

**Untersuchungen zur Expression spezifischer NK-Zell-Rezeptoren im Fettgewebe
normalgewichtiger und Diät-induziert adipöser Versuchstiere**

Dissertation

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

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

von Khaled Walid Hussein Zubaidi
geboren am 10.01.1993 in Naumburg

Betreuerin: Prof. Dr. med. Heike Kielstein

Gutachter:

Prof. Dr. Jonas Rosendahl

Prof Dr. Stefan Engeli

Datum der Verteidigung: 17.01.2023

Referat

Zahlreiche Studien konnten Adipositas als Risikofaktor für unterschiedliche Krebserkrankungen identifizieren. Natürliche Killer (NK-) Zellen gehören zum angeborenen Immunsystem und sind in der Lage tumoröse oder infizierte Zellen zu erkennen und abzutöten. Aus früheren Studien ist bekannt, dass NK-Zellen bei Adipositas in ihrer Funktionalität gestört sind. Die Ursachen hierfür sind zum Teil noch unklar. Ziel dieser Arbeit war es, NK-Zellen im Fettgewebe von Diät-induziert adipösen Ratten nach Tumorinduktion mittels Expressionsanalysen eines breiten Spektrums von spezifischen NK-Zell-Rezeptoren zu charakterisieren.

In zwei voneinander unabhängigen Tierversuchen erfolgte die Induktion einer Adipositas. In einem Tierversuch zur Untersuchung der Metastasierung eines Mammakarzinoms erhielten 64 männliche Fischer-344-Ratten über sechs bis zehn Wochen eine Hoch-Fett-Diät oder eine Kontrolldiät. Es wurden den Tieren Zellen eines syngenetischen Adenokarzinoms (MADB106) oder ein Vehikel i.v. injiziert. Anschließend wurden die Tiere 15 min (Kurzzeitversuch) bzw. drei Wochen (Langzeitversuch mit der Manifestierung von selektiven Lungenmetastasen) nach der Tumorzell-Injektion getötet und das viszerale Fettgewebe entnommen. In einem zweiten Tierversuch (Kolonkarzinom-Modell) wurden 50 sechs Wochen alte, männliche Wistar Ratten mit einer 46 Wochen dauernden Diät (Hoch-Fett-Diät oder Kontrolldiät) gefüttert. Nach acht Wochen erhielten die Tiere subkutane Injektionen mit einem Kanzerogen zur Induktion von kolorektalen Karzinomen oder ein Vehikel. Nach Abschluss der Diät folgte die Tötung der Tiere mit anschließender Entnahme des viszeralen Fettgewebes. Das entnommene Fettgewebe aus beiden Tierversuchen wurde mittels *real-time* RT-PCR auf die Expression spezifischer NK-Zell-Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Liganden und Zytokine untersucht.

In beiden Tierversuchen zeigten sich signifikante Veränderungen der Expression verschiedener aktivierender und inhibierender NK-Zell-Rezeptoren (NKp46, NKG2A, NKG2D, Ly49b, CD94, Ly49i4, Ly49i5, Ly49i6, Ly49s2, Ly49s4, Ly49s6, 2B4), Transkriptionsfaktoren (Tbx21, Eomesodermin), Liganden (Tnfsf10) und Zytokine (TNF- α) durch Fütterung einer Hoch-Fett-Diät oder durch Tumor-bedingte Effekte auf die Gen-Expression.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen Adipositas und einer veränderten Genexpression von Oberflächenrezeptoren der NK-Zellen im Fettgewebe von Fischer-344 - und Wistar- Ratten. Es ist zu vermuten, dass diese veränderte Rezeptorausstattung der im Fettgewebe adipöser Individuen geprägten NK-Zellen eine Rolle bei der Entwicklung von Adipositas-assoziierten Krebserkrankungen spielt.

Zubaidi, Khaled: Untersuchungen zur Expression spezifischer NK-Zell-Rezeptoren im Fettgewebe normalgewichtiger und Diät-induziert adipöser Versuchstiere, Halle (Saale), Univ., Med. Fak.; Diss., 61 Seiten, 2021

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Adipositas – Die „Pandemie“ des 21. Jahrhunderts.....	1
1.2 Fettgewebe als Energiespeicher mit endokriner Funktion	1
1.3 Das immun-metabolische Milieu unter Adipositas.....	2
1.4 Systemische Folgen von Adipositas.....	3
1.5 NK-Zellen	5
1.5.1 Killerzellen-immunglobulinähnliche Rezeptoren (KIR).....	6
1.5.2 C-Typ Lektin-Proteinfamilie: Killerzellen-lektinähnliche Rezeptoren (KLR) und Rezeptor-Subfamilie A (Ly49)	7
1.5.3 Natürliche zytotoxische Rezeptoren (NCRs)	7
1.6 Adipositas, veränderte NK-Zellen und Neoplasien.....	8
1.7 NK-Zellen im Fettgewebe.....	9
2 Zielstellung.....	10
3 Material und Methodik.....	11
3.1 Ratten-Tumor-Modell mit MADB106-Tumorzellen	11
3.2 Ratten-Tumor-Modell mit Azoxymethan.....	13
3.3 <i>Real-time</i> -RT-PCR-Untersuchungen im Fettgewebe der Versuchstiere.....	14
3.3.1 RNA-Extraktion und spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung	15
3.3.2 cDNA-Synthese.....	17
3.3.3 Empirische Ermittlung der <i>Annealing</i> -Temperatur der Primerpaare	18
3.3.4 Bestimmung des <i>housekeeping</i> -Gens.....	20
3.3.5 Ermittlung der Amplifikationseffizienz der Primerpaare.....	21
3.3.6 <i>real time</i> -PCR (qRT-PCR).....	23
3.3.7 Gelelektrophorese der PCR-Produkte	24
.....	25
3.4 Statistische Auswertung.....	25
4 Ergebnisse	26
4.1 Ratten-Tumor-Modell mit MADB106-Zellen und Diät-induzierter Adipositas (Mammakarzinom-Modell).....	26
4.1.1 Entwicklung von Körpergewicht, Fettstoffwechselfparameter und Tumorbefund	26
4.1.2 Relative mRNA-Konzentration von NK-Zell-relevanten Genen im Fettgewebe im Ratten-Tumor-Modell mit MADB106-Zellen und Diät-induzierter Adipositas	27

4.2 Ratten-Tumor-Modell mit Azoxymethan und Diät-induzierter Adipositas (Modell des Kolorektalkarzioms).....	33
4.2.1 Entwicklung von Körpergewicht, Fettstoffwechselfparameter und Tumorbefund	33
4.2.2 Relative mRNA-Konzentration von NK-Zell-relevanten Genen im Fettgewebe im Ratten-Tumor-Modell mit Azoxymethan und Diät-induzierter Adipositas	35
5. Diskussion	40
6. Zusammenfassung	50
7. Literaturverzeichnis	52
8. Thesen	61
Anlagen	V
Selbständigkeitserklärung	IX
Erklärung über frühere Promotionsversuche.....	X
Danksagung.....	XI

Abkürzungsverzeichnis

APC	<i>Antigen presenting cells</i>
ADCC	<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
AOM	<i>Azoxymethan</i>
ATM	<i>Adipose tissue macrophages</i>
BCR	<i>B-cell receptor, B-Zellrezeptor</i>
BMI	<i>Body mass index</i>
Bp	<i>Basenpaare</i>
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i>
C/EBP- α	<i>CCAAT/enhancer-binding protein-alpha</i>
cDNA	<i>Complementary desoxyribose nucleic acid</i>
CCL5	<i>CC-chemokine ligand 5</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CLP	<i>Common lymphoid progenitor</i>
C _T	<i>Threshold cycle</i>
DEPC	<i>Diethyldicarbonat/ Diethylpyrocarbonat</i>
DNA	<i>Desoxyribose nucleic acid</i>
E	<i>Effizienz</i>
EPIC	<i>European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition</i>
<i>et al.</i>	<i>Et alii</i>
GvHR	<i>Graft-versus-Host-Reaktion</i>
HFD	<i>Hoch-Fett-Diät</i>
HIF	<i>Hypoxie-induzierter Faktor</i>
HLA	<i>humaner Leukozyten Antigenkomplex</i>
hsCRP	<i>High- sensitivity C-reaktives Protein</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ICL	<i>Innate lymphoid cells</i>
Ig	<i>Immunglobulin</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IL	<i>Interleukin</i>
ITAM	<i>Immunrezeptor-tyrosinbasierte Aktivierungsmotive</i>
ITIM	<i>Immunrezeptor-tyrosinbasierte Inhibierungsmotive</i>
INF- γ	<i>Interferon-γ</i>
I. v.	<i>Intravenös</i>
KIR	<i>Killerzellen-immunglobulinähnliche Rezeptoren</i>
KLAR	<i>Killerzellen-lektinähnliche Rezeptoren</i>
KSM	<i>Krebsspezifische Mortalität</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
M-CSF-1	<i>Macrophage colony stimulating factor</i>
MCP1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MIC	<i>MHC class I polypeptide-related sequence</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
NF κ B	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
NKDI _s	<i>NK cell developmental intermediates</i>
NKG	<i>Natural killer group</i>

PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PI-3-Kinase	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>
PPAR- γ 2	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ 2
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
RAET1	<i>Retinoic acid early transcript 1</i>
RBP-4	Retinol-bindendes Protein 4
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	<i>Reverse-transcription polymerase chain reaction</i>
S. c.	Subkutan
SEM	<i>Standard error of mean</i>
SHBG	<i>Sex hormone-binding globulin</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCR	<i>T-cell receptor, T-Zellrezeptor</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor-beta</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
T _a	<i>Annealing-Temperatur</i>
T _m	Schmelztemperatur
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
TYROB	<i>Tyrosine kinase-binding protein</i>
ULBP	<i>UL16 binding proteins</i>
UpM	Umdrehungen pro Minute
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

1.1 Adipositas – Die „Pandemie“ des 21. Jahrhunderts

In den letzten vier Jahrzehnten hat sich die weltweite Prävalenz von Übergewicht und Adipositas sowohl im Kindes- als auch im Erwachsenenalter verdreifacht. Im Jahr 2016 betrug die Zahl der Erwachsenen mit Übergewicht 1,9 Milliarden weltweit, davon waren 650 Millionen adipös. Die Anzahl der Kinder und Jugendlichen, die 2016 weltweit mit Übergewicht oder Adipositas erfasst wurden, betrug 381 Millionen (Weltgesundheitsorganisation (WHO) 2018). Laut der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS₁), die vom Robert-Koch-Institut im Zeitraum von 2008 bis 2011 in Deutschland durchgeführt wurde, waren unter den 18- bis 79-Jährigen 67,1 % der Männer und 53 % der Frauen übergewichtig. Dabei lag die Adipositasprävalenz bei 23,3 % für Männer und bei 23,9 % für Frauen. Im Vergleich zu früheren Jahren hat die Prävalenz von Adipositas bei Kindern und Erwachsenen deutlich zugenommen. (Schienkiewitz und Mensink 2017).

Adipositas wird durch eine multifaktorielle Genese ausgelöst und führt durch erhebliche Veränderungen im Organismus zu gesundheitlichen Schäden (WHO 2000). Als Richtwert zur Einschätzung und Klassifizierung des Körpergewichts wird häufig der *Body Mass Index* (BMI) herangezogen. Hierbei wird das Körpergewicht (gemessen in Kilogramm) in Relation zum Quadrat der Körpergröße (gemessen in Metern) gesetzt. Gemäß der WHO liegt der BMI von normalgewichtigen Erwachsenen im Bereich zwischen 18,5 kg/m² und 24,9 kg/m². Erwachsene mit einem BMI ≥ 25 kg/m² gelten als übergewichtig und ab einem BMI von 30 kg/m² besteht eine behandlungsbedürftige Adipositas.

1.2 Fettgewebe als Energiespeicher mit endokriner Funktion

Lange Zeit wurde weißes Fettgewebe als ein metabolisch inaktives Gewebe betrachtet, welches nur als Speicher für Triglyceride bei Energieüberschuss bzw. eine Quelle für Fettsäuren bei erhöhtem Energiebedarf diene. Jedoch übersteigt die Bedeutung des weißen Fettgewebes seine Funktion als Fettspeicher bei weitem. Es ist als ein endokrines Organ an der Stoffwechselregulation im Organismus beteiligt. Fettgewebszellen (Adipozyten) sezernieren Fettgewebshormone, sog. Adipokine, die spezifische biologische Funktionen vermitteln. Dazu zählen Leptin, Adiponektin, Apelin, Chemerin, Visfatin, Resistin, RBP-4 (Retinol-bindendes Protein 4) und viele weitere. Sie beeinflussen u. a. die Energiebalance des Organismus, den Fettstoffwechsel, das Immunsystem, die Insulinsensitivität, die Angiogenese und den Blutdruck (Vázquez-Vela *et al.* 2008). Je nach Körperkompartiment besitzt weißes Fettgewebe unterschiedliche immun-metabolische Eigenschaften. Viszerales Fettgewebe ist metabolisch

aktiver als subkutanes Fettgewebe und besitzt sowohl im physiologischen als auch pathologischen Zustand eine höhere Dichte an Immunzellen. Im Vergleich dazu nimmt subkutanes Fettgewebe im Blut zirkulierende, freie Fettsäuren in höherem Maße auf und speichert sie (Ibrahim 2010). Neben subkutanem und viszeralem Fettgewebe wird das perivaskuläre Fettgewebe gesondert beschrieben. Es weist sowohl weiße als auch braune Fettzellen in abwechselnder Verteilung auf (Nosalski und Guzik 2017).

1.3 Das immun-metabolische Milieu unter Adipositas

Der Zustand einer exzessiven Fetteinlagerung bei Übergewicht oder Adipositas führt zu erheblichen metabolischen und immunologischen Dysregulationen. Ab einem bestimmten Alter verlieren Präadipozyten zunehmend ihre Fähigkeit, sich in vollständig ausgereifte und funktionstüchtige Adipozyten zu differenzieren. Die für die Adipogenese wesentlichen Transkriptionsfaktoren *CCAAT/enhancer-binding protein- α* (C/EBP- α) und Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor $\gamma 2$ (PPAR- $\gamma 2$) weisen mit fortgeschrittenem Alter eine zunehmend geringere Expression auf (Tchkonina *et al.* 2007). Da Adipositas einen erhöhten Speicherungsbedarf bei gleichzeitig nur eingeschränkten Kapazitäten der Zellvermehrung provoziert, kommt es im Ergebnis zu der Entstehung von unreifen, dysfunktionellen Adipozyten mit relativ kleinen Fettvakuolen und hoher synthetischer Aktivität. Die endokrine Funktion des Fettgewebes ist gestört und es kommt zu einer erhöhten Prädisposition für metabolische Erkrankungen (Vázquez-Vela *et al.* 2008).

Ein weiterer Erklärungsansatz für die Adipositas-bedingten Störungen ist die Aktivität verschiedener Immunzellen im weißen Fettgewebe. Unter physiologischen Umständen sezernieren im Fettgewebe dominante Immunzellen wie M2-Makrophagen und regulatorische T-Helferzellen anti-inflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL) -4, IL-5, IL-10, IL-13 und *transforming growth factor-beta* (TGF- β). Dabei verstärkt eine regelrechte Adiponektinsekretion der Adipozyten die Bildung der Zytokine und die Insulinsensitivität im Gewebe wird gefördert, wodurch das anti-inflammatorische Milieu aufrechterhalten wird. Adipositas bewirkt eine verminderte Sekretion von Adiponektin bei gleichzeitig erhöhter Synthese von anderen Adipokinen wie Leptin, Resistin und Visfatin. Es entwickelt sich eine chronisch geringgradige Entzündung (*low-grade inflammation*) des Fettgewebes. Die Erhöhung der Konzentration an freien Fettsäuren durch eine erhöhte Insulinresistenz bei Adipositas wirkt sich ebenfalls pro-inflammatorisch aus. Durch das Adapterprotein Fetuin A können freie Fettsäuren an Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern Recognition Receptors*, PRRs) wie TLR4 und TLR2 (*Toll-like-Rezeptoren*) binden und durch Sekretion verschiedener Chemokine weitere Immunzellen anlocken, die das Entzündungsgeschehen fördern (Saltiel und Olefsky 2017).

Beispielsweise können Adipozyten die Chemokine *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP1), *macrophage colony stimulating factor (M-CSF-1)* und *CC-chemokine ligand 5* (CCL5) sezernieren und sorgen somit für eine Infiltration des Gewebes mit proinflammatorischen M1-Makrophagen (Shi *et al.* 2006). Im Gegensatz zu „gesundem“ Fettgewebe, findet bei „pathologischem“ Fettgewebe eine um ein Vielfaches höhere Infiltration von Immunzellen statt. Mittels Chemokinen angelockte aktive Immunzellen sezernieren vermehrt pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α (Tumornekrosefaktor- α), IL-2, IL-12 und INF- γ (Interferon- γ) und verstärken die Rekrutierung weiterer Immunzellen. Dadurch kommt es zu Aufrechterhalt und Chronifizierung der *low-grade inflammation* im Fettgewebe (Guzik *et al.* 2017).

Ein dritter Erklärungsansatz ist die unzureichende Vaskularisierung bei Adipositas-bedingter Expansion des Fettgewebes mit einer daraus resultierenden hypoxischen Stoffwechsellage. Als Reaktion auf den Sauerstoffmangel kommt es zur Induktion des Transkriptionsfaktors HIF (Hypoxie-induzierter Faktor), der die Zelle an das verminderte Sauerstoffangebot anpasst. Dies führt zur HIF-1 α -induzierten Sekretion von Chemokinen und zur Infiltration des Gewebes mit weiteren Immunzellen (Lee *et al.* 2014).

1.4 Systemische Folgen von Adipositas

Durch eine gestörte homöostatische Regulation im Fettgewebe stellt Adipositas einen zentralen Einflussfaktor bei der Entstehung zahlreicher nichtübertragbarer Krankheiten dar. Dazu zählen u. a. das metabolische Syndrom, kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus Typ II (Scherer und Hill 2016), Autoimmunerkrankungen (Hjuler *et al.* 2017; Kontny und Prochorec-Sobieszek 2013) und bestimmte Arten von Neoplasien (Lauby-Secretan *et al.* 2016). Dabei wird die chronische geringgradige Inflammation des viszeralen Fettgewebes bei Adipositas als einer der grundlegenden Pathomechanismen für die Entwicklung der metabolischen Dysregulation beschrieben. Zytokine, Adipokine und freie Fettsäuren fungieren dabei als Mediatoren der Entzündungsreaktion und der darauffolgenden metabolischen Störungen. Die bei Adipositas erhöhten Konzentrationen an pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und MCP-1, Adipokinen wie Leptin und Resistin sowie die verminderten Konzentrationen an Adiponektin und IL-10 stehen in Assoziation mit erhöhter Insulinresistenz und Hyperglykämie (Xu *et al.* 2003). Die bei Adipositas bestehende Hyperinsulinämie wird durch die periphere Insulinresistenz verstärkt. Mit der Zeit kann die Insulinsekretion im Pankreas versagen und die pankreatischen β -Zellen werden zunehmend apoptotisch, wodurch sich ein Diabetes mellitus Typ II manifestiert (Zeyda und Stulnig 2009). Bei Adipositas erhöhte CRP- (C-reaktives Protein), Renin-, Aldosteron- und Insulinwerte sowie Dyslipidämie, ein erhöhtes Herzzeitvolumen und eine Sympathikusaktivierung führen langfristig zur Entstehung von

Bluthochdruck und artherosklerotischen Schäden des Endothels, wodurch es zu einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen kommt (Ashraf und Baweja 2013). Auch die veränderten Konzentrationen an Adipokinen haben einen Einfluss auf die endotheliale Dysfunktion bei Herz-Kreislaufkrankungen. Während für Adiponektin vaskulär-protective Eigenschaften nachgewiesen werden konnte, stehen die proinflammatorischen Adipokine wie Leptin, Resistin und Chemerin im Zusammenhang mit endothelialer Dysfunktion und einhergehenden vaskulären Störungen (Liberale *et al.* 2017; Nosalski und Guzik 2017).

In den letzten Jahren wurde der direkte Zusammenhang zwischen einem exzessiv hohen Körpergewicht und einer erhöhten Inzidenz an Krebserkrankungen vielfach untersucht. (Gilbert und Slingerland 2013). Calle *et al.* gehörten zu den ersten Arbeitsgruppen, die mit umfangreichen Studien diesen Zusammenhang bestätigten (Calle *et al.* 2003). Die Internationale Agentur für Krebsforschung (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) berichtete 2016 über 13 Krebsarten mit evidenzgesicherter Assoziation zu Adipositas als Risikofaktor (Lauby-Secretan *et al.* 2016).

Wie zuvor beschrieben, leiden übergewichtige Menschen häufig an einer Hyperinsulinämie und weisen eine hohe Konzentration an IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*) im Blut auf. Bei einem Überangebot von Insulin und IGF-1 werden verstärkt die Signaltransduktionswege über mTOR (*mechanistic Target of Rapamycin*) und MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) aktiviert. Diese Signalwege regulieren das Wachstum, die Proliferation, die Motilität und die Apoptose von Zellen (Karczewski *et al.* 2019). Neoplastisches Gewebe ist durch eine hohe Insulin-Sensitivität gekennzeichnet. Tumorzellen von Kolon- und Leberneoplasien weisen beispielsweise eine erhöhte Expression an Insulinrezeptoren auf (Belfiore *et al.* 2017). Außerdem konnten erhöhte Östradiolwerte durch signifikant reduzierte Konzentrationen des SHBG (*sex hormone-binding globulin*) bei Hyperinsulinämie nachgewiesen werden. Somit scheint sich eine Hyperinsulinämie durch die Erhöhung freien Östradiols indirekt fördernd auf die Kanzerogenese auszuwirken (Pugeat *et al.* 1991). Einen direkteren Einfluss auf die Östrogenkonzentration im Blut erfolgt über die, bei Adipositas erhöhte, Bildung von Aromatase und 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase durch Adipozyten. Dadurch erhöht sich die Konzentration von Östrogen und Testosteron bei Männern und postmenopausalen Frauen, wodurch das Krebsrisiko insbesondere für die Entstehung von Keimdrüsentumoren deutlich erhöht wird (Key *et al.* 2003; Roddam *et al.* 2008). Durch die Adipositas-bedingte chronische Entzündungsreaktion im Fettgewebe, aber auch in anderen Geweben, und die damit dauerhaft hohen Zytokinwerte bildet sich ein Milieu mit onkogenem Potenzial, bestehend aus freien Radikalen, Immunzellsuppressoren, Hypoxie, veränderter Signaltransduktionen, Hochregulation von proliferativen und anti-apoptischen Vorgängen sowie Angiogenese und Zellmigration (Crusz und Balkwill 2015). Weiterhin wird vermutet, dass eine Adipokin-vermittelte Regulation

von Immunzellen eine weitere wichtige Rolle bei der Adipositas-assoziierten Onkogenese darstellen muss (van Kruijsdijk *et al.* 2009).

1.5 NK-Zellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) spielen eine bedeutende Rolle in der Abwehr von virusinfizierten und maligne transformierter Zellen. NK-Zellen sind Teil des angeborenen Immunsystems und gehören der ersten Gruppe angeborener lymphatischer Zellen an (*innate lymphoid cells*, ILC; Spits *et al.* 2013). Sie werden als „natürliche Killer“ bezeichnet, da sie ohne vorrangegangene Stimulation oder Antigenkontakt aktiviert werden und ihre Zielzellen angreifen. Sie bilden 5-20 % der zirkulierenden Lymphozyten im peripheren Blut des Menschen. Zusätzlich zum Knochenmark als primärer Entstehungsort können sich NK-Zellen auch im Thymus und in sekundären lymphatischen Organen entwickeln und reifen. NK-Zellen unterscheiden sich von anderen ILCs durch ihre Expression der Oberflächenmarker CD16 (Fc γ RIIIA), CD94/NKG2 (*natural killer group 2*) heterodimere, Killerzellen-immunglobulinähnliche Rezeptoren (KIRs), NKG2D und NKp80 (Moretta *et al.* 2014). Humane NK-Zellen können im peripheren Blut entsprechend ihrer Oberflächenmarker und immunmodulatorischen Effekte in zwei größere Subpopulationen differenziert werden: überwiegend zytokinbildende NK-Zellen mit einer hohen Expressionsdichte an CD56-Molekülen (CD56^{bright}) und überwiegend zytotoxische NK-Zellen mit einer niedrigen Expressionsdichte an CD56-Molekülen (CD56^{dim}). CD56^{bright}-NK-Zellen bilden mit ca. 5-10 % aller NK-Zellen die kleinere Fraktion der beiden Subpopulationen. Sie verweilen vorwiegend in den sekundären lymphatischen Organen und sind weniger zytotoxisch aktiv, aber dafür besonders potent in der Bildung von Zytokinen wie IFN- γ , besonders nach Stimulation mit den Monokinen IL-12, IL-15 und IL-18. Etwa 90 % der NK-Zellen im peripheren humanen Blut gehören zur CD56^{dim}-Subpopulation und weisen charakteristischerweise eine hohe Expression von CD16 und KIRs und eine geringere Expression an CD62L und CD94 auf. Nach Aktivierung konfrontieren die vorwiegend zytotoxischen CD56^{dim}-NK-Zellen ihre Zielzellen mit einer hohen Produktion und Ausschüttung von Perforinen und Granzymen aus intrazellulären Granula (Cooper *et al.* 2001). Auch bei Ratten und Mäusen kann man im peripheren Blut Subpopulationen von NK-Zellen differenzieren. Da sie jedoch keine CD56-Moleküle exprimieren, erfolgt die Differenzierung anhand der Expressionsdichte der Oberflächenmoleküle CD11b, CD27, DX5 (CD49b) und NKR-P1C bei Mäusen, sowie NKR-P1A bei Ratten (Inngjerdigen *et al.* 2011).

NK-Zellen verfügen über eine Vielzahl an aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren unterschiedlicher Klassen. Je nach Stimulation dieser Rezeptoren überwiegt ein aktivierendes

oder inhibierendes Signal, welches sich auf die Aktivität der NK-Zelle auswirkt. Die Signaltransduktion läuft bei den verschiedenen Rezeptortypen über ähnliche Kaskaden ab. Im Fall der inhibierenden Rezeptoren vermitteln bestimmte Signalsequenzen, sog. Immunrezeptor-tyrosinbasierte Inhibierungsmotive (ITIM) im zytoplasmatischen Anteil des Rezeptors eine hemmende Signalkaskade. Die aktivierenden Rezeptoren stehen über transmembranäre Domänen mit assoziierten Adapterproteinen (FcR γ , CD3 ζ , DAP12) in Verbindung, die über Immunrezeptor-tyrosinbasierte Aktivierungsmotive (ITAM) verfügen und somit eine aktivierende Signalkaskade auslösen können (Lanier 2008). Wie die meisten Effektorzellen des Immunsystems können auch NK-Zellen Fc-Rezeptoren exprimieren, die eine sog. antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) auslösen können. Der Fc γ RIII-Rezeptor (CD16) von NK-Zellen bindet Antikörper auf opsonierten Ziellzellen. Dadurch wird die NK-Zelle aktiviert und es kommt zur Degranulierung zytotoxischer Perforine und Granzyme (Ravetch und Bolland 2001).

Zu den wichtigsten Rezeptorfamilien humaner NK-Zellen gehören Killerzellen-immunglobulinähnliche Rezeptoren (KIR), Killerzellen-lektinähnliche Rezeptoren (KLR) und Natürliche zytotoxische Rezeptoren (NCRs).

1.5.1 Killerzellen-immunglobulinähnliche Rezeptoren (KIR)

KIRs sind Typ-1-Transmembranproteine, die zur Immunglobulin-Superfamilie gehören und MHC-I-Moleküle als Liganden binden. Sie werden überwiegend auf der Zelloberfläche von NK-Zellen exprimiert. Subpopulationen von CD4 $^{+/-}$, CD8 $^{+/-}$ und $\delta\gamma^{+}$ -T-Zellen können diese Rezeptorgruppe ebenfalls exprimieren. Die KIR-Gene gehören zu den variabelsten Genen im menschlichen Genom. Durch hohe Sequenz-Diversität und einem hohen Polymorphismus der Allele besitzt die KIR-Rezeptorfamilie ein großes Repertoire an Rezeptoren, die sich von einem Individuum zum anderen unterscheiden können. Sie sind Teil des Leukozytenrezeptorkomplexes (LRC) auf dem menschlichen Chromosom 19q13.4. Der LRC-Cluster kommt auch bei Nagetieren vor, jedoch ohne KIR-Gene (Béziat *et al.* 2017). Aus diesem Grund waren die KIR-Rezeptoren nicht Teil der Untersuchungen am Rattenmodell in dieser Arbeit.

1.5.2 C-Typ Lektin-Proteinfamilie: Killerzellen-лектinähnliche Rezeptoren (KLR) und Rezeptor-Subfamilie A (Ly49)

KLRs bestehen aus den zwei Untereinheiten CD94 und NKG2, die sich als Heterodimer an der Zelloberfläche von NK-Zellen und einer Subpopulation von CD8⁺-T-Zellen formieren. Daher sind sie auch als CD94/NKG2-Rezeptoren bekannt. Humane CD94/NKG2-Rezeptoren binden die nicht klassischen MHC-Klasse-Ib-Moleküle HLA-E, -F und -G als Liganden und können sowohl aktivierend als auch inhibierend auf die Funktion von NK-Zellen wirken. Im Gegensatz zu den KLRs humaner NK-Zellen besitzen die NK-Zellen von Nagern eine Subfamilie der Killerzellen-лектinähnlichen Rezeptoren mit der Bezeichnung KLR-Subfamilie A (KLRA oder Ly49). Die Ly49-Gene sind zwar keine genetischen Homologe für die KIR-Gene, besitzen aber einen ebenso hohen genetischen Polymorphismus mit funktionellen Parallelen der exprimierten Rezeptoren (Rahim et al. 2014). Aus dieser relativ großen Rezeptorfamilie sind mehr als 26 Rezeptoren bei Ratten und mehr als 15 Rezeptoren bei Mäusen bekannt (Dissen et al. 2008). Mit der Ausnahme eines einzigen Rezeptors mit verkürzten extrazellulären Domänen, der vermutlich nicht funktionell ist (Ly49L-Rezeptor), besitzen humane NK-Zellen keine Ly49-Rezeptoren (Westgaard et al. 1998).

1.5.3 Natürliche zytotoxische Rezeptoren (NCRs)

Es sind drei NCRs bekannt, die überwiegend von humanen NK-Zellen exprimiert werden: NKp46 (NCR1; CD335), NKp44 (NCR2; CD336) und NKp30 (NCR3; CD337). Diese Immunglobulinähnlichen Rezeptoren sind Typ-1-Transmembranproteine, die zur Immunglobulin-Superfamilie gehören und mit ihren immunglobulinähnlichen extrazellulären Domänen entsprechende Liganden binden. NKp44 wird ausschließlich auf der Zelloberfläche von aktivierten NK-Zellen und plasmazytoide dendritische Zellen exprimiert. Der NKp30-Rezeptor gilt als besonders spezifisch für NK-Zellen. Lediglich V δ 1⁺ T-Zellen können diesen Rezeptor unter Stimulation mit IL-2 und IL-15 exprimieren (Kruse et al. 2014).

1.6 Adipositas, veränderte NK-Zellen und Neoplasien

Das Immunsystem bietet einen essenziellen Schutz gegen die Vermehrung entarteter Zellen und damit verbundene Entstehung von Tumoren. Neben T-Zellen spielen NK-Zellen eine wichtige Rolle bei der Tumorabwehr, da sie ohne vorherigen Antigenkontakt in der Lage sind zirkulierende Tumorzellen direkt zu töten. NK-Zellen wirken offenbar sowohl dem primären Wachstumsvorgang als auch der Metastasierung eines Tumors entgegen (Larsen *et al.* 2014).

Durch mehrere Studien konnten Zusammenhänge zwischen einem durch Übergewicht oder Adipositas veränderten immun-metabolischen Milieu und einer veränderten Aktivität und Funktionalität von NK-Zellen nachgewiesen werden. Dabei scheint die adipokinabhängige Signalvermittlung von zentraler Bedeutung zu sein. NK-Zellen weisen sowohl bei Nagetieren als auch beim Menschen eine hohe Expression an Rezeptoren für verschiedene Adipokine auf (Keustermans *et al.* 2017). Im Falle von Übergewicht oder Adipositas sind die Konzentrationen vieler Adipokine stark erhöht, wodurch sich eine veränderte Aktivität der NK-Zellen bei Adipositas erklären lässt. Diese Annahme wurde durch Ergebnisse verschiedener *in vitro*- und *in vivo*-Studien an Mensch und Tier verstärkt. Untersuchungen zeigten, dass eine Inkubation von NK-Zellen mit Leptin zu Veränderungen der Anzahl, Zytokinsekretion, Rezeptorexpression, Proliferation, Zytotoxizität und Veränderungen im Migrationsverhalten von NK-Zellen führt (Wrann *et al.* 2012, Oswald *et al.* 2018). Untersuchungen an Mäusen mit induzierter Leptin-Rezeptor-Defizienz (db/db-Mäusen) wiesen eine verminderte NK-Zellzahl bei *knockout* des Leptinrezeptors nach. Die Leptin-Rezeptor defizienten NK-Zellen waren in ihrer Entwicklung, Aktivität und Zytotoxizität eingeschränkt (Tian *et al.* 2002). Interessanterweise scheint die veränderte Funktionalität der NK-Zellen und anderer Immunzellen in Folge eines exzessiven Körpergewichts reversibel zu sein, sofern es zur Gewichtsreduktion durch eine verminderte Kalorienzufuhr oder vermehrte körperliche Aktivität kommt (Lips *et al.* 2016).

Zudem konnte in früheren Studien an Tiermodellen ein Zusammenhang zwischen einer Adipositas-bedingten Veränderung der NK-Zell-Funktionalität und einer erhöhten Inzidenz von Tumoren bzw. einer höheren Metastasierungsrate nachgewiesen werden. Hierzu zeigte sich eine verminderte Anzahl an NK-Zellen im Blut sowie eine reduzierte Expression des aktivierenden NK-Zell-Rezeptors NKG2D bei Diät-induziert adipösen Ratten im Vergleich zu normalgewichtigen Ratten. Nach Tumor-Induktion war die Interaktion der NK-Zellen mit den Tumorzellen vermindert und es bildeten sich signifikant mehr Lungenmetastasen bei den adipösen Ratten (Spielmann *et al.* 2017). In einem weiteren Tierexperiment war eine Diät-induzierte Adipositas bei Ratten vergesellschaftet mit einer erhöhten Inzidenz an kolorektalen Adenokarzinomen nach Tumor-Induktion. Auch in dieser Studie ging dies mit einer

verminderten Anzahl von NK-Zellen in Leber und Milz sowie einer verminderten Expression aktivierender NK-Zell-Rezeptoren einher (Bähr *et al.* 2017).

1.7 NK-Zellen im Fettgewebe

Neben frei zirkulierenden NK-Zellen in der Blutbahn und in lymphatischen Organen, werden in vielen Organen wie Darm, Uterus, Leber und Lunge ortsansässige oder „lokale“ NK-Zellen beschrieben, die nachweislich phänotypische und funktionelle Unterschiede zu den zirkulierenden NK-Zellen aufweisen. Sie können in den jeweiligen Organen für eine längere Zeit verweilen und üben dort u. a. auch eine regulative Funktion auf andere Immunzellen aus (Lysakova-Devine und O'Farrelly 2014). Neuste Untersuchungen konnten Subpopulationen von NK-Zellen mit spezifischen Effektormolekülen und residierenden Charakter im Fettgewebe von Mäusen und Menschen nachweisen. Dies deutet darauf hin, dass auch das Fettgewebe über gewebespezifische NK-Zellen verfügt (Boulenouar *et al.* 2017).

Bislang gibt es nur unzureichend Daten über mögliche Veränderungen der Expression spezifischer NK-Zell-Rezeptoren im Fettgewebe bei Adipositas und Tumorgeschehen.

2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Adipositas-assoziierten Veränderung der NK-Zell-spezifischen Rezeptorexpression im Fettgewebe zweier voneinander unabhängiger Ratten-Tumor-Modelle zu charakterisieren.

Im ersten Ratten-Tumor-Modell sollte untersucht werden, ob sich bei Diät-induziert adipösen Fischer-344-Ratten in einem Kurzzeit- und Langzeitintervall nach Injektion von MADB-106-Tumorzellen eine veränderte Rezeptorexpression von NK-Zellen im Fettgewebe nachweisen lässt.

Im zweiten Ratten-Tumor-Modell sollte, nach chemischer Induktion eines Kolonkarzinoms mittels Azoxymethan untersucht werden, ob es zu Veränderungen der Rezeptorexpression von NK-Zellen im Fettgewebe von Diät-induziert adipösen Wistar-Ratten kommt.

3 Material und Methodik

Das im Rahmen dieser Promotionsarbeit verwendete Probenmaterial entstammte aus zwei verschiedenen Tierexperimenten, die zuvor in der Arbeitsgruppe von Prof. Heike Kielstein durchgeführt wurden. Diese Tierexperimente wurden von der Tierschutzkommission des Landesverwaltungsamts Sachsen-Anhalt genehmigt (Aktenzeichen: 42502-2-1116MLU und 42502-2-1200MLU) und werden in der Folge zusammenfassend beschrieben. Ein Teil der bisher erhobenen Daten sowie Bildmaterial beider Tierversuche wurde von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt und wird in dieser Arbeit mit aufgeführt, da sie eine Grundlage für die anschließenden Untersuchungen des Fettgewebes der Tiere darstellen.

3.1 Ratten-Tumor-Modell mit MADB106-Tumorzellen

Dieses Tierexperiment wurde von John Hanke und Dorle Knauf (medizinische Doktorand*innen) unter der Leitung von Dr. Julia Spielmann (wissenschaftliche Mitarbeiterin) durchgeführt. Ziel des Tierexperiments war es, die Auswirkungen von Adipositas auf die Tumorabwehr durch NK-Zellen im Organismus zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu untersuchen. Dazu wurden zwei separate Experimente durchgeführt. Sie unterschieden sich im Tötungszeitpunkt der Tiere nach i. v. Injektion mit MADB106-Tumorzellen. Es erfolgte die Tötung der Tiere 15 min nach der i.v. Injektion der Tumorzellen (Kurzzeitversuch) oder es wurde für weitere drei Wochen nach der Tumorzell-Injektion das Wachstum der Lungenmetastasen beobachtet und die Tiere zu diesem späteren Zeitpunkt getötet (Langzeitversuch).

Für beide Experimente des Ratten-Tumor-Modells mit MADB106-Tumorzellen wurden jeweils 32 sechs Wochen alte, männliche Fischer-344-Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Nach einer einwöchigen Akklimatisationsphase wurden die Ratten in beiden Experimenten jeweils gewichtsadjustiert in zwei Gruppen eingeteilt. Dabei betrug das durchschnittliche Anfangsgewicht der Tiere des Kurzzeitversuchs 184 g und im Langzeitversuch 195,5 g. Zur Induktion einer Adipositas erhielt je eine Gruppe der Ratten eine Hoch-Fett-Diät (HFD; Altromin C1090-60, 60 % der umsetzbaren Energie aus Fett, Altromin GmbH, Lage, Deutschland). Die Ratten der zweiten Gruppe dienten als Kontrollgruppe und erhielten eine normokalorische Kontrolldiät (Ko- Kontrolle; Altromin C 1090-10, 10 % der umsetzbaren Energie aus Fett, Altromin GmbH, Lage, Deutschland). Der Fütterungszeitraum zur Induktion einer Adipositas bei den Tieren betrug sechs bis zehn Wochen.

Vor der Tumorzell-Injektion wurden die Tiere gewichtsadjustiert in weitere Untergruppen eingeteilt und bekamen eine i. v. Injektion mit MADB106-Adenokarzinomzellen (MADB106) oder mit einer Natriumchloridlösung (NaCl) als Kontrolle. Es resultierten in beiden Experimenten folgende vier Gruppen mit einer Anzahl von n = 8 pro Gruppe: Kontrolldiät mit NaCl-Injektion (Kontrolle/NaCl), Kontrolldiät mit Injektion von MADB106-Zellen (Kontrolle/Tumor), Hoch-Fett-Diät mit NaCl-Injektion (HFD/NaCl) und Hoch-Fett-Diät mit Injektion von MADB106-Zellen (HFD/Tumor) (Abb. 1).

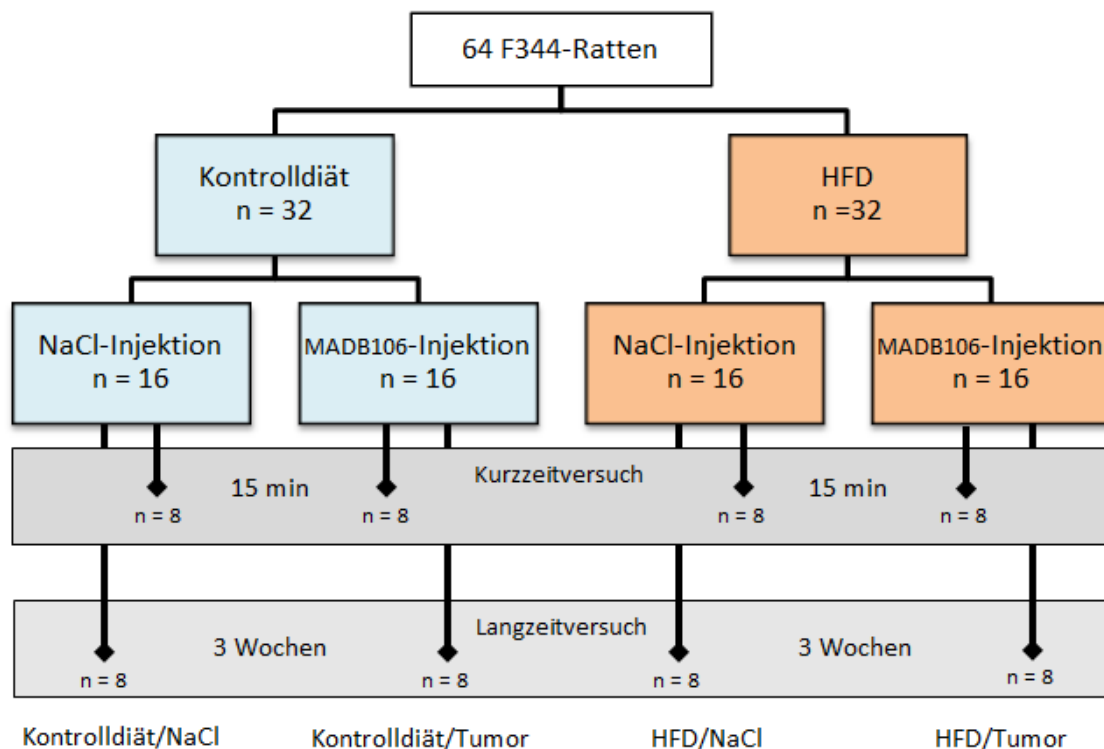


Abbildung 1: Darstellung der Gruppeneinteilung im MADB106-Tierversuch.

64 F344-Ratten bekamen eine Hoch-Fett-Diät (HFD) oder eine Kontrolldiät und erhielten nach sechs Wochen MADB106-Zellen oder Natriumchlorid (NaCl) i.v. injiziert. Anschließend wurden die Tiere 15 min (Kurzzeitversuch) oder drei Wochen (Langzeitversuch) nach Injektion getötet. Es resultierten vier Gruppen je Versuch mit einer Anzahl von 8 Tieren pro Gruppe. MADB106: MADB106-Tumorzellen, n: Anzahl der Versuchstiere.

Die Lungenmetastasen eines durch 9-10-Dimethyl-1-2-Benzanthracen induzierten Adenokarzinoms der Mamma bei weiblichen Fischer-344-Ratten sind der Ursprung der MADB106-Tumorzelllinie. Die MADB106-Zellen wurden vom Tumorstamm separiert und entsprechend der Methode nach von Hörsten aufbereitet und für das Experiment genutzt (Hörsten et al. 2000). Diese malignen Zellen können nachweislich durch NK-Zellen zerstört werden (Barlozzari et al. 1985). Bei dem Tierexperiment mit dem frühen Tötungszeitpunkt erfolgte die i. v. Injektion der MADB106-Zellen in die Schwanzvene der Tiere mit 1×10^6 Zellen

pro Tier und bei dem Tierexperiment mit dem späteren Tötungszeitpunkt mit 2×10^5 Zellen pro Tier. Bei den Tieren des Experiments mit dem frühen Tötungszeitpunkt wurde die Narkose weitere 15 min nach i. v. Injektion aufrecht erhalten. Es erfolgte die Tötung der Tiere mit anschließender Organentnahme. Dabei wurde viszerales und epididymales Fettgewebe entnommen und bei -80°C eingefroren. Beim Langzeitversuch wurde nach erfolgter i. v. Injektion die Narkose beendet, um das Wachstum der Lungenmetastasen beobachten zu können. Sie bekamen wie zuvor die entsprechende Hochfett- bzw. Kontrolldiät, bis sie nach drei Wochen erneut in Narkose versetzt und getötet wurden. Auch hier erfolgte u.a. die Entnahme von viszeralem und epididymalen Fettgewebe und die anschließende Lagerung bei -80°C .

3.2 Ratten-Tumor-Modell mit Azoxymethan

Das zweite Tierexperiment, aus welchem Probenmaterial für die Untersuchungen des Fettgewebes gewonnen wurde, wurde unter der Leitung von Dr. Ina Bähr (wissenschaftliche Mitarbeiterin) und Durchführung von Henriette Doberstein, Vincent Goritz und Ole Pörtner (medizinische Doktorandinnen und Doktoranden) ausgeführt. Gegenstand des Projektes war es, die Zusammenhänge zwischen einer durch Adipositas veränderten NK-Zell-Funktionalität und dem dadurch erhöhten Risiko für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms *in vivo* zu untersuchen.

Für das Tierexperiment wurden 50 sechs Wochen alte, männliche Wistar Ratten (Charles River) verwendet. Nach einer einwöchigen Akklimatisationsphase erfolgte eine Randomisierung der Ratten in zwei Gruppen. Eine Gruppe ($n = 25$) erhielt eine normokalorische Diät (Kontrolle, 4 % Fettgehalt, C1090-10, Altromin) und die andere Gruppe ($n = 25$) eine hyperkalorische Hochfett-Diät (HFD, 34 % Fettgehalt, C1090-60, Altromin). Die Diäten wurden in beiden Gruppen für eine Dauer von insgesamt 46 Wochen verabreicht. Nach acht Wochen Fütterung der verschiedenen Diäten erhielten 11 Ratten aus jeder Gruppe zur Induktion eines kolorektalen Karzinoms eine subkutane Injektion mit Azoxymethan (AOM, s. c., 15 mg/kg Körpergewicht, Sigma Aldrich). Die übrigen Ratten beider Gruppen dienten als Kontrollen und erhielten eine s. c. Injektion mit 0,9 % Natriumchloridlösung (Abb. 2). Sowohl die AOM-Injektionen als auch die Injektionen mit Natriumchloridlösung erfolgten einmal wöchentlich für die Dauer von zwei Wochen (Bähr *et al.* 2017).

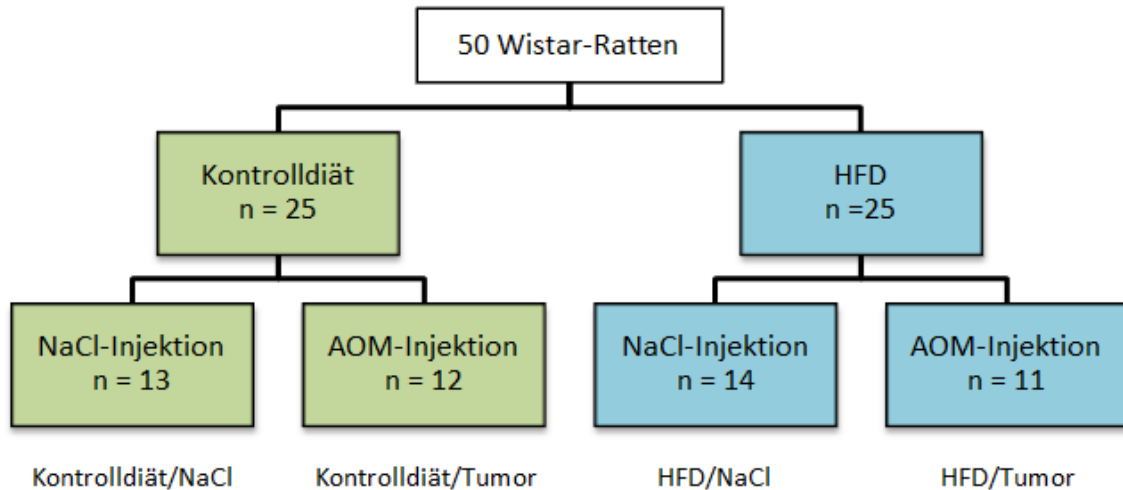


Abbildung 2: Darstellung der Gruppeneinteilung im AOM-Tierversuch, HFD: Hoch-Fett-Diät, AOM: Azoxymethan, NaCl: Natriumchlorid, n: Anzahl der Versuchstiere.

Mittels Durchflusszytometrie wurden die Immunzellpopulationen im Blut der Versuchstiere analysiert. Zudem erfolgte eine Analyse verschiedener Adipositas-assoziiierter Metabolite und Zytokine im Plasma mittels Multiplex-Immunoassay sowie eine Quantifizierung der mRNA-Expression verschiedener NK-Zell-relevanter Gene in Milz und Leber der Versuchstiere mittels real-time RT-PCR (Bähr *et al.* 2017).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels *real-time* PCR die Expression NK-Zell-relevanter Gene im Fettgewebe der Versuchstiere untersucht.

3.3 *Real-time*-RT-PCR-Untersuchungen im Fettgewebe der Versuchstiere

Grundprinzip der Vervielfältigung von Nukleinsäuren ist die natürliche Replikation. Die Polymerase-Kettenreaktion (englisch *polymerase chain reaction*, PCR) ist ein gentechnisches Standardverfahren, welches die Vervielfältigung von Nukleinsäuren *in vitro* ermöglicht. Ausgangspunkt einer jeden PCR ist eine durch thermische Denaturierung (Schritt 1) vorliegende einzelsträngige DNA, die *Template*-DNA. Es kommt zur Hybridisierung zwischen DNA-Oligonukleotiden, sog. *Primer* und *Template*-DNA (Schritt 2). An diese bindet eine hitzestabile DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase) und beginnt mit der Synthese eines zum Matrizenstrang komplementären, neuen DNA-Strang (Schritt 3). Durch zyklische Wiederholung dieser Schritte ist es möglich millionenfach Kopien von DNA-Sequenzen herzustellen (Amplifizierung) und somit die Analyse geringer Mengen an DNA zu ermöglichen. I. d. R. reichen 20 – 30 Zyklen aus um eine ausreichende Menge an DNA zu amplifizieren (Radonić *et*

al. 2004). Zusammenfassend besteht jeder Reaktionszyklus einer PCR aus: Denaturierung bei 90 – 95°C, *primer*-Hybridisierung (*Annealing*) an der *Template*-DNA bei Temperaturen $\geq 50^\circ\text{C}$ und Elongation/Polymerisierung des neuen DNA-Strangs komplementär zum Matrizen-Strang bei ca. 72°C (Abb. 3). Ursprünglich wurde die PCR für die Amplifizierung von DNA-Sequenzen entwickelt. Mittlerweile existiert eine Vielzahl an PCR-Varianten, die es ermöglichen beispielsweise RNA-Sequenzen zu amplifizieren. Dieses Prinzip wird im weiteren Verlauf beschrieben.

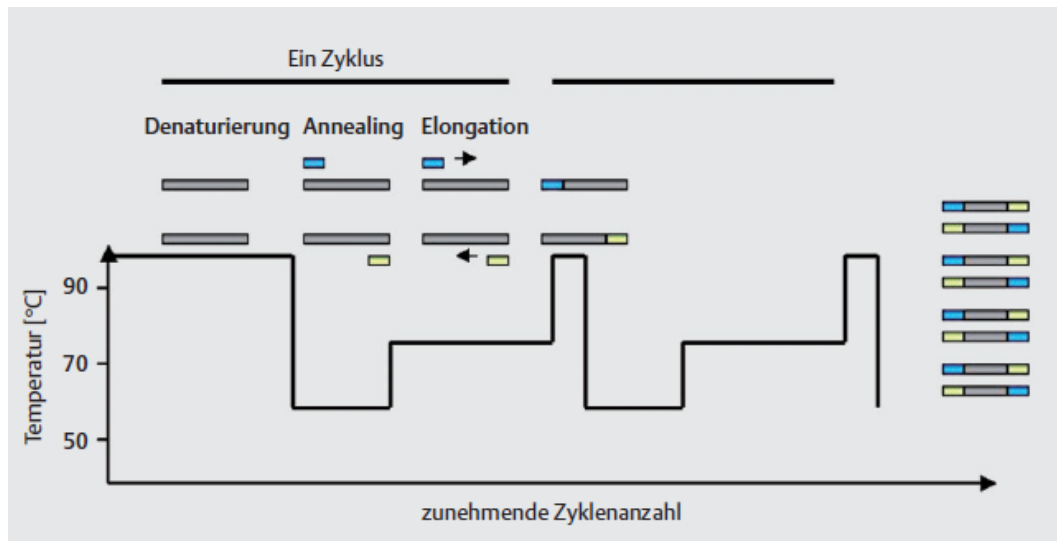


Abbildung 3: Temperaturprofil einer PCR bestehend aus den drei Phasen der Amplifikation: Denaturierung, Annealing und Elongation. Die *primer* sind blau oder gelb dargestellt. Abbildung aus Holzapfel und Wickert 2007.

3.3.1 RNA-Extraktion und spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung

Bis zur Aufarbeitung des viszeralen Fettgewebes der Ratten wurden die Fettgewebeproben bei -80°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Extraktion der Gesamt-RNA wurde das gefrorene Gewebe mit einem Mörser vorsichtig in kleinere Stücke geteilt. Mittels einer Präzisionswaage (Sartorius TE313S, Göttingen, Deutschland) wurden 100 mg von jeder Fettgewebprobe abgewogen, in Röhrcchen mit Schraubverschlüssen überführt und durch Zugabe von 1 ml QIAzol® Lysis Reagent (Phenol und Guanidiniumthiocyanat, Qiagen, Hilden, Deutschland) mittels einem Homogenisator bei 5000 Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*, rpm) für 20 Sekunden lysiert und homogenisiert (Precellys 24, Peqlab, Erlangen, Deutschland). Die Proben wurden für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mit dem RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) weiter bearbeitet. Es wurden 200 μl Chloroform zugegeben und bei 12000 rpm für 15 min zentrifugiert, um die Zellyse fortzusetzen und das Homogenat in eine wässrige und eine organische Phase zu trennen. Die RNA verbleibt in der oberen wässrigen Phase; Proteine sammeln sich in der unteren organischen Phase und DNA sammelt sich in der

dazwischen liegenden Interphase. Der Überstand (die wässrige Phase) wurde mit 70 %igen Ethanol auf eine *Spin*-Säule mit einer Siliziumdioxid-Membran gegeben und bei 10000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Es wurden 350 µl einer *RNA Wash*-Puffer-Lösung (RW1-Puffer, Qiagen) auf die Säule gegeben und der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt. Dabei dient die Siliziumdioxid-Membran als Adsorbens und bindet nukleotid-spezifisch die RNA-Moleküle, während der Durchfluss verworfen wird (Abb. 4). Anschließend wurden 80 µl einer in Puffer gelösten DNase (Qiagen) auf die Säule gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei Durchflussvorgänge in denen Puffer-Lösungen (RW1-Puffer, RPE-Puffer, Qiagen) auf die Säulen gegeben und diese bei 10000 rpm für 15 Sekunden (der dritte Durchgang für zwei Minuten) zentrifugiert wurden. In einem vierten Durchgang wurde die Säule auf ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und bei höchster Umdrehungszahl für eine Minute ohne Zugabe von weiteren Puffer-Lösungen zentrifugiert. Dieser Schritt sollte dazu dienen die Säule mit der RNA-bindenden Siliziumdioxidmembran zu trocknen und Rückstände der verwendeten Puffer zu lösen. Am Schluss wurde die Säule erneut auf ein neues 1,5 ml Sammelgefäß (Qiagen) aufgesetzt und mit 50 µl RNase-freiem Wasser bei 10000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Dadurch kam es zur Elution der RNA im Sammelgefäß. Nach abgeschlossener RNA-Extraktion wurde die RNA-Konzentration mittels spektralphotometrischer Konzentrationsbestimmung in einem Lesegerät für Mikrotiterplatten mit Monochromator-System (Synergy™ Mx Monochromator-Based Multi-Mode Microplate Reader, BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) bestimmt.

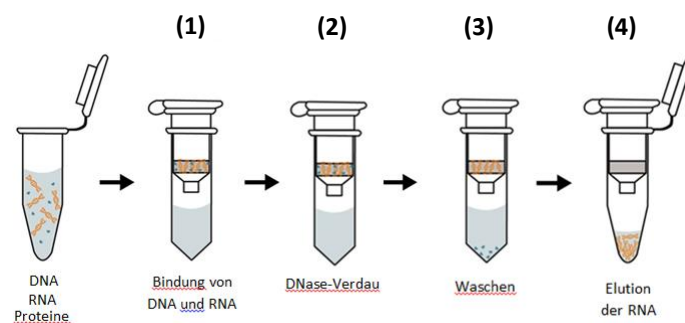


Abbildung 4: Extraktion der RNA über Anionenaustauscher-Säulen mit Siliziumdioxid-Membran. (1) Durch die ausreichende Konzentration an chaotropen Salzen wie Guanidiniumthiocyanat und einem pH-Wert ≤ 7 binden die negativ geladenen Nucleotide von DNA und RNA am positiv geladenen Siliziumdioxid der Säulenmembran. (2) Durch Zugabe von DNasen kommt es zur Hydrolyse der gebundenen DNA. (3) Nach mehrfachen Auswaschen der Säule mit Puffer-Lösungen verbleibt die RNA, gebunden an der Siliziumdioxidmembran, frei von Kontaminationen. (4) Der Durchfluss wird verworfen, die Säule wird auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt und die RNA wird durch eine verminderte Salzkonzentration und erhöhten pH-Wert im verwendeten Puffer eluiert. Abbildung modifiziert nach Lee et al. 2018.

3.3.2 cDNA-Synthese

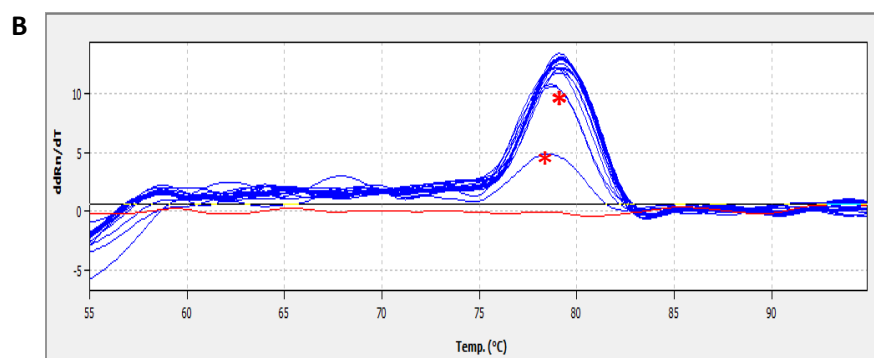
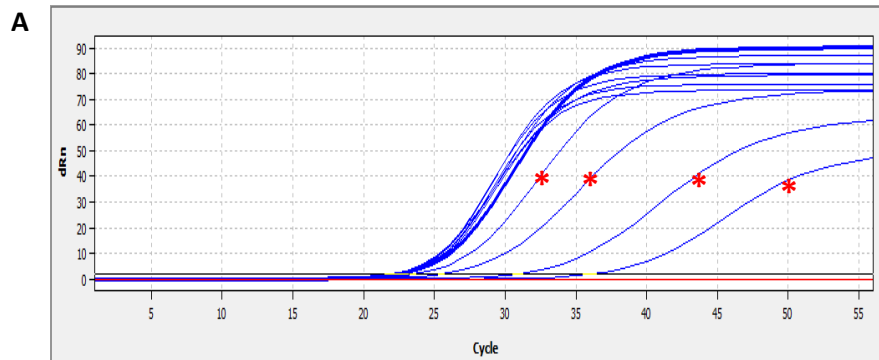
Um eine Expressionsanalyse der RNA mittels PCR zu ermöglichen, ist es notwendig eine Reverse Transkriptase (RT)-Reaktion durchzuführen. Durch die RT-Reaktion wird die RNA in komplementäre DNA (cDNA) überführt und somit einer Analyse mittels PCR zugänglich gemacht. Die mit oligo (dT)-geprimte cDNA-Synthese erfolgte mit dem ThermoScript RT-System (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Für jede RT-Reaktion wurde eine gelöste Menge von 1 µg RNA verwendet. Dazu wurde 1 µl (50 µM) Oligo (dT) gegeben und mit Diethylidcarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser zur RNasen-Inaktivierung auf ein Gesamtvolumen von 11 µl aufgefüllt. Zur thermischen Denaturierung der RNA wurden die Proben in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 70 °C für 5 Minuten inkubiert und anschließend zur Abkühlung auf Eis gelegt. Als zweiter Schritt der cDNA-Synthese wurden jeder Probe 8 µl eines Mastermix (Invitrogen, siehe Tabelle 1) zugeführt und anschließen bei 37°C für 5 Minuten inkubiert. Im dritten Schritt wurde jeder Probe 1 µl Reverse Transkriptase (ThermoScript™ RT, Invitrogen) zugeführt und bei 42°C für 60 Minuten und anschließend für 10 Minuten auf 70°C erhitzt. Für die spätere Amplifikation der cDNA mittels *real time*-PCR wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Mastermix für die RT-Reaktion

Reagenz	Menge pro Probe
5x <i>cDNA Synthesis</i> Puffer (250 mM TRIS-Acetat, 375 mM Kaliumacetate, 40 mM Magnesiumacetate)	4 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RNase-Inhibitor (RNaseOUT™, 40 Einheiten/µl)	1 µl
DEPC-Wasser	1 µl

3.3.3 Empirische Ermittlung der *Annealing*-Temperatur der Primerpaare

Die Sensitivität und Effizienz einer PCR-Reaktion werden z. T. von der Beschaffenheit der spezifischen *primer* bestimmt. Wichtige Parameter hierbei sind die Schmelztemperatur (T_m), die *annealing*-Temperatur (T_a) und die *primer/primer*-Wechselwirkungen (Bildung von Sekundärstrukturen durch *primer*-Hybridisierung). Die T_m und die *primer*-Wechselwirkungen können durch mathematische bzw. *software*-Programme ermittelt werden. Die T_a muss empirisch ermittelt werden. Hierzu wurde für jedes benutzte Primerpaar eine *real time*-PCR mit unterschiedlichen *annealing*-Temperaturen durchgeführt. Die T_a wurde im Thermozykler entsprechend eingestellt, so dass sich ein Temperatur-Gradient ($53,1^\circ\text{C} - 64,9^\circ\text{C}$ mit einer Steigerung von $1,4^\circ\text{C}/\text{well}$) auf die entsprechenden *wells* einstellte. Anschließend wurde für jedes analysierte Primerpaar anhand der effizientesten Amplifikation die optimale *annealing*-Temperatur bestimmt. Hierzu wurden die gemessenen C_T -Werte, Ausdehnung der Schmelzkurve und Intensität der aufgetragenen Probe in der Gelelektrophorese begutachtet. Außerdem konnte durch die gelelektrophoretische Untersuchung der PCR-Produkte (Abschnitt 3.3.7) die Spezifität der *primer* für das gewünschte Genprodukt sichergestellt und die Bildung von Sekundärstrukturen ausgeschlossen werden. Amplifikationskurven und gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten cDNA ist in Abbildung 5 exemplarisch für das Zielgen Ly49s4 dargestellt.



C

T_a in °C 53,1 53,4 54,2 55,2 56,9 **58,3** 59,7 61,1 62,5 63,8 64,6 64,9

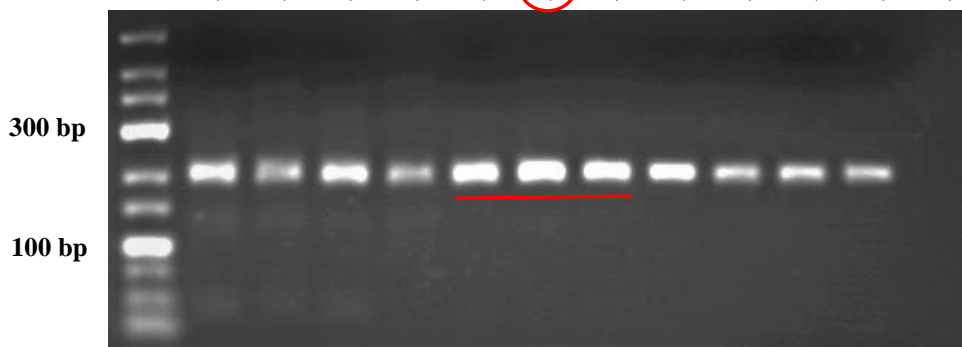


Abbildung 5: Ermittlung der optimalen *Annealing*-Temperatur (T_a) der Primerpaare für das Zielgen Ly49s4. (A) Die mit einem Sternchen (*) markierten Amplifikationskurven stellen ineffiziente Amplifikationen mit hohen C_T -Werten bei zu niedrigen oder zu hohen T_a -Temperaturen dar. (B) Die mit einem Sternchen (*) markierten *Peaks* der Schmelzkurve zeigen eine zu geringe Fluoreszenzintensität auf als Zeichen einer nicht optimal eingestellten T_a -Temperatur und einer vermutlich schlechten *primer*-Hybridisierung. (C) Auftrennung amplifizierter cDNA des Zielgens Ly49s4 mittels Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung; Betrachtung unter UV-Licht. Im Vergleich zu den aufgetragenen Proben der anderen T_a -Temperaturen, zeigen die Proben mit den *Annealing*-Temperaturen 56,9/ 58,3 und 59,7°C eine deutlich stärkere Intensität. In Anbetracht sämtlicher Kriterien wurde die T_a 58,3°C für die Primerpaare des Zielgens Ly49s4 ausgewählt.

3.3.4 Bestimmung des *housekeeping*-Gens

Bei der relativen Quantifizierung mittels *real time*-PCR wird das Verhältnis der Zielsequenz zu einer Referenzsequenz dargestellt. Für eine präzise Analyse der PCR-Produkte muss das optimale *housekeeping*-Gen, welches als Referenzgen dienen soll, individuell für das entsprechende Probenmaterial ermittelt werden. Idealerweise sollte die Transkription eines *housekeeping*-Gens nicht vom experimentellen Prozedere reguliert oder beeinflusst werden und es sollte im untersuchten Gewebe möglichst konstant exprimiert sein. Somit lassen sich Verfälschungen der gemessenen Ergebnisse durch unterschiedliche Ausgangsmengen an amplifizierbarer RNA oder cDNA bzw. durch qualitativ unterschiedliche *Templates* durch eine spätere Verrechnung ausgleichen. Durch Vorversuche wurde festgestellt, dass GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase) im Vergleich zu anderen potenziellen Referenzgenen, wie z.B. β -Aktin, PPIA (Peptidylprolyl-Isomerase A) und 18S rRNA, die konstanteste und suffizienteste Expression im Fettgewebe der Versuchstiere aufwies (Abb. 6, A-C). Aus diesem Grund wurde für Quantifizierungen der Genexpression im Rahmen dieser Arbeit das *housekeeping*-Gen GAPDH zur Normierung verwendet.

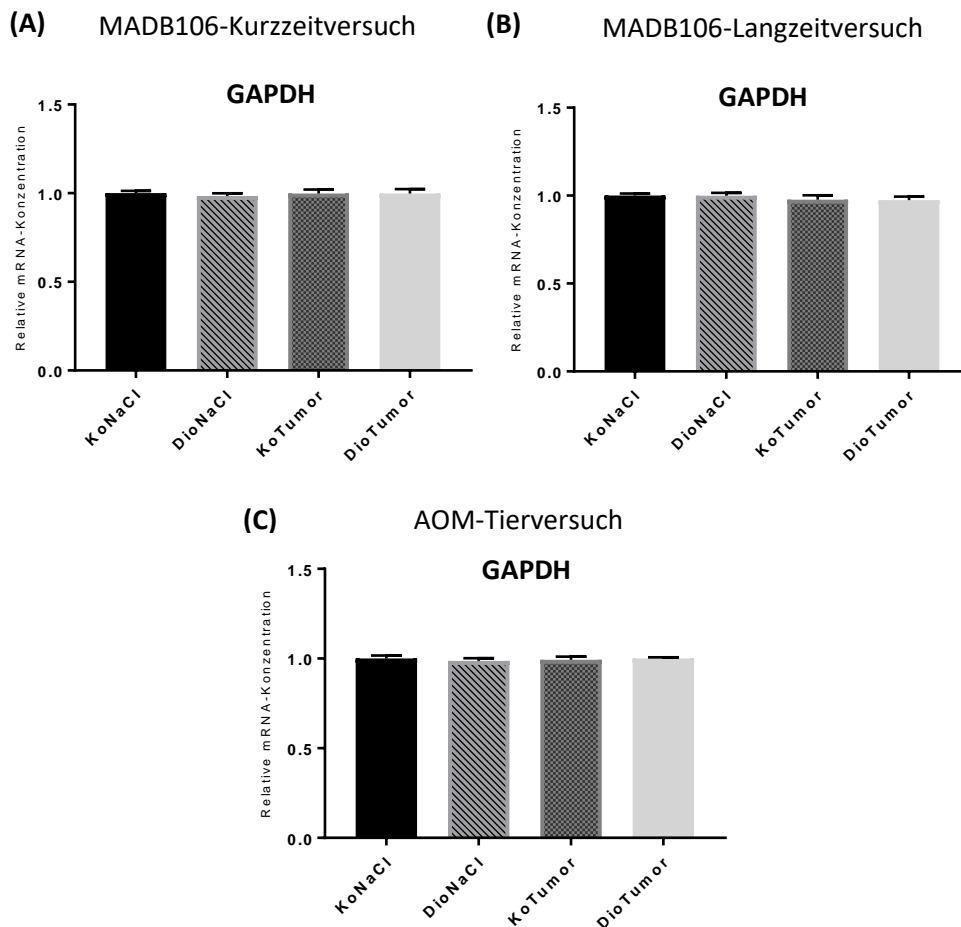


Abbildung 6: mRNA-Konzentration des Housekeeping-Gens GAPDH im MADB106-Kurz- und Langzeitversuch (A, B) sowie im Azoxymethan-Tierversuch (C).

3.3.5 Ermittlung der Amplifikationseffizienz der Primerpaare

Zur exakten Bestimmung der relativen mRNA-Expression wurde die individuelle Amplifikations-Effizienz eines jeden Primerpaares ermittelt. Hierzu wurde für jedes Primerpaar eine PCR-Reaktion in Dreifachbestimmung mit verschiedenen cDNA-Verdünnungsansätzen in DEPC-Wasser (1:2, 1:4, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100) durchgeführt. Die in der Verdünnungsreihe eingesetzte cDNA entstammt der isolierten RNA aus dem Fettgewebe der Versuchstiere. Aus den gemessenen C_T – Werten wurde eine Standard-Kurve gebildet und die Steigung der Kurve ermittelt. Nur C_T – Werte < 40 wurden zur Berechnung der Effizienz berücksichtigt. Durch Anwendung der Formel [PCR-Effizienz = $(10^{-1/\text{Steigung}} - 1) \times 100$] konnte die PCR-Effizienz für jedes Primerpaar individuell bestimmt werden (Radonić et al. 2004).

Tabelle 2: Charakteristika der verwendeten Primerpaare

Gen	Primersequenz	RefSeq	Produktgröße [bp]
GAPDH	Fw: GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG Rv: ATGGTGGTGAAGACGCCGTA	956403	143
NCR1	Fw: AGACCCTGTTTCTTCTCTTG Rv: TGAGCTTCTCATGATCCTTC	057199	197
NCR3	Fw: AAGAGCCTCCTCAACAAG Rv: AGAAAGCTGAGGGCATAG	181822	94
Klra1	Fw: CCTGTGTCAACCAAAGAAAG Rv: ATAATTCGCGAAACAGAGAG	001009486.1	181
Klrb1	Fw: GAACCAACAGTGAGATCAAC Rv: CTTTCCCTTTGAGAAGTCC	001085405	196
Klrc1	Fw: AAAGATAACAGAGATGCTGC Rv: AAATCCGTAGAAATCCATGC	001037441	200
Klrd1	Fw: TGAGTTTTATGAGCTCCAG Rv: CCTGAACTTTGAGAACTCTG	012745	131
Klrk1	Fw: TTAATGAGAACAAAGCCTGG Rv: GTTAACTCGTTGGGTGATAG	133512.1	199
Klra22	Fw: GAATGTAAAGTCTGCAGGG Rv: CTGCTCTGTCAAGTAAGATTC	173291	83
CD244	Fw: GACGTCTTTCCAGTTCATC Rv: GCTGAAGATCAGTTATCAGAAG	022259	200
Ly49i4	Fw: TGGCATGAATGTAACAGAC Rv: GGAACCTCAGTTCCTTATC	001009495	79
Ly49s4	Fw: AAAGGAATGGTCATGGATTG Rv: CATTCCCTTTTACAGATACAG	001009487	157
Ly49i5	Fw: ATGAATAGAGAGATGAGGTCC Rv: GGTCATTCATGAGACAATGTG	001009501	162
Ly49s5	Fw: CACATTATTCGAGACAGTTAC Rv: ATCACAATTCAATGGACTGC	001012749	94
Ly49i6	Fw: CTTCAGATCCGGGTATTTC Rv: CTTCTGCTCAGTACAAGTTTAG	001009718	113
Ly49s6	Fw: TAAGTTCCTTCAGGACCAC Rv: CAGTCATCATCATTTAGACCTG	001009488	186
Ly49s7	Fw: CAGAATTCAGTTTATTCCTCC Rv: TGTGTTTGAGGCAAGTTTAG	001009494	165
Ly49i9	Fw: GATAGATGATGAGGATGAACTG Rv: TAGGAGAGGCACACAATAATC	001009496	112
TNF	Fw: CTCACACTCAGATCATCTTC Rv: GAGAACCTGGGAGTAGATAAG	012675	111
Tnfsf10	Fw: CTCTACAGTTCAGAAAAGC Rv: CCTTGGAGATTGGAATTAAGG	145681	128
Tbx21	Fw: AAAGCTTACCAACAACAAGG Rv: CTTGGAAGGTAAAGATGTGAG	001107043	158
Eomes	Fw: AAAACACAGATATTACCCAGC Rv: ATGGAATCGTAGTTGTCCC	001061749	76

Fw: forward, Rv: reverse. Bp: Basenpaaren

3.3.6 *real time*-PCR (qRT-PCR)

Die *real time*-PCR basiert auf dem Prinzip einer herkömmlichen PCR und ermöglicht es im Gegensatz zu anderen PCR-Methoden die Amplifikation in Echtzeit („*real time*“) zu ermitteln. Dies erfolgt mittels Fluoreszenz-Messungen während eines PCR-Zyklus. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge an amplifizierter DNA zu. Es bestehen mehrere Methoden, um das PCR-Produkt während der Reaktion mit Fluoreszenzfarbstoffen zu erfassen. Ein sehr spezifischer Nachweis des PCR-Produktes erfolgt mittels sequenzspezifischen Sonden, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind und nur an das gewünschte PCR-Produkt binden. Die Multiplex-*real time*-PCR ist eine weitere Methode zur parallelen Erfassung mehrerer PCR-Produkte durch die Markierung der verschiedenen Sondenmoleküle mit mehreren Farbstoffen wie FAM, Cy5 oder HEX (Radonic et al. 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine Sequenz-spezifischen Sonden verwendet, sondern der DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I. Um die Spezifität des PCR-Produktes zu überprüfen wurde die amplifizierte DNA unter kontinuierlicher Temperaturerhöhung aufgeschmolzen und der Schmelzpunkt analysiert. Ein spezifischer Peak des Schmelzpunktes ist Ausdruck des spezifischen Zielgens (Abb. 7a). Zusätzliche Peaks mit geringeren Schmelzpunkten wären z.B. Ausdruck einer *primer*-Dimersierung oder weiterer Produkte, da der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I unspezifisch an jegliche DNA-Sequenz bindet (Abb. 7b).

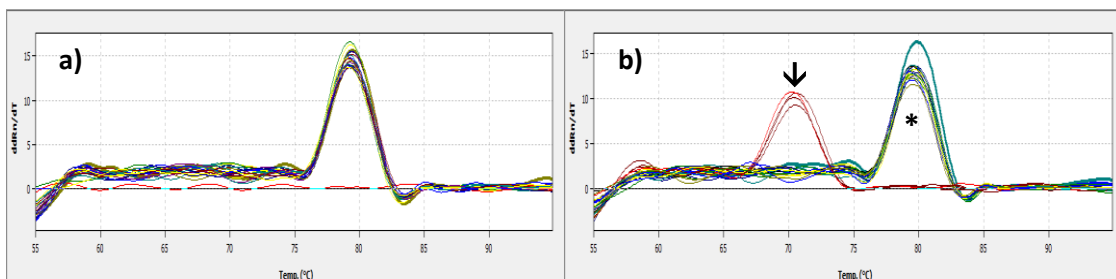


Abbildung 7: Schmelzkurven zweier *real time*-PCRs. **a)** Ein repräsentatives Beispiel einer Schmelzkurve des Zielgens Ly49s7 mit einem alleinigen *peak* als Ausdruck eines spezifischen PCR-Produkts. **b)** Neben dem *peak* des Zielgens KLRD1 (*), ist ein weiterer *peak* mit einem geringeren Schmelzpunkt auffällig (↓), vermutlich bedingt durch *primer*-Dimerisierung.

Die Durchführung der *real time*-PCR erfolgte mittels eines Thermozyklers (*qTOWER3 G touch/qTOWER3 touch*, Analytik Jena AG, Jena, Deutschland) in 96-well Assay-Mikrotiterplatten mit einem finalen Volumen von 20 μ l/well. Das verwendete Reaktionsgemisch setzte sich zusammen aus der kommerziell erhältlichen SYBR® Green Mischung (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland), spezifischem *primer*

(verdünnt mit DEPC-Wasser 1:10, KiCq-Start™ *primers*, Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland) und 2 µl cDNA als *template* (siehe Tabelle 3). Jede Amplifikation begann in der Anfangsphase mit der Denaturierung der *template*-cDNA für 5 min bei 95°C. Danach folgten 40 bis 55 Zyklen (je nach Zielsequenz variierten die in der PCR eingestellten Zyklen) bestehend aus Denaturierung für 20 Sekunden bei 95°C, *primer*-Hybridisierung für 30 Sekunden, bei einer *primer*-spezifischen *annealing*-Temperatur und Elongation des PCR-Produktes bei 72°C für 1 min. Durch Messung der Fluoreszenzintensität in jedem Zyklus ist es möglich Rückschluss auf die Menge an eingesetzter Zielnukleinsäure zu ziehen. Für die Bestimmung der mRNA-Konzentration in den gemessenen Proben wurde mit der *software qPCRsoft touch* ein sog. *threshold*-Zyklus für jeden Amplifikationslauf festgelegt. Die relative mRNA-Konzentration wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ – Methode und unter Berücksichtigung der individuellen Amplifikationseffizienzen der einzelnen *primer* berechnet (Pfaffl 2001).

Tabelle 3: Zusammensetzung des Mastermix und Pipettier-Protokoll für die qRT-PCR

Mastermix-Reagenzien	Menge	Pipettier-Protokoll
DEPC-Wasser	$9,5 \times (n + 2)$ µl	
<i>Primer</i> vor	$0,5 \times (n + 2)$ µl	
<i>Primer</i> rück	$0,5 \times (n + 2)$ µl	18 µl Mastermix / Well
SYBR Green I	$7,5 \times (n + 2)$ µl	
Template-cDNA (Proben)		2 µl / Well

n = Anzahl der Proben

3.3.7 Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Als ergänzende Qualitätskontrolle der *real time*-PCR wurden die Proben eines jeden PCR-Produktes abschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurden 1,5 g Agarose in 50 ml TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) unter Hitze gelöst. Zum späteren Nachweis der Nukleinsäuren-Stränge des PCR-Produkts (amplifizierte cDNA) wurde dem Gel noch vor dem Abkühlen 5 µl Ethidiumbromid zugefügt. Zum Abkühlen und Erstarren wurde das Gel in einen Rahmen möglichst Blasenfrei gegossen.

Vor Beginn der elektrophoretischen Auftrennung, wurden den Proben 4 µl Bromphenolblau als Ladepuffer zugesetzt. Anschließend wurden jeweils 10 µl von vier repräsentativen Proben (Kontrolldiät/NaCl, HFD/NaCl, Kontrolldiät/Tumor, HFD/Tumor) in die Geltaschen pipettiert und mit einer Spannung von 90 Volt erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der Proben. Die Detektion der mit Ethidiumbromid gefärbten cDNA-Stränge erfolgte mittels einer UV-Licht-Photoeinrichtung. Durch den Vergleich der Banden mit einer DNA-Leiter lies sich

kontrollieren ob es sich bei der sichtbaren Bande um das spezifische Produkt mit der entsprechenden Produktgröße handelte und die Bildung von Sekundärstrukturen wie *primer*-Hybride ausgeschlossen werden konnte. Die gelelektrophoretische Auftrennung ist exemplarisch für das Zielgen 2B4 in Abbildung 8 dargestellt.

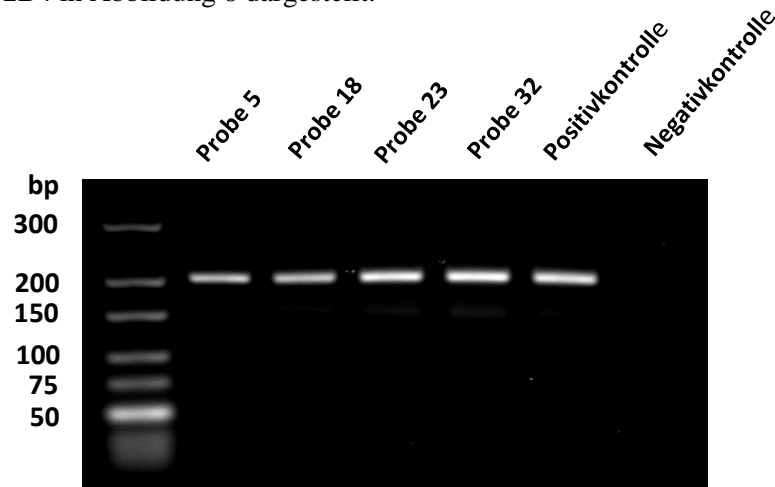


Abbildung 8: Repräsentative Abbildung der Auftrennung amplifizierter cDNA des PCR-Produkt 2B4 (CD244) mittels Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung; Betrachtung unter UV-Bestrahlung.

Neben einer Positiv- und Negativkontrolle wurden repräsentativ vier Proben aufgetragen. Die zu erwartende Produktgröße betrug 200 bp und ist mit der vorliegenden gelelektrophoretischen Auftrennung des PCR-Produkts übereinstimmend. Probe 5: Kontrolldiät/NaCl, Probe 18: HFD/NaCl, Probe 23: Kontrolldiät/Tumor, Probe 32: HFD/Tumor, Positivkontrolle: amplifizierte cDNA aus Milzgewebe der Ratten, Negativkontrolle: Mastermix ohne cDNA.

3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten der *real time*-PCR Untersuchungen erfolgte mit der Software „GraphPad Prism 7“. Mittels zweifaktorieller Varianzanalyse wurden die Faktoren „Diät“ und „Tumorinduktion“ betrachtet. Die statistischen Unterschiede der Einzelgruppen wurden dabei mit einem Posthoc-Test (Tukey-Test) analysiert und ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ eingestellt. Die in dieser Arbeit aufgeführten Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (*standard error of the mean*; SEM) dargestellt. Signifikanzen wurden mit Sternchen (*) und Tendenzen ($0,05 < p \leq 0,1$) mit dem jeweiligen exakten p -Wert gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

Die unter 4.1.1 sowie 4.2.1 aufgeführten Daten zur Körpergewichts- und Tumorentwicklung wurden von wissenschaftlichen Mitarbeiter*innen und mitwirkenden Doktorand*innen der Arbeitsgruppe erfasst und freundlicherweise zur Verfügung gestellt, da sie eine Grundlage für die Interpretation meiner darauf folgenden Ergebnisse darstellen.

4.1 Ratten-Tumor-Modell mit MADB106-Zellen und Diät-induzierter Adipositas (Mammakarzinom-Modell)

4.1.1 Entwicklung von Körpergewicht, Fettstoffwechselfparameter und Tumorbefund

Nach Abschluss der besagten Diätphasen entwickelten die Tiere, die eine Hoch-Fett-Diät erhielten, sowohl im Kurzzeit- als auch im Langzeitversuch, ein signifikant höheres Körpergewicht als ihre Kontrolltiere (Tab 4).

Tabelle 4: Körpergewicht, TAG - und Cholesterol-Konzentration der Versuchstiere des Kurz- und Langzeitversuchs mit hochkalorischem (Hoch-Fett-Diät, HFD) oder normokalorischem (Kontrolle) Futter.

Zeitpunkt der Messung	Kurzzeitversuch	Langzeitversuch	
	MADB106-Injektion	MADB106-Injektion	21 Tage nach MADB106-Injektion
Körpergewicht (g)			
Kontrolle	290 ± 3	329 ± 4	333 ± 5
HFD	304 ± 4*	348 ± 7*	363 ± 8*
TAG in der Leber (µmol/g)			
Kontrolle	38 ± 8		38 ± 4
HFD	90 ± 15*		65 ± 9*
Cholesterol in der Leber (µmol/g)			
Kontrolle	6,7 ± 0,7		7,1 ± 0,3
HFD	11 ± 1,6*		9,3 ± 0,8*

Werte sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM, n = 16 Ratten/Gruppe, TAG: Triacylglycerol, * ≤ 0,05

Die i. v. Injektion der MADB106-Zellen führte bei den Tieren nach ca. drei Wochen zur Ausbildung von Lungenmetastasen (Abb. 9). Es ist davon auszugehen, dass die Zahl von oberflächlichen Lungenmetastasen repräsentativ für die Gesamtzahl der Lungenmetastasen ist. Die Lungen von Diät-induziert adipösen Ratten, die eine Injektion mit MADB106-Zellen erhielten, wiesen signifikant mehr oberflächliche Lungenmetastasen auf als die Lungen der normalgewichtigen Tiere, die eine Injektion mit MADB106-Zellen erhielten ($49 \pm 8,5$ vs. $16 \pm 4,8$ pro Lunge, $p = 0,005$).

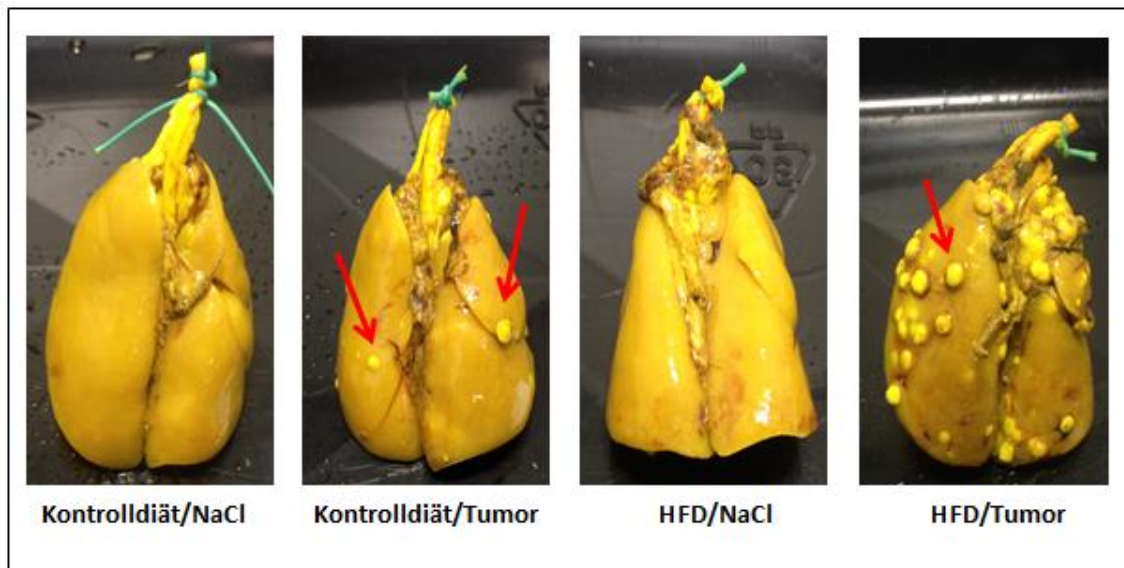


Abb. 9: Makroskopischer Befund der Lungen drei Wochen nach Injektion mit MADB106-Zellen bzw. mit NaCl. Die Fixierung mittels Bouin-Lösung erfolgte über Nacht. Durch diese Färbemethode werden die Lungenmetastasen auf der gelblich gefärbten Lungenoberfläche als weißlich erhabene Rundherde sichtbar. Die Tumorzellen der Lungenmetastasen (→) nehmen im Vergleich zum restlichen Gewebe weniger Farbstoff auf.

4.1.2 Relative mRNA-Konzentration von NK-Zell-relevanten Genen im Fettgewebe im Ratten-Tumor-Modell mit MADB106-Zellen und Diät-induzierter Adipositas

4.1.2.1 Natürliche zytotoxische Rezeptoren (NCRs)

Weder im Kurzzeitversuch noch im Langzeitversuch zeigten sich im Fettgewebe signifikante Unterschiede in der relativen mRNA-Konzentration der aktivierenden Rezeptoren NKp46 (NCR1) und NKp30 (NCR3) zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen (Abb. 10). Im Kurzzeitversuch war die relative mRNA-Konzentration des Rezeptors NKp30 (NCR3) im Fettgewebe der Diät-induziert adipösen Ratten gegenüber der Kontrollgruppe tendenziell höher (Abb. 10b, Tab. 1 Seite 62).

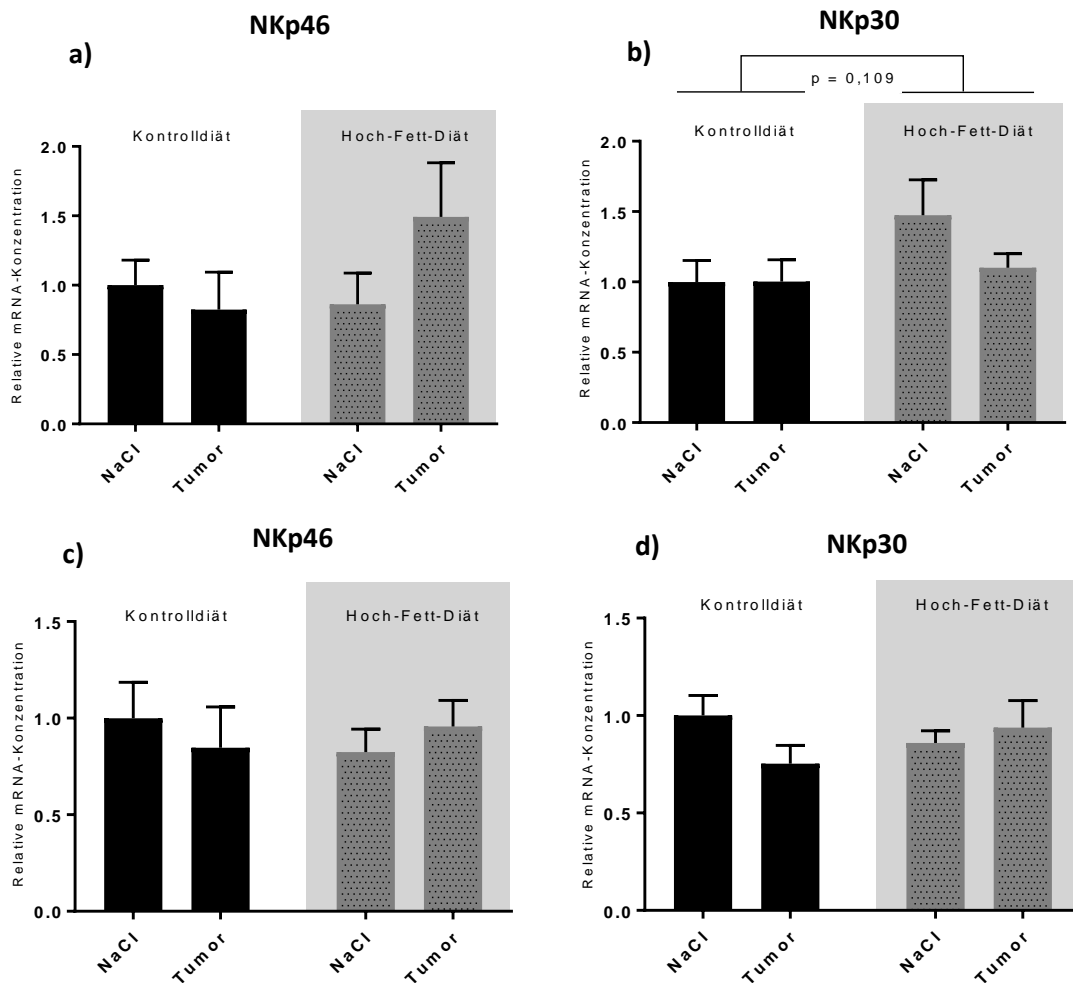


Abbildung 10: Relative mRNA-Konzentration der aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren NKp46 (NCR1) und NKp30 (NCR3) im Fettgewebe der Versuchstiere des MADB106-Kurzzeitversuches (15 min nach i.v.-Injektion, **a** und **b**) sowie des MADB106-Langzeitversuches (drei Wochen nach i.v.-Injektion, **c** und **d**). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Tendenzielle Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit exakten p-Werten gekennzeichnet.

4.1.2.2 C-Typ Lektin-Proteinfamilie: Killerzellen-лектинähnliche Rezeptoren (KLR) und Rezeptor-Subfamilie A (Ly49)

Im Kurzzeitversuch zeigten sich im Fettgewebe der Diät-induziert adipösen Ratten gegenüber der Kontrollgruppe signifikant höhere relative mRNA-Konzentrationen des aktivierenden Rezeptors NKG2A (Klrc1) und des inhibierenden Rezeptors Ly49i6, sowie tendenziell höhere relative mRNA-Konzentrationen der inhibierenden Rezeptoren Ly49b (Klra1), Ly49i4, Ly49i5 und CD94 (Klrd1) (Abb. 11, Tab. 2 Seite 62). Außerdem wurde bei den Diät-induziert adipösen Versuchstieren mit MADB106-Zell-Injektion sowohl gegenüber den normalgewichtigen Kontrolltieren als auch gegenüber den normalgewichtigen Tieren ohne Tumorzellinjektion eine signifikant höhere mRNA-Konzentrationen des Rezeptors Ly49i6 nachgewiesen (Abb. 11b,

Tab. 2 Seite 62). Der Vergleich der relativen mRNA-Konzentrationen der aktivierenden Rezeptoren Klra22 (Ly49s2), Ly49s4, Ly49s5, Ly49s6, Ly49s7 und Klrk1 (NKG2D) zeigte im Vergleich der einzelnen Gruppen keine signifikanten Veränderungen (Tab. 2 Seite 62).

Im Fettgewebe der Diät-induziert adipösen Ratten des Langzeitversuchs war die relative mRNA-Konzentration des aktivierenden Rezeptors Klra22 (Ly49s2) und des inhibierenden Rezeptors Ly49i5 gegenüber den normalgewichtigen Tieren signifikant erniedrigt (Abb. 12a und 12b). Zudem wiesen die adipösen Tiere gegenüber den normalgewichtigen Tieren eine tendenziell erniedrigte relative mRNA-Konzentration der aktivierenden Rezeptoren Ly49s4 und Ly49s6 auf (Abb. 12c und 12d). Zusätzlich zeigte sich eine signifikant niedrigere relative mRNA-Konzentration des Klra22-Rezeptors (Ly49s2) im Fettgewebe der Diät-induziert adipösen Versuchstiere mit Tumorzellinjektion im Vergleich zu den normalgewichtigen Versuchstieren, die keine Injektion mit MADB106-Zellen erhielten (Abb. 12a). Bei den übrigen KLR-Rezeptoren (Klra1, Ly49s5, Ly49s7, Ly49i4, Ly49i6, Klrd1 und Klrk1) konnten keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration von mRNA innerhalb der Vergleichsgruppen festgestellt werden (Tab. 2 Seite 62).

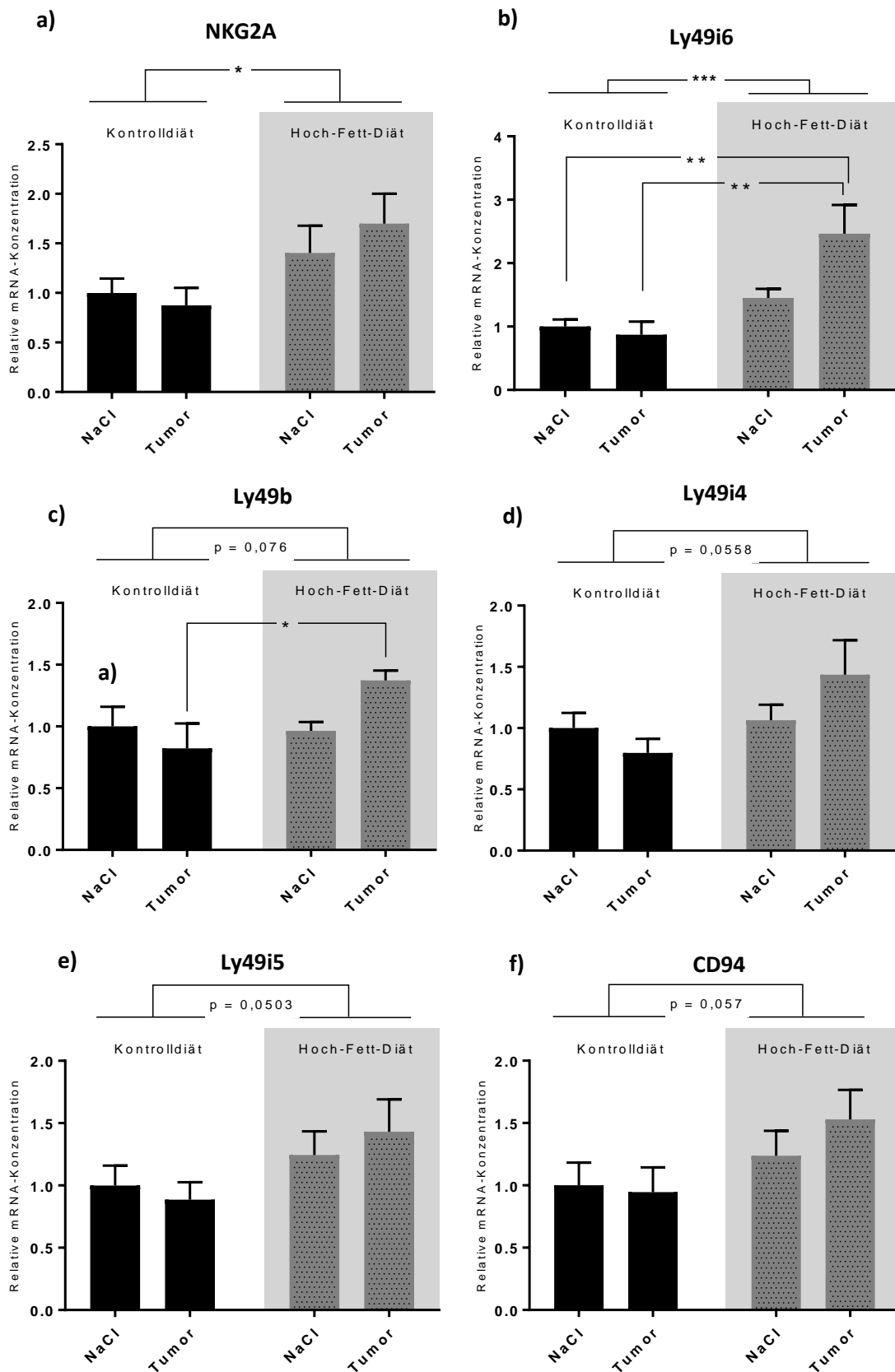


Abbildung 11: Relative mRNA-Konzentration des aktivierenden Rezeptors NKG2A (Klrc1) sowie der inhibierenden Rezeptoren Ly49i6, Ly49b (Klra1), Ly49i4, Ly49i5 und CD94 (Klrd1) im Fettgewebe der Versuchstiere des MADB106-Kurzzeitversuchs (15 min nach i.v.-Injektion, **a-f**). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$); tendenzielle Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit exakten p-Werten gekennzeichnet

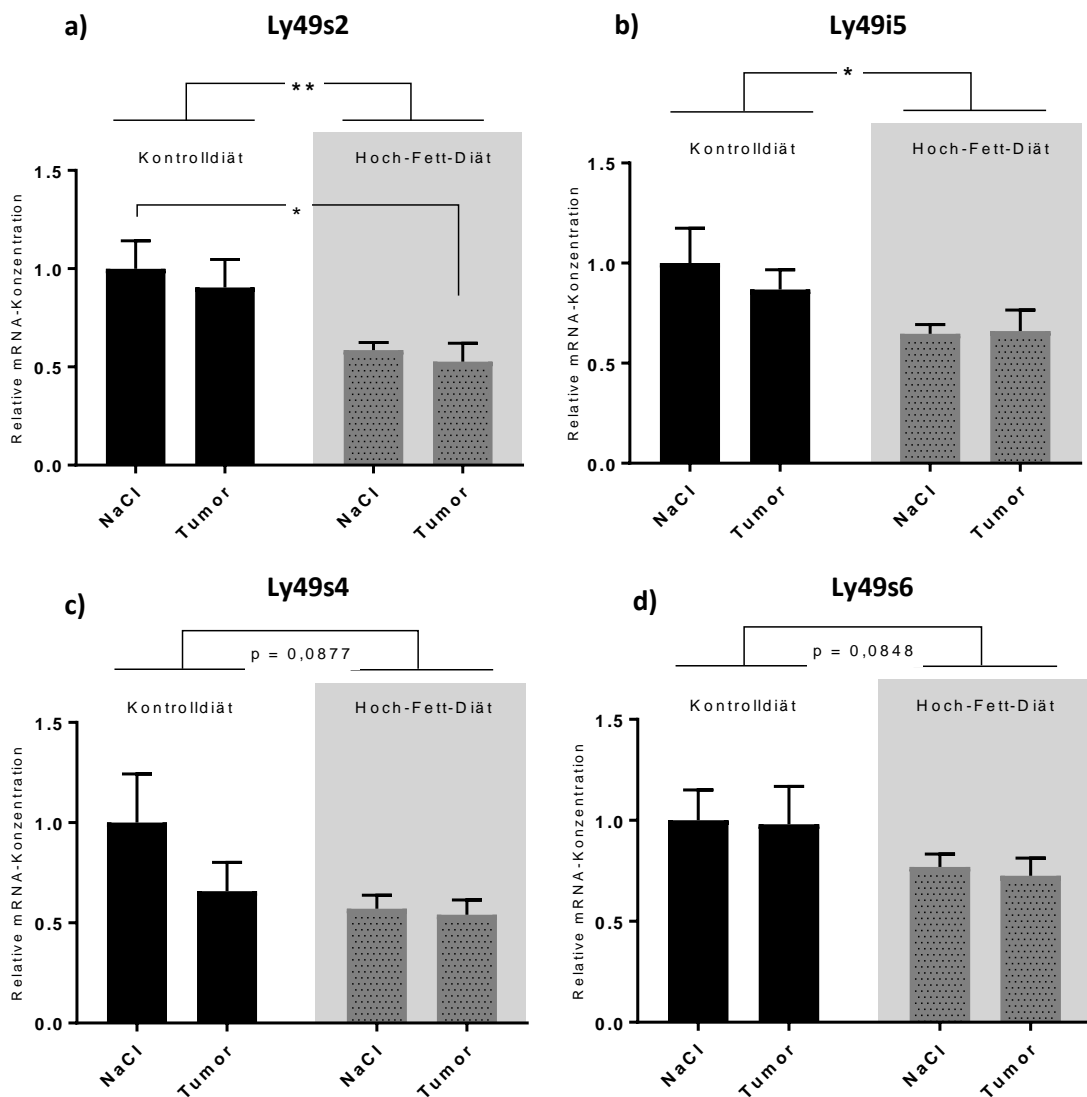


Abbildung 12: Relative mRNA-Konzentration der aktivierenden Rezeptoren Ly49s2 (Klra22), Ly49s4 und Ly49s6 sowie des inhibierenden Rezeptors Ly49i5 im Fettgewebe der Versuchstiere des MADB106-Langzeitversuchs (drei Wochen nach i.v.-Injektion, **a-d**). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$); tendenzielle Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit exakten n -Werten gekennzeichnet.

4.1.2.3 Weitere relevante Zielgene

Neben Vertretern der C-Typ Lektin-Proteinfamilie und NCRs wurde auch die Expression des aktivierenden Rezeptors 2B4 (CD244), des Zytokins TNF- α , des Liganden Tnfsf10 sowie der Transkriptionsfaktoren Tbx21 (T-bet) und Eomes im Fettgewebe der Fischer-344-Ratten analysiert.

Im Kurzzeitversuch zeigten sich im Fettgewebe der Versuchstiere mit Diät-induzierter Adipositas gegenüber der normalgewichtigen Kontrollgruppe signifikant höhere, relative

mRNA-Konzentrationen des aktivierenden Rezeptors 2B4 (CD244), des Zytokins TNF- α , des Liganden Tnfsf10 (Abb. 13) sowie des Transkriptionsfaktors Tbx21 (Abb. 14a). Zudem war die relative mRNA-Konzentration des Transkriptionsfaktors Eomesodermin (Tbr2) tendenziell, aber nicht signifikant, erhöht (Abb. 14b). Im Langzeitversuch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der gemessenen relativen mRNA-Konzentration der Genprodukte 2B4 (CD244), TNF- α , Tnfsf10, Tbx21 (T-bet) und Eomes (Tbr2) (Tab.3 Seite 63).

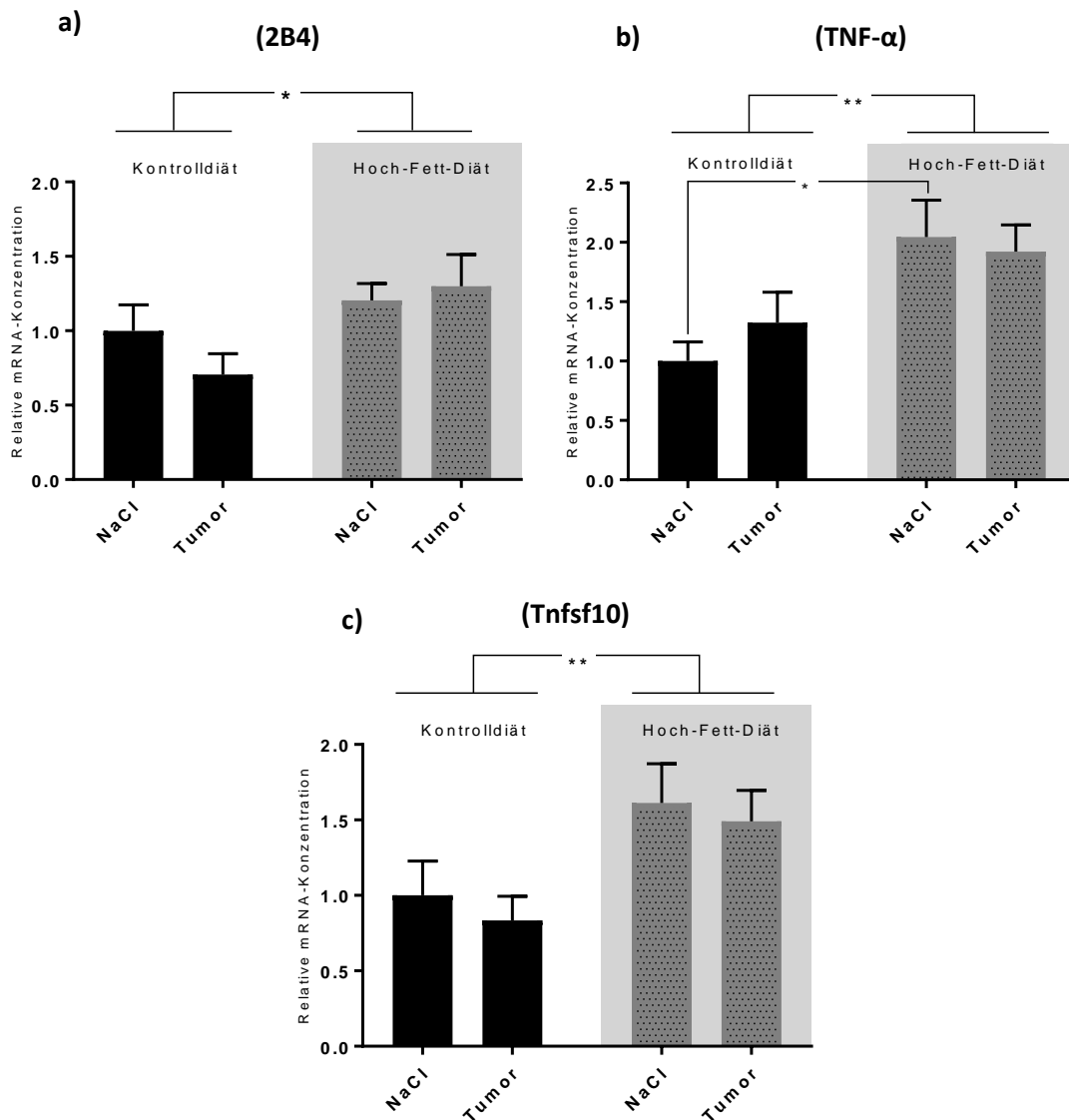


Abbildung 13: Relative mRNA-Konzentration des aktivierenden Rezeptors 2B4 (CD244) sowie des Zytokins TNF- α und des Liganden Tnfsf10 im Fettgewebe der Versuchstiere des MADB106-Kurzzeitversuchs (15 min nach i.v.-Injektion, a-c). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$); tendenzielle Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit exakten p-Werten gekennzeichnet.

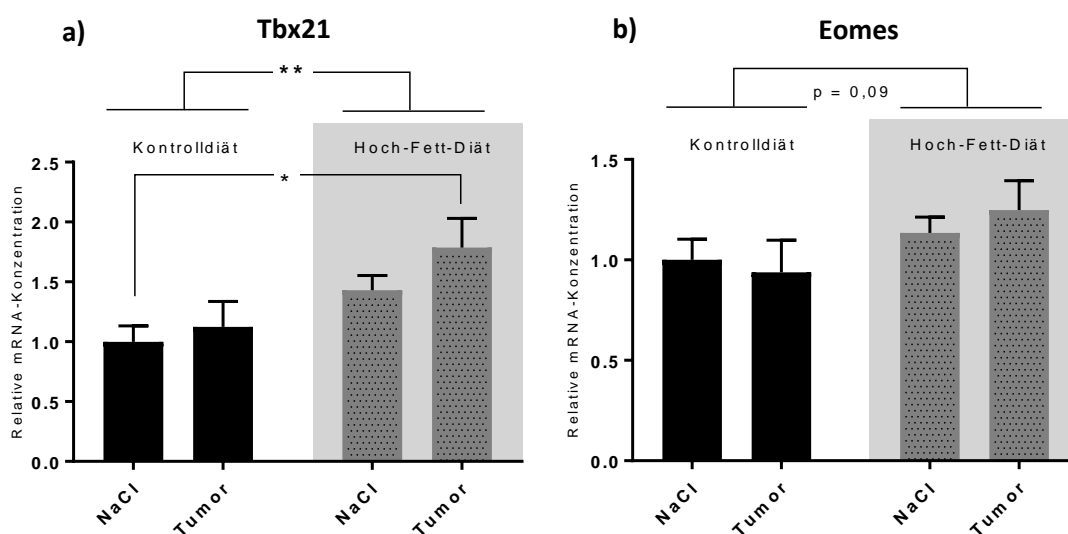


Abbildung 14: Relative mRNA-Konzentration der Transkriptionsfaktoren Tbx21 (Tbet) und Eomesodermin (Tbr2) im Fettgewebe der Versuchstiere des MADB106-Kurzzeitversuchs (15 min nach i.v.-Injektion, a und b). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$); tendenzielle Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit exakten p-Werten gekennzeichnet.

4.2 Ratten-Tumor-Modell mit Azoxymethan und Diät-induzierter Adipositas (Modell des Kolorektalkarzioms)

4.2.1 Entwicklung von Körpergewicht, Fettstoffwechselfparameter und Tumorbefund

Die Versuchstiere, welche eine HFD erhielten, wiesen im Vergleich zu den Kontrolltieren, ein signifikant höheres Körpergewicht und signifikant mehr viszerale Fettgewebssmasse auf. Ein Unterschied bezüglich der Körpergewichtsentwicklung konnte zwischen den Versuchstieren mit induzierten Tumoren und der Gruppe ohne Tumore nicht festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wiesen die Versuchstiere mit induzierten Tumoren im Vergleich zu den tumorfreien Tieren (NaCl) jedoch eine geringere Masse an viszeralem Fettgewebe auf (Tab. 5).

Die erfassten Konzentrationen an Triglyceriden und Cholesterin zeigten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. Die Serum-Konzentration an LDL war bei den Versuchstieren, die eine HFD erhielten, signifikant höher als bei den Versuchstieren mit einer normokalorischen Diät. Die Serum-Konzentration an HDL war bei den HFD- Versuchstieren, die eine i.v. Injektion mit Natriumchlorid erhielten, im Vergleich zu der normalgewichtigen Kontrollgruppe signifikant höher. Bei den Versuchstieren mit der AOM - Injektion konnte dieser Unterschied, in der HDL-Serumkonzentration zwischen den adipösen HFD-Versuchstieren und der Kontrollgruppe mit normalgewichtigen Versuchstieren, nicht beobachtet werden.

Tabelle 5: Anthropometrische und metabolische Daten der Versuchstiere nach 46 Wochen mit Hoch-Fett-Diät (HFD) oder normokalorsicher (Kontrolle) Diät

	Kontrolle		HFD	
	NaCl	AOM	NaCl	AOM
Körpergewicht (g)	700,4 ± 25,0	672,3 ± 33,7	810,1 ± 28,5*	780,2 ± 38,5*
Viszerales Fett (g)	51,5 ± 5,0	34,7 ± 5,9	72,3 ± 7,6*	64,1 ± 10,5*
Metabolische Daten				
Triglyceride (mmol/L)	2,4 ± 0,3	2,0 ± 0,2	2,8 ± 0,2	2,5 ± 0,3
Cholesterol (mmol/L)	2,3 ± 0,2	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,1
LDL (µmol/L)	258,6 ± 0,1	259,6 ± 1,0	359,3 ± 19,0*	349,0 ± 19,0*
HDL (µmol/L)	2,0 ± 0,1	1,7 ± 0,2	1,5 ± 0,1*	1,5 ± 0,1

Werte sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM, *= $p \leq 0,05$, TAG: Triacylglycerol; LDL: Lipoprotein niedriger Dichte; HDL: Lipoprotein hoher Dichte (Bähr et al. 2017).

Zur genaueren Definition und Klassifizierung der kolorektalen Tumore wurden, die in Paraffin präparierten, Tumore von einer Pathologin histologisch untersucht. Die durch Azoxymethan induzierten Tumore wurden als Adenome oder Adenokarzinome klassifiziert (Abb. 15, G-I).

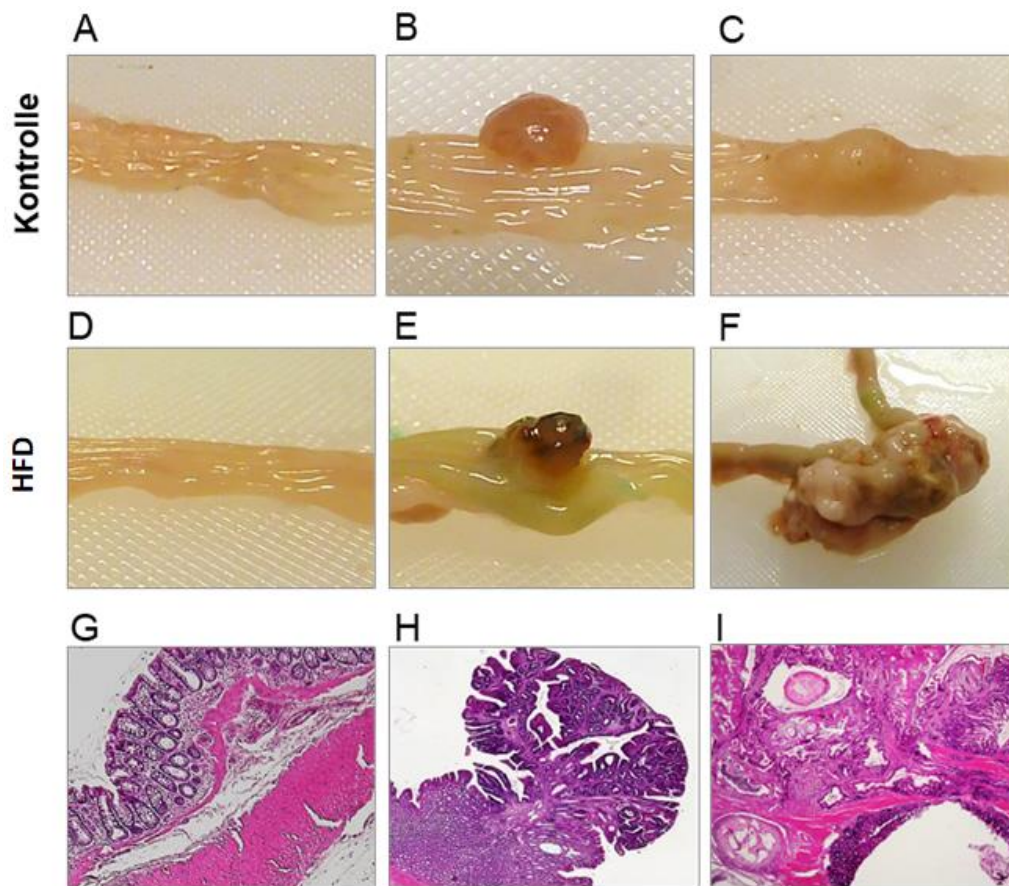


Abbildung 15: (A-F) Makroskopischer Befund normaler Kolonschleimhaut, eines kolorektalen Adenoms und einem kolorektalen Adenokarzinoms bei Ratten, die mit Azoxymethan behandelt wurden. (A-C) von normalgewichtigen Ratten, die eine normokalorische Kontrolldiät erhielten. (D-F) von diät.induziert adipösen Ratten, die eine Hoch-Fett-Diät erhielten. (G- I) Repräsentative Histopathologie gesunder Kolonschleimhaut (G), eines kolorektalen Adenoms (H) und eines kolorektalen Adenokarzinoms (I).

4.2.2 Relative mRNA-Konzentration von NK-Zell-relevanten Genen im Fettgewebe im Ratten-Tumor-Modell mit Azoxymethan und Diät-induzierter Adipositas

4.2.2.1 Natürliche zytotoxische Rezeptoren (NCRs)

Im Fettgewebe der Ratten des Tierversuchs mit Azoxymethanbehandlung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der relativen mRNA-Konzentration der Rezeptoren NKp46 (NCR1) und NKp30 (NCR3) zwischen den Versuchsgruppen. Die Versuchstiere, welche eine Hoch-Fett-Diät erhielten, hatten im Vergleich zu den normalgewichtigen Kontrolltieren eine tendenziell höhere relative mRNA-Konzentration des Rezeptors NKp46 im Fettgewebe (Abb. 16a, Tab 4 Seite 64).

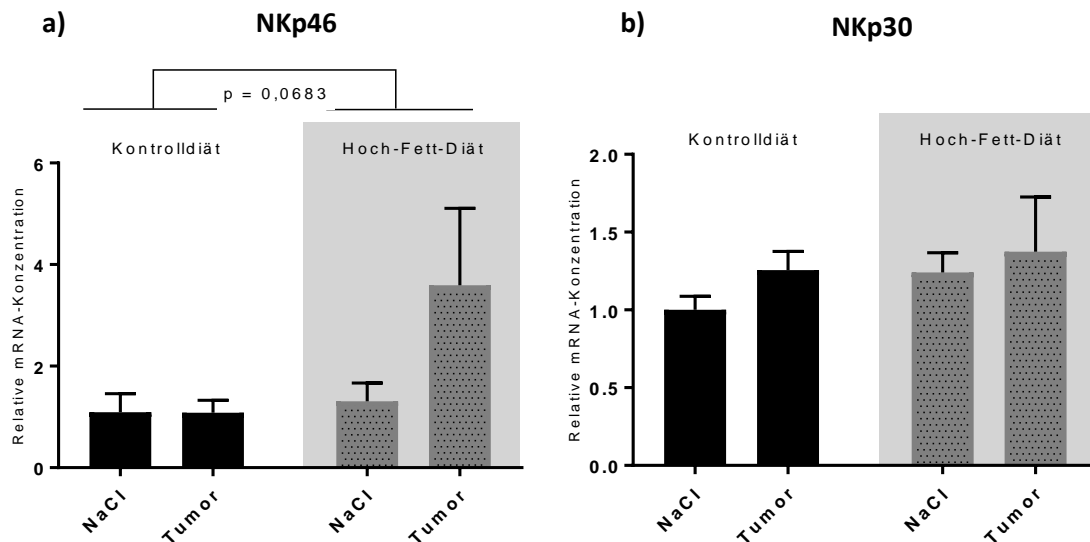


Abbildung 16: Relative mRNA-Konzentration der aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren NKp46 (NCR1) und NKp30 (NCR3) im Fettgewebe der Versuchstiere des AOM-Tierversuchs (**a** und **b**). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; tendenzielle Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit exakten p-Werten gekennzeichnet.

4.2.2.2 C-Typ Lektin-Proteinfamilie: Killerzellen-lektinähnliche Rezeptoren (KLRs) und Rezeptor-Subfamilie A (Ly49)

Im Fettgewebe der Versuchstiere mit Diät-induzierter Adipositas wurden gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikant niedrigere relative mRNA-Konzentration des aktivierenden Rezeptors NKG2D (Klrk1) sowie eine tendenziell höhere mRNA-Konzentration des aktivierenden Rezeptors Ly49s5 nachgewiesen (Abb. 17a und 17b). Zudem wiesen die AOM-behandelten Versuchstiere gegenüber den Versuchstieren ohne AOM-Injektion eine signifikant höhere relative mRNA-Konzentration des aktivierenden Rezeptors Ly49s2 (Klra22) auf (Abb. 17c). Die weiteren Rezeptoren der C-Typ-Lektin-Familie, NKG2A (Klrc1), Ly49b (Klra1), CD94 (Klrd1), Ly49i4, Ly49s4, Ly49i5, Ly49i6, Ly49s6 und Ly49s7, zeigten keine signifikanten Unterschiede in der relativen mRNA-Konzentration zwischen den Versuchsgruppen (Tab. 5 Seite 64).

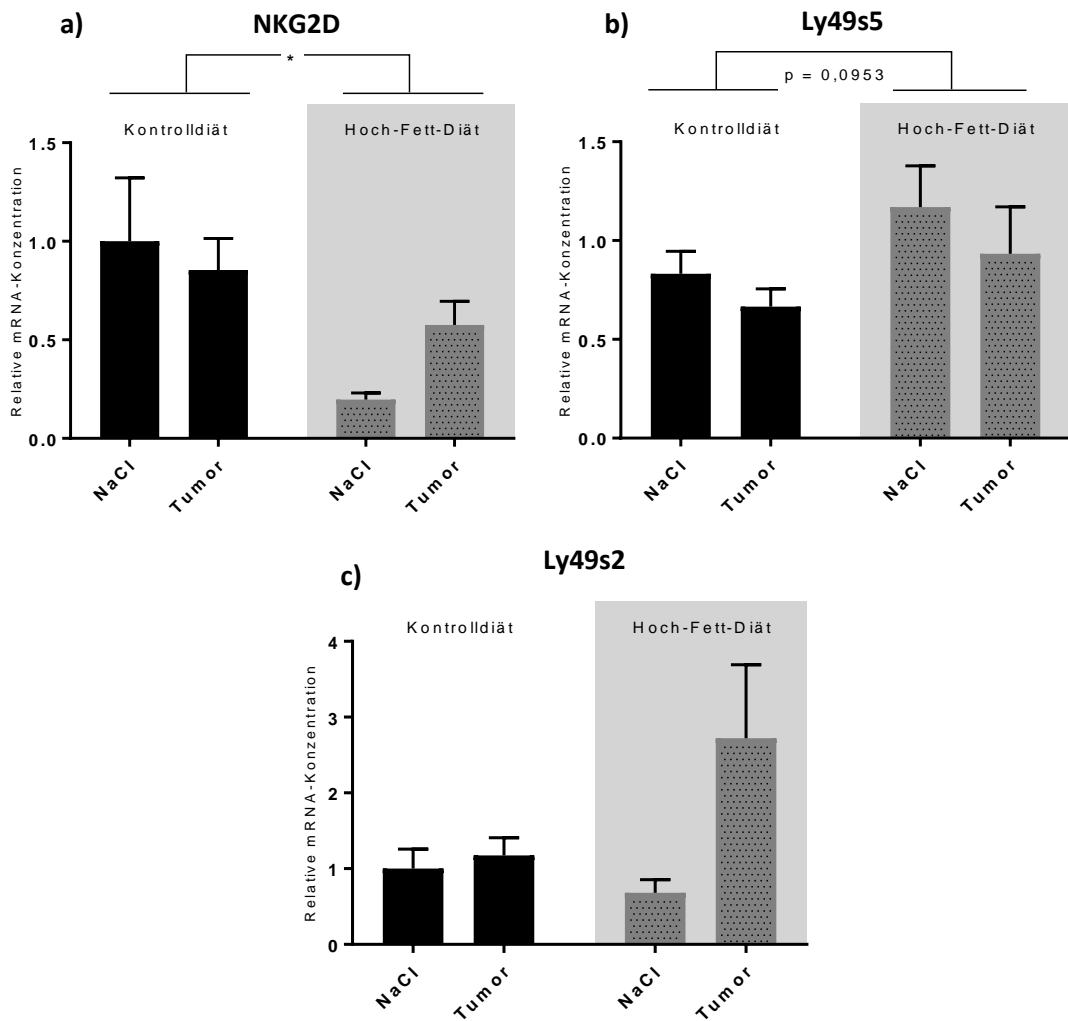


Abbildung 17: Relative mRNA-Konzentration der aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren NKG2D (Klrk1), Ly49s5 und Ly49s2 (Klra22) im Fettgewebe der Versuchstiere des AOM-Tierversuch (a-c). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; (* = $p \leq 0,05$); tendenzielle Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit exakten p-Werten gekennzeichnet.

4.2.2.3 Weitere relevante Zielgene

Wie bereits bei den Fischer-Ratten beschrieben, wurde auch bei den Wistar-Ratten, neben Vertretern der C-Typ Lektin-Proteinfamilie und NCRs, die Expression des aktivierenden Rezeptors 2B4 (CD244), des Zytokins TNF- α , des Liganden Tnfsf10 sowie der Transkriptionsfaktoren Tbx21 (T-bet) und Eomesodermin (Tbr2) im Fettgewebe untersucht. Versuchstiere, die eine Hoch-Fett-Diät erhielten, wiesen im Vergleich zur normalgewichtigen Kontrollgruppe eine signifikant höhere relative mRNA-Konzentration des Liganden Tnfsf10 sowie eine tendenziell höhere mRNA-Konzentration des Transkriptionsfaktors Tbx21 (T-bet) im Fettgewebe auf (Abb. 18c und 18d). Es zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in der relativen mRNA-Konzentration des aktivierenden Rezeptors 2B4 (CD244), TNF- α (Zytokin) und des Transkriptionsfaktors Eomesodermin (Tbr2) zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 18a, 18b und 18e, Tab. 6 Seite 65).

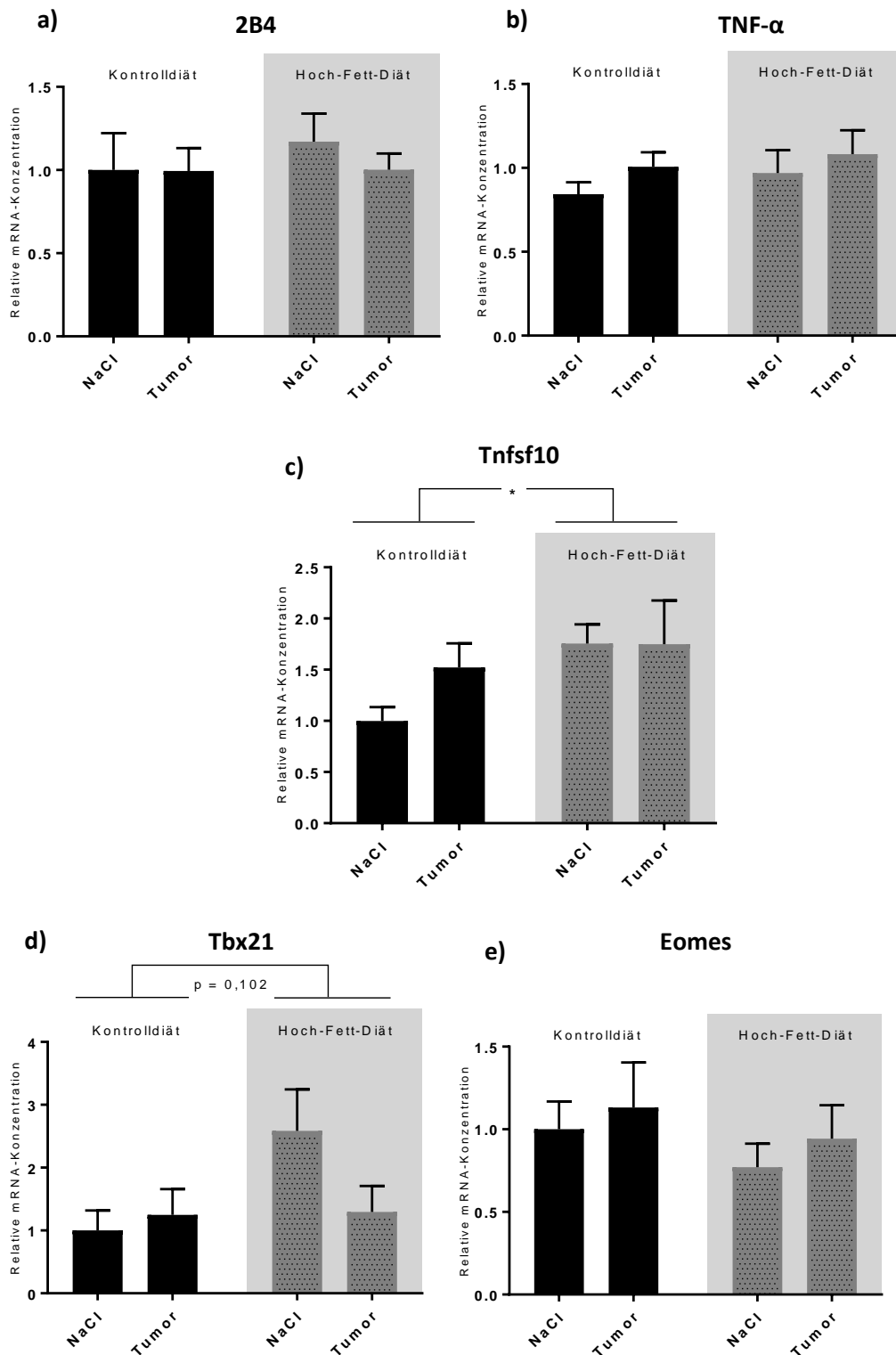


Abbildung 18: Relative mRNA-Konzentration des aktivierenden Rezeptors 2B4 (CD244), des Zytokins TNF- α und des Liganden Tnfsf10 sowie der Transkriptionsfaktoren Tbx21 und Eomes im Fettgewebe der Versuchstiere des AOM-Tierversuchs (a-e). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$); tendenzielle Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit exakten p-Werten gekennzeichnet.

5. Diskussion

Die weltweiten Gesundheitsrisiken befinden sich im ständigen Wandel. Durch effektive Präventionsmaßnahmen und neue Behandlungsstrategien in Bezug auf Infektionskrankheiten wird die Weltbevölkerung älter und der Anteil chronisch kranker Menschen nimmt stetig zu (Christensen et al 2009). Fettleibigkeit und Bewegungsmangel gehören heutzutage neben Bluthochdruck, Rauchen, erhöhten Blutglukose-Werten und Alkoholabusus zu den wichtigsten Risikofaktoren für einen frühzeitigen Tod und den erhöhten Bedarf an Pflege in der Bevölkerung (Frank Hu 2008). In vielen Ländern der Welt leiden inzwischen mehr Menschen an Übergewicht und Adipositas als an Untergewicht. Es wird prognostiziert, dass ab dem Jahr 2030 die Hälfte der Menschheit an Übergewicht leiden wird (Dobbs et al 2014). Bereits jetzt sterben jährlich mehr Menschen an Fettleibigkeit als an Unterernährung. So sind beispielsweise im Jahr 2010 ca. eine Million Menschen an den Folgen der Unterernährung gestorben, während drei Millionen Todesfälle auf Fettleibigkeit zurückzuführen waren (Mokdad et al 2016). Dabei beschränkt sich die steigende Prävalenz für Übergewicht und Adipositas nicht nur auf Industrieländer, wie Westeuropa oder Nordamerika, sondern es betrifft durch den Anstieg zucker- und fettreicher Ernährung sowie einen bewegungsärmeren Lebensstil zunehmend auch Länder des globalen Südens (*NCD Risk Factor Collaboration* 2016). Diese Daten zeigen, dass insbesondere Adipositas eine der größten gesundheitlichen Herausforderungen im 21. Jahrhundert darstellt.

Für zahlreiche Erkrankungen, wie Diabetes mellitus Typ II und kardiovaskuläre Erkrankungen, gilt Übergewicht bzw. Adipositas als ein anerkannter Risikofaktor. In den letzten Jahrzehnten wurde zudem ein erhöhter BMI mit einem Anstieg der Krebsneuerkrankungen in Verbindung gebracht (Bergström et. al 2001). So bestätigen Daten aus systemischen Übersichtsarbeiten und Meta-Analysen einen signifikanten Anstieg der Inzidenz vieler Krebsentitäten bei Populationen mit Übergewicht oder Adipositas. Somit gilt Adipositas als wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung bestimmter Neoplasien (Gilbert und Slingerland 2013; Kyrgiou et al. 2017; Behrens et al. 2018). In Anbetracht der zunehmenden Prävalenz von Adipositas werden voraussichtlich auch die absoluten Zahlen der Adipositas-assoziierten Krebsneuerkrankungen ansteigen. Schätzungen des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) zufolge, betrug im Jahr 2018 in Deutschland die Anzahl der durch Übergewicht bedingten Krebsneuerkrankungen 30567 der insgesamt 440373 aufgetretenen Krebsneuerkrankungen (Behrens et al. 2018).

Betrachtet man den prozentualen Anteil der Adipositas-assoziierten Krebsfälle für die beiden in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tumorerkrankungen, so fällt auf, dass dieser mit 9,0 % für den postmenopausalen Brustkrebs und 13,2 % für den Darmkrebs vergleichsweise gering ausfallen (Behrens et al. 2018). Jedoch besitzen diese beiden Krebsentitäten, im Vergleich zu

anderen Krebsarten mit einer stärkeren Adipositas-Assoziation, wie z.B. Gebärmutterkrebs, eine höhere Gesamtinzidenz sowohl in Deutschland als auch weltweit. Gemessen an den absoluten Zahlen bilden somit der postmenopausale Brustkrebs und Darmkrebs anteilig die beiden größten Fraktionen an Krebsfällen, die auf Adipositas zurückzuführen sind.

Adipositas beeinflusst nicht nur die Krebsinzidenz, sondern auch die Krebs-spezifische Mortalität (KSM). Prospektive Kohortenstudien zeigen, dass adipöse Menschen in onkologischer Behandlung signifikant höhere Mortalitätsraten aufgrund ihrer Krebserkrankungen entwickelten (Calle et al. 2003; Reeves et al. 2007; Berrington de Gonzalez et al. 2010). So haben z.B. adipöse Brustkrebspatientinnen ein bis zu 23 % höheres Risiko an den Folgen der Krebserkrankung zu versterben als normalgewichtige Patientinnen (Chan et al. 2014). Im Gegensatz dazu konnte beim Bronchialkarzinom eine verringerte Mortalität in Assoziation mit einem erhöhten BMI beobachtet werden, was einen protektiven Effekt von Adipositas bei manifestem Lungenkrebs vermuten lässt (Leung et al. 2011). Andere Arbeiten beschreiben eine ebenfalls negative Korrelation zwischen BMI und KSM beim Kolorektal- und Nierenzellkarzinom (Hakimi et al. 2013; Amptoulach et al. 2015). Fraglich ist, ob diese inverse Assoziation zwischen hohem BMI und niedriger KSM, mit dem kontrovers diskutierten Adipositas-Paradoxon gleichzustellen ist. Das Adipositas-Paradoxon beschreibt das epidemiologische Phänomen einer statistisch besseren Überlebenswahrscheinlichkeit von übergewichtigen bzw. adipösen Menschen bei bestimmten Erkrankungen wie z.B. bei kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes mellitus Typ II und chronischem Nierenversagen (Park et al. 2018). Ob dieses Paradoxon sich auch in Krebspopulationen sicher bestätigen lässt bleibt offen. In mehreren der zitierten Studien, in denen eine inverse Assoziation zwischen BMI und KSM beschrieben wird, lassen sich methodische Einschränkungen, wie *Confounding*, umgekehrte Kausalität oder spezifische Selektionsbias, nicht ausschließen. Die nicht adäquate Beurteilung des Körperfettanteils mittels BMI, sowie der Zeitpunkt der BMI-Messung in Bezug zur Krebsdiagnose, sind wichtige Parameter, die es zu optimieren gilt, um verlässliche Schlüsse auf die KSM bei übergewichtigen bzw. adipösen Menschen stellen zu können.

Die erhöhte Krebsinzidenz bei übergewichtigen oder adipösen Individuen lässt sich am ehesten durch die immun-metabolischen Dysregulationen im adipösen Organismus erklären. Hierbei sind die hohen Konzentrationen an Adipokinen, Insulin und den Wachstumsfaktor IGF-1, sowie der Dauerzustand einer geringgradigen Gewebsinflammation und Modulationen des Immunsystems maßgebend für die Tumorgenese (Ackerman et al. 2017). Inwieweit NK-Zellen durch immunmodulatorische Prozesse bei Fettleibigkeit verändert sind und wie groß damit der Einfluss auf die Tumorgenese ist, bleibt noch weitestgehend unklar. Bekannt ist, dass NK-Zellen im adipösen Organismus eine veränderte Anzahl und Funktionalität aufweisen (Viel et al. 2017, Laue et al. 2015). Es ist bekannt, dass Adipokine, wie Leptin, Adiponektin, Interleukin-

6 und Östrogene pathologische Einflüsse auf Funktionen von NK-Zellen nehmen (Francisco et al. 2018). Studien am Menschen sowie Untersuchungen am Tiermodell belegten zudem die Reversibilität einiger Adipositas-assoziierten Veränderungen bei NK-Zellen durch Gewichtsreduktion und Senkung des Körperfettanteils (Lautenbach et al. 2009, Jahn et al. 2015, Moulin et al. 2011). Dazu konnte in einer prospektiven Studie nachgewiesen werden, dass eine veränderte NK-Zell-Funktionalität zu einer erhöhten Krebsinzidenz führte (Imai et al. 2000). Somit ergibt sich ein möglicher Zusammenhang zwischen einer veränderten NK-Zell-Funktionalität bei Adipositas und einer erhöhten Inzidenz maligner Erkrankungen.

Viele Fragestellungen zur pathophysiologischen Auswirkung von Adipositas auf den menschlichen Organismus werden oftmals im tierexperimentellen Modell mittels genetischer oder diätischer Intervention untersucht. Die Fütterung von Hoch-Fett-Diäten (HFD) bei Ratten kann eine suffiziente Körpergewichts- und Körperfettzunahme der Tiere bewirken und folglich zur Ausbildung von Adipositas-assoziierten metabolischen Veränderungen führen, wie sie auch beim Menschen bekannt sind (Schemmel et al. 1970). So sind in Tiermodellen beispielsweise hohe Fett-, Leptin- und Insulinwerte im Serum in reproduzierbarer Form nachstellbar (Reuter 2007). Üblicherweise wird eine adipöse Stoffwechsellage bei Ratten angenommen, sofern ein signifikant höheres Körpergewicht im Vergleich zur normalgewichtigen Kontrollgruppe erreicht wird. Allerdings existiert aktuell keine einheitliche und standardisierte Kategorisierung des Körpergewichts in Normalgewicht, Übergewicht und Adipositas bei Ratten oder anderen Nagern, wie es beispielsweise mittels BMI beim Menschen möglich ist. Potentiell könnte dafür der Adipositas-Index ($(\text{Körperfettanteil}/\text{Endkörpergewicht}) \times 100$) oder der BMI bei Ratten in Frage kommen. In Studien zur Ermittlung möglicher Kriterien der Adipositas bei experimentellen Versuchstieren zeigte sich sowohl beim BMI als auch beim Adipositas-Index von Ratten eine positive Korrelation mit dem Endkörpergewicht, Körperfettanteil und Leptinspiegel im Serum (Novelli et al. 2007). Mittels *Cluster*-Analysen war es sogar möglich Ratten in Abhängigkeit ihres Adipositas-Indexes in Gruppen mit Übergewicht und Adipositas zu differenzieren (Leopoldo et al. 2016). Weitere Studien zu Kriterien der Ermittlung von Übergewicht und Adipositas im experimentellen Tiermodell sind erforderlich, um eine exaktere Differenzierung der Adipositas-assoziierten Störungen und Komorbiditäten möglich zu machen und somit eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Tierversuchen auf den Menschen zu ermöglichen. Eine Ermittlung der BMI-Werte oder der Adipositas-Indexe fand im Rahmen der beiden untersuchten Tierversuche nicht statt. Die Hoch-Fett-Diäten der beiden Tierversuche, die im Rahmen dieser Arbeit beschrieben wurden, förderten eine suffiziente Zunahme des Körpergewichts. Dies bewirkte die Entwicklung eines signifikant höheren Endkörpergewichts der adipösen Tiere verglichen mit den entsprechenden normalgewichtigen Kontrollgruppen. Die Fütterung der HFD förderte auch die Ausbildung mehrerer Indikatoren einer adipösen Stoffwechsellage, wie beispielsweise erhöhte Konzentrationen an Cholesterin und Triglyzeriden

im MADB106-Tierversuch oder vermehrtes viszerales Fettgewebe und erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine beim AOM-Tierversuch (Spielmann et al. 2017, Bähr et al. 2017). Es ist somit annehmbar, dass die Diät-induzierte Adipositas zu pathophysiologischen Veränderungen im Organismus der Ratten führte, die mit denen einer menschlichen Adipositas vergleichbar sind.

Das Ziel der Untersuchungen des MADB106-Tierversuches war es den Einfluss von Adipositas auf die Funktionalität der NK-Zellen und auf die Lungenmetastasierung einer Brustkrebszelllinie zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten zu untersuchen. Es sollte zum einen die frühe Phase der NK-Zell-vermittelten Tumorabwehr (Tötungszeitpunkt: 15 min nach Tumorzell-Applikation) und zum anderen der Zustand einer vortgeschrittenen Metastasierung im Organismus (Tötungszeitpunkt: 21 Tage nach Tumorzell-Applikation) untersucht werden. Die im Rahmen des AOM-Tierversuches bereits stattgefundenen Untersuchungen hatten das Ziel den Zusammenhang zwischen einer veränderten NK-Zell-Funktionalität und einer erhöhten Inzidenz des Kolonkarzinoms bei Adipositas zu untersuchen. Ergänzend zu den bisherigen Ergebnissen beider Tierversuche zu NK-Zellen in Blut, Milz, Leber, Kolon und Lunge war es Ziel dieser Arbeit mögliche Adipositas-assoziierte Veränderungen der Rezeptor-Expression der NK-Zellen im viszeralen Fettgewebe der Ratten mit und ohne Tumor zu analysieren.

Die Ergebnisse des Tiermodells mit dem Mammakarzinom (MADB106-Tierversuch) zeigten eine veränderte Rezeptorexpression, die am ehesten auf die HFD zurückzuführen ist. Die nicht signifikant veränderte Rezeptorexpression der normalgewichtigen Ratten mit induzierten Lungenmetastasen, im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe (normalgewichtige Ratten ohne Tumorzellapplikation) könnte darauf hindeuten, dass das im vorliegenden, experimentellen Modell bestehende Tumormilieu einen eher geringeren Einfluss auf die Funktionalität der NK-Zellen im Fettgewebe nahm. Fraglich dabei ist welche Rolle die körperlich kompartimentelle Trennung (in vivo) des untersuchten Fettgewebes vom direkten Einfluss des Tumormilieus in der Lunge trägt. Zudem stellt sich hier auch die Frage ob sich das tumorspezifische *microenvironment* zwischen einem Primum und einer Metastase beim Mammakarzinom in Bezug auf Veränderungen der Rezeptorexpression von NK-Zellen im Fettgewebe unterscheiden könnte. Bei geringer Datenlage in der Literatur sind weitere Interpretationen der Ergebnisse bezüglich dieser Fragestellungen schwierig. Auch beim Tiermodell mit dem Kolorektalkarzinom (AOM-Tierversuch) waren die signifikanten Veränderungen der Rezeptorexpression überwiegend durch die HFD bedingt. Als Ausnahme zeigte sich, eine im Vergleich zu Ratten ohne Tumorinduktion, signifikant veränderte Expression des Ly49s2 (Klra22)-Rezeptors bei Ratten mit erfolgter Tumorinduktion. Ein direkter Einfluss des Tumormilieus auf die Expression der NK-Zellrezeptoren im Tiermodell mit dem Kolorektalkarzinom ist nicht auszuschließen. Interessanterweise besteht in diesem

Tumor-Modell keine klare körperlich kompartimentelle Trennung zwischen tumorspezifischem *microenvironment* und dem untersuchten Fettgewebe. Das tumorspezifische *microenvironment* ist nachweislich für die Funktionalität von NK-Zellen und anderen Immunzellen bedeutsam. So zeigten intratumorale NK-Zellen eine begrenzte Anti-Tumor-Aktivität in Form von einer geringeren NK-Zell-Dichte und Zytotoxizität im Vergleich zu frei zirkulierenden bzw. gewebespezifischen NK-Zellen (Larsen et al. 2014). Die zwei Teile des Tiermodells mit dem Mammakarzinom, die sich im Tötungszeitpunkt nach Tumorzellinjektion unterschieden, sind als zwei voneinander unabhängige Experimente zu betrachten und ein direkter Vergleich der Ergebnisse aus beiden Experimenten ist nur begrenzt möglich. In Abhängigkeit vom Tötungszeitpunkt ergaben sich unterschiedliche Expressionsmuster der untersuchten NK-Zell-Rezeptoren. Die Expression von Rezeptoren, die im Kurzzeitversuch hochreguliert war (NKG2A, CD94, Ly49i4, Ly49i5, Ly49i6, 2B4), wiederholte sich im Langzeitversuch nicht. Stattdessen zeigten andere Rezeptoren (Ly49s2, Ly49s4, Ly49s6) die im ersten Experiment nicht signifikant verändert waren, eine Hochregulierung ihrer Expression im Langzeitversuch. Die längere Dauer von 21 Tagen nach Tumorzell-Injektion im Langzeitversuch, in denen die Ratten weiterhin eine HFD erhielten und an Körpergewicht zunahmen, könnte eine mögliche Ursache für die Diskrepanz der Veränderungen in der Rezeptorexpression bei beiden Experimenten des Tiermodells mit dem Mammakarzinom sein. Dies deutet auf eine dynamische Veränderung der Rezeptorexpression hin, welche sich je nach Voranschreiten der pathologischen Stoffwechsellage der Ratten sich bei unterschiedlichen Rezeptoren manifestieren kann. Ähnliche Beobachtungen wurden von Lee *et al.* und Wensveen *et al.* zusammenfassend beschrieben; ihre Untersuchungen zu zytokinbildenden NK-Zellen im Fettgewebe bei Adipositas ergaben, dass es zu einer wechselnden Expression der Zytokine TNF- α und IFN- γ bei NK-Zellen adipöser Mäuse kam. Dies wurde damit begründet, dass die Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihrer HFD präpariert und untersucht wurden (Wensveen et al. 2015; Lee et al. 2016). Unterschiedliche Rezeptorexpressionen in Abhängigkeit des zeitlichen Voranschreitens der Adipositas, könnte mit unterschiedlichen funktionellen Auswirkungen, wie Zytokinsekretion oder Zytotoxizität, der Adipositas auf NK-Zellen einhergehen.

Im Tiermodell mit dem Mammakarzinom zeigte sich bei den adipösen Ratten zum frühen Tötungszeitpunkt, dass im Fettgewebe die Expression inhibierender Rezeptoren der KLR-Rezeptor Familie (NKG2A und CD94) einschließlich der inhibierenden Rezeptoren der Subfamilie-A (Ly49i4, -i5 und -i6) signifikant hochreguliert war. Eine Hochregulation der Expression inhibierender NK-Zellrezeptoren bei Adipositas könnte eine Erklärung für die verminderte Tumorabwehr bei Adipositas sein. Tumoröse Zellen sind in der Lage durch Expression von HLA-Molekülen an die besagten inhibierenden Rezeptoren der KLR-Familie und der Subfamilie-A zu binden und die Inhibierung der NK-Zelle aufrecht zu erhalten, die

Expression weiterer inhibierender Rezeptoren zu induzieren und die Expression aktivierender Rezeptoren zu hemmen (Chretien et al. 2014). Somit können sich maligne Zellen der Erkennung und Zerstörung von NK-Zellen entziehen. Studien konnten zeigen, dass eine Blockierung der NKG2A-Expression mit einer höheren Zytotoxizität gegen HLA-E-exprimierende Tumorzellen einher geht (Kamiya et al. 2019). Eine Adipositas-bedingte Hochregulierung der NKG2A-Expression könnte somit das Gegenteil bewirken und zu einer verminderten Zytotoxizität der NK-Zellen gegen bestimmte Tumorzellen führen. Unter den inhibierenden KLR-Rezeptoren der Subfamilie A war Ly49i6 in der vorliegenden Arbeit im Kurzzeitversuch des Mammakarzinom-Modells bei adipösen im Vergleich zu normalgewichtigen Ratten bei Tieren mit Tumorzell-Injektion signifikant hochreguliert. Interessanterweise zeigte sich dieser Diät-assoziierte Effekt jedoch nicht bei den NaCl-behandelten Kontrolltieren. Nähere Informationen über diesen Ly49-Haplotypen oder über dessen spezifischen Liganden sind in der Literatur bisher nicht beschrieben. Möglicherweise könnte es sich hierbei um einen Rezeptor handeln, der eine besondere Affinität zu fettgewebsspezifischen Liganden oder zu spezifischen MHC-Liganden auf Adipozyten aufweist und dementsprechend bei Adipositas hochreguliert wird. Allerdings war die Ly49i6-Expression, weder im Langzeitversuch des Mammakarzinom-Modells noch im Tiermodell des Kolorektalkarzinoms, signifikant verändert. Die Relevanz der veränderten Expression des Ly49i6-Rezeptors für die Regulierung der Funktionalität von NK-Zellen im Fettgewebe sollte daher in zukünftigen Studien detailliert analysiert werden.

Interessanterweise zeigten sich zwischen den Gruppen des Tiermodells mit dem Kolorektalkarzinom keine Veränderungen der inhibierenden Rezeptoren der KLR-Familie. Im Gegensatz dazu war die Expression der aktivierenden KLR-Rezeptoren NKG2D und Ly49s5 bei den HFD-gefütterten Ratten signifikant verändert; hier zeigte sich für den NKG2D-Rezeptor eine verminderte und für den Ly49s5-Rezeptor eine Hochregulierung der Expression. In anderen Arbeiten konnte eine Hochregulierung des NKG2D-Rezeptors und des NKG2D-Liganden im Fettgewebe bei adipösen Mäusen und Menschen gezeigt werden (O'Rourke et al. 2013; Chung et al. 2014). Möglicherweise bedingt die HFD bei den Tieren eine höhere Expression der Rezeptorliganden im Fettgewebe, wodurch es zur „Bindung“ von vorwiegend NKG2D- und Ly49s5-exprimierenden NK-Zellen im Fettgewebe kommt. Infolgedessen könnte es zu einer reduzierten Anzahl von NKG2D⁺ und Ly49s5⁺ NK-Zellen in der Blutbahn oder in anderen Organen kommen und somit die Anti-Tumor-Aktivität der NK-Zellen schwächen. Durch zuvor erhobene Ergebnisse der Arbeitsgruppe aus dem Tiermodell mit dem Kolorektalkarzinom wurde gezeigt, dass die Expression des NKG2D-Rezeptors im Milzgewebe der adipösen Ratten signifikant vermindert war. Zusätzlich war die NCR1-Expression im Milzgewebe der selben adipösen Ratten ebenfalls signifikant vermindert (Bähr et al. 2017). Dafür war die Expression des NCR1-Rezeptors im Fettgewebe der adipösen Ratten signifikant hochreguliert. Auch für den NCR1-Rezeptor wurde bereits über eine

Hochregulierung seiner noch unbekanntenen Liganden im Fettgewebe bei induzierter Adipositas berichtet. Dabei erfolgte die Detektion der unbekanntenen NCR1-Liganden über Immunglobulin-Fusionsproteine (Wensveen et al. 2015). Unterschiede in der Rezeptorexpression von NK-Zellen verschiedener Gewebearten wurden bereits in zahlreichen Arbeiten beobachtet (Vitale et al. 2020). Möglicherweise kommt es auch im Fettgewebe zur Ausbildung eines bestimmten Phänotyps von NK-Zellen. Mögliche Ursachen dafür könnten gewebespezifische Differenzierungen der NK-Zellen sein, die sich auch im Fettgewebe fortsetzen. Eine andere wahrscheinliche Erklärung für das Rezeptorprofil der NK-Zellen im Fettgewebe besteht im Einfluss des besonderen immun-metabolischen Milieus des Fettgewebes auf die Rezeptorexpression der NK-Zellen insbesondere bei Adipositas.

2B4 (CD244) ist ein Rezeptor der überwiegend auf der Oberfläche von NK-Zellen exprimiert wird und eine hohe Affinität zu dessen Liganden CD48 besitzt. Die 2B4:CD48-Interaktion beeinflusst die Zytotoxizität der NK-Zellen. In der Literatur wird der 2B4-Rezeptor überwiegend als inhibierender Rezeptor beschrieben. 2B4-defiziente NK-Zellen können nachweislich nicht nur hämatopoetische Tumorzellen effizienter lysieren, sondern führen auch zur Lyse von anderen NK-Zellen und aktivierten CD8⁺- T-Zellen. Somit spielt der 2B4-Rezeptor vermutlich auch eine Rolle in der immunologischen Selbsttoleranz der NK-Zellen (McNerney et al. 2005). Die Hochregulation der Expression des inhibierenden 2B4-Rezeptors bei adipösen Ratten des Kurzzeitversuches beim Mammakarzinom-Modell könnte zur verminderten NK-Zell-Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen führen und folglich zur verminderten Tumorabwehr bei Adipositas führen. Die erhöhte Expression des 2B4-Rezeptors könnte in Folge der chronischen *low-grade inflammation* im Fettgewebe und der vermehrten Ansammlung von weiteren Immunzellen, die den 2B4-Liganden CD48 exprimieren, stattfinden. Der 2B4-Ligand CD48 wird von nahezu sämtlichen hämatopoetischen Zellen, insbesondere B- und T-Lymphozyten sowie Monozyten bzw. Makrophagen, exprimiert (Elishmereni et al. 2010). Allerdings konnten im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren signifikanten Veränderungen der 2B4-Expression innerhalb der Vergleichsgruppen der anderen beiden Tierversuche festgestellt werden. *Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL oder Tnfsf10) ist ein Protein, welches den programmierten Zelltod von Tumorzellen einleiten kann. Es spielt eine wesentliche Rolle bei entzündlichen Vorgängen und in der Pathogenese von Adipositas. Eine positive Korrelation zwischen der Serumkonzentration an TRAIL und dem Körperfettanteil, der Konzentration an Fetten im Blut und dem Taillenumfang konnte bei gesunden Individuen beobachtet werden. Es ist eine Assoziation zwischen Adipositas und einer erhöhten Expression des TRAIL-Rezeptors im Fettgewebe oder hohe Serumkonzentrationen des löslichen TRAIL-Proteins bekannt (Harith et al. 2013). Im Kurzzeitversuch des Tiermodell mit dem Mammakarzinom zeigte sich eine hochregulierte TRAIL-Expression im Fettgewebe der Ratten mit induzierter Adipositas. Allerdings war weder

im Langzeitversuch des Mammakarzinom-Modells noch im Tiermodell des Kolorektalkarzinoms eine entsprechende Hochregulation der TRAIL-Expression zu beobachten. Zudem wurde die Expression des TRAIL-Rezeptors nicht spezifisch auf NK-Zellen, sondern im gesamten Fettgewebe untersucht. Eine Schlussfolgerung zum Einfluss einer veränderten Trail-Expression auf die Funktionalität der NK-Zellen bei Adipositas ist mit den vorhandenen Ergebnissen daher nicht eindeutig abzuleiten und bedarf weiterführender Untersuchungen.

Die Entwicklung von NK-Zellen und anderen Immunzellen steht unter der Kontrolle zahlreicher Transkriptionsfaktoren. Die beiden Transkriptionsfaktoren T-bet (Tbx21) und Eomesodermin (Eomes) beeinflussen die terminale Differenzierung von NK-Zellen und die Ausbildung eines diversen Rezeptorrepertoires. Außerdem sind T-bet und Eomes an der Induktion einer regelrechten IL-15-Expression bei Immunzellen beteiligt und somit essenziell für die Proliferation und Aktivierung von NK-Zellen (Gordon et al. 2012). Eine kombinierte Mutation beider Gene (T-bet und Eomes) im Mausmodell führte zum Fehlen klassischer NK-Antigene und der Nachweis einer regelrecht differenzierten NK-Zelllinie bei den Mäusen war nicht mehr möglich (Intlekofer et al. 2005). In beiden Tumor-Modellen konnte gezeigt werden, dass adipöse Ratten eine erhöhte Expression dieser Transkriptionsfaktoren im Fettgewebe aufwiesen. Eine Hochregulierung dieser Transkriptionsfaktoren bei Adipositas kann das Ungleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren fördern, was folglich in einer Dysfunktion der NK-Zellen resultieren kann.

Die Behandlung onkologischer Patientinnen und Patienten in Deutschland hat sich in den letzten Jahrzehnten für die Mehrheit der Krebsarten verbessert. Nach Schätzungen des Zentrums für Krebsregisterdaten sind die altersstandardisierten Sterberaten bei Tumorerkrankungen zwischen 2005 und 2015 bei Männern um 12 % und bei Frauen um 7 % zurückgegangen. Krebstherapien umfassen ein weites Spektrum an Behandlungskonzepten mit Teils kurativer Zielrichtung. Neben chirurgischer Exzision, Strahlen- und Chemotherapie, finden neuere, immuntherapeutische Ansätze Einzug in die Krebstherapie. Insbesondere bei geringer Chemo- oder Strahlensensitivität, fortgeschrittenen und inoperablen soliden Tumoren oder bei Neoplasien ohne primären Herdbefund könnten Therapieansätze unter Einbeziehung des Immunsystems, eine vielversprechende Alternative darstellen. Ein bereits etablierter immuntherapeutischer Ansatz ist die allogene Stammzeltransplantation bei myeloischen Neoplasien. Neuere Krebsimmuntherapien, die teils noch in klinischen Studien geprüft werden oder bereits zugelassen sind, basieren auf dem Prinzip der individualisierten Medizin. Davon ausgehend, dass jede bösartige Neubildung eine eigene individuelle Tumorbilogie besitzt, die klinisch evident ist und molekularpathologisch genaustens analysiert werden kann, stehen unterschiedliche immuntherapeutische Ansätze zur Auswahl. So können NK-Zellen und andere zytotoxische Effektorzellen über therapeutische monoklonale oder bispezifische Antikörper an

Krebszellen binden und eine ADCC auslösen, wodurch es zur Zerstörung der malignen Zellen kommt. Dies kann beispielsweise in der Immuntherapie CD19-positiver Leukämien und Lymphomen angewendet werden (Kellner 2008). NK-Zellen könnten als hochpotente Anti-Tumor-Effektorzellen eine wichtige Rolle in der modernen Krebsimmuntherapie spielen. Neben NK-Zell-stimulierenden Zytokinen, können spezifische Antikörpertherapien durch Bindung an inhibierende NK-Zellrezeptoren oder an Agonisten für aktivierende NK-Zellrezeptoren die Anzahl und Funktionalität von NK-Zellen positiv beeinflussen. Diese Therapieansätze konnten bereits im Rahmen von klinischen Studien erfolgreich bei Patientinnen mit Ovarialkrebs demonstriert werden (Nersesian et al. 2019). Die Sicherheit der allogenen Applikation adoptiver NK-Zellen, der humanen Zelllinie NK92, wurde bereits in mehreren klinischen Studien an Krebspatienten nachgewiesen. Im Gegensatz zu allogenen T-Lymphozyten, scheinen allogene NK-Zellen eine *Graft-versus-Host-Reaktion* (GvHR) durch regulatorische Prozesse eher zu unterdrücken (Arai et al. 2008; Tonn et al. 2013; Simonetta et al. 2017). Bei der NK92-Zelllinie handelt es sich um eine reproduzierbare Quelle für humane NK-Zellen, die ursprünglich von einem Patienten mit einem seltenen NK-Zell-Lymphom abstammt. In Kombination mit einem *chimeric antigen receptor* (CAR-Gentechnologie) könnten NK92-Zellen in ihrer Anti-Tumor-Aktivität gestärkt werden und als schnell verfügbare und sichere Quelle autologer NK-Zellen die Alternative für aufwendigere und kostenintensivere Produkte der CAR-T-Zellimmuntherapie bieten (Daher und Rezvani 2018). Bei noch fehlenden Langzeitdaten zum adoptiven Zelltransfer von NK92-Zellen bleibt offen, ob diese Zellen ein potentielles Malignitätsrisiko mit sich tragen. Um allogene NK-Zellen aus anderen Quellen in dauerhaft reproduzierbarer Form gewinnen zu können, kommen Methoden wie z.B. *in vitro* Generierung primärer CAR-NK-Zellen aus humanen pluripotenten Stammzellen oder die Isolierung primärer NK-Zellen aus Nabelschnurblut in Frage (Lowe et al. 2016; Liu et al. 2018).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit einen deutlichen Einfluss einer Körpergewichtszunahme auf die Expression NK-Zell-spezifischer Oberflächenrezeptoren, von Transkriptionsfaktoren, Liganden und Zytokinen im Fettgewebe von Diät-induziert adipösen Ratten. In der Zusammenschau mit zuvor erzielten Ergebnissen aus beiden Tierversuchen besteht ein Zusammenhang zwischen der veränderten Rezeptorexpression der NK-Zellen im Fettgewebe und einer verstärkten Metastasierung eines Mammakarzinoms in die Lunge (MADB106-Tierversuch) bzw. einer Zunahme der Inzidenz des Kolorektalkarzinoms (Azoxymethan-Tierversuch). Bislang gibt es nur wenige Studien zu Anzahl, Funktion und Phänotyp von NK-Zellen im Fettgewebe und mögliche Zusammenhänge mit der Tumorgenese. Somit liefern die Erkenntnisse dieser Arbeit erstmals wichtige Ergebnisse zur Charakterisierung der NK-Zell-Rezeptorexpression bei adipösen Nagern mit und ohne Tumorleiden. Die Daten liefern grundlegende Aspekte für weiterführende Untersuchungen auf diesem Gebiet. Es sollten Untersuchungen zum Einfluss der einzelnen Rezeptoren auf die Zytotoxizität und

Zytokinsekretion von NK-Zellen folgen. Dazu sollten nachgewiesene Unterschiede der veränderten Rezeptorexpression im Fettgewebe auch auf Proteinebene dargestellt werden, z.B. mittels Durchflusszytometrie. Zudem sollte in zukünftigen Untersuchungen die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen erfolgen. Die multidisziplinäre Grundlagenforschung zum Einfluss von Adipositas auf die Krebs-spezifische NK-Zell-Funktionalität ist der Initiator wichtiger klinischer Studien beim Menschen. Potentielle Interventionspunkte könnten dadurch erkannt und für innovative Krebstherapien genutzt werden.

6. Zusammenfassung

Die weltweit zunehmende Prävalenz von Adipositas bedingt eine gleichzeitige Zunahme Adipositas-assoziiierter Folgeerkrankungen. Die moderne Medizin steht dadurch vor einer der größten gesundheitlichen Herausforderungen des neuen Jahrhunderts. Neben Diabetes mellitus Typ II und kardiovaskulären Erkrankungen gehören maligne Neoplasien zu den häufigsten Folgeerkrankungen von Adipositas. Dabei sind die genauen Entstehungsmechanismen einer Adipositas-assoziierten Neoplasie noch Gegenstand akuter Forschung. Eine wichtige ätiologische Verbindung besteht in einer Adipositas-bedingten Dysfunktion von natürlichen Killer (NK)-Zellen. NK-Zellen sind Teil des angeborenen Immunsystems und besitzen ein breites und hochspezialisiertes Rezeptorrepertoire, bestehend aus aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren. Mittels dieser Rezeptoren können NK-Zellen virus-infizierte und Tumorzellen im Organismus erkennen und abtöten.

In zwei voneinander unabhängigen Ratten-Tumor-Modellen wurde im Fettgewebe Diät-induziert adipöser Ratten mit und ohne Tumorinduktion ein breites Spektrum von spezifischen NK-Zell-Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Liganden und Zytokinen mittels Expressionsanalysen untersucht. Im Tiermodell zur Untersuchung der Metastasierung von Brustkrebs in die Lunge erhielten 64 männliche F344-Ratten zur Induktion einer Adipositas über sechs bis zehn Wochen eine Hoch-Fett-Diät oder eine Kontrolldiät. Anschließend wurde den Tieren Zellen eines syngenetischen Adenokarzinoms (MADB106) oder ein Vehikel i.v. injiziert. Ein Teil der Tiere wurde 15 Minuten, der andere Teil drei Wochen nach der Tumorzell-Injektion getötet. Für den Tierversuch mit Kolonkarzinom wurden 50 sechs Wochen alte, männliche Wistar Ratten mit einer 46 Wochen-andauernden Diät (Hoch-Fett-Diät oder Kontrolldiät) gefüttert. Nach acht Wochen erhielten 11 Ratten aus jeder Gruppe Injektionen mit Azoxy methane (AOM). Dabei handelt es sich um eine krebserregende Substanz, die bei Nagetieren spezifisch die Entstehung von kolorektalen Karzinomen induziert. Das viszerale Fettgewebe der Ratten beider Tierversuche wurde entnommen und mittels *real time*-PCR auf die Expression spezifischer NK-Zell-Rezeptoren untersucht.

Die Ergebnisse zeigen erstmals eine veränderte Expression verschiedener Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Liganden und Zytokine im Fettgewebe der Diät-induziert adipösen Ratten in Tierversuchen mit Mamma- und Kolonkarzinom. Der Effekt einer Hoch-Fett-Diät auf die Rezeptorexpression der NK-Zellen im Fettgewebe resultiert vermutlich in einer gestörten NK-Zell-Funktionalität und kann zur verstärkten Lungenmetastasierung im MADB106-Tierversuch bzw. eine erhöhte Inzidenz des Kolonkarzinoms im AOM-Tierversuch beigetragen haben. Die Daten liefern zudem Hinweise auf Spezies- und gewebesspezifische Unterschiede in der Rezeptorausstattung von NK-Zellen unter Adipositas. Die Ergebnisse zeigen auch, dass eine

veränderte Rezeptorausstattung der NK-Zellen im Fettgewebe mit einem erhöhten Risiko für Tumorerkrankungen bei Adipositas assoziiert sein kann.

7. Literaturverzeichnis

- Abel, Alex M.; Yang, Chao; Thakar, Monica S.; Malarkannan, Subramaniam (2018): Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 1869. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01869.
- Ackerman SE, Blackburn OA, Marchildon F, Cohen P. Insights into the Link Between Obesity and Cancer. *Curr Obes Rep*. 2017 Jun;6(2):195-203. doi: 10.1007/s13679-017-0263-x DOI. PMID: 28434109
- Amptoulach, Sousana; Gross, Gillis; Kalaitzakis, Evangelos (2015): Differential impact of obesity and diabetes mellitus on survival after liver resection for colorectal cancer metastases. In: *The Journal of surgical research* 199 (2), S. 378–385. DOI: 10.1016/j.jss.2015.05.059.
- Arai, S.; Meagher, R.; Swearingen, M.; Myint, H.; Rich, E.; Martinson, J.; Klingemann, H. (2008): Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial. In: *Cytotherapy* 10 (6), S. 625–632. DOI: 10.1080/14653240802301872.
- Ashraf, M. Javed; Baweja, Paramdeep (2013): Obesity: The ‘Huge’ Problem in Cardiovascular Diseases. In: *Missouri Medicine* 110 (6), S. 499–504.
- Bähr, Ina; Goritz, Vincent; Doberstein, Henriette; Hiller, Grit Gesine Ruth; Rosenstock, Philip; Jahn, Janine et al. (2017): Diet-Induced Obesity Is Associated with an Impaired NK Cell Function and an Increased Colon Cancer Incidence. In: *Journal of nutrition and metabolism* 2017, S. 4297025. DOI: 10.1155/2017/4297025.
- Barlozzari, T.; Leonhardt, J.; Wiltrout, R. H.; Herberman, R. B.; Reynolds, C. W. (1985): Direct evidence for the role of LGL in the inhibition of experimental tumor metastases. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 134 (4), S. 2783–2789.
- Barrow, Alexander David; Colonna, Marco (2019): Exploiting NK Cell Surveillance Pathways for Cancer Therapy. In: *Cancers* 11 (1). DOI: 10.3390/cancers11010055.
- Bauer, S. (1999): Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA. In: *Science* 285 (5428), S. 727–729. DOI: 10.1126/science.285.5428.727.
- Behrens, Gundula; Gredner, Thomas; Stock, Christian; Leitzmann, Michael F.; Brenner, Hermann; Mons, Ute (2018): Cancers Due to Excess Weight, Low Physical Activity, and Unhealthy Diet. In: *Deutsches Arzteblatt international* 115 (35-36), S. 578–585. DOI: 10.3238/arztebl.2018.0578.
- Belfiore, Antonino; Malaguarnera, Roberta; Vella, Veronica; Lawrence, Michael C.; Sciacca, Laura; Frasca, Francesco et al. (2017): Insulin Receptor Isoforms in Physiology and Disease: An Updated View. In: *Endocrine reviews* 38 (5), S. 379–431. DOI: 10.1210/er.2017-00073.
- Bergström A, Pisani P, Tenet V, Wolk A, Adami HO. Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. *Int J Cancer*. 2001 Feb 1;91(3):421-30. doi: 10.1002/1097-0215(200002)9999:9999<::aid-ijc1053>3.0.co;2-t Erratum in: *Int J Cancer* 2001 Jun 15;92(6):927. PMID: 11169969
- Berrington de Gonzalez, Amy; Hartge, Patricia; Cerhan, James R.; Flint, Alan J.; Hannan, Lindsay; MacInnis, Robert J. et al. (2010): Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. In: *The New England journal of medicine* 363 (23), S. 2211–2219. DOI: 10.1056/NEJMoa1000367.
- Béziat, Vivien; Hilton, Hugo G.; Norman, Paul J.; Traherne, James A. (2017): Deciphering the killer-cell immunoglobulin-like receptor system at super-resolution for natural killer and T-cell biology. In: *Immunology* 150 (3), S. 248–264. DOI: 10.1111/imm.12684.

- Borrego, Francisco; Masilamani, Madhan; Marusina, Alina I.; Tang, Xiaobin; Coligan, John E. (2006): The CD94/NKG2 Family of Receptors: From Molecules and Cells to Clinical Relevance. In: *IR* 35 (3), S. 263–278. DOI: 10.1385/IR:35:3:263.
- Boulenouar, Selma; Michelet, Xavier; Duquette, Danielle; Alvarez, David; Hogan, Andrew E.; Dold, Christina et al. (2017): Adipose Type One Innate Lymphoid Cells Regulate Macrophage Homeostasis through Targeted Cytotoxicity. In: *Immunity* 46 (2), S. 273–286. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.01.008.
- C. Kellner (2008): Entwicklung und Charakterisierung bispezifischer Antikörper-Derivate zur Immuntherapie CD19-positiver Leukämien und Lymphome.
- Calle, Eugenia E.; Rodriguez, Carmen; Walker-Thurmond, Kimberly; Thun, Michael J. (2003): Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. In: *The New England journal of medicine* 348 (17), S. 1625–1638. DOI: 10.1056/NEJMoa021423.
- Chan, D. S. M.; Vieira, A. R.; Aune, D.; Bandera, E. V.; Greenwood, D. C.; McTiernan, A. et al. (2014): Body mass index and survival in women with breast cancer-systematic literature review and meta-analysis of 82 follow-up studies. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 25 (10), S. 1901–1914. DOI: 10.1093/annonc/mdu042.
- Chaplin, David D. (2010): Overview of the immune response. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 125 (2 Suppl 2), S3-23. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.12.980.
- Chretien, Anne-Sophie; Le Roy, Aude; Vey, Norbert; Prebet, Thomas; Blaise, Didier; Fauriat, Cyril; Olive, Daniel (2014): Cancer-Induced Alterations of NK-Mediated Target Recognition: Current and Investigational Pharmacological Strategies Aiming at Restoring NK-Mediated Anti-Tumor Activity. In: *Frontiers in immunology* 5, S. 122. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00122.
- Christensen K, Doblhammer G, Rau R, Vaupel JW. Ageing populations: the challenges ahead. *Lancet*. 2009 Oct 3;374(9696):1196-208. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61460-4 Add to Citavi project by DOI. PMID: 19801098; PMCID: PMC2810516.
- Chung, Jun-Jae; Markiewicz, Mary A.; Polić, Bojan; Shaw, Andrey S. (2014): Role of NKG2D in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance. In: *PloS one* 9 (10), e110108. DOI: 10.1371/journal.pone.0110108.
- Colucci, Francesco; Traherne, James (2017): Killer-cell immunoglobulin-like receptors on the cusp of modern immunogenetics. In: *Immunology* 152 (4), S. 556–561. DOI: 10.1111/imm.12802.
- Cooper, M. A.; Fehniger, T. A.; Caligiuri, M. A. (2001): The biology of human natural killer-cell subsets. In: *Trends in immunology* 22 (11), S. 633–640.
- Crusz, Shanthini M.; Balkwill, Frances R. (2015): Inflammation and cancer: advances and new agents. In: *Nature reviews. Clinical oncology* 12 (10), S. 584–596. DOI: 10.1038/nrclinonc.2015.105.
- Daher, May; Rezvani, Katayoun (2018): Next generation natural killer cells for cancer immunotherapy: the promise of genetic engineering. In: *Current opinion in immunology* 51, S. 146–153. DOI: 10.1016/j.coi.2018.03.013.
- Dissen, Erik; Fossum, Sigbjørn; Hoelsbrekken, Sigurd E.; Saether, Per C. (2008): NK cell receptors in rodents and cattle. In: *Seminars in immunology* 20 (6), S. 369–375. DOI: 10.1016/j.smim.2008.09.007.
- R. Dobbs, C. Sawers, F. Thompson, J. Manyika, J. Woetzel, P. Child, S. McKenna, A. Spatharou (2014): How the World Could Better Fight Obesity, McKinseys & Company, http://www.mckinsey.com/insights/economic_studies/how_the_world_could_better_fight_obesity (aufgerufen am 11. Dezember 2020)

- Eagle, Robert A.; Flack, Gillian; Warford, Anthony; Martínez-Borra, Jesús; Jafferji, Insiya; Traherne, James A. et al. (2009): Cellular expression, trafficking, and function of two isoforms of human ULBP5/RAET1G. In: *PLoS one* 4 (2), e4503. DOI: 10.1371/journal.pone.0004503.
- Elishmereni M, Levi-Schaffer F. CD48: A co-stimulatory receptor of immunity. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011 Jan;43(1):25-8. DOI: 10.1016/j.biocel.2010.09.001. Epub 2010 Sep 15. PMID: 20833258
- Francisco V, Pino J, Campos-Cabaleiro V, Ruiz-Fernández C, Mera A, Gonzalez-Gay MA, Gómez R, Gualillo O. Obesity, Fat Mass and Immune System: Role for Leptin. *Front Physiol.* 2018 Jun 1;9:640. doi: 10.3389/fphys.2018.00640
- Frank B Hu. Obesity Epidemiology. New York: Oxford University Press, 2008, pp. 512. ISBN 978 0195312911. *International Journal of Epidemiology*, Volume 38, Pages 325–326,
- Gilbert, Candace A.; Slingerland, Joyce M. (2013): Cytokines, obesity, and cancer: new insights on mechanisms linking obesity to cancer risk and progression. In: *Annual review of medicine* 64, S. 45–57. DOI: 10.1146/annurev-med-121211-091527.
- Gordon, Scott M.; Chaix, Julie; Rupp, Levi J.; Wu, Junmin; Madera, Sharline; Sun, Joseph C. et al. (2012): The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation. In: *Immunity* 36 (1), S. 55–67. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.11.016.
- Guzik, Tomasz J.; Skiba, Dominik S.; Touyz, Rhian M.; Harrison, David G. (2017): The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. In: *Cardiovascular research* 113 (9), S. 1009–1023. DOI: 10.1093/cvr/cvx108.
- Hakimi, A. Ari; Furberg, Helena; Zabor, Emily C.; Jacobsen, Anders; Schultz, Nikolaus; Ciriello, Giovanni et al. (2013): An epidemiologic and genomic investigation into the obesity paradox in renal cell carcinoma. In: *Journal of the National Cancer Institute* 105 (24), S. 1862–1870. DOI: 10.1093/jnci/djt310.
- Hanahan, Douglas; Weinberg, Robert A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. In: *Cell* 144 (5), S. 646–674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hara, T.; Nishimura, H.; Hasegawa, Y.; Yoshikai, Y. (2001): Thymus-dependent modulation of Ly49 inhibitory receptor expression on NK1.1+ γ/δ T cells. In: *Immunology* 102 (1), S. 24–30. DOI: 10.1046/j.1365-2567.2001.01155.x.
- Harith, Hanis H.; Morris, Margaret J.; Kavurma, Mary M. (2013): On the TRAIL of obesity and diabetes. In: *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 24 (11), S. 578–587. DOI: 10.1016/j.tem.2013.07.001.
- Hjuler, K. F.; Gormsen, L. C.; Vendelbo, M. H.; Egeberg, A.; Nielsen, J.; Iversen, L. (2017): Increased global arterial and subcutaneous adipose tissue inflammation in patients with moderate-to-severe psoriasis. In: *The British journal of dermatology* 176 (3), S. 732–740. DOI: 10.1111/bjd.15149.
- Hörsten, Stephan von; Helfritz, Andreas; Kuhlmann, Susanne; Nave, Heike; Tschernig, Thomas; Pabst, Reinhard et al. (2000): Stereological quantification of carboxyfluorescein-labeled rat lung metastasis: a new method for the assessment of natural killer cell activity and tumor adhesion in vivo and in situ. In: *Journal of Immunological Methods* 239 (1-2), S. 25–34. DOI: 10.1016/S0022-1759(00)00162-9.
- Ibrahim, M. Mohsen (2010): Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. In: *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 11 (1), S. 11–18. DOI: 10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x.
- Imai, Kazue; Matsuyama, Satoru; Miyake, Satoshi; Suga, Kenji; Nakachi, Kei (2000): Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. In: *The Lancet* 356 (9244), S. 1795–1799. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)03231-1.

- Inngjerdengen, M.; Kveberg, L.; Naper, C.; Vaage, J. T. (2011): Natural killer cell subsets in man and rodents. In: *Tissue antigens* 78 (2), S. 81–88. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2011.01714.x.
- Intlekofer, Andrew M.; Takemoto, Naofumi; Wherry, E. John; Longworth, Sarah A.; Northrup, John T.; Palanivel, Vikram R. et al. (2005): Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. In: *Nature immunology* 6 (12), S. 1236–1244. DOI: 10.1038/ni1268.
- Kamiya, Takahiro; Seow, See Voon; Wong, Desmond; Robinson, Murray; Campana, Dario (2019): Blocking expression of inhibitory receptor NKG2A overcomes tumor resistance to NK cells. In: *The Journal of clinical investigation* 129 (5), S. 2094–2106. DOI: 10.1172/JCI123955.
- Karczewski, Jacek; Begier-Krasińska, Beata; Staszewski, Rafał; Popławska, Edyta; Gulczynska-Elhadi, Katarzyna; Dobrowolska, Agnieszka (2019): Obesity and the Risk of Gastrointestinal Cancers. In: *Digestive diseases and sciences*. DOI: 10.1007/s10620-019-05603-9.
- Kärre, K. (2002): NK cells, MHC class I molecules and the missing self. In: *Scandinavian journal of immunology* 55 (3), S. 221–228.
- Kasper, Dennis L.; Fauci, Anthony S.; Harrison, Tinsley Randolph (2016): *Harrisons Innere Medizin*. 19. Auflage. Hg. v. S. L. Hauser, D. L. Longo, J. Larry Jameson, J. L. Loscalzo, Norbert Suttrop, Martin Möckel, et al. New York, NY, Berlin, Stuttgart: McGraw-Hill Education; ABW Wissenschaftsverlag; Thieme. Online verfügbar unter https://eref.thieme.de/images/supmat/9783940615503_373.pdf, zuletzt geprüft am 14.05.2019.
- Keustermans, Genoveva; van der Heijden, Laila B.; Boer, Berlinda; Scholman, Rianne; Nuboer, Roos; Pasterkamp, Gerard et al. (2017): Differential adipokine receptor expression on circulating leukocyte subsets in lean and obese children. In: *PLoS one* 12 (10). DOI: 10.1371/journal.pone.0187068.
- Key, T. J.; Appleby, P. N.; Reeves, G. K.; Roddam, A.; Dorgan, J. F.; Longcope, C. et al. (2003): Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. In: *Journal of the National Cancer Institute* 95 (16), S. 1218–1226. DOI: 10.1093/jnci/djg022.
- Kim, Hye-Jung; Wang, Xuan; Radfar, Soroosh; Sproule, Thomas J.; Roopenian, Derry C.; Cantor, Harvey (2011): CD8+ T regulatory cells express the Ly49 Class I MHC receptor and are defective in autoimmune prone B6-Yaa mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (5), S. 2010–2015. DOI: 10.1073/pnas.1018974108.
- Kontny, Ewa; Prochorec-Sobieszek, Monika (2013): Articular adipose tissue resident macrophages in rheumatoid arthritis patients: potential contribution to local abnormalities. In: *Rheumatology (Oxford, England)* 52 (12), S. 2158–2167. DOI: 10.1093/rheumatology/ket287.
- Kruse, Philip H.; Matta, Jessica; Ugolini, Sophie; Vivier, Eric (2014): Natural cytotoxicity receptors and their ligands. In: *Immunology and cell biology* 92 (3), S. 221–229. DOI: 10.1038/icb.2013.98.
- Kyrgiou, Maria; Kalliala, Ilkka; Markozannes, Georgios; Gunter, Marc J.; Paraskevidis, Evangelos; Gabra, Hani et al. (2017): Adiposity and cancer at major anatomical sites: umbrella review of the literature. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 356, j477. DOI: 10.1136/bmj.j477.
- Lanier, Lewis L. (2008): Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. In: *Nature immunology* 9 (5), S. 495–502. DOI: 10.1038/ni1581.
- Larsen, Stine K.; Gao, Yanhua; Basse, Per H. (2014): NK Cells in the Tumor Microenvironment. In: *Critical reviews in oncogenesis* 19 (0), S. 91–105.
- Lauby-Secretan, Béatrice; Scoccianti, Chiara; Loomis, Dana; Grosse, Yann; Bianchini, Franca; Straif, Kurt (2016): Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. In: *The New England journal of medicine* 375 (8), S. 794–798. DOI: 10.1056/NEJMs1606602.

Laue T, Wrann CD, Hoffmann-Castendiek B, Pietsch D, Hübner L, Kielstein H. Altered NK cell function in obese healthy humans. *BMC Obes.* 2015 Jan 24;2:1. doi: 10.1186/s40608-014-0033-1 PMID: 26217516 Add to Citavi project by Pubmed ID; PMCID: PMC4511543.

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

Lee, Byung-Cheol; Kim, Myung-Sunny; Pae, Munkyong; Yamamoto, Yasuhiko; Eberlé, Delphine; Shimada, Takeshi et al. (2016): Adipose Natural Killer Cells Regulate Adipose Tissue Macrophages to Promote Insulin Resistance in Obesity. In: *Cell metabolism* 23 (4), S. 685–698. DOI: 10.1016/j.cmet.2016.03.002.

Lee, H., Na, W., Park, C. et al. Centrifugation-free extraction of circulating nucleic acids using immiscible liquid under vacuum pressure. *Sci Rep* 8, 5467 (2018).
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> (accessed November 16, 2021)

Lee, Yun Sok; Kim, Jung-whan; Osborne, Olivia; Oh, Da Young; Sasik, Roman; Schenk, Simon et al. (2014): Increased adipocyte O₂ consumption triggers HIF-1 α , causing inflammation and insulin resistance in obesity. In: *Cell* 157 (6), S. 1339–1352. DOI: 10.1016/j.cell.2014.05.012.

Leopoldo, A. S.; Lima-Leopoldo, A. P.; Nascimento, A. F.; Luvizotto, R. A. M.; Sugizaki, M. M.; Campos, D. H. S. et al. (2016): Classification of different degrees of adiposity in sedentary rats. In: *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 49 (4), e5028. DOI: 10.1590/1414-431X20155028.

Leung, Chi C.; Lam, Tai H.; Yew, Wing W.; Chan, Wai M.; Law, Wing S.; Tam, Cheuk M. (2011): Lower lung cancer mortality in obesity. In: *International journal of epidemiology* 40 (1), S. 174–182. DOI: 10.1093/ije/dyq134.

Liberale, Luca; Bonaventura, Aldo; Vecchiè, Alessandra; Casula, Matteo; Dallegri, Franco; Montecucco, Fabrizio; Carbone, Federico (2017): The Role of Adipocytokines in Coronary Atherosclerosis. In: *Current atherosclerosis reports* 19 (2), S. 10. DOI: 10.1007/s11883-017-0644-3.

Lips, Mirjam A.; van Klinken, Jan Bert; Pijl, Hanno; Janssen, Ignace; van Willems Dijk, Ko; Koning, Frits; van Harmelen, Vanessa (2016): Weight loss induced by very low calorie diet is associated with a more beneficial systemic inflammatory profile than by Roux-en-Y gastric bypass. In: *Metabolism: clinical and experimental* 65 (11), S. 1614–1620. DOI: 10.1016/j.metabol.2016.07.013.

Liu, E.; Tong, Y.; Dotti, G.; Shaim, H.; Savoldo, B.; Mukherjee, M. et al. (2018): Cord blood NK cells engineered to express IL-15 and a CD19-targeted CAR show long-term persistence and potent antitumor activity. In: *Leukemia* 32 (2), S. 520–531. DOI: 10.1038/leu.2017.226.

Lowe, Emily; Truscott, Laurel C.; Oliveira, Satiro N. de (2016): In Vitro Generation of Human NK Cells Expressing Chimeric Antigen Receptor Through Differentiation of Gene-Modified Hematopoietic Stem Cells. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1441, S. 241–251. DOI: 10.1007/978-1-4939-3684-7_20.

LUCAS, MICHAELA; KARRER, U. R.S.; LUCAS, ANDREW; KLENERMAN, PAUL (2001): Viral escape mechanisms – escapology taught by viruses. In: *International Journal of Experimental Pathology* 82 (5), S. 269–286. DOI: 10.1046/j.1365-2613.2001.00204.x.

Lysakova-Devine, Tatyana; O'Farrelly, Cliona (2014): Tissue-specific NK cell populations and their origin. In: *Journal of Leukocyte Biology* 96 (6), S. 981–990. DOI: 10.1189/jlb.1RU0514-241R.

- McNerney, Megan E.; Lee, Kyung-Mi; Kumar, Vinay (2005): 2B4 (CD244) is a non-MHC binding receptor with multiple functions on natural killer cells and CD8+ T cells. In: *Molecular immunology* 42 (4), S. 489–494. DOI: 10.1016/j.molimm.2004.07.032.
- Mokdad AH, Forouzanfar MH, Daoud F, Mokdad AA, El Bcheraoui C, Moradi-Lakeh M, Kyu HH, Barber RM, Wagner J, Cercy K, Kravitz H, Coggeshall M, Chew A, O'Rourke KF, Steiner C, Tuffaha M, Charara R, Al-Ghamdi EA, Adi Y, Afifi RA, Alahmadi H, AlBuhairan F, Allen N, AlMazroa M, Al-Nehmi AA, AlRayess Z, Arora M, Azzopardi P, Barroso C, Basulaiman M, Bhutta ZA, Bonell C, Breinbauer C, Degenhardt L, Denno D, Fang J, Fatusi A, Feigl AB, Kakuma R, Karam N, Kennedy E, Khoja TA, Maalouf F, Obermeyer CM, Mattoo A, McGovern T, Memish ZA, Mensah GA, Patel V, Petroni S, Reavley N, Zertuche DR, Saeedi M, Santelli J, Sawyer SM, Ssewamala F, Taiwo K, Tantawy M, Viner RM, Waldfoegel J, Zúñiga MP, Naghavi M, Wang H, Vos T, Lopez AD, Al Rabeeah AA, Patton GC, Murray CJ. Global burden of diseases, injuries, and risk factors for young people's health during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2016 Jun 11;387(10036):2383-401. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00648-6
- Moretta, Lorenzo; Montaldo, Elisa; Vacca, Paola; Del Zotto, Genny; Moretta, Francesca; Merli, Pietro et al. (2014): Human natural killer cells: origin, receptors, function, and clinical applications. In: *International archives of allergy and immunology* 164 (4), S. 253–264. DOI: 10.1159/000365632.
- Moulin, Cristiane Martins; Marguti, Ivo; Peron, Jean Pierre Schatzmann; Halpern, Alfredo; Rizzo, Luiz Vicente (2011): Bariatric Surgery Reverses Natural Killer (NK) Cell Activity and NK-Related Cytokine Synthesis Impairment Induced by Morbid Obesity. In: *OBES SURG* 21 (1), S. 112–118. DOI: 10.1007/s11695-010-0250-8.
- NCD Risk Factor Collaboration (2016): Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19·2 million participants. In: *The Lancet* 387 (10026), S. 1377–1396. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)30054-X.
- Nedergaard, Jan; Bengtsson, Tore; Cannon, Barbara (2007): Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 293 (2), E444-52. DOI: 10.1152/ajpendo.00691.2006.
- Nersesian, S., Glazebrook, H., Toulany, J., Grantham, S. R., & Boudreau, J. E. (2019). Naturally Killing the Silent Killer: NK Cell-Based Immunotherapy for Ovarian Cancer. *Frontiers in immunology*, 10, 1782. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01782>.
- Nimptsch, Katharina; Aleksandrova, Krasimira; Boeing, Heiner; Janke, Jürgen; Lee, Young-Ae; Jenab, Mazda et al. (2015): Association of CRP genetic variants with blood concentrations of C-reactive protein and colorectal cancer risk. In: *International journal of cancer* 136 (5), S. 1181–1192. DOI: 10.1002/ijc.29086.
- Nosalski, Ryszard; Guzik, Tomasz J. (2017): Perivascular adipose tissue inflammation in vascular disease. In: *British journal of pharmacology* 174 (20), S. 3496–3513. DOI: 10.1111/bph.13705.
- Novelli, E. L. B.; Diniz, Y. S.; Galhardi, C. M.; Ebaid, G. M. X.; Rodrigues, H. G.; Mani, F. et al. (2007): Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. In: *Laboratory animals* 41 (1), S. 111–119. DOI: 10.1258/002367707779399518.
- O'Rourke, Robert W.; Gaston, Garen D.; Meyer, Kevin A.; White, Ashley E.; Marks, Daniel L. (2013): Adipose tissue NK cells manifest an activated phenotype in human obesity. In: *Metabolism: clinical and experimental* 62 (11), S. 1557–1561. DOI: 10.1016/j.metabol.2013.07.011.
- Ortaldo, J. R.; Winkler-Pickett, R.; Mason, A. T.; Mason, L. H. (1998): The Ly-49 family: regulation of cytotoxicity and cytokine production in murine CD3+ cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 160 (3), S. 1158–1165.

- Park, Yikyung; Peterson, Lindsay L.; Colditz, Graham A. (2018): The Plausibility of Obesity Paradox in Cancer-Point. In: *Cancer research* 78 (8), S. 1898–1903. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3043.
- Pfaffl, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In: *Nucleic acids research* 29 (9), e45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45.
- Pikarsky, Eli; Porat, Rinnat M.; Stein, Ilan; Abramovitch, Rinat; Amit, Sharon; Kasem, Shafika et al. (2004): NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. In: *Nature* 431 (7007), S. 461–466. DOI: 10.1038/nature02924.
- Pugeat, M.; Crave, J. C.; Elmidani, M.; Nicolas, M. H.; Garoscio-Cholet, M.; Lejeune, H. et al. (1991): Pathophysiology of sex hormone binding globulin (SHBG): relation to insulin. In: *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 40 (4-6), S. 841–849.
- Radonić, Aleksandar; Thulke, Stefanie; Mackay, Ian M.; Landt, Olfert; Siegert, Wolfgang; Nitsche, Andreas (2004): Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313 (4), S. 856–862. DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.11.177.
- Rahim, Mir Munir A.; Tu, Megan M.; Mahmoud, Ahmad Bakur; Wight, Andrew; Abou-Samra, Elias; Lima, Patricia D. A.; Makrigiannis, Andrew P. (2014): Ly49 receptors: innate and adaptive immune paradigms. In: *Frontiers in immunology* 5, S. 145. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00145.
- Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:275-90. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.275 PMID: 11244038
- Reeves, Gillian K.; Pirie, Kirstin; Beral, Valerie; Green, Jane; Spencer, Elizabeth; Bull, Diana (2007): Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 335 (7630), S. 1134. DOI: 10.1136/bmj.39367.495995.AE.
- Reuter (2007): Diet-induced models for obesity and type 2 diabetes.
- Rezvani, Katayoun; Rouse, Rayne; Liu, Enli; Shpall, Elizabeth (2017): Engineering Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 25 (8), S. 1769–1781. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.06.012.
- Roddam, Andrew W.; Allen, Naomi E.; Appleby, Paul; Key, Timothy J. (2008): Endogenous sex hormones and prostate cancer: a collaborative analysis of 18 prospective studies. In: *Journal of the National Cancer Institute* 100 (3), S. 170–183. DOI: 10.1093/jnci/djm323.
- Saltiel, Alan R.; Olefsky, Jerrold M. (2017): Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. In: *The Journal of clinical investigation* 127 (1), S. 1–4. DOI: 10.1172/JCI92035.
- Schenkel, Alan Rowe; Kingry, Luke C.; Slayden, Richard A. (2013): The ly49 gene family. A brief guide to the nomenclature, genetics, and role in intracellular infection. In: *Frontiers in immunology* 4, S. 90. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00090.
- Scherer, Philipp E.; Hill, Joseph A. (2016): Obesity, Diabetes, and Cardiovascular Diseases: A Compendium. In: *Circulation research* 118 (11), S. 1703–1705. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308999.
- Schienkiewitz, Anja; Mensink, Gert B. M. (2017): Übergewicht und Adipositas bei Erwachsenen in Deutschland. DOI: 10.17886/RKI-GBE-2017-025.
- Scoville, Steven D.; Freud, Aharon G.; Caligiuri, Michael A. (2017): Modeling Human Natural Killer Cell Development in the Era of Innate Lymphoid Cells. In: *Frontiers in immunology* 8, S. 360. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00360.

- Shah, Nirav R.; Braverman, Eric R. (2012): Measuring adiposity in patients: the utility of body mass index (BMI), percent body fat, and leptin. In: *PloS one* 7 (4), e33308. DOI: 10.1371/journal.pone.0033308.
- Shi, Hang; Kokoeva, Maia V.; Inouye, Karen; Tzameli, Iphigenia; Yin, Huali; Flier, Jeffrey S. (2006): TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. In: *The Journal of clinical investigation* 116 (11), S. 3015–3025. DOI: 10.1172/JCI28898.
- Simonetta, Federico; Alvarez, Maite; Negrin, Robert S. (2017): Natural Killer Cells in Graft-versus-Host-Disease after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. In: *Frontiers in immunology* 8, S. 465. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00465.
- Spielmann J, Hanke J, Knauf D, Ben-Eliyahu S, Jacobs R, Stangl GI, Bähr I, Kielstein H. Significantly enhanced lung metastasis and reduced organ NK cell functions in diet-induced obese rats. *BMC Obes.* 2017 Jul 3;4:24. doi: 10.1186/s40608-017-0161-5. PMID: 28690853; PMCID: PMC5496225.
- Spits, Hergen; Artis, David; Colonna, Marco; Diefenbach, Andreas; Di Santo, James P.; Eberl, Gerard et al. (2013): Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. In: *Nature reviews. Immunology* 13 (2), S. 145–149. DOI: 10.1038/nri3365.
- Tchkonia, Tamara; Pirtskhalava, Tamar; Thomou, Thomas; Cartwright, Mark J.; Wise, Barton; Karagiannides, Iordanes et al. (2007): Increased TNF α and CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein with aging predispose preadipocytes to resist adipogenesis. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 293 (6), E1810-9. DOI: 10.1152/ajpendo.00295.2007.
- Tian, Zhigang; Sun, Rui; Wei, Haiming; Gao, Bin (2002): Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 298 (3), S. 297–302.
- To, Kelly; Agrotis, Alex; Besra, Gurdyal; Bobik, Alex; Toh, Ban-Hock (2009): NKT cell subsets mediate differential proatherogenic effects in ApoE $^{-/-}$ mice. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29 (5), S. 671–677. DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.182592.
- Tonn, Torsten; Schwabe, Dirk; Klingemann, Hans G.; Becker, Sven; Esser, Ruth; Koehl, Ulrike et al. (2013): Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. In: *Cytotherapy* 15 (12), S. 1563–1570. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.06.017.
- Tran, Thien T.; Naigamwalla, Dinaz; Oprescu, Andrei I.; Lam, Loretta; McKeown-Eyssen, Gail; Bruce, W. Robert; Giacca, Adria (2006): Hyperinsulinemia, but not other factors associated with insulin resistance, acutely enhances colorectal epithelial proliferation in vivo. In: *Endocrinology* 147 (4), S. 1830–1837. DOI: 10.1210/en.2005-1012.
- Vajdic, Claire M.; van Leeuwen, Marina T. (2009): Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. In: *International journal of cancer* 125 (8), S. 1747–1754. DOI: 10.1002/ijc.24439.
- van Kruijsdijk, Rob C. M.; van der Wall, Elsken; Visseren, Frank L. J. (2009): Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue. In: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 18 (10), S. 2569–2578. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0372.
- Vázquez-Vela, Maria Eugenia Frigolet; Torres, Nimbe; Tovar, Armando R. (2008): White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. In: *Archives of medical research* 39 (8), S. 715–728. DOI: 10.1016/j.arcmed.2008.09.005.

- Viel S, Besson L, Charrier E, Marçais A, Disse E, Bienvenu J, Walzer T, Dumontet C. Alteration of Natural Killer cell phenotype and function in obese individuals. *Clin Immunol.* 2017 Apr;177:12-17. doi: 10.1016/j.clim.2016.01.007.
- Visser, M.; Bouter, L. M.; McQuillan, G. M.; Wener, M. H.; Harris, T. B. (1999): Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. In: *JAMA* 282 (22), S. 2131–2135.
- Vitale M, Caligiuri MA, Sivori S. Editorial: Natural Killer Cells in Tissue Compartments. *Front Immunol.* 2020 Feb 20;11:258. doi: 10.3389/fimmu.2020.00258
- Wagner, Julia A.; Fehniger, Todd A. (2016): Human Adaptive Natural Killer Cells: Beyond NKG2C. In: *Trends in immunology* 37 (6), S. 351–353. DOI: 10.1016/j.it.2016.05.001.
- Weltgesundheitsorganisation (WHO) (2000): Obesity. Preventing and managing the global epidemic ; report of a WHO consultation. Geneva: World Health Organization (WHO technical report series, 894).
- Weltgesundheitsorganisation (WHO) (Hg.) (2018): Obesity and Overweight, Fact sheet. Online verfügbar unter <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
- Wensveen, Felix M.; Jelenčić, Vedrana; Valentić, Sonja; Šestan, Marko; Wensveen, Tamara Turk; Theurich, Sebastian et al. (2015): NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. In: *Nature immunology* 16 (4), S. 376–385. DOI: 10.1038/ni.3120.
- Westgaard, I. H.; Berg, S. F.; Orstavik, S.; Fossum, S.; Dissen, E. (1998): Identification of a human member of the Ly-49 multigene family.
- Wrann, Christiane D.; Laue, Tobias; Hübner, Lena; Kuhlmann, Susanne; Jacobs, Roland; Goudeva, Lilia; Nave, Heike (2012): Short-term and long-term leptin exposure differentially affect human natural killer cell immune functions. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 302 (1), E108-16. DOI: 10.1152/ajpendo.00057.2011.
- Xu, Haiyan; Barnes, Glenn T.; Yang, Qing; Tan, Guo; Yang, Daseng; Chou, Chieh J. et al. (2003): Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. In: *The Journal of clinical investigation* 112 (12), S. 1821–1830. DOI: 10.1172/JCI19451.
- Zeyda, Maximilian; Stulnig, Thomas M. (2009): Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review. In: *Gerontology* 55 (4), S. 379–386. DOI: 10.1159/000212758.
- Zhou, Fang (2009): Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. In: *International reviews of immunology* 28 (3-4), S. 239–260. DOI: 10.1080/08830180902978120.

8. Thesen

1. Adipöse Menschen besitzen im Vergleich zu normalgewichtigen Menschen ein höheres Risiko an bestimmten Krebsentitäten wie dem kolorektalen Karzinom und dem Mammakarzinom zu erkranken.
2. Eine veränderte Rezeptor-Expression der NK-Zellen korreliert mit der Entzündungsaktivität eines Gewebes.
3. Die mRNA-Expression aktivierender NK-Zellrezeptoren im Fettgewebe adipöser Ratten ist signifikant niedriger als bei normalgewichtigen Ratten, während die mRNA-Expression inhibierender NK-Zellrezeptoren im Fettgewebe adipöser Ratten im Vergleich zu normalgewichtigen Ratten signifikant höher ist.
4. Der Effekt einer Hoch-Fett-Diät beeinflusst die mRNA-Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen, Liganden und Transkriptionsfaktoren im Fettgewebe adipöser Ratten im Vergleich zu normalgewichtigen Ratten.
5. Eine veränderte Rezeptorexpression von NK-Zellen im Fettgewebe und eine damit einhergehende veränderte Funktionalität der NK-Zellen beeinflusst die Manifestation von Malignomen wie dem kolorektalen Karzinom und dem Metastasierungsprozess neoplastischer Zellen wie bei dem Mammakarzinom.
6. NK-Zellen als Effektorzellen mit Einfluss auf die Entstehung und Metastasierung neoplastischer Zellen besitzen das Potential zur Anwendung in der modernen Krebsimmuntherapie.

Anlagen

Tabelle 1: Relative mRNA-Konzentration der aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren NKp46 (NCR1) und NKp30 (NCR3) im Fettgewebe 15 min und 21 Tage nach i.v.-Injektion mit MADB106-Zellen oder NaCl.

	Relative mRNA-Konzentration				Two-Way ANOVA		
	Ko/NaCl	Ko/Tumor	HFD/NaCl	HFD/Tumor	p-Werte		
Kurzzzeitversuch (15 min nach i.v.-Injektion)							
Aktivierende Rezeptoren							
NKp46 (NCR1)	1 ± 0,18	0,82 ± 0,26	0,86 ± 0,22	1,49 ± 0,39	0,34	0,41	0,15
NKp30 (NCR3)	1 ± 0,15	1 ± 0,15	1,47 ± 0,25	1,1 ± 0,09	0,1 [#]	0,29	0,28
Langzeitversuch (21 Tage nach i.v.-Injektion)							
NKp46 (NCR1)	1 ± 0,18	0,84 ± 0,2	0,82 ± 0,1	0,95 ± 0,1	0,84	0,95	0,4
NKp30 (NCR3)	1 ± 0,1	0,75 ± 0,09	0,85 ± 0,06	0,9 ± 0,1	0,83	0,43	0,13

One-way ANOVA: MW ± SEM, n=8 Ratten/Gruppe; **Two-way ANOVA:** Es sind die p-Werte für die Einflussfaktoren Diät (HFD), MADB106-Zellen (Tumor) und Interaktion aufgeführt (*=p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,01; # = p ≤ 0,1)

Tabelle 2: Relative mRNA-Konzentration der Killerzellen-лектинähnlichen-Rezeptoren (KLR) und der Rezeptor-Subfamilie A (Ly49) im Fettgewebe 15 min und 21 Tage nach i.v.-Injektion mit MADB106-Zellen oder NaCl.

	Relative mRNA-Konzentration				Two-Way ANOVA		
	Ko/NaCl	Ko/Tumor	HFD/NaCl	HFD/Tumor	p-Werte		
Kurzzzeitversuch (15 min nach i.v.-Injektion)							
Aktivierende Rezeptoren							
Klra22(Ly49s2)	0,68 ± 0,04	0,71 ± 0,14	0,8 ± 0,11	0,87 ± 0,08	0,21	0,67	0,88
Klrc1 (NKG2A)	1 ± 0,14	0,87 ± 0,17	1,4 ± 0,27	1,69 ± 0,3	0,014*	0,72	0,37
Klrk1 (NKG2D)	1 ± 0,26	0,69 ± 0,2	0,56 ± 0,15	1,07 ± 0,29	0,89	0,65	0,09 [#]
Ly49s4	1 ± 0,19	0,86 ± 0,22	1,53 ± 0,39	1,21 ± 0,2	0,10 [#]	0,4	0,72
Ly49s5	1 ± 0,15	0,92 ± 0,17	1,08 ± 0,16	1,14 ± 0,16	0,37	0,95	0,7
Ly49s6	1 ± 0,18	0,91 ± 0,15	2,11 ± 0,95	1,25 ± 0,26	0,16	0,36	0,45
Ly49s7	1 ± 0,13	0,66 ± 0,14	0,82 ± 0,24	0,96 ± 0,21	0,74	0,61	0,21
Inhibierende Rezeptoren							
Klra1 (Ly49b)	1 ± 0,15	0,82 ± 0,2	0,96 ± 0,07	1,37 ± 0,08	0,07 [#]	0,41	0,04*
Klrd1	1 ± 0,18	0,94 ± 0,19	1,23 ± 0,19	1,52 ± 0,23	0,057 [#]	0,57	0,4
Ly49i4	1 ± 0,12	0,79 ± 0,11	1,06 ± 0,12	1,43 ± 0,28	0,05 [#]	0,63	0,11
Ly49i5	1 ± 0,15	0,88 ± 0,13	1,24 ± 0,18	1,43 ± 0,26	0,05 [#]	0,85	0,44
Ly49i6	1 ± 0,11	0,87 ± 0,2	1,45 ± 0,144	2,46 ± 0,45	0,0008***	0,11	0,04*
Langzeitversuch (21 Tage nach i.v.-Injektion)							
Aktivierende Rezeptoren							
Klra22(Ly49s2)	1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,58 ± 0,03	0,52 ± 0,09	0,002**	0,51	0,87

Klrc1 (NKG2A)	1 ± 0,1	1,29 ± 0,27	1,18 ± 0,25	0,89 ± 0,08	0,59	0,99	0,15
Klrk1 (NKG2D)	1 ± 0,25	0,72 ± 0,19	0,68 ± 0,13	0,79 ± 0,17	0,55	0,67	0,35
Ly49s4	1 ± 0,24	0,65 ± 0,14	0,57 ± 0,06	0,54 ± 0,07	0,08 [#]	0,23	0,32
Ly49s5	1 ± 0,14	0,84 ± 0,12	0,84 ± 0,12	0,71 ± 0,11	0,27	0,28	0,91
Ly49s6	1 ± 0,15	0,98 ± 0,18	0,76 ± 0,06	0,72 ± 0,08	0,08 [#]	0,81	0,93
Ly49s7	1 ± 0,13	0,59 ± 0,11	0,74 ± 0,14	0,65 ± 0,08	0,42	0,051	0,22
Inhibierende Rezeptoren							
Klra1 (Ly49b)	1 ± 0,15	0,79 ± 0,08	0,88 ± 0,15	0,86 ± 0,1	0,84	0,39	0,49
Klrk1	1 ± 0,2	0,85 ± 0,1	0,84 ± 0,1	0,62 ± 0,05	0,17	0,19	0,77
Ly49i4	1 ± 0,17	0,67 ± 0,09	0,59 ± 0,04	0,7 ± 0,11	0,12	0,36	0,08 [#]
Ly49i5	1 ± 0,17	0,86 ± 0,09	0,64 ± 0,04	0,66 ± 0,1	0,02*	0,62	0,54
Ly49i6	1 ± 0,13	0,88 ± 0,14	0,91 ± 0,08	1,02 ± 0,18	0,86	0,98	0,44

One-way ANOVA: MW ± SEM, n=8 Ratten/Gruppe; **Two-way ANOVA:** Es sind die p-Werte für die Einflussfaktoren Diät (HFD), MADB106-Zellen (Tumor) und Interaktion aufgeführt (*=p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,01; # = p ≤ 0,1)

Tabelle 3: Relative mRNA-Konzentration des aktivierenden NK-Zell-Rezeptors 2B4 (CD244), des Zytokins TNF-α, des Liganden Tnfsf10 und der Transkriptionsfaktoren Tbx21 (T-bet) und Eomesodermin (Tbr2) im Fettgewebe 15 min und 21 Tage nach i.v.-Injektion mit MADB106-Zellen oder NaCl.

	Relative mRNA-Konzentration				Two-Way ANOVA p-Werte		
	Ko/NaCl	Ko/Tumor	HFD/NaCl	HFD/Tumor	HFD	Tumor	Interaction
Kurzzzeitversuch (15 min nach i.v.-Injektion)							
2B4 (CD244)	1 ± 0,17	0,7 ± 0,14	1,2 ± 0,11	1,29 ± 0,21	0,02*	0,56	0,25
TNF-α	1 ± 0,16	1,32 ± 0,25	2,04 ± 0,31	1,92 ± 0,22	0,002**	0,68	0,36
Tnfsf10	1 ± 0,22	0,83 ± 0,15	1,61 ± 0,25	1,49 ± 0,2	0,007**	0,51	0,92
Tbx21 (T-bet)	1 ± 0,13	1,12 ± 0,21	1,42 ± 0,12	1,78 ± 0,24	0,0066**	0,2	0,53
Eomesodermin (Tbr2)	1 ± 0,1	0,93 ± 0,15	1,13 ± 0,07	1,24 ± 0,14	0,09 [#]	0,83	0,49
Langzeitversuch (21 Tage nach i.v.-Injektion)							
2B4 (CD244)	1 ± 0,1	0,91 ± 0,15	1,04 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,39	0,93	0,58
TNF-α	1 ± 0,13	1,04 ± 0,12	1,23 ± 0,15	0,92 ± 0,12	0,63	0,32	0,19
Tnfsf10	1 ± 0,14	0,69 ± 0,06	0,83 ± 0,06	0,95 ± 0,05	0,6	0,35	0,02*
Tbx21 (T-bet)	1 ± 0,1	0,92 ± 0,15	1,15 ± 0,15	1,01 ± 0,09	0,39	0,46	0,83
Eomesodermin (Tbr2)	1 ± 0,1	1,05 ± 0,09	0,76 ± 0,09	0,93 ± 0,11	0,12	0,31	0,58

One-way ANOVA: MW ± SEM, n=8 Ratten/Gruppe; **Two-way ANOVA:** Es sind die p-Werte für die Einflussfaktoren Diät (HFD), MADB106-Zellen (Tumor) und Interaktion aufgeführt (*=p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,01; # = p ≤ 0,1)

Tabelle 4: Relative mRNA-Konzentration der aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren NKp46 (NCR1) und NKp30 (NCR3) im Fettgewebe der Versuchstiere aus dem Ratten-Tumor-Modell mit Azoxymethan.

	Relative mRNA-Konzentration				Two-Way ANOVA		
	Ko/NaCl	Ko/Tumor	HFD/NaCl	HFD/Tumor	p-Werte		
					HFD	Tumor	Interaction
Aktivierende Rezeptoren							
NKp46 (NCR1)	1,09 ± 0,36	1,08 ± 0,24	1,3 ± 0,36	3,59 ± 1,5	0,06 [#]	0,12	0,12
NKp30 (NCR3)	1 ± 0,1	1,25 ± 0,1	1,24 ± 0,1	1,37 ± 0,3	0,29	0,25	0,72

One-way ANOVA: MW ± SEM, Ratten/Gruppe: Ko/NaCl = 13, Ko/Tumor = 12, HFD/NaCl = 14, HFD/Tumor = 11; **Two-way ANOVA:** Es sind die p-Werte für die Einflussfaktoren Diät (HFD), MADB106-Zellen (Tumor) und Interaktion aufgeführt (*=p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,01; # = p ≤ 0,1)

Tabelle 5: Relative mRNA-Konzentration der Killerzellen-лектинähnlichen-Rezeptoren (KLR) und der Rezeptor-Subfamilie A (Ly49) im Fettgewebe der Versuchstiere aus dem Ratten-Tumor-Modell mit Azoxymethan.

	Relative mRNA-Konzentration				Two-Way ANOVA		
	Ko/NaCl	Ko/Tumor	HFD/NaCl	HFD/Tumor	p-Werte		
					HFD	Tumor	Interaction
Aktivierende Rezeptoren							
Klra22(Ly49s2)	1 ± 0,26	1,17 ± 0,23	0,68 ± 0,17	2,72 ± 0,97	0,21	0,02*	0,06*
Klrc1 (NKG2A)	1,09 ± 0,21	1,22 ± 0,21	1,32 ± 0,24	1,71 ± 0,43	0,21	0,36	0,64
Klrc1 (NKG2D)	1 ± 0,3	0,85 ± 0,16	0,19 ± 0,03	0,57 ± 0,1	0,025*	0,61	0,26
Ly49s4	0,69 ± 0,16	0,73 ± 0,16	1,41 ± 0,37	0,7 ± 0,27	0,21	0,22	0,18
Ly49s5	0,83 ± 0,1	0,66 ± 0,1	1,17 ± 0,2	0,93 ± 0,23	0,09 [#]	0,26	0,84
Ly49s6	1 ± 0,2	1,66 ± 0,4	0,81 ± 0,1	0,94 ± 0,17	0,14	0,2	0,39
Ly49s7	0,33 ± 0,06	0,27 ± 0,03	0,4 ± 0,07	0,33 ± 0,1	0,41	0,39	0,91
Inhibierende Rezeptoren							
Klra1 (Ly49b)	1 ± 0,3	1,24 ± 0,3	0,98 ± 0,2	0,34 ± 0,1	0,1 [#]	0,47	0,11
Klrd1	1 ± 0,2	0,86 ± 0,15	1,15 ± 0,2	0,98 ± 0,2	0,48	0,43	0,92
Ly49i4	0,83 ± 0,2	2,36 ± 0,6	1,93 ± 0,56	0,82 ± 0,27	0,66	0,69	0,01*
Ly49i5	1 ± 0,17	1,56 ± 0,35	1,39 ± 0,27	1,45 ± 0,36	0,63	0,3	0,93
Ly49i6	0,67 ± 0,2	1,4 ± 0,6	1 ± 0,2	0,83 ± 0,3	0,77	0,48	0,26

One-way ANOVA: MW ± SEM, Ratten/Gruppe: Ko/NaCl = 13, Ko/Tumor = 12, HFD/NaCl = 14, HFD/Tumor = 11; **Two-way ANOVA:** Es sind die p-Werte für die Einflussfaktoren Diät (HFD), MADB106-Zellen (Tumor) und Interaktion aufgeführt (*=p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,01; # = p ≤ 0,1)

Tabelle 6: Relative mRNA-Konzentration des aktivierenden NK-Zell-Rezeptors 2B4 (CD244), des Zytokins TNF- α , des Liganden Tnfsf10 und der Transkriptionsfaktoren Tbx21 (T-bet) und Eomesodermin (Tbr2) im Fettgewebe der Versuchstiere aus dem Ratten-Tumor-Modell mit Azoxymethan.

	Relative mRNA-Konzentration				Two-Way ANOVA p-Werte		
	Ko/NaCl	Ko/Tumor	HFD/NaCl	HFD/Tumor	HFD	Tumor	Interaction
2B4 (CD244)	1 \pm 0,2	0,99 \pm 0,13	1,17 \pm 0,16	1 \pm 0,09	0,61	0,61	0,63
TNF- α	0,84 \pm 0,07	1 \pm 0,08	0,96 \pm 0,13	1,08 \pm 0,14	0,38	0,23	0,82
Tnfsf10	1 \pm 0,1	1,52 \pm 0,2	1,75 \pm 0,18	1,7 \pm 0,4	0,04*	0,27	0,26
Tbx21 (T-bet)	1 \pm 0,31	1,24 \pm 0,4	2,58 \pm 0,66	1,29 \pm 0,41	0,1 [#]	0,29	0,12
Eomesodermin (Tbr2)	1 \pm 0,16	1,13 \pm 0,27	0,77 \pm 0,14	0,94 \pm 0,2	0,3	0,45	0,92

One-way ANOVA: MW \pm SEM, Ratten/Gruppe: Ko/NaCl = 13, Ko/Tumor = 12, HFD/NaCl = 14, HFD/Tumor = 11; **Two-way ANOVA:** Es sind die p-Werte für die Einflussfaktoren Diät (HFD), MADB106-Zellen (Tumor) und Interaktion aufgeführt (*=p \leq 0,05; ** = p \leq 0,01; # = p \leq 0,1)

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel: „Untersuchungen zur Expression spezifischer NK-Zell-Rezeptoren im Fettgewebe normalgewichtiger und Diät-induziert adipöser Versuchstiere“, selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen benutzt habe. Die wörtlich oder dem Sinn nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit ist bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungskommission vorgelegt oder veröffentlicht worden.

Halle (Saale), den 01.12.2021

Khaled Zubaidi

Erklärung über frühere Promotionsversuche

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

Halle (Saale), den 01.12.2021

Khaled Zubaidi

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir bei der Realisierung und Verfassung dieser Arbeit zur Seite standen.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei der Leiterin des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und der Betreuerin meiner Promotionsarbeit Frau Prof. Dr. Heike Kielstein für die Aufnahme als Doktorand, die Überlassung des interessanten Promotionsthemas und die Möglichkeit, die Promotion in ihrer Arbeitsgruppe im Institut durchführen zu dürfen. Dabei gilt ein besonderer Dank für ihre stetige Unterstützung. Es war tatsächlich ein Privileg, von solch einer sowohl fachlich als auch zwischenmenschlich herausragenden Dozentin betreut werden zu dürfen.

Große Dankbarkeit empfinde ich insbesondere Frau Dr. Julia Spielmann und Frau Dr. Ina Bähr gegenüber. Nicht nur dafür, dass sie mir die Fettgewebssproben aus ihren Tiermodellen zur Vergütung gestellt haben, sondern auch für die unvergleichbare fachliche Expertise, die ich von ihnen erhalten durfte. Ich bedanke mich für die zielführende Beratung, die vielen konstruktiven Gespräche, die große Menge an Zeit und Geduld sowie die besonders freundliche und respektvolle Zusammenarbeit. Ich hätte mir keine besseren Mitbetreuerinnen für meine Arbeit vorstellen können.

Ein weiteres Dankeschön gebührt Frau Susann Möschter, die mich in diverse Laborarbeiten eingearbeitet und mich bei der Umsetzung der Methodik unterstützt hat. Natürlich möchte ich auch Frau Franziska Knöfel für ihre freundliche Hilfsbereitschaft im Labor danken.

Meinen Eltern Walid und Christa Zubaidi möchte ich dafür danken, dass sie sämtliche Mittel und Kräfte in meine Bildung investierten und es ermöglichten, dass ich mein Studium in Deutschland aufnehmen konnte und damit die Anfertigung dieser Arbeit überhaupt möglich war.

Von ganzem Herzen danke ich Lisa Rieger für ihre liebevolle Unterstützung und für so vieles mehr...