

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Direktorin: Prof. Dr. med. Heike Kielstein

Untersuchungen zur Verteilung von Immunzellen im peripheren Blut in
einem diät-induziert adipösen Rattenmodell nach Tumorinduktion

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dorle Knauf

geboren am 17.09.1989 in Freiberg (Sachsen)

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Heike Kielstein
2. PD Dr. med. Hans-Jürgen Seyfarth (Leipzig)
3. Prof. Dr. med. Thoralf Lange (Weißenfes)

25.09.2018

16.05.2019

Für Opa Günther

Referat

Weltweit ist eine Progredienz von Adipositas und die damit verbundene Zunahme gesundheitlich negativer Auswirkungen innerhalb der Gesellschaft im Hinblick auf das Herz-Kreislauf- und das Immunsystem zu beobachten. Ebenfalls wird zunehmend deutlich, dass Fettleibigkeit auch die Entstehung und Progredienz maligner Neoplasien unterstützt.

Bisherige Studien konnten eine veränderte Immunzellfunktion unter dem Einfluss von Adipositas bzw. im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen nachweisen. Allerdings wurde das Zusammenspiel dieser beiden Erkrankungen und der veränderten Immunzellfunktion bisher nur unzureichend berücksichtigt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Funktionen verschiedener Immunzellen im Hinblick auf die Exposition und Manifestation von Zellen eines Adenokarzinoms der Mamma (MADB106-Zellen) untersucht. Dabei wurde das Verhalten von NK-, B-, T-Zellen und Monozyten unter den Bedingungen einer kurz- bzw. langfristigen Tumorzelleinwirkung sowie unter normaler bzw. adipöser Stoffwechsellage verglichen.

Im Rahmen dieser Untersuchungen erhielten 32 männliche F344-Ratten eine Hochfett-Diät (34 % Rohfettgehalt), wohingegen weiteren 32 Tieren eine Kontrolldiät (4 % Rohfettgehalt) verabreicht wurde. Nachdem die Versuchstiere über einen Zeitraum von sechs bis 10 Wochen mit der entsprechenden Diät gefüttert worden waren, wurden ihnen die MADB106-Zellen bzw. Natriumchlorid als Kontrollsubstanz intravenös über die Schwanzvene injiziert. Die anschließende Tötung der Tiere erfolgte nach 15 Minuten (Kurzzeit-Versuch) bzw. 21 Tagen (Langzeit-Versuch), wonach die im Blut enthaltenen Immunzellen (NK-Zellen, B-Zellen, zytotoxische T-Zellen, T-Helfer-Zellen und Monozyten) mittels Durchflusszytometrie gemessen wurden.

Im Ergebnis zeigten sich unter einer adipösen Stoffwechsellage im Kurzzeit-Versuch peripher verminderte Zellzahlen von NK-Zellen und Monozyten, wohingegen B- und T-Zellen unbeeinflusst erschienen. Im Langzeit-Versuch ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zellzahlen der oben genannten Zelllinien im peripheren Blut.

Somit kann vermutet werden, dass im Rahmen der chronischen low-grade-inflammation bei einer adipösen Stoffwechsellage einige Immunzelltypen diese lokal unterstützen und in das Gewebe abwandern. Folglich sind sie im peripheren Blut vermindert nachweisbar. Unter den Bedingungen einer manifesten Tumorerkrankung im Langzeit-Versuch, werden diese demgegenüber ubiquitär im Organismus benötigt und dahingehend mobilisiert, sodass zahlenmäßig keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der Immunzellpräsenz im Blut zwischen normalgewichtigen und adipösen Ratten nachweisbar sind. In wieweit allerdings dieser vermutete Versuch einer Tumorkontrolle vom Organismus suffizient aufrechterhalten werden kann ist fraglich, da sich im Langzeit-Versuch weiterhin vermehrt oberflächliche

Lungenmetastasen bei adipösen Tieren zeigten. Auch könnten eben diese initial nachweisbaren zahlenmäßigen Einschränkungen der NK-Zellen und Monozyten dafür verantwortlich sein, dass die Ansiedlung der MADB106-Zellen in der Lunge und damit die Ausbildung der Lungenmetastasen bei adipösen Tieren primär möglich ist und schneller voranschreitet.

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Adipositas	1
1.2 Fettgewebe	3
1.3 Einfluss von Adipokinen auf Immunzellen	6
1.4 Mit Adipositas assoziierte Tumorerkrankungen	10
1.5 Zielsetzung	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Versuchstiere und Haltung	13
2.2 Versuchsaufbau	13
2.2.1 Tumormodell	14
2.2.2 Injektion von MADB106-Zellen bzw. NaCl	15
2.3 Gewinnung und Analyse des Probenmaterials	16
2.3.1 Blut- und Organentnahme	16
2.3.2 Lipidextraktion und Konzentrationsbestimmung	17
2.4 Immunologische Untersuchungen	18
2.4.1 PBMC-Isolation und Erythrozytenlyse nach Schwinzer	18
2.4.2 Ermittlung der PBMC-Zahl mittels Neubauer-Zählkammer	18
2.4.3 Färbung spezifischer Immunzellen mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper	19
2.4.4 Durchflusszytometrische Messungen mittels FACS	20
2.4.5 Auswertung FACS	21
2.5 Quantifizierung der NK-Zellen, Tumorzellen und NK-Zell-Tumorzell-Kontakte bzw. oberflächlicher Metastasen im Lungengewebe	24
2.6 Bestimmung der relativen mRNA-Konzentrationen im Milzgewebe von normalgewichtigen bzw. adipösen F344 Ratten mittels <i>Realtime</i> PCR	25
2.7 Statistik	26

3.	Ergebnisse	27
3.1	Gewichtsentwicklung der Versuchstiere	27
3.1.1	Kurzzeit-Versuch	27
3.1.2	Langzeit-Versuch	28
3.2	Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen in der Leber	30
3.3	Fluoreszenz activated cell sorter (FACS)- Messungen im Kurzzeit-Versuch	31
3.3.1	NK-Zellen	31
3.3.2	B-Lymphozyten	32
3.3.3	T-Lymphozyten	32
3.3.4	Zytotoxische (CD8⁺) T-Zellen	33
3.3.5	T-Helferzellen (CD4⁺)	33
3.3.6	Monozyten	34
3.4	Fluoreszenz activated cell sorter (FACS)- Messungen im Langzeit-Versuch	35
3.4.1	NK-Zellen	35
3.4.2	B-Lymphozyten	35
3.4.3	T-Lymphozyten	36
3.4.4	Zytotoxische (CD8⁺) T-Zellen	36
3.4.5	T-Helferzellen (CD4⁺)	37
3.4.6	Monozyten	37
3.5	Quantifizierung der NK-Zellen MADB106-Zellen und NK-Zell-Tumorzell Interaktion, sowie oberflächlicher Lungenmetastasen	38
3.6	Relative mRNA-Konzentration aktivierender und inhibierender NK-Zell- Rezeptoren und von NK-Zell-spezifischen Zytokinen im Milzgewebe	40
3.6.1	Relative mRNA-Konzentrationen im Kurzzeit-Versuch	40
3.6.2	Relative mRNA-Konzentrationen im Langzeit-Versuch	41
4.	Diskussion	43
5.	Zusammenfassung	56
6.	Literaturverzeichnis	58

7.	Thesen	68
	Selbstständigkeitserklärung	
	Erklärung über frühere Promotionsversuche	
	Tabellarischer Lebenslauf	
	Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of Variance
APC	Allophycocyanin
BMI	Body Mass Index
CD	Cluster of Differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CRP	C-Reaktives Protein
DIO	Diet-Induced Obesity
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
IFN γ	Interferon Gamma
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
JAK-STAT	Januskinase - Signal Transducers and Activators of Transcription
KIR	Killer cell Immunoglobulin-like Receptors
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MHC	Major Histocompatibility Complex
MP-NK-Zellen	Marginating-Pulmonary NK-Zellen
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Ms IgM/G	Maus Immunglobulin M/G
NaCl	Natriumchlorid
NKG2D	Natural-Killer Group 2, Member D
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerithrin

PE-Cy7	Phycoerithrin-Cyanin 7
PPAR γ	Peroxisome Proliferator Activate Receptor-Gamma
RPMI Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
SEM	Standard error of the mean
T _{H1/2}	T-Helfer-Zellen 1/2
T _{Reg}	T-Regulatorzellen
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor Alpha
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

Die Weltbevölkerung nimmt beständig zu und gleichzeitig steigt besonders in den Schwellen- und Industrienationen das durchschnittliche Körpergewicht kontinuierlich an und bedroht somit die Gesundheit breiter Bevölkerungsschichten [WHO, 2016]. Es ist schon lange bekannt, dass sich Übergewicht negativ auf das Herz-Kreislauf- und das Immunsystem auswirkt [WHO, 2016]. Des Weiteren steht es auch in Zusammenhang mit der Entstehung einer Reihe maligner Neoplasien [Jemal A *et al.* 2007]. Allerdings sind die genaueren Zusammenhänge bisher weitgehend unverstanden und bedürfen umfassender Untersuchungen.

1.1 Adipositas

Das individuelle Körpergewicht basiert auf einem empfindlichen Gleichgewicht zwischen Energieaufnahme und Energieverbrauch. Der Mensch nimmt Nahrung zu sich, um diese über verschiedene Wege zu verstoffwechseln und um daraus Energie zu gewinnen. Das Gewicht bleibt stabil, solange sich Energieaufnahme und –verbrauch die Waage halten. Überschreitet allerdings die Energiezufuhr den Energieverbrauch, besteht ein Überangebot an Nährstoffen und die Folge ist eine Gewichtszunahme. Die World Health Organisation (WHO) hat zur Klassifizierung der unterschiedlichen Ernährungszustände sechs Kategorien eingeführt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Gewichtsklassifikation der World Health Organisation (WHO)

WHO-Klassifikation	BMI [kg/m ²]	ICD-10
Untergewicht	≤ 18,5	
Normalgewicht	18,5 – 24,9	
Präadipös	25,0 – 29,9	
Adipositas Grad 1	30,0 – 34,9	E66.00
Adipositas Grad 2	35,0 – 39,9	E66.01
Adipositas Grad 3	≥ 40,0	E66.02

Der Body Mass Index (BMI) berechnet sich aus dem Quotienten aus Körpergewicht [kg] und der Körpergröße [m] zum Quadrat. International Classification of Diseases (ICD-10) - Kodierung für unterschiedliche Adipositas-Grade bei Erwachsenen.

Übergewicht (Prä-Adipositas) und Adipositas beschreiben eine übermäßige Fettansammlung, die sich stark auf die Gesundheit auswirken kann.

Der erhöhte Konsum von Lebensmitteln, welche reich an Fett, Salz und Zucker sind, aber nur wenig Vitamine und Minerale enthalten, ist einerseits für die steigenden Zahlen der Adipositas verantwortlich. Andererseits tragen die verminderte Bereitschaft zur Ausführung körperlicher Aktivitäten sowie eine weitgehend automatisierte Lebensweise dazu bei.

Die Prävalenz der Adipositas nimmt weltweit beständig zu und hat sich seit 1980 mehr als verdoppelt. So waren 2014 weltweit 1,9 Milliarden der Erwachsenen übergewichtig, davon über 11 % der Männer und 15 % der Frauen sogar adipös [WHO, 2016]. In den USA sind 70,8 % der Bevölkerung übergewichtig, wovon 33 % als adipös gelten. Im Vergleich dazu belaufen sich die Zahlen der übergewichtigen Menschen in Deutschland auf 60,5 % der Gesamtbevölkerung, wobei 25,1 % davon als adipös einzustufen sind. In den USA überwiegt der Anteil adipöser Frauen, währenddessen in Deutschland die Männer eher zur Fettleibigkeit neigen [WHO, 2011]. Anhand dieser Zahlen wird deutlich, warum die WHO in Bezug auf Adipositas inzwischen von einer Epidemie mit verheerenden Auswirkungen spricht. In diesem Zusammenhang wurde die Adipositas bereits in das systematische Verzeichnis der *International Classification of Diseases* (ICD-10) des Deutschen Instituts für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI) aufgenommen und mit E66.0- kodiert. Ebenfalls wurden die unterschiedlichen Grade der Adipositas verschlüsselt (Tab. 1)

2014 waren ca. 41 Millionen Kinder unter 5 Jahre übergewichtig. In diesem Zusammenhang wird erkennbar, dass Adipositas längst nicht mehr nur ein Problem der Industrienationen ist, denn 35 Millionen dieser Kinder leben in Entwicklungsländern [De Onis *et al.* 2010]. Übergewichtige Kinder neigen im Erwachsenenalter vermehrt zu Adipositas und entwickeln im Laufe ihres Lebens schneller nicht-übertragbare Krankheiten [WHO, 2016]. In den Vereinigten Staaten konnte nachgewiesen werden, dass einhergehend mit der sich ausbreitenden Adipositasepidemie, Typ-2-Diabetes in immer jüngeren Altersgruppen auftritt [Burke JP *et al.* 2002].

Adipositas hat einen starken Einfluss auf Morbidität und Mortalität. Pro Jahr sterben weltweit mindestens 2,8 Millionen Menschen an den Folgen von Adipositas. Davon sind 44 % der Todesfälle auf Diabetes, 23 % auf ischämische Herzerkrankungen und bis zu 33 % auf Tumore unterschiedlichen Ursprungs zurückzuführen [WHO, 2014]. Mit steigendem BMI erhöht sich auch das Risiko für diese nicht-übertragbaren Erkrankungen [WHO, 2016], weshalb die WHO Adipositas als eines der größten Gesundheitsrisiken weltweit einordnet. Sie führt unter anderem zu Hypertonie, welche bei übergewichtigen Menschen ca. fünfmal häufiger auftritt, als bei normalgewichtigen Vergleichspersonen [Hossain P *et al.* 2007]. Des Weiteren bedingt sie eine Dyslipidämie, die wiederum in hohem Maße mit der Entstehung eines Typ-2-Diabetes korreliert und für artherosklerotischen Gefäßwandveränderungen prädispositioniert [Libby P 2007]. Schätzungen haben ergeben, dass 2030 ca. 366 Millionen Menschen, was in etwa 4,3 % der

Weltbevölkerung entspricht, an Adipositas und dem damit assoziierten Typ-2-Diabetes leiden werden [Wild S *et al.* 2004].

Der nicht unwesentliche Einfluss von Fettleibigkeit auf die individuelle Persönlichkeitsentwicklung und sich möglicherweise daraus entwickelnde Störungen, wie Depressionen und Angstzustände [van Hanswijck de Jonge P *et al.* 2003], seien hier nur am Rande erwähnt. Die Einwirkungen von Adipositas auf die Entwicklung und Progression maligner Neoplasien, sowie auf die Metastasierung manifester Tumore, sei hier hingegen besonders betont und stellt den Schwerpunkt dieser Arbeit dar. Adipöse Patienten neigen verstärkt zu malignen Neoplasien und weisen in diesem Zusammenhang erhöhte Rezidivraten sowie schlechtere Überlebenschancen auf [Jemal A *et al.* 2007].

Auch die Auswirkungen von Fettleibigkeit auf das Immunsystem sind keinesfalls unerheblich. Die vom Fettgewebe sezernierten Adipokine beeinflussen sowohl das angeborene, als auch das erworbene Immunsystem [Lago F *et al.* 2007]. Neben diesen wirken der verstärkte Metabolismus der Immunzellen und epigenetische Faktoren ebenfalls auf den individuellen Immunstatus. In verschiedenen tierexperimentellen und klinischen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Übergewicht die Anfälligkeit gegenüber bakteriellen oder viralen Infektionen erhöht [Karlsson EA *et al.* 2010]. Die genauen systemischen Auswirkungen von Adipositas auf das Immunsystem konnten bisher allerdings nur in wenigen Studien nachgewiesen werden. Beispielsweise bedarf es in Zukunft noch genauerer Untersuchungen im Hinblick auf die Funktionsweise verschiedener Immunzellen (Natürliche Killer (NK) - Zellen, Makrophagen) unter Adipositas oder der systemischen Wirkung von Adipokinen in diesem Zusammenhang.

1.2 Fettgewebe

Der Begriff Fettgewebe beschreibt einen spezialisierten Gewebetyp, der histologisch aus einem Zellverband von Adipozyten besteht, welche sich aus mesenchymalen Vorläuferzellen entwickelt haben. Die terminale Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten wird von einer vermehrten Lipideinlagerung begleitet. Der Großteil der Zellen reift heran, ein Rest an pluripotenten Stammzellen bleibt erhalten und steht bei Zellverlusten (Alter, Verletzungen) als Reserve zur Verfügung.

Hinsichtlich seiner Funktion unterscheidet man einerseits „Baufett“, welches in Fettkörpern organisiert ist, als Polsterung und Verschiebeschicht dient und sich beispielsweise in der Orbita, im Nierenlager und an der Fußsohle befindet. Andererseits definiert man das „Speicherfett“, das der Speicherung von Nahrungsenergie dient und in der Subkutis, am Bauch und am Gesäß angelegt wird.

Histologisch besteht das Fettgewebe aus Adipozyten. Je nach Art des Fettgewebes können die Fettzellen eine große, mit Lipiden gefüllte, Vakuole enthalten. In diesem Fall spricht man vom „weißen“ bzw. univakuolärem Fett, welches wiederum als Speicherfett fungiert. Adipozyten können aber auch mehrere kleine Vakuolen enthalten und in dieser Form als „braunes“ bzw. plurivakuoläres Fett zur Wärmeerzeugung genutzt werden. Die Färbung dieses speziellen Gewebetyps ist durch einen hohen Zytochrom-Gehalt in den zahlreichen Mitochondrien bedingt. Beim Menschen liegt die Bedeutung dieses zuletzt genannten Fetttyps besonders in der Säuglingszeit, um das thermoregulatorisch ungünstige Verhältnis zwischen Wärmeproduktion und -abgabe über die Körperoberfläche zu verbessern. Im Erwachsenenalter atrophiert es und lässt sich daher nur noch in sehr geringen Mengen finden. Das weiße Fettgewebe ist der beim Menschen dominierende Gewebetyp und befindet sich hauptsächlich in zwei anatomischen Gebieten des menschlichen Körpers: subkutan (Unterhautfettgewebe) und intraperitoneal (Viszeralfett), welches gesundheitsbezogen die prognostisch ungünstigere Variante bspw. bei der Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen darstellt [Canoy D *et al.* 2007]. Inzwischen konnte belegt werden, dass eine Korrelation zwischen der Menge an viszeralem Fettgewebe und dem Gesamtkörperfettgehalt vorliegt. So weisen adipöse Individuen einen erhöhten Anteil an Viszeralfett auf [Hallgreen CE *et al.* 2008]. Frauen lagern generell mehr Fett ein und weisen hinsichtlich der Fettverteilung deutliche Unterschiede im Vergleich zu Männern auf. Messungen haben gezeigt, dass Frauen ca. 50 % der Nahrungslipide an Viszeralfett einlagern, im Gegensatz zu Männern, die 98 % der Nahrungslipide in diesen Fettdepots anlegen, woraus letztlich der allgemeine „Bierbauch“ resultiert [Pou KM *et al.* 2007].

Allerdings ist das Fettgewebe nicht nur ein Ort, an welchem Energiereserven in Form von Fettvakuolen der Adipozyten gespeichert werden. Vielmehr ist es ein komplexes endokrines Organ, in dem Adipozyten, Immunzellen und Endothelzellen eine Vielzahl von biologisch aktiven Proteinen, Hormonen, Zytokinen und Chemokinen mit unterschiedlichen Aufgaben sezernieren. Beispielsweise üben diese Einfluss auf die körpereigene Immunität, Angiogenese, Fettstoffwechsel und Hämostase aus [Trayhurn P *et al.* 2004]. Diese Mediatorstoffe werden im Allgemeinen als Adipokine bezeichnet. Es handelt sich dabei beispielsweise um Leptin, Adiponektin, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF α), Interleukin (IL-) 6, Lipoproteinlipase (LPL) und viele weitere [Kershaw EE *et al.* 2004]. Nicht alle Adipokine werden ausschließlich vom Fettgewebe sezerniert. Akutphaseproteine (C-Reaktives Protein (CRP), Haptoglobin und Amyloid A) werden in der Leber synthetisiert und IL-6, IL-8, IL-10 und IL-1 β , sowie TNF α werden zusätzlich auch von anderen Zellen in den Blutkreislauf gegeben [Fain JN 2010].

Leptin ist ein Protein, welches beim Menschen vom weißen Fettgewebe gebildet und vom obese-Gen (ob-Gen) kodiert wird. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Energiehaushaltes. In der letzten Zeit gibt es vermehrt Hinweise darauf, dass es auch auf entzündliche Prozesse im Körper Einfluss nimmt [Fantuzzi G 2005]. Leptin beeinflusst die

Funktion von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) [Wrann CD *et al.* 2012], Lymphozyten [Palmer G *et al.* 2006] und erhöht die Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch Monozyten und Makrophagen [Martin-Romero C *et al.* 2000]. Zudem fördert es die Bildung reaktiver O₂-Spezies in Neutrophilen Granulozyten [Caldefie-Chezet F *et al.* 2001].

Adiponektin kann als Gegenspieler zu Leptin und den anderen Mediatoren des Fettstoffwechsels angesehen werden. Es wirkt sowohl pro- als auch antiinflammatorisch [Fantuzzi G 2008] und seine Wirkung ist unter Adipositas vermindert. Der Adiponektinspiegel sinkt unter dem Einfluss einer adipösen Stoffwechsellage, bedingt durch die vermehrte Präsenz und Einwirkung spezieller Zytokine, wie IL-6 und TNF α [Bruun JM *et al.* 2003]. Seine funktionale Bedeutung erhält es aus der Erkenntnis, dass es bei exogener Gabe adipöse Mäuse vor den Begleiterkrankungen der Fettleibigkeit schützt [Yamauchi T *et al.* 2003]. Initial wurde Adiponektin besonders im Rahmen seiner Wirkung auf den Energiehaushalt beschrieben, neuere Erkenntnisse ergeben zudem eine weitere Wirkung auf hämatopoetische Stammzellen [Yamauchi T *et al.* 2001].

TNF α wird unter adipöser Stoffwechsellage verstärkt sezerniert und besitzt zudem proapoptische Eigenschaften [Warne JP 2003]. Zusätzlich stellt TNF α einen potenten Stimulus für die IL-6-Synthese in Adipozyten dar. Dies führt schließlich dazu, dass ungefähr ein Drittel der im Blut zirkulierenden IL-6-Menge dem Fettgewebe entstammt und daher mit dem BMI korreliert [Mohamed-Ali V *et al.* 2001].

Adipöse Patienten sind neben vermehrtem Fettgewebe auch durch eine veränderte Stoffwechsellage gekennzeichnet, wodurch die Adipokinspiegel im Plasma beeinflusst werden. Hauptsächlich handelt es sich dabei um pro-inflammatorische Adipokine [Fain JN 2010]. Aus diesem Grund und zuzüglich als Folge des Umstandes, dass unter adipösen Bedingungen die Zahl der zirkulierenden Leukozyten erhöht ist [Zaldivar F *et al.* 2006], wird im Zusammenhang mit Fettleibigkeit von einer chronischen low-grade-inflammation gesprochen [Scherer PE 2006]. Eine weitere Ursache dafür könnte die durch eine überdurchschnittliche Expansion der Fettzellen bedingte Hypoxie sein. Die Größenzunahme der Zellen eilt der Vaskularisierung voraus, was schließlich eine Sauerstoffunterversorgung bedingt [Rausch ME *et al.* 2008]. Diese Fettgewebshypoxie verstärkt die Expression proinflammatorischer Gene und senkt gleichzeitig den Adiponektinspiegel [Hosogai N *et al.* 2007]. Diese schwache, aber kontinuierliche Entzündung ist möglicherweise eine der Ursachen für Adipositas-assoziierte Erkrankungen, wie Typ-2-Diabetes, Atherosklerose [Schindler TH *et al.* 2006] und verschiedene maligne Tumorerkrankungen [Bianchini F *et al.* 2002]. Zwar erlauben einige Versuchsanordnungen die systematische Analyse des Fettgewebes hinsichtlich der Genexpression und ebenfalls konnte bereits eine Korrelation zwischen dem messenger Ribonukleinsäure (mRNA) - Gehalt von Fett- bzw. Nicht-Fettzellen und deren spezifischer Adipokinsekretion nachgewiesen werden [Fain JN 2010], so sind jedoch bisher die genauen Mechanismen für den erhöhten Serumspiegel von

inflammatorischen Mediatorstoffen unter Adipositas noch weitgehend unverstanden [Clement K *et al.* 2007]. Zukünftige Studien sollten sich daher auf ein genaueres Verständnis bezüglich der Genexpression und der daraus resultierenden Adipokinsekretion in unterschiedlichen humanen Fettgewebstypen konzentrieren.

1.3 Einfluss von Adipokinen auf Immunzellen

Wie im vorangegangenen Kapitel bereits erwähnt, haben Adipokine einen bedeutenden Einfluss auf das Immunsystem. Sowohl NK-Zellen, B- und T-Lymphozyten, als auch Makrophagen werden durch diese beeinflusst und erfüllen damit wesentliche Schlüsselfunktionen, sowohl in der angeborenen, als auch in der erworbenen Immunabwehr.

NK-Zellen sind Teil des angeborenen Immunsystems und entsprechen mit 10-15% der drittgrößten Klasse, der im Blut zirkulierenden Lymphozyten. Einerseits aktivieren sie über Zytokinsekretion, beispielsweise von Interferon Gamma ($\text{IFN}\gamma$), $\text{TNF}\alpha$, IL-2 und IL-10, indirekt andere Immunzellen. Andererseits können sie infizierte oder veränderte Zellen direkt zerstören [Vivier E *et al.* 2008]. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von viralen- und bakteriellen Infektionen und von Tumorzellen [Papamichail M *et al.* 2004]. Besonders in viszeralen Fettdepots kommt es zur NK-Zell-Akkumulation, wo sie verstärkt proinflammatorische Adipokine sezernieren [O'Rourke RW *et al.* 2009].

Humane NK-Zell-spezifische Oberflächenmoleküle sind Cluster of Differentiation (CD)-16 und CD56 (Fc γ -Rezeptoren III), wohingegen CD3 (T-Zell-Rezeptor) auf der NK-Zell-Oberfläche nicht exprimiert werden. Anhand der unterschiedlichen Dichte dieser Oberflächen-Antigene können sie in zwei Subpopulationen unterschieden werden [Lanier LL *et al.* 1986]: ca. 90 % der NK-Zellen zeigen eine geringere Expression von CD56 (CD56^{dim}) und hohe Expression von CD16 ($\text{CD16}^{\text{bright}}$), dagegen exprimieren die restlichen ca. 10 % $\text{CD56}^{\text{bright}}$ und CD16^{dim} . Bedingt durch diese Markierungsmuster der NK-Zellen kommt es zu unterschiedlicher Funktionalität der beiden Sub-Populationen. Die im peripheren Blut und in der Milz vorzugsweise anzutreffenden $\text{CD56}^{\text{dim}}\text{CD16}^{\text{bright}}$ -NK-Zellen weisen eine erhöhte Zytotoxizität auf. Sie sind für die Beseitigung von Ziel-Zellen durch Rezeptorbindung und Sezernierung zytotoxischer Granula verantwortlich. Dagegen sind die in Lymphknoten und Tonsillen hauptsächlich vorkommenden $\text{CD56}^{\text{bright}}\text{CD16}^{\text{dim}}$ -NK-Zellen auf die Sezernierung von Zytokinen (u.a. $\text{IFN}\gamma$, TNF) spezialisiert und tragen somit zur Immunantwort bei [Cooper MA *et al.* 2001; Farag SS *et al.* 2006].

Weiterhin haben NK-Zellen ein großes Rezeptorrepertoire, wobei man grundlegend zwischen zwei Gruppen von Rezeptoren unterscheidet. Die eine Gruppe interagiert mit Major Histocompatibility Complex (MHC) - Klasse-I-Molekülen, wodurch Quantität und Qualität des

Proteinkomplexes durch NK-Zellen überprüft werden können. Vertreter dieser Rezeptorgruppe sind unter anderen Killer cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) und Natural-Killer Group 2, Member D Receptors (NKG2D) [Waldhauer I *et al.* 2008]. Die andere Gruppe geht keine Verbindung mit MHC-Klasse-I-Molekülen ein. Beispiele hierfür sind CD2 [Tangye SG *et al.* 2000] und CD16 (Fc-Rezeptor) [Brunetta E *et al.* 2010]. Um veränderte NK-Zellfunktionen unter Adipositas besser verstehen zu können, muss man die unterschiedliche Rezeptorexpression betrachten. Dabei wird die Aktivität von NK-Zellen über das Gleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren reguliert. Inhibierende Rezeptoren, wie KIRs beim Menschen und Ly49 bei Nagetieren, erkennen sowohl MHC-Klasse-I-Moleküle als auch Nicht-MHC-Klasse-I-Moleküle und tragen somit zur Beseitigung von beschädigten Zellen bei. Dies geschieht im Sinne der „missing self“ Hypothese, indem sie die fehlende Präsenz von MHC-Klasse-I-Molekülen erkennen und die betroffene Zelle eliminieren [Anfossi N *et al.* 2006; Kim S *et al.* 2005; Ljunggren HG *et al.* 1990]. Dem gegenüber binden aktivierende NK-Zell-Rezeptoren, wie NKp30, NKp46 und NKG2D, vorwiegend an Bindungsmoleküle, die von Tumorzellen exprimiert werden [Inngjerdingen M *et al.* 2011]. In jedweder Hinsicht entfalten NK-Zellen ihre Zytotoxizität, nachdem sie „markierte Zellen“ erkannt haben. Durch die Sekretion von Granzymen und Perforin, aus intrazellulären Granula, leiten sie schließlich die Membranzersetzung und damit die Apoptose der Zielzellen ein [Cullen SP *et al.* 2008].

NK-Zellen können ebenfalls Leptin-Rezeptoren (Ob-Rb) exprimieren, über welche ihre Zytotoxizität und Proliferation beeinflusst werden kann [Zhao Y *et al.* 2003]. Eine kurzfristige Leptineinwirkung führt zu einer Zytotoxizitäts- und Proliferationssteigerung der NK-Zellen, wohingegen sich die Inkubation über vier Tage hemmend auf die Zellfunktion auswirkt [Wrann CD *et al.* 2012]. Bei fettleibigen Versuchstieren konnte eine Leptinresistenz der NK-Zellen nachgewiesen werden. Diese ist nicht auf die verminderte Expression von Ob-Rezeptoren zurückzuführen, sondern beruht vielmehr auf einer veränderten Signalkaskade nach Rezeptorkontakt [Nave H *et al.* 2008]. Die Regulierung der Zellzahl und -funktion geschieht weiterhin durch das umgebende metabolische und endokrine Mikromilieu. Die durch Adipositas erhöhte Zytokinkonzentration, beispielsweise von IL-15, IL-2 und IFN γ , beschleunigt die Zellproliferation [Wiltrout RH 2000; Ranson T *et al.* 2003; Elinav E, Pappo O *et al.* 2006]. Im Jahr 2009 gelang es Lautenbach *et al.* anhand von tierexperimentellen Arbeiten *in vitro* und *in vivo* zu belegen, dass der NK-Zell-Phänotyp vom Umgebungsmilieu der Zellen abhängt. [Lautenbach A, Wrann CD *et al.* 2009]. Bisher konnten die genauen Mechanismen für den Einfluss des Umgebungsmilieus auf NK-Zellen noch nicht ausreichend aufgeschlüsselt werden. Sicher ist jedoch, dass sich eine NK-Zell-Dysfunktion auf das Immunsystem im Hinblick auf den verminderten Schutz gegenüber systemischer Infektionen, sowie mangelnder Tumorkontrolle auswirkt.

Die vielseitige Wirkung von Adipokinen auf Immunzellen soll beispielhaft noch an den B- und T-Lymphozyten verdeutlicht werden. Sie sind im Gegensatz zu den NK-Zellen Teil des adaptiven/erworbenen Immunsystems und dienen hauptsächlich der Abwehr von Fremdstoffen, insbesondere von Infektionserregern. Sie können sich allerdings auch gegen veränderte körpereigene Zellen, wie zum Beispiel Tumorzellen, richten.

B-Zellen reifen im Mucosa Associated Lymphoid Tissue (MALT) von Nasen-, Bronchial- und Vaginalschleimhaut sowie den Schleimhäuten des Magen-Darm-Traktes und in den Lymphknoten heran und produzieren spezifische Antikörper gegen fremde Antigene. Als spezifische Oberflächenmoleküle weisen sie CD19 und CD20 auf. Nachdem das fremde Antigen durch die B-Zelle aufgenommen und prozessiert wurde, werden die Fragmente mittels MHC-II-Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert. T_{H2}-Zellen erkennen diese Infektion und es bildet sich ein T-B-Konjugat, wodurch die B-Zelle zur Proliferation und zur Produktion großer Mengen Antikörper veranlasst wird.

T-Zellen dagegen werden im Thymus gebildet und erkennen direkt fremde Zellen. Man unterscheidet T-Helfer-Zellen (T_{H1}/T_{H2}), welche auf ihrer Oberfläche CD3, CD4 und T-Zell-Rezeptoren (TCR) exprimieren und zytotoxische T-Zellen mit CD8 als spezifisches Differenzierungsmuster. T-Helfer-Zellen sind ebenfalls auf die Wechselwirkung mit MHC-II-Molekülen angewiesen. T_{H1}-Zellen aktivieren Makrophagen und T_{H2}-Zellen dienen, wie bereits erwähnt, der Aktivierung von B-Lymphozyten. Zytotoxische T-Zellen hingegen bedürfen der Präsentation intrazellulärer Erreger mittels MHC-I-Molekülen an der Zelloberfläche. Letztlich leiten sie mittels Perforin und Granzymen, bzw. über Präsentation des Fas-Liganden auf der Oberfläche der infizierten Zelle, die Apoptose ein und führen schließlich zur Zelllyse.

Neben einer Vielzahl anderer Rezeptoren exprimieren B- und T-Lymphozyten ebenfalls Leptinrezeptoren, wodurch sie sowohl einen entscheidenden Einfluss auf hungerinduzierte Immunsuppression als auch auf Insulinresistenz bei Adipositas haben [Feuerer M *et al.* 2009]. Weitere Studien haben gezeigt, dass Fettleibigkeit eine verstärkte Infiltration des Fettgewebes durch T-Zellen bedingt [Wu H *et al.* 2007]. Leptin reguliert zudem die Proliferation und Aktivierung von T-Zellen, indem es unter anderem den Eintritt der Zellen in die Apoptose verhindert [Fantuzzi G 2005] und generell die Lymphozytenfunktion einschränkt [Palmer G *et al.* 2006]. Weiterhin wirkt es sich negativ auf die Proliferationsfähigkeit von Regulator-T-Zellen, einer Untergruppe der T-Lymphozyten, aus [De Rosa V *et al.* 2007].

Makrophagen sind große, bewegliche, einkernige Immunzellen und Bestandteil des mononukleär-phagozytären Systems (MPS), in dessen Rahmen sie vielfältige Funktionen hinsichtlich der Erregerabwehr erfüllen. Sie entstehen aus im Blut zirkulierenden peripheren Monozyten, die ins Gewebe migrieren, um dort zu Gewebsmakrophagen zu differenzieren. Einige ihrer wesentlichen Funktionen sind die Phagozytose von Mikroorganismen, die

Antigenpräsentation mit Hilfe von MHC-II-Molekülen zur Aktivierung von T-Helfer-Zellen und schließlich die Produktion pro- und antiinflammatorischer Zytokine.

Unter Adipositas kommt es zur lokalen Gewebsnekrose, da durch die Hypertrophie der Adipozyten teilweise hypoxische Areale im Fettgewebe entstehen [Rausch ME *et al.* 2008]. Makrophagen, der bisher meist erforschte Zelltyp im Fettgewebe, sammeln sich in diesen Bereichen an und können schließlich über 50 % des Fettgewebes ausmachen [Weisberg SP *et al.* 2003]. Neben der Phagozytose von abgestorbenem Zellmaterial sezernieren sie, über Interaktion der Fresszellen mit den Adipozyten, eine Vielzahl proinflammatorischer Zytokine und gelten daher heute als die hauptsächliche Quelle vieler Entzündungsmediatoren unter Adipositas [Lumeng CN *et al.* 2007]. Es gibt Hinweise, dass beinahe die vollständige TNF α -Sekretion, große Mengen von IL-6 sowie induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthase (NO-Synthase) auf die Produktion durch Fettgewebsmakrophagen zurückzuführen sind [Xu H *et al.* 2003]. Darüber hinaus haben myloidspezifische Knockout-Studien ergeben, dass Fettgewebsmakrophagen eine entscheidende Rolle bei Adipositas-assoziierten Erkrankungen, wie Insulinresistenz und Diabetes-Typ-2, einnehmen [Arkan MC *et al.* 2005].

Wie bereits bei den NK-Zellen erwähnt, unterliegen auch Makrophagen dem Einfluss des sie umgebenden Mikromilieus [Gordon S *et al.* 2005]. Sie können zum einen mittels Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) zu beschädigten Gewebearealen gelockt werden, wo sie unter anderem eine Entzündungsreaktion hervorrufen [Kanda H *et al.* 2006]. Dies entspricht der „klassischen Aktivierung“ von M1-Makrophagen, welche darauf große Mengen IL-12, TNF α , IL-1 β und IL-6 sezernieren und freie Sauerstoffradikale bilden [Gordon S *et al.* 2005]. M2-Makrophagen hingegen unterliegen einem alternativen Aktivierungsmechanismus [Lumeng CN *et al.* 2007], bei welchem sie durch T_{H2}-spezifische Zytokine, wie IL-4 und IL-13, dazu angeregt werden, geringere Mengen proinflammatorischer Zytokine zu produzieren. Stattdessen sezernieren sie IL-10, das durch seine immunsuppressive Wirkung gekennzeichnet ist [Gordon S *et al.* 2005]. Diese „alternative Aktivierung“ der M2-Phänotypen von Makrophagen beruht auf der Anregung des Peroxisome Proliferator Activated Receptor-Gamma (PPAR γ). Odegaard *et al.* konnten 2007 in diesem Zusammenhang eine Korrelation zwischen einem defektem PPAR γ und der Prädisposition gegenüber Adipositas und Insulinresistenz nachweisen [Odegaard JI *et al.* 2007].

Zusammenfassend ist zu festzustellen, dass der Einfluss von Adipositas auf das angeborene und erworbene Immunsystem bisher nur unvollständig entschlüsselt werden konnte. Zwar liegen einige Beweise dafür vor, dass ein hoher BMI diverse Signalkaskaden in der Immunantwort beeinträchtigt, die genauen molekularen Mechanismen sind allerdings noch weitgehend unverstanden.

1.4 Mit Adipositas assoziierte Tumorerkrankungen

Die Ergebnisse einer Reihe epidemiologischer Studien verdeutlichen, dass die steigende Anzahl von adipösen Menschen mit einer steigenden Anzahl tumorbedingter Todesfälle korreliert [Calle EE *et al.* 2004]. Bedingt durch die Aktivierung von Onkogenen bzw. die Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen basiert die Entstehung eines Tumors auf genetischen Mutationen, welche Zellen dazu veranlassen, sich unkontrolliert zu teilen [Futreal PA *et al.* 2004].

Hinsichtlich der Statistiken des Continuous Update Projects (CUP) des World Cancer Research Fund International, stellt ein übermäßiges Körpergewicht einen Risikofaktor bzgl. der Entstehung fast aller Tumorarten dar [WCRFI - CUP, 2017]. Die aktuellen Daten einer amerikanischen Querschnittsstudie zeigen, dass über einen Betrachtungszeitraum von insgesamt neun Jahren eine steigende Inzidenz bei der Entwicklung von mindestens 13 verschiedenen malignen Neoplasien in Zusammenhang mit Adipositas vorlag [Steele CB *et al.* 2017].

Bestehende Unterschiede hinsichtlich der Tumorerkrankungen in unterschiedlichen Ländern sowie veränderte Inzidenzen bei einigen Tumorerkrankungen innerhalb eines Landes geben Grund zu der Annahme, dass Umwelt und Lifestyle wesentlichen Einfluss auf die Tumorgenese ausüben. Fettleibigkeit fördert die Tumorentstehung in unterschiedlichen Körperregionen, wie beispielsweise im Kolon [Giovannucci E *et al.* 2007; Kim Y *et al.* 2009], in den Nieren [Pischon T *et al.* 2006; Renehan AG, Tyson M *et al.* 2008], in der Prostata [Naghma K *et al.* 2010; Frankenberry KA *et al.* 2004] sowie in den Brustdrüsen [Willett WC 2001].

Die genauen Zusammenhänge bei diesem Sachverhalt sind bisher noch weitgehend unverstanden. Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass Leptin und andere Mediatorstoffe unter Adipositas einen wesentlichen Einfluss auf die Tumorgenese besitzen, indem sie das immunologische Gleichgewicht beeinflussen [De Rosa V *et al.* 2007; La Cava A *et al.* 2004]. Leptin kann einerseits mitogen wirken, indem es mit Rezeptoren von Wachstumsfaktoren interagiert, wodurch eine übermäßige Zellproliferation ausgelöst werden kann [Renehan AG, Roberts DL *et al.* 2008]. Andererseits können Adipokine auch zur Immunantwort gegen entartete Zellen benutzt werden. Leptin induziert beispielsweise unter bestimmten Bedingungen die NK-Zellaktivität und wirkt damit dem Tumorwachstum entgegen [Elinav E, Abd-Elnabi A *et al.* 2006].

Knockout-Mäuse zeigten im Hinblick auf Adiponektin ein ungehemmtes Tumorwachstum von subkutan implantierten Zellen eines Melanom-Subtyps bzw. eines Lungenkarzinoms. Immunhistochemisch wurde dabei unter Adiponektin-Mangel eine verminderte Rekrutierung von Makrophagen in das Tumorgewebe beobachtet, wobei die Tumorzellteilung, -apoptose oder tumorassoziierte Angiogenese unbeeinflusst blieben [Sun Y *et al.* 2010].

Brustkrebs stellt ein zunehmend häufigeres Krankheitsbild im Fachbereich Onkologie dar. Statistisch entwickelt eine von acht Frauen im Laufe ihres Lebens ein Mammakarzinom, wobei

30 % dieser Frauen an den Folgen der Erkrankung versterben [Orlando L *et al.* 2007]. Adipositas stellt einen von vielen Risikofaktoren in Bezug auf Brustkrebs dar. Fettgewebe ist als endokrines Organ in der Lage, große Mengen an Östrogen zu speichern [Henderson BE *et al.* 2000], welches wiederum die Zelldifferenzierung, -proliferation und Apoptose beeinflusst [Calle EE *et al.* 2004]. Ebenfalls wurden für Leptin [Dieudonne MN *et al.* 2002] und IGF-I [Calle EE *et al.* 2004] stimulierende Effekte in Bezug auf Brustkrebs nachgewiesen. Lautenbach *et al.* konnten tierexperimentell belegen, dass sehr hohe Dosierungen von Leptin zu einer verminderten Tumorzellproliferation führen, wogegen Östrogen unabhängig von der Dosierung die Proliferation steigert. IGF-I bedingt ebenfalls eine Zunahme der Zellzahl, allerdings kommt es bei sehr niedrigen Konzentrationen dieses Stoffes sogar zum Rückgang der Zellzahlen. Das Tumorwachstum, das bei adipösen Individuen um 90 % stärker beobachtet wurde als bei vergleichbaren normalgewichtigen Ratten, ist schließlich abhängig von der Einwirkungszeit, Konzentration und besonders der Kombination der beschriebenen Mediatoren. Den größten Effekt bewirkt die synergistische Wirkung von Östrogen und IGF-I, gefolgt von Leptin mit IGF-I und die geringste Auswirkung auf die Tumorzellproliferation hat Leptin in Verbindung mit Östrogen. Leptin allein besitzt antiproliferative Effekte, wohingegen es in Verbindung mit anderen Mediatoren stimulierende Effekte auf die Entwicklung von Brustkrebs zeigt [Lautenbach A, Budde A *et al.* 2009].

In den USA werden jährlich 1,5 Millionen Tumore neu diagnostiziert, von denen 50 % auf eine ungesunde Lebensweise zurückzuführen sind und damit vermeidbar wären [Buc E *et al.* 2006]. Maligne Neubildungen der Prostata bei Männern (25,7 %) und der Brustdrüse bei Frauen (32,1 %) stellen nach Angaben des Robert-Koch-Instituts die häufigsten Krebsneuerkrankungen in Deutschland dar. An zweiter Stelle folgen für beide Geschlechter Tumorerkrankungen des Darms (Männer: 14,3 %, Frauen: 13,5 %) [RKI, 2012]. Dieser Trend an Tumorneuerkrankungen verdeutlicht ebenfalls, dass die Art der modernen Lebensgestaltung mit wenig Bewegung, schneller Nahrungsaufnahme und vielen verschiedenen Stressfaktoren im Alltag einen wesentlichen Einfluss auf die Gesundheit besitzt. Es bedarf noch ausführlicherer Forschung, inwieweit Adipositas auf die Tumorgenese unterschiedlicher Gewebetypen Einfluss nimmt. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen an Ratten sind ein Beitrag zur Klärung der Mechanismen, welche hinter der Entstehung von Krebs bei Adipositas stehen.

1.5 Zielsetzung

Adipositas ist assoziiert mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Beeinträchtigungen des Immunsystems. Von erheblicher Bedeutung ist, dass Fettleibigkeit weiterhin die Entstehung und Progredienz maligner Neoplasien unterstützt. Die pathophysiologischen Zusammenhänge für diesen Sachverhalt sind bisher jedoch noch weitgehend unverstanden.

Bisherige Studien ließen eine veränderte Immunzellfunktion unter Adipositas erkennen. Allerdings wurde speziell der Zusammenhang einer unter Adipositas veränderten Immunzellfunktion und der vermehrten Entstehung von Tumorerkrankungen bei Adipositas bisher wenig betrachtet.

Diese Untersuchungen sind Gegenstand der hier vorliegenden Arbeit. In einem Rattenmodell der diät-induzierten Adipositas (DIO; diet-induced obesity) wurden die Funktionen verschiedener Immunzellen im Blut nach der Induktion von Lungenmetastasen eines Adenokarzinoms der Mamma (MADB106-Zellen) untersucht.

Fragestellungen der Arbeit waren:

1. Wie war der Gewichtsverlauf über 6 bzw. 10 Wochen hochkalorischer Diät?
2. Wie veränderte sich die Triglycerid- und Cholesterinkonzentration in der Leber der Versuchstiere?
3. Welchen Einfluss hat die Adipositas auf die Anzahl verschiedener Immunzellen (NK-Zellen, B-/T-Lymphozyten, zytotoxische T-Zellen, T-Helferzellen und Monozyten) im peripheren Blut bei normalgewichtigen und adipösen Ratten unter einer kurzzeitigen Exposition gegenüber MADB106-Zellen.
4. Wie verändern sich die oben genannten Immunzellzahlen im peripheren Blut bei normalgewichtigen und adipösen Ratten unter langfristiger Tumorzellexposition?
5. Kommt es bei adipösen Tieren zu einem verstärkten Tumorwachstum?

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Haltung

Für die Experimente wurden 64 männliche F344-Ratten mit einem initialen Körpergewicht von 183 ± 6 g (Kurzzeit-Versuch) bzw. 196 ± 8 g (Langzeit-Versuch) der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Alle Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg gehalten. Dabei herrschten in schallgeschützten konstant temperierten Schränken ein Hell-Dunkel-Rhythmus von jeweils 12h (Tagzyklus von 6 Uhr bis 18 Uhr), eine Temperatur von 23 ± 1 °C und eine Luftfeuchtigkeit von 50 % - 60 %. Die Tiere wurden einzeln in Käfigen (40 x 26 x 15 cm) aus durchsichtigem Polycarbonat mit Gitterdeckel gehalten, in welchen sie sich frei bewegen konnten. Der Käfigboden war mit Einstreu ausgelegt.

Die Tiere hatten jederzeit über die Raufe Zugang zu ihrem spezifischen Futter und wurden somit ad libitum gefüttert. Im Versuch erhielten die Tiere entsprechend ihrer randomisierten Gruppeneinteilung entweder eine DIO-Diät mit einem Rohfettgehalt von 34 % (C1090-60; 60 % der umsetzbaren Energie aus Fett, Altromin GmbH, Lage, Deutschland) oder eine entsprechende Kontrolldiät (Ko) mit einem Rohfettgehalt von 4 % (C1090-10; 10 % der umsetzbaren Energie aus Fett; Altromin). Wasser stand den Tieren jederzeit in Trinkflaschen zur Verfügung.

Des Weiteren wurden die Versuchstiere einmal in der Woche gewogen und einem Handling unterzogen. Das Handling beinhaltete die Kontaktaufnahme und das Streicheln der Tiere, wodurch diese sich an den Eigengeruch und die Stimme der betreuenden Personen gewöhnen konnten und Stress reduziert wurde. Alle in dieser Dissertation durchgeführten Versuche waren durch das Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt genehmigt (Aktenzeichen: 42502-2-1116MLU).

2.2 Versuchsaufbau

Nach einer Akklimatisierungsphase von einer Woche, in welcher alle 64 Tiere das nachfolgend beschriebene Kontrollfutter erhielten, wurden die Ratten gewichtsadjustiert auf zwei Gruppen verteilt. Um eine adipöse Stoffwechsellage herbeizuführen, erhielten 32 Ratten die o.g. DIO-Diät (34 % Rohfettgehalt), wohingegen den restlichen 32 Tieren weiterhin die Kontrolldiät (4 % Rohfettgehalt) verabreicht wurde. Nachdem die Versuchstiere über einen Zeitraum von sechs bis 10 Wochen mit der entsprechenden Diät gefüttert worden waren, erfolgte eine weitere

gewichtsadjustierte Einteilung in Untergruppen. Im Folgenden wurden ihnen 10^6 Zellen eines syngentisch hergestellten Adenokarzinoms (MADB106) bzw. Natriumchlorid (NaCl) als Kontrollsubstanz intravenös (i.v.) über die Schwanzvene injiziert. Die Gruppen wurden fortan wie folgt benannt: DIOMADB106 bzw. DIONaCl für alle Tiere, welche in dem genannten Zeitraum die DIO-Diät erhalten hatten und später Tumorzellen bzw. Natriumchlorid injiziert bekamen und KoMADB106 bzw. KoNaCl für alle Ratten, die eine Kontrolldiät bekommen hatten und im Nachhinein ebenfalls Tumorzellen bzw. Natriumchlorid injiziert bekamen. Nach 15 Minuten (Kurzzeit-Versuch) bzw. 21 Tagen (Langzeit-Versuch) wurden die Tiere getötet (Abb.1).

Letztlich ergaben sich folglich acht Gruppen mit entsprechenden Versuchstieren (n=8), welche sich hinsichtlich der Diät, Tumorzellinjektion und des Tötungszeitpunktes unterschieden.

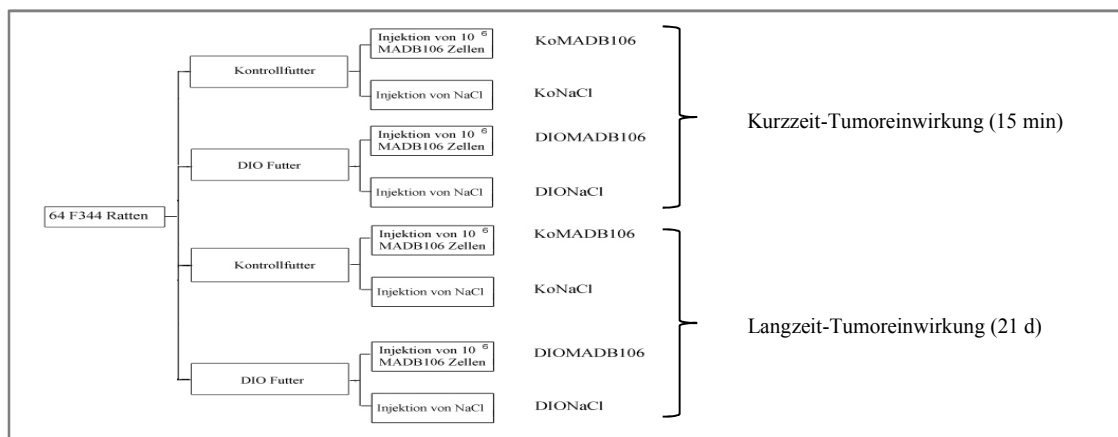


Abbildung 1: Übersicht zum Versuchsaufbau: F344 Ratten (F344 Ratten von Charles River), Tumorexpositionszeit 15 min (Minuten) bzw. 21 d (Tage), Kontrollfutter (4 % Rohfettgehalt), DIO Futter (34 % Rohfettgehalt), MADB106 Zellen (10^6 Zellen eines synthetisch hergestellten Adenokarzinoms), NaCl (Natriumchlorid 0,9 %-Lösung als Trägerstoff).

2.2.1 Tumormodell

Die in diesem Versuch verwendete Tumorzelllinie MADB106 besteht aus Zellen, welche von Lungenmetastasen eines durch 9-10-Dimethyl-1-2-Benzanthracen induzierten Adenokarzinoms der Mamma bei weiblichen F344 Ratten isoliert wurden. Diese Zellen gelten als besonders empfindlich gegenüber der Lyse durch NK-Zellen [Barlozzari T *et al.* 1983].

Die beschriebenen Zellen wurden vorausgehend entsprechend der Anleitung der Arbeitsgruppe von Hörsten *et al.* 2000 behandelt: Es wurde ein Teil des kryokonservierten Hauptstammes des Tumors aufgetaut und in Monolayer Kulturen in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) - Medium (Gibco, Grand Island, New York, USA), unter Zusatz von 10 % Hitze-inaktivierten FCS, 45 U Penicillin G/ml, 0,045 mg Steptomycin/ml, 2 mM L-Glutamin, 0,1 mM nicht

essentielle Aminosäuren und 1 mM Natriumpyruvat unter 5 % CO₂ bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen unter 0,25 % Trypsin separiert und in der log-Phase des Tumorwachstums für die i.v. Injektion entnommen. Anschließend wurden sie in RPMI Lösung resuspendiert und gewaschen [von Hörsten S *et al.* 2000].

In beiden Modellen des Experiments (Kurz- und Langzeit-Versuch) erfolgte vor der i.v. Injektion über die Schwanzvene die Markierung der Zellen mittels Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE), was die spätere Identifizierung der Tumorzellen über einen anti-Fluorescein Antikörper (anti-Fluorescein from mouse IgG1 clone B13-DE1, Roche Applied Science) in den immunhistologischen Schnitten der Lunge möglich machte [Weston SA *et al.* 1990].

Zur Vorbereitung der Zellen auf die anschließende Markierung wurden diese resuspendiert und gezählt. Anschließend wurden 40x10⁶ Zellen in 500 µl RPMI und 4 µl einer Mischung aus 50 µl CFSE Stammlösung (5 mM) und 450 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck, Darmstadt, Deutschland) gegeben. Schließlich wurden die Zellen in Phosphate Buffered Saline (PBS) - 0,1 % Bovines Serumalbumin (BSA) dreimal gewaschen, resuspendiert und die Fluoreszenz unter dem Mikroskop kontrolliert.

Für den Kurzzeit-Versuch wurden 1x10⁶ Zellen und für den Langzeit-Versuch 2 x 10⁵ Zellen pro Ratte in die Schwanzvene injiziert [von Hörsten S *et al.* 2000].

2.2.2 Injektion von MADB106-Zellen bzw. NaCl

Zur Injektion von MADB106-Zellen bzw. NaCl wurden die Ratten in einer Narkose-Kammer mittels eines Isoflurangas-Sauerstoffgemisches (3-4 Vol % Isofluran, 96-97 % O₂) in Narkose versetzt. Dieses Gasgemisch konnte unter Verwendung eines Kleintiernarkosegerätes (UniVet porta, Goppler Medizintechnik Deggendorf, Deutschland) aus Isofluranlösung (Forene® 100 % Abbott GmbH & Co. KG Wiesbaden, Deutschland) und von Sauerstoff aus einer Druckluftflasche hergestellt werden.

Nachdem sich die Tiere ca. eine Minute in Narkose befanden, wurden sie der Kammer entnommen und in Rückenlage an allen vier Extremitäten auf einer beheizten Unterlage mit Klebestreifen befestigt. Die Inhalationsanästhesie wurde anschließend durch Maskenbeatmung aufrechterhalten (Abb. 2).

Zur Erleichterung der Punktion wurde der Rattenschwanz etwa 20 Sekunden in warmes Wasser (ca. 35 °C) gehalten, wodurch sich die Durchblutung der Schwanzvene verbesserte. Im Folgenden erfolgte die Stauung an der Schwanzwurzel und daraufhin die Punktion der Schwanzvene im proximalen Drittel mit Hilfe eines Venenkatheters (Vasofix® Safey 24G, B. Braun, Melsungen, Deutschland). Zur Verifizierung der korrekten Lage des Katheters wurde

dieser zunächst mit isotoner steriler Natriumchloridlösung (NaCl 0,9 % B. Braun) angespült. Anschließend erfolgte die Injektion der Tumorzellen bzw. von NaCl 0,9 %-Lösung. Daraufhin wurden die Tiere, unter Stabilisierung der Körpertemperatur durch Wärmematten, aus der Narkose erweckt.



Abb.2: Arbeitsplatz mit Ratte in Isofluran-Kammer, Kleintiernarkosegerät mit Beatmungsmaske und Operationsfläche

2.3 Gewinnung und Analyse des Probenmaterials

2.3.1 Blut- und Organentnahme

Für die Blut- und Organentnahme am Versuchsende wurde die gleiche Anästhesieform gewählt wie für die Injektion der Tumorzellen. Die ausreichende Tiefe der Anästhesie wurde durch einen nichtauszulösenden Interdigitalreflex überprüft. Die Extremitäten der Tiere wurden anschließend auf dem Arbeitsplatz mit Nadeln fixiert (Abb. 3). Die Narkose wurde durch Maskenbeatmung während des gesamten Operationszeitraums aufrechterhalten. Zur Entblutung und anschließender Organentnahme wurde der Bauchraum des Tieres durch einen medianen Laparotomieschnitt eröffnet und die Vena cava inferior mittels einer Kanüle (Microlane 3 – 24 G x 1“, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) punktiert (Abb.3). Bei möglicher Kollabierung des Gefäßes wurde die Blutentnahme an der Aorta abdominalis bzw. am Herzen (rechter Vorhof) fortgesetzt. Somit konnte insgesamt, mit Hilfe von Monovetten (S-Monovette Plasma Lithium-Heparin, 4,9 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) ein Blutvolumen von ca. 5 – 10 ml Blut je Ratte gewonnen werden. Das Versuchstier verstarb letztlich in Folge des Blutverlustes.



Abbildung 3: Blutentnahme bei narkotisierter F344-Ratte durch Punktion der V. cava inferior, Aorta abdominalis bzw. des Herzbeutels

Nachfolgend wurden Lunge, Milz, Leber und epididymales, sowie viszerales Fett entnommen. Die Lunge wurde mit einer Trachealkanüle intubiert und anschließend im Kurzzeit-Versuch mit einem 1:5 O.C.T./PBS-Gemisch (OCT Lösung, CellPath, Newtown, United Kingdom) gefüllt und auf -80 °C Trockeneis eingefroren [von Hörsten *et al.* 2000]. Im Langzeit-Versuch erfolgte die Füllung der Lunge mit Bouin-Lösung (72 % gesättigte Pikrinsäurelösung, 23 % Formaldehyd und 5 % reine Essigsäure, Sigma, St. -Louis, USA) gefolgt von einer Lagerung über 24 Stunden in dieser Lösung im Kühlschrank. Durch die Fixierung in Bouin-Lösung erschienen oberflächliche Lungenmetastasen weißlich und ließen sich problemlos auszählen (Abb. 15).

2.3.2 Lipidextraktion und Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen in der Leber wurden durch Frau Dr. troph. Julia Spielmann vorgenommen. Dabei wurden die Gesamtlipide zunächst mit einer Mischung aus n-Hexan und Isopropanol (3:2) nach der Methode von Eder und Kirchgessner (1994) aus dem Gewebe (100 mg) extrahiert. Anschließend wurden die Proben aliquotiert und getrocknet und unter Zugabe von Triton X-100 [nach Methode von De Hoff *et al.* 1978] resuspendiert. Die Bestimmung der Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe des jeweiligen enzymatischen Reaktionskits (Ecoline S+, DiaSys GmbH, Holzheim, Deutschland).

2.4 Immunologische Untersuchungen

2.4.1 PBMC-Isolation und Erythrozytenlyse nach Schwinzer

Die Schwinzer-Lyse ist ein Verfahren zur Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) - Isolation für kleinere Blutproben bis zu 2 ml. Benannt wurde dieses Protokoll nach Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Schwinzer, Leiter des Transplantationslabors an der Medizinischen Hochschule Hannover. Die Aufbereitung der Zellen erfolgte dabei unter einer Sterilbank. Dabei wurde ein Erythrozyten-Lysepuffer verwendet, der die roten Blutkörperchen zerstörte, sodass letztendlich nur Granulozyten und Leukozyten verblieben.

Im Rahmen dieses Verfahrens wurde Vollblut im Verhältnis von 1:20 mit der Schwinzer-Lyse verdünnt. Das Lysemittel setzte sich aus 8,3 g NH_4Cl , 0,1 g Ethylendiamintetraacetat (EDTA) und 1,0 g Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3) gelöst in 1 l Aqua dest. zusammen. Die einzelnen Proben wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend weitere 10 Minuten bei 400 g und 4 °C zentrifugiert. Daraufhin dekantierte man die einzelnen Falcons und füllte sie mit PBS (9,55 g Dulbeccos in 1 l Aqua dest., pH 7,2 – 7,4) auf 40 ml auf, resuspendierte und zentrifugierte erneut unter gleichen Bedingungen. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt. Schließlich dekantierte man die überschüssige Lösung und resuspendierte die Zellreste in 1 ml PBS, bevor man die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelte.

2.4.2 Ermittlung der PBMC-Zahl mittels Neubauer-Zählkammer

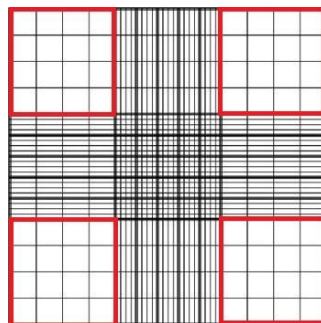


Abbildung 4: Neubauer-Zählkammer, rote Markierung entspricht einem „großen Quadrat“

Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (Abb.4) konnte die Anzahl der Zellen pro μl Blut ermittelt werden. Hierzu wurden die Zellen in den vier großen Quadraten (Fläche: 4 mm^2 , Kammertiefe $0,1\text{ mm}$) ausgezählt. Anschließend erfolgte die Berechnung anhand folgender Formel:

$$\text{Zellen pro } 1\ \mu\text{l Blut} = \frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{) x Kammertiefe (mm) x Verdünnung}}$$

Die Verdünnung entsprach dem Verhältnis 1:100 ($2\ \mu\text{l}$ Zellsuspension und $198\ \mu\text{l}$ Trypanblau).

2.4.3 Färbung spezifischer Immunzellen mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper

Die Färbung spezifischer Immunzellen mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper und die anschließende durchflusszytometrische Analyse bezogen sich auf 1 Million Zellen je Tube. Daher musste weiterhin berechnet werden, in welchem Zellsuspensionsvolumen (ml) sich 1 Million Zellen befanden.

$$x\ \text{ml} = \frac{1\ \text{Mio Zellen} \times 1\ \text{ml}}{\text{Zellen pro } 1\ \text{ml Blut}}$$

Die errechnete Menge Zellsuspension wurde anschließend in $1,5\ \text{ml}$ Eppendorf-Tubes überführt, 5 Minuten bei $1000\ \text{g}$ und $4\ ^\circ\text{C}$ zentrifugiert, dekantiert und letztlich mit $100\ \mu\text{l}$ Waschpuffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Überführung auf eine 96-well-Platte (Cellstar®, Cat.-No. 655 180, 96 Well Cell Culture Plate, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland).

Zur spezifischen Oberflächenmarkierung von Immunzellen wurden $50\ \mu\text{l}$ Antikörper-Mix (Tab. 2) gründlich gevortext, anschließend auf der 96-well-Platte zur Zellsuspension hinzugefügt und gut durchmischt. Die Inkubation der Zellen mit den Antikörpern dauerte 30 Minuten und erfolgte im Dunkeln, da die Bindung der Antikörper durch Licht gestört werden kann. Daraufhin wurden die Platten 2 Minuten bei $400\ \text{g}$ und $4\ ^\circ\text{C}$ zentrifugiert, anschließend dekantiert und mit $100\ \text{ml}$ Waschpuffer versetzt. Dieser Waschvorgang wurde zwei Mal wiederholt. Nach der letzten Dekantierung wurden die Zellen in $200\ \mu\text{l}$ Messpuffer resuspendiert und in die Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) - Messröhrchen überführt. Die Markierung der B-Zellen erfolgte mit Hilfe des Antikörpers CD45RA gekoppelt an Fluoresceinisothiocyanat (FITC). T-Zellen wurden durch den Antikörper CD3 ($\gamma\delta\text{T}$ -Zell-Rezeptor) markiert, gekoppelt an den Fluoreszenz-Farbstoff Allophycocyanin (APC), die CD4^+

T-Helferzellen mit CD4 gekoppelt an Phycoerithrin-Cyanin 7 (PE-Cy7) und die zytotoxischen T-Zellen mit CD8a gekoppelt an Phycoerithrin (PE). Schließlich wurden NK-Zellen mit dem Antikörper CD161a (NK-Zell-Rezeptor: NKR P1a) gekoppelt an PE und dem Fehlen des CD3 Antigens differenziert (Tab. 2).

Tabelle 2: FACS-Panel (Ratte):

AK-Farbstoff	Cat.Nr.	µl pro 1E06 Zellen	Isotyp
CD3 APC	557030	1:100	Ms IgM
CD4 PE-Cy7	561578	1:100	Ms IgG2a
CD8a PE	559976	1:50	Ms IgG1
CD45RA FITC	554883	1:50	Ms IgG1
CD161a PE	555009	1:50	Ms IgG1

2.4.4 Durchflusszytometrische Messungen mittels FACS

Durch das Verfahren der Durchflusszytometrie war die gleichzeitige Messung von Streulicht- und Fluoreszenzsignalen an einzelnen Zellen möglich.

Die in einer Zellsuspension enthaltenen Zellen, wurden hintereinander säulenförmig angeordnet, wonach sie einzeln einen Laserstrahl passierten. Dadurch konnte mit Hilfe des Streulichts die relative Zellgröße (Vorwärtsstreulicht: Forward Scatter (FSC)) und die intrazelluläre Granularität (Seitwärtsstreulicht (SSC)) jeder Zelle ermittelt werden. Mit Hilfe spezieller Linsen wurden diese Lichtsignale gestreut und durch Spiegel ausgerichtet. Schließlich wurden die Parameter von einem Detektor registriert, der die Signale in Spannungsimpulse übersetzte, welche wiederum direkt proportional zur jeweiligen Zellgröße bzw. -granularität waren (Abb.6). Ein Computer, mit einer spezifischen FACS-Software ausgestattet, konvertierte diese Daten schließlich in Form eines Histogramms oder eines Dotplots. Mit Hilfe dieser Daten ließen sich auf der Basis spezifischer Zelleigenschaften verschiedene Subpopulationen unterscheiden und analysieren (Abb. 5).

Durch konjugierte Antikörper, deren Farbstoffe fluoreszieren (APC, PE, FITC, Cy7), ließen sich weiterhin Subpopulationen unterscheiden. Antikörper binden an spezifische Oberflächenmoleküle der Zellen, wobei durch das Verfahren der Durchflusszytometrie sowohl die Art der gebundenen Antikörper als auch deren Quantität bestimmt werden konnte. Standard-FACS-Geräte können dabei zwischen zwei und vier Fluoreszenzen gleichzeitig analysieren. Inzwischen gibt es allerdings auch Messeinheiten, die bis zu 18 Farben zur selben Zeit

interpretieren können. Letztendlich wurden die ermittelten Zelleigenschaften in Form eines Histogramms oder Dotplots präsentiert. Somit konnten in weniger als einer Minute mehr als zehntausend Zellen einer jeweiligen Population bzw. Subpopulation zugeordnet werden.

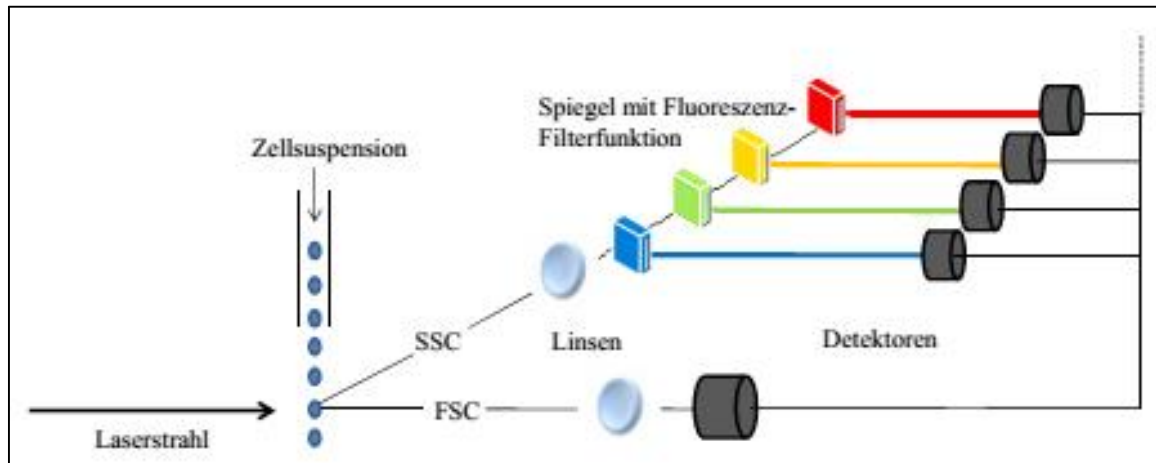


Abb. 5: Schematische Darstellung des Verfahrens der Durchflusszytometrie. Die Zellen werden, mit Hilfe von speziellen Linsen, anhand Vorwärtstreuung (FSC – Forward Scatter) und Seitwärtstreuung (SSC – Side Scatter) analysiert. Die Spiegel dienen der Ausrichtung der Lichtsignale, damit diese letztendlich durch Detektoren aufgenommen und in elektrische Spannungssignale umgewandelt werden können.

2.4.5 Auswertung FACS

Anhand der durchflusszytometrischen Messungen wurden B- und T-Zellen, NK-Zellen und Monozyten differenziert betrachtet (Abb. 6, 7).

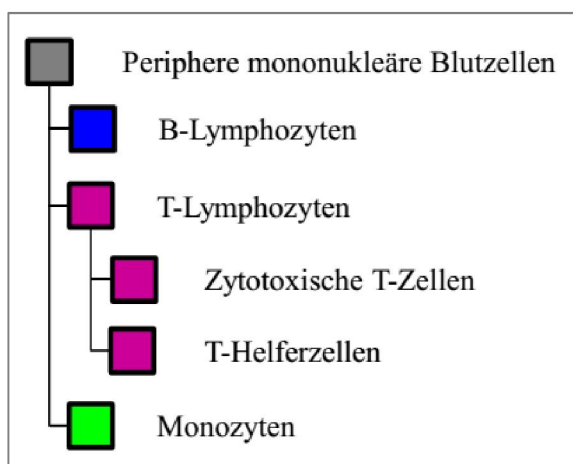


Abb. 6: Analysierte B-, T-Zellpopulationen und Monozyten

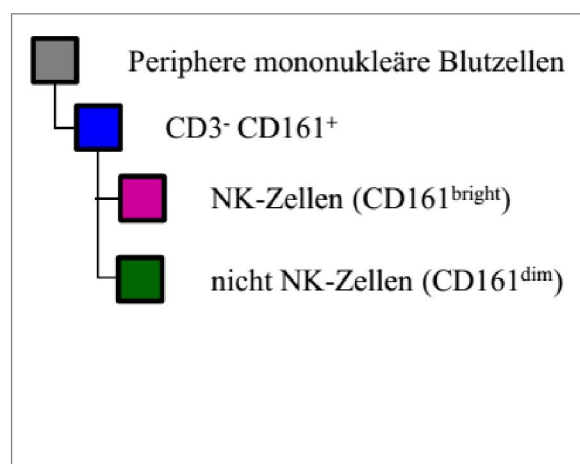


Abb. 7: Analysierte NK-Zellpopulationen

Innerhalb der lymphozytären Population wurden B-Lymphozyten ($CD45RA^+$, $CD3^-$) und T-Lymphozyten ($CD45RA^-$, $CD3^+$) unterschieden (Abb.8, 9). Des Weiteren wurden zytotoxische T-Zellen ($CD8a^+$, $CD4^-$), T-Helferzellen ($CD8^-$, $CD4^+$), (Abb.10) und Monozyten ($CD4^+$, $CD3^-$) (Abb.11) analysiert.

Im Falle der NK-Zellen ($CD161a^+$, $CD3^-$) ließen sich anhand der Expression des Oberflächenmarkers CD161a zwei Subpopulationen unterscheiden: NK-Zellen mit einer starken CD161a Expression ($CD161a^{bright}$) und NK-Zellen mit einer schwachen CD161a Expression ($CD161a^{dim}$) (Abb.12, 13). Diese Unterscheidung der NK-Zellen eignet sich allerdings lediglich für humane Seren [Cooper MA *et al.* 2001]. Bei Serummaterial der Ratte hingegen repräsentiert lediglich die bright-Population die NK-Zellen. Die dim-Population stellt hingegen polymorph-nukleäre Zellen oder Monozyten dar. Aus diesem Grund bezieht sich diese Arbeit im Folgenden auf die $CD161^{bright}$ -Population.

Mit Hilfe der erwähnten Oberflächenmarker wurden alle Zellpopulationen differenziert und anschließend gated.

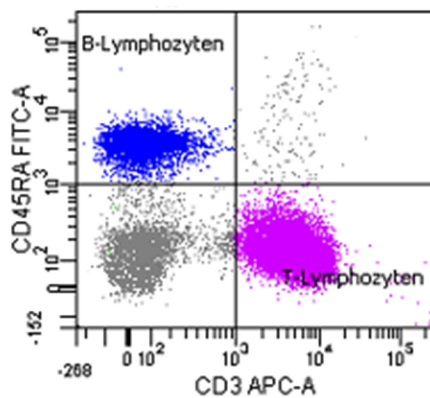


Abbildung 8: Repräsentativer Dotplot einer B- und T-Lymphozyten Färbung; B-Lymphozyten ($CD45RA^+CD3^-$) im oberen linken Quadranten; T-Lymphozyten ($CD45RA^-CD3^+$) im unteren rechten Quadranten.

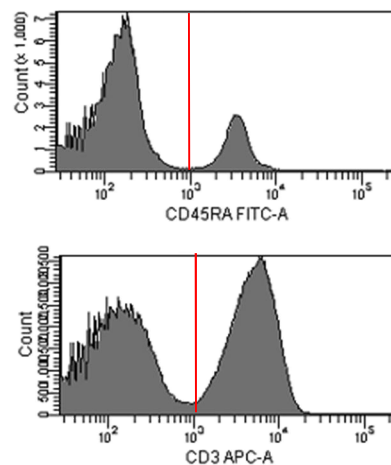


Abbildung 9: CD3 APC- und CD45RA FITC-Gates mit Minima bei 10^3 Events

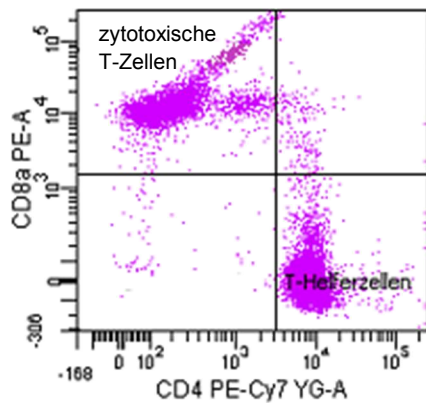


Abbildung 10: Repräsentativer Dotplot einer Färbung der zytotoxischen T-Zellen bzw. und T-Helferzellen; zytotoxische T-Zellen ($CD8a PE^+$, $CD4 PE-Cy7^-$) im oberen linken Quadranten; T-Helferzellen ($CD8a PE^-$, $CD4 PE-Cy7^+$) im rechten unteren Quadranten.

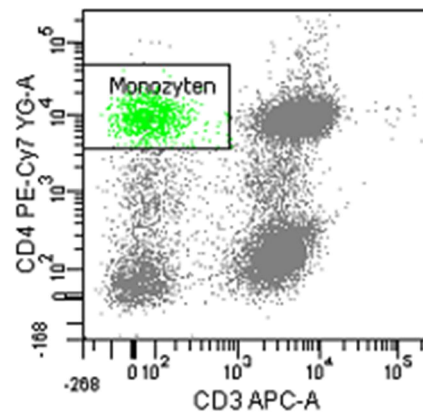


Abbildung 11: Repräsentativer Dotplot einer Monozyten Färbung; Monozyten ($CD4 PE-Cy7^+$, $CD3 APC^-$)

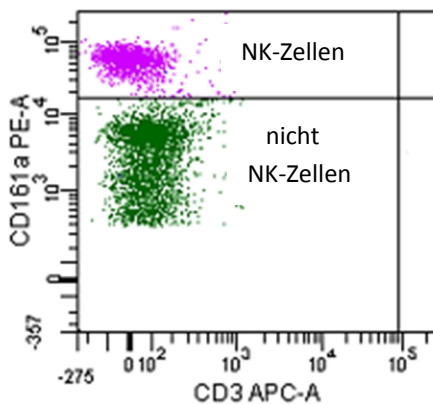


Abbildung 12: Repräsentativer Dotplot einer NK-Zell Färbung; NK-Zellen [$CD161a^{bright}$ ($CD161a PE^+$, $CD3 APC^-$)] im linken oberen Quadranten, nicht-NK-Zellen [$CD161a^{dim}$ ($CD161a PE^+$, $CD3 APC^+$)] im linken unteren Quadranten.

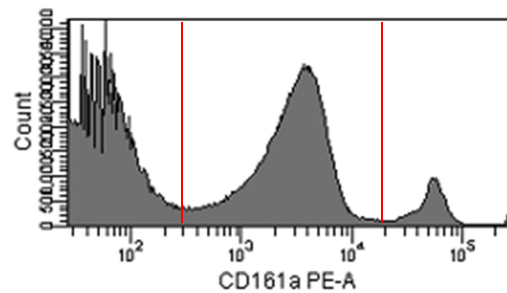


Abbildung 13: $CD161a PE$ -Gate, Minima bei $10^{4.1}$ für NK-Zellen ($CD3^-/CD161a^{bright}$) und $10^{2.2}$ für nicht-NK-Zellen ($CD3^+/CD161a^{dim}$)

2.5 Quantifizierung der NK-Zellen, Tumorzellen und NK-Zell-Tumorzellinteraktionen bzw. oberflächlicher Lungenmetastasen

Die Quantifizierung der NK-Zellen, Tumorzellen und NK-Zell-Tumorzellinteraktionen bzw. der oberflächlichen Lungenmetastasen wurde von Dr. med. John Hanke durchgeführt. Sie wird an dieser Stelle lediglich kurz erwähnt, um einen Gesamteindruck der experimentellen Methodik zu vermitteln sowie meine Ergebnisse besser in den Versuch einordnen zu können.

Die in O.C.T eingebetteten Lungen des Kurzzeitversuches wurden genutzt, um immunhistochemische Schnitte des Gewebes anzufertigen. Mit Hilfe entsprechender Antikörper erfolgte die Detektion der NK-Zellen, der MADB106-Zellen sowie der Interaktion beider Zellen im Lungengewebe. Die so gefärbten Schnitte wurden mit Hilfe eines Mikroskops (BZ9000 Fluorescence Microscope, Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg) analysiert und die entsprechenden Zellzahlen und Interaktionen ermittelt (Abb. 14), [Spielmann J *et al.* 2017].

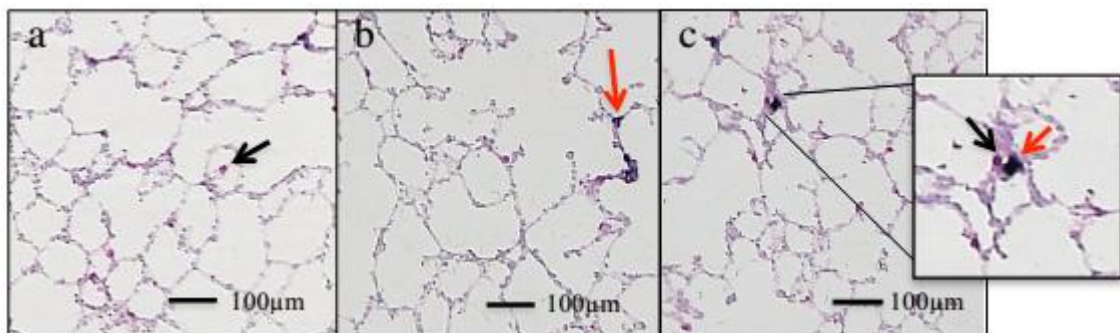


Abb. 14: Cryo-Schnitt des Lungengewebes nach doppelt immunhistochemischer Färbung (mit Anti-CD161 mAb und Anti-Fluorescein mAb) und Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Die Schnitte wurden mit einem digitalen Mikroskop eingescannt und mit dem Programm ImageJ analysiert. NK-Zellen erschienen rot (a) und MADB106-Zellen blau (b). Eine Interaktion zwischen NK-Zelle und MADB106-Zelle wurde vergrößert (c). Schwarze Pfeile zeigen NK-Zellen, rote Pfeile MADB106-Zellen.

Bei dem Langzeit-Versuch erfolgte die Fixierung des Lungengewebes mit Bouinscher Lösung. Diese Methode basierte darauf, dass Metastasen im Vergleich zum umliegenden Gewebe weniger Farbstoff aufnahmen und sich daher weißlich von der ansonsten gelblich gefärbten Lungenoberfläche abhoben (Abb. 15). Ausgehend von der Annahme, dass die Zahl der oberflächlichen Lungenmetastasen repräsentativ für die Gesamtzahl der Lungenmetastasen war [Shingu K *et al.* 2003], wurden diese auf jedem Lungensegment (bezüglich der Gruppenzugehörigkeit verblindet) gezählt.



Abbildung 15: Lunge 21 Tage nach Injektion mit MADB106 Zellen, intubiert durch Trachealkanüle und gefüllt mit Bouin- Lösung: die Metastasen erschienen weiß und konnten leicht gezählt werden.

2.6 Bestimmung der mRNA-Konzentration im Milzgewebe mittels Realtime PCR

Die Bestimmung der mRNA-Konzentration im Milzgewebe mittels *Realtime* Polymerase Chain Reaction (PCR) wurde durch Frau Dr. troph. Julia Spielmann vorgenommen und wird ebenfalls nur kurz, im Sinne des Gesamtverständnisses der Arbeit, erwähnt.

Von dem eingefrorenen Milzgewebe wurde die RNA vollständig mittels Precellys 24 (Peqlab, Erlangen, Deutschland) und unter der Verwendung von TRIZOL™ (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) entsprechend der Anleitung des Herstellers isoliert. Daraufhin erfolgte die Synthese von complementary Deoxyribonucleic Acid (cDNA) nach dem Protokoll von König und Eder (2006).

Die jeweilige mRNA-Konzentration wurde durch eine realtime detection PCR (iQ5, BioRad, München, Deutschland) und unter der Verwendung von SYBR® Green MIX (BioRad, München, Deutschland) und den spezifischen Primern (KiCqStart™ Primers, Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland) gemessen. Zur Bestimmung des relativen mRNA-Gehalts wurde der Cycle threshold-Wert (Ct-Wert) jedes Amplifizierungsgraphen mit Hilfe der Software Bio-Rad iQ5 (BioRad) bestimmt. Die Bestimmung der relativen mRNA-Konzentration erfolgte durch Anwendung der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Pfaffl 2001) mit individueller Amplifikationseffizienz eines jeden Primers verwendet. Diese wurden mittels Standardkurven aus entsprechenden Primer-Verdünnungen ermittelt. Das Gen Cyp18 wurde zur Normalisierung verwendet.

2.7 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA). Dabei erfolgte die Auswertung der Daten mittels One-way-Analysis-of-Variance (ANOVA) Test und anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test. Um allgemeine Effekte der Diäten und der Tumorzellen unabhängig vom jeweils anderen Faktor ermitteln zu können, wurde ein Two-way ANOVA Test mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt. Als Signifikanzgrenze wurde bei beiden Tests eine Irrtumswahrscheinlichkeit von höchstens 5 % zugrunde gelegt ($P \leq 0,05$).

3. Ergebnisse

3.1 Gewichtsentwicklung der Versuchstiere

3.1.1 Kurzzeit-Versuch

Das durchschnittliche Körpergewicht der Versuchstiere betrug zum Versuchsbeginn in der Kontroll-Gruppe 183,54 g und in der DIO-Gruppe 183,76 g. Die Ratten, welche über einen Zeitraum von sechs Wochen die normokalorische Kontrolldiät erhalten hatten, steigerten ihr Durchschnittsgewicht in dieser Zeit um 58 % auf $290 \pm 2,6$ g. Die Tiere, welche hingegen die hochkalorische DIO-Diät erhielten, steigerten ihr Körpergewicht um 65,5 % auf durchschnittlich $304 \pm 3,9$ g (Tab. 3). Zum Zeitpunkt der Injektion von Tumorzellen bzw. des Trägerstoffes NaCl hatten die DIO-gefütterten Tiere somit ein signifikant höheres Körpergewicht erreicht im Vergleich zu den Tieren, die die Kontrolldiät erhalten hatten ($P = 0,006$), (Abb. 16).

Tab. 3: Gewichtsentwicklung der Kontroll- und DIO-Ratten im Kurzzeit-Versuch

Wochen nach Diätbeginn	0	1	2	3	4	5	6
Gewichtsentwicklung Kontrolle [g]	183,54 ± 1,5	212,37 ± 1,6	238,13 ± 2,3	255,2 ± 2,34	268,34 ± 2,4	284,16 ± 2,75	290,24 ± 2,62
Gewichtsentwicklung DIO [g]	183,76 ± 1,6	227,18 ± 1,79	251,02 ± 2,61	271,05 ± 2,79	283,24 ± 3,46	297,47 ± 3,8	304,11 ± 3,88

Dargestellt sind die Mittelwerte und der entsprechende Standardfehler (\pm SEM); $n = 8$ Ratten/Gruppe

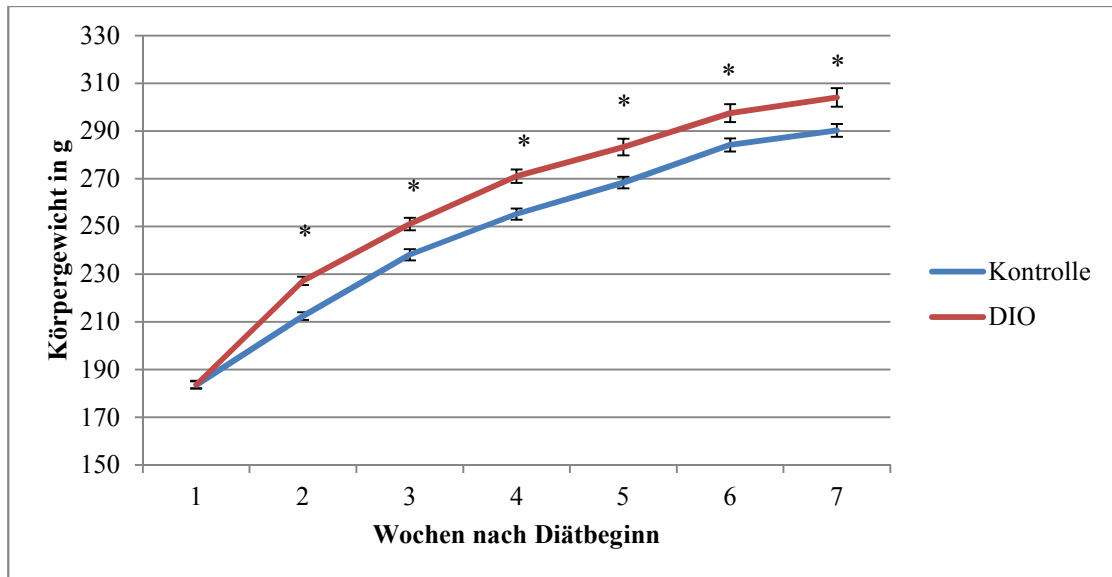


Abb. 16: Gewichtsentwicklung nach 6-wöchiger Fütterung mit Kontrolldiät und DIO-Diät. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gewichte aller Versuchstiere ($n = 8$), \pm SEM. Die Zeitpunkte, zu welchen sich die Gewichte der DIO-Gruppe signifikant von denen der Kontrollgruppe unterscheiden, sind mit * gekennzeichnet.

3.1.2 Langzeit-Versuch

Bei Versuchsbeginn betrug das durchschnittliche Gewicht der Tiere in allen Gruppen 195,5 g. Nach einer Fütterung der Ratten über 10 Wochen steigerten die Versuchstiere, welche mit normokalorischer Kontrolldiät gefüttert worden waren, ihr Körpergewicht um 68,6 % auf durchschnittlich 330 ± 4 g. Die Ratten hingegen, die eine hochkalorischen DIO-Diät erhalten hatten, steigerten ihr Körpergewicht um 78 % auf durchschnittlich $352 \pm 7,2$ g.

Nach Beendigung der zehnten Woche erfolgte die Injektion der MADB106-Tumorzellen bzw. des Trägerstoffes (NaCl). Daraufhin stagnierte die Gewichtszunahme in den einzelnen Gruppen zunächst leicht und begann nach einer Woche erneut anzusteigen. Die überdurchschnittliche Gewichtszunahme setzte sich somit auch nach der Injektion der MADB106-Zellen fort.

Zum Ende des Versuches war das Körpergewicht der DIO-Ratten weiterhin signifikant höher, als das der Kontrolltiere ($368 \text{ g} \pm 9,2 \text{ g}$ vs. $333 \text{ g} \pm 5,5 \text{ g}$, $P = 0,0027$), (Tab. 4; Abb. 17).

Tab. 4: Gewichtsentwicklung der Kontroll- und DIO-Ratten im Langzeit-Versuch

Wochen nach Diätbeginn	0	1	2	3	4	5	6
Gewichtsentwicklung Kontrolle [g]	195,53 ± 1,81	222,59 ± 2,17	245,93 ± 2,46	259,45 ± 2,81	271,8 ± 2,88	284,29 ± 3,08	294,75 ± 3,02
Gewichtsentwicklung DIO [g]	195,53 ± 2,07	227,28 ± 2,47	253,74 ± 3,33	269,09 ± 3,68	277,51 ± 4,51	294,16 ± 4,14	304,78 ± 4,43

Wochen nach Diätbeginn	7	8	9	10	11	12	13
Gewichtsentwicklung Kontrolle [g]	302,76 ± 3,48	310,51 ± 3,68	318,04 ± 3,66	329,58 ± 4,09	328,73 ± 4,38	332,49 ± 4,75	332,9 ± 5,47
Gewichtsentwicklung DIO [g]	312,69 ± 4,98	327,54 ± 5,90	336,25 ± 6,66	351,76 ± 7,21	352,66 ± 7,34	355,67 ± 7,31	367,84 ± 9,19

Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM; n = 8 Ratten/Gruppe. Die gestrichelte Linie am Übergang der 10. zur 11. Woche nach Versuchsbeginn verdeutlicht den Zeitpunkt der Injektion der MADB106-Zellen bzw. von NaCl.

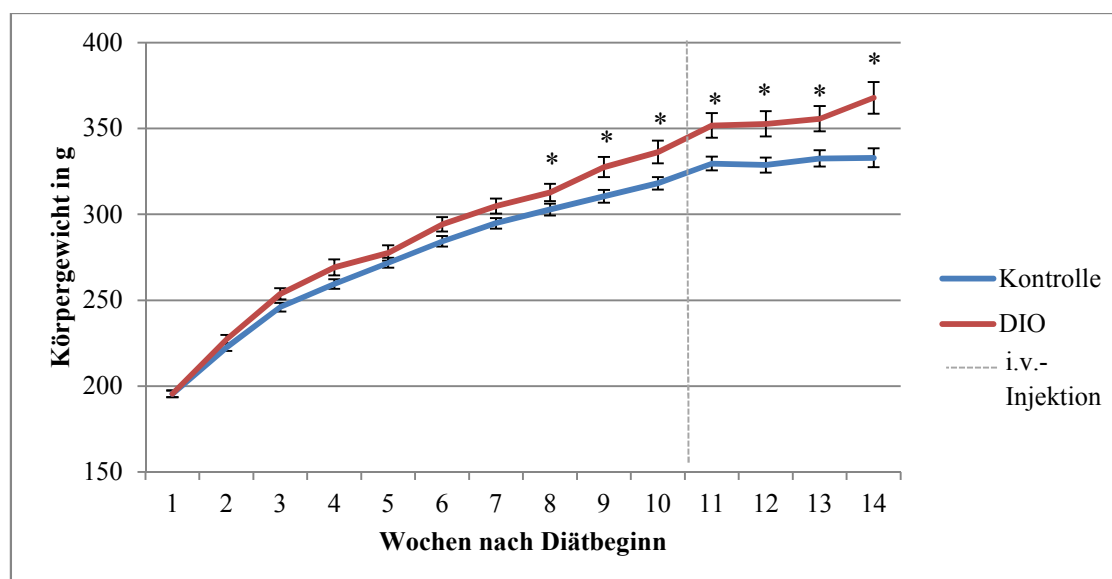


Abb. 17: Gewichtsentwicklung nach 13-wöchiger Fütterung mit der Kontrolldiät und DIO-Diät. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gewichte aller Versuchstiere ($n = 8$), \pm SEM. Die i.v.-Injektion der Tumorzellen bzw. des Trägerstoffes (NaCl) erfolgte nach 10 Wochen. Die Zeitpunkte, zu welchen sich die Gewichte der DIO-Gruppe signifikant von denen der Kontrollgruppe unterscheiden, sind mit * gekennzeichnet.

3.2 Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen in der Leber

Die Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen in der Leber waren ebenfalls signifikant höher bei den DIO-Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren (Tab. 5).

Tab. 5: Körpergewicht, Triglycerid- und Cholesterinkonzentration in der Leber bei Kontroll- und DIO-Tieren im Kurz- und Langzeitversuch

Kurzzeit-Versuch		Langzeit-Versuch	
MADB106-Injektion		MADB106-Injektion	21 Tage nach MADB106-Injektion
TG in der Leber ($\mu\text{mol/g}$)			
Kontrolle	38 ± 8		38 ± 4
DIO	90 ± 15 *		65 ± 9 *
Cholesterin in der Leber ($\mu\text{mol/g}$)			
Kontrolle	6.7 ± 0.7		7.1 ± 0.3
DIO	$11,0 \pm 1,6$ *		$9,3 \pm 0,8$ *

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; $n = 8$ Ratten/Gruppe; signifikante Werte gekennzeichnet durch *, $P \leq 0.05$; TG = Triglyceride

3.3 FACS - Messungen im Kurzzeit-Versuch

3.3.1 NK-Zellen

Die Auswertung der NK-Zellzahl nach kurzzeitiger Tumoreinwirkung über 15 Minuten ergab signifikante Unterschiede hinsichtlich der Kontroll- und DIO-Tiere. Hierbei wiesen die DIO-gefütterten Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant weniger NK-Zellen auf (dargestellt als % der PBMCs) als die Kontrolltiere ($4,3 \pm 0,07$ versus $3,95 \pm 0,38$ (SEM) % PBMCs, Abb. 18).

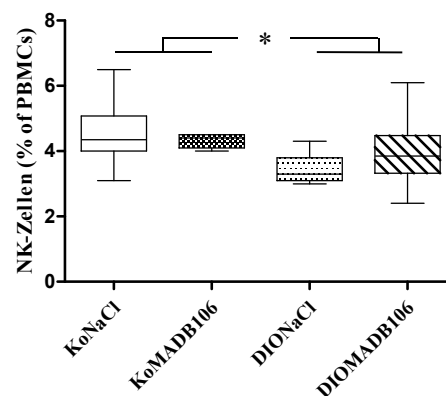


Abbildung 18: Quantitative Auswertung der NK-Zellzahl bei männlichen F344-Ratten unter Fütterung einer diet-induced-obesity (DIO) bzw. Kontrolldiät (Ko) und 15 min nach MADB106-Tumorzell-Injektion (MADB106) oder NaCl (n=8); dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und der DIO-Gruppe wurden als * gekennzeichnet, $P \leq 0.05$; PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cell.

3.3.2 B-Lymphozyten

Nach kurzzeitiger Tumorzell-Stimulation von 15 Minuten, ergab der Vergleich der B-Lymphozyten-Zellzahl keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 19).

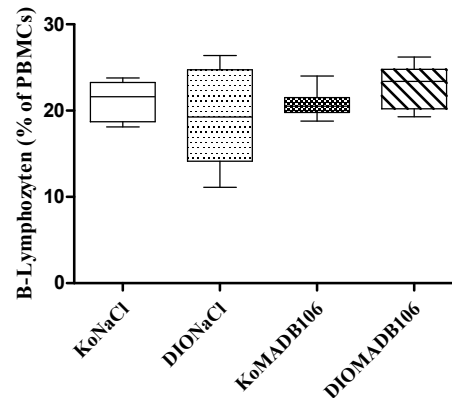


Abbildung 19: Quantitative Auswertung der B-Lymphozyten bei männlichen F344-Ratten unter Fütterung einer diet-induced-obesity (DIO) bzw. Kontrolldiät (Ko) und 15 min nach MADB106-Tumorzell-Injektion (MADB106) oder NaCl (n=8); dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cell.

3.3.3 T-Lymphozyten

Nach einer kurzzeitigen Tumorzell-Stimulation von 15 Minuten ergaben sich bei dem Vergleich der T-Lymphozyten-Zellzahl keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 20).

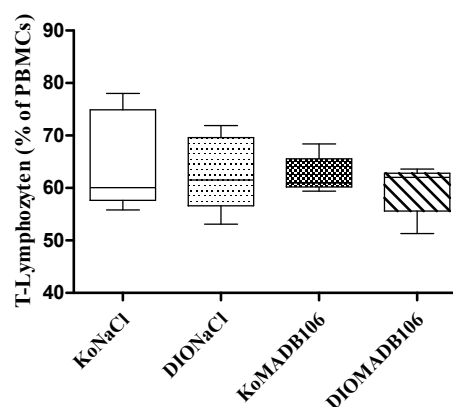


Abbildung 20: Quantitative Auswertung der T-Lymphozyten bei männlichen F344-Ratten unter Fütterung einer diet-induced-obesity (DIO) bzw. Kontrolldiät (Ko) und 15 min nach MADB106-Tumorzell-Injektion (MADB106) oder NaCl (n=8); dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cell.

3.3.4 Zytotoxische (CD8⁺) T-Zellen

Nach kurzzeitiger Tumorzell-Stimulation von 15 Minuten, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zellzahl zytotoxischer (CD8⁺) T-Zellen zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 21).

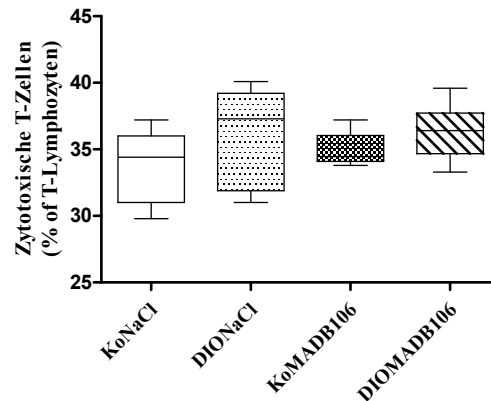


Abbildung 21: Quantitative Auswertung zytotoxischer T-Zellen (CD8⁺) bei männlichen F344-Ratten unter Fütterung einer diet-induced-obesity (DIO) bzw. Kontrolldiät (Ko) und 15 min nach MADB106-Tumorzell-Injektion (MADB106) oder NaCl (n=8); dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM; PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cell.

3.3.5 T-Helferzellen (CD4⁺)

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen beim Vergleich der Zellzahl von T-Helferzellen (CD4⁺ T-Lymphozyten) nach kurzzeitiger Tumorzell-Stimulation von 15 Minuten (Abb. 22).

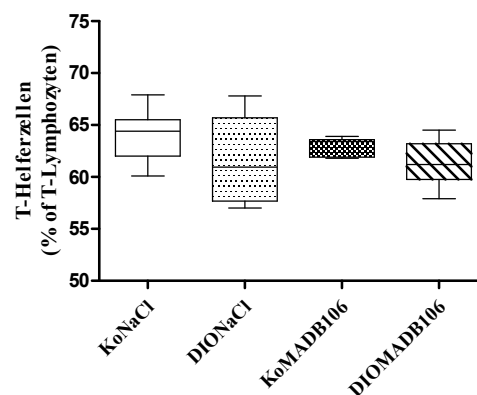


Abbildung 22: Quantitative Auswertung von T-Helferzellen (CD4⁺) bei männlichen F344-Ratten unter Fütterung einer diet-induced-obesity (DIO) bzw. Kontrolldiät (Ko) und 15 min nach MADB106-Tumorzell-Injektion (MADB106) oder NaCl (n=8); dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM; PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cell.

3.3.6 Monozyten

Es ergaben sich signifikante Unterschiede beim Vergleich der Monozyten-Zellzahl von normalgewichtigen und adipösen Kontrolltieren, welche NaCl injiziert bekamen. Die normalgewichtigen Kontrolltiere wiesen hierbei, im Vergleich zu den adipösen Kontrolltieren, eine signifikant höhere Anzahl an Monozyten, bezogen auf die PBMCs im peripheren Blut, auf. Der Vergleich von normalgewichtigen und adipösen Tumortieren, sowie die Gegenüberstellung von DIO- und Kontrollgruppe, ergaben keine signifikanten Unterschiede (Abb. 23).

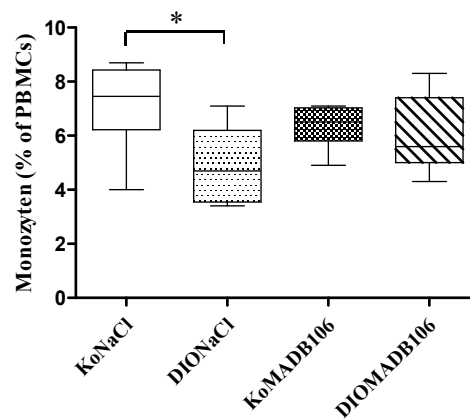


Abbildung 23: Quantitative Auswertung von Monozyten bei männlichen F344-Ratten unter Fütterung einer diet-induced-obesity (DIO) bzw. Kontrolldiät (Ko) und 15 min nach MADB106-Tumorzell-Injektion (MADB106) oder NaCl (n=8); dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen gekennzeichnet durch *, $P \leq 0.05$; PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cell.

3.4 FACS - Messungen im Langzeit-Versuch

3.4.1 NK-Zellen

Beim Vergleich des prozentualen Anteils der NK-Zellen an den PBMCs drei Wochen nach MADB106-Injektion ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 24).

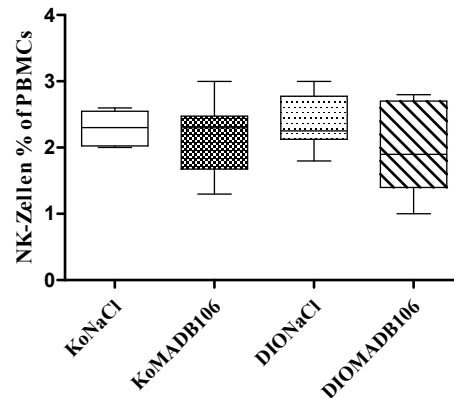


Abbildung 24: Quantitative Auswertung der NK-Zellzahl bei männlichen F344-Ratten unter Fütterung einer diet-induced-obesity (DIO) bzw. Kontrolldiät (Ko) und drei Wochen nach MADB106-Tumorzell-Injektion (MADB106) oder NaCl (n=8); dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cell.

3.4.2 B-Lymphozyten

Auch drei Wochen nach MADB106-Zellinjektion ergab die Auswertung der B-Lymphozyten-Zellzahl keine relevanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 25).

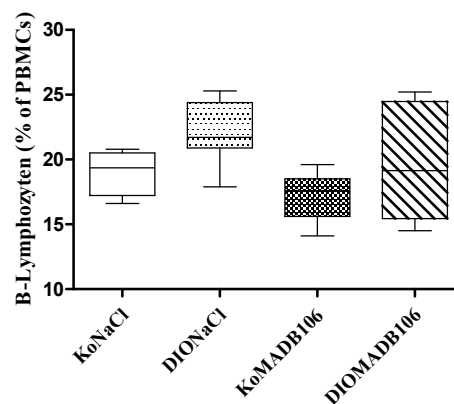


Abbildung 25: Quantitative Auswertung der B-Lymphozyten bei männlichen F344-Ratten unter Fütterung einer diet-induced-obesity (DIO) bzw. Kontrolldiät (Ko) und drei Wochen nach MADB106-Tumorzell-Injektion (MADB106) oder NaCl (n=8); dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cell.

3.4.3 T-Lymphozyten

Drei Wochen nach Injektion der Tumorzellen ergaben sich bezüglich des prozentualen Anteils der T-Lymphozyten an den PBMCs keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 26).

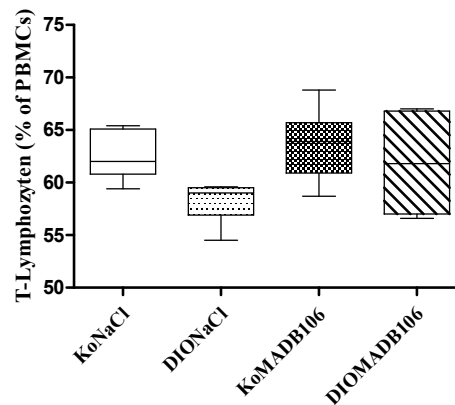


Abbildung 26: Quantitative Auswertung der T-Lymphozyten bei männlichen F344-Ratten unter Fütterung einer diet-induced-obesity (DIO) bzw. Kontrolldiät (Ko) und drei Wochen nach MADB106-Tumorzell-Injektion (MADB106) oder NaCl (n=8); dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cell.

3.4.4 Zytotoxische (CD8⁺) T-Zellen

Bei der Auswertung der Zellzahl zytotoxischer (CD8⁺) T-Zellen nach 3-wöchigem Tumorwachstum ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 27).

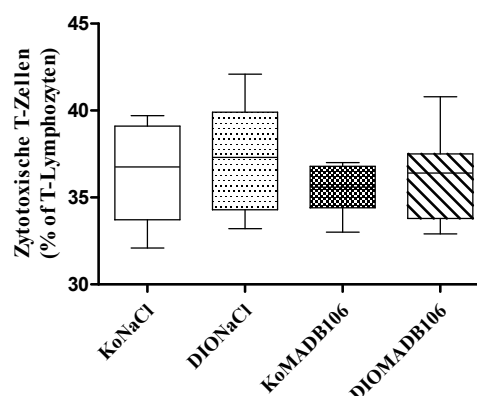


Abbildung 27: Quantitative Auswertung zytotoxischer T-Zellen (CD8⁺) bei männlichen F344-Ratten unter Fütterung einer diet-induced-obesity (DIO) bzw. Kontrolldiät (Ko) und drei Wochen nach MADB106-Tumorzell-Injektion (MADB106) oder NaCl (n=8); dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cell.

3.4.5 T-Helferzellen (CD4⁺)

Der Vergleich der Zellzahl von T-Helferzellen (CD4⁺) nach 3-wöchigem Tumorwachstum ergab keine relevanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 28).

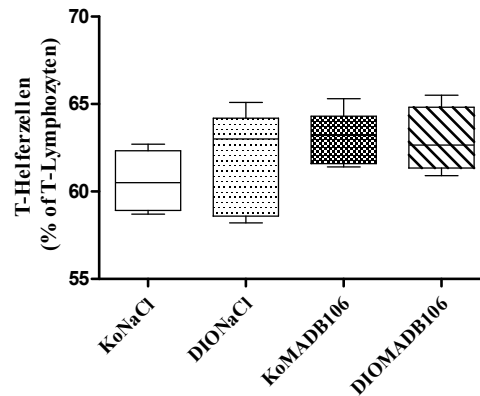


Abbildung 28: Quantitative Auswertung von T-Helferzellen (CD4⁺) bei männlichen F344-Ratten unter Fütterung einer diet-induced-obesity (DIO) bzw. Kontrolldiät (Ko) und drei Wochen nach MADB106-Tumorzell-Injektion (MADB106) oder NaCl (n=8); dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM; PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cell.

3.4.6 Monozyten

Nach einem 3-wöchigen Tumorwachstum ergab der Vergleich der Monozyten-Zellzahl keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb.29).

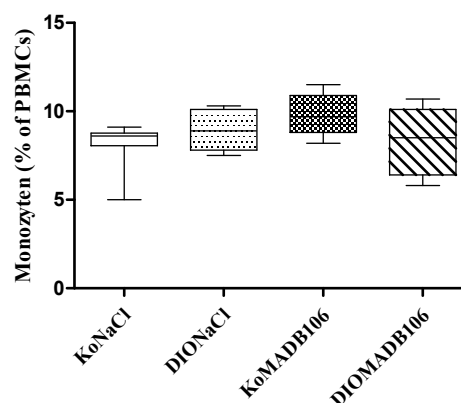


Abbildung 29: Quantitative Auswertung von Monozyten bei männlichen F344-Ratten unter Fütterung einer diet-induced-obesity (DIO) bzw. Kontrolldiät (Ko) und drei Wochen nach MADB106-Tumorzell-Injektion (MADB106) oder NaCl (n=8); dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM; PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cell.

3.5 Quantifizierung der NK-Zellen MADB106-Zellen und NK-Zell-Tumorzell-Interaktion, sowie oberflächlicher Lungenmetastasen

Die Ergebnisse im folgenden Abschnitt der Arbeit entstammen der Dissertation von Dr. med. John Hanke und sollen an dieser Stelle zum Gesamteindruck der Arbeit beitragen.

Zu einer deutlichen Zunahme der pulmonalen NK-Zellen kam es 15 Minuten nach der MADB106-Injektion, was bei den übergewichtigen DIO-Tieren nicht der Fall war (Abb. 30).

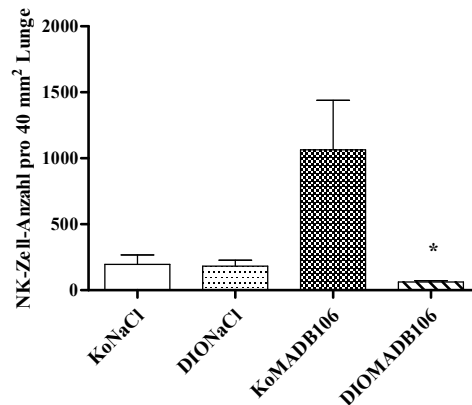


Abb. 30: Anzahl der NK-Zellen pro mm² des untersuchten Lungengewebes bei männlichen F344-Ratten unter Fütterung einer diet-induced-obesity (DIO) bzw. Kontrolldiät (Ko) und 15 min nach MADB106-Tumorzell-Injektion (MADB106) oder NaCl (n=8); dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM; signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und der DIO-Gruppe wurden als * gekennzeichnet, $P \leq 0.05$.

Bei den Ratten, die mit den Zellen des Adenokarzinoms behandelt worden waren, wiesen die DIO-Tiere signifikant weniger Tumorzellen auf als die Kontrolltiere (Abb. 31).

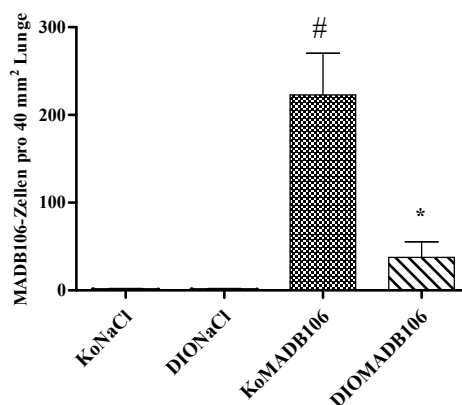


Abb. 31: Anzahl der MADB106-Zellen pro mm² des untersuchten Lungengewebes bei männlichen F344-Ratten unter Fütterung einer diet-induced-obesity (DIO) bzw. Kontrolldiät (Ko) und 15 min nach MADB106-Tumorzell-Injektion (MADB106) oder NaCl (n=8); dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM; signifikante Unterschiede zwischen der NaCl- und der MADB106-Gruppe wurden als # gekennzeichnet, signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und der DIO-Gruppe wurden als * gekennzeichnet, $P \leq 0.05$.

Auch hinsichtlich der NK-Zell-Tumorzellinteraktion wiesen sowohl Kontroll- als auch DIO-Tiere signifikante Unterschiede auf. Hierbei zeigten die Ratten der Kontrolldiät 5-mal mehr Interaktionen als nach Fütterung der DIO-Diät (Abb. 32).

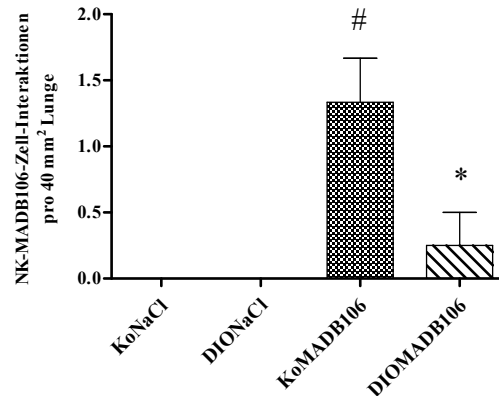


Abb. 32: Anzahl der NK-MADB106-Zell-Interaktionen pro mm² des untersuchten Lungengewebes bei männlichen F344-Ratten unter Fütterung einer diet-induced-obesity (DIO) bzw. Kontrolldiät (Ko) und 15 min nach MADB106-Tumorzell-Injektion (MADB106) oder NaCl (n=8); dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; signifikante Unterschiede zwischen der NaCl- und der MADB106-Gruppe wurden gekennzeichnet durch #, signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und der DIO-Gruppe wurden als * gekennzeichnet, $P \leq 0.05$.

Beim Langzeit-Versuch erfolgte die Auszählung der oberflächlichen Lungenmetastasen drei Wochen nach Injektion der MADB106-Zellen

Die Ratten, welche lediglich NaCl injiziert bekommen hatten, zeigten erwartungsgemäß keine oberflächlichen Lungenmetastasen, wohingegen die Tiere, welche MADB106-Zellen erhalten hatten, diese ausbildeten. Die Zahl der oberflächlichen Lungenmetastasen der DIO-gefütterten Tiere war im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erhöht (Abb. 33).



Abb. 33: Exemplarische repräsentative Bilder der Lungen drei Wochen nach Injektion von MADB106-Zellen (MADB106) bzw. NaCl. Unter Fütterung einer Kontroll- (Ko-) bzw. (DIO-) Diät.

3.6 Relative mRNA-Konzentration aktivierender und inhibierender NK Zell-Rezeptoren und NK-Zell-spezifischer Zytokine im Milzgewebe

Die Ergebnisse im folgenden Teil der Arbeit wurden von Frau Dr. troph. Julia Spielmann erhoben und dienen, wie bereits im vorangegangenen Abschnitt, dem Gesamtverständnis der Arbeit.

3.6.1 Relative mRNA-Konzentrationen im Kurzzeit-Versuch

Im Rahmen des Kurzzeit-Versuches wiesen die Tiere, 15 min nach Injektion der MADB 106-Zellen, signifikant höhere relative mRNA-Konzentrationen von inhibierenden NK-Zellrezeptoren Klra1/Ly49 in der Milz auf. Dieser Unterschied war unabhängig von der zuvor gefütterten Diät (Abb. 34).

Die Injektion der MADB106-Zellen führte bei den DIO-gefütterten Tieren im Vergleich zur NaCl-Injektion zu einem signifikanten Anstieg der relativen mRNA-Konzentration des TNFSF10/TRAIL-Rezeptors (Abb. 35). Des Weiteren war die relative mRNA-Konzentration von TNFSF10/TRAIL-Rezeptoren in der Milz der DIO-gefütterten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht. Die relativen mRNA-Konzentrationen für Ncr1, Ncr3, Klrk1 und Tnf α unterschieden sich bei den Tieren nicht.

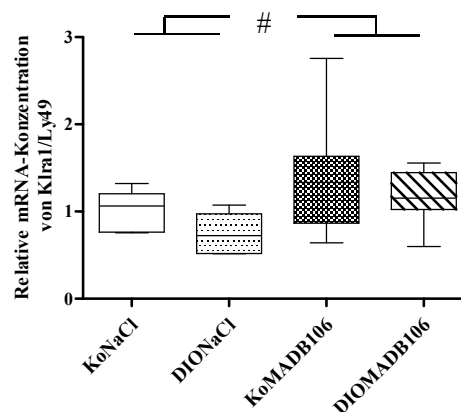


Abb. 34: Relative mRNA-Konzentration von inhibierenden NK-Zellrezeptoren Klra1/Ly49 in der Milz bei männlichen F344-Ratten unter Fütterung einer diet-induced-obesity (DIO) bzw. Kontrolldiät (Ko) und 15 min nach MADB106-Tumorzell-Injektion (MADB106) oder NaCl (n=8); dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; signifikante Unterschiede zwischen der NaCl- und der MADB106-Gruppe wurden als # gekennzeichnet, $P \leq 0.05$.

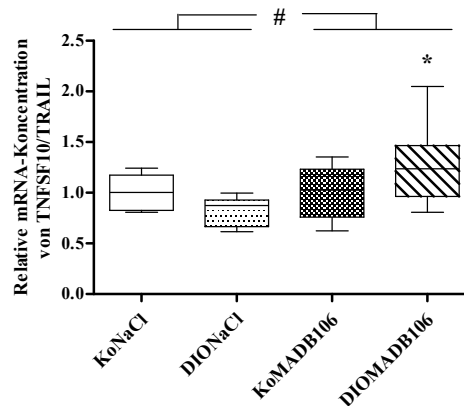


Abb. 35: Relative mRNA-Konzentration von NK-Zellrezeptoren TNFSF10/TRAIL in der Milz bei männlichen F344-Ratten unter Fütterung einer diet-induced-obesity (DIO) bzw. Kontrolldiät (Ko) und 15 min nach MADB106-Tumorzell-Injektion (MADB106) oder NaCl (n=8); dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; signifikante Unterschiede zwischen der NaCl- und DIO-Gruppe nach MADB106-Injektion wurden gekennzeichnet durch *, signifikante Unterschiede zwischen der NaCl- und der MADB106-Gruppe wurden als # gekennzeichnet, $P \leq 0.05$.

3.6.2 Relative mRNA-Konzentrationen im Langzeit-Versuch

Im Langzeit-Versuch zeigten die DIO-Ratten, welche nach 3-wöchiger Tumorzelleinwirkung Lungenmetastasen entwickelt hatten, signifikant geringere mRNA-Konzentrationen des aktivierenden NK-Zell-Rezeptors NCR1/NKp46 in der Milz gegenüber den Kontrolltieren, die NaCl injiziert bekommen hatten. Des Weiteren waren bei den Tieren, die Lungenmetastasen entwickelt hatten, im Vergleich zu den NaCl-Tieren, unabhängig von der gefütterten Diät, die relativen mRNA-Konzentrationen von NCR1/NKp46 vermindert (Abb. 36).

Die relative mRNA-Konzentration des aktivierenden NK-Zell-Rezeptors Klrk1/NKG2D in der Milz war bei den DIO-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren vermindert (Abb. 37). Für Ncr3, Tnf α und Tnfsf10 konnten zwischen den Gruppen keine Unterschiede der relativen mRNA-Konzentration in der Milz gemessen werden.

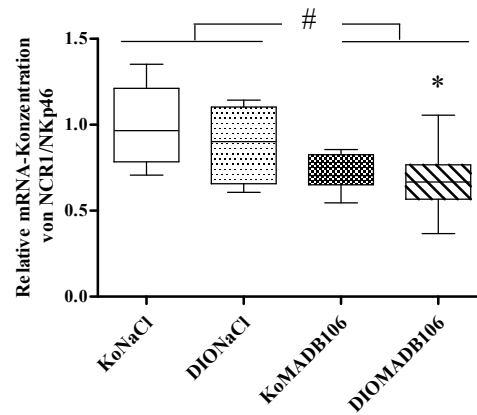


Abb. 36: Relative mRNA-Konzentration von aktivierenden NK-Zellrezeptoren NCR1/NKp46 in der Milz bei männlichen F344-Ratten unter Fütterung einer diet-induced-obesity (DIO) bzw. Kontrolldiät (Ko) und 15 min nach MADB106-Tumorzell-Injektion (MADB106) oder NaCl (n=8); dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; signifikante Unterschiede zwischen der NaCl- und DIO-Gruppe nach MADB106-Injektion wurden gekennzeichnet durch *, signifikante Unterschiede zwischen der NaCl- und der MADB106-Gruppe wurden als # gekennzeichnet, $P \leq 0.05$.

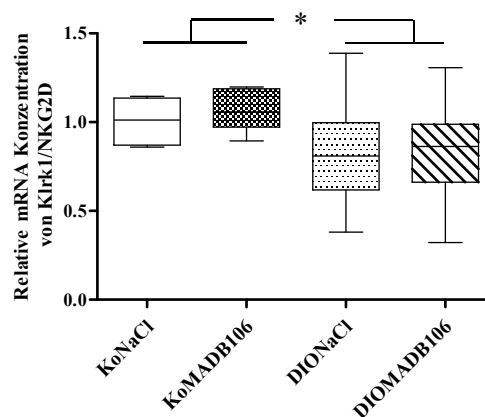


Abb. 37: Relative mRNA-Konzentration von aktivierenden NK-Zellrezeptoren Klrk1/NKG2D in der Milz bei männlichen F344-Ratten unter Fütterung einer diet-induced-obesity (DIO) bzw. Kontrolldiät (Ko) und 15 min nach MADB106-Tumorzell-Injektion (MADB106) oder NaCl (n=8); dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; signifikante Unterschiede zwischen der Ko- und DIO-Gruppe wurden gekennzeichnet durch *, $P \leq 0.05$.

4. Diskussion

Die epidemiologische Datenlage bezüglich der Adipositas und den damit korrelierenden gesundheitlichen Risiken ist eindeutig. Allerdings sind die genauen Mechanismen bezüglich des Zusammenhangs mit Tumorerkrankungen bisher weitgehend ungeklärt. Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung, diese genauer zu untersuchen und einzuordnen. Experimente auf der Grundlage von Tiermodellen sind dabei unumgänglich. Einzelner Signalkaskaden und Mediatorwirkungen ist man sich dabei inzwischen bewusst.

Es ist bekannt, dass eine adipöse Stoffwechsellage auch zu einer chronischen low-grade-Inflammation des Organismus führt [Scherer PE 2006]. Das Fettgewebe ist ein komplexes endokrines Organ und produziert eine Vielzahl inflammatorischer Adipokine [Fain JN 2010], wodurch es Einfluss auf diverse Immunfunktionen und Zellstoffwechselfvorgänge gewinnt [Trayhurn P *et al.* 2004].

Weiterhin konnte eine erhöhte NK-Zell-Akkumulation im Fettgewebe nachgewiesen werden, die durch eine verstärkte Sezernierung proinflammatorischer Adipokine ebenfalls ihren Beitrag zur Unterstützung des Entzündungsgeschehens liefert [O'Rourke RW *et al.* 2009]. Im Zuge einer adipösen Stoffwechsellage kommt es zudem zur Hypertrophie der Adipozyten und dadurch zur lokalen Gewebsnekrose im Fettgewebe [Rausch ME *et al.* 2008]. In diesen hypoxischen Bereichen akkumulieren Makrophagen, welche wiederum aus im Blut zirkulierenden Monozyten entstehen [Weisberg SP *et al.* 2003]. Über eine Interaktion der Fresszellen mit den Adipozyten ist eine umfangreiche Produktion proinflammatorischer Zytokine möglich und daher gelten Makrophagen heute als die hauptsächliche Quelle vieler Entzündungsmediatoren unter Adipositas [Lumeng CN *et al.* 2007].

Diese Signalkaskaden und Zusammenhänge im Fettgewebe berücksichtigend, bleiben dennoch wesentliche Zusammenhänge bisher unerkannt, um das Risiko von Adipositas in Verbindung mit malignen Tumorerkrankungen zu verstehen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich in diesem Zusammenhang auf der Grundlage eines Tierversuches an Ratten mit der speziellen Frage: Wie verhalten sich Immunzellen unter dem Einfluss einer diät-induzierten Adipositas und folgender Injektion von Tumorzellen und gibt es hierbei Unterschiede in Bezug auf die Entstehung und Metastasierung von malignen Tumoren?

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhielten männliche F344-Ratten über einen Zeitraum von 6 bis 10 Wochen entweder eine Hoch-Fett-Diät zur Induktion von Übergewicht oder eine entsprechende Kontrolldiät. Im nächsten Schritt erfolgte eine gewichtsspezifische Einteilung in Untergruppen und die Injektion eines synthetisch hergestellten Adenokarzinoms (MADB106) bzw. von NaCl über die Schwanzvene. Die Tötung der Tiere erfolgte nach 15 Minuten (Kurzzeit-Versuch) bzw. 21 Tagen (Langzeit-Versuch), wonach die im Blut enthaltenen Zellen

mittels durchflusszytometrischer Messungen analysiert wurden. Weiterhin wurden die Zahl der NK-Zellen, MADB106-Zellen sowie deren Interaktionen im Lungengewebe immunhistochemisch durch Dr. med. John Hanke untersucht und die relative mRNA-Konzentration verschiedener NK-Zellrezeptoren im Milzgewebe durch Dr. troph. Julia Spielmann bestimmt. Im Rahmen des Langzeit-Versuches wurden den Tieren darüber hinaus die Lungen entnommen und die oberflächlich erkennbaren Lungenmetastasen ausgezählt.

Die Zunahme an Körpergewicht ist generell verbunden mit einer Vermehrung an Fettgewebe [Rosen ED *et al.* 2006], woraus bekanntlich ein erhöhter Spiegel zirkulierender Zytokine, Hormone und anderer Mediatorstoffe resultiert [Kershaw EE *et al.* 2004]. Adipöse Individuen weisen allgemein höhere Triglycerid- und Cholesterolspiegel auf. Bei unseren Versuchen gelang es, über eine hochkalorische Spezialdiät die Hälfte der Ratten in eine adipöse Stoffwechsellage zu versetzen. Dies kann anhand der signifikant unterschiedlichen Gewichtsentwicklung der einzelnen Gruppen nachvollzogen werden. Ebenfalls wiesen die DIO-Ratten entsprechend hohe Triglycerid- und Cholesterinwerte in der Leber auf. Folglich ist davon auszugehen, dass auch im Blut der adipösen Individuen ein verändertes Mikromilieu herrschte und sich daraus unterschiedliche Bedingungen für sämtliche immunkompetenten Zellen entwickelten.

Anhand der FACS-Messungen konnte im Rahmen des Kurzzeit-Versuches nachgewiesen werden, dass DIO-Ratten signifikant weniger periphere NK-Zellen im Blut aufwiesen als die Tiere, welche die Kontrolldiät erhalten hatten. Ebenfalls wurde durch Herrn Dr. med. Hanke mittels Immunhistochemie nachgewiesen, dass sowohl die Anzahl an NK- und MADB106-Zellen als auch die NK-Zell-Tumorzell-Interaktionen bei den auf der Basis einer Hoch-Fett-Diät gefütterten Ratten im Lungengewebe nach 15 Minuten deutlich vermindert waren. Hinsichtlich der relativen mRNA-Konzentration im Milzgewebe konnte Frau Dr. troph. Julia Spielmann im Kurzzeit-Versuch unabhängig der zuvor gefütterten Diät bei allen mit MADB106-Zellen behandelten Tieren eine signifikante Erhöhung des inhibierenden Ly49-NK-Zellrezeptors feststellen. Im Langzeit-Versuch kam es hingegen bei allen Tumortieren zu einer verminderten Expression des aktivierenden NKp46-NK-Zellrezeptors. Des Weiteren wiesen übergewichtige Individuen nach 21 Tagen MADB106-Einwirkung signifikant mehr Lungenmetastasen gegenüber den Ratten auf, die im gleichen Zeitraum die Kontrolldiät erhalten hatten.

Die erniedrigte Zahl peripherer NK-Zellen im Blut adipöser DIO-Ratten im Kurzzeit-Versuch könnte eine Ursache für die später folgende vermehrte Ausbildung von Lungenmetastasen bei übergewichtigen Versuchstieren sein. NK-Zellen tragen eine entscheidende Rolle in der frühen Phase der Metastasierung und bei der Abwehr von Tumorzellen [Talmadge JE *et al.* 1980; Gorelik E *et al.* 1982; Wu J *et al.* 2003] sowie von MADB106-Zellen [Ben-Eliyahu S *et al.*

1996]. Auch die nach 15 minütiger Tumoreinwirkung immunhistochemisch nachgewiesenen verminderten NK-Zell-Tumorzell-Interaktionen im Lungengewebe der DIO-Ratten unterstützen diese Aussage.

Die Ergebnisse hinsichtlich der Rezeptorausstattung der NK-Zellen im Milzgewebe im Kurz- und Langzeit-Versuch lassen sich dahingehend interpretieren, dass sich Tumorzellen der Kontrolle durch NK-Zellen entziehen, indem sie eine Herunterregulierung aktivierender und eine Hochregulierung inhibierender Rezeptoren veranlassen [Chretien A-S *et al.* 2014]. Diese Annahme wird weiterhin, durch die signifikante Verminderung des aktivierenden NKP46-Rezeptors bei sämtlichen MADB106-Tieren im Langzeit-Versuch unterstützt. Ebenfalls wiesen adipöse Tiere eine verminderte Zahl von aktivierenden NKG2D-Rezeptoren in der Lunge auf, was auf eine Rekrutierung von NK-Zellen mit dieser Rezeptorausstattung ins Fettgewebe zurück zu führen sein könnte [Chung J-J *et al.* 2014; O'Rourke RW *et al.* 2013]. Folglich fehlen diese Strukturen in der peripheren Zirkulation und in anderen Geweben, was die von Dr. med. John Hanke verminderten Zellinteraktionen im Lungengewebe erklären könnte und damit eine weitere Ursache für die langfristig übermäßige Ausbildung von Lungenmetastasen bei adipösen F344-Ratten sein könnte.

Betrachtet man die Ergebnisse im Hinblick auf die NK-Zellen im Kurzzeit- und Langzeit-Versuch getrennt, wird deutlich, dass eine adipöse Stoffwechsellage die Funktion der NK-Zellen beeinflusst und sich damit auf die Immunabwehr gegenüber der Einwirkung von Tumorzellen hemmend auswirken kann. Die im Blut zirkulierenden NK-Zellen können ihrer Schutzfunktion als erste Abwehrbarriere gegenüber den Tumorzellen unter den Bedingungen einer adipösen Stoffwechsellage nicht dauerhaft gerecht werden. Spätfolgen dieser NK-Zellfunktionsstörung bei adipösen Tieren werden erst nach langfristiger Einwirkung der artifizuell in den Organismus eingebrachten Tumorzelllinie eines Mammakarzinoms deutlich und äußern sich in einer vermehrten Ausbildung von Lungenmetastasen trotz zahlenmäßiger Anpassung der peripheren NK-Zellen im Blut und in der Lunge.

Wrann *et al.* konnte 2011 in einem *in-vitro* Zellmodell nachweisen, dass eine kurzzeitige Stimulation von NK92-Zellen von weniger als 24 Stunden durch Leptin deren Funktion verbesserte. Der IFN γ -Spiegel wurde dadurch erhöht, es ließen sich vermehrte NK-Zell-Tumorzell-Interaktionen nachweisen. Ebenfalls stellte sich TNF α , ein Apoptose-Ligand, in erhöhter Konzentration dar. In der Folge kam es unter kurzzeitiger Leptineinwirkung vermehrt zur Tumorzelllyse. Dahingegen wirkte sich eine längere Einwirkungszeit von über 72 Stunden negativ auf die NK-Zell-Funktion hinsichtlich einer reduzierten Zellproliferationsrate aus. [Wrann CD *et al.* 2012].

Eine aktuelle Studie, welche sich ebenfalls mit der NK-Zell-Funktionalität unter dem Einfluss von Leptin beschäftigte, konnte nach entsprechender Preinkubation mit Leptin eine signifikant erniedrigte Expression des NKG2D-Rezeptors auf humanen NK92-Zellen, verbunden mit einem

deutlichen Zytotoxizitätsverlust gegenüber maligner Zellen eines Kolonkarzinoms, nachweisen [Bähr I *et al.* 2017].

Adipöse Individuen weisen dauerhaft erhöhte Leptinspiegel im Plasma auf [Kershaw EE *et al.* 2004]. Dies würde nach Wrann und Bähr *et al.* eine dauerhaft eingeschränkte NK-Zellfunktion und somit ein erhöhtes Krebsrisiko bedeuten. Diese Hypothese spiegelt sich ebenfalls in den Ergebnissen der aktuellen Studie wieder. Adipöse F344-Ratten weisen im Kurzzeit-Versuch verminderte periphere NK-Zellzahlen auf, was letztlich für die vermehrte Ausbildung pulmonaler Metastasen mitverantwortlich sein kann.

Nave *et al.* untersuchten 2008 ebenfalls den Einfluss von Leptin auf die Funktion von NK-Zellen in Bezug auf das Körpergewicht und des Weiteren deren Expression von Leptinrezeptoren (Ob-R) und intrazelluläre Signalkaskaden (JAK-STAT-Signaltransduktion). Leptin wurde normalgewichtigen und diät-induziert adipösen Ratten injiziert und im Anschluss das Blut und das Milzgewebe der Tiere mittels durchflusszytometrischer und immunhistochemischer Verfahren auf die NK-Zellzahl untersucht. Die Studie konnte eine Akkumulation von NK-Zellen im Milzgewebe und Erhöhung der Leptinrezeptoren bei adipösen Individuen zeigen, allerdings ebenfalls verminderte intrazelluläre Signalkaskaden. Die letztgenannte Beobachtung könnte eine Erklärung für die ausbleibende Aktivierung von NK-Zellen unter adipöser Stoffwechsellage sein und wird als Leptinresistenz der NK-Zellen unter adipöser Stoffwechsellage bezeichnet [Nave H *et al.* 2008].

Bezogen auf den NK-Zell-Phänotyp konnte ein Jahr später der Einfluss des umgebenden Mikromilieus nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur aktuellen Studie zeigte die Arbeitsgruppe damals, dass adipöse Tiere bei entsprechendem Mikromilieu im Vergleich zu normalgewichtigen F344-Ratten eine signifikant höhere NK-Zellzahl aufweisen konnten. Nach einer Fütterungsperiode über 12 Wochen mit hochkalorischem Spezialfutter (34 % Rohfettgehalt) wurden die Untersuchungen der NK-Zellzahlen ebenfalls mittels FACS-Analyse durchgeführt. Dabei wurden die NK-Zellen 72 Stunden nach vollständiger NK-Zell-Depletion zwischen adipösen und normalgewichtigen Ratten übertragen. Nach weiteren 72 Stunden wurden die Tiere getötet und die FACS-Analyse abgeschlossen. Im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen wiesen in diesem Fall adipöse Individuen, die NK-Zellen aus bereits zuvor adipösen Ratten übertragen bekommen hatten, erhöhte NK-Zellzahlen auf im Vergleich zu normalgewichtigen Tieren. Bei der Übertragung der Immunzellen von adipösen auf normalgewichtige Tiere normalisierte sich die Zellzahl im Verlauf [Lautenbach A, Wrann CD *et al.* 2009].

Unter Berücksichtigung der Untersuchungen von Wrann *et al.* 2011 sowie der aktuellen Studie sind die Ergebnisse übereinstimmend mit Lautenbach *et al.* zu deuten. Das Mikromilieu hat in allen drei Arbeiten einen wesentlichen Einfluss auf die Zahl und die Funktion von NK-Zellen.

Allerdings spielt die Expositionszeit dabei eine entscheidende Rolle. Es lässt sich vermuten, dass ein dauerhaft erhöhter Leptinspiegel unter adipöser Stoffwechsellage für den Körper eine anhaltende Stresssituation bedeutet, gegen die dieser mittels Mobilisation der eigenen Immunzellen versucht, entgegenzuwirken. Es scheint, dass dieser Abwehrmechanismus allerdings nicht unbefristet aufrechterhalten werden kann und letztlich erschöpflich ist, was sich in einer zahlenmäßigen Reduktion der NK-Zellen zeigt. Ein genauer Zeitrahmen für dieses Phänomen ist bisher nicht eindeutig zu bestimmen.

In einer weiteren Studie wurde 2010 eine besondere NK-Subpopulation, die sogenannten marginating-pulmonary NK-Zellen (MP-NK-Zellen), identifiziert [Melamed R *et al.* 2010]. Dabei vermutete Melamed *et al.* eine besondere Art von Leukozyten in den Lungenkapillaren von F344 Ratten, die im Vergleich zu peripheren NK-Zellen eine erhöhte Zytotoxizität gegenüber MADB106-Zellen aufweisen. In dieser Studie wurden männliche F344 Ratten mit Polyinosinic-polycytidylic acid (Poly I-C) immunstimuliert bzw. mit NaCl behandelt. Daraufhin wurden die freien NK-Zellen im Blut und die MP-NK-Zellen im Lungengewebe extrahiert und auf die zellulären Bestandteile, Aktivitätsmarker und Zytotoxizitätsmuster gegenüber „NK-resistenten“ Tumorzellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl in immunstimulierten als auch bei nativen Ratten die MP-Leukozyten einen höheren Gehalt an Granulozyten, Monozyten und NK-Zellen und weiterhin vermehrt Aktivitäts- und Bindungsmarker aufwiesen. Bei den immunstimulierten Tieren zeigten besonders MP-NK-Zellen hohe Zytotoxizitätsparameter gegen MADB106-Tumorzellen. Sie könnten damit eine Sonderstellung bei der Invasion von Tumorzellen ins Lungengewebe einnehmen [Melamed R *et al.* 2010]. Unter Berücksichtigung der zirkulierenden MADB106-Tumorzellen in der vorliegenden Studie wäre dies eine Erklärung für die verminderte NK-Zellzahl im Lungengewebe bei adipösen Tieren.

Im Jahr 2015 betrachteten Jahn *et al.* den Sachverhalt aus einer entgegengesetzten Perspektive, indem man eine adipöse Stoffwechsellage durch entsprechende Trainings- und Ernährungsumstellungen positiv beeinflusste und nicht, wie in der aktuellen Studie, eine artifizielle Adipositas herbeiführte. Dabei unterzog sich die Hälfte der 32 adipösen Versuchsteilnehmer einem dreimonatigen Sport- und Ernährungsprogramm. Im Ergebnis konnten bei der Interventionsgruppe unter anderem eine signifikante Reduktion des Körpergewichts und der Fettmasse in Verbindung mit einer erhöhten Leistungsfähigkeit erzielt werden. An Hand durchflusszytometrischer Messungen kam es unter diesen Bedingungen auf Zellebene zu einer Reduktion von Monozyten und zytotoxischen T-Zellen, wohingegen T-Lymphozyten und NK-Zellen vermehrt im peripheren Blut nachweisbar waren. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Zytotoxizität einer humanen NK-Zell-Linie (NK-92) gegenüber den Zellen eines Kolonkarzinoms bei steigender Leptinkonzentration vermindert war [Jahn J *et al.* 2015]. In Betrachtung der Ergebnisse von Jahn *et al.* und denen der aktuell vorliegenden

Studie wird die zentrale Rolle einer ausgeglichenen Stoffwechsellage in Bezug auf eine effektive NK-Zell-Abwehr im Hinblick auf die Tumorkontrolle in menschlichen und tierischen Organismen deutlich.

Zusammenfassend kann bei Betrachtung der NK-Zell-Funktion und -zahl unter adipöser Stoffwechsellage festgestellt werden, dass beide Parameter sowohl durch das umgebende Mikromilieu wie auch durch dessen Einwirkungsdauer beeinflusst werden. Eine durch Adipositas bedingte chronische low-grade-Inflammation äußert sich auf Zellebene im Sinne einer Mobilisation von Abwehrmechanismen, bspw. von NK-Zellen. Dieser daueraktivierte Zustand ist allerdings erschöpflich und führt über längere Zeit zu einer verminderten Präsenz im Lungengewebe bzw. mangelnder Aktivierung der NK-Zellen. In Folge dessen kann es zu erheblichen Folgeschäden wie bspw. der vermehrten Ausbildung von Lungenmetastasen bei adipösen Organismen kommen.

Neben den NK-Zellen nehmen auch die B- und T-Lymphozyten eine wichtige Rolle im Immunsystem ein. Diese gehören jedoch nicht zum angeborenen Teil, sondern bilden zusammen mit antigenpräsentierenden Zellen, T-Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen, Plasmazellen und verschiedenen Antikörpern das erworbene Immunsystem.

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnten anhand von FACS-Analysen weder im Kurz- noch im Langzeit-Versuch signifikante Unterschiede hinsichtlich der B-Lymphozytenzahl festgestellt werden. Die gemessenen Zellzahlen unterschieden sich bei normalgewichtigen bzw. DIO-gefütterten F344-Ratten, welche entweder mit MADB106-Zellen oder NaCl behandelt worden waren, nicht.

Ähnliche Ergebnisse zeigt eine Studie von 2007, in welcher die Auswirkung von Adipositas unter zentraler bzw. peripherer Leptineinwirkung bei gesunden bzw. endotoxischinämischen Ratten auf die zahlenmäßige Präsenz von Leukozyten im Blut untersucht wurde. In dieser Arbeit von Haas *et al.* wurde männlichen gesunden bzw. endotoxischinämischen Ratten über einen peripheren Venenzugang (i.v.) bzw. über Injektion in den linken Seitenventrikel - intracerebroventrikulär (i.c.v.) Leptin appliziert. Daraufhin analysierte man mit Hilfe von FACS-Messungen die Leukozytenzusammensetzung im peripheren Blut. Es konnte gezeigt werden, dass eine periphere (i.v.) Leptinapplikation zur Steigerung der Leukozytenzahlen im Blut gesunder Ratten führt. Dabei übertrafen die adipösen die normalgewichtigen Tiere verhältnismäßig deutlich. Dieser Anstieg der peripheren Leukozyten wurde allerdings durch Granulozyten, NK-Zellen und Monozyten verursacht. Die B- und T-Lymphozytenzahlen veränderten sich bei normalgewichtigen und adipösen Ratten nicht signifikant [Haas P *et al.* 2007].

Die fehlende B-Zellreaktion im aktuellen Versuch ist dahingehend zu deuten, dass Leptin keine direkte Wirkung auf diese Zellen ausübt [Haas P *et al.* 2008]. Diese Interpretation könnte die Ergebnisse der aktuellen Studie erklären.

Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Ergebnisse einer Studie von Nishimura *et al.*. In dieser Arbeit wurden 2013 sogenannte Regulator-B-Zellen beschrieben, die kontinuierlich IL-10 produzierten und dadurch die Entzündungsprozesse im Fettgewebe kontrollierten. Proben verschiedener Fettgewebsarten zeigten dabei eine große Anzahl reifer B-Zellen, die im Vergleich zu B-Zellen anderer Gewebetypen deutlich erhöhte Spiegel an IL-10 produzierten. Um die Rolle dieser B-Zellen *in vivo* zu untersuchen, generierte die Arbeitsgruppe chimäre Mäuse, bei denen IL-10 in seiner Produktion selektiv gehemmt wurde. Dies führte neben einer verstärkten Ansammlung von zytotoxischen (CD8⁺)-T-Zellen und Makrophagen im Fettgewebe ebenfalls zur erhöhten Konzentration proinflammatorischer Zytokine bei diät-induzierten adipösen Mäusen. Im Gegensatz dazu führte die Implantation dieser Fettgewebs-B-Zellen in subkutane Fettdepots bei adipösen Mäusen zu einer Reduzierung der lokalen T-Zellaktivierung und Zytokinproduktion. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass diese speziellen B-Zellen im Fettgewebe adipöser Mäuse kleiner waren, im Vergleich zu normalgewichtigen Kontrolltieren weniger IL-10 produzierten und dadurch immunmodulatorisch einen geringeren Einfluss besaßen [Nishimura S *et al.* 2013].

In einer anderen Arbeit von 2011 konnte nachgewiesen werden, dass B-Zellen über die Manipulation von T-Lymphozyten und die Produktion pathogenetischer IgG-Antikörper zur verstärkten Insulin-Resistenz führten. In dieser Studie wurden Mäuse über mehrere Wochen mit einer hoch- bzw. normalkalorischen Diät gefüttert. Dabei kam es nach vier Wochen zu einer signifikanten Akkumulation von T- und B-Zellen im viszeralen Fettgewebe der adipösen Tiere. Des Weiteren führte die Fütterung der hochkalorischen Diät zu einem Antikörper-Isotypenwechsel der B-Zellen, was sich in einer erhöhten IgG⁺-Konzentration im viszeralen Fett- und Milzgewebe der Mäuse zeigte. Bei reduzierter Produktion von IgM-Antikörpern kam es zeitgleich zur verstärkten IgG-Sekretion. Ebenfalls waren die Serumspiegel an IgA bei übergewichtigen Tieren deutlich verringert [Winer DA *et al.* 2011]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich Adipositas nicht nur auf das Mikromilieu im Fettgewebe auswirkt, sondern auch systemisch zu Veränderungen im Hinblick auf die Zusammensetzung der Immunglobuline im Organismus führt und daraus eine veränderte Beeinträchtigung zwischen T- und B-Zellen resultiert. B-Lymphozyten veranlassen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen zu einer erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine, was das Mikromilieu unter einer adipösen Stoffwechsellage ebenfalls unterstützt [Winer DA *et al.* 2011].

Im Gegensatz zu Makrophagen und T-Zellen ist über B-Zellen und deren Funktion unter einer adipösen Stoffwechsellage bisher relativ wenig bekannt und die bisher gewonnen Erkenntnisse stellen sich sehr inhomogen dar. Die Ergebnisse der o.g. Studien berücksichtigend, scheint es,

als ob B-Zellen ihrer direkten immunmodulatorischen Funktion besonders lokal in Geweben gerecht werden und die systemischen Funktionen mittels produzierter Antikörper realisiert werden.

Auf diesem Gebiet wird im zunehmenden Maße versucht, auf der Grundlage wissenschaftlicher Studien auch die Rolle der B-Lymphozyten im komplexen Zusammenspiel der Immunzellen unter adipösen Bedingungen zu verstehen. Durch ihre vielseitige Einflussnahme auf andere immunkompetente Zellen und die Produktion systemisch wirksamer Antikörper sollen sie das Mikromilieu maßgeblich beeinflussen, wodurch sie an der Manifestation adipositasbedingter Erkrankungen beteiligt sein könnten.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zellzahlen von T-Lymphozyten, CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen oder CD4⁺ T-Helferzellen im Blut der F344 Ratten festgestellt werden. Die zahlenmäßige Präsenz dieser Zellen war weder durch die DIO-Diät, noch durch eine Kurzzeitstimulation durch Tumorzellen bzw. durch das Wachstum von Metastasen beeinflusst.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen einer anderen, bereits im vorangegangenen Abschnitt der Arbeit zitierten, Studie überein. Dabei konnte eine periphere Leptinapplikation bei adipösen und normalgewichtigen Ratten keine signifikante zahlenmäßige Veränderung der T-Lymphozyten-Zahl im peripheren Blut bewirken [Haas P *et al.* 2008].

Donninelli *et al.* charakterisierten in einer aktuellen Studie fettgewebsassoziierte und frei im Blut zirkulierende Lymphozyten und T-Regulatorzellen (T_{Reg}) unter inflammatorischen Bedingungen, wie bspw. bei Adipositas oder unter dem Einfluss eines Kolonkarzinoms. Hierzu analysierte man mittels durchflusszytometrischer Messungen Fettgewebsbiopsien bzw. Blutproben adipöser oder normalgewichtiger Menschen, welche entweder gesund oder an einem Tumorleiden erkrankt waren. Hinsichtlich der T-Lymphozyten ergab sich, wie auch in unserem Versuch, kein signifikanter Unterschied hinsichtlich ihrer Verteilung im Gewebe oder in der peripheren Blutzirkulation. Demgegenüber konnte eine wesentliche Verminderung der T_{Reg} Anzahl im viszeralen Fettgewebe im Vergleich zum Blut unter Adipositas nachgewiesen werden. Der letztgenannte Aspekt könnte im Sinne eines negativen Feedbackmechanismus verstanden werden, bei dem die erhöhte Immunzellpräsenz im peripheren Blut unter proentzündlichen Bedingungen diesen entgegen wirken soll [Donninelli G *et al.* 2017].

Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein, welche ebenfalls eine verminderte Präsenz von T_{Reg}-Zellen unter Adipositas im viszeralen Fettgewebe im Gegensatz zum Blut nachweisen konnten [Feurerer M *et al.* 2009; Nishimura S *et al.* 2009].

Die Studie von Feuerer *et al.* konnte 2009 nachweisen, dass sich im abdominalen Fettgewebe von normalgewichtigen Mäusen besonders CD4⁺ Foxp3⁺ T_{Reg} anreicherten, während diese Zellen bei adipösen Tieren deutlich vermindert waren. Immunhistochemisch konnten direkte

Interaktionen zwischen T_{Reg} , Makrophagen und anderen Leukozyten beobachtet werden. Die Analysen ergaben, dass es sich bei diesen speziellen $CD4^+$ -T-Zellen um eine besondere Subpopulation von Immunzellen im Fettgewebe handeln könnte, unter deren Einfluss sich die Entzündungsneigung deutlich vermindert [Feurer M *et al.* 2009].

Weiterhin untersuchte Nishimura *et al.* im gleichen Jahr gezielt die Funktion $CD8^+$ -zytotoxischer T-Zellen in Verbindung mit der Rekrutierung entzündungsfördernder Makrophagen ins Fettgewebe bei Adipositas. Dabei konnte die Arbeitsgruppe anhand von FACS-Analysen nachweisen, dass sich im Fettgewebe von Mäusen vermehrt $CD3^+$ -T-Lymphozyten ansammelten. Des Weiteren wiesen diese überwiegend $CD4^+$ und $CD8^+$ als zusätzliche Oberflächenmarker auf. Der Vergleich zwischen adipösen und normalgewichtigen Tieren ergab signifikante Unterschiede bei der individuellen Zusammensetzung dieser Marker. Normalgewichtige Tiere wiesen in epididymalen Fettgewebsdepots eine erhöhte Zahl von $CD4^+$ - und T_{Reg} ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$)-Zellen auf, wogegen diese bei den adipösen Individuen deutlich reduziert waren [Nishimura S *et al.* 2009].

Somit ergibt sich in Zusammenschau der bisher erwähnten Studien im Hinblick auf menschliche und tierische Organismen und im Vergleich zu den Ergebnissen der aktuellen Arbeit der Eindruck, dass sich Adipositas auf die periphere T-Zell-Präsenz im Blut nur unwesentlich auswirkt. Lediglich eine spezielle Untergruppe, die T_{Reg} präsentieren sich bei Adipositas im Blut vermehrt im Vergleich zu ihrem Auftreten im Fettgewebe. Dieser Sachverhalt ließe sich im Sinne einer Schutzfunktion des jeweiligen Organismus interpretieren, wobei diese T_{Reg} -Zellen unter dem Einfluss einer adipösen Stoffwechsellage versuchen, der systemischen low-grade-Inflammation in der Peripherie entgegenzuwirken.

Im Gegensatz zu den bisher erwähnten Studien konnte die Arbeitsgruppe Bähr *et al.* im vergangenen Jahr, anhand von FACS-Analysen von PBMCs diät-induzierten adipöser Ratten, signifikante Unterschiede im Hinblick auf einzelne T-Zell-Subtypen nachweisen. Im Rahmen der Studie wurden, ähnlich wie in der aktuellen Arbeit, normalgewichtigen und adipösen Ratten jeweils mittels Azoxymethan (AOM) zur Induktion von Kolonkarzinomen bzw. NaCl behandelt. Im Verlauf dieser Untersuchungen konnten neben einem verstärkten Tumorwachstum unter Adipositas weiterhin eine signifikant reduzierte Anzahl von $CD4^+$ T-Helferzellen und erhöhte Zahl von $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen anhand von FACS-Analysen im Blut nachgewiesen werden [Bähr I *et al.* 2017].

Bezugnehmend auf den letztgenannten T-Zell-Typ ist eine Weiterführung der in-vivo-Versuche von Nishimura *et al.* 2009 hinzuzufügen, in welcher in vitro eine direkte Interaktion zwischen Adipozyten und T-Zellen nachgewiesen werden konnte. Dabei wurden $CD8^+$ -T-Zellen der Milz mit Adipozyten aus epididymalen Fettgewebspolstern in Kulturen angelegt, wobei sich zeigte, dass es unter Einfluss der adipösen Fettgewebsproben zur vermehrten T-Zellproliferation kam. Weiterhin sollte der Einfluss dieser $CD8^+$ -Zellen auf die Rekrutierung von Makrophagen in

in vitro ermittelt werden. Es zeigte sich, dass die CD8⁺-Zellen, die sich zuvor im adipösen Mikromilieu befanden, im Vergleich mit den Zellen unter normalen Bedingungen deutlich mehr Makrophagen rekrutierten. Entgegen der sich einstellenden unterschiedlichen Zellzusammensetzung und der daraus resultierenden Interaktionen der Zellen im Fettgewebe bei Adipositas konnte in der peripheren Blutzirkulation keine veränderte CD8⁺-Zellzahl nachgewiesen werden [Nishimura S *et al.* 2009].

Somit erschließt sich aus der aktuellen Datenlage bisher kein sicherer Beweis für ein verändertes T-Zell-Verhalten im Blut unter Adipositas. Eine adipöse Stoffwechsellage verursacht eine komplexe Kette immunmodulatorischer Prozesse, die in einer chronischen low-grade-Inflammation endet. T-Lymphozyten nehmen dabei eine entscheidende Schlüsselrolle, sowohl in entzündungsfördernden (zytotoxische T-Zellen), als auch in entzündungshemmenden (T-Helfer-Zellen, T_{Reg}) Funktionen ein.

In Übereinstimmung der zitierten Studien mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, ergibt sich allerdings kein sicherer Beweis für eine systemische Einflussnahme dieser Zellen. Es ist stattdessen anzunehmen, dass T-Zellen vorzugsweise im Fettgewebe mit anderen Immunzellen interagieren und auf diesem Weg zum Entzündungsgeschehen beitragen.

Wie bereits erwähnt, stellen Makrophagen den bisher meist erforschten Zelltyp im Fettgewebe dar. Sie entstehen aus peripher im Blut zirkulierenden Monozyten, die sich schließlich erst im Gewebe zu immunmodulatorisch wirksamen Gewebemakrophagen differenzieren. In dieser Form dienen sie der Erregerabwehr mittels Phagozytose von Mikroorganismen.

In der vorliegenden Studie wurden anhand von FACS-Messungen die peripheren Zellzahlen der Monozyten im Blut bestimmt. Dabei ergaben sich innerhalb der Kontrollgruppe im Kurzzeit-Versuch signifikant verminderte Zellzahlen der Monozyten im Blut der DIO-Ratten im Vergleich zu den normalgewichtigen Tieren. Ein Effekt durch die Injektion von MADB106-Zellen konnte nicht nachgewiesen werden und auch der Vergleich der MADB106-Gruppen miteinander ergab im Kurzzeit-Versuch keinen signifikanten Unterschied. Weiterhin ergaben sich im Langzeitversuch bei Vergleich aller Gruppen keine signifikanten Unterschiede bzgl. der Monozytenzahl im Blut.

Im Gegensatz dazu ergab eine Studie über das Verhalten von Monozyten bei adipösen und normalgewichtigen Kindern im Jahr 2016 die verstärkte Präsenz peripherer Monozyten im Blut adipöser Kinder. Hierbei wurde das Blut von 11 adipösen und neun normalgewichtigen Kindern nach einer 12-stündigen Nahrungskarenz mittels FACS-Analyse untersucht. Zudem wurden klinische Charakteristika und biochemische Parameter der beiden Versuchsgruppen analysiert und ausgewertet. Dabei zeigten adipöse Kinder einen signifikant höheren BMI und Hüftumfang im Vergleich zur normalgewichtigen Kontrollgruppe. Weiterhin wurden verminderte Adiponektin- und erhöhte Leptin- und CRP-Werte bei übergewichtigen Versuchsteilnehmern

erkannt, was die These der chronischen low-grade-Inflammation unter Adipositas bestätigt. Die durchflusszytometrischen Analysen der Blutproben ergaben signifikant erhöhte Zahlen von nicht-klassischen CD14⁺CD16⁺⁺ Monozyten bei adipösen Kindern, welche weiterhin vermehrt TNF α , IL-1 β und IL-6 produzierten und verminderte IL-10. Somit lassen die Ergebnisse der genannten Studie vermuten, dass Monozyten unter Adipositas die chronische Entzündungsreaktion positiv unterhalten und möglicherweise für Adipositas bedingte Erkrankungen im Kindesalter mitverantwortlich sind [Mattos RT *et al.* 2016].

In einer anderen Arbeit wurden Monozyten im peripheren Blut hinsichtlich ihrer Korrelation zum BMI und zum Hüftumfang (waist circumference) als erste Anzeichen für eine subklinische Entzündungsreaktion bei Adipositas untersucht. Dabei wurde das Blut von 63 Spendern nach 12-stündiger Nahrungskarenz mittels durchflusszytometrischer Bestimmungen auf die Präsenz peripherer Monozyten untersucht und das Muster untereinander verglichen. Es zeigte sich, dass die Definition von Adipositas, die sich auf den Hüftumfang und nicht den BMI bezieht, mit einem proinflammatorischen Monozytenmuster korreliert, ohne dass die Zahl der peripheren Monozyten verändert ist. Somit ergab sich die Vermutung, dass Adipositas einen Reifungsprozess von Monozyten verursacht, der das proentzündliche Milieu weiter unterstützt [Leite F *et al.* 2017].

Bzgl. der vorab genannten Studien ist hinzuzufügen, dass sich die Ergebnisse auf durchflusszytometrische Messungen nach 12-stündiger Nahrungskarenz beschränken, was in der aktuellen Arbeit nicht der Fall ist. Dadurch ließen sich möglicherweise die Unterschiede hinsichtlich der peripheren Monozytenzahl im Blut begründen. Nach 12-stündiger Nahrungskarenz kam es in den Versuchen von Leite *et al.* im vergangenen Jahr zu keiner Verringerung der peripheren Zellzahlen. In der aktuellen Arbeit hingegen zeigten sich die Monozyten im Blut zahlenmäßig bei adipösen Kontrolltieren vermindert. Allerdings erfolgte die Blutprobenanalyse nicht nach einer 12-stündigen Nahrungskarenz. Somit kann davon ausgegangen werden, dass unter Adipositas die Anzahl von Monozyten im Blut generell vermindert ist und sich im Rahmen einer gegensätzlichen Stoffwechsellage schnell erholt und angleicht.

Insgesamt gibt es hinsichtlich der zahlenmäßigen Präsenz von Monozyten im Blut unter adipöser Stoffwechsellage bisher unterschiedliche Ansichten. Sicher ist jedoch, dass sie die chronische low-grade-Inflammation unterstützen und aufrechterhalten.

Arbeiten hinsichtlich ihres Verhaltens im Fettgewebe vervollständigen die Betrachtung von Monozyten bzw. Makrophagen als Schlüsselkomponenten im Fettstoffwechsel. 2003 konnte eine Arbeitsgruppe anhand von Experimenten mit Mäusen feststellen, dass sich unter adipösen Bedingungen vermehrt Makrophagen im Fettgewebe ansammeln. Die Makrophagen von normalgewichtigen Tieren zeigten sich klein, isoliert und verstreut im Fettgewebe. Demgegenüber reicherte sich dieser Zelltyp im Fettgewebe adipöser Mäuse so stark an, dass die

Adipozyten regelrecht von den Makrophagen eingeschlossen wurden. Ähnliche Ergebnisse ergaben die Versuche anhand von subkutanem Fettgewebe beim Menschen [Weisberg SP *et al.* 2003].

Auch Nishimura *et al.* konnten 2009 mittels durchflusszytometrischer Messungen und Immunhistochemie eine signifikant erhöhte Infiltration von F4/80⁺-Makrophagen ins Fettgewebe bei diät-induzierten adipösen Mäusen feststellen [Nishimura S *et al.* 2009].

Mit der Frage, wie genau die Umverteilung von Monozyten bzw. Makrophagen stattfindet, beschäftigte sich 2003 die Arbeitsgruppe Takahashi *et al.* Bei den Versuchen wurde das Fettgewebe adipöser Mäuse auf die mRNA adipozyten-selektiver MCP-1 untersucht. Mittels PCR und Laser-Mikrodesektion konnte festgestellt werden, dass die mRNA-Konzentration für MCP-1 im Fettgewebe bei DIO-Mäusen signifikant erhöht war. Ebenfalls ergab sich, dass korrelierend zur mRNA der Anteil an MCP-1-Proteinen im Fettgewebe bei diesen Tieren etwa fünffach höher war im Vergleich zu normalgewichtigen Mäusen. Schließlich konnte die Arbeitsgruppe erhöhte MCP-1-Plasma-Spiegel in positiver Korrelation zum BMI bei diät-induzierten adipösen Mäusen feststellen [Takahashi K *et al.* 2003].

Der im eigenen Kurzzeit-Versuch erbrachte Nachweis einer generellen Verminderung der peripheren Zellzahlen von Monozyten im adipösen Umfeld reiht sich dementsprechend in den aktuellen Kenntnisstand über das Verhalten von Makrophagen unter Adipositas ein. Es lässt sich vermuten, dass die zahlenmäßige Reduktion peripherer Monozyten im Blut in der vorliegenden Arbeit der Ursache geschuldet ist, dass diese unter den Bedingungen einer adipösen Stoffwechsellage ins Fettgewebe rekrutieren und sich dort zu Gewebemakrophagen differenzieren, wogegen sie unter den Bedingungen einer persistenten Tumorerkrankung und den daraus für den Körper resultierenden Stressreaktionen ubiquitär benötigt werden und daher auch im peripheren Blut der DIO-gefütterten Ratten vergleichbar vertreten sind, wie bei den Kontrolltieren.

Die Gesamtheit der Ergebnisse der vorliegenden Studie lässt unter Einbeziehung anderer Forschungsarbeiten erkennen, dass eine diät-induzierte adipöse Stoffwechsellage für den Organismus eine Stresssituation darstellt, die durch eine chronische low-grade-Inflammation gekennzeichnet ist. Eine veränderte Nahrungszusammensetzung führt zu erhöhtem Körpergewicht und beeinträchtigt die Immunfunktion auf Zellebene unterschiedlich. Dies verursacht über einen längeren Zeitraum das vermehrte Wachstum von Tumormetastasen bei adipösen Tieren.

Allerdings lässt die isolierte Betrachtung der jeweiligen Zellzahlen im peripheren Blut viele Fragen hinsichtlich einer systemischen Reaktion des Organismus unter Adipositas offen. Eine entsprechende Erweiterung der Aufgabenstellung war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht vorgesehen. In zukünftigen Untersuchungen könnte die Bestimmung von Zytokinen und

Adipokinen bzw. die zahlenmäßige Präsenz der einzelnen Zellarten in den jeweiligen Kompartimenten (viszerales oder subkutanes Fettgewebe, Leber, ect.) eine weiterführende Klärung ermöglichen. Weiterhin wurde in der aktuellen Studie lediglich die Auswirkung einer veränderten Nahrungszusammensetzung auf die Körpergewichtsentwicklung untersucht und keine Betrachtungen bzgl. des Blutzuckerprofils, Arteriosklerose und der daraus resultierenden Nebenerkrankungen der Tiere angestellt. Auch bietet die genetische Prädisposition und eine daraus resultierende Anfälligkeit gegenüber Adipositas bedingter Erkrankungen Spielräume für weitere Hypothesen und Ansätze zukünftiger Forschungsarbeiten. Es wäre darüber hinaus denkbar, in künftigen Untersuchungen, neben den Auswirkungen eines langfristig aufgebauten (6-8 Wochen) adipösen Milieus, den kurzzeitigen Einfluss einer proinflammatorischen Umgebung auf Immunzellen vertieft zu klären.

Dennoch stellt die vorliegende Studie einen weiteren Baustein hinsichtlich des Verständnisses systemischer Immunprozesse unter Adipositas dar. In Zukunft sollte weiter an der Fragestellung der differenzierten peripheren Immunzellstimulation bzw. -hemmung unter Adipositas gearbeitet werden, um nachfolgend gegebenenfalls die Ergebnisse auf den Menschen zu übertragen und praktisch anzuwenden.

Die steigenden Prävalenzen im Hinblick auf Adipositas-assoziierte Infektions- und Tumorerkrankungen und die bisher noch weitgehend ungeklärten Zusammenhänge machen deutlich, dass noch vielfältige wissenschaftliche Studien durchgeführt werden müssen.

5. Zusammenfassung

Die weltweite Progredienz von Adipositas und die damit verbundene Zunahme gesundheitlich negativer Auswirkungen im Hinblick auf das Herz-Kreislauf- und das endokrine System sind anhand zahlreicher internationaler Studien inzwischen belegt. Des Weiteren wird zunehmend deutlich, dass Fettleibigkeit auch die Progredienz maligner Neoplasien unterstützt.

Bisherige Studien konnten veränderte Immunzellfunktionen bei Adipositas bzw. im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen nachweisen. Allerdings wurde der Zusammenhang dieser Faktoren untereinander bisher wenig berücksichtigt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zahlen verschiedener Immunzellen im Hinblick auf die Exposition mit Zellen eines Adenokarzinoms der Mamma (MADB106-Zellen) untersucht. Dabei wurde deren Präsenz unter den Bedingungen einer kurz- bzw. langfristigen Tumorzelleinwirkung sowie unter normaler bzw. adipöser Stoffwechsellage verglichen.

Es erhielten 32 männliche F344-Ratten eine DIO-Diät (34 % Rohfettgehalt), wohingegen weiteren 32 Tieren eine Kontrolldiät (4 % Rohfettgehalt) verabreicht wurde. Nachdem die Versuchstiere über einen Zeitraum von sechs bis 10 Wochen mit der entsprechenden Diät gefüttert worden waren, wurden ihnen die MADB106-Zellen bzw. Natriumchlorid als Kontrollsubstanz intravenös über die Schwanzvene injiziert. Die anschließende Tötung der Tiere erfolgte nach 15 Minuten (Kurzzeit-Versuch) bzw. 21 Tagen (Langzeit-Versuch), wonach die im Blut enthaltenen Zellen (NK-Zellen, B-Zellen, zytotoxische T-Zellen, T-Helfer-Zellen und Monozyten) mittels durchflusszytometrischer Messungen analysiert wurden.

Unter adipösen Stoffwechselbedingungen zeigen sich im Kurzzeit-Versuch peripher eine verminderte Anzahl von NK-Zellen und Monozyten, wohingegen B- und T-Zellen unbeeinflusst erscheinen. Im Langzeit-Versuch ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zellzahlen der oben genannten Zelllinien im peripheren Blut.

Somit ließe sich vermuten, dass im Rahmen der chronischen low-grade-Inflammation unter Adipositas einige Immunzell-Subpopulationen diese lokal unterstützen und in das Gewebe abwandern. Folglich sind sie im peripheren Blut vermindert nachweisbar. Unter den Bedingungen einer manifesten Tumorerkrankung im Langzeit-Versuch, werden diese allerdings ubiquitär im Organismus benötigt und dahingehend mobilisiert, sodass zahlenmäßig keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der Immunzellpräsenz im Blut zwischen normalgewichtigen und adipösen Ratten nachweisbar sind. In wieweit dieser eventuelle Versuch der Tumorkontrolle allerdings vom Organismus suffizient aufrechterhalten werden kann ist fraglich, da sich im Langzeit-Versuch weiterhin vermehrt oberflächliche Lungenmetastasen bei adipösen Tieren zeigen. Auch könnten eben diese initial nachweisbaren zahlenmäßigen Einschränkungen der NK-Zellen und Monozyten dafür verantwortlich sein, dass die Ansiedlung

der MADB106-Zellen in der Lunge und damit die Ausbildung der Lungenmetastasen bei adipösen Tieren primär möglich ist und schneller voranschreitet.

6. Literaturverzeichnis

Anfossi N, Andrè P., Guia S, Falk CS, Roetynck S, Stewart CA, *et al.* (2006). "Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I." *Immunity* 25(2): 331-342.

Arkan MC, Hevener AL, *et al.* (2005). "IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance." *Nature Medicine* 11(2): 191-198.

Barlozzari T, Reynolds CW, *et al.* (1983). "In vivo role of natural killer cells: involvement of large granular lymphocytes in the clearance of tumor cells in anti-asialo GM1-treated rats." *Journal of Immunology* 131(2): 1024-1027.

Bähr I, Goritz V, *et al.* (2017). "Diet-Induced Obesity Is Associated with an Impaired NK Cell Function and an Increased Colon Cancer Incidence." *Journal of Nutrition and Metabolism* 2017:4297025. doi: 10.1155/2017/4297025.

Ben-Eliyahu S, Page GG, *et al.* (1996). "Acute alcohol intoxication suppresses natural killer cell activity and promotes tumor metastasis." *Nature Medicine* 2(4): 457-60.

Bianchini F, Kaaks R, *et al.* (2002). "Overweight, obesity and cancer risk." *Lancet Oncology* 3(9): 565-574.

Brunetta E, Hudspeth KL, *et al.* (2010). "Pathologic natural killer cell subset redistribution in HIV-1 infection: new insights in pathophysiology and clinical outcomes." *Journal of Leukocyte Biology* 88(6): 1119-1130.

Bruun JM, Lihn AS, *et al.* (2003). "Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans." *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 285(3): E527-E533.

Buc E, Kwiatkowski F, *et al.* (2006). "Tobacco smoking: a factor of early onset of colorectal cancer." *Diseases of the Colon & Rectum* 49(12): 1893-6.

Burke JP, O'Brien P, *et al.* (2002). "Impact of case ascertainment on recent trends in diabetes incidence in Rochester, Minnesota." *American Journal of Epidemiology* 155(9): 859-65.

Caldefie-Chezet F, Poulin A, *et al.* (2001). "Leptin: a potential regulator of polymorphonuclear neutrophil bactericidal action?" *Journal of Leukocyte Biology* 69(3): 414-418.

Calle EE and Kaaks R (2004). "Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms." *Nature Reviews Cancer* 4(8): 579-591.

- Canoy D**, Boekholdt SM, *et al.* (2007). "Body fat distribution and risk of coronary heart disease in men and women in the european prospective investigation into cancer and nutrition in norfolk cohort: a population-based prospective study." *Circulation* 116(25): 2933-2943.
- Chretien AS**, Le Roy A, *et al.* (2014). "Cancer-Induced Alterations of NK-Mediated Target Recognition: Current and Investigational Pharmacological Strategies Aiming at Restoring NK-Mediated Anti-Tumor Activity." *Frontiers in Immunology* 5: 122.
- Chung JJ**, Markiewicz MA, *et al.* (2014). "Role of NKG2D in Obesity-Induced Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance." *PloS one* 9(10): e110108.
- Clement K** and Langin D (2007). "Regulation of inflammation-related genes in human adipose tissue." *Journal of Internal Medicine* 262(4): 422-430.
- Cooper MA**, Fehniger TA *et al.* (2001). "The biology of human natural killer-cell subsets." *TRENDS in Immunology* 22(11): 633-40.
- Cullen SP** and Martin SJ (2008). "Mechanisms of granule-dependent killing." *Cell Death and Differentiation* 15(2): 251-262.
- De Hoff JL**, Davidson LM, *et al.* (1978). "An enzymatic assay for determining free and total cholesterol in tissue." *Clinical Chemistry* 24(3): 433-5.
- De Onis M**, Blössner M, *et al.* (2010). "Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children." *The American Journal of Clinical Nutrition* 92(5): 1257-1264.
- De Rosa V**, Procaccini C, *et al.* (2007). "A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation." *Immunity* 26(2): 241-255.
- Dieudonne MN**, Machinal-Quelin F, *et al.* (2002). "Leptin mediates a proliferative response in human MCF-7 breast cancer cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293(1): 622-628.
- Donninelli G**, Del Cornò M, *et al.* (2017). "Distinct Blood and Visceral Adipose Tissue Regulatory T-Cell and Innate Lymphocyte Profiles Characterize Obesity and Colorectal Cancer." *Frontiers in Immunology* 8: 643.
- Elinav E**, Abd-Elnabi A, *et al.* (2006). "Suppression of hepatocellular carcinoma growth in mice via leptin, is associated with inhibition of tumor cell growth and natural killer cell activation." *Journal of Hepatology* 44(3): 529-536.

- Elinav E**, Pappo O, *et al.* (2006). "Adoptive transfer of regulatory NKT lymphocytes ameliorates non-alcoholic steatohepatitis and glucose intolerance in ob/ob mice and is associated with intrahepatic CD8 trapping." *The Journal of Pathology* 209(1): 121-8.
- Fain JN** (2010). "Release of Inflammatory Mediators by Human Adipose Tissue Is Enhanced in Obesity and Primarily by the Nonfat Cells: A Review." *Mediators of Inflammation* 2010:513948.
- Fantuzzi G** (2005). "Adipose tissue, adipokines, inflammation." *The Journal of allergy and clinical immunology* 115(5): 911-9.
- Fantuzzi G** (2008). "Adiponectin and inflammation: consensus and controversy." *Journal of allergy and clinical immunology* 121(2): 326-330.
- Farag SS** und Caligiuri MA (2006). "Human natural killer cell development and biology." *Blood Reviews* 20(3): 123–37.
- Feuerer M**, Herrero L, *et al.* (2009). "Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameter." *Nature Medicine* 15(8): 930-9.
- Frankenberry KA**, Somasundar P, *et al.* (2004). "Leptin induces cell migration and the expression of growth factors in human prostate cancer cells." *American Journal of Surgery* 188(5): 560-5.
- Futreal PA**, Coin L, *et al.* (2004). "A census of human cancer genes." *Nature Reviews. Cancer* 4(3): 177-183.
- Giovannucci E** and Michaud D (2007). "The role of obesity and related metabolic disturbances in cancers of the colon, prostate, and pancreas." *Gastroenterology* 132(6): 2208-25.
- Gordon S** and Taylor PR (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." *Nature Reviews Immunology* 5(12): 953-964.
- Gorelik E**, Wiltrot RH, *et al.* (1982). "Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice." *International Journal of Cancer* 30(1): 107–12.
- Haas P**, Straub RH, *et al.* (2008). "Peripheral but not central leptin treatment increases numbers of circulating NK cells, granulocytes and specific monocyte subpopulations in non-endotoxaemic lean and obese LEW-rats." *Regulatory Peptides* 151(1-3): 26-34.
- Hallgreen CE** and Hall KD (2008). "Allometric relationship between changes of visceral fat and total fat mass." *International Journal of Obesity* 32(5): 845-52.

- Henderson BE** and Feigelson HS (2000). "Hormonal carcinogenesis." *Carcinogenesis* 21(3): 427-433.
- Hosogai N**, Fukuhara A, *et al.* (2007). "Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation." *Diabetes* 56(4): 901-11.
- Hossain P**, Kawar B, *et al.* (2007). "Obesity and diabetes in the developing world a growing challenge." *New England Journal of Medicine* 356(3): 213-215.
- Inngjerdigen M**, Kveberg L, *et al.* (2011). "Natural killer cell subsets in man and rodents." *78(2)*: 81-8.
- Jahn J**, Spielau M, *et al.* (2015). "Decreased NK cell functions in obesity can be reactivated by fat mass reduction." *Obesity (Silver Spring)* 23(11): 2233-41.
- Jemal A**, Siegel R, *et al.* (2007). "Cancer statistics." *A Cancer Journal for Clinicians* 57(1): 43-66.
- Kanda H**, Tateya S, *et al.* (2006). "MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity." *Journal of Clinical Investigation* 116(6): 1494-505.
- Karlsson EA** and Beck MA (2010). "The burden of obesity on infectious disease." *Experimental Biology and Medicine* 235(12): 1412-1424.
- Kershaw EE** and Flier JS (2004). "Adipose tissue as an endocrine organ." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89(6): 2548-2556.
- Khan N**, Afaq F, *et al.* (2010). "Lifestyle as risk factor for cancer: evidence from human studies." *Cancer Letters* 293(2): 133-143.
- Kim S**, Poursine-Laurent J, *et al.* (2005). "Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules." *Nature* 436(7051): 709-13.
- Kim Y** and Lee S (2009). "An association between colonic adenoma and abdominal obesity: a cross-sectional study." *BMC Gastroenterology* 9: 4.
- La Cava A** and Matarese G (2004). "The weight of leptin in immunity." *Nature Reviews. Immunology* 4(5): 371-379.
- Lago F**, Dieguez C, *et al.* (2007). "The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses." *Cytokine Growth Factor Reviews* 18(3-4): 313-325.

- Lanier LL**, Le AM, *et al.* (1986). "The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes." *Journal of Immunology*, 136(12): 4480-6.
- Lautenbach A**, Budde A, *et al.* (2009). "Obesity and the associated mediators leptin, estrogen and IGF-I enhance the cell proliferation and early tumorigenesis of breast cancer cells." *Nutrition and Cancer* 61(4): 484-91.
- Lautenbach A**, Wrann CD, *et al.* (2009). "Altered phenotype of NK cells from obese rats can be normalized by transfer into lean animals." *Obesity (Silver Spring)* 17(10): 1848-55.
- Leite F**, Leite Â, *et al.* (2017). "Predictors of Subclinical Inflammatory Obesity: Plasma Levels of Leptin, Very Low-Density Lipoprotein Cholesterol and CD14 Expression of CD16+ Monocytes." *Obesity Facts* 10(4): 308-322.
- Libby P** (2007). "Fat fuels the flame: triglyceride-rich lipoproteins and arterial inflammation." *Circulation Research* 100(3): 299-301.
- Ljunggren HG** and Kärre K (1990). "In search of the "missing self": MHC molecules and NK cell recognition." *Immunology Today* 11(7): 237-44.
- Lumeng CN**, Bodzin JL, *et al.* (2007). "Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization." *Journal of Clinical Investigation* 117(1): 175-84.
- Martín-Romero C**, Santos-Alvarez J, *et al.* (2000). "Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes." *Cellular Immunology* 199(1): 15-24.
- Mattos RT**, Medeiros N, *et al.* (2016). "Chronic Low-Grade Inflammation in Childhood Obesity Is Associated with Decreased IL-10 Expression by Monocyte Subsets." *PLoS One* 11(12): e0168610
- Melamed R**, Rosenne E, *et al.* (2010). "The marginating pulmonary immune compartment in rats: characteristics of continuous inflammation and activated NK cells." *Journal of Immunotherapy* 33(1): 16-29.
- Mohamed-Ali V**, Flower L, *et al.* (2001). "Beta-adrenergic regulation of IL-6 release from adipose tissue: in vivo and in vitro studies." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86(12): 5864-9.
- Naghma K**, Farrukh A, *et al.* (2010). "Lifestyle as risk factor for cancer: evidence from human studies." *Cancer Letters* 293(2): 133-43

Nave H, Mueller G, *et al.* (2008). "Resistance of Janus kinase-2 dependent leptin signaling in natural killer (NK) cells: a novel mechanism of NK cell dysfunction in diet-induced obesity." *Endocrinology* 149(7): 3370-8.

Nishimura S, Manabe I, *et al.* (2009). "CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity." *Nature Medicine* 15(8): 914-20.

Nishimura S, Manabe I, *et al.* (2013). "Adipose Natural Regulatory B Cells Negatively Control Adipose Tissue Inflammation." *Cell Metabolism* S1550-4131(13)00386-0.

O'Rourke RW, Metcalf MD, *et al.* (2009). "Depot-specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and INF-gamma in inflammation in human adipose tissue." *International Journal of Obesity* 33(9): 978-90.

O'Rourke RW, Gaston GD, *et al.* (2013). "Adipose tissue NK cells manifest an activated phenotype in human obesity." *Metabolism* 62(11): 1557-61.

Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, *et al.* (2007). "Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance." *Nature* 447(7148): 1116-20.

Orlando L, Colleoni M, *et al.* (2007). "Management of advanced breast cancer." *Annals of Oncology* 18: 74-76.

Pfaffl MW (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR". *Nucleic Acids Research* 29:e45

Palmer G, Aurrand-Lions M, *et al.* (2006). "Indirect effects of leptin receptor deficiency on lymphocyte populations and immune response in db/db mice." *Journal of Immunology* 177(5): 2899-907.

Papamichail M, Perez SA, *et al.* (2004). "Natural killer lymphocytes: biology, development, and function." *Cancer Immunology Immunotherapy* 53(3): 176-86.

Pischon T, Lahmann PH, *et al.* (2006). "Body size and risk of renal cell carcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)." *International Journal of Cancer* 118(3): 728-38.

Pou KM, Massaro JM, *et al.* (2007). "Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study." *Circulation* 116(11): 1234-41.

Ranson T, Vosshenrich CA, *et al.* (2003). "IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis." *Blood* 101(12): 4887-4893.

Rausch ME, Weisberg S, *et al.* (2008). "Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration." *International Journal of Obesity* 32(3): 451-63.

Renehan AG, Roberts DL, *et al.* (2008). "Obesity and cancer: pathophysiological and biological mechanisms." *Archives of Physiology and Biochemistry* 114(1): 71-83.

Renehan AG, Tyson M, *et al.* (2008). "Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies." *Lancet* 371(9612): 569-578.

RKI (2012) Robert Koch Institut - Zentrum für Krebsregisterdaten: Krebs in Deutschland 2007/2008 8. Ausgabe, 2012. Abgerufen am 02.05.2014.

http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2012.pdf?__blob=publicationFile

Rosen ED, Spiegelmann BM, *et al.* (2006). "Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis." *Nature* 444(7121): 847-853.

Scherer PE (2006). "Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ." *Diabetes* 55(6): 1537-1545.

Schindler TH, Cardenas J, *et al.* (2006). "Relationship between increasing body weight, insulin resistance, inflammation, adipocytokine leptin, and coronary circulatory function." *Journal of the American College of Cardiology* 47(6): 1188-95.

Shingu K, Helfritz A, *et al.* (2003). "CD26 expression determines lung metastasis in mutant F344 rats: involvement of NK cell function and soluble CD26." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 52(9): 546-554.

Spielmann J, Hanke J *et al.* (2017). "Significantly enhanced lung metastasis and reduced organ NK cell functions in diet-induced obese rats." *BMC Obesity* 4:24.

Steele CB, Thomas CC *et al.* (2017). "Vital Signs: Trends in Incidence of Cancers Associated with Overweight and Obesity - United States, 2005-2014." *Morbidity and Mortality Weekly Report* 66(39): 1052-1058.

Sun Y and Lodish HF (2010). "Adiponectin deficiency promotes tumor growth in mice by reducing macrophage infiltration." *PLoS One* 5(8): e11987.

- Takahashi K**, Mizuarai S, *et al.* (2003). "Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice." *The Journal of Biological Chemistry* 278(47): 46654-60.
- Talmadge JE**, Meyers KM *et al.* (1980). "Role of natural killer cells in tumor growth and metastasis: C57BL/6 normal and beige mice." *Journal of the National Cancer Institute* 65(5): 929-35.
- Tangye SG**, Phillips JH, *et al.* (2000). "Functional requirement for SAP in 2B4-mediated activation of human natural killer cells as revealed by the X-Linked lymphoproliferative syndrome." *The Journal of Immunology* 165(6): 2932-6.
- Trayhurn P** and Wood IS (2004). "Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue." *British Journal of Nutrition* 92(3): 347-355.
- Van Hanswijck de Jonge P**, Van Furth EF, *et al.* (2003). "The prevalence of DSM-IV personality pathology among individuals with bulimia nervosa, binge eating disorder and obesity." *Psychological Medicine* 33(7): 1311-7.
- Vivier E**, Tomasello E, *et al.* (2008). "Functions of natural killer cells." *Nature Immunology* 9(5): 503-510.
- Von Hörsten S**, Helfritz A, *et al.* (2000). "Stereological quantification of carboxyfluorescein-labeled rat lung metastasis: a new method for the assessment of natural killer cell activity and tumor adhesion in vivo and in situ." *Journal of immunological methods* 239(1-2): 25-34.
- Waldhauer I** and Steinle A (2008). "NK cells and cancer immunosurveillance." *Oncogene* 27(45): 5932-5943.
- Warne JP** (2003). "Tumour necrosis factor alpha: a key regulator of adipose tissue mass." *Journal of Endocrinology* 177(3): 351-355.
- Weisberg SP**, McCann D, *et al.* (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." *Journal of Clinical Investigation* 112(12): 1796-808.
- Weston SA** and Parish CR (1990). "New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy." *Journal of Immunological Methods* 133(1): 87-97.
- Wild S**, Roglic G, *et al.* (2004). "Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030." *Diabetes Care* 27(5): 1047-53.

- Willett WC** (2001). "Diet and breast cancer." *Journal of Internal Medicine* 249(5): 395-411.
- Wiltrout RH** (2000). "Regulation and antimetastatic functions of liver-associated natural killer cells." *Immunological Reviews* 174: 63-76.
- Winer DA, Winer S, et al.** (2011). "B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies." *Nature Medicine* 17(5): 610-7.
- WCRFI – CUP** (2017). World Cancer Research Fund International - Continuous Update Projects. Abgerufen am 29.01.2018
<http://www.wcrf.org/int/research-we-fund/continuous-update-project-cup>
- WHO** (2011) Germany: NCD country profiles. Abgerufen am 04.07.2016.
<http://www.who.int/countries/deu/en/>
- WHO** (2011) USA: NCD country profiles. Abgerufen am 04.07.2016.
<http://www.who.int/countries/usa/en/>
- WHO** (2014): 10 facts on obesity. Abgerufen am 04.07.2016
<http://www.who.int/features/factfiles/obesity/en/>
- WHO** (2016): Obesity and overweight – Fact sheet. Abgerufen am 13.11.2017
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
- Wrann CD, Laue T, et al.** (2012). "Short-term and long-term leptin exposure differentially affect human natural killer cell immune functions." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 302(1): E108-16.
- Wu H, Ghosh S, et al.** (2007). "T-cell accumulation and regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity." *Circulation* 115(8): 1029-38.
- Wu J and Lanier LL** (2003). "Natural killer cells and cancer." *Advances in Cancer Research* 90:127–56.
- Xu H, Barnes GT, et al.** (2003). "Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance." *The Journal of Clinical Investigation* 112(12): 1821-30.
- Yamauchi T, Kamon J, et al.** (2001). "The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity." *Nature Medicine* 7(8): 941-6.

Yamauchi T, Kamon J, *et al.* (2003). "Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis." *The Journal of Biological Chemistry* 278(4): 2461-8.

Zaldivar F, McMurray RG, *et al.* (2006). "Body fat and circulating leukocytes in children." *International Journal of Obesity* 30(6): 906-11.

Zhao Y, Sun R, *et al.* (2003). "Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300(2): 247-52.

7. Thesen

1. Adipöse Menschen haben gegenüber Menschen mit normalem Körpergewicht ein erhöhtes Risiko, an malignen Neoplasien zu erkranken. Zudem zeigen Sie ein verstärktes Tumorwachstum, vermehrte Metastasierung und höhere Mortalität.
2. Immunzellen (NK-Zellen, B- und T-Lymphozyten und Monozyten) spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Elimination von schädlichen Fremdeinflüssen auf den Organismus, wie bspw. entarteten Tumorzellen.
3. Die Immunzellfunktionen unter Adipositas und die eines Organismus, welcher an einer zu Grunde liegenden Tumorerkrankung leidet, sind verändert.
4. Die Studie soll sowohl den Einfluss von Adipositas als auch zeitgleich den Einfluss von Zellen eines Adenokarzinoms der Mamma (MADB106-Zellen) auf die systemische Immunzellfunktion untersuchen.
5. Unter adipösen Stoffwechselbedingungen zeigen sich im Kurzzeit-Versuch (15 minütige Einwirkungszeit von MADB106-Zellen) peripher verminderte Zellzahlen von NK-Zellen und Monozyten.
6. B- und T-Lymphozyten erschienen zahlenmäßig unbeeinflusst im Kurz- und Langzeit-Versuch (3 wöchiges Wachstum der MADB106-Zell-induzierten Lungenmetastasen), unabhängig von der Stoffwechsellage.
7. Im Langzeit-Versuch (3 wöchiges Wachstum der MADB106-Zell-induzierten Lungenmetastasen) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zellzahlen von NK-Zellen, B- und T-Lymphozyten und Monozyten im peripheren Blut.
8. Eine chronische low-grade-Inflammation unter Adipositas führt zunächst teilweise zu einer Reduktion peripherer Abwehrmechanismen im Blut.
9. Unter den Bedingungen einer manifesten Tumorerkrankung im Langzeit-Versuch werden die peripheren Immunzellen ubiquitär im Organismus benötigt und mobilisiert, sodass keine signifikanten Veränderungen zwischen normalgewichtigen und adipösen Ratten nachweisbar sind.
10. Im Langzeit-Versuch zeigen sich vermehrt oberflächliche Lungenmetastasen bei adipösen Tieren.

Selbstständigkeitserklärung

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Untersuchungen zur Verteilung von Immunzellen im peripheren Blut in einem diät-induziert adipösen Rattenmodell nach Tumorinduktion“ selbstständig angefertigt habe und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit ist bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungskommission vorgelegt wurden.

Halle (Saale),

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich keinen vorausgegangenen Promotionsversuch unternommen habe, und dass kein Promotionsversuch an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung läuft.

Halle (Saale),

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Knauf
 Vorname: Dorle
 Geburtsdatum und -ort: 17.09.1989 in Freiberg (Sachsen)
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig
 E-Mail: dorle.knauf@web.de

Ausbildung

09/2000 – 07/2008 Geschwister-Scholl-Gymnasium Freiberg (Sachsen)
 Abschluss: Abitur (1,3)
 10/2009 – 09/2016 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 Studiengang: Humanmedizin
 09/2013 – 03/2014 Auslandssemester in Parma, Italien
 04/2015 – 09/2015 Universitätsklinikum Halle (Saale),
 Klinik für Innere Medizin II (Nephrologie, Rheumatologie,
 Endokrinologie und Diabetologie)
 09/2015 – 12/2015 Hospital Calderón Guardia in San José, Costa Rica,
 Klinik für Allgemein Chirurgie, Zentrale Notaufnahme
 12/2015 – 04/2016 Universitätsklinikum Halle (Saale),
 Department für Orthopädie, Unfall – und
 Wiederherstellungschirurgie (DOUW)

Beruflicher Werdegang

10/2016 – heute Assistenzärztin im Department für Orthopädie, Unfall – und
 Wiederherstellungschirurgie (DOUW) des
 Universitätsklinikums Halle (Saale)

Preise und Auszeichnungen

04/2008 Teilnahme am Landeswettbewerb „Jugend forscht“ ,
 Fachbereich Biologie (Thema: „Lärmbedingte Hörschäden bei
 Jugendlichen“)
 10/2014 Posterpreis zum Forschungstag 2014 Universitätsklinikum
 Halle (Saale), Thema: „Obese rats show altered NK-cell
 functions and increased lung-metastasis“
 2011 – 2016 Stipendiatin bei der „Friedrich-Ebert-Stiftung“

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen, welche an der Realisierung dieser Arbeit mitgeholfen haben, herzlich bedanken.

Ich danke Frau Prof. Heike Kielstein, Leiterin des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die übertreffend gute Betreuung im Rahmen der Doktorarbeit. Vielen Dank für die Überlassung des Themas, die umfassende wissenschaftliche Beratung, die Motivation und Begleitung in dieser Zeit. Ich habe mich sowohl professionell, wie auch menschlich jederzeit sehr gut angenommen gefühlt.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. troph. Julia Spielmann für die sehr gute Beratung, Unterstützung und Hilfe im Rahmen der Versuchsplanung, -durchführung und -auswertung. Vielen Dank für all die kreativen Ideen und motivierenden Hilfestellungen.

Ich danke Frau Dr. Janine Jahn für die Hilfe bei der Vorbereitung und Erhebung der FACS-Daten. Vielen Dank für all die Zeit und Mühe bei der Erarbeitung der einzelnen Versuchsschritte und der Einführung in die Methodik.

Ebenfalls möchte ich Herrn Dr. med. John Hanke für die Kooperation bei der Betreuung der Tiere und die Unterstützung im Rahmen der Experimente danken.

Vielen herzlichen Dank auch an Frau Franziska Knöfel, Frau Susann Möschter und Herrn Tilo Hanowski für die Unterstützung im Labor und die positive Arbeitsgruppenatmosphäre.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, ohne die ich diese Arbeit weder begonnen noch zu Ende gebracht hätte. Vielen herzlichen Dank für die jahrelange Unterstützung und Motivation.