

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Molekularbiologische Untersuchung regulatorischer Proteine des
Zytoskeletts von Natürlichen Killerzellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.) für das Fachgebiet Humanmedizin

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Jana Oswald

geboren am: 13.09.1985 in Halle (Saale)

Betreuerin: Prof. Dr. med. Heike Kielstein

Gutachter:

1. Prof. Dr. M. Hatzfeld

2. Prof. Dr. H. Kielstein

3. Prof. Dr. V. Spindler, Basel

06.10.2020

09.04.2021

Referat

Fettleibigkeit ist eine Krankheit, die durch übermäßiges Körperfett gekennzeichnet ist und ein ernstes Problem der Weltgesundheit darstellt. Es betrifft alle Altersgruppen und sozioökonomischen Bevölkerungsschichten. Als Folge der Fettleibigkeit kommt es zu einer Hyperleptinämie, welche mit Immunschwäche und einem erhöhten Risiko für die Entstehung verschiedener Arten von Krebs verbunden ist. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) als Teil des angeborenen Immunsystems stellen eine erste Abwehr gegen virusinfizierte Zellen und Tumorzellen dar. Nach der Erkennung der veränderten Zellen haben NK-Zellen die Möglichkeit, diese durch Ausschüttung von Zytokinen zu lysieren. Zusätzlich haben sie die Fähigkeit, das erworbene Immunsystem zu aktivieren. Unter den Leukozyten zählen die NK-Zellen zu den aktivsten wandernden Zellen. Hierfür ist ein schneller Auf- und Abbau von Aktin notwendig. Diese Umlagerung wird durch verschiedene Proteine gewährleistet. GTPasen wie RhoA und die dazu gehörige RhoA-assoziierte Kinase (ROCK) transportieren extrazelluläre Signale in das Zellinnere und erreichen damit unter anderem Cofilin-1 (CFL-1). CFL-1 spielt eine wesentliche Rolle bei der Depolymerisierung von Aktinmolekülen und unterstützt dabei den schnellen Umsatz von Aktin. CFL-1 kann in zwei Zuständen vorliegen. Als phosphorylierte Form liegt es als inaktives Protein vor. Slingshot-Phosphatasen (SSH) dephosphorylieren CFL-1 und wandeln es in die aktive Form um. In der vorliegenden Arbeit wurden humane NK-92-Zellen untersucht, um den *In-vitro*-Effekt von Leptin auf den Aktivitätszustand von RhoA-GTPasen, den Phosphorylierungszustand von CFL-1 und die Auswirkung auf Slingshot-Phosphatasen zu untersuchen. Weitere Schwerpunkte der Arbeit stellten die Untersuchung von morphologischen Veränderungen in NK-Zellen und des Einflusses von Leptin auf die Kolokalisation von CFL-1 und F-Aktin dar. Hierfür wurden NK-92-Zellen mit verschiedenen Leptinkonzentrationen für unterschiedliche Zeitspannen stimuliert. Proteinanalysen im Western Blot und Untersuchungen der Morphologie am Konfokalmikroskop gaben Aufschluss über den Einfluss von Leptin auf NK-92-Zellen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Kolokalisation von CFL-1 und F-Aktin sowie Änderungen in der Länge der Filopodien durch Leptin beeinflusst werden können. Es konnten keine Auswirkungen von Leptin auf die intrazellulären Proteine beobachtet werden.

Oswald, Jana: Molekularbiologische Untersuchung regulatorischer Proteine des Zytoskeletts von Natürlichen Killerzellen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss. 63 Seiten, 2020

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. Einleitung.....	1
1.1 Adipositas	1
1.2 Leptin.....	3
1.3 Natürliche Killerzellen.....	3
1.4. Migration	5
1.4.1 RhoA.....	6
1.4.2 Cofilin-1 (CFL-1).....	7
1.4.3 Slingshot-Phosphatase-1 (SSH-1).....	8
1.5 Zielsetzung.....	10
2. Methoden	11
2.1 Zellkultur NK-92-Zellen	11
2.2 Buffy-Coats und Blutspender*innen	11
2.2.1 Isolation der mononukleären Zellen.....	12
2.2.2 NK-Zell-Isolation durch magnetische Zellseparation	12
2.3 Inkubation der NK-92-Zellen mit Leptin	13
2.3.1 Inkubation für Western Blot	13
2.3.2 Inkubation für Immunhistochemie.....	13
2.4 Proteinbestimmung aus NK-92-Zellen und primären NK-Zellen.....	13
2.4.1 Isolation der Proteine.....	14
2.4.2 Proteinmessung.....	14
2.5. Gewinnung aktiver RhoA (GTP-RhoA).....	14
2.6 Western Blot aus NK-92-Zellen und primären NK-Zellen	15
2.6.1 SDS-Polyacrylamidgel.....	15
2.6.2 Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran.....	16
2.6.3 Ponceau-S-Färbung	17
2.6.4 Antikörperdetektion.....	18
2.6.5 Detektion mittels lichtemittierender Reaktion.....	20
2.7. Immunfluoreszenzfärbung in NK-92-Zellen	20
2.8. Konfokale Mikroskopie	21
2.8.1 Grundlagen der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie.....	21
2.8.2 Aufnahmen am Konfokalmikroskop	22
2.9. Statistische Auswertung	23
2.9.1 Western-Blot-Ergebnisse.....	23
2.9.2 Blutspender*innen (Buffy-Coats)	23
2.9.3 Immunhistochemische Ergebnisse	23

3. Material	24
3.1. Chemikalien und Reagenzien.....	24
3.2. Geräte und Zubehör	25
3.3. Verwendete Kits	25
3.4. Verwendete Software	25
4. Ergebnisse.....	26
4.1 Western Blot aus NK-92-Zellen	26
4.1.1 GTP-RhoA	26
4.1.2 Cofilin-1, pCofilin-1, pCofilin-1/Cofilin-1	28
4.1.3 Slingshot-Phosphatase-1 (SSH-1).....	30
4.2 Western Blot aus primären NK-Zellen.....	31
4.2.1 Blutspender*innen	31
4.2.2 GTP-RhoA	33
4.2.3 Cofilin-1, pCofilin-1, pCofilin-1/Cofilin-1	36
4.3 Immunfluoreszenzfärbung in NK-92-Zellen	38
4.3.1 Filopodienlänge	38
4.3.2 Zellumfang	40
4.3.3 Kolokalisation F-Aktin und Cofilin-1	41
5. Diskussion.....	44
6. Zusammenfassung	53
7. Literaturverzeichnis.....	55
8. Thesen	63
9. Abbildungsverzeichnis.....	IV
10. Tabellenverzeichnis.....	V
Selbständigkeitserklärung	VI
Erklärung über frühere Promotionsversuche	VII
Danksagung	VIII

Abkürzungsverzeichnis

ADF	Aktin-Depolymerisierungsfaktor
BMI	Body-Mass-Index
CFL-1	Cofilin-1
pCFL-1	phosphoryliertes Cofilin-1
GST	Glutathione-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HLA	Human Leukocyte Antigen
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ECM	Extrazelluläre Matrix
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KIR	Killer-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
MHC	Major Histocompatibility Complex
MICA/MICB	MHC class I Polypeptide-related Sequence A/B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Ob-R	Obesity receptor (Leptinrezeptor)
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
RhoA	Ras-Homologenfamilie A
ROCK	Rho-assoziierte Proteinkinase
ROI	Region of Interest
SSH	Slingshot-Phosphatase
SEM	Standard Error of the Mean
Ser3	Serinrest 3
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline und Tween
TNF	Tumornekrosefaktor
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

1.1 Adipositas

Die World Health Organization (WHO) definiert Adipositas als eine über das normale Maß hinausgehende Ansammlung von Fett und ein starkes Übergewicht mit einem Body-Mass-Index (BMI) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$. Dabei klassifiziert sie drei Schweregrade einer Adipositas. Mit einem BMI von $30\text{--}35 \text{ kg/m}^2$ spricht man von einem Grad I. Der Grad II einer Adipositas definiert sich durch einen BMI von $35\text{--}40 \text{ kg/m}^2$. Von einer Adipositas per magna, also einem Grad III, spricht man bei einem BMI von $> 40 \text{ kg/m}^2$ (World Health Organization, 2000). Fettleibigkeit stellt weltweit ein sozioökonomisches Problem dar (Abarca-Gómez *et al.*, 2017). So berichtet die WHO, dass im Jahr 2016 weltweit 1,9 Milliarden Erwachsene (39% der Weltbevölkerung) übergewichtig waren, von denen 650 Millionen (13%) bereits eine Adipositas hatten. Zusätzlich waren 340 Millionen Kinder und Jugendliche bereits übergewichtig oder adipös (World Health Organization, 2018). Adipositas ist vergesellschaftet mit einem erhöhten Risiko für ein metabolisches Syndrom (Weiss *et al.*, 2004), kardiovaskuläre Erkrankungen (Kivimäki *et al.*, 2017), Diabetes mellitus Typ 2 (Abdullah *et al.*, 2010), sowie einem gesteigerten Risiko für verschiedene Krebserkrankungen wie das Leberzellkarzinom, Kolorektales Karzinom, Pankreaskarzinom und Nierenzellkarzinom (Calle *et al.*, 2003). Fettgewebe und die damit verbundene Masse an Adipozyten spielt nicht nur eine wichtige Rolle als Energiespeicher, sondern moduliert auch Immunzellen durch die Freisetzung von Adipokinen wie Leptin, Resistin und Adiponektin sowie von Zytokinen wie Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Tilg und Moschen, 2006). So konnten Studien zeigen, dass das veränderte metabolische Milieu bei adipösen Menschen einen Einfluss auf das Immunsystem hat (Andersen *et al.*, 2016). Einige Untersuchungen konnten bereits Funktionseinschränkungen von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) unter erhöhten Konzentrationen von Leptin nachweisen (Nave *et al.*, 2008; Lamas *et al.*, 2013; Laue *et al.*, 2015)

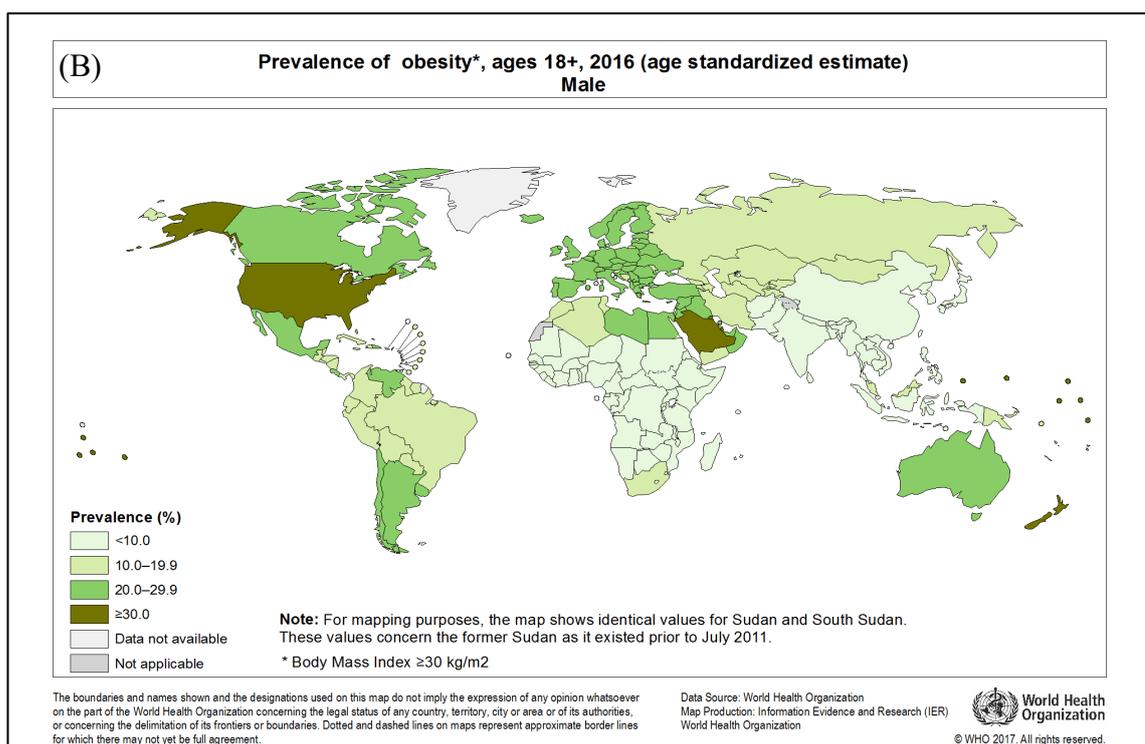
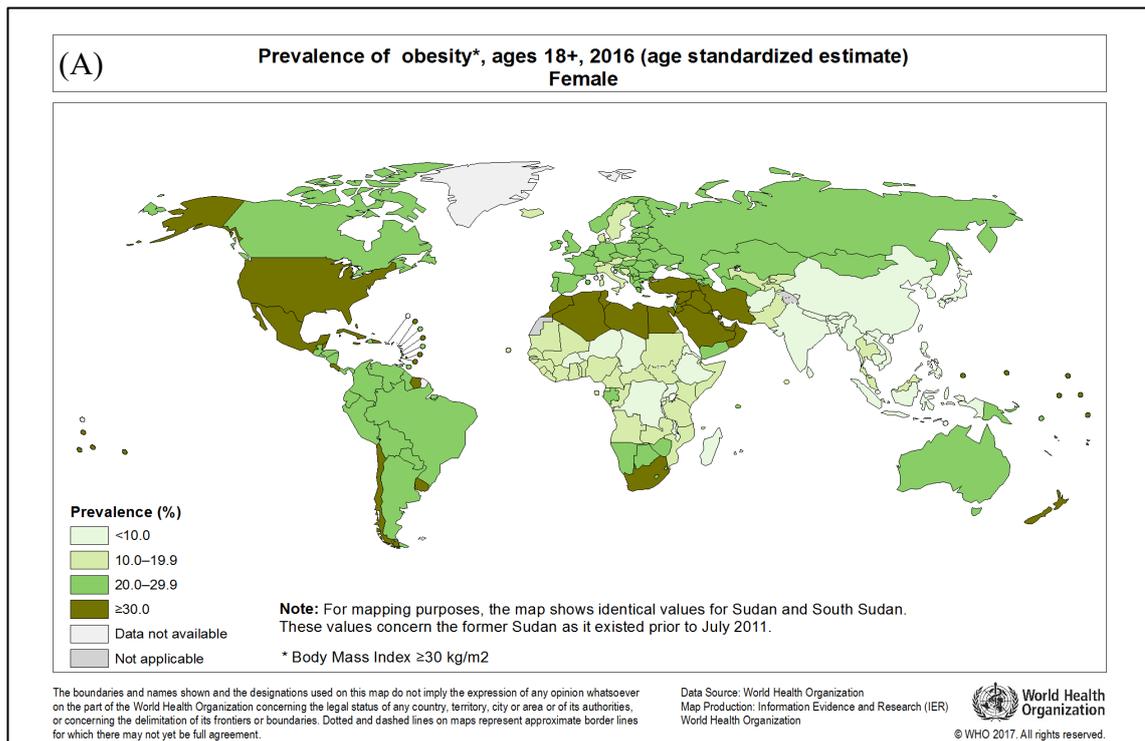


Abbildung 1: Weltweite Häufigkeit von Adipositas

Nach Alter standardisierte Schätzung für (A) Frauen und (B) Männer. WHO, 2017

1.2 Leptin

Leptin, ist ein 16 kDa großes unglykosyliertes Protein, das hauptsächlich von Adipozyten sezerniert wird (Maffei *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1994). Strukturell ist Leptin ein Mitglied der helikalen Zytokinfamilie (Madej *et al.*, 1995). Der Leptinrezeptor Ob-R zählt zu der Klasse-I-Zytokinfamilie und exprimiert auf Grund von alternativem *Splicing* 6 Isoformen (ObRa-ObRf). Aufgrund ihrer strukturellen Unterschiede werden die Isoformen des Rezeptors in drei Klassen unterteilt: lange (ObRb), kurze (ObRa, ObRc, ObRd und ObRf) und sekretorische (ObRe) Isoformen. Eine lange, voll aktive Isoform von Ob-Rb wird hauptsächlich im Hypothalamus exprimiert, wo es an der Energiehomöostase und an der Regulierung der Aktivität der Sekretionsorgane beteiligt ist. Ob-Rb wird aber auch auf allen Arten von Immunzellen exprimiert, welche an der angeborenen und adaptiven Immunantwort beteiligt sind. Unter allen Leptinrezeptoren kann nur die lange Isoform das Aktivierungssignal vollständig in die Zellen übertragen. Dabei spielt der JAK/STAT Signalweg die Hauptrolle bei der Leptinsignalübertragung (Gorska *et al.*, 2010; Wauman *et al.*, 2017). Die Produktion sowie die Blutkonzentration von Leptin sind von der Fettgewebsmenge abhängig (Maffei *et al.*, 1995). Leptin gilt als interessantes Hormon, weil es nicht nur an der Energiehomöostase beteiligt ist (Park und Ahima, 2015), sondern auch, weil in den letzten Jahren deutlich wurde, dass es sowohl das adaptive als auch das angeborene Immunsystem moduliert (Martín-Romero *et al.*, 2000; Cava und Matarese, 2004; Fernández-Riejos *et al.*, 2010).

1.3 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) machen ca. 10–15% der Lymphozyten aus und sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Als große, granuläre Zellen zeichnen sie sich immunophänotypisch durch CD56 und CD16 positive und CD3 negative Oberflächenmarker aus (Morice, 2007). Anhand der Dichte an CD56 Oberflächenexpression kann man zwei Untergruppen von NK-Zellen unterscheiden. Zellen, welche eine hohe Dichte an CD56 Oberflächenmarkern aufweisen, werden als CD56^{bright} bezeichnet und NK-Zellen mit weniger CD56 Oberflächenmarkern werden mit CD56^{dim} angegeben. Sie unterscheiden sich in der Fähigkeit, mit Zytokinen gegen Tumorzellen vorzugehen (Caligiuri, 2008). NK-Zellen haben eine Vielzahl von inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren, welche MHC-Klasse-I-Moleküle, MHC-Klasse-I-ähnliche Moleküle und Moleküle, die nicht mit MHC verwandt sind, erkennen können (Parham, 2005). Zu den Rezeptoren gehören unter anderem die inhibitorischen Killer-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren (KIRs), die an klassische MHC-Klasse-Ia-Liganden (HLA-A, B und C) binden, und die inhibitorischen CD94-NKG2A-

heterodimeren Rezeptoren, welche die nichtklassische MHC-Klasse Ib binden (HLA-E) (Bryceson *et al.*, 2006). Gegenüber den inhibitorischen Rezeptoren stehen die aktivierenden, wie NKG2D (Bauer, 1999), Nektin- und Nektin-ähnliche Rezeptoren und NKp80 (Welte *et al.*, 2006). NKG2D ist einer der am besten untersuchten Rezeptoren von NK-Zellen. Er ist ein C-Typ-Lektin-ähnlicher Rezeptor, der auf der Oberfläche aller menschlichen NK-Zellen exprimiert wird und mindestens 6 Liganden erkennt, von denen jeder eine MHC-Klasse-I-Homologie aufweist. Drei von diesen sind die Transmembranproteine: MICA, MICB und ULBP4 (Bauer, 1999; Jan Chalupny *et al.*, 2003). Zu den Hauptaufgaben der NK-Zellen zählen Identifizierung und Eliminierung von infizierten und veränderten Zellen. Wenn Signale von aktivierenden Rezeptoren überwiegen, kommt es durch Exozytose von Granzymen und Perforin sowie über FAS-Ligand-assoziierte Signalwege zur Lyse von veränderten Zellen. Zusätzlich aktivieren NK-Zellen das adaptive Immunsystem, indem sie verschiedene Zytokine wie Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) sezernieren (Stewart *et al.*, 2006). Inhibitorische Signale, welche über den KIR mittels MHC-Klasse I vermittelt werden, verhindern das Abtöten körpereigener Zellen (Bauer, 1999; Lanier, 2001; Bryceson *et al.*, 2006). Weiterhin hat das Umgebungsmilieu aus Zytokinen einen Einfluss auf die Funktion von NK-Zellen (Caligiuri, 2008; Vivier *et al.*, 2008). Humane NK-Zellen exprimieren Leptinrezeptoren auf ihrer Oberfläche (Zhao *et al.*, 2003). Lamas *et al.* konnten zeigen, dass Leptin dosisabhängig die metabolische und zytologische Aktivität von NK-92-Zellen beeinflusst (Lamas *et al.*, 2013). Unter den Leukozyten zählen die NK-Zellen neben T-Zellen zu den aktivsten migrierenden Zellen (Lang *et al.*, 2003).

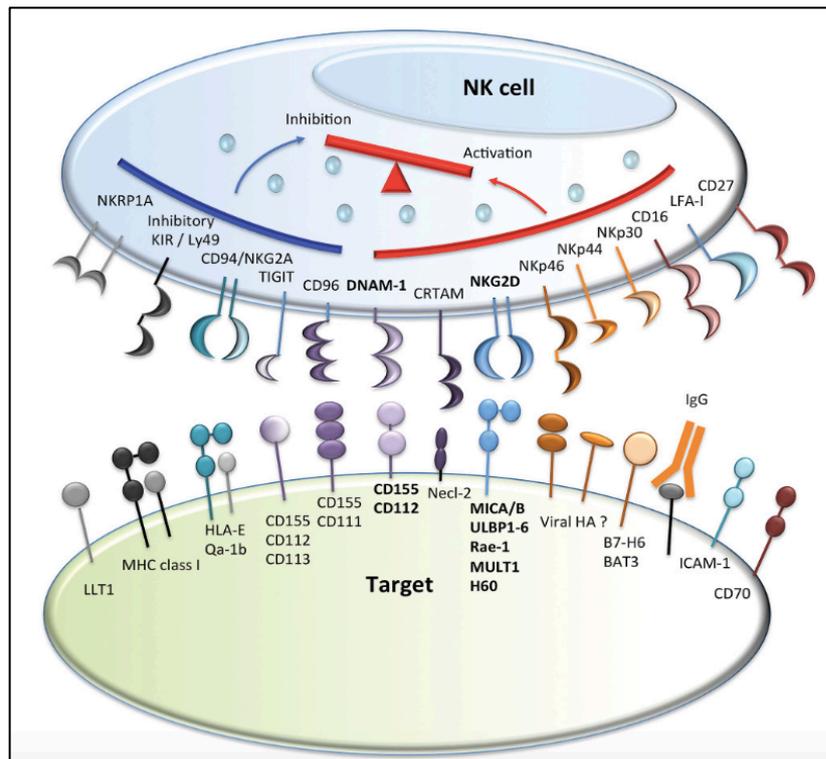


Abbildung 2: NK-Zellrezeptoren und ihre zugehörigen Liganden

Dargestellt sind wichtige inhibitorische und aktivierende Rezeptoren auf NK-Zellen (obere Zelle) und ihre verwandten Liganden auf Zielzellen (untere Zelle) (Chan *et al.*, 2014).

1.4. Migration

Migration (Zellbewegung) ist ein hochdynamischer Prozess, der für eine Vielzahl von biologischen Prozessen, wie Metastasierung und immunologische Antworten wichtig ist (Alberts, 2002). Die Zellbewegung beginnt mit der Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts und kann meist in drei Stufen unterteilt werden. Zunächst orientiert und reorganisiert die Zelle das Aktin-Netzwerk an ihrer Vorderkante. Im Anschluss haftet sie an der Vorderkante am Substrat. Schließlich ziehen kontraktile Kräfte die Zelle nach vorn. Protrusive Strukturen an der Vorderseite von beweglichen Zellen sind hochdynamisch und enthalten dichte Anordnungen von Aktinfilamenten. Die einfachsten Protrusionsstrukturen sind Filopodien, dünne Zylinder, die sich vom Hauptkortex um einige Mikrometer erstrecken können. Filopodien enthalten ein dichtes Bündel langer Aktinfilamente, die in Richtung des Vorsprungs ausgerichtet sind (Ananthakrishnan und Ehrlicher, 2007). Die Ausbildung von Filopodien und die Migration von Zellen basieren auf kontinuierlicher Polymerisation und Depolymerisation von Aktinfilamenten. An diesen dynamischen Prozessen sind viele verschiedene Proteine und deren Signalwege beteiligt (Bamburg, 1999). Dazu zählen RhoA als intrazelluläres Signalmolekül welches ROCK aktiviert, ADF/Cofilin als Depolymerisierungsfaktoren und LIM-Kinasen welche ADF/Cofilin über eine Phosphorylierung inhibieren können (Stossel *et al.*, 2006;

Hohmann und Dehghani, 2019). Verschiedene Chemokine beeinflussen die Fortbewegung von NK-Zellen in *In-vitro*-Experimenten (Robertson, 2002). Zusätzlich haben Adipozytokine, wie Leptin, Einfluss auf das Migrationsverhalten von Kolonkarzinomzellen, Glioblastomzellen, Leberzellkarzinomzellen und Endometriumkarzinomzellen (Lang und Ratke, 2009). Somit besteht ein Zusammenhang zwischen dem Umgebungsmilieu, intrazellulären Prozessen und der damit verbundenen Beeinflussung des Migrationsverhaltens.

1.4.1 RhoA

Eine große Rolle bei der Organisation von Aktin im Zytoskelett spielen die Mitglieder der Superfamilie von Ras-verwandten GTPasen. Zu dieser Familie zählen neben Ras, CDC42 unter anderem auch die G-Protein-Ras-Homolog-Genfamilien (Rho A–C) (Nobes und Hall, 1995). Über den Rho/Rho-assoziierten *Coiled-Coil-Forming*-Kinase-(ROCK)-Signalweg aktivieren sie weiter Proteine, die am Auf- und Abbau des Zytoskeletts beteiligt sind (Zeidan *et al.*, 2006). Dabei ist gezeigt worden, dass über den Rho/ROCK-Signalweg die LIM-Kinase-1 aktiviert wird (Ohashi *et al.*, 2000) und darüber Cofilin-1 phosphoryliert werden kann (Arber *et al.*, 1998). Interessanterweise wurde bereits in Studien gezeigt, dass Leptin den RhoA/ROCK-Signalweg induziert (Jaffe und Schwartz, 2008; Ghasemi *et al.*, 2017) und mittels LIM-Kinase-1 die Phosphorylierung von Cofilin beeinflusst (Li *et al.*, 2014).

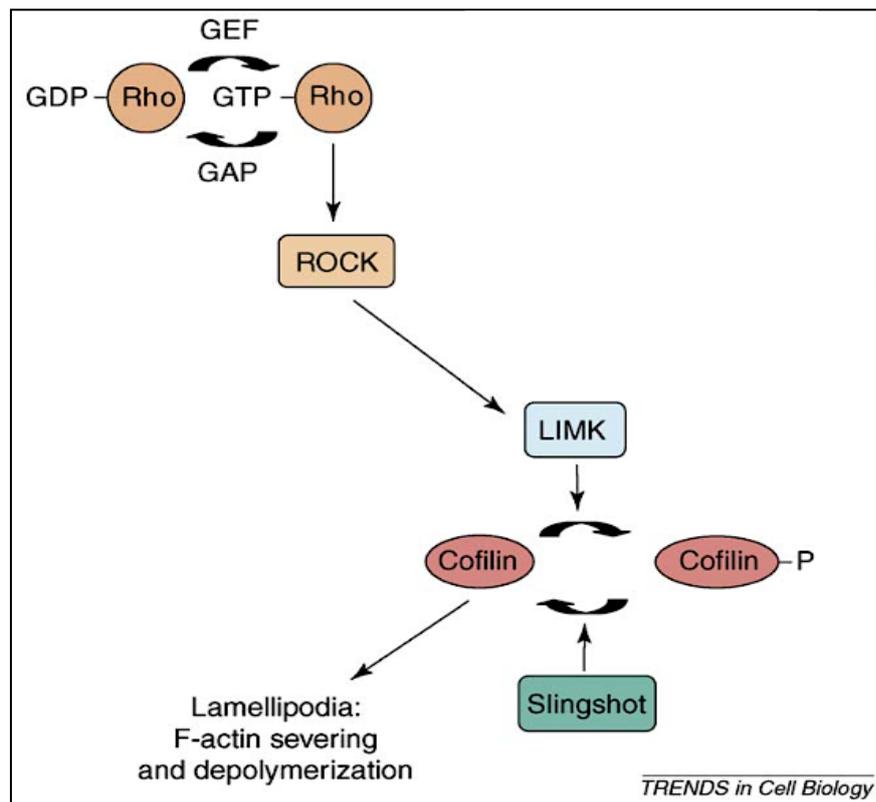


Abbildung 3: Regulation von Cofilin durch Rho-GTPasen

In ihrer aktiven, GTP-gebundenen Form aktivieren Rho-GTPase ROCK-Kinasen und diese wiederum LIMKs. Das hat zur Folge, dass Cofilin phosphoryliert und inaktiviert wird. Cofilin wird durch die Slingshot-Phosphatase (SSH) dephosphoryliert. Nicht-phosphoryliertes Cofilin fördert das Trennen und Depolymerisieren von filamentösem Aktin (F-Aktin) bei Lamellopodien (Ridley, 2006).

1.4.2 Cofilin-1 (CFL-1)

Für die hohe Dynamik beim Auf- und Abbau von Aktin sind Proteine der ADF-/Cofilin-Familie essentiell. Zu der Proteinfamilie zählen ADF, Cofilin-1 (nicht-muskuläres Cofilin, CFL-1) und Cofilin-2 (muskuläres Cofilin). Das 19kDa große Protein CFL-1, welches ubiquitär vorkommt, spielt eine wesentliche Rolle bei der Beschleunigung der Depolymerisation von Aktinfilamenten (Bamburg, 1999). Die Aktivität von CFL-1 ist reversibel durch Phosphorylierung und Desphosphorylierung an dem Serinrest 3 (Ser3) beeinflussbar, wobei das phosphorylierte Cofilin (pCFL-1) die inaktive Form darstellt und vor allem durch die LIM-Kinase reguliert wird (Vantroys *et al.*, 2008). In Abbildung 4 sind die möglichen Rollen von CFL-1 am Auf- und Abbau von Aktinfilamenten dargestellt. Neuere Erkenntnisse machen deutlich, dass die Stabilisierung oder Dephosphorylierung von F-Aktin abhängig, von der Konzentration, von dem umgebenen CFL-1 ist (Vantroys *et al.*, 2008).

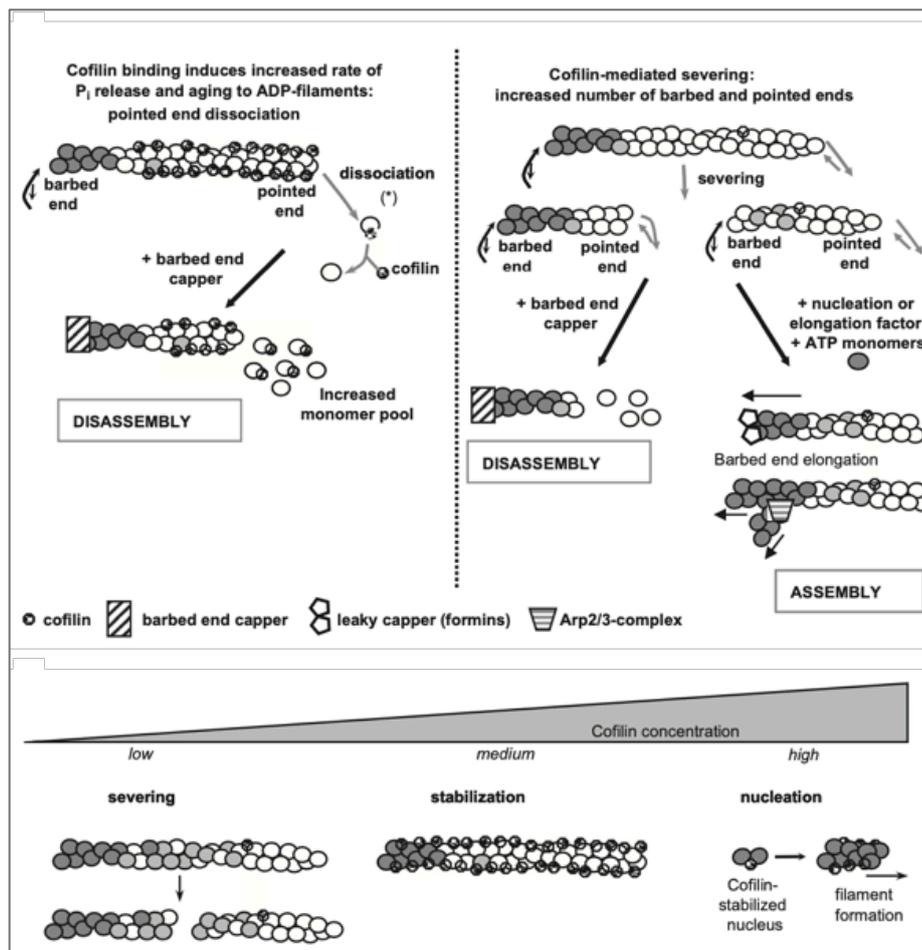


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Rolle von ADF/Cofilin

Schematische Darstellung der möglichen Rolle von ADF/Cofilin bei der Depolymerisation am spitzen Enden (links) und dem Durchtrennen (rechts) von Aktinfilamenten. Möglicherweise können ADF/Cofilin in dosisabhängiger Weise Aktinfilamente abtrennen, stabilisieren oder keimen (Andrianantoandro und Pollard, 2006; Vantroys *et al.*, 2008).

1.4.3 Slingshot-Phosphatase-1 (SSH-1)

Die Slingshot-Phosphatasen (SSH) gehören zu einer Familie von Phosphatasen, welche sowohl phosphoryliertes ADF als auch phosphoryliertes Cofilin dephosphorylieren. Sie wurden ursprünglich durch genetische Studien in *Drosophila melanogaster* als Cofilin-Phosphatasen identifiziert. Es gibt drei Mitglieder der humanen Familie: SSH-1, SSH-2 und SSH-3 (Huang *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wurde die Slingshot-Phosphatase-1 (SSH-1) untersucht. SSH-1 dephosphoryliert CFL-1 an seinem Serinrest3 (Ser3) und beeinflusst damit dessen Aktivität (Jung *et al.*, 2007). Über die Dephosphorylierung von CFL-1 kann die SSH-1 die Depolymerisierung des Aktins beeinflussen und so einen schnellen Auf- und Abbau von Aktin unterstützen (Niwa *et al.*, 2002). Durch eine Vielzahl an externen Stimuli, wie Neuregulin, Insulin und von Stromazellen-stammender-Faktor-1a, wird die SSH-1 aktiviert (Nagata-Ohashi *et al.*, 2004; Nishita *et al.*, 2002,2004). Zusätzlich zeigten molekularbiologische Analysen, dass die SSH-1 mindestens drei F-

Aktin-Bindungsstellen aufweist; eine Leu-His-Lys-Bindungsstelle in der N-terminalen Region, eine Leu-Lys-Arg-Bindungsstelle in der C-terminalen Region sowie eine Trp-458-Bindungsstelle in der Nähe des C-Terminus der Phosphatase-Domäne (Yamamoto *et al.*, 2006). Durch die Bindung an F-Aktin wird die Phosphatase-Aktivität gegenüber CFL-1 verstärkt. Interessanterweise konnten Kurita *et al.* in Studien aufzeigen, dass die Bindung von SSH-1 an F-Aktin die Aktin-Bindungs- und Trennaktivitäten von CFL-1 inhibieren kann (Kurita *et al.*, 2007).

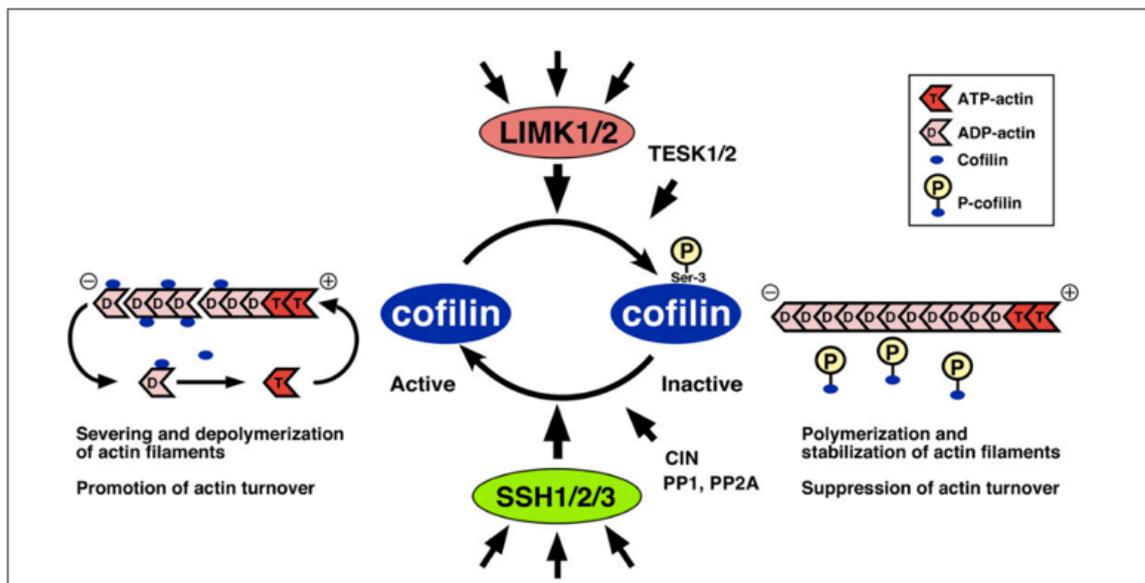


Abbildung 5: Aktinfilamentendynamik durch Phosphoregulierung von Cofilin

Cofilin wird durch Phosphorylierung an Ser 3 inaktiviert und durch SSHs reaktiviert. Die Cofilin-Phosphoregulierung ist einer der wichtigen Konvergenzpunkte von Signalnetzwerken, die extrazelluläre Signale mit der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts verbinden (Mizuno, 2013).

1.5 Zielsetzung

Im Hinblick auf die zunehmende Prävalenz von Adipositas und die damit einhergehenden Hyperleptinämie, die Dysfunktion des Immunsystems und ein gesteigertes Risiko für Krebsentstehung wurde der Einfluss von Leptin auf das Migrationsverhalten von NK-Zellen untersucht.

1. Ziel der vorliegenden Dissertation war es, den dosis- und zeitabhängigen Einfluss von Leptin auf das Migrationsverhalten von NK-Zellen und den daran beteiligten Proteinen zu analysieren. Dafür wurden folgende Fragestellungen untersucht.
2. Besteht ein konzentrations- oder zeitabhängiger Einfluss von Leptin auf die Aktivität der RhoA, Phosphorylierung von CFL-1 und Konzentrationsveränderungen der Slingshot-Phosphatase-1 (SSH-1) in NK-92-Zellen?
3. Hat der BMI einen Einfluss auf die Aktivität der RhoA und die Phosphorylierung von CFL-1 in primären NK-Zellen?
4. Welche Auswirkung hat Leptin auf morphologische Veränderungen in NK-92-Zellen?
5. Besteht ein Einfluss von Leptin auf die Kolokalisation von CFL-1 zu F-Aktin in NK-92-Zellen?

2. Methoden

2.1 Zellkultur NK-92-Zellen

Die Zelllinie NK-92 stammt von einem 50-jährigen Patienten, welcher an einem schnell voranschreitenden Non-Hodgkin-Lymphom erkrankte. NK-92-Zellen sind CD56, CD2 und CD7 positiv sowie CD3, CD16, CD10, CD19 und CD20 negativ (Gong *et al.*, 1994). Zusätzlich konnte auch gezeigt werden, dass NK-92-Zellen Leptinrezeptoren (Ob-R) exprimieren (Lamas *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2003). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin, 10 % FKS, 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin, 1 mM Natriumpyruvat und 200 U/ml humanem, rekombinantem Interleukin-2 (IL-2). Das Medium der Suspensionszellen wurde zwei- bis dreimal in der Woche gewechselt.

2.2 Buffy-Coats und Blutspender*innen

Bei Buffy-Coats handelt es sich um Abfallprodukte, welche bei der Blutspende entstehen. Die in der Dissertation verwendeten Buffy-Coats wurden freundlicherweise von der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Halle (Saale) zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung von Buffy-Coats wird das Blut nach der Blutentnahme zentrifugiert, so dass sich eine untere Schicht aus Erythrozyten und eine obere Schicht aus Plasma bildet. Die Schicht zwischen Erythrozyten und Plasma enthält zum größten Teil Leukozyten und Thrombozyten. Nach dem Entfernen der oberen Plasmaschicht und der unteren Schicht aus Erythrozyten bleibt die mittlere Schicht im Blutentnahmebeutel zurück. Diese bezeichnet man als Buffy-Coat. Sie enthält eine hohe Konzentration an Leukozyten aber auch noch Anteile von Plasma und Erythrozyten (Rosenstock, 2016). In dieser Arbeit wurden in Zusammenarbeit mit Phillip Rosenstock (Master-Student der Biochemie) Buffy-Coats von adipösen und normalgewichtigen Spendern*innen verwendet. Die Gruppe der adipösen Spender*innen wies einen mittleren BMI von 31 kg/m² auf; die Kontrollgruppe einen mittleren BMI von 22 kg/m². Um die Anonymität der Spender*innen zu gewährleisten, wurden uns lediglich Alter, Geschlecht, Größe und Gewicht mitgeteilt. Für die Proteinanalysen in dieser Dissertation wurden Zellsuspensionen verwendet, welche einen 80–90 %igen Anteil an primären NK-Zellen aufwiesen.

2.2.1 Isolation der mononukleären Zellen

Die Trennung der Blutzellen beruht auf dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation. Die unterschiedlichen Zellen des Blutes sammeln sich dabei entsprechend ihrem Gewicht in unterschiedlichen Schichten. Um diese Trennung zu gewährleisten, wurde der gesamte Inhalt des Buffy-Coats mit PBS im Verhältnis 1 : 5 verdünnt. Darauf folgend wurden 15 ml Biocoll, welches vorgelegt wurde, mit 25 ml des verdünnten Blutes vorsichtig aufgeschichtet. Anschließend erfolgte eine ungebremste Zentrifugation bei 1000g und 20 °C für 20 min. Nach der Zentrifugation erhält man drei Schichten. Die untere Biocoll-Schicht enthält Erythrozyten und Granulozyten. Die obere Schicht besteht aus Plasma und Thrombozyten. Die dritte Schicht, die Interphase, beinhaltet die mononukleären Zellen (engl. *Peripheral Blood Mononuclear Cells* = PBMC). Die PBMC wurden zweimal mit 50 ml PBS gewaschen und bei 400g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellen für die Zellzählung in 1 ml PBS resuspendiert (Rosenstock, 2016).

2.2.2 NK-Zell-Isolation durch magnetische Zellseparation

Die Isolierung von NK-Zellen aus den PBMC basierte auf einer negativen Selektionsmethode. Hierfür wurde das *NK Cell Isolation Kit* der Firma Miltenyi verwendet. Im ersten Schritt wurden die PBMC mit einem Biotin-konjugierten Antikörper inkubiert; dabei bindet der Antikörper an alle Zellen außer an den NK-Zellen. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen mit einem Anti-Biotin-Antikörpern inkubiert. Diese Antikörper sind mit superparamagnetischen Partikeln konjugiert. Die Trennung der magnetisch markierten Zellen von den nichtmarkierten Zellen erfolgt über eine Säule, welche in einem Magneten eingespannt ist. Hierbei werden die markierten Zellen in der Säule zurückgehalten, während die nichtmarkierten Zellen, die NK-Zellen, die Säule ungehindert passieren können. Im Anschluss wurden die NK-Zellen gezählt und für weitere Untersuchungen als Zellpellets in -80 °C gelagert. Die Isolation wurde entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt (Rosenstock, 2016).

2.3 Inkubation der NK-92-Zellen mit Leptin

Die Stimulation der NK-92-Zellen erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen. Eingesetzt wurden 10 ng/ml Leptin als physiologische Konzentration und 100 ng/ml als pathophysiologische Konzentration, welche bei adipösen Menschen erreicht werden kann (Lamas *et al.*, 2013; Ostlund *et al.*, 1996). Als Kurzzeitstimulationen wurden die Zeiten von 30 min, 1 h und 3 h gewählt. 24 h wurden gewählt, um Erkenntnisse mit Langzeitstimulation zu erlangen.

2.3.1 Inkubation für Western Blot

Für die Proteinuntersuchungen von CFL-1, pCFL-1, SSH und RhoA im Western Blot wurden jeweils 2×10^6 NK-92-Zellen pro Kontrolle und Stimulation in 5 ml RPMI 1640 Medium mit 10 % FKS und 200 U/ml humanem IL-2 kultiviert. Die Stimulation mit 10 ng/mL bzw. 100 ng/ml Leptin für 30 min, 1 h, 3 h und 24 h erfolgte direkt mit der Kultivierung. Die Kontrollgruppen erhielten nur das Tris-HCL, pH 8.0 (Lösungsmittel für Leptin). Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die NK-92-Zellen auf Eis gewonnen.

2.3.2 Inkubation für Immunhistochemie

Für die Untersuchung am Konfokalmikroskop wurden 5×10^5 NK-92-Zellen in 1 ml RPMI 1640 Medium mit 20 % FKS und 200 U/ml humanem IL-2 auf Deckgläschen mit 13 mm Durchmesser kultiviert. Die Deckgläschen wurden am Vortag mit 20 µg/ml humanem Fibronectin beschichtet. Um eine bessere Adhäsion der Zellen zu erreichen, wurden diese bei 1500 rpm und 20 °C für 1 min zentrifugiert. Die NK-92-Zellen erhielten 10 ng/ml sowie 100 ng/ml Leptin für 30 min bzw. 24 h.

2.4 Proteinbestimmung aus NK-92-Zellen und primären NK-Zellen

Nach Ablauf der Stimulationszeiten wurden die Zellen aus den Kulturflaschen in ein 50 ml-Falcon überführt und bei 1000 g und 20 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen mit 1 ml kaltem PBS (inklusive 143 µl Proteaseinhibitor und 100 µl Phosphataseinhibitor) resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde bei 13000 U/min und 4 °C für 5 min erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellpellets mit 1 ml eiskaltem Lysepuffer (RIPA Puffer + Phosphatase- und Proteaseinhibitor) resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

Tabelle 1: Zusammensetzung RIPA-Lysepuffer Stocklösung und Arbeitslösung

RIPA-Lysepuffer Stocklösung		RIPA-Lysepuffer Arbeitslösung	
10x PBS	10 ml	RIPA-Stocklösung	757 μ l
Nonidet	1 ml	Phosphataseinhibitor	100 μ l
SDS	100 μ l	Proteinaseinhibitor	143 μ l
Desoxycholsäure–Natriumsalz	500 mg		1 000 μ l
steriles Wasser	100 ml		

2.4.1 Isolation der Proteine

Für die Isolation der Proteine aus den NK-92-Zellen und primären NK-Zellen wurden diese im Lysepuffer auf Eis aufgetaut und mit fünf bis sechs 1,4mm großen Keramikkügelchen für 15 s bei 5 000 rpm im PreCellys®24 homogenisiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte eine Zentrifugation bei 13 000 U/min und 4 °C für 15 min. Der proteinreiche Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß übertragen.

2.4.2 Proteinmessung

Die Messung der Proteinkonzentration in NK-92-Zellen und primären NK-Zellen wurden mit dem *Micro BCA™ Protein Assay* vorgenommen und nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dafür wurden die Proteinkonzentrationen 1:50 und 1: 100 mit PBS verdünnt. Für die Analysen wurden 150 μ l Bradford Arbeitsreagenz mit 150 μ l Proteingemisch oder Standard gemischt. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C und in Dunkelheit wurde die Absorptionsrate bei 562 nm mit dem UV-Spektrometer bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Standardgerade mittels PrismGraph 6.0 analysiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass R^2 nah 1 und die Standardabweichung $Sy.x$ unter 0,05 lag.

2.5. Gewinnung aktiver RhoA (GTP-RhoA)

Für die Gewinnung der aktivierten RhoA (GTP-gebundene RhoA) wurde das *Active Rho Detection Kit* von Cell Signaling verwendet. Die Isolation der aktivierten Rho wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dabei wird das GTP-Rho-Protein in einem ersten Schritt an GST-Rhotekin-Fusionsprotein gebunden und im nächsten Schritt mit Glutathionharz immunopräzipitiert. Die so gewonnene GTP-gebundene Rho kann nun im Western Blot analysiert werden.

2.6 Western Blot aus NK-92-Zellen und primären NK-Zellen

Zur elektiven Quantifizierung der Proteine RhoA, pCFL-1, CFL-1 und SSH wurde der Western Blot angewendet. Das Prinzip beruht auf der Detektion von immobilisierten Proteinen durch spezifische Antikörper.

2.6.1 SDS-Polyacrylamidgel

Zur Analyse der Proteine RhoA, pCFL-1, CFL-1 und SSH wurde ein Tris-/Glycin-SDS-Polyacrylamidgel verwendet. Dafür wurde das Proteingemisch elektrophoretisch nach seinem Molekulgewicht aufgetrennt. Das verwendete Gel bestand aus einem Sammel- (4%) und einem Trenngel (12% auf 15%). Die Sammelgele und Trenngele (Gradientengele) wurden am Vortag vorbereitet und kühl über Nacht gelagert. Die Zusammensetzung des Sammelgels und des Gradientengels gestaltete sich, wie in der nachfolgenden Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Zusammensetzung Sammel- und Trenngele

Sammelgel	4 %	Trenngel	12 %	15 %
0,5 M Tris-HCL pH 6,8	1 ml	1,5 M Tris-HCL pH 8,8	1,9 ml	1,9 ml
destilliertes Wasser	6,88 ml	destilliertes Wasser	4,9 ml	4,13 ml
Acrylamid 40 %	1 ml	Acrylamid 40 %	3 ml	3,75 ml
SDS 10 %	100 µl	SDS 10 %	100 µl	100 µl
APS 10 % (60 mg/ml)	100 µl	APS 10 % (60 mg/ml)	100 µl	100 µl
TEMED	15 µl	TEMED	15 µl	15 µl

Tabelle 3: (Anhang zu Tabelle 2) Zusammensetzung Tris-Reagenzien

Tris-HCL pH 8,8	20 mM	1,5 M	Tris-HCL pH 6,8	0,5 M
Tris	242 mg	6 g	Tris	6 g
destilliertes Wasser	80 ml	100 ml	destilliertes Wasser	100 ml
HCL	auf pH 8,8 titrieren		HCL	auf pH 6,8 titrieren

Nach der Herstellung des 12%igen und 15%igen Gels wurden zuerst 4 ml vom 12%igen Gel und in die gleiche Pipette 4 ml vom 15%igen Gel mit einem Pipettus aufgezogen und dann in eine 10x10cm große Leerkassette (1,5mm Gel) überführt. Damit wurde gewährleistet, dass das höherprozentige Gel den unteren Abschnitt der Kammer einnimmt und das 12%ige Gel im oberen Teil zu finden war. Nach Gelierung der Trenngele wurde das 4%ige Sammelgel aufgetragen. Unter Vermeidung von Luftblasen

wurde zum Schluss der Probenkamm platziert. Am Folgetag wurden 20 µg der Probe aufgetragen. Dafür wurde das Volumen der Probe (entsprechend für 20 µg) abhängig von der Proteinkonzentration mit destilliertem Wasser auf 30 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 6 µl Laemmli-Ladungspuffer (5-fach konzentriert) hinzugegeben und für 10 min bei 70 °C denaturiert. Das in dem Ladepuffer enthaltene SDS band die Proteine zu negativen Komplexen, wodurch negativ geladene Proteinkomplexe entsprechend der Molekülgröße entstanden. Die Zusammensetzung des 5-fach konzentrierten Laemmli-Ladungspuffers ist in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Zusammensetzung 5-fach konzentriertem Laemmli-Ladepuffer

5X Laemmli-Ladepuffer	50 ml
Glycin	25 ml
1 M Tris-HCL pH 6,8	15,62 ml
β-Mercaptoethanol	5 ml
SDS	5 g
Bromphenolblau	2,5 g
destilliertes Wasser	9,38 ml

Nach dem Auftragen der Proben und des Proteinleiters wurde eine Spannung von 100V angelegt, solange sich die Proben im Sammelgel befanden. Sobald die Proben das Trenngel erreichten, wurde die Spannung auf 120V erhöht. Dabei wurde eine kontinuierliche Kühlung auf Eis gewährt, um einer Überwärmung der Gele vorzubeugen.

2.6.2 Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran

Die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden auf eine 0,2 µm Nitrozellulosemembran mittels *Semidry*-Blotverfahren übertragen. Um die Proteinbindungsstellen auf der Membran zu aktivieren, wurde dem Transferpuffer Methanol zugesetzt. Filterpapierabschnitte und Nitrozellulosemembranen wurden in Transferpuffer getränkt und anschließend auf den unteren Teil des Blotter (Anode) platziert. Der Deckel bildete die Kathode. Senkrecht zum Polyacrylamidgel wurde ein elektrisches Feld angelegt. Durch hydrophobe Wechselwirkungen erfolgte die Bindung der Proteine an die Membran. Der Transfer der Proteine von dem SDS-Gel zu der Nitrozellulosemembran erfolgte bei einer Stromstärke von 150 mA über 2 h.

Tabelle 5: Zusammensetzung 12,5-fach konzentriertem und 1-fach konzentriertem Transferpuffer

Transferpuffer pH 8,3	12,5X	Transferpuffer pH 8,3	1 X
Glycin	90 g	12,5X Transferpuffer	80 ml
Tris	18,2 g	Methanol	200 ml
destilliertes Wasser	1 000 ml	destilliertes Wasser	718 ml
		SDS 10 %	2 ml

2.6.3 Ponceau-S-Färbung

Nach 2h wurde die Blot-Kammer vorsichtig auseinandergebaut und die Membranen aufgenommen. Der vollständige Transfer auf die Nitrozellulosemembranen wurde mittels Ponceau-S-Lösung überprüft. Dafür wurden die Membranen für 1 min in der Ponceau-Lösung gefärbt und anschließend 3-mal mit Wasser gewaschen. Im Anschluss der Transferkontrolle konnte die Membran nach Molekulargewicht der Proteine geschnitten werden. In Abbildung 6 ist eine exemplarische Membran mit den Schnitthöhen dargestellt.

Tabelle 6: Zusammensetzung Ponceau-S-Lösung

Ponceau-S-Lösung	
Ponceau-S	2 g
Trichloracetatessigsäure	30 g
Sulfosalicylsäure	30 g
destilliertes Wasser	100 ml
Arbeitsverdünnung	1 : 10

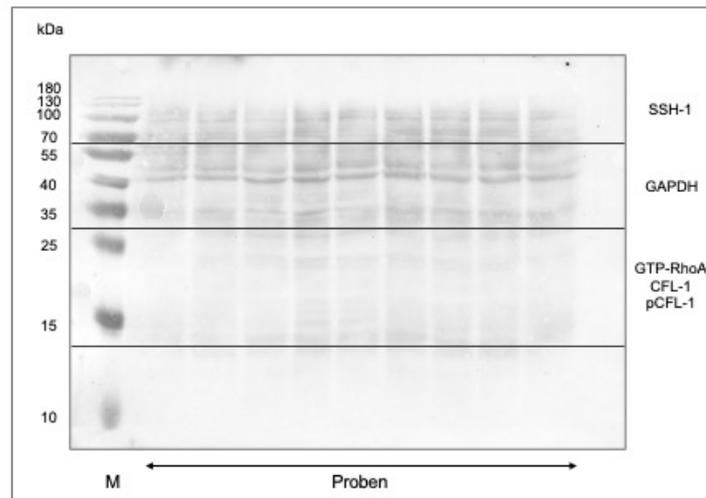


Abbildung 6: Ponceau-Bild einer 0,2 µm Nitrozellulosemembran mit Proteinen

Exemplarische Darstellung der Schnitthöhe für die einzelnen Proteine. SSH = Slingshot-Phosphatase, *Housekeeping*-Protein = GAPDH, CFL-1 = Cofilin-1, und p-CFL-1 = phosphoryliertes Cofilin-1, M = Proteinleiter.

2.6.4 Antikörperdetektion

Für die Primär- und Sekundärantikörper wurden verschiedene Verdünnungen etabliert, welche in der nachfolgenden Übersicht zusammengefasst sind. Nach dem Schneiden wurden die Membranen für CFL-1, pCFL-1, SSH und GTP-RhoA mit 5%iger Milch (Milchpulver gelöst in TBST) und die Membran für das *Housekeeping*-Protein GAPDH mit 3%iger Milch für 1 h bei 20 °C blockiert. Im Anschluss wurden die primären Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die verwendeten Konzentrationen sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Verwendete Antikörper für Western Blot Untersuchungen

Antigen	Isotyp	Hersteller	Verdünnung
Cofilin-1	mAb Rabbit IgG	Cell Signaling	1 : 3 000 (5%ige Milch)
p-Cofilin-1	mAb Rabbit IgG	Cell Signaling	1 : 5 000 (5%iges BSA)
GAPDH	mAb Rabbit IgG	Cell Signaling	1 : 10 000 (3%ige Milch)
RhoA	mAb Rabbit IgG	Cell Signaling	1 : 7 500 (5%iges BSA)
SSH	mAb Rabbit IgG	Cell Signaling	1 : 2 000 (5%ige Milch)
Goat-anti-Rabbit	mAb Goat IgG	Cell Signaling	1 : 1 2000 (5%ige Milch)

Am Folgetag wurden die Membranen in Tris-gepufferter Kochsalzlösung mit Tween 20 (TBST pH 7,4 und 0,1 % Tween 20) 3 x 5 min gewaschen und im Anschluss eine Stunde bei 20 °C mit dem Sekundärantikörper, welcher mit *Horse-Radish-Peroxidase* (HRP) konjugiert ist und an den FC-Teil des ersten Antikörpers bindet, inkubiert. Anschließend erfolgten Waschschriffe mit TBST (3 x 5 min). Danach wurden die Membranen 2 x 5 min mit TBS gewaschen.

Tabelle 8: Zusammensetzung 10-fach konzentriertem Waschpuffer (TBS) und 1-fach Konzentriertem Waschpuffer mit Tween (TBST)

Waschpuffer pH 7,4	10X TBS	Waschpuffer pH 7,4	10X TBST
NaCl	80 g	10X TBS	100 ml
KCl	2 g	destilliertes Wasser	900 ml
Tris	30 g	Tween	1 ml
destilliertes Wasser	1 000 ml		
auf pH 7,4 titrieren			

2.6.5 Detektion mittels lichtemittierender Reaktion

Die *Horse-Radish-Peroxidase* des 2. Antikörpers katalysiert die Oxidation von Luminol und löst damit eine Chemilumineszenz-Reaktion aus. Dies wurde mit dem *Chemiluminescence Imaging System* detektiert. Mit einer photosensitiven Kamera war die Aufnahme des Lumineszenzsignals und damit eine direkte Quantifizierung des emittierenden Lichtes möglich. Für die Detektion wurde *Enhanced Chemiluminescence* (ECL) verwendet.

Das *Amersham ECL Reagent* wurde in einem 1:1-Verhältnis auf die Membrane gegeben und nach 5 min das überschüssige ECL an einem Papier abgestreift. Die Membranen wurde für die Detektion mit einer Folie überzogen.

2.7. Immunfluoreszenzfärbung in NK-92-Zellen

Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die NK-92-Zellen auf dem Deckgläschen für 30 min mit 4 % PFA fixiert und für die intrazelluläre Färbung 5 min mit 0,5 % Triton X 100 permeabilisiert. Nach Auswaschung des Triton X 100 mit PBS wurden die Deckgläschen mit 1 % BSA in PBS für eine Stunde bei 20 °C geblockt. Für die Färbung von intrazellulärem CFL-1 konnte der gleiche Primärantikörper wie für den Western Blot verwendet werden. Für die Immunfluoreszenzfärbung konnte das Verhältnis 1:50 mit 1 % BSA in PBS etabliert werden. Die einstündige Inkubation bei 20 °C erzielte das beste Ergebnis. Nach erneutem Waschen mit PBS konnte der Sekundärantikörper für CFL-1 und Phalloidin für die F-Aktin-Strukturen gemeinsam für 1 h bei 20 °C aufgetragen werden. Die in dieser Arbeit etablierten Protokolle für die Färbung mit dem Sekundärantikörper, Phalloidin und DAPI sind in der nachfolgenden Auflistung dargestellt. Nach einem erneuten Waschschrift wurde der Zellkern mit DAPI für 5 min bei 20 °C gefärbt und im Anschluss ein weiteres Mal mit 4 % PFA für 10 min bei 20 °C fixiert. Zum Schluss wurden die Deckgläschen mit *ProLong*[®] Gold auf Objektträger eingebettet und bis zur Aufnahme am Konfokalmikroskop bei 4 °C und Dunkelheit gelagert.

Tabelle 9: Verwendete Substanzen für Immunhistochemie

Zielstruktur	Isotyp/Substanz	Hersteller	Verdünnung
Cofilin-1	mAb Rabbit IgG	Cell Signaling	1 : 50 (1 %BSA/PBS)
Sekundärantikörper	Esel-antiRabbit-alex488	Cell Signaling	1 : 312,5 (1 %BSA/PBS)
F-Aktin	Phalloidin Tritic	Sigma	1 : 1 000 (1 %BSA/PBS)
Zellkern	DAPI	Invitrogen	1 : 50 000 (PBS)

2.8. Konfokale Mikroskopie

2.8.1 Grundlagen der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie

Das Bild in einem konfokalen Mikroskop wird erzielt, indem ein Laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) das Anregungslicht auf eine Probe wirft. Das Laserlicht wird von einem dichroitischen Spiegel (*Dichroic Beamsplitter*) reflektiert und trifft auf zwei Linsen. Dieser Spiegel scannt den Laser über die Probe, der Farbstoff in der Probe fluoresziert und das emittierte Licht wird von demselben Spiegel abgelenkt. Das emittierte Licht tritt durch den Spiegel und wird auf die Lochblende (*Confocal Pinhole*) fokussiert. Das Licht, das durch die Lochblende tritt, wird von einem Detektor, d.h. einer Photovervielfacherröhre, gemessen. Der Detektor ist an einen Computer angeschlossen, welcher das Bild pixelweise aufbaut. Mit der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie können Schnittbilder mit einem Durchmesser von 100 µm angefertigt werden (Rai und Dey, 2011). Es können mehrere Bilder in verschiedenen Ebenen erstellt werden. Diese Bildfolge nennt man Z-Serie. Aus dieser Bildfolge können dann einzelne Bilder für die Analyse extrahiert werden (Paddock, 2000).

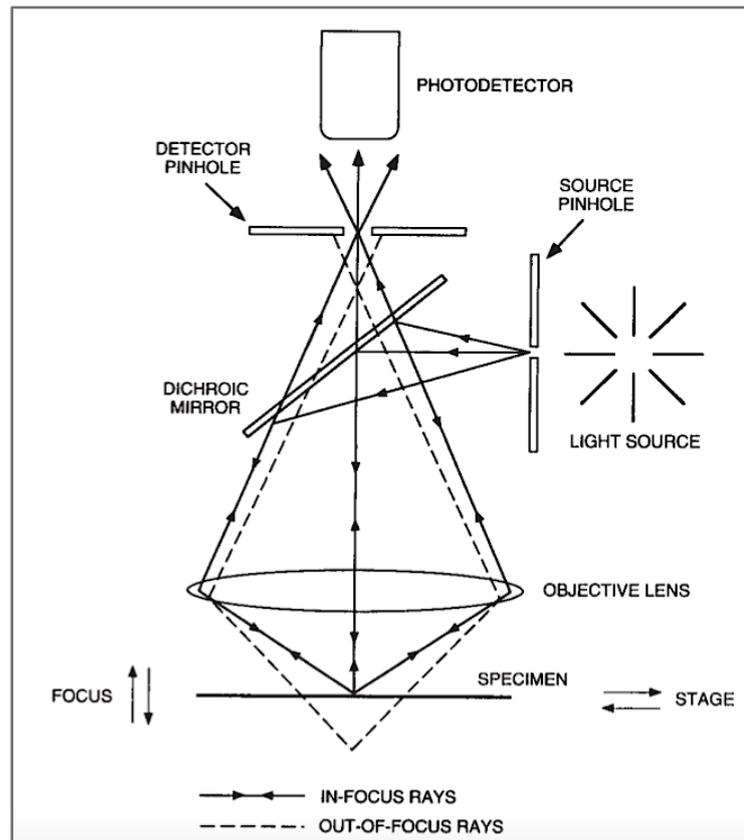


Abbildung 7: Schematische Darstellung der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie.

Anregung der Fluorophore durch einen Laser, emittiertes Licht trifft über eine Lochblende auf einen Detektor. In einem angeschlossenen Computer wird das Bild erstellt (Paddock, 2000).

2.8.2 Aufnahmen am Konfokalmikroskop

Die Bilder der NK-92-Zellen wurden mit einem konfokalen Leica-TCS SP5 X-Mikroskop aufgenommen, das mit einem Weißlichtlaser und Hybriddetektoren ausgestattet war. Ein 63x-Ölimmersionsobjektiv (NA 1,40) und standardisierte Einstellungen wurden verwendet, um eine Vergleichbarkeit der Bilder zu gewährleisten. Von jeder Probe wurden 5–6 Bilder angefertigt, mit Fiji/ImageJ 2.0.0-rc-59 / 1.51j erfasst und analysiert.

2.9. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten und die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Software GraphPadPrism 6.0. Signifikanzen wurden mit einem Sternchen (*) für $p < 0,05$ oder zwei Sternchen (**) für $p < 0,001$ gekennzeichnet.

2.9.1 Western-Blot-Ergebnisse

Die Ergebnisse der stimulierten NK-92-Zellen und der Kontrollzellen wurden mittels Two-Way-ANOVA und Tukey-Post-hoc-Test analysiert. Für die Western-Blot-Ergebnisse der primären NK-Zellen wurde der t-Test verwendet, um Unterschiede zu ermitteln. Als signifikant wurde jeweils ein p-Wert von $\leq 0,05$ angenommen. Die Abbildungen stellen den Mittelwert mit dem minimalen und maximalen Wert in einem Säulendiagramm dar.

2.9.2 Blutspender*innen (Buffy-Coats)

Die statistische Auswertung für Größe, Gewicht, BMI und die relativen Proteinmengen für GTP-RhoA, CFL-1, pCFL-1 und das Verhältnis von pCFL-1 zum gesamten zytoplasmatischen CFL-1 erfolgte mittels t-Test. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert mit dem minimalen und maximalen Wert in einem Säulendiagramm. Als signifikant wurde ein p-Wert von $\leq 0,05$ angenommen.

2.9.3 Immunhistochemische Ergebnisse

Eine Analyse der fluoreszenzmarkierten Zellen im Zeit- und Konzentrationsvergleich erfolgte unter Einbeziehung eines One-Way-ANOVA und Tukey-Post-hoc-Tests. Ein Unterschied wurde als signifikant angenommen, wenn der p-Wert $\leq 0,05$ war. Die abgebildeten Daten stellen den Mittelwert und den Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten dar.

3. Material

3.1. Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid 40%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	BIO-Rad Laboratory, Kalifornien, USA
Biocoll	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bovin Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland (PBS)
Einbettmedium (ProLong [®] Gold)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Fetales Kälberserum (FKS)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Humanes IL-2	Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, Deutschland
Humanes rekombinantes Leptin	R und D Systems, Minneapolis, USA
Humanes Fibronectin	PathClear [®] , Abington, Großbritannien
L-Glutamin	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Nitrocellulose Membran (0.2 µm)	AmershamProtran, Little Chalfont, UK
Paraformaldehyd (PFA) 4%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Vorgefärbter Proteinleiter, PageRuler [™]	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Phosphataseinhibitor	Roche Deutschland Holding GmbH, Deutschland
Prime Western Blotting Detection	GE Healthcare Life Science, Pittsburgh, Reagent ECL [™]
Proteaseinhibitor	Roche Deutschland Holding GmbH, Deutschland

RPMI 1640 Flüssigmedium	Corning Inc., Corning, USA
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	BIO-Rad Laboratory, Kalifornien, USA
Triton-X 100	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Trypan Blue Stain, 0,4%	Logos Biosystem, Annandale, USA
Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

3.2. Geräte und Zubehör

ChemiDoc™ Touch Imaging System	Bio-Rad Laboratories Inc., Kalifornien, USA
Leerkassetten 10 x 10 cm für 1,5 mm Gele	biostep GmbH, Burkhardtsdorf, Deutschland
Leica - TCS SP5 X Konfokalmikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
LUNA-II™ Automated Cell Counter	Logos Biosystems, Annandale, USA
Mini-Cell Sure Lock Mini-Cell	Novex™, Fischer Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
0,2 µm Nitrozellulosemembran	AmershamProtran, GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Semi-Dry Blotter	Biophoretics™, Nevada, USA
VWR International's Precellys®	VWR International, Pennsylvania, USA

3.3. Verwendete Kits

NK Cell Isolation Kit, human	MiltenyiBiotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Micro BCA Proteinquantifizierung Kit	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Active RhoA Kit Detection Kit	Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA

3.4. Verwendete Software

ImageJ	General Public License
Image Lab	BIO-Rad Laboratory, Kalifornien, USA
GraphPadPrism 6.0	La Jolla, Kalifornien, USA

4. Ergebnisse

4.1 Western Blot aus NK-92-Zellen

4.1.1 GTP-RhoA

Nach der Auftrennung der Proteine und Inkubation der Membranen mit den entsprechenden Antikörpern wurden die detektierten Banden mit Image Lab analysiert und ausgewertet. Dabei wurden die *Lanes* und *Banden* manuell markiert und die Signalintensitäten ermittelt. Die individuellen Intensitäten wurden gegen das mitgeführte *Housekeeping*-Protein, in diesem Fall GAPDH, verrechnet und mit GraphPadPrism 6.0 statistisch ausgewertet. Die Western Blots für die GTP-RhoA wiesen immer Doppelbanden auf. Wir analysierten sowohl die oberen Banden (Abbildung 8(A)) als auch die unteren Banden (Abbildung 8(B)). Für beide Banden konnte kein signifikantes Veränderungsniveau ermittelt werden. Demnach konnte kein Einfluss von Leptin, weder bezogen auf die Konzentration noch auf die Zeit, beobachtet werden. Es ist deutlich zu sehen, dass die unteren Banden sich schwächer darstellen als die oberen Banden. Mögliche Ursachen hierfür können Isoformen der RhoA oder posttranslationale Modifikationen am Protein sein. Abbildung 8(C) stellt eine Übersicht von drei unabhängigen Experimenten zum Zeitpunkt 30 min dar und in Abbildung 8(D) sind exemplarisch mehrere repräsentative Blots für alle untersuchten Zeitpunkte abgebildet.

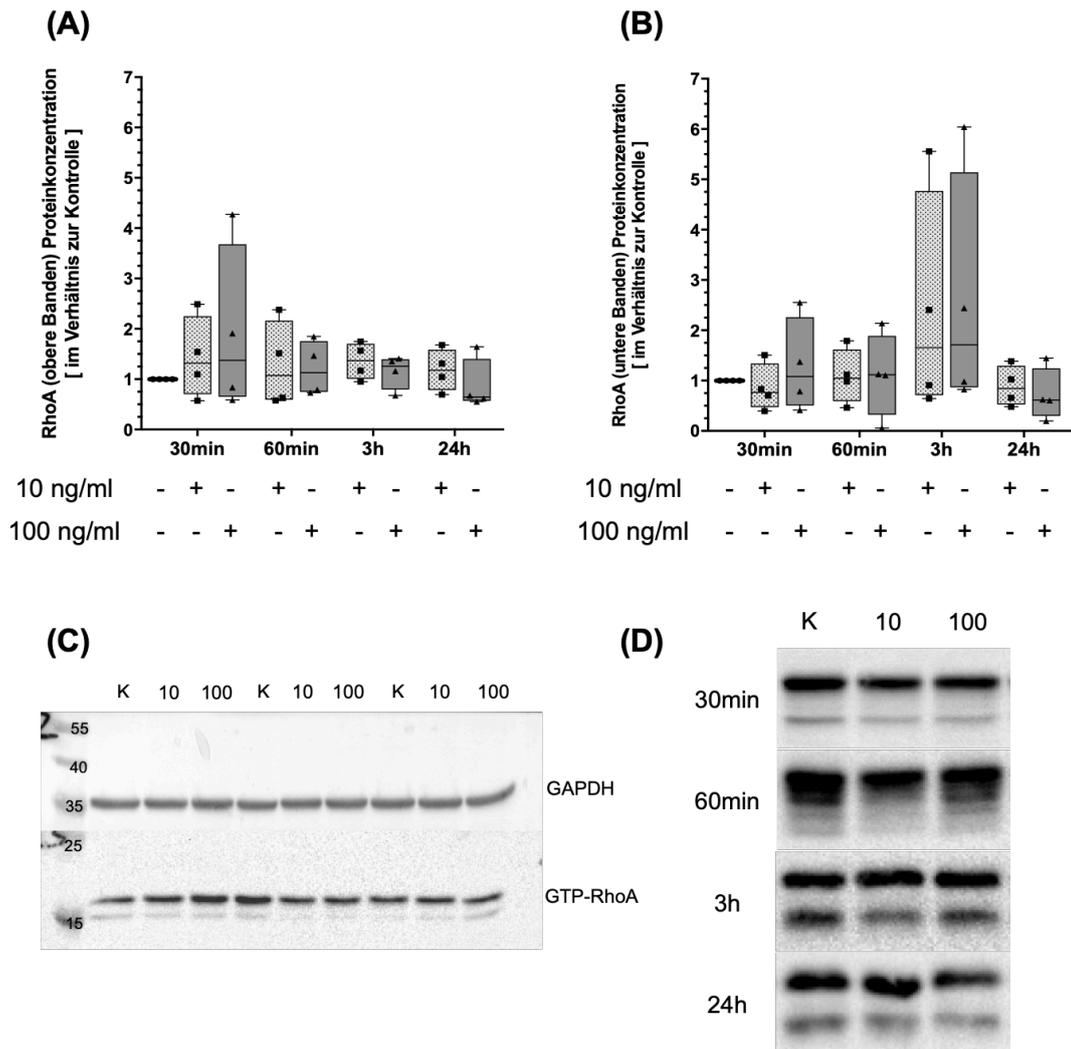


Abbildung 8: Relative Proteinkonzentrationen der RhoA in stimulierten NK-92-Zellen im Verhältnis zur Kontrolle

Quantitative Analyse der oberen (A) und der unteren (B) Banden; dargestellt sind die Inkubationszeitpunkte 30 min, 60 min, 3 h und 24 h mit 10 ng/ml Leptin (schraffiert) und 100 ng/ml Leptin (grau); Berechnung mit Two-Way-ANOVA und Tukey-Post-hoc-Test; als signifikant wurde ein p -Wert $< 0,05$ angenommen; (C) Übersicht von drei unabhängigen Experimenten zum Zeitpunkt 30 min; (D) repräsentative Blots für alle untersuchten Zeitpunkte; Housekeeping-Protein GAPDH, K = Kontrolle, 10 = 10 ng/ml Leptin, 100 = 100 ng/ml Leptin.

4.1.2 Cofilin-1, pCofilin-1, pCofilin-1/Cofilin-1

In Abbildung 9(A) sind die Proteinkonzentrationen von CFL-1 bezogen auf die mitgeführten Kontrollen dargestellt. Stimulationen mit physiologischer Leptinkonzentration (10 ng/ml) hatten keinen Einfluss auf die Proteinkonzentration. In der Stimulationsgruppe der pathophysiologischen Konzentration von Leptin (100 ng/ml) ist ein Abwärtstrend über die Zeit zu beobachten. Eine signifikante Veränderung konnte allerdings nicht erreicht werden. Die Proteinkonzentration von pCFL-1 ist in Abbildung 9(B) dargestellt. Besonders interessant ist der Zeitpunkt 60 min. Eine deutliche aber nicht signifikante Reduktion war zu diesem Zeitpunkt in beiden Stimulationsgruppen zu beobachten. In Abbildung 9(C) ist das Verhältnis von pCFL-1 zum gesamten intrazytoplasmatischen CFL-1 dargestellt. Nach 60 min Stimulation mit 100 ng/ml Leptin wurde der niedrigste Anteil an pCFL-1 im Verhältnis zum gesamten CFL-1 erreicht. Diese Veränderung war allerdings nicht signifikant ($p = 0,0706$). Mit Zunahme der Stimulationszeit näherten sich die Konzentrationen von p-CFL-1 der Kontrollgruppe an. Abbildung 9(D) stellt eine Übersicht über alle Zeitpunkte der beiden Proteine CFL-1 und pCFL-1 dar. In Abbildung 9(E) sind drei unabhängige Experimente für den Zeitpunkt 60 min dargestellt.

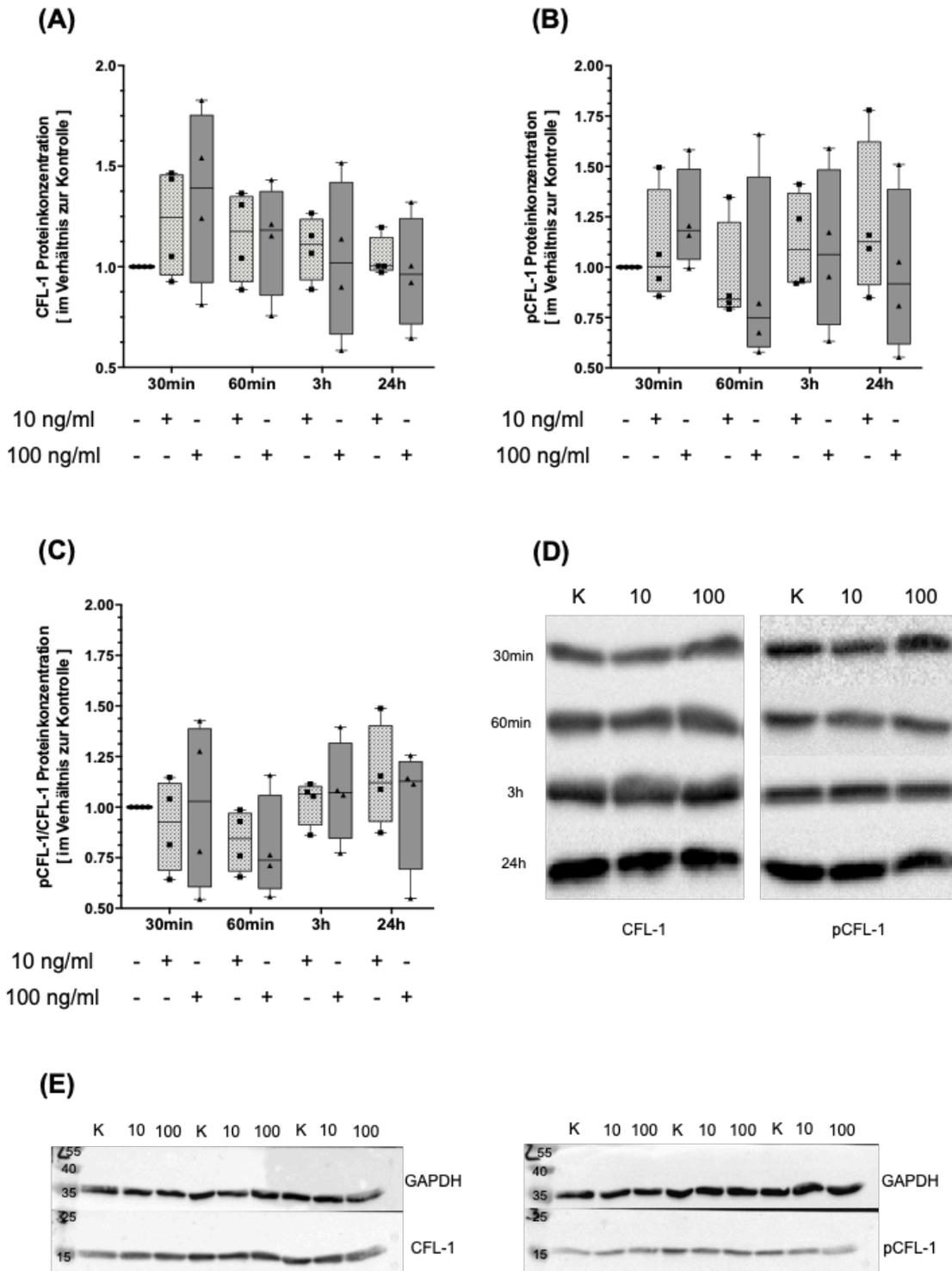


Abbildung 9: Relative Proteinkonzentrationen von CFL-1 und pCFL-1 in stimulierten NK-92-Zellen im Verhältnis zur Kontrolle

Quantitative Analyse von CFL-1 (A) und pCFL-1 (B) Banden; (C) stellt das Verhältnis von pCFL-1 zum gesamten zytosolischen CFL-1 dar, dargestellt sind die Inkubationszeitpunkte 30 min, 60 min, 3 h und 24 h mit 10 ng/ml Leptin (schraffiert) und 100 ng/ml Leptin (grau); Berechnung mit Two-Way-ANOVA und Tukey Post-hoc-Test; als signifikant wurde ein p-Wert < 0,05 angenommen; (D) repräsentative Blots für alle untersuchte Zeitpunkte; (E) Übersicht von drei unabhängigen Experimenten zum Zeitpunkt 60 min für CFL-1 und pCFL-1, *Housekeeping*-Protein GAPDH, CFL-1 = Cofilin-1, pCFL-1 = pCofilin-1, K = Kontrolle, 10 = 10 ng/ml Leptin, 100 = 100 ng/ml Leptin.

4.1.3 Slingshot-Phosphatase-1 (SSH-1)

In Abbildung 10(A) sind die Proteinkonzentrationen der SSH-1 bezogen auf die mitgeführten Kontrollen dargestellt. Stimulationen mit physiologischer Leptinkonzentration (10 ng/ml) und pathophysiologischer Leptinkonzentration (100 ng/ml) hatten keinen Einfluss auf die Konzentrationen der SSH-1. In den gewählten Zeitpunkten konnte auch kein eindeutiger Trend beobachtet werden. Abbildung 10(B) stellt eine Übersicht über alle Zeitpunkte dar. In Abbildung 10(C) sind drei unabhängige Experimente für den Zeitpunkt 3 h dargestellt.

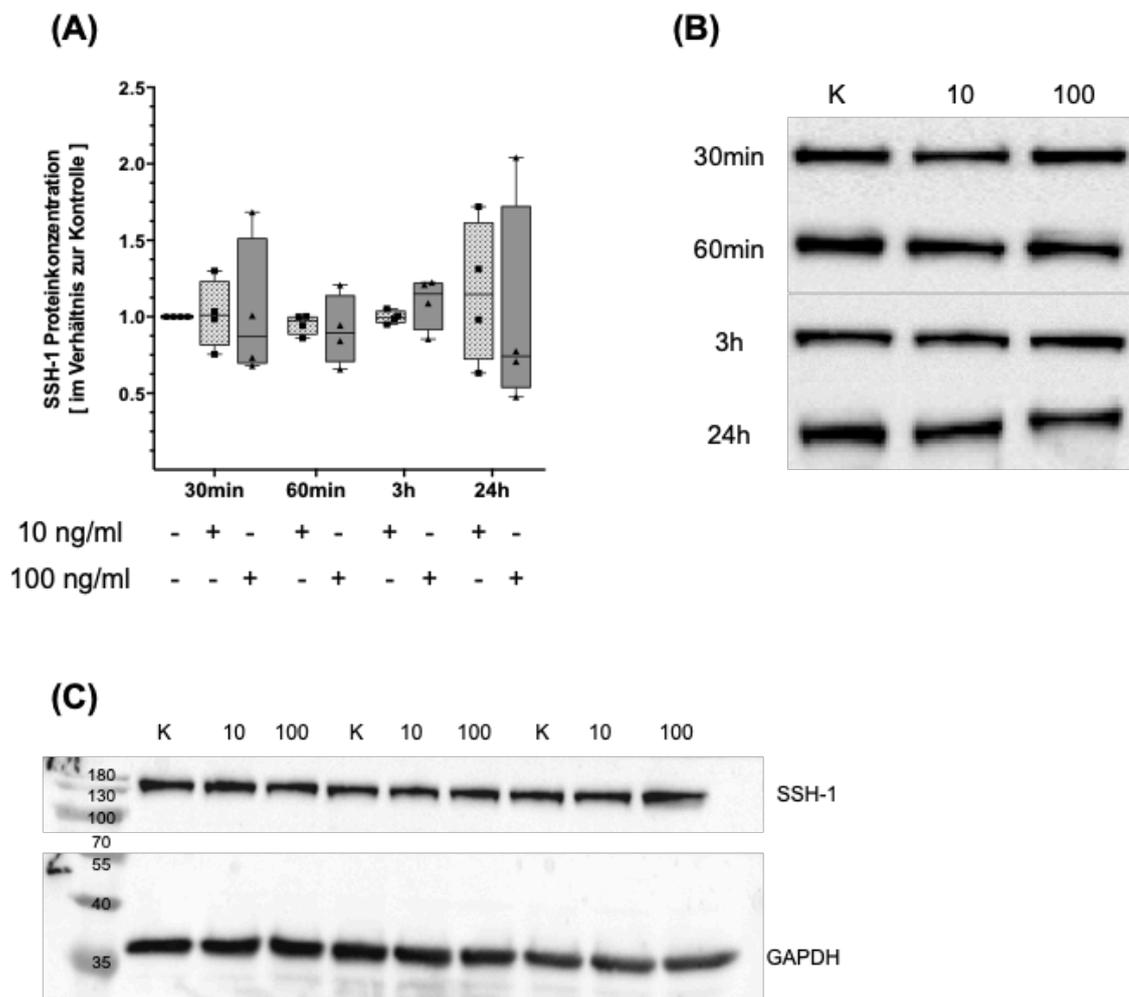


Abbildung 10: Relative Proteinkonzentrationen der SSH-1 in stimulierten NK-92-Zellen im Verhältnis zur Kontrolle

Quantitative Analyse der SSH-1 (A); dargestellt sind die Inkubationszeitpunkte 30 min, 60 min, 3 h und 24 h mit 10 ng/ml Leptin (schraffiert) und 100 ng/ml Leptin (grau); Berechnung mit Two-Way-ANOVA und Tukey Post-hoc-Test; als signifikant wurde ein p-Wert $<0,05$ angenommen; (B) repräsentative Blots für alle untersuchte Zeitpunkte; (C) Übersicht von drei unabhängigen Experimenten zum Zeitpunkt 3 h; *Housekeeping*-Protein GAPDH, SSH-1 = Slingshot-Phosphatase-1, K = Kontrolle, 10 = 10ng Leptin, 100 = 100ng Leptin.

4.2 Western Blot aus primären NK-Zellen

4.2.1 Blutspender*innen

Beide Gruppen bestanden aus 5 Spendern*innen (3 Frauen und 2 Männer). Es gab keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Körpergröße der Spender*innen (Abbildung 11(A)). Die adipöse Gruppe hatte ein signifikant höheres Körpergewicht und folglich einen größeren BMI. Die Gruppe der Normalgewichtigen wies ein mittleres Körpergewicht von 63 kg auf, die adipöse Gruppe ein mittleres Körpergewicht von 121 kg. Die aus der Größe und dem Gewicht ermittelten BMI erreichten einen mittleren Wert in der normalgewichtigen Gruppe von 22 kg/m^2 und in der Gruppe der Adipösen von 41 kg/m^2 (Abbildung 11(B-C)). Die Unterschiede waren hoch signifikant mit einem p-Wert $< 0,0001$.

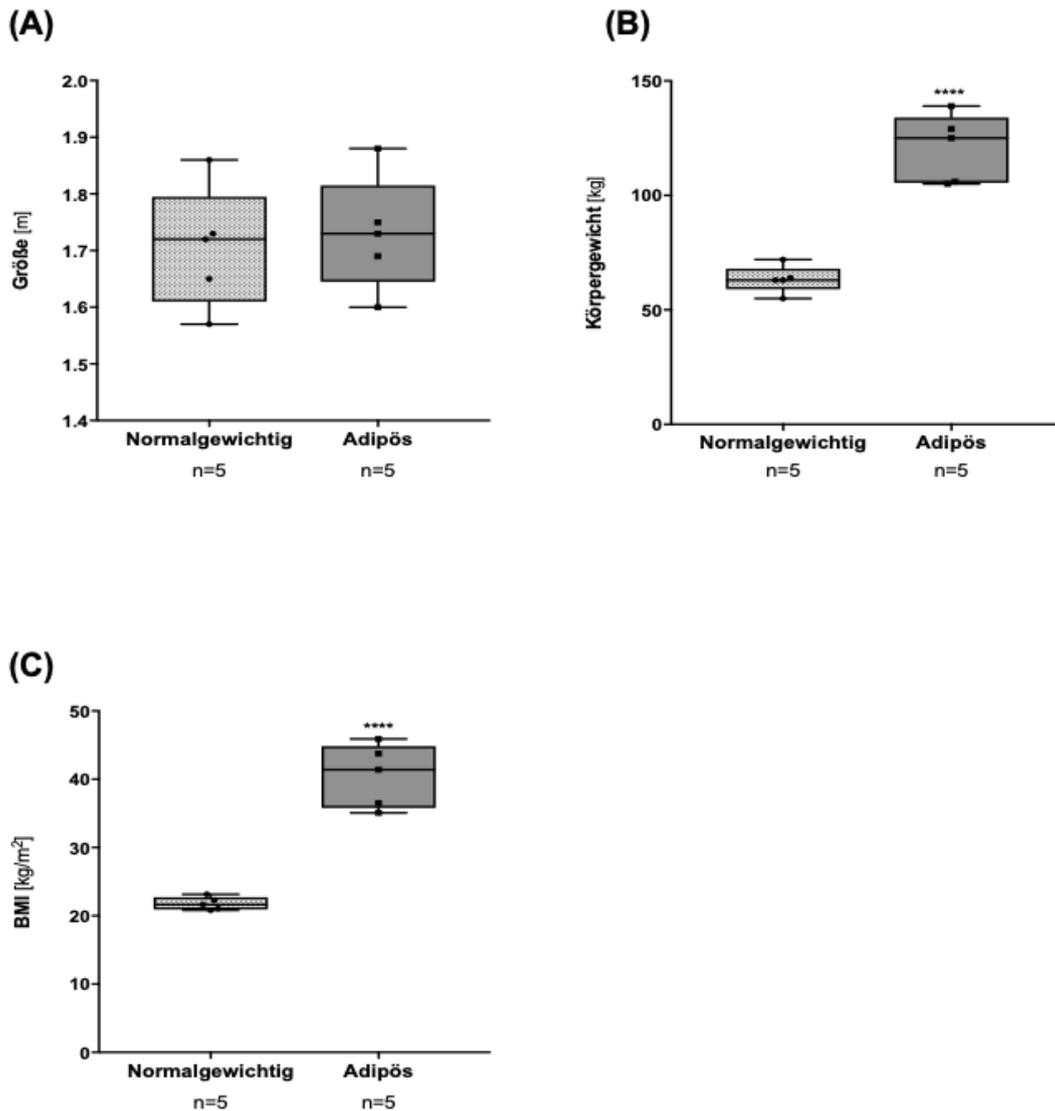


Abbildung 11: Größe, Gewicht und BMI der Blutspender*innen

Verteilung der Größe in den normalgewichtigen und adipösen Gruppen (A), Körpergewicht (B) und der ermittelte BMI (C); Berechnung mit t-Test; als signifikant wurde ein p-Wert $<0,05$ angenommen. In Körpergewicht und BMI unterschieden sich die Probanden signifikant mit einem p-Wert $<0,0001$ (****).

4.2.2 GTP-RhoA

Entsprechend den Analysen der NK-92-Zellen wies die GTP-RhoA in primären NK-Zellen ebenfalls Doppelbanden auf. Im Rahmen von Voruntersuchungen und zur Etablierung der richtigen Antikörperkonzentration wurden die Proteinmengen eines männlichen normalgewichtigen und eines männlichen adipösen Spenders aufgebraucht. Aus diesem Grund standen für die Untersuchungen der GTP-RhoA nur noch vier Spender*innen zur Verfügung. Wie bereits in den Stimulationsversuchen mit NK-92-Zellen wurden die oberen und unteren Banden separat betrachtet. Die Ergebnisse wurden auf das mitgeführte Referenzprotein GAPDH bezogen. Die Normalisierung auf eine Kontrollgruppe konnte für diese Untersuchung nicht vorgenommen werden. Die beiden Gruppen der Blutspender*innen können nur gegenübergestellt werden. Wir analysierten sowohl die oberen Banden (Abbildung 12(A)) als auch die unteren Banden (Abbildung 12(B)). Für beide Banden konnten keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden. Die Abbildung 12(C) stellt einen repräsentativen Blot der normalgewichtigen und adipösen Blutspender*innen dar. Im Vergleich zu den Untersuchungen mit NK-92-Zellen fällt auf, dass die unteren Banden der primären NK-Zellen deutlich prominenter sind und sich die oberen Banden schwächer darstellen. Mit Blick auf die Western-Blot-Ergebnisse für die GTP-RhoA in stimulierten NK-92-Zellen konnten wir deutliche Unterschied zwischen den oberen und unteren Banden beobachten. So unterschieden sich signifikant ($p = 0,0249$) die oberen Banden der Gruppe 10 ng/ml Leptin für 30 min gegenüber den oberen Banden der normalgewichtigen Blutspender*innen (Abbildung 13 (A)). Die unteren Banden der Stimulationsgruppen mit physiologischer (10 ng/ml) Leptinkonzentration in NK-92-Zellen sind gegenüber der Gruppe der normalgewichtigen Blutspender*innen signifikant verändert (Abbildung 13 (B), $p < 0,0001$). Betrachtet man die Stimulationsgruppe mit pathophysiologischer (100 ng/ml) Leptinkonzentration für 24 h in NK-92-Zellen im Vergleich mit der Gruppe der adipösen Spender*innen, so stellen sich nur die unteren Banden signifikant (Abbildung 13 (D), $p = 0,024$) verändert dar.

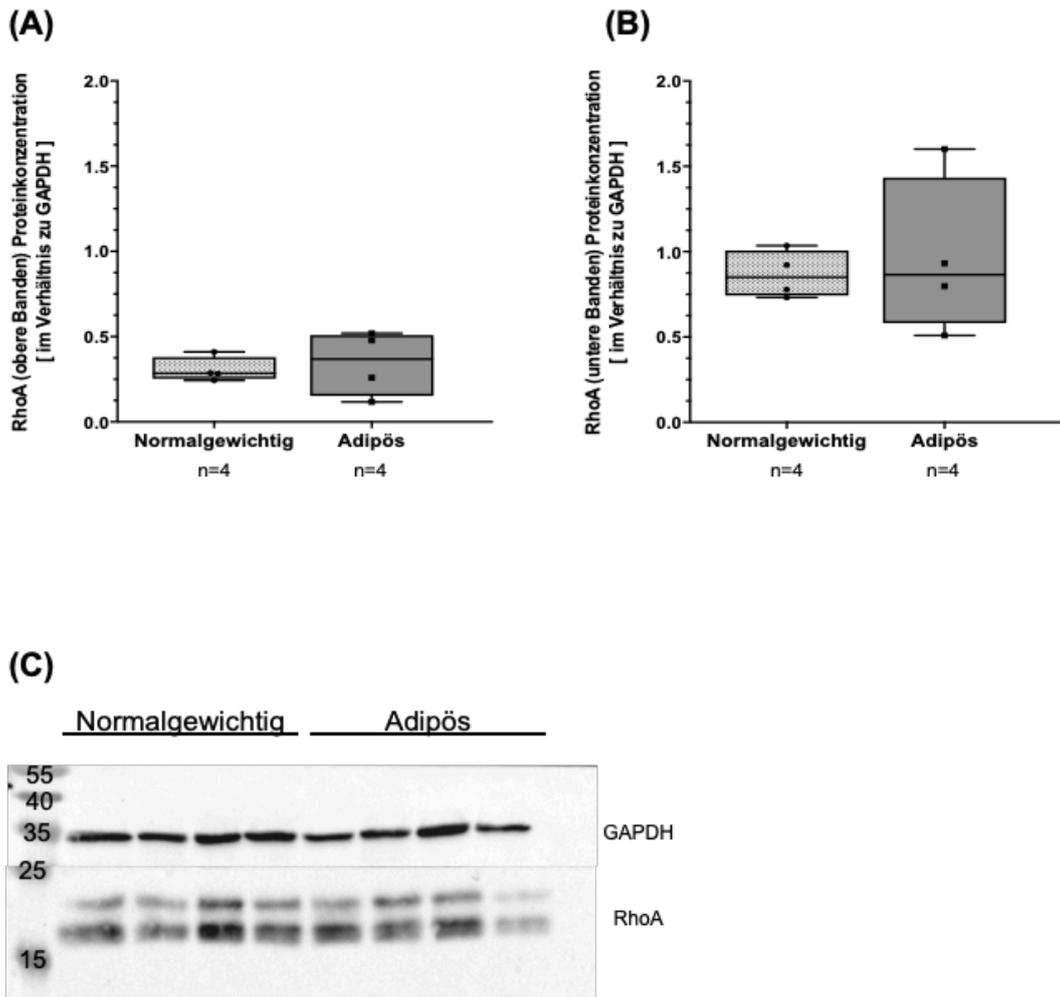


Abbildung 12: Relative Proteinkonzentrationen der GTP-RhoA in normalgewichtigen und adipösen Spender*innen

Quantitative Analyse der oberen (A) und der unteren (B) Banden; dargestellt sind die Normalgewichtigen (schraffiert) und Adipösen (grau); Berechnung mit t-Test; als signifikant wurde ein p-Wert $<0,05$ angenommen (C) repräsentativer Blot für normalgewichtige und adipöse Spender*innen, *Housekeeping*-Protein GAPDH.

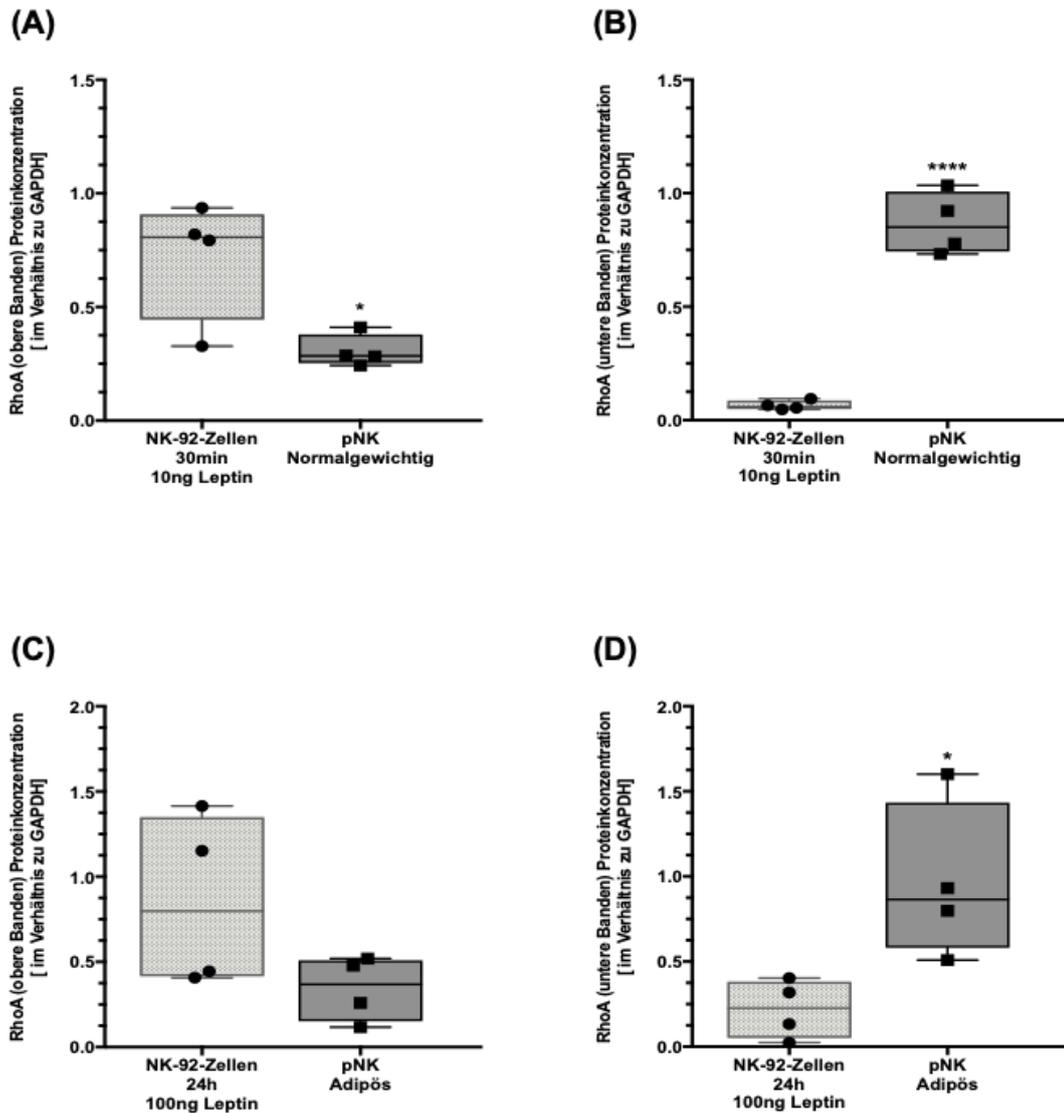


Abbildung 13: Relative Proteinkonzentrationen der GTP-RhoA im Vergleich NK-92-Zellen gegenüber primäre NK-Zellen

Quantitative Analyse der oberen und der unteren Banden; dargestellt sind die NK-92-Zellen (schraffiert) und primäre NK-Zellen (grau). Dargestellt sind in A–B kurzzeitige (30 min) Stimulation mit 10 ng/ml Leptin gegenüber primäre NK-Zellen von normalgewichtigen Spender*innen:

* $p = 0,0249$, **** $p < 0,0001$. In C–D sind die Langzeit-Stimulationen (24 h) von NK-92-Zellen mit 100 ng/ml Leptin gegenüber adipösen Spender*innen dargestellt: * $p = 0,024$; Berechnung mit t-Test; als signifikant wurde ein p-Wert $< 0,05$ angenommen. pNK = primäre NK-Zellen, Housekeeping-Protein GAPDH

4.2.3 Cofilin-1, pCofilin-1, pCofilin-1/Cofilin-1

In den Abbildungen 13(A–B) sind die Proteinkonzentrationen von CFL-1 und pCFL-1 im Verhältnis zum *Housekeeping*-Protein GAPDH in Säulendiagrammen dargestellt. Abgebildet sind die Mediane mit dem minimalen und maximalen Wert. Eine/r der Spender*innen aus der adipösen Gruppe wies sowohl im *Housekeeping*-Protein als auch im CFL-1 und p-CFL-1 sehr schwache Banden auf. Im Rahmen der statistischen Auswertung stellten sich diese Banden als Ausreißer dar, welche das mittlere Ergebnis nach unten korrigierten. Ein hoher Lipidanteil im Blut könnte als mögliches Problem bei der NK-Zell-Separation gewesen sein. Wir entschieden uns, die Ergebnisse mit nur vier Spender*innen auszuwerten. Für beide Proteine konnten keine Unterschiede beobachtet werden. Das Verhältnis von pCFL-1 zum gesamten CFL-1 war in beiden Gruppen annähernd gleich (Abbildung 13(C)). Repräsentative Blots von normalgewichtigen und adipösen Spendern*innen für CFL-1 und pCFL-1 sind in Abbildung 13(D–E) dargestellt.

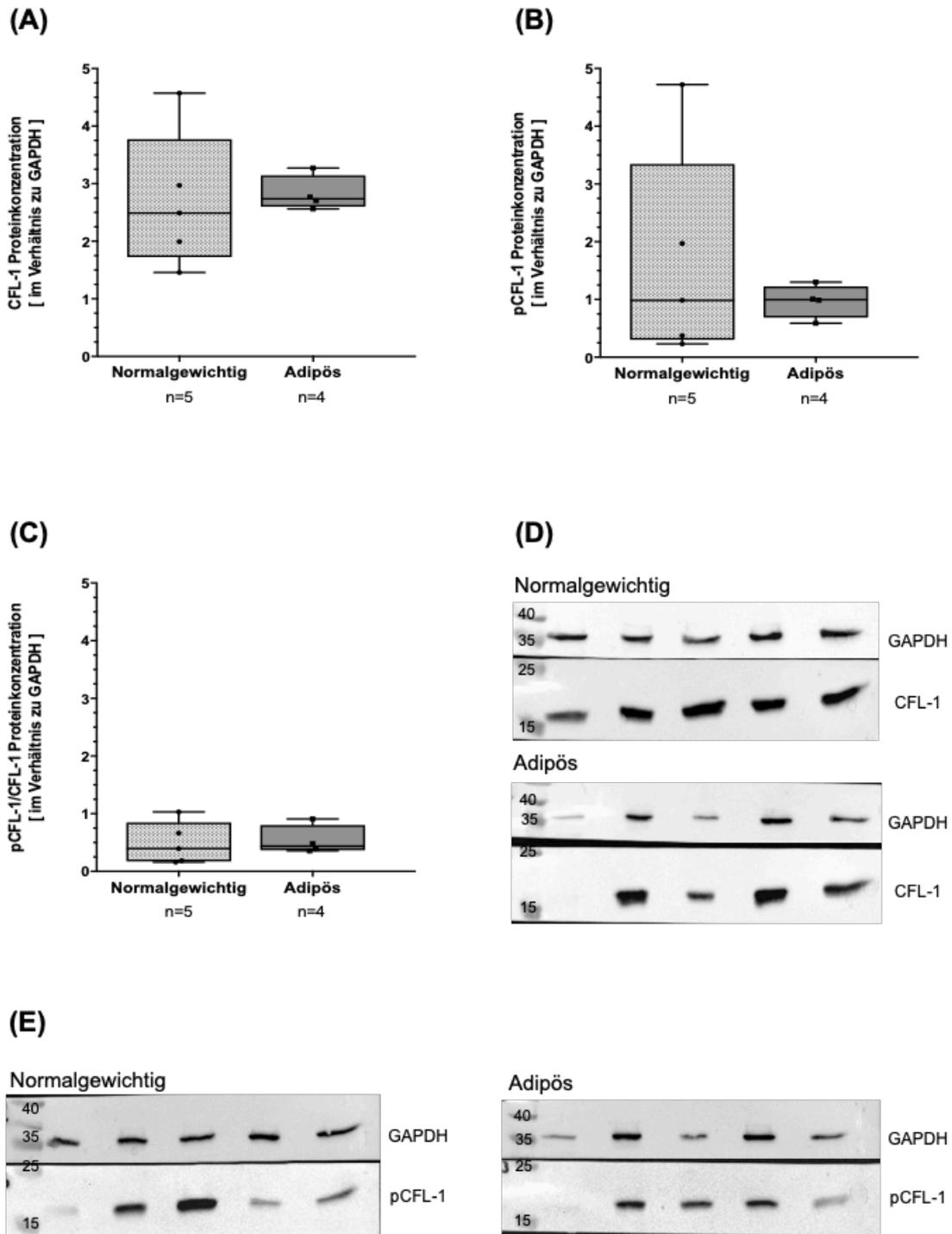


Abbildung 14: Relative Proteinkonzentrationen von CFL-1 und pCFL-1 in normalgewichtigen und adipösen Spender*innen

Quantitative Analyse von CFL-1 (A) und pCFL-1 (B) Banden; (C) stellt das Verhältnis von pCFL-1 zum gesamten CFL-1 dar, dargestellt sind Normalgewichtig (schraffiert) und Adipös (grau); Berechnung mit t-Test; als signifikant wurde ein p-Wert $< 0,05$ angenommen; (D) repräsentative Blots für CFL-1 in normalgewichtigen und adipösen Spendern*innen; (E) repräsentative Blots für pCFL-1 in normalgewichtigen und adipösen Spender*innen; CFL-1 = Cofilin-1, pCFL-1 = pCofilin-1, *Housekeeping*-Protein GAPDH.

4.3 Immunfluoreszenzfärbung in NK-92-Zellen

Um den Einfluss von Leptin auf morphologische Änderungen von NK-92-Zellen zu untersuchen, wurden die Filopodienlängen und der NK-Zellumfang in 44–45 Zellen pro Gruppe gemessen (Kontrollen, Kurzzeitstimulation und Langzeitstimulation). Aufgrund von technischen Problemen konnten in der Gruppe, die 30 min mit 10 ng/ml Leptin stimuliert wurde, nur 35 Zellen analysiert werden. Die zu untersuchenden Zellen wurden einfach verblindet ausgewählt. Dabei war es wichtig, Zellen auszuwählen, die komplett auf dem Bildausschnitt zusehen waren und nicht von anderen Zellen überlagert wurden.

4.3.1 Filopodienlänge

Die Filopodienlänge wurde beginnend mit dem Ende der Zellmembran bis zum sichtbaren Ende gemessen. Auf Grund verschiedener Formen und Längen der Filopodien konnte die Filopodienlängen nicht standardisiert erhoben werden. Daher wurden alle Filopodien manuell gemessen. Pro Gruppe wurden 600–1 200 Filopodien gemessen. Um eine statistische Korrektheit zu gewährleisten, wurden alle gemessenen Längen von Filopodien in jeder Gruppe per Excel zufällig für $n = 600$ ausgewählt. Die Abbildungen 14(A-B) stellen den Mittelwert mit dem Standardfehler (SEM) von 600 gemessenen Filopodienlängen dar. Abbildung 14(A) gibt einen Überblick über den kurzen Stimulationszeitpunkt (30 min). Die Stimulation mit der physiologischen Leptinkonzentration (10 ng/ml) ergab signifikant verringerte Filopodienlängen gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Mittels On-Way-ANOVA und Tukey Post-hoc-Test ermittelten wir einen signifikanten p-Wert mit 0,0013. Stimulationen über 24 h wiesen keine wesentlichen Veränderungen der Filopodienlängen auf (Abbildung 14(B)). Tabelle 10 stellt eine Übersicht der minimalen und maximalen Filopodienlängen dar. In Abbildung 15(a) ist eine NK-92-Zelle abgebildet, welche exemplarisch für die kurzzeitige Stimulation mit 10 ng/ml Leptin steht. Deutlich zu sehen sind die kürzeren Filopodien im Vergleich zu der Zelle in Abbildung 15(b), die über einen längeren Zeitraum (24 h) mit 10 ng/ml Leptin stimuliert wurde.

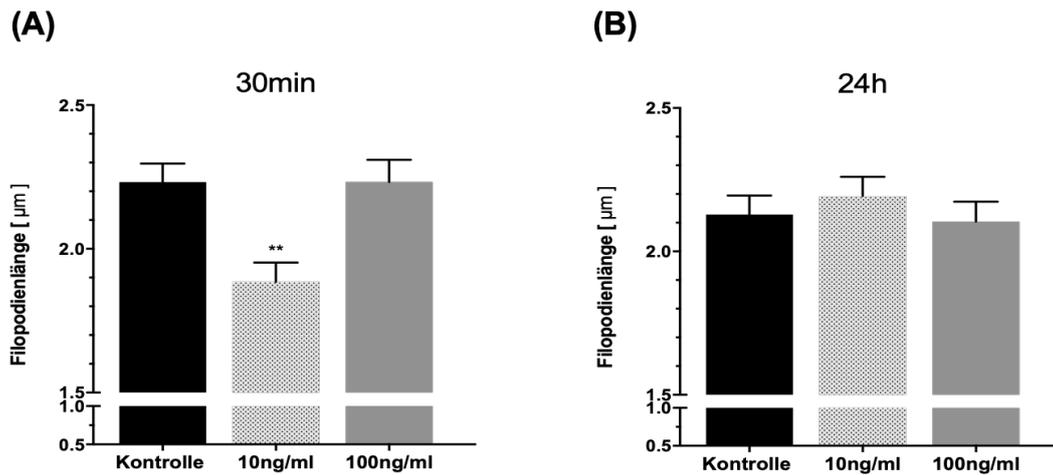


Abbildung 15: Filopodienlängen (µm) in NK-92-Zellen

Filopodienlänge nach (A) 30 min Leptin-Stimulation; ** $p = 0,0013$ im Vergleich zur Kontrolle. (B) 24 h Leptin-Stimulation; Berechnung mit On-Way-Anova und Tukey Post-hoc-Test; als signifikant wurde ein p -Wert $< 0,05$ angenommen. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten ($n = 600$ Filopodien pro Gruppe) dargestellt.

Tabelle 10: Minimale und maximale Länge der Filopodien (in µm)

	30 min			24 h		
	Kontrolle	10 ng/ml	100 ng/ml	Kontrolle	10 ng/ml	100 ng/ml
Minimum	0,3	0,4	0,3	0,2	0,3	0,3
Maximum	11,8	14,7	14	11,3	17,3	13,5

Filopodienlänge nach 30 min und 24 h Leptin-Stimulation. Dargestellt sind die kürzesten (Minimum) und längsten (Maximum) Filopodienlängen pro Gruppe (in µm). 10 ng/ml = 10 ng/ml Leptin, 100 ng/ml = 100 ng/ml Leptin.

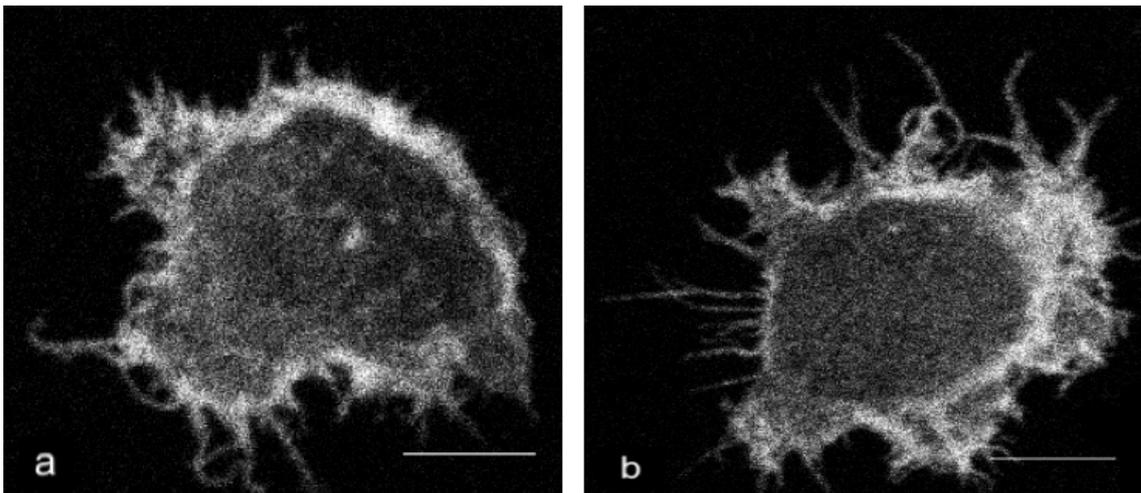


Abbildung 16: Repräsentative NK-92-Zellen (grau skaliert)

Dargestellt sind zwei exemplarische NK-92-Zellen, welche den Unterschied in der Länge der Filopodien zwischen 10 ng/ml Leptin für 30 min (a) und 10 ng/ml Leptin für 24 h (b) aufzeigen; Maßstabsbalken: 6 μm .

4.3.2 Zellumfang

Die Zellumfänge der Zellen wurden ebenfalls manuell erhoben, da auf Grund von unterschiedlichen Formen der NK-92-Zellen eine Standardisierung auch hier nicht möglich war. Es konnten weder zeitabhängige, noch konzentrationsabhängige Einflüsse der Leptin-Stimulation auf die Umfänge der NK-92-Zellen beobachtet werden. Abbildung 16(A) stellt den Mittelwert \pm SEM für die kurzzeitige Stimulation und Abbildung 16(B) den Mittelwert \pm SEM für die Langzeitstimulation dar.

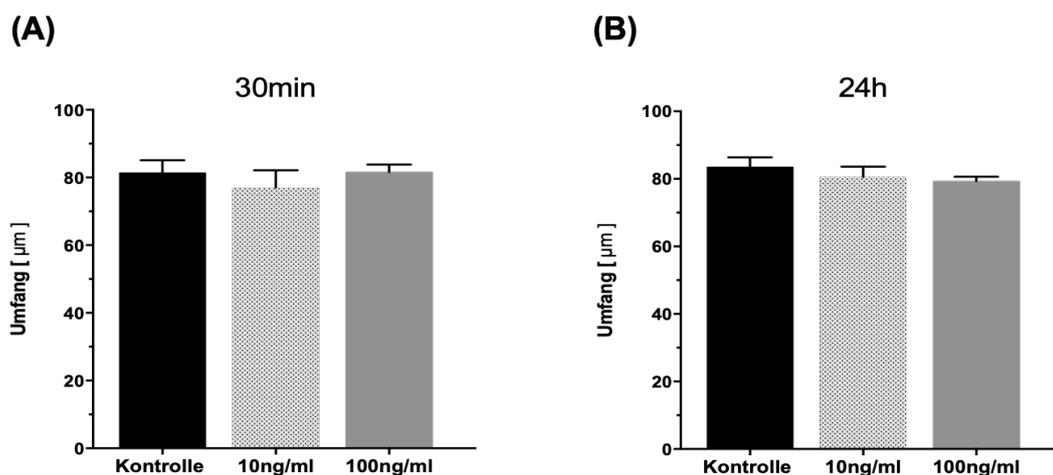


Abbildung 17: Umfang der NK-92-Zellen in μm

Dargestellt sind die Zellumfänge für die Leptin-Stimulation 30 min (A) und 24 h (B). Berechnung mit On-Way-ANOVA und Tukey Post-hoc-Test; als signifikant wurde ein p-Wert $< 0,05$ angenommen. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten (n = 70–90 pro Gruppe) dargestellt. 10 ng/ml = 10 ng/ml Leptin, 100 ng/ml = 100 ng/ml Leptin

4.3.3 Kolokalisation F-Aktin und Cofilin-1

Zur Untersuchung der Kolokalisation von CFL-1 und F-Aktin wurde der Kolokalisationskoeffizient nach Manders in Regionen von Interesse (ROI) mit Coloc2 in ImageJ ausgewertet. Die ROIs wurden mit dem ROI-Plug-in (Software-Erweiterung) ermittelt und die Kernfläche abgezogen. Für jede Versuchsgruppe wurden 28-30 Zellen ausgewählt und analysiert. Um eine Manipulation der Kolokalisationskoeffizienten zu vermeiden, wurden keine manuellen Hintergrund-Subtraktionen durchgeführt und für die Analyse mit Coloc2 wurde eine automatische Schwelle eingestellt. Die Kolokalisation kann quantifiziert werden, indem die Anzahl der gleichzeitig auftretenden Pixel als Bruchteil der Gesamtzahl ausgedrückt werden. Dabei erhält man die fraktionellen Kolokalisationskoeffizienten nach Manders (MCC). M1 (fraktioneller Kolokalisationskoeffizient von F-Aktin zu CFL-1) und M2 (fraktioneller Kolokalisationskoeffizient für CFL-1 zu F-Aktin). Diese Koeffizienten sind proportional zur Fluoreszenzmenge der kolokalisierenden Proteine im Verhältnis zur Gesamtfluoreszenz im untersuchten Bereich. Die Messpunkte reichen von 0 bis 1, wobei 0 keine und 1 100% Überlappung bedeuten (Manders *et al.*, 1993; Zinchuk *et al.*, 2007). In Abbildung 17 ist eine vergrößerte NK-92-Zelle mit detaillierter Ansicht der Zellmembran zu sehen. Die Kolokalisation (gelb) von CFL-1 (grün) und F-Aktin (rot) ist deutlich zu erkennen. Tabelle 11 zeigt die fraktionellen Kolokalisationskoeffizienten für F-Aktin (rote Fluoreszenz; tM1) und CFL-1 (grüne Fluoreszenz; tM2) mit der von Coloc2 verwendeten automatischen Schwelle. Die Überlagerung von F-Aktin zu CFL-1 (dargestellt durch tM1) nach kurzfristiger (30 min) Leptin-Stimulation lag zwischen 53 % und 58 % in allen Gruppen. Die Überlappung verringerte sich nach einer Langzeitstimulation (24 h) um ungefähr 10 % und lag zwischen 45 % und 49 % in allen Gruppen. Nach 30-minütiger Behandlung mit 10 ng/ml Leptin konnte im Vergleich zu den Kontrollzellen ein geringfügiger höherer Wert für CFL-1 (tM2) beobachtet werden. Interessanterweise zeigte die Inkubation mit 10 ng/ml Leptin für 24 h eine geringere Überlappung von CFL-1 zu F-Aktin im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle (tM2 48 % gegenüber tM2 der Kontrolle 54 %). In Bezug auf die intrazellulären Lokalisationen von CFL-1 zeigt Abbildung 18 das allgegenwärtige Auftreten von CFL-1 in den Zellen und eine Kolokalisation mit F-Aktin an der Membran. Jedes Feld in Abbildung 18 zeigt jeweils eine NK-92-Zelle für die Stimulationszeitpunkte 30 min und 24 h. Die oberen NK-Zellen repräsentieren die Kontrollgruppe, die mittleren Zellen die Stimulation mit 10 ng/ml Leptin und die untere Reihe die Inkubation mit 100 ng/ml Leptin. Der grüne Kanal zeigt CFL-1, der rote Kanal zeigt F-Aktin. Bilder in der rechten Spalte zeigen ein zusammengeführtes Bild.

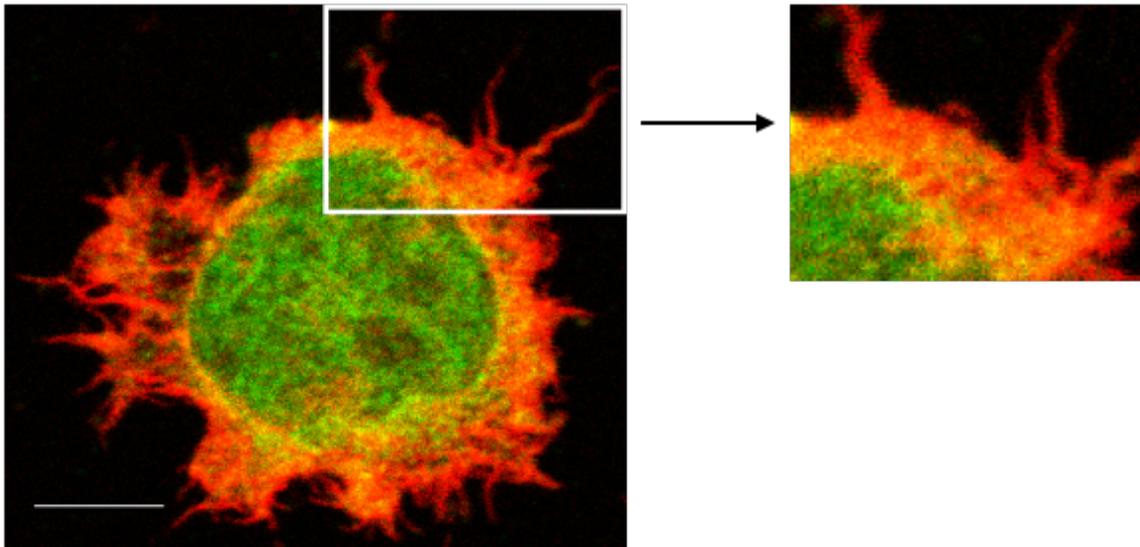


Abbildung 18: Vergrößerte Ansicht einer NK-92-Zelle

Dargestellt ist eine detaillierte Ansicht einer NK-92-Zelle mit einer Vergrößerung der Zellmembran mit den kolokalisierenden Proteinen CFL-1 (grün) und F-Aktin (rot), überlagert (gelb); Maßstabsbalken: 6 μm .

Tabelle 11: Fraktionelle Kolokalisationskoeffizienten nach Manders in NK-92-Zellen

Koeffizienten nach Manders	30 min			24 h		
	K	10 ng/ml	100 ng/ml	K	10 ng/ml	100 ng/ml
tM1	57 % $\pm 5 \%$	58 % $\pm 4 \%$	53 % $\pm 5 \%$	45 % $\pm 5 \%$	46 % $\pm 4 \%$	49 % $\pm 4 \%$
tM2	50 % $\pm 3 \%$	56 % $\pm 2 \%$	54 % $\pm 2 \%$	54 % $\pm 3 \%$	48 % $\pm 2 \%$	51 % $\pm 2 \%$

tM1, fraktioneller Kolokalisationskoeffizient für F-Aktin; tM2, fraktioneller Kolokalisationskoeffizient für CFL-1; Mittelwert \pm SEM in Prozent; n = 28–30 pro Gruppe, K = Kontrolle, 10 ng/ml = 10 ng/ml Leptin, 100 ng/ml = 100 ng/ml Leptin.

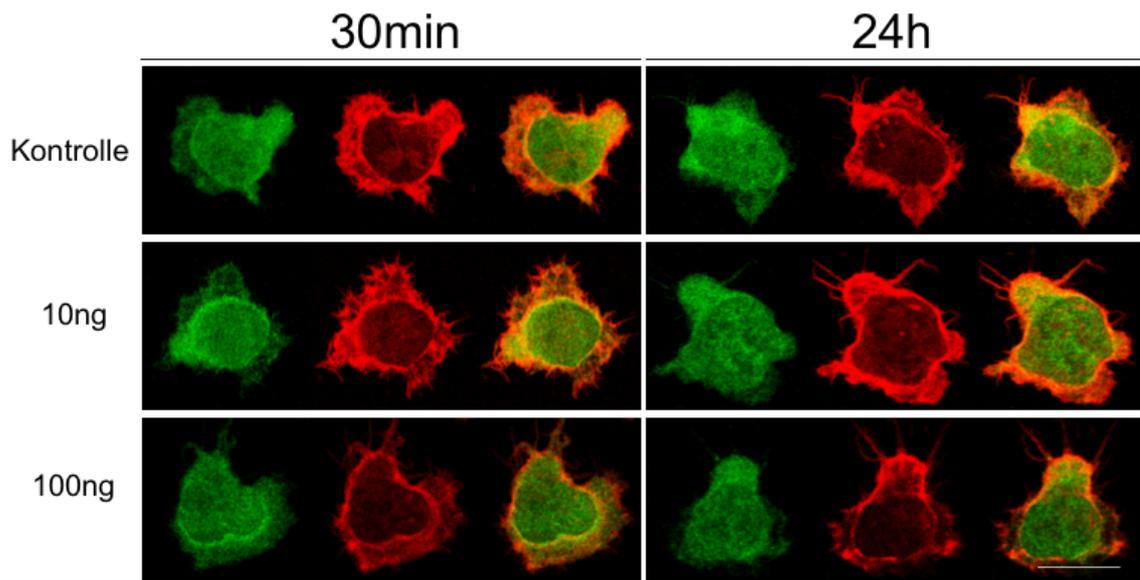


Abbildung 19: Überblick der Verteilung von CFL-1 und F-Aktin in NK-92-Zellen

Dargestellt ist die Kolo­kalisierung von CFL-1 und F-Aktin für die Kurzzeitstimulation (30 min) und Langzeitstimulation (24 h). Die obere Reihe stellt zwei Zellen der Kontrollgruppe dar. Die mittlere Reihe stellt zwei Zellen aus der Stimulationsgruppe mit 10 ng/ml Leptin dar und die untere Reihe 100 ng/ml. Jedes Feld zeigt eine vergrößerte Ansicht einer NK-92-Zelle. Der grüne Kanal zeigt CFL-1, der rote Kanal zeigt F-Aktin. Bilder ganz rechts zeigen ein zusammengeführtes Bild. Originalbilder 2048x2048px; Maßstabsbalken 10 µm.

5. Diskussion

Adipositas ist eine chronische Erkrankung, die durch einen Überschuss an Körperfett definiert wird. Sie stellt zunehmend ein weltgesundheitsliches Problem dar und ist verbunden mit signifikant erhöhten Leptin-Serumspiegeln (Shah und Braverman, 2012). Leptin, ein unglykosyliertes 16 kDa großes Protein, wird hauptsächlich von Adipozyten produziert. Es gehört in die Gruppe der Zytokine und wird üblicherweise als Adipozytokin oder Adipokin bezeichnet (La Cava *et al.*, 2004). Leptin nimmt eine Doppelrolle als Hormon und Zytokin ein. Als Hormon beeinflusst es unter anderem die Energiehomöostase, die endokrinen Funktionen und den Knochenstoffwechsel. Außerdem fördert Leptin als Zytokin die Entzündungsreaktionen (La Cava, 2017). Die gesamte Wirkung von Leptin auf das Immunsystem äußert sich hauptsächlich proinflammatorisch. Immunzellen werden dazu angeregt, weitere Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin (IL) -2 oder IL-6 auszuschütten. Zusätzlich wird der Leptinrezeptor durch proinflammatorische Signale hochreguliert (Fernández-Riejos *et al.*, 2010). Es wird vermutet, dass erhöhte Spiegel an zirkulierendem Leptin bei adipösen Patienten erheblich zu einer systemischen niedriggradigen Entzündung beitragen und die Patienten anfälliger für die Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen sowie Typ-II-Diabetes machen (Abdullah *et al.*, 2010; Kivimäki *et al.*, 2017). Eine Hyperleptinämie stellt aber auch ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Krebs dar. So konnten bereits mehrere Studien einen positiven Zusammenhang zwischen hohen Leptin-Spiegeln, veränderten Immunzellfunktionen und einer erhöhten Krebsinzidenz aufzeigen (Fernández-Riejos *et al.*, 2010; Grossmann *et al.*, 2010; Jardé *et al.*, 2011; Vona-Davis und Rose, 2007).

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) spielen als Teil unseres angeborenen Immunsystems eine wesentliche Rolle bei der zellbasierten Immunabwehr gegen virusinfizierte und transformierte Zellen (Vivier *et al.*, 2008). Es ist bekannt, dass NK-Zellen eine Vielzahl von inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren aufweisen, welche MHC-Klasse-I-Moleküle, MHC-Klasse-I-ähnliche Moleküle und Moleküle, die nicht mit MHC verwandt sind, erkennen können (Caligiuri, 2008). Zusätzlich zu den inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren exprimieren NK-Zellen auch Leptinrezeptoren und könne so durch das Umgebungsmilieu beeinflusst werden (Zhao *et al.*, 2003; Lamas *et al.*, 2013). Zusätzlich zu der Möglichkeit, Oberflächenmoleküle auf den umliegenden Zellen zu erkennen, ist die Fähigkeit von Leukozyten, sich koordiniert durch den Körper zu bewegen, eine wesentliche Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Immunüberwachung (Gismondi und Santoni, 2006). Dabei zählen NK-Zellen zu den am besten migrierenden Zellen des Immunsystems (Lang *et al.*, 2003).

Zellmigration ist ein hochkomplexer Prozess, an dem eine Vielzahl an Proteinen beteiligt sind (Hohmann und Dehghani, 2019). Eine migrierende Zelle beginnt mit der Polarisierung und Ausbildung von Ausläufern in Migrationsrichtung. Diese Auszüge können spitzenartige Filopodien sein und werden normalerweise durch Aktinpolymerisation angetrieben (Ridley *et al.*, 2003).

In Zellen tritt Aktin in zwei unterschiedlichen Zuständen auf: als monomeres G-Aktin und als filamentöses F-Aktin. Die Modulation des Aktin-Zytoskeletts wird durch das Gleichgewicht von globulärem G- und polymerem F-Aktin sowie durch Aktin-assoziierte Proteine reguliert (Rotty und Bear, 2015). Aktinmonomere, welche für die Polymerisation am vorderen Ende (Migrationsrichtung) benötigt werden, können durch Proteine der ADF-/Cofilin-Familie abgetrennt werden und somit dem vorderen Ende zur Verfügung gestellt werden. Damit spielt Cofilin eine wesentliche Rolle bei der Depolymerisierung von Aktinfilamenten und der Migration von Zellen (Hohmann und Dehghani, 2019). Cofilin-1 (CFL-1), ein zytosolisches Protein, liegt in zwei Formen vor: zum einen als dephosphorylierte (CFL-1) aktive Form und zum anderen als phosphorylierte (pCFL-1) inaktive Form (Bamburg, 1999). Interessanterweise wirken sich RhoA-GTPasen, LIM-Kinasen sowie Slingshot-Phosphatasen-1 (SSH-1) auf die Aktivierung und Inaktivierung von CFL-1 aus (Ridley, 2006).

Bislang liegen nur wenige Informationen über die Bedeutung von Leptin für die Migrationsleistung und die beteiligten Proteine in NK-Zellen vor.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Leptin auf morphologische Veränderungen und die an der Migration beteiligten Proteine in NK-92-Zellen und primären humanen NK-Zellen untersucht. Hauptaugenmerk wurde dabei auf Proteine gelegt, die an der Depolymerisierung von F-Aktin beteiligt sind. In *In-vitro*-Stimulationsversuchen mit physiologischen (10 ng/ml) und pathophysiologischen (100 ng/ml) Leptinkonzentrationen zu verschiedenen Zeiten (30 min, 60 min, 3 h, 24 h) wurden in NK-92-Zellen quantitative Proteinveränderungen der GTP-RhoA, CFL-1, pCFL-1, sowie der Slingshot-Phosphatase-1 (SSH-1) im Western Blot untersucht. Um den Einfluss des Body-Mass- Index (BMI) auf die Proteine GTP-RhoA, CFL-1 und pCFL-1 in NK-Zellen zu untersuchen, wurden aus Buffy-Coats von Blutspender*innen primäre NK-Zellen separiert, Proteine isoliert und im Western Blot analysiert. Die konzentrationsabhängige und zeitabhängige Wirkung von Leptin auf morphologische Veränderungen in NK-92-Zellen wurde mit Hilfe der Konfokal-Mikroskopie analysiert.

Ein möglicher zugrunde liegender molekularer Mechanismus für den Einfluss von Leptin auf CFL-1 und F-Aktin und der damit verbundenen Formveränderung von NK-Zellen könnte eine Aktivierung der RhoA-ROCK-LIMK-Cofilin-Kaskade sein (Li *et al.*, 2014). Um diesen Weg zu adressieren wurden die GTP-gebundenen RhoA in NK-92-Zellen und in primären humanen NK-Zellen isoliert und im Western Blot untersucht. Nach

Normalisierung der Volumenintensitäten konnte keine konzentrations- und zeitabhängige Wirkung von Leptin beobachtet werden. Untersuchungen an vier normalgewichtigen und übergewichtigen Blutspender*rinnen wiesen ebenso keine wesentlichen Unterschiede auf. Interessanterweise stellten sich in allen Untersuchungsgruppen deutliche Doppelbanden dar.

Rho-GTPasen liegen in zwei funktionellen Formen vor. GDP-gebundene Rho-GTPasen gelten als inaktiv. Als Reaktion auf ein eingehendes Signal kommt es zur Aktivierung der RhoA durch den Austausch von GDP zu GTP (Mackay und Halle, 1998; Jaffe und Hall, 2005). Der monoklonale RhoA-Antikörper bindet in der Nähe des Carboxylendes der humanen RhoA. Es ist möglich, dass während der Isolation der GTP-gebundenen Rho-Proteine Veränderungen an dem Carboxylende vorgenommen wurden und so die exakte Bindung des monoklonalen Antikörpers erschwert wurde bzw. eine Doppeldetektion verursachte.

Zu den Funktionen der RhoA gehören unter anderem die Regulation der Aktomyosin-Kontraktilität, die Zytokinese, die fokale Adhäsionsanordnung und die Zellpolarität (Barry und Critchley, 1994; Kimura *et al.*, 2000; Bi *et al.*, 2005; Van Keymeulen *et al.*, 2006). Rho-GTPasen unterlaufen posttranslationale Modifikationsprozesse, die einen Einfluss auf den Aktivitätszustand und die Funktion haben. Neben den Modifikationen an den Carboxylenden sind Phosphorylierung und Ubiquitinierung weitere posttranslationale Modifikationsprozesse. Interessanterweise sind die Aminosäuresequenzen der RhoA und der homologen RhoC bis zu 92% gleich; sie weisen dazu ähnliche Stellen für Phosphorylierung und Ubiquitinierung auf (Olson, 2018). Posttranslationale Modifikationen bzw. eine hohe Ähnlichkeit von RhoA und RhoC könnten weiterer Gründe für die detektierten Doppelbanden sein. Ein *Knock-down* der Rho-Proteine in NK-Zellen könnte Aufschluss über die Bindung des monoklonalen RhoA-Antikörpers geben. Massenspektrometrische Analysen der Proteine aus den Doppelbanden könnten helfen, detaillierte Auskünfte über die Proteine zu erhalten. Auf Ebene der Gensequenzen könnten Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) zur Aufklärung des Problems beitragen. Über Formveränderung durch Aktinumsstrukturierung haben Zellen die Fähigkeiten, auf Umwelteinflüsse und chemische Reize zu reagieren. Solche Aktinumsstrukturierungen sind während des Wanderungsprozesses essentiell. Die Migration kann in drei Schritte unterteilt werden. Zu Beginn treibt eine Zelle die Membran vorwärts, indem sie das Aktin-Netzwerk an ihrer vorderen Seite orientiert und reorganisiert. Im Anschluss haftet die Zelle an der Vorderkante am Substrat und löst sich am Zellkörper und an der Rückseite vom Untergrund ab. Schließlich ziehen kontraktile Kräfte, die größtenteils durch die Wirkung des Aktomyosin-Netzwerks erzeugt werden, die Zelle nach vorne (Ananthakrishnan und Ehrlicher, 2007). Um diese Prozesse zu gewährleisten, sind schnelle Umsätze von Aktin am Zytoskelett notwendig (Hohmann und Dehghani, 2019).

Aktin-Depolymerisierungsfaktoren, wie ADF-Proteine und Cofilin, sind wesentliche Modulatoren der Aktindynamik in eukaryotischen Zellen. Die essentiellen ADF-/Cofilin-Proteine werden in allen Eukaryoten in drei Formen exprimiert: ADF, Cofilin-1 (CFL-1), als Hauptform im nichtmuskulären Gewebe, und Cofilin-2, die Hauptform im Muskel. Während CFL-1 ursprünglich als Protein angesehen wurde, das Aktinfilamente abtrennt und depolymerisiert, kennt man heute seine vielfältigeren Rollen bei der Regulierung des Aktinpools. Ob Cofilin den Aufbau oder Abbau von Aktin fördert, hängt von der Konzentration von Cofilin im Verhältnis zum Aktin ab (Vantroys *et al.*, 2008). *In-vitro*-Studien haben gezeigt, dass bei geringerer Konzentration von Cofilin im Verhältnis zu Aktin ein kontinuierlicher Abbau von Filamenten dominiert (Andrianantoandro und Pollard, 2006). Eine höhere Konzentration von Cofilin im Verhältnis zu Aktin fördert den Aufbau und die Stabilisierung von F-Aktinfilamenten (Chan *et al.*, 2009). Interessanterweise hemmt die Phosphorylierung von CFL-1 an der Ser3, seine Bindung an F-Aktin (Bamburg, 1999). Die Phosphorylierung kann über verschiedene Kinasen und Phosphatasen reguliert werden. Zu den Kinasen gehören unter anderem die LIM-Kinasen (LIMK). Interessanterweise ist die LIMK ein Ziel von Rho-GTPasen (Bernard, 2007). Li *et al.* konnten zeigen, dass es durch Leptin über den RhoA-ROCK- und LIMK-Signalweg zur Phosphorylierung von CFL-1 kommt (Li *et al.*, 2014).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Stimulationsversuche konnten keinen konzentrations- bzw. zeitabhängigen Einfluss von Leptin auf CFL-1, pCFL-1 und die Relation zueinander aufzeigen. Analysen der primären humanen NK-Zellen wiesen auch keine signifikanten Unterschiede zwischen normalgewichtigen und adipösen Blutspender*innen auf. Es muss berücksichtigt werden, dass bei adipösen Menschen nicht nur die Leptinkonzentrationen erhöht sind, sondern auch Interleukine und weitere Hormone in veränderter Konzentration vorliegen (Ngo *et al.*, 2015). Zudem sind Phosphorylierungen an Proteinen sehr schnelle Vorgänge, die sich innerhalb von Minuten ändern können. Es ist zu vermuten, dass sich aus der Kombination der erhöhten Zytokine und Adipokine eine negative Auswirkung auf NK-Zellen ergibt. Zusätzlich sollte in Betracht gezogen werden, dass weitere Proteine, wie Destrin, Coronin 1A und weitere Mitglieder der ADF-/Cofilin-Familie am Umbauprozess des Aktins beteiligt sind (Bamburg, 1999).

Aus diesem Grund ist es wichtig, weitere Untersuchungen an Proteinen der ADF-Familie durchzuführen.

Intrazytoplasmatische Phosphatasen wie die Slingshot-Phosphatasen-1 (SSH-1) reaktivieren CFL-1 durch Dephosphorylierung (Mizuno, 2013). Die SSH-1 gehört zur Familie der Slingshot-Homologen von Phosphatasen, welche an dem Auf- und Abbau von Aktin beteiligt sind. Die SSH-Proteine dephosphorylieren und aktivieren CFL-1, welches anschließend an Aktinfilamente bindet. Damit spielt die SSH-1 eine wichtige

Rolle bei der Migration von Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass Insulin über den Phosphoinositol-3-Kinase-Weg die SSH aktivieren kann und über die Dephosphorylierung von CFL-1 einen Einfluss auf die Migration hat (Chen *et al.*, 2017; Nishita *et al.*, 2004). Studien die einen Einfluss von Leptin auf die SSH-1 nachweisen, konnten nicht gefunden werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die dosis- und zeitabhängige Wirkung von Leptin auf diese Phosphatase untersucht. Entsprechend den Ergebnissen der Untersuchungen an CFL-1 konnte in drei unabhängigen Experimenten in NK-92-Zellen kein Einfluss von Leptin beobachtet werden. Mögliche Ursachen für diese Ergebnisse könnten zu lange Inkubationszeiten gewesen sein. Analog den schnellen Phosphorylierungsprozessen am CFL-1, könnte der Umsatz der SSH-1 auch in kurzen Zeitspannen erfolgen. Ferner könnten die gewählten Leptinkonzentrationen zu gering gewesen sein. Eine Mehrzahl an verschiedenen Leptinkonzentrationen und kürzere Zeitintervalle könnten mehr Aufschluss über die Wirkung von Leptin auf die SSH-1 geben. Auch hier sollte der Einfluss von weiteren Adipozytokinen und Interleukinen untersucht werden.

Außerdem wurde erstmals der Einfluss von Leptin auf Filopodien und das Ausmaß morphologischer Veränderungen in NK-Zellen untersucht. In *In-vitro*-Experimenten mit NK-92-Zellen wurde der Einfluss von Leptin auf Parameter der Zellmotilität, wie Filopodienlängen und Umfang der NK-Zelle untersucht. Filopodien gelten als das einfachste Protrusionswerkzeug während der Zellbewegung und enthalten große Mengen an Aktinfilamenten (Agnew *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass Filopodien die Zellmigration beeinflussen (Jacquemet *et al.*, 2015). Eine Schlüsselfunktion der Filopodien besteht darin, die extrazelluläre Matrix (ECM) zu erkunden. Dabei verwenden Zellen Filopodien, um die ECM-Topographie sowie die ECM-Festigkeit zu erfassen (Chan und Odde, 2008; Morgan *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2012). In der Gruppe der Kurzzeitstimulationen (30 min) wiesen die Zellen, welche mit physiologischen Leptinkonzentrationen (10 ng/ml) inkubiert wurden signifikant kürzere Filopodien gegenüber Kontrollgruppen und pathophysiologischen Leptinkonzentrationen (100 ng/ml) auf. Dieses Ergebnis kann auf ein verändertes Migrationsverhalten dieser NK-92-Zellen hindeuten. Xue *et al.* zeigten Veränderungen der Filopodien während des Zellmigrationszyklus in B16F1-Mäusemelanomzellen (Xue *et al.*, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass während der Protrusionsphase Filopodien initiiert wurden, sich verlängerten und innerhalb des Lamellopodiums blieben. Während der Rückzugsphase wuchsen die projizierten Filopodien beständig, während die Lamellopodiumkante zur Filopodienbasis zurückgezogen wurde. Darüber hinaus nahm die Anzahl der stationären Filopodien zu und ab, während sich die Zelle bewegte (Xue *et al.*, 2010).

Es ist zu berücksichtigen, dass in der vorliegenden Studie lediglich zwei Zeitpunkte untersucht werden konnten. Angesichts der relativ kurzen Sequenzen von Zellmigrationszyklen und der damit einhergehenden Veränderung der Filopodienlänge innerhalb weniger Minuten sollten künftige Studien die zeitabhängige Dynamik von NK-Zellmigrationsmustern untersuchen. Eine zeitliche- und konzentrationsabhängige Wirkung von Leptin auf den Zellumfang von NK-92-Zellen konnte nicht beobachtet werden.

Allerdings sind Formveränderungen von Zellen wichtige Voraussetzungen für Zellmigration. Somersalo *et al.* konnten morphologische Veränderungen menschlicher NK-Zellen während der Migration auf mit Fibronectin beschichteten Filtern aufzeigen. Hierbei zeigte sich, dass die runde Form der Zellen während der Migration durch die Filter hindurch verloren ging und die Ausbreitung der Zelle zunahm (Somersalo und Saksela, 1991). Im Hinblick auf unsere Ergebnisse ist zu beachten, dass in dieser Arbeit nur der Umfang einer Zelle ermittelt wurde. Eine 3D-Zelle wurde auf 2D-Bilder projiziert und ausgewertet. Damit fehlt die Möglichkeit, Formveränderungen in einer weiteren Ebene zu ermitteln. Es ist auch denkbar, dass sich die Form einer Zelle ändert, ohne dass sich dies quantifizierbar auf den Zellumfang auswirkt.

Die räumliche Nähe von Proteinen, welche an Aktin binden, wie CFL-1, ist eine wesentliche Voraussetzung für ihre Wirkung am Aktin. CFL-1 ist ein kleines 19kDa großes Protein, das frei in Zellen diffundiert und in mehreren Zellkompartimenten vorkommt. Der Serinrest 3 am CFL-1 ist die Hauptphosphorylierungsstelle, welche an der Regulation von CFL-1 beteiligt ist. Die Phosphorylierung an diesem Serinrest beeinträchtigt die Cofilin-Aktin-Wechselwirkung (Song *et al.*, 2006).

Studien mit Immunfluoreszenzmikroskopie an fixierten Karzinomzellen ergaben, dass die beiden Hauptformen CFL-1 und pCFL-1 in der Zelle unterschiedlich verteilt sind. CFL-1 befindet sich in lokomotorischen und invasiven Vorsprüngen wie Lamellopodien und Invadopodien in beweglichen Epithel- und Karzinomzellen, während das pCFL-1 gleichmäßiger im gesamten Zytoplasma verteilt ist (Song *et al.*, 2006; Delorme *et al.*, 2007; Bravo-Cordero *et al.*, 2013). Im Prozess der Apoptose einer Zelle kommt es zu Lokalisationsveränderungen von CFL-1 in den Zellkern und in die Mitochondrien (Chua *et al.*, 2003; Grzanka *et al.*, 2011).

Um den Einfluss von Leptin auf die Kolokalisation von CFL-1 und F-Aktin zu analysieren, wurden NK-92-Zellen kurzzeitig (30 min) und länger (24 h) mit physiologischen (10 ng/ml) und pathophysiologischen (100 ng/ml) Leptinkonzentrationen inkubiert und immunhistochemisch markiert. Für die Auswertung wurde Regionen von Interesse (ROI) definiert und die Überlappung der Fluoreszenzen für beide Proteine in diesen Regionen ermittelt. Mit Hilfe der Kolokalisationskoeffizienten nach Manders ermittelten wir die fraktionierte Kolokalisation für CFL-1 und F-Aktin. Die Ergebnisse wiesen auf einen

zeitabhängigen Effekt der Kolo-kalisation von CFL-1 zu F-Aktin hin. Dabei zeigte sich eine ca. 10 %ige Reduktion der Kolo-kalisation in allen Gruppen der Langzeitstimulation (24h). Zudem wiesen die Stimulationsgruppen mit 10 ng/ml Leptin für 24 h eine deutliche, aber nicht signifikante verminderte Kolo-kalisation gegenüber der korrespondierenden Kontrollgruppe (24 h) auf. CFL-1 als Schlüsselregulator der Aktindynamik am vorderen Ende migrierender Zellen spielt eine wesentliche Rolle. Seine Funktion ist in der Zelle streng reguliert. Seine räumliche Nähe zu F-Aktin ist ein wesentlicher Bestandteil bei der Regulation von Aktin (DesMarais *et al.*, 2005). Auf molekularer Ebene wird die Bindung an Aktinmonomeren bzw. an Aktinfilamente durch Phosphorylierung und pH geregelt (Bernstein *et al.*, 2000). Die Wirkung von CFL-1 beruht auf der Fähigkeit, kooperativ an F-Aktin zu binden und konzentrationsabhängig die Stabilisierung und Destabilisierung der Aktin-Wechselwirkung zu fördern (McGough *et al.*, 1997).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass die Kurzzeitbehandlung (30 min) mit Leptin in physiologischer Konzentration (10 ng/ml) die Annäherung von CFL-1 und F-Aktin in NK-92-Zellen erhöht. Eine nähere Beziehung könnte die Zellmigration erleichtern. Dieses Ergebnis unterstützt ferner eine positive Wirkung von Leptin auf die NK-Zellmorphologie in einer gesunden Mikroumgebung. Pathophysiologische (100 ng/ml) Leptinkonzentrationen wiesen insgesamt eine geringere Kolo-kalisation von CFL-1 und F-Aktin auf, was auf eine weniger nahe Beziehung der beiden Proteine hindeuten könnte.

Allerdings stellt die Detektion von benachbarten Proteinen noch keinen Beweis einer biochemischen Wechselwirkung dar. Zusätzlich ist die Bewertung der Kolo-kalisation in der vorliegenden Studie anfällig für die Auflösungsgrenzen eines Konfokalmikroskops. Theoretisch liegen die lateralen und axialen Auflösungen, die bei optimaler Verwendung mit konfokalen Mikroskopen erreicht werden können, bei 180 nm bzw. 500 nm (Schermelleh *et al.*, 2010). Hingegen konnten Ngo *et al.* mit Hilfe eines Hochgeschwindigkeits-Rasterkraftmikroskops zeigen, dass CFL-1 gebundene Aktinfilamente nur 2 nm dicker sind als die entsprechenden Aktinfilamente ohne gebundenes CFL-1 (Ngo *et al.*, 2015). Darüber hinaus wurden 3D-Zellen in 2D-Bilder abgebildet und durch Zusammenlegung von mehreren Bildebenen das Bild konstruiert. Daher können durchscheinende Signale von tieferliegenden Ebenen nicht ausgeschlossen werden.

Mit elektronenmikroskopischen Bildern oder Aufnahmen an einem STED-Mikroskop könnten detailliertere Aussagen getroffen werden (Nagaoka *et al.*, 1995; Rak *et al.*, 2011).

Weitere Studien in NK-Zellen sind erforderlich, um den Beitrag von Leptin zur Interaktion von CFL-1 und Aktin zu untersuchen. Molekularbiologische Untersuchungen können Aufschluss darüber geben, inwieweit Leptin die Bindung von CFL-1 an F-Aktin

beeinflusst. Zusätzlich muss in Betracht gezogen werden, dass weitere Proteine, wie Destrin, Coronin 1A und andere Mitglieder der ADF-/Cofilin-Familie, am Umbauprozess des Aktins beteiligt sind und möglicherweise einen kompensierenden Effekt darstellen (Bamburg, 1999). Auf Grund der vermehrten Fettgewebsmasse bei adipösen Menschen wird vermutet, dass die Fettzellen einem erhöhten mechanischen Stress und Zellstress unterliegen und sich daraus eine vermehrte Freisetzung von freien Fettsäuren und Zytokinen ergibt (Weisberg *et al.*, 2003). Zusätzlich werden vermehrt Immunzellen rekrutiert und eine lokale und systemische leichte Entzündung verursacht (Gregor und Hotamisligil, 2011). Die systemische Wirkung von Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) in adipösen Menschen steht im Fokus heutiger Forschung (Winkler *et al.*, 2003; Kern *et al.*, 2018; Hoffmann *et al.*, 2019). Der gemeinsame Effekt von IL-6, TNF- α und Leptin auf NK-Zellen und ihre Migrationsfähigkeit sollte daher untersucht werden.

In diesem Zusammenhang sind die *Suppressor-of-Cytokine-Signaling*-Proteine, wie CIS und SOCS1-7, besonders zu erwähnen. Als negative Rückkopplung von Interleukinrezeptoren und Leptinrezeptoren spielen sie eine wichtige Rolle bei der Regulation und Differenzierung von Immunzellen (Bjørnbæk *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2017; Krebs und Hilton, 2001; Yoshimura *et al.*, 2007). Studien haben bereits gezeigt, dass den SOCS-Proteinen eine wesentliche Bedeutung als physiologischer Regulator des angeborenen und erworbenen Immunsystems zukommt. Diese Moleküle regulieren positiv und negativ die Aktivierung von Makrophagen und dendritischen Zellen, sind für die Entwicklung und Differenzierung von T-Zellen essentiell (Yoshimura *et al.*, 2007) und können die NK-Zellantwort regulieren (Keating und Nicholson, 2019). Daher wäre es interessant, diese Proteine in weiterführenden Studien zu adressieren.

Zur Untersuchung der Wirkung von Adipozytokinen auf Genregulationen könnten Analysen von MicroRNAs hilfreich sein (Iacomino und Siani, 2017; Leong *et al.*, 2012; Yao *et al.*, 2010). MicroRNAs (miRNAs) sind eine Gruppe von nichtcodierenden, kurzen RNAs, welche eine Größe von 20–25 Nucleotiden aufweisen. Sie sind ein wichtiger Bestandteil bei der Genregulierung und Gegenstand vieler Untersuchungen (He und Hannon, 2004; Chen und Meister, 2005; Wahid *et al.*, 2010). Studien weisen darauf hin, dass Leptin die Regulation von MicroRNAs beeinflusst und darüber auch bestimmte Funktionen von NK-Zellen beeinflussen könnte. So konnten Shirshv *et al.* aufzeigen, dass Leptin konzentrationsabhängig eine signifikante Reduktion von miRNA-29a und miRNA-378b in NK-Zellen hervorruft. Diese miRNAs sind in Zytotoxizität von NK-Zellen involviert (Shirshv *et al.*, 2017). Weitere Untersuchungen machten deutlich, dass die miRNA-1245 den aktivierenden Rezeptor NKG2D herunterreguliert und die Expression der Zytokine Perforin-1 und Granzym durch die miRNA-27a beeinträchtigt wird (Kim *et al.*, 2011; Espinoza *et al.*, 2012). Außerdem zeigten Ninio-Many *et al.* bereits auf, dass

miRNAs in Prostatakarzinomzellen einen Einfluss auf molekulare Mechanismen im Rahmen der Fortbewegung haben (Ninio-Many *et al.*, 2014). Durch Leptin verursachte Veränderungen in der Zellbiomechanik könnten einen weiteren interessanten Ansatz für die Untersuchung der Auswirkung von Leptin auf das Migrationsverhalten von NK-Zellen darstellen. Dabei könnten Analysen an einem *Atomic Force Mikroskop* (AFM) behilflich sein. Die Kraftspektroskopie könnte verwendet werden, um Adhäsions-, Elastizitäts- und Oberflächenspannungsveränderung in NK-Zellen zu analysieren. Untersuchungen der Zelloberfläche durch AFM-Techniken können Heterogenitäten mechanischer Eigenschaften der Oberfläche auf Nanoebene und in subzellulären Schichten aufdecken (Lehenkari und Horton, 1999; Kuznetsova *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2018).

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Studie, dass Leptin als Adipozytokin einen konzentrations- und zeitabhängigen Einfluss auf morphologische Veränderungen in NK-92-Zellen aufweist. Signifikant kürzere Filopodien sind das Resultat der Untersuchungen mit physiologischen Leptinkonzentrationen. Zusätzlich legt die Arbeit eine zeitabhängige Reduktion der Kolo-kalisation von CFL-1 und F-Aktin dar. Dies könnten Hinweise auf eine erschwerte Migration von NK-Zellen darstellen und ein Grund für die reduzierte antitumorale Aktivität von NK-Zellen im Rahmen einer Adipositas erklären. Proteinanalysen wiesen keinen eindeutigen Einfluss von Leptin auf Proteine auf, welche mit dem Aktinumbauprozess assoziiert sind. Dennoch sind weitere molekularbiologische, genetische und morphologische Untersuchungen notwendig, um den genauen Mechanismus zu verstehen und mehr Erkenntnisse über die Auswirkung der metabolischen Veränderung bei adipösen Menschen auf NK-Zellen und ihre Funktion zu gewinnen.

6. Zusammenfassung

Eine stetige Zunahme der Adipositasprävalenz in den letzten Jahrzehnten stellt weltweit ein gesundheitliches und sozioökonomisches Problem dar. Personen mit einem erhöhten Body-Mass-Index ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) erleiden vermehrt kardiovaskuläre Erkrankungen sowie Diabetes mellitus Typ 2 und weisen eine gesteigerte Inzidenz für verschiedene Krebserkrankungen wie das Leberzell-, Kolorektal-, Pankreas- und Nierenzellkarzinom auf. Fettgewebe spielt nicht nur eine wichtige Rolle als Energiespeicher, sondern moduliert auch Immunzellen durch die Freisetzung von Adipokinen (vor allem Leptin). Die Produktion sowie die Blutkonzentration von Leptin korrelieren mit der Fettgewebsmenge. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), welche infizierte und veränderte Zellen lysieren können, sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Unter den Leukozyten zählen NK-Zellen zu den am aktivsten migrierenden Zellen. Zellmotilität ist ein hochdynamisches Phänomen, welches auf einen schnellen Umsatz an Aktinfilamenten angewiesen ist. Aktinbindungsproteine (vor allem Cofilin-1) und ihre Regulierung durch GTPasen (RhoA) und Slingshot-Phosphatase-1 (SSH-1) spielen eine wesentliche Rolle bei der Polymerisierung und Depolymerisierung von Aktinfilamenten und damit bei der Zellmigration.

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, den dosis- und zeitabhängigen Einfluss von Leptin auf das Migrationsverhalten von NK-Zellen und den daran beteiligten Proteinen zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden NK-92-Zellen mit humanem rekombinantem Leptin in zwei verschiedenen Konzentrationen (10 ng/ml physiologisch, 100 ng/ml pathophysiologisch) für verschiedene Zeitpunkte stimuliert. Die quantitative Veränderung der Proteine Cofilin-1 (CFL-1), pCofilin-1 (pCFL-1), GTP-RhoA und Slingshot-Phosphatase-1 (SSH-1) wurde in NK-92-Zellen und primären humanen NK-Zellen mittels Western Blot analysiert. Für die Untersuchung des Einflusses von Leptin auf die morphologischen Veränderungen in NK-Zellen und die Kolokalisation von CFL-1 und F-Aktin wurden NK-92-Zellen auf Fibronektin beschichteten Deckgläschen fixiert und mit Fluorochrom gekoppelten Antikörpern sowie Phalloidintoxin und DAPI markiert. Nachfolgend wurden Bilder an einem konfokalen Mikroskop von Leica unter standardisierten Einstellungen aufgenommen und mit Fiji/ImageJ ausgewertet.

Kurzzeitstimulationen (30 min) mit physiologischen Leptinkonzentrationen (10 ng/ml) wiesen signifikant kürzere Filopodienlängen von NK-92-Zellen auf. Einen Einfluss auf den Zellumfang konnte allerdings nicht beobachtet werden. Interessanterweise zeigte sich in der Analyse der fraktionierten Kolokalisation von CFL-1 und F-Aktin eine ca. 10%ige Reduktion in allen Gruppen der Langzeitstimulation (24 h). Zudem wies die Stimulationsgruppe mit 10 ng/ml Leptin für 24 h eine deutliche, aber nicht signifikante

verminderte Kolokalisation gegenüber der korrespondierenden Kontrollgruppe (24 h) auf. Die Stimulationsversuche mit physiologischen (10 ng/ml) und pathophysiologischen (100 ng/ml) Leptinkonzentrationen für die Zeitpunkte 30 min, 60 min, 3 h und 24 h zeigten keinen signifikanten Einfluss von Leptin auf die Expression der Proteine GTP-RhoA, CFL-1, pCFL-1 und SSH-1. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Gruppe mit der Stimulation von 100 ng/ml Leptin für 60 min den geringsten Anteil an pCFL-1 am gesamten zytosolischen CFL-1 erreichte. Die Reduktion war allerdings nicht signifikant ($p = 0,0706$).

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit eine konzentrationsabhängige signifikante Reduktion der Filopodienlängen in NK-92-Zellen und eine zeitabhängige Herabsetzung der Kolokalisation von CFL-1 und F-Aktin. Dies könnte ein Hinweis auf eine erschwerte Migration von NK-Zellen sein und einen Grund für die reduzierte antitumorale Aktivität von NK-Zellen im Rahmen einer Adipositas darstellen.

7. Literaturverzeichnis

- Abarca-Gómez, L. et al. (2017) 'Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults'. *The Lancet*. 390(10113): 2627–2642.
- Abdullah, A. et al. (2010) 'The magnitude of association between overweight and obesity and the risk of diabetes: A meta-analysis of prospective cohort studies'. *Diabetes Res Clin Pract*. 89(3): 309-319.
- Agnew, B. et al. (1995) 'Reactivation of phosphorylated actin depolymerizing factor and identification of the regulatory site'. *J Biol Chem*. (270): 17582–17587.
- Alberts, B. et al. (2002) *Molecular biology of the cell*. 4th ed. Garland Science. New York
- Ananthakrishnan, R. und Ehrlicher, A. (2007) 'The forces behind cell movement'. *Int J Biol Sci*. 3(5): 303-317.
- Andersen, C. J. et al. (2016) 'Impact of Obesity and Metabolic Syndrome on Immunity'. *Adv Nutr*. 7(1): 66-75.
- Andrianantoandro, E. und Pollard, T. D. (2006) 'Mechanism of Actin Filament Turnover by Severing and Nucleation at Different Concentrations of ADF/Cofilin'. *Mol.Cell*. 24(1): 13–23.
- Arber, S. et al. (1998) 'Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase'. *Nature*. 393(6687): 805–809.
- Bamburg, J. R. (1999) 'Proteins of the ADF/Cofilin Family: Essential Regulators of Actin Dynamics'. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 15: 185–230.
- Barry, S. T., Critchley, D. R. (1994) 'The RhoA-dependent assembly of focal adhesions in Swiss 3T3 cells is associated with increased tyrosine phosphorylation and the recruitment of both pp125FAK and protein kinase C- δ to focal adhesions'. *J Cell Sci*. 107(7): 2033-2045.
- Bauer, S. (1999) 'Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA'. *Science*. 285(5428): 727-729.
- Bernard, O. (2007) 'Lim kinases, regulators of actin dynamics'. *Int J Biochem Cell Biol*. 39(6): 1071-1076.
- Bernstein, B. W. et al. (2000) 'Intracellular pH modulation of ADF/cofilin proteins'. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 47(4): 319-336.
- Bi, D. et al. (2005) 'Contractile Properties of the Cultured Vascular Smooth Muscle Cells: The Crucial Role Played by RhoA in the Regulation of Contractility'. *Circ Res*. 96(8): 890-897.
- Bjørnbæk, C. et al. (1999) 'The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance'. *J Biol Chem*. 274(42): 30059-30065.
- Bravo-Cordero, J. J. et al. (2013) 'Spatial regulation of RhoC activity defines protrusion formation in migrating cells'. *J Cell Sci*. 126(15): 3356-3369.

- Bryceson, Y. T. et al. (2006) 'Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells'. *Immunol Rev.* 214: 73-91.
- Caligiuri, M. A. (2008) 'Human natural killer cells'. *Blood.* 112(3):461-469.
- Calle, E. E. et al. (2003) 'Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults'. *N Engl J Med.* 348(17): 1625-1638.
- Cava, A. L. und Matarese, G. (2004) 'The weight of leptin in immunity'. *Nat Rev Immunol.* 4(5): 371-379.
- Chan, C., et al. (2009) 'Cofilin dissociates Arp2/3 complex and branches from actin filaments'. *Curr Biol.* 19(7): 537-545.
- Chan, C. E. und Odde, D. J. (2008) 'Traction dynamics of filopodia on compliant substrates'. *Science.* 322(5908): 1687-1691.
- Chen, C. et al. (2017) 'Slingshot-1L, a cofilin phosphatase, induces primary breast cancer metastasis'. *Oncotarget.* 8(39): 66195-66203.
- Chen, P. Y. und Meister, G. (2005) 'microRNA-guided posttranscriptional gene regulation'. *Biol Chem.* 386(12): 1205-1218.
- Chua, B. T. et al. (2003) 'Mitochondrial translocation of cofilin is an early step in apoptosis induction'. *Nat Cell Biol.* 5(12): 1083-1089.
- Delorme, V. et al. (2007) 'Cofilin activity downstream of Pak1 regulates cell protrusion efficiency by organizing lamellipodium and lamella actin networks'. *Dev Cell.* 13(5): 646-662.
- Deng, X. et al. (2018) 'Application of atomic force microscopy in cancer research'. *J Nanobiotechnology.* 16(1): 102.
- DesMarais, V. et al. (2005) 'Cofilin takes the lead'. *J Cell Sci.* 118(1): 19-26.
- Espinoza, J. L. et al. (2012) 'Human microRNA-1245 down-regulates the NKG2D receptor in natural killer cells and impairs NKG2D-mediated functions'. *Haematologica.* 97(9): 1295-1303.
- Fernández-Riejos, P. et al. (2010) 'Role of leptin in the activation of immune cells'. *Mediators Inflamm.* 2010: 568343.
- Ghasemi, A. et al. (2017) 'RhoA/ROCK pathway mediates leptin-induced uPA expression to promote cell invasion in ovarian cancer cells'. *Cell Signal.* 32: 104-114.
- Gismondi, A. und Santoni, A. (2006) 'Migration of NK cells. Lymphocyte Trafficking in Health and Disease., 95-112.
- Gong, J., et al. (1994) 'Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells'. *Leukemia.* 8(4): 652-658.
- Gorska, E. et al. (2010) 'Leptin receptors'. *Eur J Med Res.* 15(2): 50-54.
- Gregor, M. F. und Hotamisligil, G. S. (2011) 'Inflammatory mechanisms in obesity'. *Annu Rev Immunol.* 29: 415-445.

- Grossmann, M. E. et al. (2010) 'Obesity and breast cancer: status of leptin and adiponectin in pathological processes'. *Cancer Metastasis Rev.* 29(4): 641-653.
- Grzanka, D. et al. (2011) 'Actin cytoskeleton reorganization correlates with cofilin nuclear expression and ultrastructural changes in cho aa8 cell line after apoptosis and mitotic catastrophe induction by doxorubicin'. *Ultrastruct Pathol.* 35(3): 130-138.
- He, L. und Hannon, G. J. (2004) 'MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation'. *Nat Rev Genet.* 5(7): 522-531.
- Hoffmann, A. et al. (2019) 'Leptin decreases circulating inflammatory IL-6 and MCP-1 in mice'. *Biofactors.* 45(1) :43-48.
- Hohmann und Deghani (2019) 'The Cytoskeleton-A Complex Interacting Meshwork'. *Cells.* 8(4): 362.
- Huang, T. Y. et al. (2006) 'Cofilin phosphatases and regulation of actin dynamics'. *Curr Opin Cell Biol.* 18(1): 26-31.
- Iacomino, G. und Siani, A. (2017) 'Role of microRNAs in obesity and obesity-related diseases'. *Genes Nutr.* 12:23.
- Jacquemet, G. et al. (2015) 'Filopodia in cell adhesion, 3D migration and cancer cell invasion'. *Curr Opin Cell Biol.* 36: 23-31.
- Jaffe, A. B. und Hall, A. (2005) 'Rho GTPases: biochemistry and biology'. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21: 247-269.
- Jaffe, T. und Schwartz, B. (2008) 'Leptin promotes motility and invasiveness in human colon cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways'. *Int J Cancer.* 123(11): 2543-2556.
- Jan Chalupny, N. et al. (2003) 'ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D'. *Biochem Biophys Res Commun.* 305(1): 129-135.
- Jardé, T. et al. (2011) 'Molecular mechanisms of leptin and adiponectin in breast cancer'. *Eur J Cancer.* 47(1): 33-43.
- Jung, S.-K. et al. (2007) 'Crystal structure of human slingshot phosphatase 2'. *Proteins.* 68(1): 408-412.
- Keating, N. und Nicholson, S. E. (2019) 'SOCS-mediated immunomodulation of natural killer cells'. *Cytokine.* 118: 64-70.
- Kern, L. et al. (2018) 'Obesity-Induced TNF α and IL-6 Signaling: The Missing Link between Obesity and Inflammation-Driven Liver and Colorectal Cancers'. *Cancers (Basel).* 11(1): 24.
- Kim, T.-D. et al. (2011) 'Human microRNA-27a* targets Prf1 and GzmB expression to regulate NK-cell cytotoxicity'. *Blood.* 118(20): 5476-5486.
- Kim, W. S. et al. (2017) 'Suppressor of Cytokine Signaling 2 Negatively Regulates NK Cell Differentiation by Inhibiting JAK2 Activity'. *Sci Rep.* 7:46153.
- Kimura, K. et al. (2000) 'Accumulation of GTP-bound RhoA during cytokinesis and a critical role of ECT2 in this accumulation'. *J Biol Chem.* 275(23): 17233-17236.

- Kivimäki, M. et al. (2017) 'Overweight, obesity, and risk of cardiometabolic multimorbidity: pooled analysis of individual-level data for 120 813 adults from 16 cohort studies from the USA and Europe'. *Lancet Public Health*. 2(6): e277-e285.
- Krebs, D. L. und Hilton, D. J. (2001) 'SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling'. *Stem Cells*. 19(5): 378-387.
- Kurita, S. et al. (2007) 'A pathway of neuregulin-induced activation of cofilin-phosphatase Slingshot and cofilin in lamellipodia'. *J Cell Biol*. 165(4): 465-471.
- Kuznetsova, T. G. et al. (2007) 'Atomic force microscopy probing of cell elasticity'. *Micron*. 38(8): 824-833.
- La Cava, A. (2017) 'Leptin in inflammation and autoimmunity'. *Cytokine*. 98: 51-58.
- La Cava, A. et al. (2004) 'Unraveling the multiple roles of leptin in inflammation and autoimmunity'. *J Mol Med (Berl)*. 82(1): 4-11.
- Lamas, B. et al. (2013) 'Leptin modulates dose-dependently the metabolic and cytolytic activities of NK-92 cells'. *J Cell Physiol*. 228(6): 1202-1209.
- Lang, K. et al. (2003) 'Neurotransmitters regulate the migration and cytotoxicity in natural killer cells'. *Immunol Lett*. 90(2-3): 165-172.
- Lang, K. und Ratke, J. (2009) 'Leptin and Adiponectin: new players in the field of tumor cell and leukocyte migration'. *Cell Commun Signal*. 7: 27.
- Lanier, L. L. (2001) 'Face off--the interplay between activating and inhibitory immune receptors'. *Curr Opin Immunol*. 13(3): 326-331.
- Laue, T. et al. (2015) 'Altered NK cell function in obese healthy humans'. *BMC Obes*. 2: 1.
- Lee, D. et al. (2012) 'Differential dynamics of platelet contact and spreading'. *Biophys J*. 102(3): 472-482.
- Lehenkari, P. P. und Horton, M. A. (1999) 'Single integrin molecule adhesion forces in intact cells measured by atomic force microscopy'. *Biochem Biophys Res Commun*. 259(3): 645-650.
- Leong, J. W. et al. (2012) 'Natural killer cell regulation by microRNAs in health and disease'. *J Biomed Biotechnol*. 2012: 632329.
- Li, Z. et al. (2014) 'Leptin activates RhoA/ROCK pathway to induce cytoskeleton remodeling in nucleus pulposus cells'. *Int J Mol Sci*. 15(1): 1176-1188.
- Mackay, D. J. G. und Halle, A. (1998) 'Rho GTPases'. *J Biol Chem*. 273(33): 20685-20688.
- Madej, T. et al. (1995) 'Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine'. *FEBS Lett*. 373(1): 13-18.
- Maffei, M. et al. (1995) 'Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus'. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92(15): 6957-6960.

- Maffei, M. et al. (1995) 'Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects'. *Nat Med.* 1(11): 1155-1161.
- Manders, E. M. M. et al. (1993) 'Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images', *J. Microsc.* 169(3): 375-382.
- Martín-Romero, C. et al. (2000) 'Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes'. *Cell Immunol.* 199(1): 15-24.
- McGough, A. et al. (1997) 'Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function'. *J Cell Biol.* 138(4): 771-781.
- Mizuno, K. (2013) 'Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation'. *Cell Signal.* 25(2): 457-469.
- Morgan, M. R. et al. (2009) 'Giving off mixed signals--distinct functions of alpha5beta1 and alphavbeta3 integrins in regulating cell behaviour'. *IUBMB Life.* 61(7): 731-738.
- Morice, W. G. (2007) 'The immunophenotypic attributes of NK cells and NK-cell lineage lymphoproliferative disorders'. *Am J Clin Pathol.* 127(6): 881-886.
- Nagaoka, R. et al. (1995) 'Effects of cofilin on actin filamentous structures in cultured muscle cells. Intracellular regulation of cofilin action'. *J Cell Sci.* 108 (2): 581-593.
- Nagata-Ohashi, K. et al. (2004) 'A pathway of neuregulin-induced activation of cofilin-phosphatase Slingshot and cofilin in lamellipodia'. *J Cell Biol.* 165(4): 465-471.
- Nave, H. et al. (2008) 'Resistance of Janus kinase-2 dependent leptin signaling in natural killer (NK) cells: a novel mechanism of NK cell dysfunction in diet-induced obesity'. *Endocrinology.* 149(7): 3370-3378.
- Ngo, K. X. et al. (2015) 'Cofilin-induced unidirectional cooperative conformational changes in actin filaments revealed by high-speed atomic force microscopy'. *Elife.* 4: e04806.
- Ninio-Many, L. et al. (2014) 'MicroRNA miR-125a-3p modulates molecular pathway of motility and migration in prostate cancer cells'. *Oncoscience.* 1(4): 250-261.
- Nishita, M. et al. (2002) 'Stromal cell-derived factor 1alpha activates LIM kinase 1 and induces cofilin phosphorylation for T-cell chemotaxis'. *Mol Cell Biol.* 22(3): 774-783.
- Nishita, M. et al. (2004) 'Phosphoinositide 3-kinase-mediated activation of cofilin phosphatase Slingshot and its role for insulin-induced membrane protrusion'. *J Biol Chem.* 279(8): 7193-7198.
- Niwa, R. et al. (2002) 'Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin'. *Cell.* 108(2): 233-246.
- Nobes, C. D. und Hall, A. (1995) 'Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia'. *Cell.* 81(1): 53-62.
- Ohashi, K. et al. (2000) 'Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop'. *J Biol Chem.* 275(5): 3577-3582.

- Olson, M. F. (2018) 'GTPases, their post-translational modifications, disease-associated mutations and pharmacological inhibitors'. *Small GTPases*. 9(3): 203-215.
- Ostlund, R. E. (1996) 'Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates'. *J Clin Endocrinol Metab*. 81(11): 3909-3913.
- Oswald, J. et al. (2018) 'Leptin affects filopodia and cofilin in NK-92 cells in a dose- and time-dependent manner'. *Eur J Histochem*. 62(1): 2848.
- Paddock, S. W. (2000) 'Principles and practices of laser scanning confocal microscopy'. *Mol Biotechnol*. 16(2): 127-149.
- Parham, P. (2005) 'MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival'. *Nat Rev Immunol*. 5(3): 201-214.
- Park, H.-K. und Ahima, R. S. (2015) 'Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism'. *Metabolism*. 64(1): 24-34.
- Rai, V. und Dey, N. (2011) 'The Basics of Confocal Microscopy', in Wang, C.-C. (ed.) *Laser Scanning*. Rijeka: IntechOpen. 1: 75-96.
- Rak, G. D. et al. (2011) 'Natural killer cell lytic granule secretion occurs through a pervasive actin network at the immune synapse'. *PLoS Biol*. 9(9): e1001151.
- Ridley, A. J. et al. (2003) 'Cell migration: integrating signals from front to back'. *Science*. 302(5651): 1704-1709.
- Ridley, A. J. (2006) 'Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking'. *Trends Cell Biol*. 16(10): 522-529.
- Robertson, M. J. (2002) 'Role of chemokines in the biology of natural killer cells'. *J Leukoc Biol*. 71(2): 173-183.
- Rosenstock, P. (2016) 'Sialic-Acid-Binding Immunoglobulin-Like Lectins auf Natürlichen Killer-Zellen', Masterarbeit, Universität Halle-Wittenberg.
- Rotty, J. D. und Bear, J. E. (2015) 'Competition and collaboration between different actin assembly pathways allows for homeostatic control of the actin cytoskeleton'. *Bioarchitecture*. 5(1-2): 27-34.
- Schermelleh, L. et al. (2010) 'A guide to super-resolution fluorescence microscopy'. *J Cell Biol*. 190(2): 165-175.
- Shah, N. R. und Braverman, E. R. (2012) 'Measuring adiposity in patients: the utility of body mass index (BMI), percent body fat, and leptin'. *PLoS One*. 7(4): e33308.
- Shirshev, S. V. et al. (2017) 'MicroRNA in hormonal mechanisms of regulation of NK cell function'. *Dokl Biochem Biophys*. 474(1): 168-172.
- Siiteri, P. K. (1987) 'Adipose tissue as a source of hormones'. *Am J Clin Nutr*. 45(1): 277-282.
- Somersalo, K. und Saksela, E. (1991) 'Fibronectin facilitates the migration of human natural killer cells'. *Eur J Immunol*. 21(1): 35-42.

- Song, X. et al. (2006) 'Initiation of cofilin activity in response to EGF is uncoupled from cofilin phosphorylation and dephosphorylation in carcinoma cells'. *J Cell Sci.* 119(14): 2871-2881.
- Stewart, C. A. et al. (2006) 'Strategies of natural killer cell recognition and signaling'. *Curr Top Microbiol Immunol.* 298: 1-21.
- Stosel, T. P. et al. (2006) 'Cell surface actin remodeling'. *J Cell Sci.* 119(16): 3261-3264.
- Tilg, H. und Moschen, A. R. (2006) 'Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity'. *Nat Rev Immunol.* 6(10): 772-783.
- Van Keymeulen, A. et al. (2006) 'To stabilize neutrophil polarity, PIP3 and Cdc42 augment RhoA activity at the back as well as signals at the front'. *J Cell Biol.* 174(3): 437-445.
- Vantroys, M. et al. (2008) 'Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation'. *Eur J Cell Biol.* 87(8-9): 649-667.
- Vivier, E. et al. (2008) 'Functions of natural killer cells'. *Nat Immunol.* 9(5): 503-510.
- Vona-Davis, L. und Rose, D. P. (2007) 'Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression'. *Endocr Relat Cancer.* 14(2): 189-206.
- Wahid, F. et al. (2010) 'MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials'. *Biochim Biophys Acta.* 1803(11): 1231-1243.
- Wauters, J. et al. (2017) 'The Leptin Receptor Complex: Heavier Than Expected?'. *Front Endocrinol (Lausanne).* 8: 30.
- Weisberg, S. P. et al. (2003) 'Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue'. *J Clin Invest.* 112(12): 1796-1808.
- Weiss, R. et al. (2004) 'Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents'. *N Engl J Med.* 350(23): 2362-2374.
- Welte, S. et al. (2006) 'Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction'. *Nat Immunol.* 7(12): 1334-1342.
- Winkler, G. S. et al. (2003) 'Expression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha protein in the subcutaneous and visceral adipose tissue in correlation with adipocyte cell volume, serum TNF-alpha, soluble serum TNF-receptor-2 concentrations and C-peptide level'. *Eur J Endocrinol.* 149(2): 129-135.
- World Health Organisation (2018) www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight. Available at: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
- World Health Organization (2000) Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation. Geneva: World Health Organization (WHO technical report series, 894).
- Xue, F. et al. (2010) 'Contribution of Filopodia to Cell Migration: A Mechanical Link between Protrusion and Contraction'. *Int J Cell Biol.* 2010: 507821.

- Yamamoto, M. et al. (2006) 'Identification of multiple actin-binding sites in cofilin-phosphatase Slingshot-1L'. *FEBS Lett.* 580(7): 1789-1794.
- Yao, J. et al. (2010) 'MicroRNA-related cofilin abnormality in Alzheimer's disease'. *PLoS One.* 5(12): e15546.
- Yoshimura, A. et al. (2007) 'SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation'. *Nat Rev Immunol.* 7(6): 454-465.
- Zeidan, A. et al. (2006) 'Essential role of Rho/ROCK-dependent processes and actin dynamics in mediating leptin-induced hypertrophy in rat neonatal ventricular myocytes'. *Cardiovasc Res.* 72(1): 101-111.
- Zhang, Y. et al. (1994) 'Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue'. *Nature.* 374(6521): 479
- Zhao, Y. et al. (2003) 'Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines'. *Biochem Biophys Res Commun.* 300(2): 247-252.
- Zinchuk, V. et al. (2007) 'Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena'. *Acta Histochem Cytochem.* 40(4): 101-111.

8. Thesen

1. Adipositas ist ein weltweit zunehmendes gesundheitliches und sozioökonomisches Problem und geht einher mit dauerhaft erhöhten Konzentrationen von Leptin, sowie einem gesteigerten Risiko für verschiedene Tumorentitäten.
2. An einem schnellen Umsatz von Aktin während der Zellmigration sind verschiedene Proteine wie die GTPase RhoA, Cofilin-1, seine phosphorylierte Form und Slingshot-Phosphatasen beteiligt.
3. Die vorliegende Arbeit hat untersucht, welchen Einfluss eine *In-vitro*-Stimulation mit physiologischen (10 ng/ml) und pathophysiologischen (100 ng/ml) Leptinkonzentrationen über unterschiedlich lange Zeiträume auf die morphologische Veränderungen und die Expression von GTP-RhoA, CFL-1, p-CFL-1 und SSH-1 in NK-92-Zellen hat.
4. In primären NK-Zellen wurde der Einfluss des BMI auf die Expression der Proteine GTP-RhoA, CFL-1, p-CFL-1 untersucht.
5. Eine *In-vitro*-Leptin-Stimulation hatte keinen Einfluss auf den Aktivitätszustand der RhoA GTPase, die Proteinkonzentration von der Slingshot-Phosphatase-1 (SSH-1) sowie auf die Phosphorylierung von Cofilin-1 (CFL-1) in NK-Zellen.
6. Einen Einfluss des BMI auf die Expression der Proteine GTP-RhoA, CFL-1, p-CFL-1 konnte nicht beobachtet werden.
7. Eine kurzzeitige (30 min) Stimulation mit einer physiologischen Leptinkonzentration verursachte signifikant verkürzte Filopodien von NK-92-Zellen.
8. Eine Langzeitstimulation (24 h) mit physiologischer Leptinkonzentration wies eine deutliche Reduktion der fraktionierten Kolokalisation von CFL-1 und F-Aktin auf.
9. Die vorliegende Arbeit zeigte erstmalig einen Einfluss einer physiologischen Leptin Stimulation auf die Filopodienlänge und einen zeitabhängigen Effekt auf die Kolokalisation von CFL-1 und F-Aktin in NK-92-Zellen.

9. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Weltweite Häufigkeit von Adipositas
- Abbildung 2: NK-Zellrezeptoren und ihre zugehörigen Liganden
- Abbildung 3: Regulation von Cofilin durch Rho-GTPasen
- Abbildung 4: Schematische Darstellung der Rolle von ADF/Cofilin
- Abbildung 5: Aktinfilamentendynamik durch Phosphoregulierung von Cofilin
- Abbildung 6: Ponceau-Bild einer 0,2 µm Nitrozellulosemembran mit Proteinen
- Abbildung 7: Schematische Darstellung der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie.
- Abbildung 8: Relative Proteinkonzentrationen der RhoA in stimulierten NK-92-Zellen im Verhältnis zur Kontrolle
- Abbildung 9: Relative Proteinkonzentrationen von CFL-1 und pCFL-1 in stimulierten NK-92-Zellen im Verhältnis zur Kontrolle
- Abbildung 10: Relative Proteinkonzentrationen der SSH-1 in stimulierten NK-92-Zellen im Verhältnis zur Kontrolle
- Abbildung 11: Größe, Gewicht und BMI der Blutspender*innen
- Abbildung 12: Relative Proteinkonzentrationen der GTP-RhoA in normalgewichtigen und adipösen Spender*innen
- Abbildung 13: Relative Proteinkonzentrationen der GTP-RhoA im Vergleich NK-92-Zellen gegenüber primäre NK-Zellen
- Abbildung 14: Relative Proteinkonzentrationen von CFL-1 und pCFL-1 in normalgewichtigen und adipösen Spender*innen
- Abbildung 15: Filopodienlängen (µm) in NK-92-Zellen
- Abbildung 16: Repräsentative NK-92-Zellen (grau skaliert)
- Abbildung 17: Umfang der NK-92-Zellen in µm
- Abbildung 18: Vergrößerte Ansicht einer NK-92-Zelle
- Abbildung 19: Überblick der Verteilung von CFL-1 und F-Aktin in NK-92-Zellen

10. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Zusammensetzung RIPA-Lysepuffer Stocklösung und Arbeitslösung
- Tabelle 2: Zusammensetzung Sammel- und Trenngele
- Tabelle 3: (Anhang zu Tabelle 2) Zusammensetzung Tris-Reagenzien
- Tabelle 4: Zusammensetzung 5-fach konzentriertem Laemmli-Ladepuffer
- Tabelle 5: Zusammensetzung 12,5-fach konzentriertem und 1-fach konzentriertem Transferpuffer
- Tabelle 6: Zusammensetzung Ponceau-S-Lösung
- Tabelle 7: Verwendete Antikörper für Western Blot Untersuchungen
- Tabelle 8: Zusammensetzung 10-fach konzentriertem Waschpuffer (TBS) und 1-fach Konzentriertem Waschpuffer mit Tween (TBST)
- Tabelle 9: Verwendete Substanzen für Immunhistochemie
- Tabelle 10: Minimale und maximale Länge der Filopodien (in μm)
- Tabelle 11: Fraktionelle Kolokalisationskoeffizienten nach Manders in NK-92-Zellen

Selbständigkeitserklärung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema: „Molekularbiologische Untersuchung regulatorischer Proteine des Zytoskeletts von Natürlichen Killerzellen“, selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel angewendet habe. Die Arbeit ist bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungskommission vorgelegt worden.

Halle (Saale)

Jana Oswald

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre hiermit, dass ich bis zu diesem Zeitpunkt keinen vorausgegangenen Promotionsversuch unternommen habe und dass kein Promotionsversuch an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung läuft.

Halle (Saale)

Jana Oswald

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Durchführung und Erstellung meiner Dissertation unterstützt haben.

Für das spannende Thema und die gute wissenschaftliche Beratung danke ich sehr Frau Professorin Heike Kielstein, Leiterin des Instituts für Anatomie und Zellbiologie. Ihre besonnene, kompetente und gutgelaunte Art wird mir stets ein Vorbild sein.

Für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit danke ich Frau Doktor Ina Bähr, Frau Doktor Julia Spielmann, Frau Doktor Maria Schindler, Herr Maximilian Büttner und Herr Philip Rosenstock.

Zudem möchte ich mich für die freundliche und geduldige Unterstützung bei der Einarbeitung und Durchführung meiner Western Blots bei Frau Franziska Knöfel, sowie Frau Melissa Helwig bedanken.

Für die Erstellung und Auswertung der Bilder am Konfokalmikroskop danke ich ausdrücklich Frau Doktor Nadine Bley und Herr Doktor Danny Misiak.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für ihre unermüdlichen Zusprüche und Unterstützung.