

# **Modulation der Immunfunktion durch eine Fettmassereduktion bei Menschen mit Adipositas**

Dissertation  
zur Erlangung des  
Doktorgrades der Ernährungswissenschaften (Dr. troph.)

Der

Naturwissenschaftlichen Fakultät III  
Agrar- und Ernährungswissenschaften,  
Geowissenschaften und Informatik

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt von

Diplom-Ernährungswissenschaftlerin Janine Jahn  
geb. am 15.11.1986 in Schkeuditz

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. Gabriele I. Stangl
2. Prof. Dr. Heike Kielstein
3. Prof. Dr. Matthias Blüher

Verteidigung am: 07.11.2016

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>II</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Adipositas .....	1
1.2 Adipositas-assoziierte Erkrankungen .....	1
1.3 Immunsystem .....	1
1.4 Natürliche Killerzellen .....	2
1.4.1 Subpopulationen der NK-Zellen .....	2
1.4.2 Missing-Self-Hypothese.....	3
1.4.3 Zytotoxizität der NK-Zelle .....	4
1.4.4 Natürliche Zytotoxizität - ein Killer greift an .....	4
1.4.5 Das natürliche Equipment einer Killerzelle.....	4
Interferon- $\gamma$ .....	4
Granzym A .....	5
TRAIL .....	5
1.5 Adipokine .....	6
1.5.1 Leptin .....	6
Leptin-Signalweg.....	7
1.5.2 Resistin .....	8
1.5.3 MCP-1.....	8
1.6 Adipositas – eine chronische Entzündung .....	9
1.7 Modulation des Immunsystems.....	9
1.7.1 Gewichtsreduktion und NK-Zellen.....	10
1.8 Zielstellungen .....	11
<b>2 Material .....</b>	<b>12</b>
2.1 Chemikalien und Reagenzien .....	12
2.2 Zubehör und Geräte .....	13
2.3 Verwendete Kits .....	13
2.4 Verwendete Analysensoftware .....	13

<b>3 Methoden</b> .....	<b>14</b>
3.1 Studienpopulation.....	14
3.2 Intervention.....	14
3.3 Anthropometrische und physiologische Messungen.....	15
3.3.1 Taillen- und Hüftumfang.....	15
3.3.2 Körperzusammensetzung.....	15
3.3.3 Physical Working Capacity (PWC)-Test.....	16
3.3.4 Relative maximale Leistungsfähigkeit.....	17
3.3.5 Relative maximale Sauerstoffaufnahme.....	17
3.3.6 Blutprobenentnahme.....	17
3.3.7 Analyse von Glucose, Triglyceriden und Cholesterin.....	17
Glucosebestimmung.....	17
Triglyceridbestimmung.....	18
Cholesterinbestimmung.....	18
3.4 Gewinnung von peripheral blood mononuclear cells (PBMC).....	19
3.5 Durchflusszytometrische Analyse.....	19
3.6 Analyse von Plasma Adipokinen und Zytokinen.....	20
3.6.1 Prinzip.....	21
3.6.2 Versuchsdurchführung.....	22
3.7 Proteinisolation.....	23
3.8 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	23
3.9 Western Blot.....	24
3.9.1 Benötigte Puffer und Substanzen:.....	24
3.10 Zelllinien und Kultivierung.....	27
3.11 NK-Zell vermittelter Zytotoxizitätsassay.....	27
3.11.1 Versuchsdurchführung.....	28
3.12 Statistische Auswertungen.....	29
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>30</b>
4.1 Studienpopulation, anthropometrische und metabolische Parameter.....	30
4.2 Parameter der körperlichen Leistungsfähigkeit.....	32
4.3 Veränderungen der PBMC-Populationen.....	33

4.3.1	Messung verschiedener PBMC-Populationen im Durchflusszytometer.....	33
4.3.2	Graphische Darstellung der Veränderungen der PBMC-Populationen.....	36
4.4	Einfluss der Intervention auf NK-Zellen.....	37
4.4.1	Messung der NK-Zell-Populationen im Durchflusszytometer.....	37
4.4.2	Graphische Darstellung der Veränderungen der NK-Zell-Populationen .....	42
4.5	Adipokin-Spiegel nach Gewichtsverlust .....	46
4.6	Leptin-Signalweg .....	48
4.7	NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität nach Leptin-Stimulation.....	50
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>51</b>
5.1	Anthropometrische und physiologische Parameter.....	51
5.2	Sportliche Parameter .....	52
5.3	Zelluläre Veränderungen .....	52
5.4	Leptin und Resistin .....	55
5.5	NK-Zell-Zytotoxizität .....	56
5.6	Ausblick .....	56
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>60</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>XXI</b>
	<b>Publikationsverzeichnis.....</b>	<b>XXII</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>XXIII</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>XXIV</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADCC	<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i> ; Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität
Ak	Antikörper
AMA	<i>American Medical Association</i>
APC	<i>antigen-presenting cells</i> ; Antigen-präsentierende Zellen
BATDA	Bis(Acetoxymethyl) 2,2':6',2''-Terpyridin-6,6''-Dicarboxylat
BCA	bicinchonic acid; Bicinchoninsäure
BCM	<i>Body cell mass</i> ; Körperzellmasse
BF	<i>Body fat</i> ; Körperfett
BIA	Bioelektrische Impedanzanalyse
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL2	CC-Chemokin-Ligand-2
CRP	C-reaktives Protein
CTL	<i>cytotoxic T lymphocytes</i> ; zytotoxische T-Lymphozyten
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
ECM	<i>Extra cell mass</i> ; extrazelluläre Masse
EKG	Elektrokardiogramm
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i> ; extrazellulär Signal-regulierte Kinase 1/2
FasL	Fas Ligand
FKS	Fetales Kälberserum
HDL	High Density Lipoprotein
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> ; Meerrettichperoxidase
IL	Interleukin
IS	immunologische Synapse
JAK2	Janus Kinase 2
KIR1	<i>Inhibitory Killer Ig-like Receptor</i>
LBM	<i>Lean body mass</i> ; Magermasse
LDL	Low Density Lipoprotein
LFA-1	<i>Leukocyte Function-Associated Antigen 1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i> ; Monocyte Chemoattractant Protein 1
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> ; Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
MPO	Myeloperoxidase

MTOC	<i>Microtubule Organizing Center</i> ; Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
NKG2D	<i>Natural Killer Group 2, member D</i>
NKZA	Natürliche Killerzell-Aktivität
ob	<i>obese</i> ; adipös
Ob-R	Leptin-Rezeptor
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i> ; Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
OPG	Osteoprotegerin
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> ; mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PE	Phycoerithrin
PFA	Paraformaldehyd
pJAK2	phosphoryliertes JAK2
pSTAT3	phosphoryliertes STAT3
PWC	<i>Physical Working Capacity</i> ; körperliche Leistungsfähigkeit
R	Resistance
RDB	Reagent Dilution Buffer
ROS	<i>reactive oxygen species</i> ; radikale Sauerstoffspezies
sCD40L	<i>soluble CD40 Ligand</i>
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gel Elektrophorese
SEM	<i>standard error of the mean</i> ; Standardfehler
sICAM-1	<i>soluble Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
STAT3	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription 3</i>
sTNF-R	<i>soluble TNF-Receptor</i>
Tab.	Tabelle
TDA	2,2':6',2"-Terpyridin-6,6"-Dicarboxylsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i> ; TNF-verwandter Apoptose-induzierender Ligand
TRAILR1, 2, 3, 4	TRAIL Rezeptor-1, -2, -3, -4
URTI	<i>Upper Respiratory Tract Infection</i> ; Infektionen der oberen Atemwege
VO <sub>2 max</sub>	maximale Sauerstoffaufnahme
W	Watt
WHO	<i>World Health Organisation</i> ; Weltgesundheitsorganisation
WHR	<i>Waist-Hip-Ratio</i> ; Taillen-Hüftumfang-Verhältnis
WR	<i>Working Reagent</i> ; Arbeitslösung
Xc	Reactance

Fremdsprachige Begriffe sind *kursiv* gedruckt.

# 1 Einleitung

## 1.1 Adipositas

Der Begriff Adipositas stammt vom lateinischen Wort „*adeps*“ und bedeutet übersetzt „*fett*“. Die Adipositas wird auch als Fettleibigkeit, umgangssprachlich sogar als Fettsucht bezeichnet. Sie entsteht durch ein Ungleichgewicht zwischen Energieaufnahme und Energieverbrauch, sodass ein starkes Übergewicht mit einem hohen Körperfettgehalt resultiert. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat die Adipositas mit einem Body-Mass-Index (BMI) von  $\geq 30 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$  festgelegt (World Health Organization 2000), wobei der BMI als Quotient aus Körpergewicht (kg) und Körpergröße zum Quadrat ( $\text{m}^2$ ) berechnet wird. Normalgewicht ist mit einem BMI von  $\leq 24,9 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$  und Übergewicht oder auch Präadipositas mit einem BMI von  $25 - 29,9 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$  klassifiziert. Die Adipositas selbst wird in drei verschiedene Grade eingeteilt: Adipositas Grad I bei einem BMI von  $30 - 34,9 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$ , Adipositas Grad II von  $35 - 39,9 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$  und Adipositas Grad III ab einem BMI von  $\geq 40 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$  (World Health Organization 2000). In den letzten 30 Jahren ist die Prävalenz des Übergewichts und der Adipositas stetig angestiegen, die weltweite Adipositas hat sich seitdem verdoppelt und ist nun zu einem weltweiten Gesundheitsproblem avanciert (World Health Organization Updated January 2015). Die Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (*Organization for Economic Co-operation and Development*; OECD) beschreibt in ihrem *OECD Factbook*, dass mehr als die Hälfte (53%) der Erwachsenen in den OECD Ländern (u.a. Deutschland, Vereinigtes Königreich, USA, Australien, Japan) übergewichtig oder adipös sind; allein in den USA sind 35,9% der Bevölkerung adipös (OECD 2013). Jedoch betrifft die Adipositas-Epidemie nicht nur Wohlstandsländer, sondern auch immer mehr ärmere Entwicklungsländer (Dinsa *et al.*, 2012). Die American Medical Association (AMA) hat schließlich im Jahr 2013 die Adipositas als einen Krankheitszustand mit multiplem pathophysiologischem Hintergrund definiert (American Medical Association 2013).

## 1.2 Adipositas-assoziierte Erkrankungen

Die WHO gibt an, dass jährlich mindestens 2,8 Millionen Menschen aufgrund von Adipositas oder Übergewicht sterben (World Health Organization 2010). Adipositas ist mit einer Reihe von Krankheiten assoziiert. Dazu zählen Typ II Diabetes mellitus, Dyslipidämie, Hypertonie sowie kardiovaskuläre Herzerkrankungen (Wilson *et al.*, 2002; Wilding 2014). Außerdem steigt bei einem erhöhten BMI das Risiko verschiedene Krebserkrankungen zu erleiden (wie z.B. Kolon-, Nieren-, Prostata- und postmenopausales Mamma-Karzinom), die Anfälligkeit für Infektionen steigt sowie die Gesamt mortalität (Lamas *et al.*, 2002; Katzmarzyk *et al.*, 2012). Statistisch betrachtet ist die Lebenserwartung einer adipösen Person mit einem BMI von  $40\text{-}45 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$  um 8-10 Jahre vermindert im Vergleich zu einer normal-gewichtigen Person (OECD 2010).

## 1.3 Immunsystem

Das humane Immunsystem besteht aus dem erworbenen, spezifischen und dem angeborenen, unspezifischen Immunsystem. Zum erworbenen Immunsystem gehört die zelluläre Abwehr in Form

von T-Lymphozyten und die humorale Abwehr mit den B-Lymphozyten bzw. den reifen, Antikörperproduzierenden Plasmazellen. Das angeborene Immunsystem erkennt Pathogene ohne vorherige Sensibilisierung und bekämpft diese mit Hilfe von physischen, humoralen und zellulären Barrieren. Zu ihm zählen Granulozyten, Monozyten bzw. Makrophagen, Natürliche Killer (NK)-Zellen und dendritische Zellen.

## 1.4 Natürliche Killerzellen

NK-Zellen sind ein zentraler Bestandteil der angeborenen Immunantwort und gehören zur Untergruppe der Lymphozyten, wobei ihr Anteil im peripheren Blut ca. 10-15% beträgt. Die Arbeitsgruppen um Herberman und Holden entdeckten NK-Zellen im Jahr 1978 während Studien zur zellvermittelten Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen (Herberman und Holden 1978). NK-Zellen produzieren neben zytolytischer Granula auch verschiedene Zytokine (z.B. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )), um andere Immunzellen wie auch NK-Zellen zu stimulieren, und sind in der Lage schnell und auf direktem Weg virusinfizierte oder maligne veränderte Zellen zu zerstören. In diversen Tierstudien konnte die direkte antikanzerogene Funktion von NK-Zellen in Verbindung mit IFN- $\gamma$ , Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand (*TNF-related apoptosis inducing ligand*; TRAIL) und Perforin gezeigt werden (Street *et al.*, 2001; Takeda *et al.*, 2001; Dunn *et al.*, 2004). Zudem zeigen Menschen mit einem seltenen NK-Zell-Defizit eine Fülle an schweren Krankheiten und Infektanfälligkeiten durch verminderte oder fehlende NK-Zytotoxizität - oft mit frühzeitigem Tod im ersten Lebensdrittel (Orange 2002; Orange 2006).

### 1.4.1 Subpopulationen der NK-Zellen

Phänotypisch exprimieren humane NK-Zellen das Oberflächenmolekül CD56 bei gleichzeitigem Fehlen von CD3, dem charakteristischen T-Zell-Marker. Als erste konnten Lanier *et al.* (1986) zeigen, dass NK-Zellen aufgrund ihrer CD56 und CD16 Rezeptor-Expression in 2 Untergruppen eingeteilt werden können:

CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen tragen oberflächlich geringe Mengen an CD56, aber hohe Level an CD16. Im Gegensatz dazu zeigen CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen eine hohe CD56 Rezeptordichte mit geringer CD16 Expression. Im humanen peripheren Blutsystem setzt sich die Gesamt-NK-Zell-Population aus ca. 90% CD56<sup>dim</sup> und ca. 10% CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen zusammen. Funktionell gesehen weisen CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen eine höhere Zytotoxizität und Granularität mit geringer Zytokinexpression auf als CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, während letztgenannte hohe Zytokinmengen produzieren können, aber weniger zytotoxisch agieren (Nagler *et al.*, 1989; Cooper *et al.*, 2001). Zusätzlich exprimieren NK-Zellen diverse andere Oberflächenantigene (NK-, Zytokin- und Chemokin-Rezeptoren sowie Adhäsionsmoleküle) und intrazelluläre Chemokine und Zytokine in unterschiedlichem Ausmaß, wodurch funktionell weitere Untergruppen entstehen und Verhaltensmuster der Zellen während der Immunantwort möglicherweise begründet liegen (Cooper *et al.*, 2001; Wilk *et al.*, 2008). In der Abbildung 1 sind die CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Subpopulationen nach Cooper *et al.* (2001) dargestellt.

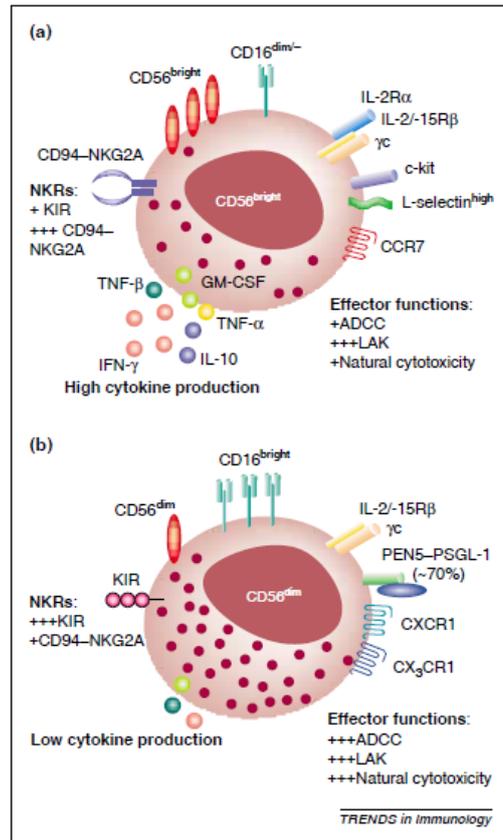


Abbildung 1: CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Subpopulationen (Cooper *et al.*, 2001).

### 1.4.2 Missing-Self-Hypothese

Ljunggren und Karre beschrieben (1990) erstmals die „Missing-Self-Hypothese“: Eine NK-Zelle bindet über einen Rezeptor an eine Zielzelle, wobei diese die *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-Klasse I Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimiert. Die MHC-Klasse I Liganden werden mit Hilfe von inhibierenden Rezeptoren der NK-Zelle erkannt und ein negatives Signal hemmt schließlich deren Aktivierung (Selbst-Toleranz). Sind Zellen verändert, virusinfiziert oder entartet, befinden sich weniger oder keine MHC-Klasse I Moleküle an ihrer Oberfläche und die NK-Zelle wird durch eine fehlende Hemmung aktiviert und agiert anschließend zytotoxisch. Neue Erkenntnisse zeigen, dass ein Fehlen von MHC-Klasse I Liganden nicht ausreichend ist, um eine NK-Zell-Aktivierung gegenüber Zielzellen hervorzurufen. Die NK-Funktionalität basiert eher auf einem Gleichgewicht zwischen aktivierenden und hemmenden Signalen nach Ligandenbindung an NK-Zell-Rezeptoren, wobei sowohl die Affinität als auch die Anzahl an Signalen entscheidend ist (Lanier 2001; Bryceson *et al.*, 2006; Caligiuri 2008). Interessanterweise ist in einem Individuum die Menge und Kombination der inhibierenden Rezeptoren auf NK-Zellen verschieden, wobei jede NK-Zelle aber mindestens eine Subpopulation eines hemmenden Rezeptors exprimiert (Valiante *et al.*, 1997). Während der „Ausbildung“ der NK-Zellen wird Selbst-Toleranz erlernt, indem sie NK-Zell-eigene MHC Klasse I-Moleküle mit einem hemmenden Rezeptor erkennen, der sie später auch bei Zielzell-Liganden-Bindung hemmen wird (Kim *et al.*, 2005).

### 1.4.3 Zytotoxizität der NK-Zelle

Eine NK-Zelle kann Zytotoxizität gegenüber Zielzellen entweder über direkte Zellkontakte oder die Sekretion von löslichen Faktoren ausüben. Der bedeutendste Mechanismus ist die Freisetzung von zytolytischer, intrazellulärer Granula, welche mit Perforin und Granzymen gefüllt sind. In Versuchen mit Perforin-defizienten Mäusen fehlt die zytolytische Aktivität der NK-Zellen gegenüber Zielzellen vollständig und zeigt damit Perforin als essentiellen Bestandteil der NK-Zytotoxizität (Kagi *et al.*, 1994). NK-Zellen exprimieren aber auch Vertreter der Tumornekrosefaktor (TNF) Familie wie TRAIL, TNF- $\alpha$  oder Fas Ligand (FasL), über die die NK-Zelle an sogenannte Todesrezeptoren (*death receptor*) auf der Zielzelle bindet und so Apoptose in einer Perforin-unabhängigen Weise induziert. Ein weiterer Weg Zytotoxizität auszuüben, erfolgt über die Bindung von Antikörper (Ak)-gebundenen Zielzellen an CD16, die sogenannte Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*; ADCC).

### 1.4.4 Natürliche Zytotoxizität - ein Killer greift an

In nur ungefähr 30 Minuten kann eine NK-Zelle ihre Zielzelle zerstören (Eriksson *et al.*, 1999). Damit dies passiert, müssen einige Schritte erfolgen:

Um mit einer Zielzelle kommunizieren zu können, muss eine stabile Bindung zwischen NK-Zelle und Zielzelle hergestellt werden, die durch Adhäsionsmoleküle wie *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) und dem passenden Rezeptor *Leukocyte Function-Associated Antigen 1* (LFA-1) vermittelt wird (Patarroyo *et al.*, 1990; Bryceson *et al.*, 2005). Gleichzeitig kommt es zur Bildung einer sogenannten immunologischen Synapse (IS) mit Dislokation und Cluster-Bildung von MHC Klasse I und ICAM-1 Proteinen auf der Zielzelle in Richtung ihrer bindenden Rezeptoren *Inhibitory Killer Ig-like Receptor* (KIR1) und LFA1, die sich auf der NK-Zell-Oberfläche am immunologisch-synaptischen Spalt befinden (Davis *et al.*, 1999). Dominieren aktivierende die hemmenden Signale, erfolgt, wie oben beschrieben, eine Aktivierung der NK-Zelle. Es kommt zu einer Polarisierung des Aktin-Zytoskeletts mit anschließender Mobilisierung des Mikrotubuli-organisierenden Zentrums (*Microtubule Organizing Center*; MTOC) und assoziierter intrazellulärer Granula zur IS hin (Barber *et al.*, 2004). Danach fusionieren die Granula mit der Zellmembran und das vor allem darin enthaltene Perforin (Liu *et al.*, 1986) und Granzym A (Velotti *et al.*, 1992) werden per Exozytose in die IS abgegeben, um dort schließlich ihre volle Wirkung zu entfalten. Der Abschluss dieses Prozesses bildet die Loslösung von der Zielzelle mit Übergang in einen Ruhezustand und nachfolgender Biogenese neuer, intrazellulärer Granula (Mace *et al.*, 2014).

### 1.4.5 Das natürliche Equipment einer Killerzelle

#### Interferon- $\gamma$

Interferon- $\gamma$  ist das typische Zytokin der NK-Zelle. Es gehört aufgrund seiner Rezeptor-Struktur zu den Typ II Interferonen, die hauptsächlich von T- und NK-Zellen als Immunantwort auf eine virale oder mikrobielle Infektion produziert werden (Boehm *et al.*, 1997). IFN- $\gamma$  hat in der Immunbiologie viele Funktionen: es reguliert und fördert die Expression vieler Gene, die bei der Antigen-Präsentation der MHC Klasse-I und -II Moleküle involviert sind; es aktiviert Makrophagen, wodurch es zu einer erhöhten

Phagozytose kommt; zudem induziert es die Stickstoffmonoxid- und Superoxid-Produktion, welche ebenfalls intrazelluläre Pathogene abtöten (Boehm *et al.*, 1997). Außerdem wird IFN- $\gamma$  eine wichtige protektive Rolle in der immunologischen Kontrolle von Tumorwachstum und –progression zugeschrieben (Balachandran und Adams; Ikeda *et al.*, 2002; Bekisz *et al.*, 2013). Patientinnen und Patienten mit einem IFN- $\gamma$  Rezeptor-Defekt leiden an schweren viralen und bakteriellen Infektionen (Dorman *et al.*, 1999; Dorman *et al.*, 2004). Laut Cooper *et al.* (2001) sind vor allem humane CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen die Hauptproduzenten von IFN- $\gamma$  unter den NK-Zellen, die dazu Interleukin (IL)-12 in Kombination mit anderen Interleukinen (z.B. IL-15, IL-18) oder der Bindung eines NK-aktivierenden Rezeptors (CD16, *Natural-Killer Group 2, member D* [NKG2D]) benötigen. Klinisch gesehen, gibt es aufgrund der wichtigen immunmodulatorischen Funktion ein großes Interesse an der therapeutischen Anwendung von Interferonen. Einige Interferon-basierte Medikamente sind bereits auf dem Markt (Lin und Young 2014), darunter auch IFN- $\gamma$  (Marciano *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2009).

### **Granzym A**

Granzyme sind Serinproteasen, die neben Perforin in der zytotoxischen Granula von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen (*cytotoxic T lymphocytes*, CTL) zu finden sind und erstmalig im Jahr 1987 in der Arbeitsgruppe um Jürg Tschopp entdeckt wurden (Masson und Tschopp 1987; Jenne und Tschopp 1988). Daher stammt auch die Namensgebung: Granula (Gran-) und Enzym (-zym) für Granula-assoziierte Enzyme (Jenne und Tschopp 1988). Insgesamt gibt es 5 humane Granzyme (A, K, B, H und M), wobei Granzym A neben Granzym B mengenmäßig am häufigsten in intrazellulärer Granula vorkommt (Lieberman 2010). Granzyme werden intrazellulär bei einem sehr basischen pH-Wert von 9-11 gespeichert, wirken aber erst bei einem sauren pH-Wert proteolytisch und werden zudem als inaktive Vorstufen synthetisiert, um eine Selbst-Zerstörung innerhalb der Zelle zu vermeiden (Lieberman 2010). Sie werden zusammen mit Perforin per Exozytose ausgeschüttet, wobei Perforin die Zielzell-Perforation gewährleistet und innerhalb eines kurzen Zeitfensters die Diffusion der Granzyme in die Zielzelle ermöglicht (Lopez *et al.*, 2013). Granzym A transloziert ins Zytosol, wo es aktiv die doppelwandige Mitochondrien-Membran durchquert, im Inneren Schaden initiiert und anschließend verstärkt radikale Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROS) gebildet werden (Martinvalet *et al.*, 2008). Diese ROS fördern die Translokation des SET-Komplexes in den Nukleus, wo er anschließend durch Granzym A gespalten wird und nachfolgende, freigesetzte Proteine eine einzelsträngige DNA-Fragmentierung auslösen (Beresford *et al.*, 2001). Somit führt Granzym A zu einem programmierten Zelltod in der Zielzelle.

### **TRAIL**

Der TNF-verwandte Apoptose-induzierende Ligand (TRAIL, auch Apo2L genannt) gehört neben TNF und FasL zu den wesentlichen Apoptose-vermittelnden Vertretern der TNF-Familie und wurde 1995 entdeckt (Wiley *et al.*, 1995). Es stellt ein charakteristisches Typ-II Transmembranprotein dar, wird in vielen Geweben exprimiert und wirkt über 5 Rezeptoren: TRAIL Rezeptor-1 (TRAILR1, DR4), TRAIL Rezeptor-2 (TRAILR2, DR5, APO2, Killer, TRICK), TRAIL Rezeptor-3 (TRAILR3, DcR1, TRID, LID), TRAIL Rezeptor-4 (DcR2, TRUND) sowie Osteoprotegerin (OPG), der einzige lösliche Rezeptor

(Wiley *et al.*, 1995; Emery *et al.*, 1998; Kelley und Ashkenazi 2004). TRAIL induziert, wie der Name bereits verrät, Apoptose über TRAILR1 und/oder TRAILR2, welche jeweils extrazellulär exprimiert werden und nach Bindung über eine zytosolische Domäne und Aktivierung intrinsischer Caspasen diese induzieren (Kelley und Ashkenazi 2004). Da der TRAIL-vermittelte Zelltod in Tumor- und Virus-infizierten Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, jedoch nicht in normalen Zellen (Wiley *et al.*, 1995; Snell *et al.*, 1997; Ashkenazi *et al.*, 1999; Walczak *et al.*, 1999) einsetzt, werden TRAIL und TRAIL-Rezeptor Agonisten als potentielle antikanzerogene Therapeutika untersucht. In Nager-Studien mit verschiedenen Karzinomarten zeigte TRAIL, allein oder in Kombination mit Chemo- oder Strahlentherapie, eine bedeutende Antitumor-Wirkung (Ashkenazi *et al.*, 1999; Walczak *et al.*, 1999; Chinnaiyan *et al.*, 2000; Kelley *et al.*, 2001; Ray und Almasan 2003). Rekombinantes, humanes lösliches TRAIL wurde bereits als Medikament „Dulanermin“ in vorklinischen Studien getestet (Ashkenazi *et al.*, 2008; Herbst *et al.*, 2010). Leider zeigte es in klinischen Studien keinen signifikanten Antitumor-Effekt, ebenso wie TRAIL-Rezeptor Agonisten (Belada *et al.*, 2010; Soria *et al.*, 2011; Subbiah *et al.*, 2012; Holland 2014; Lemke *et al.*, 2014). Obwohl die TRAIL-Expression auf NK-Zellen relativ gering ist, scheint es eine Rolle bei der NK-Zell-Zytotoxizität gegenüber TRAIL-sensitiven Tumorzellen zu spielen (Kayagaki *et al.*, 1999), sodass nach Gabe von TRAIL-blockierenden Antikörpern ein signifikant erhöhtes Tumorwachstum sowie -metastasierung im Tiermodell festgestellt wurde (Takeda *et al.*, 2001; Takeda *et al.*, 2001). Außerdem konnte die gleiche Arbeitsgruppe (Smyth *et al.*, 2001) zeigen, dass IFN- $\gamma$  die TRAIL-Expression auf NK-Zellen *in vivo* induziert.

## 1.5 Adipokine

Die Adipositas geht mit einer vermehrten Fettmasse einher, die nicht nur als Kälteschutz, mechanischer Schutz und Energiespeicher dient, sondern auch ein großes hormonproduzierendes, endokrines Organ ist, das wesentlich in den Stoffwechsel eingreift. Die sezernierten Fettgewebshormone werden Adipo(zyto)kine genannt.

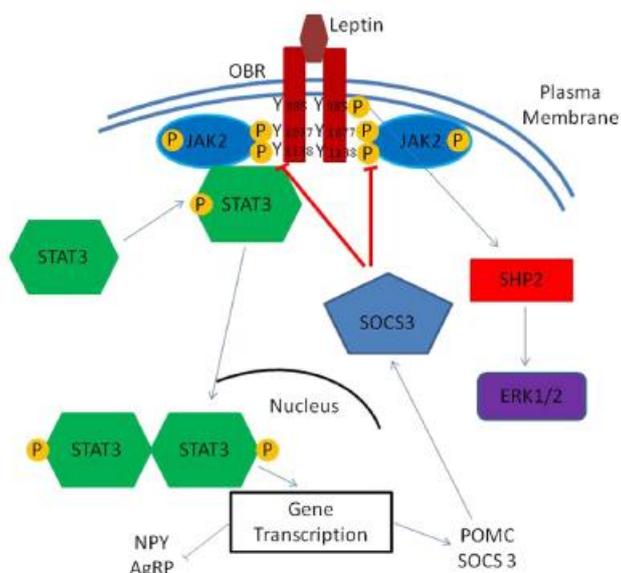
### 1.5.1 Leptin

Leptin ist das wohl bekannteste Hormon des Fettgewebes. Es wurde 1994 durch die Arbeitsgruppe um Friedman (Zhang *et al.*, 1994) als Produkt des *obese* (*ob*) Gens entdeckt und als ein Hormon der Energiehomöostase beschrieben, welches das Körpergewicht kontrolliert (Friedman und Halaas 1998). Hinter seinem Namen verbirgt sich auch seine Funktion: „Leptin“ stammt vom griechischen Wort „leptos“ und bedeutet dünn. Die Plasma-Leptin Konzentrationen sind proportional zum Körperfettgehalt und es agiert mit anderen hormonellen Hunger- und Sättigungsregulatoren vor allem im Hypothalamus (Elmqvist *et al.*, 2005). Das Fettverteilungsmuster und der Körperfettgehalt sind geschlechterabhängig, wobei Männer zu einer stammbetonten (androgen-viszeralen) und Frauen zu einer hüftbetonten (gynoid-subkutanen) Fettverteilung tendieren. Die vom Fettgewebe sezernierte Leptin-Menge variiert regionsspezifisch und steigt proportional zur Körperfettmasse an (Considine *et al.*, 1996). Die physiologischen Serum Leptin-Spiegel bei Frauen sind mehr als 3x höher im Vergleich zu Männern (Szabova *et al.*, 2012). Es sind 6 Leptin-Rezeptor Isoformen (Ob-R) bekannt, über die es seine Wirkung entfaltet. Dazu zählen die unterschiedlich langen transmembranären Rezeptoren Ob-

Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Rf und die lösliche Form Ob-Re, dem die zellmembrandurchspannende Domäne fehlt (Münzberg und Morrison 2015). Nur Ob-Rb hat eine lange zytoplasmatische Domäne, die in der Lage ist, die JAK-STAT-Signaltransduktionskaskade in Gang zu setzen (Banks *et al.*, 2000). Ein Fehlen von Leptin bzw. ein Mangel an Ob-R, wie es Douglas Coleman schon in den 1960er Jahren bei rezessiv mutierten *ob/ob* und *db/db* Mäusen vermutete (Coleman 2010), führt zu einer Störung im Energiestoffwechsel und erhöhter Fettmasse (Coleman 1978; Friedman und Leibel 1992). Leptin wirkt aber nicht nur zentral, sondern auch im peripheren Gewebe. Dort übernimmt es wichtige Funktionen in der Regulation der Skelettmuskelmasse (Arounleut *et al.*, 2013), bei der Gehirn- (Shi *et al.*, 2014) und Knochenentwicklung (Ducy *et al.*, 2000), in der Reproduktion (Chehab *et al.*, 1996), Angiogenese (Sierra-Honigmann *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2001), Hämatopoese (Bennett *et al.*, 1996) sowie in der angeborenen und erworbenen Immunfunktion (Fantuzzi und Faggioni 2000; Sanchez-Margalet *et al.*, 2003; La Cava und Matarese 2004). Neben seiner T-Zell-modulierenden Wirkung (Lord *et al.*, 1998), inhibiert es die Proliferation von Monozyten/Makrophagen und fördert deren Zytokinausschüttung (Santos-Alvarez *et al.*, 1999; Fantuzzi und Faggioni 2000), außerdem moduliert es über Chemotaxis und die erhöhte Sekretion von Sauerstoffradikalen die Aktivität und Funktion von neutrophilen Granulozyten (Caldefie-Chezet *et al.*, 2001; Caldefie-Chezet *et al.*, 2003). Innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen Ob-Rb exprimieren (Nave *et al.*, 2008) und eine kurzzeitige Leptin-Stimulation die IFN- $\gamma$  Sekretion und zytotoxische Tumorzelllyse erhöht (Wrann *et al.*, 2012). Eine langzeitige Leptinwirkung, wie es bei adipösen Personen der Fall ist, führt zu einer gestörten NK-Zell-Funktion und verminderter Zellproliferation (Wrann *et al.*, 2012). Außerdem zeigen isolierte NK-Zellen aus adipösen Spendern funktionelle Defizite und eine veränderte Immunantwort nach Leptin-Stimulation *in vitro* (Laue *et al.*, 2015).

### **Leptin-Signalweg**

Nach Bindung von Leptin an die extrazelluläre Domäne des Ob-R kommt es zur Aktivierung der Janus Kinase 2 (JAK2), welche Tyrosinreste der langen, zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors und sich selbst phosphoryliert (Abbildung 2). Wird der Tyrosinrest 1138 phosphoryliert und aktiviert, kommt es zur Bindung des *Signal Transducers and Activators of Transcription 3* (STAT3) mit anschließender Phosphorylierung und Aktivierung von STAT3 (pSTAT3) und von JAK2 (pJAK2). Eine Aktivierung von STAT3 hat seine Dimerisierung und Translokation in den Zellkern zur Folge, wo es Veränderungen in der Expression verschiedener Gene vermittelt (Crujeiras *et al.*, 2015). Wird anstelle von 1138 der Tyrosinrest 985 phosphoryliert und aktiviert, erfolgt eine Aktivierung des Signalwegs der extrazellulär Signal-regulierten Kinase 1 und 2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*; ERK1/2) (Crujeiras *et al.*, 2015).



**Abbildung 2: Intrazelluläre JAK-STAT-Signalkaskade nach Leptin-Bindung** (Crujeiras *et al.*, 2015).

### 1.5.2 Resistin

Resistin wurde 2001 als ein Hormon des Fettgewebes entdeckt und man vermutete eine Verbindung zwischen Typ II Diabetes und Adipositas, weshalb sich auch der Name aus den Wörtern „*resistance to insulin*“ zusammensetzt (Steppan *et al.*, 2001). In Versuchen konnte durch die Gabe von rekombinantem Resistin die Glukosetoleranz von adipösen Tieren verbessert werden (Steppan *et al.*, 2001). Während murines Resistin fast ausschließlich in weißem Fettgewebe gebildet wird, wird das humane Protein nur in sehr geringen Mengen in Adipozyten, dafür aber in fettgewebsständigen Makrophagen und Monozyten gebildet (Savage *et al.*, 2001; Patel *et al.*, 2003; Bo *et al.*, 2005). Da die im Tiermodell gezeigten Ergebnisse nicht im Menschen bestätigt werden konnten, besteht nun vielmehr die Hypothese, dass humanes Resistin eine Rolle bei Entzündungen, Arteriosklerose, Herzerkrankungen und metabolischen Krankheiten spielt (Burnett *et al.*, 2005; Reilly *et al.*, 2005; Yaturu *et al.*, 2006; Lazar 2007; Schwartz und Lazar 2011). Mehrmalig konnte gezeigt werden, dass adipöse Personen erhöhte Serum Resistin-Spiegel aufweisen im Vergleich zu Normalgewichtigen, aber dass humanes Resistin in keiner Verbindung zu einer Insulinresistenz steht (Azuma *et al.*, 2003; Owecki *et al.*, 2011).

### 1.5.3 MCP-1

Das Monozyten Chemoattraktorprotein-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*; MCP-1), auch unter CC-Chemokin-Ligand-2 (CCL-2) bekannt, wurde 1989 bereits als Monozyten Chemotaktischer Faktor in der Arbeitsgruppe um Matsushima beschrieben (Matsushima *et al.*, 1989). MCP-1 gehört zur Familie der CC-Chemokine, die als Signalproteine an ihrem Aminoterminus zwei Cysteinreste (C-C) aufweisen und bei der Chemotaxis, besonders bei Monozyten, nach proinflammatorischer Zytokinausschüttung bei Entzündung und Verletzung eine wichtige Rolle spielen (Deshmane *et al.*, 2009). MCP-1 wird ubiquitär von verschiedenen Zellen exprimiert und ist durch eine Vielzahl von Stimuli hochreguliert (Cushing *et al.*, 1990; Sica *et al.*, 1990; Standiford *et al.*, 1991; Brown *et al.*,

1992; Barna *et al.*, 1994). Die Hauptquelle für MCP-1 sind Monozyten und Makrophagen (Yoshimura *et al.*, 1989; Yoshimura *et al.*, 1989). Es reguliert die Migration und die Gewebsinfiltration von Monozyten, dendritischen Zellen, NK-Zellen und T-Zellen (Zachariae *et al.*, 1990; Allavena *et al.*, 1994; Loetscher *et al.*, 1994) und weist bereits damit auf seine kritische Rolle in entzündlichen Erkrankungen wie Arteriosklerose, multiple Sklerose und rheumatoide Arthritis (Hayashida *et al.*, 2001; Mahad und Ransohoff 2003; Kusano *et al.*, 2004) hin.

## 1.6 Adipositas – eine chronische Entzündung

Die Adipositas stellt einen chronischen Entzündungszustand dar, der auch als *low-grade* Inflammation bezeichnet wird (Spiegelman und Hotamisligil 1993; Bastard *et al.*, 1999). Das Fettgewebe schüttet vermehrt Adipokine aus und es kommt zu einer lokalen Makrophagen-Infiltration. Aber nicht nur im Fettgewebe selbst sind erhöhte Spiegel an inflammatorischen Zytokinen wie z.B. von TNF- $\alpha$  und C-reaktivem Protein (CRP) messbar, sondern auch im Blut adipöser Personen (Bastard *et al.*, 2000). Somit breitet sich diese lokale Entzündung auch systemisch aus, ist nachweisbar, aber noch subklinisch. Studien zeigen, dass eine Gewichtsreduktion bei Adipositas die Expression dieser Entzündungsmarker senken und die Makrophagen-Infiltration reduzieren kann (Hotamisligil *et al.*, 1995; Clement *et al.*, 2004).

## 1.7 Modulation des Immunsystems

Es ist allgemein bekannt, dass regelmäßige, sportliche Aktivität das Risiko kardiovaskuläre Erkrankungen, Bluthochdruck, Diabetes, metabolisches Syndrom, aber auch infektiöse und Tumorerkrankungen zu entwickeln vermindert (Blair *et al.*, 1996; Lynch *et al.*, 1996; Evenson *et al.*, 2003; Katzmarzyk *et al.*, 2004; Barlow *et al.*, 2006) und mit einer erhöhten Lebenserwartung korreliert ist. Das Immunsystem, das bei vielen der oben genannten Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt, lässt sich durch eine Vielzahl von Faktoren positiv oder negativ beeinflussen. Dazu zählen neben sportlicher Aktivität auch verschiedene Nahrungsmittel sowie Schlafmangel und psychischer Stress (Grimble 2001; Segerstrom und Miller 2004; Irwin 2008; Pedersen *et al.*, 2009). Die Arbeitsgruppe um David Nieman hat sich dem Thema „Modulation des Immunsystems“ als eine der Ersten gewidmet. Sie beschreiben, dass Menschen mit moderater sportlicher Aktivität Infektionen der oberen Atemwege (*Upper Respiratory Tract Infection*; URTI) reduzieren können, während ein Hochleistungs-Training, wie es z.B. bei Marathon-Läufern und anderen Spitzen-Athleten häufig vorkommt, ein erhöhtes Risiko für URTI sowie eine vorübergehende Immunsuppression mit einem erhöhten Infektionsrisiko zur Folge hat (Nieman 1994; Nieman 2007; Nieman *et al.*, 2011). Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen unterstützen diese Ergebnisse (Pedersen und Toft 2000; Gleeson 2007).

### 1.7.1 Gewichtsreduktion und NK-Zellen

Auch eine Abnahme des Körpergewichts bei adipösen Personen reduziert das Krankheitsrisiko, wobei ein kombiniertes Sport- und Ernährungsprogramm am effektivsten ist (Ito *et al.*, 2001; Amati *et al.*, 2008). Da dies bei einer extremen und morbiden Adipositas meist keine für den Patienten durchführbare Lösung darstellt und hohe Gesundheitsrisiken birgt, stellt die bariatrische Chirurgie eine Möglichkeit der Gewichtsreduktion in diesem Fall dar (Karlsson *et al.*, 2007; Dietz *et al.*, 2015). Außerdem zeigt sich bereits wenige Tage nach einer Operation eine Remission des Typ II Diabetes mellitus sowie langfristig eine Verringerung der Mortalität von kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes und Krebs (Svane und Madsbad 2014).

Ein besonderes Augenmerk dieser Arbeit liegt auf den NK-Zellen, die, wie in Kapitel 1.4 beschrieben, die erste Abwehr von Viren und entarteten Zellen bilden. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass humane NK-Zellen nach Langzeit-Stimulation mit Adipokinen und vor allem Leptin, wie es bei adipösen Personen in hoher Menge im Blut zirkuliert, eine verminderte Expression zytotoxisch agierender Bestandteile aufweisen (Wrann *et al.*, 2012; Huebner *et al.*, 2013). Mit weiteren Versuchen konnten wir außerdem verdeutlichen, dass NK-Zellen den Leptin-Rezeptor tragen (Wrann *et al.*, 2012; Laue *et al.*, 2015) und der intrazelluläre Leptin-Signalweg über Ob-R sowohl in adipösen Nagern als auch bei humaner Adipositas gestört ist (Nave *et al.*, 2008; Wrann *et al.*, 2012). Ein Versuch mit Diät-induzierten adipösen Nagern zeigte, dass eingeschränkte Funktionen der aus diesen Tieren entnommenen NK-Zellen nach einem Transfer in dünne Tiere innerhalb kurzer Zeit reaktiviert werden konnten. Die Verbesserung der Funktionalität der NK-Zellen war u.a. auf einen gesteigerten Leptin-Postrezeptor-Signalweg zurückzuführen (Lautenbach *et al.*, 2009).

Es existieren aber nur wenige Studien, die den Effekt einer Gewichtsreduktion auf die Natürliche Killerzell-Aktivität (NKZA) bei adipösen Personen *in vivo* zeigen. Die Gruppe um Kelley *et al.* (1994) zeigte, dass die Anzahl zirkulierender NK-Zellen nach einer kalorienarmen Ernährung und Gewichtsverlust bei Frauen reduziert ist. Scanga *et al.* (1998) führten eine 8-wöchige Studie mit adipösen Probandinnen durch, die entweder einem Diät-Programm oder einem Programm bestehend aus Diät und Sport folgten. Sie publizierten anschließend eine verminderte NKZA aufgrund des Gewichtsverlustes nach der Diät, nicht jedoch bei kombiniertem Sport-Diät-Programm. Im gleichen Jahr wurde außerdem eine 12-wöchige Studie veröffentlicht, die keine signifikanten Veränderungen der NKZA nach Kalorienreduktion und Gewichtsverlust bei adipösen Frauen zeigt (Nieman *et al.*, 1998). Eine Veröffentlichung von Moulin *et al.* beschreibt, dass adipöse Patienten vor einer bariatrischen Operation normale NK-Zell-Zahlen aber eine verminderte NKZA aufweisen, wohingegen es zu einem signifikanten Anstieg der NKZA nach bariatrischer Chirurgie kommt (Moulin *et al.*, 2011). Diese Daten hinsichtlich einer Modulation der NK-Zellen sind sehr vielversprechend. Ein operativer Eingriff ist eine Möglichkeit der Behandlung von extrem adipösen Patienten, nicht jedoch bei der Mehrheit der Menschen mit Adipositas. In der vorliegenden Arbeit nahmen die Probandinnen und Probanden mit einem BMI von  $\geq 30 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$  an einem kontrollierten 3-monatigen Sport- und Ernährungsprogramm mit dem Ziel einer Körpergewichts- und Fettmassereduktion teil, damit eine mögliche immunmodulierende Wirkung untersucht werden kann.

## 1.8 Zielstellungen

In Hinblick auf die weltweit zunehmende Prävalenz von Adipositas und der damit einhergehenden erhöhten Krebsentstehung wurde der Einfluss einer Gewichts- bzw. Fettmassereduktion bei bestehender Adipositas auf verschiedene Immunfunktionen untersucht. Im Zentrum der vorliegenden Arbeit waren dabei die NK-Zellen, die als Untergruppe der Lymphozyten eine wichtige Rolle bei der Abwehr von entarteten sowie virus-infizierten Zellen spielen und bei Adipositas eine gestörte Funktion aufweisen.

Ziel der Promotionsarbeit zum Thema „Modulation der Immunfunktion durch eine Fettmassereduktion bei Menschen mit Adipositas“ war es, die folgenden Fragestellungen zu untersuchen:

1. Können adipöse Personen durch ein 3-monatiges kontrolliertes Sport- und Ernährungsprogramm ihr Körpergewicht und andere anthropometrische Parameter signifikant verändern? Können die Probanden durch die Intervention das viszerale Körperfett reduzieren?
2. Welchen Einfluss hat eine Gewichtsreduktion auf verschiedene Immunzellen und NK-Zell-Funktionen im Speziellen?
3. Wie wirkt sich die Intervention auf Adipokin-Spiegel (v.a. Leptin) im Blut aus und wie reagieren metabolische Parameter?
4. Werden Komponenten des Leptin-Signalweges durch eine mögliche Reduktion der Adipokin-Spiegel verändert?
5. Führt eine *in vitro* Stimulation von NK-Zellen mit Leptin zu funktionellen Einschränkungen hinsichtlich ihrer Zytotoxizität gegenüber Zielzellen?

Die im Rahmen dieser Promotion durchgeführten Untersuchungen sollen die bisherigen Ergebnisse im Tiermodell zur immunmodulierenden Wirkung veränderter Adipokin-Mengen nach Gewichts- bzw. Fettmasseverlust bei Adipositas auf das humane System erweitern. Die Ergebnisse sind für das bessere Verständnis der Adipositas und ihrer assoziierten Erkrankungen in Verbindung mit den vom Fettgewebe sezernierten Adipokinen von großer Bedeutung.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
APS	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Biocoll	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Coomassie Brilliantblau	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (99,8%)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Leptin	R&D Systems, Minneapolis, USA
$\beta$ -Mercaptoethanol	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Molekulargewichts-Standard	
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Natriumazid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> (PBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Pentaglobin	Biotest Pharma GmbH, Dreieich, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Ponceau-S	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
RPMI-Medium 1640	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Saponin	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA

SDS	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Sodium Pyruvate	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
TEMED	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
TRIS	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
TRIS-Hydrochlorid (TRIS-HCl)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypsin	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Tween	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland

## 2.2 Zubehör und Geräte

Fusion Fx7	Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Deutschland
Forma Series II Water Jacketed CO <sub>2</sub> Incubator Hepa Class 100	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Gewebekulturflaschen Cellstar®	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Hybond Membrane	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
Leerkassetten	biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland
LSR Fortessa	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Scie-Plas Semi Dry Blotting System	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Synergy™ Mx	BioTek® Instruments, Inc., Vermont, USA
XCell SureLock® Mini-Cell	Life Technologies, Carlsbad, USA

## 2.3 Verwendete Kits

Cholesterol FS	DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Deutschland
DELFI A EuTDA Cytotoxicity Reagents	PerkinElmer Inc., Waltham, USA
FlowCytomix™ Human Obesity 9plex Kit	eBioscience, Bender MedSystems GmbH, Wien, Österreich
Glucose Gluc-DH FS	DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Deutschland
Micro BCA™ Protein Assay	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Triglycerides FS	DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Deutschland

## 2.4 Verwendete Analysensoftware

BD FACSDiva™	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
FlowCytomix Pro Software	eBioscience, Bender MedSystems GmbH, Wien, Österreich
Fusion Capt-Software	Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Deutschland
GraphPad Prism 5.01 Software	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA

## 3 Methoden

Im Methodenteil wird der Einfachheit halber die männliche Form (Proband, Person) verwendet. Wenn es nicht differenziert beschrieben ist, sind damit auch weibliche Personen eingeschlossen.

### 3.1 Studienpopulation

Die Teilnehmer der Studie waren Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Stadtwerke Halle GmbH, die durch Werbung in der Mitarbeiterzeitschrift, Informationsbroschüren und E-Mails akquiriert wurden. Die Probanden wiesen einen BMI von mindestens  $30 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$  auf und waren maximal 65 Jahre alt. Zu den Ausschlusskriterien zählten eine bestehende Schwangerschaft, Stillen, chronische Infektionskrankheiten, sowie akute, metabolische, endokrine Erkrankungen (z.B. Typ I Diabetes, Hypo- oder Hyperthyreose) oder immunsuppressive Therapien (z.B. Chemotherapie). Insgesamt wurden 24 adipöse Probandinnen und Probanden für die experimentelle Gruppe und 15 adipöse Personen für die Kontrollgruppe rekrutiert, wovon aufgrund der bestehenden Ausschlusskriterien 5 Personen zu Beginn und aufgrund persönlicher Gründe 2 Probanden während der Studie ausgeschieden sind.

Schließlich konnten 32 gesunde, adipöse Probanden in die Studie eingeschlossen werden. In der experimentellen Gruppe nahmen 19 Personen an einem 3-monatigen Interventionsprogramm teil, während die Kontrollgruppe aus 13 Studienteilnehmern bestand, die hinsichtlich BMI, Alter und Geschlecht mit den Probanden der Interventionsgruppe gematcht worden sind. Jeder Proband wurde über die Studie aufgeklärt, unterzeichnete eine Einverständniserklärung und füllte einen Fragebogen zu familiären, schulischen, beruflichen, verhaltensbezogenen-, medizinischen, sport- und ernährungsrelevanten Hintergründen aus.

### 3.2 Intervention

Die Probanden der Interventionsgruppe nahmen an einem leicht durchführbaren und individuell angepassten Sportprogramm teil. Nach den Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) „*Obesity: preventing and managing the global epidemic.*“ (2000) bestand das Sportprogramm aus drei Einheiten pro Woche: eine Einheit Ausdauertraining und zwei Kombinationseinheiten aus Kräftigung und Ausdauer. Jede Einheit umfasste eine Stunde. Vor Studienbeginn und nach Studienende wurde bei allen Teilnehmern der Blutdruck gemessen, die Herzfrequenzvariabilität bestimmt und ein Elektrokardiogramm (EKG) durchgeführt. Außerdem folgten weitere umfassende Untersuchungen zur Beurteilung der Körperzusammensetzung, des Grundumsatzes und der Leistung: eine Bioimpedanzanalyse (BIA) sowie ein *Physical Working Capacity* (PWC)-Test inklusive einer spirometrischen Auswertung. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die individuelle Leistungsfähigkeit eingeschätzt, um ein optimales Training ohne Überbelastung zu garantieren.

Begleitend zur körperlichen Aktivität folgten Ernährungsempfehlungen, die auf den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) e.V. basieren („Vollwertig essen und trinken nach den 10 Regeln der DGE“, Rösch 2011). Verschiedene Informationsblätter mit klar dargestellten Richtlinien

erhielt jeder Proband sowie Gruppenberatungen und auch Einzelgespräche zur Verdeutlichung der Thematik "Gesunde Ernährung" wurden angeboten. Nach individuell berechnetem Grundumsatz folgten Empfehlungen für die tägliche Energiezufuhr mit einer gesunden Lebensmittelauswahl und möglichst gering verarbeiteten Produkten, drei Hauptmahlzeiten ohne Snacks und Zwischenmahlzeiten, sowie vermehrter Zufuhr von Vollkornprodukten, Gemüse und fettarmen, eiweißreichen Lebensmitteln als Abendmahlzeit.

### 3.3 Anthropometrische und physiologische Messungen

#### 3.3.1 Taillen- und Hüftumfang

Die Umfänge wurden bei jedem Probanden vor Beginn und nach Ende der Studie stehend und in Atemruhelage mit Hilfe eines flexiblen Maßbandes gemessen. Für den Taillenumfang wurde lateral zwischen dem unteren Rand des Brustkorbes und der Crista iliaca Maß genommen; für den Hüftumfang wurde der Trochanter major als Bezugspunkt gewählt.

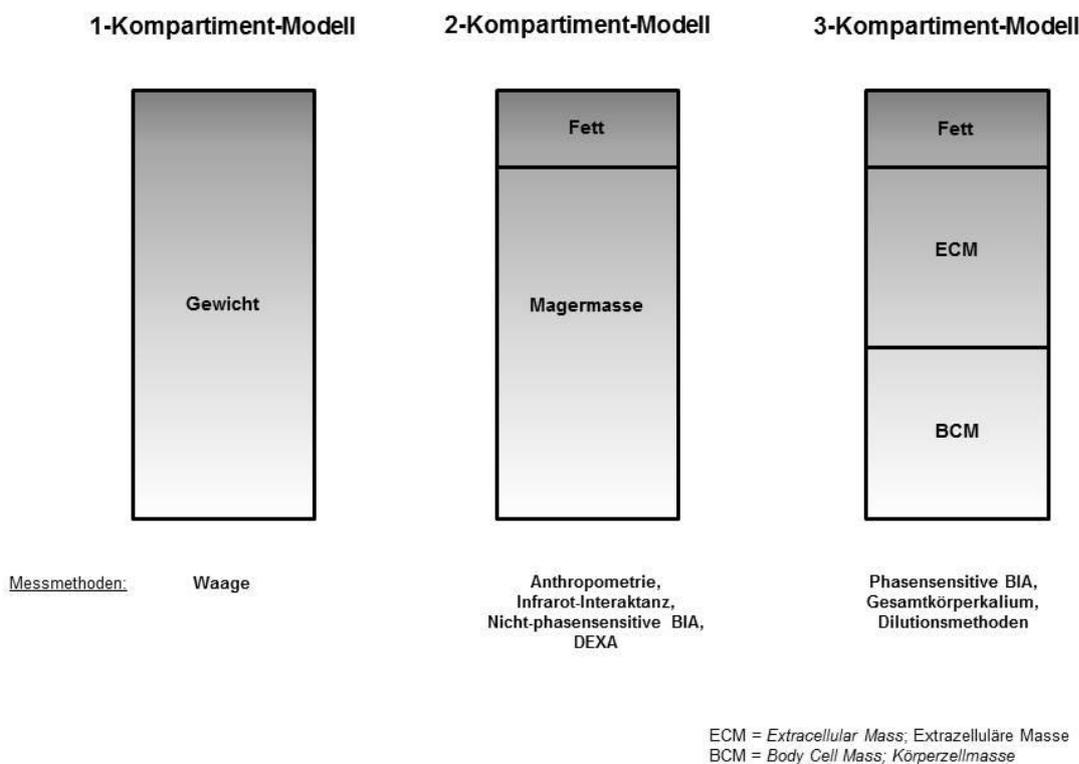
#### 3.3.2 Körperzusammensetzung

Die folgenden Messungen wurden in Kooperation mit dem Institut für Leistungsdiagnostik und Gesundheitsförderung e.V. in Halle (Saale) durch den Diplom-Ernährungswissenschaftler Marco Spielau durchgeführt.

Die Körpergewichtsmessungen der Probanden und kleine Zwischenuntersuchungen wurden mit Hilfe der Körperanalyse-Waage BC-545 (Tanita Europe B.V., Amsterdam, Niederlande) durchgeführt. Dazu stellte sich der Proband mit nackten Füßen auf die vier Elektroden der Trittfläche und nahm zusätzlich die zwei ausziehbaren Griffe in die Hand. Die 4-Punkt Bioelektrische Impedanzanalyse (BIA) erfolgte durch zwei ungefährliche, niederfrequente elektrische Ströme, um den Widerstand (Impedanz) des Körpers zu messen. Neben der Beurteilung der Fett- und Muskelmasse, berechnete die Waage nach Alters-, Geschlecht- und Größenangabe auch den BMI sowie den kalorischen Grundumsatz.

Zur Berechnung des individuellen Grundumsatzes und für präzise Analysen der Körperzusammensetzung zu Beginn und am Ende der Studie wurde ein phasensensitives Monofrequenz-Gerät von Data Input® (Data Input GmbH, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Dem liegenden Probanden wurden dazu je zwei Hand- und Fußelektroden angebracht, um, wie bei dem oben genannten Gerät, mit Wechselstrom die Impedanz des Körpers zu messen. Mit Hilfe der 3-Kompartiment-Messung wurden Körperfett (*body fat*; BF) und Magermasse (*lean body mass*; LBM), welche zusätzlich in Körperzellmasse (*body cell mass*; BCM) und extrazelluläre Masse (*extra cellular mass*; ECM) unterteilt wird, bestimmt (Abbildung 3). Die Impedanz  $Z$  setzt sich aus dem ohmschen Widerstand des Gesamtkörperwassers (*Resistance*;  $R$ ) und dem kapazitiven Widerstand der Körperzellen (*Reactance*;  $X_c$ ) zusammen (Data Input GmbH 2009). Die Fettmasse besitzt eine hohe *Resistance*, während die Magermasse durch ihren hohen Anteil an Elektrolyten und Wasser eine geringe *Resistance* hat und damit ein guter Stromleiter ist. Körperzellen wirken durch ihre Protein-Lipid-Zellmembran wie Kondensatoren und sind so über die *Reactance* bestimmbar. Zur Körperzellmasse zählen alle stoffwechselaktiven Zellen, während der Rest der Magermasse, wie bindegewebige Strukturen (Sehnen, Collagen, Faszien), Knochen und Flüssigkeiten (Plasma,

interstitielles und transzelluläres Wasser), zur extrazellulären Masse gehören (Data Input GmbH 2009).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Kompartiment-Modelle** verändert nach Data Input GmbH, 2009.

### 3.3.3 Physical Working Capacity (PWC)-Test

Nach WHO-Richtlinien wurde mit den Probanden ein submaximaler PWC-Test mit einer Zielherzfrequenz von 130 bzw. 150 Schlägen pro min durchgeführt. Ein PWC 130 Test wurde bei Personen angewandt, die blutdrucksenkende oder herzfrequenzbeeinflussende Medikamente einnahmen. Bei allen anderen Probanden wurde ein PWC 150 Test durchgeführt. Dazu wurde allen Probanden ein Brustgurt mit integriertem Pulsmesssystem angebracht, das die Herzfrequenz übermittelt. Zusätzlich erhielten die Probanden eine Atemmaske zur Atemgasanalyse mittels Spirometrie. Für den Test durchliefen die Probanden verschiedene Belastungsstufen auf einem Fahrradergometer (Ergo Fit Cycle 457 Med, Ergo-Fit GmbH & Co KG, Primasens, Deutschland), welches zuvor individuell angepasst wurde. Vor Beginn der ersten Stufe wurde bereits arterielles Kapillarblut aus dem Ohrläppchen entnommen. Bei Testbeginn absolvierten die Probanden die erste Stufe mit 25 W Widerstand für 2 min, wobei sich die Belastung stufenweise um 25 W alle 2 min und ohne Pause erhöhte. In jeder Belastungsstufe wurde Blut aus dem Ohrläppchen zur Laktatbestimmung entnommen und die Herzfrequenz (HF) notiert. Bei Erreichen der Zielherzfrequenz von 130 bzw. 150 Schlägen pro min wurde diese Stufe nach 2 min beendet und die Endherzfrequenz notiert. Anschließend folgte eine 5-minütige aktive Erholungsphase, in der mit geringen 25 W Widerstand weitergefahren wurde.

### 3.3.4 Relative maximale Leistungsfähigkeit

Die relative maximale Leistungsfähigkeit entspricht der Leistungsstufe mit absoluter Wattzahl, in der der PWC-Test beendet wurde. Da das Testende bei einer Herzfrequenz von 130 bzw. 150  $\text{min}^{-1}$  festgelegt wurde, entspricht die Leistungsfähigkeit der Probanden nicht der absoluten Leistung bis zur völligen Erschöpfung.

### 3.3.5 Relative maximale Sauerstoffaufnahme

Die relative maximale Sauerstoffaufnahme (rel.  $\text{VO}_2 \text{ max}$ ) berechnet sich aus der maximalen Sauerstoffaufnahme der Probanden bei Testende und ihrem Körpergewicht [ $\text{ml O}_2\text{-Volumen}\cdot\text{kg}^{-1}$  Körpergewicht]. Mit Hilfe der mobilen Spirometrieanlage Cortex MetaMax<sup>®</sup> 3B (Cortex Biophysik GmbH, Leipzig, Deutschland) wurde jeder Atemzug des Probanden während des PWC-Tests hinsichtlich der Sauerstoffaufnahme und Kohlenstoffdioxidabgabe untersucht.  $\text{VO}_2 \text{ max}$  gibt an, wie viele ml Sauerstoff ein Organismus je kg Körpergewicht maximal verwerten kann. Es wird gemessen, wie viel Sauerstoff ein Mensch unter Belastung über die Lunge aufnehmen und im Blut transportieren kann, um ihn anschließend in die Muskelzellen zu bringen, damit er dort zur aeroben Energiegewinnung genutzt werden kann. Je schneller dies erfolgt bzw. je höher die rel.  $\text{VO}_2 \text{ max}$  ist, desto fitter, leistungsfähiger und belastungsresistenter ist ein Organismus.

### 3.3.6 Blutprobenentnahme

Allen Probanden wurde zu vier verschiedenen Zeitpunkten Blut entnommen: vor Studienbeginn, nach einem Monat, nach drei Monaten Studiendauer (entspricht Ende der Studie), sowie drei Monate nach Studienende. Für die Blutentnahme wurde eine Nüchtern-Blutprobe über die Vena mediana cubiti abgenommen. Dazu wurde ein Stauschlauch am Oberarm angelegt, die betreffende Stelle in der Ellenbeuge mit Desinfektionsmittel benetzt und einem Tupfer trocken gewischt. Für die Punktion wurde eine Flügelkanüle im 30° Winkel eingestochen und das venöse Blut in verschiedenen Monovetten (3x 9 ml Heparin-Monovette, 1x 2,7 ml Heparin-Monovette sowie 1x 2,7 ml Fluorid-Monovette) aufgefangen. Nach erfolgter Blutentnahme wurde der Stauschlauch gelöst, die Nadel herausgezogen und mit einem Tupfer Druck auf die Einstichstelle ausgeübt, damit sich diese schnellstmöglich verschließt.

### 3.3.7 Analyse von Glucose, Triglyceriden und Cholesterin

Alle Analysen wurden in Kooperation mit Frau Prof. Gabriele I. Stangl durch das Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften in Halle (Saale) in Doppelbestimmung durchgeführt.

#### Glucosebestimmung

Für die Glucosebestimmung wurde Natriumfluorid-behandeltes Blut 10 min bei 4°C und 1500 x g zentrifugiert und das Plasma anschließend abpipettiert. Für die Analyse wurde das Kit Glucose Gluc-DH FS verwendet, wobei zunächst vier Teile Reagenz R1 mit einem Teil R2 als Gebrauchsreagenz gemischt wurden. Anschließend wurden 700  $\mu\text{l}$  Gebrauchsreagenz zu 7  $\mu\text{l}$  Fluorid-Plasma oder

Glucose-Standard (DiaSys Diagnostic Systems GmbH) gegeben, vermischt, eine Minute inkubiert und schließlich die Extinktion bei 340 nm nach 1, 2 und 3 min gemessen.

Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$\text{Glucose [mg}\cdot\text{dl}^{-1}] = \frac{\Delta E_{\text{Probe}}}{\Delta E_{\text{Standard}}} \times \text{Standard-Konzentration [mg}\cdot\text{dl}^{-1}]$$

$$\text{Glucose [mg}\cdot\text{dl}^{-1}] \times 0,05551 = \text{Glucose [mmol}\cdot\text{l}^{-1}]$$

### Triglyceridbestimmung

Heparinisiertes Blut wurde zunächst bei 4°C und 1500 x g für 10 min zentrifugiert und das Plasma abgenommen. 10 µl Plasma oder Kalibratorlösung (TruCal U, DiaSys Diagnostic Systems GmbH) wurden mit 750 µl Reagenz (Triglycerides FS Kit) versetzt, gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde anschließend bei 500 nm gegen den Reagenzien-Leerwert gemessen.

Die Formel zur Berechnung lautet:

$$\text{Triglyceride [mg}\cdot\text{dl}^{-1}] = \frac{\Delta E_{\text{Probe}}}{\Delta E_{\text{Kalibrator}}} \times \text{Kalibrator-Konzentration [mg}\cdot\text{dl}^{-1}]$$

$$\text{Triglyceride [mg}\cdot\text{dl}^{-1}] \times 0,01126 = \text{Triglyceride [mmol}\cdot\text{l}^{-1}]$$

### Cholesterinbestimmung

Für die Gesamtcholesterinbestimmung des Plasmas wurde, wie bei der Triglyceridbestimmung, Blut mit dem Gerinnungshemmer Heparin für 10 min, 4°C und 1500 x g zentrifugiert und das Plasma abgenommen. Es wurden 750 µl Reagenz des Cholesterol FS Kits zu 10 µl Plasma oder Kalibratorlösung (TruCal U, DiaSys Diagnostic Systems GmbH) gegeben, vermischt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion bei 500 nm gegen den Reagenzien-Leerwert gemessen. Zur Bestimmung der High Density Lipoprotein (HDL) Fraktion des Cholesterins wurde dieses zunächst aus dem heparinisiertem Blut gefällt, indem 100 µl Plasma und 250 µl Fällungsreagenz (HDL Precipitant, DiaSys Diagnostic Systems GmbH) miteinander vermengt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert sowie 20 min bei 2500 x g zentrifugiert wurden. Aus dem Fällungsüberstand wurden 50 µl (bzw. 10 µl Kalibratorlösung und 40 µl NaCl) mit 750 µl Reagenz gemischt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich die Extinktion bei 500 nm gegen den Reagenzien-Leerwert gemessen.

Nach folgender Formel werden die Cholesteringehalte ermittelt:

$$\text{Cholesterin [mg}\cdot\text{dl}^{-1}] = \frac{\Delta E_{\text{Probe}}}{\Delta E_{\text{Kalibrator}}} \times \text{Kalibrator-Konzentration [mg}\cdot\text{dl}^{-1}]$$

$$\text{Cholesterin [mg}\cdot\text{dl}^{-1}] \times 0,02586 = \text{Cholesterin [mmol}\cdot\text{l}^{-1}]$$

Bei der Berechnung der HDL-Fraktion wurden die Verdünnungen durch die Fällungsreagenz (1:3,5) und durch den Einsatz erhöhten Probenvolumens im Gegensatz zum Kalibrator (5:1) einbezogen, um die Ausgangskonzentrationen wieder herzustellen.

Die Low Density Lipoprotein (LDL) Fraktion des Cholesterins wurde nach Friedewald (Friedewald *et al.*, 1972) berechnet:

$$\text{Cholesterin}_{\text{LDL}} = \text{Cholesterin}_{\text{Gesamt}} - \text{Cholesterin}_{\text{HDL}} - (\text{Triglyceride-Faktor}^{-1})$$

(Faktor = 2,2 [mmol·l<sup>-1</sup>])

### 3.4 Gewinnung von peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

Nach der Entnahme von heparinisiertem Vollblut wurde dieses im Verhältnis 1:1 mit *Dulbecco's phosphate buffered saline* (PBS) vermischt und vorsichtig auf eine Biocoll-Trennlösung geschichtet. Diese Lösung hat bei Raumtemperatur eine spezifische Dichte von 1,077 g·ml<sup>-1</sup> und trennt nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 1000 x g ohne Bremse PBMC von Erythrozyten und Granulozyten. Die gewünschte Zellschicht wurde vorsichtig abgenommen, mit PBS versetzt und 10 min bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet gründlich in PBS resuspendiert, um anschließend nochmals 10 min bei 4°C und 400 x g zu zentrifugieren. Der Überstand wurde ebenfalls verworfen und das entstandene Pellet in 1 ml PBS gelöst. Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zell-Proben mit Trypanblau versetzt und in einem Neubauer Haemozytometer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Germany) für die weiterführenden Versuche gezählt.

### 3.5 Durchflusszytometrische Analyse

Zur Bestimmung von extrazellulären Oberflächenmolekülen wurden isolierte PBMC zu je 1 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte ausgesät und anschließend mit verschiedenen Fluoreszenz-markierten monoklonalen Antikörpern (Tabelle 1) für 30 min auf Eis und im Dunkeln inkubiert. Um unspezifische Antikörperbindungen auszuschließen, wurden Isotypenkontrollen gleicher Spezies und Farben sowie humanes Pentaglobin verwendet. Nach einer anschließenden Zentrifugation bei 400 x g und 4°C für 2 min, wurde der Überstand verworfen und die Zellpellets mit Waschpuffer gewaschen. Es wurde wiederholt gewaschen, zentrifugiert und für die nachfolgende Analyse per Durchflusszytometer in Messpuffer gelöst.

Für eine zusätzliche Messung intrazellulärer Marker wurden einige Zellen nach der Oberflächenfärbung mit CD3 PE und CD56 APC mit 4% Paraformaldehyd (PFA) für 10 min auf Eis und im Dunkeln fixiert. Diese Zellen wurden bei 400 x g und 4°C für 2 min zentrifugiert, der Überstand wurde abpipettiert und Waschpuffer zugegeben, um mögliche PFA-Reste zu entfernen. Nach Zentrifugation wurden die Zellen durch Saponinpuffer perforiert, nochmals zentrifugiert und anschließend für 30 min auf Eis und im Dunkeln mit intrazellulären Antikörpern inkubiert. Darauf folgte mehrmaliges Waschen mit Saponinpuffer und Waschpuffer, bis schließlich auch diese Zellen für die Messung in Messpuffer gelöst wurden.

Die Proben wurden mit Hilfe der BD FACSDiva Flow Cytometry Software an einem LSR Fortessa analysiert und ausgewertet.

**Tabelle 1: Antikörper-Übersicht zur Nutzung in der Durchflusszytometrie.**

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma	Zielstruktur
CD3 PE	Maus	1:250	BD Biosciences	T-Lymphozyt
CD3 PE-Cy7	Maus	1:50	BD Biosciences	T-Lymphozyt
CD4 APC	Maus	1:250	BD Biosciences	CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyt
CD8 PE	Maus	1:500	BD Biosciences	CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyt
CD14 FITC	Maus	1:500	BD Biosciences	Monozyt
CD20 APC-H7	Maus	1:50	BD Biosciences	B-Lymphozyt
CD56 APC	Maus	1:100	BD Biosciences	NK-Zelle
Granzyme A FITC	Maus	1:100	BD Biosciences	Granzym A in NK-Zelle
IFN- $\gamma$ PE-Cy7	Maus	1:100	BD Biosciences	IFN- $\gamma$ in NK-Zelle
Ob-R Fluorescein	Maus	1:20	R&D Systems	Ob-R auf NK-Zelle
TRAIL PE	Maus	1:20	BD Biosciences	TRAIL auf NK-Zelle

Waschpuffer:  
 1 M PBS  
 1% BSA  
 0,1% Natriumazid

Messpuffer:  
 1 M PBS  
 0,1% BSA  
 0,1% Natriumazid

Saponin-Puffer:  
 0,1% 1 g·ml<sup>-1</sup> Saponin-Lösung  
 0,1% 1M HEPES  
 Aqua dest.

### 3.6 Analyse von Plasma Adipokinen und Zytokinen

Heparinisiertes Blut wurde bei 1000 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Plasma-Überstand wurde abgenommen, bei -80°C eingefroren und nach Studienende wurden alle Proben in einem Versuchsdurchlauf gemessen.

### 3.6.1 Prinzip

Das FlowCytomix™ Human Obesity 9plex Kit beruht auf einem Partikel-basierten Immunoassay mit anschließender durchflusszytometrischer Messung. Partikel (Beads) sind mit verschiedenen Antikörpern beschichtet, wobei es zwei Partikelgrößen (4 µm, 5 µm) gibt und diese mit verschiedenen Intensitäten eines Fluoreszenz-Farbstoffes gekoppelt sind. Dadurch lassen sich bis zu 20 verschiedene Analyte gleichzeitig in einer Probe detektieren. In dem benutzten Kit können 9 Adipozytokine nachgewiesen werden: humaner löslicher CD40 Ligand (*soluble CD40L*; sCD40L), lösliches *Intercellular Adhesion Molecule 1* (*soluble ICAM-1*; sICAM-1), IL-6, Leptin, MCP-1, Myeloperoxidase (MPO), OPG, Resistin sowie löslicher TNF-Rezeptor (*soluble TNF-R*; sTNF-R).

sCD40L ist ein löslicher Ligand, gehört zur TNF-Rezeptor Superfamilie und ist an der Pathophysiologie chronisch entzündlicher Erkrankungen beteiligt. Seine Serum-Spiegel sind mit dem BMI positiv korreliert und können durch Gewichtsverlust reduziert werden (Desideri und Ferri 2003; Scherthaner *et al.*, 2006; Unek *et al.*, 2010).

ICAM-1 spielt eine Schlüsselrolle in der Leukozyten-Adhäsion und Migration (Long 2011). Seine lösliche Form, sICAM-1, zirkuliert im Blut, stellt einen typischen Entzündungsmarker dar und zeigt erhöhte Werte in adipösen Personen, wobei es mit einer stammbetonten Adipositas korreliert (Targher *et al.*, 2001; Leinonen *et al.*, 2003).

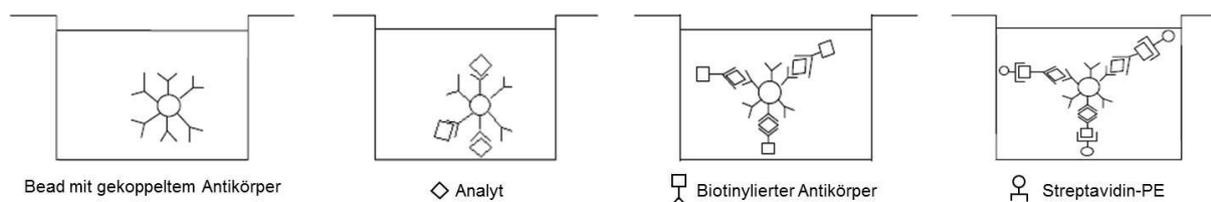
IL-6 ist ein Zytokin, das sowohl von Monozyten/Makrophagen als auch Muskelzellen produziert wird (Akira *et al.*, 1993). Es hat pro- und antiinflammatorische Effekte, erhöht die Lipolyse und die Fettsäure-Oxidation und seine nüchtern Plasma-Konzentrationen korrelieren positiv mit dem Grad der Adipositas (Vozarova *et al.*, 2001).

MPO kommt in der azidophilen Granula der Leukozyten vor und katalysiert die Bildung verschiedener reaktiver (auch radikaler) Sauerstoffspezies, welche eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Pathogenen und Parasiten spielen (Klebanoff 1980). Bei einer Fülle an Reaktionsprodukten entsteht oxidativer Stress, der bei einigen chronisch entzündlichen Erkrankungen (z.B. Arteriosklerose) eine Rolle spielt (Podrez *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002; Nicholls und Hazen 2009).

OPG ist ein lösliches Protein der TNF-Rezeptor Superfamilie (Simonet *et al.*, 1997), das u.a. als Rezeptor für TRAIL dient, von vielen Geweben wie auch dem Fettgewebe (An *et al.*, 2007) produziert wird und in Verbindung mit kardiovaskulären Erkrankungen steht (Jono *et al.*, 2002). Außerdem scheint es negativ mit dem BMI und dem Bauchumfang korreliert zu sein (Ashley *et al.*, 2011).

Das proinflammatorische Zytokin TNF-α übt seine Wirkung sowohl über TNF-R als auch über die lösliche Form, sTNF-R, aus, die in der Blutlaufbahn zirkuliert (Aderka *et al.*, 1992). sTNF-R ist bei Adipositas und vermehrter Fettmasse erhöht (Zahorska-Markiewicz *et al.*, 2000; Olszanecka-Glinianowicz *et al.*, 2011) und zeigte seine protektive Wirkung gegenüber der Adipositas-induzierten Insulin-Resistenz in *Knockout* Mäusen (Romanatto *et al.*, 2009).

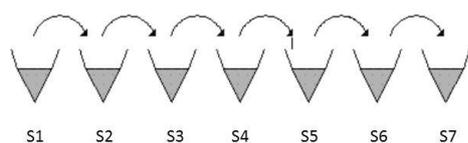
Proben und Standardlösungen werden, wie in Abbildung 4 dargestellt, mit den beschichteten Beads inkubiert, wobei die Antikörper an die zu bestimmenden Analyte binden. Hinzu kommt ein Biotin-konjugierter zweiter Antikörper, der sich an den ersten koppelt, und in einem weiteren Inkubationsschritt wird der Fluoreszenzfarbstoff Streptavidin-Phycoerythrin (-PE) hinzugefügt, der an das Biotin-Antikörper-Gemisch bindet.



**Abbildung 4: Prinzip des FlowCytomix** ([www.ebioscience.de](http://www.ebioscience.de)).

### 3.6.2 Versuchsdurchführung

Vor Versuchsbeginn wurde das Assay Buffer Concentrate (10x) im Verhältnis 1:10 mit autoklaviertem Wasser vermischt, um so einen 1x Assay Buffer zu erhalten. Die Standard-Zytokine waren lyophilisiert und wurden nach Zentrifugation in Aqua dest. gelöst. Der Inhalt wurde durch Schnipsen gemischt und 30 min bis zur vollständigen Lösung inkubiert. Für die Standard-Verdünnungen wurden jeweils 10 µl der gelösten Standard-Zytokine in das S1-Reaktionsgefäß pipettiert (Abbildung 5) und mit Assay Buffer auf 200 µl Volumen aufgefüllt. Das entsprach einer 1:20 Verdünnung eines jeden Zytokins. S2 bis S7 wurden mit 100 µl Assay Buffer befüllt. Anschließend wurden aus dem gut vermischten S1-Reaktionsgefäßes 50 µl in S2 pipettiert, S2 gut gemischt und daraus wiederum 50 µl in S3 gegeben. Dies wurde bis S7 fortgeführt. Auch der Bead-Zytokin-Mix wurde vorbereitet, indem jedes Zytokin-Gemisch im Verhältnis 1:20 pipettiert und mit Reagent Dilution Buffer (RDB) auf das benötigte Endvolumen aufgefüllt wurde. Dieses Gemisch wurde nachfolgend für 5 min bei 3000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und wiederum in gleichem RDB-Volumen resuspendiert, sodass schließlich 25 µl Bead-Mix pro Well pipettiert werden konnten. Nach gleicher Prozedur wurde der Konjugat-Mix vorbereitet, wobei 50 µl Volumen für jedes Well benötigt wurden.



**Abbildung 5: Verdünungsschema der Standard-Zytokine** ([www.ebioscience.de](http://www.ebioscience.de)).

Wenn alle Vorbereitungen abgeschlossen waren, wurden 50 µl Assay Buffer in jedes Well der Platte pipettiert und per Vakuum abgesaugt. Danach wurden die Standard-Verdünnungen S1-S7 sowie Assay Buffer als Blank-Wert auf der Platte verteilt. Für spätere Einstellungen zur Messung wurde ein zusätzliches Well mit S1 befüllt. In alle restlichen Wells wurden je 25 µl zu untersuchende Probe pipettiert. Auf alle Wells wurden nun 25 µl Bead-Mix und 50 µl Konjugat-Mix gegeben und für 2 h im Dunkeln auf einem Schüttler inkubiert.

In dieser Zeit wurde die Streptavidin-PE-Lösung hergestellt, indem Streptavidin-PE im Verhältnis 1:31,25 mit Assay Buffer verdünnt und bis zur weiteren Verwendung dunkel und auf Eis gelagert wurde. Nach 2-stündiger Inkubationszeit wurde die Platte per Vakuum leergesaugt und die Wells mehrmals mit 100 µl Assay Buffer gewaschen. Daraufhin wurden 50 µl Streptavidin-PE-Lösung in jedes Well gegeben und die Platte für 1 h schüttelnd im Dunkeln inkubiert. Wiederum wurden die

Wells mit Assay Buffer gewaschen sowie anschließend mit 200 µl Assay Buffer ausgespült und das Volumen in FACS-Röhrchen überführt. Die Proben wurden an einem LSR Fortessa gemessen und mit Hilfe der FlowCytomix Pro Software ausgewertet.

### 3.7 Proteinisolation

Isolierte PBMC wurden zentrifugiert und PBS-Überstände entfernt. 100 µl 1x Triton X-100 im Verhältnis 1:100 mit Protease und Phosphatase Inhibitor Cocktail vermenget und zu je  $1 \times 10^6$  PBMC gegeben, gevortext und 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde noch einmal gut gemischt und 15 min bei 4°C und 13.000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden nachfolgend in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

### 3.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des Micro BCA™ Protein Assay Kits bestimmt. Diese Methode verwendet Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid*, BCA) als Detektionsreagenz für Kupfer-Ionen ( $\text{Cu}^{1+}$ ), welche sich bilden, wenn  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen durch Proteine in alkalischer Umgebung reduziert werden. Durch Chelatkomplex-Bildung aus zwei Molekülen BCA mit einem  $\text{Cu}^{1+}$ -Ion entsteht ein violett-gefärbtes Reaktionsprodukt, welches eine starke Absorption bei 562 nm aufweist.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein mitgelieferter Bovines Serumalbumin (BSA)-Standard in einer Reihe verdünnt. Für die Arbeitslösung (*Working Reagent*, WR) wurden 25 Teile Reagenz MA, 24 Teile MB und ein Teil MC vermenget. In einer 96-Well-Platte wurden 150 µl Standard- oder Probenvolumen pipettiert sowie 150 µl WR und die Platte anschließend 30 s auf einem Schüttler durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 37°C wurde die Platte auf Raumtemperatur heruntergekühlt und die Absorption bei 562 nm im Synergy™ Mx Plattenreader gemessen. Zur Auswertung der Daten wurde von allen gemessenen Proben der Leerwert subtrahiert und nach Erstellung einer Standardkurve die Proteinkonzentrationen der zu untersuchenden Proben bestimmt.

### 3.9 Western Blot

Für die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteingemische wurden Sammel- und Trenngele (Tabelle 2) in Kassetten gegossen und über Nacht auspolymerisiert.

**Tabelle 2: Sammel- und Trenngel**

	Sammelgel (4%)	Trenngel (12%)
0,5 M TRIS-HCl (pH 6,8)	1 ml	-
1,5 M TRIS-HCl (pH 8,8)	-	1,9 ml
Aqua dest.	6,88 ml	5,4 ml
Acrylamid (40%)	1 ml	2,5 ml
SDS (10%)	100 µl	100 µl
APS (10%, 60 mg·ml <sup>-1</sup> )	100 µl	100 µl
TEMED	15 µl	15 µl

#### 3.9.1 Benötigte Puffer und Substanzen:

5fach Lämmli-Ladepuffer	25 ml Glycerin 15,62 ml TRIS-HCl (1M, pH 6,8) β-Mercaptoethanol 5 g SDS 2,5 g Bromphenolblau → mit Aqua dest. auf 50 ml auffüllen
10x Lämmli-Puffer (zur Taschenbeladung)	30,25 g TRIS (MW=121,14 g·mol <sup>-1</sup> ) 144,25 g Glycin 10 g SDS → mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen
1x Lämmli-Puffer	100 ml 10x Lämmli-Puffer → mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen
TBS bzw. TBS-T	8 g NaCl 0,2 g KCl 3 g TRIS → pH 7,4 einstellen und mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen Für TBS-T 1 ml Tween zugeben und gut schütteln.

12,5x Transferpuffer	18,2 g TRIS 90 g Glycin → mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen (pH 8,3 prüfen)
1x Transferpuffer	80 ml 12,5x Transferpuffer 200 ml Methanol → mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen und 2 ml 10% SDS zugeben
Coomassie Färbelösung	25% Isopropanol 10% Essigsäure 0,05% Coomassie Brilliantblau
Ponceau Färbelösung	0,2% Ponceau S 1% Essigsäure Die Gebrauchslösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnen.

Gleiche Volumina der zu untersuchenden Proteinproben wurden mit 5fach Lämmli-Ladepuffer im Verhältnis 1:5 verdünnt, vermischt und 10 min im 70°C warmen Wasserbad zur Proteindenaturierung inkubiert. Anschließend wurden die Proben gevortext und kurz zentrifugiert. Die Acrylamidgel-Kassetten wurden in die XCell SureLock® Mini-Cell Kammer gespannt, mit 1x Lämmli-Puffer gefüllt, 5 µl Molekulargewichts-Standard und 5 µg Referenzprotein (humane Leberzelllinie SK Hep-1 (Heffelfinger *et al.*, 1992)) in je eine Tasche gegeben und die restlichen Taschen mit den vorbereiteten Proben befüllt. Für die Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE) lief das Sammelgel bei 120 V ca. 30 min und für die folgende Proteintrennung ca. 1,5 h bei 160 V. Mit Hilfe des *Semidry-Blottings* wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulose Membran (Hybond Membrane) übertragen. In Abbildung 6 ist der Versuchsaufbau dargestellt: zwischen den mit Transferpuffer befeuchteten Filterpapieren wurden Membran und Gel übereinandergelegt, Anode sowie Kathode angeschlossen und 2 h eine Stromstärke von 150 mA angestellt.

Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die Membran in Ponceau- und das Gel in Coomassie-Färbelösung für wenige Minuten gelegt. Nach Entfärbung mit Aqua dest. konnte die Übertragung überprüft und gegebenenfalls Proteinreste auf dem Gel angefärbt werden. Nun wurde anhand der Größen-Marker die Membran in zwei Teilstücke geschnitten, um verschieden große Proteine gleichzeitig nachweisen zu können.

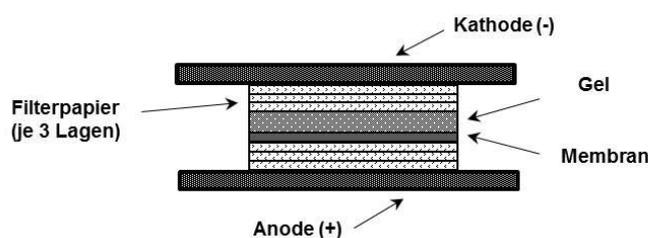


Abbildung 6: Versuchsaufbau des Semidry-Blots.

Die Membran wurde nach dem Proteintransfer mit 5% Milchpulver in TBS-T für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, um freie, unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Der Primärantikörper (Tabelle 3) wurde in 5% Milchpulver oder 5% BSA in TBS-T verdünnt, für 1 h bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben und schließlich über Nacht in einer feuchten Kammer im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Morgen wurde die Membran 3 x 5 min in TBS-T gewaschen und für 1 h mit dem verdünnten *Horseradish Peroxidase* (HRP)-konjugierten Sekundärantikörper (Tabelle 3) bei Raumtemperatur und ebenfalls in einer feuchten Kammer inkubiert. Im Anschluss daran wurde 3 x 5 min mit TBS-T und 2 x 5 min mit TBS gewaschen, um nachfolgend die Membran mit ECL Prime Western Blotting Detection Reagent 5 min im Dunkeln zu inkubieren und darauf befindliche Proteine am Fusion Fx7 mittels Chemilumineszenz zu detektieren. Um auf den gleichen Membranen auch die unphosphorylierten Proteine nachzuweisen, wurden die Membranen mit Hilfe eines Restore Western Blot Stripping Buffer und einem selbst hergestellten Stripping Buffer (siehe Seite 27) von zuvor verwendeten Antikörpern befreit. Daraufhin erfolgte eine 20 minütige Blockierung mit 5% Milchpulver in TBS-T, sowie die Inkubation des primären und sekundären Antikörpers (Tabelle 3). Abschließend wurde  $\beta$ -Aktin (Tabelle 3) nach obigem Protokoll als Haushaltsgen nachgewiesen. Zur Auswertung der Proteinbanden wurde die Fusion Capt-Software verwendet. Grundsätzlich wurden die Banden gegen  $\beta$ -Aktin-Banden bzw. phosphoryliertes gegen unphosphoryliertes Protein abgeglichen, um Ladungsdifferenzen auszugleichen. Um Proben verschiedener Gele miteinander vergleichen zu können, wurde zusätzlich die Relation zum Referenzprotein gesetzt.

**Tabelle 3: Primär- und Sekundärantikörper**

**Primärantikörper**

Antikörper	Spezies	eingesetzte Verdünnung	Verdünnungs-medium	Firma
ERK 1/2	Kaninchen	1:1000	5% BSA in TBS-T	
pERK 1/2	Kaninchen	1:500	5% BSA in TBS-T	New England BioLabs GmbH, Frankfurt/Main, Deutschland
STAT3	Kaninchen	1:1000	5% BSA in TBS-T	
pSTAT3	Kaninchen	1:500	5% BSA in TBS-T	
$\beta$ -Aktin	Maus	1:40000	5% Milch in TBS-T	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA

**Sekundärantikörper**

Antikörper	Spezies	eingesetzte Verdünnung	Verdünnungs-medium	Firma
Anti-Maus IgG	Ziege	1:20000	5% Milch in TBS-T	dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Anti-Kaninchen IgG	Ziege	1:2000-1:10000	5% BSA in TBS-T	New England BioLabs GmbH, Frankfurt/Main, Deutschland

Stripping Buffer	20 ml 10% SDS
	12,5 ml 0,5 M TRIS-HCl pH 6.8
	700 µl β-Mercaptoethanol
	→ mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen

### 3.10 Zelllinien und Kultivierung

Die humane Kolon-Adenokarzinom-Zelllinie DLD-1 wurde freundlicherweise von Herrn Dr. rer. nat. Thomas Müller aus der Klinik für Innere Medizin IV, Abteilung Hämatologie und Onkologie, des Universitätsklinikums Halle (Saale) zur Verfügung gestellt. Die Zellen stammen ursprünglich von einem 45-jährigen Patienten mit Adenokarzinom des Colon sigmoideum (Dexter *et al.*, 1979). Die Kultivierung erfolgte in RPMI-Medium 1640 unter Zusatz von 10% fetales Kälberserum (FKS), 100 U·ml<sup>-1</sup> Penicillin und 100 µg·ml<sup>-1</sup> Streptomycin in einem Inkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> sowie 95% Luftfeuchtigkeit. Die Kolon-Adenokarzinom-Zellen wachsen adhärent als *Monolayer* und wurden bei 80% Konfluenz für weitere Versuche genutzt. Der Mediumwechsel erfolgte zweimal die Woche und das Umsetzen der Zellen in neue Zellkulturflaschen wurde im Verhältnis 1:7 durchgeführt.

Die humane NK-Zelllinie NK-92 wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Roland Jacobs aus der Klinik für Immunologie und Rheumatologie der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt. Sie stammt von einem Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom (Gong *et al.*, 1994), wächst im Gegensatz zur DLD-1 Zelllinie als Suspensionskultur und ist nicht adhärent. Die NK-Zellen wurden in RPMI-Medium 1640 mit 10% FKS, 100 U·ml<sup>-1</sup> Penicillin, 100 µg·ml<sup>-1</sup> Streptomycin sowie 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin und 200 U·ml<sup>-1</sup> humanes, rekombinantes Interleukin-2 unter den gleichen Bedingungen wie die DLD-1 Zelllinie kultiviert. Hier erfolgte der Mediumwechsel ebenfalls zweimal pro Woche und für eine neue Passage wurden die Zellen im Verhältnis 1:4 mit frischem Medium versetzt.

### 3.11 NK-Zell vermittelter Zytotoxizitätsassay

#### Prinzip

Das DELFIA<sup>®</sup> Cell Cytotoxicity Kit weist Zell-vermittelte Zellzytotoxizität nach, indem die Zielzellen mit Bis(Acetoxyethyl)2,2':6',2"-Terpyridin-6,6"-Dicarboxylat (BATDA), einem Fluoreszenz-verstärkenden Liganden, inkubiert werden. Diese hydrophobe Acetoxyethylester-Verbindung diffundiert passiv durch die Zellmembran und gelangt so ins Innere der Zelle, wo es durch Acetylästerasen zu dem hydrophilen Liganden 2,2':6',2"-Terpyridin-6,6"-Dicarboxylsäure (TDA) hydrolysiert und nun nicht mehr membrangängig ist (Abbildung 7). Nach Zugabe von Effektorzellen und einer erfolgten Zytolyse der Zielzellen wird TDA freigesetzt und bildet nach Addition der DELFIA Europium Solution einen stabilen und stark fluoreszierenden Chelatkomplex (EuTDA), der schließlich photometrisch gemessen werden kann (Abbildung 8). Findet keine Zelllyse durch die Effektorzellen statt und die Zielzellen bleiben intakt, wird keine Fluoreszenz detektiert, da Europium Lösung kein Licht emittiert. Dieses Verfahren

verwendet keine radioaktiven Substanzen im Gegensatz zum konventionellen *Chromium-Release Assay*.

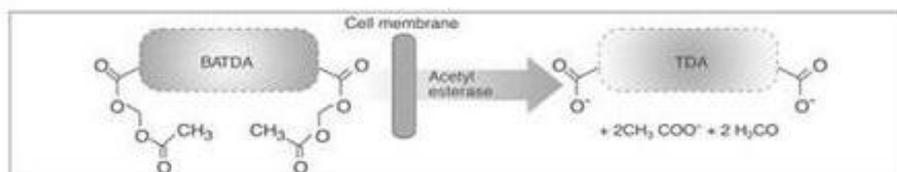


Abbildung 7: Hydrolyse zu TDA nach BATDA-Zugabe ([www.perkinelmer.de](http://www.perkinelmer.de)).

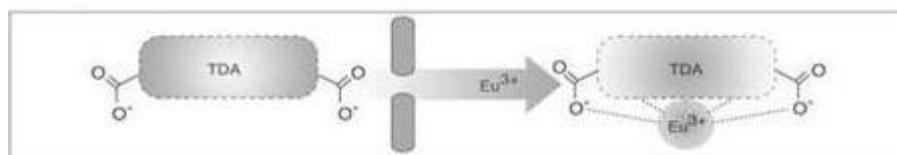


Abbildung 8: EuTDA-Komplexbildung nach Zugabe der Europium Solution ([www.perkinelmer.de](http://www.perkinelmer.de)).

### 3.11.1 Versuchsdurchführung

Zur Bestimmung der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität wurde das DELFIA® EuTDA Cytotoxicity Reagents Kit entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Zu Beginn des Versuchs wurden die Effektorzellen NK-92 in einem Röhrchen abzentrifugiert, gezählt und auf 2,5 Mio. Zellen pro ml eingestellt. Diese Zellen wurden entweder mit verschiedenen rekombinanten, humanen Leptin-Konzentrationen für 4 h stimuliert ( $10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) oder blieben als Kontrollen unstimuliert. Die Versuche wurden jeweils in 5 unabhängigen Experimenten mit je  $n=4$  durchgeführt.

Kurz vor Ende der Inkubationszeit wurden die DLD-1 Zellen, die Zielzellen, vorbereitet, indem diese aus einer großen Zellkulturflasche mit Trypsin gelöst, RPMI-Medium 1640 hinzugegeben, abzentrifugiert und schließlich auf eine Konzentration von 1 Mio. Zellen pro ml Medium eingestellt wurden. Zu 3 ml Zellsuspension wurden 5  $\mu\text{l}$  BATDA-Reagenz hinzugefügt und unter gelegentlichem Schwenken des Röhrchens bei  $37^\circ\text{C}$  für 15 min inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen erneut für 3 min bei  $200 \times g$  zentrifugiert und in neuem Medium resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt dreimal wiederholt. Nach einer Ruhephase von 30 min im Brutschrank wurden die Zellen zentrifugiert und auf 50.000 Zellen pro ml Medium eingestellt. Eine Probe der Zellsuspension wurde abzentrifugiert und der Überstand zur Hintergrund-Bestimmung der 96-Well-Platte genutzt.

Nach Inkubation der NK-92 Zellen wurden diese zentrifugiert und in 1 ml frischem Medium gelöst (2,5 Mio. Zellen pro ml). Zudem wurde ein Lysepuffer zur Bestimmung der maximalen Zellyse als quantitativer Vergleich im Wasserbad auf  $37^\circ\text{C}$  erwärmt.

In einer V-Boden-Platte wurden verschiedene Lösungen pipettiert: Hintergrund-Wells (100  $\mu\text{l}$  DLD-1 Überstand + 100  $\mu\text{l}$  Medium), Spontanlyse-Wells (100  $\mu\text{l}$  DLD-1 Zellen + 100  $\mu\text{l}$  Medium), Maximallyse-Wells (100  $\mu\text{l}$  DLD-1 Zellen + 70  $\mu\text{l}$  Medium + 30  $\mu\text{l}$  Lysepuffer bzw. 100  $\mu\text{l}$  DLD-1 Zellen + 90  $\mu\text{l}$  Medium + 10  $\mu\text{l}$  5% Triton X-100) sowie Wells mit den Leptin-stimulierten und unstimulierten

NK-92 mit DLD-1 Zellen im Verhältnis 3:1. Die fertig pipettierte Platte wurde für 2 min bei 100 x g zentrifugiert und 1 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in der Platte für 5 min bei 500 x g zentrifugiert und jeweils 20 µl der Zellüberstände in eine Flachboden 96-Well-Platte des Kits überführt, je 200 µl Europium Lösung hinzugegeben und 15 min schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert.

Das Fluoreszenz-Signal wurde mit Hilfe des Synergy™ Mx Photometer bei 340/615 nm detektiert und korrelierte direkt mit Menge an lysierten Zellen. Kalkuliert wurde die spezifische Lyse über die Formel:

$$\text{Spezifische Lyse [\%]} = \frac{\text{Experimentelle Lyse} - \text{Spontane Lyse}}{\text{Maximale Lyse} - \text{Spontane Lyse}} \times 100$$

### 3.12 Statistische Auswertungen

Die Auswertungen der statistisch erhobenen Daten erfolgte mittels Student's *t*-Test (bezüglich Zellkultur-Versuche) oder zweifaktorieller Varianzanalyse (*two-way* ANOVA) der GraphPad Prism 5.01 Software. Faktoriell wurden in der *two-way* ANOVA Geschlecht x Zeitpunkt und Intervention x Zeitpunkt betrachtet, wobei statistische Unterschiede mit dem Bonferroni Post-hoc Test bewertet und bei  $p < 0,05$  als signifikant betrachtet wurden. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (*standard error of the mean*; SEM) oder als Mediane (Minimum zu Maximum) dargestellt; Signifikanzen wurden mit Sternchen (\*) oder Raute (#) gekennzeichnet.

## 4 Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurden Daten zu verschiedenen Zeitpunkten erhoben: zu Studienbeginn (Baseline), nach einem Monat Studiendauer, nach 3 Monaten Studiendauer (Studienende) und 3 Monate nach Studienende. Die anthropometrischen, metabolischen und sportlichen Messwerte werden zu Studienbeginn und -ende präsentiert. Erste Veränderungen auf zellulärer und molekularer Ebene sind bereits nach Studienende detektierbar, wohingegen Signifikanzen erst 3 Monate nach Studienende sichtbar werden. Aufgrund der Übersichtlichkeit werden nicht alle Messergebnisse in jeder Abbildung präsentiert. Durch terminliche, persönliche und wissenschaftliche Hintergründe können nicht alle Probandinnen und Probanden zu jedem Zeitpunkt in die Messung und Auswertung einbezogen werden.

### 4.1 Studienpopulation, anthropometrische und metabolische Parameter

Die experimentelle Gruppe der Studie bestand aus 8 Probanden und 11 Probandinnen mit durchschnittlich 50 Lebensjahren (Tabelle 4). Die Männer reduzierten während der Studie ihr Gewicht, ihren BMI, ihren Taillen- und Hüftumfang sowie ihre Fettmasse hoch signifikant ( $P < 0,001$ ), während die Frauen ebenso signifikante Veränderungen ( $P < 0,01$ ) der genannten anthropometrischen Parameter im Vergleich zum Studienbeginn (Baseline) aufwiesen (Tabelle 4). Die Männer verloren innerhalb der 3-monatigen Studiendauer durchschnittlich 10 kg ihres Körpergewichts, was mit der Fettmassereduktion um 10 kg fast gleichzusetzen ist. Verglichen zur Baseline, hatte die Intervention keinen signifikanten Effekt auf das Taillen-Hüftumfang-Verhältnis und die Magermasse bei beiden Geschlechtern. Einen signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern konnte nach Studienende hinsichtlich des Hüftumfangs und der Fettmasse verzeichnet werden. Grundsätzlich zeigte sich zwischen den Geschlechtern eine Signifikanz bezüglich Taillen-Hüftumfang-Verhältnis und Magermasse zu beiden Messzeitpunkten. Die Probanden der experimentellen Gruppe konnten ihren Glukose-Spiegel nach dem 3-monatigen Sport- und Ernährungsprogramm signifikant im Vergleich zum Ausgangswert senken. Bis auf einen geschlechtsspezifischen signifikanten Unterschied für die HDL-Cholesterol Fraktion zu Studienbeginn gab es keine Veränderungen für das Gesamtcholesterol, seine Fraktionen HDL- und LDL-Cholesterol sowie die Triglyzeride im Blut-Plasma innerhalb der Gruppen.

In Tabelle 5 ist die Kontrollgruppe hinsichtlich ihrer anthropometrischen und metabolischen Parameter dargestellt. Es gab keine Veränderungen hinsichtlich der Körpermaße und -massen bei weiblichen und männlichen Studienteilnehmern innerhalb der Gruppen. Signifikante Unterschiede waren lediglich zwischen beiden Geschlechtern bezüglich des Gewichts, des Taillen-Hüftumfang-Verhältnisses und der Magermasse zu verzeichnen. In der männlichen Kontrollgruppe erhöhte sich das LDL-Cholesterol signifikant, wohingegen das HDL-Cholesterol in der weiblichen Kontrollgruppe signifikant im Vergleich zur Baseline sank. Außerdem hatten die weiblichen Kontrollpersonen einen signifikant erhöhten HDL-Cholesterol Spiegel im Vergleich zu den männlichen Kontrollen.

**Tabelle 4: Übersicht der experimentellen Gruppe**

	Männer		Frauen	
<i>Studienpopulation</i>				
Anzahl (n)	8		11	
Alter [Jahre]	48,8 ± 3,3		46,8 ± 3,4	
	Baseline	Studienende	Baseline	Studienende
<i>Anthropometrische Parameter</i>				
Gewicht [kg]	102,7 ± 3,6	92,6 ± 4,4 <sup>***</sup>	92,1 ± 3,3	87,7 ± 3,5 <sup>**</sup>
BMI [kg·m <sup>-2</sup> ]	32,7 ± 0,8	29,4 ± 1,1 <sup>***</sup>	32,3 ± 0,7	30,8 ± 0,8 <sup>**</sup>
Taillenumfang [cm]	110,6 ± 2,5	100,1 ± 3,4 <sup>***</sup>	105,9 ± 1,6	100,7 ± 2,2 <sup>**</sup>
Hüftumfang [cm]	113,9 ± 2,4	105,9 ± 2,0 <sup>***</sup>	118,3 ± 1,8	113,9 ± 2,5 <sup>** #</sup>
Taillen-Hüftumfang-Verhältnis	0,97 ± 0,01	0,94 ± 0,02	0,90 ± 0,01 <sup>##</sup>	0,89 ± 0,02 <sup>#</sup>
Fettmasse [kg]	34,4 ± 2,3	24,2 ± 3,2 <sup>***</sup>	39,3 ± 2,1	34,7 ± 2,1 <sup>** #</sup>
Magermasse [kg]	68,3 ± 1,8	68,4 ± 1,9	52,8 ± 1,7 <sup>###</sup>	52,8 ± 1,8 <sup>###</sup>
<i>Metabolische Parameter</i>				
Glukose [mmol·l <sup>-1</sup> ]	5,88 ± 0,36	4,89 ± 0,30 <sup>**</sup>	5,13 ± 0,15	4,95 ± 0,27
Gesamtcholesterol [mmol·l <sup>-1</sup> ]	4,98 ± 0,19	4,49 ± 0,30	5,50 ± 0,54	5,08 ± 0,27
HDL-Cholesterol [mmol·l <sup>-1</sup> ]	1,71 ± 0,09	1,67 ± 0,08	2,13 ± 0,09 <sup>##</sup>	1,95 ± 0,10
LDL-Cholesterol [mmol·l <sup>-1</sup> ]	2,60 ± 0,18	2,19 ± 0,24	2,68 ± 0,52	2,42 ± 0,25
Triglyzeride [mmol·l <sup>-1</sup> ]	1,46 ± 0,08	1,39 ± 0,09	1,52 ± 0,12	1,57 ± 0,11

Die Werte entsprechen Mittelwerten ± SEM; \*\**P* < 0,01, \*\*\**P* < 0,001 im Vergleich zur Baseline innerhalb einer Gruppe; #*P* < 0,05, ##*P* < 0,01, ###*P* < 0,001 im Vergleich zur männlichen experimentellen Gruppe zum gleichen Zeitpunkt.

**Tabelle 5: Übersicht der Kontrollgruppe**

	Männer		Frauen	
<i>Studienpopulation</i>				
Anzahl (n)	6		7	
Alter [Jahre]	49,8 ± 5,8		48,5 ± 5,5	
	Baseline	Studienende	Baseline	Studienende
<i>Anthropometrische Parameter</i>				
Gewicht [kg]	109,3 ± 6,1	109,3 ± 6,1	84,1 ± 3,5 <sup>##</sup>	83,7 ± 3,7 <sup>##</sup>
BMI [kg·m <sup>-2</sup> ]	32,3 ± 1,8	32,3 ± 1,8	31,8 ± 1,0	31,6 ± 1,0
Taillenumfang [cm]	113,0 ± 3,3	113,4 ± 3,1	104,0 ± 2,7	103,4 ± 2,6
Hüftumfang [cm]	115,8 ± 3,1	114,4 ± 3,5	115,0 ± 2,2	113,3 ± 1,5
Taillen-Hüftumfang-Verhältnis	0,98 ± 0,02	0,99 ± 0,02	0,90 ± 0,01 <sup>#</sup>	0,91 ± 0,01 <sup>##</sup>
Fettmasse [kg]	31,4 ± 4,4	31,3 ± 2,8	34,3 ± 2,1	34,8 ± 2,1
Magermasse [kg]	77,9 ± 2,4	77,2 ± 4,3	49,8 ± 1,7 <sup>###</sup>	48,8 ± 1,9 <sup>###</sup>
<i>Metabolische Parameter</i>				
Glukose [mmol·l <sup>-1</sup> ]	5,54 ± 0,47	5,46 ± 0,23	5,38 ± 0,23	4,97 ± 0,21
Gesamtcholesterol [mmol·l <sup>-1</sup> ]	4,89 ± 0,27	5,39 ± 0,15	5,27 ± 0,31	5,40 ± 0,23
HDL-Cholesterol [mmol·l <sup>-1</sup> ]	2,10 ± 0,12	1,85 ± 0,08	2,91 ± 0,25 <sup>#</sup>	2,57 ± 0,22 <sup>* #</sup>
LDL-Cholesterol [mmol·l <sup>-1</sup> ]	1,99 ± 0,20	2,76 ± 0,14 <sup>**</sup>	1,73 ± 0,35	2,12 ± 0,29
Triglyzeride	1,76 ± 0,18	1,72 ± 0,08	1,38 ± 0,11	1,57 ± 0,15

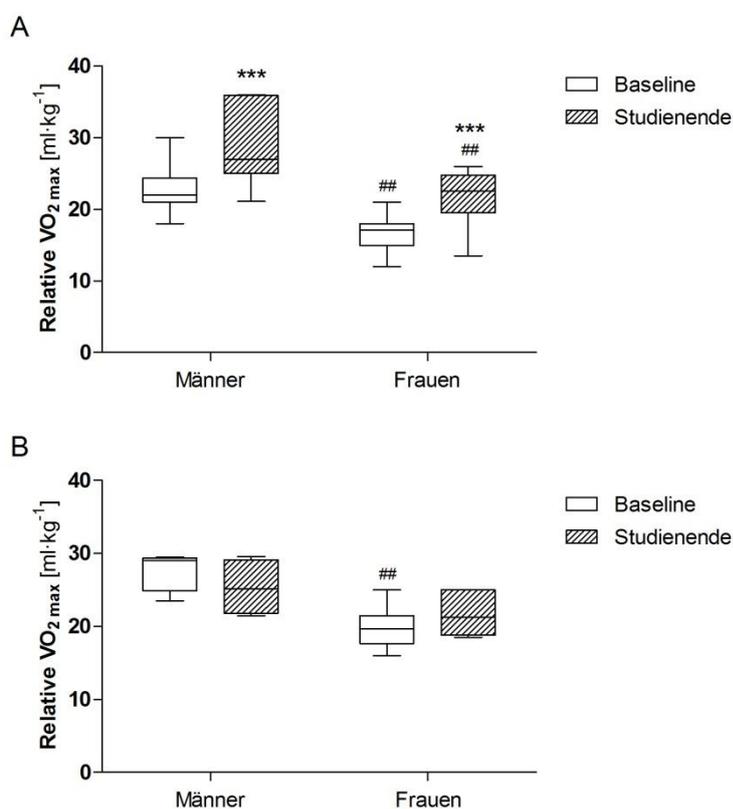
Die Werte entsprechen Mittelwerten ± SEM; \**P* < 0,05, \*\**P* < 0,01 im Vergleich zur Baseline innerhalb einer Gruppe; #*P* < 0,05, ##*P* < 0,01, ###*P* < 0,001 im Vergleich zur männlichen Kontrollgruppe zum gleichen Zeitpunkt.

## 4.2 Parameter der körperlichen Leistungsfähigkeit

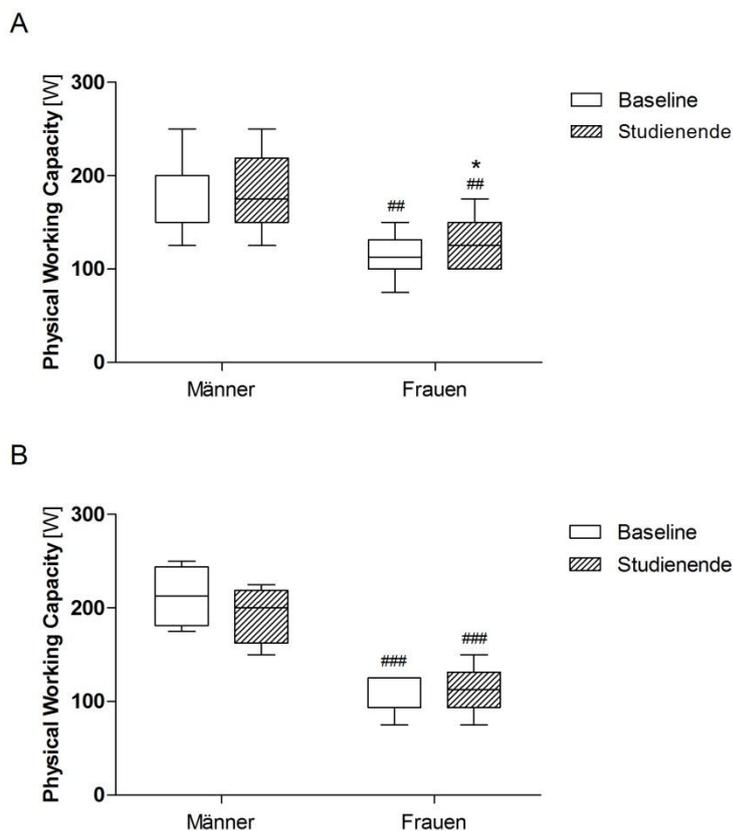
Zu den gemessenen Parametern der körperlichen Leistungsfähigkeit gehören die relative maximale Sauerstoffaufnahme (rel.  $VO_{2\max}$ ) und die körperliche Leistungsfähigkeit (PWC).

Die in Abbildung 9 A dargestellte rel.  $VO_{2\max}$  der experimentellen Gruppen stieg in beiden Geschlechtern nach der Intervention signifikant an. Zu Studienbeginn und -ende zeigte sich bei den Probanden eine signifikant höhere rel.  $VO_{2\max}$  im Vergleich zu den Probandinnen. Abbildung 9 B zeigt die rel.  $VO_{2\max}$  der Kontrollgruppen, die bis auf eine Signifikanz zwischen den Geschlechtern zu Beginn der Studie keine weiteren signifikanten Unterschiede aufweist.

Die Studienteilnehmerinnen der experimentellen Gruppe besitzen eine signifikant geringere PWC zu beiden Messzeitpunkten im Vergleich zu den Studienteilnehmern, jedoch konnten sie diese während der Studie signifikant erhöhen (Abbildung 10 A). In Abbildung 10 B sind keine Signifikanzen innerhalb der Kontrollgruppen sichtbar, aber auch hier zeigt sich ein signifikanter Geschlechtereinfluss vor und nach Intervention.



**Abbildung 9: Relative maximale Sauerstoffaufnahme (rel.  $VO_{2\max}$ )** der männlichen und weiblichen experimentellen Gruppe (A) und der Kontrollgruppe (B) zu Studienbeginn (Baseline) und Studienende. Die Werte entsprechen den Medianen (Minimum bis Maximum); \*\*\* $P < 0,001$  im Vergleich zur Baseline innerhalb einer Gruppe; ## $P < 0,01$  im Vergleich zur männlichen experimentellen bzw. Kontrollgruppe zum gleichen Zeitpunkt.

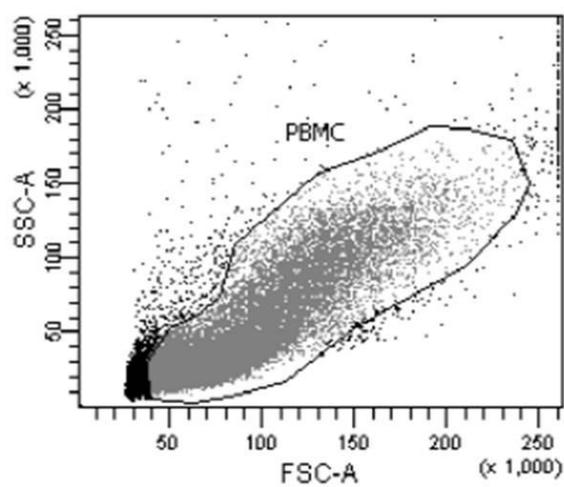
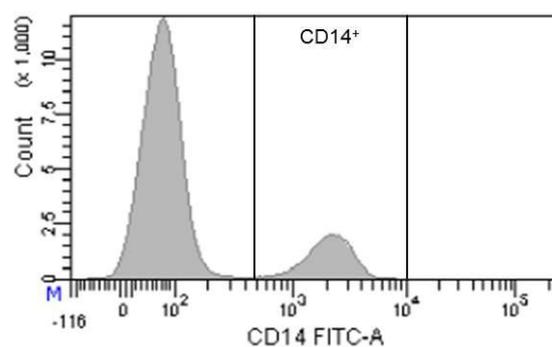
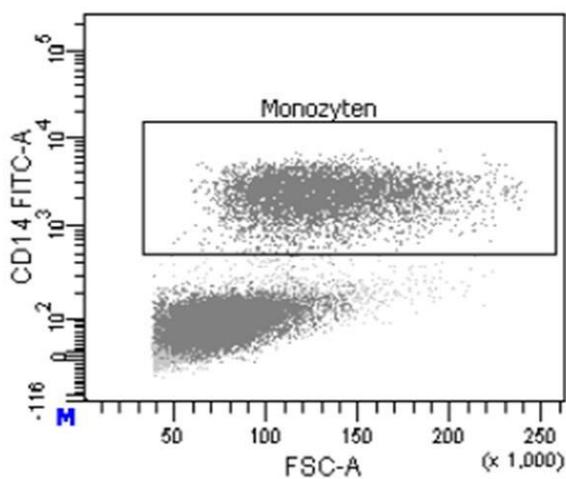
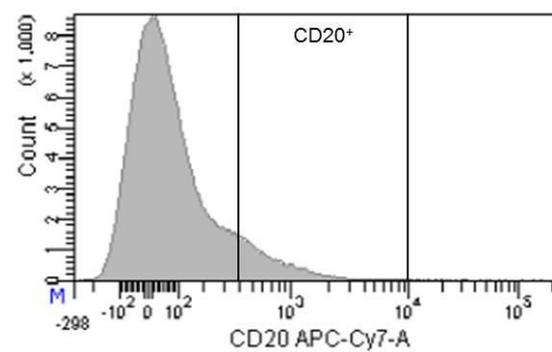
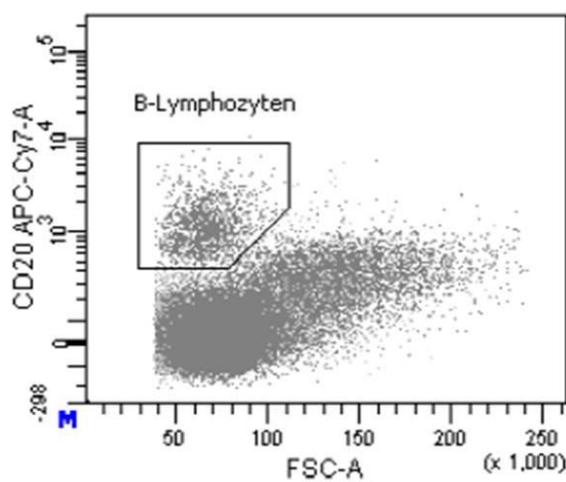


**Abbildung 10: Physical Working Capacity (PWC)** der männlichen und weiblichen experimentellen Gruppe (A) und der Kontrollgruppe (B) zu Studienbeginn (Baseline) und Studienende. Die Werte entsprechen den Medianen (Minimum bis Maximum); \* $P < 0,05$  im Vergleich zur Baseline innerhalb einer Gruppe; ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  im Vergleich zur männlichen experimentellen bzw. Kontrollgruppe zum gleichen Zeitpunkt.

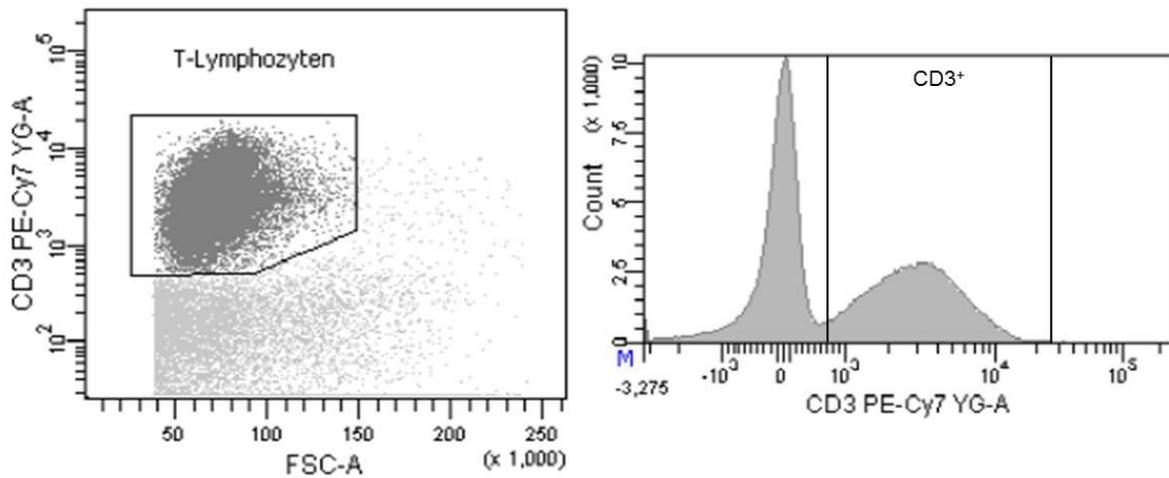
## 4.3 Veränderungen der PBMC-Populationen

### 4.3.1 Messung verschiedener PBMC-Populationen im Durchflusszytometer

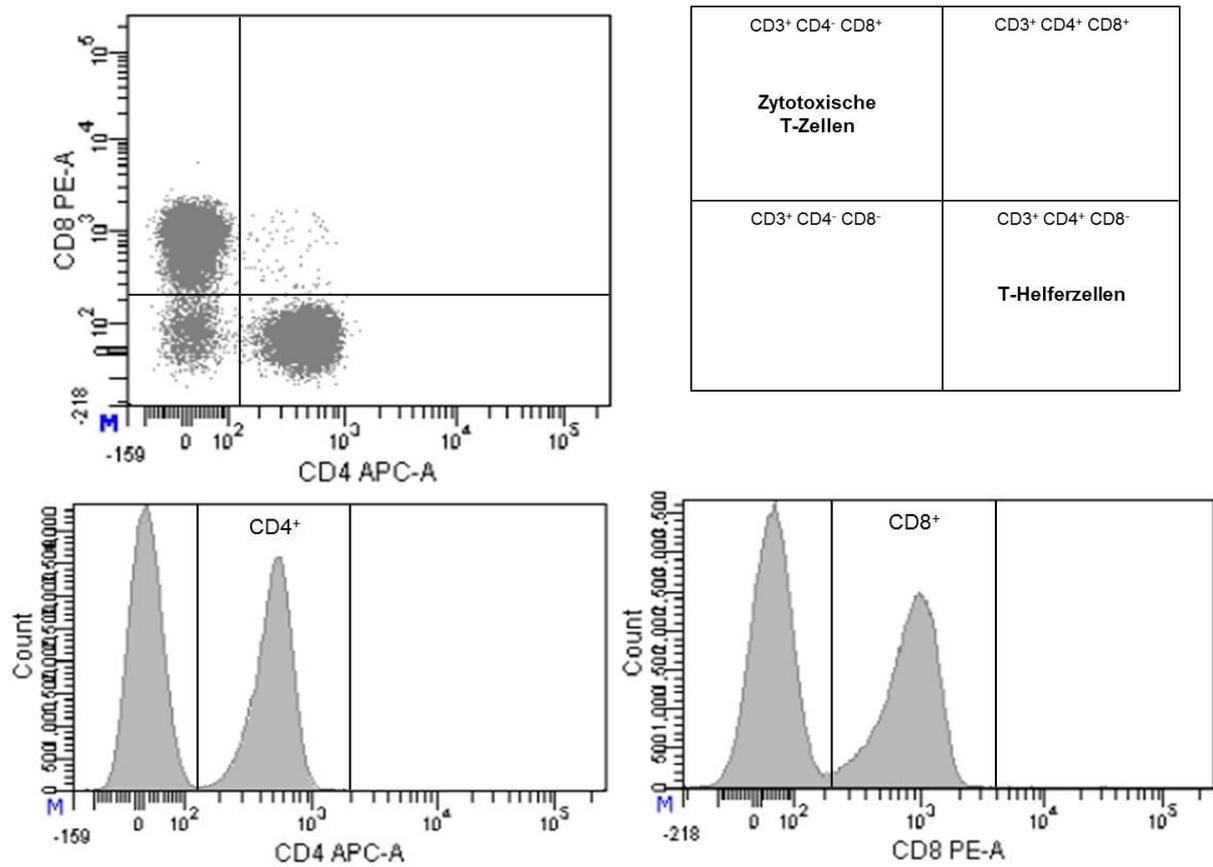
Mit Hilfe des Durchflusszytometers wurden isolierte PBMC nach Granularität und Größe von unerwünschten Partikeln abgegrenzt (Abbildung 11 A). Aus dem PBMC-Gate wurden  $CD14^+$  Zellen, die Monozyten, und  $CD20^+$  Zellen, die B-Lymphozyten, bestimmt (Abbildung 11 B und C). T-Lymphozyten hingegen tragen auf ihrer Oberfläche CD3 (Abbildung 11 D) und können über eine weitere Unterscheidung nach CD4 und CD8 (Abbildung 11 E) in T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen klassifiziert werden.

**A****B****C**

D



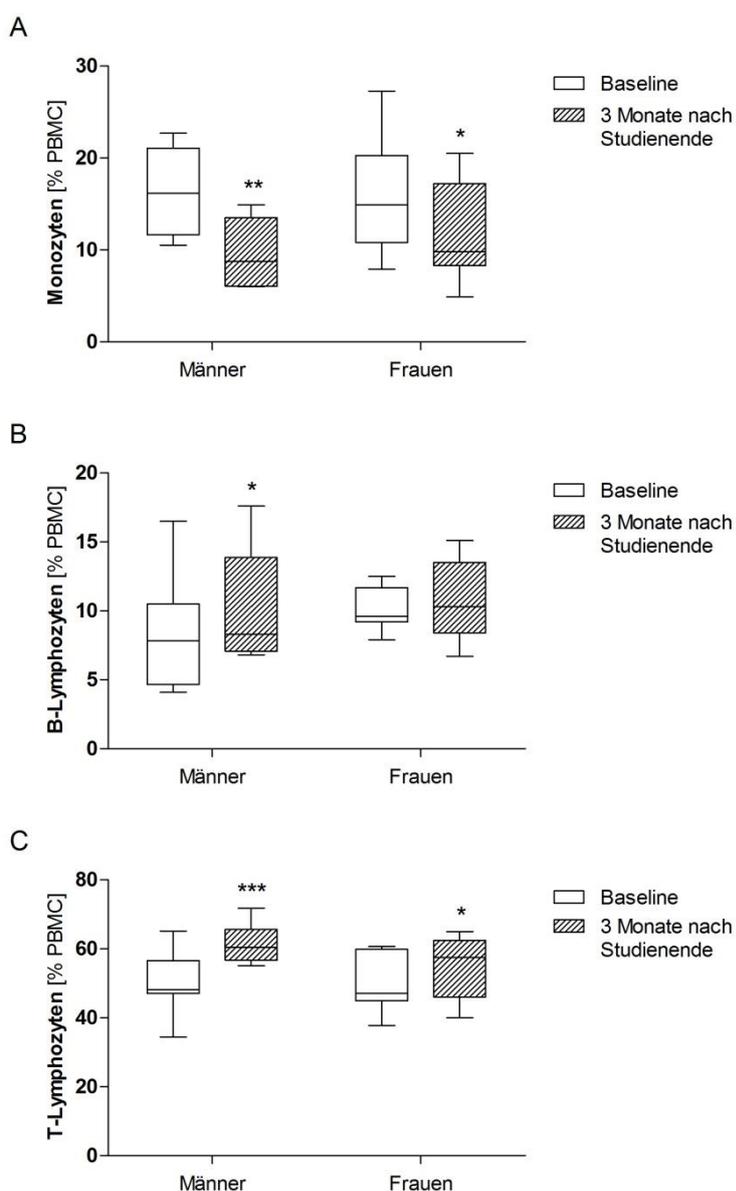
E

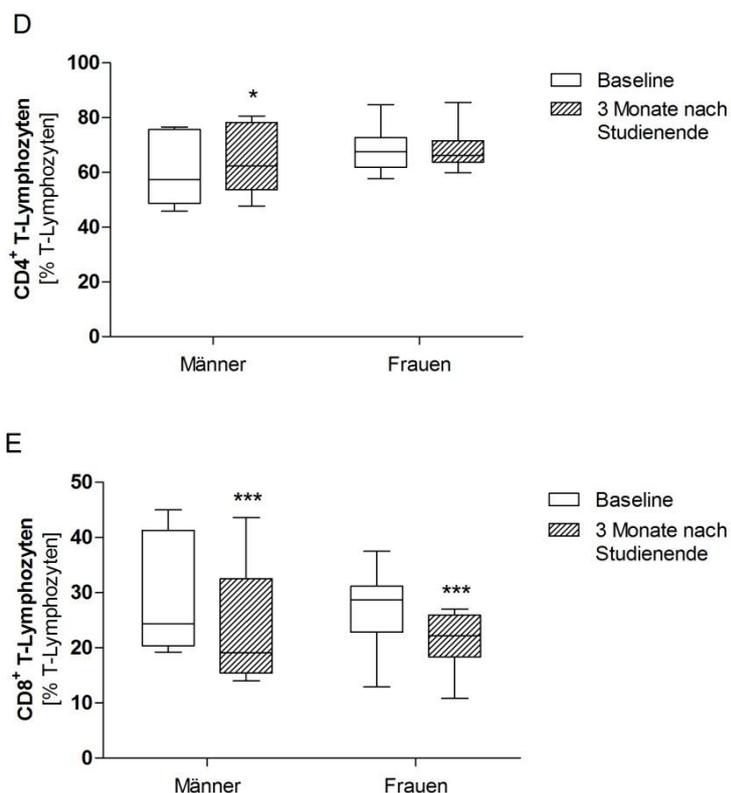


**Abbildung 11: Klassifizierung der PBMC-Population im Durchflusszytometer.** Nach PBMC-Gating (A) folgt die Klassifizierung in Monozyten (B), B-Lymphozyten (C) und T-Lymphozyten (D). T-Lymphozyten können anschließend durch CD4- und CD8-Trennung in CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (T-Helferzellen) und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (zytotoxische T-Zellen) unterteilt werden (E).

### 4.3.2 Graphische Darstellung der Veränderungen der PBMC-Populationen

Abbildung 12 A-E zeigt den prozentualen Anteil der einzelnen PBMC-Populationen der männlichen und weiblichen experimentellen Gruppe zu Beginn der Intervention (Baseline) und 3 Monate nach Studienende. Die Anzahl an Monozyten ist 3 Monate nach Studienende in beiden experimentellen Gruppen signifikant vermindert (A), während die Anzahl an B-Lymphozyten innerhalb der männlichen experimentellen Gruppe zunahm (B). Die T-Lymphozyten Zellzahl stieg 3 Monate nach Studienende in beiden Geschlechtern signifikant an (C). Nach Klassifizierung der T-Lymphozyten in  $CD4^+$  und  $CD8^+$  ist eine signifikante Erhöhung der  $CD4^+$  T-Lymphozyten 3 Monate nach Studienende bei den Männern nachweisbar (D). Große Signifikanzen aber zeigen beide Geschlechter bezüglich ihrer  $CD8^+$  T-Lymphozyten, den zytotoxischen T-Zellen (E).





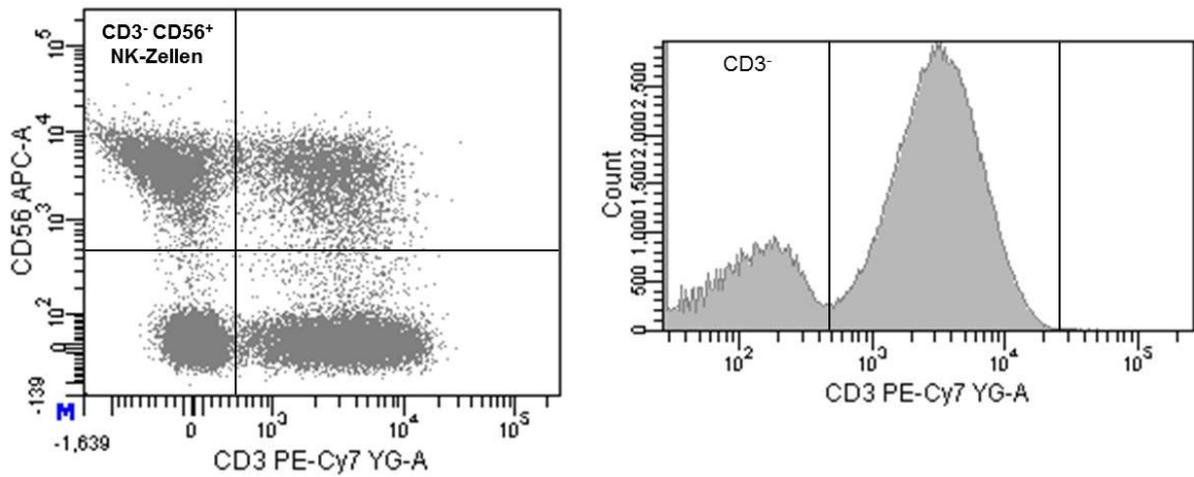
**Abbildung 12: Monozyten, B-Lymphozyten und T-Lymphozyten mit CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten.** (A) Monozyten, (B) B-Lymphozyten und (C) T-Lymphozyten der experimentellen Gruppen zur Baseline und 3 Monate nach Studienende. (D) CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und (E) CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten als Untergruppe der T-Lymphozyten. Die Werte entsprechen den Medianen (Minimum bis Maximum); \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  im Vergleich zur Baseline innerhalb einer Gruppe.

## 4.4 Einfluss der Intervention auf NK-Zellen

### 4.4.1 Messung der NK-Zell-Populationen im Durchflusszytometer

Mit Hilfe des Durchflusszytometers wurde eine weitere Lymphozyten-Population näher betrachtet. Wie in Abbildung 11 A wurden zunächst PBMC eingegrenzt und schließlich nach CD3<sup>-</sup> und CD56<sup>+</sup> Zellen, den NK-Zellen, differenziert (Abbildung 13 A). Nach der CD56 Oberflächenexpression können diese Zellen in CD56<sup>bright</sup> (hohe CD56 Expression) und CD56<sup>dim</sup> (geringe CD56 Expression) NK-Zellen unterschieden werden (Abbildung 13 B), was auch funktionelle Unterschiede zur Folge hat. In dieser Arbeit stehen besonders NK-Zellen im Fokus, auf denen weitere Bestandteile betrachtet werden. Abbildung 14 A zeigt den Leptin-Rezeptor (Ob-R) auf NK-Zellen nach Isotypen-Kontrolle (Abbildung 14 B). Ein anderer wichtiger Ligand ist TRAIL, der ebenfalls nach einer Kontrollfärbung mit Isotypen (Abbildung 15 B) auf NK-Zellen brachtet wurde (Abbildung 15 A).

A



B

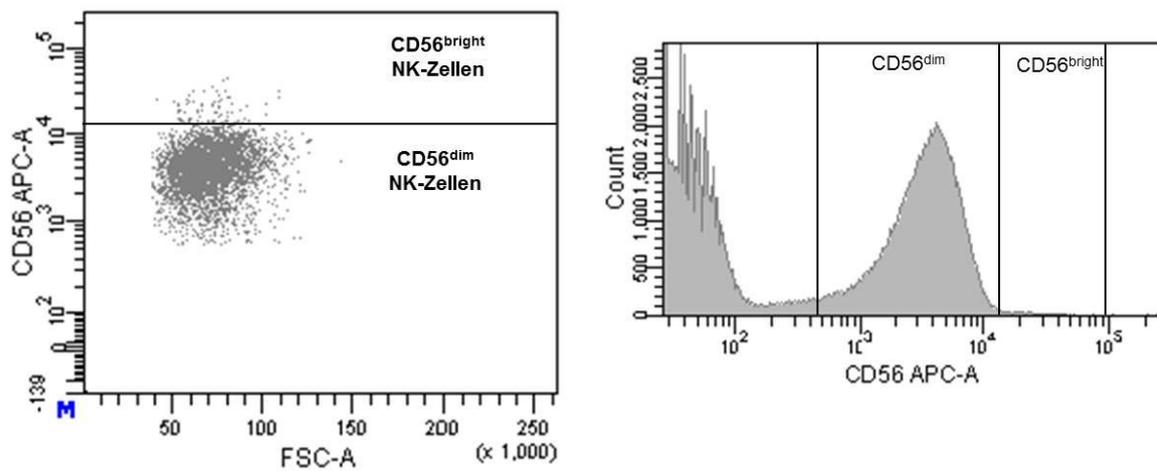
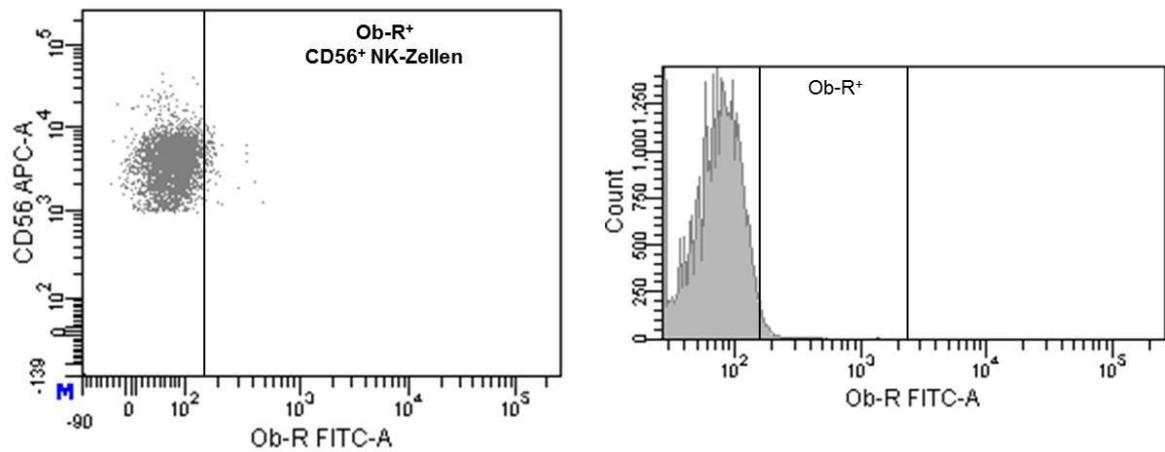
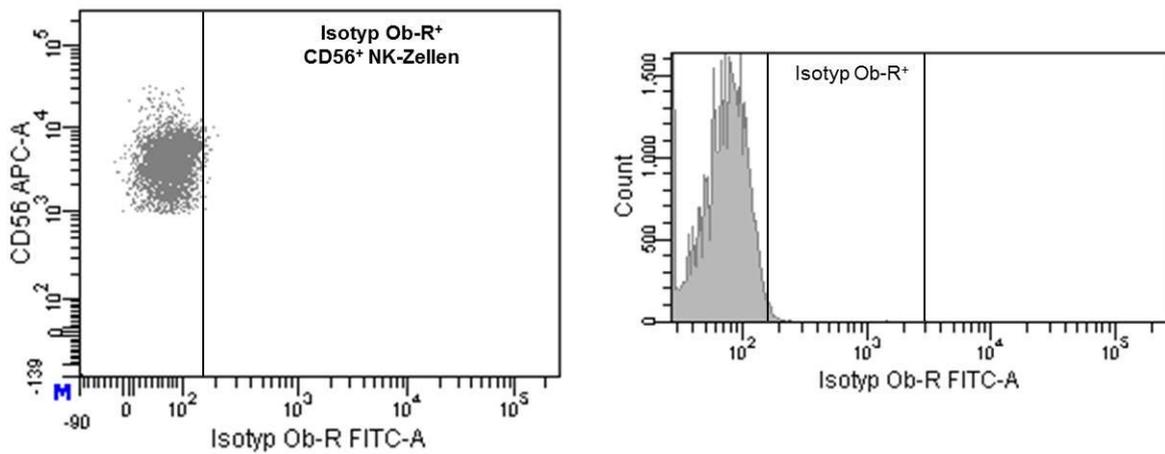


Abbildung 13: NK-Zellen mit CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> Differenzierung. Nach PBMC Eingrenzung wie in Abbildung 11 A, folgt Trennung nach CD3<sup>-</sup> und CD56<sup>+</sup> (A). Weitere Differenzierung nach CD56-Expression mit CD56<sup>bright</sup> (hohe Dichte) und CD56<sup>dim</sup> (geringe Dichte) NK-Zellen (B).

A

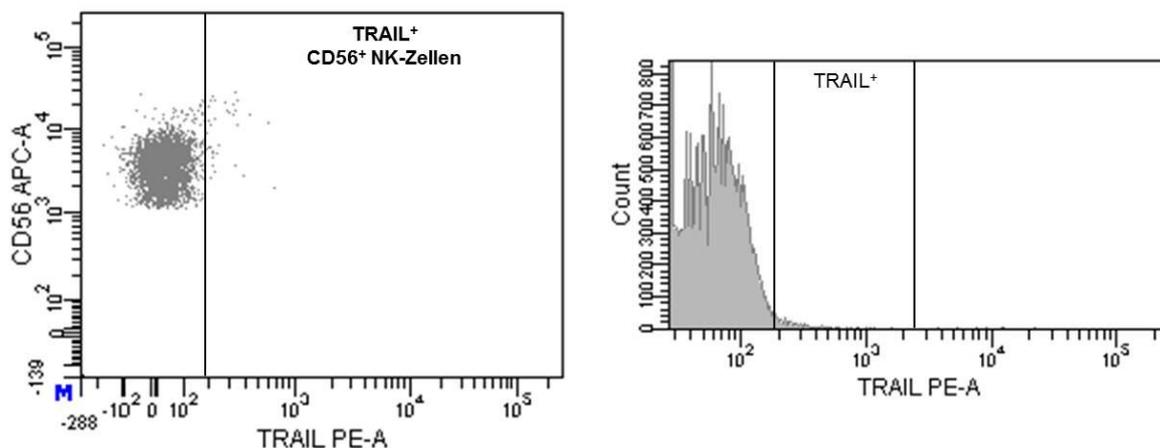


B

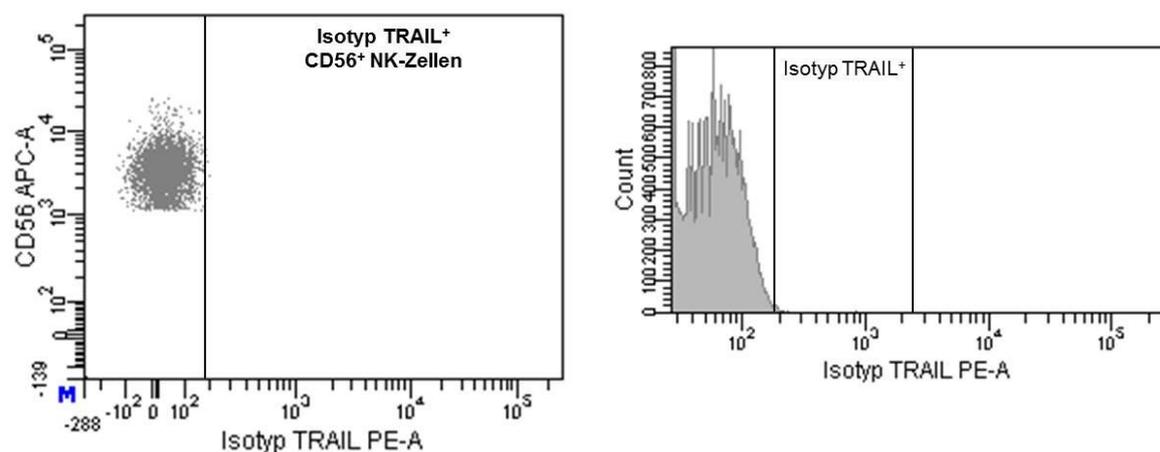


**Abbildung 14: NK-Zellen mit Ob-R Expression.** Nach PBMC Eingrenzung (Abbildung 11 A) und Trennung nach CD3<sup>-</sup> und CD56<sup>+</sup> (Abbildung 13 A) folgt die weitere Differenzierung nach Ob-R<sup>+</sup> NK-Zellen (A) nach vorangegangener Isotypen-Kontrolle (B).

A



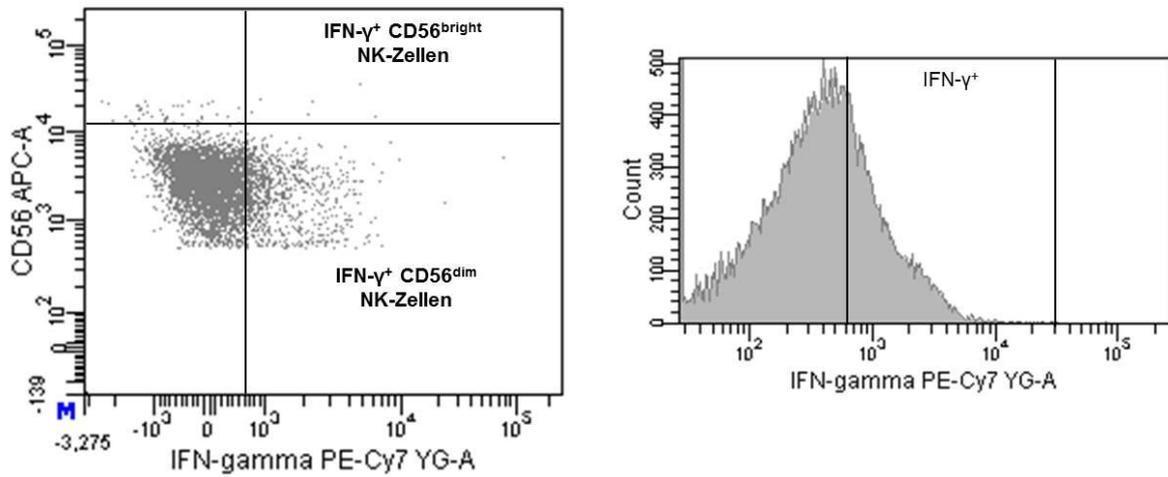
B



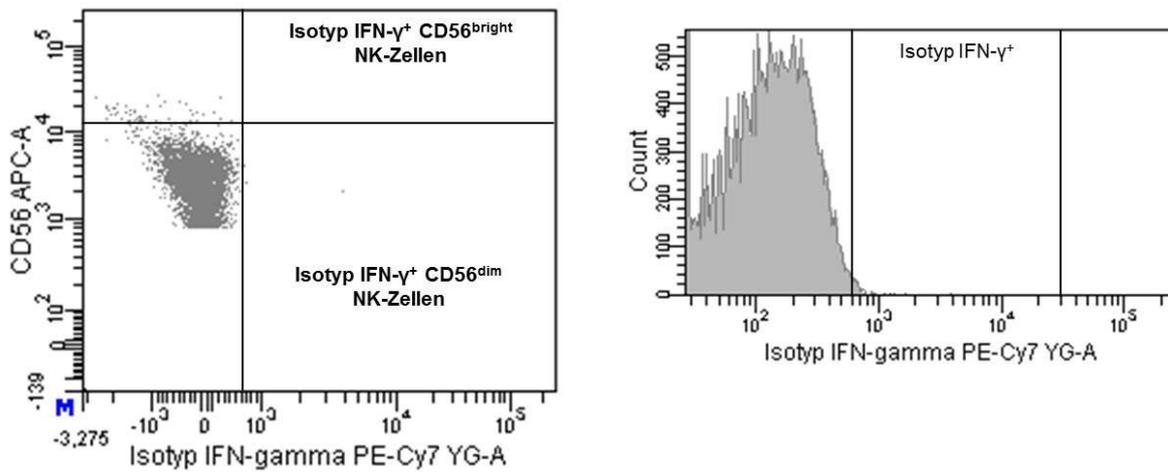
**Abbildung 15: NK-Zellen mit TRAIL Expression.** Nach PBMC Eingrenzung (Abbildung 11 A) und Trennung nach CD3<sup>-</sup> und CD56<sup>+</sup> (Abbildung 13 A) folgt die weitere Differenzierung nach TRAIL<sup>+</sup> NK-Zellen (A) nach vorangegangener Isotypen-Kontrolle (B).

In der zytotoxischen Granula von NK-Zellen befinden sich u.a. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Granzym A. Beide intrazellulären Bestandteile wurden nach Isotypen-Kontrolle (Abbildung 16 B und Abbildung 17 B) auf CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen angefärbt (Abbildung 16 A und Abbildung 17 A).

A

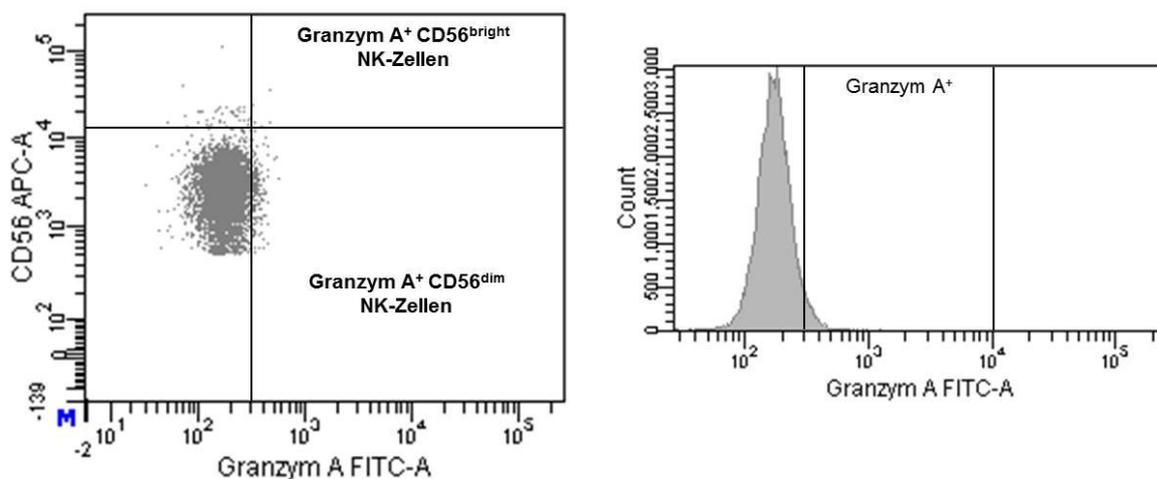


B

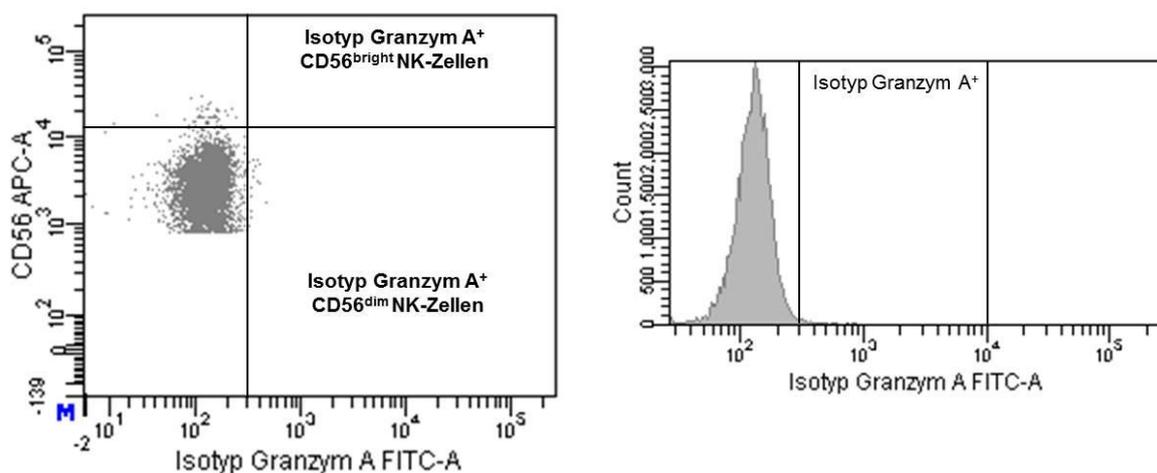


**Abbildung 16: CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen mit intrazellulärer IFN- $\gamma$  Expression.** Nach PBMC Eingrenzung (Abbildung 11 A) und Trennung nach CD3<sup>-</sup> und CD56<sup>+</sup> (Abbildung 13 A) folgt die weitere Differenzierung nach IFN- $\gamma^+$  CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen (A) nach vorangegangener Isotypen-Kontrolle (B).

A



B



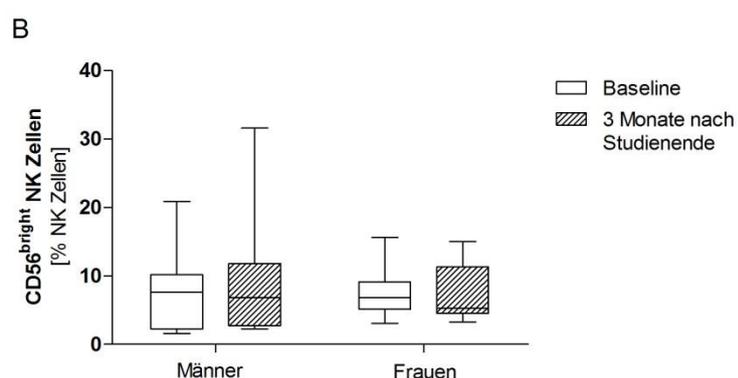
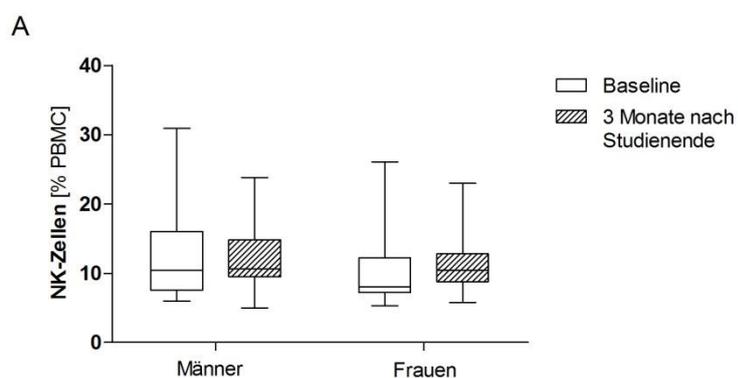
**Abbildung 17: CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen mit intrazellulärer Granzym A Expression.** Nach PBMC Eingrenzung (Abbildung 11 A) und Trennung nach CD3<sup>-</sup> und CD56<sup>+</sup> (Abbildung 13 A) folgt die weitere Differenzierung nach Granzym A<sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen (A) nach vorangegangener Isotypen-Kontrolle (B).

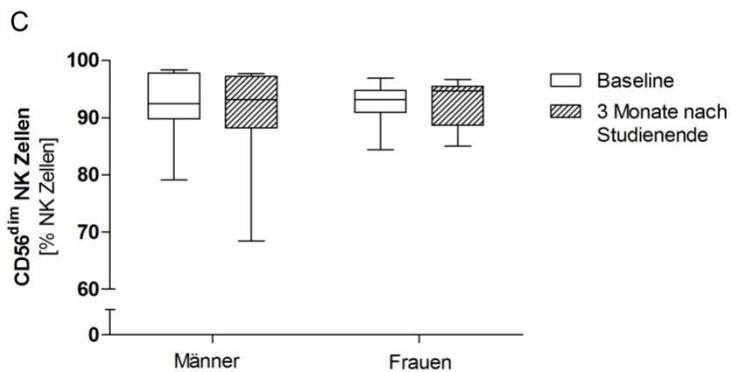
#### 4.4.2 Graphische Darstellung der Veränderungen der NK-Zell-Populationen

Abbildung 18 A zeigt die prozentuale Menge an NK-Zellen der weiblichen und männlichen experimentellen Gruppe zur Baseline und 3 Monate nach Studienende. In Abbildung 18 B und C werden die Gruppen zu gleichen Zeitpunkten veranschaulicht, jedoch sind die NK-Zellen nach CD56<sup>bright</sup> (Abbildung 18 B) und CD56<sup>dim</sup> unterteilt (Abbildung 18 C). CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen betragen rund 10% und CD56<sup>dim</sup> ca. 90% der gesamten NK-Zellen. Weder die gesamte NK-Zell-Population noch die zwei Subgruppen zeigten Veränderungen hinsichtlich ihrer Zellzahl nach der Intervention (Abbildung 18 A-C).

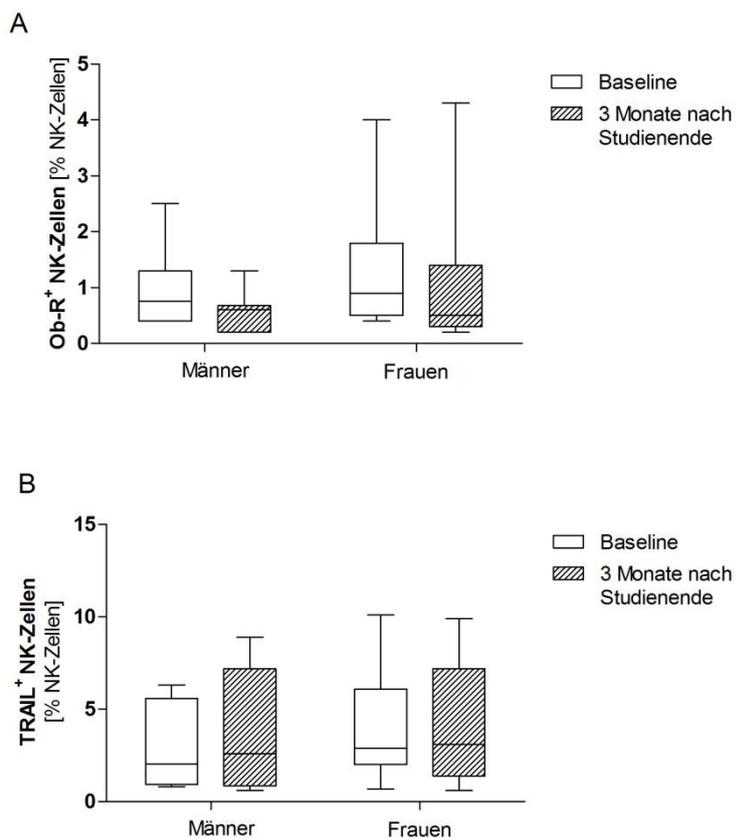
Die spezifische Ob-R Expression auf den NK-Zellen zu Studienbeginn und 3 Monate nach Studienende stellt Abbildung 19 A dar. In Abbildung 19 B sind die TRAIL<sup>+</sup> NK-Zellen der Männer und Frauen der experimentellen Gruppe illustriert. Sowohl Ob-R<sup>+</sup> als auch TRAIL<sup>+</sup> NK-Zellen zeigten keine signifikanten Veränderungen 3 Monate nach Studienende im Vergleich zum Studienbeginn innerhalb der Gruppen und auch zwischen den Geschlechtern.

Um die Zytotoxizität der NK-Zellen nachzuweisen, wurden, wie in Abbildung 20 dargestellt, die intrazelluläre IFN- $\gamma$  und Granzym A Expression auf den NK-Zell-Subtypen näher betrachtet. 3 Monate nach Studienende zeigten die Probanden eine signifikant erhöhte IFN- $\gamma$  Expression der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, während es keine Unterschiede in den Probandinnen gab (Abbildung 20 A). Eine stark signifikant erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion konnte in den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen 3 Monate nach Intervention in beiden Geschlechtern festgestellt werden (Abbildung 20 B). So stieg die Menge an intrazellulär produziertem IFN- $\gamma$  um mehr als das Doppelte an. Granzym A hingegen zeigte keine Signifikanz in der CD56<sup>bright</sup> (Abbildung 20 C) und CD56<sup>dim</sup> (Abbildung 20 D) NK-Zell-Population zu Beginn und 3 Monate nach Studienende der männlichen und weiblichen Interventionsgruppe.

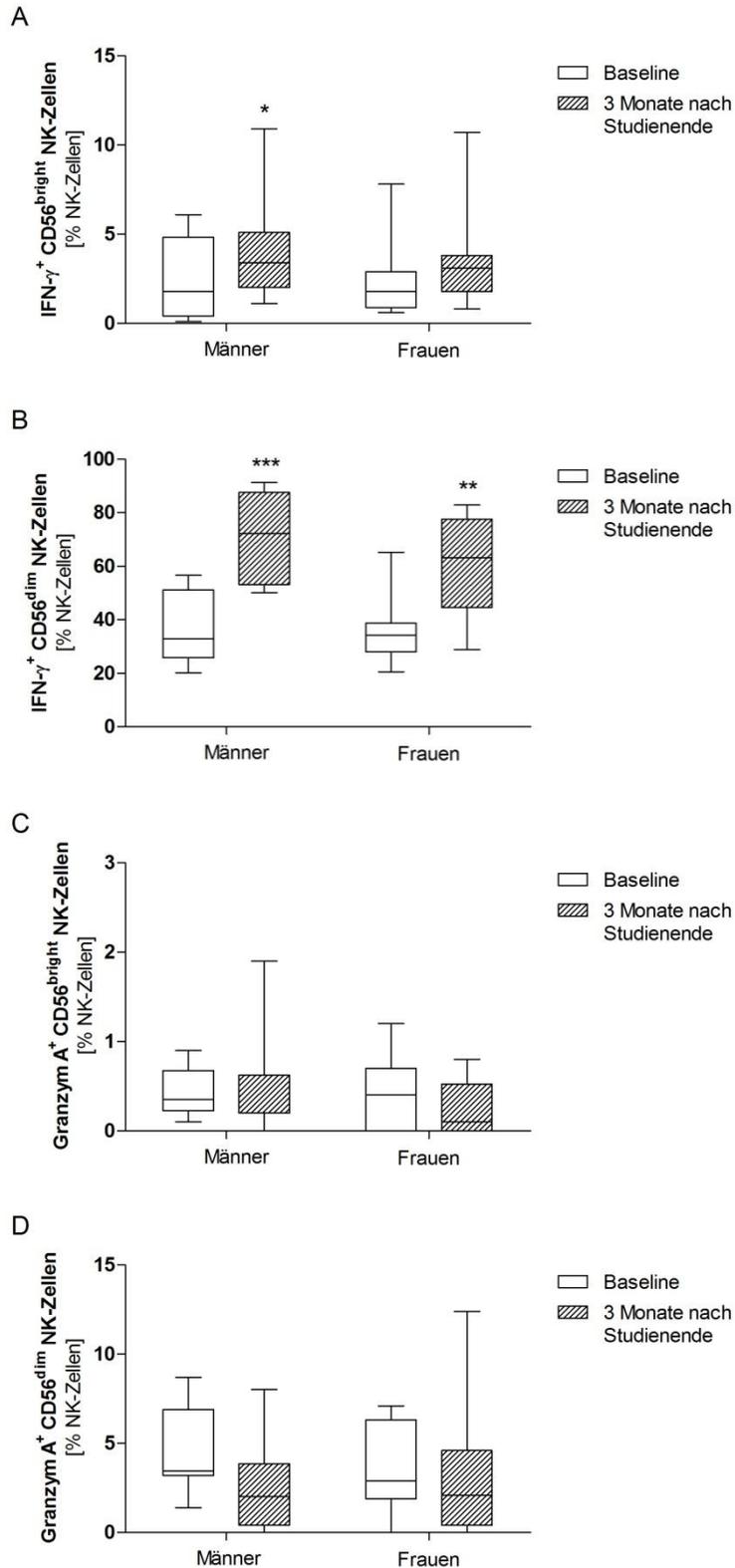




**Abbildung 18: NK-Zellen mit CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> Differenzierung.** Darstellung der gesamten NK-Zellzahl der experimentellen Männer und Frauen zur Baseline und 3 Monate nach Studienende (A). Weitere Differenzierung nach hoher und geringer CD56 Expression mit CD56<sup>bright</sup> (B) und CD56<sup>dim</sup> (C) NK-Zellen, welche ebenfalls keine Veränderungen nach der Intervention zeigen. Die Werte entsprechen den Medianen (Minimum bis Maximum).



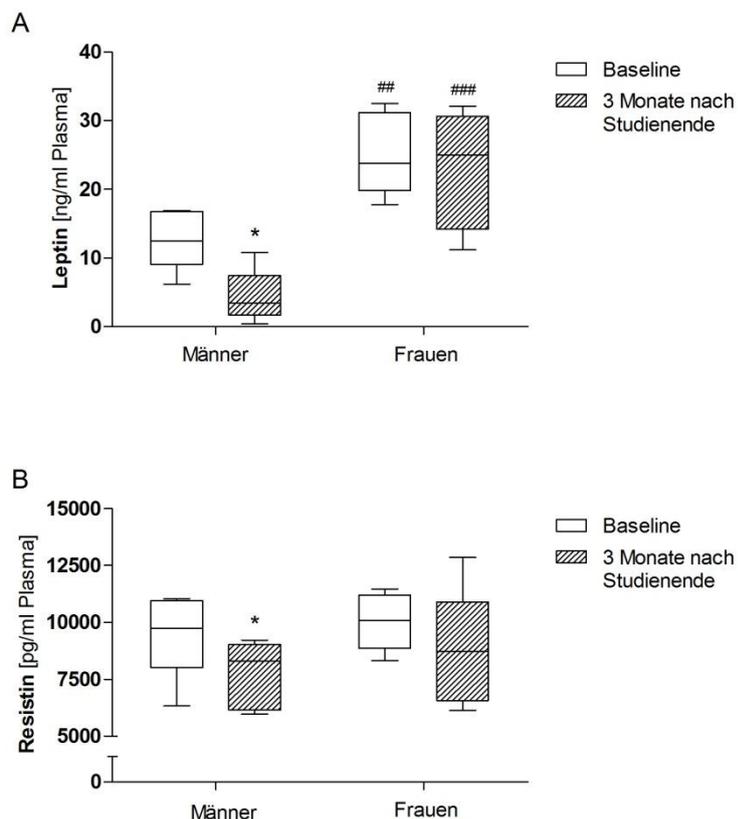
**Abbildung 19: Ob-R<sup>+</sup> und TRAIL<sup>+</sup> NK-Zellen.** Es sind die männlichen und weiblichen experimentellen Gruppen zu Beginn und 3 Monate nach Studienende dargestellt. Es gibt weder bei den Ob-R<sup>+</sup> NK-Zellen (A) noch bei den TRAIL<sup>+</sup> NK-Zellen (B) Signifikanzen 3 Monate nach Studienende. Die Werte entsprechen den Medianen (Minimum bis Maximum).

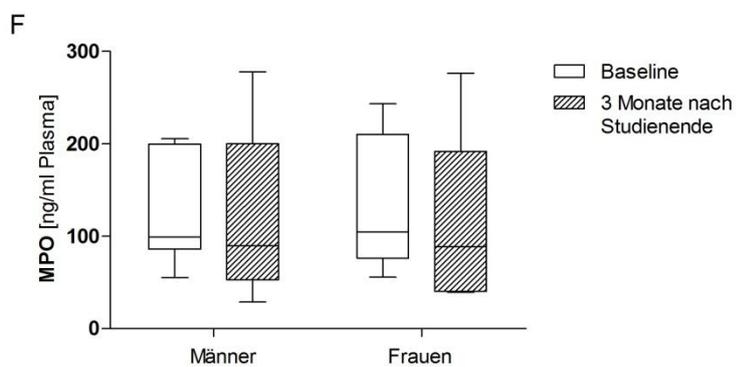
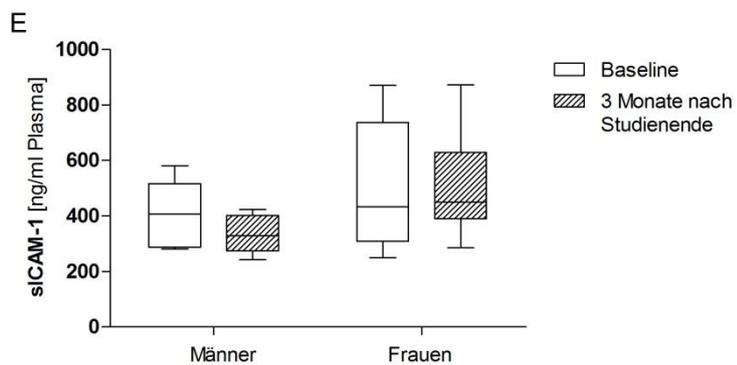
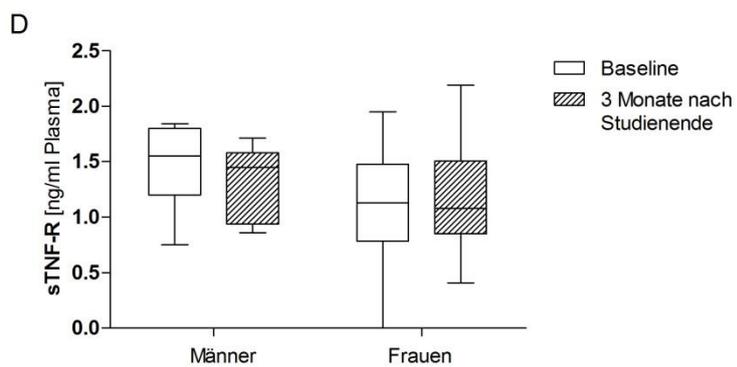
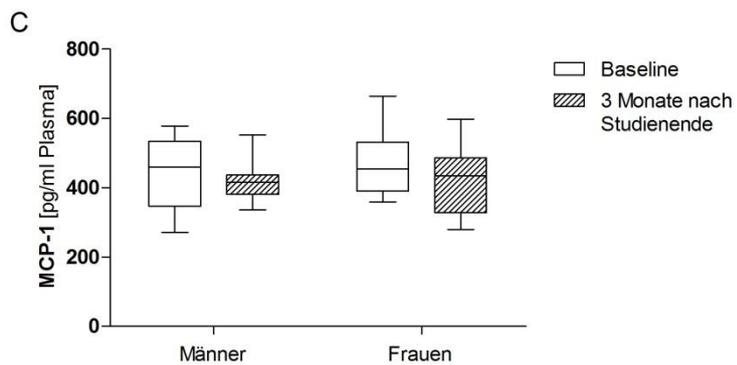


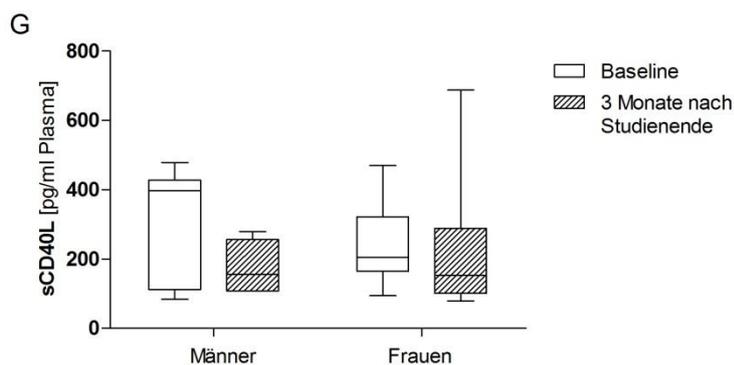
**Abbildung 20: IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> und Granzym A<sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen.** Vergleich der männlichen und weiblichen experimentellen Gruppen zu Beginn und 3 Monate nach Studienende. Es gibt eine signifikante Erhöhung der IFN- $\gamma$  Expression der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen der experimentellen Männer 3 Monate nach Studienende im Vergleich zur Baseline (A). Männer und Frauen zeigen eine signifikante Erhöhung der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen um mehr als das Doppelte 3 Monate nach Studienintervention (B). Die Granzym A Expression der CD56<sup>bright</sup> (C) und CD56<sup>dim</sup> (D) NK-Zellen ist in beiden Geschlechtern nicht verändert. Die Werte entsprechen den Medianen (Minimum bis Maximum); \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  im Vergleich zur Baseline innerhalb einer Gruppe.

## 4.5 Adipokin-Spiegel nach Gewichtsverlust

Im Blutplasma der Probanden und Probandinnen wurden einige Adipozytokine untersucht. IL-6 und OPG konnten nicht nachgewiesen werden bzw. waren unter der Nachweisgrenze. Abbildung 21 A zeigt, dass die Plasma-Leptin Spiegel der Männer signifikant um mehr als die Hälfte reduziert werden konnten, wobei es bei den Frauen keine Veränderungen 3 Monate nach Intervention gab. Insgesamt gibt es einen hoch signifikanten Geschlechtereinfluss, wobei die Frauen 3 Monate nach Studienende 5-fach höhere Leptin-Konzentrationen im Vergleich zur männlichen Experimentgruppe aufweisen. Auch die Plasma-Resistin Level sanken signifikant bei den Probanden, während sie bei den Probandinnen unverändert blieben (Abbildung 21 B). MCP-1, sTNF-R, sICAM-1, MPO und sCD40L zeigten zwischen Baseline und 3 Monate nach Studienende keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich ihrer Blutplasma Konzentrationen (Abbildung 21 C-G).







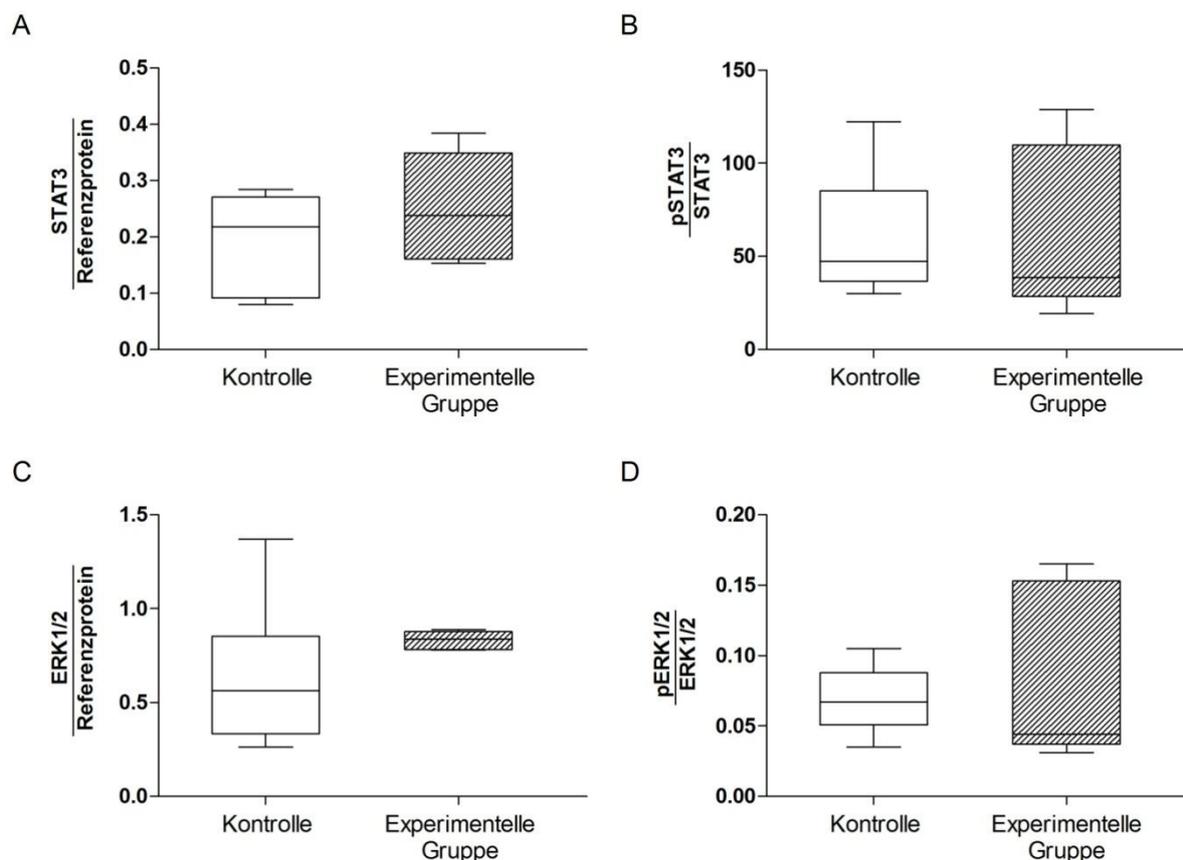
**Abbildung 21: Plasma-Konzentrationen von Leptin, Resistin, MCP-1, sTNF-R, sICAM-1, MPO und sCD40L.**

(A) Die experimentellen Probanden reduzierten signifikant ihre Plasma-Leptin Spiegel um die Hälfte im Vergleich vor und 3 Monate nach der Intervention, während die Leptin-Konzentrationen der Probandinnen unverändert blieben. Eine hohe Signifikanz stellt sich zwischen den Geschlechtern dar: die Frauen weisen 3 Monate nach Studienende bis zu 5fach höhere Leptin-Level im Vergleich zu den Männern auf. (B) Die Resistin-Mengen im Blutplasma der männlichen experimentellen Gruppe sind ebenfalls 3 Monate nach der Studie signifikant gesunken. Keine Veränderungen gab es bezüglich der (C) MCP-1, (D) sTNF-R, (E) sICAM-1, (F) MPO und (G) sCD40L Plasma-Spiegel der experimentellen Männer und Frauen zu beiden Zeitpunkten. Die Werte entsprechen den Medianen (Minimum bis Maximum); \* $P < 0,05$  im Vergleich zur Baseline innerhalb einer Gruppe; ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  im Vergleich zur männlichen experimentellen Gruppe zum gleichen Zeitpunkt.

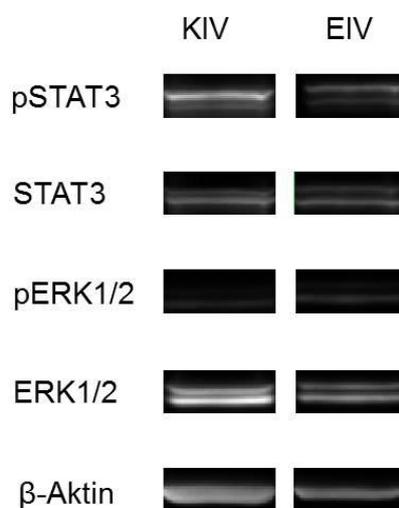
#### 4.6 Leptin-Signalweg

STAT3 und ERK1/2 sind 2 Phosphokinasen, die eine Schlüsselrolle im Leptin-Signalweg spielen. Für dieses Experiment wurden nach Alter und Körpergewicht passende, männliche Kontrollpersonen mit Teilnehmern der experimentellen Gruppe 3 Monate nach Studienende verglichen. Die durchgeführten Western Blot Analysen zeigten keine signifikanten Veränderungen der Expression von STAT3 und ERK 1/2 (Abbildung 22 A und C) in Relation zum Referenzprotein in den PBMC. Ebenso konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der aktiven, phosphorylierten Formen von STAT3 und ERK1/2 (Abbildung 22 B und D) zwischen den Kontrollpersonen und der experimentellen Gruppe 3 Monate nach Intervention festgestellt werden.

Exemplarisch sind in Abbildung 23 die Proteinnachweise für pSTAT3, STAT3, pERK1/2, ERK1/2 und  $\beta$ -Aktin aus den PBMC einer Kontrollperson und eines Teilnehmers der experimentellen Gruppe zum Zeitpunkt IV (3 Monate nach Studienende) dargestellt.



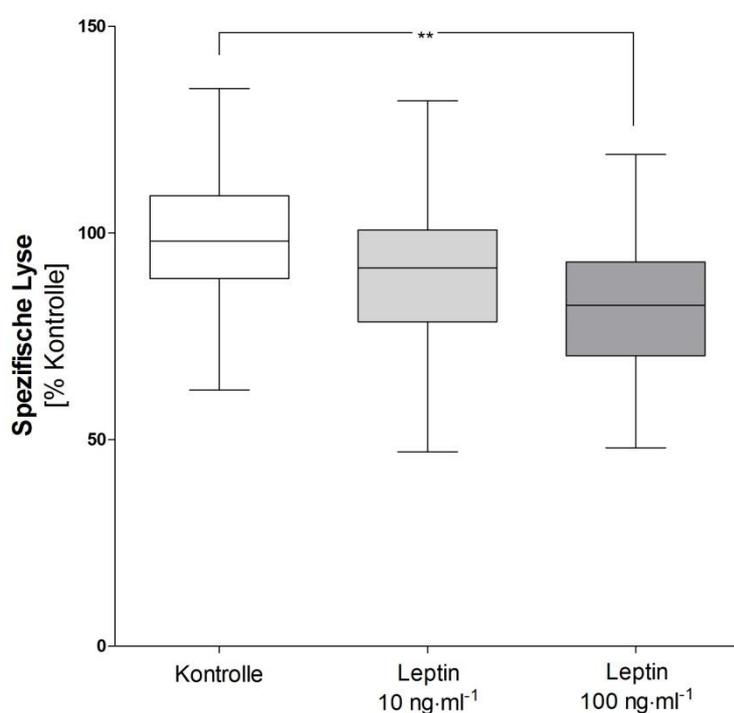
**Abbildung 22: Proteinanalyse von STAT3, ERK 1/2 und seinen phosphorylierten Formen.** Die (A) STAT3 und (C) ERK 1/2 Proteinexpression in Relation zum Referenzprotein zwischen Kontroll- und experimenteller Gruppe 3 Monate nach Intervention zeigte keine signifikanten Unterschiede. Ebenso die Darstellung der Aktivierungslevel von STAT3 und ERK 1/2 als Quotient seiner phosphorylierten zur unphosphorylierten Form im Vergleich der männlichen Kontrollgruppe zur experimentellen Gruppe 3 Monate nach Studienende (B und D). Die Werte entsprechen den Medianen (Minimum bis Maximum).



**Abbildung 23: Proteinnachweis im Western Blot.** Darstellung des Proteinnachweises einer männlichen Kontrollperson 3 Monate nach Studienende (KIV) sowie eines experimentellen Mannes (EIV) für aktives STAT3 (pSTAT3), STAT3, aktives ERK1/2 (pERK1/2), ERK1/2 und das Haushaltsgen β-Aktin der isolierten PBMC auf einer Membran.

#### 4.7 NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität nach Leptin-Stimulation

Hohe Leptin-Spiegel, wie sie bei den Teilnehmern zu Beginn der Studie vorlagen, werden dafür verantwortlich gemacht, die NK-Zell-vermittelte Tumorzelllyse negativ zu beeinflussen. Aufgrund dessen wurde ein *in vitro* Zytotoxizitätstest mit NK-92 Zellen durchgeführt, welche charakteristisch den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen mit einer hohen zytotoxischen Aktivität entsprechen (Maki *et al.*, 2001). Diese wurden mit verschiedenen Leptinmengen inkubiert und zeigten eine signifikante Reduktion der spezifischen Zelllyse nach Stimulation mit 100 ng·ml<sup>-1</sup> Leptin im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Eine Inkubation mit 10 ng·ml<sup>-1</sup> Leptin zeigte keine signifikanten Veränderungen bezüglich der NK-Zell-Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen (Abbildung 24).



**Abbildung 24: NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität nach Leptin-Stimulation.** NK-92 Zellen wurden mit 10 ng·ml<sup>-1</sup> und 100 ng·ml<sup>-1</sup> Leptin stimuliert. Im Vergleich zur Kontrolle sank die spezifische NK-Zelllyse gegenüber den Tumorzellen signifikant um 20%. Die Werte entsprechen den Medianen (Minimum bis Maximum); \*\* $P < 0,01$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

## 5 Diskussion

Ein Übermaß an Nahrungsmitteln, hoch verarbeiteten Lebensmitteln sowie fehlende Bewegung durch lange und vor allem sitzende Berufstätigkeiten und bequeme Transportmittel sind nur einige Punkte, die die Energieaufnahme erhöhen, einen Energieverbrauch senken und eine Zunahme des Körpergewichts fördern. Die Adipositas stellt ein großes, weltweites Gesundheitsproblem dar, das nicht nur in Industrienationen auftritt, sondern auch Entwicklungsländer betrifft (Ng *et al.*, 2014). Unter Übergewicht und Fettleibigkeit leiden zudem immer mehr Kinder und Jugendliche, wodurch ihnen nachteilige Gesundheitseffekte drohen (Ng *et al.*, 2014). Das Nierenkarzinom, das Karzinom des Endometriums, postmenopausaler Brustkrebs sowie das kolorektale Karzinom sind nur einige der Krebsarten, die bei Adipositas häufiger auftreten als bei normalgewichtigen Personen (Bianchini *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008; De Pergola und Silvestris 2013). Die Gesundheitskosten, die direkt oder indirekt durch Adipositas entstehen, ermittelten Knoll und Hauner in einer Hochrechnung für das Jahr 2010 mit rund 17 Milliarden Euro und für 2020 mit mehr als 25 Milliarden Euro, wobei ein Großteil den Folgekosten für Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ II, Herz-Gefäß-Erkrankungen und Arthrose entspricht (Knoll und Hauner 2008). Die Adipositasepidemie muss durch geeignete Präventionsmaßnahmen aufgehalten werden, die in familiären, sozialen, beruflichen und kulturellen Bereichen greifen (Weltgesundheitsorganisation Europa 2006; Müller *et al.*, 2007).

### 5.1 Anthropometrische und physiologische Parameter

In der hier vorgestellten Studie wurde ein 3-monatiges Sport- und Ernährungsprogramm als eine Möglichkeit der Körpergewichts- und vor allem Fettmassereduktion gewählt. Die vorliegenden Daten zeigen, dass Männer und Frauen während der Intervention ihren Bauch- und Hüftumfang signifikant reduzieren konnten, jedoch das Taillen-Hüftumfang-Verhältnis (*Waist-Hip-Ratio*; WHR) keine Veränderung zeigt. Das liegt daran, dass beide Umfänge von den Probanden und Probandinnen ähnlich stark reduziert werden konnten und somit der Quotient aus beiden gleich bleibt. Das Körpergewicht und der BMI wurden hoch signifikant reduziert. Es liegen Korrelationen zwischen Bauchumfang und BMI vor (Shields *et al.*, 2012), dennoch variiert der Bauchumfang bei Personen mit gleichem BMI. Außerdem ist ein BMI weniger akkurat, um Körpergewichtsveränderungen zu bestimmen, da dieser nur aus dem Körpergewicht und der Körpergröße ermittelt wird, nicht aber die Körperzusammensetzung oder die Fettverteilung betrachtet wird. Daher sollten der Bauch- und auch der Hüftumfang als zwei wichtige Parameter zur Bestimmung des Adipositas-bezogenen Gesundheitsrisikos immer betrachtet werden. Ziel der Studie war eine Körpergewichtsreduktion von 10% zu erzielen, welche die Teilnehmer erreicht haben. Die Teilnehmerinnen verloren nur ungefähr die Hälfte des angestrebten Gewichts. In einer 16-monatigen Langzeitstudie von Donnelly *et al.* (2003) führte moderater Sport bei den männlichen Probanden zu einem Gewichtsverlust, bei den Probandinnen verhinderte der Sport lediglich eine Gewichtszunahme. In unserer durchgeführten Studie resultiert der mangelnde Gewichtsverlust aus einer geringeren *Compliance*, dem kooperativem Verhalten, der Teilnehmerinnen möglicherweise in Kombination mit dem von Donnelly *et al.* beschriebenen Ergebnis, dass Sport bei Männern einen Gewichtsverlust hervorruft, bei Frauen

lediglich eine Gewichtszunahme verhindert (2003). Auch in dieser Studie hat sich gezeigt, dass Frauen eine höhere Fettmasse und geringere Muskelmasse haben als ihre männlichen Pendanten bei gleichem BMI (Jackson *et al.*, 2002; Geer und Shen 2009). Während Männer eher an der ungünstigen androgenen (viszeralen) Fettverteilung leiden und vermehrt einen „Bauch“ ansetzen, unterliegen Frauen eher einem gynoidalen (subkutanen) Phänotyp (Geer und Shen 2009; Hocking *et al.*, 2013; White und Tchoukalova 2013). Insgesamt konnte das Ziel einer Fettmassereduktion der Interventionsgruppe erreicht werden, wobei die Muskelmasse, analysiert mit einer BIA, gleich geblieben ist. Die Studie hat erfreulicherweise auch einen langfristigen Effekt: viele Probandinnen und Probanden übernahmen die Inhalte der Intervention auch nach Studienende in ihren Berufsalltag, trieben Sport (wenn auch in reduzierten Einheiten) und ernährten sich bewusster. Durch die positiven Resultate der Studie blieb die Motivation bestehen und die Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer reduzierten oder hielten ihr Körpergewicht konstant.

Eine hohe Korrelation besteht zwischen Adipositas und dem Risiko einen Diabetes mellitus Typ II zu entwickeln (Bell *et al.*, 2014). Die männlichen Teilnehmer konnten ihre Nüchtern-Glukose Spiegel durch die Intervention signifikant reduzieren und senken somit aktiv ihr Risiko an einer Störung des Blutzuckerspiegels zu erkranken. In einer Übersichtsarbeit zeigen Stevens *et al.* (2015), dass Patienten mit einem verbesserten Lebensstil in Kombination mit Verhaltensänderungen dem Fortschreiten eines Typ II Diabetes mellitus vorbeugen können. Einige Probandinnen und Probanden leiden unter Hypertonie und müssen täglich Antihypertensiva einnehmen. Drei Personen der Interventionsgruppe konnten ihre blutdrucksenkende Medikation reduzieren oder sogar komplett absetzen. Darüber hinaus konnte eine Studienteilnehmerin die Einnahme eines Cholesterinsenkers beenden.

## 5.2 Sportliche Parameter

Als ein wichtiger Parameter der sportlichen Fitness wurde die relative  $VO_{2\max}$  untersucht, die in beiden Interventionsgruppen (Frauen und Männer) hoch signifikant gesteigert werden konnte, jedoch (noch) nicht auf physiologische Werte (Heer *et al.*, 2014). Das Sportprogramm, welches die Probanden und Probandinnen erhielten, wurde auf die jeweilige Person unter Berücksichtigung ihrer sportlichen Kapazität zugeschnitten, um ein Übertraining zu vermeiden und es bestmöglich in den bestehenden Berufsalltag integrieren zu können. Zusätzlich gab es Hinweise auf Bewegungen im Alltag, um einen erhöhten Kalorienverbrauch zu induzieren. Durch diese Maßnahmen wurden die Teilnehmer leistungsfähiger und belastungsresistenter im Vergleich zum Studienbeginn.

## 5.3 Zelluläre Veränderungen

Grundlegend wirkt Sport antiinflammatorisch, da es die viszerale Fettmasse reduziert, welche proinflammatorische Zytokine ausschüttet, die Bildung und Freisetzung von entzündungshemmenden Myokinen aus den sich kontrahierenden Skelettmuskeln fördert sowie zu einer reduzierten Expression von Toll-like Rezeptoren auf Monozyten und Makrophagen führt, die u.a. die Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen hemmen (Gleeson *et al.*, 2011). Ebenso hat die Ernährung einen

komplexen Einfluss auf das Immunsystem: während Omega-6 Fettsäuren und mittelkettige, gesättigte Fettsäuren die Immunzellbildung mit Eikosanoidproduktion anregen, hemmen Omega-3 Fettsäuren beispielsweise die Expression von proinflammatorischen Zytokinen und wirken entzündungshemmend (De Rosa *et al.*, 2015). Die heutige Ernährungsweise in den Industrienationen beinhaltet vorwiegend verarbeitete, energiereiche Lebensmittel mit hohem Zucker-, Fett- und Fleischgehalt zulasten einer nährstoffreichen Kost mit frischem Gemüse, Früchten und Fisch, und korreliert mit einem Anstieg der Inzidenz von Immundysfunktionen (Allergien, Autoimmunerkrankungen oder Asthma) (De Rosa *et al.*, 2015).

In der vorliegenden Arbeit sank auf zellulärer Ebene der prozentuale Anteil von Monozyten an der PBMC-Population beider Interventionsgruppen 3 Monate nach Studienende signifikant, während die T-Lymphozyten Zellzahl signifikant anstieg. Die Arbeitsgruppe um Markofski (2008; 2014) zeigte, dass körperliche Aktivität die Anzahl an Monozyten vermindert und somit ein Parameter der systemischen *low-grade* Inflammation gesenkt wird, die bei einer Adipositas persistiert. Aber nicht nur körperliche Betätigung hat einen Einfluss auf das Immunsystem, sondern auch die vom Fettgewebe ausgeschütteten Adipokine. Leptin-defiziente *ob/ob* Mäuse zeigen eine Abnahme der zirkulierenden Lymphozyten-Zellzahlen mit einer Erhöhung an Monozyten um das Vierfache (Faggioni *et al.*, 2000). Eine Leptin-Gabe induzierte im gleichen Versuch eine Proliferation von T-Lymphozyten und inhibierte das Monozyten/Makrophagen System (Faggioni *et al.*, 2000). Im Menschen konnte ebenfalls eine Korrelation zwischen Leptin-Werten und Leukozyten-Zellzahlen möglicherweise durch eine Stimulation der Hämatopoese nachgewiesen werden (Wilson *et al.*, 1997; Hirose *et al.*, 1998). Nagareddy *et al.* (2014) widerlegen diese Ansicht und weisen in einem Tierversuch mit *ob/ob* Mäusen nach, dass Diät-induzierte adipöse Mäuse erhöhte Mengen an zirkulierenden Monozyten besitzen und eine intraperitoneale Leptin-Gabe die Monozyten-Zellzahl nicht verringert, ebenso wie eine Knochenmarkstransplantation aus einem Wildtyp in eine *ob/ob* Maus eine Monozytose erzeugt. Die Arbeitsgruppe formuliert die Hypothese, dass kein defekter Leptin-Signalweg die Ursache für die Monozytose ist, sondern diese Adipositas-abhängig auftritt. Unterstützt wird diese Aussage von einer Humanstudie, die zeigt, dass adipöse Patienten 18 Monate nach bariatrischer Chirurgie und daraus resultierendem Gewichtsverlust signifikant verminderte Monozyten-Zellzahlen aufweisen (Nagareddy *et al.*, 2014). Die Autoren der Studie beschreiben, dass Makrophagen im Fettgewebe durch die Freisetzung von IL-1 $\beta$  die Hämatopoese und damit Monozyten-Bildung im Knochenmark anregen und so die Monozyten-Zahl erhöhen.

T-Lymphozyten werden nach ihrer CD4 und CD8 Expression auf der Zelloberfläche in zwei funktionell wichtige Populationen eingeteilt: CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen. Bisher ist die Datenlage bezüglich T-Zell-Populationen bei Adipositas sehr uneinheitlich. Manche Arbeitsgruppen zeigen verminderte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozytenmengen bei adipösen Personen (Tanaka *et al.*, 2001; Womack *et al.*, 2007), wohingegen es in anderen Studien signifikant erhöhte Mengen an T-Helferzellen und gleichbleibende Level an zytotoxischen T-Zellen gibt (Nieman *et al.*, 1999; van der Weerd *et al.*, 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden die CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten nur in der männlichen Experimentgruppe signifikant 3 Monate nach Studienende erhöht und die CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten Zellzahl signifikant in beiden Geschlechtern vermindert. T-Zellen akkumulieren

vermehrt im viszeralen Fettgewebe bei adipösen Mäusen und Menschen (Kintscher *et al.*, 2008; Rausch *et al.*, 2008; Duffaut *et al.*, 2009) und ihnen wird außerdem bei der Initiierung der Makrophagen-Einwanderung ins Fettgewebe eine wichtige Funktion zugeschrieben (Nishimura *et al.*, 2009). Im Fettgewebe erfolgt die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen durch Makrophagen, welche dann als Ursache der *low-grade* Inflammation betrachtet werden. Eine Studie von Fathy und Morshed (2013) zeigt, dass morbid adipöse Patienten nach einer laparoskopischen Magenverkleinerung signifikant geringere Mengen an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten im peripheren Blut besitzen und sie 4 Monate postoperativ, ebenso wie in der hier vorgestellten Studie, einen signifikanten Gewichtsverlust sowie einen Abfall des Leptin-Spiegels aufweisen. In weiteren Studien wurden unterschiedliche Effekte eines Gewichtsverlusts auf Immunzellpopulationen gezeigt: Ballesteros-Pomar *et al.* (2014) verglichen adipöse Patienten, die einen Gewichtsverlust mit einer niedrig-kalorischen Diät oder nach bariatrischem Eingriff erlangten. Keine signifikanten Effekte gab es nach der 6-wöchigen Diät mit einer Gewichtsreduktion von bis zu 10% des Körpergewichts, jedoch folgte eine Verminderung der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Gruppe der insulinresistenten Patienten ein Jahr nach biliopankreatischer Diversion.

Die vorliegende Studie zeigt einen signifikanten, spezifischen Effekt auf das T-Zell-System. Insbesondere die Reduktion der zirkulierenden zytotoxischen T-Lymphozyten durch eine Verminderung der Körperfettmasse der Probanden wirkt dem pro-inflammatorischen Zustand adipöser Menschen effektiv entgegen.

NK-Zellen tragen viele funktionelle Oberflächenmoleküle, die mit anderen Zellen interagieren können. In dieser Studie wurden Ob-R und TRAIL auf NK-Zellen untersucht, wobei die Intervention keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich beider Strukturen bewirkte. Ob-R wird in verschiedenen Isoformen exprimiert, wobei Ob-Rb als Einziger eine lange, intrazelluläre Domäne besitzt, welche die biologische Funktion ausübt (Banks *et al.*, 2000). Der verwendete Antikörper detektiert die extrazelluläre Domäne des Rezeptors, der für alle Isoformen gleich ist, und eine Unterscheidung in Subtypen ist somit nicht möglich. Die Verwendung eines spezifischen Antikörpers für die intrazelluläre Domäne des Ob-Rb wäre für zukünftige Untersuchungen interessant. TRAIL induziert Apoptose in virusinfizierten und malignen Zellen (Ashkenazi *et al.*, 1999; Ashkenazi *et al.*, 2008) und scheint in Abhängigkeit von IFN- $\gamma$  zu wirken, welches *in vitro* die Sensitivität gegenüber TRAIL und auch die TRAIL-Expression auf NK-Zellen erhöht (Tateishi *et al.*, 2006; Sarhan *et al.*, 2012). IFN- $\gamma$  ist ein für die Immunantwort bedeutsames Zytokin, das in viel höheren Mengen von CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen im Vergleich zu CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen produziert wird. Drei Monate nach Studienende zeigte sich eine signifikant erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen aus der männlichen Interventionsgruppe im Vergleich zum Studienbeginn. Erstaunlicherweise wurde in beiden Geschlechtern 3 Monate nach Intervention ein hoch signifikanter Anstieg der IFN- $\gamma$  Produktion in den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen um mehr als das 2-fache detektiert. Hier ist besonders interessant, dass die IFN- $\gamma$  Expression in den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen viel höher als bis dato beschrieben ist (Fehniger *et al.*, 1999; Cooper *et al.*, 2001). Die Ergebnisse zeigen insgesamt eine erhöhte Bildung von IFN- $\gamma$  in den mengenmäßig stark vertretenen CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen. Bereits in vorhergehenden Studien unserer Arbeitsgruppe konnten wir eine signifikante Erhöhung der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen nach Stimulation

mit Adipozyten-konditioniertem Medium zeigen (Huebner *et al.*, 2013), sowie einen Anstieg der IFN- $\gamma$  Expression nach kurzzeitiger Leptin-Behandlung von isolierten humanen NK-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Wrann *et al.*, 2012). In anderen Studien konnte ebenfalls eine erhöhte IFN- $\gamma$  Ausschüttung von CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen im Vergleich zu CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen nach Stimulation oder Zielzellbindung gezeigt werden (Fauriat *et al.*, 2010; De Maria *et al.*, 2011). Auch dies zeigt die frühe, induzierbare Abwehrfunktion von NK-Zellen. IFN- $\gamma$  reguliert die Differenzierung und Funktion von vielen verschiedenen Immunzellen (z.B. Monozyten, Makrophagen, T- und NK-Zellen). Eine Tierstudie zeigte außerdem eine erhöhte Regression von Metastasen und ein Anstieg des Überlebens von Tieren nach IFN- $\gamma$  Behandlung (Nakashima *et al.*, 2012).

## 5.4 Leptin und Resistin

Leptin ist nicht nur das bekannteste Adipokin, es ist auch quantitativ das Wichtigste. Ein Überangebot an Leptin ist in vielen Bereichen negativ korreliert: es erhöht die Zellproliferation, -transformation und -invasion *in vitro* und ist z.B. positiv mit postmenopausalem Brustkrebs, Prostata- sowie kolorektalem Karzinom assoziiert (Garofalo und Surmacz 2006; Lautenbach *et al.*, 2009; Garcia-Robles *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2014; Alshaker *et al.*, 2015). Die Teilnehmerinnen der Interventionsgruppe haben im Vergleich zu den männlichen Teilnehmern bis zu 5-fach höhere Plasma-Leptinspiegel. Dies wurde bereits in anderen Studien beschrieben (Geer und Shen 2009). Die Probanden der experimentellen Gruppe der vorgestellten Studie konnten ihre Fettmasse und Plasma-Leptin Spiegel signifikant reduzieren, während eine positiv zu bewertende Abnahme des Plasma-Leptins in der weiblichen Interventionsgruppe ausblieb. In weiteren Studien wurde ebenfalls gezeigt, dass eine Abnahme des Körpergewichts bzw. der Körperfettmasse mit einer Leptin-Reduktion einhergeht (Bastard *et al.*, 2000; Kelly *et al.*, 2014; Knuth *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2014; You *et al.*, 2014; Calbet *et al.*, 2015; Mason *et al.*, 2015). Ein Überangebot an Leptin, wie es bei Adipositas vorliegt, kann zu einer Leptin-Resistenz führen, ähnlich dem Insulin bei Typ II Diabetes mellitus (Cruz *et al.*, 2012). Es kommt zu einer Reduktion der Wirksamkeit von Leptin mit gestörter Zellfunktion. Ein potentieller Mechanismus für die Entwicklung einer Leptin-Resistenz könnte ein gestörter intrazellulärer Leptin-Signalweg sein. Unsere Arbeitsgruppe konnte in einer tierexperimentellen Studie zeigen, dass die Phosphorylierung von JAK-2 (einer wichtigen Komponente des JAK2/STAT3 Signalwegs) bei adipösen Tieren signifikant reduziert war (Nave *et al.*, 2008). In der vorliegenden Studie zeigten die untersuchten Downstream-Komponenten des Leptin-Signalwegs (Cui *et al.*, 2006), STAT3 und ERK1/2, hinsichtlich ihrer Proteinexpression keine Veränderungen. Bei einer Normalisierung der Leptin-Spiegel kann die chronische Rezeptor-Aktivierung reduziert werden und somit Leptin wieder funktionell agieren.

Obwohl die physiologische Rolle von humanem Resistin noch unklar ist, ist bekannt, dass adipöse Personen erhöhte Resistin-Level besitzen. Die männliche experimentelle Gruppe in der vorliegenden Arbeit konnte ihre Plasma-Resistin Mengen signifikant reduzieren. Edwards *et al.* (2011) zeigten ebenfalls in ihrer Studie, dass Typ II Diabetes mellitus Patienten nach einer Magenverkleinerung mit anschließender Gewichtsabnahme signifikant geringere Resistin mRNA Mengen im Blut aufweisen. Resistin wird als Antwort auf proinflammatorische Signale von Makrophagen produziert (Savage *et al.*,

2001; Patel *et al.*, 2003; Bo *et al.*, 2005) und es stimuliert gleichzeitig die Sekretion von entzündungsfördernden Zytokinen aus Makrophagen (Axelsson *et al.*, 2005). In verschiedenen Studien (Ohmori *et al.*, 2005; Reilly *et al.*, 2005) konnte außerdem gezeigt werden, dass Patienten mit koronarer Herzkrankheit und Arteriosklerose erhöhte Resistin-Level aufweisen, die ebenfalls mit inflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-6, ICAM-1 und CRP) korreliert sind. Da Resistin mit pathologischen Erscheinungen assoziiert wird, scheint eine Verminderung seiner Expression, gerade auch bei Adipositas, von Vorteil zu sein.

## 5.5 NK-Zell-Zytotoxizität

NK-Zellen können über verschiedene Wege virusinfizierte oder Tumor-Zellen schädigen. Eine Methode, diese Funktion zu messen, ist die NK-Zytotoxizität gegenüber Zielzellen zu bestimmen. Diese Zytotoxizität kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden, wie der Stimulationsversuch mit dem Adipokin Leptin gezeigt hat: es sank die Zytotoxizität der humanen NK-Zelllinie NK-92 gegenüber humanen Kolonkarzinomzellen mit steigenden Leptin-Dosen signifikant. In einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe (Wrann *et al.*, 2012) konnte gezeigt werden, dass eine Kurzzeitstimulation mit Leptin die zytotoxische Lyse von Zielzellen steigert, während eine Langzeit-Leptin-Gabe inhibitorisch auf NK-Zell-Funktionen wirkt. Die Gruppe von Martin-Romero konnte analog dazu eine dosis-abhängige Modulation der Aktivität und Proliferation von T-Lymphozyten durch Leptin zeigen (2000). Beide Studien und die vorliegende Arbeit zeigen die dosis-abhängige, spezifische immunmodulierende Wirkung von Leptin. Die NKZA kann auch im Menschen direkt moduliert werden: durch sportliche Betätigung wird sie erhöht (Pedersen *et al.*, 1998), während eine zu hohe Trainingsintensität eine Immunsuppression zur Folge hat. Eine Gewichtsreduktion von Personen mit Adipositas steigert die NKZA und IFN- $\gamma$  Produktion nach bariatrischer Chirurgie (Moulin *et al.*, 2011).

## 5.6 Ausblick

In Deutschland werden die Kosten für Adipositas im Jahr 2020 mit 25 Milliarden Euro hochgerechnet (Knoll und Hauner 2008) und die Kosten für schwerwiegende Formen der Fettleibigkeit lagen in den USA bei rund 69 Billionen Dollar im Jahr 2013 (Wang *et al.*, 2015). In Zeiten stetig steigender Adipositasprävalenzen ist ein frühes Eingreifen in Form von Primär- oder aber Sekundärprävention, v.a. bei Kindern und Jugendlichen, wichtig. Auf der Europäischen Ministerkonferenz der WHO zur Bekämpfung der Adipositas im November 2006 wurde eine „Europäische Charta zur Bekämpfung der Adipositas“ herausgebracht (WHO European Ministeries Conferences on Counteracting Obesity 2006). Ein zentraler Endpunkt dieser Charta ist: „Das letztendliche Ziel aller Maßnahmen in der Region lautet Eindämmung der Epidemie und Trendumkehr. Sichtbare Fortschritte, insbesondere bei Kindern und Jugendlichen, müssten in den meisten Ländern innerhalb der nächsten 4-5 Jahre, eine Trendumkehr bis spätestens 2015 erreichbar sein.“ (WHO European Ministeries Conferences on Counteracting Obesity 2006 in deutscher Version, Seite 2). Mit einem Blick aus dem Jahr 2016 ist die Erfüllung des Ziels als kritisch zu betrachten und scheint schwer erreichbar nach so langer Zeit der

Krankheitspersistenz. Auf Grundlage dieser Charta wurde in Deutschland der „Nationale Aktionsplan gegen das Übergewicht“ von Müller *et al.* (2007) als eine Initiative der Deutschen Adipositas-Gesellschaft e.V. entworfen. In diesem sind eine geringere Prävalenz sowie die Prävention weiterer Gewichtszunahmen und die Gewichtsreduktion bzw. –normalisierung bei Adipösen als erstrebenswerte Ziele verankert.

In der vorliegenden Studie wurde den Probanden ein individuelles Programm angeboten, um schnellstmöglich und langfristig eine Abnahme des Körpergewichts und der Fettmasse zu erreichen. Einige Studien zeigen, dass eine Kombination aus Sport und Ernährungsumstellung effektiver für eine Gewichtsreduktion ist, als nur einen Schwerpunkt zu setzen (Ito *et al.*, 2001; Amati *et al.*, 2008). Durch das einfache, leicht in den Berufsalltag integrierbare Programm steigerten die Teilnehmer der vorliegenden Studie ihre Leistungsfähigkeit und verloren in kurzer Zeit rund 10 kg Fettmasse, was dem anfangs gesteckten Ziel eines Gewichtsverlusts von 10% entspricht. Die Probandinnen nahmen im Vergleich dazu nur die Hälfte der Fettmasse ab, steigerten ihre Leistungsfähigkeit in Form der relativen  $VO_{2\ max}$  aber ebenso hoch signifikant wie die männlichen Probanden. Auch bei den Teilnehmerinnen zeigte ein kurzzeitiges, leicht integrierbares, individuelles und damit auch längerfristig wirksames Programm den gewünschten Erfolg einer Fettmassereduktion sowie weitere positive Auswirkungen.

Wünschenswert wäre es, wenn die Studienteilnehmer und –teilnehmerinnen weiterhin auf gesunde Ernährung sowie Bewegung achten und damit der Adipositas gezielt und langfristig entgegen wirken. Eine Folgestudie mit größerer Probandenanzahl und längerer Studiendauer wäre wünschenswert, um weitere Effekte einer Fettmassereduktion auf das Immunsystem analysieren zu können.

## 6 Zusammenfassung

Seit Jahrzehnten nimmt die Adipositasprävalenz in Industrie- und Entwicklungsländern stetig zu und ist zu einem weltweiten Gesundheitsproblem herangewachsen. Personen mit erhöhtem BMI leiden vermehrt an kardiovaskulären Erkrankungen, Hypertonie, Typ II Diabetes mellitus sowie Dyslipidämie, und haben ein erhöhtes Risiko an malignen Tumoren wie kolorektales Karzinom, postmenopausaler Brustkrebs, Prostata- oder Nierenkarzinom zu erkranken. Das Fettgewebe des Körpers ist ein großes endokrines Organ und produziert verschiedene Adipokine (vor allem Leptin), welche die Immunfunktionen, den Metabolismus und die Zellproliferation, ebenso wie das Krebswachstum und die -metastasierung beeinflussen. Natürliche Killer (NK)-Zellen sind Immunzellen, die eine erste Barriere gegenüber malignen oder virus-infizierten Zellen bilden und ohne eine vorherige Sensibilisierung direkt agieren. Sie exprimieren apoptotische Oberflächenproteine (TRAIL) und produzieren verschiedene Zytokine (IFN- $\gamma$ ), die eine Zerstörung der Zielzellen bewirken können. In früheren Studien der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Nagetiere und Menschen mit Adipositas gestörte NK-Zell-Funktionen aufweisen, die sich *in vitro* durch eine Langzeit-Stimulationen mit Adipokinen simulieren lassen. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, welche Auswirkungen ein Gewichts- und Fettmasseverlust von adipösen Personen auf NK-Zell-Funktionen zur Folge hat und ob sich diese wieder auf ein Normalmaß regulieren lassen.

Für die vorliegende Studie wurden 32 gesunde, adipöse Frauen und Männer nach Geschlecht und Alter in eine Kontrollgruppe (n=13) und experimentelle Gruppe (n=19) eingeteilt. Die Teilnehmerinnen und Teilnehmer der experimentellen Gruppe erhielten ein standardisiertes 3-monatiges Sport- und Ernährungsprogramm, um ihre Fettmasse zu reduzieren. Die Kontrollgruppe hingegen erhielt keine Ernährungsumstellung und verzichtete weiterhin auf Sport. Den Probandinnen und Probanden wurde zu 4 verschiedenen Zeitpunkten Blut entnommen: zu Beginn der Studie (Baseline), nach einem Monat und 3 Monaten Studiendauer (Studienende) sowie 3 Monate nach Studienende. Diese wurden dann hinsichtlich Glucose-, Cholesterin- und Triglycerid-Spiegel untersucht, ebenso wurden verschiedene Plasma-Adipozytokine bestimmt. Wichtige Immunzellen wie T-, B-, NK-Zellen und Monozyten wurden mittels Dichtezentrifugation gewonnen und anschließend nach intra- und extrazellulärer Proteinmarkierung im Durchflusszytometer analysiert. Mit einem Teil der isolierten Zellen wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden außerdem Gewicht und Körperzusammensetzung mittels Bioimpedanzanalyse sowie Funktionstests auf einem Fahrradergometer mit spirometrischer Auswertung durchgeführt. Zusätzlich wurde ein NK-Zytotoxizitätsassay unter Leptin-Stimulation mit einer humanen Kolonkarzinomzelllinie durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine signifikante Reduktion des Körpergewichts, der Fettmasse, des BMI sowie des Taillen- und Hüftumfangs in beiden experimentellen Gruppen. Außerdem konnte eine signifikante Erhöhung der relativen  $VO_{2\text{ max}}$  verbunden mit erhöhter Leistungsfähigkeit erreicht werden. Auf Zellebene reagierten einzelne Populationen verschieden: während die Anzahl an Monozyten und zytotoxischen T-Zellen abnahm, erhöhte sich die Menge an T-Lymphozyten und IFN- $\gamma$  produzierenden CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen, einer Untergruppe von NK-Zellen, die ca. 90% der Gesamt-NK-Zellen ausmachen. Die im Blutplasma analysierten Proteine Leptin, Resistin und auch der Blut-

Glucose Spiegel reduzierte sich signifikant in der männlichen Experimentgruppe. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Zytotoxizität der humanen NK-Zelllinie NK-92 gegenüber humanen Kolonkarzinomzellen mit steigender Leptin-Stimulation sinkt.

Diese Studie verdeutlicht eine Modulation der Immunfunktion nach Reduktion des Körperfetts bei adipösen Personen. Ein einfaches und in den Berufsalltag leicht integrierbares Sport- und Ernährungsprogramm beeinflusst bereits nach wenigen Monaten zelluläre wie auch endokrine Komponenten und schafft so basale Veränderungen, die als Grundlage für weitere Modifikationen in Signalwegen dienen. Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen den hohen Stellenwert eines Gewichtsverlustes zur Wiederherstellung einer effektiven NK-Zell-Abwehr zur Tumorkontrolle.

## 7 Summary

For decades, the prevalence of obesity is increasing continuously in industrial and developing countries and has grown into a global health problem. People with elevated BMI suffer more often from cardiovascular diseases, hypertension, diabetes mellitus type II, dyslipidemia and have higher risk of cancer of colon, postmenopausal breast, prostate and kidney. The adipose tissue is an endocrine organ producing various adipokines (especially leptin) which influence immune functions, metabolism and cell proliferation, as well as growth and metastasis of malignant tumours. Natural killer (NK) cells are immune cells that attack tumor or virus-infected cells first place without previous sensitization. They express surface proteins (TRAIL) and produce several cytokines (IFN- $\gamma$ ) to kill target cells. In former studies of our group, impaired NK cell functions in rodents and humans with obesity after long-term stimulation with adipokines were detected. The objective of this study was to investigate the effects of weight loss and fat mass reduction in obese subjects on NK cell functions and a potential reactivation.

For the purposes of this study, 32 healthy, obese women and men were divided in control (n=13) and experimental group (n=19) according to age and gender. The participants of the experimental group performed a standardized 3-month program of exercise training and nutrition to reduce their body fat mass. They were compared with a control group, receiving no advices about nutrition and exercise at all. Blood samples of participants were obtained at 4 different points of time: at the beginning (baseline), after one month and 3 months (study end), and 3 months after the end of study. Levels of glucose, cholesterol and triacylglyceride as well as various plasma adipokines were determined. Important immune cells like T, B, NK cells and monocytes were separated by density gradient centrifugation and analyzed by flow cytometry after extra- and intracellular cell staining. Furthermore, isolated cells were investigated by means of western blot. At different points of time, study participants underwent measurements of body weight and body composition by bioelectrical impedance analysis, and functional tests (included spirometry) on a cycle ergometer. For NK cell-mediated cytotoxicity assay, a human colon adenocarcinoma cell line was stimulated with leptin.

The results show a significant reduction of body weight, fat mass, BMI, waist and hip circumferences for both experimental groups. Furthermore, the participants reached a significant increase in related  $VO_{2max}$  associated with enhanced physical performance. Immune cells obtained from study subjects responded differently: whereas the number of monocytes and cytotoxic T cells were decreased, the populations of T lymphocytes and IFN- $\gamma$  expression in CD56<sup>dim</sup> NK cells, the major subset of NK cells, were enhanced. Plasma leptin, resistin and blood glucose of male experimental group were significantly reduced. Additionally, cytotoxicity of human NK cell line NK-92 towards a human colorectal adenocarcinoma cell line was declined after stimulation with increasing leptin dosages.

This study elucidates a modulation of immune functions after body fat mass reduction in individuals with obesity. A feasible and appropriate everyday program of exercise and nutrition is already affecting cellular and endocrine components after few months, and creates fundamental alterations for further modifications in signal pathways. The results of this study demonstrate a great importance of body weight loss to reactivate an effective NK cell defence in tumor surveillance.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: CD56 <sup>dim</sup> und CD56 <sup>bright</sup> NK-Zell-Subpopulationen .....	3
Abbildung 2: Intrazelluläre JAK-STAT-Signalkaskade nach Leptin-Bindung.....	8
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Kompartiment-Modelle .....	16
Abbildung 4: Prinzip des FlowCytomix .....	22
Abbildung 5: Verdünnungsschema der Standard-Zytokine.....	22
Abbildung 6: Versuchsaufbau des Semidry-Blots. ....	25
Abbildung 7: Hydrolyse zu TDA nach BATDA-Zugabe .....	28
Abbildung 8: EuTDA-Komplexbildung nach Zugabe der Europium Solution. ....	28
Abbildung 9: Relative maximale Sauerstoffaufnahme (rel. VO <sub>2 max</sub> ) .....	32
Abbildung 10: Physical Working Capacity (PWC) .....	33
Abbildung 11: Klassifizierung der PBMC-Population im Durchflusszytometer. ....	35
Abbildung 12: Monozyten, B-Lymphozyten und T-Lymphozyten mit CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten.....	37
Abbildung 13: NK-Zellen mit CD56 <sup>dim</sup> und CD56 <sup>bright</sup> Differenzierung.).....	38
Abbildung 14: NK-Zellen mit Ob-R Expression. ....	39
Abbildung 15: NK-Zellen mit TRAIL Expression.....	40
Abbildung 16: CD56 <sup>bright</sup> und CD56 <sup>dim</sup> NK-Zellen mit intrazellulärer IFN-γ Expression. ....	41
Abbildung 17: CD56 <sup>bright</sup> und CD56 <sup>dim</sup> NK-Zellen mit intrazellulärer Granzym A Expression.....	42
Abbildung 18: NK-Zellen mit CD56 <sup>dim</sup> und CD56 <sup>bright</sup> Differenzierung. ....	44
Abbildung 19: Ob-R <sup>+</sup> und TRAIL <sup>+</sup> NK-Zellen.....	44
Abbildung 20: IFN-γ <sup>+</sup> und Granzym A <sup>+</sup> CD56 <sup>bright</sup> und CD56 <sup>dim</sup> NK-Zellen.....	45
Abbildung 21: Plasma-Konzentrationen von Leptin, Resistin, MCP-1, sTNF-R, sICAM-1, MPO und sCD40L. ....	48
Abbildung 22: NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität nach Leptin-Stimulation. ....	50
Abbildung 23: Proteinanalyse von STAT3, ERK 1/2 und seinen phosphorylierten Formen. ....	49
Abbildung 24: Proteinnachweis im Western Blot.....	49

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antikörper-Übersicht zur Nutzung in der Durchflusszytometrie. ....	20
Tabelle 2: Sammel- und Trenngel .....	24
Tabelle 3: Primär- und Sekundärantikörper .....	26
Tabelle 4: Übersicht der experimentellen Gruppe .....	31
Tabelle 5: Übersicht der Kontrollgruppe .....	31

## 10 Literaturverzeichnis

- Aderka, D., Engelmann, H., Maor, Y., Brakebusch, C. und Wallach, D. (1992). "Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors." *J Exp Med* 175(2): 323-9.
- Akira, S., Taga, T. und Kishimoto, T. (1993). "Interleukin-6 in biology and medicine." *Adv Immunol*(54): 1-78.
- Allavena, P., Bianchi, G., Zhou, D., van Damme, J., Jilek, P., Sozzani, S. und Mantovani, A. (1994). "Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3." *Eur J Immunol* 24(12): 3233-6.
- Alshaker, H., Sacco, K., Alfraidi, A., Muhammad, A., Winkler, M. und Pchejetski, D. (2015). "Leptin signalling, obesity and prostate cancer: molecular and clinical perspective on the old dilemma." *Oncotarget* 6(34): 35556-63.
- Amati, F., Dube, J. J., Shay, C. und Goodpaster, B. H. (2008). "Separate and combined effects of exercise training and weight loss on exercise efficiency and substrate oxidation." *J Appl Physiol* (1985) 105(3): 825-31.
- American Medical Association (2013). H-440.842 Recognition of Obesity as a Disease, American Medical Association House of Delegates.
- An, J. J., Han, D. H., Kim, D. M., Kim, S. H., Rhee, Y., Lee, E. J. und Lim, S. K. (2007). "Expression and regulation of osteoprotegerin in adipose tissue." *Yonsei Med J* 48(5): 765-72.
- Arounleut, P., Bowser, M., Upadhyay, S., Shi, X. M., Fulzele, S., Johnson, M. H., Stranahan, A. M., Hill, W. D., Isales, C. M. und Hamrick, M. W. (2013). "Absence of functional leptin receptor isoforms in the POUND (Lepr(db/lb)) mouse is associated with muscle atrophy and altered myoblast proliferation and differentiation." *PLoS One* 8(8): e72330.
- Ashkenazi, A., Holland, P. und Eckhardt, S. G. (2008). "Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL)." *J Clin Oncol* 26(21): 3621-30.
- Ashkenazi, A., Pai, R. C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D. A., Marsters, S. A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A. E., Hebert, A., DeForge, L., Koumenis, I. L., Lewis, D., Harris, L., Bussiere, J., Koepfen, H., Shahrokh, Z. und Schwall, R. H. (1999). "Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand." *J Clin Invest* 104(2): 155-62.
- Ashley, D. T., O'Sullivan, E. P., Davenport, C., Devlin, N., Crowley, R. K., McCaffrey, N., Moyna, N. M., Smith, D. und O'Gorman, D. J. (2011). "Similar to adiponectin, serum levels of osteoprotegerin are associated with obesity in healthy subjects." *Metabolism* 60(7): 994-1000.
- Axelsson, J., Heimbürger, O., Lindholm, B. und Stenvinkel, P. (2005). "Adipose tissue and its relation to inflammation: the role of adipokines." *J Ren Nutr* 15(1): 131-6.
- Azuma, K., Katsukawa, F., Oguchi, S., Murata, M., Yamazaki, H., Shimada, A. und Saruta, T. (2003). "Correlation between serum resistin level and adiposity in obese individuals." *Obes Res* 11(8): 997-1001.
- Balachandran, S. und Adams, G. P. "Interferon-gamma-induced necrosis: an antitumor biotherapeutic perspective." *J Interferon Cytokine Res* 33(4): 171-80.
- Ballesteros-Pomar, M. D., Calleja, S., Diez-Rodriguez, R., Calleja-Fernandez, A., Vidal-Casariago, A., Nunez-Alonso, A., Cano-Rodriguez, I. und Olcoz-Goni, J. L. (2014). "Inflammatory status is different in relationship to insulin resistance in severely obese people and changes after bariatric surgery or diet-induced weight loss." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 122(10): 592-6.
- Banks, A. S., Davis, S. M., Bates, S. H. und Myers, M. G., Jr. (2000). "Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor." *J Biol Chem* 275(19): 14563-72.
- Barber, D. F., Faure, M. und Long, E. O. (2004). "LFA-1 contributes an early signal for NK cell cytotoxicity." *J Immunol* 173(6): 3653-9.
- Barlow, C. E., LaMonte, M. J., Fitzgerald, S. J., Kampert, J. B., Perrin, J. L. und Blair, S. N. (2006). "Cardiorespiratory fitness is an independent predictor of hypertension incidence among initially normotensive healthy women." *Am J Epidemiol* 163(2): 142-50.
- Barna, B. P., Pettay, J., Barnett, G. H., Zhou, P., Iwasaki, K. und Estes, M. L. (1994). "Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in adult human non-neoplastic astrocytes is sensitive to tumor necrosis factor (TNF) or antibody to the 55-kDa TNF receptor." *J Neuroimmunol* 50(1): 101-7.
- Bastard, J. P., Jardel, C., Bruckert, E., Blondy, P., Capeau, J., Laville, M., Vidal, H. und Hainque, B. (2000). "Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss." *J Clin Endocrinol Metab* 85(9): 3338-42.

- Bastard, J. P., Jardel, C., Delattre, J., Hainque, B., Bruckert, E. und Oberlin, F. (1999). "Evidence for a link between adipose tissue interleukin-6 content and serum C-reactive protein concentrations in obese subjects." *Circulation* 99(16): 2221-2.
- Bekisz, J., Sato, Y., Johnson, C., Husain, S. R., Puri, R. K. und Zoon, K. C. (2013). "Immunomodulatory effects of interferons in malignancies." *J Interferon Cytokine Res* 33(4): 154-61.
- Belada, D., Mayer, J., Czuczman, M., Flinn, I., Durbin-Johnson, B. und Bray, G. (2010). "Phase II study of dulanermin plus rituximab in patients with relapsed follicular non-Hodgkin's lymphoma (NHL)." *Journal of Clinical Oncology* 28: abstract 8104.
- Bell, J. A., Kivimaki, M. und Hamer, M. (2014). "Metabolically healthy obesity and risk of incident type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies." *Obes Rev* 15(6): 504-15.
- Bennett, B. D., Solar, G. P., Yuan, J. Q., Mathias, J., Thomas, G. R. und Matthews, W. (1996). "A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis." *Curr Biol* 6(9): 1170-80.
- Beresford, P. J., Zhang, D., Oh, D. Y., Fan, Z., Greer, E. L., Russo, M. L., Jaju, M. und Lieberman, J. (2001). "Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks." *J Biol Chem* 276(46): 43285-93.
- Bianchini, F., Kaaks, R. und Vainio, H. (2002). "Overweight, obesity, and cancer risk." *Lancet Oncol* 3(9): 565-74.
- Blair, S. N., Kampert, J. B., Kohl, H. W., 3rd, Barlow, C. E., Macera, C. A., Paffenbarger, R. S., Jr. und Gibbons, L. W. (1996). "Influences of cardiorespiratory fitness and other precursors on cardiovascular disease and all-cause mortality in men and women." *Jama* 276(3): 205-10.
- Bo, S., Gambino, R., Pagani, A., Guidi, S., Gentile, L., Cassader, M. und Pagano, G. F. (2005). "Relationships between human serum resistin, inflammatory markers and insulin resistance." *Int J Obes (Lond)* 29(11): 1315-20.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. und Howard, J. C. (1997). "Cellular responses to interferon-gamma." *Annu Rev Immunol* 15: 749-95.
- Brown, Z., Strieter, R. M., Neild, G. H., Thompson, R. C., Kunkel, S. L. und Westwick, J. (1992). "IL-1 receptor antagonist inhibits monocyte chemotactic peptide 1 generation by human mesangial cells." *Kidney Int* 42(1): 95-101.
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Barber, D. F., Ljunggren, H. G. und Long, E. O. (2005). "Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells." *J Exp Med* 202(7): 1001-12.
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H. G. und Long, E. O. (2006). "Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells." *Immunol Rev* 214: 73-91.
- Burnett, M. S., Lee, C. W., Kinnaird, T. D., Stabile, E., Durrani, S., Dullum, M. K., Devaney, J. M., Fishman, C., Stamou, S., Canos, D., Zbinden, S., Clavijo, L. C., Jang, G. J., Andrews, J. A., Zhu, J. und Epstein, S. E. (2005). "The potential role of resistin in atherogenesis." *Atherosclerosis* 182(2): 241-8.
- Calbet, J. A., Ponce-Gonzalez, J. G., Perez-Suarez, I., de la Calle Herrero, J. und Holmberg, H. C. (2015). "A time-efficient reduction of fat mass in 4 days with exercise and caloric restriction." *Scand J Med Sci Sports* 25(2): 223-33.
- Caldefie-Chezet, F., Poulin, A., Tridon, A., Sion, B. und Vasson, M. P. (2001). "Leptin: a potential regulator of polymorphonuclear neutrophil bactericidal action?" *J Leukoc Biol* 69(3): 414-8.
- Caldefie-Chezet, F., Poulin, A. und Vasson, M. P. (2003). "Leptin regulates functional capacities of polymorphonuclear neutrophils." *Free Radic Res* 37(8): 809-14.
- Caligiuri, M. A. (2008). "Human natural killer cells." *Blood* 112(3): 461-9.
- Chehab, F. F., Lim, M. E. und Lu, R. (1996). "Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin." *Nat Genet* 12(3): 318-20.
- Chinnaiyan, A. M., Prasad, U., Shankar, S., Hamstra, D. A., Shanaiah, M., Chenevert, T. L., Ross, B. D. und Rehemtulla, A. (2000). "Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(4): 1754-9.
- Clement, K., Viguerie, N., Poitou, C., Carette, C., Pelloux, V., Curat, C. A., Sicard, A., Rome, S., Benis, A., Zucker, J. D., Vidal, H., Laville, M., Barsh, G. S., Basdevant, A., Stich, V., Cancellolo, R. und Langin, D. (2004). "Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects." *Faseb J* 18(14): 1657-69.
- Coleman, D. L. (1978). "Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice." *Diabetologia* 14(3): 141-8.
- Coleman, D. L. (2010). "A historical perspective on leptin." *Nat Med* 16(10): 1097-9.
- Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Nyce, M. R., Ohannesian, J. P., Marco, C. C., McKee, L. J. und Bauer, T. L. (1996). "Serum

- immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans." *N Engl J Med* 334(5): 292-5.
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A. und Caligiuri, M. A. (2001). "The biology of human natural killer-cell subsets." *Trends Immunol* 22(11): 633-40.
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Turner, S. C., Chen, K. S., Ghaheri, B. A., Ghayur, T., Carson, W. E. und Caligiuri, M. A. (2001). "Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset." *Blood* 97(10): 3146-51.
- Crujeiras, A. B., Carreira, M. C., Cabia, B., Andrade, S., Amil, M. und Casanueva, F. F. (2015). "Leptin resistance in obesity: An epigenetic landscape." *Life Sci*.
- Cruz, N. G., Sousa, L. P., Sousa, M. O., Pietrani, N. T., Fernandes, A. P. und Gomes, K. B. (2012). "The linkage between inflammation and Type 2 diabetes mellitus." *Diabetes Res Clin Pract* 99(2): 85-92.
- Cui, H., Cai, F. und Belsham, D. D. (2006). "Leptin signaling in neurotensin neurons involves STAT, MAP kinases ERK1/2, and p38 through c-Fos and ATF1." *Faseb J* 20(14): 2654-6.
- Cushing, S. D., Berliner, J. A., Valente, A. J., Territo, M. C., Navab, M., Parhami, F., Gerrity, R., Schwartz, C. J. und Fogelman, A. M. (1990). "Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(13): 5134-8.
- Data Input GmbH (2009). *Das B.I.A.-Kompendium III. Ausgabe.*
- Davis, D. M., Chiu, I., Fassett, M., Cohen, G. B., Mandelboim, O. und Strominger, J. L. (1999). "The human natural killer cell immune synapse." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(26): 15062-7.
- De Maria, A., Bozzano, F., Cantoni, C. und Moretta, L. (2011). "Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(2): 728-32.
- De Pergola, G. und Silvestris, F. (2013). "Obesity as a major risk factor for cancer." *J Obes* 2013: 291546.
- De Rosa, V., Galgani, M., Santopaolo, M., Colamatteo, A., Laccetti, R. und Matarese, G. (2015). "Nutritional control of immunity: Balancing the metabolic requirements with an appropriate immune function." *Semin Immunol*.
- Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S. und Sawaya, B. E. (2009). "Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview." *J Interferon Cytokine Res* 29(6): 313-26.
- Desideri, G. und Ferri, C. (2003). "Effects of obesity and weight loss on soluble CD40L levels." *Jama* 289(14): 1781-2.
- Dexter, D. L., Barbosa, J. A. und Calabresi, P. (1979). "N,N-dimethylformamide-induced alteration of cell culture characteristics and loss of tumorigenicity in cultured human colon carcinoma cells." *Cancer Res* 39(3): 1020-5.
- Dietz, W. H., Baur, L. A., Hall, K., Puhl, R. M., Taveras, E. M., Uauy, R. und Kopelman, P. (2015). "Management of obesity: improvement of health-care training and systems for prevention and care." *Lancet* 385(9986): 2521-33.
- Dinsa, G. D., Goryakin, Y., Fumagalli, E. und Suhrcke, M. (2012). "Obesity and socioeconomic status in developing countries: a systematic review." *Obes Rev* 13(11): 1067-79.
- Donnelly, J. E., Hill, J. O., Jacobsen, D. J., Pottenger, J., Sullivan, D. K., Johnson, S. L., Heelan, K., Hise, M., Fennessey, P. V., Sonko, B., Sharp, T., Jakicic, J. M., Blair, S. N., Tran, Z. V., Mayo, M., Gibson, C. und Washburn, R. A. (2003). "Effects of a 16-month randomized controlled exercise trial on body weight and composition in young, overweight men and women: the Midwest Exercise Trial." *Arch Intern Med* 163(11): 1343-50.
- Dorman, S. E., Picard, C., Lammas, D., Heyne, K., van Dissel, J. T., Baretto, R., Rosenzweig, S. D., Newport, M., Levin, M., Roesler, J., Kumararatne, D., Casanova, J. L. und Holland, S. M. (2004). "Clinical features of dominant and recessive interferon gamma receptor 1 deficiencies." *Lancet* 364(9451): 2113-21.
- Dorman, S. E., Uzel, G., Roesler, J., Bradley, J. S., Bastian, J., Billman, G., King, S., Filie, A., Schermerhorn, J. und Holland, S. M. (1999). "Viral infections in interferon-gamma receptor deficiency." *J Pediatr* 135(5): 640-3.
- Ducy, P., Amling, M., Takeda, S., Priemel, M., Schilling, A. F., Beil, F. T., Shen, J., Vinson, C., Rueger, J. M. und Karsenty, G. (2000). "Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass." *Cell* 100(2): 197-207.
- Duffaut, C., Zakaroff-Girard, A., Bourlier, V., Decaunes, P., Maumus, M., Chiotasso, P., Sengenès, C., Lafontan, M., Galitzky, J. und Bouloumie, A. (2009). "Interplay between human adipocytes and T lymphocytes in obesity: CCL20 as an adipochemokine and T lymphocytes as lipogenic modulators." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29(10): 1608-14.

- Dunn, G. P., Old, L. J. und Schreiber, R. D. (2004). "The three Es of cancer immunoediting." *Annu Rev Immunol* 22: 329-60.
- Edwards, C., Hindle, A. K., Fu, S. und Brody, F. (2011). "Downregulation of leptin and resistin expression in blood following bariatric surgery." *Surg Endosc* 25(6): 1962-8.
- Elmqvist, J. K., Coppari, R., Balthasar, N., Ichinose, M. und Lowell, B. B. (2005). "Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis." *J Comp Neurol* 493(1): 63-71.
- Emery, J. G., McDonnell, P., Burke, M. B., Deen, K. C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E. R., Eichman, C., DiPrinzio, R., Dodds, R. A., James, I. E., Rosenberg, M., Lee, J. C. und Young, P. R. (1998). "Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL." *J Biol Chem* 273(23): 14363-7.
- Eriksson, M., Leitz, G., Fallman, E., Axner, O., Ryan, J. C., Nakamura, M. C. und Sentman, C. L. (1999). "Inhibitory receptors alter natural killer cell interactions with target cells yet allow simultaneous killing of susceptible targets." *J Exp Med* 190(7): 1005-12.
- Evenson, K. R., Stevens, J., Cai, J., Thomas, R. und Thomas, O. (2003). "The effect of cardiorespiratory fitness and obesity on cancer mortality in women and men." *Med Sci Sports Exerc* 35(2): 270-7.
- Faggioni, R., Jones-Carson, J., Reed, D. A., Dinarello, C. A., Feingold, K. R., Grunfeld, C. und Fantuzzi, G. (2000). "Leptin-deficient (ob/ob) mice are protected from T cell-mediated hepatotoxicity: role of tumor necrosis factor alpha and IL-18." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(5): 2367-72.
- Fantuzzi, G. und Faggioni, R. (2000). "Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis." *J Leukoc Biol* 68(4): 437-46.
- Fathy, S. M. und Morshed, G. (2013). "Peripheral blood lymphocyte subsets (CD4+, CD8+ T cells), leptin level and weight loss after laparoscopic greater curvature plication in morbidly obese patients." *Arch Med Sci* 10(5): 886-90.
- Fauriat, C., Long, E. O., Ljunggren, H. G. und Bryceson, Y. T. (2010). "Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition." *Blood* 115(11): 2167-76.
- Fehniger, T. A., Shah, M. H., Turner, M. J., VanDeusen, J. B., Whitman, S. P., Cooper, M. A., Suzuki, K., Wechser, M., Goodsaid, F. und Caligiuri, M. A. (1999). "Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response." *J Immunol* 162(8): 4511-20.
- Friedewald, W. T., Levy, R. I. und Fredrickson, D. S. (1972). "Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge." *Clin Chem* 18(6): 499-502.
- Friedman, J. M. und Halaas, J. L. (1998). "Leptin and the regulation of body weight in mammals." *Nature* 395(6704): 763-70.
- Friedman, J. M. und Leibel, R. L. (1992). "Tackling a weighty problem." *Cell* 69(2): 217-20.
- Garcia-Robles, M. J., Segura-Ortega, J. E. und Fafutis-Morris, M. (2013). "The biology of leptin and its implications in breast cancer: a general view." *J Interferon Cytokine Res* 33(12): 717-27.
- Garofalo, C. und Surmacz, E. (2006). "Leptin and cancer." *J Cell Physiol* 207(1): 12-22.
- Geer, E. B. und Shen, W. (2009). "Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance." *Gend Med* 6 Suppl 1: 60-75.
- Gleeson, M. (2007). "Immune function in sport and exercise." *J Appl Physiol* (1985) 103(2): 693-9.
- Gleeson, M., Bishop, N. C., Stensel, D. J., Lindley, M. R., Mastana, S. S. und Nimmo, M. A. (2011). "The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease." *Nat Rev Immunol* 11(9): 607-15.
- Gong, J. H., Maki, G. und Klingemann, H. G. (1994). "Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells." *Leukemia* 8(4): 652-8.
- Grimble, R. F. (2001). "Nutritional modulation of immune function." *Proc Nutr Soc* 60(3): 389-97.
- Hayashida, K., Nanki, T., Girschick, H., Yavuz, S., Ochi, T. und Lipsky, P. E. (2001). "Synovial stromal cells from rheumatoid arthritis patients attract monocytes by producing MCP-1 and IL-8." *Arthritis Res* 3(2): 118-26.
- Heer, M., Baecker, N., Wnendt, S., Fischer, A., Biolo, G. und Frings-Meuthen, P. (2014). "How fast is recovery of impaired glucose tolerance after 21-day bed rest (NUC study) in healthy adults?" *ScientificWorldJournal* 2014: 803083.
- Heffelfinger, S. C., Hawkins, H. H., Barrish, J., Taylor, L. und Darlington, G. J. (1992). "SK HEP-1: a human cell line of endothelial origin." *In Vitro Cell Dev Biol* 28A(2): 136-42.

- Herberman, R. B. und Holden, H. T. (1978). "Natural cell-mediated immunity." *Adv Cancer Res* 27: 305-77.
- Herbst, R. S., Eckhardt, S. G., Kurzrock, R., Ebbinghaus, S., O'Dwyer, P. J., Gordon, M. S., Novotny, W., Goldwasser, M. A., Tohnya, T. M., Lum, B. L., Ashkenazi, A., Jubb, A. M. und Mendelson, D. S. (2010). "Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer." *J Clin Oncol* 28(17): 2839-46.
- Hirose, H., Saito, I., Kawai, T., Nakamura, K., Maruyama, H. und Saruta, T. (1998). "Serum leptin level: possible association with haematopoiesis in adolescents, independent of body mass index and serum insulin." *Clin Sci (Lond)* 94(6): 633-6.
- Hocking, S., Samocha-Bonet, D., Milner, K. L., Greenfield, J. R. und Chisholm, D. J. (2013). "Adiposity and insulin resistance in humans: the role of the different tissue and cellular lipid depots." *Endocr Rev* 34(4): 463-500.
- Holland, P. M. (2014). "Death receptor agonist therapies for cancer, which is the right TRAIL?" *Cytokine Growth Factor Rev* 25(2): 185-93.
- Hotamisligil, G. S., Arner, P., Caro, J. F., Atkinson, R. L. und Spiegelman, B. M. (1995). "Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance." *J Clin Invest* 95(5): 2409-15.
- Huebner, L., Engeli, S., Wrann, C. D., Goudeva, L., Laue, T. und Kielstein, H. (2013). "Human NK cell subset functions are differentially affected by adipokines." *PLoS One* 8(9): e75703.
- Ikeda, H., Old, L. J. und Schreiber, R. D. (2002). "The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting." *Cytokine Growth Factor Rev* 13(2): 95-109.
- Irwin, M. R. (2008). "Human psychoneuroimmunology: 20 years of discovery." *Brain Behav Immun* 22(2): 129-39.
- Ito, H., Ohshima, A., Tsuzuki, M., Ohto, N., Yanagawa, M., Maruyama, T., Kaji, Y., Kanaya, S. und Nishioka, K. (2001). "Effects of increased physical activity and mild calorie restriction on heart rate variability in obese women." *Jpn Heart J* 42(4): 459-69.
- Jackson, A. S., Stanforth, P. R., Gagnon, J., Rankinen, T., Leon, A. S., Rao, D. C., Skinner, J. S., Bouchard, C. und Wilmore, J. H. (2002). "The effect of sex, age and race on estimating percentage body fat from body mass index: The Heritage Family Study." *Int J Obes Relat Metab Disord* 26(6): 789-96.
- Jenne, D. E. und Tschopp, J. (1988). "Granzymes, a family of serine proteases released from granules of cytolytic T lymphocytes upon T cell receptor stimulation." *Immunological Reviews* 103: 53-71.
- Jono, S., Ikari, Y., Shioi, A., Mori, K., Miki, T., Hara, K. und Nishizawa, Y. (2002). "Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease." *Circulation* 106(10): 1192-4.
- Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K. J., Podack, E. R., Zinkernagel, R. M. und Hengartner, H. (1994). "Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice." *Nature* 369(6475): 31-7.
- Karlsson, J., Taft, C., Ryden, A., Sjostrom, L. und Sullivan, M. (2007). "Ten-year trends in health-related quality of life after surgical and conventional treatment for severe obesity: the SOS intervention study." *Int J Obes (Lond)* 31(8): 1248-61.
- Katzmarzyk, P. T., Church, T. S. und Blair, S. N. (2004). "Cardiorespiratory fitness attenuates the effects of the metabolic syndrome on all-cause and cardiovascular disease mortality in men." *Arch Intern Med* 164(10): 1092-7.
- Katzmarzyk, P. T., Reeder, B. A., Elliott, S., Joffres, M. R., Pahwa, P., Raine, K. D., Kirkland, S. A. und Paradis, G. (2012). "Body mass index and risk of cardiovascular disease, cancer and all-cause mortality." *Can J Public Health* 103(2): 147-51.
- Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Nakayama, M., Takeda, K., Akiba, H., Tsutsui, H., Okamura, H., Nakanishi, K., Okumura, K. und Yagita, H. (1999). "Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells." *J Immunol* 163(4): 1906-13.
- Kelley, D. S., Daudu, P. A., Branch, L. B., Johnson, H. L., Taylor, P. C. und Mackey, B. (1994). "Energy restriction decreases number of circulating natural killer cells and serum levels of immunoglobulins in overweight women." *Eur J Clin Nutr* 48(1): 9-18.
- Kelley, S. K. und Ashkenazi, A. (2004). "Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL." *Curr Opin Pharmacol* 4(4): 333-9.
- Kelley, S. K., Harris, L. A., Xie, D., Deforge, L., Totpal, K., Bussiere, J. und Fox, J. A. (2001). "Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety." *J Pharmacol Exp Ther* 299(1): 31-8.

- Kelly, K. R., Navaneethan, S. D., Solomon, T. P., Haus, J. M., Cook, M., Barkoukis, H. und Kirwan, J. P. (2014). "Lifestyle-induced decrease in fat mass improves adiponectin secretion in obese adults." *Med Sci Sports Exerc* 46(5): 920-6.
- Kim, S., Poursine-Laurent, J., Truscott, S. M., Lybarger, L., Song, Y. J., Yang, L., French, A. R., Sunwoo, J. B., Lemieux, S., Hansen, T. H. und Yokoyama, W. M. (2005). "Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules." *Nature* 436(7051): 709-13.
- Kintscher, U., Hartge, M., Hess, K., Foryst-Ludwig, A., Clemenz, M., Wabitsch, M., Fischer-Posovszky, P., Barth, T. F., Dragun, D., Skurk, T., Hauner, H., Bluher, M., Unger, T., Wolf, A. M., Knippschild, U., Hombach, V. und Marx, N. (2008). "T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(7): 1304-10.
- Klebanoff, S. J. (1980). "Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes." *Ann Intern Med* 93(3): 480-9.
- Knoll, K.-P. und Hauner, H. (2008). "Kosten der Adipositas in der Bundesrepublik Deutschland Eine aktuelle Krankheitskostenstudie." *Adipositas* 4(2): 204-210.
- Knuth, N. D., Johannsen, D. L., Tamboli, R. A., Marks-Shulman, P. A., Huizenga, R., Chen, K. Y., Abumrad, N. N., Ravussin, E. und Hall, K. D. (2014). "Metabolic adaptation following massive weight loss is related to the degree of energy imbalance and changes in circulating leptin." *Obesity (Silver Spring)* 22(12): 2563-9.
- Kusano, K. F., Nakamura, K., Kusano, H., Nishii, N., Banba, K., Ikeda, T., Hashimoto, K., Yamamoto, M., Fujio, H., Miura, A., Ohta, K., Morita, H., Saito, H., Emori, T., Nakamura, Y., Kusano, I. und Ohe, T. (2004). "Significance of the level of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerosis." *Circ J* 68(7): 671-6.
- La Cava, A. und Matarese, G. (2004). "The weight of leptin in immunity." *Nat Rev Immunol* 4(5): 371-9.
- Lamas, O., Marti, A. und Martinez, J. A. (2002). "Obesity and immunocompetence." *Eur J Clin Nutr* 56 Suppl 3: S42-5.
- Lanier, L. L. (2001). "Face off--the interplay between activating and inhibitory immune receptors." *Curr Opin Immunol* 13(3): 326-31.
- Lanier, L. L., Le, A. M., Civin, C. I., Loken, M. R. und Phillips, J. H. (1986). "The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes." *J Immunol* 136(12): 4480-6.
- Laue, T., Wrann, C. D., Hoffmann-Castendiek, B., Pietsch, D., Huebner, L. und Kielstein, H. (2015). "Altered NK cell function in obese healthy humans." *BMC Obesity* 2:1.
- Lautenbach, A., Budde, A., Wrann, C. D., Teichmann, B., Vieten, G., Karl, T. und Nave, H. (2009). "Obesity and the associated mediators leptin, estrogen and IGF-I enhance the cell proliferation and early tumorigenesis of breast cancer cells." *Nutr Cancer* 61(4): 484-91.
- Lautenbach, A., Wrann, C. D., Jacobs, R., Muller, G., Brabant, G. und Nave, H. (2009). "Altered phenotype of NK cells from obese rats can be normalized by transfer into lean animals." *Obesity (Silver Spring)* 17(10): 1848-55.
- Lazar, M. A. (2007). "Resistin- and Obesity-associated metabolic diseases." *Horm Metab Res* 39(10): 710-6.
- Leinonen, E., Hurt-Camejo, E., Wiklund, O., Hulten, L. M., Hiukka, A. und Taskinen, M. R. (2003). "Insulin resistance and adiposity correlate with acute-phase reaction and soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes." *Atherosclerosis* 166(2): 387-94.
- Lemke, J., von Karstedt, S., Zinngrebe, J. und Walczak, H. (2014). "Getting TRAIL back on track for cancer therapy." *Cell Death Differ* 21(9): 1350-64.
- Lieberman, J. (2010). "Granzyme A activates another way to die." *Immunol Rev* 235(1): 93-104.
- Lin, F. C. und Young, H. A. (2014). "Interferons: Success in anti-viral immunotherapy." *Cytokine Growth Factor Rev* 25(4): 369-76.
- Liu, C. C., Perussia, B., Cohn, Z. A. und Young, J. D. (1986). "Identification and characterization of a pore-forming protein of human peripheral blood natural killer cells." *J Exp Med* 164(6): 2061-76.
- Ljunggren, H. G. und Karre, K. (1990). "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition." *Immunol Today* 11(7): 237-44.
- Loetscher, P., Seitz, M., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M. und Moser, B. (1994). "Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes." *Faseb J* 8(13): 1055-60.
- Long, E. O. (2011). "ICAM-1: getting a grip on leukocyte adhesion." *J Immunol* 186(9): 5021-3.

- Lopez, J. A., Susanto, O., Jenkins, M. R., Lukoyanova, N., Sutton, V. R., Law, R. H., Johnston, A., Bird, C. H., Bird, P. I., Whisstock, J. C., Trapani, J. A., Saibil, H. R. und Voskoboinik, I. (2013). "Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack." *Blood* 121(14): 2659-68.
- Lord, G. M., Matarese, G., Howard, J. K., Baker, R. J., Bloom, S. R. und Lechler, R. I. (1998). "Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression." *Nature* 394(6696): 897-901.
- Lynch, J., Helmrich, S. P., Lakka, T. A., Kaplan, G. A., Cohen, R. D., Salonen, R. und Salonen, J. T. (1996). "Moderately intense physical activities and high levels of cardiorespiratory fitness reduce the risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in middle-aged men." *Arch Intern Med* 156(12): 1307-14.
- Mace, E. M., Dongre, P., Hsu, H. T., Sinha, P., James, A. M., Mann, S. S., Forbes, L. R., Watkin, L. B. und Orange, J. S. (2014). "Cell biological steps and checkpoints in accessing NK cell cytotoxicity." *Immunol Cell Biol* 92(3): 245-55.
- Mahad, D. J. und Ransohoff, R. M. (2003). "The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)." *Semin Immunol* 15(1): 23-32.
- Maki, G., Klingemann, H. G., Martinson, J. A. und Tam, Y. K. (2001). "Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92." *J Hematother Stem Cell Res* 10(3): 369-83.
- Marciano, B. E., Wesley, R., De Carlo, E. S., Anderson, V. L., Barnhart, L. A., Darnell, D., Malech, H. L., Gallin, J. I. und Holland, S. M. (2004). "Long-term interferon-gamma therapy for patients with chronic granulomatous disease." *Clin Infect Dis* 39(5): 692-9.
- Markofski, M. M., Flynn, M. G., Carrillo, A. E., Armstrong, C. L., Campbell, W. W. und Sedlock, D. A. (2014). "Resistance exercise training-induced decrease in circulating inflammatory CD14+CD16+ monocyte percentage without weight loss in older adults." *Eur J Appl Physiol* 114(8): 1737-48.
- Martin-Romero, C., Santos-Alvarez, J., Goberna, R. und Sanchez-Margalet, V. (2000). "Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes." *Cell Immunol* 199(1): 15-24.
- Martinvalet, D., Dykxhoorn, D. M., Ferrini, R. und Lieberman, J. (2008). "Granzyme A cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death." *Cell* 133(4): 681-92.
- Mason, C., Xiao, L., Imayama, I., Duggan, C. R., Campbell, K. L., Kong, A., Wang, C. Y., Alfano, C. M., Blackburn, G. L., Foster-Schubert, K. E. und McTiernan, A. (2015). "The effects of separate and combined dietary weight loss and exercise on fasting ghrelin concentrations in overweight and obese women: a randomized controlled trial." *Clin Endocrinol (Oxf)* 82(3): 369-76.
- Masson, D. und Tschopp, J. (1987). "A family of serine esterases in lytic granules of cytolytic T lymphocytes." *Cell* 49(5): 679-85.
- Matsushima, K., Larsen, C. G., DuBois, G. C. und Oppenheim, J. J. (1989). "Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line." *J Exp Med* 169(4): 1485-90.
- Miller, C. H., Maher, S. G. und Young, H. A. (2009). "Clinical Use of Interferon-gamma." *Ann N Y Acad Sci* 1182: 69-79.
- Miller, G. D., Isom, S., Morgan, T. M., Vitolins, M. Z., Blackwell, C., Brosnihan, K. B., Diz, D. I., Katula, J. und Goff, D. (2014). "Effects of a community-based weight loss intervention on adipose tissue circulating factors." *Diabetes Metab Syndr* 8(4): 205-11.
- Moulin, C. M., Marguti, I., Peron, J. P., Halpern, A. und Rizzo, L. V. (2011). "Bariatric surgery reverses natural killer (NK) cell activity and NK-related cytokine synthesis impairment induced by morbid obesity." *Obes Surg* 21(1): 112-8.
- Müller, M. J., Maier, H. und Mann, R. (2007). Nationaler Aktionsplan gegen das Übergewicht. Eine Initiative der Deutschen Adipositas-Gesellschaft e.V.
- Münzberg, H. und Morrison, C. D. (2015). "Structure, production and signaling of leptin." *Metabolism* 64(1): 13-23.
- Nagareddy, P. R., Kraakman, M., Masters, S. L., Stirzaker, R. A., Gorman, D. J., Grant, R. W., Dragoljevic, D., Hong, E. S., Abdel-Latif, A., Smyth, S. S., Choi, S. H., Korner, J., Bornfeldt, K. E., Fisher, E. A., Dixit, V. D., Tall, A. R., Goldberg, I. J. und Murphy, A. J. (2014). "Adipose tissue macrophages promote myelopoiesis and monocytosis in obesity." *Cell Metab* 19(5): 821-35.
- Nagler, A., Lanier, L. L., Cwirla, S. und Phillips, J. H. (1989). "Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells." *J Immunol* 143(10): 3183-91.

- Nakashima, H., Miyake, K., Clark, C. R., Bekisz, J., Finbloom, J., Husain, S. R., Baron, S., Puri, R. K. und Zoon, K. C. (2012). "Potent antitumor effects of combination therapy with IFNs and monocytes in mouse models of established human ovarian and melanoma tumors." *Cancer Immunol Immunother* 61(7): 1081-92.
- Nave, H., Mueller, G., Siegmund, B., Jacobs, R., Stroh, T., Schueler, U., Hopfe, M., Behrendt, P., Buchenauer, T., Pabst, R. und Brabant, G. (2008). "Resistance of Janus kinase-2 dependent leptin signaling in natural killer (NK) cells: a novel mechanism of NK cell dysfunction in diet-induced obesity." *Endocrinology* 149(7): 3370-8.
- Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., Mullany, E. C., Biryukov, S., Abbafati, C., Abera, S. F., Abraham, J. P., Abu-Rmeileh, N. M., Achoki, T., AlBuhairan, F. S., Alemu, Z. A., Alfonso, R., Ali, M. K., Ali, R., Guzman, N. A., Ammar, W., Anwari, P., Banerjee, A., Barquera, S., Basu, S., Bennett, D. A., Bhutta, Z., Blore, J., Cabral, N., Nonato, I. C., Chang, J. C., Chowdhury, R., Courville, K. J., Criqui, M. H., Cundiff, D. K., Dabhadkar, K. C., Dandona, L., Davis, A., Dayama, A., Dharmaratne, S. D., Ding, E. L., Durrani, A. M., Esteghamati, A., Farzadfar, F., Fay, D. F., Feigin, V. L., Flaxman, A., Forouzanfar, M. H., Goto, A., Green, M. A., Gupta, R., Hafezi-Nejad, N., Hankey, G. J., Harewood, H. C., Havmoeller, R., Hay, S., Hernandez, L., Husseini, A., Idrisov, B. T., Ikeda, N., Islami, F., Jahangir, E., Jassal, S. K., Jee, S. H., Jeffreys, M., Jonas, J. B., Kabagambe, E. K., Khalifa, S. E., Kengne, A. P., Khader, Y. S., Khang, Y. H., Kim, D., Kimokoti, R. W., Kinge, J. M., Kokubo, Y., Kosen, S., Kwan, G., Lai, T., Leinsalu, M., Li, Y., Liang, X., Liu, S., Logroscino, G., Lotufo, P. A., Lu, Y., Ma, J., Mainoo, N. K., Mensah, G. A., Merriman, T. R., Mokdad, A. H., Moschandreas, J., Naghavi, M., Naheed, A., Nand, D., Narayan, K. M., Nelson, E. L., Neuhouser, M. L., Nisar, M. I., Ohkubo, T., Oti, S. O., Pedroza, A., Prabhakaran, D., Roy, N., Sampson, U., Seo, H., Sepanlou, S. G., Shibuya, K., Shiri, R., Shiue, I., Singh, G. M., Singh, J. A., Skirbekk, V., Stapelberg, N. J., Sturua, L., Sykes, B. L., Tobias, M., Tran, B. X., Trasande, L., Toyoshima, H., van de Vijver, S., Vasankari, T. J., Veerman, J. L., Velasquez-Melendez, G., Vlassov, V. V., Vollset, S. E., Vos, T., Wang, C., Wang, X., Weiderpass, E., Werdecker, A., Wright, J. L., Yang, Y. C., Yatsuya, H., Yoon, J., Yoon, S. J., Zhao, Y., Zhou, M., Zhu, S., Lopez, A. D., Murray, C. J. und Gakidou, E. (2014). "Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013." *Lancet* 384(9945): 766-81.
- Nicholls, S. J. und Hazen, S. L. (2009). "Myeloperoxidase, modified lipoproteins, and atherogenesis." *J Lipid Res* 50 Suppl: S346-51.
- Nieman, D. C. (1994). "Exercise, infection, and immunity." *Int J Sports Med* 15 Suppl 3: S131-41.
- Nieman, D. C. (2007). "Marathon training and immune function." *Sports Med* 37(4-5): 412-5.
- Nieman, D. C., Henson, D. A., Austin, M. D. und Sha, W. (2011). "Upper respiratory tract infection is reduced in physically fit and active adults." *Br J Sports Med* 45(12): 987-92.
- Nieman, D. C., Henson, D. A., Nehlsen-Cannarella, S. L., Ekkens, M., Utter, A. C., Butterworth, D. E. und Fagoaga, O. R. (1999). "Influence of obesity on immune function." *J Am Diet Assoc* 99(3): 294-9.
- Nieman, D. C., Nehlsen-Cannarella, S. L., Henson, D. A., Koch, A. J., Butterworth, D. E., Fagoaga, O. R. und Utter, A. (1998). "Immune response to exercise training and/or energy restriction in obese women." *Med Sci Sports Exerc* 30(5): 679-86.
- Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., Yoshimura, K., Kadowaki, T. und Nagai, R. (2009). "CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity." *Nat Med* 15(8): 914-20.
- OECD (2010). "Obesity and the Economics of Prevention: Fit not Fat." 268.
- OECD (2013). *OECD Factbook 2013: Economic, Environmental and Social Statistics. Overweight and obesity*. Paris, OECD Publishing.
- Ohmori, R., Momiyama, Y., Kato, R., Taniguchi, H., Ogura, M., Ayaori, M., Nakamura, H. und Ohsuzu, F. (2005). "Associations between serum resistin levels and insulin resistance, inflammation, and coronary artery disease." *J Am Coll Cardiol* 46(2): 379-80.
- Olszanecka-Glinianowicz, M., Chudek, J., Kocelak, P., Szromek, A. und Zahorska-Markiewicz, B. (2011). "Body fat changes and activity of tumor necrosis factor alpha system--a 5-year follow-up study." *Metabolism* 60(4): 531-6.
- Orange, J. S. (2002). "Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection." *Microbes Infect* 4(15): 1545-58.
- Orange, J. S. (2006). "Human natural killer cell deficiencies." *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 6(6): 399-409.

- Owecki, M., Miczke, A., Nikisch, E., Pupek-Musialik, D. und Sowinski, J. (2011). "Serum resistin concentrations are higher in human obesity but independent from insulin resistance." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 119(2): 117-21.
- Park, H. Y., Kwon, H. M., Lim, H. J., Hong, B. K., Lee, J. Y., Park, B. E., Jang, Y., Cho, S. Y. und Kim, H. S. (2001). "Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro." *Exp Mol Med* 33(2): 95-102.
- Patarroyo, M., Prieto, J., Rincon, J., Timonen, T., Lundberg, C., Lindbom, L., Asjo, B. und Gahmberg, C. G. (1990). "Leukocyte-cell adhesion: a molecular process fundamental in leukocyte physiology." *Immunol Rev* 114: 67-108.
- Patel, L., Buckels, A. C., Kinghorn, I. J., Murdock, P. R., Holbrook, J. D., Plumpton, C., Macphee, C. H. und Smith, S. A. (2003). "Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators." *Biochem Biophys Res Commun* 300(2): 472-6.
- Pedersen, A. F., Zachariae, R. und Bovbjerg, D. H. (2009). "Psychological stress and antibody response to influenza vaccination: a meta-analysis." *Brain Behav Immun* 23(4): 427-33.
- Pedersen, B. K., Rohde, T. und Ostrowski, K. (1998). "Recovery of the immune system after exercise." *Acta Physiol Scand* 162(3): 325-32.
- Pedersen, B. K. und Toft, A. D. (2000). "Effects of exercise on lymphocytes and cytokines." *Br J Sports Med* 34(4): 246-51.
- Podrez, E. A., Abu-Soud, H. M. und Hazen, S. L. (2000). "Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis." *Free Radic Biol Med* 28(12): 1717-25.
- Rausch, M. E., Weisberg, S., Vardhana, P. und Tortoriello, D. V. (2008). "Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration." *Int J Obes (Lond)* 32(3): 451-63.
- Ray, S. und Almasan, A. (2003). "Apoptosis induction in prostate cancer cells and xenografts by combined treatment with Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and CPT-11." *Cancer Res* 63(15): 4713-23.
- Reilly, M. P., Lehrke, M., Wolfe, M. L., Rohatgi, A., Lazar, M. A. und Rader, D. J. (2005). "Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans." *Circulation* 111(7): 932-9.
- Romanatto, T., Roman, E. A., Arruda, A. P., Denis, R. G., Solon, C., Milanski, M., Moraes, J. C., Bonfleur, M. L., Degasperi, G. R., Picardi, P. K., Hirabara, S., Boschero, A. C., Curi, R. und Velloso, L. A. (2009). "Deletion of tumor necrosis factor-alpha receptor 1 (TNFR1) protects against diet-induced obesity by means of increased thermogenesis." *J Biol Chem* 284(52): 36213-22.
- Sanchez-Margalet, V., Martin-Romero, C., Santos-Alvarez, J., Goberna, R., Najib, S. und Gonzalez-Yanes, C. (2003). "Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action." *Clin Exp Immunol* 133(1): 11-9.
- Santos-Alvarez, J., Goberna, R. und Sanchez-Margalet, V. (1999). "Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes." *Cell Immunol* 194(1): 6-11.
- Sarhan, D., D'Arcy, P., Wennerberg, E., Liden, M., Hu, J., Winqvist, O., Rolny, C. und Lundqvist, A. (2012). "Activated monocytes augment TRAIL-mediated cytotoxicity by human NK cells through release of IFN-gamma." *Eur J Immunol* 43(1): 249-57.
- Savage, D. B., Sewter, C. P., Klenk, E. S., Segal, D. G., Vidal-Puig, A., Considine, R. V. und O'Rahilly, S. (2001). "Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans." *Diabetes* 50(10): 2199-202.
- Scanga, C. B., Verde, T. J., Paolone, A. M., Andersen, R. E. und Wadden, T. A. (1998). "Effects of weight loss and exercise training on natural killer cell activity in obese women." *Med Sci Sports Exerc* 30(12): 1666-71.
- Scherthaner, G. H., Kopp, H. P., Krzyzanowska, K., Kriwanek, S., Koppensteiner, R. und Scherthaner, G. (2006). "Soluble CD40L in patients with morbid obesity: significant reduction after bariatric surgery." *Eur J Clin Invest* 36(6): 395-401.
- Schwartz, D. R. und Lazar, M. A. (2011). "Human resistin: found in translation from mouse to man." *Trends Endocrinol Metab* 22(7): 259-65.
- Seegerstrom, S. C. und Miller, G. E. (2004). "Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry." *Psychol Bull* 130(4): 601-30.
- Shi, W. Z., Miao, Y. L., Guo, W. Z., Wu, W., Li, B. W., An, L. N., Fang, W. W. und Mi, W. D. (2014). "Leptin reverses corticosterone-induced inhibition of neural stem cell proliferation through activating the NR2B subunits of NMDA receptors." *Biochem Biophys Res Commun*.
- Shields, M., Tremblay, M. S., Connor Gorber, S. und Janssen, I. (2012). "Measures of abdominal obesity within body mass index categories, 1981 and 2007-2009." *Health Rep* 23(2): 33-8.

- Sica, A., Wang, J. M., Colotta, F., Dejana, E., Mantovani, A., Oppenheim, J. J., Larsen, C. G., Zachariae, C. O. und Matsushima, K. (1990). "Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor." *J Immunol* 144(8): 3034-8.
- Sierra-Honigmann, M. R., Nath, A. K., Murakami, C., Garcia-Cardena, G., Papapetropoulos, A., Sessa, W. C., Madge, L. A., Schechner, J. S., Schwabb, M. B., Polverini, P. J. und Flores-Riveros, J. R. (1998). "Biological action of leptin as an angiogenic factor." *Science* 281(5383): 1683-6.
- Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Luthy, R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H. L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T. M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R. und Boyle, W. J. (1997). "Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density." *Cell* 89(2): 309-19.
- Smyth, M. J., Cretney, E., Takeda, K., Wiltrot, R. H., Sedger, L. M., Kayagaki, N., Yagita, H. und Okumura, K. (2001). "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis." *J Exp Med* 193(6): 661-70.
- Snell, V., Clodi, K., Zhao, S., Goodwin, R., Thomas, E. K., Morris, S. W., Kadin, M. E., Cabanillas, F., Andreeff, M. und Younes, A. (1997). "Activity of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in haematological malignancies." *Br J Haematol* 99(3): 618-24.
- Soria, J. C., Mark, Z., Zatloukal, P., Szima, B., Albert, I., Juhasz, E., Pujol, J. L., Kozielski, J., Baker, N., Smethurst, D., Hei, Y. J., Ashkenazi, A., Stern, H., Amler, L., Pan, Y. und Blackhall, F. (2011). "Randomized phase II study of dulanermin in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in advanced non-small-cell lung cancer." *J Clin Oncol* 29(33): 4442-51.
- Spiegelman, B. M. und Hotamisligil, G. S. (1993). "Through thick and thin: wasting, obesity, and TNF alpha." *Cell* 73(4): 625-7.
- Standiford, T. J., Kunkel, S. L., Phan, S. H., Rollins, B. J. und Strieter, R. M. (1991). "Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells." *J Biol Chem* 266(15): 9912-8.
- Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., Patel, H. R., Ahima, R. S. und Lazar, M. A. (2001). "The hormone resistin links obesity to diabetes." *Nature* 409(6818): 307-12.
- Stevens, J. W., Khunti, K., Harvey, R., Johnson, M., Preston, L., Woods, H. B., Davies, M. und Goyder, E. (2015). "Preventing the progression to type 2 diabetes mellitus in adults at high risk: a systematic review and network meta-analysis of lifestyle, pharmacological and surgical interventions." *Diabetes Res Clin Pract* 107(3): 320-31.
- Street, S. E., Cretney, E. und Smyth, M. J. (2001). "Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis." *Blood* 97(1): 192-7.
- Subbiah, V., Brown, R. E., Buryanek, J., Trent, J., Ashkenazi, A., Herbst, R. und Kurzrock, R. (2012). "Targeting the apoptotic pathway in chondrosarcoma using recombinant human Apo2L/TRAIL (dulanermin), a dual proapoptotic receptor (DR4/DR5) agonist." *Mol Cancer Ther* 11(11): 2541-6.
- Svane, M. S. und Madsbad, S. (2014). "Bariatric surgery - effects on obesity and related co-morbidities." *Curr Diabetes Rev* 10(3): 208-14.
- Szabova, M., Jahnova, E., Horvathova, M., Ilavska, S., Pruzincova, V., Nemessanyi, T., Tulinska, J., Wsolova, L. und Volkovova, K. (2012). "Changes in immunologic parameters of humoral immunity and adipocytokines in obese persons are gender dependent." *Hum Immunol* 73(5): 486-92.
- Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M. J., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., Iwakura, Y., Yagita, H. und Okumura, K. (2001). "Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells." *Nat Med* 7(1): 94-100.
- Takeda, K., Smyth, M. J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Yamaguchi, N., Yagita, H. und Okumura, K. (2001). "Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth." *Cell Immunol* 214(2): 194-200.
- Tanaka, S., Isoda, F., Ishihara, Y., Kimura, M. und Yamakawa, T. (2001). "T lymphopaenia in relation to body mass index and TNF-alpha in human obesity: adequate weight reduction can be corrective." *Clin Endocrinol (Oxf)* 54(3): 347-54.

- Targher, G., Bonadonna, R. C., Alberiche, M., Zenere, M. B., Muggeo, M. und Bonora, E. (2001). "Relation between soluble adhesion molecules and insulin sensitivity in type 2 diabetic individuals: role of adipose tissue." *Diabetes Care* 24(11): 1961-6.
- Tateishi, K., Ohta, M., Guleng, B., Kanai, F., Tanaka, Y., Asaoka, Y., Jazag, A., Imamura, J., Imamura, T., Ijichi, H., Ikenoue, T., Kawakami, T., Fukushima, Y., Washida, M., Sata, M., Miyagishi, M., Taira, K., Yoshida, H., Kawabe, T. und Omata, M. (2006). "TRAIL-induced cell death cooperates with IFN-gamma activation in the graft-versus-tumor effect against colon tumors." *Int J Cancer* 118(9): 2237-46.
- Timmerman, K. L., Flynn, M. G., Coen, P. M., Markofski, M. M. und Pence, B. D. (2008). "Exercise training-induced lowering of inflammatory (CD14+CD16+) monocytes: a role in the anti-inflammatory influence of exercise?" *J Leukoc Biol* 84(5): 1271-8.
- Unek, I. T., Bayraktar, F., Solmaz, D., Ellidokuz, H., Sisman, A. R., Yuksel, F. und Yesil, S. (2010). "The levels of soluble CD40 ligand and C-reactive protein in normal weight, overweight and obese people." *Clin Med Res* 8(2): 89-95.
- Valiante, N. M., Uhrberg, M., Shilling, H. G., Lienert-Weidenbach, K., Arnett, K. L., D'Andrea, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L. und Parham, P. (1997). "Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors." *Immunity* 7(6): 739-51.
- van der Weerd, K., Dik, W. A., Schrijver, B., Schweitzer, D. H., Langerak, A. W., Drexhage, H. A., Kiewiet, R. M., van Aken, M. O., van Huisstede, A., van Dongen, J. J., van der Lelij, A. J., Staal, F. J. und van Hagen, P. M. (2012). "Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4+ T cells with skewing toward a Treg- and Th2-dominated phenotype." *Diabetes* 61(2): 401-8.
- Velotti, F., Palmieri, G., D'Ambrosio, D., Piccoli, M., Frati, L. und Santoni, A. (1992). "Differential expression of granzyme A and granzyme B proteases and their secretion by fresh rat natural killer cells (NK) and lymphokine-activated killer cells with NK phenotype (LAK-NK)." *Eur J Immunol* 22(4): 1049-53.
- Vozarova, B., Weyer, C., Hanson, K., Tataranni, P. A., Bogardus, C. und Pratley, R. E. (2001). "Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion." *Obes Res* 9(7): 414-7.
- Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R. G., Rauch, C. T., Schuh, J. C. und Lynch, D. H. (1999). "Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo." *Nat Med* 5(2): 157-63.
- Wang, Y., Jacobs, E. J., Patel, A. V., Rodriguez, C., McCullough, M. L., Thun, M. J. und Calle, E. E. (2008). "A prospective study of waist circumference and body mass index in relation to colorectal cancer incidence." *Cancer Causes Control* 19(7): 783-92.
- Wang, Y. C., Pamplin, J., Long, M. W., Ward, Z. J., Gortmaker, S. L. und Andreyeva, T. (2015). "Severe Obesity In Adults Cost State Medicaid Programs Nearly \$8 Billion In 2013." *Health Aff (Millwood)* 34(11): 1923-31.
- Weltgesundheitsorganisation Europa (2006). Europäische Charta zur Bekämpfung der Adipositas. Europäische Ministerkonferenz der WHO zur Bekämpfung der Adipositas, Istanbul, Türkei.
- White, U. A. und Tchoukalova, Y. D. (2013). "Sex dimorphism and depot differences in adipose tissue function." *Biochim Biophys Acta* 1842(3): 377-92.
- WHO European Ministeries Conferences on Counteracting Obesity (2006). European Charter on counteracting obesity., Istanbul, Türkei.
- Wilding, J. P. (2014). "The importance of weight management in type 2 diabetes mellitus." *Int J Clin Pract*: 682-691.
- Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R., Smith, T. D., Rauch, C., Smith, C. A. und et al. (1995). "Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis." *Immunity* 3(6): 673-82.
- Wilk, E., Kalippke, K., Buyny, S., Schmidt, R. E. und Jacobs, R. (2008). "New aspects of NK cell subset identification and inference of NK cells' regulatory capacity by assessing functional and genomic profiles." *Immunobiology* 213(3-4): 271-83.
- Wilson, C. A., Bekele, G., Nicolson, M., Ravussin, E. und Pratley, R. E. (1997). "Relationship of the white blood cell count to body fat: role of leptin." *Br J Haematol* 99(2): 447-51.
- Wilson, P. W., D'Agostino, R. B., Sullivan, L., Parise, H. und Kannel, W. B. (2002). "Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience." *Arch Intern Med* 162(16): 1867-72.
- Womack, J., Tien, P. C., Feldman, J., Shin, J. H., Fennie, K., Anastos, K., Cohen, M. H., Bacon, M. C. und Minkoff, H. (2007). "Obesity and immune cell counts in women." *Metabolism* 56(7): 998-1004.

- World Health Organization (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation (WHO Technical Report Series 894).
- World Health Organization, Ed. (2010). Global status report on noncommunicable diseases Description of the global burden of NCDs, their risk factors and determinants.
- World Health Organization (Updated January 2015). Obesity and Overweight. Fact sheet N°311.
- Wrann, C. D., Laue, T., Hubner, L., Kuhlmann, S., Jacobs, R., Goudeva, L. und Nave, H. (2012). "Short-term and long-term leptin exposure differentially affect human natural killer cell immune functions." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302(1): E108-16.
- Yaturu, S., Daberry, R. P., Rains, J. und Jain, S. (2006). "Resistin and adiponectin levels in subjects with coronary artery disease and type 2 diabetes." *Cytokine* 34(3-4): 219-23.
- Yoshimura, T., Robinson, E. A., Tanaka, S., Appella, E. und Leonard, E. J. (1989). "Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes." *J Immunol* 142(6): 1956-62.
- Yoshimura, T., Yuhki, N., Moore, S. K., Appella, E., Lerman, M. I. und Leonard, E. J. (1989). "Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE." *FEBS Lett* 244(2): 487-93.
- You, T., Wang, X., Murphy, K. M., Lyles, M. F., Demons, J. L., Yang, R., Gong, D. W. und Nicklas, B. J. (2014). "Regional adipose tissue hormone/cytokine production before and after weight loss in abdominally obese women." *Obesity (Silver Spring)* 22(7): 1679-84.
- Zachariae, C. O., Anderson, A. O., Thompson, H. L., Appella, E., Mantovani, A., Oppenheim, J. J. und Matsushima, K. (1990). "Properties of monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) purified from a human fibrosarcoma cell line." *J Exp Med* 171(6): 2177-82.
- Zahorska-Markiewicz, B., Janowska, J., Olszanecka-Glinianowicz, M. und Zurakowski, A. (2000). "Serum concentrations of TNF-alpha and soluble TNF-alpha receptors in obesity." *Int J Obes Relat Metab Disord* 24(11): 1392-5.
- Zhang, R., Brennan, M. L., Shen, Z., MacPherson, J. C., Schmitt, D., Molenda, C. E. und Hazen, S. L. (2002). "Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation." *J Biol Chem* 277(48): 46116-22.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. und Friedman, J. M. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." *Nature* 372(6505): 425-32.
- Zhou, W., Tian, Y., Gong, H., Guo, S. und Luo, C. (2014). "Oncogenic role and therapeutic target of leptin signaling in colorectal cancer." *Expert Opin Ther Targets* 18(8): 961-71.

## Lebenslauf

**Name:** Janine Jahn

**Geburtsdatum:** 15.11.1986

**Geburtsort:** Schkeuditz

**Familienstand:** ledig

**05/2014 – 03/2016:** Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Vollzeit)  
Institut für Anatomie und Zellbiologie  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Seit 05/2011:** Promotion der Ernährungswissenschaften  
Institut für Anatomie und Zellbiologie  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**11/2010 – 04/2011:** Wissenschaftliche Hilfskraft  
Institut für Anatomie und Zellbiologie  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**10/2005 - 04/2011:** Diplomstudium Ernährungswissenschaften  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Thema der Diplomarbeit: „Nachweis von Filaggrin-2 und Hornerin an der Augenoberfläche und im Tränenapparat“  
Prof. Dr. med. Friedrich Paulsen  
Institut für Anatomie und Zellbiologie  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
  
Auszeichnung mit dem Sicca-Förderpreis des Ressorts Trockenes Auge im Berufsverband der Augenärzte Deutschlands (3000 €)

**09/1997 - 07/2005:** Allgemeine Hochschulreife  
Gymnasium Delitzsch

**09/1993 – 08/1997:** Grundschule Rackwitz

# Publikationsverzeichnis

Teile dieser Arbeit sind in folgende Veröffentlichungen, Vorträge und Poster eingegangen:

## Zeitschriftenartikel

**Jahn J**, Spielau M, Brandsch C., Stangl GI, Delank KS, Bähr I, Berreis T, Wrann CD, Kielstein H (2015): Decreased NK cell functions in obesity can be re-activated by fat mass reduction. *Obesity*; doi: 10.1002/oby.21229.

Schmidt JJ\*, **Jahn J\***, Golla P, Hafer C, Kielstein JT, Kielstein H (2015): Effect of therapeutic plasma exchange on plasma levels and total removal of adipokines and inflammatory markers. *BMC Obesity*. (\*gleichberechtigte Autoren)

## Vorträge

**Jahn J**, Moeschter S, Spielau M, Kielstein H (2013): Normalisierung gestörter NK-Zell-Funktionen durch eine Körpergewichts-Reduktion bei adipösen Menschen. 48. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft, Leipzig.

**Jahn J** (2011): Modulation der Natürlichen Killer (NK)-Zell Immunität durch eine Körpergewichts-Reduktion bei adipösen Menschen. Erster Doktorandenkongress der Medizinischen Fakultät, Halle (Saale).

## Poster

**Jahn J**, Moeschter S, Spielau M, Kielstein H (2014): Decreased NK cell functions can be re-activated by weight loss. 30. Jahrestagung der Deutschen Adipositas Gesellschaft, Leipzig.

**Jahn J**, Moeschter S, Spielau M, Kielstein H (2013): Re-activation of NK cell functions by weight loss in obesity. 14th Meeting of the Society for Natural Immunity, Heidelberg.

**Jahn J**, Moeschter S, Spielau M, Kielstein H (2012): NK cell functions in obesity after weight loss. Arbeitstagung Anatomische Gesellschaft, Würzburg

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale), den

---

Janine Jahn

## Danksagung

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

Dem ehemaligen Institutsleiter **Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer** und der neuen Direktorin **Frau Prof. Dr. Heike Kielstein** danke ich für die Möglichkeit meine Dissertation am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Halle (Saale) anfertigen zu können.

Meiner Doktormutti **Frau Prof. Dr. Heike Kielstein** danke ich außerdem für das spannende Promotionsthema und die Chance die Promotion in ihrer Arbeitsgruppe durchführen zu können. Besonders danke ich ihr für die vielen konstruktiven Gespräche, die stete Unterstützung in jeglicher Hinsicht und eine Betreuung in ganz besonders herzlicher Art und Weise!

Bei **Frau Prof. Dr. Stangl** und **Frau Dr. Corinna Brandsch** bedanke ich mich für die tolle Studien-Kooperation und die dabei durchgeführten Analysen der Blut-Parameter. **Herrn Marco Spielau** danke ich für die sportliche Betreuung der Probandinnen und Probanden während der Studie. Für die Zusammenarbeit bei dem *in vitro* Experiment danke ich **Frau Dr. Ina Bähr**. Ein herzliches Dankeschön geht auch an **Frau Jacqueline Zudock**, die mit viel Einfühlungsvermögen eine große Hilfe bei der Blutentnahme war.

Großer Dank gebührt natürlich meinen zwei guten Seelen im Labor: **Frau Susann Möschter** und **Frau Franziska Knöfel**, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Ich werde unsere tolle Zeit nie vergessen!

**Frau Nneka Schwimmer-Okike** danke ich für die vielen Diskussionsrunden medizinisch-wissenschaftlicher Art und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt natürlich auch all denen, die mich während der gesamten Arbeit vor allem im Privaten unterstützt und begleitet haben: meiner **Familie** und vor allem meiner besseren Hälfte **Armin**.