

**Medizinische Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

Der Einfluss von Leptin auf die Migration von Natürlichen Killerzellen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

von Trutz-Eckhardt Uwe Hermann Siegfried Fischer

geboren am 16.04.1990 in Schwerte

Betreuerin: Frau Prof. Heike Kielstein

Gutachter*innen:

Frau Prof. Heike Kielstein

Herr Prof. Thomas Tschernig, Homburg / Saar

Herr Prof. Andreas Schmiedl, Hannover

12.07.2021

20.01.2022

Referat

Einleitung

Weltweit nimmt die Anzahl der übergewichtigen und adipösen Menschen zu. Neben anderen Folgeerkrankungen ist bei dieser Gruppe eine erhöhte Inzidenz für bestimmte Tumorarten festgestellt worden. Durch eine Zunahme des Fettgewebes steigt auch die Serumkonzentration der von Adipozyten produzierten Hormone (Adipokine) – eines davon ist Leptin. Es hat neben zentralen Wirkungen, die zu einer Appetitzügelung und Gewichtsreduktionen führen, auch periphere Wirkungen auf Immunzellen, wie z.B. den Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). NK-Zellen sind Zellen des angeborenen Immunsystems und töten virusinfizierte- und Tumorzellen ohne vorherige Sensibilisierung. Es wurde gezeigt, dass NK-Zellen unter der bei Adipositas erhöhten Leptinkonzentration Tumorzellen schlechter lysieren können. Da erhöhte Leptinkonzentrationen auch den Umbau des Aktinnetzwerkes in Zellen hemmen, wird vermutet, dass auch die (Aktin-abhängige) Migration von NK-Zellen beeinflusst wird. Dies wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit untersucht.

Methoden

Mittels Transwell-Migration-Assay wurde die gerichtete Migration der humanen Zelllinie NK-92 unter dem zeit- und dosisabhängigem Einfluss von Leptin zu einem CXCL-12-Gradienten hin untersucht. Die ungerichtete Migration wurde mittels Time-Lapse Live-Cell-Imaging hinsichtlich der Migrationsgeschwindigkeit betrachtet. Immunhistochemische Färbungen viszeraler Fettproben von i.p.-Leptin-behandelten Mäusen wurden in Hinblick auf die NK-Zell-Dichte untersucht. Zudem wurden Adhäsions-Assays mit NK-92-Zellen unter verschiedenen Leptinkonzentrationen und Inkubationszeiten durchgeführt.

Ergebnisse

Die gerichtete und ungerichtete Migration von NK-92-Zellen unter dem zeit- und dosisabhängigen Einfluss von Leptin wird nicht signifikant verändert. Die ungerichtete Migrationsgeschwindigkeit war 3h nach Experimentbeginn tendenziell niedriger als nach 24h.

Es finden sich signifikant mehr NK-Zellen im viszeralen Fettgewebe von *ob/ob*-Mäusen als im subkutanen Fett. Die intraperitoneale Leptingabe führte tendenziell zu einer erhöhten Anzahl von NK-Zellen im viszeralen Fettgewebe. Zudem sind NK-Zellen möglicherweise in der Lage, s.g. „Crown-like-structures“ (CLS) bzw. eine ähnliche räumliche Anordnung im Fettgewebe zu bilden. Bisher ist dies exklusiv für Makrophagen beschrieben worden.

In Adhäsions-Assays wurde unter dem Einfluss von Leptin eine signifikant reduzierte Adhäsionskraft von NK-92-Zellen festgestellt.

Zusammenfassung

Leptin hat einen Einfluss auf den Aktinumbau in Zellen, und damit wahrscheinlich auch einen Einfluss auf die Migrationseigenschaften von NK-Zellen. Die Adhäsion, welche notwendig für eine suffiziente Migration ist, ist unter Leptineinfluss signifikant reduziert. Trotzdem ergaben sich keine Unterschiede in der gerichteten und ungerichteten Migration von NK-92-Zellen unter Leptineinfluss. Möglicherweise sind NK-92-Zellen als immortalisierte Tumorzelllinie nicht oder nur noch in geringem Maße durch Leptin in der Migration beeinflussbar. Die Experimente sollten mit primären NK-Zellen wiederholt bzw. erweitert werden. Zudem sollten weitere Experimente hinsichtlich der möglichen Bildung von CLS durch NK-Zellen erfolgen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite	
1	Einleitung	1
1.1	Übergewicht und Adipositas	1
1.2	Fettgewebe und Leptin	2
1.3	Natürliche Killerzellen	3
1.4	Migration von Immunzellen	5
1.4.1	Extravasation	5
1.4.2	Migration	7
1.5	Mit Adipositas assoziierte Erkrankungen	9
1.5.1	Metabolisches Syndrom und kardiovaskuläre Erkrankungen	9
1.5.2	Diabetes Mellitus Typ II	10
1.5.3	Tumorerkrankungen	10
1.6	Einfluss von Leptin auf NK-Zellen	12
2	Zielstellung	14
3	Material und Methodik	15
3.1	NK-92-Zellen	15
3.2	Transwell-Migration-Assay	15
3.3	Live-Cell-Imaging	20
3.4	Immunhistochemische Färbungen	23
3.5	Adhäsions-Assay	25
3.6	Statistik	25
4	Ergebnisse	27
4.1	Transwell-Migration-Assay	27
4.2	Live-Cell-Imaging	28
4.3	Immunhistochemische Färbungen	29
4.3.1	Verteilungsmuster der NK-Zellen	29
4.3.2	Potentielle Ausbildung von „Crown-Like-Structures“ durch NK-Zellen	31
4.4	Adhäsions-Assay	33
5	Diskussion	38
6	Zusammenfassung	47
7	Literaturverzeichnis	49
8	Thesen	58

Anhang

Selbstständigkeitserklärung mit Unterschrift

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Abkürzungsverzeichnis

ADF	Actin Depolymerizing Factor
AgRP	Agouti-related peptide
APC	Antigen-Presenting-Cells
BMI	Body Mass Index
CAM	Cell Adhesion Molecule
CCL-2	CC-Chemokin-Ligand-2
CLS	Crown-Like-Structures
CXCL-12	CXC-Motiv-Chemokin 12
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
EZM	Extrazellulärmatrix
GH	Growth Hormone
GluT4	Glukosetransporter 4
IGF	Insulin-Like Growfactor
IGFBP-1/2	Insulin-Growth-Factor-Binding-Proteine 1 und 2
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon- γ
KAR	Killer Activation Receptor
KHK	Koronare Herzkrankheit
KIR	Killer Cell Immunoglobulin Like Receptor
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMP	Matrix-Metallo-Proteasen
Mrd.	Milliarden
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NPY	Neuropeptid Y
PBS	Phosphate Buffered Saline
PECAM-1	Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule
PFA	Paraformaldehyd
POMC	Proopiomelanocortin

RBP4	Retinol-Bindendes Protein 4
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SHBG	sex-hormone-binding globulin
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
WHO	World Health Organization
WHR	Waist-Hip-Ratio
z.Zt.	zur Zeit
17 β -HSD	17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase

Der Einfluss von Leptin auf die Migration von Natürlichen Killerzellen

1 Einleitung

1.1 Übergewicht und Adipositas

Normalgewicht, Übergewicht und Adipositas sind definiert durch den BMI (Body-Mass-Index), welcher das Verhältnis zwischen dem Gewicht einer Person in kg und seiner Körpergröße in Metern zum Quadrat (kg/m^2) beschreibt. Ein BMI von 18,5 bis 24,9 kg/m^2 steht für Normalgewicht, 25-29,9 kg/m^2 bedeuten Übergewicht. Ab einem Wert von ≥ 30 kg/m^2 spricht man von Adipositas (WHO, World Health Organization 2015). Obwohl der BMI stark mit dem Körperfettanteil korreliert (Gallagher et al. 1996), sollte beachtet werden, dass er nicht immer als alleiniges Kriterium der Gewichtsgruppen-Definition herangezogen werden sollte, da er keine Aussagen über die Verteilung von Fett- oder Muskelanteil im Körper trifft. So hatte z.B. Arnold Schwarzenegger, als er „Mr. Universe“ wurde, einen BMI von 30 kg/m^2 (Krasniewicz und Blitz 2006). Deshalb gibt es zusätzliche Indices wie den Hüftumfang oder die Waist-Hip-Ratio (WHR), bei der das Verhältnis zwischen Taillen- und Hüftumfang angegeben wird. Sie können, in Kombination mit dem BMI, eine bessere Aussage über die Menge und Verteilung des Körperfettanteils und den resultierenden Gesundheitsrisiken (s. 1.5) treffen (Després 2011; Shields et al. 2012).

Übergewicht und Adipositas sind nicht nur ein gesundheitliches Problem, sondern zunehmend auch ein ökonomisches. So lag beispielsweise die Gesamtkostenbelastung des deutschen Gesundheitssystems durch Behandlung von Übergewicht sowie Folgeerkrankungen im Jahre 2003 bei mindestens 13 Mrd. Euro (Knoll und Hauner 2008). In den USA lag die Summe für den gleichen Zeitraum zwischen 93 – 117 Mrd. Dollar (Wyatt et al. 2006).

Nach Daten der World Health Organization (WHO) hat sich die weltweite Anzahl der Adipösen seit 1980 mehr als verdoppelt, 2014 waren mehr als 1,9 Mrd. Menschen übergewichtig, davon über 600 Mio. adipös. Im Jahr 2013 gab es 42 Mio. Kinder unter fünf Jahren weltweit, die übergewichtig oder adipös waren. Dabei ist Übergewicht und Adipositas nicht mehr nur ein Problem der Industrienationen, auch in Ländern mit geringem und mittlerem Einkommen gibt es steigende Zahlen (WHO 2015).

Ursache von Übergewicht und Adipositas sind eine Differenz zwischen Energiezufuhr und -verbrauch. Wird dem Körper im Mittel mehr Energie zur Verfügung gestellt als er

verbraucht, wird diese u.a. als Fettreserve gespeichert. Die Ursache der weltweiten Zunahme von Übergewicht wird v.a. in der vermehrten Einnahme von hochkalorischen Mahlzeiten und der Abnahme körperlicher Aktivitäten gesehen (Wright und Aronne 2012; Sahoo et al. 2015).

Mit einem erhöhten BMI steigen die Risiken für Typ-II-Diabetes, kardiovaskuläre Krankheiten, Probleme des Stütz- und Bewegungsapparates sowie für einige Krebsarten (Wilson et al. 2002; Calle 2007; Stofkova 2009; Ligibel 2011; Ligibel und Strickler 2013). Des Weiteren beeinflusst Fettgewebe als endokrines Organ die Immunfunktionen und Entzündungsprozesse des Körpers (Fantuzzi 2005; Stofkova 2009).

1.2 Fettgewebe und Leptin

Fettgewebe ist eine Form des Bindegewebes, welches aus verschiedenen Zellarten besteht - den Hauptanteil bilden die namensgebenden Adipozyten (Fettzellen). Grundsätzlich kann es in weißes und braunes Fettgewebe unterteilt werden. Braunes Fettgewebe zeigt sich histologisch multivakuolär, da es aus vielen kleinen Lipidtropfen besteht. Man findet es bei Säuglingen, wo es der zitterfreien Wärmeerzeugung durch Entkopplung der Atmungskette dient. Weißes Fettgewebe ist univakuolär und enthält pro Zelle nur einen großen Lipidtropfen. Es bildet den Hauptanteil des Fettgewebes im Menschen und beträgt im Idealfall bei jungen Frauen weniger als 33 %, bei jungen Männern weniger als 20% des Körpergewichts (Gallagher et al. 2000). Die Energiespeicher-, Isolier- und Polstereigenschaften des Fettgewebes sind gut erforscht, so dass mittlerweile die endokrinen Funktionen in den Fokus weltweiter intensiver Forschung gerückt sind. Hier spielt besonders das viszerale Fettgewebe eine entscheidende Rolle (Fantuzzi 2005; Gil et al. 2011; Guzik et al. 2017).

Fettzellen sind in der Lage, Hormone zu produzieren (s.g. Adipokine). Zu diesen gehört insbesondere Leptin. Es ist ein Hormon, welches durch das *ob*-Gen kodiert und hauptsächlich von Adipozyten produziert wird. Dabei steht das Körpergewicht in direkter positiver Korrelation mit der Leptinserumkonzentration (Zhang et al. 1994; Maffei et al. 1995; Stofkova 2009). Es gibt bisher keine Definition einer „normalen“ Leptinkonzentration, aber verschiedenen Studien zeigen Werte für normalgewichtige, gesunde Menschen bei $\leq 10\text{ng/ml}$ (Krempler et al. 1998; Silha et al. 2003; Al Maskari und Alnaqdy 2006). Es ist Teil eines negativen-Feedback-Mechanismus, welcher die Regulation des Körpergewichts steuert. Leptin wirkt im Hypothalamus über eine Hemmung der Produktion von NPY (Neuropeptid Y) und AgRP (Agouti-related peptide) sowie durch eine erhöhte Produktion des Hormons POMC (Proopiomelanocortin), so dass Appetit und Nahrungsaufnahme verringert und der

Energieverbrauch gesteigert werden (Schwartz et al. 2000).

Normalerweise führt eine Gewichtszunahme auch zu einer Zunahme des Leptinspiegels im Blut. Dieses löst eine biologische Antwort aus, welche zu einer negativen Energiebilanz führt (Verringerung der Nahrungsaufnahme, Zunahme des Sympathikotonus sowie des Energieverbrauchs) (Friedman 2002). In Mausversuchen konnte gezeigt werden, dass die subkutane (s.c.) Gabe von Leptin zu einer konzentrationsabhängigen Gewichtsreduktion geführt hat (Halaas et al. 1997; Kovalszky et al. 2010).

Analog verhält es sich bei Gewichtsabnahme: eine sinkende Leptinkonzentration führt zu einer positiven Energiebilanz. Dabei führt nicht nur die reine Hormonkonzentration zu einer Reaktion, sondern auch die Sensitivität der Leptinrezeptoren (Friedman 2002; Nave et al. 2008). Das bei vielen adipösen Individuen die Leptinkonzentration erhöht ist und gleichzeitig die Fettmasse konstant bleibt oder steigt, wird einer relativen Leptinresistenz zugeschrieben (Halaas et al. 1997; Schwartz et al. 2000).

Ein besonders interessantes Fallbeispiel sei hier kurz vorgestellt: ein zweieinhalb Jahre altes Kind fiel durch eine ungebremste Gewichts- und Fettgewebszunahme auf. Bei seiner Vorstellung im Universitätsklinikum Ulm wurden ein BMI von 38,6 kg/m² sowie ein ungezügelter Appetit festgestellt. Untersuchungen zeigten, dass zwar Leptin in einer hohen Konzentration (42,6 ng/ml) gemessen werden konnte, jedoch war dieses aufgrund einer Mutation im Lep-Gen (Pendang des murinen Ob-Gens) funktionslos – eine massive Gewichtszunahme war die Folge. Erst durch die Behandlung mit rekombinantem humanen Leptin konnten sowohl eine Normalisierung des Gewichts, als auch der Essgewohnheiten erreicht werden (Wabitsch et al. 2015).

1.3 Natürliche Killerzellen

NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) stammen aus dem Knochenmark und gehören zu den Lymphozyten, zu denen man weiterhin auch T- und B-Zellen zählt. Sie können Tumor- und virusinfizierte Zellen ohne vorherige Sensibilisierung lysieren und Apoptose auslösen. NK-Zellen machen in gesunden Menschen einen Anteil von ca. 10-15 % aller Lymphozyten aus und sind definiert durch die Expression des Zell-Oberflächenmarkers CD56 und dem Fehlen von CD3 (CD56⁺/CD3⁻) (Cooper et al. 2001).

Humane NK-Zellen kann man anhand der Dichte des Oberflächenproteins CD56 weiter unterscheiden in CD56^{bright} und CD56^{dim}. Die Mehrheit bildet die CD56^{dim} – Gruppe (~ 90%), welche weniger CD56 exprimiert als die CD56^{bright} – Zellen (~ 10%). Die CD56^{dim} – Zellen sind dabei v.a. zytotoxisch, während die CD56^{bright} – Zellen hauptsächlich verschiedene Zytokine zur Aktivierung von Monozyten produzieren (Lanier et al. 1986;

Cooper et al. 2001).

NK-Zellen werden zum angeborenen, unspezifischen Immunsystem gezählt. Neuere Studien weisen allerdings darauf hin, dass sich auch NK-Zellen im Laufe des Lebens auch an äußere Einflussfaktoren, wie verschiedene Antigenstrukturen, „erinnern“ können. Diese Eigenschaften konnten sowohl im Mausmodell, als auch im Menschen gezeigt werden (Paust und Andrian 2011; Scheiter et al. 2013; Marcus und Raulet 2013). Bisher waren solche Eigenschaften in Form von Gedächtniszellen nur bei B- und T-Lymphozyten bekannt

Eine NK-Zelle erkennt abzutötende Zielzellen an der Herunterregulierung bestimmter Zell-Oberflächenmoleküle. Fast alle Zellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche s.g. MHC-Proteine (Major Histocompatibility Complex-Proteine), welche der Präsentation von Antigenfragmenten und der Zellkommunikation dienen. Sie werden weiter unterteilt in zwei Klassen: MHC I und MHC II. Die MHC I – Proteine finden sich auf allen kernhaltigen Zellen, MHC II – Proteine nur auf speziellen Zellen des Immunsystems, den APC (Antigen-Presenting-Cells).

Neben den NK-Zellen gibt es eine weitere Killerzellart, die T-Killerzellen. Sie erkennen durch eine Virusinfektion oder einen Tumor veränderte MHC I – Proteine auf einer betroffenen Zelle und töten diese gezielt durch eine Zerstörung der Zellmembran und Apoptose-Induktion ab. Da viele Viren und Tumore aber in der Lage sind, die Expression von MHC I zu reduzieren, können die T-Killerzellen dann nicht aktiv werden – hier beginnt der Aufgabenbereich der NK-Zellen.

NK-Zellen tragen im Gegensatz zu T-Killerzellen keine antigenspezifischen Rezeptoren, sondern vermitteln ihre Funktion über aktivierende und inhibierende Rezeptoren, welche mit den MHC I – Molekülen auf den Zielzellen interagieren. Sie werden zusammengefasst als KIR- (Killer Cell Immunoglobulin Like Receptor) und KAR- (Killer Activation Receptor), zu denen u.a. NKG2D, NKp30, NKp44 und NKp46 gehören. Dieses Prinzip ist als „Missing-self-Hypothese“ bekannt und soll hier kurz erläutert werden: Wenn bei einem NK-Zell – Zielzell – Kontakt mehr inhibitorische als aktivierende Rezeptoren aktiviert werden, dann passiert nichts, da das inhibitorische Signal überwiegt, so z.B. bei Kontakt mit einer gesunden Zelle (s. Abb. 1a). Bei einer infizierten – oder einer Tumorzelle mit reduzierten oder fehlenden MHC I – Proteinen (s. Abb. 1b) überwiegt hingegen das aktivierende Signal, und die NK-Zelle tötet die Zielzelle durch Perforation der Zellmembran und Apoptoseinduktion ab (Kärre 2002).

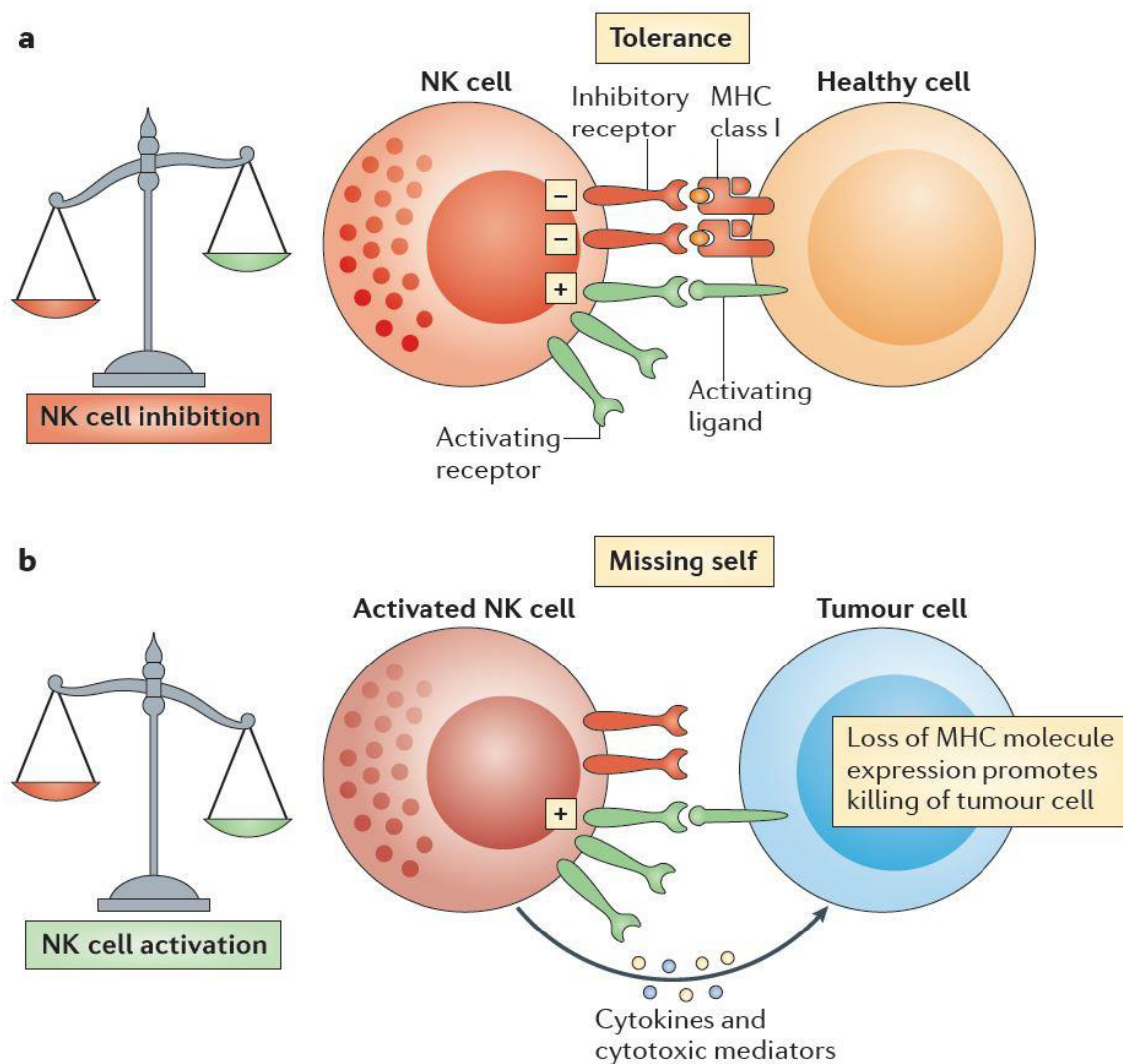


Abbildung 1:
NK-Zellen und die Missing-self-Hypothese (Vivier et al. 2012)

1.4 Migration von Immunzellen

1.4.1 Extravasation

Im folgenden Abschnitt wird erläutert, wie NK-Zellen aus der Blutbahn in ihr Zielgewebe gelangen. Dieser Vorgang heißt Extravasation und ist im Prinzip für alle Immunzellen gleich.

Nachdem die NK-Zellen ihren Bildungsort im Knochenmark verlassen haben, werden sie über die Blutgefäße im Körper verteilt und verlassen bei Bedarf die Blutbahn, um zu Ihrem Wirkungsort zu gelangen. Dies können beispielsweise als Ziel von NK-Zellen Tumore sein. Die Migration der Zellen zu ihrem Bestimmungsort wird „homing“ genannt und ist ein komplexes Zusammenspiel vieler Faktoren. An dieser Stelle werden die

Grundlagen für die Extravasation im Allgemeinen kurz dargelegt.

Das Austreten der Zellen aus der Blutbahn passiert v.a. in postkapillären Venolen, da es hier zu einer Erweiterung der Gefäße und einer Verlangsamung der Strömungsgeschwindigkeit kommt. Man kann mehrere Schritte der Extravasation unterscheiden (Rink et al. 2012; Carman 2012):

1. lockere Kontaktaufnahme der Leukozyten mit dem Endothel
2. lockeres Rollen der Leukozyten auf dem Endothel („leucocyte rolling“)
3. Aktivierung der Zellen z.B. durch Entzündungsmediatoren oder Chemokine
4. stabiles Haften der Zellen am Endothel („tight adhesion“)
5. Diapedese = das Durchwandern des Endothels

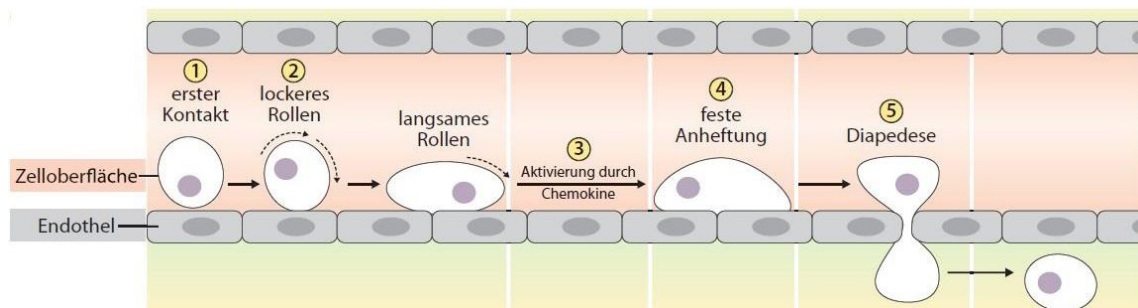


Abbildung 2:

Extravasation von Immunzellen (Rink et al. 2012)

Jeder dieser Schritte wird durch verschiedene Zelladhäsionsmoleküle (CAM = Cell Adhesion Molecule) vermittelt, zu denen z.B. Selektine, Cadherine, Integrine sowie CAMs der Ig-Superfamilie zählen (Strell und Entschladen 2008).

Zuerst kommt es zu einer lockeren Kontaktaufnahme mit dem Endothel, welche durch die konstitutiv exprimierten Selektine vermittelt wird (1). Sie binden an Kohlenhydrat-Liganden auf vorbeiziehenden Zellen. Da im Gefäß eine starke Strömungsgeschwindigkeit herrscht, werden die Immunzellen nicht fest an einer Stelle gehalten, sondern durch eine permanentes Lösen und Neuknüpfen von Verbindungen nur gebremst – es kommt zum „Rollen“ der Zellen an der Gefäßwand entlang (2) (Shimizu et al. 1999).

Für eine festere Bindung sind die Integrine verantwortlich (3). Sie müssen erst durch z.B. Chemokine aktiviert werden, damit sie an ihre Liganden auf den Endothelzellen binden können. Die Aktivierung entsteht durch eine Konformationsänderung der Integrine, durch die ihre Affinität zu den Liganden erhöht wird. Einige Chemokine wie z.B. CXCL-12 (CXC-Motiv-Chemokin 12, s. auch 3.2) führen zu einer sofortigen und festen Integrin-

abhängigen Anhaftung der Leukozyten an der Gefäßwand (Campbell et al. 1998). Zudem binden die Integrine der Leukozyten an die Adhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie auf den Endothelzellen und setzen Signalkaskaden in Gang, die zu einer Veränderung des Zytoskeletts (v.a. des Aktins) führen. Dadurch flachen die Leukozyten auf der Innenwand des Gefäßes ab und sind sehr fest am Endothel fixiert (4) (Barreiro et al. 2002; Brakebusch und Fassler 2003). Im letzten Schritt wandern sie durch Diapedese in das Gewebe ein (5). Die exakten Mechanismen konnten bisher nicht genauer ermittelt werden. Es konnte aber gezeigt werden, dass es zwei Wege durch das Endothel gibt: die parazelluläre und die seltenere und wenig beschriebene transzelluläre Diapedese (Petri und Bixel 2006). Für die parazelluläre Migration müssen tight- und adherens junctions zwischen den Endothelzellen überwunden werden. Hierfür gilt das PECAM-1-Adhäsionsmolekül (Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule) als essentiell, welches zur Ig-Superfamilie gehört und sich sowohl auf Endothel-, als auch auf Immunzellen findet. Eine Blockade von PECAM-1 auf NK-Zellen hemmt die Diapedese von diesen durch das Endothel (Berman et al. 1996). Auch JAMs (Junctional Adhesion Molecules) werden als wesentlich für die Diapedese diskutiert. Sie gehören ebenfalls zu der Ig-Superfamilie und binden an die Integrine der Immunzellen (Engelhardt und Wolburg 2004).

Um durch die Basalmembran zu gelangen, können NK-Zellen und andere Leukozyten MMPs (Matrix-Metallo-Proteasen) synthetisieren. Diese Enzyme sind in der Lage, Proteine der Extrazellulärmatrix zu spalten, so dass die Durchwanderung möglich wird. MMPs spielen auch für die anschließende Migration von Zellen durch das Gewebe eine maßgebliche Rolle (Gifford und Itoh 2019). Nach der Extravasation migrieren die Zellen, ebenfalls durch CAMs und Chemokine vermittelt, weiter zu ihrem Bestimmungsort (Rink et al. 2012)

1.4.2 Migration

Für eine aktive Zellbewegung von eukaryotischen Zellen spielen zwei Systeme eine wichtige Rolle: a) das Strukturprotein Aktin mit Hilfsmolekülen (Pollard und Cooper 2009) und b) die Adhäsion an die Extrazellulärmatrix (EZM) mit einer mechanischen Verbindung zum Zytoskelett (Geiger und Yamada 2011; Bershadsky und Kozlov 2011). Ein einzelnes Aktinmonomer wird als G-Aktin bezeichnet und kann unter Energieverbrauch zu dem filamentösen F-Aktin polymerisieren. Zwei F-Aktin-Stränge bilden schließlich (in doppelhelikaler Struktur vorliegende) Mikrofilamente. Zum aktiven Zell- „kriechen“ sind mehrere Schritte nötig: An der Zellvorderseite („leading edge“) kommt es zu einer Protrusion in Bewegungsrichtung, die durch eine

Selbstopolymerisierung des Aktinnetzwerkes und der Adhäsion an den Untergrund ermöglicht wird. Gleichzeitig kommt es an der Rückseite der Zelle („trailing edge“) zum Abbau des Aktinnetzwerkes und zum Lösen der Verbindung mit dem Untergrund.

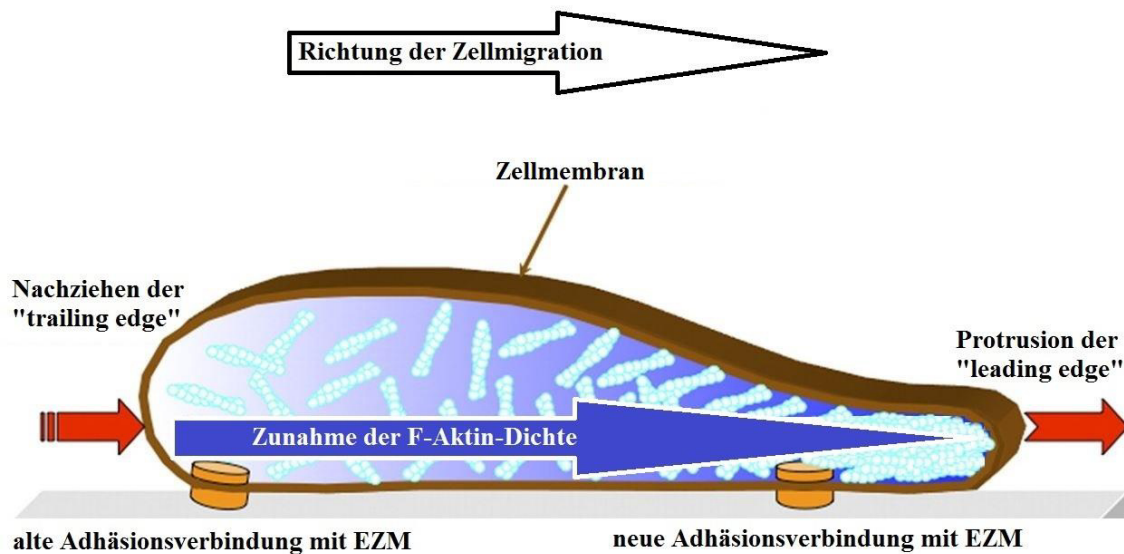


Abbildung 3:

Prinzip der Zellmigration (modifiziert nach Bershadsky und Kozlov 2011)

Durch die Polymerisierung des Aktins an der „leading edge“ wird eine Kraft aufgebaut, die die elastische Zellmembran in Migrationsrichtung ausstülpt. Gleichzeitig wird eine Zugspannung über Zellmembran und Zytoskelett auf die restliche Zelle aufgebaut und die „trailing edge“ nachgezogen (Bershadsky und Kozlov 2011). Es wurde gezeigt, dass die Dichte des Aktinnetzwerkes exponentiell von der „leading edge“ zur „trailing edge“ abnimmt, und man vermutet, dass die Aktinfilamente an der „trailing edge“ der Zelle durch die aufgebaute Membranspannung dissoziiert werden (Ofer et al. 2011). Unterstützt wird die Depolymerisierung der Filamente auch durch Aktin-bindende Proteine wie z.B. ADF (Actin Depolymerizing Factor) oder Cofilin, welche die Repolymerisierung an der Aktinfilamente verhindern (Bamburg 1999; Svitkina 2018). Insgesamt ist das Verständnis des Aktin-Abbaus z.Zt. noch limitiert, so dass auch andere Ansätze diskutiert werden (Brieher 2013). Für die Gerichtetheit der Zellbewegung könnten Mikrotubuli eine Rolle spielen, da sie den Umbau von Aktin beeinflussen können (Ganguly et al. 2012). Durch das Vorschieben bzw. Ausstülpen der Zellmembran in Richtung der Migration und das Nachziehen der restlichen Zelle ist es dieser möglich, aktiv zu migrieren.

1.5 Mit Adipositas assoziierte Erkrankungen

An dieser Stelle werden die wichtigsten und für diese Arbeit relevanten Adipositas-assoziierten Erkrankungen vorgestellt.

1.5.1 Metabolisches Syndrom und kardiovaskuläre Erkrankungen

Das metabolische Syndrom tritt immer in Verbindung mit Übergewicht auf und ist ein Risikofaktor für kardio-vaskuläre Krankheiten sowie Typ-II-Diabetes. Es wird charakterisiert durch das gleichzeitige Auftreten der folgenden Pathologien:

- abdominelle (viszerale) Fettleibigkeit
- gestörter Kohlenhydratstoffwechsel (Insulinresistenz)
- Hypertonie
- Dyslipoproteinämie (Störung des Lipoproteinverhältnisses im Blut) (Eckel et al. 2005)

Die durchschnittliche Prävalenz des metabolischen Syndroms in Europa liegt bei 24,3% (Männer: 23,9%, Frauen: 24,6%) und variiert je nach Land zwischen 1,2% bis 32,3% (Scuteri et al. 2015). Dabei ist bis heute noch nicht abschließend geklärt, welche der Symptome Ursache, und welche Resultate der anderen sind. Allerdings gilt der weltweite Anstieg von Übergewicht und Adipositas als der Hauptgrund für die Zunahme des metabolischen Syndroms (Grundy 2004; O'Neill und O'Driscoll 2015). Die 1948 gestartete und immer noch fortgeführte Framingham-Herz-Studie untersucht die Ursachen und Risiken der koronaren Herzkrankheit (KHK), Arteriosklerose und Bluthochdruck. Im Rahmen dieser und anderer Studien konnte gezeigt werden, dass Übergewicht und Adipositas zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Hypertonie führt (Wilson et al. 2002; Kurukulasuriya et al. 2011) und ein BMI ≥ 30 kg/m² – unabhängig von anderen Einflussfaktoren – die Wahrscheinlichkeit für tödliche KHK-Ereignisse steigert (Logue et al. 2011). Übergewicht führt über mehrere Wege zu Bluthochdruck: die renale Natrium-Resorption steigt, das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System wird aktiviert und durch die Leptinwirkung wird zudem der Sympathikotonus erhöht (Re 2009; Landsberg et al. 2013). Zusätzlich steigert die Hypertonie als Hauptrisikofaktor die Wahrscheinlichkeit, einen Schlaganfall jeden Typs zu erleiden (Dubow und Fink 2011). Die bei Übergewichtigen ebenfalls beobachtete chronische subklinische Gefäßentzündung wird hingegen hauptsächlich durch die entzündungsfördernde Hypertriglyceridämie hervorgerufen (Caballero et al. 2008; Miller et al. 2011).

1.5.2 Diabetes Mellitus Typ II

Das Hormon Insulin sorgt für eine Senkung der Blutzuckerkonzentration durch die Aufnahme von Glukose aus dem Blut in die Zielzellen. Bei gesunden Menschen stimuliert es den vermehrten Einbau von GluT4 (Glukosetransporter 4) in die Zellmembran, durch den die Glukoseaufnahme in die Zelle ermöglicht wird. Bei Typ-II-Diabetes ist zwar wirksames Insulin vorhanden, jedoch kann es durch eine verstärkte Unempfindlichkeit der Insulinrezeptoren nicht richtig wirken – es liegt eine Insulinresistenz vor, welche zu einer Herunterregulierung von GluT4 führt. Zu Beginn der Erkrankung kann der relative Insulinmangel durch eine gesteigerte Hormonproduktion im Pankreas ausgeglichen werden, diese sinkt aber nach einiger Zeit wieder ab und reicht nicht mehr aus, um den Blutzuckerspiegel zu kontrollieren. Der genaue Mechanismus der Insulinresistenz ist noch nicht geklärt, Übergewicht wird aber als wesentlicher Risikofaktor angesehen – so sind beispielsweise in Großbritannien ca. 90% der Typ-II-Diabetes-Patienten übergewichtig oder adipös (Whitmore 2010). Im Verdacht, die Insulinresistenz auszulösen, steht das von Adipozyten produzierte RBP4 (Retinol-Bindende Protein 4). Messungen zeigen erhöhte Serumwerte für RBP4 bei Mäusen mit Insulinresistenz und adipösen Menschen mit Typ-II-Diabetes (Yang et al. 2005; Graham et al. 2006). Weiterhin löste eine intraperitoneale (i.p.) Gabe von RBP4 bei gesunden Mäusen eine Insulinresistenz aus (Yang et al. 2005). Neuere Arbeiten sehen auch die bei Adipositas regelmäßig auftretende chronische Fettgewebsentzündung als einer der wichtigsten Gründe für die Entstehung der Insulinresistenz. Das Zusammenspiel zwischen Adipozyten, Makrophagen und NK-Zellen im viszeralen Fett wird mittlerweile als Ausgangspunkt dafür angesehen (Wensveen et al. 2015).

1.5.3 Tumorerkrankungen

Es wird geschätzt, dass Übergewicht und Adipositas für 14 % der männlichen und 20 % der weiblichen Krebstoten in den USA verantwortlich sind (Goodwin und Chlebowski 2016). 2014 wurde in einer britischen Studie mit 5,24 Millionen Teilnehmern gezeigt, dass der BMI einen potenzierenden Einfluss auf das Erkrankungsrisiko für 10 der häufigsten 22 Tumorarten hat, u.a. für Tumore in Uterus, Gallenblase, Leber, Nieren, Kolon, Schilddrüse, Ovar sowie für Leukämie und auf das postmenopausale Mammakarzinom (Bhaskaran et al. 2014). Des Weiteren sind die Rezidiv- und Sterbewahrscheinlichkeiten bei einigen Tumorarten höher bei Patienten mit Adipositas, wie z.B. beim postmenopausalen Mammakarzinom (Ligibel 2011), dem kolorektalen Karzinom (Dignam et al. 2006) sowie dem Prostatakarzinom (Efstathiou et al. 2007;

Parekh et al. 2012).

Bei Adipösen wird häufig eine chronische low-grade – Inflammation nachgewiesen, welche mehrere Organsysteme betreffen kann. Eine chronische Entzündung erhöht das Risiko für die Entwicklung von Krebs, und dieses Risiko steigt mit der Dauer der Inflammation an (Shacter und Weitzman 2002). Die Gründe für die chronische Entzündung liegen bei den bei Übergewicht vermehrt stoffwechselaktiven Zellen und der resultierenden gesteigerten Zytokinproduktion – v.a. im Fettgewebe. Bei Adipösen werden vermehrt proinflammatorische Zytokine wie z.B. TNF- α (Tumornekrosefaktor- α), IL-6 (Interleukin-6), IL-1 β (Interleukin-1 β) sowie CCL2 (CC-Chemokin-Ligand-2) produziert, welche v.a. entzündungsfördernd auf Fettgewebe, Leber, Muskel, Pankreas und das Gehirn wirken (Gregor und Hotamisligil 2011). Unterstützt wird die Entzündung zusätzlich durch eine erhöhte Anzahl von im Blut zirkulierenden Leukozyten (Ryder et al. 2014; Tenório et al. 2014), sowie durch eine vermehrte Proliferation, Infiltration und Aktivierung von Immunzellen (wie z.B. Makrophagen und NK-Zellen) in das / im Fettgewebe (Gregor und Hotamisligil 2011; Guzik et al. 2017). Außerdem kommt es bei einer schnellen Vermehrung von Fettgewebe zu einer Gewebehypoxie, bei der resultierend proangiogenetische Moleküle freigesetzt und Makrophagen aktiviert werden. Dies trägt ebenfalls zu einer Entzündung bei (Silha et al. 2005; Hosogai et al. 2007).

Auch Insulin ist maßgeblich an der erhöhten Tumorinzidenz bei Übergewicht beteiligt. Der erhöhte Insulinspiegel bei übergewichtigen Typ-II-Diabetikern geht mit einer erhöhten Verfügbarkeit von IGFs (Insulin-Like Growth Factors) einher. Insulin hemmt die Synthese der IGFBP-1/2 (Insulin-Growth-Factor-Binding-Proteine 1 und 2), so dass es zu einem Anstieg der Plasmakonzentration von freiem IGF-1 kommt, welches wie Insulin das Zellwachstum anregt und antiapoptotisch auf Tumorzellen wirkt (Calle und Thun 2004; Lautenbach et al. 2009b; Babichev et al. 2011).

Insulin und freies IGF-1 nehmen auch Einfluss auf die Synthese und Bioverfügbarkeit von Sexualhormonen (wie z.B. Östrogen), welche förderlich auf die Entwicklung und Progression verschiedener Tumorarten wirken (Calle und Thun 2004). So werden beispielsweise erhöhte bioverfügbare Östrogene als Hauptfaktor für eine gesteigerte Brustkrebsinzidenz bei übergewichtigen postmenopausalen Frauen gesehen (Endogenous Hormones Breast Cancer Collaborative Group 2003).

Chronische Hyperinsulinämie und vermehrtes freies IGF-1 inhibieren zudem die hepatische Produktion des SHBG (sex-hormone-binding globulin). Resultierend steigt bei Männern und bei Frauen in der Postmenopause die Blut-Östrogenkonzentration an. Zusätzlich produziert das Fettgewebe die Enzyme 17 β -HSD (17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase) und Aromatase, welche bei übergewichtigen Männern und

postmenopausalen Frauen Androgene in Östrogene umwandeln (Calle und Kaaks 2004).

1.6 Einfluss von Leptin auf NK-Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass das von den Adipozyten produzierte Hormon Leptin nicht nur einen Einfluss auf den Energiehaushalt des Körpers hat, sondern ebenfalls auf das Immunsystem. So bestehen auch Analogien der Aminosäuresequenz von Leptin zur langen Kette von immunregulierenden Zytokinen wie IL-2, IL-12 und GH (Growth Hormone) (Madej et al. 1995). Auch der Leptinrezeptor Ob-R zeigt Sequenzhomologien zu Mitgliedern der Klasse-I –Zytokinrezeptoren, z.B. zu dem Rezeptor von IL-6. (Tartaglia et al. 1995).

NK-Zellen exprimieren ebenfalls Leptinrezeptoren, deren Aktivierung sie (im Mausmodell) während der Reifung im Knochenmark vor Apoptose schützt. Die Rezeptoren sind auch notwendig für die Differenzierung zu reifen NK-Zellen (Lo et al. 2009). In Leptinrezeptor-defizienten knock-out Mäusen ist zudem die relative und absolute NK-Zellzahl in Leber, Lunge, Milz und peripherem Blut reduziert (Tian et al. 2002). In früheren Untersuchungen wurde davon ausgegangen, dass eine Leptinstimulation die Zytotoxizität von NK-Zellen steigert, und man diskutierte eine Leptingabe als Behandlungsmöglichkeit bei einer beeinträchtigten Immunfunktion (Zhao et al. 2003). Diese Ergebnisse konnten später nur mit Einschränkungen bestätigt werden. Es ist zwar korrekt, dass eine kurzzeitige Leptinstimulation zu einer verbesserten NK-Zell-Funktion führt – wird aber länger stimuliert, sinkt die Zellproliferation und die Fähigkeit, erkrankte Zellen zu lysieren, nimmt ab (Wrann et al. 2012).

In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass sich die beeinträchtigten Funktionen von NK-Zellen aus Diät-induziert adipösen Ratten wieder normalisierten, nachdem sie in normalgewichtige Tiere transfundiert wurden (Lautenbach et al. 2009a). Ähnliche Ergebnisse ergab der Vergleich der NK-Zell-Funktion bei adipösen Menschen vor und nach einer bariatrischen Operation mit daraus resultierend signifikantem Gewichtsverlust. Die durchschnittliche Leptinkonzentration im Blut reduzierte sich von 105.6 ng/ml (präoperativ) auf 29.0 ng/ml (sechs Monate postoperativ) und bei 22 von 28 Patienten kam es zu einer signifikant verbesserten Zytotoxizität der NK-Zellen (Moulin et al. 2010).

Dieser Effekt lässt sich nicht nur bei bariatrischen Operationen nachweisen. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass mit einer Gewichtsabnahme durch sportliche Betätigung und leichter Ernährungsumstellung ebenfalls ein Abfall des Leptinspiegels im Blut erreicht werden kann. Im Verlauf kam es ebenfalls zu einer verbesserten NK-Zell-Funktion im Sinne einer vermehrten Produktion von INF- γ (Jahn et al. 2015).

Bei adipösen Menschen konnten bei Fettgewebs-NK-Zellen ebenfalls phänotypische Veränderungen nachgewiesen werden. Diese exprimieren im Vergleich zu Blut-NK-Zellen höhere Level von aktivierenden Rezeptoren wie beispielsweise NKG2D oder NKp46 (s. 1.3). Bei normalgewichtigen Patienten konnte dieser Unterschied nicht gezeigt werden, und es wird vermutet, dass die Aktivierung der NK-Zellen durch die chronische low-grade – Inflammation begünstigt wird (O'Rourke et al. 2013).

Auch in sonst „gesunden“ Adipösen können in Blut-NK-Zellen veränderte funktionelle Stoffwechselwege sowie verringerte Apoptose-induzierende Zelloberflächenmoleküle nachgewiesen werden, außerdem ist die Produktion einiger Zytokine im Vergleich zu Normalgewichtigen eingeschränkt (Laue et al. 2015).

In einer elfjährigen prospektiven Studie war eine geringere NK-Zell-Zytotoxizität mit einer erhöhten Tumorinzidenz assoziiert (Imai et al. 2000). Da Fettakkumulation und Leptin die NK-Zell-Funktion (u.a. Zytotoxizität) negativ beeinflussen, ist an dieser Stelle eine Verbindung zwischen Übergewicht, einem veränderten Hormonstatus und einer erhöhten Tumorinzidenz durch eine verringerte NK-Zellfunktion gegeben.

2 Zielstellung

In der vorliegenden Dissertation soll die Migration der NK-Zellen als weiterer Einflussfaktor der bei Adipositas erhöhten Tumorinzidenz betrachtet werden. Bisher wurden hauptsächlich die Auswirkungen von Leptin auf die NK-Zell-Funktionen betrachtet, so dass eine Fokussierung auf die Beeinflussung der Migration sinnvoll erscheint, da Leptin nachweislich z.B. die auch für eine Migration wichtige Aktinmodulation innerhalb von Zellen stören kann (Harvey et al. 2000).

Ziel dieser Dissertation ist die Klärung der Fragestellung, ob die *in-vitro* Exposition von pathologischen Leptinkonzentrationen auf NK-Zellen einen Einfluss auf deren Migration und Adhäsionsfähigkeit hat und ob NK-Zellen nach einer *in-vivo* Leptinapplikation vermehrt in verschiedene Fettdepots einwandern.

Folgende Fragestellungen sollen adressiert werden:

1. Gibt es Zeit- und Leptindosisabhängige Unterschiede in der gerichteten Migration, gemessen im Transwell-Migration-Assay, von humanen NK-92-Zellen?
2. Lassen sich mittels Lebendzellaufnahmen Zeit- und Leptindosisabhängige Unterschiede in der ungerichteten Migration von humanen NK-92-Zellen beobachten?
3. Migrieren NK-Zellen nach einer *in-vivo* Leptinapplikation in das perigonadale (viszerale) oder subkutane Fettgewebe von *ob/ob* (Leptindefiziente) Mäusen?
4. Beeinflussen verschiedene Leptinkonzentrationen die Adhäsionsfähigkeit von NK-92-Zellen?

3 Material und Methodik

Für alle Pipettierschritte wurden Eppendorf-Pipetten (Eppendorf Research und Eppendorf Research plus, Eppendorf, Hamburg, BRD) verwendet. Die benutzten Zentrifugen sind eine Sigma 2-5 (Sigma Laborzentrifugen, Osterode, BRD) sowie eine Heraeus Megafuge 2.0R (Heraeus, Hanau, Deutschland).

3.1 NK-92 Zellen

Die für die Migrationsversuche verwendeten Natürlichen Killerzellen sind NK-92-Zellen, welche wir von unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Roland Jacobs (Medizinische Hochschule Hannover) erhielten.

Es handelt sich hierbei um eine humane NK-Zelllinie, die 1994 aus einem 50-jährigen Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom isoliert wurde und ein IL-2-abhängiges Wachstum zeigt (Gong et al. 1994). Die Zellen wurden in RPMI-1640 – Medium (Biochrom, Berlin, BRD) inklusive je 1% Natrium-Pyruvat, Penicillin-Streptomycin und L-Glutamin sowie 10% FBS (FBS Superior, Biochrom, Berlin) im Inkubationsschrank (37°C, 5% CO₂, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte immer montags und donnerstags durch vorsichtiges Herunterzentrifugieren (1000U/Min., 5 Min.) und anschließendem Resuspendieren in frischem Medium. Die Zellen wurden vorher mit Hilfe von Trypanblau gezählt (Hämozytometer (Neubauer improved), im weiteren Verlauf der Studie mit dem automatischem Zellzähler LUNA II (Logos Biosystems, South Korea)). Es wurde darauf Wert gelegt, dass die Zellen nicht zu hoch konzentriert sind (eingestellt auf $5-8 \times 10^5$ Zellen/Flasche). Pro Zellkulturflasche (Greiner bio-one, 250ml, 75cm²) wurden 25ml Zellsuspension verwendet, die Flaschen wurden stehend gelagert.

3.2 Transwell-Migration-Assay

Das Transwell-Migration-Assay ist eine Methode zur Untersuchung von gerichteter Zellmigration zu einem Lockstoff, z.B. einem Chemokin. Dabei werden die Zellen vor / während der Migration unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt, die mutmaßlich einen Einfluss auf die Migration haben. Die Zellen werden vor dem eigentlichen Migrationsexperiment verschiedenen Konditionen ausgesetzt – in vorliegenden Fall erfolgte eine Leptininkubation in verschiedenen Konzentrationen und Dauer.

Anschließend erfolgt das Setup des Transwell-Migration-Assays, welches hier kurz

erläutert werden soll (s. auch Abbildung 4):

In das obere Kompartiment, gebildet aus dem s.g. „Insert“, wird eine bestimmte Anzahl an Zellen eingesät. Der Boden des Inserts besteht aus einer Membran, deren Poren einen deutlich kleineren Durchmesser als die Zellen selbst haben, so dass diese passiv nicht in das untere Kompartiment gelangen können. Dafür ist eine aktive Zellmigration mit entsprechender Verformung und Migration durch die Poren nötig. Im unteren Kompartiment befindet sich ein Zellkulturmedium und ein Chemokin, welches bekanntermaßen NK-Zellen anlockt und zur Migration in Richtung des unteren Kompartiments anregt. Anschließend wird die in das untere Kompartiment migrierte Zellzahl ermittelt.

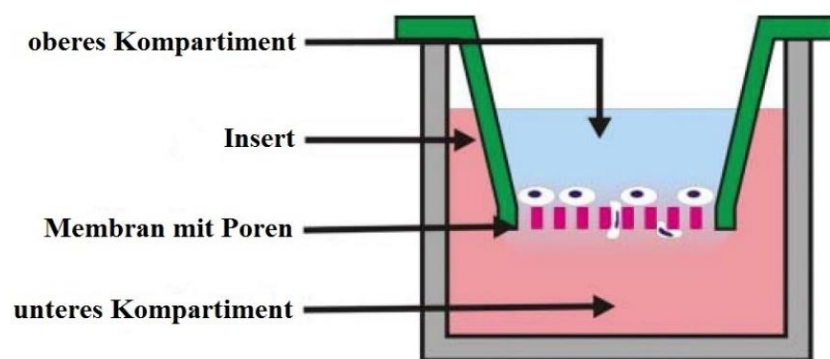


Abbildung 4

Schema Transwell-Migration-Assay (modifiziert nach Keenan und Folch 2007)

Es wurden Vorversuche mit verschiedenen Sets von Transwell-Migration-Assays gemacht. Alle hatten gemeinsam, dass es sich um eine 24-well-Platte handelt, die zusammen mit je 12 Inserts geliefert wird. Die Inserts jeder Firma haben einen Durchmesser von 6,5mm und eine Porengröße von 5µm. Alle sind unbeschichtet. Die Entscheidung für diese Maße fiel durch vergleichende Literaturrecherche (vergl. Peng et al. 2011; Pfeiffer et al. 2013; Yamin et al. 2013) sowie ein freundlicherweise durch Dr. Marit Inngjerdigen (Innate Lymphocyte Group, Oslo University Hospital, Norwegen) zur Verfügung gestelltes Protokoll.

Getestet wurden die folgenden Produkte:

- Cytoselect™ 24-Well Cell Migration Assay CBA-102 (Cell Biolabs, Inc. CA, USA)
- QCM™ Chemotaxis 5µm 24-Well Cell Migration Assay ECM507 (Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Corning 3421 Transwell® 5µm Pore Membrane Insert in 24-Well Plates (Corning)

Inc., Life Sciences MA, USA)

Die beiden erstgenannten Assays wurden als Kit mit zusätzlichen Reagenzien zu Auswertung der migrierten Zellzahl durch eine Fluoreszenzmessung geliefert, Corning lieferte nur die Plastikware (24-Well-Platten und Inserts).

Die ersten Vorversuche wurden mit dem Corning-System durchgeführt. Die Zellen wurden vor dem Versuch 24h lang FBS-frei gesetzt, mussten also „hungern“. Zu dem Vorgehen, ob ein Hungern nötig ist oder nicht, oder sogar kontraproduktiv sein kann, gibt es zahlreiche verschiedene Ansichten und Diskussionen, und letztlich entzieht ein Teil der Forscher*innen den Zellen für eine gewisse Zeit FBS, ein anderer Teil nicht. Für die Vorversuche haben die Zellen im Kulturmedium zunächst ohne FBS und IL-2 gehungert. Nach 24h wurden in das untere Kompartiment (entspricht einem Well der 24-Well-Platte) 600µl des Hungermediums (Negativkontrolle) bzw. des Hungermedium inkl. eines potenten Chemokines (Positivkontrolle, welches die NK-Zell-Migration anregt) gegeben. Das Chemokin ist CXCL-12 (CXC-Motiv-Chemokin 12, Peprotech, Hamburg) und erwiesenermaßen das am stärksten zur Migration anregende Chemokin bei NK-92-Zellen (Berahovich et al. 2006). Dem Protokoll von Dr. Inngjerdings folgend wurde eine Konzentration von 200ng/ml verwendet.

Es wurden 5×10^5 Zellen in 100µl Medium resuspendiert, in die Transwell-Inserts gegeben, und diese in die Wells platziert. Nach 3h Inkubation im Brutschrank wurden die Inserts entfernt und das Medium inkl. der migrierten Zellen in 2ml-Zentrifugationsröhrchen überführt, die anschließend bei 1000U/Min. 5 Min. zentrifugiert wurden. Danach wurde der Überstand vorsichtig mit der Pipette abgenommen, das Zellpellet in 100µl PBS (Phosphate Buffered Saline) resuspendiert, in einer 1:2 Verdünnung mit Trypanblau gefärbt und in einem Hämocytometer betrachtet und gezählt. Unter den oben genannten Bedingungen ist keine Zelle migriert, deshalb wurden dem Hunger- und Migrationsmedium noch 25mM HEPES (Carl Roth, Karlsruhe) und 0,5% BSA (Sigma-Aldrich, MO, USA) zugesetzt (nach dem Protokoll von Dr. Inngjerdings). Nach dieser Veränderung konnten migrierte Zellen nachgewiesen werden.

Zur genauen Auswertung der migrierten Zellzahlen bot sich ein Kit an, welches bereits alle nötigen Reagenzien enthielt, um die Zellzahlen per Fluoreszenz zu messen (s.o.). Die Fluoreszenzmessungen wurden mit einem Multiplatten-Lesegerät (BioTek Synergy, BioTek Instruments, Winooski, USA) durchgeführt. Zur Zellzahlbestimmung sollte eine Standardkurve aus einer zuvor hergestellten Verdünnungsreihe benutzt werden. Der Fluoreszenzfarbstoff bindet nach der chemischen Lyse der Zellen durch einen Lysepuffer an die DNA, nachfolgend kann die Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{ex}}=480\text{nm}$ und $\lambda_{\text{em}}=520\text{nm}$ gemessen werden.

Leider stellten sich die Kits beider Firmen (Merck Millipore & Cell Biolabs) als sehr

unzuverlässig bei Doppel- oder Dreifachbestimmungen heraus – es gab Abweichungen bei Messungen derselben Probe um bis zu 20%. Auch der Fluoreszenzfarbstoff alleine, der noch einmal gesondert bestellt und getestet wurde (CyQUANT® Cell Proliferation Assay Kit, Invitrogen, Life Technologies, CA, USA) zeigte große Abweichungen. In einem Nachbarinstitut wurden die Messungen mit einem Fluoreszenzmessgerät eines anderen Herstellers wiederholt, dabei kam es zu ähnlichen, nicht tolerierbaren Abweichungen. Wurden die Messungen allerdings mit dem mitgelieferten DNA-Standard der Kits getestet, zeigten sich vergleichbare Ergebnisse. Es musste also davon ausgegangen werden, dass der Invitrogen-Fluoreszenzfarbstoff – anders als von den Herstellern der Kits angegeben – ungeeignet ist, um eine zuverlässige Zellzahlbestimmung bei NK-92-Zellen durchzuführen.

Aus diesem Grund wurde das Protokoll zur Zellzahlbestimmung überarbeitet und fortan mit der Plastikware von Corning und einem anderen Fluoreszenzfarbstoff gearbeitet (s. unten). Zugleich wurde die in den Versuchen eingesetzte Zellzahl verringert, damit die Zellen weniger räumlichen Stress haben. Außerdem wurde im weiteren Verlauf kein FBS-Entzug mehr durchgeführt, ebenfalls um die Zellen nicht unnötigem Stress auszusetzen. Die Zellen wurden nicht mehr chemisch, sondern durch Ultraschall lysiert (Sonoplus Ultraschall-Homogenisator HD 3100, Bandelin, Berlin, BRD).

Untersucht wurden die Einflüsse einer Leptinkonzentration im Äquivalent zu einem Körpergewicht im Normalbereich (10ng/ml), im adipösen Bereich (100ng/ml) und in einer sehr hohen, unphysiologischen Konzentration (500ng/ml) sowie mit Positiv- und Negativkontrollen ohne Leptin. Die physiologischen Konzentrationen von 10 und 100ng/ml wurden nach beschriebenen Fällen aus der Literatur (Krempler et al. 1998; Silha et al. 2003; Al Maskari und Alnaqdy 2006; Moulin et al. 2010) sowie bereits durchgeführten Experimenten anderer Arbeitsgruppen mit NK-92-Zellen und Leptin ausgewählt (Lamas et al. 2013). Die unphysiologisch hohe Leptinkonzentration (500ng/ml) wurde gewählt, um evtl. vorhandene Effekte sichtbar zu machen, welche unter physiologischen Konzentrationen noch nicht nachweisbar sind. Als Stimulationszeiträume wurden 3h (kurzzeitige Stimulation) und 24h (Langzeitstimulation) gewählt. Leptin zeigt dabei keine Effekte auf Viabilität, Zellzyklus oder Apoptose (Lamas et al. 2013).

Im Folgenden wird der Ablauf der Experimente kurz erklärt:

1. 24h vor dem Experiment wurden die Zellen in frischem Medium und einer Konzentration von $1,5 \times 10^6$ Zellen/Flasche vorbereitet. Sofort (Langzeitstimulation) oder 21h später (kurzzeitige Stimulation) wurde Leptin dazu

gegeben.

2. Die Zellsuspension wurde aus den Kulturflaschen in Zentrifugationsröhrchen überführt und zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 1ml Migrationsmedium resuspendiert, sowie die Zellzahl durch den automatischen Zellzähler bestimmt. Es wurde eine Konzentration von 4×10^5 Zellen/ml eingestellt und 250 μ l in ein Insert gegeben (entspricht 1×10^5 Zellen/Insert). Pro Kondition (Positivkontrolle, Negativkontrolle und 10, 100, und 500ng/ml Leptin) werden als Doppelbestimmung zwei Inserts benutzt. In das untere Kompartiment der 24-Well-Platte sind jeweils 600 μ l Migrationsmedium inklusive des Chemokins CXCL-12 gegeben worden, in das der Negativkontrolle Medium ohne CXCL-12. Das Assay wurde anschließend drei Stunden im Inkubator belassen.
3. Nach drei Stunden wurden die Inserts vorsichtig aus den Wells entfernt und das Medium inklusive der migrierten Zellen aus jedem unteren Well mehrmals auf- und ab- pipettiert und anschließend jeweils in ein 2ml-Zentrifugationsröhrchen überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (13 000 U/min, sieben Minuten). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und die Röhrchen bei -80°C gelagert, bis alle Versuche abgeschlossen waren.
4. Zur Auswertung der Zahl der migrierten Zellen wurde nach einer Vielzahl von fehlgeschlagenen Versuchen mit Kits anderer Firmen für die Versuche das „DNA Quantification Kit“ (Kamiya Biomedical Company, Seattle, WA, USA) benutzt. Dazu wurden die Zellen im Zentrifugationsröhrchen aufgetaut und in 50 μ l des mitgelieferten DNA-Puffers resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Zelllyse durch Ultraschall (je 3x 30 Sek, in Eiswasser, zwischendurch herunterzentrifugiert).
5. Anschließend wurde jedes Zentrifugationsröhrchen mit den nun lysierten Zellen dem Protokoll des Kamiya-Kits folgend mit 1ml DNA-Puffer aufgefüllt und gut gevortext.
6. Nachfolgend wurde 50 μ l des Color Developers (Fluoreszenzfarbstoff) zu jedem Zentrifugationsröhrchen beigefügt und gevortext.
7. Alle Proben wurden mit einem Vortexer sorgfältig gemischt und danach wurden aus jedem Zentrifugationsröhrchen für eine Vierfachbestimmung je 4x 200 μ l entnommen und in eine für Fluoreszenzmessungen geeignete 96-Well-Platte (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) gegeben. Im Anschluss wurde die Fluoreszenz bei $\lambda_{ex}=356\text{nm}$ und $\lambda_{em}=458\text{nm}$ gemessen.
8. Die Anzahl der migrierten Zellen wurde als relatives Ergebnis anhand der Fluoreszenzen verglichen.

3.3 Live-Cell-Imaging

Es sollte nicht nur der Einfluss von Leptin auf die gerichtete (s. 3.2), sondern auch auf die ungerichtete Migration von NK-Zellen untersucht werden. Dafür wurden NK-92-Zellen in ein Well einer 12-well-Platte (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) mit einer Zellzahl von ca. 1×10^4 Zellen/1ml ausgesät, welches eine Stunde vorher mit Fibronectin (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cultrex[®] Human Fibronectin, PathClear[®], Amsbio, Abington, UK) beschichtet wurde, um eine bessere Adhäsion der Zellen zu gewährleisten (Oswald et al. 2018). Das Fibronectin wurde in 12 μl -Aliquots bei -80°C gelagert und jeweils ein Aliquot vor einem Experiment aufgetaut und mit 588 μl PBS (phosphate buffered saline – Phosphat gepufferte Salzlösung) verdünnt (1:50). Das Fibronectin wird nachfolgend in ein Well einer 12-Well-Zellkulturplatte gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und das Well einmal mit PBS gewaschen.

Die Zellen wurden in dem normalen Kulturmedium ausgesät. Danach wurde die Platte für eine Minute bei 400 U/min in einer Plattenzentrifuge zentrifugiert, um das Adhärenz zu erleichtern.

In dem Video des Inkubator-Mikroskops (10-fache Vergrößerung: Lonza Cytosmart[™] Lux 10X System, Lonza, Schweiz) konnte beobachtet werden, dass die meisten Zellen bereits direkt nach dem Zentrifugationsschritt adhärten, die restlichen adhärten ebenfalls innerhalb von wenigen Minuten.

Es wurde wie auch bei dem Versuch zur gerichteten Migration Leptin zu den Wells hinzugegeben, so dass eine Konzentration von je 10, 100 und 500 ng/ml (vergl. 3.2) vorlag. Die Zellen in einem Well dienten der Kontrolle und wurden nicht mit Leptin behandelt. Anschließend wurde jeweils ein Bildausschnitt von jedem Well über 26,5h beobachtet und jede Minute ein Bild gemacht. Die Bilder wurden nach Abschluss der Aufnahmen mit dem „Tracking-Tool[™] PRO v. 2.1“ (Gradientech, Uppsala, Schweden) analysiert. Mit diesem Tool ist ein automatisiertes Tracking der migrierten Zellen möglich (s. Abbildungen 5 und 6). Es wurde jeweils die Bewegung der Zellen innerhalb eines Zeitraumes von 90 Minuten unter Kontroll- und Leptinexposition analysiert:

- a) nach 3h (entspricht Stunde 4 bis 5,5 nach Leptingabe) und
- b) nach 24h (entspricht Stunde 25 bis 26,5 nach Leptingabe)

Die erfassten Daten wurden durch die Software hinsichtlich der Durchschnittsgeschwindigkeit der migrierten Zellen analysiert und miteinander verglichen.

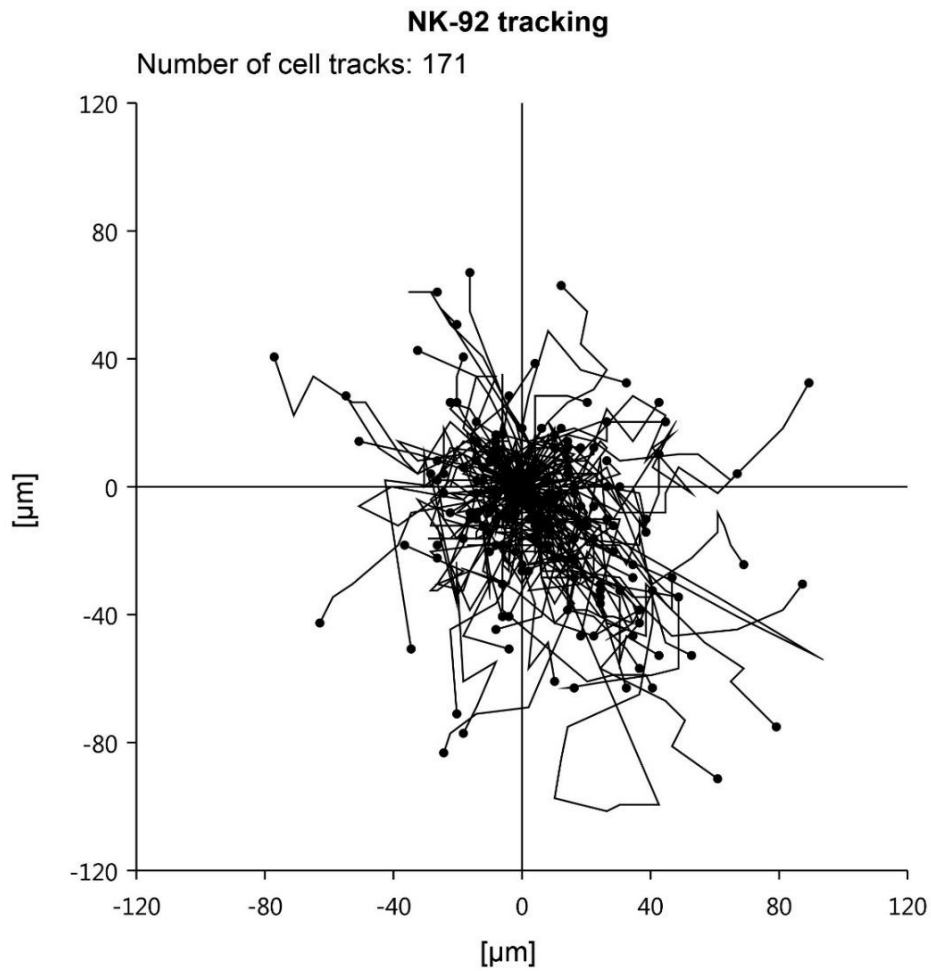


Abbildung 5

Beispielplot aus dem Programm „TrackingTool™ PRO v.2.1“ für das Tracking der ungerichteten Bewegung von NK-92-Zellen. Erkennbar ist, dass die Zellen ungeordnet von Ihrem jeweiligen Startpunkt aus in alle Richtungen gleichmäßig migrieren

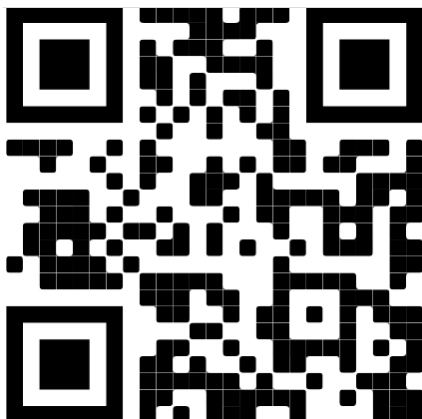


Abbildung 6

Beispielvideo der ungerichteten Migration von NK-92-Zellen (zum Betrachten bitte den QR-Code scannen)

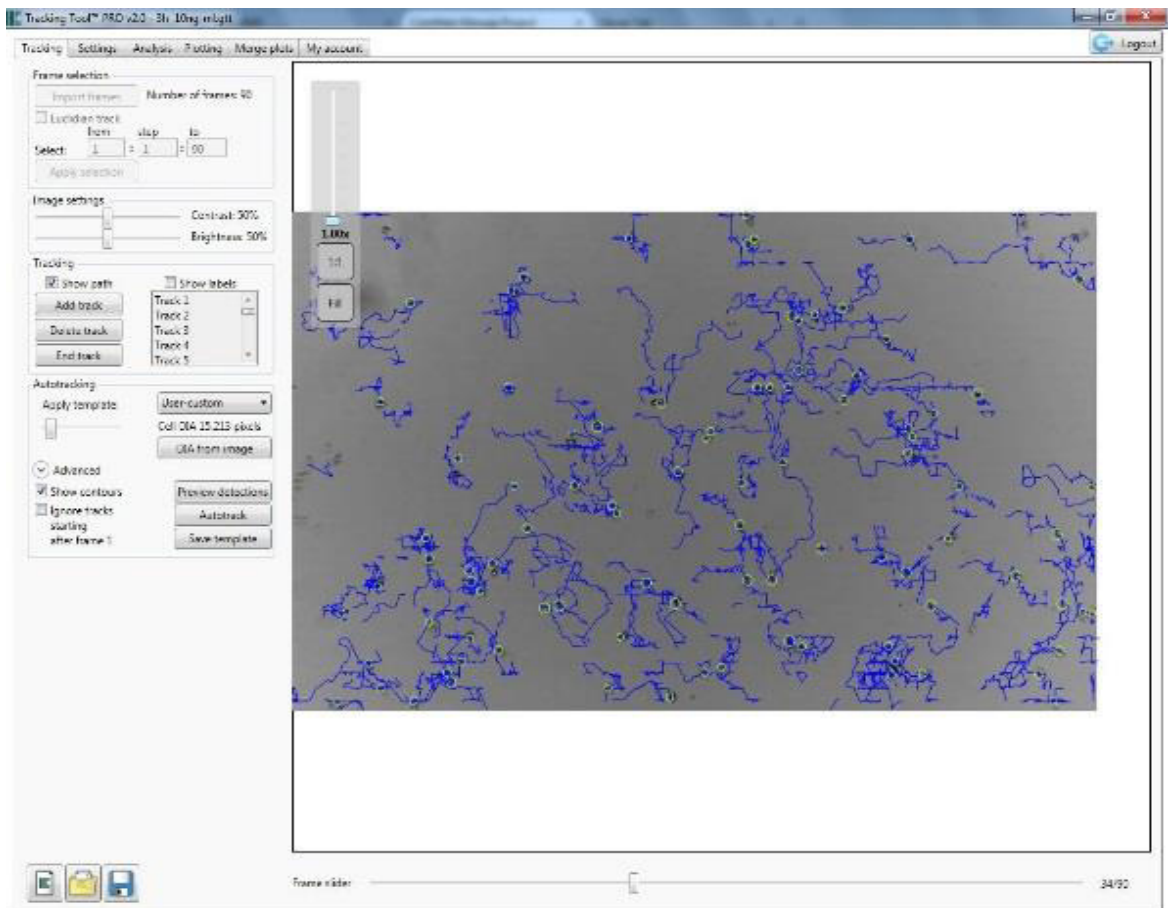


Abbildung 7

Screenshot der Auswertung der ungerichteten Migration von NK-92-Zellen zur Verdeutlichung des Trackings der einzelnen Zellen durch das „TrackingTool™ PRO v. 2.1“

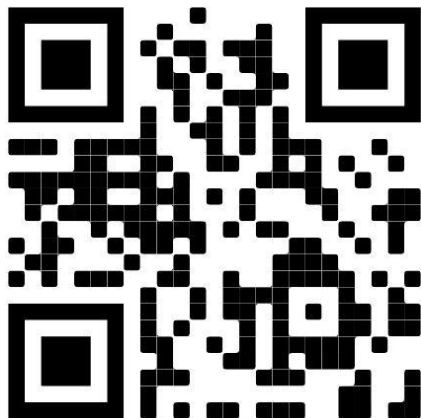


Abbildung 8

Beispielvideo für die Auswertung der ungerichteten Migration der NK-92-Zellen mit dem „Tracking-Tool™ PRO v. 2.1“ (zum Betrachten bitte den QR-Code scannen)

3.4 Immunhistochemische Färbungen

Die Proben des im Folgenden beschriebenen Experimentes sind dankenswerterweise von Prof. Martin Gericke (zum Zeitpunkt der Experimente tätig im Institut für Anatomie der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig, aktuell im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) bereits fertig geschnitten zur Verfügung gestellt worden (Tierversuchsnummer: TVV37/12).

Um einen Einfluss von Leptin auch auf die NK-Zell-Migration *in-vivo* zu untersuchen, wurden je zwei *ob/ob*-Mäuse genutzt. Durch eine Mutation im Leptinkodierenden Gen wird kein funktionierendes Leptin produziert, also sind diese Mäuse funktionell Leptindefizient. Die Tiere dienen als Tiermodell für Adipositas und Typ-II-Diabetes (Pellemounter et al. 1995). Den Mäusen wurde für 24h intraperitoneal Leptin oder NaCl (Kontrolle) verabreicht. Die Konzentration des Leptins (R&D Systems, Recombinant Mouse Leptin Protein, Minneapolis, USA) betrug 1mg/kg Körpergewicht. Nach 24h wurden den Tieren perigonadales (viszerales) und subkutanes (s.c.) Fett entnommen, eingebettet, geschnitten und auf Objektträger überführt.

Nach einigen Probefärbungen mit Organen, die mit Sicherheit NK-Zellen enthalten (Milz, Leber), wurden Färbungen mit den Fettgewebsschnitten durchgeführt. Die Schnitte wurden nach folgendem Protokoll behandelt:

1. Tag

- Objektträger beschriften und mindestens 2h im Wärmeschrank (60°C) inkubieren
- Schnitte entparaffinieren in absteigender Alkoholreihe, je zwei Minuten bei Raumtemperatur (RT)
 - 2x HistoClear → Isopropanol → 2x 96% → 80% → 70% → 60% → Aqua dest.
- Umranden der Schnitte mit Silikonstift PAP-PEN
- Blockierung der endogenen Peroxidase
 - 1% Wasserstoffperoxid auf Gewebeschnitte geben, 20 Minuten bei RT inkubieren (dunkel)
- 2x mit Aqua dest. spülen, 1x mit TBST (Tris-buffered saline with Tween20) waschen, je 5 Minuten bei RT
- Blockierung in 10% Ziegen Serum in TBST, 1h bei RT (dunkel)
- 1. Antikörper: anti- CD-335 (=NCR1=NKp46) (Rabbit anti-NCR, bs-10027R,

polyklonal, Bioss Antibodys, MA, USA), bei 4°C über Nacht, dunkel

- Verdünnung 1:500 in TBST, Negativkontrolle nur TBST

2. Tag

- Waschen der Proben in TBST, Negativkontrolle getrennt, 3x 5 Minuten
- 2. Antikörper HRP-gekoppelt (EnVision+, HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit K4002, Dako, Hamburg, BRD), 1h bei RT, dunkel
- Waschen in TBST 3x 5 Minuten
- Entwickeln mit DAB (Liquid DAB+ Substrate Chromogen System K3467, Dako, Hamburg, BRD), 30 Minuten bei RT, dunkel
 - 1ml des Substrates in mitgeliefertes Röhrchen geben
 - einen Tropfen Chromogen zugeben, vortexen, auf Gewebeschnitte geben
 - Abstoppen der Reaktion unter Leitungswasser
- Kernfärbung mit Hämalaun, 1:2 verdünnt, wenige Sekunden
- Bläuen unter fließendem Leitungswasser, 10 Minuten
- Schnitte Waschen in Aqua dest., zwei Minuten bei RT
- anschließend Überführen in HistoClear, je 2x zwei Minuten bei Raumtemperatur
- Eindecken mit alkoholfreiem Medium: Aquatex
- über Nacht abdampfen / trocknen lassen

Nach dem Färben und Eindecken der Schnitte wurden diese unter einem Mikroskop (Keyence BZ-8100E, 4x und 20x Nikon-Objektive mit stufenlosem Zoom) betrachtet und die angefärbten NK-Zellen ausgezählt. Dabei wurde die insgesamt pro Schnitt betrachtete Fläche nach der der kleinsten Gewebeprobe ausgewählt und beträgt 8,45 mm². Es wurde darauf geachtet, dass die Schnitte nicht direkt aufeinanderfolgend waren, um zu verhindern, dass dieselbe Ebene doppelt gefärbt und ausgezählt wurde. Um eine gleichmäßige Betrachtung zu gewährleisten, wurden jeweils sechs Sichtfelder (20-fache Vergrößerung) an zwei Rändern und zwölf Sichtfelder im Zentrum des Gewebeschnittes betrachtet. Jedes Sichtfeld wurde, sobald der Verdacht bestand, dass eine NK-Zelle vorhanden ist, herangezoomt und genauer betrachtet sowie evtl. ein Bild zur Dokumentation gemacht. Es wurden nur Zellen gezählt, bei denen ein Zellkern erkennbar war. Pro Bedingung wurden immer nach dem gleichen Verfahren zehn Schnitte ausgezählt, die aus dem Pool von insgesamt 40 Schnitten verblindet entnommen wurden.

3.5 Adhäsions-Assay

Hiermit sollte die Beeinflussung von Leptin auf die Adhäsionsfähigkeit von NK-Zellen untersucht werden. Die Experimente wurden in Kooperation mit der „Core Facility Imaging“ der Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier, Leiterin: Dr. Nadine Bley) durchgeführt. Die NK-92-Zellen wurden dazu analog zu den anderen Experimenten kultiviert (s.o.). Das Experiment ist insgesamt zwei Mal an unterschiedlichen Tagen durchgeführt worden. Jede Versuchsanordnung ist hierbei in einer achtfachen Ausführung getestet worden (je 3h bzw. 24h Stimulation mit je 0, 10, 100 und 500ng/ml Leptin).

Zunächst wurden die NK-92-Zellen in dem normalen Kulturmedium 3h bzw. 24h mit 0, 10, 100 und 500mg/ml Leptin im Medium stimuliert. Die Zellen wurden anschließend gezählt und ca. 1000 NK-92-Zellen pro Well in 100µl Medium in eine 96-Well-Zellkulturplatte (TPP® well plate, flat bottom) überführt, welche vorher nach dem bereits beschriebenen Vorgehen mit Fibronectin beschichtet wurden (s. 2.3). Um Einsaatunterschiede zu vermeiden, wurde zusätzlich eine Vitalitätsmessung mittels „CellTiter Glo® Cell Viability Assay“ in einem „GloMax® Plate Reader“ (beides von Promega, Fichtburg, USA) durchgeführt. Die ermittelten Lumineszenzwerte dienten der Normalisierung der Adhäsionsmessung. Anschließend wurden die zur Adhäsion eingesäten Zellen für 30 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und die Adhäsion der Zellen anschließend vermessen. Dazu wurde der Überstand abgenommen, nicht-adhärenente Zellen wurden mittels Phosphate Buffered Saline (PBS) entfernt. Die adhärenenten Zellen wurden mit 4% PFA (Paraformaldehyd) fixiert. Die Zellkerne wurden mittels DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) markiert. Die Analyse erfolgt fluoreszenzmikroskopisch unter Verwendung eines TE2000E Epi-Fluoreszenzmikroskopes (Nikon, Tokio, Japan) und 10-facher Vergrößerung. Je Well wurde eine Aufnahme in mittlerer Position angefertigt, die anschließend mittels ImageJ (Version 1.52e) ausgewertet wurden. Hierfür wurden die Zellkerne über ein globales Schwellwertverfahren segmentiert und automatisiert ausgezählt.

3.6 Statistik

Die statistischen Berechnungen und die Erzeugung der statistischen Abbildungen für die Experimente der gerichteten Migration (Transwell-Migration-Assay), der Experimente zur ungerichteten Migration (Live-Cell-Imaging) sowie zur Auswertung der Verteilung der NK-Zellen im Fettgewebe (Immunhistochemische Färbungen) sind mit dem Programm „GraphPad PRISM“, Version 8.1.2 durchgeführt worden. Es erfolgte eine Varianzanalyse (one-way ANOVA), als Post-Hoc-Test wurde der Dunnett-Test (Dunetts multiple

comparison test) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgesetzt. Beim Adhäsions-Assay erfolgte die Darstellung der Input-normalisierten Werte (Vitalitätsmessung) sowie die statistische Signifikanzbestimmung mittels Mann-Whitney rank-sum Test. Genutzt wurde das Programm „SigmaPlot“ (Version 14.0). Das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Transwell-Migration-Assay

NK-92-Zellen sollten nach zeit- und dosisabhängiger Inkubation mit Leptin aktiv durch eine Membran in Richtung eines potenten Chemokins migrieren.

In diesem Experiment konnten keine signifikanten Unterschiede in der Migrationsgeschwindigkeit der Zellen nach Exposition mit verschiedenen Leptinkonzentrationen gegenüber den Positivkontrollen festgestellt werden (s. Abbildung 7). Es konnte lediglich die bereits bekannte und publizierte migrationsfördernde Wirkung von CXCL-12 auf NK-92 Zellen bestätigt werden (vergl. Negativ – und Positivkontrolle).

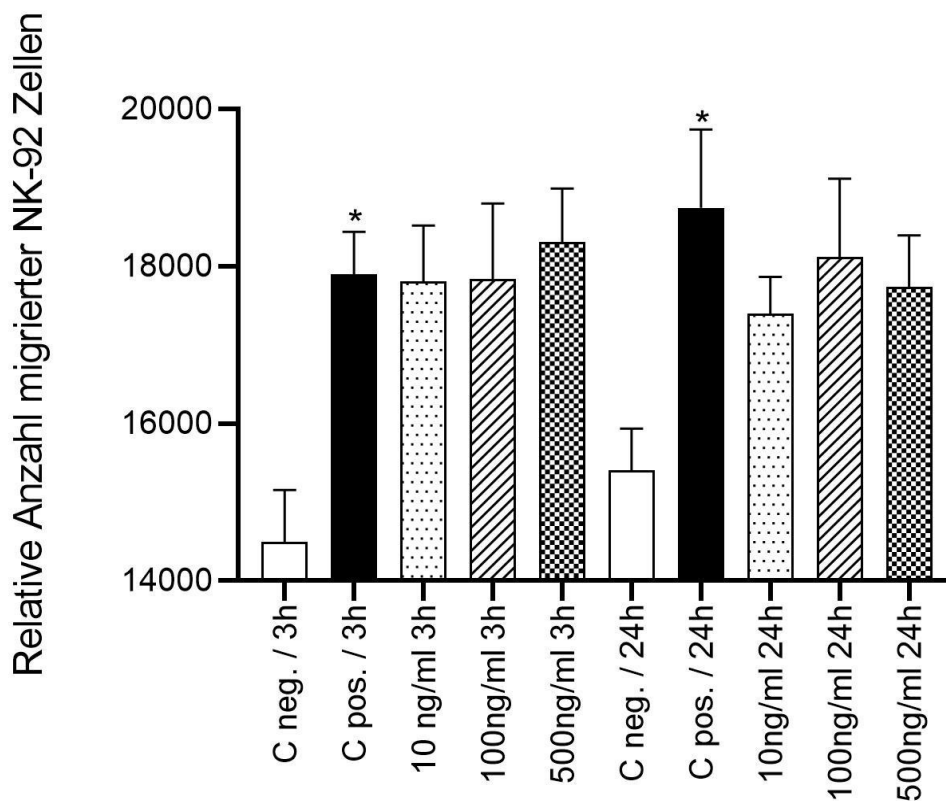


Abbildung 9

Ergebnisse des Transwell-Migration-Assays.

Dargestellt ist die relative Anzahl von migrierten NK-92-Zellen nach Stimulation mit 10, 100 und 500 ng/ml Leptin. Die Zellen wurden entweder 3h oder 24h lang stimuliert. NK-92-Zellen ohne jegliche Stimulation (C neg.) bzw. mit Stimulation durch das potente Chemokin CXCL-12 (C pos.) dienten als Kontrolle. Dargestellte sind die Mittelwerte \pm SEM. * = $p \leq 0,05$

4.2 Live-Cell-Imaging

NK-92-Zellen migrierten nach zeit- und dosisabhängiger Inkubation mit Leptin ungerichtet in einer Zellkulturflasche.

Augenmerk wurde auf die Durchschnittsgeschwindigkeit der ungerichteten Zellmigration gelegt. Es konnte festgestellt werden, dass die Zellen 24h nach Experimentbeginn tendenziell schneller migrierten, als nach 3h. Dies konnte in allen Leptingruppen (10, 100 und 500ng/ml), jedoch auch in den Kontroll-Assays ohne Leptinexposition beobachtet werden. Die Migrationsgeschwindigkeit war allerdings unter keiner Kondition signifikant verändert.

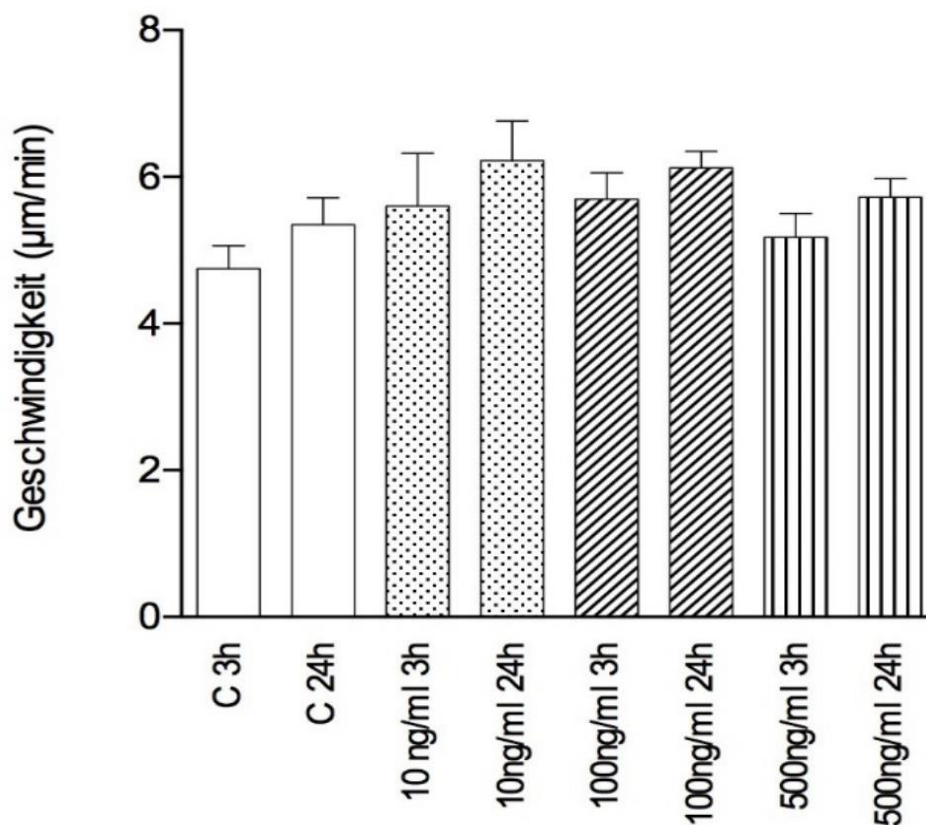


Abbildung 10

Migrationsgeschwindigkeit unter dem Einfluss von verschiedenen Leptinkonzentrationen. Dargestellt ist die ungerichtete Geschwindigkeit von migrierten NK-92-Zellen nach Stimulation mit 10, 100 und 500 ng/ml Leptin. Die Zellen wurden entweder 3h oder 24h lang stimuliert. NK-92-Zellen ohne jegliche Stimulation (C) dienen als Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM

4.3 Immunhistochemische Färbungen

4.3.1 Verteilungsmuster der NK-Zellen

Es wurden NK-Zellen im subkutanen und viszeralen Fettgewebe von *ob/ob*-Mäusen, welche vorher z.T. intraperitoneal Leptin erhalten haben, angefärbt.

In allen subkutanen sowie viszeralen Fettgewebsproben sowohl der Kontroll- als auch der leptinbehandelten Gruppe wurden NK-Zellen gefunden. Beispielhaft sind nachfolgend repräsentative Aufnahmen der detektierten Zellen abgebildet (s. Abbildung 11-14):

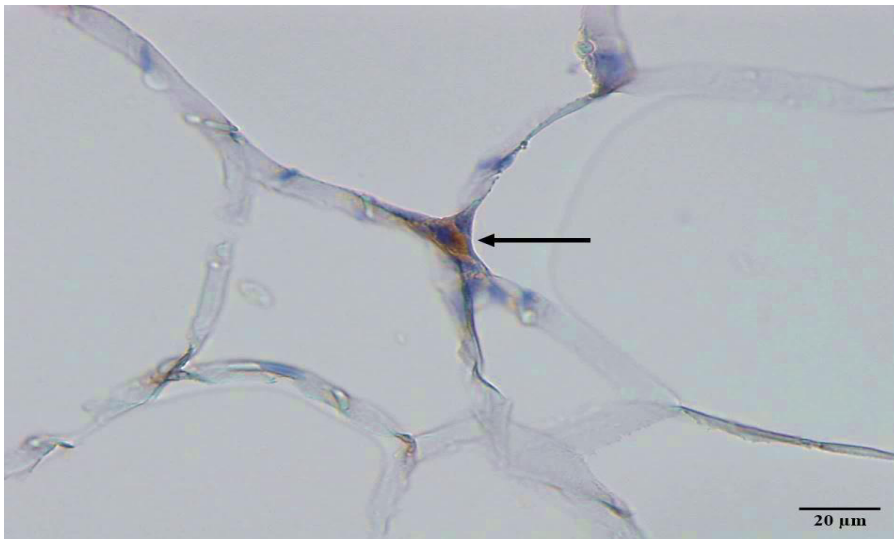


Abbildung 11

Eine NK-Zelle (Pfeil) im viszeralen Fettgewebe eines Kontrolltieres



Abbildung 12

Eine NK-Zelle (Pfeil) im subkutanen Fettgewebe eines Kontrolltieres

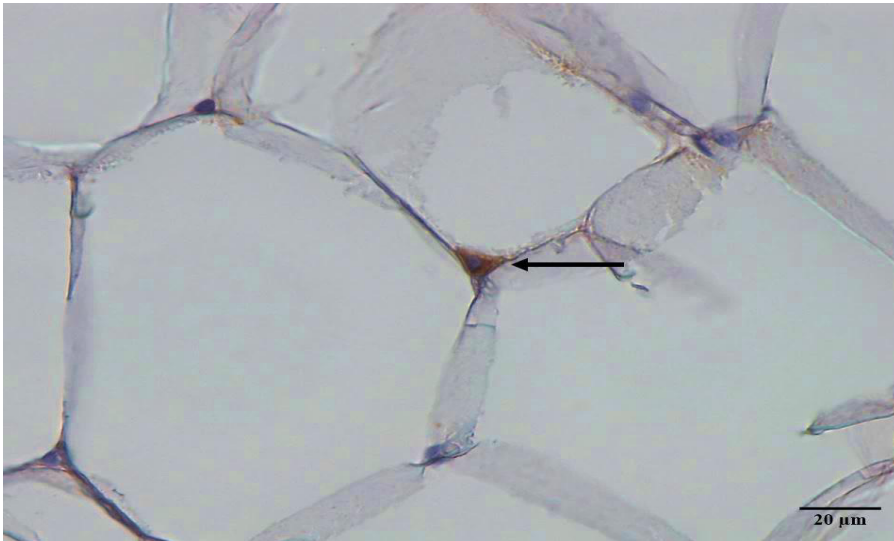


Abbildung 13

Eine NK-Zelle (Pfeil) im viszeralen Fettgewebe eines mit Leptin behandelten Tieres



Abbildung 14

Zwei NK-Zellen (Pfeile) im subkutanen Fettgewebe eines mit Leptin behandelten Tieres

Bei der Auswertung wurde innerhalb der Kontrollgruppen eine signifikant höhere NK-Zellzahl im viszeralen Fettgewebe im Vergleich zum subkutanen Fettgewebe festgestellt (s. Abbildung 15).

In dem viszeralen Fettgewebe war die NK-Zellzahl in der mit Leptin behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe tendenziell erhöht, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant.

Es gab ebenfalls keinen Unterschied zwischen den Zellzahlen im subkutanen Fettgewebe zwischen der Kontroll- und der Leptingruppe.

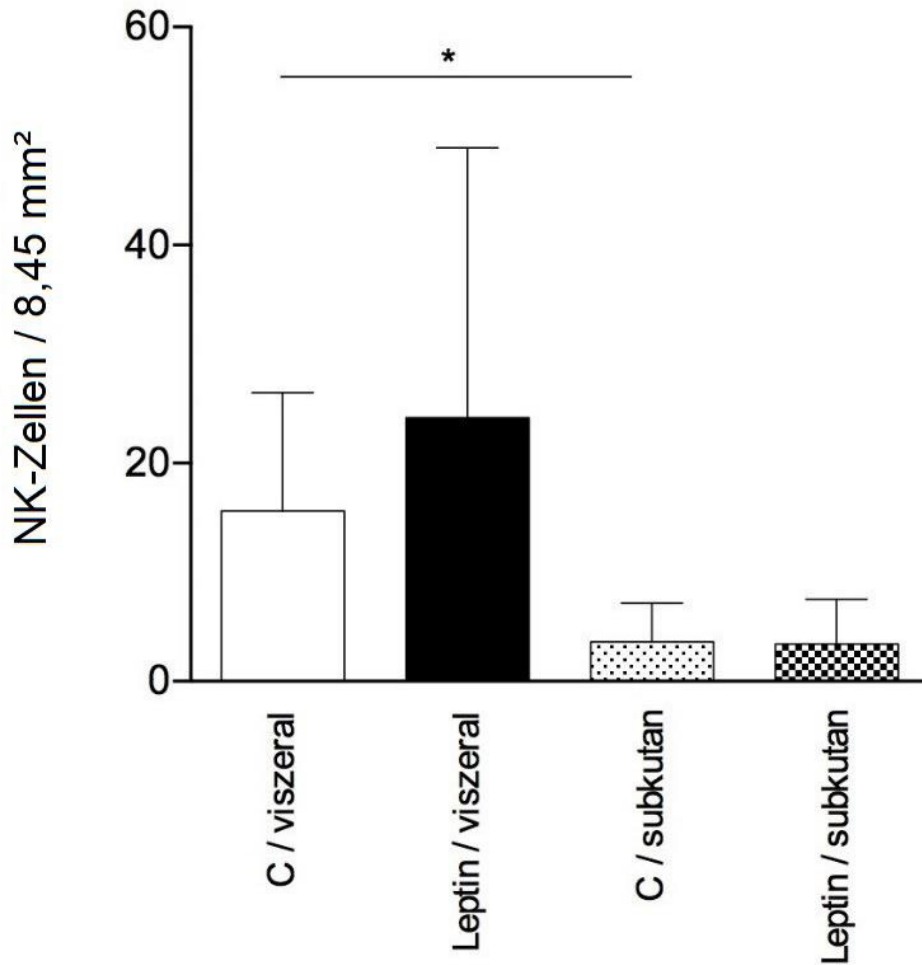


Abbildung 15

Häufigkeiten von NK-Zellen im viszeralen und subkutanen Fett

Dargestellt ist die NK-Zellzahl auf einer Fläche von 8,45mm² nach intraperitonealer Stimulation mit 1mg/kg Körpergewicht Leptin. Die Stimulation erfolgte für 24h. Als Kontrolle dienten Tiere, denen statt Leptin isotone Kochsalzlösung erhalten haben (C). Die NK-Zellzahlen im viszeralen und subkutanen Fettgewebe wurden detektiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. * = $p \leq 0,05$

4.3.2 Potentielle Ausbildung von „Crown-Like-Structures“ durch NK-Zellen

Dieser Ergebnisteil der Arbeit ist zufällig entdeckt worden. „Crown-Like-Structures“ (CLS) sind bisher exklusiv für Makrophagen beschrieben. Hierbei handelt es sich um mikroskopisch erkennbare Ansammlungen von Makrophagen, welche sich um apoptotische Adipozyten herum gruppieren. CLS kommen vor allem in viszeralem Fettgewebe vor, hier werden apoptotische Adipozyten durch die Makrophagen abgebaut (Murano et al. 2008).

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen des Fettgewebes fiel die

besondere Gruppierung der NK-Zellen um einzelne Adipozyten zunächst nicht auf. Erst bei weiterer Recherche zu Makrophagen und ihrer Rolle im Fettgewebe ist die überraschende Ähnlichkeit der CLS zu den Strukturen, die einige NK-Zellen bilden, bemerkt worden. Ein Beispielbild (s. Abbildung 16) einer als CLS beschriebenen Anordnung von Makrophagen aus einer Publikation einer anderen Arbeitsgruppe soll hierbei als Vergleichsbild dienen:



Abbildung 16

Eine CLS, die durch Makrophagen gebildet wurde. Beispielbild aus Canello et al (Canello et al. 2006)

Nachfolgend sind zwei repräsentative Beispielbilder (s. Abbildung 17 und 18) der in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit entdeckten NK-Zell-Anordnungen abgebildet. Man sieht eine große Ähnlichkeit zu der oben dargestellten CLS, welche durch Makrophagen gebildet wird:

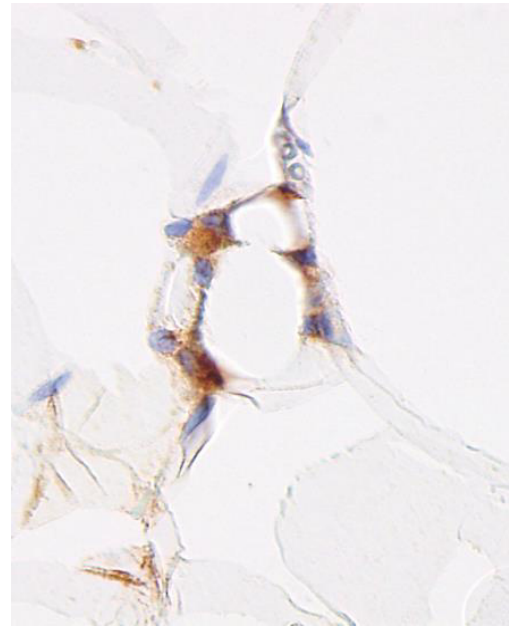
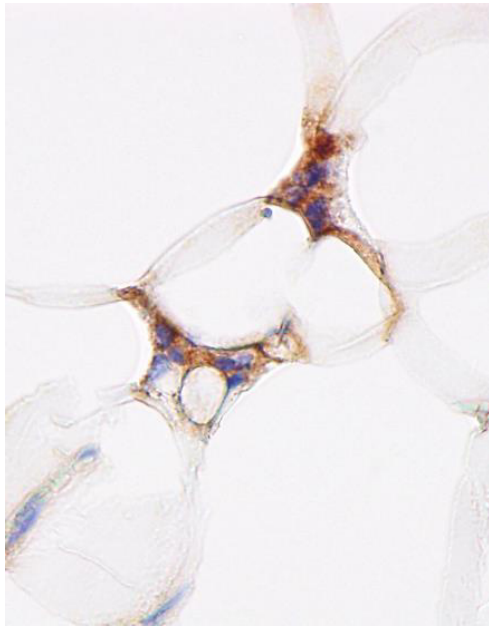


Abbildung 17 und Abbildung 18

NK-Zellen im viszeralen Fettgewebe einer Kontrollmaus, welche möglicherweise ebenfalls eine CLS-artige Struktur bilden

4.4 Adhäsions-Assay

Im Adhäsions-Assay adhärten NK-92-Zellen unter verschiedenen Konditionen zeit- und Leptinkonzentrationsabhängig. Nach dem Abwaschen der nicht adhärenen Zellen wurden die adhärenen Zellen ausgezählt und die Zahlen miteinander verglichen.

Bei der Betrachtung der einzelnen Ergebnisse der Gruppen zu 0 (Kontrolle), 10, 100 und 500ng/ml Leptin nach jeweils 3h und 24h adhärten in der Gruppe der 3h mit Leptin behandelten Zellen signifikant weniger Zellen bei einer Behandlung mit 10 bzw. 500ng/ml Leptin im Vergleich zur Kontrollgruppe. In den anderen Versuchskonfigurationen ergab sich kein signifikanter Unterschied, allerdings ist die Tendenz zu weniger adhärenen Zellen in allen Leptinbehandelten Gruppen erkennbar (s. Abbildung 24).

Anschließend wurden die Zellzahlen aus der 3h- und 24h-Leptininkubierten Gruppen gepoolt betrachtet. Hier zeigte sich eine signifikant geringere Anzahl an adhärenen Zellen in allen mit Leptin stimulierten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe, (s. Abbildung 23). Zwischen den verschiedenen Gruppen der unterschiedlichen Leptinkonzentrationen gab es keine signifikanten Unterschiede in der Zahl der adhärenen Zellen.

Nachfolgend sind repräsentative Beispielaufnahmen (s. Abbildung 19-22) der adhärenen Zellen abgebildet:

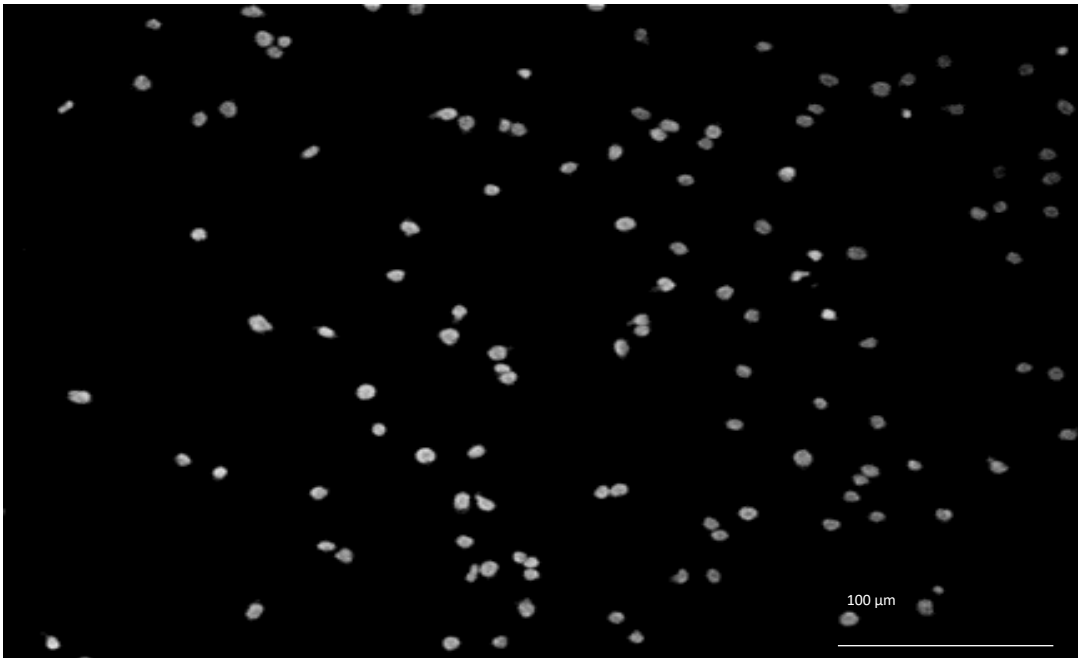


Abbildung 19
Beispielbild für NK-92-Zellen im Adhäsions-Assay ohne Leptinzugabe



Abbildung 20
Beispielbild für NK-92-Zellen im Adhäsions-Assay unter einer Leptinkonzentration von 10ng/ml



Abbildung 21

Beispielbild für NK-92-Zellen im Adhäsions-Assay unter einer Leptinkonzentration von 100ng/ml

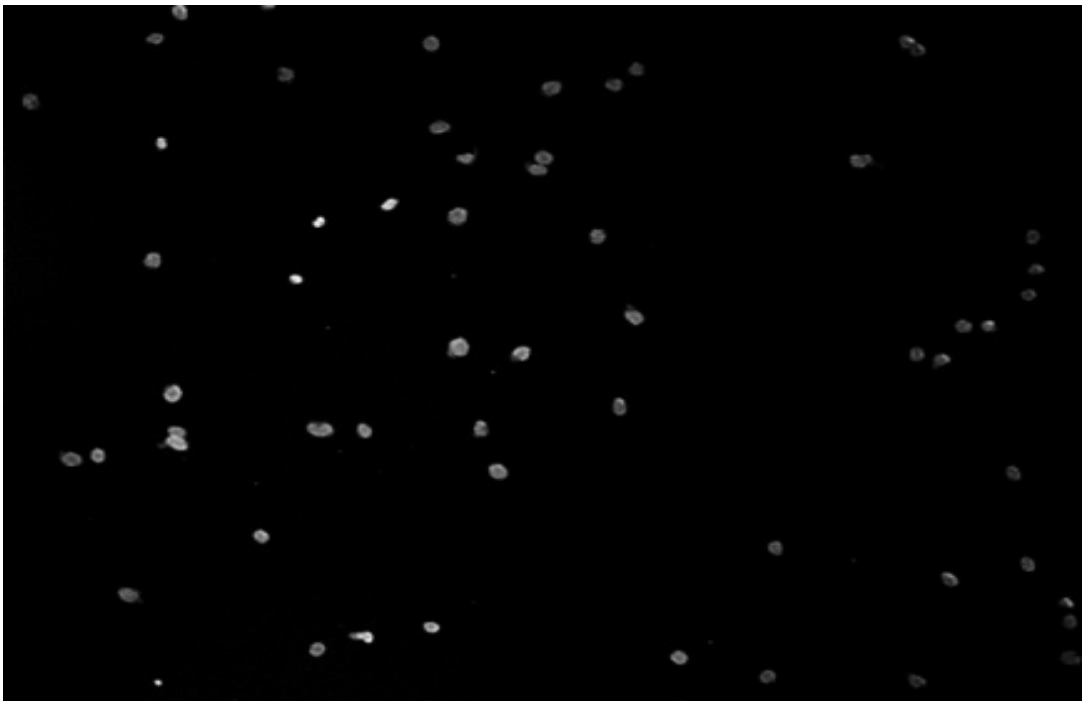


Abbildung 22

Beispielbild für NK-92-Zellen im Adhäsions-Assay unter einer Leptinkonzentration von 500ng/ml

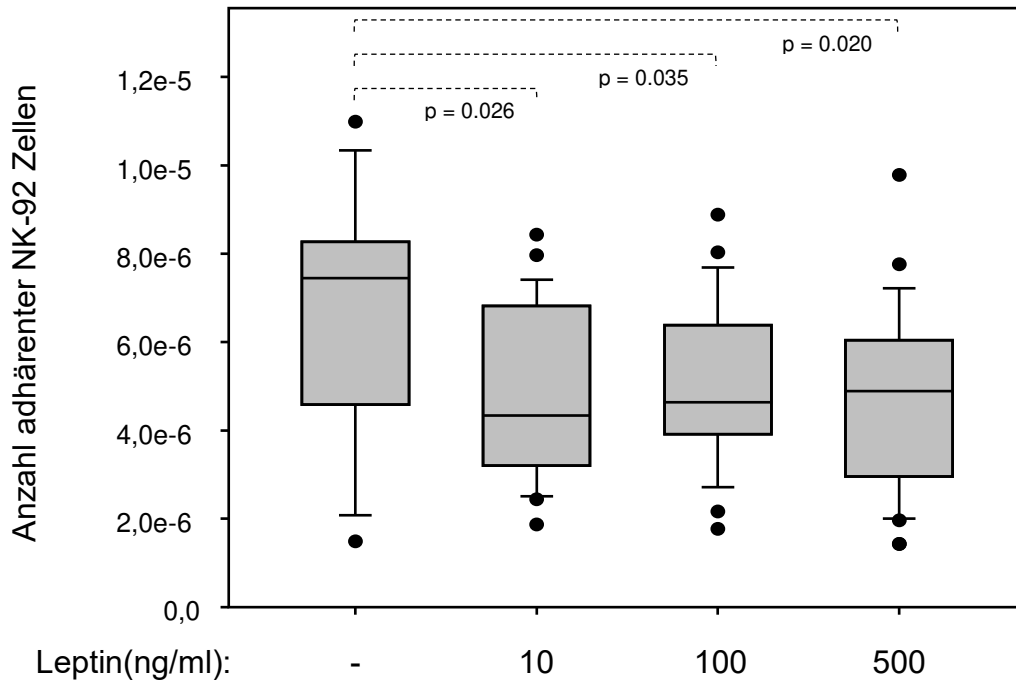


Abbildung 23

Adhäsions-Assay

Dargestellt ist die Anzahl von adhärenter NK-92-Zellen nach Stimulation mit 10, 100 und 500ng/ml Leptin (3h und 24h gepoolt). NK-92-Zellen ohne jegliche Stimulation (-) dienen als Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

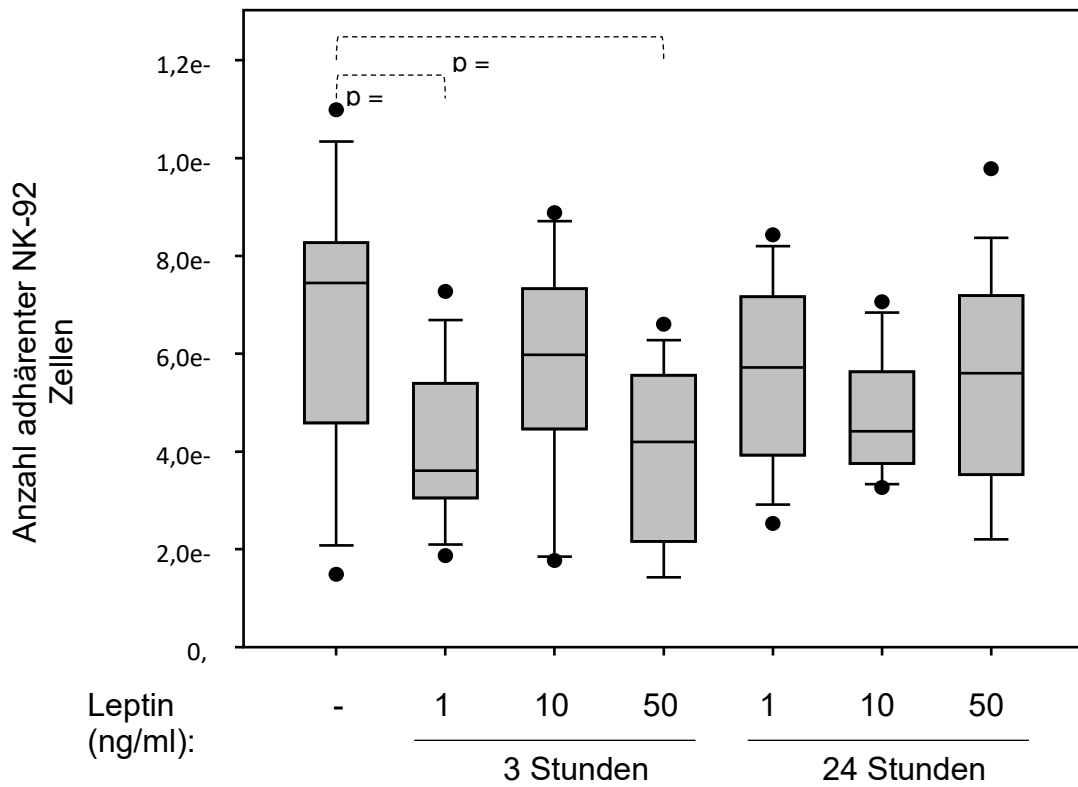


Abbildung 24

Adhäsions-Assay

Dargestellt ist die Anzahl von adhärenter NK-92-Zellen nach Stimulation mit 10, 100 und 500ng/ml Leptin. Die Zellen wurden jeweils 3h oder 24h stimuliert. NK-92-Zellen ohne jegliche Stimulation (-) dienten als Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

5 Diskussion

Krebserkrankungen stellen bei Übergewichtigen und Adipösen ein ernstzunehmendes, in zunehmendem Maße auftretendes Problem dar. Für einen Großteil der Krebstoten in den USA sind Übergewicht und Fettleibigkeit verantwortlich (Goodwin und Chlebowski 2016). Ein erhöhter BMI ist mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für kardiovaskuläre Krankheiten und Tumore assoziiert (Wilson et al. 2002; Bhaskaran et al. 2014). Die Konzentration des Adipokins Leptin im Blut steigt proportional zum Körperfettanteil an, und ist bei Adipösen signifikant erhöht (Schwartz et al. 2000; Silha et al. 2005). Die hohen Leptinspiegel in Adipösen werden mit einer Leptinresistenz, ähnlich der Insulinresistenz, erklärt (Halaas et al. 1997; Schwartz et al. 2000). NK-Zellen sind eine Untergruppe der Lymphozyten und Zellen des angeborenen Immunsystems, die hauptsächlich virusinfizierte Zellen sowie Tumorzellen bekämpfen (Cooper et al. 2001).

Bei Adipösen konnten durch Fettabbau reversible Veränderungen von NK-Zellen und ihren Funktionen beschrieben werden (Lautenbach et al. 2009a; Laue et al. 2015; Jahn et al. 2015).

Effekte von Leptin auf die Migrationsfähigkeit von NK-Zellen sind bisher noch nicht untersucht worden. Erstmals konnte in unserer Arbeitsgruppe eine Veränderung von Filopodien als kleinster Migrationseinheit von Zellen unter dem Einfluss von Leptin bei NK-Zellen nachgewiesen werden (Oswald et al. 2018). Leptin könnte deshalb auch einen Einfluss auf die Migrationsfähigkeit von NK-Zellen haben und so möglicherweise die Anzahl der zu einem Tumor migrierenden Zellen beeinflussen. Dabei korreliert eine hohe Anzahl von Tumor-infiltrierenden NK-Zellen mit einer verbesserten Prognose für den Patienten (Wendel et al. 2008; Vivier et al. 2012).

Aus früheren Studien stellte sich die Frage, ob Leptin ebenfalls einen Einfluss auf die Migrationsgeschwindigkeit der NK-Zellen hat. Eine gerichtete wie auch ungerichtete Migration finden maßgeblich durch Aktinfilament-Umbauten in der Zelle statt. Dies könnte beispielsweise bei einer veränderten Migrationsgeschwindigkeit unter erhöhten Leptinspiegeln eine weitere Erklärung für eine erhöhte Tumorzinzidenz unter Adipösen sein – z.B., wenn die Zellen schlechter zum Tumor migrieren.

Mit dem Transwell-Migration-Assay wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob NK-92-Zellen unter der Stimulation von verschiedenen Leptinkonzentrationen einen Unterschied in der gerichteten Migration aufweisen. Dazu mussten die Zellen aktiv durch Poren von einem Kompartiment in ein anderes migrieren, getriggert vom Chemokin CXCL-12.

Dass in den Experimenten bei der gerichteten Migration keine signifikante Veränderung der Migrationsgeschwindigkeit in keiner der Leptin-Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen festgestellt worden ist, entsprach allerdings nicht den Erwartungen. Die Migration von Zellen erfolgt v.a. durch einen intrazellulären Um- und Aufbau von Aktin sowie der Adhäsion der Zelle an der extrazellulären Matrix (Pollard und Cooper 2009; Geiger und Yamada 2011; Bershadsky und Kozlov 2011). Die Aktinpolymerisation erfolgt in der Zelle an der „leading edge“, also in Richtung der Migration. Gleichzeitig wird an der „trailing edge“ Aktin wieder depolarisiert (Bershadsky und Kozlov 2011). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Leptin bei NK-92-Zellen ebenfalls die Ausbildung von Filopodien, dem kleinsten Abschnitt einer sich fortbewegenden Zelle, beeinflusst. Es kam zu einer Dosis- und Inkubationszeitabhängigen Verkürzung von Filopodien sowie einer insgesamt Vermehrung der Filopodien bei den Zellen. Die Filopodien von NK-92-Zellen, die für kurze Zeit (30 Minuten) mit einer relativ niedrigen Leptinkonzentration stimuliert wurden, waren signifikant kürzer als die Filopodien der Kontrollzellen. Zudem wurde gezeigt, dass die Kolo-kalisation (also die räumliche Nähe) von Aktin und dem Aktin-bindenden Protein Cofilin unter Leptineinfluss reduziert wurde (Oswald et al. 2018). Cofilin sorgt für eine beschleunigte Depolymerisierung, also dem Abbau von Aktin-Filamenten (Hotulainen et al. 2005). Diese können dann von der Zelle an anderer Stelle, z.B. zum aktiven Migrieren in Richtung der „leading edge“, wiederverwendet werden (Svitkina 2018). In der Vergangenheit konnte zudem gezeigt werden, dass Leptin ATP-sensitive K⁺-Kanäle aktivieren kann, und so über einen Phosphoinositid3-Kinase (PI3-Kinase)-Signalweg zu einem Umbau des filamentösen Aktins führt (Harvey et al. 2000; O'Malley et al. 2005). Dies ließ auch eine Wirkung auf die Migrationsgeschwindigkeit erwarten. Möglicherweise ist der *in-vitro*-Einfluss auf die NK-92-Zellen aber zu klein, um eine statistisch relevante Änderung der Migrationsgeschwindigkeit zu bewirken. Eventuell sind die Effekte von Leptin auf NK-92-Zellen in Hinblick auf die Migrationsgeschwindigkeit auch deshalb nicht oder nur minimal vorhanden, weil diese als eine immortalisierte Zelllinie ursprünglich aus einem Tumorpatienten stammt und bestimmte Eigenschaften im Vergleich zu primären NK-Zellen verändert bzw. nicht mehr vorhanden sind. Es muss diskutiert werden, ob die verwendete Zelllinie, verglichen mit primären NK-Zellen oder anderen NK-Zelllinien, eine geringere Sensitivität bezüglich der Migrationsfähigkeit gegenüber Leptin aufweist. Auch in weiteren Experimenten der Arbeitsgruppe mit NK-Zellen und anderen Read-out-Systemen konnte eine reduzierte Wirkung von Leptin auf NK-92-Zellen versus anderen NK-Zelllinien und primären NK-Zellen nachgewiesen werden. So wurde in Experimenten gezeigt, dass die Zytotoxizität von NK-92-Zellen ohne und auch mit Leptin gegenüber DLD-1-Zellen (humane kolorektale Adenokarzinom-Zellen) signifikant geringer ist, als

bei primären NK-Zellen. Dem gegenüber stand eine signifikant erhöhte Interferon (INF)- γ -Produktion von NK-92-Zellen im Vergleich zu den primären NK-Zellen. Die INF- γ -Produktion ließ sich bei den NK-92-Zellen auch nicht durch Leptingaben beeinflussen, während Leptin die INF- γ -Produktion bei primären NK-Zellen signifikant senkte (Bähr et al. 2017).

Was wiederum für eine potentielle Beeinflussung des Aktinumbaus durch Leptin auch in NK-92-Zellen spricht, ist, dass diese Zellen in anderen Experimenten abhängig von verschiedenen Leptinkonzentrationen signifikante Veränderungen z.B. der Zytotoxizität und des Zellstoffwechsels aufwiesen (Lamas et al. 2013). Zum Töten von Zielzellen ist die Ausbildung einer „immunologischen Synapse“ zwischen NK- und Zielzelle notwendig, hierfür ist ebenfalls eine F-Aktin-Polymerisation erforderlich. Deshalb könnte die Veränderung der Zytotoxizität hiermit, neben funktionellen Veränderungen, ebenfalls begründet sein (Banerjee und Orange 2010; Lee et al. 2014; Mace und Orange 2014). Die in unseren Experimenten genutzte NK-92-Zelllinie ist eine der weitverbreitetsten immortalisierten NK-Zelllinien in Zellkulturlaboren weltweit (Gong et al. 1994). Die oben diskutierten Ergebnisse in der Zytotoxizität bzw. der INF- γ -Produktion unterstreichen dennoch, dass die genutzte Zelllinie nicht alle Eigenschaften vergleichbar mit primären NK-Zellen aufweist. Ähnliche Diskrepanzen in Bezug auf die Beeinflussbarkeit der Migration durch Leptin könnte es also auch im Vergleich von NK-92-Zellen mit anderen NK-Zelllinien oder primären NK-Zellen geben.

Leptin kann auch direkt als Chemokin auf Immunzellen und auch Tumorzellen wirken. Für NK-Zellen sind diesbezüglich bisher keine Daten verfügbar. Ein Einfluss als Chemokin auf andere Immunzellen wie z.B. den basophilen Granulozyten ist aber bereits publiziert worden. Wurde Leptin in einem Transwell-Migration-Assay als Chemoattraktor im unteren Well genutzt, so migrierten signifikant mehr Zellen durch die Membran. Der Effekt von Leptin als Chemokin war sogar gleichwertig zu anderen, bereits bekannten migrationsanregenden Chemoattraktoren für basophile Granulozyten (Suzukawa et al. 2011). Für neutrophile und eosinophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen und dendritische Zellen ist ebenfalls beschrieben worden, dass Leptin eine gesteigerte Migration induzieren kann (Żelechowska et al. 2020). Auch für Tumorzellen, z.B. Prostatakarzinomzellen, konnte bei Experimenten zur Migration im Transwell-Migration-Assay eine signifikant höhere Tumorzellzahl migrieren, wenn Leptin als alleiniges Chemokin im unteren Well genutzt wurde (Frankenberry et al. 2004). Andere Arbeitsgruppen wählten eine unterschiedliche Vorgehensweise und inkubierten verschiedene Tumorzellen bereits vor der Migration durch ein Transwell-Migration-Assay mit Leptin. Hier konnten jeweils signifikant höhere Zahlen migrierter Zellen in den mit Leptin behandelten Gruppen gezeigt werden. Die untersuchten Zellen waren hier

Brustkrebszelllinien, Magenkarzinomzelllinien und Zelllinien eines papillären Schilddrüsenkarzinoms. Interessanterweise kann Leptin bei anderen Tumorarten wiederum eine hemmende Wirkung auf die Migration von entsprechenden Tumorzelllinien haben, wie z.B. dem anaplastischen und follikulären Schilddrüsenkarzinom (Cheng et al. 2010; Dong et al. 2014; Haque et al. 2018). Leptin ist also generell in der Lage, die Migrationsfähigkeit von verschiedenen Immun- und Tumorzellen zu beeinflussen bzw. Zellen als potentes Chemokin auch direkt zu einer gerichteten Migration zu animieren.

Ob Leptin auch eine Wirkung als Lockstoff auf NK-Zellen hat, sollte daher bei zukünftigen Experimenten geprüft werden.

Leptin könnte aber auch nicht nur auf die gerichtete Migration einen Einfluss haben, sondern ebenfalls auf die allgemeine Bewegungsfähigkeit der Zellen an sich. Deshalb wurden NK-92-Zellen in einem Live-Cell-Imaging-System gefilmt und der zeitabhängige Einfluss verschiedener Leptinkonzentrationen auf die ungerichtete Migration untersucht. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede in der Migrationsgeschwindigkeit der NK-Zellen unter dem Einfluss von Leptin.

Für NK-Zellen gibt es bisher keine vergleichbaren Untersuchungen, und die Datenlage ist auch für andere Immunzellen aktuell noch sehr spärlich. Für neutrophile Granulozyten konnte allerdings zumindest ein Einfluss des BMIs von schlanken und adipösen Probanden und Probandinnen auf die ungerichtete Migrationsstrecke dieser Zellen gezeigt werden. Die Leptinlevel der Probanden wurden hierbei nicht bestimmt. Bekanntermaßen ist aber davon auszugehen, dass sie bei den adipösen Personen verglichen mit den Schlanken deutlich erhöht gewesen sein müssen (Jahn et al. 2015). Es konnte eine signifikant erhöhte ungerichtete Migrationsstrecke von neutrophilen Granulozyten beobachtet werden, die aus adipösen Individuen gewonnen wurden (Brotfain et al. 2015). Dies lässt vermuten, dass Adipositas und ein damit einhergehender erhöhter Leptinspiegel auch auf andere Immunzellen, wie z.B. den NK-Zellen, einen Einfluss auf die ungerichtete Migrationsgeschwindigkeit haben könnte.

Leptin sorgt also bei vielen Tumorzellen und einigen Immunzellen für eine Erhöhung der Migrationsleistung. Bei den in dieser Arbeit genutzten NK-92-Zellen scheint es allerdings keinen Einfluss zu haben. Entweder lassen sich NK-Zellen generell nicht im Hinblick auf Migrationseigenschaften unter erhöhten Leptinspiegeln beeinflussen, so dass Tumorzellen durch eine gesteigerte Migration „im Vorteil“ sind und es deshalb zu einer erhöhten Tumorzinzidenz unter Übergewichtigen und Adipösen kommt. Oder es eignen sich, wie bereits diskutiert, die verwendeten NK-92-Zellen für derartige Migrationsexperimente nicht, da diese Zelllinie als immortalisierte Tumorzelllinie

möglicherweise bestimmte Eigenschaften in Hinblick auf die Beeinflussung der Migration durch Leptin verloren hat, bzw. dieser Einfluss in Experimenten nicht messbar / zu gering ist. Es sollten daher weitere Experimente mit anderen NK-Zelllinien bzw. primär gewonnen NK-Zellen im Hinblick auf die gerichtete und ungerichtete Migration erfolgen. Des Weiteren führt Adipositas nicht nur zu einer Erhöhung des Leptinspiegels, sondern auch zu Veränderungen bei anderen Hormonen (wie z.B. Adiponektin oder Insulin) sowie Änderungen der Blutzuckerkonzentration usw. (Schwartz et al. 2000). Diese könnten einzeln oder in Kombination ebenfalls Auswirkungen auf die Migrationsfähigkeit haben und wurden in den durchgeführten Experimenten nicht untersucht.

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war, ob eine peritoneale Leptinapplikation eine NK-Zellmigration induzieren kann. Hierzu wurde ein *ob/ob*-Mausmodell genutzt.

Das Fettgewebe eines erwachsenen Menschen kann grundsätzlich in das subkutane und das viszerale (die inneren Organe umschließende) Fettgewebe unterteilt werden. Vermehrtes subkutanes Fettgewebe wird im Allgemeinen als weniger gesundheitsschädlich als vermehrtes viszerales Fettgewebe angesehen. Viszerales Fett ist im Vergleich metabolisch aktiver, zellreicher, besser vaskularisiert und innerviert und enthält mehr Entzündungs- und Immunzellen als subkutanes Fettgewebe. Für die bei Übergewichtigen und Adipösen vorliegende chronische, subklinische Inflammation wird die deutlich erhöhte Anzahl von aktiven Immunzellen im viszeralen Fettgewebe mit verantwortlich gemacht (Ibrahim 2010; Catryse und van Loo 2018).

Die häufigste Immunzellart, welche im Fettgewebe vorkommt, sind Makrophagen. Bei schlanken Menschen sorgen sie für den Abbau von untergegangenen Adipozyten und sind endokrin wenig aktiv. Im Fettgewebe von adipösen Probanden konnte eine massive Zunahme der Zellzahl und endokrinen Aktivität von Makrophagen und auch NK-Zellen beschrieben werden (Catryse und van Loo 2018).

Die Anzahl der NK-Zellen in unseren Versuchen war im viszeralen Fett der Versuchstiere im Vergleich zum subkutanen Fett innerhalb der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Dieser Aspekt konnte bereits in anderen Arbeiten gezeigt werden (Wensveen et al. 2015).

Innerhalb der Zellzahlen des viszeralen Fettes gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, allerdings war die NK-Zellzahl in der Leptingruppe tendenziell höher als in der Kontrollgruppe.

Für Fettgewebsmakrophagen wurde nachgewiesen, dass in hochkalorisch ernährten Mäusen eine zeitabhängige Makrophagenproliferation im Fettgewebe (viszeral mehr als subkutan) vorhanden ist (Haase et al. 2014). Die Arbeitsgruppe Gericke konnte zudem zeigen, dass Makrophagen aus dem Fettgewebe adipöser Mäuse auch nach Explantation und Überführung des Fettgewebes in eine Zellkultur weiter hoch proliferativ

und proinflammatorisch aktiv bleiben. Makrophagen können hierbei in einen proinflammatorischen M1-Phänotyp und einen eher anti-inflammatorischen M2-Phänotyp unterschieden werden. Makrophagen aus dem Fettgewebe von schlanken Versuchstieren zeigten dabei fast ausschließlich einen M2-Phänotyp, während Makrophagen aus adipösen Mäusen weniger M2- und mehr M1-Phänotypen aufwiesen (Braune et al. 2017). Für NK-Zellen ist ein solcher Wechsel zwischen verschiedenen Phänotypen bisher nicht bekannt.

Ob die NK-Zellen vermehrt in das Fettgewebe migrierten oder dort ebenfalls proliferierten, wurde im Rahmen dieser Dissertation nicht untersucht. Eine NK-Zell-Proliferation scheint allerdings eine mögliche Erklärung zu sein. In adipösen Individuen ist das Zytokin IL-4 erhöht (El-Wakkad et al. 2013). IL-4 stellt einen Proliferationsreiz für Makrophagen dar. Makrophagen selbst produzieren IL-15, welches wiederum im Mausmodell die Proliferation von NK-Zellen fördert (s.g. IL-4-NK-Zellen) (Kiniwa et al. 2016). Auch andere Arbeitsgruppen halten eine Proliferation der NK-Zellen im Fettgewebe für wahrscheinlicher als eine vermehrte Migration (Wensveen et al. 2015). Für anderen Immunzellen kann Leptin die Blutgefäße für eine Extravasation „abdichten“: Leptin, nach einer cerebralen Ischämie in die Cisterna magna von Ratten injiziert, kann durch eine Stabilisierung der Blut-Hirn-Schranke neutrophile Granulozyten daran hindern, Infarktareale zu infiltrieren (Hung et al. 2020).

Dem gegenüber steht, dass Leptin die Gefäßpermeabilität von neu gebildeten Blutgefäßen erhöhen kann und zudem für deren Fenestrierung verantwortlich ist. In normalgewichtigen Mäusen wurden fenestrierte Blutgefäße vor allem im (Leptin produzierendem) Fettgewebe und anderen hormonproduzierenden Geweben gefunden. Durch die Poren dieser Kapillaren können kleine Proteine / Hormone vereinfacht hindurchtreten. In Leptindefizienten ob/ob-Mäusen waren fenestrierte Kapillaren im Fettgewebe dagegen überhaupt nicht vorhanden (Cao et al. 2001). Im Hinblick auf den Einfluss von Leptin auf die Struktur und Integrität von Gefäßen und die daraus resultierenden Bedeutung auf die Extravasation von Immun- und insbesondere NK-Zellen sind also noch viele Fragestellungen ungeklärt.

Auch die gegenseitige Beeinflussung von NK-Zellen und Makrophagen im Fettgewebe ist weiter Gegenstand von Forschungsprojekten. Lee et al. vermuten, dass NK-Zellen durch Produktion von Zytokinen selbst eine Art vorgeschalteten Regulator für Fettgewebsmakrophagen darstellen. In Mausmodellen, in denen NK-Zellen depletiert wurden, verbesserte sich die Adipositas-induzierte Insulinresistenz. Parallel kam es zu einer Abnahme von Fettgewebsmakrophagen und einer verringerten Fettgewebsinflammation. Wurde das NK-Zell-Wachstum durch Gabe von IL-15 hingegen wieder stimuliert bzw. NK-Zellen in Versuchstiere transplantiert, kam es umgekehrt zu

einer Vermehrung der Fettgewebsmakrophagen sowie vermehrter Entzündung und einer Steigerung der Insulinresistenz (Lee et al. 2016).

Welche Zellart letztendlich eine Proliferation bzw. Migration der jeweils anderen auslöst, lässt sich zum heutigen Zeitpunkt noch nicht eindeutig feststellen und sollte – insbesondere in Hinblick auf die NK-Zellen – Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Festhalten lässt sich, dass NK-Zellen und Makrophagen eng miteinander agieren und die Entzündung des Fettgewebes wahrscheinlich gegenseitig aufrechterhalten.

Ein weiteres interessantes Ergebnis dieser Arbeit ist, dass NK-Zellen im Fettgewebe eine bestimmte Anordnung einnehmen können, die stark an ähnliche Konfigurationen von Makrophagen im Fettgewebe erinnern. Soweit zum Zeitpunkt der Erstellung der Arbeit nach ausführlicher Literaturrecherche bekannt, konnte erstmals gezeigt werden, dass NK-Zellen im Fettgewebe möglicherweise ebenfalls in s.g. „Crown-Like-Structures“ (CLS) auftreten können.

Die Bildung von CLS wurde bisher nur bei Makrophagen beschrieben, welche tote oder sterbende Adipozyten umlagern und abbauen. Dabei sind über 90% der Makrophagen in viszeralem Fett übergewichtiger Menschen und Tiere als CLS angeordnet. Die CLS kommen ebenfalls signifikant häufiger im viszeralen als im subkutanen Fettgewebe übergewichtiger Mäuse vor (Murano et al. 2008). NK-Zellen stehen auch in anderen Organen in engen räumlichen Beziehungen zu Makrophagen. Deshalb könnte vermutet werden, dass die angefärbte CLS-ähnliche-Anordnung der NK-Zellen mit sehr ähnlich oder genau gleich angeordneten Makrophagen korrespondieren könnten, welche ihrerseits ebenfalls eine Art CLS bilden. Denkbar wäre, dass hier eine Abtötung der CLS-bildenden Makrophagen durch die NK-Zellen erfolgt, die sich zu diesem Zweck räumlich ähnlich anordnen. Dass NK-Zellen (überstimulierte) Makrophagen abtöten können, ist bereits mehrfach beschrieben worden. Dadurch wird wahrscheinlich eine überschießende Immunantwort verhindert (Vivier et al. 2008; Bellora et al. 2010; Michel et al. 2012). In anderen Versuchen war die Dichte der CLS in epididymalem/viszeralem Fett von zwölf Wochen mit Leptin intraperitoneal behandelten *ob/ob*-Mäusen (Leptindefizienten Mäusen) signifikant reduziert – ob dieser Effekt allerdings durch NK-Zellen vermittelt wurde, ist noch unklar (Hoffmann et al. 2019). Innerhalb der CLS konnten im subkutanen Fettgewebe bereits B- und T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Sie formten allerdings nicht selbst CLS, sondern wurden zwischen den Makrophagen der CLS dokumentiert. (McDonnell et al. 2012). Anhand der in dieser Arbeit dokumentierten NK-Zell-Lokalisation kann vermutet werden, dass NK-Zellen selbst fähig sind, CLS zu bilden – in dem hier ausgewerteten Versuch wurden ausschließlich NK-Zellen angefärbt, keine Makrophagen. Im Vergleich zu Bildern von CLS, die durch Makrophagen gebildet werden, lassen sich große Analogien erkennen.

Welche Rolle NK-Zellen in der möglichen Anordnung als CLS im Fettgewebe spielen, ist bisher nicht untersucht worden. Sollten sich die CLS-ähnlichen Strukturen der NK-Zellen in enger räumlicher Nähe zu den durch Makrophagen gebildeten CLS befinden, dient dies wahrscheinlich der Regulation oder der Apoptoseinduktion der korrespondierend angeordneten Makrophagen. Die Entdeckung der Ähnlichkeiten mit den aus Makrophagen gebildeten CLS erfolgte rein zufällig, weshalb keine Statistik über die Verteilung der mutmaßlichen NK-Zell-CLS zwischen Leptin- / Kontrollgruppe oder Subkutan- / Viszeraalfett erfolgte.

Ob NK-Zellen tatsächlich in CLS vorhanden sind oder sogar selbst in der Lage sind, CLS zu bilden, ist bis dato unbekannt. Es sollten in zukünftigen Untersuchungen bestenfalls Makrophagen und NK-Zellen in denselben Schnitten angefärbt werden, auch um festzustellen, ob eine CLS möglicherweise aus Makrophagen und NK-Zellen gemeinsam gebildet wird.

In einem weiteren Experiment erfolgte die zeit- und dosisabhängige Stimulierung von NK-92-Zellen mit Leptin. Anschließend wurde festgestellt, wie sich Leptin auf die Adhäsionsfähigkeit der NK-Zellen auswirkt.

Nach jeweils drei- und 24-stündiger Leptininkubation in aufsteigenden Dosierungen zeigten sich in unseren Experimenten innerhalb der Leptingruppen signifikant weniger adhären NK-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bisher ist die Adhäsion von NK-Zellen unter Leptineinfluss nicht untersucht worden. Auch zu anderen Zellarten existieren nur wenige Daten in Bezug auf die Adhäsionsfähigkeit unter Leptineinfluss. So wurden beispielsweise Monozyten untersucht, welche aus buffy coats (Leukozyten-/Thrombozytengemisch) isoliert wurden. Nach Inkubation mit verschiedenen Leptinkonzentrationen (0, 10, 100 und 1000ng/ml) ließ man die Zellen auf Endothelzellen adhären. Interessanterweise zeigte sich mit steigender Leptinkonzentration auch eine vermehrte Adhäsion – bis zu 3,5-fach mehr Zellen adhärten unter der höchsten Leptinkonzentration im Vergleich zur Kontrolle (Curat et al. 2004). Zwar wurde hier die Adhäsion auf Endothelzellen ausgewertet und ist daher nur eingeschränkt vergleichbar, dennoch scheinen Monozyten und NK-Zellen bezüglich der Adhäsionsfähigkeit gegensätzlich auf Leptin zu reagieren. Eine suffiziente Adhäsion der Zellen mit der Extrazellulärmatrix (intravasal und auch innerhalb eines zu durchwandernden Gewebes) ist ebenso essentiell für die Fortbewegung der Zelle wie auch der intrazelluläre Umbau des Zytoskeletts notwendig ist. An beiden Vorgängen ist Aktin das maßgeblich beteiligte Strukturprotein, dessen Umbau wie bereits beschrieben durch Leptin beeinflusst werden kann. Es wird davon ausgegangen, dass sowohl eine zu geringe, als auch eine zu starke Adhäsion der Zellen die Migrationsgeschwindigkeit verlangsamt. Bei einer zu geringen

Adhäsion ist zu wenig Traktion für eine schnelle Fortbewegung vorhanden, bei einer zu starken Anhaftung der Zelle hemmt diese ebenfalls die Migration (DiMilla et al. 1991; Gupton und Waterman-Storer 2006; Kim und Wirtz 2013). Die optimale Adhäsion für NK-Zellen ist im Hinblick auf die Migrationsgeschwindigkeit bisher nicht untersucht worden, so dass eine verminderte Adhäsion zunächst keine Aussage über eine Verbesserung oder Verschlechterung der Migrationsleistung geben kann. Beide Optionen sind daher möglich.

Auch bei Tumorzellen konnte ein Einfluss von Leptin auf die Adhäsion beschrieben werden. Die kolorektale Krebszelllinie HCT 116 wurde zwölf Stunden einer physiologischen Leptinkonzentration ausgesetzt (10ng/ml). Diese Leptininkubation hatte ebenfalls einen signifikant verstärkenden Effekt auf die Adhäsion der Zellen auf Zellkulturplatten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Yoon et al. 2014).

Leptin kann also bei einigen Immun- und Tumorzellen die Adhäsionsfähigkeiten erhöhen. Bei der untersuchten NK-92-Zelllinie reduzierte Leptin die Fähigkeit zur Adhäsion. Um zu klären, ob dies nur bei der untersuchten Zelllinie so ist, sollten weitere Adhäsionsuntersuchungen mit anderen NK-Zelllinien bzw. primären NK-Zellen erfolgen. Zudem könnten beispielsweise auch die Konzentration von verschiedenen Adhäsionsmolekülen in Überständen von NK-Zellkulturen bestimmt werden, welche mit Leptin stimuliert wurde.

6 Zusammenfassung

Die Inzidenz von Übergewicht und Adipositas nimmt weltweit zu, damit auch die gesundheitlichen und ökonomischen Folgen.

Fettgewebe bildet als endokrines Organ verschiedene Hormone, wie z.B. Leptin. Leptin ist einerseits maßgeblich an der Fett- und Energiehomöostase des Körpers beteiligt, andererseits beeinflusst es die Immunfunktion von Abwehrzellen sowie ebenfalls Entzündungsprozesse.

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gehören zu den Lymphozyten und sind Immunzellen, die Tumor- und virusinfizierte Zellen eliminieren können. Die immunologische Funktion der NK-Zellen kann durch erhöhte Leptinspiegel gestört werden.

Leptin beeinflusst auch die Polymerisierung von Aktin, welche u.a. wichtig für eine aktive Zellmigration ist. In der vorliegenden Arbeit wurde durch verschiedene Methoden (Transwell-Migration-Assays, Live-Cell-imaging) betrachtet, ob erhöhte Leptinkonzentrationen einen Einfluss auf die Migrationsgeschwindigkeit der NK-Zelllinie NK-92 haben. Zudem wurde evaluiert, ob Leptin auch einen Einfluss auf die Adhäsion von NK-92-Zellen an extrazellulärer Matrix hat. Mittels immunhistochemischer Färbungen von Fettgewebe aus mit Leptin behandelten Mäusen wurde schließlich untersucht, ob es Unterschiede in der im Fettgewebe präsenten NK-Zellzahl gibt.

In den Migrationsexperimenten konnten keine signifikanten Unterschiede in der Migrationsgeschwindigkeit von NK-92-Zellen nach Leptinstimulation festgestellt werden – weder für die gerichtete, noch die ungerichtete Migration.

Bei den immunhistochemischen Färbungen konnte bestätigt werden, dass insgesamt mehr NK-Zellen im viszeralem als subkutanem Fettgewebe nachweisbar sind. Es gab allerdings keine signifikanten Unterschiede in den Zellzahlen in den verschiedenen Fettgewebekompartimenten zwischen Leptin- und Kontrollgruppe. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass sich die NK-Zellen möglicherweise in Crown-Like-Structures-ähnlichen Ansammlungen um Adipozyten positionieren. Dies war bisher nur für Makrophagen beschrieben worden – nun erstmals potentiell auch für NK-Zellen.

Nach Leptinstimulation adhärten signifikant weniger NK-92-Zellen auf mit Fibronektin beschichtetem Zellkulturplastik als in der nicht behandelten Kontrollgruppe.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die gerichtete und ungerichtete Migration von NK-92-Zellen durch Leptinstimulation nicht signifikant verändert wird. Intraperitoneale Leptinapplikation führt bei Mäusen tendenziell zu einer erhöhten Anzahl von NK-Zellen im viszeralen Fettgewebe, und möglicherweise sind NK-Zellen in der

Lage, ähnliche Strukturen wie die bisher nur bei Makrophagen bekannten Crown-like-Structures auszubilden. Zudem führte eine Leptininkubation bei NK-92-Zellen zu einer Abnahme der Adhäsionsfähigkeit. Unklar ist hierbei noch, ob dies zu einer verbesserten oder verschlechterten Migrationsfähigkeit führt.

In weiteren Experimenten sollten die Migrationsversuche mit primär gewonnenen NK-Zellen und/oder anderen NK-Zelllinien wiederholt werden. Des Weiteren sollten weitere Versuche im Zusammenhang von NK-Zellen und der Ausbildung von CLS durchgeführt werden, um zu klären, welche Funktion NK-Zellen in diesen Strukturen einnehmen. Zudem sollte der Einfluss von Leptin auch auf die Adhäsionsfähigkeit von anderen NK-Zelllinien/ primären NK-Zellen weiter erforscht werden.

7 Literatur

- Al Maskari MY, Alnaqdy AA (2006) Correlation between Serum Leptin Levels, Body Mass Index and Obesity in Omanis. *Sultan Qaboos Univ Med J* 6:27–31
- Babichev Y, Khalid S, Fantus IG (2011) *Potential Mechanisms Linking Insulin to Cancer*. Springer New York
- Bähr I, Goritz V, Doberstein H, Hiller GGR, Rosenstock P, Jahn J, Pörtner O, Berreis T, Mueller T, Spielmann J, Kielstein H (2017) Diet-Induced Obesity Is Associated with an Impaired NK Cell Function and an Increased Colon Cancer Incidence. *Journal of nutrition and metabolism* 2017:4297025. doi:10.1155/2017/4297025
- Bamburg JR (1999) Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annual review of cell and developmental biology* 15:185–230. doi:10.1146/annurev.cellbio.15.1.185
- Banerjee PP, Orange JS (2010) Quantitative measurement of F-actin accumulation at the NK cell immunological synapse. *J. Immunol. Methods* 355:1–13. doi:10.1016/j.jim.2010.02.003
- Barreiro O, Yáñez-Mó M, Serrador JM, Montoya MC, Vicente-Manzanares M, Tejedor R, Furthmayr H, Sánchez-Madrid F (2002) Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J Cell Biol* 157:1233–1245. doi:10.1083/jcb.200112126
- Bellora F, Castriconi R, Dondero A, Reggiardo G, Moretta L, Mantovani A, Moretta A, Bottino C (2010) The interaction of human natural killer cells with either unpolarized or polarized macrophages results in different functional outcomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:21659–21664. doi:10.1073/pnas.1007654108
- Berahovich RD, Lai NL, Wei Z, Lanier LL, Schall TJ (2006) Evidence for NK Cell Subsets Based on Chemokine Receptor Expression. *The Journal of Immunology* 177:7833–7840. doi:10.4049/jimmunol.177.11.7833
- Berman ME, Xie Y, Muller WA (1996) Roles of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) in natural killer cell transendothelial migration and beta 2 integrin activation. *J Immunol* 156:1515–1524
- Bershadsky AD, Kozlov MM (2011) Crawling cell locomotion revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:20275–20276. doi:10.1073/pnas.1116814108
- Bhaskaran K, Douglas I, Forbes H, dos-Santos-Silva I, Leon DA, Smeeth L (2014) Body-mass index and risk of 22 specific cancers; A population-based cohort study of 5·24 million UK adults. *The Lancet* 384:755–765. doi:10.1016/S0140-6736(14)60892-8
- Brakebusch C, Fassler R (2003) The integrin-actin connection, an eternal love affair. *EMBO J* 22:2324–2333. doi:10.1093/emboj/cdg245
- Braune J, Weyer U, Hobusch C, Mauer J, Brüning JC, Bechmann I, Gericke M (2017) IL-6 Regulates M2 Polarization and Local Proliferation of Adipose Tissue Macrophages in Obesity. *J Immunol* 198:2927–2934. doi:10.4049/jimmunol.1600476
- Brieher W (2013) Mechanisms of actin disassembly. *Mol Biol Cell* 24:2299–2302. doi:10.1091/mbc.E12-09-0694
- Brotfain E, Hadad N, Shapira Y, Avinoah E, Zlotnik A, Raichel L, Levy R (2015) Neutrophil functions in morbidly obese subjects. *Clinical and experimental immunology* 181:156–163. doi:10.1111/cei.12631
- Caballero AE, Bousquet-Santos K, Robles-Osorio L, Montagnani V, Soodini G, Porramatikul S, Hamdy O, Nobrega ACL, Horton ES (2008) Overweight Latino children

and adolescents have marked endothelial dysfunction and subclinical vascular inflammation in association with excess body fat and insulin resistance. *Diabetes Care* 31:576–582. doi:10.2337/dc07-1540

Calle EE (2007) Obesity and cancer. *BMJ* 335:1107–1108. doi:10.1136/bmj.39384.472072.80

Calle EE, Kaaks R (2004) Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* 4:579–591. doi:10.1038/nrc1408

Calle EE, Thun MJ (2004) Obesity and cancer. *Oncogene* 23:6365. doi:10.1038/sj.onc.1207751

Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC (1998) Chemokines and the Arrest of Lymphocytes Rolling Under Flow Conditions. *Science* 279:381–384. doi:10.1126/science.279.5349.381

Canello R, Tordjman J, Poitou C, Guilhem G, Bouillot JL, Hugol D, Coussieu C, Basdevant A, Hen AB, Bedossa P, Guerre-Millo M, Clément K (2006) Increased Infiltration of Macrophages in Omental Adipose Tissue Is Associated With Marked Hepatic Lesions in Morbid Human Obesity. *Diabetes* 55:1554–1561. doi:10.2337/db06-0133

Cao R, Brakenhielm E, Wahlestedt C, Thyberg J, Cao Y (2001) Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6390–6395. doi:10.1073/pnas.101564798

Carman CV (2012) High-resolution fluorescence microscopy to study transendothelial migration. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 757:215–245. doi:10.1007/978-1-61779-166-6_15

Catrysse L, van Loo G (2018) Adipose tissue macrophages and their polarization in health and obesity. *Cell. Immunol.* 330:114–119. doi:10.1016/j.cellimm.2018.03.001

Cheng S-P, Yin P-H, Chang Y-C, Lee C-H, Huang S-Y, Chi C-W (2010) Differential roles of leptin in regulating cell migration in thyroid cancer cells. *Oncology reports* 23:1721–1727. doi:10.3892/or_00000817

Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22:633–640

Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R, Bouloumié A (2004) From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages; Induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* 53:1285–1292. doi:10.2337/diabetes.53.5.1285

Després J-P (2011) Excess visceral adipose tissue/ectopic fat the missing link in the obesity paradox? *J. Am. Coll. Cardiol.* 57:1887–1889. doi:10.1016/j.jacc.2010.10.063

Dignam JJ, Polite BN, Yothers G, Raich P, Colangelo L, O'Connell MJ, Wolmark N (2006) Body mass index and outcomes in patients who receive adjuvant chemotherapy for colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 98:1647–1654. doi:10.1093/jnci/djj442

DiMilla PA, Barbee K, Lauffenburger DA (1991) Mathematical model for the effects of adhesion and mechanics on cell migration speed. *Biophysical Journal* 60:15–37. doi:10.1016/S0006-3495(91)82027-6

Dong Z, Fu S, Xu X, Yang Y, Du L, Li W, Kan S, Li Z, Zhang X, Wang L, Li J, Liu H, Qu X, Wang C (2014) Leptin-mediated regulation of ICAM-1 is Rho/ROCK dependent and enhances gastric cancer cell migration. *British journal of cancer* 110:1801–1810. doi:10.1038/bjc.2014.70

Dubow J, Fink ME (2011) Impact of hypertension on stroke. *Curr Atheroscler Rep* 13:298–305. doi:10.1007/s11883-011-0187-y

- Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ (2005) The metabolic syndrome. *Lancet* 365:1415–1428. doi:10.1016/S0140-6736(05)66378-7
- Efstathiou JA, Bae K, Shipley WU, Hanks GE, Pilepich MV, Sandler HM, Smith MR (2007) Obesity and mortality in men with locally advanced prostate cancer: analysis of RTOG 85-31. *Cancer* 110:2691–2699. doi:10.1002/cncr.23093
- El-Wakkad A, Hassan NE-M, Sibaii H, El-Zayat SR (2013) Proinflammatory, anti-inflammatory cytokines and adipokines in students with central obesity. *Cytokine* 61:682–687. doi:10.1016/j.cyto.2012.11.010
- Endogenous Hormones Breast Cancer Collaborative Group (2003) Body Mass Index, Serum Sex Hormones, and Breast Cancer Risk in Postmenopausal Women. *JNCI J Natl Cancer Inst* 95:1218–1226. doi:10.1093/jnci/djg022
- Engelhardt B, Wolburg H (2004) Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *European Journal of Immunology* 34:2955–2963. doi:10.1002/eji.200425327
- Fantuzzi G (2005) Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 115:911. doi:10.1016/j.jaci.2005.02.023
- Frankenberry KA, Somasundar P, McFadden DW, Vona-Davis LC (2004) Leptin induces cell migration and the expression of growth factors in human prostate cancer cells. *American journal of surgery* 188:560–565. doi:10.1016/j.amjsurg.2004.07.031
- Friedman JM (2002) The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr Rev* 60:14
- Gallagher D, Visser M, Sepulveda D, Pierson RN, Harris T, Heymsfield SB (1996) How useful is body mass index for comparison of body fatness across age, sex, and ethnic groups? *Am J Epidemiol* 143:228–239
- Gallagher D, Heymsfield SB, Heo M, Jebb SA, Murgatroyd PR, Sakamoto Y (2000) Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. *Am J Clin Nutr* 72:694–701
- Ganguly A, Yang H, Sharma R, Patel KD, Cabral F (2012) The Role of Microtubules and Their Dynamics in Cell Migration*. *J Biol Chem* 287:43359–43369. doi:10.1074/jbc.M112.423905
- Geiger B, Yamada KM (2011) Molecular Architecture and Function of Matrix Adhesions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3. doi:10.1101/cshperspect.a005033
- Gifford V, Itoh Y (2019) MT1-MMP-dependent cell migration; Proteolytic and non-proteolytic mechanisms. *Biochemical Society transactions* 47:811–826. doi:10.1042/BST20180363
- Gil A, Olza J, Gil-Campos M, Gomez-Llorente C, Aguilera CM (2011) Is adipose tissue metabolically different at different sites? *International journal of pediatric obesity : IJPO : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 6 Suppl 1:13–20. doi:10.3109/17477166.2011.604326
- Gong JH, Maki G, Klingemann HG (1994) Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 8:652–658
- Goodwin PJ, Chlebowski RT (2016) Obesity and Cancer; Insights for Clinicians. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 34:4197–4202. doi:10.1200/JCO.2016.70.5327
- Graham TE, Yang Q, Blüher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, Wason CJ, Oberbach A, Jansson P-A, Smith U, Kahn BB (2006) Retinol-binding protein 4 and insulin

- resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N. Engl. J. Med.* 354:2552–2563. doi:10.1056/NEJMoa054862
- Gregor MF, Hotamisligil GS (2011) Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu. Rev. Immunol.* 29:415–445. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101322
- Grundy SM (2004) Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89:2595–2600. doi:10.1210/jc.2004-0372
- Gupton SL, Waterman-Storer CM (2006) Spatiotemporal feedback between actomyosin and focal-adhesion systems optimizes rapid cell migration. *Cell* 125:1361–1374. doi:10.1016/j.cell.2006.05.029
- Guzik TJ, Skiba DS, Touyz RM, Harrison DG (2017) The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. *Cardiovascular research* 113:1009–1023. doi:10.1093/cvr/cvx108
- Haase J, Weyer U, Immig K, Klötting N, Blüher M, Eilers J, Bechmann I, Gericke M (2014) Local proliferation of macrophages in adipose tissue during obesity-induced inflammation. *Diabetologia* 57:562–571. doi:10.1007/s00125-013-3139-y
- Halaas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidathusein N, Denton DA, Friedman JM (1997) Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8878–8883
- Haque I, Ghosh A, Acup S, Banerjee S, Dhar K, Ray A, Sarkar S, Kambhampati S, Banerjee SK (2018) Leptin-induced ER- α -positive breast cancer cell viability and migration is mediated by suppressing CCN5-signaling via activating JAK/AKT/STAT-pathway. *BMC cancer* 18:99. doi:10.1186/s12885-018-3993-6
- Harvey J, Hardy SC, Irving AJ, Ashford MLJ (2000) Leptin activation of ATP-sensitive K⁺ (K_{ATP}) channels in rat CRI-G1 insulinoma cells involves disruption of the actin cytoskeleton. *The Journal of Physiology* 527:95–107. doi:10.1111/j.1469-7793.2000.00095.x
- Hoffmann, Thomas Ebert, Nora Klötting, Marlen Kolb, Martin Gericke, Franziska Jeromin, Beate Jessnitzer, Ulrike Lössner, Ralph Burkhardt, Michael Stumvoll, Mathias Fasshauer, Susan Kralisch (2019) Leptin decreases circulating inflammatory IL-6 and MCP-1 in mice. *BioFactors* 45:43–48. doi:10.1002/biof.1457
- Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochino Y, Komuro R, Matsuda M, Shimomura I (2007) Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Its Impact on Adipocytokine Dysregulation. *Diabetes* 56:901–911. doi:10.2337/db06-0911
- Hotulainen P, Paunola E, Vartiainen MK, Lappalainen P (2005) Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells. *Molecular biology of the cell* 16:649–664. doi:10.1091/mbc.e04-07-0555
- Hung W-T, Wang C-H, Lin S-Y, Cheng S-Y, Liao L-Y, Lu L-Y, Chen Y-J, Huang Y-Z, Lin C-H, Hsueh C-M (2020) Leptin protects brain from ischemia/reperfusion-induced infarction by stabilizing the blood-brain barrier to block brain infiltration by the blood-borne neutrophils. *The European journal of neuroscience*:e14896. doi:10.1111/ejn.14896
- Ibrahim MM (2010) Subcutaneous and visceral adipose tissue; Structural and functional differences. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 11:11–18. doi:10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x
- Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K (2000) Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 356:1795–1799. doi:10.1016/S0140-6736(00)03231-1

- Jahn J, Spielau M, Brandsch C, Stangl GI, Delank K-S, Bahr I, Berreis T, Wrann CD, Kielstein H (2015) Decreased NK cell functions in obesity can be reactivated by fat mass reduction. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 23:2233–2241. doi:10.1002/oby.21229
- Kärre K (2002) NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand J Immunol* 55:221–228
- Keenan TM, Folch A (2007) Biomolecular gradients in cell culture systems. *Lab Chip* 8:34–57. doi:10.1039/B711887B
- Kim D-H, Wirtz D (2013) Focal adhesion size uniquely predicts cell migration. *FASEB J.* 27:1351–1361. doi:10.1096/fj.12-220160
- Kiniwa T, Enomoto Y, Terazawa N, Omi A, Miyata N, Ishiwata K, Miyajima A (2016) NK cells activated by Interleukin-4 in cooperation with Interleukin-15 exhibit distinctive characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113:10139–10144. doi:10.1073/pnas.1600112113
- Knoll K-P, Hauner H (2008) Kosten der Adipositas in der Bundesrepublik Deutschland - Eine aktuelle Krankheitskostenstudie. *Adipositas* 2:204–210
- Kovalszky I, Surmacz E, Scolaro L, Cassone M, Ferla R, Sztodola A, Olah J, Hatfield MPD, Lovas S, Otvos L, JR (2010) Leptin-based glycopeptide induces weight loss and simultaneously restores fertility in animal models. *Diabetes Obes Metab* 12:393–402. doi:10.1111/j.1463-1326.2009.01170.x
- Krasniewicz L, Blitz M (2006) *Arnold Schwarzenegger; A biography.* Greenwood Press, Westport, Conn.
- Krempler F, Hell E, Winkler C, Breban D, Patsch W (1998) Plasma leptin levels: interaction of obesity with a common variant of insulin receptor substrate-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1686–1690
- Kurukulasuriya LR, Stas S, Lastra G, Manrique C, Sowers JR (2011) Hypertension in obesity. *Med Clin North Am* 95:903–917. doi:10.1016/j.mcna.2011.06.004
- Lamas B, Goncalves-Mendes N, Nachat-Kappes R, Rossary A, Caldefie-Chezet F, Vasson M-P, Farges M-C (2013) Leptin modulates dose-dependently the metabolic and cytolytic activities of NK-92 cells. *Journal of Cellular Physiology* 228:1202–1209. doi:10.1002/jcp.24273
- Landsberg L, Aronne LJ, Beilin LJ, Burke V, Igel LI, Lloyd-Jones D, Sowers J (2013) Obesity-related hypertension: pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment: a position paper of The Obesity Society and the American Society of Hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 15:14–33. doi:10.1111/jch.12049
- Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH (1986) The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 136:4480–4486
- Laue T, Wrann CD, Hoffmann-Castendiek B, Pietsch D, Hübner L, Kielstein H (2015) Altered NK cell function in obese healthy humans. *BMC Obes* 2:1–10. doi:10.1186/s40608-014-0033-1
- Lautenbach A, Wrann CD, Jacobs R, Müller G, Brabant G, Nave H (2009a) Altered phenotype of NK cells from obese rats can be normalized by transfer into lean animals. *Obesity (Silver Spring)* 17:1848–1855. doi:10.1038/oby.2009.140
- Lautenbach A, Budde A, Wrann CD, Teichmann B, Vieten G, Karl T, Nave H (2009b) Obesity and the associated mediators leptin, estrogen and IGF-I enhance the cell proliferation and early tumorigenesis of breast cancer cells. *Nutr Cancer* 61:484–491. doi:10.1080/01635580802610115

- Lee H-R, Huh SY, Hur DY, Jeong H, Kim TS, Kim SY, Park SB, Yang Y, Bang SI, Park H, Cho D (2014) ERDR1 enhances human NK cell cytotoxicity through an actin-regulated degranulation-dependent pathway. *Cell. Immunol.* 292:78–84. doi:10.1016/j.cellimm.2014.10.002
- Lee B-C, Kim M-S, Pae M, Yamamoto Y, Eberlé D, Shimada T, Kamei N, Park H-S, Sasorith S, Woo JR, You J, Mosher W, Brady HJM, Shoelson SE, Lee J (2016) Adipose Natural Killer Cells Regulate Adipose Tissue Macrophages to Promote Insulin Resistance in Obesity. *Cell metabolism* 23:685–698. doi:10.1016/j.cmet.2016.03.002
- Ligibel J (2011) Obesity and breast cancer. *Oncology (Williston Park)* 25:994–1000
- Ligibel JA, Strickler HD (2013) Obesity and its impact on breast cancer: tumor incidence, recurrence, survival, and possible interventions. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*:52–59. doi:10.1200/EdBook_AM.2013.33.52
- Lo CKC, Lam QLK, Yang M, Ko K-H, Sun L, Ma R, Wang S, Xu H, Tam S, Wu C-Y, Zheng B-J, Lu L (2009) Leptin Signaling Protects NK Cells from Apoptosis During Development in Mouse Bone Marrow. *Cell Mol Immunol* 6:353–360. doi:10.1038/cmi.2009.46
- Logue J, Murray HM, Welsh P, Shepherd J, Packard C, Macfarlane P, Cobbe S, Ford I, Sattar N (2011) Obesity is associated with fatal coronary heart disease independently of traditional risk factors and deprivation. *Heart* 97:564–568. doi:10.1136/hrt.2010.211201
- Mace EM, Orange JS (2014) Lytic immune synapse function requires filamentous actin deconstruction by Coronin 1A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111:6708–6713. doi:10.1073/pnas.1314975111
- Madej T, Boguski MS, Bryant SH (1995) Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine. *FEBS Lett* 373:13–18
- Maffei M, Fei H, Lee GH, Dani C, Leroy P, Zhang Y, Proenca R, Negrel R, Ailhaud G, Friedman JM (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* 92:6957–6960
- Marcus A, Raulet DH (2013) Evidence for natural killer cell memory. *Curr. Biol.* 23:20. doi:10.1016/j.cub.2013.07.015
- McDonnell ME, Ganley-Leal LM, Mehta A, Bigornia S, Mott M, Rehman Q, Farb MG, Hess D, Joseph L, Gokce N, Apovian CM (2012) B lymphocytes in human subcutaneous adipose crown-like structures. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 20:1372–1378. doi:10.1038/oby.2012.54
- Michel T, Hentges F, Zimmer J (2012) Consequences of the crosstalk between monocytes/macrophages and natural killer cells. *Frontiers in immunology* 3:403. doi:10.3389/fimmu.2012.00403
- Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, Bittner V, Criqui MH, Ginsberg HN, Goldberg AC, Howard WJ, Jacobson MS, Kris-Etherton PM, Lennie TA, Levi M, Mazzone T, Pennathur S (2011) Triglycerides and Cardiovascular Disease A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* 123:2292–2333. doi:10.1161/CIR.0b013e3182160726
- Moulin CM, Marguti I, Peron JPS, Halpern A, Rizzo LV (2010) Bariatric Surgery Reverses Natural Killer (NK) Cell Activity and NK-Related Cytokine Synthesis Impairment Induced by Morbid Obesity. *OBES SURG* 21:112–118. doi:10.1007/s11695-010-0250-8
- Murano I, Barbatelli G, Parisani V, Latini C, Muzzonigro G, Castellucci M, Cinti S (2008) Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J. Lipid Res.* 49:1562–1568. doi:10.1194/jlr.M800019-JLR200
- Nave H, Mueller G, Siegmund B, Jacobs R, Stroh T, Schueler U, Hopfe M, Behrendt P,

- Buchenauer T, Pabst R, Brabant G (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* 149:3370–3378. doi:10.1210/en.2007-1516
- O'Rourke RW, Gaston GD, Meyer KA, White AE, Marks DL (2013) Adipose tissue NK cells manifest an activated phenotype in human obesity. *Metabolism* 62:1557–1561. doi:10.1016/j.metabol.2013.07.011
- Ofer N, Mogilner A, Keren K (2011) Actin disassembly clock determines shape and speed of lamellipodial fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:20394–20399. doi:10.1073/pnas.1105333108
- O'Malley D, Irving AJ, Harvey J (2005) Leptin-induced dynamic changes in the actin cytoskeleton mediate the activation and synaptic clustering of BK channels. *FASEB J*. 19:1917–1919. doi:10.1096/fj.05-4166fje
- O'Neill S, O'Driscoll L (2015) Metabolic syndrome; A closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 16:1–12. doi:10.1111/obr.12229
- Oswald J, Büttner M, Jasinski-Bergner S, Jacobs R, Rosenstock P, Kielstein H (2018) Leptin affects filopodia and cofilin in NK-92 cells in a dose- and time-dependent manner. *European Journal of Histochemistry : EJH* 62. doi:10.4081/ejh.2018.2848
- Parekh N, Chandran U, Bandera EV (2012) Obesity in cancer survival. *Annu. Rev. Nutr.* 32:311–342. doi:10.1146/annurev-nutr-071811-150713
- Paust S, Andrian UH von (2011) Natural killer cell memory. *Nat Immunol* 131:500–508. doi:10.1038/ni.2032
- Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F (1995) Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269:540–543. doi:10.1126/science.7624776
- Peng Y-M, van de Garde, Martijn D B, Cheng K-F, Baars PA, Remmerswaal EBM, van Lier, René A W, Mackay CR, Lin H-H, Hamann J (2011) Specific expression of GPR56 by human cytotoxic lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* 90:735–740. doi:10.1189/jlb.0211092
- Petri B, Bixel MG (2006) Molecular events during leukocyte diapedesis. *FEBS J* 273:4399–4407. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05439.x
- Pfeiffer IA, Zinser E, Strasser E, Stein MF, Dörrie J, Schaft N, Steinkasserer A, Knippertz I (2013) Leukoreduction system chambers are an efficient, valid, and economic source of functional monocyte-derived dendritic cells and lymphocytes. *Immunobiology* 218:1392–1401. doi:10.1016/j.imbio.2013.07.005
- Pollard TD, Cooper JA (2009) Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement. *Science* 326:1208–1212. doi:10.1126/science.1175862
- Re RN (2009) Obesity-Related Hypertension. *Ochsner J* 9:133–136
- Rink L, Kruse A, Haase H (2012) *Immunologie für Einsteiger*. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg
- Ryder E, Diez-Ewald M, Mosquera J, Fernandez E, Pedreanez A, Vargas R, Pena C, Fernandez N (2014) Association of obesity with leukocyte count in obese individuals without metabolic syndrome. *Diabetes Metab Syndr* 8:197–204. doi:10.1016/j.dsx.2014.09.002
- Sahoo K, Sahoo B, Choudhury AK, Sofi NY, Kumar R, Bhadoria AS (2015) Childhood obesity: causes and consequences. *J Family Med Prim Care* 4:187–192. doi:10.4103/2249-4863.154628
- Scheiter M, Lau U, van Ham M, Bulitta B, Gröbe L, Garritsen H, Klawonn F, König S,

- Jänsch L (2013) Proteome analysis of distinct developmental stages of human natural killer (NK) cells. *Mol. Cell Proteomics* 12:1099–1114. doi:10.1074/mcp.M112.024596
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, JR, Seeley RJ, Baskin DG (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661–671. doi:10.1038/35007534
- Scuteri A, Laurent S, Cucca F, Cockcroft J, Cunha PG, Mañas LR, Mattace Raso FU, Muiesan ML, Ryliškytė L, Rietzschel E, Strait J, Vlachopoulos C, Völzke H, Lakatta EG, Nilsson PM (2015) Metabolic syndrome across Europe; Different clusters of risk factors. *European journal of preventive cardiology* 22:486–491. doi:10.1177/2047487314525529
- Shacter E, Weitzman SA (2002) Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park)* 16:217
- Shields M, Tremblay MS, Connor Gorber S, Janssen I (2012) Measures of abdominal obesity within body mass index categories, 1981 and 2007–2009. *Health Rep* 23:33–38
- Shimizu Y, Rose DM, Ginsberg MH (1999) Integrins in the immune system. *Adv Immunol* 72:325–380
- Silha JV, Krsek M, Skrha JV, Sucharda P, Nyomba BL, Murphy LJ (2003) Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance. *Eur J Endocrinol* 149:331–335. doi:10.1530/eje.0.1490331
- Silha JV, Krsek M, Sucharda P, Murphy LJ (2005) Angiogenic factors are elevated in overweight and obese individuals. *International Journal of Obesity* 29:1308. doi:10.1038/sj.ijo.0802987
- Stofkova A (2009) Leptin and adiponectin: from energy and metabolic dysbalance to inflammation and autoimmunity. *Endocr Regul* 43:157–168
- Strell C, Entschladen F (2008) Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells. *Cell Commun Signal* 6:10. doi:10.1186/1478-811X-6-10
- Suzukawa M, Nagase H, Ogahara I, Han K, Tashimo H, Shibui A, Koketsu R, Nakae S, Yamaguchi M, Ohta K (2011) Leptin enhances survival and induces migration, degranulation, and cytokine synthesis of human basophils. *J Immunol* 186:5254–5260. doi:10.4049/jimmunol.1004054
- Svitkina T (2018) The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 10. doi:10.1101/cshperspect.a018267
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83:1263–1271
- Tenório, Thiago Ricardo dos Santos, Farah BQ, Ritti-Dias RM, Botero JP, Brito DC, Moura, Patrícia Muniz Mendes Freire de, Prado WLd (2014) Relation between leukocyte count, adiposity, and cardiorespiratory fitness in pubertal adolescents. *Einstein (Sao Paulo)* 12:420–424. doi:10.1590/S1679-45082014AO3214
- Tian Z, Sun R, Wei H, Gao B (2002) Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation. *Biochem Biophys Res Commun* 298:297–302
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S (2008) Functions of natural killer cells. *Nature immunology* 9:503–510. doi:10.1038/ni1582
- Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L (2012) Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol* 12:239–252. doi:10.1038/nri3174
- Wabitsch M, Funcke J-B, Lennerz B, Kuhnle-Krahl U, Lahr G, Debatin K-M, Vatter P, Gierschik P, Moepps B, Fischer-Posovszky P (2015) Biologically inactive leptin and

- early-onset extreme obesity. *N. Engl. J. Med.* 372:48–54. doi:10.1056/NEJMoa1406653
- Wendel M, Galani IE, Suri-Payer E, Cerwenka A (2008) Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN-gamma and CXCR3 ligands. *Cancer Res.* 68:8437–8445. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1440
- Wensveen FM, Jelenčić V, Valentić S, Šestan M, Wensveen TT, Theurich S, Glasner A, Mendrila D, Štimac D, Wunderlich FT, Brüning JC, Mandelboim O, Polić B (2015) NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. *Nat. Immunol.* 16:376–385. doi:10.1038/ni.3120
- Whitmore C (2010) Type 2 diabetes and obesity in adults. *Br J Nurs* 19:880. doi:10.12968/bjon.2010.19.14.49041
- WHO (2015) WHO | Obesity and overweight. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Zugegriffen: 05. Mai 2015
- Wilson PWF, D'Agostino RB, Sullivan L, Parise H, Kannel WB (2002) Overweight and Obesity as Determinants of Cardiovascular Risk: The Framingham Experience. *Arch Intern Med* 162:1867–1872. doi:10.1001/archinte.162.16.1867
- Wrann CD, Laue T, Hübner L, Kuhlmann S, Jacobs R, Goudeva L, Nave H (2012) Short-term and long-term leptin exposure differentially affect human natural killer cell immune functions. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302:16. doi:10.1152/ajpendo.00057.2011
- Wright SM, Aronne LJ (2012) Causes of obesity. *Abdom Imaging* 37:730–732. doi:10.1007/s00261-012-9862-x
- Wyatt SB, Winters KP, Dubbert PM (2006) Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem. *Am J Med Sci* 331:166–174
- Yamin R, Kaynan NS, Glasner A, Vitenshtein A, Tsukerman P, Bauman Y, Ophir Y, Elias S, Bar-On Y, Gur C, Mandelboim O (2013) The viral KSHV chemokine vMIP-II inhibits the migration of Naive and activated human NK cells by antagonizing two distinct chemokine receptors. *PLoS Pathog.* 9:e1003568. doi:10.1371/journal.ppat.1003568
- Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB (2005) Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436:356–362. doi:10.1038/nature03711
- Yoon K-W, Park S-Y, Kim J-Y, Lee S-M, Park C-H, Cho S-B, Lee W-S, Joo Y-E, Lee J-H, Kim H-S, Choi S-K, Rew J-S (2014) Leptin-induced adhesion and invasion in colorectal cancer cell lines. *Oncology reports* 31:2493–2498. doi:10.3892/or.2014.3128
- Żelechowska P, Brzezińska-Błaszczyk E, Kusowska A, Kozłowska E (2020) The role of adipokines in the modulation of lymphoid lineage cell development and activity; An overview. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 21:e13055. doi:10.1111/obr.13055
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425–432. doi:10.1038/372425a0
- Zhao Y, Sun R, You L, Gao C, Tian Z (2003) Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300:247–252. doi:10.1016/S0006-291X(02)02838-3

8 Thesen

1. Übergewicht und Adipositas führt zu einem erhöhten Erkrankungs- und Rezidivrisiko für viele Tumorarten.
2. Das Fettgewebshormon Leptin führt zu verschiedenen Funktionseinschränkungen von NK-Zellen gegenüber Tumorzellen.
3. Die gerichtete Migration von NK-92-Zellen wird unter Leptineinfluss im Transwell-Migration-Assay nicht signifikant verändert.
4. Ebenso wird die ungerichtete Migrationsgeschwindigkeit von NK-92-Zellen unter Leptineinfluss nicht signifikant verändert.
5. Die ungerichtete Migrationsgeschwindigkeit von NK-92-Zellen war 3h nach Experimentbeginn tendenziell niedriger als nach 24h.
6. Es finden sich signifikant mehr NK-Zellen im viszeralen Fettgewebe von *ob/ob*-Mäusen als im subkutanen Fettgewebe.
7. Eine intraperitoneale Leptingabe führt tendenziell zu einer erhöhten Anzahl von NK-Zellen im viszeralen Fettgewebe von *ob/ob*-Mäusen.
8. NK-Zellen sind im Fettgewebe möglicherweise in der Lage, bisher nur bei Makrophagen beschriebene „Crown-like-structures“ auszubilden.
9. NK-92-Zellen zeigen unter einer Zeit- und dosisabhängigen Leptininkubation eine signifikant schlechtere Adhäsionsfähigkeit.
10. Leptin hat durch Beeinflussung von Adhäsion und wahrscheinlich Migration von NK-Zellen einen direkten Einfluss auf deren Tumorbekämpfung.

Anhänge

Selbstständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Erklärung zum Wahrheitsgehalt der Angaben

Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben. / I declare that all information given is accurate and complete. The thesis has not been used previously at this or any other university in order to achieve an academic degree.

(3) Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Halle, 16.05.2021



Trutz-Eckhardt Fischer

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich jenen Menschen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Heike Kielstein für die hervorragende Betreuung und die enorme Unterstützung bei der Planung und Umsetzung der gesamten Arbeit. Danke, dass ich dich jederzeit kontaktieren kann und du immer – auch außerhalb der „Arbeit“ – ein offenes Ohr hast!

Außerdem möchte ich mich besonders bei unserem super Laborteam, insbesondere Susann Möschter und Franziska Knöfel, bedanken. Ohne die beiden wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt des Weiteren Dr. Nadine Bley und Prof. Martin Gericke für die umfangreiche Unterstützung bei der Organisation von Material und dem Umsetzen der Experimente.

Zudem danke ich meinen Eltern für die emotionale und finanzielle Unterstützung, ohne ich diese Dissertation nicht hätte anfertigen können. DANKE!