

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

Direktorin: Prof. Dr. med. Heike Kielstein

Der Einfluss von Adipositas bei p38- und extracellular signal-regulated kinase 1/2-
vermittelten Immunreaktionen in der Tumor-Azidose -
Eine Pilotstudie an humanen Immunzellen männlicher Probanden

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

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

von Moritz Breitling
geboren am 08.09.1989 in Halle (Saale)

Gutachterin/Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Heike Kielstein
2. Prof. Dr. med. Patrick Michl
3. Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Müller-Klieser (Mainz)

12.07.2016

19.05.2017

Referat

Adipositas ist ein von steigender Prävalenz gekennzeichnetes, weltweites Gesundheitsproblem, welches mit diversen malignen Tumoren vergesellschaftet ist. Das Tumorgewebe weist ein von regelrecht differenzierten Gewebe abweichendes Mikromilieu auf, für das auch die extrazelluläre Azidose charakteristisch ist. Es wurde bereits gezeigt, dass das azidotische Milieu in Tumoren für die Prognose entscheidende Bedeutung haben könnte. MAPKs (mitogen-activated proteinkinases) spielen eine zentrale Rolle in vielen zellulären Funktionen, wie Proliferation, Genexpression und Differenzierung. Wichtige Vertreter dieser Proteinkinasen stellen p38 und ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2) dar. Die genaue Rolle der p38- und ERK1/2-MAPKs in PBMC (peripheral blood mononuclear cells) in einem tumor-azidotischen Mikromilieu ist bisher noch nicht vollständig bekannt. Daher war das Ziel der vorliegenden In-vitro-Studie, den Einfluss von Adipositas und einer extrazellulären Tumor-Azidose auf die p38- und ERK1/2-Expressionen zu untersuchen. Außerdem sollte analysiert werden, ob unter anderem in Bezug auf die Lebensbedingungen und -gewohnheiten, Unterschiede zwischen den Gruppen auszumachen sind. Den Probanden wurde Vollblut entnommen, welches weiterführend aufbereitet wurde, um die PBMC zu isolieren. Aus diesen wurde im Rahmen etablierter Laboruntersuchungen, wie Gelelektrophoresen und Western Blots, die Expressionen der p38- und ERK1/2-MAPKs bestimmt. Zudem erfolgte eine Befragung der Probanden. Diese zeigte allerdings keine bedeutsamen Differenzen.

Bezüglich der genannten Proteinkinasen konnte für die Aktivierbarkeit der p38-MAPK in einem physiologischen pH-Milieu, ein statistisch signifikanter Unterschied im Sinne einer erhöhten Expression bei den adipösen Männern, festgestellt werden. Eine entsprechende Tendenz zeigte sich auch bei einem azidotischen pH-Wert, die jedoch knapp das Signifikanzniveau verfehlte. Dies lässt eine gesteigerte Aktivierbarkeit von p38, unabhängig vom untersuchten pH-Unterschied, bei Adipösen vermuten.

Diese Studie weist somit auf eine möglicherweise verstärkte Bedeutung des p38-Signalweges in PBMC adipöser Männer hin. Eine Beeinflussung p38-vermittelter Inflammationsreaktionen durch Adipositas, unter physiologischen und azidotischen pH-Bedingungen, wäre somit denkbar. Dies könnte vielfältige Bedeutung bei der Modulation inflammatorischer Reaktionen und der Tumorabwehr bei Adipösen haben. Um diese Hinweise zu konkretisieren, sollten weiterführende Studien mit PBMC-Subpopulationen durchgeführt werden.

Breitling, Moritz: Der Einfluss von Adipositas bei p38- und extracellular signal-regulated kinase 1/2-vermittelten Immunreaktionen in der Tumor-Azidose - Eine Pilotstudie an humanen Immunzellen männlicher Probanden, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 74 Seiten, 2016

	Inhaltsverzeichnis	Seite
	Inhaltsverzeichnis	I
	Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	III
1	Einleitung	1
1.1	Adipositas	1
1.2	Risikofaktoren für die Pathogenese von Karzinomen	2
1.3	Tumormikromilieu	5
1.4	NK-Zellen - Vertreter der PBMC	7
1.5	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen	10
1.5.1	Bedeutung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen	10
1.5.2	p38-MAPK	10
1.5.3	ERK1/2-MAPK	12
2	Zielstellung	14
3	Material und Methodik	15
3.1	Auswahl der Probanden	15
3.2	Befragung der Probanden	15
3.3	Gewinnung des Vollblutes	16
3.4	Auswahl der Zellpopulation	16
3.5	Isolierung von PBMC aus Vollblut	17
3.6	Proteinextrahierung und Western Blot Analyse zur Bestimmung der Expression von p38, pp38, ERK1/2 und pERK1/2	18
3.7	Statistische Analyse	20
4	Ergebnisse	21
4.1	Stressempfinden und sportliche Betätigung	21
4.2	Ernährungsverhalten	22
4.3	Rauchverhalten und Alkoholkonsum	24
4.4	Cholesterin, HDL, LDL, Triglyzeride, Blutzucker	25
4.5	Familiäre Krebserkrankungen und Übergewichtigkeit	27
4.6	Relative Expression von ERK1/2 und pERK1/2 bei physiologischen und azidotischen extrazellulären pH-Wert	28
4.7	Relative Expression von p38 und pp38 bei physiologischen und azidotischen extrazellulären pH-Wert	31

Inhaltsverzeichnis

5	Diskussion	35
6	Zusammenfassung	47
	Literaturverzeichnis	49
	Thesen	69
	Anhang	71
	Selbstständigkeitserklärung	V
	Erklärung über frühere Promotionsversuche	VI
	Tabellarischer Lebenslauf	VII
	Danksagung	IX

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

*	statistisch signifikant
ACTH	adrenocorticotropic hormone
ATP	adenosine triphosphate
BCA	bicinchoninic acid
BGS98	Bundes-Gesundheitssurvey 1998
BMI	Body-Mass-Index
bright	hohe Expressionsdichte
CA	Karzinom
CD	cluster of differentiation
COX	cyclooxygenase
CREB	cyclic adenosine monophosphate response element binding protein
CRH	corticotropin-releasing hormone
DEGS1	Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland
dim	niedrige Expressionsdichte
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1 and 2
FasL	Fas ligand
G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase
GTP	guanosine triphosphate
GTPase	guanosine triphosphatase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HCl	Salzsäure
HDL	high density lipoprotein
HIF-1 α	hypoxia inducible factor-1 alpha
IFN- γ	interferon-gamma
IgG	immunoglobulin G
IL	Interleukin
LDL	low density lipoprotein
M1	classically activated phenotype
M2	alternatively activated phenotype

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

MAPKs	mitogen-activated proteinkinases
MAPKK	mitogen-activated proteinkinase kinase
MAPKKK	mitogen-activated proteinkinase kinase kinase
MES	2-morpholinoethanesulfonic acid
MKs	mitogen-activated proteinkinase-activated proteinkinases
MMP	matrix metalloproteinase
MW	Mittelwert
neg	keine Expression
NF- κ B	nuclear factor kappa B
NK	natural killer
NKG2D	natural killer group 2, member D
Ob-R	leptin receptors
Ob-Rb	leptin receptors isotype b
p	p-value
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
pERK1/2	phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1 and 2
PGE2	prostaglandin E2
pp38	phosphorylated p38
PSA	prostate-specific antigen
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	rat sarcoma
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide electrophoresis
SEM	standard error of the mean
TAMs	tumor-associated macrophages
TBS	tris buffered saline
TGF- α	transforming growth factor-alpha
TGF- β	transforming growth factor-beta
Th1	T helper type 1
Th2	T helper type 2
TNF- α	tumor necrosis factor-alpha
TNF- β	tumor necrosis factor-beta
TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

1.1 Adipositas

Adipositas stellt ein weltweites Gesundheitsproblem dar, welches eine stark steigende Prävalenz zeigt [1]. Man nutzt den BMI (Body-Mass-Index) als bestimmendes Kriterium, welcher als Körpergewicht in kg dividiert durch die Körpergröße in Metern zum Quadrat definiert ist. Dabei werden laut WHO (World Health Organization) Menschen mit einem BMI von 25-30 kg/m² als übergewichtig und solche mit einem BMI > 30 kg/m² als adipös angesehen [2]. Im Jahr 2014 wurden global circa 1,9 Milliarden übergewichtige erwachsene Menschen ermittelt, wovon wiederum mehr als 600 Millionen Erwachsene als adipös einzuordnen sind. Damit waren im Jahr 2014 circa 11 % der Männer und rund 15 % der Frauen weltweit adipös [2]. In Deutschland ist laut der DEGS1 (Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland) mehr als jeder Fünfte adipös, wobei die Gruppe der 18- bis 29-Jährigen eine im Vergleich geringe Prävalenz zeigt (8,6 % bei den Männern, 9,6 % bei den Frauen). Weiterhin zeigte diese Studie, dass mit steigendem Lebensalter die Prävalenz für Adipositas derart steigt, dass sich der Anteil der adipösen Männer und Frauen im Alter von 40 bis 49 Jahren auf rund 23 % beziehungsweise 19 % und bei den 50- bis 59-Jährigen auf rund 28 % beziehungsweise 27 % beläuft. Bei den 60- bis 79-Jährigen ist der Anteil der Adipösen in beiden Gruppen sogar noch höher (> 30 %) [3].

Darüber hinaus konnten in der gleichen Studie deutliche Unterschiede in Abhängigkeit vom sozioökonomischen Status ausgemacht werden. In der Gruppe der 40 bis 59 Jahre alten Männer und Frauen mit einem als „niedrig“ eingestuften sozioökonomischen Status waren circa doppelt beziehungsweise dreimal so viele Erwachsene adipös, wie bei den Männern und Frauen mit einem „hohen“ sozioökonomischen Status [3].

Es konnte zudem bei einem Vergleich zwischen der DEGS1 und dem BGS98 (Bundes-Gesundheitssurvey 1998) auch eine Zunahme der gesamten Adipositas-Prävalenz in einem Zeitraum von circa 10 Jahren, sowohl bei den Männern um rund 4,4 % auf 23,3 %, als auch bei den Frauen um circa 1,4 % auf 23,9 %, verzeichnet werden [3]. Die Tendenz ist ebenso weltweit steigend. Laut WHO verdoppelte sich im Zeitraum von 1980 bis 2014 die Adipositas-Prävalenz [2].

Adipositas wird als einer der Hauptrisikofaktoren für verschiedenste Erkrankungen der heutigen Gesellschaft angesehen. Ein entsprechend erhöhter BMI bei Fettleibigkeit

stellt einen wichtigen Risikofaktor für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes mellitus, Osteoarthritis [1,2] und Karzinomen, wie dem Mamma- und dem Kolonkarzinom, dar [2].

In Bezug auf eine Assoziation zu Karzinomen wurde in einer Metaanalyse gezeigt, dass ein Anstieg des BMI bei Frauen und Männern mit einer Vielzahl von Malignomen assoziiert ist. Hier stellte sich eine Assoziation zwischen dem Anstieg des BMI um 5 kg/m² bei Männern und Karzinomen der Schilddrüse, der Niere und des Kolons dar. Bei den Frauen wurde ebenso, bei entsprechendem Anstieg des BMI um 5 kg/m², eine deutliche Assoziation zu Karzinomen der Niere, des Kolons und des Endometriums ausgemacht [4]. In einigen anderen Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass Karzinome, wie die der postmenopausalen Mamma [5], des Endometriums [6,7], der Niere [8,9], des Kolons und des Rektums [10-12] mit Adipositas assoziiert sind. In Bezug auf das Leberkarzinom wurde im Rahmen einer Metaanalyse, in der über 1,5 Millionen Männer und Frauen einbezogen waren, ein steigendes relatives Risiko in Abhängigkeit vom BMI ermittelt. Das Risiko an einem Leberkarzinom zu erkranken war bei einem BMI von 35 kg/m², im Vergleich zu 30 kg/m², erhöht [13].

1.2 Risikofaktoren für die Pathogenese von Karzinomen

Laut der „German cancer statistics 2004“ erkrankten im Jahr 2004 in Deutschland insgesamt 436.500 Menschen an einem Karzinom. Dabei wurden 58000 neue Fälle des Prostatakarzinoms und 57000 Neuerkrankungen in Bezug auf das Mammakarzinom gemeldet. Das entspricht einer relativen Zunahme der Inzidenz der Ausgangsquote auf 250 % bezüglich des Prostatakarzinoms und auf 150 % in Bezug auf das Mammakarzinom, im Vergleich zu den Daten von 1980.

Die Tendenz ist, unter anderem wegen der demographischen Entwicklung in Deutschland, auch bei der Gesamtanzahl der Karzinomneuerkrankungen deutlich steigend. Seit 1980 stieg die Zahl der Neuerkrankungen um circa 60 % [14].

Rauchen spielt durch die mehrfach gezeigte positive Assoziation zum Bronchial- [15-17], Larynx- [15,17,18], Ösophagus- [15,17,18] und Pankreaskarzinom [15,17,19,20] sowie zu malignen Veränderungen der Harnblase [15,18,21], Niere [21] und des Pharynx [15,22] in vielen Fällen eine bedeutende Rolle in der Karzinomentstehung.

Daneben stellt Adipositas einen wichtigen Risikofaktor für die Pathogenese verschiedener Karzinome dar [1,23-25]. Erhöhte physische Aktivität geht dagegen mit einer reduzierten Mortalität, bezogen auf das Kolon- und Mamma-CA (Karzinom) einher [26].

Bei adipösen Menschen werden verschiedenste Regelkreise innerhalb des Organismus derart beeinflusst, wodurch die Pathogenese unterschiedlicher maligner Tumoren begünstigt werden kann. Neben dem Immunsystem werden unter anderem der Insulin- und Estradiolhaushalt maßgeblich moduliert [27]. Es ist erwiesen, dass Fettgewebe auch endokrine Funktionen, wie die Sekretion von Adipokinen besitzt.

Adiponektin - ein Produkt des Fettgewebes [28,29] - stellt einen bedeutenden Vertreter der Adipokine dar. In verschiedenen Studien konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine erhöhte Adiponektinplasmakonzentration mit einem reduzierten Risiko, sowohl für koronare Herzerkrankungen bei männlichen Diabetikern [30], als auch für das Auftreten eines Myokardinfarkts bei Männern einhergeht [31]. Zudem werden Adiponektin potentielle antiinflammatorische Eigenschaften zugesprochen [32-35]. Dieses Adipokin hemmt unter anderem die Monozytenadhäsion [34], das Wachstum von Makrophagen-Vorläufern, sowie in vitro die Synthese von TNF- α (tumor necrosis factor-alpha) [32] und stimuliert die Expression des antiinflammatorisch wirksamen IL (Interleukin)-10 [36]. Adiponektin wird darüber hinaus auch eine wichtige insulinsensibilisierende Funktion zugesprochen, welche sich unter anderem protektiv auf die bei Diabetes mellitus Typ 2 bestehende Insulinresistenz auswirkt [37].

In einer anderen Studie konnte dabei eine positive Assoziation zwischen erhöhten Adiponektinspiegel und einem reduzierten Risiko für Diabetes mellitus Typ 2 ausgemacht werden [38]. Im Umkehrschluss wurde ebenso gezeigt, dass eine entsprechend niedrigere Adiponektinkonzentration positiv mit einer Insulinresistenz assoziiert ist [39].

Aktuelle Studien weisen darüber hinaus auf potentielle tumorsupprimierende Eigenschaften von Adiponektin in Bezug auf das Prostata- [40] und das Endometriumkarzinom [41] hin, wohingegen dieses Adipokin beim Kolorektal- und Mammakarzinom begünstigend auf die Tumorprogression wirken könnte [36].

Interessanterweise liegt jedoch bei Adipösen, im Vergleich zu Normalgewichtigen, eine niedrigere Adiponektinplasmakonzentration im Plasma vor. Entsprechende inverse Korrelationen zwischen dem Body-Mass-Index [42,43] beziehungsweise Adipositas [39] und Plasmaadiponektinkonzentration konnten bereits festgestellt werden.

Die Ursache für die niedrigere Adiponektinkonzentration bei adipösen Menschen ist nicht vollständig geklärt. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass der erhöhte Spiegel von proinflammatorischen Zytokinen, wie beispielsweise IL-6 sowohl die Synthese als auch die Freisetzung dieses Adipokins negativ beeinflussen kann [44,45]. Durch die Vermehrung des Fettgewebes, wie es bei Adipositas der Fall ist, entsteht eine Dysregulation der Adipokinproduktion [46,47]. Diese spiegelt sich mitunter in einer verminderten Adiponektin-Sekretionsrate [32,48] wider, woraus eine subklinisch manifeste, chronische Inflammationsreaktion resultiert [46]. Ursächlich für die chronische Reaktion ist mitunter der weiterhin erhöhte Spiegel an zirkulierenden proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-6 [48].

Eine derartige Immunantwort kann mit einer Insulinresistenz vergesellschaftet sein [49], bei der sowohl die zuvor erwähnte Zytokinsekretion durch Makrophagen, welche unter anderem im Fettgewebe lokalisiert sind [50], als auch die verminderte Präsenz des insulinsensitivitätssteigernden Adiponektins [48] wichtige modulierende Aspekte darzustellen scheinen [48,50].

Das Prostatakarzinom stellt bei Männern in Deutschland das häufigste Karzinom und darüber hinaus die dritthäufigste Todesursache durch ein Karzinom dar [51].

Im Rahmen eines In-vitro-Versuches stellte sich heraus, dass Prostatakarzinomzellen, welche mit dem Serum fettleibiger Mäuse inkubiert wurden, eine deutlich erhöhte Proliferations- und Migrationsrate aufwiesen. Weiterhin konnte nach der Exposition beobachtet werden, dass die MMP (matrix metalloproteinase)-Aktivität und das Wachstum dieser Karzinomzellen deutlich verstärkt waren [52].

Hinsichtlich des Erkrankungsrisikos wurde im Rahmen einer Metaanalyse eine positive Assoziation zu Adipositas festgestellt [53]. Mehrere Studien zeigten, dass sich jene positive Assoziation vor allem bei „high-grade“ Prostatakarzinomen (Gleason-Score ≥ 7) nachweisen lässt [54-56]. Diese Ergebnisse sind auch in Verbindung mit der erschwerten Diagnosestellung bei Adipösen zu sehen. Neben der komplizierteren digitalen rektalen Untersuchung weist auch die Prostatabiopsie eine reduzierte Wahrscheinlichkeit auf, ein bereits maligne verändertes Areal zu treffen [57], da die Prostata bei Adipösen häufig ein größeres Volumen im Vergleich zu normalgewichtigen Männern einnimmt [57,58]. Zudem weisen Fettleibige, im Vergleich zu nicht-adipösen Männern, durchschnittlich niedrigere Konzentrationen des PSA (prostate-specific antigen) auf [57,59,60]. Die Bestimmung dieses Antigens findet weit verbreitete Anwendung beim Screening des Prostatakarzinoms [61]. Ursache für die niedrigere Konzentration könnte zum einen der verringerte Testosteronspiegel - und damit auch

die reduzierte PSA-Synthese - zum anderen das erhöhte Plasmavolumen bei fettleibigen Männern sein [57].

Es bestehen neben dem Prostatakarzinom auch weitere maligne Erkrankungen, bei denen Adipositas einen begünstigenden Faktor für die Pathogenese darzustellen scheint. So steht, wie bereits zuvor erwähnt, zum Beispiel ein erhöhtes Erkrankungsrisiko hinsichtlich des Mammakarzinoms in Verbindung mit der Gewichtszunahme. Dies gilt vor allem für den postmenopausalen Typ der Neoplasie. Die erhöhte Östrogensynthese des überschüssigen Fettgewebes stellt möglicherweise einen relevanten Aspekt in Bezug auf die Pathogenese dar [27].

Ähnlich wie bei dem Prostatakarzinom wird auch hier auf eine positive Assoziation zwischen erhöhten BMI und progredienter Form des Mammakarzinoms bei der Diagnosestellung hingewiesen [62].

1.3 Tumormikromilieu

Ein solider Tumor weist neben morphologischen Unterschieden auch ein abweichendes Mikromilieu gegenüber regelgerecht differenzierten Gewebe auf. Dabei sind nicht nur der veränderte Aufbau des Gefäßsystems [63-65] im Sinne eines Verlusts des hierarchischen Aufbaus, sondern auch eine insuffiziente Perfusion [63] und die damit in Verbindung stehende ungenügende Sauerstoffversorgung des Tumors für diesen charakteristisch [63,65]. Die hohe Proliferationsrate der Tumorzellen bedingt die insuffiziente Blutversorgung [66]. Die daraus resultierende Hypoxie fördert die Synthese proangiogener Faktoren, unter anderem durch die reduzierte Aktivität von als Sauerstoffsensoren wirkenden Molekülen. Folglich wird der Abbau von HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 α) gehemmt und somit vermehrt hypoxieinduzierte Gene transkribiert. Zu diesen gehört VEGF (vascular endothelial growth factor), welcher eine wesentliche Triebkraft der Tumorangiogenese darstellt. Die Balance zwischen pro- und antiangiogenen Stimuli ist damit aufgehoben, sodass die Gefäßstrukturen innerhalb des Tumors eine veränderte Anatomie, hinsichtlich eines vergrößerten Gefäßquerschnitts und einer abnorm erhöhten Permeabilität, zeigen. Die Endothelzellen weisen keine, wie in normal differenzierten Gewebe, durch Cadherine vermittelte Adhärenskontakte auf und führen durch eine Vergrößerung der Interzellularräume zur Permeabilitätssteigerung [67].

Um den extrem hohen Energiebedarf zu decken, müssen diese Zellen, bedingt durch die chronische Hypoxie, einen anaeroben Stoffwechsel bevorzugen und betreiben daher in gesteigertem Maße Glykolyse. Die - als „Warburg-Effekt“ bezeichnete - Reaktion kann bei noch bestehender Sauerstoffversorgung beobachtet werden [68].

Ein weiteres Charakteristikum des Tumormilieus stellt die, aus der hohen Glykolyserate resultierende, Azidose dar. Neben ATP (adenosine triphosphate) wird bei der Glykolyse auch Laktat gebildet, welches als organische Säure eine Absenkung des pH-Wertes bedingt.

Die Freisetzung des Laktats in den Extrazellularraum erfolgt durch Monocarboxylat-Transporter [68-70], welche zusammen mit Bikarbonat-Transportern, Protonenpumpen sowie Natrium-Protonen-Austauschern eine Absenkung des extrazellulären pH-Wertes in Tumoren bedingen [70]. Zudem trägt beispielsweise die, durch Carboanhydrase 9 vermittelte Umwandlung von Kohlenstoffdioxid zu Kohlensäure zur Ansäuerung des umgebenden Milieus bei [71].

Ein azidotisches extrazelluläres Milieu, bei dem der pH-Wert teilweise Werte unter 6,5 erreicht, ist das Resultat der extrem gesteigerten Laktatproduktion [63,68,72].

Die für das Tumormikromilieu charakteristische extrazelluläre Azidose hat vielfältige klinische Relevanz. Diese Azidose kann zu einer Erhöhung der Migrationsgeschwindigkeit von Prostatakarzinomzellen führen [73] und eine Resistenzbildung dieser Zellen gegenüber Chemotherapeutika begünstigen [63,74]. Weitere Studien zeigen darüber hinaus, dass die Zersetzung der extrazellulären Matrix in Melanometastasen durch die extrazelluläre Azidose positiv beeinflusst wird [75,76]. Diese Ergebnisse weisen auf eine zentrale klinische Rolle des azidotischen Milieus in Tumoren hin.

1.4 NK-Zellen - Vertreter der PBMC

NK (natural killer)-Zellen stellen eine Subpopulation der den PBMC (peripheral blood mononuclear cells) zugehörigen Lymphozyten dar und gehören dem angeborenen Immunsystem an.

Sie werden durch Zytokine wie IL-12 und IL-15 aktiviert [77,78]. Die zytotoxischen Funktionen dieser speziellen Lymphozyten werden im Wesentlichen über zwei verschiedene Wege vermittelt. Ein Mechanismus beruht auf der Freisetzung von Perforin - einem membranzerstörenden Protein - und Granzymen (speziellen Serinproteasen) via Exozytose. Der andere Weg führt über die Bindung von spezifischen Liganden, wie beispielsweise FasL (Fas-ligand), der NK-Zellen an den „death domains“ (zum Beispiel Fas) der zu bekämpfenden Zellen, zur Aktivierung von Caspasen.

Beide Mechanismen induzieren eine Apoptose der entsprechenden Zielzellen [79].

Mehrere Studien zeigten, dass sowohl die Freisetzung von Perforin [80,81] als auch die Expression von FasL [82,83] zu einer durch NK-Zellen vermittelten Tumorsuppression führen kann.

Eine entsprechende Einschränkung der zytotoxischen Funktionen dieser Zellen geht scheinbar mit einem gesteigerten Risiko an einem Karzinom zu erkranken einher [84]. Weiterführende Studien weisen zusätzlich auf eine Korrelation zwischen Natürlichen-Killer-Zellen und der Prognose von Karzinomen hin [85-91]. So zeigte eine dieser Studien bezogen auf das Kolorektalkarzinom, dass die Überlebensraten von Patienten deutlich höher lagen, die eine hohe NK-Zellinfiltration im Tumor aufwiesen, als bei den Patienten mit entsprechend geringer Infiltration durch NK-Zellen [85].

Weitere Studien stellten fest, dass die verstärkte NK-Zellinfiltration des Tumors mit einer günstigeren Prognose der Erkrankung, bezogen auf das Magen- [86,87], das klarzellige Nierenzellkarzinom [91] sowie das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom [89,90] vergesellschaftet ist.

Die gesteigerte NK-Zell-Infiltration war unter anderem mit einer höheren Zahl von Frühformen des Magenkarzinoms sowie mit einer selteneren lymphatischen Metastasierung assoziiert [87]. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch in Bezug auf das hepatozelluläre Karzinom gezeigt werden [88].

Es bestehen allerdings auch mehrere Angaben, die auf eine negative Modulation der NK-Zell-Funktionen durch das Tumormikromilieu hinweisen [92-95].

Verschiedene Faktoren im Tumormilieu wie IL-4 und TGF- β (transforming growth factor-beta) können zur verminderten Expression stimulierend wirksamer Rezeptoren (zum Beispiel NKG2D = natural killer group 2, member D) auf NK-Zellen führen. Es resultiert daraus eine reduzierte Freisetzung von Perforin und IFN- γ (interferon-gamma), was eine Einschränkung von immunologischen und tumorsupprimierenden Funktionen dieser Zellen zur Folge hat [93,94].

Eine andere Studie kam zu dem Schluss, dass von Ösophagus- und Magenkarzinompatienten stammende NK-Zellen durch im Tumormilieu freigesetztes H₂O₂ (Wasserstoffperoxid) beeinflusst werden. Die H₂O₂-Bildung stand demnach mit einer verminderten Infiltration der Karzinome durch CD (cluster of differentiation)56^{dim} (^{dim} = niedrige Expressionsdichte) NK-Zellen im Zusammenhang. Ursache hierfür könnte die in Bezug auf die H₂O₂-induzierte Apoptose festgestellte, erhöhte Sensitivität der CD56^{dim} Zellen im Vergleich zu den CD56^{bright} (^{bright} = hohe Expressionsdichte) NK-Zellen sein [92]. Die Exposition der CD56^{dim} NK-Zellen mit H₂O₂ führte in einer anderen Studie auch zur verminderten Expression von funktionell relevanten Rezeptoren, wie NKG2D [95].

Ein anderer Aspekt der Modulation von NK-Zell-Funktionen ergibt sich im Hinblick auf die Bedeutung von Fettgewebe und damit auch von Adipozyten. Diesbezüglich wurde gezeigt, dass das von Adipozyten produzierte Adiponektin die IL-2 induzierte Zytotoxizität der Natürlichen-Killer-Zellen hemmt [96].

NK-Zellen besitzen neben einer Vielzahl hemmender oder stimulierender Rezeptoren [97,98] auch Ob-R (leptin receptors), welche ebenso auf T- und B-Lymphozyten exprimiert werden [99]. Neben der Bedeutung als Regulator des Energiehaushalts hat Leptin Einfluss auf das Immunsystem, was unter anderem in der strukturellen Ähnlichkeit zu dem bei der Aktivierung von NK-Zellen bedeutenden IL-2 liegt [96,100]. Im Falle der Isoform Ob-Rb (leptin receptors isotype b) besteht zusätzlich eine auffällige Homologie mit IL-6-Rezeptoren [99].

Bei T-Lymphozyten fördert das Anorexigen die Zytokinproduktion der Th1 (T helper type 1)-Zellen und hemmt die der Th2 (T helper type 2)-Zellen [101].

Über die genaue Wirkung von Leptin auf NK-Zellen ist bisher wenig bekannt [102]. Es konnte jedoch im Rahmen einer Studie an dünnen und fettinduzierten F344-Ratten nachgewiesen werden, dass sich die leptininduzierte Aktivität sowie das

Verbreitungsmuster von NK-Zellen splenalen Ursprungs nur bei den dünnen Versuchstieren erheblich ändert. Grund hierfür ist nicht eine verringerte Ob-R-Expression bei den fettinduzierten F344 Ratten, sondern eine verringerte Aktivierung der sich anschließenden intrazellulären Signalkaskaden. Bei dem in vivo durchgeführten Leptinaustausch war vor allem der, durch die Janus-Kinase 2p getriggerte Signalweg von einer verringerten Stimulation betroffen [99]. Darüber hinaus wurde in vitro eine signifikant reduzierte Proliferationsrate humaner NK-Zellen, die für sieben Tage mit Leptin inkubiert wurden, festgestellt. Die über TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) vermittelte Zytotoxizität der NK-Zellen war bei der Inkubation mit Leptin initial erhöht, sie konnte aber bereits nach vier Tagen nur noch in wesentlich geringerem Maße nachgewiesen werden [102].

Adipositas und die damit verbundene erhöhte Leptinsekretion [102] scheint somit, wie auch Untersuchungen an hepatischen NK-Zellen adipöser und normalgewichtiger Menschen partiell bestätigen, hemmend auf Proliferation, Ob-R-Expression [103] und Zytotoxizität zu wirken [102].

Weitere funktionelle Bedeutung hat die Unterscheidung der Natürlichen-Killer-Zellen anhand der Dichte der an der Zelloberfläche befindlichen Strukturen CD16 und CD56. Die Einteilung erfolgt in drei wesentliche Gruppen (erste Gruppe: CD56^{bright}, CD16^{neg} (^{neg} = keine Expression); zweite Gruppe: CD56^{bright}, CD16^{dim}; dritte Gruppe: CD56^{dim}, CD16^{bright}) [100]. Der Anteil der CD56^{bright} NK-Zellen an der Gesamtpopulation der Natürlichen-Killer-Zellen im Blut ist relativ gering und beträgt circa 5 % bis 10 % [77,104]. Außerdem könnten die CD56^{bright} Zellen Vorläufer der CD56^{dim} NK-Zellen sein [104,105].

Die CD56^{dim} NK-Zellen erfüllen besonders zytotoxische Funktionen, was auf die CD56^{bright} Zellen weniger zutrifft [77,100]. Dagegen produzieren die CD56^{bright} Zellen deutlich mehr Zytokine als die CD56^{dim} Zellen. Zu den von CD56^{bright}-NK-Zellen gebildeten immunregulatorischen Zytokinen gehören unter anderem IFN- γ , IL-10 und TNF- β (tumor necrosis factor-beta) [77].

1.5 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

1.5.1 Bedeutung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen

Die MAPKs (mitogen-activated proteinkinasen) stellen wichtige Glieder in der Steuerung verschiedenster zellulärer Aktionen und Reaktionen dar, zu denen Proliferation, Differenzierung und Apoptose zählen [106-108]. Zielsubstrate sind mitunter Transkriptionsfaktoren, MAPK-aktivierte Proteinkinasen und Proteine des Zytoskeletts [109].

Die ERK (extracellular signal-regulated kinase)- und die p38-Gruppe stellen als Serin-/Threoninkinasen zwei Gruppen der MAPKs dar [110].

Jede der MAPK-zugehörigen Gruppen ist prinzipiell aus den drei folgenden, der Reihe nach arbeitenden, Kinasen aufgebaut: MAPK, MAPKK (mitogen-activated proteinkinase kinase), MAPKKK (mitogen-activated proteinkinase kinase kinase) [109,111]. Zu Beginn der Signaltransduktionskette steht ein Stimulus, beispielsweise bedingt durch Zytokine, welche zu einer Phosphorylierung und/oder Interaktion einer MAPKKK mit einem GTP (guanosine triphosphate)-bindenden Protein aus der Ras (rat sarcoma)-Familie und letztlich zur Aktivierung derselben Kinase führt [109,112]. Infolge dieser Reaktion wird eine MAPKK wiederum durch Phosphorylierung aktiviert. Jene MAPKK phosphoryliert konsekutiv die Aminosäuren Threonin und Tyrosin, welche in einer Subdomäne der MAPK lokalisiert sind, was zur Stimulation dieser MAPK führt. Schließlich ermöglicht eine Mitogen-aktivierte Proteinkinase, wie ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2) und p38, die Phosphorylierung von verschiedensten Substraten wie MKs (mitogen-activated proteinkinase-activated proteinkinasen) [109].

1.5.2 p38-MAPK

Die p38-MAPK wird in vier Isoformen unterteilt, welche in Bezug auf die Aminosäuresequenz zu circa 60 % miteinander übereinstimmen [113]. Auf die Isoformen soll an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden, weswegen in dem weiteren Verlauf zusammenfassend von der „p38-MAPK“ gesprochen wird. Die p38-MAPK spielt eine wichtige Rolle, sowohl in der Modifikation von Differenzierung, Migration, als auch Apoptose [113,114].

Es wurde außerdem festgestellt, dass p38 eine Steuerfunktion bezogen auf die Expression einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren [115], wie CREB (cyclic adenosine monophosphate response element binding protein) [116,117], NF- κ B (nuclear factor-kappa B) [109], p53 [109,111,117], Zytokinen sowie Oberflächenrezeptoren zukommt [109].

p53 ist ein wichtiger Tumorsuppressor und stellt eines von vielen Zielsubstraten der p38-MAPK dar, weswegen eine indirekt tumorsupprimierende Bedeutung der p38-MAPK denkbar wäre [111,117].

Aktivierende Faktoren stellen neben Zytokinen auch oxidativer Stress, Hypoxie und UV-Strahlung dar [118].

In neutrophilen Granulozyten und T-Zellen, als Vertreter immunologisch relevanter Zellen, wird der p38-Signalweg durch diverse inflammatorische Botenstoffe, wie bakterielle Lipopolysaccharide und Zytokine, stimuliert [115] und veranlasst wiederum die Synthese proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , TNF- α und IL-6. Es werden über oben genannte prinzipielle Kaskade sowohl die Chemotaxis, Adhärenz und Apoptose der neutrophilen Granulozyten als auch die T-Zell-Differenzierung moduliert [109].

Bezüglich der p38-MAPK in Makrophagen wurde dieser Kinase eine wichtige Bedeutung bei der Vermittlung von Inflamationsreaktionen zugesprochen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass es in einem Tumormilieu via p38-MAPK-Signalweg zu einer verstärkten, durch Osteopontin getriggerten, COX (cyclooxygenase)-2-Expression kommt. Dies bedingt wiederum eine verstärkte PGE₂- (prostaglandin E₂) und MMP 9-Freisetzung [119].

Eine entsprechende Beeinflussung der PGE₂-Freisetzung durch die p38-Signalkaskade wurde auch in anderen Studien gezeigt [120,121]. Eine wichtige Rolle von p38 in der Initiation und Unterhaltung einer Inflamationsreaktion erscheint daher naheliegend.

Die PGE₂- und MMP 9-Sekretion der Makrophagen könnte darüber hinaus einen zusätzlichen Trigger für Tumorprogression und Angiogenese in Melanomen darstellen [119].

Als weiteren Aspekt liegen in Bezug auf verschiedenen Karzinomzelllinien Studien vor, die zu dem Schluss kommen, dass eine Inhibition der p38-MAPK eine vermutlich tumorsupprimierende Wirkung haben kann. Die damit in Verbindung stehende Herunterregelung der MMP 9-Expression soll dabei entscheidend sein [122-124].

Im scheinbaren Kontrast dazu steht das Ergebnis einer anderen Studie, die der p38-MAPK in Mammakarzinomzellen eine tumor-inhibierende Wirkung, durch Suppression der Migration mesenchymaler Stammzellen im Bereich des Primärtumors und der Metastasen, zuspricht. Die p38-MAPK könnte somit hemmend auf die Metastasierung dieses Karzinoms wirken [125].

Die Untersuchungsergebnisse der Studien zeigen, dass der p38-MAPK in diesem Zusammenhang scheinbar deutlich unterschiedliche Funktionen zukommen, die mitunter vom Zelltyp abhängig sein könnten.

In der Literatur finden sich zusätzlich Angaben zur p38-MAPK in humanen PBMC. Diesbezüglich bestehen Informationen zur Freisetzung von Th1- und Th2-spezifischen Zytokinen, welche durch die p38-Signalkaskade vermittelt werden [126]. Eine andere Untersuchung zeigte außerdem, dass die PBMC von Lungenkarzinompatienten deutlich mehr Th1- und Th2-Zytokine freisetzen, als jene in der Vergleichsgruppe [127]. Dies weist auf eine Bedeutung der PBMC bei immunologischen Prozessen in Karzinompatienten hin, in welchen möglicherweise auch der p38-Signalweg modulierend einwirkt.

1.5.3 ERK1/2-MAPK

Die MAPKs ERK1 und ERK2 stimmen strukturell in mehr als 80 % der Aminosäuresequenz miteinander überein [106]. Diese haben Bedeutung bei der Regulation von Differenzierung, Proliferation und Motilität [106,128].

Die Aktivierung von ERK1/2 wird beispielsweise durch Wachstumsfaktoren wie EGF (epidermal growth factor), osmotischen Stress und Zytokine induziert [128].

Bei ungefähr einem Drittel der Tumoren kommt es zu einer fehlerhaften Regulation der ERK1/2 Signalkaskade, welche sich in einer erhöhten Aktivität dieser Kaskade äußert. Ursache hierfür sind entweder eine übermäßige Expression oder Mutationen der Rezeptor-Tyrosinkinasen, oder Mutationen von Ras und B-Raf (rapidly accelerated fibrosarcoma) [118].

Der ERK-Signalweg fördert sowohl die Proliferation, als auch die Metastasierung. In Karzinomen konnte bereits eine abweichende Aktivität dieser Kaskade nachgewiesen werden. Ursache für die anhaltend verstärkte Aktivität scheint mitunter die Mutation der vorgeschalteten Ras-GTPase (guanosine triphosphatase) und/oder die übermäßige

Expression des EGFR (epidermal growth factor receptor) zu sein [129]. Neben einer Mutation von Ras, welche unter anderem in 90 % der Pankreaskarzinome und 50 % der Kolonkarzinome festgestellt wurde [130], konnte auch die Überexpression von EGFR in einer Vielzahl von Karzinomen nachgewiesen werden [131]. Infolge der durch Ras aktivierten Signalkaskade kommt es zur Beeinflussung der Transkription, woraus eine erhöhte Expression des EGFR spezifischen Liganden TGF- α (transforming growth factor-alpha) resultiert. Die gesteigerte Expression und Freisetzung von TGF- α führt wiederum zur EGFR-Stimulation [132,133].

Eine Verstärkung der Aktivität des ERK1/2-Signalweges konnte zudem bei ausgedehnten Prostatatumoren - unabhängig von Androgenspiegel - festgestellt werden, was wiederum mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet war [134-136]. Dagegen konnte eine andere Studie mit vergleichbaren Prostatakarzinomen die gesteigerte Aktivierung der ERK1/2-MAPK nicht bestätigen [137]. Somit ist die Bedeutung dieser Kinase in Prostatakarzinomzellen bislang nicht vollständig geklärt.

2 Zielstellung

Zentrale Ziele der vorliegenden Studie waren es, Hinweise zu gewinnen, ob Adipositas bei Männern, sowie eine extrazelluläre Tumor-Azidose, Einfluss auf die immunologische Aktivität von humanen PBMC nehmen.

Zu diesem Zweck wurde untersucht:

- ob und wenn ja, inwieweit Unterschiede bezüglich der Expressionen der immunologische bedeutenden Mitogen-aktivierten Proteinkinasen p38, ERK1/2 und deren jeweilige aktive Form pp38 (phosphorylated p38) und pERK1/2 (phosphorylated ERK1/2) in den PBMC von adipösen und normalgewichtigen Männern auszumachen sind
- ob und wenn ja, inwieweit Differenzen in Bezug auf die Aktivierbarkeit dieser MAPKs in den PBMC adipöser und normalgewichtiger Männer feststellbar sind
- ob und wenn ja, inwieweit sich die Expression unter einem physiologischen extrazellulären pH-Wert (7,4) im Vergleich zu einem für Tumore charakteristischen, azidotischen extrazellulären Milieu (pH 6,6) zwischen adipösen und normalgewichtigen Männern unterscheidet.

Weitere Ziele dieser Studie waren, mittels des spezifisch für die vorliegende Studie erstellten Fragebogens und durch etablierte Labordiagnostikverfahren, herauszufinden:

- ob sich Differenzen zwischen adipösen und normalgewichtigen Männern in Bezug auf Lebensbedingungen und -gewohnheiten, wie zum Beispiel Stress, Rauchen und Alkoholkonsum feststellen lassen
- ob Unterschiede bezüglich stoffwechselrelevanter Blutparameter zwischen adipösen und normalgewichtigen Männern auszumachen sind.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie könnten somit Hinweise auf eine potentielle Beeinflussung von p38- und ERK1/2-vermittelten immunologischen Reaktionen humaner PBMC durch eine Tumor-Azidose liefern. Desweiteren könnten die gewonnenen Erkenntnisse dieser Untersuchungen unter Umständen Tendenzen zeigen, ob Adipositas eine Bedeutung in der Modifikation dieser Signalkaskaden in den PBMC von Männern zukommt.

Dies würde einen Anlass liefern, weiterführend an der Bedeutung der p38- und der ERK1/2-MAPK in Subpopulationen der PBMC, im Zusammenhang mit Adipositas und der extrazellulären Tumor-Azidose zu forschen. Daraus resultieren möglicherweise auch Hinweise auf therapeutisch relevante Ansatzpunkte in der Karzinomtherapie.

3 Material und Methodik

3.1 Auswahl der Probanden

Um die für die vorliegende Studie gewünschte Mischpopulation der PBMC der Zielgruppen zu erhalten, wurden männliche Probanden im Alter von 40 bis 60 Jahren rekrutiert, welche im Untersuchungszeitraum Patienten in der internistischen Praxis von Herrn Dr. med. Tilo Breitling waren. Das Durchschnittsalter der adipösen Männer lag bei 52,1 und bei den Normalgewichtigen bei 51,1 Lebensjahren. Die Probanden wurden anhand ihres Body-Mass-Index in 2 Gruppen eingeteilt haben. Die erste Gruppe wurde - entsprechend des BMI - durch die normalgewichtigen Männer (BMI < 25 kg/m²) repräsentiert und der zweiten Gruppe gehören diejenigen Probanden mit einem BMI > 30 kg/m² an, welche folgend als „adipös“ bezeichnet werden. Der durchschnittliche BMI betrug 23,0 kg/m² bei den Normalgewichtigen und 34,7 kg/m² bei den Adipösen. Die zur Einteilung erforderlichen Angaben (Körpergewicht und Größe) wurden im Rahmen von Routinekontrollen höchstens zwei Monate vor der Blutentnahme durch Herrn Dr. med. Tilo Breitling bestimmt. Ausschlusskriterien für die Aufnahme in die Studie waren das Vorliegen von akuten und chronischen Infektionskrankheiten, Diabetes mellitus Typ I, Hyper- und Hypothyreose, chronischen Autoimmun-Thyreoiditiden, Tumorleiden, sonstigen Autoimmunerkrankungen sowie von angeborenen und/oder erworbenen (beispielsweise infolge einer Chemotherapie) immunsupprimierten Zuständen. Insgesamt konnten nach vorheriger, den Ausschlusskriterien entsprechender Selektion, 13 adipöse und 14 normalgewichtige Probanden rekrutiert werden.

3.2 Befragung der Probanden

Unter Erfüllung der Auflagen des Ethikkommissions-Votums (Bearbeitung-Nummer: 2013-24) der MLU-Halle-Wittenberg erfolgte eine Befragung der Probanden, mithilfe eines eigens erstellten Fragebogens sowie die im nächsten Abschnitt beschriebene Entnahme von Vollblut der Probanden.

In dem Fragebogen wurde unter anderem auf Themen, wie psychosoziale Stressfaktoren, Übergewicht in der Familie, Sport, Ernährungsverhalten, Alkoholkonsum und Rauchen eingegangen (Musterfragebogen siehe Anhang A1) Den Fragebogen erhielten die Probanden mindestens 14 Tage vor dem jeweiligen Blutentnahmetermine und gaben

diesen am Tag der Blutentnahme ausgefüllt ab. Ein Teil der aus dem Fragebogen erhobenen Daten wird im Ergebnisteil nicht mit aufgeführt, da diese nicht wissenschaftlich reliabel sind.

3.3 Gewinnung des Vollblutes

Um eine ausreichende Vorbereitungszeit zu gewährleisten erhielten die Probanden mindestens 14 Tage vor dem Blutentnahmetermin sowohl einen Probanden-informationsbogen zur Studie und zu den dabei geplanten Blutentnahmen, als auch den oben beschriebenen Fragebogen. Die enthaltene Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie wurde inklusive des ausgefüllten Fragebogens am Tag der Blutentnahme unterschrieben vorgelegt.

Bei vorliegender Einverständniserklärung der Probanden wurden einmalig jeweils circa 35 ml Vollblut aus einer Unterarmvene der nüchternen Probanden entnommen. Dies erfolgte, verteilt auf fünf separate Termine, im Zeitraum vom 27.08.2012 bis zum 10.09.2012, jeweils von 7.30 Uhr bis 8 Uhr. Dabei dienten circa 5 ml des Vollblutes, welche mit Z-Gel Monovetten (Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland) abgenommen wurden, zur Bestimmung folgender Parameter aus dem Serum: Triglyzeride, HDL, LDL, Cholesterin, Blutglukosespiegel. Jene Parameter wurden im Rahmen von etablierten Laboruntersuchungen (Labor Schottdorf MVZ GmbH, Augsburg, Deutschland) bestimmt und von Herrn Dr. med. Tilo Breitling zur Verfügung gestellt. Die übrigen 30 ml wurden mit Citrat-Monovetten (Sarstedt AG & Co.) entnommen, sofort auf Eis gelegt und binnen circa einer Stunde in das Institut für Anatomie und Mikrobiologie der MLU-Halle-Wittenberg transportiert. Dort erfolgte die weitere Aufbereitung der Blutproben.

3.4 Auswahl der Zellpopulation

In der vorliegenden Studie wurde sich gezielt für die Untersuchung von PBMC und nicht von NK-Zellen entschieden. Die Untersuchungen an dieser Subpopulation der PBMC hätten zwar vermeintlich eine höhere Aussagekraft, jedoch ist die Extrahierung einer ausreichenden Menge NK-Zellen, aufgrund ihres geringen quantitativen Anteils an den PBMC, nur durch die Entnahme eines wesentlich höheren Blutvolumens möglich.

Dies wäre nach eigener Einschätzung nur für eine deutlich reduzierte Zahl der Probanden tolerabel gewesen.

3.5 Isolierung von PBMC aus Vollblut

Um die weiteren Untersuchungen durchführen zu können, musste ein möglichst reines Zellpellet aus PBMC gewonnen werden. Dies erforderte mehrere Vorversuche an Vollblutproben von separaten Probanden, um einen möglichst niedrigen Anteil an Erythrozyten und Thrombozyten zu erhalten und gleichzeitig die PBMC-Population so wenig wie möglich zu dezimieren. Nach Erarbeitung einer entsprechenden Methode wurde am „Institut für Anatomie und Zellbiologie“ der MLU-Halle-Wittenberg die Zellseparation aus den Blutproben wie folgt durchgeführt.

Es wurden 30 ml Vollblut mit 20 ml ACD (Acetat-Citrat-Dextrose) -PBS (phosphate buffered saline; 9,55 g/l , pH 7,2-7,4) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) in ein 50 ml-Zentrifugationsröhrchen (greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich) versetzt. Der ACD-Puffer wurde aus 25 g Natriumacetat (SIGMA ALDRICH Co., St. Louis, USA), 20g Dextrose (SIGMA ALDRICH Co.) und 15 g Citrat (SIGMA ALDRICH Co.), welche in 100ml destillierten und autoklavierten Wasser gelöst wurden, hergestellt. Diese Lösung wurde dabei mit 0,1 mol/l HCl (Salzsäure) auf einen pH-Wert von 4,5 eingestellt. Für die Herstellung des ACD-PBS-Puffers wurde tropfenweise ACD-Puffer in die PBS (Biochrom AG) gegeben, bis sich ein pH-Wert von 6,5 eingestellt hatte. Schließlich wurde die Lösung, um eventuelle Kontaminationen weitestgehend ausschließen zu können, durch Sterilfiltration (Porengröße 0,22 μm ; TPP ®, Trasadingen, Schweiz) in eine autoklavierte und luftdicht-verschließbare Glasflasche überführt. Der Einsatz von ACD als Antikoagulanzen verhindert weitestgehend die Agglomeration der Thrombozyten [138]. Als Folge verblieb ein größerer Anteil dieser Zellen im Serum, was zu einer verringerten Kontamination der PMBC-Schicht führte. Das mit ACD-PBS (Biochrom AG) versetzte Vollblut wurde durch mehrmaliges Schwenken im Zentrifugationsröhrchen homogenisiert und anschließend jeweils 25 ml der Lösung vorsichtig auf 10 ml Biocoll (Dichte 1,063 g/ml), bestehend aus 80,56 % Biocoll (Dichte 1,077 g/ml) (Biochrom AG) und 19,44 % PBS (Biochrom AG), geschichtet. Dabei wurde ein Vermischen der beiden Phasen weitestgehend vermieden.

Anschließend wurde die aufgeschichtete Suspension aus Vollblut und ACD-PBS (Biochrom AG) bei Raumtemperatur (circa 20 °C), bei 1000 x g für 20 min und ohne Bremse (um eine Vermischung der getrennten Phasen zu vermeiden) zentrifugiert

(Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Um die Thrombozyten-Kontamination zu reduzieren, wurde anschließend der Überstand einschließlich des Zellrings abpipettiert und verworfen. Das verbliebene Zellpellet wurde mit ACD-PBS (Biochrom AG) auf ein Gesamtvolumen von 25 ml aufgefüllt, durch Schwenken des Zentrifugationsröhrchens vorsichtig gelöst und homogenisiert. Jeweils circa 12,5 ml der erhaltenen Lösung wurden vorsichtig auf je 15 ml Biocoll (Dichte 1,077 g/ml) in zwei separate Zentrifugationsröhrchen geschichtet. Ein Vermischen der beiden Schichten wurde wie auch zuvor vermieden. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 20 °C und 1000 x g für 20 min, ohne Bremse (Thermo Fisher Scientific). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet aus jedem der beiden Zentrifugationsröhrchen mit einer Pipette abgesaugt, um dieses anschließend in ein weiteres Zentrifugationsröhrchen zu überführen, welches daraufhin mit PBS (Biochrom AG) auf 50 ml aufgefüllt wurde. Ein weiterer Zentrifugationschritt (4 °C, 1000 x g, 10 min, mit Bremse) (Thermo Fisher Scientific) folgte. Der Großteil des Überstandes (circa 45 ml) wurde im darauf folgenden dekantiert und das am Boden des Röhrchens befindliche Zellpellet zusammen mit den verbliebenen circa 5 ml homogenisiert. Diese Lösung wurde mit PBS (Biochrom AG) auf 50 ml aufgefüllt und direkt nach dem sich anschließenden Zentrifugationschritt (4 °C, 400 x g, 10 min, mit Bremse) (Thermo Fisher Scientific) zügig dekantiert.

Das nun hauptsächlich aus den PBMC bestehende Zellpellet wurde im Zentrifugationsröhrchen verbleibend auf Eis gestellt, um die Zellverluste zu minimieren.

3.6 Proteinextrahierung und Western Blot Analyse zur Bestimmung der Expression von p38, pp38, ERK1/2 und pERK1/2

In Kooperation mit dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie der MLU-Halle-Wittenberg (nachfolgend „Julius-Bernstein-Institut für Physiologie“ bezeichnet) erfolgten, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Oliver Thews, die weiteren Untersuchungen an den PBMC. Diese erfolgten gemäß des im Julius-Bernstein-Institut erstellten und bereits etablierten Protokolls.

Die nachfolgend verwandten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (München, Deutschland) oder Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen, sofern es nicht anderweitig gekennzeichnet wurde.

Die gewonnenen PBMC wurden 180 min ruhig gestellt und auf zwei sterilen Petri-Schalen

verteilt. Anschließend wurden die PBMC jeweils einer Petrischale mit einer auf pH 7,4 eingestellten Bikarbonat-HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) gepufferten Ringerlösung (Pufferkapazität 5,9 mM pro pH-Einheit) 180 min inkubiert.

Analog wurden die Zellen in der jeweils anderen Petri-Schale mit einer Bikarbonat-MES (2-morpholinoethanesulfonic acid) gepufferter Ringerlösung (auf pH 6,6 justiert, Pufferkapazität 3,9 mM pro pH-Einheit) 180 min inkubiert. Die sich anschließende elektronische Zellzahlbestimmung mit dem „Casy“-System (Innovatis, Reutlingen, Deutschland) stellte ein im „Julius-Bernstein-Institut für Physiologie“ bereits etabliertes Verfahren dar. Die Zellpellets wurden nach dem ersten Zentrifugationsschritt (4 °C, 450 x g, 5 min) (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) mit 80 µl Lysepuffer 30 min auf Eis inkubiert und danach gemäß etablierten Protokoll erneut zentrifugiert. Die im weiteren Verlauf durchgeführte Proteinbestimmung erfolgte durch die ebenfalls etablierte BCA (bicinchoninic acid) -Methode (Thermo Fisher Scientific), welche auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ im basischen Milieu basiert. Es kommt dabei zur Chelatbildung von Cu⁺ mit zwei BCA-Molekülen. Diese Komplexverbindung wird bei dem spezifischen Absorptionsmaximum von 562 nm zur Proteinbestimmung genutzt [139].

Zum Auftrennen der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde eine SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide electrophoresis) durchgeführt. Für die notwendige Denaturierung der Proteine wurden diese mit Redmix (0.5 M Tris-HCl pH 6.8; 10% SDS (sodium dodecyl sulfate); 10% 2- Mercaptoethanol; 20% Glycerol; 0.01% Bromphenolblau) bei 90°C für 5 min inkubiert. Zur Auftrennung wurde ein 12 %iges Trenngel verwandt. Die Laufzeit lag bei 36 min mit 11 mA/Gel und 108 min mit 20 mA/Gel. Der Transfer der Proteine erfolgte auf Nitrozellulosemembranen (Protran, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland). Vor der Inkubation mit den Erstantikörpern gegen die oben genannten MAPKs wurden analog zum Protokoll mehrere Waschschriffe durchgeführt und die Membran für 30 min mit Blocking-Lösung (5% fettfreies Milchpulver in TBS (tris buffered saline) /Tween gelöst) blockiert. Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach drei weiteren Waschschriffen wurde mit dem Zweitantikörper Anti-rabbit-Peroxidase für 120 min in Blocking-Lösung inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem ChemiDocXRS-System (Biorad, München, Deutschland). Für die abschließende semi-quantitative Auswertung wurde die QuantityOne-Software (Biorad) genutzt [139,140].

3.7 Statistische Analyse

Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit der Statistik-Software „IBM SPSS Statistics 19“ (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland). Die Abbildungen und Tabellen wurden mit dem Tabellen-Kalkulationsprogramm „Numbers“ (Version 3.2.2, Apple Inc., Cupertino, USA) erstellt. Die Verteilung der Daten ist als arithmetischer MW (Mittelwert) \pm SEM (standard error of the mean) angegeben. Der Vergleich zwischen adipöser und normalgewichtiger Gruppe erfolgte in Abhängigkeit davon, ob eine Normalverteilung angenommen werden konnte oder nicht. Die Normalverteilung der Werte wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test geprüft. In den Fällen, in denen von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte, wurde zum Vergleich der beiden Gruppen der zweiseitige Students-t-Test mit ungleichen Varianzen durchgeführt. Dies betrifft die Auswertung der auf Abbildung 3 basierenden Daten. In den Fällen, in denen nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte, wurde der zweiseitige Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zum Vergleich durchgeführt. Dementsprechend erfolgte dieser Test für die den Abbildungen 4 und 6 bis 11 zugrundeliegenden Daten. Die Werte mit p (p-value) $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen und mit „*“ gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Stressempfinden und sportliche Betätigung

In der vorliegenden Studie gaben alle erwerbstätigen Probanden eine wöchentliche Arbeitszeit von mindestens 35 Stunden an. Hier muss jedoch berücksichtigt werden, dass zum Zeitpunkt der Befragung in der adipösen Versuchsgruppe 100 % ganztätig erwerbstätig waren, wohingegen der Anteil bei den Normalgewichtigen 71,4 % betrug, wodurch die Vergleichbarkeit der beiden Gruppen - zumindest in diesem Abschnitt - eingeschränkt ist.

Mit Hilfe des eigens individuell erstellten Fragebogens wurden, mitunter im Hinblick auf regelmäßige sportliche Betätigung und Stressempfinden im Alltag, die jeweiligen Probanden in beiden Vergleichsgruppen, auf die das Erstgenannte und/oder das Zweitgenannte zutreffend ist, registriert. Die Anzahl der adipösen und normalgewichtigen Männer, welche regelmäßig Sport treiben (≥ 1 mal pro Woche, ≥ 30 min pro Sitzung) und/oder sich in verschiedenen Aspekten des Alltags gestresst fühlen, wie zum Beispiel im Beruf oder im privaten Umfeld, wurde summiert und deren jeweiliger Anteil prozentual in den Gruppen „adipös“ und „normalgewichtig“ gegenübergestellt. In der Gruppe der adipösen Männer (92,3 %) gaben 63,7 % mehr - im Vergleich zu den Normalgewichtigen (28,6 %) - an, im Alltag gestresst zu sein. Das Stressempfinden bezog sich dabei in jedem Fall auf die berufliche Tätigkeit. Der Anteil der Probanden, welche regelmäßig Sport treiben, lag bei den normalgewichtigen Männern (50 %) 11,5 % höher, als bei den adipösen Männern (38,5 %) (siehe Abbildung 1).

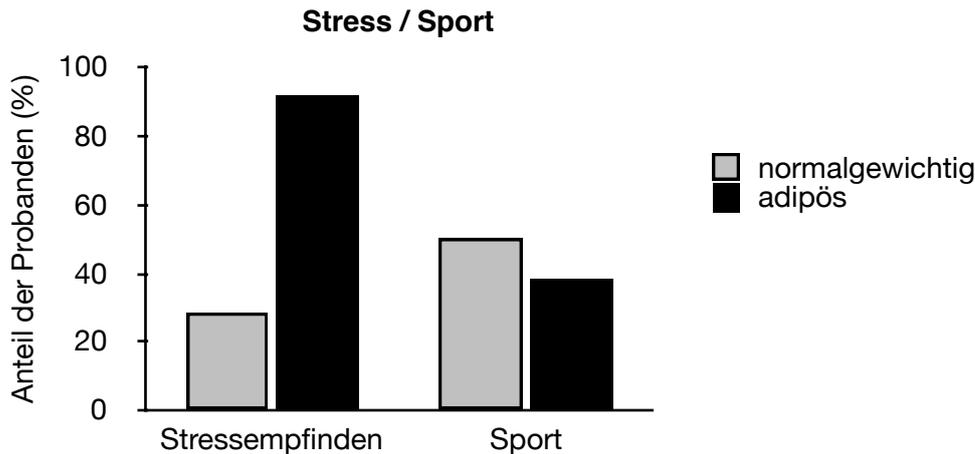


Abbildung 1: Anteil der Probanden (%), die regelmäßig Sport treiben (≥ 1 mal pro Woche, ≥ 30 min pro Sitzung) und/oder im Alltag (Beruf, privates Umfeld, Sport, Sonstige) Stress empfinden
 n (normalgewichtige Probanden) = 14
 n (adipöse Probanden) = 13

4.2 Ernährungsverhalten

Die Probanden wurden außerdem bezüglich ihres Ernährungsverhaltens befragt.

Dabei gaben sowohl 76,9 % der adipösen Männer, als auch 78,6 % der normalgewichtigen Probanden an, dass ihnen gesunde Ernährung wichtig ist (siehe Tabelle 1).

Weder bei den adipösen Männern, noch bei den Normalgewichtigen wurde ein veganes oder vegetarisches Ernährungsverhalten angegeben.

Außerdem wurden die Männer befragt, auf welche Eigenschaften der Nahrungsmittel besonders Wert gelegt wird. Dabei lag in Bezug auf vorwiegend kalorienarme Nahrungsmittel der Anteil der Adipösen (38,5 %) circa 11,5 % unter dem der normalgewichtigen Probanden (50 %). Vorwiegend kalorienreiche Lebensmittel bevorzugen lediglich 7,1 % der Normalgewichtigen und keiner unter den befragten adipösen Männern. Auf ballaststoffreiche Lebensmittel dagegen legen 30,8 % der adipösen und 42,9 % der normalgewichtigen Probanden besonderen Wert.

Weiterhin spielt ein niedriger Preis der Lebensmittel bei 23,1 % der Adipösen und bei 7,1 % der Normalgewichtigen eine wichtige Rolle.

Der Anteil der Männer, denen fetthaltige Ernährung wichtig ist, liegt in der Gruppe der adipösen Probanden bei 7,7 % und in normalgewichtigen Gruppe bei 0 %. Zudem konnte festgestellt werden, dass mit 46,2 % der Anteil adipöser Männer, die auf keine

der genannten Eigenschaften besonderen Wert legen, mehr als doppelt so hoch ist, im Vergleich zu den Normalgewichtigen (21,4 %) (siehe Tabelle 1)

Die Probanden wurden zusätzlich befragt, ob sie auch bei bereits bestehenden Sättigungsgefühl weiter Nahrung aufnehmen. Unter den adipösen Probanden lag der Anteil derer, die trotz Sättigungsgefühl weiter essen bei 23,1 % und lag damit nur geringfügig über dem Anteil der normalgewichtigen Männer (21,4%) (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Ernährungsverhalten der Probanden

	Antwort- möglichkeiten	normal- gewicht (n = 14)		adipös (n = 13)	
		Anzahl	Anteil (%)	Anzahl	Anteil (%)
Gesunde Ernährung ist wichtig	ja	11	78,6	10	76,9
	nein	3	21,4	3	23,1
Vegetarier oder Veganer	Vegetarier	0	0	0	0
	Veganer	0	0	0	0
	keines von beiden	14	100	13	100
Besonderer Wert bei der Ernährung	vorwiegend kalorienarm	7	50	5	38,5
	vorwiegend kalorienreich	1	7,1	0	0
	vorwiegend ballaststoffreich	6	42,9	4	30,8
	niedriger Preis	1	7,1	3	23,1
	fetthaltig	0	0	1	7,7
	keine Beachtung der genannten Punkte bei der Ernährung	3	21,4	6	46,2
Weitere Nahrungsaufnahme trotz Sättigungsgefühl	ja	3	21,4	3	23,1
	nein	11	78,6	10	76,9

4.3 Rauchverhalten und Alkoholkonsum

Es wurden alle Probanden zu ihrem Rauchverhalten und Alkoholkonsum befragt.

Bezüglich des Alkoholkonsums wurde nach folgenden Konsumfrequenzen differenziert: täglich / alle 2 bis 3 Tage / 1 mal pro Woche / 1 bis 2 mal pro Monat / weniger als 1 bis 2 mal pro Monat. Es stellte sich heraus, dass der Anteil der täglichen Alkoholkonsumenten bei den Adipösen (38,5 %) mehr als zweieinhalbfach höher lag, als bei den Normalgewichtigen (14,3 %). Weiterhin war der Anteil der adipösen Männer, welche alle 2 bis 3 Tage (30,8 %) beziehungsweise 1 mal pro Woche Alkohol konsumieren (7,7 %), 12,1 % beziehungsweise 20,9 % niedriger als in der normalgewichtigen Vergleichsgruppe (Alkoholkonsum alle 2 bis 3 Tage: 42,9 %; Alkoholkonsum 1 mal pro Woche: 28,6 %). Bei den adipösen Probanden, welche 1 bis 2 mal pro Monat Alkohol konsumieren, lag der Anteil bei 0 %. Dagegen betrug der Anteil der normalgewichtigen Männer mit dieser Konsumfrequenz 7,1 %. Des Weiteren konnte ermittelt werden, dass der Anteil der Normalgewichtigen (7,1 %), welche weniger als 1 bis 2 mal pro Monat Alkohol konsumieren 16 % niedriger lag, als in der adipösen Vergleichsgruppe (23,1 %) (siehe Abbildung 2).

Als Raucher wurden all diejenigen Männer eingeordnet, welche täglich mindestens eine Zigarette konsumieren, wodurch 50 % der normalgewichtigen Männer und 7,7 % der adipösen Männer gemäß des oben genannten Kriteriums als Raucher klassifiziert wurden (siehe Abbildung 2). Demnach waren in dieser Gegenüberstellung über 6 mal mehr normalgewichtige Probanden Raucher, als in der adipösen Gruppe.

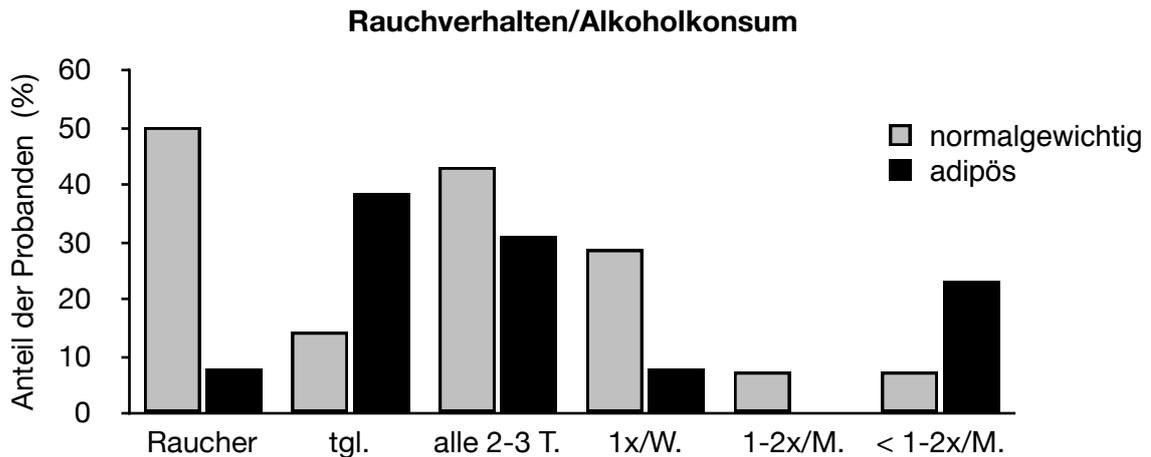


Abbildung 2: Anteil der Probanden (%), die Raucher sind (≥ 1 Zigarette pro Tag rauchen) und/oder Alkohol konsumieren, Frequenz des Alkoholkonsums: täglich (tgl.) / alle 2 bis 3 Tage (alle 2-3 T.) / 1 mal pro Woche (1x/W.) / 1 bis 2 mal pro Monat (1-2x/M.) / weniger als 1 bis 2 mal pro Monat (< 1-2x/M.)
 n (normalgewichtige Probanden) = 14
 n (adipöse Probanden) = 13

4.4 Cholesterin, HDL, LDL, Triglyzeride, Blutzucker

Es wurden nach erfolgter Blutentnahme, im Rahmen etablierter Laboruntersuchungen, die folgenden metabolischen Blutparameter quantitativ bestimmt: Cholesterin, HDL (high density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein), Triglyzeride, Blutzucker.

Im Bezug auf die quantitative Bestimmung von Cholesterin lag die durchschnittliche Konzentration bei den Normalgewichtigen (230,9 mg/dl \pm 11,8 mg/dl) 2,6 % höher, als bei den Adipösen (224,9 mg/dl \pm 10,9 mg/dl).

Die Konzentration von HDL bei den Normalgewichtigen (67,7 mg/dl \pm 5,7 mg/dl) überstieg um mehr als ein Drittel, die der adipösen Männer (50,2 mg/dl \pm 3,0 mg/dl).

Bei den Parametern LDL und Triglyzeride wurden für die normalgewichtigen Männer, im Vergleich zu den adipösen Männern, niedrigere Werte festgestellt. Im Einzelnen lag die Konzentration bei den Normalgewichtigen für die Triglyzeride (154,4 mg/dl \pm 26,5 mg/dl) 36,3 % unter jenem Wert in der adipösen Vergleichsgruppe (242,5 mg/dl \pm 42,2 mg/dl). In Bezug auf LDL war die durchschnittliche Konzentration bei den normalgewichtigen Probanden (127,6 mg/dl \pm 10,0 mg/dl) 5,5 % höher, als bei den Adipösen (135 mg/dl \pm 8,7 mg/dl) (siehe Abbildung 3).

Der Mittelwert für den Blutzucker lag in der normalgewichtigen Gruppe ($5,7 \text{ mmol/l} \pm 0,4 \text{ mmol/l}$) 13,6 % unter dem entsprechenden Wert der adipösen Männer ($6,6 \text{ mmol/l} \pm 0,6 \text{ mmol/l}$) (siehe Abbildung 4).

Im Falle von HDL konnte eine signifikante Differenz zwischen der adipösen und der normalgewichtigen Probandengruppe ausgemacht werden ($p = 0,013$). Die Ergebnisse für Cholesterin ($p = 0,714$), LDL ($p = 0,581$), Triglyzeride ($p = 0,124$) und Blutzucker ($p = 0,091$) erreichten jedoch nicht das Signifikanzniveau ($p < 0,05$).

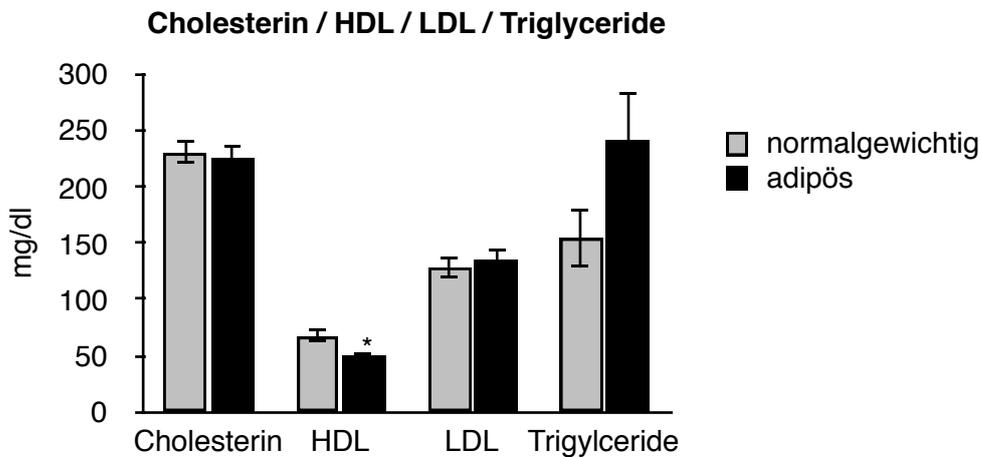


Abbildung 3: Konzentration (mg/dl) im Serum der nüchternen Probanden;
Parameter: Cholesterin / HDL / LDL / Triglyzeride; MW \pm SEM
* = statistisch signifikant ($p < 0,05$)
n (normalgewichtige Probanden) = 14
n (adipöse Probanden) = 13

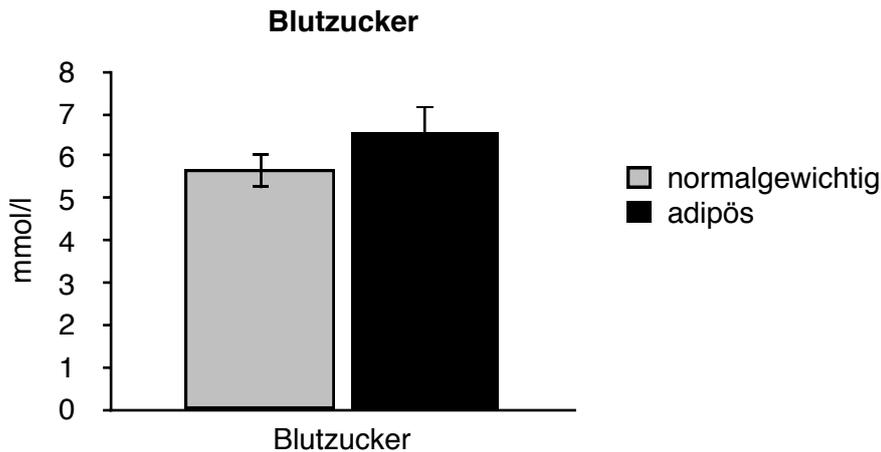


Abbildung 4: Konzentration (mmol/l) im Serum der nüchternen Probanden;
Parameter: Blutzucker; MW \pm SEM
n (normalgewichtige Probanden) = 14
n (adipöse Probanden) = 13

4.5 Familiäre Krebserkrankungen und Übergewichtigkeit

Im Rahmen der schriftlich durchgeführten Befragung wurde die Anzahl der Familienmitglieder (Geschwister, Kinder und Eltern), welche übergewichtig und/oder an einer Krebserkrankung leiden beziehungsweise litten, jedes Probanden bestimmt. Daraus wurde jeweils der Mittelwert berechnet.

In der Gruppe der adipösen Männer lag die durchschnittliche Anzahl der übergewichtigen Familienmitglieder bei 2 und war damit viermal höher als in der normalgewichtigen Gruppe, mit durchschnittlich 0,5 übergewichtigen Familienmitgliedern (siehe Abbildung 5).

Im Bezug auf die Familienmitglieder mit einer Krebserkrankung konnten wir bei den adipösen Probanden (0,5) eine 28,6 % niedrigere Anzahl im Vergleich zu den normalgewichtigen Männern (0,7) feststellen (siehe Abbildung 5).

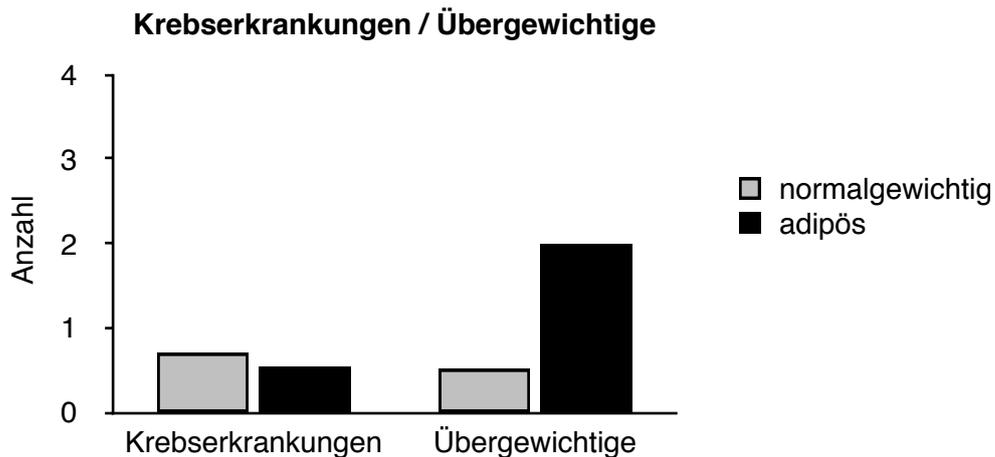


Abbildung 5: Anzahl der Familienmitglieder (Geschwister, Kinder, Eltern), die übergewichtig sind und/oder an einer Krebserkrankung leiden/litten;
 n (normalgewichtige Probanden) = 14
 n (adipöse Probanden) = 13

4.6 Relative Expression von ERK1/2 und pERK1/2 bei physiologischen und azidotischen extrazellulären pH-Wert

Bei der Auswertung der Laborergebnisse in Bezug auf die MAPKs ERK1/2, pERK1/2, p38 und pp38 wurden zunächst die absoluten Expressionswerte für die MAPKs bestimmt. Um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen der normalgewichtigen und der adipösen Gruppe zu erreichen, wurden alle Expressionswerte relativiert. Als Vergleichswerte wurden die jeweiligen Daten für die normalgewichtigen Probanden gleich 100 % gesetzt. Bei der Auswertung der Laborergebnisse wurde sowohl die relative Expression der MAPKs in der jeweiligen inaktiven Form (ERK1/2, p38), als auch die der aktiven (phosphorylierten) Form (pERK1/2, pp38) in der adipösen und der normalgewichtigen Gruppe bestimmt. Die relative Expression bei den normalgewichtigen Probanden wurde als Vergleichswert gleich 100 % gesetzt. Darüber hinaus haben wir die relative Expression der entsprechenden aktiven Formen mit der relativen Gesamtexpression der MAPKs ins Verhältnis gesetzt (pERK1/2 / ERK1/2, pp38 / p38). Ziel dieser Quotientenbildung war es, Rückschlüsse auf eine eventuelle Beeinflussung der Aktivierbarkeit der MAPKs in Abhängigkeit von BMI, als auch von dem extrazellulären pH-Wert, treffen zu können. Die Bestimmung der oben genannten

relativen Expressionen erfolgte unter einem physiologischen extrazellulären pH-Wert (7,4) sowie unter einem azidotischen extrazellulären pH-Wert (6,6). Des Weiteren wurden die Ergebnisse bei beiden pH-Werten miteinander ins Verhältnis gesetzt (pH 6,6 / pH 7,4), um damit Hinweise für eine mögliche Beeinflussung der relativen Expression der MAPKs durch ein azidotisches extrazelluläres Milieu zu erhalten. Auf die Ergebnisse in Bezug auf die p38 MAPK wird im darauffolgenden Abschnitt (4.7) detailliert eingegangen.

Im Einzelnen war in Bezug auf ERK1/2, die relative Expression in der Gruppe der adipösen Probanden bei pH 7,4 (70,6 % ± 8,8 %) um knapp ein Drittel (29,4 %) und bei pH 6,6 (78,7 % ± 9,1 %) um mehr als ein Fünftel (21,3 %) im Vergleich zu den normalgewichtigen Männern reduziert. Bezogen auf die Ergebnisse bei pH 6,6 gegenüber pH 7,4 (pH 6,6 / pH 7,4) war in der adipösen Gruppe (108,9 % ± 4,4 %) die Expression um 8,9 % gegenüber den Normalgewichtigen erhöht (siehe Abbildung 6). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den normalgewichtigen und adipösen Probanden bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 ($p = 0,068$) ermittelt werden, jedoch wurde eine deutliche Tendenz, im Sinne einer verringerten Expression von ERK1/2 bei den adipösen Probanden, erkennbar. Sowohl bei pH 6,6 ($p = 0,215$), als auch in Abhängigkeit vom pH-Unterschied (pH 6,6 / pH 7,4) ($p = 0,182$) waren die Differenzen zwischen beiden Gruppen nicht statistisch signifikant.

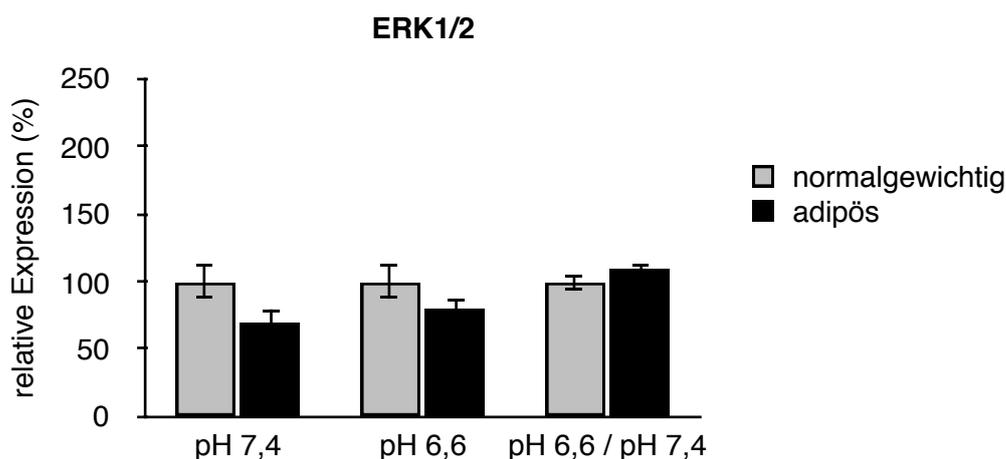


Abbildung 6: Relative Expression (%) von ERK1/2 bei pH 7,4; pH 6,6; pH 6,6 / pH 7,4; MW ± SEM
n (normalgewichtige Probanden) = 14
n (adipöse Probanden) = 13

Im Falle der aktiven Form pERK1/2 konnte man bei pH 7,4 eine um 18,2 % niedrigere relative Expression in der adipösen Gruppe (81,8 % ± 13,7 %) feststellen, wohingegen sowohl bei pH 6,6, als auch bei pH 6,6 / pH 7,4 die relative Expression bei den Adipösen, die der Normalgewichtigen um 20,4 % (pH 6,6: 120,4 % ± 31 %) und 83,4 % (pH 6,6 / pH 7,4: 183,4 % ± 50,8 %) überstieg (siehe Abbildung 7).

Es konnte weder bei pH 7,4 ($p = 0,827$), pH 6,6 ($p = 0,68$), noch bei pH 6,6 / pH 7,4 ($p = 0,369$) ein statistisch signifikanter Unterschied ausgemacht werden.

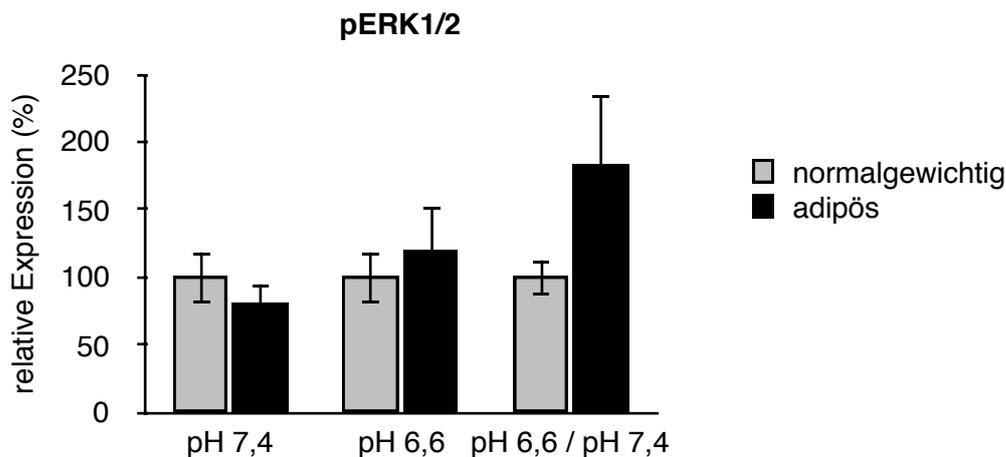


Abbildung 7: Relative Expression (%) von pERK1/2 bei pH 7,4; pH 6,6; pH 6,6 / pH 7,4; MW ± SEM
 n (normalgewichtige Probanden) = 14
 n (adipöse Probanden) = 13

Darüber hinaus wurde die relative Expression in Bezug auf die Aktivierbarkeit der ERK1/2-MAPK (pERK1/2 / ERK1/2) untersucht.

Sowohl bei pH 7,4, pH 6,6 als auch bei beim Vergleich der Werte in Abhängigkeit vom pH-Unterschied (pH 6,6 / pH 7,4) lag die relative Expression bei den adipösen Männern über der der Normalgewichtigen. Im Einzelnen war die relative Expression bei pH 7,4 um 5,4 % (105,4 % ± 16,8 %), bei pH 6,6 um 33,7 % (133,7 % ± 35,1 %) und bei pH 6,6 / pH 7,4 um 62,2 % (162,2 % ± 39,9 %) erhöht (siehe Abbildung 8).

In keinem der genannten Fälle konnte ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ermittelt werden ($p_{\text{pH } 7,4} = 0,752$; $p_{\text{pH } 6,6} = 0,512$; $p_{\text{pH } 6,6 / \text{pH } 7,4} = 0,452$).

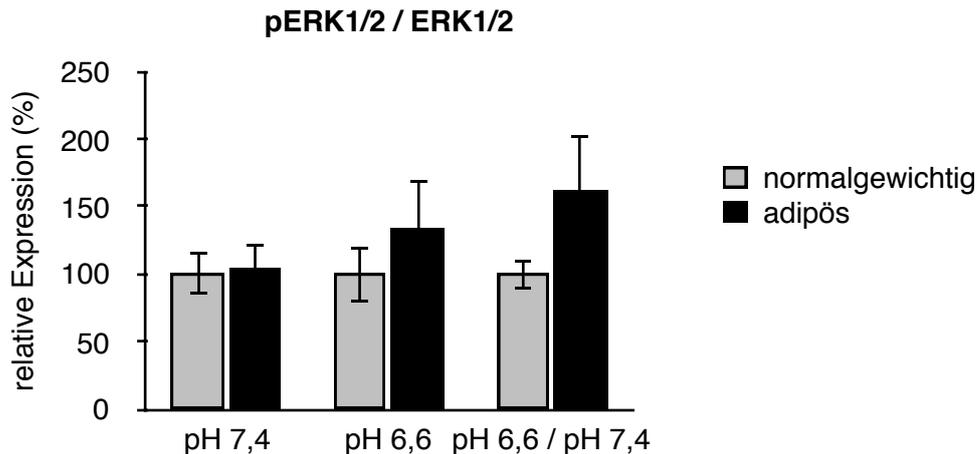


Abbildung 8: Relative Expression (%) von pERK1/2 / ERK1/2 bei pH 7,4; pH 6,6; pH 6,6 / pH 7,4; MW \pm SEM
 n (normalgewichtige Probanden) = 14
 n (adipöse Probanden) = 13

4.7 Relative Expression von p38 und pp38 bei physiologischen und azidotischen extrazellulären pH-Wert

Die Bestimmung der relativen Expression von p38, pp38 sowie der Aktivierbarkeit dieser MAPK (pp38 / p38) erfolgte analog der in Abschnitt 4.5 beschriebenen Vorgehensweise. Aufgrund von verfahrenstechnischen Komplikationen mit den Zellpellets von 2 adipösen Probanden war eine Bestimmung der Expressionen von p38, pp38 und pp38/p38 dieser Probanden nicht möglich. Daher erfolgte die Erfassung der Expressionen von p38, pp38 und pp38/p38 von 11 adipösen und 14 normalgewichtigen Probanden.

Die MAPK p38 wurde sowohl bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4, als auch bei pH 6,6 in der Gruppe der adipösen Probanden schwächer exprimiert, als bei den normalgewichtigen Probanden. Die relative Expression war in der adipösen Gruppe bei pH 7,4 (61,8 % \pm 14,6 %) um mehr als ein Drittel (38,2 %) und bei pH 6,6 (56,1 % \pm 14,4 %) um mehr als zwei Fünftel (43,9 %), im Vergleich zu den Normalgewichtigen, reduziert. In Abhängigkeit vom pH-Unterschied (pH 6,6 / pH 7,4) wurde p38 bei den Adipösen lediglich um 2,7 % (97,3 % \pm 13,1 %) weniger exprimiert (siehe Abbildung 9). Diese Ergebnisse waren nicht statistisch signifikant ($p_{\text{pH } 7,4} = 0,198$; $p_{\text{pH } 6,6} = 0,239$; $p_{\text{pH } 6,6 / \text{pH } 7,4} = 0,763$).

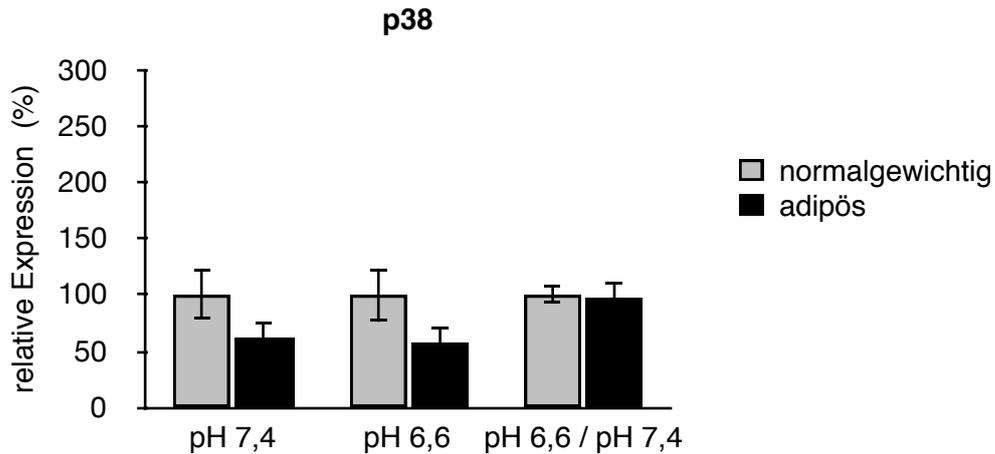


Abbildung 9: Relative Expression (%) von p38 bei pH 7,4; pH 6,6; pH 6,6 / pH 7,4; MW \pm SEM
 n (normalgewichtige Probanden) = 14
 n (adipöse Probanden) = 11

Bei der phosphorylierten - und somit aktiven - Form von p38 überstieg die relative Expression in der adipösen Gruppe die der Normalgewichtigen bei pH 7,4 um 6,2 % (106,2 % \pm 19 %) und bei pH 6,6 um 2 % (102 % \pm 16,5 %). Dagegen konnte man bei den Adipösen, in Abhängigkeit vom pH-Unterschied (pH 6,6 / pH 7,4), eine im Vergleich um 7,7 % (92,3 % \pm 11,5 %) reduzierte relative Expression von pp38 ausmachen (siehe Abbildung 10).

Es konnten jedoch keine statistisch signifikanten Differenzen zwischen adipösen und normalgewichtigen Männern festgestellt werden ($p_{\text{pH } 7,4} = 0,848$; $p_{\text{pH } 6,6} = 0,763$; $p_{\text{pH } 6,6 / \text{pH } 7,4} = 0,427$).

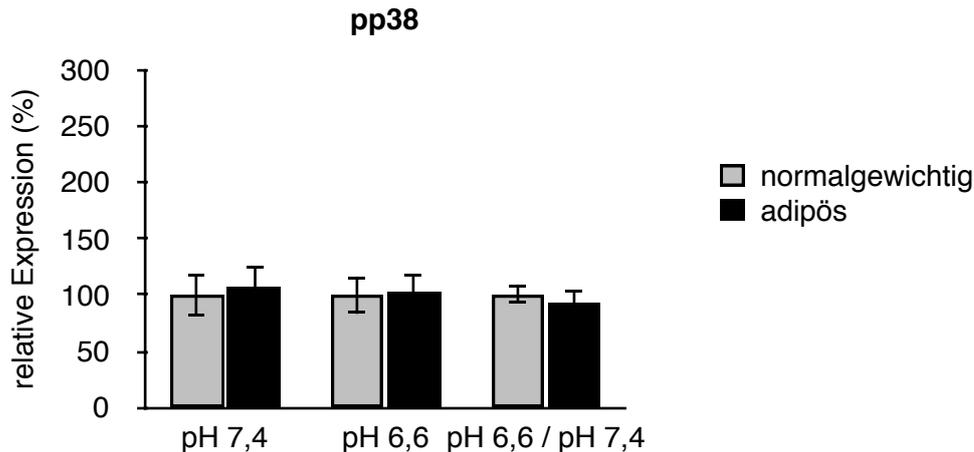


Abbildung 10: Relative Expression (%) von pp38 bei pH 7,4; pH 6,6; pH 6,6 / pH 7,4; MW \pm SEM
 n (normalgewichtige Probanden) = 14
 n (adipöse Probanden) = 11

Außerdem wurde die relative Expression in Bezug auf die Aktivierbarkeit von p38 (pp38 / p38) bestimmt. Die relative Expression war bei den adipösen Probanden im physiologischen pH von 7,4 (209,9 % \pm 39,4 %) mehr als doppelt so hoch gegenüber der normalgewichtigen Vergleichsgruppe. Außerdem lag die relative Expression bei einem extrazellulären pH-Wert von 6,6 in der adipösen Gruppe 112,7 % (212,7 % \pm 59,4 %) über der der normalgewichtigen Probanden. Damit war der Expressionsunterschied bei pH 6,6 sogar noch leicht größer, als bei pH 7,4. Bei der Untersuchung auf einen eventuellen Einfluss des azidotischen Milieus im Vergleich zum physiologischen pH-Wert (pH 6,6 / pH 7,4) konnte lediglich eine um 2,4 % (97,6 % \pm 10,7 %) reduzierte Expression bei den adipösen Probanden festgestellt werden, was auf einen - wenn überhaupt - unwesentlichen Einfluss des azidotischen Milieus hinweist (siehe Abbildung 11).

Der Expressionsunterschied zwischen beiden Vergleichsgruppen war bei pH 7,4 statistisch signifikant ($p = 0,023$). Im Falle der Expressionsdifferenz bei pH 6,6 konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ausgemacht werden ($p = 0,066$). Die Ergebnisse bei pH 6,6 verfehlten jedoch nur knapp das Signifikanzniveau ($p < 0,05$) und zeigen damit zumindest einen Trend, im Sinne einer im Vergleich erhöhten Aktivierbarkeit von p38 (pp38 / p38) der adipösen Männer in einem azidotischen Milieu. In Bezug auf den Einfluss des pH-Unterschiedes (pH 6,6 / pH 7,4) war kein signifikanter Unterschied nachweisbar ($p = 0,978$).

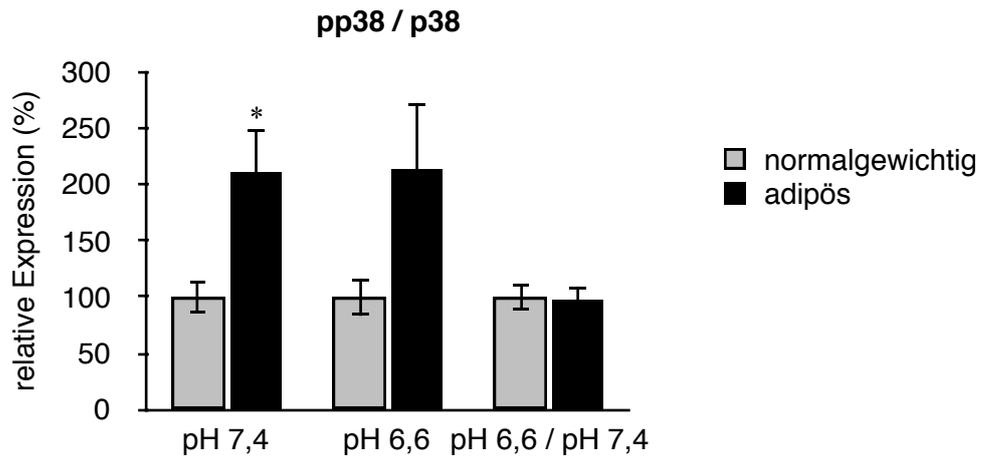


Abbildung 11: Relative Expression (%) von pp38 / p38 bei pH 7,4; pH 6,6; pH 6,6 / pH 7,4; MW \pm SEM
* = statistisch signifikant ($p < 0,05$)
n (normalgewichtige Probanden) = 14
n (adipöse Probanden) = 11

5 Diskussion

Die vorliegende Studie konzentrierte sich auf die in vitro Beeinflussung - der für eine Vielzahl von Zellfunktionen bedeutenden - MAPKs ERK1/2 und p38 humaner PBMC, sowohl in einer extrazellulären Tumorazidose, als auch in einem Milieu mit physiologischen pH-Wert (7,4). Zusätzlich wurde mit der Unterteilung der Probanden anhand ihres BMI in eine adipöse und eine normalgewichtige Gruppe untersucht, ob Adipositas möglicherweise einen modulierenden Faktor bei der Expression von ERK1/2 und/oder p38, deren jeweilige aktivierte Form und Aktivierbarkeit, darstellt. Außerdem wurde unter anderem durch Befragung der Probanden untersucht, ob sich Hinweise auf Differenzen zwischen den beiden Gruppen bezüglich verschiedener Faktoren, wie beispielsweise psychosozialer Stress, Rauchen und Alkoholkonsum, feststellen lassen.

Die Rolle der PBMC in einem Tumor assoziierten, azidotischen Milieu und der Zusammenhang zwischen Aktivität der ERK1/2- und p38- Signalkaskaden dieser Zellen und Adipositas, als immunrelevanter Faktor, sind derzeit noch nicht genau erforscht.

Ziel der vorliegenden Studie war es somit, Hinweise auf mögliche Zusammenhänge festzustellen, um einen Anhalt für weitere, spezifischere Forschungen an Subpopulationen der PBMC zu erhalten.

Im Hinblick auf das psychosoziale Stressempfinden konnte ein interessanter Unterschied zwischen der adipösen und der normalgewichtigen Probandengruppe herausgearbeitet werden.

Bei den adipösen Männern gaben nahezu alle Probanden (92,3 %) an, im Alltag gestresst zu sein, wohingegen sich unter den Normalgewichtigen nur rund ein Drittel (28,6 %) der Probanden alltäglich gestresst fühlt. Das Stressempfinden bezog sich in jedem Fall auf den ausgeübten Beruf. Der deutliche Unterschied zwischen adipösen und normalgewichtigen Männern könnte Assoziation zwischen dem wahrgenommenen psychosozialen Stress und Adipositas hindeuten. Aufgrund der partiell zum Befragungszeitpunkt bestehenden Erwerbslosigkeit in der normalgewichtigen Gruppe (Anteil der Erwerbstätigen 71,4 %), als auch wegen der vergleichsweise geringen Fallzahl (N = 27) der vorliegende Studie, ist dieses Ergebnis nur sehr eingeschränkt aussagefähig.

Andere Studien zeigten allerdings eine ähnlich positive Assoziation von psychosozialen Stress mit einer Gewichtszunahme [141-144] beziehungsweise mit Adipositas [145,146].

In einer umfangreichen Analyse, in der unter anderem vier Verlaufsstudien einbezogen waren, konnte ebenso eine Korrelation, speziell zwischen beruflichen Stress und Adipositas festgestellt werden. Veränderungen von nicht-adipös hin zu adipös waren mit jenen Probanden assoziiert, welche im Verlauf, jedoch nicht zu Beginn der Studien, beruflichen Stress empfanden. Überraschenderweise war das Stressempfinden bei denjenigen Probanden, die sich von initial adipös hin zu nicht-adipös entwickelten, und zu Beginn der Studien keinem beruflichen Stress ausgesetzt waren, mit einer Gewichtsabnahme assoziiert [147].

Die von uns durchgeführte Studie zeigt dagegen den Ist-Zustand zum Zeitpunkt der Befragung, weswegen keine Aussage zum Gewichtsverhalten über einen Zeitraum gemacht werden kann.

Die Angaben in der Literatur zu einer Geschlechtsspezifität sind nicht einheitlich.

In einigen Studien konnte eine stärkere positive Assoziation zwischen Stressinput und Gewichtszunahme bei Männern ausgemacht werden [141,146], wohingegen ebenso Literaturangaben vorliegen, welche einen stärkeren Effekt beim weiblichen Geschlecht zeigen [148,149]. Im Rahmen der „Whitehall II Studie“ wurde nur bei Männern, welche initial einen BMI $> 27 \text{ kg/m}^2$ aufwiesen, eine stressassoziierte Gewichtszunahme festgestellt, wohingegen ein BMI $< 22 \text{ kg/m}^2$ mit einer Gewichtsabnahme assoziiert war [141]. Dagegen kamen mehrere Untersuchungen zu dem Schluss, dass keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bestehen [143,144,147].

Zu geschlechtsspezifischen Unterschieden konnte, aufgrund der Auswahl von ausschließlich männlichen Probanden, in der vorliegenden Studie keine Aussage getroffen werden.

Die Art des Stressfaktors kann scheinbar unterschiedlichen Einfluss auf das Gewichtsverhalten haben [150], was eine mögliche Erklärung für die differenten Ergebnisse dieser Studien sein könnte.

Das Ernährungsverhalten kann durch Stress nachweislich beeinflusst werden. Demnach ändert sich die Präferenz hin zu hoch fett- [151-154] und zuckerhaltigen [151,155] Nahrungsmitteln, was wiederum die allgemeine Gewichtszunahme begünstigen kann [151]. In diesem Zusammenhang wurde beispielsweise mehrfach eine positive Assoziation zwischen Belastung im Beruf und Fettaufnahme über die Nahrung festgestellt [156,157]. In der vorliegenden Studie konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden. Keiner der befragten adipösen Männer gab an, auf kalorienreiche Nahrungsmittel bei der Ernährung zu achten und lediglich ein adipöser Proband legt bei der Ernährung besonderen Wert auf fetthaltige Nahrungsmittel. Aufgrund der niedrigen Fallzahl dieser Studie haben diese Ergebnisse jedoch nur begrenzte Aussagekraft.

Eine mögliche Ursache für die besonders durch chronischen Stress induzierte Nahrungsaufnahme scheint eine Reaktion der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, als wichtige Regulationsinstanz für Stress- und Ernährungsverhalten, zu sein [151,158,159]. Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse scheint vor allem bei Individuen mit einer viszeralen Fettleibigkeit eine erhöhte Aktivität aufzuweisen [159]. Bestandteile der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse stellen anatomische Strukturen dar, in der sowohl wichtige Regulationsinstanzen für Stressreaktionen, als auch für das Ernährungsverhalten eng beieinander lokalisiert sind [160,161].

In der Folge des Stressinputs kommt es zu verstärkter Freisetzung von CRH (corticotropin-releasing hormone) aus dem Hypothalamus. Daraus resultiert die vermehrte Freisetzung von ACTH (adrenocorticotropic hormone), was wiederum in der Nebennierenrinde die Synthese von Kortisol stimuliert [160]. Daraus resultiert eine erhöhte Sekretion dieses Glukokortikoids [151,155,159,160,162]. Die Glukokortikoide können mit Neuropeptid Y [163-165], CRH, Leptin [161,163] sowie Insulin [161,166] interagieren und dadurch Einfluss auf das Ernährungsverhalten haben [161,165]. Dabei konnte bei Frauen, welche eine erhöhte stress-assoziierte Kortisolausschüttung aufweisen, eine gesteigerte, Stress induzierte Nahrungsaufnahme gezeigt werden [167]. Zudem fördern Glukokortikoide die Differenzierung von Adipozytenvorläufern zu Adipozyten, was wiederum zur Gewichtszunahme beiträgt [168].

Die Reaktion der Hypophysen-Hypothalamus-Nebennieren-Achse auf Stress ist in Bezug auf die Kortisolausschüttung interindividuell sehr different [169,170].

Die Differenzierung der Individuen in zwei unterschiedliche Reaktionstypen spielt für das Verständnis dieser Mechanismen eine wichtige Rolle. Die Unterscheidung erfolgt

in eine Gruppe, die auf psychosozialen Stress mit einer hohen Kortisolausschüttung reagieren und in eine zweite Gruppe, die auf entsprechenden Stress mit einer vergleichsweise geringen Freisetzung von Kortisol reagieren. Im Einzelnen ist besonders bei denen, welche eine hohe Kortisolreaktivität aufweisen, die Freisetzung von Kortisol mit einer gesteigerten Kalorienaufnahme, im Gegensatz zu den geringer Reagierenden, assoziiert [152,155,167]. Allgemein scheinen jedoch Männer, verglichen mit Frauen, mit einer stärkeren Kortisolausschüttung auf Stress zu reagieren [171,172]. Des Weiteren findet man in der Literatur Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem wahrgenommenen psychosozialen Stress und verschiedenen Stoffwechselfparametern. Es konnte zum Beispiel eine positive Korrelation zwischen dem empfundenen Stress und dem Triglyzeridspiegel festgestellt werden [173].

Eine derartige positive Tendenz zwischen dem wahrgenommenen psychosozialen Stress und der durchschnittlichen Triglyzeridkonzentration konnte auch in dieser Studie bei den adipösen Probanden festgestellt werden. Die Konzentration der Triglyzeride war bei den Adipösen im Vergleich zu den Normalgewichtigen deutlich erhöht. Es konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied ausgemacht werden. Gründe für das verpasste Signifikanzniveau sind vermutlich die geringe Stichprobengröße und die deutlichen Schwankungen der Messwerte. Die scheinbar positive Assoziation zwischen Stressempfinden und Triglyzeridkonzentration bei den adipösen Männern hat somit nur geringe Aussagekraft und keine statistische Relevanz.

Im Rahmen der weiteren Bestimmung von stoffwechselrelevanten Blutwerten konnte für die durchschnittliche Konzentration von HDL, jedoch nicht für die von LDL, Cholesterin und Blutzucker, ein statistisch bedeutsamer Unterschied zwischen beiden Gruppen dargelegt werden. Bei den Adipösen wurde eine im Vergleich mehr als ein Drittel niedrigere Konzentration festgestellt ($p = 0,013$). Die inverse Korrelation zwischen HDL-Spiegel und Adipositas deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien [174,175]. Darüber hinaus zeigte eine andere Studie eine positive Assoziation zwischen dem Triglyzerid/HDL- Verhältnis und BMI [176].

Somit konnte diese Studie auf eine scheinbar positive Assoziation zwischen Adipositas und Stressempfinden hinweisen und die inverse Assoziation zwischen Adipositas und HDL-Konzentration bestätigen.

Eine bereits mehrfach in anderen Studie nachgewiesene Korrelation zwischen dem mit Stress vergesellschafteten Kortisolspiegel und erniedrigtem HDL-Spiegel wäre in diesem Zusammenhang ebenso denkbar [177-181]. Diese Annahme hat allerdings,

wegen der nicht erfolgten Bestimmung der Kortisolkonzentration und der niedrigen Fallzahl (N = 27), nur hypothetischen Charakter.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass in der Gruppe der normalgewichtigen Männer jeder Zweite als Raucher (≥ 1 Zigarette pro Tag) eingestuft wurde, wohingegen in der adipösen Gruppe der Anteil der Raucher bei lediglich 8 % lag. Dies könnte auf eine höhere Prävalenz von normalgewichtigen männlichen Rauchern hindeuten. Das Ergebnis ist aufgrund der geringen Fallzahl der Studie jedoch nicht statistisch repräsentativ und damit nur eingeschränkt aussagefähig.

Eine inverse Assoziation zwischen Rauchen und BMI wurde bereits gezeigt [182].

Es konnte außerdem in einer mehr als 280000 Männer umfassenden Studie gezeigt werden, dass aktive Raucher nicht nur im Vergleich zu Nichtrauchern, sondern auch gegenüber ehemaligen Rauchern einen niedrigeren BMI aufweisen. Der BMI lag durchschnittlich bei 27 kg/m² in der Gruppe der ehemaligen Raucher und bei 26,3 kg/m² in der Nichtrauchergruppe. Dagegen lag der BMI in der Gruppe der aktiven Raucher bei durchschnittlich 25,9 kg/m² [183].

Über die Bedeutung der p38- und ERK1/2-MAPK in PBMC in Tumoren ist bisher nur wenig bekannt.

Viele Studien konzentrieren sich bisher auf die TAMs (tumor-associated macrophages), welchen eine Bedeutung in Bezug auf Tumorwachstum [119,184-188] und Metastasierung zukommt [184,186,189]. Mehrfach wurde gezeigt, dass die Anwesenheit dieser Makrophagen mit einer schlechteren Prognose für verschiedenste Karzinome einhergeht [190-192].

Laut Literatur ist in diesem Zusammenhang die prinzipielle Unterscheidung der Makrophagen in M1 (classically activated phenotype)-polarisierte Makrophagen, welche proinflammatorische und zytotoxische Funktionen besitzen, und M2 (alternatively activated phenotype)-polarisierte Makrophagen, die sowohl in der Wundheilung, als auch in der Modifikation von Inflammationsreaktionen entscheidend sind, wichtig [193-198]. Mehrere Studien stellten fest, dass speziell M2-polarisierte TAMs die Progression von Karzinomen fördern [193,199-201]. Darüber hinaus wurde mehrfach auf eine mögliche zentrale Rolle von M2-polarisierten TAMs für die lymphogene Metastasierung von Pankreaskarzinomen hingewiesen [202,203]. In diesen Untersuchungen zeigten sich Assoziationen zwischen Infiltration der regionären

Lymphknoten des Pankreas durch M2-polarisierten TAMs und einer vermehrten Lymphangiogenese in den Lymphknoten [202]. Zudem könnte die erhöhte Dichte von Lymphgefäßen, sowohl mit einer erhöhten Zahl M2-polarisierter TAMs, als auch mit der lymphogenen Metastasierung des Pankreaskarzinoms in Verbindung stehen [203].

Die TAMs können unter anderem durch verstärkte Sekretion von VEGF [185,204,205] und der damit verbundenen Aktivierung der Angiogenese, das Tumorstadium begünstigen [119,185,186,192,204,206-208]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass VEGF die Migration von Makrophagen in wenig vaskularisierte Areale des Mammakarzinoms stimuliert [204,205].

Außerdem finden sich aktuelle Angaben, dass es bei einer übermäßigen Expression des HOXB7-Gens in Mamma-CA-Zellen zur vermehrten Akkumulation von M2-polarisierten TAMs kommt. Die Vermittlung erfolgt via TGF- β . Dieser Zusammenhang könnte auch bei der Metastasierung des Mammakarzinoms von Bedeutung sein [209]. Eine andere Studie kam zu dem Schluss, dass das von den TAMs freigesetzte IL-2 die Ausbreitung von Karzinomstammzellen zu begünstigen scheint, was möglicherweise auch zur Progression des hepatozellulären Karzinoms beiträgt [210].

Bezugnehmend auf das Basalzellkarzinom wirkt sich die TAM induzierte, COX-2 abhängige, Freisetzung von MMP 9 begünstigend auf die Invasion und damit auch auf die Progression dieses Karzinoms aus [207].

Die p38-MAPK in Makrophagen hat unter anderem durch die Stimulation der PGE₂-Freisetzung in Makrophagen eine entscheidende Bedeutung in der Modulation inflammatorischer Reaktionen [119-121], was scheinbar auch im Tumormilieu gilt. Die PGE₂- und MMP 9-Sekretion dieser Zellen könnte zudem einen Trigger für die Angiogenese und Progression von Tumoren darstellen [119].

In Karzinomzellen hat die p38-Signalkaskade scheinbar deutlich differente Funktionen. In der Literatur finden sich dabei Angaben, die sowohl auf eine positive Beeinflussung der Tumorstadium, durch Steigerung der MMP 9-Expression [122-124], als auch auf eine tumorinhibierende Wirkung hinweisen [125].

Der p38-Signalweg hat durch Initiation der Freisetzung von Th1- und Th2-Zytokinen vermutlich auch eine Bedeutung bei der Vermittlung von inflammatorischen Reaktionen in humanen PBMC [126]. Diese Zytokine werden verstärkt von PBMC freigesetzt, die von Lungenkarzinompatienten stammen [127]. Daraus lässt sich auf eine mögliche Rolle der PBMC bei immunologischen Reaktionen in Karzinompatienten schließen. Eine entsprechende Beeinflussung durch die p38-MAPK in PBMC scheint in diesem Zusammenhang möglich zu sein.

Das azidotische Milieu in soliden Tumoren stellt einen wichtigen Faktor für deren Progression dar. Der pH-Wert in diesen Tumoren liegt zwischen 6,5 und 6,8. Die inadäquate Blutversorgung des Tumors führt zu einer ungenügenden Sauerstoffversorgung und somit zur Hypoxie. Daraus resultierend wird vermehrt Energie durch anaerobe Glykolyse erzeugt, welche zur ebenso gesteigerten Laktatproduktion führt, die wiederum die extrazelluläre Azidose bedingt [68].

Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass die extrazelluläre Azidose in AT1-Prostatakarzinomzellen zur - p38-vermittelten - verstärkten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika führt. In diesem Zusammenhang war die gesteigerte P-Glykoprotein-Aktivität entscheidend für die Resistenzentstehung [63,74]. Die extrazelluläre Azidose führt bei diesen Prostata-CA-Zellen auch zur Erhöhung derer Migrationsgeschwindigkeit [73].

Daneben begünstigt die extrazelluläre Azidose in Melanometastasen die Zerstörung der extrazellulären Matrix via MMP-9 [75,76].

Unter anderem aufgrund dieser Forschungsergebnisse richtete sich das Augenmerk dieser Studie speziell auf die PBMC in Verbindung mit der extrazellulären Tumor-Azidose.

In der vorliegenden In-vitro-Studie wurden daher erstmals PBMC, sowohl von adipösen als auch normalgewichtigen Männern, einem azidotischen Milieu ausgesetzt, um eine eventuelle Assoziation zum Body-Mass-Index zu prüfen. In diesem Zusammenhang wurde die relative Expression von p38 und ERK1/2, deren jeweilige aktive Form (pp38 und pERK1/2) sowie die Aktivierbarkeit dieser MAPKs in den PBMC beider Probandengruppen bestimmt.

Die Aktivierbarkeit dieser MAPKs ist in diesem Zusammenhang ein Indikator dafür, wie stark der jeweilige MAPK-Signalweg in Abhängigkeit von pH-Wert und BMI aktiviert wird und damit möglicherweise auch verstärkt bei der Beeinflussung von Tumoren sowie bei der Unterhaltung und Initiation von Inflammationsreaktionen relevant sein könnte.

In der vorliegenden Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass die Aktivierbarkeit der p38-MAPK bei den PBMC der adipösen Männer, im Vergleich zu den PBMC der Normalgewichtigen, signifikant erhöht ist. Das Verhältnis der Expression zwischen aktiver Form und Gesamt-p38 (pp38 / p38) war in den PBMC der adipösen Probanden, stark zugunsten der aktiven Form (pp38) verändert. Sowohl bei pH 7,4 als auch bei pH 6,6 überstieg die relative Expression von pp38 / p38 bei den Adipösen (jeweils um mehr als 100 %) die der normalgewichtigen Probanden.

Neben dem bei pH 7,4 festgestellten statistischen signifikanten Unterschied ($p = 0,023$) zwischen beiden Gruppen, spricht auch der deutliche Expressionsunterschied bei pH 6,6 ($p = 0,066$), welcher nur knapp das Signifikanzniveau ($p < 0,05$) verfehlte, für eine erhöhte Aktivierbarkeit der p38-MAPK-Signalkaskade bei den adipösen Männern in einem tumorähnlichen, azidotischen Milieu.

Es konnte jedoch kein relevanter Unterschied bezüglich der relativen Expression in Abhängigkeit vom pH-Unterschied (pH 7,4 / pH 6,6) festgestellt werden. Der untersuchte pH-Unterschied scheint somit keinen bedeutsamen Einfluss auf die Expressionen dieser MAPKs zu haben.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der p38-MAPK in PBMC adipöser Männer, im Vergleich zu den Normalgewichtigen, möglicherweise eine stärkere Bedeutung zukommt. Dies könnte sich auch im Hinblick auf die Initiation und Unterhaltung von inflammatorischen Reaktionen sowie bei der Modifikation von malignen Tumoren äußern.

Die erhöhte Aktivierbarkeit (pp38 / p38) könnte somit wahrscheinlich mit einer erleichterten Initiation von Inflammationsreaktionen in Verbindung stehen. Dies würde sich vermutlich auch in Form einer erhöhten PGE₂-und MMP 9-Freisetzung äußern, welche sich zum Beispiel ähnlich wie bei den Makrophagen, positiv auf die Progression des Basalzellkarzinoms [207] und des malignen Melanoms [119] auswirken könnte.

Die signifikant höhere Aktivierbarkeit von p38 in den PBMC der adipösen Männer war für uns überraschend, da unter anderem im Hinblick auf die bei Adipositas nachgewiesene verminderte Adiponektinkonzentration [42,211] eine geringere Aktivierung des p38-Signalweges zu erwarten wäre. Eine andere Studie stellte bei CD4⁺ T-Zellen eine deutlich verstärkte, durch Adiponektin induzierte, Phosphorylierung von p38 fest [212]. Dies würde im Umkehrschluss eine verminderte Aktivierung von p38, bei dem mit Adipositas vergesellschafteten verringerten Adiponektinspiegel, bedeuten. Neben der nachgewiesenen antiinflammatorischen Funktionen [213,214], welche beispielsweise durch Inhibition der Makrophagenaktivierung realisiert wird [213], hemmt dieses Adipokin, auch durch Phosphorylierung von p38 und ERK1/2, die Apoptose neutrophiler Granulozyten [215-217].

Dagegen zeigten einige Studien auch proinflammatorische Effekte von Adiponektin bei Makrophagen, Lymphozyten [212] und dendritischen Zellen [218]. Dabei führt die gesteigerte p38-Phosphorylierung zur vermehrten Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu Th1-Zellen [212]. Th1- und Th2-Zellen differenzieren sich aus CD4⁺ T-Lymphozyten, in Abhängigkeit von der Zytokinzusammensetzung des jeweilig

umgebenden Milieus [83]. Eine verstärkte Differenzierung zu Th1-Zellen wird darüber hinaus durch IL-12 vermittelt [218,219]. Zu den wiederum von Th1-Zellen freigesetzten Zytokinen gehören neben IL-2, TNF- β auch INF- γ [219]. Über die Freisetzung von INF- γ stimulieren diese Zellen die Makrophagen und fördern außerdem die Freisetzung von IgG (immunoglobulin G). Zudem kommt es durch die von Th1-Zellen ausgeschütteten IL-2 und TNF- β zur Aktivierung der zytotoxischen Funktionen von CD8⁺ T-Zellen [219].

Th1-Zellen spielen somit eine wichtige Rolle in der Regulation inflammatorischer Prozesse.

Darüber hinaus lässt die durch Adiponektin, via p38-Signalkaskade, induzierte Synthese von IL-6 in synovialen Fibroblasten, auf eine ebenso proinflammatorische Funktion des Adipokins schließen [220].

Aufgrund der Literaturangaben und des bei normalgewichtigen Menschen höheren Adiponektinspiegels, war im Voraus auch eine gesteigerte Aktivierbarkeit der p38-MAPK (pp38 / p38) in den PBMC der normalgewichtigen Probanden zu vermuten.

Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass die Adipositas assoziierte, verminderte Adiponektinplasmakonzentration mit einem, im Vergleich zu den Normalgewichtigen, niedrigeren Anteil des aktiven p38 am Gesamt-p38 vergesellschaftet sein müsste.

Die vorliegende In-vitro-Studie lieferte jedoch ein gegensätzliches Ergebnis.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass in diesem Fall der Adiponektin induzierten p38-Phosphorylierung bei PBMC eine eher geringe Bedeutung zukommt.

Möglicherweise tragen andere Adipositas assoziierte Strukturen - wie Leptin oder G6PD (glucose-6-phosphate dehydrogenase) - deutlicher zur verstärkten Aktivierbarkeit von p38 in der fettleibigen Gruppe bei.

Leptin ist dabei ein dem Fettgewebe assoziiertes Hormon, welches zur Phosphorylierung von p38 in PBMC's führt [221]. Im Bezug auf G6PD - ein für den Glucosetransfer wichtiges Enzym - wurde bereits gezeigt, dass jenes Enzym in Makrophagen des Fettgewebes verstärkt exprimiert wird. G6PD aktiviert dabei in höherem Maße die p38-MAPK, was möglicherweise auch bei proinflammatorischen Reaktionen der Makrophagen von Bedeutung sein könnte [222].

Im Falle von ERK1/2, pERK1/2 und pERK1/2 / ERK1/2 konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen adipösen und normalgewichtigen Probanden festgestellt werden. Der Expressionsunterschied von ERK1/2 zwischen adipösen und normalgewichtigen Probanden bei pH 7,4 ($p = 0,068$) verfehlte nur knapp das

Signifikanzniveau. Dennoch zeigt dieses Ergebnis eine Tendenz, im Sinne einer reduzierten Expression der ERK1/2-MAPK bei den adipösen Männern. Dies könnte mit einer bereits bei CD8+ T-Zellen gezeigten, ERK1/2 vermittelten, Beeinflussung zytotoxischer Funktionen in Verbindung stehen [223,224]. Eine entsprechend verringerte Expression der MAPK bei den adipösen Männern könnte auf eine eingeschränkte Beeinflussung der CD8+ T-Zellfunktionen hindeuten. Adipositas wäre daher als ein modulierender Faktor der ERK1/2-Aktivität in dieser Subpopulation der PBMC denkbar.

Weiterhin ließ sich in der adipösen Gruppe, jedoch nicht in jener der Normalgewichtigen, bezüglich der aktiven Form (pERK1/2) und der Aktivierbarkeit (pERK1/2 / ERK1/2) von ERK1/2 eine deutlich erhöhte Expression beim Verhältnis pH 6,6 zu pH 7,4 (pH 6,6 / pH 7,4) ausmachen. Die Unterschiede waren allerdings weder bei pERK1/2 ($p = 0,369$), noch bezüglich der Aktivierbarkeit der MAPK ($p = 0,452$) statistisch signifikant.

Dennoch könnte diese Tendenz auf einen möglichen Adipositas assoziierten, positiven Einfluss der Azidose auf die Phosphorylierung von ERK1/2 hindeuten. Es wurde bereits in anderen Studien beobachtet, dass bei pH 6,6 eine verstärkte Aktivierung von ERK1/2 in Rattenfibroblasten [225] und AT1 Prostatakarzinomzellen [73] erfolgt.

Es sollten daher weiterführende Untersuchungen mit größeren Probandengruppen durchgeführt werden, welche sich auf den Einfluss der tumorassoziierten Azidose bei der Phosphorylierung von ERK1/2 in PBMC adipöser Menschen konzentrieren. Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch, ob geschlechtsspezifische Unterschiede auszumachen sind.

Die Auswertung der vorliegenden Studie zeigt weiterhin, dass die extrazelluläre Azidose (pH 6,6) nur unwesentlich bis gar nicht die Aktivierung und Aktivierbarkeit der p38-MAPK beeinflusst hat.

Die Ergebnisse im Hinblick auf die Expression bei pH 6,6 im Vergleich zu pH 7,4 waren besonders in Bezug auf die p38-MAPK überraschend, da unter anderem bei Untersuchungen an AT1-Prostatakarzinomzellen ein deutlicher Einfluss des extrazellulären azidotischen Milieus, im Sinne einer Stimulation, auf die Phosphorylierung von p38 und ERK1/2 nachgewiesen wurde [73].

Zusätzlich wurde gezeigt, dass die extrazelluläre Azidose bei Rattenfibroblasten auch zu einer Steigerung der COX-2- sowie der TNF- α -Expression, jedoch unabhängig von ERK1/2 in Bezug auf COX-2, und unabhängig von p38 oder ERK1/2 im Fall von TNF- α führt [59].

Eine andere Studie kam zu dem Ergebnis, dass es unter demselben azidotischen extrazellulären pH-Wert von 6,6 zur vermehrten Aktivierung der p38 vorgeschalteten MKK3/6 in AT1-Prostatakarzinomzellen kommt. Demnach resultiert daraus auch eine gesteigerte Phosphorylierung von p38 zur pp38 [140].

Eine Erklärung für das gegensätzliche Ergebnis im Vergleich der vorliegenden Studie könnte sein, dass die hier untersuchten PBMC, in Bezug auf die Aktivierbarkeit von p38, wesentlich weniger empfindlich gegenüber einer azidotischen Extrazellulärmatrix reagieren, als die in den genannten Studien untersuchten Rattenzelllinien (AT1 R-3327 Prostatakarzinomzellen [73,140], Fibroblasten [225]). Zudem muss bedacht werden, dass bei der vorliegenden Studie die PBMC aus Vollblut gewonnen, und diese einer tumorähnlichen extrazellulären Azidose ausgesetzt wurden. Allerdings wurden andere möglicherweise relevante, modulierende Faktoren wie die Hypoxie nicht in die Untersuchungen einbezogen. Eine weitere nahe liegende Erklärung ist, dass sich die Ergebnisse von Untersuchungen primärer Rattenzellen nicht eins-zu-eins auf humane PBMC übertragen lassen.

Dies lässt eine wahrscheinlich nur unterschwellige Beeinflussung der p38-MAPK in PBMC in einer Tumor-Azidose vermuten. Es wäre jedoch auch denkbar, dass eine Modifikation der Aktivierbarkeit von p38 (pp38 / p38) dennoch im azidotischen Milieu stattfindet, jedoch nur bei Zellen, die einen quantitativ geringen Anteil an den PBMC ausmachen. Dies könnte sich unter Umständen auch auf inflammatorische Reaktionen der PBMC in einem Tumormilieu auswirken.

Zu Bedenken ist in jedem Fall die relativ geringe Fallzahl (N = 27) dieser Studie, weswegen eine gewisse Zurückhaltung bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden sollte.

In diesem Zusammenhang wurde beispielsweise bei Th17- Zellen, welche eine Subpopulation der T-Lymphozyten darstellen, bereits mehrfach eine potentielle Abwehrfunktion gegen Tumorzellen demonstriert [226,227]. Diese Studien zeigten, dass bei spezifischen Tumoren, wie zum Beispiel dem Ovarialkarzinom [226] oder dem Nasopharynxkarzinom [227], auch eine verstärkte Freisetzung von INF- γ und IL-2 als inflammatorische Reaktion erfolgt.

Ein entsprechender Einfluss des Tumormilieus wäre ebenso bei NK-Zellen denkbar. Aktuelle Studien konnten bereits aufzeigen, dass NK-Zellen sowohl eine tumorinhibierende Rolle in Bezug auf das Lungenkarzinom spielen können [228], als auch eine durch TAMs bedingte erhöhte Zytolyseaktivität aufweisen, welche interessanterweise sogar zur verstärkten Zerstörung von speziellen TAMs führt [229].

Um einen möglichen Einfluss des azidotischen Tumormilieus feststellen zu können, bedarf es allerdings spezifischerer Untersuchungen, welche sich gezielt auf zum Beispiel NK-Zellen oder andere Subpopulationen der PBMC konzentrieren. Dementsprechende Studien mit NK-Zellen würden möglicherweise neue Erkenntnisse für die Tumorforschung liefern. Weiterführende Untersuchungen mit humanen NK-Zellen werden daher auch aktuell in der Arbeitsgruppe durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aufgrund der in dieser Studie nachgewiesenen, signifikant erhöhten Aktivierbarkeit der p38-MAPK bei den adipösen Männern, eine besondere Bedeutung der p38-Signalkaskade in den PBMC adipöser Männer zu vermuten ist. Dies könnte möglicherweise auf ein verändertes Verhalten dieser Immunzellen bei Inflammationsreaktionen, sowohl in einem physiologischen, als auch in einem azidotischen Tumormilieu hindeuten.

Es sollten daher weiterführende in vitro Untersuchungen erfolgen, welche sich spezifisch auf Subpopulationen der PBMC, wie den NK-Zellen konzentrieren, um eine mögliche Assoziation zwischen dem azidotischen Tumormilieu, Adipositas und der p38-MAPK in diesen Zellen differenzierter zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Adipositas stellt ein weltweit verbreitetes, von steigender Prävalenz gekennzeichnetes Gesundheitsproblem dar [1], welches mit einer Vielzahl von malignen Tumoren assoziiert ist [5,9,10].

Kennzeichnend für das Tumorgewebe ist ein, im Vergleich zu normaldifferenzierten Gewebe, verändertes Mikromilieu, für das unter anderem eine Hypoxie, als auch eine extrazelluläre Azidose charakteristisch sind [63,65]. Die Azidose in Tumoren könnte auf die Prognose bedeutenden Einfluss, durch beispielsweise die beschleunigte Zersetzung von extrazellulärer Matrix [75,76] und durch verstärkte Resistenzbildung gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika [63,74], haben.

MAPKs sind in eine Vielzahl zellulärer Funktionen, wie Proliferation, Differenzierung, Genexpression und Apoptose involviert [106,107]. Die p38- und die ERK1/2-MAPK stellen dabei wichtige Vertreter dieser Proteinkinasen dar.

Über die Bedeutung der p38- und ERK1/2-MAPKs in PBMC im Tumormikromilieu ist bisher nur wenig bekannt. Aus diesem Grund hatte die vorliegende Arbeit zum Ziel, den Einfluss von sowohl einer extrazellulären Tumor-Azidose, als auch von Adipositas auf die Expression der p38-MAPK und der ERK1/2-MAPK in normalgewichtigen und adipösen Männern zu untersuchen. Zudem sollte untersucht werden, ob in Bezug auf weitere Faktoren, wie beispielsweise Lebensbedingungen und -gewohnheiten, Differenzen zwischen beiden Gruppen festzustellen sind.

Es wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich weiterer Faktoren, wie den Lebensbedingungen und -gewohnheiten festgestellt, mit Ausnahme der HDL-Konzentration, welche bei den adipösen Männern reduziert war.

Sowohl für p38, ERK1/2, als auch für deren jeweilige aktive Formen pp38 und pERK1/2 konnten keine statistisch bedeutsamen Expressionsunterschiede zwischen normalgewichtigen und adipösen Männern gezeigt werden. Allerdings konnte bei physiologischen pH-Bedingungen eine deutliche Tendenz im Hinblick auf eine reduzierte Expression von ERK1/2 bei Adipösen gezeigt werden. Ein statistisch bedeutsamer Unterschied konnte für die Aktivierbarkeit der p38-MAPK, unter einem physiologischen pH-Wert im Sinne einer erhöhten Expression bei den adipösen Männern, gezeigt werden. Eine dementsprechende Tendenz zeigte sich auch unter azidotischen Bedingungen, sodass die gesteigerte Aktivierbarkeit von p38 unabhängig von dem untersuchten pH-Unterschied zu sein scheint.

Diese Studie weist somit auf eine möglicherweise verstärkte Bedeutung des p38-Signalweges in PBMC adipöser Männer hin. Eine Beeinflussung von p38-vermittelten

Zusammenfassung

Inflamationsreaktionen durch Adipositas, sowohl in einem Milieu mit physiologischem pH-Wert, als auch in einer Tumor-Azidose, wäre somit denkbar. Dies könnte weitreichende Bedeutung bei der Modulation von inflammatorischen Reaktionen und der Tumorabwehr bei Adipösen haben. Aus diesem Grund sollten weiterführende Untersuchungen mit Subpopulationen der PBMC durchgeführt werden, um konkretere Zusammenhänge darstellen zu können.

Literaturverzeichnis

1. Vucenik I, Stains JP (2012) Obesity and cancer risk: evidence, mechanisms, and recommendations. *Ann N Y Acad Sci* 1271:37-43.
2. WHO Fact sheet „Obesity and overweight“:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> ; Abrufdatum: 19.07.2015.
3. Mensink GB, Schienkiewitz A, Haftenberger M, Lampert T, Ziese T, Scheidt-Nave C (2013) Overweight and obesity in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1). *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsf Gesundheitssch* 56:786-794.
4. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M (2008) Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 371:569-578.
5. Norat T, Chan D, Lau R, Vieira R (2008) The Associations Between Food, Nutrition and Physical Activity and the Risk of Breast Cancer. WCRF/AICR Systematic Literature Review Continuous Update Project Report. London: World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research.
6. Zhang Y, Liu H, Yang S, Zhang J, Qian L, Chen X (2014) Overweight, obesity and endometrial cancer risk: results from a systematic review and meta-analysis. *Int J Biol Markers* 29:e21-29.
7. Friedenreich C, Cust A, Lahmann PH, Steindorf K, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, Mesrine S, Linseisen J, Rohrmann S, Boeing H, Pischon T, Tjønneland A, Halkjaer J, Overvad K, Mendez M, Redondo ML, Garcia CM, Larrañaga N, Tormo MJ, Gurrea AB, Bingham S, Khaw KT, Allen N, Key T, Trichopoulou A, Vasilopoulou E, Trichopoulos D, Pala V, Palli D, Tumino R, Mattiello A, Vineis P, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Berglund G, Manjer J, Lundin E, Lukanova A, Slimani N, Jenab M, Kaaks R, Riboli E (2007) Anthropometric factors and risk of endometrial cancer: the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Causes Control* 18:399-413.
8. Scélo G, Brennan P (2007) The epidemiology of bladder and kidney cancer. *Nat Clin Pract Urol* 4:205-217.
9. Vainio H, Kaaks R, Bianchini F (2002) Weight control and physical activity in cancer prevention: international evaluation of the evidence. *Eur J Cancer Prev* 11 Suppl 2:S94-100.
10. Norat T, Chan D, Lau R, Aune D, Vieira R (2010) The Associations Between Food, Nutrition and Physical Activity and the Risk of Colorectal Cancer; WCRF/AICR

- Systematic Literature Review Continuous Update Project Report. London: World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research.
11. Ning Y, Wang L, Giovannucci EL (2010) A quantitative analysis of body mass index and colorectal cancer: findings from 56 observational studies. *Obes Rev* 11:19-30.
 12. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ (2003) Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 348:1625-1638.
 13. Rui R, Lou J, Zou L, Zhong R, Wang J, Xia D, Wang Q, Li H, Wu J, Lu X, Li C, Liu L, Xia J, Xu H (2012) Excess body mass index and risk of liver cancer: a nonlinear dose-response meta-analysis of prospective studies. *PLoS One* 7:e44522.
 14. Haberland J, Bertz J, Wolf U, Ziese T, Kurth BM (2010) German cancer statistics 2004. *BMC Cancer* 10:52.
 15. Kuper H, Boffetta P, Adami HO (2002) Tobacco use and cancer causation: association by tumour type. *J Intern Med* 252:206-224.
 16. Lee PN, Forey BA, Coombs KJ (2012) Systematic review with meta-analysis of the epidemiological evidence in the 1900s relating smoking to lung cancer. *BMC Cancer* 12:385.
 17. Lubin JH, Alavanja MC, Caporaso N, Brown LM, Brownson RC, Field RW, Garcia-Closas M, Hartge P, Hauptmann M, Hayes RB, Kleinerman R, Kogevinas M, Krewski D, Langholz B, Létourneau EG, Lynch CF, Malats N, Sandler DP, Schaffrath-Rosario A, Schoenberg JB, Silverman DT, Wang Z, Wichmann HE, Wilcox HB, Zielinski JM (2007) Cigarette smoking and cancer risk: modeling total exposure and intensity. *Am J Epidemiol* 166:479-489.
 18. Letašiová S, Medve'ová A, Šovčíková A, Dušinská M, Volkovová K, Mosoiu C, Bartonová A (2012) Bladder cancer, a review of the environmental risk factors. *Environ Health* 11 Suppl 1:S11.
 19. Nakao M, Hosono S, Ito H, Oze I, Watanabe M, Mizuno N, Yatabe Y, Yamao K, Niimi A, Tajima K, Tanaka H, Matsuo K (2013) Cigarette smoking and pancreatic cancer risk: a revisit with an assessment of the nicotine dependence phenotype. *Asian Pac J Cancer Prev* 14:4409-4413.
 20. Iodice S, Gandini S, Maisonneuve P, Lowenfels AB (2008) Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbecks Arch Surg* 393:535-545.
 21. Cumberbatch MG, Rota M, Catto JW, La Vecchia C (2015) The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney Carcinogenesis: A Comparison of Exposures and

- Meta-analysis of Incidence and Mortality Risks. *Eur Urol* pii:S0302-2838(15)00548-5.
22. Sasco AJ, Secretan MB, Straif K (2004) Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer* 45 Suppl 2:S3-9.
23. Calle EE, Kaaks R (2004) Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 4:579-591.
24. Reeves GK, Pirie K, Beral V, Green J, Spencer E, Bull D (2007) Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. *BMJ* 335:1134.
25. De Pergola G, Silvestris F (2013) Obesity as a major risk factor for cancer. *J Obes* 2013:291546.
26. Ballard-Barbash R, Friedenreich CM, Courneya KS, Siddiqi SM, McTiernan A, Alfano CM (2012) Physical activity, biomarkers, and disease outcomes in cancer survivors: a systematic review. *J Natl Cancer Inst* 104:815-840.
27. Kushi LH, Doyle C, McCullough M, Rock CL, Demark-Wahnefried W, Bandera EV, Gapstur S, Patel AV, Andrews K, Gansler T (2012) American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA Cancer J Clin* 62:30-67.
28. Bełtowski J (2003) Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue. *Med Sci Monit* 9:RA55-61.
29. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N (2008) The physiological and pathophysiological role of adiponectin and adiponectin receptors in the peripheral tissues and CNS. *FEBS Lett* 582:74-80.
30. Schulze MB, Shai I, Rimm EB, Li T, Rifai N, Hu FB (2005) Adiponectin and future coronary heart disease events among men with type 2 diabetes. *Diabetes* 54:534-539.
31. Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB (2004) Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA* 291:1730-1737.
32. Barb D, Williams CJ, Neuwirth AK, Mantzoros CS (2007) Adiponectin in relation to malignancies: a review of existing basic research and clinical evidence. *Am J Clin Nutr* 86:s858-866.
33. Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR (2003) Adiponectin: more than just another fat cell hormone?. *Diabetes Care* 26:2442-2450.
34. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y (1999) Novel

- modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100:2473-2476.
35. Ohashi K, Ouchi N, Matsuzawa Y (2012) Anti-inflammatory and anti-atherogenic properties of adiponectin. *Biochimie* 94:2137-2142.
36. Summer R, Fiack CA, Ikeda Y, Sato K, Dwyer D, Ouchi N, Fine A, Farber HW, Walsh K (2009) Adiponectin deficiency: a model of pulmonary hypertension associated with pulmonary vascular disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297:L432-438.
37. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA (2001) Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1930-1935.
38. Yamamoto S, Matsushita Y, Nakagawa T, Hayashi T, Noda M, Mizoue T (2014) Circulating adiponectin levels and risk of type 2 diabetes in the Japanese. *Nutr Diabetes* 4:e130.
39. Yamauchi T, Kadowaki T (2013) Adiponectin receptor as a key player in healthy longevity and obesity-related diseases. *Cell Metab* 17:185-196.
40. Tan W, Wang L, Ma Q, Qi M, Lu N, Zhang L, Han B (2015) Adiponectin as a potential tumor suppressor inhibiting epithelial-to-mesenchymal transition but frequently silenced in prostate cancer by promoter methylation. *Prostate* 75:1197-1205.
41. Zhang L, Wen K, Han X, Liu R, Qu Q (2015) Adiponectin mediates antiproliferative and apoptotic responses in endometrial carcinoma by the AdipoRs/AMPK pathway. *Gynecol Oncol* 137:311-320.
42. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257:79-83.
43. Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ, Retzlaff BM, Knopp RH, Brunzell JD, Kahn SE (2003) Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia* 46:459-469.
44. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K (2003) Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol* 14:561-566.
45. Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Klein J, Paschke R (2003) Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1

- adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 301:1045-1050.
46. Piya MK, McTernan PG, Kumar S (2013) Adipokine inflammation and insulin resistance: the role of glucose, lipids and endotoxin. *J Endocrinol* 216:T1-T15.
47. Maury E, Brichard SM (2010) Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 314:1-16.
48. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR (2010) Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 316:129-139.
49. Festa A, D'Agostino R Jr, Howard G, Mykkänen L, Tracy RP, Haffner SM (2000) Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 102:42-47.
50. Shapiro H, Lutaty A, Ariel A (2011) Macrophages, meta-inflammation, and immuno-metabolism. *ScientificWorldJournal* 11:2509-2529.
51. „Prostatakrebs“: <http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Prostatakrebs/prostatakrebs.html> ; Abrufdatum: 10.05.2016.
52. Price RS, Cavazos DA, De Angel RE, Hursting SD, deGraffenried LA (2012) Obesity-related systemic factors promote an invasive phenotype in prostate cancer cells. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 15:135-143.
53. MacInnis RJ, English DR (2006) Body size and composition and prostate cancer risk: systematic review and meta-regression analysis *Cancer. Causes Control* 17:989-1003.
54. Wright ME, Chang SC, Schatzkin A, Albanes D, Kipnis V, Mouw T, Hurwitz P, Hollenbeck A, Leitzmann MF (2007) Prospective study of adiposity and weight change in relation to prostate cancer incidence and mortality. *Cancer* 109:675-684.
55. Gong Z, Neuhauser ML, Goodman PJ, Albanes D, Chi C, Hsing AW, Lippman SM, Platz EA, Pollak MN, Thompson IM, Kristal AR (2006) Obesity, diabetes, and risk of prostate cancer: results from the prostate cancer prevention trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:1977-1983.
56. Rodriguez C, Freedland SJ, Deka A, Jacobs EJ, McCullough ML, Patel AV, Thun MJ, Calle EE (2007) Body mass index, weight change, and risk of prostate cancer in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16:63-69.
57. Freedland SJ, Platz EA (2007) Obesity and prostate cancer: making sense out of apparently conflicting data. *Epidemiol Rev* 29:88-97.
58. Fowke JH, Motley SS, Cookson MS, Concepcion R, Chang SS, Wills ML, Smith JA Jr (2007) The association between body size, prostate volume and prostate-specific antigen. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 10:137-142.

59. Baillargeon J, Pollock BH, Kristal AR, Bradshaw P, Hernandez J, Basler J, Higgins B, Lynch S, Rozanski T, Troyer D, Thompson I (2005) The association of body mass index and prostate-specific antigen in a population-based study. *Cancer* 103:1092-1095.
60. Bañez LL, Hamilton RJ, Partin AW, Vollmer RT, Sun L, Rodriguez C, Wang Y, Terris MK, Aronson WJ, Presti JC Jr, Kane CJ, Amling CL, Moul JW, Freedland SJ (2007) Obesity-related plasma hemodilution and PSA concentration among men with prostate cancer. *JAMA* 298:2275-2280.
61. Ku Ja, Kim ME, Lee NK, Park YH, Ahn JO (2003) Influence of age, anthropometry, and hepatic and renal function on serum prostate-specific antigen levels in healthy middle-age men. *Urology* 61:132-136.
62. Carmichael AR, Bates T (2004) Obesity and breast cancer: a review of the literature. *Breast* 13: 85-92.
63. Sauvant C, Nowak M, Wirth C, Schneider B, Riemann A, Gekle M, Thews O (2008) Acidosis induces multi-drug resistance in rat prostate cancer cells (AT1) in vitro and in vivo by increasing the activity of the p-glycoprotein via activation of p38. *Int J Cancer* 123:2532-2542.
64. Konerding MA, Malkusch W, Klaphor B, van Ackern C, Fait E, Hill SA, Parkins C, Chaplin DJ, Presta M, Denekamp J (1999) Evidence for characteristic vascular patterns in solid tumours: quantitative studies using corrosion casts. *Br J Cancer* 80:724-732.
65. Höckel M, Vaupel P (2001) Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 93:266-276.
66. Fukumura D, Jain RK (2007) Tumor microenvironment abnormalities: causes, consequences, and strategies to normalize. *J Cell Biochem* 101:937-949.
67. Goel S, Duda DG, Xu L, Munn LL, Boucher Y, Fukumura D, Jain RK (2011) Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol Rev* 91:1071-1121.
68. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P (1989) Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 49: 6449–6465.
69. Kaelin WG Jr, Thompson CB (2010) Q&A: Cancer: clues from cell metabolism. *Nature* 465:562-564.
70. Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Uramoto H, Yoshida Y, Tanabe M, Ise T, Murakami T, Yoshida T, Nomoto M, Kohno K (2003) Cellular pH regulators:

- potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev* 29:541-549.
71. Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL (2007) Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev* 26:299-310.
72. Romero-Garcia S, Lopez-Gonzalez JS, Báez-Viveros JL, Aguilar-Cazares D, Prado-Garcia H (2011) Tumor cell metabolism: an integral view. *Cancer Biol Ther* 12:939-948.
73. Riemann A, Schneider B, Gündel D, Stock C, Thews O, Gekle M (2014) Acidic priming enhances metastatic potential of cancer cells. *Pflugers Arch* 466:2127-2138.
74. Thews O, Gassner B, Kelleher DK, Schwerdt G, Gekle M (2006) Impact of extracellular acidity on the activity of P-glycoprotein and the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs. *Neoplasia* 8:143-152.
75. Kato Y, Lambert CA, Colige AC, Mineur P, Noël A, Frankenne F, Foidart JM, Baba M, Hata R, Miyazaki K, Tsukuda M (2005) Acidic extracellular pH induces matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma cells through the phospholipase D-mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 280:10938-10944.
76. Kato Y, Ozawa S, Tsukuda M, Kubota E, Miyazaki K, St-Pierre Y, Hata R (2007) Acidic extracellular pH increases calcium influx-triggered phospholipase D activity along with acidic sphingomyelinase activation to induce matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma. *FEBS J* 274:3171-3183.
77. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, Carson WE, Caligiuri MA (2001) Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 97:3146-3151.
78. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP (1999) Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 17:189-220.
79. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, Takeda K, van Dommelen SL, Degli-Esposti MA, Hayakawa Y (2005) Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 42:501-510.
80. Street SE, Hayakawa Y, Zhan Y, Lew AM, MacGregor D, Jamieson AM, Diefenbach A, Yagita H, Godfrey DI, Smyth MJ (2004) Innate immune surveillance of spontaneous B cell lymphomas by natural killer cells and gammadelta T cells. *J Exp Med* 199:879-884.
81. Trapani JA, Smyth MJ (2002) Functional significance of the perforin/granzyme cell

- death pathway. *Nat Rev Immunol* 2:735-747.
82. Bradley M, Zeytun A, Rafi-Janajreh A, Nagarkatti PS, Nagarkatti M (1998) Role of spontaneous and interleukin-2-induced natural killer cell activity in the cytotoxicity and rejection of Fas+ and Fas- tumor cells. *Blood* 92:4248-4255.
83. Screpanti V, Wallin RP, Ljunggren HG, Grandien A (2001) A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells. *J Immunol* 167:2068-2073.
84. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K (2000) Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 356:1795-1799.
85. Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, Martos JA, Moreno M (1997) The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 79:2320-2328.
86. Takeuchi H, Maehara Y, Tokunaga E, Koga T, Kakeji Y, Sugimachi K (2001) Prognostic significance of natural killer cell activity in patients with gastric carcinoma: a multivariate analysis. *Am J Gastroenterol* 96:574-578.
87. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, Aridome K, Hokita S, Aikou T (2000) Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 88:577-583.
88. Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, Jiménez R, Chillón MJ, Jareño J, Zuñi M, Callol L (2002) Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* 35:23-28.
89. Carrega P, Morandi B, Costa R, Frumento G, Forte G, Altavilla G, Ratto GB, Mingari MC, Moretta L, Ferlazzo G (2008) Natural killer cells infiltrating human nonsmall-cell lung cancer are enriched in CD56 bright CD16(-) cells and display an impaired capability to kill tumor cells. *Cancer* 112:863-875.
90. Platonova S, Cherfils-Vicini J, Damotte D, Crozet L, Vieillard V, Validire P, André P, Dieu-Nosjean MC, Alifano M, Régnard JF, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Cremer I (2011) Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res* 71:5412-5422.
91. Eckl J, Buchner A, Prinz PU, Riesenberger R, Siegert SI, Kammerer R, Nelson PJ, Noessner E (2012) Transcript signature predicts tissue NK cell content and defines renal cell carcinoma subgroups independent of TNM staging. *J Mol Med (Berl)* 90:55-66.
92. Izawa S, Kono K, Mimura K, Kawaguchi Y, Watanabe M, Maruyama T, Fujii H (2011) H₂O₂ production within tumor microenvironment inversely correlated with

- infiltration of CD56(dim) NK cells in gastric and esophageal cancer: possible mechanisms of NK cell dysfunction. *Cancer Immunol Immunother* 60:1801-1810.
93. Leonardi GC, Candido S, Cervello M, Nicolosi D, Raiti F, Travali S, Spandidos DA, Libra M (2012) The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma (review). *Int J Oncol* 40:1733-1747.
94. Pietra G, Manzini C, Rivara S, Vitale M, Cantoni C, Petretto A, Balsamo M, Conte R, Benelli R, Minghelli S, Solari N, Gualco M, Queirolo P, Moretta L, Mingari MC (2012) Melanoma cells inhibit natural killer cell function by modulating the expression of activating receptors and cytolytic activity. *Cancer Res* 72:1407-1415.
95. Harlin H, Hanson M, Johansson CC, Sakurai D, Poschke I, Norell H, Malmberg KJ, Kiessling R (2007) The CD16⁻ CD56(bright) NK cell subset is resistant to reactive oxygen species produced by activated granulocytes and has higher antioxidative capacity than the CD16⁺ CD56(dim) subset. *J Immunol* 179:4513-4519.
96. Kim KY, Kim JK, Han SH, Lim JS, Kim KI, Cho DH, Lee MS, Lee JH, Yoon DY, Yoon SR, Chung JW, Choi I, Kim E, Yang Y (2006) Adiponectin is a negative regulator of NK cell cytotoxicity. *J Immunol* 176:5958-5964.
97. Ryan JC, Naper C, Hayashi S, Daws MR (2001) Physiologic functions of activating natural killer (NK) complex-encoded receptors on NK cells. *Immunol Rev* 181:126-137.
98. Lanier LL (2008) Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 9:495-502.
99. Nave H, Mueller G, Siegmund B, Jacobs R, Stroh T, Schueler U, Hopfe M, Behrendt P, Buchenauer T, Pabst R, Brabant G (2008) Resistance of Janus kinase-2 dependent leptin signaling in natural killer (NK) cells: a novel mechanism of NK cell dysfunction in diet-induced obesity. *Endocrinology* 149:3370-3378.
100. Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH (1989) Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* 143:3183-3191.
101. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI (1998) Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394:897-901.
102. Wrann CD, Laue T, Hübner L, Kuhlmann S, Jacobs R, Goudeva L, Nave H (2012) Short-term and long-term leptin exposure differentially affect human natural killer cell immune functions. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302:E108-116.
103. Lautenbach A, Breitmeier D, Kuhlmann S, Nave H (2011) Human obesity reduces

- the number of hepatic leptin receptor (ob-R) expressing NK cells. *Endocr Res* 36:158-166.
104. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22:633-640.
105. Romagnani C, Juelke K, Falco M, Morandi B, D'Agostino A, Costa R, Ratto G, Forte G, Carrega P, Lui G, Conte R, Strowig T, Moretta A, Münz C, Thiel A, Moretta L, Ferlazzo G (2007) CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol* 178:4947-4955.
106. Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH (2001) MAP kinases. *Chem Rev* 101:2449-2476.
107. Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410:37-40.
108. Keshet Y, Seger R (2010) The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol* 661:3-38.
109. Roux PP, Blenis J (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:320-344.
110. Su B, Karin M (1996) Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr Opin Immunol* 8:402-411.
111. Cook R, Wu CC, Kang YJ, Han J (2007) The role of the p38 pathway in adaptive immunity. *Cell Mol Immunol* 4:253-259.
112. Kolch W (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351:289-305.
113. Raman M, Chen W, Cobb MH (2007) Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26:3100-3112.
114. Cuenda A, Rousseau S (2007) p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1773:1358-1375.
115. Ono K, Han J (2000) The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 12:1-13.
116. Kyriakis JM, Avruch J (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81:807-869.
117. Zarubin T, Han J (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 15:11-18.

118. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W (2007) MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26:3279-3290.
119. Kale S, Raja R, Thorat D, Soundararajan G, Patil TV, Kundu GC (2014) Osteopontin signaling upregulates cyclooxygenase-2 expression in tumor-associated macrophages leading to enhanced angiogenesis and melanoma growth via $\alpha 9\beta 1$ integrin. *Oncogene* 33:2295-2306.
120. Yang WS, Park YC, Kim JH, Kim HR, Yu T, Byeon SE, Unsworth LD, Lee J, Cho JY (2012) Nanostructured, self-assembling peptide K5 blocks TNF- α and PGE₂ production by suppression of the AP-1/p38 pathway. *Mediators Inflamm* 2012:489810.
121. Jeong D, Lee J, Yi YS, Yang Y, Kim KW, Cho JY (2013) p38/AP-1 pathway in lipopolysaccharide-induced inflammatory responses is negatively modulated by electrical stimulation. *Mediators Inflamm* 2013:183042.
122. Noh HJ, Sung EG, Kim JY, Lee TJ, Song IH (2010) Suppression of phorbol-12-myristate-13-acetate-induced tumor cell invasion by apigenin via the inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Oncol Rep* 24:277-283.
123. Hwang YP, Yun HJ, Choi JH, Kang KW, Jeong HG (2010) Suppression of phorbol-12-myristate-13-acetate-induced tumor cell invasion by bergamottin via the inhibition of protein kinase Cdelta/p38 mitogen-activated protein kinase and JNK/nuclear factor-kappaB-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Mol Nutr Food Res* 54:977-990.
124. Hwang YP, Yun HJ, Choi JH, Han EH, Kim HG, Song GY, Kwon KI, Jeong TC, Jeong HG (2011) Suppression of EGF-induced tumor cell migration and matrix metalloproteinase-9 expression by capsaicin via the inhibition of EGFR-mediated FAK/Akt, PKC/Raf/ERK, p38 MAPK, and AP-1 signaling. *Mol Nutr Food Res* 55:594-605.
125. Hong B, Li H, Zhang M, Xu J, Lu Y, Zheng Y, Qian J, Chang JT, Yang J, Yi Q (2015) p38 MAPK inhibits breast cancer metastasis through regulation of stromal expansion. *Int J Cancer* 136:34-43.
126. Pujari R, Nagre NN, Chachadi VB, Inamdar SR, Swamy BM, Shastry P (2010) Rhizoctonia bataticola lectin (RBL) induces mitogenesis and cytokine production in human PBMC via p38 MAPK and STAT-5 signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 1800:1268-1275.
127. Yannelli JR, Tucker JA, Hidalgo G, Perkins S, Kryscio R, Hirschowitz EA (2009) Characteristics of PBMC obtained from leukapheresis products and tumor

- biopsies of patients with non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 22:1459-1471.
128. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 74:49-139.
129. Roberts PJ, Der CJ (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26:3291-3310.
130. Malumbres M, Barbacid M (2003) RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 3:459-465.
131. Grandis JR, Sok JC (2004) Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. *Pharmacol Ther* 102:37-46.
132. Gangarosa LM, Sizemore N, Graves-Deal R, Oldham SM, Der CJ, Coffey RJ (1997) A raf-independent epidermal growth factor receptor autocrine loop is necessary for Ras transformation of rat intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 272:18926-18931.
133. Schulze A, Lehmann K, Jefferies HB, McMahon M, Downward J (2001) Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells. *Genes Dev* 15:981-994.
134. Mukherjee R, Bartlett JM, Krishna NS, Underwood MA, Edwards J (2005) Raf-1 expression may influence progression to androgen insensitive prostate cancer. *Prostate* 64:101-107.
135. Weber MJ, Gioeli D (2004) Ras signaling in prostate cancer progression. *J Cell Biochem* 91:13-25.
136. Gioeli D, Mandell JW, Petroni GR, Frierson HF Jr, Weber MJ (1999) Activation of mitogen-activated protein kinase associated with prostate cancer progression. *Cancer Res* 59:279-284.
137. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA (2007) Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1773:1263-1284.
138. Lei H, Gui L, Xiao R (2009) The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. *Clin Biochem* 42:1452-1460.
139. Riemann A. 2012. Azidose-induzierte Veränderung der Signaltransduktion und Invasivität von Prostatakarzinomzellen der Ratte (AT-1) : Mechanismen und Bedeutung [Dissertation]. Halle: Universität.
140. Riemann A, Schneider B, Ihling A, Nowak M, Sauvant C, Thews O, Gekle M

- (2011) Acidic environment leads to ROS-induced MAPK signaling in cancer cells. *PLoS One* 6:e22445.
141. Kivimäki M, Head J, Ferrie JE, Shipley MJ, Brunner E, Vahtera J, Marmot MG (2006) Work stress, weight gain and weight loss: evidence for bidirectional effects of job strain on body mass index in the Whitehall II study. *Int J Obes (Lond)* 30:982-987.
142. Lallukka T, Sarlio-Lähteenkorva S, Kaila-Kangas L, Pitkäniemi J, Luukkonen R, Leino-Arjas P (2008) Working conditions and weight gain: a 28-year follow-up study of industrial employees. *Eur J Epidemiol* 23:303-310.
143. Block JP, He Y, Zaslavsky AM, Ding L, Ayanian JZ (2009) Psychosocial stress and change in weight among US adults. *Am J Epidemiol* 170:181-192.
144. Harding JL, Backholer K, Williams ED, Peeters A, Cameron AJ, Hare MJ, Shaw JE, Magliano DJ (2014) Psychosocial stress is positively associated with body mass index gain over 5 years: evidence from the longitudinal AusDiab study. *Obesity (Silver Spring)* 22:277-286.
145. Brunner EJ, Chandola T, Marmot MG (2007) Prospective effect of job strain on general and central obesity in the Whitehall II Study. *Am J Epidemiol* 165:828-837.
146. Wardle J, Chida Y, Gibson EL, Whitaker KL, Steptoe A (2011) Stress and adiposity: a meta-analysis of longitudinal studies. *Obesity (Silver Spring)* 19:771-778.
147. Nyberg ST, Heikkilä K, Fransson EI, Alfredsson L, De Bacquer D, Bjorner JB, Borritz M, Burr H, Casini A, Clays E, Dragano N, Erbel R, Geuskens GA, Hooftman WE, Houtman IL, Jöckel KH, Kittel F, Knutsson A, Leineweber C, Lunau T, Madsen IE, Hanson LL, Marmot MG, Nielsen ML, Nordin M, Oksanen T, Pentti J, Rugulies R, Siegrist J, Suominen S, Virtanen M, Westerholm P, Westerlund H, Zins M, Ferrie JE, Theorell T, Hamer M, Singh-Manoux A, Batty GD, Kivimäki M (2012) Job strain in relation to body mass index: pooled analysis of 160 000 adults from 13 cohort studies. *J Intern Med* 272:65-73.
148. Burdette AM, Hill TD (2008) An examination of processes linking perceived neighborhood disorder and obesity. *Soc Sci Med* 67:38-46.
149. Laitinen J, Ek E, Sovio U (2002) Stress-related eating and drinking behavior and body mass index and predictors of this behavior. *Prev Med* 34:29-39.
150. Serlachius A, Hamer M, Wardle J (2007) Stress and weight change in university students in the United Kingdom. *Physiol Behav* 92:548-553.
151. Torres SJ, Nowson CA (2007) Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition* 23:887-894.

152. Kirschbaum C, Pirke KM, Hellhammer DH (1993) The 'Trier Social Stress Test'--a tool for investigating psychobiological stress responses in a laboratory setting. *Neuropsychobiology* 28:76-81.
153. Ng DM, Jeffery RW (2003) Relationships between perceived stress and health behaviors in a sample of working adults. *Health Psychol* 22:638-42.
154. McCann BS, Warnick GR, Knopp RH (1990) Changes in plasma lipids and dietary intake accompanying shifts in perceived workload and stress. *Psychosom Med* 52:97-108.
155. Epel E, Lapidus R, McEwen B, Brownell K (2001) Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. *Psychoneuroendocrinology* 26:37-49.
156. Kawakami N, Tsutsumi A, Haratani T, Kobayashi F, Ishizaki M, Hayashi T, Fujita O, Aizawa Y, Miyazaki S, Hiro H, Masumoto T, Hashimoto S, Araki S (2006) Job strain, worksite support, and nutrient intake among employed Japanese men and women. *J Epidemiol* 16:79-89.
157. Hellerstedt WL, Jeffery RW (1997) The association of job strain and health behaviours in men and women. *Int J Epidemiol* 26:575-583.
158. Zellner DA, Loaiza S, Gonzalez Z, Pita J, Morales J, Pecora D, Wolf A (2006) Food selection changes under stress. *Physiol Behav* 87:789-793.
159. Anagnostis P, Athyros VG, Tziomalos K, Karagiannis A, Mikhailidis DP (2009) Clinical review: The pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: a hypothesis. *J Clin Endocrinol Metab* 94:2692-2701.
160. Nieuwenhuizen AG, Rutters F (2008) The hypothalamic-pituitary-adrenal-axis in the regulation of energy balance. *Physiol Behav* 94:169-177.
161. Maniam J, Morris MJ (2012) The link between stress and feeding behaviour. *Neuropharmacology* 63:97-110.
162. Adam TC, Epel ES (2007) Stress, eating and the reward system. *Physiol Behav* 91:449-458.
163. Cavagnini F, Croci M, Putignano P, Petroni ML, Invitti C (2000) Glucocorticoids and neuroendocrine function. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 2:S77-79.
164. Kuo LE, Kitlinska JB, Tilan JU, Li L, Baker SB, Johnson MD, Lee EW, Burnett MS, Fricke ST, Kvetnansky R, Herzog H, Zukowska Z (2007) Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nat Med* 13:803-811.
165. Heinrichs SC, Menzaghi F, Pich EM, Hauger RL, Koob GF (1993) Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by

- neuropeptide Y. *Brain Res* 611:18-24.
166. Strack AM, Sebastian RJ, Schwartz MW, Dallman MF (1995) Glucocorticoids and insulin: reciprocal signals for energy balance. *Am J Physiol* 268:R142-149.
167. Newman E, O'Connor DB, Conner M (2007) Daily hassles and eating behaviour: the role of cortisol reactivity status. *Psychoneuroendocrinology* 32:125-132.
168. Tataranni PA, Larson DE, Snitker S, Young JB, Flatt JP, Ravussin E (1996) Effects of glucocorticoids on energy metabolism and food intake in humans. *Am J Physiol* 271:E317-325.
169. Björntorp P, Rosmond R (2000) Obesity and cortisol. *Nutrition* 16:924-936.
170. Singh A, Petrides JS, Gold PW, Chrousos GP, Deuster PA (1999) Differential hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity to psychological and physical stress. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1944-1948.
171. Kirschbaum C, Wüst S, Hellhammer D (1992) Consistent sex differences in cortisol responses to psychological stress. *Psychosom Med* 54:648-657.
172. Stroud LR, Salovey P, Epel ES (2002) Sex differences in stress responses: social rejection versus achievement stress. *Biol Psychiatry* 52:318-327.
173. Bove M, Carnevali L, Cicero AF, Grandi E, Gaddoni M, Noera G, Gaddi AV (2010) Psychosocial factors and metabolic parameters: is there any association in elderly people? The Massa Lombarda Project. *Aging Ment Health* 14:801-806.
174. Fenger RV, Gonzalez-Quintela A, Linneberg A, Husemoen LL, Thuesen BH, Aadahl M, Vidal C, Skaaby T, Sainz JC, Calvo E (2013) The relationship of serum triglycerides, serum HDL, and obesity to the risk of wheezing in 85,555 adults. *Respir Med* 107:816-824.
175. Tchernof A, Després JP (2013) Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev* 93:359-404.
176. Musso C, Graffigna M, Soutelo J, Honfi M, Ledesma L, Miksztowicz V, Pazos M, Migliano M, Schreier LE, Berg GA (2011) Cardiometabolic risk factors as apolipoprotein B, triglyceride/HDL-cholesterol ratio and C-reactive protein, in adolescents with and without obesity: cross-sectional study in middle class suburban children. *Pediatr Diabetes* 12:229-234.
177. Rosmond R, Dallman MF, Björntorp P (1998) Stress-related cortisol secretion in men: relationships with abdominal obesity and endocrine, metabolic and hemodynamic abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1853-1859.
178. Blusková Z, Košťálová L, Celec P, Vitáriušová E, Pribilincová Z, Maršálková M, Šemberová J, Kyselová T, Hlavatá A, Kovács L (2014) Evaluation of lipid and glucose metabolism and cortisol and thyroid hormone levels in obese appropriate

- for gestational age (AGA) born and non-obese small for gestational age (SGA) born prepubertal Slovak children. *J Pediatr Endocrinol Metab* 27:693-699.
179. Treviño Villarreal DC, López Guevara V, Ramírez López LE, Tijerina Sáenz A (2012) Relationship of serum cortisol and metabolic syndrome components, dietary intakes and anxiety disorder in children at 8 to 12 years of age with obesity. *Nutr Hosp* 27:1562-1568.
180. Sen Y, Aygun D, Yilmaz E, Ayar A (2008) Children and adolescents with obesity and the metabolic syndrome have high circulating cortisol levels. *Neuro Endocrinol Lett* 29:141-145.
181. Ward AM, Fall CH, Stein CE, Kumaran K, Veena SR, Wood PJ, Syddall HE, Phillips DI (2003) Cortisol and the metabolic syndrome in South Asians. *Clin Endocrinol (Oxf)* 58:500-505.
182. Willett WC, Dietz WH, Colditz GA (1999) Guidelines for healthy weight. *N Engl J Med* 341:427-434.
183. Watters JL, Park Y, Hollenbeck A, Schatzkin A, Albanes D (2009) Cigarette smoking and prostate cancer in a prospective US cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18:2427-2435.
184. De Palma M, Lewis CE (2013) Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell* 23:277-286.
185. Sun T, Yang Y, Luo X, Cheng Y, Zhang M, Wang K, Ge C (2014) Inhibition of tumor angiogenesis by interferon- γ by suppression of tumor-associated macrophage differentiation. *Oncol Res* 21:227-235.
186. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE (2002) The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 196:254-265.
187. Shieh YS, Hung YJ, Hsieh CB, Chen JS, Chou KC, Liu SY (2009) Tumor-associated macrophage correlated with angiogenesis and progression of mucoepidermoid carcinoma of salivary glands. *Ann Surg Oncol* 16:751-760.
188. De Palma M, Venneri MA, Roca C, Naldini L (2003) Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat Med* 9:789-795.
189. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW (2001) Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* 193:727-740.
190. Shi L, Lei D, Ma C, Xu F, Li Y, Wang Y, Cong N, Liu D, Pan XL (2010) Clinicopathological implications of tumour-associated macrophages and

- vascularization in sinonasal melanoma. *J Int Med Res* 38:1276-1286.
191. Ding T, Xu J, Wang F, Shi M, Zhang Y, Li SP, Zheng L (2009) High tumor-infiltrating macrophage density predicts poor prognosis in patients with primary hepatocellular carcinoma after resection. *Hum Pathol* 40:381-389.
192. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL (1996) Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 56:4625-4629.
193. Mantovani A, Allavena P, Sica A (2004) Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. *Eur J Cancer* 40:1660-1667.
194. Liu YC, Zou XB, Chai YF, Yao YM (2014) Macrophage polarization in inflammatory diseases. *Int J Biol Sci* 10:520-529.
195. Gordon S, Martinez FO (2010) Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32:593-604.
196. Zhou D, Huang C, Lin Z, Zhan S, Kong L, Fang C, Li J (2014) Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cell Signal* 26:192-197.
197. Galdiero MR, Garlanda C, Jaillon S, Marone G, Mantovani A (2013) Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression. *J Cell Physiol* 228:1404-1412.
198. Martinez FO, Helming L, Gordon S (2009) Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 27:451-483.
199. Lanciotti M, Masieri L, Raspollini MR, Minervini A, Mari A, Comito G, Giannoni E, Carini M, Chiarugi P, Serni S (2014) The role of M1 and M2 macrophages in prostate cancer in relation to extracapsular tumor extension and biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Biomed Res Int* 2014:486798.
200. Hu W, Li X, Zhang C, Yang Y, Jiang J, Wu C (2016) Tumor-associated macrophages in cancers. *Clin Transl Oncol* 18:251-258.
201. Cao W, Peters JH, Nieman D, Sharma M, Watson T, Yu J (2015) Macrophage subtype predicts lymph node metastasis in oesophageal adenocarcinoma and promotes cancer cell invasion in vitro. *Br J Cancer* 113:738-746.
202. Kurahara H, Takao S, Maemura K, Mataka Y, Kuwahata T, Maeda K, Sakoda M, Iino S, Ishigami S, Ueno S, Shinchi H, Natsugoe S (2013) M2-polarized tumor-associated macrophage infiltration of regional lymph nodes is associated with nodal lymphangiogenesis and occult nodal involvement in pN0 pancreatic cancer. *Pancreas* 42:155-159.

203. Kurahara H, Shinci H, Matak Y, Maemura K, Noma H, Kubo F, Sakoda M, Ueno S, Natsugoe S, Takao S (2011) Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *J Surg Res* 167:e211-219.
204. Leek RD, Hunt NC, Landers RJ, Lewis CE, Royds JA, Harris AL (2000) Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J Pathol* 190:430-436.
205. Lewis JS, Landers RJ, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE (2000) Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinoma. *J Pathol* 192:150-158.
206. Chen WT, Hung WC, Kang WY, Huang YC, Su YC, Yang CH, Chai CY (2009) Overexpression of cyclooxygenase-2 in urothelial carcinoma in conjunction with tumor-associated-macrophage infiltration, hypoxia-inducible factor-1alpha expression, and tumor angiogenesis. *APMIS* 117:176-184.
207. Tjiu JW, Chen JS, Shun CT, Lin SJ, Liao YH, Chu CY, Tsai TF, Chiu HC, Dai YS, Inoue H, Yang PC, Kuo ML, Jee SH (2009) Tumor-associated macrophage-induced invasion and angiogenesis of human basal cell carcinoma cells by cyclooxygenase-2 induction. *J Invest Dermatol* 129:1016-1025.
208. Clear AJ, Lee AM, Calaminici M, Ramsay AG, Morris KJ, Hallam S, Kelly G, Macdougall F, Lister TA, Gribben JG (2010) Increased angiogenic sprouting in poor prognosis FL is associated with elevated numbers of CD163+ macrophages within the immediate sprouting microenvironment. *Blood* 115:5053-5056.
209. Liu S, Jin K, Hui Y, Fu J, Jie C, Feng S, Reisman D, Wang Q, Fan D, Sukumar S, Chen H (2015) HOXB7 promotes malignant progression by activating the TGFβ signaling pathway. *Cancer Res* 75:709-719.
210. Wan S, Zhao E, Kryczek I, Vatan L, Sadovskaya A, Ludema G, Simeone DM, Zou W, Welling TH (2014) Tumor-associated macrophages produce interleukin 6 and signal via STAT3 to promote expansion of human hepatocellular carcinoma stem cells. *Gastroenterology* 147:1393-1404.
211. Tsao TS, Lodish HF, Fruebis J (2002) ACRP30, a new hormone controlling fat and glucose metabolism. *Eur J Pharmacol* 440:213-221.
212. Cheng X, Folco EJ, Shimizu K, Libby P (2012) Adiponectin induces pro-inflammatory programs in human macrophages and CD4+ T cells. *J Biol Chem* 287:36896-36904.
213. Folco EJ, Rocha VZ, López-Ilasaca M, Libby P (2009) Adiponectin inhibits pro-inflammatory signaling in human macrophages independent of interleukin-10. *J Biol Chem* 284:25569-25575.

214. Goldstein BJ, Scalia RG, Ma XL (2009) Protective vascular and myocardial effects of adiponectin. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 6:27-35.
215. Rossi A, Lord JM (2013) Adiponectin inhibits neutrophil apoptosis via activation of AMP kinase, PKB and ERK 1/2 MAP kinase. *Apoptosis* 18:1469-1480.
216. Castro-Alcaraz S, Miskolci V, Kalasapudi B, Davidson D, Vancurova I (2002) NF-kappa B regulation in human neutrophils by nuclear I kappa B alpha: correlation to apoptosis. *J Immunol* 169:3947-3953.
217. Ward C, Chilvers ER, Lawson MF, Pryde JG, Fujihara S, Farrow SN, Haslett C, Rossi AG (1999) NF-kappaB activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro. *J Biol Chem* 274:4309-4318.
218. Jung MY, Kim HS, Hong HJ, Youn BS, Kim TS (2012) Adiponectin induces dendritic cell activation via PLCγ/JNK/NF-κB pathways, leading to Th1 and Th17 polarization. *J Immunol* 188:2592-2601.
219. Abbas AK, Murphy KM, Sher A (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383:787-793.
220. Tang CH, Chiu YC, Tan TW, Yang RS, Fu WM (2007) Adiponectin enhances IL-6 production in human synovial fibroblast via an AdipoR1 receptor, AMPK, p38, and NF-kappa B pathway. *J Immunol* 179:5483-5492.
221. van den Brink GR, O'Toole T, Hardwick JC, van den Boogaardt DE, Versteeg HH, van Deventer SJ, Peppelenbosch MP (2000) Leptin signaling in human peripheral blood mononuclear cells, activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein (MAP) kinase and p70 S6 kinase. *Mol Cell Biol Res Commun* 4:144-150.
222. Ham M, Lee JW, Choi AH, Jang H, Choi G, Park J, Kozuka C, Sears DD, Masuzaki H, Kim JB (2013) Macrophage glucose-6-phosphate dehydrogenase stimulates proinflammatory responses with oxidative stress. *Mol Cell Biol* 33:2425-2435.
223. Lilić M, Kulig K, Messaoudi I, Remus K, Janković M, Nikolić-Zugić J, Vukmanović S (1999) CD8(+) T cell cytolytic activity independent of mitogen-activated protein kinase / extracellular regulatory kinase signaling (MAP kinase / ERK). *Eur J Immunol* 29:3971-3977.
224. Riese MJ, Grewal J, Das J, Zou T, Patil V, Chakraborty AK, Koretzky GA (2011) Decreased diacylglycerol metabolism enhances ERK activation and augments CD8+ T cell functional responses. *J Biol Chem* 286:5254-5265.
225. Riemann A, Ihling A, Thomas J, Schneider B, Thews O, Gekle M (2015) Acidic environment activates inflammatory programs in fibroblasts via a cAMP-MAPK

- pathway. *Biochim Biophys Acta* 1853:299-307.
226. Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, Wei S, Huang E, Finlayson E, Simeone D, Welling TH, Chang A, Coukos G, Liu R, Zou W (2009) Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 114:1141-1149.
227. Li J, Mo HY, Xiong G, Zhang L, He J, Huang ZF, Liu ZW, Chen QY, Du ZM, Zheng LM, Qian CN, Zeng YX (2012) Tumor microenvironment macrophage inhibitory factor directs the accumulation of interleukin-17-producing tumor-infiltrating lymphocytes and predicts favorable survival in nasopharyngeal carcinoma patients. *J Biol Chem* 287:35484-35495.
228. Ke M, Wang H, Zhang M, Tian Y, Wang Y, Li B, Yu J, Dou J, Xi T, Zhou C (2014) The anti-lung cancer activity of SEP is mediated by the activation and cytotoxicity of NK cells via TLR2/4 in vivo. *Biochem Pharmacol* 89:119-130.
229. Bellora F, Castriconi R, Dondero A, Pessino A, Nencioni A, Liggieri G, Moretta L, Mantovani A, Moretta A, Bottino C (2014) TLR activation of tumor-associated macrophages from ovarian cancer patients triggers cytolytic activity of NK cells. *Eur J Immunol* 44:1814-1822.

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

Direktorin: Prof. Dr. med. Heike Kielstein

Thesen der Dissertation

Der Einfluss von Adipositas bei p38- und extracellular signal-regulated kinase 1/2-
vermittelten Immunreaktionen in der Tumor-Azidose -
Eine Pilotstudie an humanen Immunzellen männlicher Probanden

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

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

von Moritz Breitling
geboren am 08.09.1989 in Halle (Saale)

1. Adipositas stellt einen weit verbreiteten und von steigender Prävalenz gekennzeichneten Risikofaktor für die Tumorphagenese dar.
2. Die Azidose als Charakteristikum des Tumormikromilieus moduliert zelluläre Funktionen.
3. TAMs (tumor-associated macrophages) gehen mit einer schlechteren Prognose für verschiedene Malignome einher.
4. Die MAPKs (mitogen-activated proteinkinasen) ERK-1/2 und p38 stellen wichtige immunregulatorische Proteinkinasen dar, die auch in der Steuerung anderer zellulärer Funktionen von Bedeutung sind.
5. In der vorliegenden Studie zeigen adipöse, im Vergleich zu normalgewichtigen Männern, ein erhöhtes - mit der beruflichen Tätigkeit assoziiertes - Stressempfinden.
6. Die HDL- (high-density lipoprotein) Konzentration ist bei den untersuchten adipösen Männern signifikant niedriger, als bei den Normalgewichtigen.
7. Die Tumor-Azidose hat weder auf die Expression von ERK1/2 und p38, deren jeweilige phosphorylierte Form, noch auf die Aktivierbarkeit in den untersuchten PBMC (peripheral blood mononuclear cells) einen signifikanten Einfluss.
8. Die Expressionen von ERK1/2, pERK1/2 (phosphorylated ERK1/2) und deren Aktivierbarkeit (pERK1/2 / ERK1/2) zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen normalgewichtigen und adipösen Männern, jedoch wurde in der vorliegenden Studie eine deutliche Tendenz, im Sinne einer reduzierten Expression von ERK1/2 im physiologischen pH-Milieu, erkennbar.
9. Die Aktivierbarkeit der p38-MAPK in den PBMC adipöser Männer ist im Vergleich zu normalgewichtigen Probanden bei einem physiologischen pH-Wert signifikant erhöht und zeigt auch in der Azidose eine entsprechende Tendenz.
10. Die gesteigerte Aktivierbarkeit der p38-MAPK in den PBMC könnte sich in einer Beeinflussung inflammatorisch relevanter Reaktionen in adipösen Männern äußern.

Anhang

A1: Musterfragebogen

FRAGEBOGEN

„ Einfluss des Tumormilieus auf verschiedene Aktivierungsparameter von humanen PBMC´s normalgewichtiger und adipöser Männer“

Bitte markieren Sie die jeweils zutreffende Antwort mit einem kleinen Kreuz!

Körpergewicht:

Größe:

Pseudonymisierungs-Code (wird von einem Mitarbeiter ausgefüllt):

1. Haben Sie Geschwister, wenn ja wie viele? ja (Anzahl:)
 nein

2. Sind bzw. waren Ihre Geschwister übergewichtig, wenn ja wie viele?
 ja (Anzahl:)
 nein

3. Sind bzw. waren Ihr Vater und/oder Ihre Mutter
übergewichtig? Vater übergewichtig
 Mutter übergewichtig
 keiner von beiden
übergewichtig

4. Familienstand Single
 In einer festen Beziehung
 Verheiratet

5. Haben Sie Kinder, wenn ja wie viele? ja (Anzahl:)
 nein

6. Ist Ihre/Ihr Partnerin/Partner übergewichtig? ja
 nein

7. Ist/Sind Ihr/Ihre Kind/Kinder übergewichtig (wenn mehrere Kinder, dann wie viele davon
übergewichtig)? ja (Anzahl:)
 nein

8. Haben Sie in Ihrer Vergangenheit (vor mehr als fünf Jahren) an einer Krebserkrankung
gelitten, wenn ja an welcher/-en? ja

 nein

9. Sind bzw. waren Krebserkrankungen in Ihrer Familie bekannt, wenn ja welche
Krebserkrankung und bei wem? ja

 nein

10. Höchster Bildungsstand
- Haupt-/ Realschulabschluss
 - Fachabitur/Abitur
 - Fachschulabschluss
 - Hochschulabschluss
 - Abgeschlossene Berufsausbildung
 - Kein Abschluss
11. Aktuelle Berufstätigkeit
- Ganztags erwerbstätig
 - Halbtags erwerbstätig
 - Hausmann
 - Rentner
 - Schüler/Student/Azubi
 - nicht erwerbstätig
12. Arbeitszeit pro Woche:
- > 40 h
 - 35 - 40 h
 - 30 - 35 h
 - 25 - 30 h
 - 20 - 25 h
 - < 20 h
13. Schichtarbeit und/oder Wochenendarbeit?
- ja
 - nein
14. Haben Sie regelmäßigen Umgang mit potentiell gesundheitsgefährdenden Stoffen, wenn ja welche?
- ja
 - nein
-
15. Ist Ihnen gesunde Ernährung wichtig?
- ja
 - nein
16. Sind Sie Veganer bzw. Vegetarier?
- Veganer
 - Vegetarier
 - keines von beiden
17. Worauf achten Sie bei Ihrer Ernährung besonders? (mehrere Antwortmöglichkeiten)
- vorwiegend kalorienarm
 - vorwiegend kalorienreich
 - vorwiegend ballaststoffreich
 - niedriger Preis
 - fetthaltig
 - keine Beachtung der genannten Punkte bei der Ernährung

18. Essen Sie weiter, auch wenn Sie satt sind? ja
 nein
19. Trinken Sie Alkohol? ja
 nein
20. Wie oft trinken Sie Alkohol? täglich
 aller 2-3 Tage
 1 x pro Woche
 1-2 x pro Monat
 < 1-2 x pro Monat
21. Wie viel Alkohol trinken Sie durchschnittlich?
22. Sind Sie Raucher, wenn ja wie viele Zigaretten rauchen Sie im Durchschnitt täglich? ja (Anzahl:)
 nein
-
23. Betreiben sie aktiv Sport? ja
 nein
24. Welche Sportart(-en) betreiben Sie?
25. Wie oft treiben Sie Sport? < 1x pro Woche
 1x pro Woche
 2 x pro Woche
 3 x pro Woche
 > 3 x pro Woche
26. Welchen Zeitumfang hat eine Trainingseinheit ungefähr? < 0,5 h
 0,5 h
 1 h
 1,5 h
 > 1,5 h
-
27. Fühlen Sie sich in einem der folgenden Bereiche häufig gestresst? Beruf
 privates Umfeld
 Sport
 kein/kaum Stressempfinden
 Sonstige ()

Selbstständigkeitserklärung

Ich, Moritz Breitling, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Halle (Saale), den 01.06.2016

Moritz Breitling

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich versichere, dass die Arbeit bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Ich stelle den Antrag auf Eröffnung des Promotionsverfahrens erstmalig an die Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Einen früheren Promotionsversuch meinerseits gab es nicht.

Halle (Saale), den 01.06.2016

Moritz Breitling

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Moritz Breitling

Geburtsdatum: 08.09.1989

Geburtsort: Halle (Saale)

Anschrift: Brandenburger Straße 10
06114 Halle (Saale)

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Schulische Ausbildung

1996 - 2001 Grundschole „Bergschule“ in Bad Köstritz (Thüringen)

2001 - 18.06.2008 Besuch des Gymnasiums „Osterlandgymnasium Gera“
in Gera (Thüringen)

18.06.2008 Allgemeine Hochschulreife/Abitur

Beruflicher Werdegang und Studium

03.11.2008 - 27.02.2009 Praktikum in der Gemeinschaftspraxis Dr. med. Petra Breitling/
Dr. med. Tilo Breitling in Gera

01.04.2009 - 30.04.2009 Pflegepraktikum im
„Krankenhaus St. Elisabeth & St. Barbara“ in Halle (Saale)

01.10.2009 - 29.11.2014 Studium der Zahnmedizin an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

11.12.2014	Approbation als Zahnarzt
01.04.2015 - 31.12.2015	Zahnärztliche Tätigkeit als Vorbereitungsassistent im „ZahnMedizinCenter Sachsen Anhalt" in Sandersdorf und in Wolfen
seit 01.01.2016	Zahnärztliche Tätigkeit als Vorbereitungsassistent im „Dentale - Zahnärztliches Kompetenzzentrum Leipzig“ in Leipzig

Halle (Saale), den 01.06.2016

Moritz Breitling

Danksagung

Eine Dissertation ist nicht ohne die Unterstützung anderer Personen möglich. Daher möchte ich mich an dieser Stelle bei all den entsprechenden Menschen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner akademischen Lehrerin, Frau Professor Dr. med. Heike Kielstein, die mir durch Überlassung des Themas die vorliegende Dissertation ermöglicht hat. Ich möchte Ihr ganz besonders danken für jedweden Rat, Zuspruch, für die Hilfestellungen und nicht zuletzt natürlich auch für Ihre Geduld.

Danken möchte ich auch sehr Herrn Professor Dr. med. Oliver Thews, ohne dessen Unterstützung und Hilfestellung diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Mein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der MLU-Halle-Wittenberg, insbesondere Frau Janine Jahn und den Mitarbeitern des Julius-Bernstein-Instituts für Physiologie der MLU-Halle-Wittenberg, insbesondere MTA Bettina und Frau Dr. rer. nat. Anne Riemann, die tatkräftig Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Untersuchungen geleistet haben.

Zuletzt möchte ich mich speziell bei meiner Ehefrau Anke und meinen Eltern für ihre Unterstützung, Geduld und Liebe bedanken, die mich nicht verzagen ließen und letztlich entscheidend zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.