimmunol.172.3.1455
- Frey, M., Packianathan, N. B., Fehniger, T. A., Ross, M. E., Wang, W. C., Stewart, C. C., . . . Evans, S. S. (1998). Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *J Immunol*, *161*(1), 400-408. Retrieved from https://www.jimmunol.org/content/jimmunol/161/1/400.full.pdf
- Frye, R., Myers, M., Axelrod, K. C., Ness, E. A., Piekarz, R. L., Bates, S. E., & Booher, S. (2012). Romidepsin: a new drug for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Clin J Oncol Nurs*, *16*(2), 195-204. doi:10.1188/12.CJON.195-204
- Furumai, R., Matsuyama, A., Kobashi, N., Lee, K.-H., Nishiyama, M., Nakajima, H., . . . Horinouchi, S. (2002). FK228 (Depsipeptide) as a Natural Prodrug That Inhibits Class I Histone Deacetylases. *Cancer Research*, *62*(17), 4916-4921. Retrieved from https://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/62/17/4916.full.pdf

- Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., & Trinchieri, G. (2002). Reciprocal Activating Interaction between Natural Killer Cells and Dendritic Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 195(3), 327-333. doi:10.1084/jem.20010938
- Glozak, M. A., & Seto, E. (2007). Histone deacetylases and cancer. *Oncogene*, 26(37), 5420-5432. doi:10.1038/sj.onc.1210610
- Gong, J. H., Maki, G., & Klingemann, H. G. (1994). Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia*, 8(4), 652-658.
- Gulbins, E., & Lang, K. S. (2019). Immunsystem. In R. Brandes, F. Lang, & R. F. Schmidt (Eds.), *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie* (32th ed., S. 312-323). Berlin: Springer.
- Gulubova, M., Manolova, I., Kyurkchiev, D., Julianov, A., & Altunkova, I. (2009). Decrease in intrahepatic CD56+ lymphocytes in gastric and colorectal cancer patients with liver metastases. *APMIS*, 117(12), 870-879. doi:10.1111/j.1600-0463.2009.02547.x
- Guruvayoorappan, C., & Kuttan, G. (2007). Amentoflavone, a biflavonoid from *Biophytum sensitivum* augments lymphocyte proliferation, natural killer cell and antibody dependent cellular cytotoxicity through enhanced production of IL-2 and IFN-gamma and restrains serum sialic acid and gamma glutamyl transpeptidase production in tumor - bearing animals. *Journal of experimental therapeutics & oncology*, 6(4), 285-295. Retrieved from [https://www.unboundmedicine.com/medline/citation/18038762/Amentoflavone\\_a\\_biflavonoid\\_from\\_Biophytum\\_sensitivum\\_augments\\_lymphocyte\\_proliferation\\_natural\\_killer\\_cell\\_and\\_antibody\\_dependent\\_cellular\\_cytotoxicity\\_through\\_enhanced\\_production\\_of\\_IL\\_2\\_and\\_IFN\\_gamma\\_and\\_restrains\\_serum\\_sialic\\_acid\\_and\\_gamma\\_glutamyl\\_transpeptidase\\_production\\_in\\_tumor\\_bearing\\_animals](https://www.unboundmedicine.com/medline/citation/18038762/Amentoflavone_a_biflavonoid_from_Biophytum_sensitivum_augments_lymphocyte_proliferation_natural_killer_cell_and_antibody_dependent_cellular_cytotoxicity_through_enhanced_production_of_IL_2_and_IFN_gamma_and_restrains_serum_sialic_acid_and_gamma_glutamyl_transpeptidase_production_in_tumor_bearing_animals)
- Haslam, E. (1998). *Practical polyphenolics : from structure to molecular recognition and physiological action*. Cambridge, UK ; New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- Herberman, R. B., Nunn, M. E., & Lavrin, D. H. (1975). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *International Journal of Cancer*, 16(2), 216-229. doi:10.1002/ijc.2910160204
- Herzenberg, L. A., Sweet, R. G., & Herzenberg, L. A. (1976). Fluorescence-activated Cell Sorting. *Scientific American*, 234(3), 108-118. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/24950310>
- Hodek, P., Trefil, P., & Stiborová, M. (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*, 139(1), 1-21. doi:https://doi.org/10.1016/S0009-2797(01)00285-X
- Hoffmann, S. C., Cohnen, A., Ludwig, T., & Watzl, C. (2011). 2B4 Engagement Mediates Rapid LFA-1 and Actin-Dependent NK Cell Adhesion to Tumor Cells as Measured by Single Cell Force Spectroscopy. *The Journal of Immunology*, 186(5), 2757-2764. doi:10.4049/jimmunol.1002867
- Höglund, P., & Brodin, P. (2010). Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. *Nature Reviews Immunology*, 10(10), 724-734. doi:10.1038/nri2835
- Hu, L., Cao, D., Li, Y., He, Y., & Guo, K. (2012). Resveratrol sensitized leukemia stem cell-like KG-1a cells to cytokine-induced killer cells-mediated cytolysis through NKG2D ligands and TRAIL receptors. *Cancer Biology & Therapy*, 13(7), 516-526. doi:10.4161/cbt.19601

- Huergo-Zapico, L., Acebes-Huerta, A., López-Soto, A., Villa-Álvarez, M., Gonzalez-Rodriguez, A. P., & Gonzalez, S. (2014). Molecular Bases for the Regulation of NKG2D Ligands in Cancer. *Frontiers in Immunology*, 5(106). doi:10.3389/fimmu.2014.00106
- Iannello, A., Debbeche, O., Samarani, S., & Ahmad, A. (2008). Antiviral NK cell responses in HIV infection: I. NK cell receptor genes as determinants of HIV resistance and progression to AIDS. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(1), 1-26. doi:10.1189/jlb.0907650
- Jacobs, R., Hintzen, G., Kemper, A., Beul, K., Kempf, S., Behrens, G., . . . Schmidt, R. E. (2001). CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *European Journal of Immunology*, 31(10), 3121-3126. doi:10.1002/1521-4141(200110)31:10<3121::Aid-immu3121>3.0.Co;2-4
- Jazirehi, A. R., Kurdistani, S. K., & Economou, J. S. (2014). Histone Deacetylase Inhibitor Sensitizes Apoptosis-Resistant Melanomas to Cytotoxic Human T Lymphocytes through Regulation of TRAIL/DR5 Pathway. *The Journal of Immunology*, 192(8), 3981-3989. doi:10.4049/jimmunol.1302532
- Ji, K., Lin, K., Wang, Y., Du, L., Xu, C., He, N., Liu, Q. (2018). TAZ inhibition promotes IL-2-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by activating the JNK/F-actin/mitochondrial fission pathway. *Cancer Cell International*, 18(1), 117. doi:10.1186/s12935-018-0615-y
- Jinushi, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Hiramatsu, N., Sakamori, R., Yamaguchi, S., & Hayashi, N. (2005). Impairment of natural killer cell and dendritic cell functions by the soluble form of MHC class I-related chain A in advanced human hepatocellular carcinomas. *Journal of Hepatology*, 43(6), 1013-1020. doi:https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.05.026
- Johnstone, R. W. (2002). Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(4), 287-299. doi:10.1038/nrd772
- Kärre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G., & Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*, 319(6055), 675-678. doi:10.1038/319675a0
- Kashii, Y., Giorda, R., Herberman, R. B., Whiteside, T. L., & Vujanovic, N. L. (1999). Constitutive Expression and Role of the TNF Family Ligands in Apoptotic Killing of Tumor Cells by Human NK Cells. *The Journal of Immunology*, 163(10), 5358-5366. Retrieved from <https://www.jimmunol.org/content/jimmunol/163/10/5358.full.pdf>
- Kelly-Rogers, J., Madrigal-Estebas, L., O'Connor, T., & Doherty, D. G. (2006). Activation-Induced Expression of CD56 by T Cells Is Associated With a Reprogramming of Cytolytic Activity and Cytokine Secretion Profile In Vitro. *Human Immunology*, 67(11), 863-873. doi:https://doi.org/10.1016/j.humimm.2006.08.292
- Kiessling, R., Klein, E., & Wigzell, H. (1975). „Natural” killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *European Journal of Immunology*, 5(2), 112-117. doi:10.1002/eji.1830050208
- Kim, H. R., Park, H. J., Park, J. H., Kim, S. J., Kim, K., & Kim, J. (2004). Characteristics of the killing mechanism of human natural killer cells against hepatocellular carcinoma cell lines HepG2 and Hep3B. *Cancer Immunol Immunother*, 53(5), 461-470. doi:10.1007/s00262-003-0461-0
- Kim, J. H., & Lee, J. K. (2015). Naringenin enhances NK cell lysis activity by increasing the expression of NKG2D ligands on Burkitt's lymphoma cells. *Archives of Pharmacal Research*, 38(11), 2042-2048. doi:10.1007/s12272-015-0624-5
- Kim, K. Y., Kim, J. K., Han, S. H., Lim, J. S., Kim, K. I., Cho, D. H., . . . Yang, Y. (2006). Adiponectin is a negative regulator of NK cell cytotoxicity. *J Immunol*, 176(10), 5958-5964. doi:10.4049/jimmunol.176.10.5958

- Kim, M. S., Kwon, H. J., Lee, Y. M., Baek, J. H., Jang, J.-E., Lee, S.-W., . . . Kim, K.-W. (2001). Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nature Medicine*, 7(4), 437-443. doi:10.1038/86507
- Klingemann, H., Boissel, L., & Toneguzzo, F. (2016). Natural Killer Cells for immunotherapy-Advantages of the NK-92 Cell Line over Blood NK Cells. *Frontiers in Immunology*, 7. doi:ARTN 9110.3389/fimmu.2016.00091
- Knowles, B. B., Howe, C. C., & Aden, D. P. (1980). Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*, 209(4455), 497-499. doi:10.1126/science.6248960
- Konjević, G., Mirjačić Martinović, K., Vuletić, A., Jović, V., Jurisić, V., Babović, N., & Spužić, I. (2007). Low expression of CD161 and NKG2D activating NK receptor is associated with impaired NK cell cytotoxicity in metastatic melanoma patients. *Clinical & Experimental Metastasis*, 24(1), 1-11. doi:10.1007/s10585-006-9043-9
- Krefeld, R. E. (1991). Durchflußzytometrie, eine schnelle und einfache Methode zur Analyse großer Zellzahlen. *Journal of Laboratory Medicine*, 15(11), 563. doi:https://doi.org/10.1515/labm.1991.15.11.563
- Krzewski, K., & Strominger, J. L. (2008). The killer's kiss: the many functions of NK cell immunological synapses. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(5), 597-605. doi:https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.05.006
- Kubin, M., Cassiano, L., Chalupny, J., Chin, W., Cosman, D., Fanslow, W., . . . Armitage, R. (2001). ULBP1, 2, 3: novel MHC class I-related molecules that bind to human cytomegalovirus glycoprotein UL16, activate NK cells. *Eur J Immunol*, 31(5), 1428-1437. doi:10.1002/1521-4141(200105)31:5<1428::Aid-immu1428>3.0.Co;2-4
- Lanier, L. L. (2005). NK cell recognition. *Annual Review of Immunology*, 23(1), 225-274. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526
- Lanier, L. L., Testi, R., Bindl, J., & Phillips, J. H. (1989). Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *The Journal of Experimental Medicine*, 169(6), 2233-2238. doi:10.1084/jem.169.6.2233
- Lee, S.-H., Miyagi, T., & Biron, C. A. (2007). Keeping NK cells in highly regulated antiviral warfare. *Trends in Immunology*, 28(6), 252-259. doi:https://doi.org/10.1016/j.it.2007.04.001
- Leischner, C., Burkard, M., Pfeiffer, M. M., Lauer, U. M., Busch, C., & Venturelli, S. (2016). Nutritional immunology: function of natural killer cells and their modulation by resveratrol for cancer prevention and treatment. *Nutrition Journal*, 15(1), 47. doi:10.1186/s12937-016-0167-8
- Leung, J. C. K., Tsang, A. W. L., Chan, D. T. M., & Lai, K. N. (2000). Absence of CD89, Polymeric Immunoglobulin Receptor, and Asialoglycoprotein Receptor on Human Mesangial Cells. *Journal of the American Society of Nephrology*, 11(2), 241-249. doi:10.1681/asn.V112241
- Leung, W. (2014). Infusions of Allogeneic Natural Killer Cells as Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 20(13), 3390-3400. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-13-1766
- Li, Q., Huyan, T., Ye, L.-J., Li, J., Shi, J.-L., & Huang, Q.-S. (2014). Concentration-Dependent Biphasic Effects of Resveratrol on Human Natural Killer Cells in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(45), 10928-10935. doi:10.1021/jf502950u
- Li, Y., & Seto, E. (2016). HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(10), a026831. doi:10.1101/cshperspect.a026831
- Lieberman, J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nature Reviews Immunology*, 3(5), 361-370. doi:10.1038/nri1083

- Lin, C.-C., Yu, C.-S., Yang, J.-S., Lu, C.-C., Chiang, J.-H., Lin, J.-P., . . . Chung, J.-G. (2012). Chrysin, a Natural and Biologically Active Flavonoid, Influences a Murine Leukemia Model In Vivo through Enhancing Populations of T-and B-Cells, and Promoting Macrophage Phagocytosis and NK Cell Cytotoxicity. *In Vivo*, 26(4), 665-670. Retrieved from <http://iv.iarjournals.org/content/26/4/665.abstract>; <http://iv.iarjournals.org/content/26/4/665.full.pdf>
- Lissoni, P. (2017). Therapy implications of the role of interleukin-2 in cancer. *Expert Review of Clinical Immunology*, 13(5), 491-498. doi:10.1080/1744666X.2017.1245146
- Ljunggren, H.-G., & Malmberg, K.-J. (2007). Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nature Reviews Immunology*, 7, 329. doi:10.1038/nri2073
- Ljunggren, H. G., & Kärre, K. (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*, 11(7), 237-244. doi:10.1016/0167-5699(90)90097-s
- Lotzová, E., Savary, C. A., & Herberman, R. B. (1987). Induction of NK cell activity against fresh human leukemia in culture with interleukin 2. *The Journal of Immunology*, 138(8), 2718-2727. Retrieved from <https://www.jimmunol.org/content/jimmunol/138/8/2718.full.pdf>
- Lotzová, E., Savary, C. A., & Herberman, R. B. (1987). Inhibition of clonogenic growth of fresh leukemia cells by unstimulated and IL-2 stimulated NK cells of normal donors. *Leukemia Research*, 11(12), 1059-1066. doi:[https://doi.org/10.1016/0145-2126\(87\)90158-5](https://doi.org/10.1016/0145-2126(87)90158-5)
- Lu, C.-C., & Chen, J.-K. (2010). Resveratrol enhances perforin expression and NK cell cytotoxicity through NKG2D-dependent pathways. *Journal of Cellular Physiology*, 223(2), 343-351. doi:10.1002/jcp.22043
- Lugini, L., Cecchetti, S., Huber, V., Luciani, F., Macchia, G., Spadaro, F., . . . Fais, S. (2012). Immune Surveillance Properties of Human NK Cell-Derived Exosomes. *The Journal of Immunology*, 189(6), 2833-2842. doi:10.4049/jimmunol.1101988
- Luo, Q., Luo, W., Zhu, Q., Huang, H., Peng, H., Liu, R., . . . Zou, Y. (2020). Tumor-Derived Soluble MICA Obstructs the NKG2D Pathway to Restrain NK Cytotoxicity. *Aging and disease*, 11(1), 118-128. doi:10.14336/AD.2019.1017
- Maeda, T., Towatari, M., Kosugi, H., & Saito, H. (2000). Up-regulation of costimulatory/adhesion molecules by histone deacetylase inhibitors in acute myeloid leukemia cells. *Blood*, 96(12), 3847-3856. doi:10.1182/blood.V96.12.3847
- Magner, W. J., Kazim, A. L., Stewart, C., Romano, M. A., Catalano, G., Grande, C., . . . Tomasi, T. B. (2000). Activation of MHC Class I, II, and CD40 Gene Expression by Histone Deacetylase Inhibitors. *The Journal of Immunology*, 165(12), 7017-7024. doi:10.4049/jimmunol.165.12.7017
- Maki, G., Klingemann, H.-G., Martinson, J. A., & Tam, Y. K. (2001). Factors Regulating the Cytotoxic Activity of the Human Natural Killer Cell Line, NK-92. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*, 10(3), 369-383. doi:10.1089/152581601750288975
- Maness, P. F., & Schachner, M. (2006). Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nature Neuroscience*, 10, 19. doi:10.1038/nn1827
- Mann, B. S., Johnson, J. R., Cohen, M. H., Justice, R., & Pazdur, R. (2007). FDA Approval Summary: Vorinostat for Treatment of Advanced Primary Cutaneous T-Cell Lymphoma. *The Oncologist*, 12(10), 1247-1252. doi:10.1634/theoncologist.12-10-1247

- McDermott, J., & Jimeno, A. (2014). Belinostat for the treatment of peripheral T-cell lymphomas. *Drugs Today (Barc)*, *50*(5), 337-345. doi:10.1358/dot.2014.50.5.2138703
- Miller, K. M., Tjeertes, J. V., Coates, J., Legube, G., Polo, S. E., Britton, S., & Jackson, S. P. (2010). Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining. *Nature Structural & Molecular Biology*, *17*(9), 1144-1151. doi:10.1038/nsmb.1899
- Milligan, S. R., Kalita, J. C., Heyerick, A., Rong, H., De Cooman, L., & De Keukeleire, D. (1999). Identification of a Potent Phytoestrogen in Hops (*Humulus lupulus* L.) and Beer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *84*(6), 2249-2249. doi:10.1210/jcem.84.6.5887
- Milligan, S. R., Kalita, J. C., Pocock, V., Van De Kauter, V., Stevens, J. F., Deinzer, M. L., . . . De Keukeleire, D. (2000). The Endocrine Activities of 8-Prenylnaringenin and Related Hop (*Humulus lupulus* L.) Flavonoids. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *85*(12), 4912-4915. doi:10.1210/jcem.85.12.7168
- Minucci, S., & Pelicci, P. G. (2006). Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nature Reviews Cancer*, *6*(1), 38-51. doi:10.1038/nrc1779
- Mithraprabhu, S., Kalff, A., Chow, A., Khong, T., & Spencer, A. (2014). Dysregulated Class I histone deacetylases are indicators of poor prognosis in multiple myeloma. *Epigenetics*, *9*(11), 1511-1520. doi:10.4161/15592294.2014.983367
- Moretta, A. (2003). Moretta, A. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 957-964. *Nature reviews. Immunology*, *2*, 957-964. doi:10.1038/nri956
- Moretta, A., Marcenaro, E., Parolini, S., Ferlazzo, G., & Moretta, L. (2008). NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death & Differentiation*, *15*(2), 226-233. doi:10.1038/sj.cdd.4402170
- Murphy, K., & Weaver, C. (2018). *Janeway Immunologie* (9th ed., S. 156 – 157 und S. 581 - 621). Berlin: Springer Spektrum.
- Natarajan, U., Venkatesan, T., Radhakrishnan, V., Samuel, S., & Rathinavelu, A. (2019). Differential Mechanisms of Cell Death Induced by HDAC Inhibitor SAHA and MDM2 Inhibitor RG7388 in MCF-7 Cells. *Cells*, *8*(1), 8. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/1/8>
- Ni, L., Wang, L., Yao, C., Ni, Z., Liu, F., Gong, C., . . . Zhu, S. (2017). The histone deacetylase inhibitor valproic acid inhibits NKG2D expression in natural killer cells through suppression of STAT3 and HDAC3. *Sci Rep*, *7*, 45266. doi:10.1038/srep45266
- Oehme, I., Deubzer, H. E., Wegener, D., Pickert, D., Linke, J.-P., Hero, B., . . . Witt, O. (2009). Histone Deacetylase 8 in Neuroblastoma Tumorigenesis. *Clinical Cancer Research*, *15*(1), 91-99. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-08-0684
- Ogbomo, H., Michaelis, M., Kreuter, J., Doerr, H. W., & Cinatl, J. (2007). Histone deacetylase inhibitors suppress natural killer cell cytolytic activity. *FEBS Letters*, *581*(7), 1317-1322. doi:10.1016/j.febslet.2007.02.045
- Orange, J. S., Brodeur, S. R., Jain, A., Bonilla, F. A., Schneider, L. C., Kretschmer, R., . . . Geha, R. S. (2002). Deficient natural killer cell cytotoxicity in patients with IKK-gamma/NEMO mutations. *J Clin Invest*, *109*(11), 1501-1509. doi:10.1172/jci14858
- Orr, M. T., & Lanier, L. L. (2010). Natural killer cell education and tolerance. *Cell*, *142*(6), 847-856. doi:10.1016/j.cell.2010.08.031
- Pan, J., Shen, J., Si, W., Du, C., Chen, D., Xu, L., . . . Fan, W. (2017). Resveratrol promotes MICA/B expression and natural killer cell lysis of breast cancer cells by suppressing c-Myc/miR-17 pathway. *Oncotarget*, *8*(39), 65743-65758. doi:10.18632/oncotarget.19445

- Papewalis, C., Jacobs, B., Baran, A. M., Ehlers, M., Stoecklein, N. H., Willenberg, H. S., . . . Schott, M. (2011). Increased numbers of tumor-lysing monocytes in cancer patients. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 337(1), 52-61. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.01.020>
- Patel, A. R., & Nagalli, S. (2020). Valproate Toxicity. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.
- Pepper, M. S., Hazel, S. J., Hümpel, M., & Schleuning, W.-D. (2004). 8-prenylnaringenin, a novel phytoestrogen, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Journal of Cellular Physiology*, 199(1), 98-107. doi:10.1002/jcp.10460
- Petrich, A., & Nabhan, C. (2016). Use of class I histone deacetylase inhibitor romidepsin in combination regimens. *Leukemia & lymphoma*, 57(8), 1755-1765. doi:10.3109/10428194.2016.1160082
- Pietta, P.-G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035-1042. doi:10.1021/np9904509
- Pili, R., Kruszewski, M. P., Hager, B. W., Lantz, J., & Carducci, M. A. (2001). Combination of phenylbutyrate and 13-cis retinoic acid inhibits prostate tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res*, 61(4), 1477-1485. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11245454>; <https://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/61/4/1477.full.pdf>
- Poggi, A., Catellani, S., Garuti, A., Pierri, I., Gobbi, M., & Zocchi, M. R. (2009). Effective in vivo induction of NKG2D ligands in acute myeloid leukaemias by all-trans-retinoic acid or sodium valproate. *Leukemia*, 23(4), 641-648. doi:10.1038/leu.2008.354
- Qian, D. Z., Kato, Y., Shabbeer, S., Wei, Y., Verheul, H. M. W., Salumbides, B., . . . Pili, R. (2006). Targeting Tumor Angiogenesis with Histone Deacetylase Inhibitors: the Hydroxamic Acid Derivative LBH589. *Clinical Cancer Research*, 12(2), 634-642. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-05-1132
- Qiu, G.-H., Xie, X., Xu, F., Shi, X., Wang, Y., & Deng, L. (2015). Distinctive pharmacological differences between liver cancer cell lines HepG2 and Hep3B. *Cytotechnology*, 67(1), 1-12. doi:10.1007/s10616-014-9761-9
- Raulet, D. H., & Vance, R. E. (2006). Self-tolerance of natural killer cells. *Nature reviews. Immunology*, 6(7), 520-531. doi:10.1038/nri1863
- Reth, M. (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature*, 338(6214), 383-384. doi:10.1038/338383b0
- Rettig, I., Koeneke, E., Trippel, F., Mueller, W. C., Burhenne, J., Kopp-Schneider, A., . . . Oehme, I. (2015). Selective inhibition of HDAC8 decreases neuroblastoma growth in vitro and in vivo and enhances retinoic acid-mediated differentiation. *Cell death & disease*, 6(2), e1657-e1657. doi:10.1038/cddis.2015.24
- Richardson, P. G., Laubach, J. P., Lonial, S., Moreau, P., Yoon, S.-S., Hungria, V. T. M., . . . San-Miguel, J. F. (2015). Panobinostat: a novel pan-deacetylase inhibitor for the treatment of relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 15(7), 737-748. doi:10.1586/14737140.2015.1047770
- Ritz, J., Schmidt, R. E., Michon, J., Hercend, T., & Schlossman, S. F. (1988). Characterization of Functional Surface Structures on Human Natural Killer Cells. In F. J. Dixon (Ed.), *Advances in Immunology* (Vol. 42, pp. 181-211): Academic Press.
- Robinson, B. W. S., & Morstyn, G. (1987). Natural killer (NK)-resistant human lung cancer cells are lysed by recombinant interleukin-2-activated NK cells. *Cellular Immunology*, 106(2), 215-222. doi:[https://doi.org/10.1016/0008-8749\(87\)90165-1](https://doi.org/10.1016/0008-8749(87)90165-1)

- Romee, R., Foley, B., Lenvik, T., Wang, Y., Zhang, B., Ankarlo, D., . . . Miller, J. (2013). NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood*, *121*(18), 3599-3608. doi:10.1182/blood-2012-04-425397
- Roothans, D., Smits, E., Lion, E., Tel, J., & Anguille, S. (2013). CD56 marks human dendritic cell subsets with cytotoxic potential. *Oncol Immunology*, *2*(2), e23037. doi:10.4161/onci.23037
- Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Chang, A. E., Avis, F. P., Leitman, S., . . . White, D. E. (1987). A Progress Report on the Treatment of 157 Patients with Advanced Cancer Using Lymphokine-Activated Killer Cells and Interleukin-2 or High-Dose Interleukin-2 Alone. *New England Journal of Medicine*, *316*(15), 889-897. doi:10.1056/nejm198704093161501
- Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Leitman, S., Chang, A. E., Ettinghausen, S. E., . . . Reichert, C. M. (1985). Observations on the Systemic Administration of Autologous Lymphokine-Activated Killer Cells and Recombinant Interleukin-2 to Patients with Metastatic Cancer. *New England Journal of Medicine*, *313*(23), 1485-1492. doi:10.1056/nejm198512053132327
- Rossi, L. E., Avila, D. E., Spallanzani, R. G., Ziblat, A., Fuertes, M. B., Lapyckyj, L., . . . Zwirner, N. W. (2012). Histone deacetylase inhibitors impair NK cell viability and effector functions through inhibition of activation and receptor expression. *J Leukoc Biol*, *91*(2), 321-331. doi:10.1189/jlb.0711339
- Saito, T., Abe, D., & Nogata, Y. (2015). Polymethoxylated flavones potentiate the cytolytic activity of NK leukemia cell line KHYG-1 via enhanced expression of granzyme B. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *456*(3), 799-803. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.12.027
- Salih, H. R., Rammensee, H.-G., & Steinle, A. (2002). Cutting Edge: Down-Regulation of MICA on Human Tumors by Proteolytic Shedding. *The Journal of Immunology*, *169*(8), 4098-4102. doi:10.4049/jimmunol.169.8.4098
- Schmudde, M., Braun, A., Pende, D., Sonnemann, J., Klier, U., Beck, J. F., . . . Bröker, B. M. (2008). Histone deacetylase inhibitors sensitize tumour cells for cytotoxic effects of natural killer cells. *Cancer Letters*, *272*(1), 110-121. doi:https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.06.027
- Shahzad, R., Rachael, A. S., & Suzanne, L. (2017). Immunomodulatory Drugs (IMiDs) in Multiple Myeloma. *Current Cancer Drug Targets*, *17*(9), 846-857. doi:http://dx.doi.org/10.2174/1568009617666170214104426
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., . . . Boyd, M. R. (1990). New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *82*(13), 1107-1112. doi:10.1093/jnci/82.13.1107
- Skov, S., Pedersen, M. T., Andresen, L., Thor Straten, P., Woetmann, A., & Ødum, N. (2005). Cancer Cells Become Susceptible to Natural Killer Cell Killing after Exposure to Histone Deacetylase Inhibitors Due to Glycogen Synthase Kinase-3-Dependent Expression of MHC Class I-Related Chain A and B. *Cancer Research*, *65*(23), 11136-11145. doi:10.1158/0008-5472.Can-05-0599
- Slany, A., Haudek, V. J., Zwickl, H., Gundacker, N. C., Grusch, M., Weiss, T. S., . . . Gerner, C. (2010). Cell characterization by proteome profiling applied to primary hepatocytes and hepatocyte cell lines Hep-G2 and Hep-3B. *J Proteome Res*, *9*(1), 6-21. doi:10.1021/pr900057t
- Soriani, A., Zingoni, A., Cerboni, C., Iannitto, M. L., Ricciardi, M. R., Di Gialleonardo, V., . . . Santoni, A. (2009). ATM-ATR-dependent up-regulation of DNAM-1 and NKG2D ligands on multiple myeloma cells by therapeutic agents results in enhanced NK-cell susceptibility and is associated with a senescent phenotype. *Blood*, *113*(15), 3503-3511. doi:10.1182/blood-2008-08-173914



- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., . . . Vivier, E. (2013). Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nature Reviews Immunology*, 13, 145. doi:10.1038/nri3365
- Steinle, A., Li, P., Morris, D. L., Groh, V., Lanier, L. L., Strong, R. K., & Spies, T. (2001). Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics*, 53(4), 279-287. doi:10.1007/s002510100325
- Steinwascher, S., Nugues, A.-L., Schoeneberger, H., & Fulda, S. (2015). Identification of a novel synergistic induction of cell death by Smac mimetic and HDAC inhibitors in acute myeloid leukemia cells. *Cancer Letters*, 366(1), 32-43. doi:https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.05.020
- Stevens, J. F., Taylor, A. W., & Deinzer, M. L. (1999). Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 832(1-2), 97-107. doi:10.1016/s0021-9673(98)01001-2
- Sudo, T., Mimori, K., Nishida, N., Kogo, R., Iwaya, T., Tanaka, F., . . . Mori, M. (2011). Histone deacetylase 1 expression in gastric cancer. *Oncology reports*, 26, 777-782. doi:10.3892/or.2011.1361
- Sutlu, T., & Alici, E. (2009). Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *Journal of Internal Medicine*, 266(2), 154-181. doi:10.1111/j.1365-2796.2009.02121.x
- Tai, Y.-T., Li, X.-F., Catley, L., Coffey, R., Breitkreutz, I., Bae, J., . . . Anderson, K. C. (2005). Immunomodulatory Drug Lenalidomide (CC-5013, IMiD3) Augments Anti-CD40 SGN-40-Induced Cytotoxicity in Human Multiple Myeloma: Clinical Implications. *Cancer Research*, 65(24), 11712-11720. doi:10.1158/0008-5472.Can-05-1657
- Tam, Y. K., Maki, G., Miyagawa, B., Hennemann, B., Tonn, T., & Klingemann, H. G. (1999). Characterization of Genetically Altered, Interleukin 2-Independent Natural Killer Cell Lines Suitable for Adoptive Cellular Immunotherapy. *Human Gene Therapy*, 10(8), 1359-1373. doi:10.1089/10430349950018030
- Tonn, T., Becker, S., Esser, R., Schwabe, D., & Seifried, E. (2001). Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92. *J Hematother Stem Cell Res*, 10(4), 535-544. doi:10.1089/15258160152509145
- Tonn, T., Schwabe, D., Klingemann, H. G., Becker, S., Esser, R., Koehl, U., . . . Bug, G. (2013). Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. *Cytotherapy*, 15(12), 1563-1570. doi:https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.06.017
- Trapani, J. A., Davis, J., Sutton, V. R., & Smyth, M. J. (2000). Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo. *Current Opinion in Immunology*, 12(3), 323-329. doi:https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00094-7
- Ungerstedt, J. S., Sowa, Y., Xu, W. S., Shao, Y., Dokmanovic, M., Perez, G., Marks, P. A. (2005). Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(3), 673-678. doi:10.1073/pnas.0408732102
- Urlaub, D., Höfer, K., Müller, M.-L., & Watzl, C. (2017). LFA-1 Activation in NK Cells and Their Subsets: Influence of Receptors, Maturation, and Cytokine Stimulation. *The Journal of Immunology*, 198(5), 1944-1951. doi:10.4049/jimmunol.1601004
- Vaissière, T., Sawan, C., & Herceg, Z. (2008). Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 659(1), 40-48. doi:https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.02.004

- Valle-Mendiola, A., Weiss-Steider, B., Rocha-Zavaleta, L., & Soto-Cruz, I. (2014). IL-2 Enhances Cervical Cancer Cells Proliferation and JAK3/STAT5 Phosphorylation at Low Doses, While at High Doses IL-2 Has Opposite Effects. *Cancer Investigation*, 32(4), 115-125. doi:10.3109/07357907.2014.883526
- Van Acker, H. H., Anguille, S., Willemen, Y., Van den Bergh, J. M., Berneman, Z. N., Lion, E., . . . Van Tendeloo, V. F. (2016). Interleukin-15 enhances the proliferation, stimulatory phenotype, and antitumor effector functions of human gamma delta T cells. *Journal of Hematology & Oncology*, 9(1), 101. doi:10.1186/s13045-016-0329-3
- Van Acker, H. H., Capsomidis, A., Smits, E. L., & Van Tendeloo, V. F. (2017). CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity? *Frontiers in Immunology*, 8(892). doi:10.3389/fimmu.2017.00892
- Venturelli, S., Berger, A., Böcker, A., Busch, C., Weiland, T., Noor, S., Bitzer, M. (2013). Resveratrol as a pan-HDAC inhibitor alters the acetylation status of histone [corrected] proteins in human-derived hepatoblastoma cells. *PLoS One*, 8(8), e73097-e73097. doi:10.1371/journal.pone.0073097
- Venturelli, S., Burkard, M., Biendl, M., Lauer, U. M., Frank, J., & Busch, C. (2016). Prenylated chalcones and flavonoids for the prevention and treatment of cancer. *Nutrition*, 32(11), 1171-1178. doi:https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.03.020
- Venturelli, S., Niessner, H., Sinnberg, T., Berger, A., Burkard, M., Urmann, C., Busch, C. (2018). 6- and 8-Prenylnaringenin, Novel Natural Histone Deacetylase Inhibitors Found in Hops, Exert Antitumor Activity on Melanoma Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51(2), 543-556. doi:10.1159/000495275
- Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*, 1(3), 1112-1116. doi:10.1038/nprot.2006.179
- Vitale, C., Chiossone, L., Cantoni, C., Morreale, G., Cottalasso, F., Moretti, S., Mingari, M. C. (2004). The corticosteroid-induced inhibitory effect on NK cell function reflects down-regulation and/or dysfunction of triggering receptors involved in natural cytotoxicity. *European Journal of Immunology*, 34(11), 3028-3038. doi:https://doi.org/10.1002/eji.200425418
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*, 9, 503. doi:10.1038/ni1582; https://www.nature.com/articles/ni1582#supplementary-information
- Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S. H., Zitvogel, L., & Vivier, E. (2005). Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood*, 106(7), 2252-2258. doi:10.1182/blood-2005-03-1154
- Wang, D., Zhao, M., Chen, G., Cheng, X., Han, X., Lin, S., Yu, X. (2013). The histone deacetylase inhibitor vorinostat prevents TNF $\alpha$ -induced necroptosis by regulating multiple signaling pathways. *Apoptosis*, 18(11), 1348-1362. doi:10.1007/s10495-013-0866-y
- Watzl, C., & Urlaub, D. (2012). Molecular mechanisms of natural killer cell regulation. *Frontiers in Bioscience*, 17, 1418-1432.
- Weichert, W., Röske, A., Niesporek, S., Noske, A., Buckendahl, A.-C., Dietel, M., Denkert, C. (2008). Class I Histone Deacetylase Expression Has Independent Prognostic Impact in Human Colorectal Cancer: Specific Role of Class I Histone Deacetylases *In vitro* and *In vivo*. *Clinical Cancer Research*, 14(6), 1669-1677. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-07-0990
- West, A. C., & Johnstone, R. W. (2014). New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(1), 30-39. doi:10.1172/JCI69738

- Williams, B. A., Law, A. D., Routy, B., denHollander, N., Gupta, V., Wang, X. H., . . . Keating, A. (2017). A phase I trial of NK-92 cells for refractory hematological malignancies relapsing after autologous hematopoietic cell transplantation shows safety and evidence of efficacy. *Oncotarget*, 8(51), 89256-89268. doi:10.18632/oncotarget.19204
- Wu, J., Song, Y., Bakker, A. B., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L. L., & Phillips, J. H. (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science*, 285(5428), 730-732. doi:10.1126/science.285.5428.730
- Xie, H., Zhang, Q., Zhou, H., Zhou, J., Zhang, J., Jiang, Y., . . . Jiang, X. (2018). microRNA-889 is downregulated by histone deacetylase inhibitors and confers resistance to natural killer cytotoxicity in hepatocellular carcinoma cells. *Cytotechnology*, 70(2), 513-521. doi:10.1007/s10616-017-0108-1
- Yang, H., Lan, P., Hou, Z., Guan, Y., Zhang, J., Xu, W., . . . Zhang, C. (2015). Histone deacetylase inhibitor SAHA epigenetically regulates miR-17-92 cluster and MCM7 to upregulate MICA expression in hepatoma. *British journal of cancer*, 112(1), 112-121. doi:10.1038/bjc.2014.547
- Yokoyama, W. M., & Kim, S. (2006a). How do natural killer cells find self to achieve tolerance? *Immunity*, 24(3), 249-257. doi:10.1016/j.immuni.2006.03.006
- Yokoyama, W. M., & Kim, S. (2006b). Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunol Rev*, 214, 143-154. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00458.x
- Zhang, J., Zheng, H., & Diao, Y. (2019). Natural Killer Cells and Current Applications of Chimeric Antigen Receptor-Modified NK-92 Cells in Tumor Immunotherapy. *Int J Mol Sci*, 20(2). doi:10.3390/ijms20020317
- Zhang, J., & Zhong, Q. (2014). Histone deacetylase inhibitors and cell death. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 71(20), 3885-3901. doi:10.1007/s00018-014-1656-6
- Zhang, Z., Yamashita, H., Toyama, T., Sugiura, H., Omoto, Y., Ando, Y., . . . Iwase, H. (2004). HDAC6 Expression Is Correlated with Better Survival in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 10(20), 6962-6968. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-04-0455
- Zhou, H., Jiang, S., Chen, J., & Su, S. B. (2014). Suberoylanilide hydroxamic acid suppresses inflammation-induced neovascularization. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 92(10), 879-885. doi:10.1139/cjpp-2014-0117
- Zhu, S., Denman, C. J., Cobanoglu, Z. S., Kiany, S., Lau, C. C., Gottschalk, S. M., . . . Lee, D. A. (2015). The narrow-spectrum HDAC inhibitor entinostat enhances NKG2D expression without NK cell toxicity, leading to enhanced recognition of cancer cells. *Pharm Res*, 32(3), 779-792. doi:10.1007/s11095-013-1231-0
- Zhu, S., Phatarpekar, P. V., Denman, C. J., Senyukov, V. V., Somanchi, S. S., Nguyen-Jackson, H. T., . . . Lee, D. A. (2014). Transcription of the activating receptor NKG2D in natural killer cells is regulated by STAT3 tyrosine phosphorylation. *Blood*, 124(3), 403-411. doi:10.1182/blood-2013-05-499707
- Zierau, O., Morrissey, C., Watson, R. W., Schwab, P., Kolba, S., Metz, P., & Vollmer, G. (2003). Antiandrogenic activity of the phytoestrogens naringenin, 6-(1,1-dimethylallyl)naringenin and 8-prenylnaringenin. *Planta Med*, 69(9), 856-858. doi:10.1055/s-2003-43222
- Zingoni, A., Molfetta, R., Fionda, C., Soriani, A., Paolini, R., Cippitelli, M., . . . Santoni, A. (2018). NKG2D and Its Ligands: "One for All, All for One". *Frontiers in Immunology*, 9(476). doi:10.3389/fimmu.2018.00476
- <https://viamedici.thieme.de/lernmodul/549574/subject/biochemie/immunsystem/angebot+und+adaptive+immunantwort/angebot+und+adaptive+immunantwort+überblick>, [Zugriff 27.07.2020]

## 7 Erklärungen zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Abteilung Innere Medizin VIII der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen unter der Betreuung von Herrn apl. Prof. Dr. Ulrich M. Lauer und in enger Kooperation mit der Abteilung für Klinische und Vegetative Physiologie des Physiologischen Instituts des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Dr. Sascha Venturelli durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Dr. Sascha Venturelli.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung von Herrn Dipl.-Biochemiker Christian Leischner und der medizintechnischen Assistentin Frau Andrea Schenk von mir eigenständig und mit Unterstützung durch Frau Schenk durchgeführt.

Teile der durchflusszytometrischen Versuche sowie deren statistische Auswertung wurden durch Herrn Christian Leischner durchgeführt.

Die komplette statistische Auswertung der Zellkultur erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen Menschen danken, die mich bei der Anfertigung und Bearbeitung meiner Dissertation unterstützt haben.

Zuerst gilt mein Dank Herrn apl. Prof. Dr. Ulrich M. Lauer, der mir die Möglichkeit gegeben hat, die Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Im Folgenden möchte ich einen besonderen Dank an Herrn Prof. Dr. Dr. Sascha Venturelli und seine Arbeitsgruppe richten. Herrn Prof. Venturelli danke ich insbesondere für die herausragende Betreuung, die ich während der ganzen Arbeit erfahren durfte. Auf seine Kompetenz, seine Zuverlässigkeit und seine freundliche Betreuung und Beratung konnte ich mich zu jedem Zeitpunkt verlassen.

Ein weiterer sehr großer Dank geht an Herrn Dr. Markus Burkard und Herrn Dipl.-Biochemiker Christian Leischner, die mit ihrer Hilfsbereitschaft und konstruktiven Kritik über die gesamte Arbeit hinweg unglaublich wertvolle Wegbegleiter waren. Weiterhin geht ein großer Dank an die medizintechnischen Assistentinnen Frau Irina Smirnow und Frau Andrea Schenk für ihre Hilfestellungen im Labor. Insbesondere Andreas Geduld und Erfahrung in der Einarbeitung in die Techniken der Zellkultur und Durchführung der Assays haben den Grundstein zum Gelingen dieser Arbeit gelegt.

An die gesamte Arbeitsgruppe gewandt möchte ich mich schließlich für einen ganz besonderen Abschnitt in meinem Leben bedanken. An diese besondere Zeit, die stets vertrauensvolle und angenehme Atmosphäre und vor allem an Euch werde ich mich in Zukunft mit viel Freude zurückerinnern.

Zu guter Letzt will ich mich an dieser Stelle auch ganz besonders bei meiner Familie für ihre uneingeschränkte Unterstützung sowie ihr großes Vertrauen in mich während der gesamten Studienzeit und darüber hinaus bedanken.

