

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

Direktorin: Prof. Dr. med. Heike Kielstein

Immunologische Untersuchungen zum Einfluss von Adipositas auf die Entstehung von
kolorektalen Karzinomen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

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

von Henriette Doberstein
geboren am: 19.12.1990 in Radebeul
Betreuer: Prof. Dr. med. Heike Kielstein
Gutachter:
Frau Prof. H. Kielstein
Prof. H.-J. Seyfarth (Leipzig)
Prof. T. Lange (Weißenfels)
25.09.2018
20.08.2019

Referat

Adipositas stellt einen bedeutenden Risikofaktor für maligne Erkrankungen dar. Unter anderem konnten zahlreiche Studien zeigen, dass die Detektion und Lyse entarteter Zellen durch Natürliche Killerzellen bei Adipositas gestört ist.

Ziel der vorliegenden Studie war es festzustellen, ob die erhöhte Inzidenz von kolorektalen Karzinomen bei Adipositas auf eine gestörte NK-Zell-Funktionalität zurückgeführt werden kann. Über einen Versuchszeitraum von 45 Wochen erhielt eine Versuchspopulation von insgesamt 50 männlichen Wistar-Ratten eine hochkalorische Diät (Fettgehalt 60 %) zur Induktion einer Adipositas oder eine normokalorische Kontrolldiät (Fettgehalt 10 %). Zur Induktion eines kolorektalen Karzinoms erhielt je die Hälfte der Ratten acht Wochen nach Fütterungsbeginn eine subkutane Injektion mit dem Karzinogen Azoxymethan oder mit NaCl als Kontrolllösung. Am Versuchsende wurden die Tiere getötet, Milz, Leber, viszerales Fett sowie Dickdarm entnommen und makroskopisch sowie histopathologisch betrachtet. Das Milzgewebe der Tiere wurde mit molekularbiologischen und immunhistochemischen Methoden untersucht.

Die adipösen Tiere entwickelten im Vergleich zur normalgewichtigen Kontrollgruppe mehr kolorektale Tumoren mit erhöhtem Tumorgewicht und Tumorgroße. Bei der histopathologischen Analyse der Tumoren konnten deutliche Unterschiede in der Dignität festgestellt werden - adipöse Versuchstiere wiesen mehr Karzinome auf als die normalgewichtigen Kontrolltiere. Ein Immunoassay zur Analyse von Zytokinen im Blut der Ratten zeigte bei den adipösen Tieren signifikant erhöhte Konzentrationen des proinflammatorischen Interleukin (IL)-1 β und erniedrigte Konzentrationen des entzündungshemmenden IL-10. Im Milzgewebe der adipösen Tiere fanden sich signifikant weniger NK-Zellen als bei den Kontrolltieren. Die mRNA-Expression der aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren NKG2D und NKp46 war in der Gruppe der adipösen Ratten im Vergleich zu den normalgewichtigen Tieren signifikant verringert.

Die Daten deuten darauf hin, dass es bei adipösen Wistar-Ratten zu einer gestörten NK-Zell-Funktionalität gegenüber malignen Zellen und in Folge dessen zu einer erhöhten Inzidenz kolorektaler Karzinome kommt. Daher ist davon auszugehen, dass Adipositas und die daraus resultierenden veränderten Funktionen der NK-Zellen in der Tumorabwehr eine große Bedeutung bei der Entstehung von Krebserkrankungen haben.

Doberstein, Henriette: Immunologische Untersuchungen zum Einfluss von Adipositas auf die Entstehung von kolorektalen Karzinomen. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 57 Seiten, 2018

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Referat | 2 |
| Abkürzungsverzeichnis | 3 |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Adipositas und Folgeerkrankungen | 1 |
| 1.2 Kolorektales Karzinom | 3 |
| 1.2.1 Der Einfluss von Adipositas auf die Entstehung kolorektaler Karzinome | 4 |
| 1.2.2 Immunabwehr von Tumorzellen | 6 |
| 1.3 NK-Zellen | 6 |
| 1.3.1 Der Einfluss von Adipositas und Tumoren auf die Funktion der NK-Zellen | 8 |
| 1.4 Zielstellung | 10 |
| 2 Material und Methoden | 11 |
| 2.1 Versuchstiere, Tierhaltung und Versuchsablauf | 11 |
| 2.2 Aufarbeitung des Milzgewebes | 14 |
| 2.3 Immunhistochemische Untersuchungen am Milzgewebe | 15 |
| 2.4 Datenerhebung | 16 |
| 2.4.1 Quantifizierung der NK-Zellen in der Milz | 16 |
| 2.4.2 Quantifizierung von Zytokinen im Plasma der Versuchstiere | 17 |
| 2.4.3 Analyse ausgewählter Serummetabolite | 17 |
| 2.4.4 Molekularbiologische Analyse der Expression spezifischer NK-Zell-Rezeptoren | 18 |
| 2.5 Statistische Auswertung | 19 |
| 3. Ergebnisse | 20 |
| 3.1 Gewichtsentwicklung der Versuchstiere | 20 |
| 3.2 Futter- und Energieaufnahme | 22 |
| 3.3 Viszerale Fettmasse | 25 |
| 3.4 Anzahl der Kolontumoren | 25 |
| 3.5 Histologische Differenzierung der Tumoren | 26 |
| 3.6 Größe und Gewicht der Tumoren | 27 |
| 3.7 Immunhistochemische Analyse der Milzen | 29 |
| 3.8 Molekularbiologische Untersuchungen des Milzgewebes | 30 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.9 | Serumkonzentrationen ausgewählter Metabolite | 33 |
| 3.10 | Zytokin-Plasmakonzentration | 35 |
| 4. | Diskussion | 37 |
| 5. | Zusammenfassung | 45 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 47 |
| 7. | Thesen | 57 |
| | Tabellarischer Lebenslauf | 58 |
| | Selbstständigkeitserklärung | 59 |
| | Erklärung über frühere Promotionsversuche | 60 |
| | Danksagung | 61 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|--|
| AICR | <i>American Institute for Cancer Research</i> |
| AOM | Azoxymethan |
| APAAP | Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase |
| BMI | <i>Body-Mass-Index</i> |
| BSA | <i>Bovine serum albumin</i> |
| Bp | <i>Base pair</i> |
| CRP | C-reaktives Protein |
| CYP A | Cytochrome P450 A |
| DIO | <i>Diet induced obesity</i> |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| ERK | <i>Extracellular signal-regulated kinases</i> |
| GM-CSF | Granulozyten |
| HDL | <i>High-density lipoprotein</i> |
| HNPCC | <i>Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer</i> |
| IGF I | <i>Insulin-like growth factor I</i> |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| INF | Interferon |
| JAK | Januskinase |
| KIR | <i>Killer cell immunoglobulin-like receptors</i> |
| Klrk1 | <i>Killer cell lectin like receptor K1</i> |
| LDL | <i>Low-density lipoprotein</i> |
| MCP1 | <i>Monocyte Chemoattractant Protein1</i> |
| MHC | <i>Major Histocompatibility Complex</i> |
| mRNA | Messenger RNA |
| NaCl | Natriumchlorid |

| | |
|-------------|--|
| NCAM | <i>Neural cell adhesion molecule</i> |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| NCR | <i>Natural cytotoxicity receptor</i> |
| Ncr | <i>Natural Cytotoxicity Triggering Receptor</i> |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen |
| O.C.T | <i>Optimum cutting temperature</i> |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline</i> |
| PFA | Paraformaldehyd |
| Ppia | Peptidylprolylisomerase A |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion |
| SEM | <i>Standard error of mean</i> |
| TBS | <i>Tris-buffered saline</i> |
| TGF β | <i>Transforming Growth Factor β</i> |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TAA | Tumorassoziierte Antigene |
| TSA | Tumorspezifischen Antigene |
| WCRF | <i>World Cancer Research Fund</i> |
| WHO | World Health Organization |

1. Einleitung

1.1 Adipositas und Folgeerkrankungen

Weltweit ist die Anzahl der übergewichtigen und adipösen Menschen in den letzten Jahren sowohl in den westlichen Industrienationen als auch zunehmend in Schwellen- und Entwicklungsländern gestiegen (Ettarh et al. 2013; Sundborn et al. 2010; The SuRF report 2 2005). Übergewicht und Adipositas entstehen bei einem Übermaß an Energiezufuhr über die Nahrung und wird zusätzlich durch Bewegungsmangel begünstigt; es resultiert eine positive Energiebilanz. Mit Hilfe des Body-Mass-Index (BMI), welcher als Quotient aus dem Körpergewicht in Kilogramm und der Körpergröße in Metern zum Quadrat definiert ist, lässt sich eine Einteilung in Untergewicht, Normalgewicht, Übergewicht und Adipositas vornehmen. Dabei definiert die Weltgesundheitsorganisation (WHO) Normalgewichtigkeit bei einem BMI zwischen $18,5 \text{ kg/m}^2$ und $<25 \text{ kg/m}^2$, Untergewicht bei einem BMI von $< 18,5 \text{ kg/m}^2$ und Übergewicht ab einem BMI von 25 kg/m^2 . Ab einem Wert von 30 kg/m^2 spricht man von Adipositas, welche sich in 3 Schweregrade gliedern lässt (The SuRF report 2 2005). Bereits im Jahr 1997 stufte die WHO Adipositas offiziell als Erkrankung ein. Andere Maße für die Beurteilung der Körperzusammensetzung sind das Verhältnis von Taillen- und Hüftumfang (*Waist-to-Hip-Ratio*), sowie die Größe der Körperoberfläche und der Bauchumfang. Während die Prävalenz für Übergewicht, auch Präadipositas genannt, zwischen 1998 und 2011 in Deutschland weitestgehend stabil blieb (67,1 % der Männer und 53,0 % der Frauen), stieg die Prävalenz der Adipositas bei Männern von 18,9 % auf 23,3 % und bei Frauen von 22,5 % auf 23,9 % an (Mensink et al. 2013). Weltweit waren im Jahr 2014 fast zwei Milliarden Menschen übergewichtig, wovon mehr als eine halbe Milliarde Menschen als adipös eingestuft wurde (WHO 2014). Diese Entwicklung zeigt die weitreichende Bedeutung dieser Erkrankung für den Gesundheitszustand unserer Gesellschaft, da sich mit steigendem BMI auch das Risiko für zahlreiche Begleiterkrankungen erhöht.

Fettleibigkeit stellt Studien zufolge einen eigenständigen Risikofaktor für die Entstehung von Hypertonie, zerebralen Mikroangiopathien und Schlaganfällen, Diabetes mellitus Typ 2, Arthrose, dem Schlafapnoe-Syndrom und verschiedenen malignen Erkrankungen dar (Baretić 2013; Berrington de Gonzalez et al. 2010; Benecke und Vogel 2005; Kwon et al. 2016; Lupat et al. 2016; Powell et al. 2005; Renehan et al. 2008; Schienkiewitz et al. 2006). Beispielsweise konnte mit Daten der *Nurses Health Study* gezeigt werden, dass Frauen mit einem BMI über 30 kg/m^2 im Vergleich zu Studienteilnehmerinnen mit einem BMI unter

22 kg/m² ein etwa 30-fach erhöhtes Risiko aufwiesen an Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken, wobei das Risiko bei einer androiden Fettverteilung (viszeral betonte Adipositas) höher war, als bei einer gynoiden Fettverteilung (Colditz et al. 1990). Zudem manifestiert sich die Erkrankung durch einen stark erhöhten BMI frühzeitig (Benecke und Vogel 2005; Schienkiewitz et al. 2006). Ursache für das erhöhte Diabetesrisiko bei Adipositas liegt in einer Hyperinsulinämie mit nachfolgend herabgesetzter Empfindlichkeit der Insulinrezeptoren und Insulinresistenz der Zellen. Dies führt wiederum zur verminderten Glukoseaufnahme in die Muskelzellen und zur Steigerung der viszeralen Glukoneogenese mit dauerhaft erhöhtem Blutzuckerspiegel (Shah et al. 2002).

Weiterhin besteht eine starke Assoziation von Adipositas und kardiometabolischen Risikofaktoren, wie einem erhöhten Blutzuckerspiegel, Hypertonie, erhöhten Blutfettwerten und einem vermehrten Anteil abdomineller Fettmenge (Pak et al. 2016). Die hohe Prävalenz von Hypertonie bei Fettleibigkeit ist nicht nur bei Erwachsenen belegt; auch Kinder zeigen bei steigender Inzidenz von Übergewicht eine Adipositas-assoziierte Zunahme an kindlichem Bluthochdruck (Harris et al. 2016; Lupat et al. 2016). Diese Entwicklung ist besorgniserregend, da Hypertonie einen der Hauptrisikofaktoren für sowohl hämorrhagische als auch ischämische Schlaganfälle darstellt (Palmer et al. 1992). Auch orthopädische Erkrankungen wie die Arthrose des Kniegelenks werden durch starkes Übergewicht begünstigt, da es zur Fehl- und Überlastung der Gelenke durch das unverhältnismäßig hohe Körpergewicht in Bezug zur Größe der Gelenkfläche kommt (Hart und Spector 1993). Studien belegen, dass Adipositas außerdem das Risiko für die Entstehung von Karzinomen in Kolon, Prostata, Endometrium, Nieren und Gallenblase, sowie in der weiblichen Brust und Leukämien erhöht (Bianchini et al. 2002; Renehan et al. 2008; WHO 2014). Für das kolorektale Karzinom konnte weiterhin gezeigt werden, dass nicht nur die Inzidenz mit dem BMI steigt; es kam ebenfalls zu vermehrten Komplikationen bei der operativen Therapie (Heus et al. 2016).

Zudem stellt Adipositas einen Risikofaktor für eine erhöhte Mortalität bei verschiedenen Erkrankungen dar. So stellten beispielsweise im Jahr 2015 Herz-Kreislauf-Erkrankungen die führende Todesursache im Zusammenhang mit einem erhöhten BMI dar. Die zweithäufigste Ursache für BMI-bedingte Todesfälle war Diabetes mellitus (Afshin et al. 2017). Weiterhin ist das Gesamtüberleben nach einer operativen Versorgung des kolorektalen Karzinoms neben dem Tumorstadium auch direkt vom BMI des Patienten abhängig (Kocarnik et al. 2016). Somit erhöht Adipositas die Gesamtmortalität nach Diagnosestellung bei Darmkrebs (Calle et al. 2003; Fedirko et al. 2014).

Neben den gesundheitlichen Folgen für die von Übergewicht oder Adipositas Betroffenen belastet die steigende Prävalenz von Adipositas zunehmend das Gesundheitssystem (Simon et

al. 2011). Daher ist es unumgänglich sich mit der Prävention und Therapie dieser Erkrankung intensiv auseinander zu setzen. Um der Entwicklung präventiv entgegen wirken zu können, ist es wichtig die Risikofaktoren zu kennen, welche die Entstehung der Adipositas fördern. Im deutschen Sozialbericht von 2008 wurde festgestellt, dass die Prävalenz von Adipositas mit zunehmendem Lebensalter steigt, wobei das Maximum bei den 60 bis unter 70-jährigen liegt (Ein Sozialbericht für die Bundesrepublik Deutschland 2008; Mensink et al. 2013). Außerdem konnte gezeigt werden, dass chronischer Stress zu einer erhöhten Nahrungsaufnahme und in Folge dessen zu einer Steigerung des Körpergewichtes führen kann (Isasi et al. 2015; Lu et al. 2016). Interessant ist auch der Aspekt, dass der Anteil an Adipösen indirekt proportional zum sozioökonomischen Status ist (Mensink et al. 2013). Ein niedrigerer Bildungsstand und eine höhere Akzeptanz von Fettleibigkeit in niedrigeren sozialen Schichten stellen zwei Gründe für diesen Zusammenhang dar (EisingerM 2008).

Da Adipositas als eine chronische Erkrankung anzusehen ist, bedarf sie auch einer chronischen Therapie. Diese stützt sich auf drei Säulen: die Veränderung der Lebens- und Ernährungsweise (*Lifestyle-Änderung*), die medikamentöse und die chirurgische Therapie. Es wird empfohlen primär die Lebensgewohnheiten mittels Ernährungs- und Bewegungstherapie zu verändern, um langfristig eine negative Energiebilanz und damit eine Reduktion des Körpergewichtes zu erreichen. Führen diese Maßnahmen nicht zum gewünschten Erfolg, ist es möglich medikamentös die Reduktion der intestinalen Aufnahme von Fetten zu intensivieren (Baretić 2013). Bei besonders schweren oder therapieresistenten Fällen von Adipositas stellt die bariatrische Chirurgie, wie zum Beispiel der Roux-Y-Magenbypass oder das Magenband, eine weitere Therapiemöglichkeit dar. Diese Methoden führen durch eine veränderte Magen-Darm-Passage letztlich zu einer Malabsorption und damit zur Gewichtsreduktion (Li und Richard 2017).

1.2 Kolorektales Karzinom

Nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen Krebserkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar (Deutsches Bundesamt für Statistik 2015). Das kolorektale Karzinom ist neben bösartigen Neubildungen der Lunge sowie der Brustdrüse und der Prostata eine der häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland (Deutsches Bundesamt für Statistik 2014).

Als Krebs bezeichnet man maligne Neubildungen in Geweben, die im Gegensatz zu benignen Raumforderungen spezielle Merkmale aufweisen, die sie von normalen, gesunden Zellen

abgrenzen. Zu diesen Eigenschaften zählen die ungehemmte Proliferation, welche es den Tumorzellen ermöglicht sich unabhängig von Wachstumsfaktoren und wachstumshemmenden Mediatoren zu teilen, ein invasives Wachstum und der Verlust der Ortsständigkeit, was zur Absiedelung von Metastasen führen kann. Außerdem haben diese Zellen Mechanismen entwickelt um der Apoptose zu entgehen und können ihre Versorgung mit Sauerstoff durch die Induktion der Angiogenese verbessern (Kushlinskiĭ und Nemtsova 2014). Damit sind Tumorzellen in der Lage die Integrität des umgebenden Gewebes zu zerstören. Bei den Faktoren, welche zur Entstehung von kolorektalen Karzinomen führen, unterscheidet man in endogene (genetisch bedingte) und exogene Ursachen. Zu den endogenen Ursachen zählen die Polyposis- und Non-Polyposis-Syndrome, wie beispielsweise die familiäre adenomatöse Polyposis oder das Lynch-Syndrom (Synonym: hereditäres nicht-Polyposis-assoziiertes kolorektales Karzinom; HNPCC), bei denen eine genetische Prädisposition für die Ausbildung maligner Tumore des Gastrointestinaltraktes besteht (Half et al. 2009). Allerdings entstehen nur etwa fünf bis zehn Prozent der kolorektalen Karzinome aufgrund von genetisch bedingten Syndromen (World Cancer Research Fund International und American Institute for Cancer Research 2007). Der weitaus größere Teil entsteht unter dem Einfluss verschiedener exogener Faktoren. Speziell beim kolorektalen Karzinom scheint die Zusammensetzung der Nahrung und deren Abbauprodukte großen Einfluss auf die Integrität der Schleimhaut zu haben. Eine besonders fetthaltige Ernährung verursacht hohe Plasmakonzentrationen an Cholesterin, welche zur übermäßigen Produktion von Gallensäuren führt. Deren Abbauprodukte, welche durch Darmbakterien hergestellt werden, haben eine toxische Wirkung auf die Zellen der intestinalen Schleimhaut und stellen gleichzeitig einen Proliferationsreiz dar (Henne-Bruns et al. 2008). Für einige Nahrungs- und Genussmittel, wie rotes Fleisch und Alkohol, konnte ein direkter Einfluss auf die Entstehung von Tumoren im Enddarmbereich nachgewiesen werden. So steigt das Erkrankungsrisiko bei einem täglichen Verzehr von 50 g rotem Fleisch um 21 % und bei einer täglichen Aufnahme von 10 g Ethanol um 9 %. Des Weiteren existieren bestimmte Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, welche die Entstehung von Tumoren zur Folge haben können, wie zum Beispiel die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn (Kim und Chang 2014; World Cancer Research Fund International und American Institute for Cancer Research 2007).

1.2.1 Der Einfluss von Adipositas auf die Entstehung kolorektaler Karzinome

Es konnte beobachtet werden, dass Adipositas das Risiko für die Entstehung von kolorektalen Karzinomen erhöht; bei steigender Anzahl von an Fettleibigkeit erkrankter Personen steigt

auch die Inzidenz von Tumoren des Kolons (Renehan et al. 2010; WHO 2014). Andererseits konnte gezeigt werden, dass sich durch die Reduktion des Körpergewichts das Risiko an Krebs, insbesondere an Darmkrebs, zu erkranken wieder verringert (Parker und Folsom 2003).

Die bei Adipositas stark vermehrt vorkommenden Adipozyten produzieren Zytokine, sogenannte Adipokine, welche einen großen Einfluss auf die Entstehung und das Wachstum kolorektaler Tumoren haben. Das Peptidhormon Leptin spielt eine bedeutende Rolle in der Regulierung des Appetits und übt dazu einen zentralnervösen Einfluss auf den Hypothalamus aus (Leininger 2011). Ist ausreichend Fettgewebe vorhanden und der Serum-Leptinspiegel damit adäquat hoch, sinkt die Nahrungsaufnahme. Verringert sich die Masse an Fettgewebe, sinkt auch die Serumkonzentration an Leptin und konsekutiv der Appetit und die Nahrungsaufnahme. Der Serum-Leptinspiegel korreliert mit dem BMI und ist somit bei Fettleibigkeit besonders stark erhöht (Liu et al. 2001; Zhang et al. 2005). Des Weiteren übt Leptin einen proliferativen Einfluss auf Zellen aus (Huang und Li 2000). Dieser proliferative Effekt fördert auch die Vermehrung maligner Zellen, wodurch die Entwicklung von Kolontumoren verstärkt werden kann (Hardwick et al. 2001; Liu et al. 2001). Außerdem verbesserte Leptin bei Versuchen an Zelllinien aus kolorektalen Karzinomen die Zellinvasion und Adhäsion der Tumorzellen (Yoon et al. 2014).

Ein weiteres in Fettgewebe und Leber gebildetes Adipokin ist der Insulin-ähnliche-Wachstumsfaktor-I (*insulin-like-growth-faktor I*, IGF-I), der physiologisch eine große Bedeutung für das Wachstum unterschiedlichster Körperzellen hat und außerdem inhibierend auf die Apoptose wirken kann (Baserga et al. 1994; Laviola et al. 2007). Es konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Bioverfügbarkeit von IGF-I, wie sie bei Adipositas auftritt, einen erheblichen Einfluss auf die Karzinogenese kolorektaler Tumoren nimmt (Macaulay 1992; Sandhu 2002). Die bei Patienten mit Adipositas im Blut vermehrt zirkulierenden Adipokine, wie die proinflammatorischen Zytokine Tumornekrose-Faktor α (TNF- α) und Interleukin-6 (IL-6), sowie die vermehrte Präsenz von Makrophagen und freien Fettsäuren lösen eine chronisch systemische Entzündungsreaktion aus (Bremer und Jialal 2013).

Studien konnten zeigen, dass chronische Entzündungsprozesse die Entstehung von Darmkrebs und weiteren malignen Erkrankungen fördern (Coussens und Werb 2002; Kuper et al. 2000). Die bei Entzündungsreaktionen gehäuft vorkommenden Zellen des Immunsystems setzen vermehrt Sauerstoffradikale frei, welche das Erbgut von Erregern, aber auch von gesunden Zellen schädigen und somit zu Mutationen und zur Entartung körpereigener Zellen führen können (Maeda und Akaike 1998). Immunzellen, insbesondere Makrophagen, fördern bei entzündlichen Prozessen außerdem das Zellwachstum und die Zellteilung durch Ausschüttung verschiedener Mediatoren und Wachstumsfaktoren, welche auch Einfluss auf die Proliferation

von Tumorzellen nehmen (Chen 2011; Deutscher Ärzteverlag GmbH und Ärzteblatt 2006; Kimura et al. 2007).

1.2.2 Immunabwehr von Tumorzellen

Einige Zellen des Immunsystems haben die Aufgabe maligne Zellen zu erkennen, zu markieren oder sie gezielt abzutöten. Zu diesen Zellen gehören Dendritische Zellen, welche die tumorspezifischen oder tumorassoziierten Antigene (TSA/TAA) auf Ihrer Oberfläche präsentieren und damit die zytotoxischen CD8+ T-Zellen aktivieren (Dunn et al. 2004). Die CD8+-T-Lymphozyten erkennen dann auf den MHC (*major histocompatibility complex*)-I-Molekülen der Tumorzellen die TAA, welche zwar auch auf normalen Körperzellen zu finden sind, auf Tumorzellen jedoch übermäßig stark exprimiert werden (MORRIS et al. 2003). Es konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen die Anzahl ihrer MHC-I Moleküle verringern können um der Abwehr durch zytotoxische T-Zellen zu entgehen (Bubeník 2004; Pantel et al. 1991). Außerdem sind maligne Zellen dazu in der Lage das sie umgebende Mikromilieu durch Sekretion verschiedener Zytokine und Mediatoren wie Histamin, TGF (*transforming growth factor*) β und IL-10 zu beeinflussen. Das entstehende Mikroklima hemmt die Aktivierung von T-Helfer-Zellen (CD4+) und CD8+ T-Zellen und damit die Tumorabwehr (Müller et al. 2002). Speziell für IL-10 konnte die hemmende Wirkung auf die zytotoxische T-Zell-Aktivität belegt werden (Coussens und Werb 2002). Auf Grund der beschriebenen Mechanismen wird Krebs auch als das gelegentliche Misslingen der adäquaten Immunreaktion gegen molekular veränderte Zellen (Immunüberwachungstheorie) bezeichnet (Hardin et al. 2015). Eine weitere Gruppe von Immunzellen, welche für die Abwehr infizierter oder maligner Zellen verantwortlich ist, stellen die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) dar.

1.3 NK-Zellen

Mitte der 1970er Jahre beschrieben Kiessling und Klein erstmals die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und deren lytische Aktivität gegenüber Leukämiezellen in Mäusen (Kiessling et al. 1975). NK-Zellen sind große granuläre Lymphozyten und umfassen beim Menschen ca. 10 % aller peripheren Lymphozyten (Robertson MJ 1990). Sie gehören neben Makrophagen, Dendritischen Zellen, Granulozyten und Monozyten zum angeborenen Immunsystem und entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark (Colucci et al. 2003). Ihre

Aufgaben bestehen im Erkennen und Abtöten virusinfizierter Körperzellen, Tumorzellen und durch Antikörper markierte Zellen (Schütt und Bröker 2011). Funktionell stellen sie ein Bindeglied zwischen dem nativen und dem adaptiven Immunsystem dar. So können in ihrer Entwicklung auch Mechanismen zur Bildung einer Toleranz der Rezeptoren gegenüber körpereigener Zellen und die Fähigkeit der NK-Zellen beobachtet werden, sich an das umgebende Milieu anzupassen (Schütt und Bröker 2011; Vivier et al. 2011). NK-Zellen besitzen keine spezifischen Rezeptoren, wie beispielsweise B- oder T-Lymphozyten, sondern tragen verschiedene, antigenunabhängige, aktivierende und inhibierende Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche. Der hemmende Rezeptor wird durch den Kontakt mit normalen MHC I – Molekülen auf den überprüften Zellen aktiviert und verhindert so autoaggressive Reaktionen gegenüber gesunden Körperzellen (Schütt und Bröker 2011). Wie in 1.2.2. beschrieben, sind Tumorzellen in der Lage ihre MHC I-Moleküle in Struktur und Anzahl zu verändern und so der Abwehr durch zytotoxische T-Zellen zu entgehen (Pantel et al. 1991). Allerdings wird dadurch die hemmende Wirkung der inhibierenden Rezeptoren auf den NK-Zellen aufgehoben. Werden die aktivierenden Rezeptoren der NK-Zellen durch Liganden aus infizierten Zellen oder Tumorzellen zusätzlich aktiviert, überwiegen in der Summe somit die aktivierenden Signale und die jeweilige Zielzelle wird von der NK-Zelle lysiert (Ljunggren und Kärre 1990; Schütt und Bröker 2011; Vivier et al. 2011). Dass das abnorme Fehlen von MHC-I-Molekülen zur Aktivierung von NK-Zellen beiträgt, beschrieb Klas Kärre 1986 als sogenannte *“Missing self”*-Hypothese (Kärre et al. 1986). Die zytotoxische Wirkung wird dabei durch die gezielte Exozytose von Granula durch die NK-Zellen erreicht, welche Perforine und zytotoxisch wirkende Granzyme enthalten (Schütt und Bröker 2011; Trapani und Smyth 2002).

Die NK-Zell-Rezeptoren lassen sich in drei große Gruppen einteilen: die Killer-Immunglobulin-ähnlichen-Rezeptoren (KIR), die Natürlichen-Zytotoxizitäts-Rezeptoren (*natural cytotoxicity receptors*, NCR) und die C-Typ-Lektin-Rezeptoren (Lanier 1998). Es gibt aktivierende und hemmende KIR-Rezeptoren, welche sich auch auf einigen T-Lymphozyten befinden und somit nicht spezifisch für NK-Zellen sind (Saulquin et al. 2003). Ihre Funktionsweise entspricht der oben beschriebenen Erkennung von MHC-I-Molekülen. Auch die C-Typ-Lektin-Rezeptoren besitzen NK-Zell-aktivierende und inhibierende Vertreter. Der Rezeptorkomplex CD94/NKG2A wirkt inhibitorisch, während der CD94/NKG2B-Rezeptor aktivierend auf die NK-Zell-Funktionalität wirkt. Ein dritter Vertreter dieser Gruppe ist der NKG2D-Rezeptor, ein aktivierender unabhängiger Rezeptor auf NK-Zellen, welcher jedoch ebenfalls auf einigen T-Zell-Untergruppen zu finden ist (Groh et al. 2001; López-Botet et al. 2000). Die dritte große Gruppe von NK-Zell-Rezeptoren stellen die zur Ig-Superfamilie gehörenden natürlichen

Zytotoxizitäts-Rezeptoren dar. Zu den NCRs werden u.a. NKp30, NKp44 und NKp46 gezählt, die im Gegensatz zu den anderen zwei Rezeptorgruppen spezifische Marker für Natürliche Killerzellen sind (Marras et al. 2011; Moretta et al. 2001). NKp30 und NKp46 lassen sich unabhängig von der Aktivität auf NK-Zellen nachweisen, während NKp44 nur auf aktivierten NK-Zellen nachweisbar ist (Moretta et al. 2000).

Phänotypisch sind Natürliche Killerzellen durch die Präsenz des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls CD56, auch als NCAM (*neural cell adhesion molecule*, NCAM) bezeichnet, und den Mangel an CD3 charakterisiert (Lanier et al. 1989; Robertson MJ 1990). Anhand der Dichte des Oberflächenmoleküls CD56 lassen sich zwei Subpopulationen unterscheiden. Etwa 90 % der Natürlichen Killerzellen exprimieren CD56 in geringer Dichte auf ihrer Oberfläche und werden daher als CD56^{dim}-Subpopulation bezeichnet. Die sogenannte CD56^{bright}-Subpopulation bilden die verbleibenden 10 %, welche sich durch eine sehr hohe Dichte an CD56 auszeichnen (Lanier et al. 1986). CD56^{dim}- und CD56^{bright}-NK-Zellen unterscheiden sich in ihrer Aktivität und Produktion von Zytokinen. Frühe Studien zeigten, dass die CD56^{bright}-Subpopulation hohe Konzentrationen an Zytokinen wie Interferon (IFN)- γ , TNF- α , IL-10, IL-13 und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) hervorrufen, während die CD56^{dim}-Zellen überwiegend zytotoxisch wirken (Cooper et al. 2001). Mittlerweile konnte jedoch belegt werden, dass alle NK-Zellen nach ausreichender Stimulation mit MHC-I-negativen Zellen oder IL-12 und IL-15 zytotoxisch wirken und IFN- γ freisetzen können, weshalb man CD56^{dim}- und CD56^{bright}-Zellen heute als „zielzellsensitiv“ und „zytokinsensitiv“ bezeichnet (Anfossi et al. 2006).

1.3.1 Der Einfluss von Adipositas und Tumoren auf die Funktion der NK-Zellen

Verschiedene Faktoren führen zur Verminderung bis hin zur Aufhebung der Funktionen von Natürlichen Killerzellen. So konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen eine funktionelle Erschöpfung beim Vorliegen von chronischen Entzündungszuständen oder Tumoren aufweisen (Bi und Tian 2017). Da Adipositas, wie unter 1.1 bereits beschrieben, chronische inflammatorische Zustände verursacht, unterliegen Anzahl und Funktionalität von NK-Zellen einer Beeinflussung durch das Körpergewicht. So wurde bei adipösen, aber sonst gesunden Personen eine veränderte Anzahl von NK-Zellen im Blut sowie funktionelle Defizite dieser NK-Zellen festgestellt (Laue et al. 2015; Lautenbach et al. 2011). Diese Veränderungen beruhen auf der Beeinflussung der NK-Zellen durch verschiedene Zellen, Mediatoren und Zytokine. Dem

Peptidhormon Leptin kommt dabei eine große Bedeutung für den Einfluss des Körpergewichtes auf systemische Entzündungsreaktionen und die Abwehr entarteter Zellen zu. So konnte nachgewiesen werden, dass Leptin sowohl die Anzahl als auch die Funktionen, wie beispielsweise die Zytotoxizität, Natürlicher Killerzellen moduliert. Dabei konnte gezeigt werden, dass es trotz erhöhter Leptin-Konzentrationen im Blut Diät-induzierter adipöser Ratten und einer daraus resultierenden erhöhten Anzahl peripherer NK-Zellen zu funktionellen Defiziten kam. Zwar exprimierten die Zellen adipöser Tiere eine normale Anzahl an Leptin-Rezeptoren, diese zeigten allerdings eine Resistenz gegenüber der Stimulation mit Leptin (Nave et al. 2008). In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese funktionelle Beeinträchtigung der NK-Zellen durch eine Gewichtsreduktion wieder normalisiert werden kann. Verringert sich das Körpergewicht, sinkt auch die Plasmakonzentration von Leptin und die Expression von INF- γ in CD56^{dim}-NK-Zellen steigt an (Jahn et al. 2015). Eine vermehrte Sekretion des Zytokins INF- γ kann zusätzlich die zytotoxische Potenz von CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen verstärken (Schütt und Bröker 2011). Auch andere Studien belegen den aktivitätssteigernden Effekt auf NK-Zellen bezüglich Zytolyse und Zytotoxizität durch Fasten bzw. eine reduzierte Fettaufnahme über die Nahrung (Hebert et al. 1990; Wing et al. 1983). Demnach ist die gestörte Funktionalität von NK-Zellen bei Adipositas reversibel, was auch dadurch belegt werden konnte, dass sich bei einem Transfer dysfunktionaler NK-Zellen aus adipösen Ratten in normalgewichtige Ratten die Funktion dieser Zellen teilweise normalisierte (Lautenbach et al. 2009). NK-Zellen sind also in der Lage sich an das vorliegende metabolische Milieu anzupassen (Vivier et al. 2011). Dies nutzen maligne Zellen und Zellen in der Mikroumgebung von Tumoren um sich vor der zytotoxischen Wirkung der Immunzellen zu schützen (Bi und Tian 2017). Dazu sezernieren sie immunregulatorische Mikrovesikel, sog. Tumor-assoziierte Exosomen. Deren Inhaltsstoffe inhibieren die Perforin-Expression und die zytolytische Aktivität und senken die Anzahl von NK-Zellen (Liu et al. 2006). Außerdem unterdrücken sie die NK-Zell-Funktion durch die Sekretion des immunsuppressiv wirkenden *Transforming growth factor* (TGF)- β und die Expression von Liganden für den NKG2D-Rezeptor, wodurch die NKG2D-Rezeptorexpression auf NK-Zellen herab reguliert wird (Clayton et al. 2008).

Mit der Kenntnis über die gestörte NK-Zell-Funktionalität und dem erhöhten Kolontumorrisiko bei Adipositas stellte sich die Frage, ob Assoziationen zwischen der verminderten NK-Zell-Aktivität gegenüber Tumorzellen und dem vermehrten Auftreten von Darmkrebs bei Fettleibigkeit bestehen.

1.4 Zielstellung

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, inwiefern die gestörte NK-Zell-Funktionalität bei Adipositas die Entstehung kolorektaler Karzinome beeinflusst.

Dabei soll am Rattenmodell analysiert werden,

1. wie stark sich die viszerale Fettmasse und die Serumkonzentrationen verschiedener Adipositas-assoziiierter Metabolite zwischen normalgewichtigen und adipösen Ratten unterscheiden.
2. in wie weit sich Anzahl, Größe und Dignität kolorektaler Karzinome zwischen adipösen und normalgewichtigen Tieren unterscheiden.
3. ob es Veränderungen der Anzahl Natürlicher Killerzellen in der Milz zwischen normalgewichtigen und adipösen Tieren gibt.
4. ob sich die Expression verschiedener aktivierender NK-Zell-Rezeptoren in der Milz zwischen normalgewichtigen und adipösen Tieren unterscheiden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere, Tierhaltung und Versuchsablauf

Die im Folgenden geschilderten Experimente wurden an 50 männlichen Wistar-Ratten, welche von der Charles River GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden, durchgeführt. Alle Tiere waren zu Versuchsbeginn sechs Wochen alt und wiesen ein Körpergewicht zwischen 230,0 g und 369,2 g auf. Die Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen in tierexperimentellen Laborräumen des Zentrums für Angewandte Medizinische und Humanbiologische Forschung in Halle (Saale) in einem schallisolierten spezifisch pathogenfreien Raum bei 22 ± 1 °C Raumtemperatur. Der Tag-Nacht-Rhythmus der Tiere wurde mit je 12 Stunden Helligkeit und 12 Stunden Dunkelheit gewährleistet (Tagzyklus von 6:00 Uhr bis 18:00 Uhr). Die Tiere wurden im gesamten Versuchszeitraum einzeln in mit Streu ausgelegten Typ-IV-Käfigen mit einer Grundfläche von je 1815 cm^2 (Maße: L: 590 mm x B: 380 mm x H: 200 mm) gehalten. Futter und Wasser standen im gesamten Versuchszeitraum *ad libitum* zur Verfügung.

Die Ratten wurden nach einer zweiwöchigen Akklimatisationsphase gewichtsadjustiert in zwei Haupt- mit je zwei Untergruppen unterteilt (Abbildung 1). Die zwei Hauptgruppen unterschieden sich im Fett- und Energiegehalt des Futters. Somit bekamen 25 der Versuchstiere (Kontrolltiere) eine normokalorische Kontrolldiät (Altromin C 1090-10, 10 % der umsetzbaren Energie aus Fett, Altromin GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) und 25 Tiere (DIO, *diet induced obesity* -Tiere) eine hochkalorische Hoch-Fett-Diät (Altromin C1090-60, 60 % der umsetzbaren Energie aus Fett, Altromin GmbH & Co. KG) zur Induktion einer Adipositas. Zur Kontrolle der Gewichtszunahme der Ratten wurden die Tiere einmal wöchentlich gewogen. Ein regelmäßiges Handling der Tiere diente zur Gewöhnung der Versuchstiere an den Menschen und damit zur Erleichterung der Injektionen im späteren Versuchsverlauf. Außerdem wurde das Futter für je drei bis vier Tiere pro Gruppe ein- und ausgewogen um die tägliche Futteraufnahme bestimmen zu können.

Acht Wochen nach Beginn der Fütterung der spezifischen Diäten wurden die Ratten erneut gewichtsadjustiert in je zwei Untergruppen aufgeteilt (zur genauen Gruppeneinteilung siehe Abbildung 1). Die Tiere erhielten je eine subkutane Injektion mit dem stark karzinogenen Azoxymethan (AOM; 15 mg/kg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) zur Induktion von kolorektalen Karzinomen, oder mit Natriumchlorid (NaCl) als Kontrolllösung. Das Azomethan-Derivat ruft tumoröse Läsionen bei Versuchstieren hervor, welche der Karzinogenese des

kolorektalen Karzinoms beim Menschen entsprechen (Borinstein et al. 2010; Lijinsky et al. 1985). Die Injektion erfolgte nach einer kurzzeitigen Isofluran-Betäubung (Forene, Abbvie, Ludwigshafen, Deutschland) der Versuchstiere mit Hilfe eines Kleintiernarkosegerätes (UniVet porta, Groppler Medizintechnik, Deggendorf, Deutschland) subkutan in die Nackenfalte der Tiere (Abbildung 2). Nach einer Woche wurden die Injektionen von AOM oder NaCl bei jedem Tier einmalig wiederholt. Alle in dieser Dissertation beschriebenen Experimente wurden zuvor vom Landesverwaltungsamt Halle (Saale) genehmigt und entsprechend den Bestimmungen des deutschen Tierschutzes durchgeführt (Aktenzeichen 42502-2.1200 MLU).

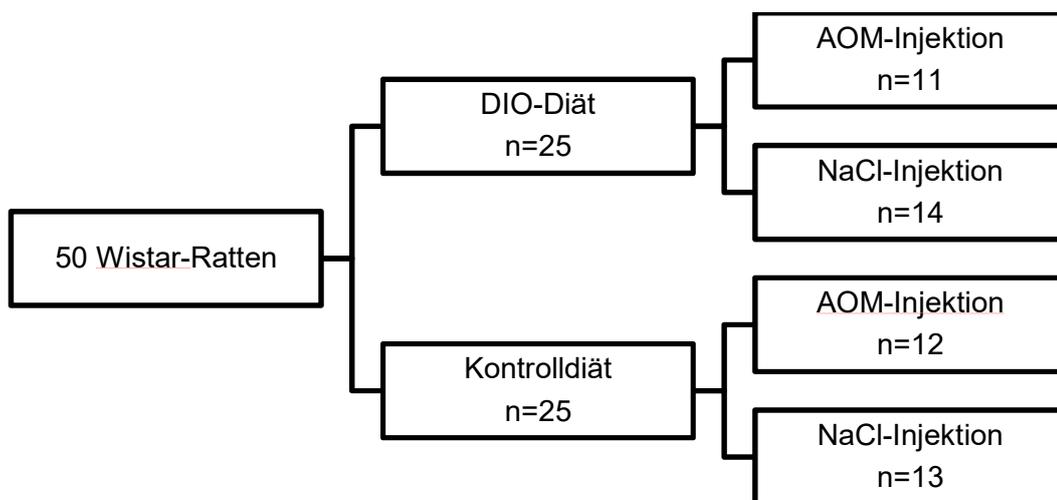


Abbildung 1: Übersicht der Versuchstiergruppen; DIO, *diet-induced-obesity*; AOM, Azoxymethan.



Abbildung 2: Injektion von Azoxymethan in die Nackenfalte eines Versuchstieres

Nach einer Versuchslaufzeit von insgesamt 45 Wochen (37 Wochen nach AOM- bzw. NaCl-Applikation) wurden die Ratten getötet. Dazu erhielten die Tiere unter Verwendung des Kleintiernarkosegerätes zunächst eine inhalative Narkose (Abbildung 3a) durch ein Isofluran-Sauerstoffgemisch (3 - 4 Vol % Isofluran, 96 - 97 % O₂).

Die erfolgreiche Narkose wurde durch den Ausfall von Stell-, Zwischenzeh- und Schwanzreflex geprüft. Nach vollständiger Betäubung erfolgte mit Hilfe einer Tierwaage die Bestimmung des finalen Körpergewichtes. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte anschließend durch Maskenbeatmung. Durch Eröffnen des Bauchraumes und des Thorax wurde das Herz freigelegt und der rechte Ventrikel mit einer BUTTERFLY-Kanüle punktiert (Abbildung 3b). Mit dieser Methode erfolgte die Blutentnahme in Serum- und Heparin-Monovetten (S-Monovette Lithium- Heparin, 4,9 ml und S-Monovette Serum mit Gerinnungsaktivator, 9 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland), was zum Exitus der Tiere führte. Bis zur Tötung der Tiere erfolgten alle voran beschriebenen Arbeiten in Kooperation mit Herrn Vincent Goritz, (medizinischer Doktorand der AG Prof. Dr. Heike Kielstein).

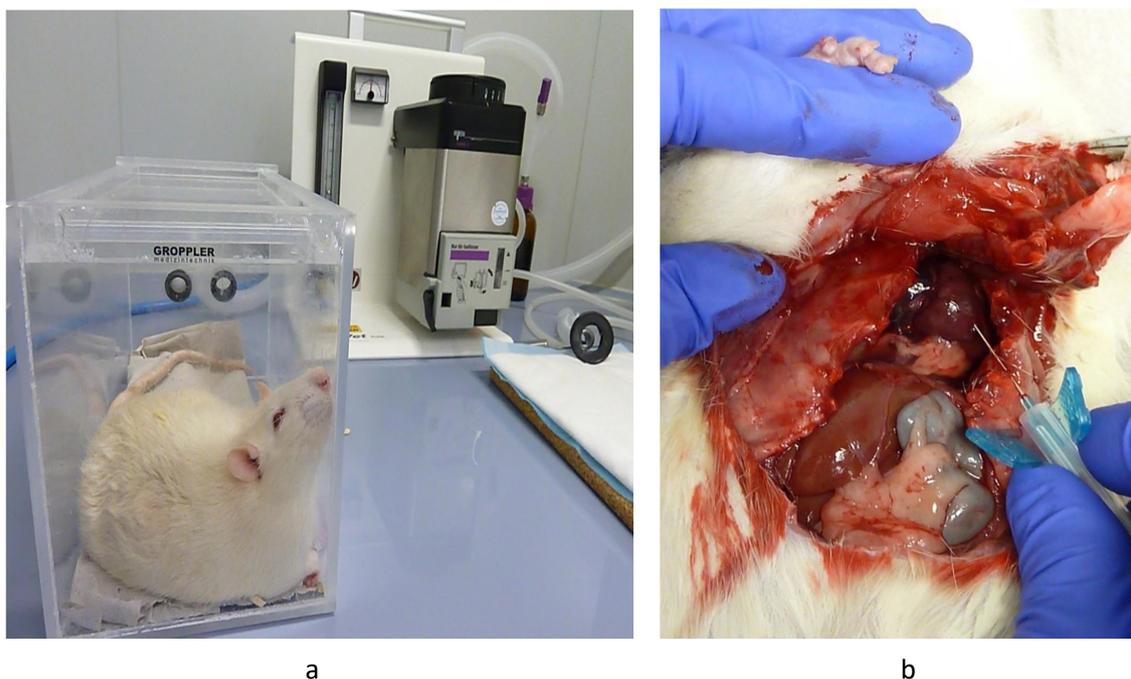


Abbildung 3: a Versuchstier in Narkosekammer, Kleintiernarkosegerät im Hintergrund, b Rattensitus, Punktion des rechten Ventrikels

Durch einen Laparotomieschnitt konnten die Bauchorgane vollständig freigelegt werden. Es erfolgten die Entnahmen von Milz- und Lebergewebe aus dem Mittellappen, sowie dem viszeralen Fett der Tiere. Die Gewebeproben von Milz und Leber wurden direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff und anschließend bei -80 °C asserviert. Der Dickdarm wurde

proximal am ileocekalen Übergang und distal unter Mitnahme des Rektums abgesetzt. Für die Präparation des Darmes wurde dieser nach Markierung des proximalen und distalen Endes durch einen Längsschnitt zunächst vollständig eröffnet und unter fließendem Leitungswasser gespült. Anschließend erfolgte die makroskopische Begutachtung und Quantifizierung des Kolons hinsichtlich des Auftretens von Tumoren im proximalen und distalen Kolonabschnitt. Die registrierten Neoplasien wurden mit einem Skalpell isoliert sowie in zwei Ebenen (Länge und Breite) mit einem Noniometer vermessen. Das Gewicht der Neubildungen wurde durch Wiegen der isolierten Tumoren mit Hilfe einer Feinwaage ermittelt.

Die makroskopisch tumorverdächtigen Darmabschnitte wurden durch Herrn Ole Pörtner (medizinischer Doktorand der AG Prof. Dr. Heike Kielstein) gespült, entwässert, geschnitten und gefärbt.

Im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Halle (Saale) erfolgte durch Frau Dr. Ruth Hiller die histopathologische Analyse der Tumorschnitte, welche verblindet durchgeführt wurde. Dabei wurden Neoplasien, die sich in ihrem Wachstum auf die Tunica mucosa beschränkten als Adenome und Neubildungen, welche die Lamina muscularis mucosae durchbrachen und so die Tunica submucosa infiltrierten als Karzinome klassifiziert.

Außerdem wurde durch Herrn Vincent Goritz das gesamte intra- und retroperitoneale viszerale Fettgewebe entnommen und gewogen. Zur Gewinnung von Serum und Plasma wurde das Blut bei 1500 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Serum bzw. Plasma wurde als Überstand abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

2.2 Aufarbeitung des Milzgewebes

Zur Aufbereitung der Milzproben wurden sechs Tiere aus jeder der vier Gruppen, adjustiert nach Gewicht und dem Auftreten von Tumoren ausgewählt, sodass insgesamt Proben von 24 Versuchstieren immunhistochemisch untersucht wurden. Von jedem der 24 Tiere wurden jeweils fünf Gewebeschnitte der Milz angefertigt. Die bei -80 °C gelagerten Milzen wurden komplett mit dem Eindeckmedium O.C.T (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) überschichtet. Nach dem Aushärten erfolgte die Herstellung von 12 µm bis 14 µm dicken Schnitten am Gefriermikrotom (Leica CM-3050-S, Wetzlar, Deutschland), sowie die Übertragung jedes dritten Schnittes auf einen Objektträger. Danach trockneten die Schnitte bei Raumtemperatur an der Luft für ca. 60 min, bevor sie für 10 min in Aceton (Sigma-Aldrich) fixiert und anschließend bis zur Färbung bei -20 °C gelagert wurden.

2.3 Immunhistochemische Untersuchungen am Milzgewebe

Für die Färbung der Milzschnitte wurden immunhistochemische Untersuchungen nach der Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP) - Methode verwendet. Dazu wurde der Primärantikörper *Mouse Anti Rat CD161* (BioRad, Hercules, CA, USA; in 98,9 % PBS, 1 % BSA, 0,09 % Natriumazid) in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet, welcher sich gegen den NK-PR1-Rezeptor (CD 161) auf der Oberfläche der NK-Zellen richtete. Zunächst wurden die Objektträger in einer TBS-Tween-Lösung, bestehend aus einer TBS-Stocklösung (10 %) und destilliertem Wasser (89,95 %) sowie dem Zusatz von TWEEN 20 (0,05 %, Sigma-Aldrich) gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 60 min in einer feuchten Kammer. Als Negativkontrolle wurde ein Schnitt ohne Behandlung mit dem Primärantikörper bei ansonsten identischer Weiterbehandlung mitgeführt. Nach erneutem Waschen in der TBS-Tween-Lösung, erfolgte eine 30-minütige Inkubation der Schnitte mit dem Sekundärantikörper *Polyclonal Rabbit Anti- Mouse Immunglobulin* (Dako, Hamburg, Deutschland), welcher mit einer Verdünnung von 1:50 in 5 % Rattenserum (95 % PBS und 5 % Rattenserum) auf die Schnitte aufgetragen wurde. Es erfolgte ein Waschschrift der Objektträger in TBS-Tween, bevor der APAAP-Komplex (APAAP Mouse Monoclonal, Dako), 1:50 verdünnt mit TBS-Tween für 30 min auf die Milz-Schnitte gegeben wurde. Nach dem erneuten Waschen mit TBS-Tween wurde die Inkubation mit Sekundärantikörper sowie mit dem APAAP-Komplex wiederholt, jedoch mit einer reduzierten Inkubationszeit von je 15 min. Es folgte das Auftragen des jeweils am Tag der Durchführung frisch hergestellten und filtrierten APAAP-Substrates, bestehend aus 2 mg Fast Blue (Sigma-Aldrich) und 4 ml Substrat (98 % 0,1 M Tris-Puffer pH 8,2; 2 % N,N-Diethylformamide; 0,01 % 1 M Levamisol-Lösung; 20 mg Naphtol). Nach 25 min Inkubation und erneutem Waschen in TBS-Tween erfolgte eine Gegenfärbung mit Mayers Hämalan (1:5-Verdünnung mit PBS) für 10 sek mit anschließendem Bläuen in Leitungswasser für 10 min. Die Fixierung erfolgte mittels Eindeckelung der Schnitte mit Glycergel *Mounting Medium* (Dako) und einem Deckgläschen.

2.4 Datenerhebung

2.4.1 Quantifizierung der NK-Zellen in der Milz

Die Analyse der Milz-Schnitte erfolgte verblindet; somit konnte bei der Quantifizierung nicht auf die Zugehörigkeit des Schnittes zu Tieren und den entsprechenden Versuchsgruppen geschlossen werden. Mit Hilfe des Mikroskopes BZ9000 (Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) wurde von jedem der 120 Milz-Schnitte ein digitales Bild des kompletten Schnittes mit einer 8-fachen Vergrößerung angefertigt, wobei 1 μm 0,3 Pixel entsprachen. Anschließend wurde in dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) ein Raster mit einer Feldgröße von $1,6 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ pro Einzelfeld über das gesamte Bild gelegt. Es wurden pro Schnitt acht Felder für die Quantifizierung der NK-Zellen pro Fläche ausgewählt, wobei je vier Felder in der roten Pulpa und vier Felder im Bereich des Übergangs von roter zu weißer Pulpa ausgezählt wurden. Die Auswahl der Einzelfelder erfolgte links oben im Raster beginnend nach den im Folgenden genannten Kriterien:

1. Rote Pulpa bzw. nur Übergang von roter zu weißer Pulpa im Bildausschnitt
2. Keine Bildartefakte, beispielsweise Luftblasen, Ablagerungen, Risse im Bildausschnitt
3. Keine größeren Gefäßlumina im Bildausschnitt
4. Kein direkter Kontakt zwischen den seitlichen Flächen der einzelnen ausgewählten Felder

Entsprach ein Kästchen diesen Anforderungen wurde nach dessen Auswertung nach rechts folgend ein Feld übersprungen und das nächste Kästchen hinsichtlich dieser Kriterien überprüft. Die Quantifizierung der NK-Zellen erfolgte für jedes der ausgewählten Kästchen einzeln. Vor der Zählung der NK-Zellen wurden zunächst der Kontrast und die Helligkeit des Bildausschnittes optimiert. Anschließend erfolgte die Einstellung eines geeigneten *Thresholdes* zur optimalen Anpassung von Farbstufen, Helligkeitswerten und Sättigung für das Erkennen der angefärbten Zellen. Um die NK-Zellen (blau markiert) zu erfassen, wurden nach Auswahl der *Threshold*-Methode „Intermodes“ die Einstellungen Hue: 142-179, *Saturation* 0-255 und *Brightness* 0-161 vorgenommen. Schließlich wurde die Anzahl der Zellen über die Funktion „*Analyze particles*“ bestimmt, wobei die Einstellungen für die zu erfassende Größe und die Zirkularität einzuschließender Zellen folgendermaßen gewählt wurden: *Size*: 3-100 Pixel Units und *Circularity*: 0-1.

2.4.2 Quantifizierung von Zytokinen im Plasma der Versuchstiere

Für die gleichzeitige Messung und Quantifizierung verschiedener Zielproteine, wie Leptin, TNF- α , IL-10 und IL-1 β wurde das *Bead*-basierte Multiplex-*Immunoassay* angewandt. Dieses Messverfahren stellt eine Kombination aus der Luminex® xMAP®-Technologie und einem *Sandwich*-ELISA basierend auf dem Antikörper-Analyt-Antikörper-Komplex dar. Dieser Komplex bindet an mit Antikörpern beschichtete Polyesterol-Mikrokügelchen, den sogenannten "*Beads*", welche ein Gemisch aus 2 Fluoreszenzfarbstoffen enthalten. Die Polyesterol-Mikrokügelchen besitzen dadurch spezifische Absorptions- und Emissionswellenlängen und können so bei Anregung mit Hilfe einer LED oder Laser-Bestrahlung über ihre spezifische Eigenfluoreszenz (*Bead*-Region) erkannt werden – eine spektrale Adresse entsteht. Um zu verhindern, dass entstehende *Bead*-Aggregate die Messungen beeinflussen, wird zusätzlich die Partikelgröße bestimmt, wodurch zu große Partikel von der Messung ausgeschlossen werden können. Die spektrale Adresse der *Beads* wird über einen Laser mit einer Wellenlänge von 635 nm erfasst. Ein zweiter Laser mit einer Anregungswellenlänge von 532 nm detektiert den Fluoreszenzfarbstoff der einzelnen Konjugatmoleküle, was eine Quantifizierung der zu analysierenden Partikel ermöglicht. Das ProcartaPlex® Multiplex-*Immunoassay*-Panel wurde von der Firma Affymetrix eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland) bezogen. Die Daten wurden mit der Software Procartaplex-Analyst 1.0 (eBioscience) ausgewertet.

2.4.3 Analyse ausgewählter Serummetabolite

Im Serum der Versuchstiere wurden die Konzentrationen von Triglycerol, Gesamtcholesterin, sowie HDL- (*high-density lipoprotein*) Cholesterin und LDL- (*low-density lipoprotein*) Cholesterin gemessen. Die Analysen erfolgten im Zentrallabor des Universitätsklinikums Halle (Saale) unter Verwendung enzymatisch-photometrischer Standard-Analysetechniken (Beckmann Coulter Synchron-Systeme, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) und Messung mit Hilfe des Beckmann Coulter DxC 800 Systems.

2.4.4 Molekularbiologische Analyse der Expression spezifischer NK-Zell-Rezeptoren

Mittels Precellys 24 (PepLab, Erlangen, Deutschland) und einer Trizol-basierten Extraktionsmethode (Sigma-Aldrich) wurde die gesamte RNA der gefrorenen Milzen gemäß den Empfehlungen des Herstellers extrahiert. Dazu wurden von jeder Milz ein identisch großes Stück mit 1 ml Trizol behandelt und anschließend unter Zusatz von Keramikkügelchen zwei Mal für je 15 sek bei 50000 rpm homogenisiert. Nach Zugabe und Vermischung von 200 µl Chloroform wurden die Proben für 15 min bei 4 °C und 16200 x g zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erreichen. Anschließend wurde die RNA-enhaltende obere wässrige Phase abgenommen und mit kaltem Isopropanol versetzt. Nach einer 10-minütigen Ruhephase in der die RNA-Fällung stattfinden konnte, wurde die Probe für 10 min bei 4 °C und 16200 x g zentrifugiert. Zu dem entstandenen Pellet wurde nach Abnahme des Überstandes 1 ml kaltes 75 % Ethanol/DEPCs gegeben und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt diente dem Waschen des Pellets und wurde anschließend nochmals wiederholt. Nach Trocknung des Pellets wurde es in DEPC-Wasser auf Eis gelöst und die Konzentration und Reinheit der RNA photometrisch bestimmt. Anschließend erfolgte die Überprüfung der Integrität der RNA durch eine Agarose-Gelelektrophorese mit einem 1,5 % Agarosegel in TAE-Puffer. Mittels einer DNase-Behandlung (Promega, Madison, WI, USA) wurde bewirkt, dass sich keine, die Reverse-Transkriptase-Reaktion störende DNA mehr in den Proben befand. Anschließend wurden Reinheit und Konzentration der Proben erneut überprüft. Die folgende cDNA-Synthese durch eine Reverse-Transkriptase-Reaktion wurde gemäß der Anleitung des Lieferanten (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) durchgeführt. Dazu wurden, um die Bindung des Primers an die mRNA zu ermöglichen 2 µg RNA und 1 µl Oligo-dT-Primer mit DEPC-Wasser auf 11 µl aufgefüllt und für 5 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend erfolgte nach Zugabe von 8 µl eines Mastermixes (4 µl Reaktionspuffer, 2 µl 10 mM dNTPs, 1 µl RNase-Inhibitor und 1 µl DEPC-Wasser) eine 5-minütige Inkubation bei 37 °C. Schließlich wurde der Probe für die finale Transkription 1 µl Reverse-Transkriptase zugesetzt und für 60 min bei 42 °C inkubiert. Um das Enzym wieder zu deaktivieren erfolgte als letzter Schritt eine 10-minütige Inkubation bei 70 °C. Die Konzentrationen der mRNA der Gene wurden mittels *Real-time* Polymerase-Kettenreaktion (iQ5, BioRad) mit SYBR *Green Fluorescein* Mix (BioRad) gemessen. Die verwendeten ratspezifischen Primer (Sigma-Aldrich) und Sequenzen sind in Tabelle 1 dargestellt. Um die Zielgenwerte zu normalisieren, wurden die Werte für die Haushaltsgene Ppia (Peptidylprolylisomerase A, Cyclophilin A) als Referenz verwendet. Die relative mRNA-Konzentration wurde, bestimmt durch eine Standardkurve mit unterschiedlichen

Verdünnungen der Primer, unter Verwendung des $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Verfahrens (Pfaffl 2001) und der individuellen Amplitudeneffektivität für jeden Primer berechnet.

Tabelle 1: Charakteristika der spezifischen Primer der RT-PCR-Analysen; Bp, Basenpaare; Fw, *forward*; Rv, *reverse*; NCBI, *National Center for Biotechnology Information*

| Gen | Protein | Sequenz | Bp | NCBI Referenz |
|-------|---------|--|-----|---------------|
| Ppia | CypA | Fw:GTGTTCTTCGACATCACG Rv:TGTCTGCAAACAGCTCGAAG | 92 | NM_017101 |
| Klrk1 | NKG2D | Fw:TTAATGAGAACAAAGCCTGG Rv:GTTAACTCGTTGGGTGATAG | 199 | NM_133512 |
| Ncr1 | NKp46 | Fw:AGACCCTGTTTCTTCTCTTG Rv:TGAGCTTCTCATGATCCTTC | 197 | NM_057199 |
| Ncr3 | NKp30 | Fw:AAGAGCCTCCTCAACAAG Rv:AGAAAGCTGAGGGCATAG | 94 | NM_181822 |

2.5 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde die Software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $P < 0,05$ festgelegt. Mit Ausnahme der absoluten Tumoranzahlen wurden alle Daten als Mittelwerte \pm dem Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of mean*, SEM) angegeben. Zur Ermittlung von Unterschieden zwischen den Einzelgruppen diente die einfaktorielle Varianzanalyse (*One-way ANOVA*) sowie der *Tukey-Post-hoc*-Test. Mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse (*Two-way ANOVA*) wurde der Einfluss der Hochfettdiät unabhängig von der NaCl- bzw. AOM-Behandlung beurteilt.

3. Ergebnisse

3.1 Gewichtsentwicklung der Versuchstiere

Vor Beginn der Fütterung wurden alle Versuchstiere gewogen, wobei das durchschnittliche Körpergewicht der Ratten $296,3 \pm 36,7$ g betrug. Anschließend erfolgte eine gewichtsadjustierte Einteilung der Versuchstiere in vier Gruppen. Zum Zeitpunkt der Injektion von Azoxymethan, bzw. von NaCl (acht Wochen nach Beginn der Fütterung), gab es noch keine signifikanten Gewichtsunterschiede zwischen den Kontroll- und DIO-Tieren. In den ersten acht Versuchswochen steigerten die Ratten unter hochkalorischer Diät ihr Gewicht um durchschnittlich 68,6 %, während sich das Gewicht der Kontrolltiere um 65,4 % erhöhte. Signifikante Unterschiede der Gewichtszunahme zwischen den normalgewichtigen und den DIO-Tieren wurden ab der 30. Woche nach Beginn der Fütterung festgestellt (Abbildung 4).

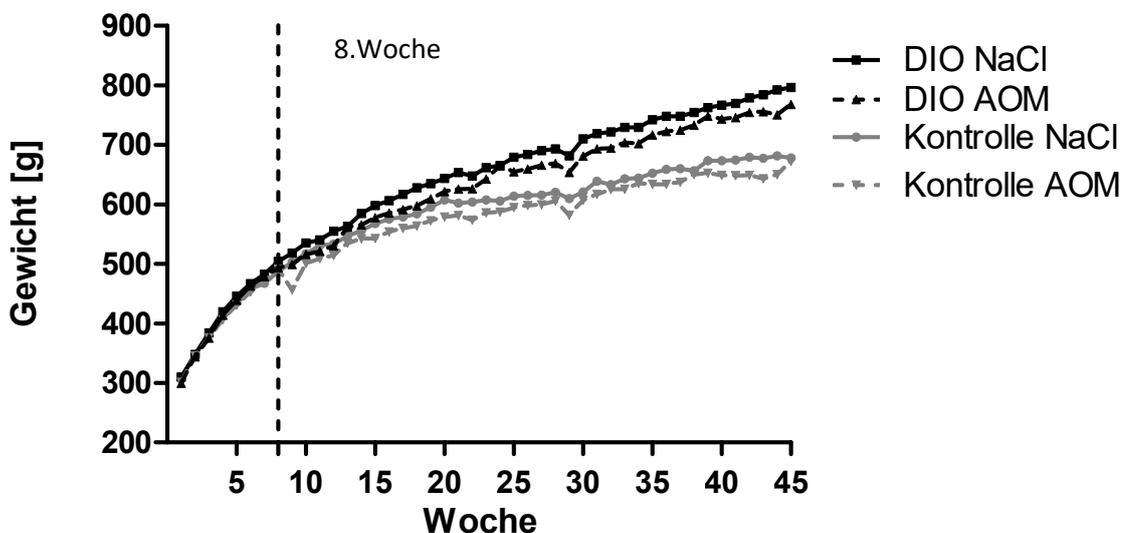


Abbildung 4: Gewichtsentwicklung der vier Versuchstiergruppen über 45 Wochen von normalgewichtigen (Kontrolle) und übergewichtigen (DIO, *diet-induced obesity*) Ratten, welche mit NaCl oder Azoxymethan (AOM) behandelt wurden.

Am Versuchsende wiesen die Tiere der beiden DIO-Gruppen deutlich signifikante Unterschiede bezüglich des Körpergewichtes im Vergleich zu ihrer jeweiligen Kontrollgruppe auf ($P < 0,05$, Abbildung 5).

Auch der Vergleich zwischen den DIO-Ratten und den Kontrolltieren ohne Berücksichtigung der Behandlung mit Azoxymethan bzw. NaCl mittels *Two-way*-ANOVA-Analyse zeigte signifikante Unterschiede bezüglich des Körpergewichtes der Ratten ($P < 0,01$). Die Behandlung mit Azoxymethan oder NaCl hatte hingegen keinen wesentlichen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung der normalgewichtigen und adipösen Versuchstiere.

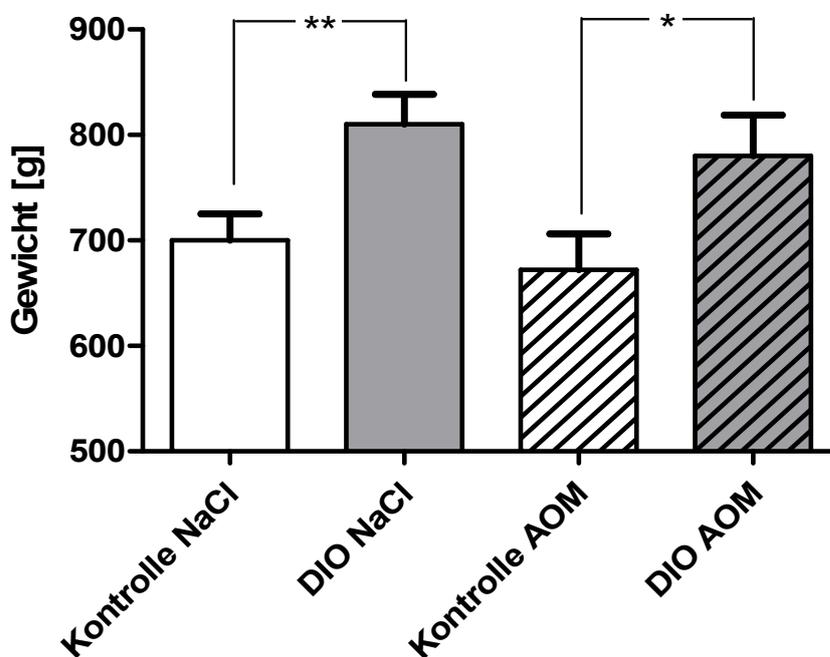


Abbildung 5: Gewichtsunterschiede zum Versuchsende von normalgewichtigen (Kontrolle) und übergewichtigen (DIO, *diet-induced obesity*) Ratten, welche mit NaCl oder Azoxymethan (AOM) behandelt wurden. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit * ($P < 0,05$) bzw. ** ($P < 0,01$) gekennzeichnet. Die *Two-way*-Anova-Analyse zum Einfluss der Hochfettdiät unabhängig von der NaCl- bzw. AOM-Behandlung ergab signifikante Unterschiede zwischen den Kontroll- und DIO-Gruppen. ($P < 0,01$)

3.2 Futter- und Energieaufnahme

Die täglich aufgenommene Futtermenge war bei den Ratten, welche die DIO-Diät erhielten, signifikant geringer als bei den Kontrolltieren (*Two-way*-ANOVA; $P < 0,01$; Abbildung 6a). Die Analyse der Futteraufnahme zwischen den Einzelgruppen ergab signifikante Unterschiede zwischen der AOM-behandelten Kontroll- und DIO-Gruppe ($P < 0,05$). Demgegenüber war die reduzierte Futteraufnahme zwischen NaCl-behandelten Kontroll- und DIO-Tieren nicht signifikant.

Aufgrund des höheren Energiegehaltes der DIO-Diät war die tägliche Energieaufnahme der Tiere, welche das hochkalorische Futter bekamen, dennoch signifikant höher als bei den Kontrolltieren (*Two-way*-ANOVA; $P < 0,0007$; Abbildung 6b). Dabei war die Energieaufnahme bei AOM-behandelten DIO-Tieren gegenüber AOM-behandelten NaCl-Tieren signifikant erhöht ($p < 0,01$), während die Unterschiede in der Energieaufnahme bei den NaCl-behandelten Versuchstieren nicht signifikant waren (Abbildung 6b).

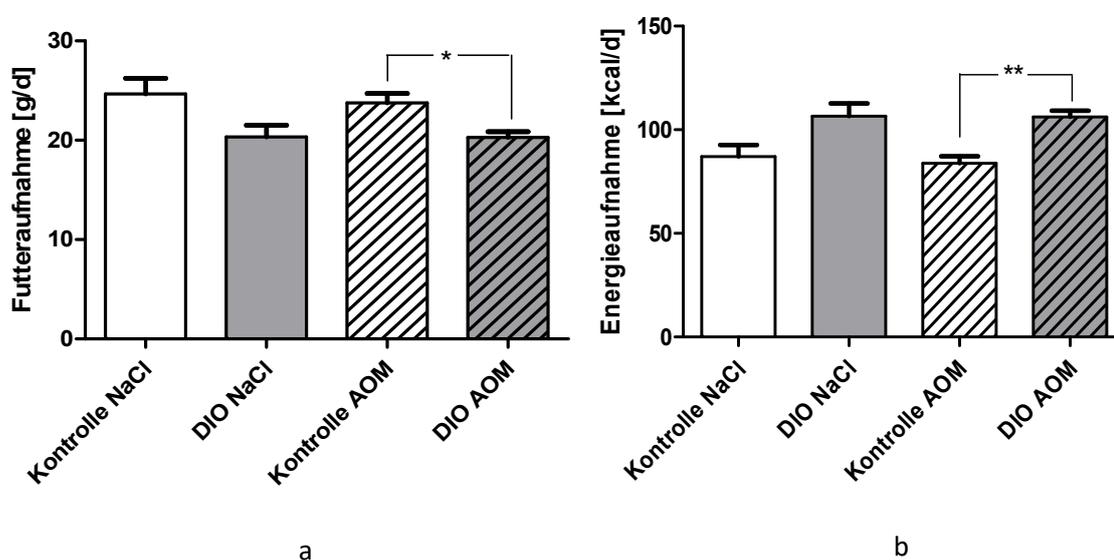


Abbildung 6a und b: Tägliche Futteraufnahme (a) und tägliche Energieaufnahme (b) von normalgewichtigen (Kontrolle) und übergewichtigen (DIO, *diet-induced obesity*) Ratten, welche mit NaCl oder Azoxymethan (AOM) behandelt wurden. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit * ($P < 0,05$) und ** ($P < 0,01$) gekennzeichnet. Die *Two-way*-ANOVA-Analyse zum Einfluss der Hochfett-diät unabhängig von der NaCl- bzw. AOM-Behandlung ergab signifikante Unterschiede zwischen den Kontroll- und DIO-Gruppen in a ($P < 0,01$), in b ($P < 0,001$)

Durch die unterschiedliche Zusammensetzung der beiden Diäten (DIO-Futter mit 34 % Fettgehalt und Kontrollfutter mit 4 % Fettgehalt) gewannen die mit der DIO-Diät gefütterten Tiere signifikant mehr Energie über die Aufnahme von Fetten als die Ratten der jeweiligen Kontrollgruppen (*Two-way-ANOVA*, $P < 0,001$, Abbildung 7). Dabei war die tägliche Fettaufnahme sowohl bei den NaCl- als auch bei den AOM-behandelten DIO-Tieren gegenüber der jeweiligen Versuchsgruppe mit normokalorischem Futter signifikant erhöht ($P < 0,001$, Abbildung 7a).

Die Energieaufnahme aus Kohlenhydraten war sowohl bei NaCl- als auch bei AOM-Behandlung bei den Tieren mit hochkalorischer Diät signifikant geringer als bei den Kontrolltieren, bei denen Kohlenhydrate den Hauptteil der Energieaufnahme darstellten ($P < 0,001$; *Two-way-ANOVA*; $P < 0,0001$; Abbildung 7b).

Der aufgenommene Anteil der Energie aus Proteinen war bei den DIO-Ratten im Vergleich zu den Kontrollratten insgesamt signifikant geringer (*Two-way-ANOVA*; $P < 0,05$), zwischen den einzelnen Gruppen wurde allerdings keine Signifikanz erreicht (Abbildung 7c)

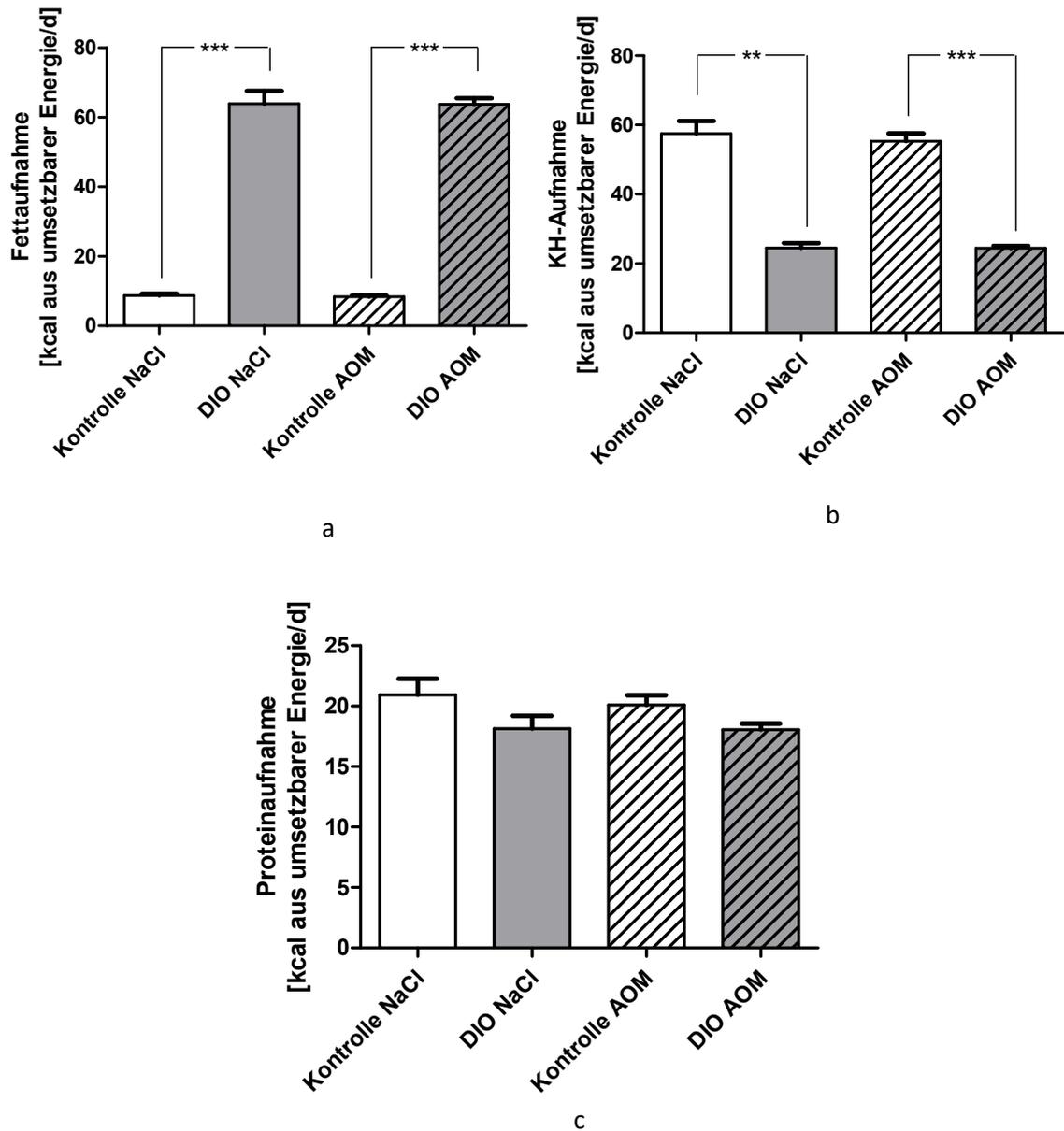


Abbildung 7a-c: Umsetzbare Energie aus der Fettaufnahme pro Tag bei normalgewichtigen (Kontrolle) und übergewichtigen (DIO, *diet-induced obesity*) Ratten, welche mit NaCl oder Azoxyethan (AOM) behandelt wurden. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit ** ($P < 0,01$) bzw. *** ($P < 0,001$) gekennzeichnet. Die *Two-way*-ANOVA-Analyse zum Einfluss der Hochfett-diät unabhängig von der NaCl- bzw. AOM-Behandlung ergab bezüglich der Fett- (a) und Kohlenhydrataufnahme (b) signifikante Unterschiede zwischen den Kontroll- und DIO-Gruppen ($P < 0,001$). Hinsichtlich der Proteinaufnahme (c) konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

3.3 Viszerale Fettmasse

Am Versuchsende wurde die viszerale Fettmasse, welche sich aus epididymalem, mesentrialem und omentalem Fett zusammensetzte, bei jedem Tier bestimmt. Eine *Two-way*-Analyse zeigte signifikante Unterschiede zwischen den DIO-Tieren und den Kontrolltieren ($P < 0,001$), wobei die DIO-Ratten durchschnittlich 58,2 % mehr viszerales Fett aufwiesen als die Kontrolltiere. Zudem konnten im Vergleich der Einzelgruppen sowohl bei NaCl- als auch bei AOM-Behandlung Unterschiede im Signifikanzbereich zwischen der jeweiligen DIO-Gruppe und der korrespondierenden Kontrollgruppe festgestellt werden ($P < 0,05$). Des Weiteren war die viszerale Fettmenge bei AOM-behandelten Kontrolltieren gegenüber NaCl-behandelten Kontrolltieren signifikant erniedrigt ($P < 0,05$).

3.4 Anzahl der Kolontumoren

Bei der Analyse der Darmabschnitte konnte festgestellt werden, dass NaCl-behandelte Tiere unabhängig von der erhaltenen Diät keine Kolontumoren ausgebildet hatten. In beiden Versuchstiergruppen, welche mit Azoxymethan behandelt worden waren, entwickelten sich erwartungsgemäß Kolontumoren. Insgesamt waren bei den DIO-Tieren mehr Tumoren ausgebildet, als bei der korrespondierenden normalgewichtigen Kontrollgruppe (DIO-AOM 9 Tumore vs. KO-AOM 6 Tumore, Abbildung 8). Die Lokalisation der Neoplasien unterschied sich dabei zwischen den Gruppen: Während die Kontrolltiere ein gleichmäßiges Verteilungsmuster, je drei Tumoren im proximalen und drei Tumoren im distalen Darmabschnitt zeigten, befanden sich bei den adipösen Ratten 33,3 % der Tumoren im proximalen Anteil und 66,6 % der Tumoren im distalen Anteil des Darmes. Zudem konnten bei allen Versuchstieren makroskopisch keine Metastasen in anderen Organen festgestellt werden.

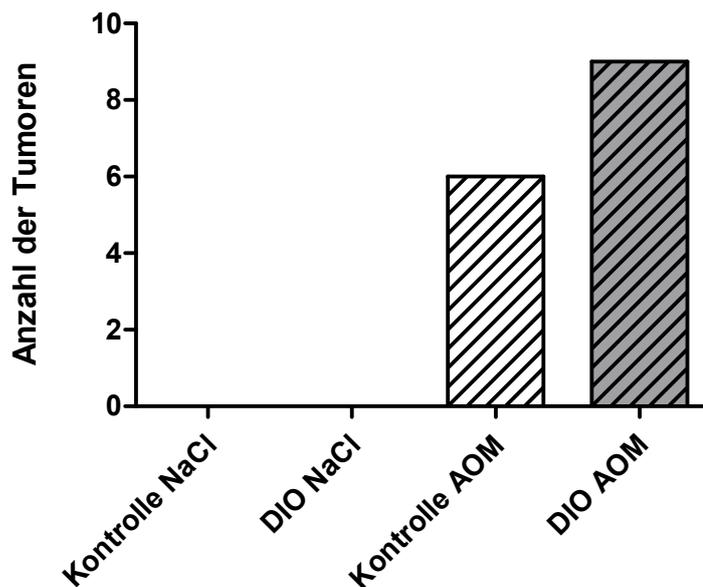


Abbildung 8: Anzahl der Kolontumore bei normalgewichtigen (Kontrolle) und übergewichtigen (DIO, *diet-induced obesity*) Ratten, die mit NaCl bzw. Azoxymethan (AOM) behandelt wurden.

3.5 Histologische Differenzierung der Tumoren

Die histologische Untersuchung der identifizierten Tumoren ergab, dass sich die beiden mit Azoxymethan behandelten Versuchstiergruppen nicht nur in Anzahl, Gewicht und Größe der Tumoren, sondern insbesondere in der Tumordignität unterschieden. So waren bei den Kontrolltieren 50 % der Tumoren Adenome und 50 % Karzinome. Bei den DIO-Ratten dagegen handelte es sich in 89 % der Fälle um Karzinome und nur 11 % waren Adenome (Abbildung 10). Abbildung 11 zeigt exemplarisch makroskopische Aufnahmen unauffälliger Darmabschnitte, sowie adenomatöse und karzinomatöse Veränderungen im Darm von AOM-behandelten Kontroll- und DIO-Ratten, sowie repräsentative mikroskopische Bilder von gesundem Kolongewebe, einem Adenom und einem Adenokarzinom.

3.6 Größe und Gewicht der Tumoren

Die Tumore der adipösen Tiere hatten eine durchschnittliche Größe von $47,7 \pm 13,3 \text{ mm}^2$ und waren damit deutlich größer als die der normalgewichtigen Vergleichsgruppe, deren Tumorgröße $25,9 \pm 12,9 \text{ mm}^2$ betrug. In beiden Gruppen waren die histologisch identifizierten malignen Karzinome größer als die als benigne einzustufenden Adenome (Abbildung 9).

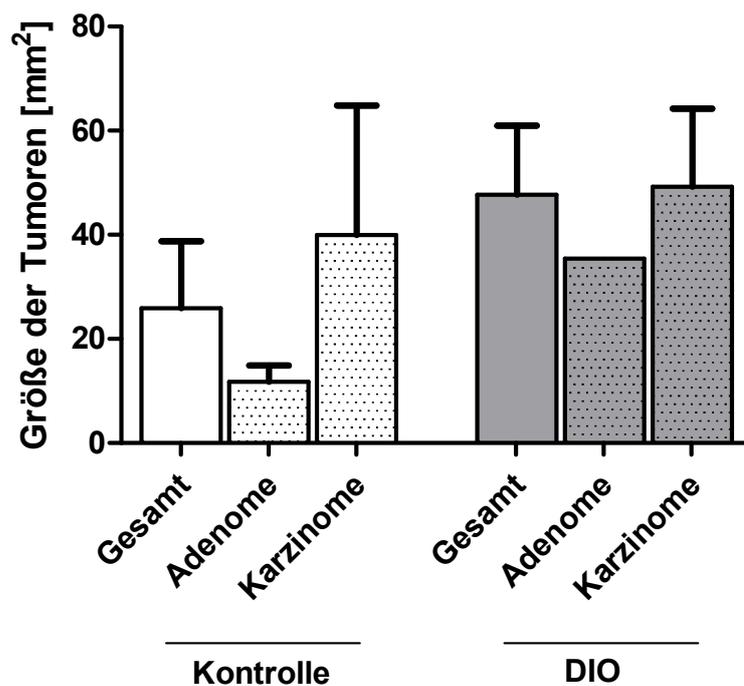


Abbildung 9: Größe der Tumoren unter Berücksichtigung der Tumorhistologie bei normalgewichtigen (Kontrolle) und übergewichtigen (DIO, *diet-induced obesity*) Ratten, die mit Azoxymethan (AOM) behandelt wurden.

Die Unterschiede im Tumorwachstum zwischen den AOM-behandelten Kontroll- und DIO-Gruppen wurden auch anhand des Tumorgewichtes deutlich. Das durchschnittliche Gewicht der Neoplasien betrug bei den DIO-Tieren $14,5 \pm 4,7 \text{ mg}$ und war damit mehr als doppelt so hoch wie das Tumorgewicht der Kontrollgruppe, bei der die Tumore $6,8 \pm 4,8 \text{ mg}$ wogen (Abbildung 10). Die Unterschiede in Größe und Gewicht der Tumoren waren jedoch nicht signifikant.

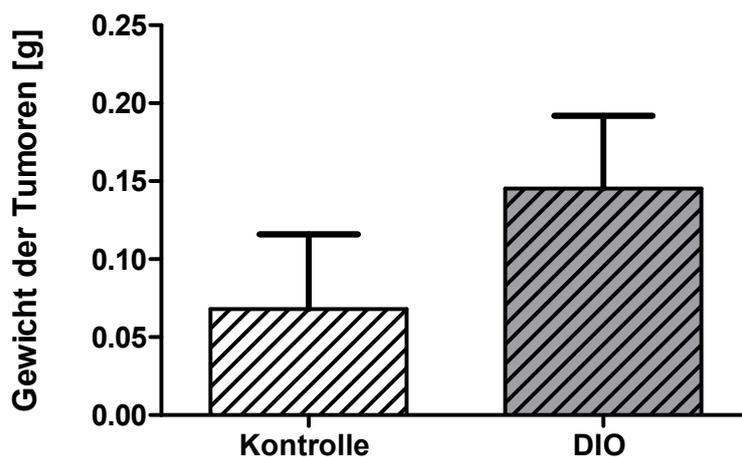


Abbildung 10: Vergleich des durchschnittlichen Tumorgewichtes bei normalgewichtigen (Kontrolle) und übergewichtigen (DIO, *diet-induced obesity*) Ratten nach Behandlung mit Azoxymethan (AOM).

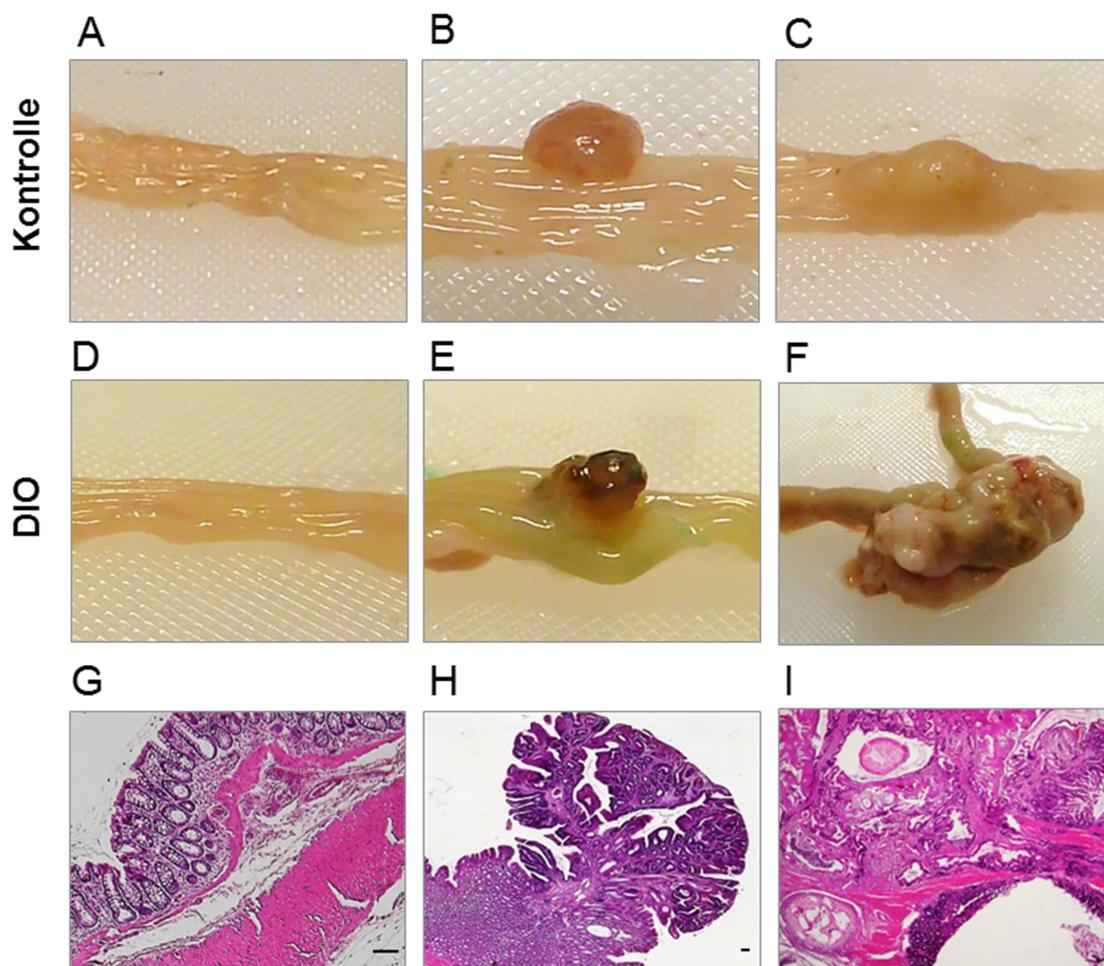


Abbildung 11: (A-F) Makroskopische Befunde von normalem Kolongewebe, kolorektalen Adenomen und kolorektalen Adenokarzinomen nach der Behandlung von normalgewichtigen Ratten (A-C) sowie diätinduziert-fettleibigen (DIO, *diet-induced obesity*) Ratten (D-F) mit Azoxymethan (AOM). (G-I) Representative mikroskopische Befunde von gesundem Kolongewebe (G), einem kolorektalem Adenom (H) und einem kolorektalem Karzinom (I) (scale bar, 100 μ m).

3.7 Immunhistochemische Analyse der Milzen

Die Auszählung der immunhistochemisch angefärbten NK-Zellen in den Milzen der Versuchstiere ergab eine signifikant verminderte Zellzahl in den Milzen der DIO-Ratten im Vergleich zu den normalgewichtige Kontrollgruppen (*Two-way-ANOVA*; $P < 0,05$). Ein Vergleich der Einzelgruppen ergab allerdings keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 12). In Abbildung 13 sind repräsentative Schnitte einer AOM-behandelten Kontroll- und DIO-Ratte mit immunhistochemischer Anfärbung der NK-Zellen.

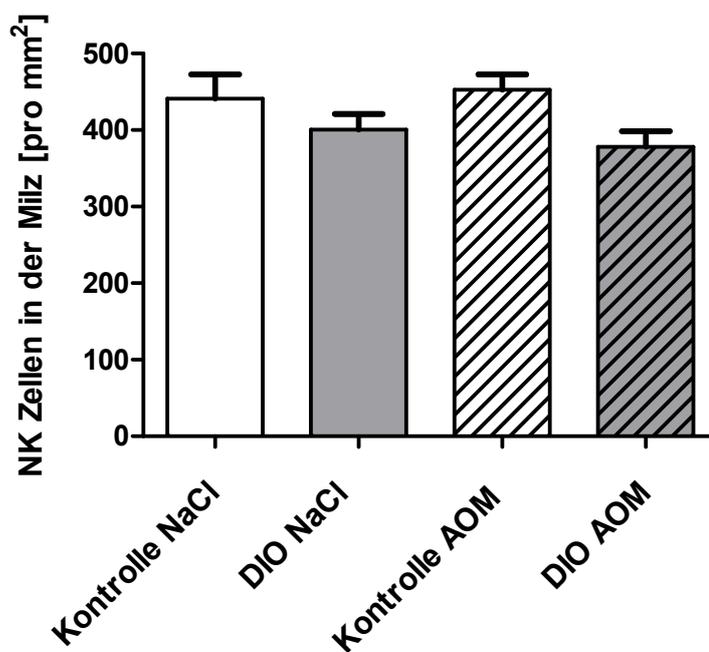


Abbildung 12: Anzahl der NK-Zellen in den Milzen von normalgewichtigen (Kontrolle) und übergewichtigen (DIO, *diet-induced obesity*) Ratten, welche mit NaCl oder Azoxymethan (AOM) behandelt wurden. Die Daten wurden als Mittelwerte \pm des Standardfehlers bei je $n = 5$ Tieren pro Einzelgruppe dargestellt. Die *Two-way-ANOVA*-Analyse zum Einfluss der Hochfettdiät unabhängig von der NaCl- bzw. AOM-Behandlung ergab signifikante Unterschiede zwischen den Kontroll- und DIO-Gruppen ($P < 0,05$).

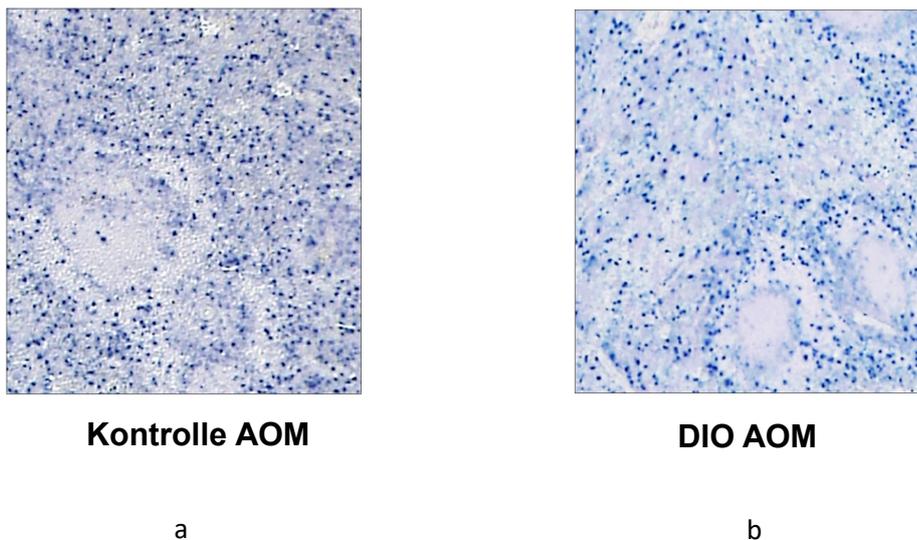


Abbildung 13: Repräsentative immunohistochemische Bilder von NK-Zellen (dunkelblau) in der Milz von normalgewichtigen Kontrolltieren (a) und übergewichtigen DIO (DIO, *diet-induced obesity*)-Tieren (b), welche mit Azoxymethan (AOM) behandelt wurden (*scale bar*, 100 μm).

3.8 Molekularbiologische Untersuchungen des Milzgewebes

Die Messungen der Expression der aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren Klrk1/NKG2D und Ncr1/NKp46 ergab signifikant geringere Werte im Milzgewebe der DIO-Ratten sowohl bei AOM- als auch bei NaCl-Behandlung verglichen mit der jeweiligen korrespondierenden Kontrollgruppe ($P < 0,05$; *Two-way-Anova*; $P < 0,001$, Abbildung 14).

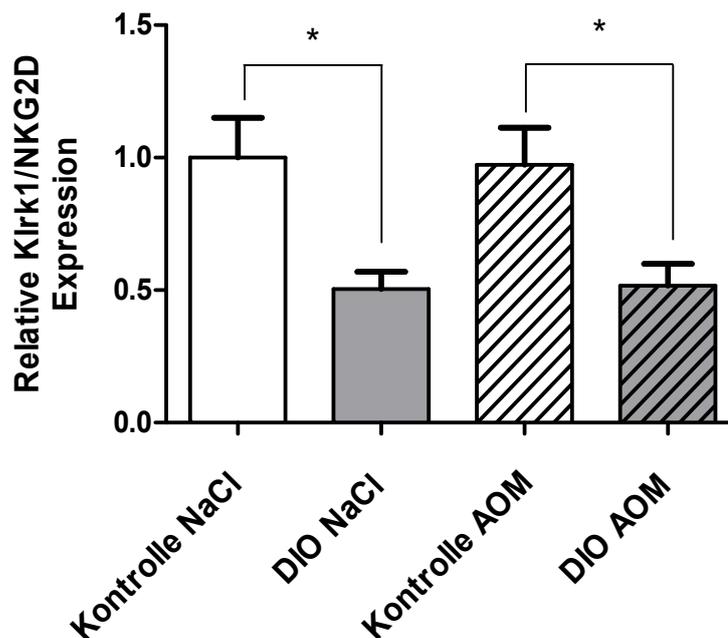


Abbildung 14: Expression der mRNA des aktivierenden NK-Zell-Rezeptors Klrk1/NKG2D in der Milz bei normalgewichtigen (Kontrolle) und übergewichtigen (DIO, *diet-induced obesity*) Ratten, welche mit NaCl oder Azoxymethan (AOM) behandelt wurden. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit * ($P < 0,05$) gekennzeichnet. Die *Two-way*-ANOVA-Analyse zum Einfluss der Hochfettdiät unabhängig von der NaCl- bzw. AOM-Behandlung ergab signifikante Unterschiede zwischen den Kontroll- und DIO-Gruppen ($P < 0,001$).

NaCl- und AOM-behandelte Versuchstiere mit DIO-Diät wiesen gegenüber den korrespondierenden normalgewichtigen Kontrolltieren eine signifikant verringerte mRNA-Expression des Ncr1/NKp46-Rezeptors auf ($P < 0,01$ bzw. $P < 0,001$; *Two-way*-Anova; $P < 0,001$). Bei den Kontrolltieren führte die Behandlung mit Azoxymethan zu einer signifikant erhöhten Expression des Ncr1/NKp46-Rezeptors im Vergleich zu den NaCl-behandelten Tieren ($P < 0,05$). Diese verstärkte Expression konnte bei den DIO-Tieren nicht beobachtet werden (Abbildung 15).

Die Expression des Ncr3/NKp30-Rezeptors war bei den DIO-Tieren ebenfalls geringer als bei den Kontrollratten, die Werte erreichten jedoch nicht das Signifikanzniveau (Abbildung 16).

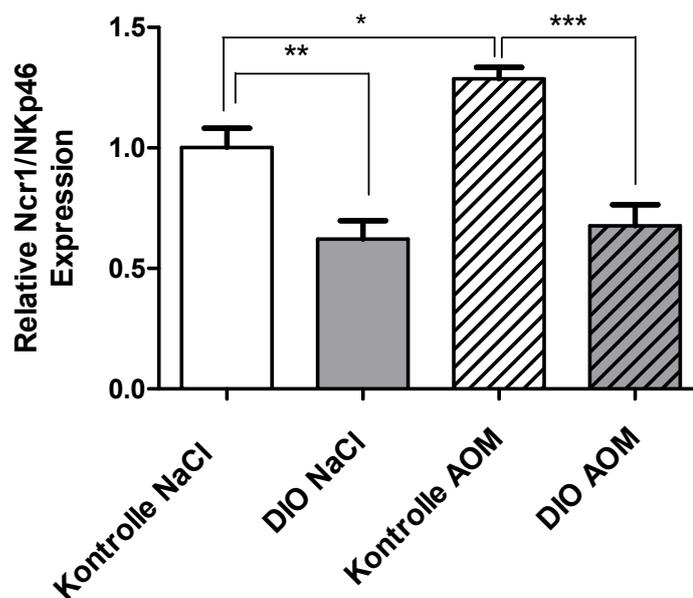


Abbildung 15: Expression der mRNA des aktivierenden NK-Zell-Rezeptors Ncr1/NKp46 in der Milz bei normalgewichtigen (Kontrolle) und übergewichtigen (DIO, *diet-induced obesity*) Ratten, welche mit NaCl oder Azoxymethan (AOM) behandelt wurden. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) bzw. *** ($P < 0,001$) gekennzeichnet. Die *Two-way*-ANOVA-Analyse zum Einfluss der Hochfettdiät unabhängig von der NaCl- bzw. AOM-Behandlung ergab signifikante Unterschiede zwischen den Kontroll- und DIO-Gruppen ($P < 0,001$).

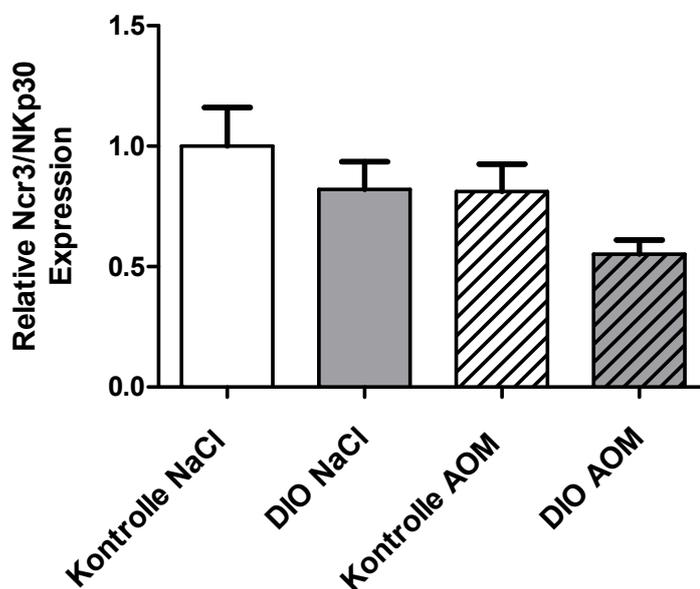


Abbildung 16: Expression der mRNA des aktivierenden NK-Zell-Rezeptors Ncr3/NKp30 in der Milz bei normalgewichtigen (Kontrolle) und übergewichtigen (DIO, *diet-induced obesity*) Ratten, welche mit NaCl oder Azoxymethan (AOM) behandelt wurden. Die *Two-way*-ANOVA-Analyse zum Einfluss der Hochfettdiät unabhängig von der NaCl- bzw. AOM-Behandlung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll- und DIO-Gruppen.

3.9 Serumkonzentrationen ausgewählter Metabolite

Die Konzentrationen von Triglyzeriden und Gesamtcholesterin im Serum der Ratten zeigten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstiergruppen (Abbildung 17 a und b). Demgegenüber war die HDL-Serumkonzentration bei DIO-Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant verringert (*Two-way-ANOVA*; $P < 0,01$). Die Analyse der Einzelgruppen ergab eine signifikante Verringerung der HDL-Konzentration bei den NaCl-behandelten, nicht jedoch bei AOM-behandelten, DIO-Tieren ($P < 0,01$; Abbildung 17c).

Die Messung der LDL-Konzentrationen im Serum war sowohl bei NaCl-behandelten als auch bei AOM-behandelten Versuchstieren mit DIO-Futter im Vergleich zur korrespondierenden normalgewichtigen Kontrollgruppe signifikant erhöht (*Two-way-ANOVA*; $P < 0,001$). Dabei hatte die Behandlung mit NaCl und AOM keinen Einfluss (Abbildung 17d).

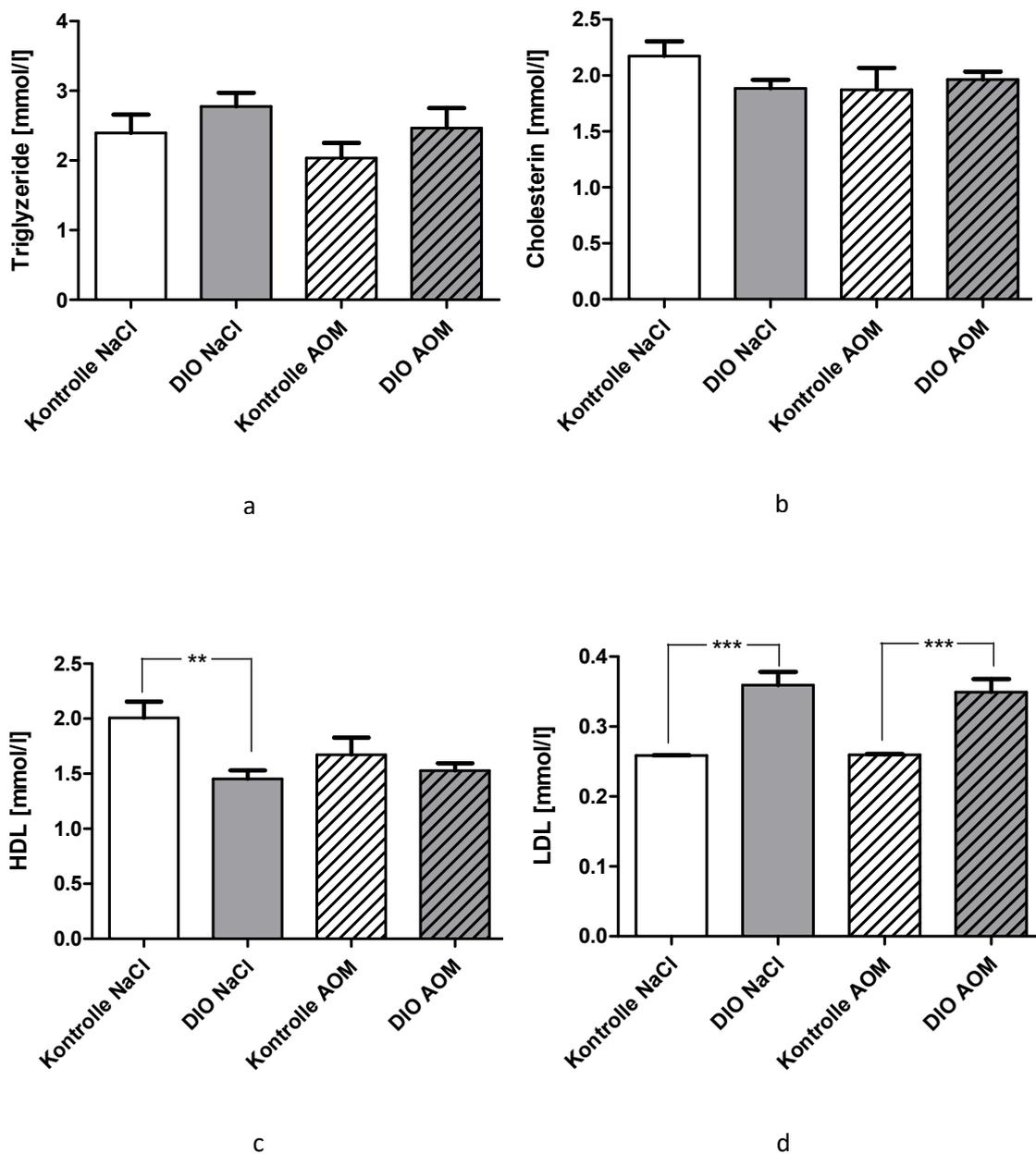


Abbildung 17 a-d: Serumkonzentrationen von Triglyzeriden, Gesamtcholesterin, HDL (*high-density lipoprotein*) Cholesterin und LDL (*low-density lipoprotein*) Cholesterin bei normalgewichtigen (Kontrolle) und übergewichtigen (DIO, *diet-induced obesity*) Ratten, welche mit NaCl oder Azoxymethan (AOM) behandelt wurden. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit ** (P < 0,01) bzw. *** (P < 0,001) gekennzeichnet. Die *Two-way*-ANOVA-Analyse zum Einfluss der Hochfettdiät unabhängig von der NaCl- bzw. AOM-Behandlung ergab bei Triglyzeriden und Gesamtcholesterin keine signifikanten Unterschiede; die HDL- und LDL-Konzentrationen unterschieden sich zwischen den DIO- und Kontrollgruppen signifikant (HDL, P < 0,01; LDL, P < 0,001).

3.10 Zytokin-Plasmakonzentration

Die mit Hilfe der Luminex-Methode bestimmte Konzentration von Leptin im Plasma der DIO-Ratten war im Vergleich zu den Kontrolltieren tendenziell erhöht, es wurde jedoch kein Signifikanzniveau erreicht (*Two-way*-ANOVA; $P = 0,06$). Bei Betrachtung der einzelnen Versuchstiergruppen konnten keine Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 18a).

Im Plasma der DIO-Ratten zeigte sich eine Erhöhung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β verglichen mit den normalgewichtigen Kontrolltieren, wobei lediglich die Werte für die IL-1 β -Konzentration Signifikanz erreichten (*Two-way*-Anova; TNF- α , $P < 0,12$; IL-1 β , $P < 0,05$, Abbildung 18b und c). Dabei waren die unterschiedlichen Plasmakonzentrationen von Leptin, TNF- α und IL-1 β unabhängig von der Behandlung der Tiere mit Azoxymethan oder NaCl. Zudem zeigten sich signifikante Konzentrationsunterschiede von IL-10 zwischen DIO-Ratten und den normalgewichtigen Kontrolltieren (*Two-way*-Anova; $P < 0,05$). Der Vergleich der Einzelgruppen ergab eine signifikante Erniedrigung der IL-10-Plasmakonzentrationen bei den DIO-Tieren mit NaCl-Behandlung im Vergleich zu den mit NaCl-behandelten Kontrolltieren ($P < 0,05$). Des Weiteren wiesen die normalgewichtigen AOM-behandelten Ratten signifikant geringere IL-10 Konzentrationen als die entsprechende normalgewichtige NaCl-behandelte Kontrollgruppe auf ($P < 0,05$). Zwischen den DIO- und normalgewichtigen Tieren mit AOM-Behandlung konnten hingegen keine wesentlichen Konzentrationsunterschiede für IL-10 festgestellt werden (Abbildung 18d).

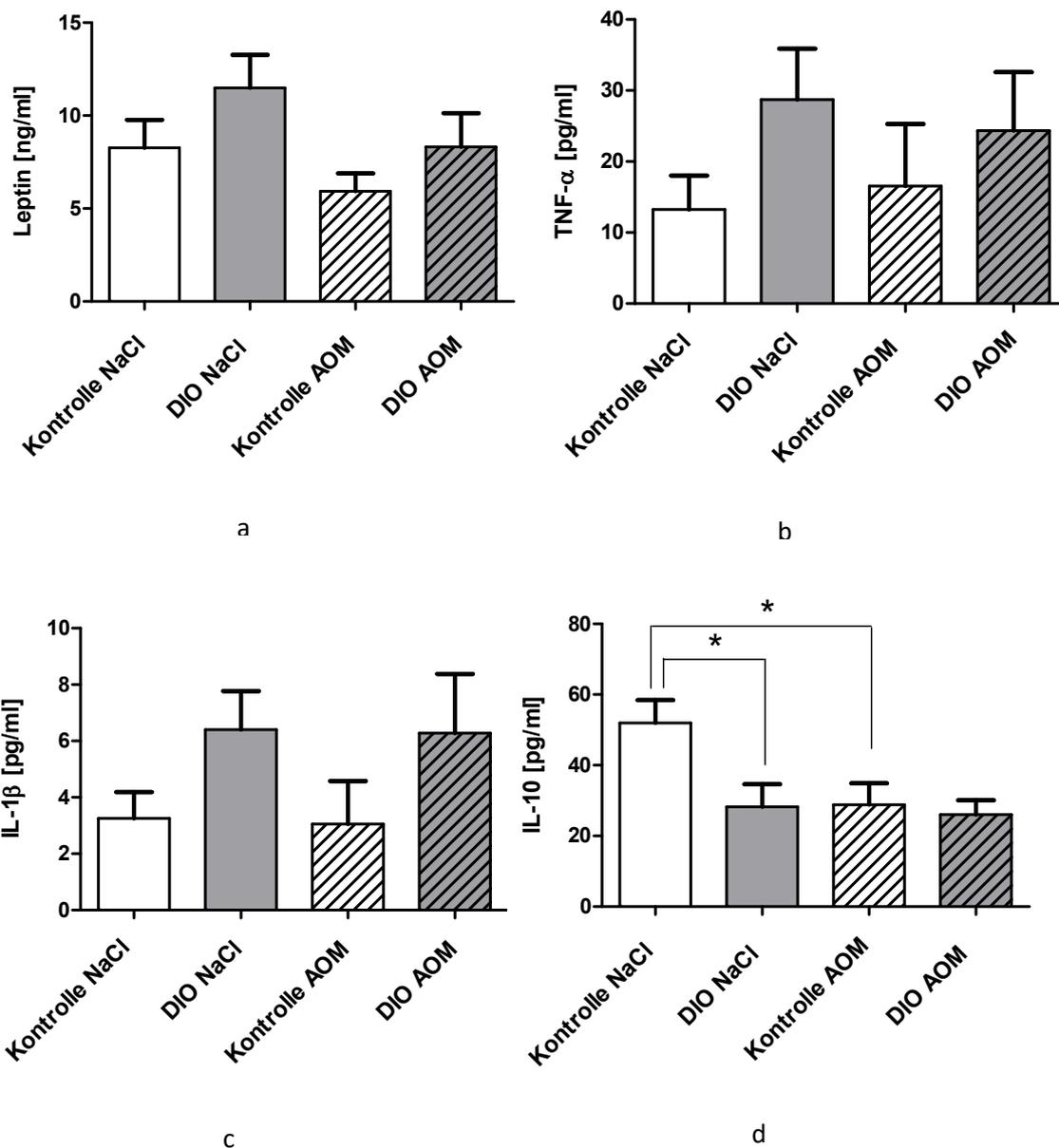


Abbildung 18: Plasmakonzentrationen von Leptin, Tumornekrose-Faktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1 β und IL-10 bei normalgewichtigen (Kontrolle) und übergewichtigen (DIO, *diet-induced obesity*) Ratten, welche mit NaCl oder Azoxymethan (AOM) behandelt wurden. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit * ($P < 0,05$) gekennzeichnet. Die *Two-way-ANOVA*-Analyse zum Einfluss der Hochfett diät unabhängig von der NaCl- bzw. AOM-Behandlung ergab bei Leptin und TNF- α keine signifikanten Unterschiede; die IL-1 β - und IL-10 -Konzentrationen unterschieden sich zwischen den DIO- und Kontrollgruppen signifikant (IL-1 β , $P < 0,05$; IL-10, $P < 0,05$).

4. Diskussion

Die global steigende Anzahl an übergewichtigen und adipösen Personen sowohl in Industrieländern als auch in Schwellen- und Entwicklungsländern stellt ein weltweit wachsendes gesundheitliches Problem dar. In verschiedenen Studien konnte belegt werden, dass die zunehmende Adipositas direkt mit steigenden Inzidenzraten verschiedener Karzinome, unter anderem des kolorektalen Karzinoms assoziiert ist (Laiyemo 2014; Renehan et al. 2010; WHO 2014). Außerdem konnten erhöhte Komplikationsraten in der Versorgung und gesteigerte Mortalitätsraten bei adipösen Menschen mit kolorektalem Karzinom gegenüber normalgewichtigen erkrankten Personen festgestellt werden (Fedirko et al. 2014; Heus et al. 2016; Kocarnik et al. 2016; Renehan et al. 2010). Als Ursache dieses Zusammenhangs werden unter anderen die entzündlichen Prozesse und beeinträchtigte Immunfunktionen, wie sie bei Adipositas entstehen, angesehen. So wurden bei adipösen Menschen erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine festgestellt (Harvey et al. 2011). Außerdem konnten eine veränderte Anzahl sowie funktionelle Defizite von NK-Zellen bei Adipositas beobachtet werden (Harvey et al. 2011; Laue et al. 2015; Nave et al. 2008). NK-Zellen, welche zum angeborenen Immunsystem gehören, haben wichtige Funktionen bei der Abwehr von Tumorzellen (Schütt und Bröker 2011). Ebenso konnte gezeigt werden, dass Adipositas zu einer Beeinträchtigung von Immunfunktionen, speziell der NK-Zell-Funktionalität führen kann (Wrann et al. 2012). Auf der Grundlage dieses Wissens wurde die These aufgestellt, dass Adipositas durch die Beeinträchtigung der NK-Zell-Funktionalität das Risiko kolorektale Karzinome zu entwickeln entscheidend erhöht.

Tiermodelle mit Fütterung einer Hochfettdiät wurden bereits in vielen Studien erfolgreich zur Induktion von Adipositas, Dyslipidämie, Steatose, einer gestörten Glukosetoleranz sowie um eine erhöhte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine hervor zu rufen, verwendet (Buettner et al. 2007; Kira Laura Piotrowitz 2016; Takahashi et al. 2012). Bei Versuchstieren wird die Diät-induzierte Adipositas für Untersuchungen zum Einfluss von erhöhtem Körpergewicht und vermehrter Fettmasse auf verschiedenste Körperfunktionen verwendet. Im Gegensatz zu Tiermodellen mit genetisch bedingter Adipositas kann somit der Einfluss einer vermehrten Energie- und Fettaufnahme durch erhöhte Nahrungsaufnahme auf den Metabolismus untersucht werden. Wie erwartet, zeigte sich im Rahmen dieser Studie bei der Gruppe der Diät-induziert adipösen Ratten ab der 30. Woche nach Beginn der Fütterung eine signifikante Erhöhung von Körpergewicht und viszeralem Fettgewebe gegenüber der

normokalorischen Kontrollgruppe. Die Auswertung von Futter-, Energie- und Nährstoffaufnahme bei den Versuchstieren konnte zeigen, dass bei Fütterung der hochkalorischen Hoch-Fett-Diät trotz geringerer Futtermenge eine vermehrte Energie- und Fettzufuhr zu erhöhtem Körpergewicht und viszeralen Fettmenge führte.

Bei der Analyse der Daten zu Tumoranzahl, -gewicht und -größe ergaben sich ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den adipösen und normalgewichtigen Versuchstieren. So wiesen die fettleibigen Tiere, welche mit AOM behandelt wurden eine höhere Anzahl sowie Größe und Gewicht an Tumoren auf, als die normalgewichtigen Kontrolltiere, welche die AOM-Injektionen erhielten. Des Weiteren zeigten sich deutliche Unterschiede in der Dignität der untersuchten Kolontumoren. Während sich unter den Tumoren der normalgewichtigen Ratten ebenso viele Adenome wie Karzinome fanden, entwickelten die adipösen Ratten deutlich mehr Karzinome als Adenome. Diese Daten sind ein erneuter Beleg für ein bestehendes erhöhtes Risiko für kolorektale Karzinome bei Adipositas, wie bereits mehrere vorangegangene Studien demonstrierten (Kocarnik et al. 2016; Laiyemo 2014).

Chronische Entzündungsreaktionen, wie sie bei Adipositas zu beobachtet sind, werden als eine mögliche Ursache für die positive Korrelation zwischen Fettleibigkeit und der Entstehung kolorektaler Karzinome angesehen, da chronische Entzündungsreize die Entartung intestinaler Zellen fördern können (Coussens und Werb 2002; Harvey et al. 2011). Die Arbeitsgruppe Bremer und Jialal konnte zeigen, dass es bei Adipositas zu einem Anstieg von *Monocyte Chemoattractant Protein* (MCP)-1, einem Chemokin, welches für die Migration von Zellen des Immunsystems, kommt. Damit können sich vermehrt Immunzellen, wie Monozyten, T-Zellen und Dendritische Zellen in verschiedenen Geweben ansammeln. Außerdem waren in dieser Studie erhöhte Plasma-Konzentrationen von Adipokinen, u.a. IL-1, IL-6, IL-8 und Leptin sowie ein erniedrigter Plasma-Spiegel von Adiponektin zu messen (Bremer und Jialal 2013). Vor allem der Anstieg der proinflammatorisch wirkenden Botenstoffe IL-1 β , IL-6, IL-17 und TNF- α bei einer Zunahme an Fettgewebe konnte in diversen Studien belegt werden (Chang et al. 2013; Chen 2011; Harvey et al. 2011; Rosen und Spiegelman 2006). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Anstieg der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β im Plasma der DIO-Ratten gemessen werden. Demgegenüber war die Konzentration des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 bei den fettleibigen Versuchstieren gegenüber den normalgewichtigen Kontrolltieren ohne AOM-Behandlung signifikant vermindert. Auch diese Ergebnisse stehen im Konsens mit den Daten bisheriger Untersuchungen (Bosutti et al. 2008; Chang et al. 2013). In einer Querschnittsstudie an Jugendlichen im Alter von etwa 12-14 Jahren und unterschiedlichem BMI untersuchte die Arbeitsgruppe Chang et al. einzelne Plasmazytokinkonzentrationen bei Adipositas. Dabei

wiesen die übergewichtigen Probanden neben erhöhten Konzentrationen für TNF- α und IL-1 β erniedrigte Plasmaspiegel von IL-10 auf. Die gesteigerte Konzentration von IL-1 β bei Adipositas korrelierte dabei mit dem erniedrigten IL-10-Plasmaspiegel der untersuchten Personen (Chang et al. 2013). IL-10 ist ein antiinflammatorisch wirkendes Zytokin, welches von einer Vielzahl an Zellen, beispielsweise Leukozyten, T- und B-Zellen, Makrophagen, Monozyten und Dendritischen Zellen produziert wird (Shouval et al. 2014). Die immunsuppressive Wirkung wird unter anderem durch die Hemmung der Sekretion proinflammatorischer Botenstoffe wie IL-12 und TNF- α bewirkt (Rahim et al. 2005). *In vitro*-Untersuchungen konnten belegen, dass IL-10 die Zytotoxizität von NK-Zellen erhöht und außerdem die Sekretion von Zytokinen wie INF- γ durch NK-Zellen steigert (Mocellin et al. 2004; Qian et al. 2006). Des Weiteren fördert IL-10 die Proliferation von NK-Zellen (Cai et al. 1999). IL-1 β besitzt dagegen proinflammatorische Wirkung und beeinträchtigt sowohl die Entwicklung von NK-Zellen als auch deren Funktionalität (Elkabets et al. 2010). Mit dem Wissen um die Einflüsse von IL-1 β und IL-10 ist anzunehmen, dass die hohen Plasmaspiegel an IL-1 β und die verminderten Konzentrationen von IL-10 im Plasma der fettleibigen Versuchstiere dieser Studie inhibitorisch auf die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen gegenüber Tumorzellen wirken. Dies könnte eine Erklärung für die höhere Inzidenz kolorektaler Karzinome der adipösen Ratten gegenüber den normalgewichtigen Kontrolltieren in dieser Studie sein.

NK-Zellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Abwehr maligner Zellen. Bisher existieren keine Standardwerte für die Anzahl von zirkulierenden oder gewebsständigen NK-Zellen im Rahmen von Entzündungen oder malignen Prozessen beim Menschen oder der Ratte. Allerdings fanden sich in früheren Studien quantitative Unterschiede in Bezug auf die Anzahl zirkulierender und gewebeständiger NK-Zellen bei fettleibigen Individuen im Vergleich zu normalgewichtigen Menschen oder Versuchstieren. So wurden beispielsweise bei der Analyse von Blutproben adipöser und normalgewichtiger Probanden signifikant weniger zirkulierende NK-Zellen in den Proben adipöser Personen festgestellt als bei den normalgewichtigen Kontrollpersonen (Lynch et al. 2009). Ebenso konnte im Tierversuch eine verminderte Anzahl von NK-Zellen im Blut bei Diät-induziert adipösen Ratten nachgewiesen werden (Spielmann et al. 2017). Die Arbeitsgruppe Caspar-Bauguil et al. stellte bei der Untersuchung Diät-induziert fettleibiger Mäuse fest, dass diese im Vergleich zu ihrer normalgewichtigen Kontrollgruppe eine signifikant verringerte Anzahl gewebsständiger NK-Zellen in den epididymalen Fettpolstern aufweisen (Caspar-Bauguil et al. 2005). Auch bei Beobachtungen an Leptin-Rezeptor-defizienten Mäusen (*db/db B6 mice*) mit genetisch bedingter Adipositas, konnte gezeigt werden, dass die NK-Zell-Zahl bei übergewichtigen Tieren in Leber, Milz und Lunge stark vermindert ist (Tian et al. 2002). Verminderte NK-Zell-Zahlen bei fettleibigen Menschen

in der Leber konnten außerdem in einer Arbeit von Lautenbach et al. festgestellt werden (Lautenbach et al. 2011). Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen im Rahmen dieser Arbeit zur Analyse der Anzahl gewebeständiger NK-Zellen in der Milz überein. Auch im Milzgewebe der adipösen Versuchstiere konnten signifikant weniger NK-Zellen nachgewiesen werden als in den Gewebeschnitten der normalgewichtigen Kontrolltiere. Zudem weisen die Diät-induziert adipösen Ratten eine verminderte Anzahl an NK-Zellen im Lebergewebe auf (Ergebnisse der Promotionsarbeit von Vincent Goritz, medizinischer Doktorand der AG Prof. Dr. Heike Kielstein; Bähr et al., 2017). Demgegenüber zeigten Studien an adipösen Ratten eine verminderte Anzahl gewebsständiger NK-Zellen vier Stunden nach Injektion von Leptin mit einer normalgewichtigen Kontrollgruppe (Nave et al. 2008). Dabei ist anzumerken, dass sich der Versuchsaufbau dahingehend von der vorliegenden Studie unterscheidet, dass die Versuchstiere ein deutlich geringeres Gewicht nach einer relativ kurzen Fütterungsphase von lediglich 8 Wochen aufwiesen. Außerdem ist davon auszugehen, dass der Anstieg der NK-Zell-Zahl eher auf eine Migration der Zellen in das Gewebe als auf eine verstärkte Proliferation zurück zu führen ist.

Für die erfolgreiche Reaktion der NK-Zellen auf Tumorzellen ist nicht nur die Anzahl der NK-Zellen entscheidend, sondern auch der Rezeptorbesatz der Oberfläche dieser Immunzellen. Aus den drei identifizierten Gruppen in die sich die Rezeptormoleküle von NK-Zellen unterteilen lassen, die Killer-Immunglobulin-ähnlichen-Rezeptoren (KIR), die C-Typ-Lektin-Rezeptoren und die Natürlichen-Zytotoxizitäts-Rezeptoren (Lanier 1998), scheinen letztere eine besondere Rolle in der Tumorabwehr zu spielen. Die Arbeitsgruppe um Moretta et al. konnte 2001 zeigen, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen der Oberflächendichte der Gruppe von Zytotoxizitäts-Rezeptoren und der Fähigkeit von NK-Zellen, verschiedene Tumorzellen abzutöten, gibt (Moretta et al. 2001). Darüber hinaus konnten Spielmann et al. zeigen, dass fettleibige Ratten eine reduzierte Expression der mRNA des aktivierenden NK-Zell-Rezeptors NKG2D bei gleichzeitig vermehrtem Auftreten von Lungenmetastasen nach Injektion von Mammakarzinomzellen aufwiesen (Spielmann et al. 2017). Übereinstimmend zeigen die Daten der hier beschriebenen Studie eine signifikant geringere mRNA-Expression der aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren NKG2D und NKp46 bei adipösen Tieren im Vergleich zu den normalgewichtigen Kontrolltieren bei gleichzeitig erhöhter Tumorraten bei Adipositas. Die Expression des NKp46-Rezeptors war zudem bei den normalgewichtigen AOM-behandelten Versuchstieren deutlich höher als bei den normalgewichtigen Kontrolltieren ohne AOM-Behandlung. Diese Daten deuten darauf hin, dass bei Normalgewicht eine zytotoxizitätsfördernde Reaktion der NK-Zellen nach Behandlung mit dem Karzinogen stattfindet; bei Adipositas jedoch eine Adaptation der NK-Zellen durch Hochregulierung der

NKp46-Expression an das Tumorgeschehen ausbleibt. Diese Ergebnisse belegen somit eine inadäquat erniedrigte NK-Zell-Aktivität gegenüber Zielzellen bei Adipositas und könnten damit eine weitere Ursache für das erhöhte Risiko für die Entwicklung kolorektaler Karzinomen bei fettleibigen Patienten und Versuchstieren darstellen.

Weitere Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Plasmakonzentrationen von Leptin der AOM-behandelten DIO-Ratten verglichen mit den AOM-behandelten normalgewichtigen Tieren tendenziell erhöht sind. Es existieren verschiedene Studien, die das im Fettgewebe produzierte Peptidhormon Leptin und dessen Wirkung auf Zellen des Darmes untersuchten. Einige Studien konnten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit gesteigerte Leptin-Plasmaspiegel bei Fettleibigkeit sowie eine positive Korrelation von BMI und Leptin-Plasmakonzentration belegen (Dixit 2008; Zhang et al. 2005). Hardwick et al. wiesen in *in vitro*-Experimenten nach, dass humane Darmkrebs-Zelllinien Leptin-Rezeptoren exprimieren. Über die Stimulation des Leptin-Rezeptors kann die p42/44 Mitogen-aktivierte Proteinkinase phosphoryliert werden und über die sich anschließende Signalkaskade zur Steigerung der Zellproliferation von Kolonkarzinomzellen führen (Hardwick et al. 2001). Außerdem konnte in einer weiteren Arbeit herausgefunden werden, dass Leptin sowohl die Angiogenese, als auch die Zellinvasion und Adhäsion über die JAK (Januskinase)- und ERK (*extracellular signal-regulated kinases*)- Signalkaskaden verbessert und somit das Wachstum und Überleben kolorektaler Karzinomzellen bei Adipositas fördert (Chen 2011; Huang und Li 2000; Yoon et al. 2014). Des Weiteren beeinflusst Leptin auch die Funktionalität, speziell die Zytotoxizität, von NK-Zellen. NK-Zellen exprimieren auf Ihrer Oberfläche den Leptin-Rezeptor Ob-R (Zhao et al. 2003). Zum einen konnte festgestellt werden, dass NK-Zellen nach einer Stimulation mit Leptin *in vitro* eine gesteigerte Zytotoxizität aufweisen (Zhao et al. 2003). Aktuellere Studie demonstrieren hingegen, dass NK-Zellen adipöser Probanden funktionelle Defizite nach *in vitro*-Stimulation mit Leptin zeigen (Laue et al. 2015). So wirkt Leptin in erhöhten Konzentrationen und bei lang andauernder Stimulation inhibitorisch auf die NK-Zell-Zytotoxizität gegenüber verschiedener Tumorzellen und hemmt die Proliferation von NK-Zellen (Wrann et al. 2012 Bähr et al. 2017). Weiterhin konnten zellphysiologische Versuche nachweisen, dass eine Leptininkubation die Expression aktivierender NK-Zell-Rezeptoren reduziert (Bähr et al. 2017).

Diese Daten deuten darauf hin, dass die verminderte NK-Zell-Zytotoxizität bei Adipositas durch eine verminderte Expression aktivitätssteigernder Oberflächenrezeptoren auf NK-Zellen bedingt ist.

Unter Berücksichtigung des hemmenden Einflusses von Leptin auf die Zytotoxizität und Proliferation von NK-Zellen kann davon ausgegangen werden, dass die erhöhten Leptin-Spiegel

bei den fettleibigen Ratten dieser Arbeit zu einer verminderten NK-Zell-Reaktion gegenüber malignen Zellen im Darm der adipösen Versuchstiere führen. Zudem könnte die proliferative Wirkung von Leptin auf Darmzellen ein weiterer Grund für das gesteigerte Kolonkarzinomrisiko bei Adipositas sein. Um weitere Erkenntnisse im Hinblick auf den Einfluss von Leptin und anderen Adipokinen auf die Expression aktivierender NK-Zell-Rezeptoren zu gewinnen, sind weiterführende *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen notwendig. Beispielsweise könnten Analysen zur Expression aktivierender NK-Zell-Rezeptoren im Blut adipöser und normalgewichtiger Menschen und die Korrelation mit den Leptin-Plasmakonzentrationen die Bedeutung von Leptin auf die Rezeptorexpression in Abhängigkeit vom Körpergewicht spezifizieren. Zytotoxizitäts-Untersuchungen an Zelllinien mit blockierenden Antikörpern, welche sich gegen die aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren richten, könnten weitere Erkenntnisse über die Rolle der NK-Zellen und ihrer Rezeptoren bei der Tumorabwehr bringen. Außerdem sollten zukünftige Studien die Expression der verschiedenen NK-Zell-Rezeptoren direkt im Gewebe von kolorektalen Karzinomen analysieren, um den Aktivitätszustand von NK-Zellen bei normalgewichtigen und adipösen Individuen hinsichtlich der unmittelbaren zellulären Tumorabwehr und in Folge dessen der Tumorentwicklung charakterisieren zu können. Darüber hinaus können auch Untersuchungen fettleibiger und normalgewichtiger gesunder Menschen im Vergleich zu Patienten mit kolorektalem Karzinomen unterschiedlichen Körpergewichts Erkenntnisse bezüglich der Anzahl und Aktivität von NK-Zellen im Blut in Abhängigkeit von Körpergewicht und Tumorstatus liefern. Im Rahmen zukünftiger Studien sollte auch der eventuelle Einfluss der Tumor-Mikroumgebung, wie beispielsweise die existierende Hypoxie im Tumorgebiet näher untersucht werden. Erste Studien konnten bereits belegen, dass der Zustand des Sauerstoffmangels den Hypoxie-induzierbaren Faktor 1 α in NK-Zellen aktiviert und in Folge dessen zu einer verringerten Expression des aktivierenden NK-Zell-Rezeptors NKG2D führt (Sarkar et al. 2013). Eine weitere Arbeit konnte zeigen, dass NK-Zellen unter Hypoxie eine deutlich verringerte Aktivität hinsichtlich der Abtötung und Lyse von Zielzellen aufweisen. Es wurde außerdem *in vitro* eine Beeinträchtigung der Expression der aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren NKp46, NKp30 und NKp44 unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesen (Balsamo et al. 2013).

Ein weiterer relevanter Aspekt für zukünftige Untersuchungen ist der Einfluss des Bewegungsmangels auf NK-Zellen und die chronischen Entzündungsprozesse bei Adipositas. Es ist bekannt, dass regelmäßige körperliche Aktivität die Immunfunktion des Körpers erhöht, die Ausschüttung proinflammatorisch wirkender Zytokine wie das C-Reaktives Protein (CRP), IL-6 und TNF- α deutlich senkt und somit präventiv gegenüber chronischen Erkrankungen wie

Adipositas wirkt (Colbert et al. 2004). Eine weitere Studie demonstrierte, dass regelmäßiges körperliches Training Einfluss auf die NK-Zell-Aktivität hat. Bei weiblichen Athleten konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivität von NK-Zellen bei sportlich aktiven Personen im Vergleich zu inaktiven Personen erhöht ist (Nieman et al. 1993). Bewegungsmangel könnte also ebenfalls durch die verminderte NK-Zell-Aktivität und die fehlende Hemmung der Zytokinausschüttung einen Einfluss auf die gesteigerte Karzinogenese bei Adipositas haben. Bisher unzureichend untersucht wurde weiterhin der Einfluss besonders zuckerhaltiger Ernährung auf die Karzinogenese. Studien zeigen, dass es nach Aufnahme von Mahlzeiten mit einem hohen glykämischen Index zum akuten Anstieg von Entzündungsparametern kommt (Dickinson et al. 2008). Der Bericht der WCRF (*World Cancer Research Foundation*) und des AICR (*American Institute for Cancer Research*) legt eine Assoziation von zuckerhaltigen Speisen und der Entstehung kolorektaler Karzinome nahe, wohingegen Studien, welche u.a. die Einflüsse von Saccharose und Fruktose auf die Karzinogenese speziell im Darm untersuchte, diesen Zusammenhang nicht belegen konnten (Wang et al. 2014; World Cancer Research Fund International und American Institute for Cancer Research 2007). Möglicherweise führt im Rahmen von Überernährung neben dem Einfluss einer Hochfettdiät auch eine erhöhte Glukoseaufnahme zur Beeinflussung der NK-Zell-Funktion. *In vitro*-Versuche an Glukose-behandelten NK-Zellen könnten Aufschluss über die Bedeutung einer erhöhten Glukoseverfügbarkeit für die NK-Zell-Aktivität geben.

In Anbetracht der Schätzung der WCRF und des AICR, dass etwa 45 % der Fälle von kolorektalen Krebserkrankungen in Hochrisikogruppen durch Diät-Modifikation, körperliche Aktivität und Gewichtskontrolle vermieden werden könnten (World Cancer Research Fund International und American Institute for Cancer Research 2007), gewinnt neben verschiedenen Therapiemöglichkeiten die Prävention von Adipositas zunehmend an Bedeutung. Bereits 2002 wurde durch Arbeiten von Bianchini et al. gezeigt, dass die Vermeidung einer exzessiven Gewichtszunahme ein bedeutender Faktor in der Krebsvorsorge sein könnte (Bianchini et al. 2002). Kurz darauf konnte nachgewiesen werden, dass ein Gewichtsverlust bei bestehendem Übergewicht das Risiko für die Entstehung maligner Tumoren, speziell kolorektaler Karzinome, senkt (Parker und Folsom 2003). Demgegenüber existieren auch Studien in denen der Zusammenhang zwischen Gewichtsreduktion und Tumorentstehung nicht belegt werden kann (Laiyemo et al. 2012). In der randomisierten kontrollierten Studie von Laiyemo et al. wurde über einen Versuchszeitraum von vier Jahren untersucht, ob Gewichtsverlust induziert durch verschiedene Diäten das Risiko für Rezidive von kolorektalen Adenomen, welche Vorläuferläsionen für kolorektale Karzinome darstellen, senkt. Dieser Zusammenhang konnte

jedoch nicht bestätigt werden. Es ist allerdings anzumerken, dass von den insgesamt 1826 Teilnehmern der Studie nur 492 Personen einen BMI über 30 kg/m^2 aufwiesen und von diesen nur 119 Probanden nach vier Jahren mehr als 10 kg an Gewicht verloren hatten. Außerdem wurden die Teilnehmer nur zu Beginn und am Ende der Studie gewogen, sodass nicht detektiert wurde, wann und wie (kontinuierlich oder über einen kurzen Zeitraum) der Gewichtsverlust stattfand. Die Gründe für den in dieser Studie nicht nachzuweisenden positiven Effekt eines Gewichtsverlustes auf das Risiko der Adenomrezidiv-Entstehung sind zusammenfassend in der Anzahl der fettleibigen Personen, die an Gewicht verloren haben, bezüglich der Gesamtteilnehmerzahl und dem zu geringen Gewichtsverlust in Bezug zum Ausgangsgewicht zu sehen. Außerdem wurde nicht erfasst ob es nach Gewichtsverlust Änderung in den Serum-Konzentrationen von Leptin, INF- γ und anderen bei Adipositas erhöhten Metaboliten gab. Aktuelle Untersuchungen an adipösen Individuen konnten demonstrieren, dass es bei einer Gewichtsreduktion durch körperliche Aktivität und Ernährungsumstellung zum Absinken der erhöhten Leptin-Plasmaspiegel sowie zum Anstieg der Expression von INF- γ bei CD56^{dim}-Zellen kommt. Diese Daten weisen darauf hin, dass die gestörte Funktionalität von NK-Zellen bei Adipositas durch eine Gewichtsreduktion wieder normalisiert werden kann (Jahn et al. 2015).

5. Zusammenfassung

Adipositas hat sich in den letzten Jahren weltweit zu einem massiven gesundheitlichen Problem entwickelt und stellt einen Risikofaktor für zahlreiche Folgeerkrankungen, wie beispielsweise maligne Erkrankungen dar. Jedoch sind die genauen Mechanismen der Entwicklung bösartiger Tumoren unter dem Einfluss der Adipositas bisher noch nicht vollständig erforscht und verstanden. In diesem Zusammenhang könnten Natürliche Killer (NK-) Zellen ein elementarer Einflussfaktor sein. NK-Zellen werden dem angeborenen Immunsystem zugeordnet und sind in der Lage infizierte und maligne Zellen zu erkennen und abzutöten.

Um die Einflüsse von Adipositas auf die Funktionalität von NK-Zellen und in dessen Folge auf die Entstehung kolorektaler Karzinome untersuchen zu können, wurde eine tierexperimentelle Studie an 50 männlichen Diät-induziert adipösen und normalgewichtigen Wistar-Ratten durchgeführt. Zur Induktion der Adipositas erhielten die Versuchstiere eine hochkalorische Diät mit einem Fettgehalt von 60 %. Um die Entstehung von kolorektalen Karzinomen zu induzieren, wurden die Ratten subkutan mit dem Karzinogen Azoxymethan behandelt. Nach einer Versuchslaufzeit von 45 Wochen wurde der Darm der Tiere auf das Vorhandensein von Neoplasien untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die adipösen Tiere mehr kolorektale Tumoren mit erhöhtem Tumorgewicht und erhöhter Tumorgroße entwickelten. Bei der histologischen Analyse der Tumoren, konnten deutliche Unterschiede in der Dignität festgestellt werden - adipöse Versuchstiere wiesen deutlich mehr Karzinome als Adenome auf, als die normalgewichtigen Kontrolltiere.

Das Blut der Ratten wurde mit Hilfe eines *Bead*-basiertem Multiplex-Immunoassay im Hinblick auf die Konzentration verschiedener pro- und antiinflammatorischer Zytokine untersucht. Bei den adipösen Tieren zeigten sich im Gegensatz zu den normalgewichtigen Versuchstieren signifikant erhöhte Spiegel an proinflammatorischem IL-1 β und erniedrigte Konzentrationen des entzündungshemmenden IL-10.

Das Milzgewebe der Ratten wurde kryokonserviert sowie immunhistochemisch untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass im Gewebe der adipösen Tiere signifikant weniger NK-Zellen vorkommen als bei den normalgewichtigen Ratten.

Um eine Aussage über die NK-Zell-Funktionalität treffen zu können, wurde das Milzgewebe anschließend hinsichtlich der mRNA-Expression spezifischer NK-Zell-Rezeptoren molekularbiologisch untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikant verringerte mRNA-

Expression der aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren NKG2D und NKp46 in der Gruppe der adipösen Ratten im Vergleich zu den normalgewichtigen Tieren.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass Adipositas durch die Entstehung eines chronisch entzündlichen Zustandes die Entwicklung und Funktionalität von NK-Zellen entscheidend negativ beeinflusst und somit zu einem erhöhten Risiko für die Entstehung kolorektaler Karzinome beiträgt.

6. Literaturverzeichnis

Afshin, Ashkan; Forouzanfar, Mohammad H.; Reitsma, Marissa B.; Sur, Patrick; Estep, Kara; Lee, Alex et al. (2017): Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. In: *The New England journal of medicine* 377 (1), S. 13–27. DOI: 10.1056/NEJMoa1614362.

Anfossi, Nicolas; André, Pascale; Guia, Sophie; Falk, Christine S.; Roetyncck, Sophie; Stewart, C. Andrew et al. (2006): Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. In: *Immunity* 25 (2), S. 331–342. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.06.013.

Balsamo, Mirna; Manzini, Claudia; Pietra, Gabriella; Raggi, Federica; Blengio, Fabiola; Mingari, Maria Cristina et al. (2013): Hypoxia downregulates the expression of activating receptors involved in NK-cell-mediated target cell killing without affecting ADCC. In: *European journal of immunology* 43 (10), S. 2756–2764. DOI: 10.1002/eji.201343448.

Baretić, M. (2013): Obesity drug therapy. In: *Minerva endocrinologica* 38 (3), S. 245–254.

Baserga, R.; Sell, C.; Porcu, P.; Rubini, M. (1994): The role of the IGF-I receptor in the growth and transformation of mammalian cells. In: *Cell Prolif* 27 (2), S. 63–71. DOI: 10.1111/j.1365-2184.1994.tb01406.x.

Benecke, Andrea; Vogel, Heiner (Hg.) (2005): Übergewicht und Adipositas. Robert-Koch-Institut; Deutschland. Geänd. Aufl. Berlin: Robert Koch-Inst (Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 16).

Berrington de Gonzalez, Amy; Hartge, Patricia; Cerhan, James R.; Flint, Alan J.; Hannan, Lindsay; Maclnnis, Robert J. et al. (2010): Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. In: *The New England journal of medicine* 363 (23), S. 2211–2219. DOI: 10.1056/NEJMoa1000367.

Bi, Jiacheng; Tian, Zhigang (2017): NK Cell Exhaustion. In: *Frontiers in immunology* 8, S. 760. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00760.

Bianchini, Franca; Kaaks, Rudolf; Vainio, Harri (2002): Overweight, obesity, and cancer risk. In: *The Lancet Oncology* 3 (9), S. 565–574. DOI: 10.1016/S1470-2045(02)00849-5.

Borinstein, Scott C.; Conerly, Melissa; Dzieciatkowski, Slavomir; Biswas, Swati; Washington, M. Kay; Trobridge, Patty et al. (2010): Aberrant DNA methylation occurs in colon neoplasms arising in the azoxymethane colon cancer model. In: *Molecular carcinogenesis* 49 (1), S. 94–103. DOI: 10.1002/mc.20581.

Bosutti, Alessandra; Malaponte, Grazia; Zanetti, Michela; Castellino, Pietro; Heer, Martina; Guarnieri, Gianfranco; Biolo, Gianni (2008): Calorie restriction modulates inactivity-induced changes in the inflammatory markers C-reactive protein and pentraxin-3. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93 (8), S. 3226–3229. DOI: 10.1210/jc.2007-1684.

Bremer, Andrew A.; Jialal, Ishwarlal (2013): Adipose Tissue Dysfunction in Nascent Metabolic Syndrome. In: *Journal of Obesity* 2013 (19), S. 1–8. DOI: 10.1155/2013/393192.

Buettner, Roland; Schölmerich, Jürgen; Bollheimer, L. Cornelius (2007): High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. In: *Obesity (Silver Spring, Md.)* 15 (4), S. 798–808. DOI: 10.1038/oby.2007.608.

- Cai, G.; Kastelein, R. A.; Hunter, C. A. (1999): IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN-gamma when combined with IL-18. In: *European journal of immunology* 29 (9), S. 2658–2665. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4141(199909)29:09<2658::AID-IMMU2658>3.0.CO;2-G.
- Calle, Eugenia E.; Rodriguez, Carmen; Walker-Thurmond, Kimberly; Thun, Michael J. (2003): Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. In: *The New England journal of medicine* 348 (17), S. 1625–1638. DOI: 10.1056/NEJMoa021423.
- Caspar-Bauguil, S.; Cousin, B.; Galinier, A.; Segafredo, C.; Nibbelink, M.; André, M. et al. (2005): Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity. In: *FEBS letters* 579 (17), S. 3487–3492. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.05.031.
- Chang, Jung-Su; Chang, Chun-Chao; Chien, Eve; Lin, Sean S-H; Cheng-Shiuan, Tsai; Bai, Chyi-Huey; Chao, Kuo-Ching (2013): Association between interleukin 1 β and interleukin 10 concentrations: a cross-sectional study in young adolescents in Taiwan. In: *BMC pediatrics* 13, S. 123. DOI: 10.1186/1471-2431-13-123.
- Chen, J. (2011): Multiple signal pathways in obesity-associated cancer. In: *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 12 (12), S. 1063–1070. DOI: 10.1111/j.1467-789X.2011.00917.x.
- Clayton, Aled; Mitchell, J. Paul; Court, Jacquelyn; Linnane, Seamus; Mason, Malcolm D.; Tabi, Zsuzsanna (2008): Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180 (11), S. 7249–7258.
- Colbert, Lisa H.; Visser, Marjolein; Simonsick, Eleanor M.; Tracy, Russell P.; Newman, Anne B.; Kritchevsky, Stephen B. et al. (2004): Physical activity, exercise, and inflammatory markers in older adults: findings from the Health, Aging and Body Composition Study. In: *Journal of the American Geriatrics Society* 52 (7), S. 1098–1104. DOI: 10.1111/j.1532-5415.2004.52307.x.
- Colditz, G. A.; Willett, W. C.; Stampfer, M. J.; Manson, J. E.; Hennekens, C. H.; Arky, R. A.; Speizer, F. E. (1990): Weight as a risk factor for clinical diabetes in women. In: *American journal of epidemiology* 132 (3), S. 501–513.
- Colucci, Francesco; Caligiuri, Michael A.; Di Santo, James P. (2003): What does it take to make a natural killer? In: *Nature reviews. Immunology* 3 (5), S. 413–425. DOI: 10.1038/nri1088.
- Cooper, M. A.; Fehniger, T. A.; Turner, S. C.; Chen, K. S.; Ghaheri, B. A.; Ghayur, T. et al. (2001): Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. In: *Blood* 97 (10), S. 3146–3151.
- Coussens, Lisa M.; Werb, Zena (2002): Inflammation and cancer. In: *Nature* 420 (6917), S. 860–867. DOI: 10.1038/nature01322.
- Deutscher Ärzteverlag GmbH; Ärzteblatt, Redaktion Deutsches (2006): Onkologie: Wie chronische Entzündungen zu Krebserkrankungen führen. Online verfügbar unter <https://www.aerzteblatt.de/archiv/50481/Onkologie-Wie-chronische-Entzuendungen-zu-Krebserkrankungen-fuehren>, zuletzt geprüft am 03.08.2017.
- Deutsches Bundesamt für Statistik (2014): Staat & Gesellschaft - Todesursachen - Die 10 häufigsten Todesfälle durch Krebserkrankungen - Statistisches Bundesamt (Destatis). Internet. Online verfügbar unter

<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Krebserkrankungen.html>, zuletzt aktualisiert am 11.12.2014, zuletzt geprüft am 01.08.2017.

Deutsches Bundesamt für Statistik (2015): Staat & Gesellschaft - Todesursachen - Statistisches Bundesamt (Destatis). Online verfügbar unter <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>, zuletzt geprüft am 01.08.2017.

Dixit, Vishwa Deep (2008): Adipose-immune interactions during obesity and caloric restriction: reciprocal mechanisms regulating immunity and health span. In: *Journal of leukocyte biology* 84 (4), S. 882–892. DOI: 10.1189/jlb.0108028.

Dunn, Gavin P.; Old, Lloyd J.; Schreiber, Robert D. (2004): The three Es of cancer immunoediting. In: *Annual review of immunology* 22, S. 329–360. DOI: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803.

Ein Sozialbericht für die Bundesrepublik Deutschland (2008). Bonn (Datenreport, ; 2008).

EisingerM (2008): Microsoft Word - NVS_II_Abschlussbericht_Teil_1.doc. Online verfügbar unter https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Ernaehrung/NVS_Ergebnisbericht.pdf?__blob=publicationFile, zuletzt geprüft am 28.07.2017.

Elkabets, Moshe; Ribeiro, Vera S. G.; Dinarello, Charles A.; Ostrand-Rosenberg, Suzanne; Di Santo, James P.; Apte, Ron N.; Vosshenrich, Christian A. J. (2010): IL-1 β regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function. In: *European journal of immunology* 40 (12), S. 3347–3357. DOI: 10.1002/eji.201041037.

Ettarh, Remare; van de Vijver, Steven; Oti, Sam; Kyobutungi, Catherine (2013): Overweight, obesity, and perception of body image among slum residents in Nairobi, Kenya, 2008-2009. In: *Preventing chronic disease* 10, E212. DOI: 10.5888/pcd10.130198.

Fedirko, Veronika; Romieu, Isabelle; Aleksandrova, Krasimira; Pischon, Tobias; Trichopoulos, Dimitrios; Peeters, Petra H. et al. (2014): Pre-diagnostic anthropometry and survival after colorectal cancer diagnosis in Western European populations. In: *International journal of cancer* 135 (8), S. 1949–1960. DOI: 10.1002/ijc.28841.

Groh, V.; Rhinehart, R.; Randolph-Habecker, J.; Topp, M. S.; Riddell, S. R.; Spies, T. (2001): Costimulation of CD8 α beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. In: *Nature immunology* 2 (3), S. 255–260. DOI: 10.1038/85321.

Half, Elizabeth; Bercovich, Dani; Rozen, Paul (2009): Familial adenomatous polyposis. In: *Orphanet journal of rare diseases* 4, S. 22. DOI: 10.1186/1750-1172-4-22.

Hardin, Jeff; Bertoni, Gregory; Kleinsmith, Lewis (2015): Beckers Welt der Zelle. 8., aktualisierte Auflage. Hg. v. Wolf-Michael Weber. Hallbergmoos: Pearson (Always learning). Online verfügbar unter <http://www.myilibrary.com?id=820435>.

Hardwick, J. C.; Van Den Brink, G R; Offerhaus, G. J.; van Deventer, S. J.; Peppelenbosch, M. P. (2001): Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells. In: *Gastroenterology* 121 (1), S. 79–90.

Harris, Kevin C.; Benoit, Genevieve; Dionne, Janis; Feber, Janusz; Cloutier, Lyne; Zarnke, Kelly B. et al. (2016): Hypertension Canada's 2016 Canadian Hypertension Education Program Guidelines for Blood Pressure Measurement, Diagnosis, and Assessment of Risk of Pediatric Hypertension. In: *The Canadian journal of cardiology* 32 (5), S. 589–597. DOI: 10.1016/j.cjca.2016.02.075.

- Hart, D. J.; Spector, T. D. (1993): The relationship of obesity, fat distribution and osteoarthritis in women in the general population: the Chingford Study. In: *The Journal of rheumatology* 20 (2), S. 331–335.
- Harvey, Alison E.; Lashinger, Laura M.; Hursting, Stephen D. (2011): The growing challenge of obesity and cancer: an inflammatory issue. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1229, S. 45–52. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2011.06096.x.
- Hebert, J. R.; Barone, J.; Reddy, M. M.; Backlund, J. Y. (1990): Natural killer cell activity in a longitudinal dietary fat intervention trial. In: *Clinical immunology and immunopathology* 54 (1), S. 103–116.
- Henne-Bruns, Doris; Kremer, Bernd; Dürig, Michael; Barth, Harald (Hg.) (2008): Chirurgie. 311 Tabellen. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).
- Heus, Colin; Cakir, Hamit; Lak, Arjan; Doodeman, Hiëronymus J.; Houdijk, Alexander P.J. (2016): Visceral obesity, muscle mass and outcome in rectal cancer surgery after neo-adjuvant chemotherapy. In: *International Journal of Surgery* 29, S. 159–164. DOI: 10.1016/j.ijso.2016.03.066.
- Huang, L.; Li, C. (2000): Leptin: a multifunctional hormone. In: *Cell research* 10 (2), S. 81–92. DOI: 10.1038/sj.cr.7290038.
- Isasi, Carmen R.; Parrinello, Christina M.; Jung, Molly M.; Carnethon, Mercedes R.; Birnbaum-Weitzman, Orit; Espinoza, Rebeca A. et al. (2015): Psychosocial stress is associated with obesity and diet quality in Hispanic/Latino adults. In: *Annals of epidemiology* 25 (2), S. 84–89. DOI: 10.1016/j.annepidem.2014.11.002.
- Jahn, Janine; Spielau, Marco; Brandsch, Corinna; Stangl, Gabriele I.; Delank, Karl-Stefan; Bähr, Ina et al. (2015): Decreased NK cell functions in obesity can be reactivated by fat mass reduction. In: *Obesity (Silver Spring, Md.)* 23 (11), S. 2233–2241. DOI: 10.1002/oby.21229.
- Kärre, K.; Ljunggren, H. G.; Piontek, G.; Kiessling, R. (1986): Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. In: *Nature* 319 (6055), S. 675–678. DOI: 10.1038/319675a0.
- Kiessling, R.; Klein, E.; Wigzell, H. (1975): "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. In: *European journal of immunology* 5 (2), S. 112–117. DOI: 10.1002/eji.1830050208.
- Kim, Eun Ran; Chang, Dong Kyung (2014): Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the risk, pathogenesis, prevention and diagnosis. In: *World journal of gastroenterology* 20 (29), S. 9872–9881. DOI: 10.3748/wjg.v20.i29.9872.
- Kimura, Yusuke N.; Watari, Kosuke; Fotovati, Abbas; Hosoi, Fumihito; Yasumoto, Kosei; Izumi, Hiroto et al. (2007): Inflammatory stimuli from macrophages and cancer cells synergistically promote tumor growth and angiogenesis. In: *Cancer science* 98 (12), S. 2009–2018. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2007.00633.x.
- Kira Laura Piotrowitz (2016): Regulation des Lipidmetabolismus in Hepatozyten. Online verfügbar unter <http://hss.ulb.uni-bonn.de/2016/4458/4458a.pdf>, zuletzt geprüft am 12.09.2017.
- Kocarnik, Jonathan M.; Chan, Andrew T.; Slatery, Martha L.; Potter, John D.; Meyerhardt, Jeffrey; Phipps, Amanda et al. (2016): Relationship of pre-diagnostic body mass index with survival after

colorectal cancer: Stage-specific associations. In: *International journal of cancer*. DOI: 10.1002/ijc.30163.

Kuper, H.; Adami, H. O.; Trichopoulos, D. (2000): Infections as a major preventable cause of human cancer. In: *Journal of internal medicine* 248 (3), S. 171–183.

Kushlinskiĭ, N. E.; Nemtsova, M. V. (2014): Molecular biological characteristics of cancer. In: *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk* (1-2), S. 5–15.

Kwon, Hyung-Min; Park, Jong-Ho; Park, Jin Ho; Jeong, Han-Yeong; Lim, Jae-Sung; Jeong, Han-Gil et al. (2016): Visceral Fat Is an Independent Predictor of Cerebral Microbleeds in Neurologically Healthy People. In: *Cerebrovasc Dis* 42 (1-2), S. 90–96. DOI: 10.1159/000445300.

Laiyemo, A. O.; Doubeni, C.; Badurdeen, D. S.; Murphy, G.; Marcus, P. M.; Schoen, R. E. et al. (2012): Obesity, weight change, and risk of adenoma recurrence: a prospective trial. In: *Endoscopy* 44 (9), S. 813–818. DOI: 10.1055/s-0032-1309837.

Laiyemo, Adeyinka O. (2014): The risk of colonic adenomas and colonic cancer in obesity. In: *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 28 (4), S. 655–663. DOI: 10.1016/j.bpg.2014.07.007.

Lanier, L. L. (1998): NK cell receptors. In: *Annual review of immunology* 16, S. 359–393. DOI: 10.1146/annurev.immunol.16.1.359.

Lanier, L. L.; Le, A. M.; Civin, C. I.; Loken, M. R.; Phillips, J. H. (1986): The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 136 (12), S. 4480–4486.

Lanier, L. L.; Testi, R.; Bindl, J.; Phillips, J. H. (1989): Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. In: *The Journal of experimental medicine* 169 (6), S. 2233–2238.

Laue, Tobias; Wrann, Christiane D.; Hoffmann-Castendiek, Birgit; Pietsch, Daniel; Hübner, Lena; Kielstein, Heike (2015): Altered NK cell function in obese healthy humans. In: *BMC obesity* 2, S. 1. DOI: 10.1186/s40608-014-0033-1.

Lautenbach, Anne; Breitmeier, Dirk; Kuhlmann, Susanne; Nave, Heike (2011): Human obesity reduces the number of hepatic leptin receptor (ob-R) expressing NK cells. In: *Endocrine research* 36 (4), S. 158–166. DOI: 10.3109/07435800.2011.580442.

Lautenbach, Anne; Wrann, Christiane D.; Jacobs, Roland; Müller, Guenter; Brabant, Georg; Nave, Heike (2009): Altered phenotype of NK cells from obese rats can be normalized by transfer into lean animals. In: *Obesity (Silver Spring, Md.)* 17 (10), S. 1848–1855. DOI: 10.1038/oby.2009.140.

Laviola, Luigi; Natalicchio, Annalisa; Giorgino, Francesco (2007): The IGF-I signaling pathway. In: *Current pharmaceutical design* 13 (7), S. 663–669.

Leininger, Gina M. (2011): Lateral thinking about leptin: a review of leptin action via the lateral hypothalamus. In: *Physiology & behavior* 104 (4), S. 572–581. DOI: 10.1016/j.physbeh.2011.04.060.

Li, Wei; Richard, Denis (2017): Effects of Bariatric Surgery on Energy Homeostasis. In: *Canadian journal of diabetes* 41 (4), S. 426–431. DOI: 10.1016/j.jcjd.2017.05.002.

Lijinsky, W.; Saavedra, J. E.; Reuber, M. D. (1985): Organ-specific carcinogenesis in rats by methyl- and ethylazoxyalkanes. In: *Cancer research* 45 (1), S. 76–79.

Liu, C.; Yu, S.; Zinn, K.; Wang, J.; Zhang, L.; Jia, Y. et al. (2006): Murine Mammary Carcinoma Exosomes Promote Tumor Growth by Suppression of NK Cell Function. In: *The Journal of Immunology* 176 (3), S. 1375–1385. DOI: 10.4049/jimmunol.176.3.1375.

Liu, Z.; Uesaka, T.; Watanabe, H.; Kato, N. (2001): High fat diet enhances colonic cell proliferation and carcinogenesis in rats by elevating serum leptin. In: *International journal of oncology* 19 (5), S. 1009–1014.

Ljunggren, H. G.; Kärre, K. (1990): In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. In: *Immunology today* 11 (7), S. 237–244.

López-Botet, M.; Llano, M.; Navarro, F.; Bellón, T. (2000): NK cell recognition of non-classical HLA class I molecules. In: *Seminars in immunology* 12 (2), S. 109–119. DOI: 10.1006/smim.2000.0213.

Lu, Q. Y.; Hou, F. L.; Zhang, Z. C.; Tao, F. B. (2016): Relationship between chronic psychosocial stress and BMI among adolescents. In: *Zhonghua liu xing bing xue za zhi = Zhonghua liuxingbingxue zazhi* 37 (1), S. 40–44. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.01.008.

Lupat, Agong; Hengelbrock, Johannes; Luissin, Masliza; Fix, Mario; Bassa, Burc; Craemer, Eva Maria et al. (2016): Brunei epidemiological stroke study: patterns of hypertension and stroke risk. In: *Journal of hypertension*. DOI: 10.1097/HJH.0000000000000945.

Lynch, Lydia A.; O'Connell, Jean M.; Kwasnik, Anna K.; Cawood, Thomas J.; O'Farrelly, Cliona; O'Shea, Donal B. (2009): Are natural killer cells protecting the metabolically healthy obese patient? In: *Obesity (Silver Spring, Md.)* 17 (3), S. 601–605. DOI: 10.1038/oby.2008.565.

Macaulay, V. M. (1992): Insulin-like growth factors and cancer. Unter Mitarbeit von V. M. Macaulay. Nature Publishing Group. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1977607/>, zuletzt aktualisiert am 01.01.1992, zuletzt geprüft am 04.08.2017.

Maeda, H.; Akaike, T. (1998): Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. In: *Biochemistry. Biokhimiia* 63 (7), S. 854–865.

Marras, Francesco; Bozzano, Federica; Maria, Andrea de (2011): Involvement of activating NK cell receptors and their modulation in pathogen immunity. In: *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011, S. 152430. DOI: 10.1155/2011/152430.

Mensink, G.B.M.; Schienkiewitz, A.; Haftenberger, M.; Lampert, T.; Ziese, T.; Scheidt-Nave, C. (2013): Übergewicht und Adipositas in Deutschland. In: *Bundesgesundheitsbl.* 56 (5-6), S. 786–794. DOI: 10.1007/s00103-012-1656-3.

Mocellin, S.; Panelli, M.; Wang, E.; Rossi, C. R.; Pilati, P.; Nitti, D. et al. (2004): IL-10 stimulatory effects on human NK cells explored by gene profile analysis. In: *Genes and immunity* 5 (8), S. 621–630. DOI: 10.1038/sj.gene.6364135.

Moretta, A.; Biassoni, R.; Bottino, C.; Mingari, M. C.; Moretta, L. (2000): Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytolysis. In: *Immunology today* 21 (5), S. 228–234.

Moretta, A.; Bottino, C.; Vitale, M.; Pende, D.; Cantoni, C.; Mingari, M. C. et al. (2001): Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytolysis. In: *Annual review of immunology* 19, S. 197–223. DOI: 10.1146/annurev.immunol.19.1.197.

- MORRIS, E. C.; BENDLE, G. M.; STAUSS, H. J. (2003): Prospects for immunotherapy of malignant disease. In: *Clin Exp Immunol* 131 (1), S. 1–7. DOI: 10.1046/j.1365-2249.2003.02055.x.
- Müller, Ludmila; Kiessling, Rolf; Rees, Robert C.; Pawelec, Graham (2002): Escape mechanisms in tumor immunity: an update. In: *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer* 21 (4), S. 277–330.
- Nave, Heike; Mueller, Guenter; Siegmund, Britta; Jacobs, Roland; Stroh, Thorsten; Schueler, Ulrike 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. In: *Endocrinology* 149 (7), S. 3370–3378. DOI: 10.1210/en.2007-1516.
- Nieman, D. C.; Henson, D. A.; Gusewitch, G.; Warren, B. J.; Dotson, R. C.; Butterworth, D. E.; Nehlsen-Cannarella, S. L. (1993): Physical activity and immune function in elderly women. In: *Medicine and science in sports and exercise* 25 (7), S. 823–831.
- Pak, Kyoungjune; Lee, Seung Hun; Lee, Jeong Gyu; Seok, Ju Won; Kim, In Joo; Sun, Qinghua (2016): Comparison of Visceral Fat Measures with Cardiometabolic Risk Factors in Healthy Adults. In: *PLoS ONE* 11 (4), e0153031. DOI: 10.1371/journal.pone.0153031.
- Palmer, A. J.; Bulpitt, C. J.; Fletcher, A. E.; Beevers, D. G.; Coles, E. C.; Ledingham, J. G. et al. (1992): Relation between blood pressure and stroke mortality. In: *Hypertension* 20 (5), S. 601–605. DOI: 10.1161/01.HYP.20.5.601.
- Pantel, K.; Schlimok, G.; Kutter, D.; Schaller, G.; Genz, T.; Wiebecke, B. et al. (1991): Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells. In: *Cancer research* 51 (17), S. 4712–4715.
- Parker, E. D.; Folsom, A. R. (2003): Intentional weight loss and incidence of obesity-related cancers: the Iowa Women's Health Study. In: *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 27 (12), S. 1447–1452. DOI: 10.1038/sj.ijo.0802437.
- Peritt, D.; Robertson, S.; Gri, G.; Showe, L.; Aste-Amezaga, M.; Trinchieri, G. (1998): Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 161 (11), S. 5821–5824.
- Pfaffl, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In: *Nucleic acids research* 29 (9), e45.
- Powell, A.; Teichtahl, A. J.; Wluka, A. E.; Cicuttini, F. M. (2005): Obesity: a preventable risk factor for large joint osteoarthritis which may act through biomechanical factors. In: *British journal of sports medicine* 39 (1), S. 4–5. DOI: 10.1136/bjism.2004.011841.
- Qian, Cheng; Jiang, Xiaodong; An, Huazhang; Yu, Yizhi; Guo, Zhenhong; Liu, Shuxun et al. (2006): TLR agonists promote ERK-mediated preferential IL-10 production of regulatory dendritic cells (diffDCs), leading to NK-cell activation. In: *Blood* 108 (7), S. 2307–2315. DOI: 10.1182/blood-2006-03-005595.
- Rahim, Sheikh Showkat; Khan, Nooruddin; Boddupalli, Chandra Sekhar; Hasnain, Seyed E.; Mukhopadhyay, Sangita (2005): Interleukin-10 (IL-10) mediated suppression of IL-12 production in RAW 264.7 cells also involves c-rel transcription factor. In: *Immunology* 114 (3), S. 313–321. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2005.02107.x.

- Renehan, Andrew G.; Soerjomataram, Isabelle; Tyson, Margaret; Egger, Matthias; Zwahlen, Marcel; Coebergh, Jan Willem; Buchan, Iain (2010): Incident cancer burden attributable to excess body mass index in 30 European countries. In: *International journal of cancer* 126 (3), S. 692–702. DOI: 10.1002/ijc.24803.
- Renehan, Andrew G.; Tyson, Margaret; Egger, Matthias; Heller, Richard F.; Zwahlen, Marcel (2008): Body-mass index and incidence of cancer. A systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. In: *The Lancet* 371 (9612), S. 569–578. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60269-X.
- Robertson MJ, Ritz J. (1990): Biology and clinical relevance of human natural killer cells. In: *Blood*. Online verfügbar unter <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/76/12/2421.full.pdf>, zuletzt geprüft am 28.05.2017.
- Rosen, Evan D.; Spiegelman, Bruce M. (2006): Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. In: *Nature* 444 (7121), S. 847–853. DOI: 10.1038/nature05483.
- Sandhu, M. S. (2002): Insulin, Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I), IGF Binding Proteins, Their Biologic Interactions, and Colorectal Cancer. In: *CancerSpectrum Knowledge Environment* 94 (13), S. 972–980. DOI: 10.1093/jnci/94.13.972.
- Sarkar, Subhashis; Germeraad, Wilfred T. V.; Rouschop, Kasper M. A.; Steeghs, Elisabeth M. P.; van Gelder, Michel; Bos, Gerard M. J.; Wieten, Lotte (2013): Hypoxia induced impairment of NK cell cytotoxicity against multiple myeloma can be overcome by IL-2 activation of the NK cells. In: *PLoS one* 8 (5), e64835. DOI: 10.1371/journal.pone.0064835.
- Saulquin, Xavier; Gastinel, Louis N.; Vivier, Eric (2003): Crystal structure of the human natural killer cell activating receptor KIR2DS2 (CD158j). In: *The Journal of experimental medicine* 197 (7), S. 933–938. DOI: 10.1084/jem.20021624.
- Schienkiewitz, Anja; Schulze, Matthias B.; Hoffmann, Kurt; Kroke, Anja; Boeing, Heiner (2006): Body mass index history and risk of type 2 diabetes: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. In: *The American journal of clinical nutrition* 84 (2), S. 427–433.
- Schütt, Christine; Bröker, Barbara (2011): *Grundwissen Immunologie*. 3. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10454859>.
- Shah, P.; Vella, A.; Basu, A.; Basu, R.; Adkins, A.; Schwenk, W. F. et al. (2002): Effects of Free Fatty Acids and Glycerol on Splanchnic Glucose Metabolism and Insulin Extraction in Nondiabetic Humans. In: *Diabetes* 51 (2), S. 301–310. DOI: 10.2337/diabetes.51.2.301.
- Shouval, Dror S.; Ouahed, Jodie; Biswas, Amlan; Goettel, Jeremy A.; Horwitz, Bruce H.; Klein, Christoph et al. (2014): Interleukin 10 receptor signaling: master regulator of intestinal mucosal homeostasis in mice and humans. In: *Advances in immunology* 122, S. 177–210. DOI: 10.1016/B978-0-12-800267-4.00005-5.
- Simon, Gregory E.; Arterburn, David; Rohde, Paul; Ludman, Evette J.; Linde, Jennifer A.; Operskalski, Belinda H.; Jeffery, Robert W. (2011): Obesity, depression, and health services costs among middle-aged women. In: *Journal of general internal medicine* 26 (11), S. 1284–1290. DOI: 10.1007/s11606-011-1774-x.

- Spielmann, J.; Hanke, J.; Knauf, D.; Ben-Eliyahu, S.; Jacobs, R.; Stangl, G. I. et al. (2017): Significantly enhanced lung metastasis and reduced organ NK cell functions in diet-induced obese rats. In: *BMC obesity* 4, S. 24. DOI: 10.1186/s40608-017-0161-5.
- Sundborn, Gerhard; Metcalf, Patricia A.; Gentles, Dudley; Scragg, Robert; Dyall, Lorna; Black, Peter; Jackson, Rod (2010): Overweight and obesity prevalence among adult Pacific peoples and Europeans in the Diabetes Heart and Health Study (DHAHS) 2002-2003, Auckland New Zealand. In: *The New Zealand medical journal* 123 (1311), S. 30–42.
- Takahashi, Yoshihisa; Soejima, Yurie; Fukusato, Toshio (2012): Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. In: *World journal of gastroenterology* 18 (19), S. 2300–2308. DOI: 10.3748/wjg.v18.i19.2300.
- The SuRF report 2. Surveillance of chronic disease risk factors : country-level data and comparable estimates (2005). Geneva: WHO.
- Tian, Zhigang; Sun, Rui; Wei, Haiming; Gao, Bin (2002): Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation. In: *Biochemical and biophysical research communications* 298 (3), S. 297–302.
- Trapani, Joseph A.; Smyth, Mark J. (2002): Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. In: *Nature reviews. Immunology* 2 (10), S. 735–747. DOI: 10.1038/nri911.
- Vivier, Eric; Raulet, David H.; Moretta, Alessandro; Caligiuri, Michael A.; Zitvogel, Laurence; Lanier, Lewis L. et al. (2011): Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 331 (6013), S. 44–49. DOI: 10.1126/science.1198687.
- Wang, Zhenjie; Uchida, Kazuhiro; Ohnaka, Keizo; Morita, Makiko; Toyomura, Kengo; Kono, Suminori et al. (2014): Sugars, sucrose and colorectal cancer risk: the Fukuoka colorectal cancer study. In: *Scandinavian journal of gastroenterology* 49 (5), S. 581–588. DOI: 10.3109/00365521.2013.822091.
- WHO (2014): Overweight and obesity. Online verfügbar unter http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_text/en/.
- Wing, E. J.; Stanko, R. T.; Winkelstein, A.; Adibi, S. A. (1983): Fasting-enhanced immune effector mechanisms in obese subjects. In: *The American journal of medicine* 75 (1), S. 91–96.
- World Cancer Research Fund International; American Institute for Cancer Research (2007): Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer. A global perspective. 1. publ. Washington, DC: AICR.
- Wrann, Christiane D.; Laue, Tobias; Hübner, Lena; Kuhlmann, Susanne; Jacobs, Roland; Goudeva, Lilia; Nave, Heike (2012): Short-term and long-term leptin exposure differentially affect human natural killer cell immune functions. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 302 (1), E108-16. DOI: 10.1152/ajpendo.00057.2011.
- Yoon, Kyung-Won; Park, Seon-Young; Kim, Ji-Young; Lee, Su-Mi; Park, Chang-Hwan; Cho, Sung-Bum et al. (2014): Leptin-induced adhesion and invasion in colorectal cancer cell lines. In: *Oncology reports* 31 (6), S. 2493–2498. DOI: 10.3892/or.2014.3128.
- Zhang, Faming; Chen, Yanyun; Heiman, Mark; Dimarchi, Richard (2005): Leptin: structure, function and biology. In: *Vitamins and hormones* 71, S. 345–372. DOI: 10.1016/S0083-6729(05)71012-8.

Zhao, Yueran; Sun, Rui; You, Li; Gao, Chunyi; Tian, Zhigang (2003): Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. In: *Biochemical and biophysical research communications* 300 (2), S. 247–252.

7. Thesen

1. Adipöse Menschen haben ein erhöhtes Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken.
2. Durch Adipositas werden Natürliche Killerzellen in Ihrer Funktionalität gestört.
3. Natürliche Killerzellen spielen physiologisch eine entscheidende Rolle in der Abwehr maligne entarteter Zellen.
4. Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, inwiefern die gestörte NK-Zell-Funktionalität bei Diät-induziert adipösen Ratten die Entstehung kolorektaler Karzinome beeinflusst
5. Das Körpergewicht und die viszerale Fettmasse sind bei adipösen Ratten im Vergleich zu normalgewichtigen Kontrolltieren erhöht.
6. Adipöse Ratten weisen eine höhere Anzahl, Größe und einen höheren Anteil maligner kolorektaler Neoplasien auf als normalgewichtige Tiere.
7. Körpergewicht, die Plasma- und die Serumkonzentrationen verschiedener Adipositas-assoziiierter Metabolite unterscheiden sich zwischen normalgewichtigen und adipösen Ratten deutlich.
8. Die Anzahl der NK-Zellen im Milzgewebe adipöser Versuchstiere ist signifikant niedriger als bei normalgewichtigen Ratten.
9. Die mRNA-Expression aktivierender NK-Zell-Rezeptoren im Milzgewebe ist bei adipösen Ratten signifikant niedriger als bei normalgewichtigen Ratten.
10. Die erhobenen Daten dieser Studie stellen eine wichtige Grundlage für weiterführende Analysen der gestörten Tumorabwehr durch NK-Zellen bei Adipositas dar.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Doberstein, Henriette
 Geburtsdatum- / Ort: 19.12.1990 in Radebeul
 Familienstand: ledig
 Nationalität: deutsch

Schulische Ausbildung

1997 - 2001 Besuch der Grundschule West (Coswig)
 2001 - 2009 Besuch des Gymnasiums Coswig

Hochschul-Ausbildung

10/2010 - 06/2017 Studium der Humanmedizin an der
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Praktisches Jahr

05/2016 – 08/2016 Universitätsklinikum Halle (Saale),
 Klinik für Inneren Medizin I (Gastroenterologie und Pneumologie)
 08/2016 – 12/2016 Städtischen Krankenhaus Dresden-Friedrichstadt ,
 Klinik für HNO-Heilkunde und Kopf-Hals Chirurgie
 12/2016 – 04/2017 Städtischen Klinikum Görlitz,
 Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie

Beruflicher Werdegang

10/2017 – 11/2019 Assistenzärztin im Carl-Thiem-Klinikum Cottbus,
 Klinik für HNO-Krankheiten, Kopf- und Halschirurgie
 Seit 11/2019 Assistenzärztin im Städtischen Klinikum Dresden Friedrichstadt
 Klinik für HNO-Krankheiten, Kopf- und Halschirurgie

Selbstständigkeitserklärung

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende und zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Charakterisierung von Adipositas-assoziierten Veränderungen der NK-Zell-Funktion beim kolorektalen Karzinom“ im Institut für Anatomie und Zellbiologie unter Betreuung von Frau Prof. Dr. Heike Kielstein selbstständig angefertigt und keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel oder Quellen benutzt habe. Die Arbeit ist bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule in dieser oder ähnlicher Form zur Promotion eingereicht worden. Des Weiteren versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Halle(Saale),

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre hiermit, dass ich keine früheren Promotionsversuche unternommen habe. Des Weiteren versichere ich, dass aktuell kein weiterer Promotionsversuch an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung stattfindet.

Halle(Saale),

Danksagung

Allen Personen die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben, möchte ich an dieser Stelle sehr herzlich danken.

Allen voran möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Heike Kielstein für die Überlassung des Themas der vorliegenden Dissertation bedanken. Ihre herzliche Art, die außerordentlich gute Kommunikation und Motivation werden mir stets zum Vorbild sein.

Ein ganz besonderer Dank gilt der hervorragenden Betreuung durch Frau Dr. Ina Bähr. Ohne Ihre Hingabe, Motivation und Beratung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Auch möchte ich mich ganz herzlich für die intensive Unterstützung durch die medizintechnische Assistentin Frau Franziska Knöfel und ihren Kollegen bedanken, die mich überaus engagiert in die Laborarbeiten einarbeiteten und mir helfend zur Seite standen.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Vincent Goritz für die hervorragende Zusammenarbeit bei der Betreuung der Versuchstiere und der Durchführung aller zu dieser Arbeit gehörenden Experimente.

Abschließend danke ich meiner Familie und allen Freunden, die mir stets aufmunternd und verständnisvoll zur Seite standen und mich in allen Lebenslagen unterstützen.