

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

Direktorin: Prof. Dr. med. Heike Kielstein

Adipöse F344 Ratten zeigen eine NK-Zell Dysfunktion und vermehrtes
Tumorwachstum

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

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

von John Hanke
geboren am: 09.01.1990 in Leipzig

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Heike Kielstein
2. Prof. Dr. med. Jürgen Wolf (Köln)
3. Prof. Dr. med. Uwe Eichfeld (Leipzig)

01.12.2015

15.06.2016

Für meine Familie

Referat

Verschiedene Studien konnten Adipositas als Risikofaktor für unterschiedliche Krebserkrankungen identifizieren. Natürliche Killer (NK)-Zellen gehören zum angeborenen Immunsystem und sind in der Lage Tumorzellen zu erkennen und abzutöten. Aus früheren Studien ist bekannt, dass NK-Zellen bei Adipositas in ihrer Funktionalität gestört sind. Ziel der hier vorgestellten Studie war es, zu untersuchen, ob die gestörte NK-Zell-Funktionalität Ursache für die erhöhte Inzidenz von Krebs bei Adipositas sein kann.

Zur Induktion einer Adipositas erhielten 64 männliche F344 Ratten über 6 bis 10 Wochen eine Hoch-Fett-Diät (34 % Fettgehalt) oder eine Kontrolldiät (4 % Fettgehalt). Anschließend wurden den Tieren 10^6 Zellen eines syngenetischen Adenokarzinoms (MADB106) oder ein Vehikel i. v. injiziert. 15 min nach der Injektion wurden 32 Tiere getötet, die Lungen entnommen und diese anschließend immunhistochemisch gefärbt. Im Folgenden wurden die NK-, MADB 106-Zellzahl, sowie die Anzahl der NK-Tumor-Zell-Interaktionen quantifiziert. Drei Wochen nach der Tumorzell-Injektion wurde die zweite Tiergruppe (n=32) getötet, um die entstandenen Lungenmetastasen zu zählen.

Zum frühen Zeitpunkt nach Injektion der Tumorzellen wiesen die adipösen Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant weniger NK-Zellen (63 vs. 1064/40 mm²) und NK-Tumor-Zell-Interaktionen (0,3 vs. 1,3/40 mm²) im Lungengewebe auf.

Nach 3 Wochen konnten in den Lungen der adipösen Tiere signifikant mehr Lungenmetastasen, als in den entsprechenden Kontrolltieren (49 vs. 22/Lunge) gezählt werden.

Die Induktion einer Adipositas führt bei F344 Ratten zu einer veränderten Funktionalität der NK-Zellen gegenüber den Tumorzellen und infolgedessen zur Ausbildung von signifikant mehr Lungenmetastasen, als bei den entsprechenden Kontrolltieren. Es ist zu vermuten, dass die veränderte NK-Zell-Funktionalität bei Adipositas eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Krebs spielt.

Hanke, John: Adipöse F344 Ratten zeigen eine NK-Zell Dysfunktion und vermehrtes Tumorwachstum, Halle (Saale), Univ., Med. Fak.; Diss., 49 Seiten, 2016.

Inhaltsverzeichnis		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Adipositas	1
1.2.	Krebs	3
1.3.	Metastasierung	5
1.4.	Warum führt Adipositas zu Tumoren?	7
1.5.	Zielstellung	11
2.	Material und Methoden	12
2.1.	Versuchstiere	12
2.2.	Tumormodell	13
2.3.	Applikation der MADB 106 Tumorzellen	14
2.4.	Tötung der Versuchstiere und Präparation der Lungen	15
2.5.	Schneiden und Färben der Lungen	16
2.5.1.	Früher Zeitpunkt	16
2.5.2.	Später Zeitpunkt	18
2.6.	Erhebung der Daten	18
2.6.1.	Quantifizierung der NK-Zellen, Tumorzellen und NK-Zell-Tumorzell- Interaktionen bei dem frühen Untersuchungs-Zeitpunkt	18
2.6.2.	Quantifizierung der oberflächlichen Lungenmetastasen bei dem späten Untersuchungs-Zeitpunkt	20
2.7.	FACS Analyse der NK-Zellen im Blut der Versuchstiere	21
2.8.	Statistische Auswertung	21
3.	Ergebnisse	22
3.1.	Gewichtsentwicklung der Versuchstiere	22
3.1.1.	Früher Zeitpunkt	22
3.1.2.	Später Zeitpunkt	23
3.2.	Quantifizierung der NK- und MADB 106-Zellen im Lungengewebe	24
3.2.1.	NK-Zellen	24
3.2.2.	MADB 106-Zellen	25
3.2.3.	NK-MADB 106-Interaktionen	26

3.3.	Quantifizierung der Oberflächenmetastasen zum späten Zeitpunkt	27
3.4.	FACS Analyse der NK-Zellen im Blut der Versuchstiere	29
4.	Diskussion	30
5.	Zusammenfassung	38
6.	Literaturverzeichnis	39
7.	Thesen	49
	Tabellarischer Lebenslauf	50
	Selbstständigkeitserklärung	51
	Erklärung über frühere Promotionsversuche	52
	Danksagung	53

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity
AgRP	agouti related protein
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
BF %	Körperfettanteil in Prozent
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
DIO	diet-induced obesity
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN-NK	Doppelt-negative NK-Zellen
DTC	disseminated tumor cells
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FasL	Fas Ligand
IFN- α	Alpha-Interferon
IFN- γ	Gamma-Interferon
IGFBP-1 & 2	insulin-growth-factor-binding-protein-1/2
IL	Interleukin
mAK	monoklonaler Antikörper
NaCl	Natriumchlorid
NCR	natural cytotoxicity receptors
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zelle
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PIGF	placental growth factor
SEM	standard error of the mean
SHBP	sexualhormone-binding-proteine
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TANK	Tumor-assoziierte Natürliche Killenzellen
TBS	tris-buffered saline
TINK	Tumor-infiltrierende Natürliche Killerzellen
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand

TSA	Tumor-spezifisches Antigen
VEGF	vascular endothelial growth factor

1. Einleitung

1.1. Adipositas

Adipositas ist eines der größten Gesundheitsprobleme der Industriestaaten und zunehmend auch der ärmeren Länder. Sie liegt vor bei einem Body Mass Index von 30 kg/m^2 oder darüber. Den Zustand mit einem BMI zwischen 25 kg/m^2 und 30 kg/m^2 bezeichnet man als präadipös.

Nach dem Schema der WHO kann man die Adipositas in 3 Stufen einteilen: Stufe I mit einem BMI von 30 kg/m^2 bis 35 kg/m^2 , Stufe II mit einem BMI von 35 kg/m^2 bis 40 kg/m^2 und Stufe III mit einem BMI von 40 kg/m^2 und höher. Mit steigendem Gewicht steigt dabei auch das Risiko für Begleiterkrankungen (Berrington de Gonzalez et al., 2010).

In Deutschland beträgt die Prävalenz der Adipositas bei erwachsenen Frauen 19,2 %, bei erwachsenen Männern 23,1 % (WHO, 2011). Weltweit hat sich die Zahl der Betroffenen in den letzten 30 Jahren mehr als verdoppelt (WHO, 2012), insgesamt haben 1,46 Milliarden Menschen einen $\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$, darunter 205 Millionen Männer und 297 Millionen Frauen mit einem BMI über 30 kg/m^2 (Finucane et al., 2011). Diese Zahlen zeigen, dass Übergewicht nicht zuletzt ein Gesundheitsökonomisches Problem ist, da im Vergleich zu Normalgewichtigen deutlich höhere Behandlungs- und Versorgungskosten anfallen (Simon et al., 2011).

Der Grund für die Fettleibigkeit ist oft schlicht ein Ungleichgewicht zwischen Energiezufuhr und Energieverbrauch. Dazu führen falsche Ernährung, wie zum Beispiel eine zu große Kalorienzufuhr und zu viele fettige und/oder süße Nahrungsmittel, als auch zu wenig Bewegung. Entwicklungsgeschichtlich ist unser Körper nicht an den Zustand des andauernden Nahrungsmittelüberschusses gewöhnt. In Zwillingsstudien konnte gezeigt werden, dass auch genetische Faktoren eine große Rolle für das Körpergewicht spielen (Stunkard et al., 1990). So lässt sich erklären, warum bei gleicher Energiezufuhr manche Menschen mehr zunehmen als andere. Seit wenigen Jahren wird auch ein Einfluss epigenetischer Veränderungen der DNA vermutet (Ng et al., 2010). Als Ursache kommen zusätzlich psychische Faktoren in Frage, z. B. durch Stress kann eine Gewichtszunahme begünstigt werden (De Vriendt et al., 2009).

Übergewicht ist mit zahlreichen Folge- und Begleiterkrankungen assoziiert. Verschiedene Studien beweisen, dass Adipositas ein unabhängiger Risikofaktor für die

Entwicklung von Diabetes mellitus Typ II (Colditz et al., 1995), arterieller Hypertonie (Redon, 2001; Kurukulasuriya et al., 2011), kardiovaskulären Erkrankungen (Lavie et al., 2009), Hirninfarkt (Katsiki et al., 2011), Arthrose der großen Gelenke (Powell et al., 2005) und Depressionen (Simon et al., 2011) ist. In letzter Zeit rückt auch immer mehr der Zusammenhang zwischen Adipositas und Tumoren in den Fokus der Forschung (siehe 1.2. und 1.4.)

Bei einem Exzess an Nahrungsmitteln muss im Körper deutlich mehr Insulin gebildet werden, um die aufgenommenen Kohlehydrate in die Zellen aufzunehmen. Die hohen Fettsäurespiegel im Blut (Karpe et al., 2011) und weitere Faktoren verursachen jedoch eine Resistenz der Insulinrezeptoren. Die Wirkung des Insulins wird abgeschwächt und der Blutzucker kann nicht mehr ausreichend gesenkt werden. Ein Typ II Diabetes entsteht.

Durch die bei Übergewichtigen erhöhten Zytokinspiegel (siehe 1.4.) und die erhöhte Konzentration von freien Fettsäuren kommt es, zusammen mit einer erhöhten Makrophagenaktivität, zu einer chronischen Gefäßinflammation, erhöhtem oxidativen Stress, zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems und einer Sympathikusaktivierung (Dorreesteijn et al., 2012). Folglich entsteht eine arterielle Hypertonie. Diese wiederum stellt den wichtigsten Risikofaktor für alle Typen des Hirninfarkts dar (Dubow und Fink, 2011).

Adipositas führt zudem zur Vergrößerung des Blutvolumens, was einen größeren kardialen Umsatz nach sich zieht. Aus dem vergrößerten Auswurfvolumen, gekoppelt mit vergrößertem peripheren Gefäßwiderstand, resultiert eine Dilatation des linken Ventrikels - kardiovaskuläre Erkrankungen entstehen (Lavie et al., 2009).

Der wohl wichtigste Grund für Arthrose bei übergewichtigen Menschen ist, dass die Größe der Gelenkfläche nicht proportional zur Körpermasse zunimmt und diese deshalb stärkeren Belastungen ausgesetzt ist. Des Weiteren werden metabolische Einflussfaktoren (erhöhter Glukose- und Lipidspiegel, Vitamin-D-Defizienz, radikale Nitrit- und Sauerstoffspezies) und Inflammation (durch Adipokine und Zytokine aus dem Fettgewebe) diskutiert (Wang et al., 2015).

Die Therapie der Adipositas beruht auf einer langfristigen Negativierung der täglichen Energiebilanz. Dies lässt sich in der Basistherapie über Ernährungstherapie, Bewegungstherapie und Verhaltenstherapie erreichen. Führen diese Maßnahmen nicht zum gewünschten Erfolg, kann durch die Ergänzung mit Medikamenten oder einer chirurgischen Intervention behandelt werden. Auf dem deutschen Markt sind zwei

medikamentöse Wirkgruppen gegen Adipositas zugelassen, der Lipase-Hemmer Orlistat, der ab einem BMI von $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ oder $\geq 28 \text{ kg/m}^2$ mit Begleiterkrankungen verordnet werden kann und Amphetamine, wie Amfepramon oder Phenylpropanolamin, die laut der aktuellen Leitlinie wegen einem schlechten Wirkungs-/Nebenwirkungsprofil nicht mehr empfohlen werden. Auf eine chirurgische Intervention sollte nur bei Versagen aller anderen Therapien und bei einem BMI $\geq 40 \text{ kg/m}^2$ oder $\geq 35 \text{ kg/m}^2$ mit starken Begleiterkrankungen zurückgegriffen werden. Bei BMI $\geq 50 \text{ kg/m}^2$ kann auch ohne vorangegangene konservative Therapie die chirurgische Intervention als Primärtherapie empfohlen werden (Deutsche Adipositas-Gesellschaft et al., 2014).

1.2. Krebs

Tritt in einem Gewebe eine Zellwucherung auf, so wird grundsätzlich zwischen benignen (gutartigen) und malignen (bösartigen) Tumoren unterschieden. Nur die malignen Prozesse werden als Krebs im engeren Sinne bezeichnet.

Bösartige Neubildungen stellen in Deutschland, nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die zweithäufigste Todesursache dar (Deutsches Bundesamt für Statistik, 2013). Allein im Jahr 2008 erkrankten hierzulande 246.700 Männer und 223.100 Frauen an Krebs. Dabei sind bei deutschen Frauen Brustkrebs, Darmkrebs und Lungenkrebs am stärksten vertreten. Bei deutschen Männern sind Prostatakrebs, Darmkrebs und Lungenkrebs am häufigsten (RKI, 2012).

Krebszellen haben verschiedene Eigenschaften, die sie von normalen Körperzellen abgrenzen. So sind sie immortalisiert, können sich also unbegrenzt teilen, weichen dem Zelltod (Apoptose) aus, sind in der Lage ohne Einwirken von äußeren Wachstumsfaktoren zu proliferieren, reagieren nicht auf wachstumshemmende Signale, verlieren ihre Ortsständigkeit (metastasieren, näheres unter 1.3.), wachsen invasiv und zeigen eine ungehemmte Angiogenese (Hanahan und Weinberg, 2000).

Ursache für die Entwicklung dieser Eigenschaften sind Basenveränderungen der intrinsischen Tumorabwehr auf dem Erbgut der Zelle. Es kommt zu einer Disinhibition von aktivierenden Genen (Protoonkogenen, z. B. RAS) (Croce, 2008) oder der Inhibition von Zellzyklus-drosselnden Genen (Tumorsuppressorgenen, z. B. p53) (Zuckerman et al., 2009). Diese Basenveränderungen entstehen durch genetische Prädisposition, Mutationen oder der Integration von körperfremder DNA durch die Infektion mit Viren.

Transformierte Zellen zeigen häufig ein verändertes Proteinmuster, produzieren demnach tumorspezifische oder tumorassoziierte Antigene (TSA/TAA), über die sie von Zellen der extrinsischen Tumorabwehr erkannt werden können. TSA kommen nur in Tumorzellen vor und bilden im Eigentlichen ein perfektes Ziel für eine antigenspezifische Immunantwort. Leider werden sie, ganz im Gegensatz zu den TAA, nur schwach über MHC I Komplexe auf der Membran präsentiert (Morris et al., 2003). TAA kommen auch in normalen Körperzellen in schwacher Konzentration vor. In Tumorzellen sind sie jedoch überexprimiert und können auf diese Weise über MHC I Komplexe auf der Zellmembran von tumorspezifischen CD8⁺-T-Lymphozyten erkannt werden (Morris et al., 2003). Diese Immunzellen müssen zuvor im Zusammenspiel mit dendritischen Zellen induziert werden (Dunn et al., 2004). Für die Abwehr von bösartigen Neubildungen spielen außerdem Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), als Zellen der angeborenen Immunabwehr, eine außerordentlich wichtige Rolle. Diese können über aktivierende Rezeptoren, wie NKG2D, Zellen mit NKG2D-Liganden (Vivier et al., 2008) und NCR's (Brusilovsky et al., 2012) (natural cytotoxicity receptors) Zellen mit bestimmten Oberflächenmustern erkennen und nachfolgend lysieren. NKG2D Liganden werden als sogenannte „Stressliganden“ von Tumorzellen, z. B. Melanomzellen (Vetter et al., 2002) oder Brustkrebszellen (de Kruijff et al., 2012) gebildet. Durch inhibitorische Rezeptoren wie KIR, der durch MHC-Komplexe auf anderen Zellen aktiviert wird, kann eine Toleranz gegenüber körpereigenen Zellen hergestellt werden, außerdem wirken so Zellen mit herunterregulierter MHC-I-Komplex-Anzahl aktivierend auf NK-Zellen (Vivier et al., 2008).

Mit der Interaktion zwischen Tumor- und Immunzellen beschäftigt sich das Konzept des Cancer immunoediting, welches von 3 Phasen der Tumor-Immunabwehr ausgeht. Einer Eliminierungsphase, in der neben NK-Zellen und CD8⁺ T-Zellen auch Makrophagen eine große Rolle spielen, eine Phase des Gleichgewichts (Equilibrium) zwischen Tumor- und Abwehrzellen und einer Escape-Phase, in der es zu einer Tumorprogression kommt (Dunn et al., 2004).

Verschiedene Faktoren fördern die Entstehung von Tumoren. Hier sind Rauchen und Alkohol (und andere chemische Noxen), UV- und Röntgenstrahlung (physikalische Noxen), Virusinfektionen (z. B. CMV), Immunsuppression (z. B. nach Organtransplantation) und psychische Krankheiten (z. B. Depressionen) zu nennen. So haben im Schnitt 85 % der Lungenkrebspatienten geraucht (Torok et al., 2011).

Alkoholismus und/oder eine Hepatitisinfektion erhöhen erheblich das Leberkrebsrisiko (Jamal und Morgan, 2003). Lange Exposition mit Sonnenlicht verursacht Hautkrebs (de Gruijl, 1999). Auch für Depressionen ließ sich ein erhöhtes Risiko für zerebrale Neoplasien nachweisen (Dalton et al., 2002).

Ein weiterer wichtiger Faktor ist, wie unter 1.1. bereits erwähnt, das Übergewicht. Etwa ein Drittel aller Krebsfälle in den Industriestaaten soll auf falsche Nahrungsmittel, schlechte Ernährung und ungenügende körperliche Aktivität zurückzuführen sein (Glade, 1999).

In einer groß angelegten Kohortenstudie der American Cancer Society mit mehr als 900.000 Probanden konnte gezeigt werden, dass Männer mit einem BMI ≥ 40 kg/m² ein um 52 % erhöhtes Krebssterberisiko und Frauen, mit dem gleichen BMI, sogar ein um 62 % erhöhtes Krebssterberisiko hatten. Die Inzidenzen von Kolon- oder Rektumkarzinom, Ösophaguskarzinom, Nierenzellkarzinom, Gallenblasen- und Leberkarzinom waren erhöht (Calle et al., 2003).

Der Bezug von Adipositas zu Kolon- oder Rektumkarzinom, Ösophaguskarzinom, postmenopausalen Brustkrebs, Endometriumkarzinom und Nierenzellkarzinom konnte auch in anderen Studien gezeigt werden (Bianchini et al., 2002). Ein Zusammenhang zum Pankreaskarzinom (Patel et al., 2005), Gallenblasenkarzinom und Prostatakarzinom wird für möglich gehalten (Popkin, 2007).

Auch im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass unter Tieren, die den gleichen Noxen ausgesetzt sind (z. B. DMBA), diejenigen mit diät-induziertem Übergewicht eine deutlich stärkere Zellproliferation in der Brustdrüse und den Leistenlymphknoten zeigten, was einen Einfluss von Übergewicht auf die Frühentstehung von Brusttumoren zeigt (Lautenbach et al., 2009).

Versuche in anderen Arbeitsgruppen zeigten auch, dass Tumore bei adipösen Individuen schneller wachsen und mehr Metastasen bilden (Zyromski et al., 2009).

1.3. Metastasierung

Der Verlust der Ortsständigkeit von Tumorzellen und deren Abwanderung in andere Gewebe ist der Hauptgrund, warum Tumoren so lebensbedrohlich sind. Dabei unterscheidet man erstens die lymphogene Metastasierung, bei der Tumorzellen über Lymphgefäße transportiert werden, zweitens die hämatogene Metastasierung, bei der der Transport über die Blutbahn erfolgt und zuletzt die kavitäre Metastasierung, bei der

über Körperflüssigkeiten Organe in der selben Körperhöhle befallen werden. Bei der hämatogenen und lymphogenen Form werden mehrere Schritte beobachtet: der Primärtumor muss mit Blutgefäßen versorgt werden (Angiogenese), Tochterzellen von diesem gelangen in ein Gefäß (Intravasion), werden über den Blutstrom weitergetragen und gelangen aus dem Gefäß in das Gewebe (Extravasion) (Chambers et al., 2002). Im Folgenden wird sich diese Arbeit meist mit der hämatogenen Metastasierung befassen. Metastasen können in allen Organen des Körpers auftreten, finden sich jedoch beispielsweise fast nie in den Muskeln (Sleeman et al., 2011). Tumorzellen vieler Neoplasien bilden Tochtergeschwülste in bestimmten Organen, zum Beispiel streuen Prostatakrebs oder Brustkrebs oft in die Knochen (Woodward und Coleman, 2010). Tumore können auch Tochterzellen zu sich selbst absetzen, sogenanntes „self seeding“ (Kim et al., 2009). Häufig lässt sich diese Organspezifität rein mechanisch, mit dem Weg des Blutes durch den Kreislauf, erklären. Hinzu kommen spezifische Faktoren des Microenvironments, also Zell-Zell- und Zell-Matrix- Interaktionen der Tumorzellen (Friedl und Alexander, 2011).

Das Absetzen von Tochterkolonien ist dabei ein sehr ineffizienter Prozess. Die Mehrheit der Tumorzellen, die bis in den Extravasalraum des fremden Gewebes gelangen, bilden keine Tochterkolonien aus (Cameron et al., 2000). Bei Untersuchungen mit Melanomzellen, die in die Pfortader von Mäusen eingebracht wurden, schafften es 80 % der Zellen in den Extravasalraum zu gelangen. Von diesen bildete jede vierzigste Zelle eine Mikrometastase und nur jede hundertste Mikrometastase wuchs zu einer makroskopisch sichtbaren Metastase heran (Luzzi et al., 1998). Die restlichen Zellen sterben entweder ab oder gehen in einen Ruhezustand über (DTC's - disseminated tumor cells) (Sleeman et al., 2011). Die DTC's sind hochresistent gegen Chemotherapie, die sich gegen proliferierende Zellen richtet, und können auch nach vielen Jahren noch für Rezidive sorgen (Uhr und Pantel, 2011).

Die Tumorzellen werden intravasal (Nieswandt et al., 1999), als auch im Gewebe (Yang et al., 2006) von NK-Zellen erkannt (siehe 1.2.) und angegriffen. Interessanterweise unterdrücken Thrombozyten diese Interaktion, indem sie sich mantelartig um die Tumorzellen anlagern. Auf diesem Weg und durch weitere Mechanismen fördern sie die Progression von Tumoren (Jain et al., 2010). Bereits im Jahr 1968 wurde erkannt, dass Thrombozytopenie im Mausmodell zu einer Unterdrückung der Metastasierung führt (Gasic et al., 1968). Sorgt man außer der Thrombozytopenie für eine Depletion der NK-

Zellen, so hebt sich dieser Effekt auf (Nieswandt et al., 1999). Was wiederum die bedeutende Rolle der NK-Zellen für diesen Effekt unterstreicht.

Das Ausmaß der Streuung eines Tumors im Körper kann auch durch verschiedene andere Faktoren beeinflusst werden. Demnach kann Alkohol (Blank und Meadows, 1996) oder Sauerstoffmangel (Avni et al., 2011) das Metastasierungspotential von Tumorzellen verstärken.

Ein weiterer wichtiger Faktor ist erneut das Übergewicht. In einer Studie aus Dänemark von 2011 konnte nachgewiesen werden, dass Frauen mit einem BMI $\geq 30 \text{ kg/m}^2$, im Vergleich zu Frauen, bei denen der BMI $\leq 25 \text{ kg/m}^2$ war, in den ersten 10 Jahren nach der Brustkrebsdiagnose ein um 46 % erhöhtes Risiko hatten, Fernmetastasen zu entwickeln (Ewertz et al., 2011). Vorausgehend wurden auch im Tiermodell mit Pankreaskrebs bei adipösen Mäusen ähnliche Ergebnisse gefunden (Zyromski et al., 2009).

1.4. Warum führt Adipositas zu Tumoren?

Der genannte Zusammenhang wird durch verschiedene Faktoren bedingt, die im Folgenden nacheinander dargestellt werden.

Der bei Übergewichtigen erhöhte Insulinspiegel (siehe 1.1.) führt zu einer verminderten Synthese von IGFBP-1 & 2 (Insulin-growth-factor-binding-protein-1/2), sowohl in der Leber, als auch im Gewebe. Dadurch kommt es zu einer größeren Bioverfügbarkeit von IGF-1 (Insulin-like growth factor-1) im Blut und im Gewebe. Außerdem fördert Insulin die Bildung von IGF-1 in der Leber (Calle und Kaaks, 2004). Sowohl Insulin, als auch IGF-1 wirken stimulierend auf die Zellproliferation und anti-apoptotisch, fördern also auch die Proliferation von Tumorzellen (Pollak, 2012).

Fettzellen exprimieren die Hormone Aromatase und 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17 β -HSD), folglich kommt es hier zur Synthese von Testosteron und den Östrogenen E1 und E2. Zusätzlich ist die Synthese von SHBP (sexualhormone-binding-proteine) in der Leber vermindert, was durch Insulin ausgelöst wird. Dadurch steigt messbar die Menge der biologisch aktiven Östrogene bei Männern und postmenopausalen Frauen an (Calle und Kaaks, 2004). Es ist bekannt, dass das Wachstum und die Entstehung von Keimdrüsentumoren, wie Brust- oder Prostatakrebs, stark von Sexualhormonen beeinflusst werden. Bei einer postmenopausalen Hormonersatztherapie kam es beispielsweise zu einer erhöhten Brustkrebsinzidenz

(Kenemans und Bosman, 2003). Die Blockade der Androgen- (z. B. durch Flutamid) bzw. Östrogenrezeptoren (z. B. durch Tamoxifen) lässt sich auch pharmakologisch zur Behandlung von Brust- oder Prostataveränderungen nutzen (Suzuki et al., 2008; Rivera-Guevara und Camacho, 2011).

Das gehäufte Auftreten von Colon- und Rektumkarzinomen bei adipösen Menschen könnte sich auch damit erklären lassen, dass viele Übergewichtige zu wenige Ballaststoffe, z. B. in Form von Vollkornbrot oder Obst mit der Nahrung, aufnehmen. Ballaststoffe sollen krebserregende Stoffe binden, durch Wasser, welches osmotisch angezogen wird, verdünnen oder deren Ausscheidung verkürzen (Aune et al., 2011). Über diese Effekte wurde in den letzten Jahren kontrovers diskutiert (Bingham und Riboli, 2004; Park et al., 2005). Neue Studien zeigen, dass hohe Mengen von eingenommenen Ballaststoffen das Krebsrisiko im Enddarmbereich senken (Aune et al., 2011).

Ein weiterer wichtiger Ansatz, dem sich die vorliegende Arbeit widmet, ist die Annahme, dass es bei Fettleibigkeit zu einer Immunsuppression kommt, die dazu führt, dass Tumorzellen nicht erkannt und lysiert werden können. Fettgewebe dient nicht nur als einfacher Speicher für Energie, es produziert auch aktiv verschiedene Zytokine und Hormone und beeinflusst andere Gewebe bei Ihrer Hormon- und Zytokinsynthese.

Zytokine, die vom Fettgewebe produziert werden, heißen Adipokine. Die wichtigsten sind Leptin, TNF α , Adiponektin, Resistin und Interleukin 6. Bei Adipositas kommt es zu einem Anstieg der Serum-Leptin-Konzentration, der zu einer zentralen Leptin-Rezeptor-Defizienz führt, und einem Abfall der Ghrelin-, sowie Adiponektin-Konzentration (Dixit, 2008). Im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass Knockout-Tiere ohne Leptin (*ob/ob* Tiere) oder mit defektem Leptinrezeptor (*db/db* Tiere) neben ihrem Übergewicht immunsupprimiert sind und einen atrophierten Thymus aufweisen (Palmer et al., 2006), außerdem ist die Funktion der dendritischen Zellen eingeschränkt (Macia et al., 2006). Diese Immunsuppression, die auch bei adipösen, leptin-resistenten Patienten beobachtet wird, führt zu einer erhöhten Infektanfälligkeit, einer chronischen, subklinischen Inflammation (Kim, 2006). Dabei gibt es verschiedene Mechanismen, welche die Inflammation und Krebsentstehung verknüpfen (Howe et al., 2013). Im Tierexperiment sind diät-induzierte, adipöse Ratten deutlich empfindlicher gegenüber dem Influenza-Virus als Normalgewichtige und die Inzidenz der H1N1-Virusinfektion war bei Menschen mit einem BMI über 30 kg/m² extrem erhöht (Nave et al., 2011).

Wie bereits erwähnt (1.2.), haben Immunzellen wie NK-Zellen, T-Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen eine wichtige Rolle in der Tumorabwehr. Diese Arbeit wird sich ganz besonders mit NK-Zellen und deren Rolle bei der Entstehung von Tumoren bei adipösen Individuen beschäftigen.

NK-Zellen gehören zu den Zellen der unspezifischen Immunabwehr und können über verschiedene Mechanismen (siehe 1.2.) Krebszellen erkennen. Ist dieser Mechanismus gestört, können Krebszellen proliferieren. Menschen mit einer herabgesetzten zytotoxischen NK-Zell-Aktivität haben ein höheres Risiko an Krebs zu erkranken (Imai et al., 2000).

Bei der Untersuchung der NK-Zell-Funktion werden entweder direkt der Rezeptorbesatz oder die Zytotoxizität herangezogen, zudem können auch Änderungen in der NK-Zellzahl im Blut oder Gewebe untersucht werden.

Die Arbeitsgruppe von Heike Kielstein (ehemals Nave) konnte zeigen, dass in diät-induziert adipösen Ratten verschiedene NK-Zellfunktionen gestört sind. Die Zellen exprimieren zwar eine normale Zahl von Leptinrezeptoren (Ob-R), diese sind jedoch für ihre Aktivierung durch Leptin defizient. Leptin hat eine große Rolle für die Aktivierung von NK-Zellen und die Regulation der Zahl dieser Immunzellen (Nave et al., 2008).

Diese Veränderungen scheinen reversibel zu sein. Überträgt man NK-Zellen mit defizienten Ob-Rezeptoren aus adipösen Tieren auf Normalgewichtige, so normalisiert sich die Zellfunktion (Lautenbach et al., 2009). Analog kommt es bei adipösen Patienten nach bariatrischer Chirurgie zu einer Verbesserung der Zytotoxizität der NK-Zellen (Moulin et al., 2011). Nach einer Fastenperiode kommt es sowohl bei Normalgewichtigen (Barone et al., 1989), als auch um so stärker bei übergewichtigen (Wing et al., 1983) Menschen zu einer verstärkten NK-Zell-Zytotoxizität. Auch andere Studien zeigten eine abgeschwächte NK-Zell Aktivität bei hohem Fettanteil in der Nahrung (Lamas et al., 2015) (Tiermodell), eingeschränkte NK-Zell-Funktion bei Adipositas (Laue et al., 2015), beziehungsweise veränderte Sensitivität auf IL-2 und Glukokortikoiden bei normaler NK-Zell Aktivität (Dovio et al., 2004) bei adipösen Menschen.

Unter 1.2. und 1.3. wurde geschildert, dass die NK-Zellaktivität sowohl auf die Tumorentstehung, als auch auf die Metastasierung einen bewiesenen Einfluss hat. Ein logischer Schluss wäre, dass bei Adipösen, die eine gestörte NK-Zellfunktion aufweisen, aus diesem Grund auch mehr Tumore und Metastasen auftreten.

Dies konnte noch nicht direkt gezeigt werden, was eines der Hauptziele dieser Arbeit darstellt.

1.5. Zielstellung

Das Ziel der Arbeit ist es, die Rolle der Adipositas-induzierten NK-Zell-Funktionsstörung für die Krebsinzidenz darzustellen.

Genauer soll dabei untersucht werden, ob bei diät-induziert adipösen Ratten

1. im kurzfristigen Intervall nach Injektion von MADB 106-Tumorzellen die Migration von NK-Zellen in die Lunge der Tiere gestört ist.
2. im kurzfristigen Intervall nach Injektion von Tumorzellen die Häufigkeit der Interaktion zwischen NK- und Tumorzellen verändert ist.
3. im kurzfristigen Intervall nach Injektion von Tumorzellen die Zahl der Tumorzellen im peripheren Gewebe verändert ist.
4. im längerfristigen Intervall nach Injektion von Tumorzellen die Zahl der oberflächlichen makroskopischen Lungenmetastasen verändert ist.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Die hier geschilderten Tierexperimente wurden unter Berücksichtigung des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und zuvor von der Tierschutzkommission der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt.

Es handelt sich um 2 Experimente, die sich mit unterschiedlichen Zeitpunkten der Tumorabwehr des Organismus bei Adipositas bzw. Normalgewicht beschäftigen. Bei dem 1. Versuch werden die Tiere 15 min nach der Injektion von MADB 106-Zellen getötet, bei dem 2. Versuch erst nach 3 Wochen.

Bei den beiden Experimenten wurden jeweils 32 sechs Wochen alte Fischer 344 Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet, die einzeln in Käfigen unter kontrollierten keimarmen, schallgedämpften Bedingungen bei einer Temperatur von $23,5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, einer Luftfeuchtigkeit von 50–55 % und einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Zyklus gehalten wurden. Auf dem Boden der Käfige befand sich Einstreu.

Nach einer Akklimatisationsphase (eine Woche), in der alle 64 Tiere die gleiche Kontrolldiät (Ko - Kontrolle; Altromin C 1090-10, 10 % der umsetzbaren Energie aus Fett, Altromin GmbH & Co. KG Lage, Deutschland) erhielten, wurden die Ratten in beiden Versuchen gewichtsadjustiert in zwei Gruppen eingeteilt, die unterschiedliches Futter erhielten. Dabei bekam die eine Hälfte der Tiere weiterhin das Kontrollfutter zu fressen, die andere erhielt in den folgenden Wochen eine Hoch-Fett-Diät (DIO - diet induced obesity - diät-induzierte Adipositas; Altromin C1090-60, 60 % der umsetzbaren Energie aus Fett, Altromin GmbH). Der Zugang zu Trinkwasser und Futter erfolgte ad libitum. Außerdem wurden die Tiere einmal in der Woche gewogen und einem Handling unterzogen, das heißt, sie wurden aus dem Käfig genommen und gestreichelt, um den durch die Einzelhaltung verursachten Stress zu vermindern und das spätere Handling bei den Versuchen zu erleichtern. Die Betreuung der Tiere erfolgte durch mich und Dorle Knauf (die zweite medizinische Doktorandin, die in dem Projekt mitarbeitete).

Nach einer Zeit von 6 Wochen (für den frühen Versuchs-Zeitpunkt), bzw. 10 Wochen (für den späten Versuchs-Zeitpunkt) wurden die Tiere gewichtsadjustiert in weitere Untergruppen eingeteilt, welche sich durch die Art der i. v. Injektion unterscheiden (MADB 106-Adenokarzinomzellen bzw. Natriumchloridlösung).

Letztendlich ergaben sich also 8 Gruppen von Tieren mit $n = 8$, die sich jeweils durch die Variablen Zeitpunkt der Tötung, Qualität der i. v. Injektion, sowie Qualität des Futters unterschieden.

2.2. Tumormodell

Bei dem Experimentaltumor MADB 106 handelt es sich um Zellen, die aus Lungenmetastasen eines durch 9-10-Dimethyl-1-2-Benzanthracen hervorgerufenen Adenokarzinoms der Mamma bei weiblichen F344 Ratten gewonnen wurden, weshalb sie syngenetisch zu diesem Stamm sind. Diese Zellen sind besonders empfindlich für die Zerstörung durch NK-Zellen (Barlozzari et al., 1983).

Von dem gefrorenen Hauptstamm des Tumors wurde ein Teil aufgetaut und in Monolayer Kulturen in RPMI Medium (Gibco, Grand Island, New York, USA), unter Zusatz von 10 % Hitze-inaktivierten FCS, 45 U Penicillin G/ml, 0,045 mg Steptomycin/ml, 2 mM L-Glutamin, 0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren und 1 mM Natriumpyruvat unter 5 % CO₂ bei 37 °C inkubiert. Unter 0,25 % Trypsin wurden die Zellen separiert und in der log-Phase des Tumorwachstums für die i. v. Injektion entnommen. Anschließend werden sie in RPMI Lösung re-suspendiert und gewaschen (von Horsten et al., 2000).

Bei beiden Experimenten (früher/später Untersuchungszeitpunkt) wurden die Zellen anschließend mit dem CFSE (Carboxyfluorescein) markiert, der intrazellulär von unspezifischen Esterasen gespalten wird und mit verschiedenen Makromolekülen Komplexe bildet, was auch eine Identifizierung der Zellen nach einigen Tagen möglich macht (Weston und Parish, 1990). Um die Zellen für die Markierung vorzubereiten, wurden sie resuspendiert und gezählt. Anschließend wurden 40×10^6 Zellen in 500 μ l RPMI und 4 μ l einer Mischung aus 50 μ l CFSE Stammlösung (5 mM) und 450 μ l DMSO (Merck, Darmstadt, Deutschland) gegeben. Am Ende wurden die Zellen in PBS-0,1 % BSA dreimal gewaschen, resuspendiert und die Fluoreszenz unter dem Mikroskop kontrolliert. Für die Injektion in die Schwanzvene der Ratte werden für den frühen Zeitpunkt 1×10^6 Zellen pro Tier und für den späteren Zeitpunkt 2×10^5 Zellen pro Tier verwendet (von Horsten et al., 2000).

2.3. Applikation der MADB 106 Tumorzellen

Um die Tumorzellen zu applizieren, wurden die Tiere mittels eines Isoflurangas-Sauerstoffgemisches (3–4 Vol % Isofluran, 96–97 % O₂) betäubt. Zur Herstellung dieses Gasgemisches wurde ein Kleintiernarkosegerät (UniVet porta, Groppler Medizintechnik Deggendorf, Deutschland), Isofluranlösung (Forene® 100 %, Abbott GmbH & Co. KG Wiesbaden, Deutschland) und Sauerstoff aus einer Druckluftflasche verwendet.

Zur Einleitung der Narkose wurden die Tiere zuerst in einen mit Isoflurangas gefüllten Behälter gesetzt (Abb. 1). Als sie nach ca. 1 min. narkotisiert am Boden des Behälters lagen, konnten sie problemlos umgelegt und in Rückenlage auf der Arbeitsoberfläche über eine über den Mund und die Nase gestülpte Haube weiter mit dem Gasgemisch versorgt werden.

Um die Durchblutung der Schwanzvenen zu verbessern, wurde der Rattenschwanz für etwa 20 Sekunden in ein mit warmen Wasser (ca. 35 °C) gefülltes Becherglas getaucht. Nach dem Abtrocknen des Schwanzes und Anlage einer Klammer zur Stauung an der Schwanzwurzel wurde ein Venenkatheter (Vasofix® Safey 24 G, B.Braun, Melsungen, Deutschland) in eine der Venen im proximalen Schwanzdrittel eingebracht und dieser mit isotoner, steriler Natriumchloridlösung (NaCl

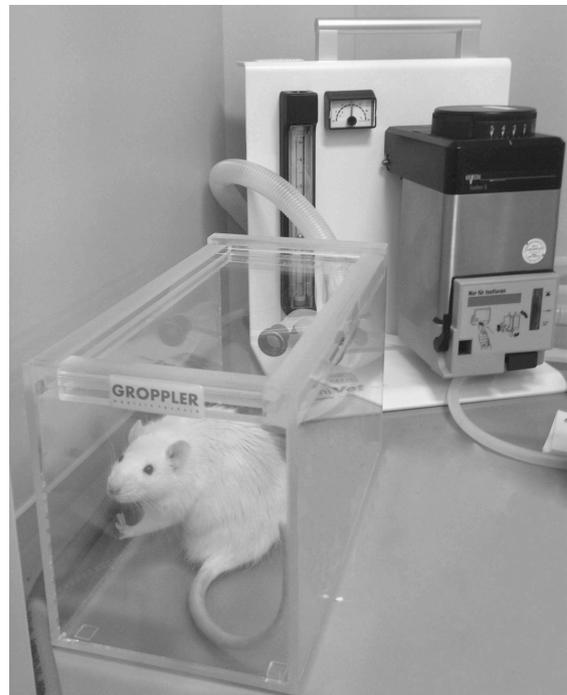


Abbildung 1: Versuchstier in Narkosekammer, Kleintiernarkosegerät

0,9 %, B. Braun) angespült, um sich über die korrekte Lage im Gefäß zu vergewissern. Anschließend wurden die Tumorzellen, die vorher in 1 ml Spritzen aufgezogen wurden, bzw. die NaCl 0,9 %-Lösung ohne Tumorzellen als Kontrolle injiziert.

2.4. Tötung der Versuchstiere und Präparation der Lungen

Die Tiere für den frühen Untersuchungs-Zeitpunkt verbrachten nach der Injektion 15 Minuten in Narkose, bevor mit einer chirurgischen Schere eine Laparotomie durchgeführt wurde. Die Tiere für den späten Untersuchungs-Zeitpunkt hingegen wurden durch Entzug des Narkosegases geweckt und erst nach 3 Wochen nach dem gleichen Prozedere, wie beim Spritzen der Tumorzellen, erneut in Narkose versetzt. Auch bei den Tieren des späten Zeitpunktes wurde folgend ein Laparotomieschnitt durchgeführt.

Nach Beiseiteschieben des Darms nach links wurde die Vena cava inferior gesucht und mit einer Kanüle (Microlance 3 – 24 G x 1“, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) punktiert. Bei ungenügender Blutmenge bei der Abnahme wurde nachfolgend auch die Bauchaorta punktiert. Mit Hilfe von Monovetten (S-Monovette Plasma Lithium-Heparin, 4,9 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) wurde den Ratten auf diese Weise ca. 5–10 ml Blut entnommen. War es nach der Punktion der beiden Gefäße nicht mehr möglich, noch mehr Blut zu entnehmen, wurden diese zur Sicherheit mit einer Schere durchtrennt.

Als der Tod eingetreten war, wurde der Laparotomieschnitt vorsichtig bis zum Diaphragma hin weitergeführt, so dass die Lunge kollabierte. Nachfolgend wurde das Zwerchfell in beide Richtungen seitlich eingeschnitten und der mediane Bauchschnitt durch eine Sternotomie nach oben hin erweitert bis die Trachea zu sehen war (siehe Abb. 2). Der Thorax wurde mit 2 Pinzetten zur Seite hin aufgedehnt, um die Lunge besser darzustellen.

Im oberen Drittel der Trachea wurde dann erneut ein Schnitt gesetzt und eine Knopfkanüle eingeführt, die mit Hilfe eines Fadens befestigt wurde.



Abbildung 2: Situs einer Versuchsratte nach medianer Laparotomie und Sternotomie, die Trachea wurde mit einer Pinzette dargestellt.

Durch leichten Zug an der Trachea, Durchtrennen der großen Gefäße über- und unterhalb des Herzes und vorsichtiges Freipräparieren konnten die Lunge und das Herz nun vollständig entnommen werden.

Anschließend wurden die Lungen über die Knopfkanüle an einem Glasstrichter befestigt, der die unten angeführten Lösungen enthielt. Und nachfolgend vollständig mit dieser Flüssigkeit gefüllt (siehe Abb. 3). Bei dem frühen Zeitpunkt wurde dafür O.C.T./PBS-Gemisch (1/5 OCT Lösung, CellPath, Newtown, UK ; 4/5 PBS Puffer) verwendet, folgend konnte durch Abschnüren mit einem Faden am Hilus der linken Lungenlappen separiert und auf -80°C Trockeneis eingefroren werden (von Horsten et al., 2000).

Bei dem späten Zeitpunkt wurde Bouinsche Lösung (72 % gesättigte Pikinsäurelösung, 23 % Formaldehyd und 5 % reine Essigsäure, Sigma, St. Louis, USA) verwendet, die gefüllten Lungen mit einer Ligatur an der Trachea unterhalb der Knopfkanüle versehen und nach Abtrennen der Knopfkanüle in ein Becherglas gegeben, das ebenfalls mit Bouin-Lösung gefüllt war (Shingu et al., 2003).

Für weitere Untersuchungen wurden bei den Ratten auch Leber, Milz, epidymales Fett und viszerales Fett entnommen und bei -80°C eingefroren.



Abbildung 3: (A) Glasstrichter, Ventil und Knopfkanüle, die in der Trachea der Lunge fixiert wurde (B) Lunge, gefüllt mit OCT-Lösung (C) Lunge, gefüllt mit Bouinscher Lösung

2.5. Schneiden und Färben der Lungen

2.5.1. Früher Zeitpunkt

Die gefrorenen Lungen wurden komplett in O.C.T./PBS-Gemisch (1/5 OCT Lösung, CellPath, Newtown, UK ; 4/5 PBS Puffer) getaucht und anschließend in einer Ebene senkrecht zum kleinsten Durchmesser des Präparates in $5\ \mu\text{m}$ dicke Scheiben

geschnitten. Jeder 15. Schnitt wurde auf Gelatine-beschichtete Objektträger übertragen, luftgetrocknet und während des Färbens bei -20 °C gelagert.

Das Färben der Schnitte erfolgte über eine doppelte Immunhistochemie nach der APAAP-Methode (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex wurde nach Sekundär-Antikörper aufgetragen) und eine anschließende Gegenfärbung mit Haematoxylin. Die monoklonalen Primär-Antikörper richteten sich gegen das intrazelluläre CFSE in den gespritzten Tumorzellen und gegen den NK-RP1 Rezeptor (CD 161) auf der Oberfläche der NK-Zellen.

Nach dem Auftauen der Präparate wurden sie 10 min bei -20 °C in Aceton fixiert und anschließend in TBS-Tween (0.05 % Tween® 20, Sigma, St. Louis, USA; in 10 % TBS-Stocklösung und 89,95 % destillierten Wasser) gespült (kurzes Eintauchen 2–3 mal hintereinander in frische Lösung) und gewaschen (Träger stehen für 2 min in frischer Lösung). Danach wurden sie mit dem primären Anti-Fluorescein-mAK (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany; 1/250 in 98,9 % PBS, 1 % BSA, 0,1 % Natriumazid) über Nacht in feuchten Kammern inkubiert. Nach erneutem Spülen und Waschen mit TBS-Tween wurden die Schnitte für 30 min mit dem bridging-Antikörper (Polyclonal Rabbit Anti Mouse Immunoglobulins Dako Z 0259, rabbit anti-mouse, Dako, Hamburg, Deutschland; 1/50 in 95 % PBS und 5 % Rattenserum) inkubiert. Es wurde wieder mit TBS-Tween gewaschen, der APAAP-Komplex (100 ml Dako D 0651, mouse, Dako, Hamburg, Deutschland; 1/50 in TBS-Tween) hinzugefügt und die Präparate für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die letzten beiden Schritte (Inkubation mit bridging Antikörper, Inkubation mit APAAP-Komplex) wurden mit einer Inkubationszeit von 15 min wiederholt. Den nächsten Schritt stellte die Zugabe des Substrates Fast Blue (Sigma, Deisenhofen, Germany), das im Substratpuffer (98 % 0,1 M Tris-Puffer pH 8,2; 2 % N,N-Diethylformamide; 0,01 % 1 M Levamisol-Lösung 20 mg Naphtol) aufgelöst (2 mg Fast Blue auf 3 ml Substratpuffer) und anschließend filtriert wurde, dar. Die Inkubation erfolgte hier für 25 min, anschließend wurde wieder in TBS-Tween gewaschen.

Die Inkubation mit dem Anti-CD161-mAK (mouse anti rat CD161, MorphoSys AbD GmbH, Düsseldorf, Deutschland) erfolgte über eine Stunde und es schloss sich die gleiche Färbeprozedur, mit der Ausnahme, dass hier als APAAP-Substrat Fast Red (Sigma, Deisenhofen, Germany) verwendet wurde (2,5 mg Fast Red auf 4 ml Substratpuffer), an. Am Ende erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin (Hämatoxylin, Meyers Hämalaunlösung, Merck, Darmstadt, Deutschland; 1/5 in PBS).

Die angeführte Prozedur für das Schneiden und Färben der Lungen erfolgte nach Vorgaben laut von Hörsten, et al., 2000. Einige Parameter, wie die Dauer der Inkubation der Primärantikörper oder Schichtdicke der Präparate, wurden an unseren Versuchsaufbau angepasst.

Nach der Färbeprozedur wurden die Schnitte mit Mounting Medium (Dako Glycergel, Dako Deutschland, Hamburg) und Glas-Deckplättchen fixiert.

2.5.2. Später Zeitpunkt

Die Färbung erfolgte über Nacht in Bouinscher Lösung bei 4 °C. Sie beruht darauf, dass die Tumorzellen der Lungenmetastasen im Vergleich zum umliegenden Gewebe weniger Farbstoff aufnehmen und sich somit als weiße Flecken auf der gelblich angefärbten Lungenoberfläche darstellen. Dieser Farbstoff wurde, wie oben bereits geschildert, über die Trachea in die Lunge eingeleitet und die Lunge folgend in ein Becherglas gegeben, das mit der Lösung gefüllt war.

2.6. Erhebung der Daten

2.6.1. Quantifizierung der NK-Zellen, Tumorzellen und NK-Zell-Tumorzell-Interaktionen bei dem frühen Untersuchungs-Zeitpunkt

Von jedem der angefertigten Schnitte wurde mit Hilfe eines Mikroskops (BZ9000 Fluorescence Microscope, Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg) ein digitales Bild angefertigt, das einen ca. 1700 µm breiten Ausschnitt horizontal über die ganze Breite des Präparates zeigt. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Ausschnitt immer genau unterhalb der großen Gefäße liegt, wenn das auf Grund der Schnittqualität nicht möglich war, immer genau oberhalb dieser.

Auf diese Bilder wurde auf dem Computer im Programm ImageJ, nach einer Skalierung (0,611 Pixel entsprachen 1 µm), ein Raster mit einer Feldgröße von $5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ pro Einzelfeld gelegt, wobei die Ausrichtung per Zufall erfolgte (siehe Abb. 4).

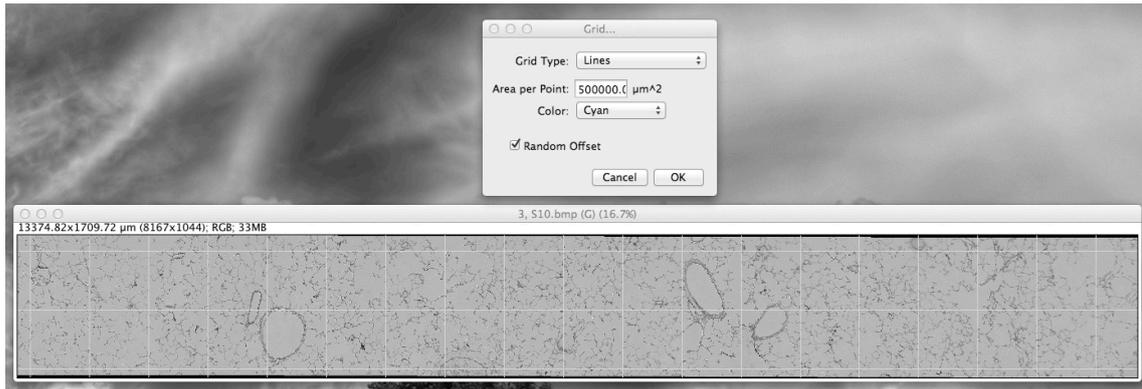


Abbildung 4: Digitales, mikroskopisches Bild einer doppelt immunhistochemisch gefärbten Rattenlunge. Darüber gelegt wurde ein Raster mit einer Feldgröße von $5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ pro Feld.

Aus diesem Raster wurden pro Schnitt 8 Einzelfelder ausgewählt, die auf die Anzahl, der in ihnen befindlichen NK- und Tumorzellen, sowie NK-Tumorzell-Interaktionen untersucht wurden. Im Folgenden wird kurz das Vorgehen zur Auswahl der Felder und im Anschluss die Analyse der Zellzahlen erläutert.

Begonnen wurde links oben auf dem Präparat. Wenn der entsprechende Ausschnitt an dieser Stelle

1. kein großes Gefäß ($\geq 150 \mu\text{m}$ Durchmesser; Wanddicke $\geq 10 \mu\text{m}$; starke Färbung der Gefäßwand)
 2. keine Bildartefakte (z. B. stark unscharfe Stellen, Flecken, Luftblasen)
 3. ausreichend Lungengewebe (mind. 75 % des Kästchens zeigt normal konfiguriertes, nicht zerrissenes Lungengewebe)
 4. keinen direkten Flächenkontakt zu einem anderen ausgewählten Ausschnitt
- zeigt, so wurde dieser ausgewählt. War dies der Fall, wurde nach rechts ein Kästchen übersprungen und somit wieder für das 3. Kästchen oben von links entschieden, ob es die Einschlusskriterien erfüllt oder nicht. Erfüllte der Bildinhalt eines Kästchens nicht die Einschlusskriterien, so konnte bei dem rechts benachbarten Feld weiter gemacht werden. Nachdem 4 Kästchen aus der oberen Reihe ausgewählt wurden, war in der unteren Reihe links beginnend fortzufahren.

Die Zellzählung wurde für jedes der ausgewählten Felder einzeln durchgeführt. Dafür wird im Programm ImageJ ein Threshold (Image → Adjust → Threshold) gesetzt, der es ermöglicht, in den Bildern bestimmte Farbstufen, Sättigungswerte und Helligkeitsstufen zu markieren. Für die Kennzeichnung der NK-Zellen (rot markiert mit Fast Red) wurde die Einstellung Hue: 214–255, Saturation: 116–255 und Brightness: 59–255 gewählt. Für die Darstellung der MADB 106-Zellen (blau markiert mit Fast Blue B) die

Einstellung Hue: 148–214, Saturation: 116–255 und Brightness: 0–84. Anschließend wird über die Funktion Analyse → Analyse Praticles die Anzahl der Zellen bestimmt. Für die NK-Zellen wurde hier die Einstellung Size 3–100 Pixel Units gewählt und Circularity 0–1, für die MADB Zellen Size 25–Infinity und Circularity 0–1. (siehe Abb. 5)

Die Analyse der einzelnen Schnittbilder erfolgte verblindet, wobei die Datei- und Ordnernamen der eingescannten Bilder von Dr. Julia Spielmann verschlüsselt wurden und ich bei der Bestimmung der Zellzahl keine Kenntnis über die Gruppenzugehörigkeit der einzelnen Bilder hatte.

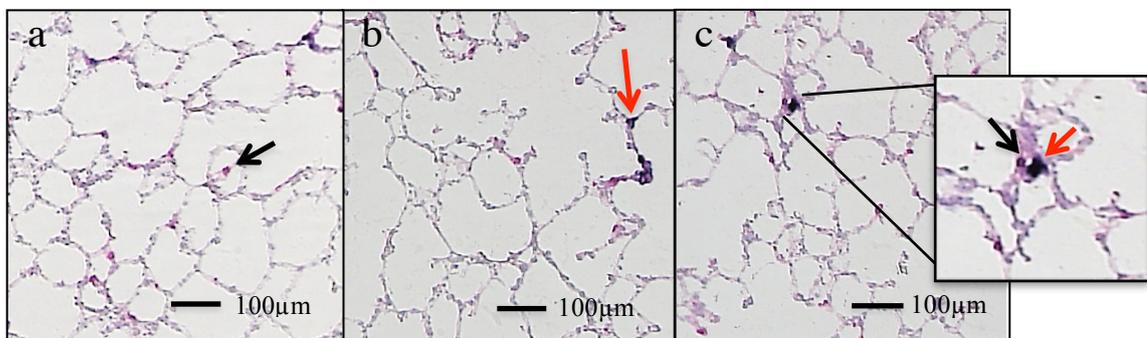


Abbildung 5: Doppelt immunohistochemisch gefärbter und mit Hämatoxylin gegengefärbter Cryo-Schnitt. Die Färbung erfolgte unter der Nutzung von Anti-CD161 mAb und anti-Fluorescein mAb. Die Schnitte wurden mit einem digitalen Mikroskop eingescannt und mit dem Programm ImageJ analysiert. NK-Zellen wurden rot dargestellt (a), MADB 106-Zellen wurden blau dargestellt (b). Eine NK-Zell-MADB 106-Zell-Interaktion wurde vergrößert (c). Schwarze Pfeile zeigen NK-Zellen, rote Pfeile MADB 106-Zellen.

2.6.2. Quantifizierung der oberflächlichen Lungenmetastasen bei dem späten Untersuchungs-Zeitpunkt

Die oberflächlichen Metastasen (siehe Abb. 3 und 11) wurden auf jedem Lungensegment (linke Lunge: Ober-/Mittel-/Unter-/Hinterlappen, rechte Lunge) gezählt. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Zahl der oberflächlichen Lungenmetastasen repräsentativ für die Gesamtzahl der Lungenmetastasen ist (Shingu et al., 2003). Dies erfolgte verblindet und von zwei Untersuchern. Shingu et al. wendeten dieses Vorgehen bereits bei Fischer 344 Ratten an, die intravenös MADB 106-Zellen erhielten.

2.7. FACS Analyse der NK-Zellen im Blut der Versuchstiere

Die Analyse des Blutes der Versuchstiere wurde von Dorle Knauf und Dr. Julia Spielmann durchgeführt. Ein Teil dieser Daten wird in dieser Arbeit angeführt, um ein gesamtheitliches Bild des von uns durchgeführten Experimentes darstellen zu können. Das bei der Tötung der Tiere gewonnene Blut wurde mittels FACS-Analytik zur Bestimmung der absoluten und relativen Anzahl der NK-Zellen, NKT-Zellen, T-Zellen, B-Zellen Monozyten untersucht.

2.8. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software Graphpad-Prism. Dabei wurde das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM. Zur Analyse von potentiell signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen wurde ein t-Test (Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben) durchgeführt. Die in der Arbeit aufgeführten Diagramme wurden mit Microsoft Exel erstellt.

3. Ergebnisse

3.1. Gewichtsentwicklung der Versuchstiere

3.1.1. Früher Zeitpunkt

Das durchschnittliche Gewicht der Versuchstiere betrug am Anfang der Futterphase in jeder der Gruppen 184 g. Nach der sechswöchigen Futterperiode hatten die Kontrolltiere ihr Gewicht um 58 % gesteigert und die DIO-Tiere um 65,5 %. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Tiere mit der hochkalorischen, fettreichen Diät ein signifikant höheres Körpergewicht erreicht als die Vergleichstiere mit Standardfutter ($290 \pm 2,6$ g vs. $304 \pm 3,9$ g; $P = 0,006$)

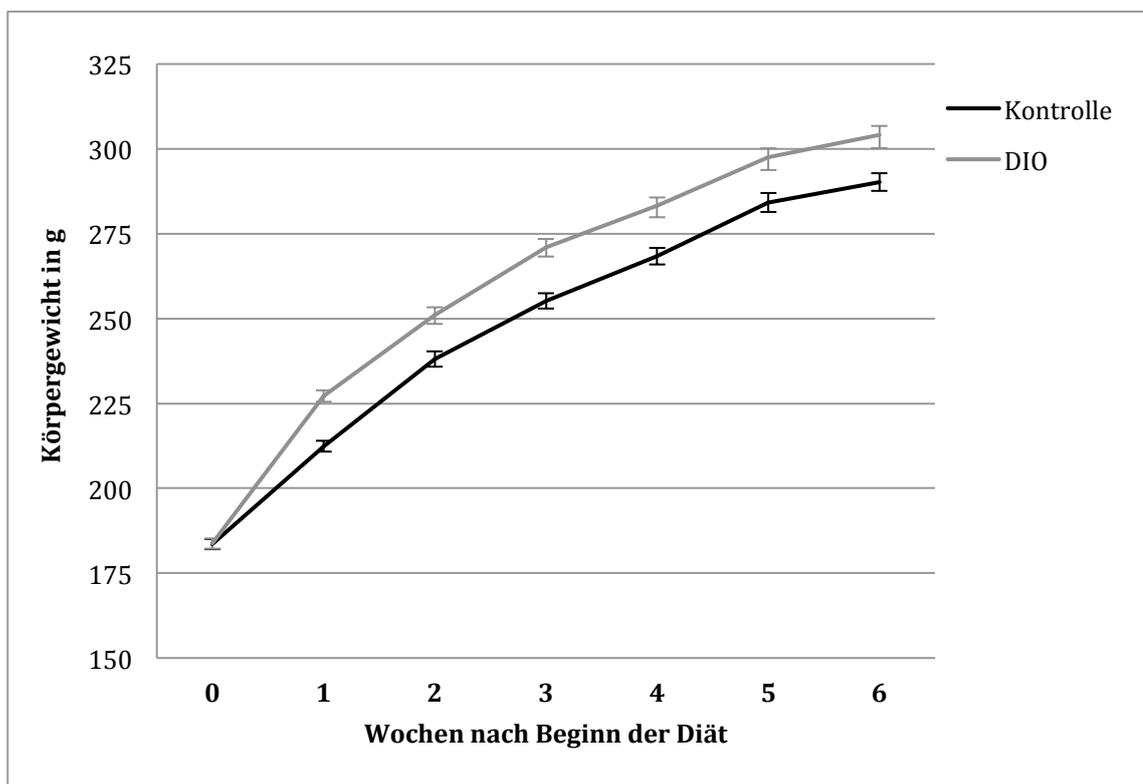


Abbildung 6: Gewichtsentwicklung der Versuchstiere bei sechswöchiger fettreicher (DIO-) oder fettarmer (Kontroll-) Diät. , +/- SEM.

3.1.2. Später Zeitpunkt

Zu Versuchsbeginn wogen die Versuchstiere des späten Zeitpunktes in allen vier Gruppen durchschnittlich 195,5 g. Nach 10 Wochen hatte das Körpergewicht der Tiere, die Kontrollfutter erhielten um 68,6 % gesteigert, dass der DIO-Tiere um 78 %. Auch hier gab es einen signifikanten Unterschied zwischen dem Körpergewicht der Kontrolltiere, im Vergleich zu den Tieren, die fettreiche Nahrung erhielten ($330 \text{ g} \pm 4 \text{ g}$ vs. $352 \text{ g} \pm 7,2 \text{ g}$; $P = 0,012$).

In den 3 Wochen nach der Tumorzell-Injektion stagnierte das Gewicht in beiden Gruppen anfangs und stieg dann nach einer Woche weiter an. Das durchschnittliche Gewicht der DIO-Tiere war wieder signifikant höher, als das der Kontrolltiere ($368 \text{ g} \pm 9,2 \text{ g}$ vs. $333 \text{ g} \pm 5,5 \text{ g}$; $P = 0,0027$).

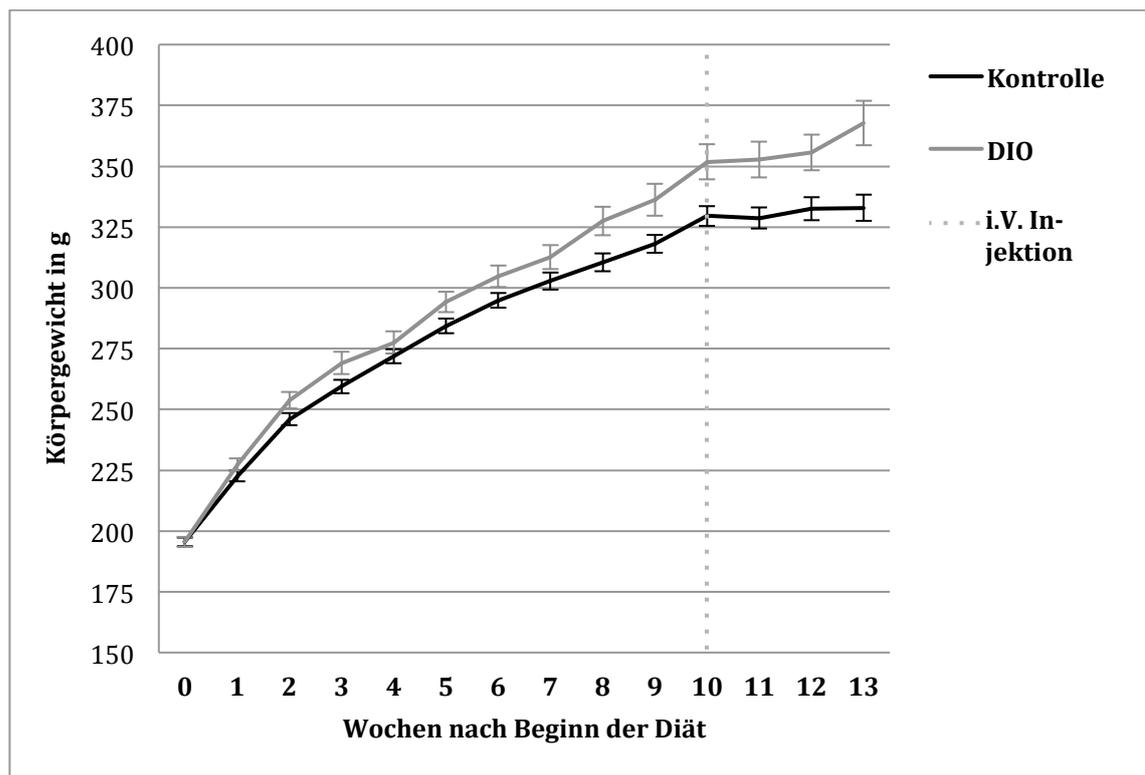


Abbildung 7: Gewichtsentwicklung der Versuchstiere bei vierzehnwöchiger fettreicher (DIO-) oder fettarmer (Kontroll-) Diät. Nach 10 Wochen erfolgte die Injektion von MADB 106-Zellen oder Vehikel (NaCl)., +/- SEM.

3.2. Quantifizierung der NK- und MADB 106-Zellen im Lungengewebe

3.2.1. NK-Zellen

Bei den Kontroll- und den DIO-Tieren, die mit NaCl behandelt wurden, konnte eine ähnliche Zahl an NK-Zellen festgestellt werden (195 ± 72 vs. 183 ± 45 in 40 mm^2 untersuchtem Lungengewebe).

Bei den normalgewichtigen Kontrollratten kam es im Vergleich zu diesen Werten 15 Minuten nach MADB 106-Injektion zu einer deutlichen Zunahme der Anzahl pulmonaler NK-Zellen (1064 ± 460 vs. 195 ± 72 in 40 mm^2 untersuchtem Lungengewebe; $P = 0,085$). Dieser Effekt war bei den DIO-Tieren nicht zu verzeichnen, da es zu keiner großen Änderung der NK-Zellzahl im Vergleich zu den Tieren, denen Vehikel gespritzt wurde kam (63 ± 9 vs. 183 ± 45 in 40 mm^2 untersuchtem Lungengewebe). Damit war der Unterschied der NK-Zellzahl zwischen den Kontroll- und DIO-Tieren, denen MADB 106-Zellen injiziert wurden, deutlich (1064 ± 460 vs. 63 ± 9 in 40 mm^2 untersuchtem Lungengewebe; $P = 0,05$).

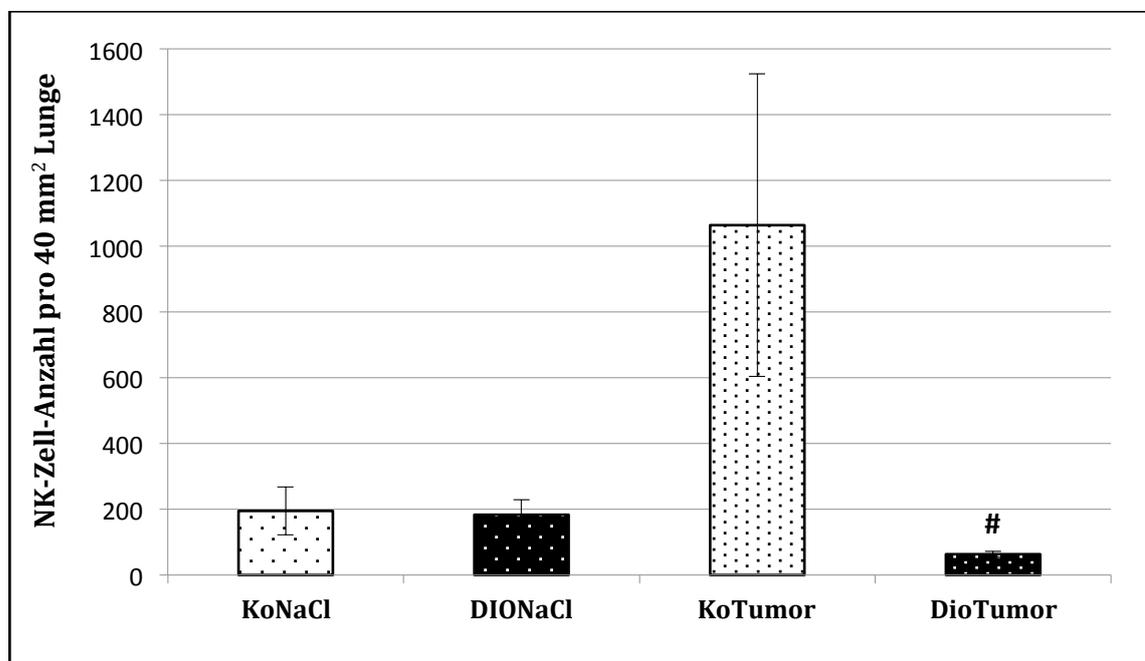


Abbildung 8: Anzahl der NK-Zellen pro mm^2 untersuchtem Lungengewebe 15 min nach Injektion von MADB 106-Zellen (-Tumor) oder Vehikel (-NaCl). Dies erfolgte nach sechswöchiger fettreicher (DIO-) oder fettarmer (Ko-) Diät. +/-SEM, signifikante Unterschiede zwischen der NaCl- und der Tumorgruppe würden als * gekennzeichnet, signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und der DIO-Gruppe würden als # gekennzeichnet ($p < 0,05$).

3.2.2. MADB 106-Zellen

Bei den Tieren, die mit den Adenokarzinomzellen behandelt wurden, wiesen die Kontrolltiere signifikant mehr Tumorzellen auf als die DIO-Tiere (223 ± 48 vs. 38 ± 18 in 40 mm^2 untersuchtem Lungengewebe; $P = 0,025$).

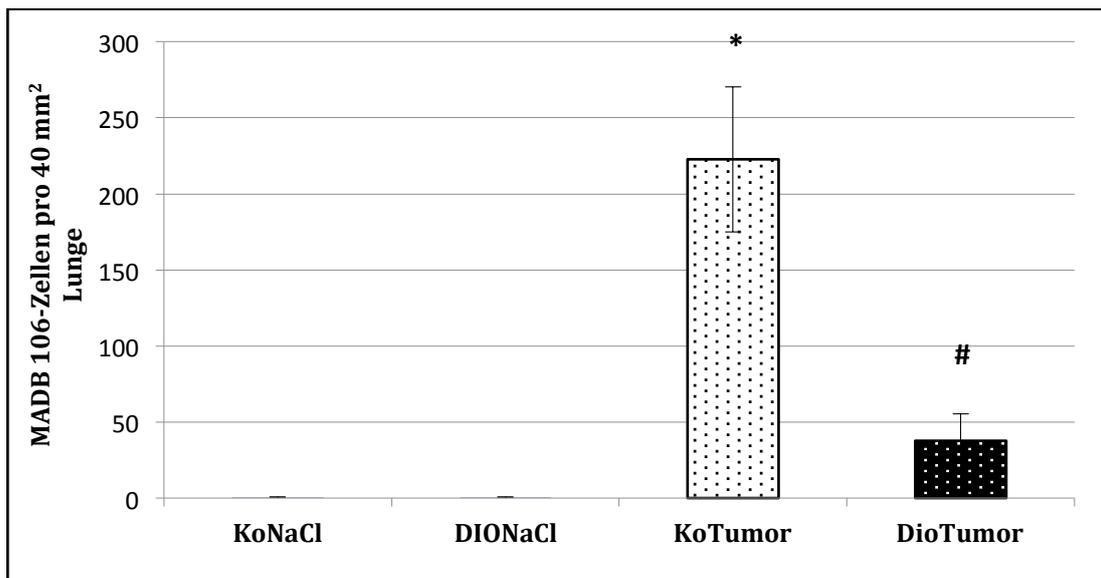


Abbildung 9: Anzahl der MADB 106-Zellen pro mm^2 untersuchtem Lungengewebe 15 min nach Injektion von MADB 106-Zellen (-Tumor) oder Vehikel (-NaCl). Dies erfolgte nach sechswöchiger fettreicher (DIO-) oder fettarmer (Ko-) Diät. +/-SEM, signifikante Unterschiede zwischen der NaCl- und der Tumorgruppe würden als * gekennzeichnet, signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und der DIO-Gruppe würden als # gekennzeichnet ($p < 0,05$).

3.2.3. NK-MADB 106-Interaktionen

Bezüglich der NK-Tumorzell-Interaktionen wiesen Tiere der beiden Gruppen, die MADB 106-Zellen intravenös erhielten, signifikante Unterschiede auf. Hierbei zeigten die Ratten nach fettarmer Ernährung 5 mal mehr Interaktionen als nach fettreicher Ernährung ($1,33 \pm 0,34$ vs. $0,25 \pm 0,25$ pro 40 mm^2 Lungengewebe; $P = 0,045$).

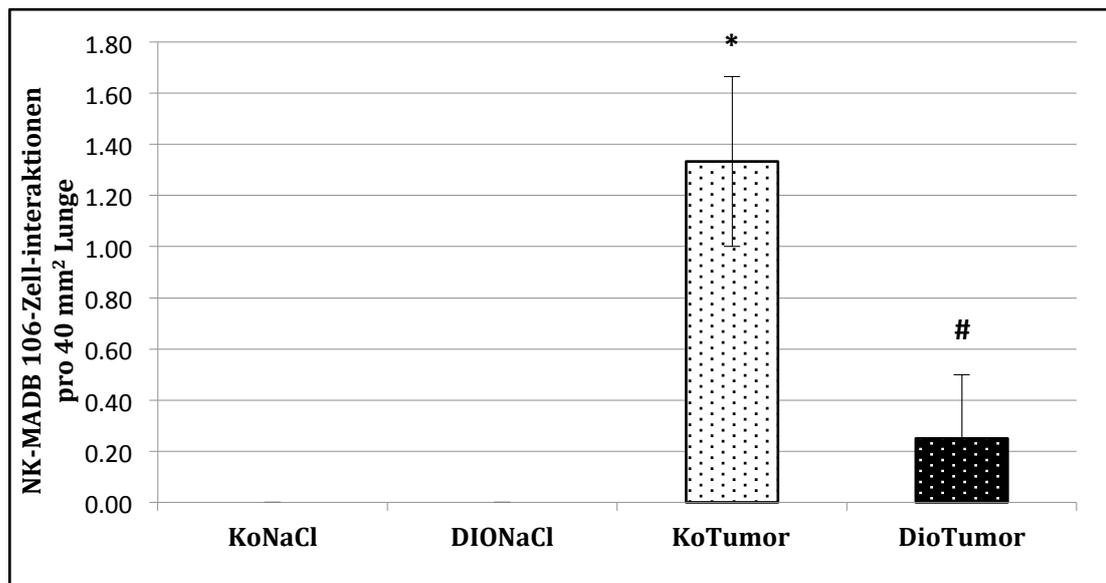


Abbildung 10: Anzahl der NK-Zell -MADB 106- Interaktionen pro mm^2 untersuchtem Lungengewebe 15 min nach Injektion von MADB 106-Zellen (-Tumor) oder Vehikel (-NaCl). Dies erfolgte nach sechswöchiger fettreicher (DIO-) oder fettarmer (Ko-) Diät. +/-SEM, signifikante Unterschiede zwischen der NaCl- und der Tumorgruppe würden als * gekennzeichnet, signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und der DIO-Gruppe würden als # gekennzeichnet ($p < 0,05$).

3.3. Quantifizierung der Oberflächenmetastasen zum späten Zeitpunkt

Individuen, die mit Vehikel behandelt wurden, zeigten keine oberflächlichen Lungenmetastasen. Bei diät-induziert-adipösen Tieren, die MADB 106-Zellen erhielten, fanden sich signifikant mehr oberflächliche Lungenmetastasen ($16 \pm 4,8$ vs. $49 \pm 8,5$ pro Lunge, $P = 0,005$) als bei den normalgewichtigen Kontrolltieren, die MADB 106-Zellen erhielten.

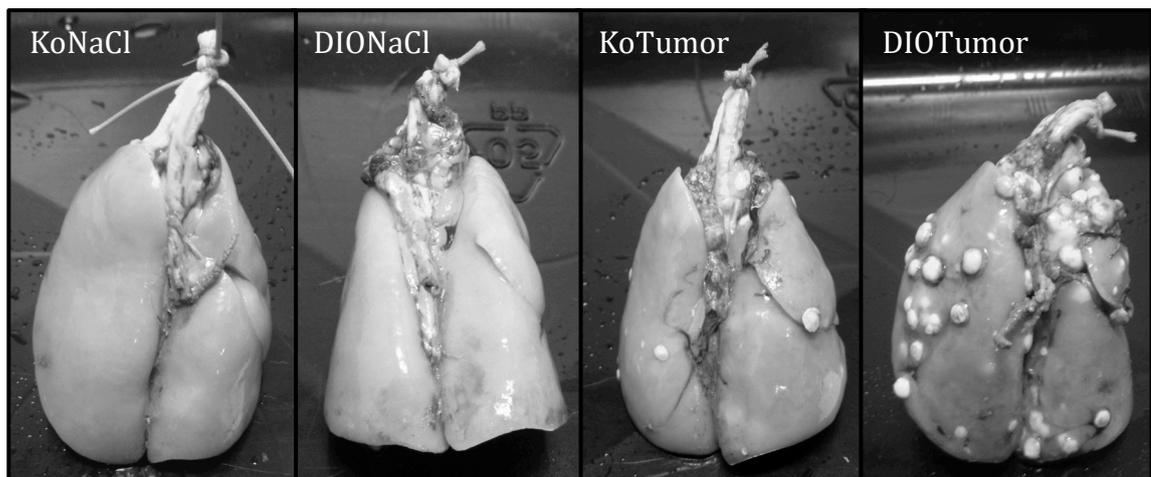


Abbildung 11: Repräsentative makroskopische Bilder der Oberflächenlichen Lungenmetastasen 3 Wochen nach Injektion von MADB 106-Zellen (-Tumor) oder Vehikel (-NaCl). Fixation und Färbung erfolgte in Bouin Lösung. Vorangegangen war eine zehnwöchige fettreiche (DIO-) oder fettarme (Ko-) Diät.

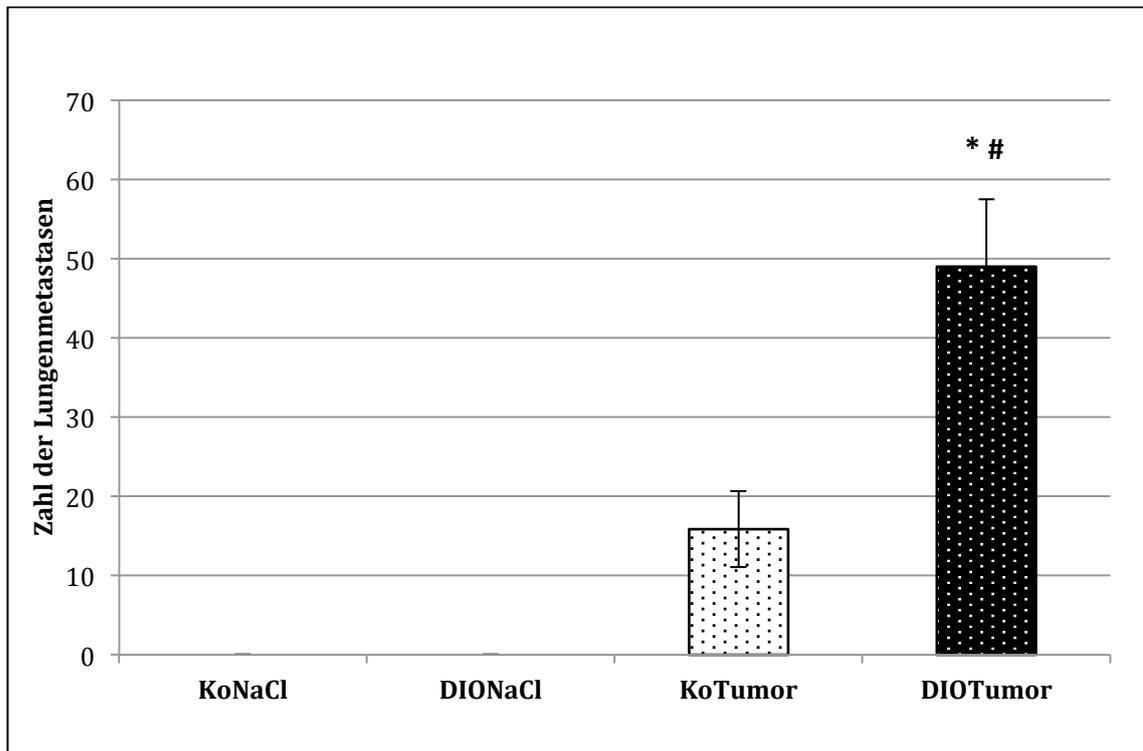


Abbildung 12: Anzahl der Oberflächlichen Lungenmetastasen 3 Wochen nach Injektion von MADB 106-Zellen (-Tumor) oder Vehikel (-NaCl). Dies erfolgte nach zehnwöchiger fettreicher (DIO-) oder fettarmer (Ko-) Diät. +/-SEM, signifikante Unterschiede zwischen der NaCl- und der Tumorgruppe würden als * gekennzeichnet, signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und der DIO-Gruppe würden als # gekennzeichnet ($p < 0,05$).

3.4. FACS Analyse der NK-Zellen im Blut der Versuchstiere

Bei dem frühen Untersuchungszeitpunkt zeigten die Tiere in allen vier Gruppen etwa gleiche Zahlen an NK-Zellen und NKT-Zellen.

Bei dem späten Zeitpunkt drei Wochen nach der Injektion der Tumorzellen zeigten die Tiere der DIO-Gruppe, verglichen mit der Kontrollgruppe, eine signifikant niedrigere Zahl an NK-Zellen im Blut ($12,2 \% \pm 0,6 \%$ vs. $16,5 \% \pm 2 \%$; $P = 0,0006$). Die Zahl der NKT-Zellen war wieder in allen Gruppen etwa gleich.

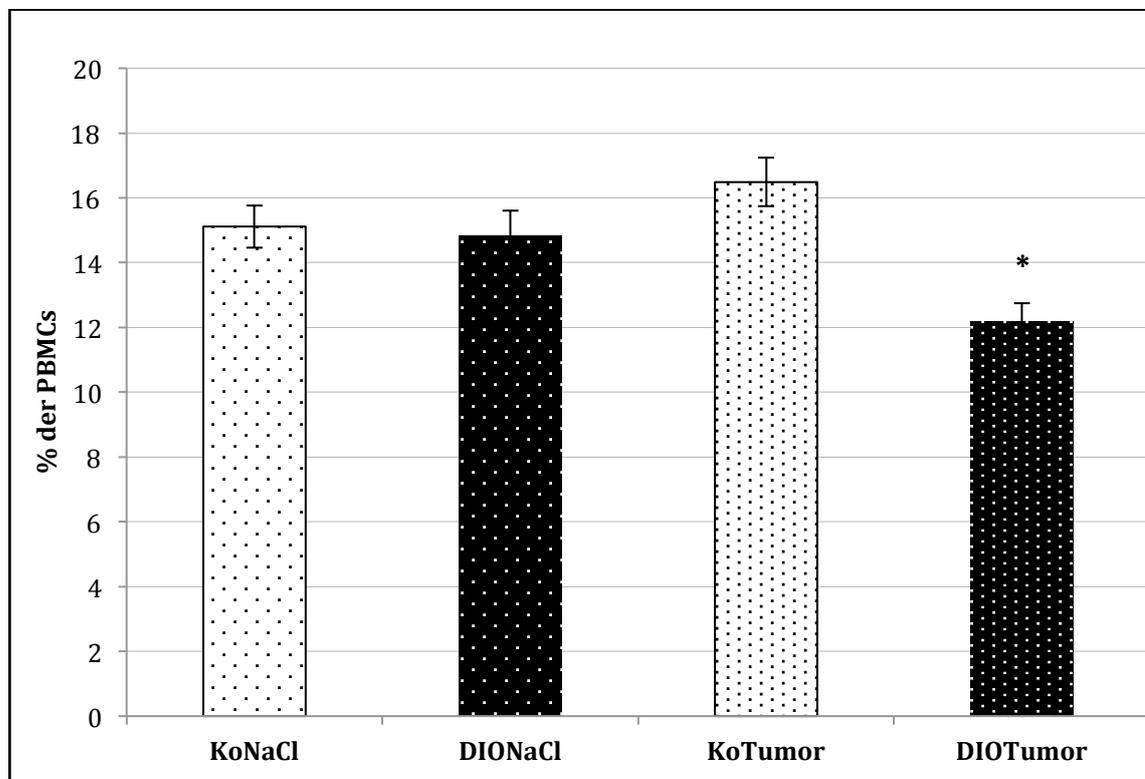


Abbildung 13: FACS-basierte Analyse der NK-Zell Zahl im Blut 3 Wochen nach Injektion von MADB 106-Zellen (-Tumor) oder Vehikel (-NaCl). Dies erfolgte nach sechswöchiger fettreicher (DIO-) oder fettarmer (Ko-) Diät. +/- SEM, signifikante Unterschiede zwischen der NaCl- und der Tumorgruppe würden als * gekennzeichnet, signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und der DIO-Gruppe würden als # gekennzeichnet ($p < 0,05$).

4. Diskussion

Tumoren bei Adipösen stellen in Deutschland und anderen Industriestaaten ein wichtiges Problem dar. Schätzungsweise 40.000 neue Krebsfälle treten hierzulande pro Jahr aufgrund von Übergewicht auf (Calle und Kaaks, 2004). Zudem ist die Krebsmortalität bei Adipositas-Patienten erhöht (Calle et al., 2003). Beispielsweise ist Adipositas ein signifikanter Faktor für eine erhöhte Krebs-spezifische Mortalität bei Prostatakarzinomen (Zhang et al., 2015), Cervix-Karzinomen (Frumovitz et al., 2014) und Brustkrebs (Chang et al., 2013). Ob dieser Effekt durch eine verstärkte Metastasierung oder ein stärkeres Tumorwachstum zustande kommt, scheint dabei noch unklar. Tierexperimentelle Daten suggerieren, dass es diesbezüglich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Entitäten gibt (Park et al., 2012; Kim et al., 2013). Anzumerken bleibt auch, dass Adipositas bei wenigen Tumoren auch einen positiven Einfluss auf die Überlebenszeit hat, was für Bronchialkarzinome zutrifft (Leung et al., 2011).

Ursachen für die erhöhte Inzidenz und Mortalität von Tumoren bei adipösen Individuen stellen ein gesteigerter Blut-Insulinspiegel, eine höhere Bioverfügbarkeit vom Wachstumsfaktor IGF-1, chronische Inflammation, sowie eine verminderte Immunfunktion dar. Dabei wurde bisher noch nicht näher untersucht, welchen Stellenwert hierbei die NK-Zellen haben. Verschiedene Studien weisen bereits darauf hin, dass die Anzahl und Funktion dieser Immunzellen bei adipösen Individuen verändert ist (Nave et al., 1998; Iorio et al., 2006). Diese Veränderungen zeigen eine Reversibilität nach Gewichtsverlust beim Menschen (Moulin et al., 2011; Jahn et al., 2015) oder Übertragung der NK-Zellen in normalgewichtige Individuen im Tiermodell (Lautenbach et al., 2009).

Um im Tiermodell die menschliche Adipositas durch übermäßige Kalorienzufuhr abzubilden bieten sich hochkalorische Diäten bei Nagetieren, wie Mäusen oder Ratten, an, da andere Adipositas-Modelle auf genetischen Veränderungen bei den Tierstämmen beispielsweise durch Überexpression von AgRP (Agouti related protein - wirkt Appetit steigernd im Hypothalamus) oder Unterexpression von Leptin oder Leptinrezeptoren basieren (Kanasaki und Koya, 2011). Diese Ursachen spielen beim Menschen eine untergeordnete Rolle.

Das in dieser Arbeit beschriebene Modell der diät-induzierten Adipositas bei F344 Ratten wurde bereits in anderen Studien verwendet, um Effekte von nahrungsmittelinduzierter Adipositas auf den Organismus zu untersuchen. Beispielsweise wurde das Verhalten (Buchenauer et al., 2009), sowie die Herzfunktion (Nagarajan et al., 2013) unter Adipositas analysiert und tumorbiologische Untersuchungen zur Leukozytenverteilung und Zytokinquantifizierung durchgeführt (Behrendt et al., 2010).

Der deutliche Anstieg der Anzahl pulmonaler NK-Zellen der normalgewichtigen Versuchstiere nach Injektion von Tumorzellen spricht für eine Mobilisierung dieser Immunzellen hauptsächlich aus dem Blut bzw. wahrscheinlich auch lymphatischen Organen (Knochenmark, Milz oder andere) oder nicht lymphatischen Organen (z. B. Leber) in die Lunge. Dieser Effekt wurde von verschiedenen Autoren sowohl bei tumorbefallenem Gewebe, als auch bei infektiösen Entzündungsreaktionen (Khan et al., 2006) beschrieben. Standard- oder Normalwerte für die NK-Zellzahl in der Lunge beim Menschen oder der Ratte wurden bis dato noch nicht publiziert. Die detaillierten Mechanismen der Migration sind dabei zum Großteil noch unklar (Gregoire et al., 2007). L-Selektine, die auch von anderen Lymphozyten exprimiert werden, scheinen dabei eine wichtige Rolle zu spielen (Sobolev et al., 2009).

Der NK-Zell-Anstieg blieb in den Lungen der DIO-Versuchstiere nach Tumorzell-Injektion aus. Zu vermuten ist, dass die Zellen möglicherweise nicht adäquat auf Zytokin-Signale anderer Immunzellen reagieren, die durch die Tumorzellinvasion ausgelöst werden. So schütten verschiedene Zellen des angeborenen Immunsystems (dendritische Zellen, Makrophagen, NKT-Zellen, NK-Zellen), die Tumorzellen über ihre Oberflächenrezeptoren erkennen, Mediatoren wie Interferon (IFN-) α oder Interleukin (IL-) 12 (auch NKSF-NK-Zellen stimulierender Faktor) aus, die zu einer Proliferation, IFN- γ -Produktion und einer Erhöhung der Zytotoxizität der NK-Zellen führen (Walzer et al., 2005). Denkbar wäre, dass ein oder mehrere der inflammatorischen Zytokine, beispielsweise über eine verstärkte Expression von L-Selektinen oder P-Selektin-Liganden, zu einer NK-Zell-Migration führen. IL 2 und IL 12 führen experimentell zu einer verstärkten Endothel-Ahäsion (Allavena et al., 1996). Bei adipösen Tieren scheint dieser Mechanismus der NK-Zell-Immigration in das Gewebe, das mit Tumorzellen befallen ist, gestört zu sein. Dies ist als Zeichen eines Funktionsverlustes dieser Immunzellen zu werten. Studien bei Menschen zeigen, dass sich eine erniedrigte NK-Zellzahl im Tumorgewebe negativ auf die Prognose von

Colon-, Magen und Lungenkarzinomen auswirkt (Coca et al., 1997; Ishigami et al., 2000; Villegas et al., 2002).

Zusätzlich für einen Verlust der NK-Zell-Funktion spricht, dass sich bei den DIO Tieren beim frühen Untersuchungszeitpunkt signifikant weniger NK-Zell-Tumorzell-Interaktionen zeigten. Erkennt eine NK-Zelle eine Tumorzelle, z. B. anhand der herunterregulierten MHC-I Komplexe an deren Oberfläche über Disinhibition der KIR-Rezeptoren oder über spezifische Oberflächenmuster über NCR-Rezeptoren (siehe 1.2.), so lagert sie sich an diese Zelle an und führt deren Zelltod durch folgende Mechanismen herbei (Cheng et al., 2013). Erstens durch die Ausschüttung von Granula, die Granzym und Perforine enthalten und zur Tumor-Zell-Apoptose führen (Kagi et al., 1994). Zweitens durch die Expression von Todesrezeptor-Liganden, wie FasL oder TRAIL, die mit Rezeptoren auf der Tumorzell-Oberfläche interagieren und ebenfalls deren Apoptose einleiten (Screpanti et al., 2001). Drittens über die Ausschüttung von Substanzen wie IFN- γ und anderer Zytokine die eine spezifische Immunabwehr einleiten und die Angiogenese des Tumors einschränken (Street et al., 2001). Und viertens mittels ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity), wobei die NK-Zellen über ihren Fc γ RIII (CD16)-Rezeptor IgG-(Antikörper)-Moleküle auf Tumorzellen binden und dadurch aktiviert werden (Smyth et al., 2002). Für die komplexe Abwehr der NK-Zellen gegen die Tumorzellen ist also ein direkter Zell-Zell-Kontakt nötig, der auch als „killers kiss“ bezeichnet wird (Krzewski und Strominger, 2008).

Der erniedrigten NK-Zell-Zahl und -Funktion in der Lunge entsprechend fanden wir in unserem zweiten Experiment in der DIO-Gruppe, der Tumorzellen gespritzt wurde, auch signifikant mehr oberflächliche Lungenmetastasen. Wie bereits beschrieben (siehe 1.3.), gibt es für menschlichen Brustkrebs bereits deutliche Hinweise auf eine verstärkte Metastasierung bei Adipösen (Ewertz et al., 2011). Auch bei anderen Experimenten mit Melanom-Zellen bei Mäusen kam es zu einem deutlichen Anstieg der pulmonalen Metastasen bei Adipositas (Mori et al., 2006). Obwohl die Versuchstiere im beschriebenen Experiment keine Symptome von Schmerzen oder Atemnot zeigten, ist davon auszugehen, dass beim krebserkrankten Menschen durch den schnelleren Krankheitsprogress mit einer verminderten Lebensqualität, Schmerzen, Atemnot und sicher auch mit einem kürzeren Gesamtüberleben zu rechnen wäre.

Unser Versuch gibt dabei Hinweise, dass die verstärkte Metastasierung nicht nur darauf zurückzuführen ist, dass die Tumorzellen eher ihre Ortsständigkeit verlieren, bzw. stärker hormonell stimuliert werden. Stattdessen werden die disseminierten

Tumorzellen bei Normalgewichtigen effektiver von der natürlichen Immunabwehr erkannt und eliminiert, indem NK-Zellen in das Lungengewebe immigrieren und sich auch statistisch häufiger an die Tumorzellen anlagern. Wichtig ist dabei nicht nur die zytotoxische Funktion durch direktes Anlagern, sondern auch die Ausschüttung von IFN- γ der tumornahen NK-Zellen, die zu einer Induzierung von (M1-) Makrophagen führt (Schoenborn und Wilson, 2007).

Laut der Arbeitsgruppe Fu et al. kann man beim Menschen funktionell zwischen zytotoxischen, regulativen und toleranten NK-Zellen unterscheiden (Fu et al., 2014). Die erste Gruppe, die zytotoxischen NK-Zellen, zeigen in der FACS-Analyse den Phänotyp CD56^{dim} und stellen die große Mehrzahl der im Blut befindlichen NK-Zellen dar. Diese Zellen besitzen die Möglichkeit andere Zellen, beispielsweise suspekter Tumorzellen, über bereits beschriebene Mechanismen (siehe 1.2.) zu erkennen und zu lysieren. Diese Gruppe der NK-Zellen besitzt jedoch nur begrenzt die Möglichkeit nach ihrer Aktivierung Zytokine oder Chemokine zu produzieren (Caligiuri, 2008). Die zweite Gruppe mit dem Phänotyp CD56^{bright}, auch als regulative NK-Zellen bezeichnet, bildet etwa 10 % der NK-Zellen im peripheren Blut und nahezu 100 % der NK-Zellen im sekundären lymphatischen Gewebe, beispielsweise Lymphknoten. Diese können zwar erkannte Zellen nicht lysieren, dafür aber große Mengen von Zytokinen und Chemokinen produzieren und damit entscheidend eine Immunreaktion beeinflussen (Caligiuri, 2008). Es bestehen Theorien, dass CD56^{bright}- und CD56^{dim}-Zellen aufeinanderfolgende Schritte in der Differenzierung von NK-Zellen darstellen (Romagnani et al., 2007). Die dritte Gruppe, die von Fu beschrieben wird, trägt auch hauptsächlich den Phänotyp CD56^{bright}, wird auch als DN-NK (double-negative-NK-Zellen, CD11b⁻ CD27⁻) bezeichnet und ist auf Grund von überwiegend inhibitorischen Oberflächenrezeptoren anderen Zellen gegenüber wenig reaktiv (Fu et al., 2011). Diese Zellen fanden sich auch im Tumorgewebe von Menschen mit nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, wobei die Präsenz und Anzahl dieser mit der Progression der Tumore in Zusammenhang gebracht werden konnte (Jin et al., 2013). DN-NK-Zellen beschreiben laut gegenwärtigem Forschungsstand ein frühes Stadium der NK-Zell-Reifung (Fu et al., 2011) und es ist noch unklar, warum diese vermehrt in bestimmten Tumoren vorkommen. Möglicherweise sind weiterentwickelte NK-Zellen empfindlicher gegenüber den Tumorzellen und die DN-NK-Zellen werden selektiert oder das Tumormikromilieu führt zur Induktion von NK-Zellen dieses unreifen Typs (Jin et al., 2013).

Künftige Studien könnten zeigen, inwiefern die einzelnen Subgruppen der NK-Zellen an dem verstärkten Wachstum der Metastasen bei den adipösen Versuchstieren beteiligt sind. Dabei wäre denkbar, dass sowohl die zytotoxischen, als auch die regulativen NK-Zellen eine Rolle spielen. Die verringerte Anzahl von NK-Zell-Tumorzell-Kontakten bei den adipösen Ratten könnte für eine veränderte Funktion der zytotoxischen NK-Zellen sprechen. Die verringerte Gesamtzahl der NK-Zellen in der Lunge der adipösen Ratten der Tumorgruppe könnte im Sinne einer ungenügenden Aktivierung einer Immunreaktion für eine Dysfunktion der regulativen NK-Zellen sprechen. Interessant wäre hierfür auch zu wissen, inwiefern sich die IFN- γ -Konzentration im Serum der Tiere verhält, was in zukünftigen Experimenten auch untersucht werden sollte.

Betrachtet man die Nicht-Tumor-Zellen um einen Tumor, spricht man von Tumor-Microenvironment. An dieser Umgebung sind verschiedene Zelltypen beteiligt, unter anderem Endothelzellen, Fibroblasten, Fettzellen und Immunzellen, wie Makrophagen, B- und T-Zellen und NK-Zellen (Albini und Sporn, 2007). Besonders bedeutend scheinen dabei die Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM's) zu sein, die die Initiation und das Wachstum des Tumors fördern (Quatromoni und Eruslanov, 2012) und zu der Tumormetastasierung beitragen (Siveen und Kuttan, 2009). NK-Zellen, die in den Tumor infiltrieren (beispielsweise DN-NK-Zellen) bzw. an ihm assoziiert sind, werden auch als TINK (tumor-infiltrating NK) bzw. TANK (tumor-associated NK) bezeichnet (Bruno et al., 2014). Die zytotoxische Funktion der TINK wird dabei durch verschiedene Mechanismen von den Tumorzellen und dem Tumor-Mikromilieu unterdrückt (Vitale et al., 2014). Studien weisen zudem darauf hin, dass diese Zellen fördernd auf die Tumor-Angiogenese wirken, indem sie VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und PlGF (Placental Growth Factor) produzieren (Bruno et al., 2013). Da TINK's, beziehungsweise TANK's, mit einer Tumorprogression in Zusammenhang gebracht werden, stellen NK-Zellen an dieser Stelle einen wichtigen Ansatzpunkt für eine therapeutische Intervention dar (Bruno et al., 2014). Die Funktionen der NK-Zellen im Tumor-Microenvironment sind nicht näher bekannt, möglicherweise gibt es Wechselwirkungen zwischen den TAM's und NK-Zellen, was einen weiteren wichtigen Angriffspunkt für die zukünftige Forschung darstellen sollte.

Bei der immunhistochemischen Untersuchung der Lungen ergab sich, dass die normalgewichtigen Tiere deutlich mehr Tumorzellen im untersuchten Lungengewebe aufwiesen. Dies lässt sich möglicherweise darüber erklären, dass es bei adipösen Individuen zu einer verlangsamten Tumorzell-Immigrationsdauer kommt. Die

Geschwindigkeit der Ansiedelung einer Zelle wird dabei hauptsächlich durch Adhäsions-Rezeptoren (beispielsweise Integrine) und deren Wechselwirkung mit Liganden in der Extrazellulären Matrix bestimmt (Palecek et al., 1997). In folgenden Experimenten sollte die Tumor-Zellzahl auch in anderen Kompartimenten, wie dem Blut, gemessen werden, um von der Verteilung der Tumorzellen nach Injektion ein besseres Bild zu erlangen.

In unterschiedlichen publizierten Studien, sowie auch bei unserem Experiment, wurde die Anzahl der einzelnen NK-Zell-Subpopulationen, sowie anderer Lymphozyten im peripheren Blut untersucht. Anders als in diesem Versuch, wo der Anstieg zwar vorhanden war, aber nur gering ausfiel und nicht signifikant war, stieg bei anderen Experimenten die NK-Zell-Zahl nach Tumorzellinjektion deutlich an (Shingu et al., 2002). Dies würde auch gut zu der erhöhten NK-Zellzahl in der Lunge 15 Minuten nach Tumorzellinjektion im Sinne einer Mobilisierung dieser Immunzellen in die tumorbefallenen Lungen passen.

Die Kontrolltiere ohne Tumorzellkontakt (DIO und normalgewichtig) zeigten in unserem Experiment etwa gleich viele NK-Zellen im peripheren Blut. Studien beim Menschen zeigten zum Teil, dass es durch Adipositas nicht direkt zu einer Veränderung der NK-Zellzahl im Blut kommt (Nieman et al., 1999), zum Teil fand man bei den Adipösen mehr NK-Zellen (Iorio et al., 2006).

Unsere Versuchstiere waren nach der 6-wöchigen Futterperiode 5 % schwerer, bzw. nach der 10-wöchigen 7 % schwerer als die Kontrolltiere. Vergleicht man dies mit einer Person der Größe von 1,75 m und einem Gewicht von 76,5 kg (BMI = 24,9 kg/m², oberes Normalgewicht) bzw. einem Gewicht von 92 kg (BMI = 30 kg/m², untere Grenze Adipositas) fällt auf, dass beim Menschen der Gewichtsunterschied zwischen Adipositas und Normalgewicht laut WHO-Definition (siehe 1.1.) mindestens 20 % beträgt.

Da es trotz des vergleichsweise (zum adipösen Menschen) geringen Gewichtsunterschiedes zwischen DIO- und Kontrolltieren erhebliche Differenzen bei der NK-Zell Zahl und Funktion im Lungengewebe, sowie der Ausprägung der Oberflächenmetastasen nach 3 Wochen gab, kann man davon ausgehen, dass bei diesem Modell nicht nur der reine Gewichtsunterschied entscheidend ist, sondern vordergründig die Zusammensetzung der Nahrung, sowie die Qualität und Quantität des subkutanen und viszeralen Fettes. In den großen epidemiologischen Studien konnten auch innerhalb des Normalgewichts beim Menschen Unterschiede bezüglich des Tumorrisikos

festgestellt werden (Calle und Kaaks, 2004). Andere Studien zeigten, dass sich auch das kardiovaskuläre Risiko im BMI-Bereich 20–24,9 kg/m² verändert, was als „normal weight obesity“ bezeichnet wurde (Romero-Corral et al., 2010). Bei der Untersuchung von normalgewichtigen, gesunden Menschen fand sich bei jenen, die einen höheren Körperfettanteil (BF %) besaßen, ein höheres Herz-Kreislauf Risiko (Kim et al., 2013). Der prozentuale Körperfettanteil scheint also dicht mit dem Auftreten von Folgeerkrankungen zu korrelieren. Bei den verschiedenen epidemiologischen Studien, die sich mit dem Risikofaktor Adipositas beschäftigen, wird trotzdem vordergründig der BMI als Surrogatparameter für das Körperfett eingesetzt, da die direkte Quantifizierung von viszeralen und subkutanen Fett (z. B. via Unterwasser-Wiegen, MRT, CT) sehr teuer und aufwendig ist und günstige Methoden wie die Bioimpedanz wenig valide sind (Goodpaster, 2002; Elia, 2013).

Anzumerken ist auch, dass selbst innerhalb der Spezies Mensch deutliche Unterschiede bezüglich eines BMI vorliegen, ab dem Adipositas-typische Veränderungen wie Insulinresistenz oder ein erhöhtes Herz-Kreislauf Risiko vorliegen. Dies scheint darauf zurückzuschließen zu sein, dass bei manchen ethnischen Gruppen (z. B. Indonesiern oder Chinesen) der Körperfettanteil (BF %), verglichen mit der europäischen und amerikanischen weißen Bevölkerung, durchschnittlich schon bei niedrigeren BMI Werten ansteigt (Cheng, 2003; Deurenberg-Yap und Deurenberg, 2003).

Auf den vermuteten Pathomechanismus der Leptin-Resistenz von NK-Zellen wurde bereits unter 1.4. eingegangen. Interessant wäre hierbei, inwiefern die Leptin-Resistenz mehr vom BF % als vom BMI abhängt und ob es auch bei normalgewichtigen mit hohem BF % zu einer NK-Zell-Funktionsstörung kommt.

Bezüglich des durchgeführten Experiments sind Limitationen zu nennen. Die Differenzierung des Phänotyps der NK-Zellen in der Lunge kann noch spezifischer erfolgen, beispielsweise über sog. „single cell isolation“ mit nachfolgender FACS Analyse der gewonnenen Zellen (Rocca et al., 2013) oder Immunhistochemie unter Nutzung weiterer Marker (z. B. PEN5 (Vivier et al., 1995) oder CD16). Dies stellt auch einen Ansatzpunkt für nachfolgende Studien dar.

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass es bei veränderter Nahrungszusammensetzung und Veränderung des Körpergewichtes bei diät-induziert adipösen Ratten zu einer NK-Zell-Funktionsstörung kommt, die zu einem forcierten Wachstum von Tumormetastasen führt. Dies ist eine Grundlage für tierexperimentelle Interventionsstudien, beispielsweise über die Aktivierung von NK-Zellen und eine Basis

für klinische Studien. So stellt sich beispielsweise auch die Frage, ob bestimmte adipöse Tumorpatienten (z. B. Brustkrebspatientinnen mit starker Adipositas) von den immunologischen Effekten einer energiearmen Diät profitieren könnten.

5. Zusammenfassung

Adipositas und ihre Folgeerkrankungen stellen in Deutschland und der Welt eines der größten Gesundheitsprobleme dar. Als eine dieser Folgeerkrankungen manifestiert sich die Entwicklung von bösartigen Tumoren, wobei die genaueren Mechanismen der Krebsentwicklung bei Adipositas noch unklar sind. Ein Faktor könnte dabei eine Funktionsstörung von Natürlichen Killer (NK)-Zellen darstellen. NK-Zellen gehören zu den Zellen des angeborenen Immunsystems und können Tumorzellen über verschiedene Oberflächenrezeptoren erkennen, sich an diese anlagern und sie abtöten.

An 64 diät-induziert adipösen und normalgewichtigen Fischer-344 Ratten wurden die kurz- und langfristigen Effekte auf die NK-Zellzahl im Lungengewebe nach Injektion von MADB 106 Tumorzellen untersucht. MADB 106 Tumorzellen sind Adenokarzinom-Zellen, die aus Lungenmetastasen eines Mammakarzinoms bei weiblichen F344 Ratten gewonnen wurden. Dafür erhielten die Tiere vor den Versuchen für 6–10 Wochen eine hochkalorische Nahrung zur Induktion einer Adipositas bzw. eine niedrigkalorische Kontrolldiät.

Um zu untersuchen ob es bei den adipösen Tieren zu Veränderungen des Mechanismus der Mobilisierung der Immunzellen in das betroffene Organ, sowie der Anlagerung an die Tumorzellen kommt, wurden 15 min nach der Injektion der Tumorzellen in die Schwanzvene der Ratten die Lungen entnommen, kryokonserviert und immunhistochemisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass die adipösen Tiere weniger NK-Zellen im tumorbefallenen Lungengewebe zeigten, sowie weniger Interaktionen zwischen Tumor- und NK-Zellen. Dies ist als Einschränkung der NK-Zell Aktivität zu werten, da somit mehr Tumorzellen der Lyse durch diese entkommen und so mehr Metastasen heranwachsen können.

Um zu untersuchen, ob es wirklich zur Entwicklung von mehr oberflächlichen Lungenmetastasen bei adipösen Ratten kommt, wurde der Versuch wiederholt und die Lungen erst 21 Tage nach der Injektion der Tumorzellen entnommen. Dabei zeigte sich eine deutlich größere Zahl von oberflächlichen Lungenmetastasen bei den adipösen Tieren im Vergleich zu den normalgewichtigen Kontrolltieren.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass es bei diät-induziert adipösen Ratten zu einer NK-Zell Funktionsstörung kommt, die zu einem verstärkten Wachstum von Tumormetastasen führt.

6. Literaturverzeichnis

- Albini A., Sporn M. B. (2007) The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer* 7(2): 139-147.
- Allavena P., Bianchi G., et al. (1996) Regulation of adhesion and transendothelial migration of natural killer cells. *Nat Immunol* 15(2-3): 107-116.
- Aune D., Chan D. S., et al. (2011) Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ* 343: d6617.
- Avni R., Cohen B., et al. (2011) Hypoxic stress and cancer: imaging the axis of evil in tumor metastasis. *NMR Biomed* 24(6): 569-581.
- Barlozzari T., Reynolds C. W., et al. (1983) In vivo role of natural killer cells: involvement of large granular lymphocytes in the clearance of tumor cells in anti-asialo GM1-treated rats. *J Immunol* 131(2): 1024-1027.
- Barone J., Hebert J. R., et al. (1989) Dietary fat and natural-killer-cell activity. *Am J Clin Nutr* 50(4): 861-867.
- Behrendt P., Buchenauer T., et al. (2010) Diet-induced obesity, exogenous leptin-, and MADB106 tumor cell challenge affect tissue leukocyte distribution and serum levels of cytokines in F344 rats. *Endocrine* 38(1): 104-112.
- Berrington de Gonzalez A., Hartge P., et al. (2010) Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *N Engl J Med* 363(23): 2211-2219.
- Bianchini F., Kaaks R., et al. (2002) Overweight, obesity, and cancer risk. *Lancet Oncol* 3(9): 565-574.
- Bingham S., Riboli E. (2004) Diet and cancer--the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Nat Rev Cancer* 4(3): 206-215.
- Blank S. E., Meadows G. G. (1996) Ethanol modulates metastatic potential of B16BL6 melanoma and host responses. *Alcohol Clin Exp Res* 20(4): 624-628.
- Bruno A., Ferlazzo G., et al. (2014) A think tank of TINK/TANKs: tumor-infiltrating/tumor-associated natural killer cells in tumor progression and angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 106(8): dju200.
- Bruno A., Focaccetti C., et al. (2013) The proangiogenic phenotype of natural killer cells in patients with non-small cell lung cancer. *Neoplasia* 15(2): 133-142.

- Brusilovsky M., Rosental B., et al. (2012) Human NK cell recognition of target cells in the prism of natural cytotoxicity receptors and their ligands. *J Immunotoxicol* 9(3): 267-274.
- Buchenauer T., Behrendt P., et al. (2009) Diet-induced obesity alters behavior as well as serum levels of corticosterone in F344 rats. *Physiol Behav* 98(5): 563-569.
- Caligiuri M. A. (2008) Human natural killer cells. *Blood* 112(3): 461-469.
- Calle E. E., Kaaks R. (2004) Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 4(8): 579-591.
- Calle E. E., Rodriguez C., et al. (2003) Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 348(17): 1625-1638.
- Cameron M. D., Schmidt E. E., et al. (2000) Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res* 60(9): 2541-2546.
- Chambers A. F., Groom A. C., et al. (2002) Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2(8): 563-572.
- Chang S. H., Pollack L. M., et al. (2013) Obesity, mortality, and life years lost associated with breast cancer in nonsmoking US Women, National Health Interview Survey, 1997-2000. *Prev Chronic Dis* 10: E186.
- Cheng M., Chen Y., et al. (2013) NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol* 10(3): 230-252.
- Cheng T. O. (2003) Lower body mass index cut-off values for obesity in China. *Nutr Rev* 61(12): 432; author reply 432-433.
- Coca S., Perez-Piqueras J., et al. (1997) The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 79(12): 2320-2328.
- Colditz G. A., Willett W. C., et al. (1995) Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. *Ann Intern Med* 122(7): 481-486.
- Croce C. M. (2008) Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 358(5): 502-511.
- Dalton S. O., Mellekjaer L., et al. (2002) Depression and cancer risk: a register-based study of patients hospitalized with affective disorders, Denmark, 1969-1993. *Am J Epidemiol* 155(12): 1088-1095.
- de Gruijl F. R. (1999) Skin cancer and solar UV radiation. *Eur J Cancer* 35(14): 2003-2009.

- de Kruijf E. M., Sajet A., et al. (2012) NKG2D ligand tumor expression and association with clinical outcome in early breast cancer patients: an observational study. *BMC Cancer* 12: 24.
- De Vriendt T., Moreno L. A., et al. (2009) Chronic stress and obesity in adolescents: scientific evidence and methodological issues for epidemiological research. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 19(7): 511-519.
- Deurenberg-Yap M., Deurenberg P. (2003) Is a re-evaluation of WHO body mass index cut-off values needed? The case of Asians in Singapore. *Nutr Rev* 61(5 Pt 2): S80-87.
- Deutsche Adipositas-Gesellschaft, Deutsche Diabetes Gesellschaft, et al. (2014) S3 Leitlinie: „Prävention und Therapie der Adipositas“. Gültig vom 30.04.2014 bis 30.04.2019. Abgerufen am 06.10.2015.
http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/050-0011_S3_Adipositas_Pr%C3%A4vention_Therapie_2014-11.pdf
- Deutsches Bundesamt für Statistik (2013) Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2013. Abgerufen am 06.10.2015.
https://http://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400137004.pdf?__blob=publicationFile
- Dixit V. D. (2008) Adipose-immune interactions during obesity and caloric restriction: reciprocal mechanisms regulating immunity and health span. *J Leukoc Biol* 84(4): 882-892.
- Dorresteyn J. A., Visseren F. L., et al. (2012) Mechanisms linking obesity to hypertension. *Obes Rev* 13(1): 17-26.
- Dovio A., Caramello V., et al. (2004) Natural killer cell activity and sensitivity to positive and negative modulation in uncomplicated obese subjects: relationships to leptin and diet composition. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28(7): 894-901.
- Dubow J., Fink M. E. (2011) Impact of hypertension on stroke. *Curr Atheroscler Rep* 13(4): 298-305.
- Dunn G. P., Old L. J., et al. (2004) The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22: 329-360.
- Elia M. (2013) Body composition by whole-body bioelectrical impedance and prediction of clinically relevant outcomes: overvalued or underused? *Eur J Clin Nutr* 67 Suppl 1: S60-70.

- Ewertz M., Jensen M. B., et al. (2011) Effect of obesity on prognosis after early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 29(1): 25-31.
- Finucane M. M., Stevens G. A., et al. (2011) National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet* 377(9765): 557-567.
- Friedl P., Alexander S. (2011) Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell* 147(5): 992-1009.
- Frumovitz M., Jhingran A., et al. (2014) Morbid obesity as an independent risk factor for disease-specific mortality in women with cervical cancer. *Obstet Gynecol* 124(6): 1098-1104.
- Fu B., Tian Z., et al. (2014) Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. *Immunology* 141(4): 483-489.
- Fu B., Wang F., et al. (2011) CD11b and CD27 reflect distinct population and functional specialization in human natural killer cells. *Immunology* 133(3): 350-359.
- Gasic G. J., Gasic T. B., et al. (1968) Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61(1): 46-52.
- Glade M. J. (1999) Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, 1997. *Nutrition* 15(6): 523-526.
- Goodpaster B. H. (2002) Measuring body fat distribution and content in humans. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5(5): 481-487.
- Gregoire C., Chasson L., et al. (2007) The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev* 220: 169-182.
- Hanahan D., Weinberg R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57-70.
- Howe L. R., Subbaramaiah K., et al. (2013) Molecular pathways: adipose inflammation as a mediator of obesity-associated cancer. *Clin Cancer Res* 19(22): 6074-6083.
- Imai K., Matsuyama S., et al. (2000) Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 356(9244): 1795-1799.
- Iorio R., Sepe A., et al. (2006) Immune phenotype and serum leptin in children with obesity-related liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 91(1): 341-344.

- Ishigami S., Natsugoe S., et al. (2000) Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 88(3): 577-583.
- Jahn J., Spielau M., et al. (2015) Decreased NK cell functions in obesity can be reactivated by fat mass reduction. *Obesity (Silver Spring)*: 2233-2241.
- Jain S., Harris J., et al. (2010) Platelets: linking hemostasis and cancer. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(12): 2362-2367.
- Jamal M. M., Morgan T. R. (2003) Liver disease in alcohol and hepatitis C. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17(4): 649-662.
- Jin J., Fu B., et al. (2013) CD11b(-)CD27(-) NK cells are associated with the progression of lung carcinoma. *PLoS One* 8(4): e61024.
- Kagi D., Ledermann B., et al. (1994) Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369(6475): 31-37.
- Kanasaki K., Koya D. (2011) Biology of obesity: lessons from animal models of obesity. *J Biomed Biotechnol* 2011: 197636.
- Karpe F., Dickmann J. R., et al. (2011) Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation. *Diabetes* 60(10): 2441-2449.
- Katsiki N., Ntaios G., et al. (2011) Stroke, obesity and gender: a review of the literature. *Maturitas* 69(3): 239-243.
- Kenemans P., Bosman A. (2003) Breast cancer and post-menopausal hormone therapy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 17(1): 123-137.
- Khan I. A., Thomas S. Y., et al. (2006) CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection. *PLoS Pathog* 2(6): e49.
- Kim J. K. (2006) Fat uses a TOLL-road to connect inflammation and diabetes. *Cell Metabolism* 4(6): 417-419.
- Kim J. Y., Han S. H., et al. (2013) Implication of high-body-fat percentage on cardiometabolic risk in middle-aged, healthy, normal-weight adults. *Obesity (Silver Spring)* 21(8): 1571-1577.
- Kim M. Y., Oskarsson T., et al. (2009) Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell* 139(7): 1315-1326.
- Kim W. G., Park J. W., et al. (2013) Diet-induced obesity increases tumor growth and promotes anaplastic change in thyroid cancer in a mouse model. *Endocrinology* 154(8): 2936-2947.
- Krzewski K., Strominger J. L. (2008) The killer's kiss: the many functions of NK cell immunological synapses. *Curr Opin Cell Biol* 20(5): 597-605.

- Kurukulasuriya L. R., Stas S., et al. (2011) Hypertension in obesity. *Med Clin North Am* 95(5): 903-917.
- Lamas B., Nachat-Kappes R., et al. (2015) Dietary fat without body weight gain increases in vivo MCF-7 human breast cancer cell growth and decreases natural killer cell cytotoxicity. *Molecular Carcinogenesis* 54(1): 58-71.
- Laue T., Wrann C., et al. (2015) Altered NK cell function in obese healthy humans. *BMC Obesity* 2(1): 1-10.
- Lautenbach A., Budde A., et al. (2009) Obesity and the associated mediators leptin, estrogen and IGF-I enhance the cell proliferation and early tumorigenesis of breast cancer cells. *Nutr Cancer* 61(4): 484-491.
- Lautenbach A., Wrann C. D., et al. (2009) Altered phenotype of NK cells from obese rats can be normalized by transfer into lean animals. *Obesity (Silver Spring)* 17(10): 1848-1855.
- Lavie C. J., Milani R. V., et al. (2009) Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss. *J Am Coll Cardiol* 53(21): 1925-1932.
- Leung C. C., Lam T. H., et al. (2011) Lower lung cancer mortality in obesity. *Int J Epidemiol* 40(1): 174-182.
- Luzzi K. J., MacDonald I. C., et al. (1998) Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 153(3): 865-873.
- Macia L., Delacre M., et al. (2006) Impairment of dendritic cell functionality and steady-state number in obese mice. *J Immunol* 177(9): 5997-6006.
- Mori A., Sakurai H., et al. (2006) Severe pulmonary metastasis in obese and diabetic mice. *Int J Cancer* 119(12): 2760-2767.
- Morris E. C., Bendle G. M., et al. (2003) Prospects for immunotherapy of malignant disease. *Clin Exp Immunol* 131(1): 1-7.
- Moulin C. M., Marguti I., et al. (2011) Bariatric surgery reverses natural killer (NK) cell activity and NK-related cytokine synthesis impairment induced by morbid obesity. *Obes Surg* 21(1): 112-118.
- Nagarajan V., Gopalan V., et al. (2013) Cardiac function and lipid distribution in rats fed a high-fat diet: in vivo magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 304(11): H1495-1504.
- Nave H., Beutel G., et al. (2011) Obesity-related immunodeficiency in patients with pandemic influenza H1N1. *Lancet Infect Dis* 11(1): 14-15.

- Nave H., Mueller G., et al. (2008) Resistance of Janus kinase-2 dependent leptin signaling in natural killer (NK) cells: a novel mechanism of NK cell dysfunction in diet-induced obesity. *Endocrinology* 149(7): 3370-3378.
- Nave H., von Hoersten S., et al. (1998) Intravenous cannulation of the freely behaving rat: frequent blood sampling and volume-dependent effect on blood leukocyte counts. *J Exp Anim Sci* 39: 67-77.
- Ng S. F., Lin R. C., et al. (2010) Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* 467(7318): 963-966.
- Nieman D. C., Henson D. A., et al. (1999) Influence of obesity on immune function. *J Am Diet Assoc* 99(3): 294-299.
- Nieswandt B., Hafner M., et al. (1999) Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res* 59(6): 1295-1300.
- Palecek S. P., Loftus J. C., et al. (1997) Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature* 385(6616): 537-540.
- Palmer G., Aurrand-Lions M., et al. (2006) Indirect effects of leptin receptor deficiency on lymphocyte populations and immune response in db/db mice. *J Immunol* 177(5): 2899-2907.
- Park H., Kim M., et al. (2012) A high-fat diet increases angiogenesis, solid tumor growth, and lung metastasis of CT26 colon cancer cells in obesity-resistant BALB/c mice. *Mol Carcinog* 51(11): 869-880.
- Park Y., Hunter D. J., et al. (2005) Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies. *JAMA* 294(22): 2849-2857.
- Patel A. V., Rodriguez C., et al. (2005) Obesity, recreational physical activity, and risk of pancreatic cancer in a large U.S. Cohort. *CEBP* 14(2): 459-466.
- Pollak M. (2012) The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nat Rev Cancer* 12(3): 159-169.
- Popkin B. M. (2007) Understanding global nutrition dynamics as a step towards controlling cancer incidence. *Nat Rev Cancer* 7(1): 61-67.
- Powell A., Teichtahl A. J., et al. (2005) Obesity: a preventable risk factor for large joint osteoarthritis which may act through biomechanical factors. *BJSM* 39(1): 4-5.
- Quatromoni J. G., Eruslanov E. (2012) Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *Am J Transl Res* 4(4): 376-389.

- Redon J. (2001) Hypertension in obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 11(5): 344-353.
- Rivera-Guevara C., Camacho J. (2011) Tamoxifen and its new derivatives in cancer research. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 6(2): 237-245.
- RKI (2012) Robert Koch Institut - Zentrum für Krebsregisterdaten: Krebs in Deutschland 2007/2008 8. Ausgabe, 2012. Abgerufen am 06.10.2015.
http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2012.pdf?__blob=publicationFile
- Rocca Y. S., Roberti M. P., et al. (2013) Altered phenotype in peripheral blood and tumor-associated NK cells from colorectal cancer patients. *Innate Immunity* 19(1): 76-85.
- Romagnani C., Juelke K., et al. (2007) CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol* 178(8): 4947-4955.
- Romero-Corral A., Somers V. K., et al. (2010) Normal weight obesity: a risk factor for cardiometabolic dysregulation and cardiovascular mortality. *Eur Heart J* 31(6): 737-746.
- Schoenborn J. R., Wilson C. B. (2007) Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 96: 41-101.
- Screpanti V., Wallin R. P., et al. (2001) A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells. *J Immunol* 167(4): 2068-2073.
- Shingu K., Helfritz A., et al. (2002) Kinetics of the early recruitment of leukocyte subsets at the sites of tumor cells in the lungs: natural killer (NK) cells rapidly attract monocytes but not lymphocytes in the surveillance of micrometastasis. *Int J Cancer* 99(1): 74-81.
- Shingu K., Helfritz A., et al. (2003) CD26 expression determines lung metastasis in mutant F344 rats: involvement of NK cell function and soluble CD26. *Cancer Immunol Immunother* 52(9): 546-554.
- Simon G. E., Arterburn D., et al. (2011) Obesity, depression, and health services costs among middle-aged women. *J Gen Intern Med* 26(11): 1284-1290.
- Siveen K. S., Kuttan G. (2009) Role of macrophages in tumour progression. *Immunol Lett* 123(2): 97-102.
- Sleeman J. P., Nazarenko I., et al. (2011) Do all roads lead to Rome? Routes to metastasis development. *Int J Cancer* 128(11): 2511-2526.

- Smyth M. J., Hayakawa Y., et al. (2002) New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2(11): 850-861.
- Sobolev O., Stern P., et al. (2009) Natural killer cells require selectins for suppression of subcutaneous tumors. *Cancer Res* 69(6): 2531-2539.
- Street S. E., Cretney E., et al. (2001) Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* 97(1): 192-197.
- Stunkard A. J., Harris J. R., et al. (1990) The body-mass index of twins who have been reared apart. *N Engl J Med* 322(21): 1483-1487.
- Suzuki H., Okihara K., et al. (2008) Alternative nonsteroidal antiandrogen therapy for advanced prostate cancer that relapsed after initial maximum androgen blockade. *J Urol* 180(3): 921-927.
- Torok S., Hegedus B., et al. (2011) Lung cancer in never smokers. *Future Oncology* 7(10): 1195-1211.
- Uhr J. W., Pantel K. (2011) Controversies in clinical cancer dormancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(30): 12396-12400.
- Vetter C. S., Groh V., et al. (2002) Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma. *J Invest Dermatol* 118(4): 600-605.
- Villegas F. R., Coca S., et al. (2002) Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* 35(1): 23-28.
- Vitale M., Cantoni C., et al. (2014) Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur J Immunol* 44(6): 1582-1592.
- Vivier E., Munroe M., et al. (1995) Identification of tissue-infiltrating lymphocytes expressing PEN5, a mucin-like glycoprotein selectively expressed on natural killer cells. *Am J Pathol* 146(2): 409-418.
- Vivier E., Tomasello E., et al. (2008) Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9(5): 503-510.
- von Horsten S., Helfritz A., et al. (2000) Stereological quantification of carboxyfluorescein-labeled rat lung metastasis: a new method for the assessment of natural killer cell activity and tumor adhesion in vivo and in situ. *J Immunol Methods* 239(1-2): 25-34.
- Walzer T., Dalod M., et al. (2005) Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 106(7): 2252-2258.

- Wang X., Hunter D., et al. (2015) Metabolic triggered inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 23(1): 22-30.
- Weston S. A., Parish C. R. (1990) New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *J Immunol Methods* 133(1): 87-97.
- WHO (2011) Germany: health profile. Abgerufen am 06.10.2015.
<http://www.who.int/countries/deu/en/>
- WHO (2012) Global Health Observatory (GHO): Overweight- Situation and trends. Abgerufen am 06.10.2015.
http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_text/en/
- Wing E. J., Stanko R. T., et al. (1983) Fasting-enhanced immune effector mechanisms in obese subjects. *Am J Med* 75(1): 91-96.
- Woodward E. J., Coleman R. E. (2010) Prevention and treatment of bone metastases. *Curr Pharm Des* 16(27): 2998-3006.
- Yang Q., Goding S. R., et al. (2006) Antitumor activity of NK cells. *Immunol Res* 36(1-3): 13-25.
- Zhang X., Zhou G., et al. (2015) Impact of obesity upon prostate cancer-associated mortality: A meta-analysis of 17 cohort studies. *Oncol Lett* 9(3): 1307-1312.
- Zuckerman V., Wolyniec K., et al. (2009) Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *J Pathol* 219(1): 3-15.
- Zyromski N. J., Mathur A., et al. (2009) Obesity potentiates the growth and dissemination of pancreatic cancer. *Surgery* 146(2): 258-263.

7. Thesen

1. Adipöse Menschen haben ein größeres Risiko an bestimmten Tumorentitäten zu erkranken.
2. Bei tumor erkrankten adipösen Menschen kommt es zu einem verstärkten Tumorwachstum, einer vermehrten Metastasierung und einer erhöhten Mortalität.
3. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) spielen beim Prozess der Tumor- und Metastasen-Bekämpfung eine wichtige Rolle.
4. Bei adipösen Menschen kommt es zu einer Dysfunktion von NK-Zellen.
5. Die vorliegende Arbeit soll untersuchen, inwieweit die Dysfunktion von NK-Zellen bei adipösen F344-Ratten zu einer vermehrten Lungenmetastasierung führt.
6. Im kurzen Zeitintervall (15 Minuten) nach Injektion von MADB 106-Tumorzellen war die Migration von NK-Zellen in die Lunge der adipösen Versuchstiere gestört. Es finden sich signifikant weniger NK-Zellen als bei normalgewichtigen Kontrolltieren.
7. Im kurzen Zeitintervall (15 Minuten) nach Injektion von Tumorzellen ist die Häufigkeit der Interaktion zwischen NK- und Tumorzellen im Lungengewebe der adipösen Versuchstiere verändert. Es finden sich signifikant weniger NK-Zell-Tumorzell-Interaktionen als bei normalgewichtigen Kontrolltieren.
8. Im kurzen Zeitintervall (15 Minuten) nach Injektion von Tumorzellen ist die Zahl der Tumorzellen im Lungengewebe der adipösen Versuchstiere signifikant verändert.
9. Im langen Zeitintervall (3 Wochen) nach Injektion von Tumorzellen ist die Zahl der Lungenmetastasen bei adipösen Tieren signifikant erhöht.
10. Die tierexperimentellen Daten der vorliegenden Arbeit sind eine wichtige Grundlage für weitere Untersuchungen der gestörten Tumorabwehr durch NK-Zellen bei adipösen Individuen.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Hanke, John
Geburtsdatum- / Ort: 09.01.1990
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulische Ausbildung

1996–2000 Besuch der Grundschule Rückmarsdorf (Leipzig)
2000–2008 Besuch des Robert Schumann Gymnasiums (Leipzig)

Zivildienst

10/2008–06/2009 Diakonissenkrankenhaus Leipzig

Hochschul-Ausbildung

seit 10/2009 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-
Universität Halle Wittenberg
03/2015–06/2015 Auslandsaufenthalt Universität Zürich (PJ-Tertial)

Praktisches Jahr

11/2014–03/2015 Universitätsklinikum Halle (Saale),
Klinik für Mund-, Kiefer- und
plastische Gesichtschirurgie
03/2015–06/2015 Zuger Kantonsspital (Schweiz),
Chirurgische Klinik
06/2015–10/2015 Elisabeth Krankenhaus Halle (Saale),
Medizinische Klinik I (Gastroenterologie,
Nephrologie)

Selbstständigkeitserklärung

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel: „Adipöse F344 Ratten zeigen eine NK-Zell Dysfunktion und vermehrtes Tumorwachstum“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die Arbeit ist bisher weder im In - noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungskommission vorgelegt worden.

Halle an der Saale,

Erklärung über frühere Promotionsversuche

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

Halle an der Saale,

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen, die mir bei der Realisierung dieser Arbeit geholfen haben, herzlich bedanken.

Für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Beratung, die Begleitung zu den Kongressen und die Motivation danke ich sehr Frau Professor Heike Kielstein, Leiterin des Instituts für Anatomie und Zellbiologie. Ihre ruhige, kompetente und stets gut gelaunte Art wird mir dabei immer ein Vorbild sein.

Für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit und die Hilfe bei der praktischen Durchführung der Arbeit danke ich Frau Doktor Julia Spielmann.

Dorle Knauf danke ich für die gute Kooperation bei der Betreuung der Tiere und die Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

Für die Anfertigung der Gewebeschnitte und methodische Unterstützung danke ich Frau Franziska Knöfel.

Außerdem danke ich Frau Susanne Kuhlmann für die Einführung in die Methodik.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich immer unterstützt hat.