

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Else Kröner-Fresenius-Zentrum für Ernährungsmedizin - Klinik  
für Ernährungsmedizin

## **Untersuchung zur ZAG-Expression im Fettgewebe von Tumorpatienten**

Rosaly Theresia Neher

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Ernährungsmedizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. J.J. Hauner
2. apl. Prof. Dr. J. H. Kleeff

Die Dissertation wurde am 09.06.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Ernährungsmedizin am 28.09.2011 angenommen.

## Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	3
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	5
TABELLENVERZEICHNIS .....	6
1 EINLEITUNG .....	7
2 GRUNDLAGEN .....	8
2.1 Tumor und Kachexie .....	8
2.1.1 Tumor .....	8
2.1.2 Kachexie .....	9
2.1.3 Mechanismen der tumorassoziierten Mangelernährung .....	13
2.1.4 Methoden zur Erfassung des Ernährungszustandes.....	17
2.1.5 Bedeutung der Zytokine bei Tumorerkrankungen .....	21
2.1.6 Folgen einer Kachexie .....	24
2.1.7 Therapieansätze .....	25
2.2 Fettgewebe, Lipolyse und Lipogenese .....	26
2.2.1 Das Fettgewebe und seine Funktion .....	26
2.2.2 Metabolische Eigenschaften des Fettgewebes .....	28
2.3 Zinc- $\alpha$ 2-Glycoprotein (ZAG) .....	30
2.3.1 Biochemische Eigenschaften .....	34
2.3.2 ZAG-Effekte im menschlichen Organismus.....	36
2.3.3 UCP-1,-2,-3 .....	38
2.3.4 ZAG-Signalwege .....	40
2.3.5 ZAG-Rezeptoren .....	42
2.3.6 ZAG-Regulation .....	44
2.4 Fragestellung .....	46
3 ERGEBNISSE .....	46

3.1 Expression von ZAG im Fettgewebe von Tumorpatienten .....	46
3.2 Klinische Charakteristika der Tumorpatienten und der Kontrollgruppe .....	46
3.3 Ausreichende Isolierung von RNA aus menschlichem Fettgewebe .....	48
3.4 ZAG wird im menschlichen Fettgewebe exprimiert .....	49
3.5 Charakterisierung der Real time quantitativen PCR .....	49
3.6 Auswertungen zur ZAG mRNA-Expression .....	50
3.7 Korrelationsanalysen .....	53
4 DISKUSSION .....	58
4.1 Gruppenzusammensetzung .....	58
4.2 Diskussion der Untersuchungen zur Expression von ZAG im menschlichen Fettgewebe .....	58
5 METHODIK UND MATERIAL .....	68
5.1 Biochemische und molekularbiologische Methoden .....	68
5.1.1 Fraktionierung von Fettzellen und Isolierung von Gesamt-RNA aus menschlichem Fettgewebe .....	68
5.1.2 Spektrophotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration .....	70
5.1.3 Reverse Transkription von Total-RNA .....	70
5.1.4 Real Time Quantitative PCR .....	71
5.2 Statistische Auswertung und Datenverarbeitung .....	72
5.3 Geräte, Materialien und Chemikalien .....	73
6 ZUSAMMENFASSUNG .....	75
7 LITERATURVERZEICHNIS .....	77

## Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrom
AIS	Anemia Inducing Substance
APP	Akut-Phase-Protein
$\beta$ 3-AR	$\beta$ 3-Adrenorezeptor
ATP	Adenosintri-phosphat
BMI	Body-Mass-Index
cAMP	3',5'-cyclo-Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CRP	C-reaktives Protein
CTP	Cytidintri-phosphat
FAD	Flavinadeninnucleotid
FS	Fettsäure
FFS	freie Fettsäuren
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GOT	Glutamat-Oxalat-Transaminase
GTP	Guanosintri-phosphat
HSL	Hormon-sensitive Lipase
HWZ	Halbwertszeit
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
Kcal	Kilokalorie
KG	Körpergewicht
LMF	Lipid Mobilizing Factor
LPL	Lipoproteinlipase
MAC 16	Mouse Colon Adenocarcinoma 16
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex
mRNA	Messenger RNA
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid

NPY	Neuropeptid Y
NTP	Nukleosidtriphosphat
om	omental
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIF	Proteolysis Inducing Factor
POMC	Proopiomelanocortin
PPAR $\gamma$	Peroxisome-Proliferator Activated Receptor $\gamma$
RBP	Retinol-Bindendes-Protei
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
sc	subcutan
UCP	Uncoupling Protein
TTP	Thymidintriphosphat
ZAG	Zinc-alpha2-Glycoprotein

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Metabolische Aktivitäten der Fettzellen. (verändert nach Löffler und Petrides, 1998) Verschiedene Stoffwechselwege führen zum Auf- und Abbau von Triacylglycerinen..... 29*
- Abbildung 2: Eingesetzte Fettgewebemenge. Signifikante Korrelation zwischen der eingesetzten Gewebemenge (in mg) und der erzielten Ausbeute (in µg/ml) (p=0,01 bzw. p<0,05) ..... 49*
- Abbildung 3: Expressionsraten von ZAG im Fettgewebe. Kontrollgruppe (0, n=69) und Tumorpatienten (1, n=26)..... 50*
- Abbildung 4: Vergleich des ZAG-Expressionsniveau im subkutanen und omentalen Fettgewebe. Gezeigt sind MW und SD der relativen ZAG-Expression, (sc=1, n=66; om=2, n=31) ..... 51*
- Abbildung 5: ZAG-Expression bei verschiedenen Tumorstadien (pT1, pT2, pT3). In den Box-and-Whisker-Plots sind MW und SD der relativen ZAG-Expression dargestellt. (n(pT1)=2, n(pT2)=9, n(pT3)=9) ..... 52*
- Abbildung 6: Auftragung des ZAG-Expressionsniveaus der Kontrollgruppe und der Patienten mit Tumorstadium pT3. Dargestellt sind MW und SD der relativen ZAG-Expression. (n(kein Tumor)=69, n(pT3)=9) ..... 53*
- Abbildung 7: Zusammenhang von BMI und ZAG-Expression. Punktwolke mit Regressionsgerade; ein positiver Zusammenhang zwischen BMI und der ZAG-Expressionsrate ist dargestellt. (n=90)..... 54*
- Abbildung 8: Zusammenhang zwischen BMI und Tumorpatienten sowie zwischen  
55*
- Abbildung 9: Zusammenhang zwischen Fettzellgröße und ZAG Expressionsniveau. Im Streudiagramm ist ein positiver Zusammenhang zwischen Fettzellgröße und ZAG Expressionsniveau dargestellt. (n=49)..... 56*

## **Tabellenverzeichnis**

<i>Tabelle 1: Metabolische und humorale Veränderungen bei Tumorkachexie .....</i>	<i>12</i>
<i>Tabelle 2: BMI-Richtwerte zur Erfassung des Ernährungszustandes (WHO, 2000) .</i>	<i>18</i>
<i>Tabelle 3: Parameter zur Beurteilung einer Mangelernährung.....</i>	<i>20</i>
<i>Tabelle 4: Charakterisierung der Gesamtgruppe der Tumorpatienten und der Kontrollgruppe .....</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 5: Korrelationsanalyse der Expressionsdaten mit klinischen Parametern. Aufgelistet sind die Korrelationskoeffizienten (r) der zusammengefassten Gruppen „Tumor“ und „Nichttumor“. Korrelationskoeffizienten <math>&gt;+/-0,2</math> für positive/negative Zusammenhänge sind der Tabelle fettgedruckt. ....</i>	<i>57</i>
<i>Tabelle 6: Herstellung des Reagenz mit RealMasterMix (Endkonzentrationen, 20<math>\mu</math>l Reaktionsvolumen) zur Hot Start PCR.....</i>	<i>72</i>

## 1 Einleitung

Tumorerkrankungen stellen in Europa derzeit die zweithäufigste Todesursache nach den Herz-Kreislauferkrankungen dar. Weltweit sind sie jährlich für 7,1 Millionen Todesfälle verantwortlich, das entspricht 12,3% der globalen, totalen Todesfälle (World Health Organization News, 2003). In Deutschland erkranken pro Jahr etwa 500 pro 100.000 Menschen an einem malignen Tumor. Das heißt, dass in einem Jahr mehr als 400.000 Menschen von Krebs betroffen werden. Etwa 25% aller Menschen in Europa sterben an einer Tumorerkrankung. Sie ist Todesursache Nummer eins bei älteren Menschen. Mehr als 70% der über 65-Jährigen werden von Krebserkrankungen betroffen sein (European Commission health report, 2001). Jeder Dritte wird im Laufe seines Lebens an einem Karzinom erkranken. In Mitteleuropa ist beispielsweise das kolorektale Karzinom die zweithäufigste Tumorerkrankung bei Männern und Frauen und tritt mit einer Inzidenz von ca. 25/10000 Einwohner/Jahr auf (Boyle & Langman, 2000).

Als Begleiterscheinung bei den meisten Patienten mit gastrointestinalen Tumoren zeigt sich ein deutlicher Gewichtsverlust (Dewys et al., 1980; Tisdale, 2002). Mangelernährung im Rahmen von malignen Magen-Darm-Erkrankungen ist ein wesentlicher Aspekt dieser Begleiterscheinung, erklärt aber das Phänomen nicht vollständig. Allerdings ist die Gewichtsabnahme ein wesentlich zu beachtender Aspekt der Grunderkrankung, da Mangelernährung und Tumorkachexie die Haupttodesursachen von Krebserkrankungen darstellen (DeWys, 1980).

Gewichtsverlust bei Tumorpatienten resultiert zum einen aus einer verminderten Energieaufnahme und zum anderen aus einem erhöhten Energiebedarf. Zunehmend werden humorale und metabolische Veränderungen im Körper von Tumorpatienten diskutiert, die neben dem Energieverbrauch des Tumors einen erhöhten Energiebedarf zu erklären scheinen.

So wird Zinc- $\alpha$ 2-Glycoprotein (ZAG), ein Adipokin, in Verbindung mit der Tumorkachexie gebracht (McDermott et al., 2006). ZAG und der diesem identischen Lipid Mobilizing Factor (LMF) stimulieren die Lipidreduktion sowohl bei Mäusen in vivo als auch in vitro (Russell et al., 2004).



In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Expression von ZAG im Fettgewebe von Patienten mit Tumorerkrankungen mit der Expression von ZAG im Fettgewebe von gesunden Probanden untersucht. Desweiteren wurde nach einem Zusammenhang zwischen ZAG-Expression (auf RNA Ebene) und Tumorkachexie geforscht. Ebenso interessierte eine Assoziation zwischen ZAG-Expression und Alter, Tumorstadium, Fettzellgröße oder BMI. Ausserdem wurde untersucht, ob Zusammenhänge zwischen der ZAG-Expression und dem Vorliegen einer Hypertonie oder eines Diabetes mellitus sowie der Serumkonzentration von CRP, Kreatinin, GOT, GPT, Natrium, Kalium und Calcium besteht.

## **2 Grundlagen**

### **2.1 Tumor und Kachexie**

#### **2.1.1 Tumor**

Als Tumor (Syn. Geschwulst, Neoplasma, Neoplasie) bezeichnet man eine Zunahme des Gewebavolumens, die durch Vermehrung von körpereigenen, entarteten Zellen (transformierten Zellen) entstehen kann. Dieser Prozess ist v. a. das Ergebnis von Störungen der Proliferation, Differenzierung und der Apoptose. Die Krebsentstehung stellt einen in Schritten ablaufenden Prozess dar (Mehrschritt-Theorie der Krebsentstehung). Das Tumorstadium geht in der Regel von einer transformierten somatischen Zelle aus. Durch Proliferation dieser Zelle entsteht über viele Zellzyklen zunächst eine monoklonale Zellformation. Die genetische Instabilität der Tumorzellen führt dann zu einer zunehmenden Tumorzellheterogenität.

In der klinischen Praxis wird eine Tumorerkrankung entsprechend ihrer Dignität in benigne, semimaligne und maligne Tumoren eingeteilt.

Benigne Tumoren sind überwiegend durch ein expansiv-verdrängendes Wachstum, durch gute Abgrenzung zum gesunden Gewebe, gute Differenzierung, fehlende oder geringe Zellabnormitäten, geringe mitotische Aktivität und dem Fehlen von Metastasen gekennzeichnet.

Semimalige Tumoren setzen in der Regel keine Tochtergeschwülste, zerstören aber umliegendes Gewebe und wachsen in dieses teilweise destruierend hinein.

Maligne Tumore infiltrieren umgebendes Gewebe und zerstören es, außerdem setzen sie entweder hämatogen, lymphogen oder durch Abtropfung Tochtergeschwülste. Maligne Tumoren sind gekennzeichnet durch schnelles, invasives Wachstum, durch schlechte Abgrenzung, unreife Differenzierung, hohe Mutationsrate, Zellatypien, hohe Zellteilungsrate, Metastasen und häufige Rezidive. In den folgenden Abschnitten soll im Speziellen auf maligne Tumore eingegangen werden.

### **2.1.2 Kachexie**

Das Wort „Kachexie“ kommt aus dem Griechischen („kakos“ und „hexis“) und bedeutet schlechte Verfassung. Costa et al. (1981) definierten die Kachexie als zunehmende Auszehrung des Patienten. Krankheitsbilder, die regelmäßig mit einer Kachexie einhergehen, sind Essstörungen, chronische Herzinsuffizienz, AIDS, chronische Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts und Tumore. In der Literatur werden die Begriffe Mangelernährung, Malnutrition, Wasting und Kachexie fälschlicherweise oft synonym verwandt. Gemeinsam stehen diese Begriffe für einen ungewollten Gewichtsverlust.

Klinisch lässt sich die Kachexie definieren als Gewichtsverlust von mehr als 5 kg in den letzten 5 Monaten oder 10% innerhalb eines Jahres. Anders als im Hungerzustand, in dem Körperfett abgebaut und die Magermasse bewahrt wird, verlieren kachektische Patienten Gewicht durch eine Abnahme beider Kompartimente. Vorrangig betrifft der Verlust die Skelettmuskulatur und weniger das Organewebe. Ein Ausgangsgewicht von weniger als 90% des Normalgewichts (bemessen nach dem BMI) oder ein Gewichtsverlust von mehr als 10 bzw. 5% in drei Monaten sind Hinweise auf ein potentiell Ernährungdefizit. Bei der Tumorkachexie kommt es zum Verlust von fettfreier Körpermasse, Muskel-Wasting, Immunschwäche sowie einer Verschlechterung des körperlichen und geistigen Zustandes (Argilés, 2005).

Im Gegensatz zur Kachexie bezeichnet Anorexie den Verlust des Impulses zur Nahrungsaufnahme. Lange Zeit wurde vermutet, dass Anorexie bei Tumorpatienten alleinige Ursache der Malnutrition und des Gewichtsverlustes ist. Allerdings ist zu beobachten, dass durch Therapie der Anorexie z.B. mit medikamentöser

Appetitstimulation, enteraler Supplementation oder parenteraler Ernährung keine anabole Stoffwechsellage erreicht werden kann (Heber et al., 1992; Nelson, 2000). Bei der Tumorkachexie basiert der Gewichtsverlust auf Abnahme von Fettmasse und Skelettmuskelmasse in etwa gleichem Anteil, Patienten mit Anorexie jedoch erfahren einen Gewichtsverlust hauptsächlich durch Reduktion der Fettmasse (Tisdale, 2001). Da Anorexie nicht alleine das Auftreten eines Gewichtsverlusts bei Tumorpatienten erklärt, muss von einem veränderten Metabolismus ausgegangen werden. Es stellt sich ein komplexes multifaktorielles Syndrom dar, das im Zusammenspiel mit metabolischen und humoralen Veränderungen, Appetitlosigkeit, frühzeitiger Sättigung und reduzierter Nahrungsaufnahme, Ödemen, Müdigkeit, geschwächtes Immunsystem, Geschmacksveränderungen und Mangel an Konzentration zum Gewichtsverlust führt (Fearon, 2001). Die genaueren Entstehungsmechanismen der Kachexie sind bislang nur unzureichend bekannt. Vermutlich besteht ein Zusammenhang mit dem Tumor selbst, der körpereigenen Antwort auf den Tumor und/oder der Therapie (Tisdale et al., 1999; Fearon, 2001). Bezüglich der direkten Effekte des Tumors sind Mediatoren identifiziert worden, die neue Therapieoptionen ergeben könnten. Zu diesen Mediatoren gehören LMF und Proteolysis Inducing Factor (PIF).

Im Gegensatz zur Inanition (Auszehrung) werden bei der Kachexie nicht nur die Speicherfettdepots, sondern auch das Baufett und die Skelettmuskulatur abgebaut. Das Knochenmark wandelt sich in Gallertmark um. Auch bei anderen Organen kommt es zu Atrophien und Funktionsausfällen. Lebensbedrohlich wird der Zustand, wenn der Herzmuskel angegriffen wird und es zur Beeinträchtigung der respiratorischen Muskelfunktion kommt. Kachexie führt damit bald zu irreversiblen Veränderungen, zur „terminalen Kachexie“ und schließlich zum Tod.

Weitere Störungen des Fettgewebismetabolismus sind die Lipatrophie und die Lipodystrophie. Die Lipatrophie ist definiert als Fettgewebsschwund, der als umschriebene Form infolge dauerhafter Druckbelastung, z.B. an Ellenbogen und Gesäß, oder wiederholter Insulininjektionen auftreten kann. Die Lipodystrophie beschreibt den Zustand eines Patienten mit Änderung des Verteilungsmusters des subkutanen Fettgewebes. Beiden Fettgewebserkrankungen können folgende Symptome oder Krankheiten zu Grunde liegen: mechanische Faktoren, erhöhte

Blutzucker- und Blutfettwerte, Leber- und Milzvergrößerung, Acanthosis nigricans, Autoimmunerkrankungen und kongenitale Erkrankungen wie die familiäre partielle Lipodystrophie oder die generalisierte Lipodystrophie.

Krebspatienten zeigen häufig eine Mangelernährung, die zum Gewichtsverlust führt. In schweren Fällen kann aus einer Mangelernährung eine Kachexie entstehen. Bereits in den sechs Monaten vor der Diagnosestellung haben 50% der Erkrankten an Gewicht verloren. Davon zeigen 15% eine Abnahme von rund 10 Prozent ihres Körpergewichts. In Abhängigkeit von Tumorart und Krankheitsstadium können Patienten einen Gewichtsverlust zwischen 9 bis 85% aufweisen.

Die Häufigkeit der Tumorkachexie ist abhängig vom Typ, Stadium und der Lokalisation des Tumors. So ist die Prävalenz bei Patienten mit Tumoren des Gastrointestinaltraktes und der Lunge im Vergleich mit Patienten mit Brust- und Schilddrüsenkrebs höher, wie auch bei Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien. Obwohl bei fortgeschrittener Tumorerkrankung die Mehrzahl der Tumorpatienten mangelernährt ist, besteht kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Mangelernährung und der Größe, der Ausbreitung und dem Differenzierungsgrad des Tumors sowie der Erkrankungsdauer. Bei Mäusen mit Tumoren konnte man zeigen, dass die Kachexie bereits vor dem Auftreten einer Anorexie vorhanden ist (Costa, 1963; DeWys et al., 1980; Fearon, 1992; Vinci et al., 2005). DeWys et al. (1980) fanden heraus, dass das Auftreten von Gewichtsverlust abhängig von der Tumorentität ist. Von den Patienten, die an niedrigmalignen Non Hodgkin Lymphomen, Mammakarzinomen, nicht-lymphozytären Lymphomen oder Sarkomen erkrankt waren, zeigten 31% bis 40% einen Gewichtsverlust. Bei 48% bis 61% der Patienten, die an höher-malignen Non Hodgkin Lymphomen, Kolon-, Prostata- oder Bronchialkarzinomen erkrankt waren, trat ein Gewichtsverlust auf. Die höchste Prävalenz für das Auftreten eines Gewichtsverlustes (83% bis 87%) wurde bei Patienten mit Pankreas- oder mit Magenkarzinomen beschrieben.

Bei Tumorerkrankungen ergibt sich ein gesteigerter Energiebedarf aus unterschiedlichen Ursachen. So haben Tumorpatienten einen erhöhten Energiebedarf durch humorale und metabolische Veränderungen (s. Tabelle 1).

**Metabolische Veränderungen**

Erhöhte Serumkonzentration von Glycerin,  
freie Fettsäuren, Triglyceride, Laktat,  
Gesteigerte Lipolyse  
Verminderte Aktivität der Lipoproteinlipase  
Gesteigerte Proteolyse und Protein-turnover  
Entwicklung einer Insulinresistenz und  
einer relativen Glucoseintoleranz

**Humorale Veränderungen**

Erhöhte Serumwerte der Akutphaseproteine  
Erhöhte Werte von Proteolysis Inducing  
Factor  
Erhöhte Werte von Cortisol  
Erhöhte Zytokinwerte (IL1, IL6, TNF- $\alpha$ )  
Erhöhte Werte von Lipid Mobilizing Factor

*Tabelle 1: Metabolische und humorale Veränderungen bei Tumorkachexie*

Metabolische Veränderungen, die im Zusammenhang mit Krebs stehen, betreffen den Protein-, Fett- und Kohlenhydrathaushalt. Man findet oft einen Hypermetabolismus neben abnormalen Zusammensetzungen der Aminosäuren im Plasma, gesteigerter Gluconeogenese aus Aminosäuren und Laktat und Veränderungen im Leber- und Muskelproteinumsatz (Holmes & Dickerson, 1987; Hyltander et al., 1991; Bozzetti, 2001). Kachektische Krebspatienten zeigen Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel wie Glucoseintoleranz, Insulinresistenz, abnormale Insulinsekretion und eine gesteigerte Glucoseproduktion in der Leber. Im Proteinmetabolismus findet man einen erhöhten Proteinumsatz im gesamten Körper, gesteigerte Proteinsynthese in der Leber und sinkende Syntheserate in der Muskulatur. Im Fettstoffwechsel sind Veränderungen wie gesteigerte Lipolyse, erhöhte Werte an freien Fettsäuren, erhöhter Glycerinumsatz neben verminderter Lipogenese, Hyperlipidämie und Fehlen an Glucose, die die Oxidation der freien Fettsäuren unterdrückt, zu finden. Tumorspezifische Produkte wie der PIF und der LMF können Aminosäuren und Fettsäuren direkt aus dem Muskel- und Fettgewebe mobilisieren.

Bei Tumorpatienten ist also der Energieumsatz gesteigert und der Sauerstoffverbrauch erhöht. Ein weiterer Erklärungsansatz hierfür ist der ununterbrochene Stoffwechselumsatz im bösartigen Gewebe im Gegensatz zu dem im Tagesverlauf periodischen Umsatz im normalen Körpergewebe. Der Kampf um Nährstoffe zwischen dem Tumor und dem Wirt kann in einem beschleunigten Hungerstatus resultieren, der weiter die metabolische Störung und die Steigerung des Ruheenergieumsatzes fördert (Buss, 1987; Langer et al., 2001). Dies führt zu sinkender Effizienz der Energieausbeute. Dass es trotz einem bei Tumorpatienten nicht generell erhöhten Energiebedarf zur Gewichtsabnahme kommt liegt daran, dass – im Gegensatz zum Hungerzustand – Tumorpatienten ihren Energie- und Nährstoffbedarf nicht ihrer Energiezufuhr anpassen können.

Möglicherweise ist auch ein paraneoplastisches Syndrom für die Kachexie verantwortlich. Dieses Syndrom ist ein Sammelbegriff für Funktionsstörungen oder Krankheitszustände, die im Zusammenhang mit Neoplasien auftreten. Es kommt nicht durch das direkte oder metastatische Tumorwachstum zustande. Es kann einem klinisch nachweisbaren Tumor vorausgehen. Die Syndrome werden hervorgerufen durch die endokrine Sekretion von Wirkstoffen durch die Tumorzelle. Sie üben tumorfern ihre Wirkung aus. Zu den Wirkstoffen gehören u. a. Hormone, Gerinnungsfaktoren und Wachstumsfaktoren. Symptome können u. a. Erkrankungen der Nerven und Muskeln (Myasthenie), Hypertrophe Osteoarthropathie (Trommelschlägelfinger, Uhrglasnägel) und Thrombophlebitis sein.

Zu den Risikofaktoren für Kachexie gehören u. a. Lebensalter (Bruera, 1997), metabolische Vorerkrankungen, Beeinträchtigung der Verdauung und Absorption und langer Nikotinabusus besonders bei Tumoren des Gastrointestinaltraktes und der Lunge (Bruera, 1997; Brown, 2002).

### **2.1.3 Mechanismen der tumorassoziierten Mangelernährung**

Eine Mangelernährung kann die Folge von lokalen Wirkungen des Tumors wie die Behinderung der Nahrungspassage, Malabsorption, der Reaktion des Patientenorganismus auf den Tumor oder den Nebenwirkungen der Tumortherapie sein. Krebspatienten zeigen häufig eine reduzierte Nahrungsaufnahme infolge von systemischen Wirkungen des Tumorleidens, lokalen Tumorwirkungen,

psychologischen Effekten und Medikamentennebenwirkungen (Barber et al., 1999). Die reduzierte Nahrungsaufnahme bei Tumorpatienten korreliert mit dem Tumorstadium. Zusammenhänge finden sich auch mit der Tumorlokalisation, Krankheitsdauer und der Therapie (Ravasco et al., 2003).

Der Ernährungszustand kann auch durch eine Erhöhung des Grundumsatzes, durch systemische Effekte des Tumors wie Übelkeit/Erbrechen, depressive Verstimmungen, Schmerz und Müdigkeit (Capra et al., 2001) sowie Störungen im zentralen „Hungerzentrum“ beeinflusst sein.

Eine Erhöhung des Grundumsatzes kommt vermutlich bei den meisten Krebspatienten vor und trägt in größerem Maße zu einem Gewichtsverlust bei als eine sinkende Nahrungsaufnahme (Hyltander et al., 1991; Bosaeus et al., 2001).

Interessanterweise soll auch das Magenpeptidhormon Ghrelin eine Rolle bei der Kachexie spielen. Es ist in die Appetitstimulation involviert (Korbonits & Grossman, 2004). Nach Verabreichung dieses Peptides kam es bei an Tumor erkrankten Mäusen zu einer Verbesserung des Gewichtsverlustes auf Grund steigender Nahrungsaufnahme (Hanada et al., 2004).

Klein und Wolfe (1990) stellten fest, dass kachektische Krebspatienten einen höheren Gesamtumsatz an Fett haben als gesunde Personen. Bei der Kachexie findet man eine erhöhte Lipolyse, eine sinkende Lipogenese, steigende Spiegel an zirkulierenden freien Fettsäuren und Glycerin (Fearon & Preston, 1990). Doch wurde auch vermutet, dass trotz des vermutlich höheren Ruheumsatzes der gesamte Energieverbrauch auf Grund der eingeschränkten körperlichen Tätigkeit unverändert bleibt (Barber et al., 1999).

Kachexie hat eine multifaktorielle Pathogenese. Verschiedene Systeme, die die Energieproduktion und den Energietransport in der Zelle modulieren, sind involviert. Zu ihnen gehören Hormone (Leptin), Neuropeptide, Zytokine (Interleukin-1, Interleukin-6, Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ , Interferon- $\gamma$ ) und Neurotransmitter (Serotonin und Dopamin) (Dinarello & Wolf, 1993; Strassmann et al., 1992; Langstein et al., 1991; Hirai et al., 1998). Tumorzellen sind fähig, Zytokine zu produzieren und zu humoralen Veränderungen zu führen. In Tierversuchen wurde gezeigt, dass

bestimmte Zytokine wie IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 sowie der LMF und die Anemia Inducing Substance (AIS) an der Kachexieentstehung durch Änderungen im Metabolismus beteiligt sind (Dunlop & Campbell, 2000; Zaki et al., 2004; Matthy et al., 1991; Ishiko et al., 1999).

Auf der Suche nach Mediatoren, welche die Kachexie vermitteln, wurde zunächst der LMF beschrieben. LMF verursacht einen spezifischen Verlust an Körperfett jedoch nicht an Skelettmuskulatur und ohne Reduktion der Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme. LMF stimuliert die Lipolyse der Adipozyten *in vitro* und *in vivo*. Er steigert außerdem den Metabolismus im Fettgewebe, wie an lebenden Mäusen untersucht, und könnte somit den Verlust an Fettgewebe erklären (Russell & Tisdale, 2002; Russell et al., 2004). Es wurde ein linearer Zusammenhang zwischen der Höhe der Serum- und Urinspiegel von LMF und dem Gewichtsverlust bei Krebs gefunden (Groundwater et al., 1990). LMF wirkt direkt auf das Fettgewebe, er setzt freie Fettsäuren und Glycerin in der Weise frei wie es auch die normalen physiologischen Stimuli tun (Beck & Tisdale, 1987). Der LMF wurde im Urin von kachektischen Patienten mit Magen-, Rektum-, Pankreas-, Ovar- und Lebertumor gefunden, jedoch nicht bei Patienten ohne Gewichtsverlust und nicht bei gesunden Personen (Todorov et al., 1998). Eine Behandlung mit LMF verursacht einen signifikanten Anstieg des Glucosemetabolismus im Gehirn, Herz, braunen Fettgewebe und in der Gastrocnemiusmuskulatur. Im weißen Fettgewebe und Diaphragma verringert es den Glucoseumsatz. Das Gehirn verbraucht die meiste Blutglucose, der Glucosemetabolismus im Gehirn steigt um den Faktor drei bei Anwesenheit von LMF (Hirai et al., 1998). Die durch LMF induzierte Hypoglykämie entsteht durch einen gesteigerten Glucoseverbrauch in Herz, braunen Fettgewebe, der Gastrocnemiusmuskulatur und im Gehirn (Russell & Tisdale, 2002). Der Mechanismus des gesteigerten Glucoseverbrauchs ist nicht bekannt, aber es scheint, dass es auf einem nicht-Insulin-abhängigen Wege geschieht (Islam-Ali & Tisdale, 2001a).

Der Haupteffekt des LMF, der von Adenokarzinomen produziert wird, ist die Fettmobilisation und der Fettverbrauch durch eine gesteigerte Lipolyse (Hirai et al., 1998) und durch eine Stimulation der mRNA Expression des Uncoupling Protein 1 (UCP1, Synonym: Thermogenin) im braunen Fettgewebe und des Uncoupling



Protein 2 (UCP2) im braunen Fettgewebe, in der Skelettmuskulatur und der Leber. Bing et al. (2002) konnten den Effekt von LMF auf die Expression von UCP-1, -2, und -3 mRNA und die Fettmobilisation anhand tierexperimenteller Untersuchungen zeigen. Sie injizierten gesunden Mäusen intravenös LMF, den sie zuvor aus dem Urin von Tumorpatienten gewonnen haben. Hierbei zeigten sie einen lipolytischen Effekt des LMF mit Verlust an Körperfett, aber kein Verlust an Muskelmasse. UCP sind mitochondriale Proteine, sie werden unterschiedlich hoch in den jeweiligen Geweben exprimiert, induzieren in vitro die Hitzeproduktion und sie sind an der Regulation des Energiegleichgewichts beteiligt.

Das braune Fettgewebe, ein thermogenetisches Gewebe, findet man beim Menschen typischerweise an definierten anatomischen Stellen des Körpers während der ersten Lebensphase. Es verringert sich allmählich im Alter. Es wurde ein hohes Vorkommen an braunem Fettgewebe bei erwachsenen Patienten mit Krebs und Kachexie gefunden im Gegensatz zu einer vergleichbaren Patientengruppe, die an anderen Krankheiten verstarben (Shellock et al., 1986). Doch wurde in dieser Studie nicht untersucht, ob das alleinige Tumorkommen auch zu einer Erhöhung des braunen Fettgewebes führt. Die Stoffwechselaktivität im braunen Fettgewebe ist wesentlich höher als im weißen. Es ist sowohl an der Temperaturregulation als auch an der Energiebalance beim Menschen beteiligt (Rothwell & Stock, 1984). Die Aktivierung des braunen Fettgewebes könnte somit teilweise für die durch Krebs induzierte Kachexie mittels erhöhten Energieverbrauch verantwortlich sein (Shellock et al., 1986).

In vivo Studien bestätigen, dass LMF einen selektiven Verlust an Körperfett ohne Änderung des Körperwassers und mit einer Tendenz, die fettfreie Körpermasse zu erhöhen, bewirkt (Hirai et al., 1998). Russell und Tisdale (2002) konnten in ihrer Studie belegen, dass LMF den oxidativen Metabolismus im gesamten Tier stimuliert. LMF ist homolog zu dem bereits relativ früh beschriebenen Zinc-alpha-Glycoprotein (ZAG), auf das später noch näher eingegangen wird (Todorov et al., 1998).

Peptide, die vom Tumor stammen wie der Tumor spezifische PIF und der bereits erwähnte LMF, werden in Betracht gezogen für die Kachexieentwicklung verantwortlich zu sein (Argilés et al., 2003b). PIF, ein Proteoglykan, verursacht einen

Abbau an Skelettmuskulatur durch Proteolyse, eine sinkende Proteinsynthese und einen Gewichtsverlust bei Mäusen (Lorite et al., 1998). Im Urin von kachektischen Tumorpatienten korrelieren die PIF Spiegel mit dem Gewichtsverlust (Cabal-Manzano, 2001, Williams et al., 2004).

Auch die AIS könnte über die Regulation des Energieverbrauchs an der Kachexieentstehung beteiligt sein. Sie ist ein Glykoprotein, das von malignem Tumorgewebe sezerniert wird. Sie kann die Nahrungsaufnahme, das Körpergewicht und -fett bei Kaninchen senken (Ishiko et al., 1999). AIS wurde im Plasma von Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung gefunden. Dort erhöht sie die Fragilität der Erythrozyten und erzeugt somit eine Anämie und reduziert die Funktion immunkompetenter Zellen (Ishiko et al., 1987). Sie zeigt beim Menschen auch lipolytische Aktivität (Ishiko et al., 1999). Osamu et al. (2000) vermuten, dass AIS für den Gewichtsverlust bei Patienten mit bösartigen Tumoren mitverantwortlich ist.

Tumorpatienten zeigen Veränderungen im Carnitinsystem (Peluso et al., 2000). Bei Patienten mit Tumor und Kachexie sind die Spiegel an Serumcarnitin erniedrigt im Vergleich zu Tumorpatienten mit gutem Ernährungszustand (Vinci et al., 2005). Mögliche metabolische Veränderungen bei Krebspatienten sind eine Reduktion der körpereigenen Carnitin-Synthese und eine reduzierte Aufnahme mit der Nahrung. Die erniedrigten Serum Carnitin Spiegel könnten zur Kachexieentstehung beitragen und erklären die Muskelschmerzen, die physische und geistige Ermüdung, unter denen die Patienten häufig leiden.

#### **2.1.4 Methoden zur Erfassung des Ernährungszustandes**

Zur Erfassung des Ernährungszustandes wird häufig der Body-Mass-Index (BMI) verwendet. Es kann als ein sehr einfaches und klinisch praktikables anthropometrisches Verfahren angesehen werden, in dem der Quotient von Körpergewicht in kg zur Körpergröße in m<sup>2</sup> gebildet wird.

BMI = KG(kg)/Körpergröße (m<sup>2</sup>)

<b>Ernährungszustand</b>	<b>BMI</b>
Untergewicht	<19
Normalgewicht	19-25
Leichtes Übergewicht	26-30
Adipositas	31-35
Starke Adipositas	>35

*Tabelle 2: BMI-Richtwerte zur Erfassung des Ernährungszustandes (WHO, 2000)*

Hierbei erhält man ein Relativmaß, welches es erlaubt, den Ernährungszustand verschiedener Patienten miteinander zu vergleichen. Das Körpergewicht wird in Relation zur Körpergröße gesetzt. Dabei kann jedoch nicht differenziert werden, welche Kompartimente, Körperfett oder fettfreie Körpermasse, von evtl. Gewichtsveränderungen betroffen sind. Fehleinschätzungen sind möglich, da bei Tumorpatienten die verminderte Körpermasse durch eine Zunahme der Weichteil- und Flüssigkeitsmasse kompensiert wird.

Auch Serumproteine wie z.B. Albumin können als Parameter zur Beurteilung des Ernährungszustandes eingesetzt werden. Hierbei sind Serumproteine, die einen hohen Umsatz mit einer entsprechend kurzen Halbwertszeit im Stunden- bis Tage-Bereich aufweisen, besonders empfindliche Parameter des Ernährungszustandes. So können neben Transferrin (HWZ 8d) vor allem Präalbumin (HWZ 48h) und Retinol-Bindendes-Protein (HWZ 10h) als Serumproteine, die bei Malnutrition im Serum erniedrigt sind, gemessen werden. Laut Harrison besteht eine klinisch manifeste Malnutrition bei folgenden Werten:

Serumtransferrin < 180-260 mg/dl

Serumpräalbumin < 20-50 mg/dl

Serum-RBP < 3-4,5mg/dl

Die Gültigkeit der Einschätzung einer Malnutrition durch die o.g. Serumproteine sowie ihre Korrelation zu anderen Verfahren (Anthropometrie) wurde in mehreren Arbeiten gezeigt (Ingenbleek et al., 1975; Young und Hill, 1978). Jedoch wurde aufgrund der kurzen Halbwertszeit der Serumproteine auf die Störanfälligkeit der

Messwerte hingewiesen. Zwar stellen die geprüften kurzlebigen Serumproteine empfindliche Parameter dar, eine Malnutrition anzuzeigen, gleichwohl sind sie jedoch schon wegen ihrer kurzen Halbwertszeit im Blut relativ großen Schwankungen unterzogen, so dass eine entsprechend große Streubreite erwartet werden muss.

Da diese Proteine zu den Anti-Akut-Phase-Proteinen zählen, ist es schwierig, die Auswirkungen möglicher beeinflussender Störeffekte wie z.B. entzündlicher Vorgänge zu erfassen und zu werten (Ingenbleek et al., 1975; Varela et al., 1997).

Zu beachten ist bei Transferrin, dass eine zusätzlich bestehende Eisenmangelanämie die Aussagefähigkeit bezüglich einer Malnutrition einschränkt.

In der Leitlinie „Enterale Ernährung: Onkologie“ der Deutschen Gesellschaft für Ernährungsmedizin (DGEM) werden zur Definition des Ernährungszustandes der Gewichtsverlust des Patienten und der „Subject Global Assessment“ (SGA) vorgeschlagen. Danach ist eine klinisch relevante Mangelernährung als Verlust von mindestens 10% des Körpergewichts oder als ein SGA Gruppe C definiert. Fehleinschätzungen des Ernährungszustandes sind möglich, da bei Tumorpatienten die verminderte Körpermasse durch Zunahme der Weichteil- und Flüssigkeitsmasse kompensiert wird. Bei adipösen Patienten kann trotz Übergewichts ein Verlust an stoffwechselaktiver Körperzellmasse vorliegen. Doch ist die Beurteilung des Gewichtsverlaufs die am einfachsten zu erhebende Messgröße.

Die Beurteilung des Ernährungszustandes kann zusätzlich mittels anthropometrischer Daten erfolgen. Hierbei wird die Größe der Fettdepots sowie der Muskelmasse anhand der Trizepshautfaltendicke und des Armmuskelumfanges gemessen. Möglich ist auch die Erhebung des Kreatinin-Längenindex. Weitere Methoden zur Erfassung des Ernährungszustandes sind die Bestimmung der Plasmawerte der Funktionsproteine und des Immunstatus anhand der abnehmenden Lymphozytenzahl (s. Tabelle 3).

<b>Parameter</b>	<b>Untersuchung: Beurteilung im Sinne einer Mangelernährung</b>
Körpergewicht	Vergleich des aktuellen Körpergewichts, Ausgangsgewicht von weniger als 90% des Normalgewichts (bemessen nach dem BMI) oder ungewollter Gewichtsverlust >10% in 6 Monaten bzw. >5% in Monaten
Funktionsproteine	Albumin <3,5g/dl, Präalbumin-, Cholinesterase-, Transferrin-Abfall
Immunstatus	Absolute Lymphozytenzahl <1500/ $\mu$ l
Anthropometrische Daten	Trizephautfaltendicke, Kreatinin-Längenindex
Indizes	Z.B. Ernährungsindex (PNI), EI (Quotient aus mehreren Parametern), BIA (Bioelectrical Impedance Analysis, Messung des Ohmschen Widerstandes)

*Tabelle 3: Parameter zur Beurteilung einer Mangelernährung*

Sämtliche erhobene Patientendaten sollten immer in Kombination und im Verlauf beurteilt werden. Zur Beurteilung und Verlaufskontrolle des Ernährungszustandes können verschiedene Indizes herangezogen werden. Hierzu zählt der Ernährungsindex (PNI), der die Serum-Albumin-Konzentration, die Trizephautfaltendicke, den Serum-Transferrinspiegel und ein Hauttest mit drei ubiquitären Antigenen erfasst. Weitere Indices für die Ernährung ist der EI, der einen Quotienten aus mehreren Parametern beinhaltet, und die bioelektrische Impedanzanalyse (BIA). Hierbei wird der Ohmsche Widerstand und die Reaktanz gemessen, die mit Hilfe von Elektroden an Hand und Fuß über einen Wechselstrom durch den Körper geleitet werden. Die gemessenen Werte korrelieren mit der Körperzusammensetzung. Aus diesen und einigen anderen Basisdaten werden Körperfett, Magermasse und Gesamtkörperwasser ermittelt.

Aspekte wie die ausführliche Anamnese der Essgewohnheiten bzw. der Möglichkeiten der Nahrungsaufnahme des Patienten sollen dabei immer beachtet werden.

### **2.1.5 Bedeutung der Zytokine bei Tumorerkrankungen**

Zytokine sind Polypeptide mit einem Molekulargewicht von ca. 15-25 kDa. Sie werden z.B. bei Verletzungen oder Infektionen als Mediatoren freigesetzt. Sie können von den meisten Körperzellen synthetisiert und sezerniert werden. Wie bereits erwähnt wird vermutet, dass die Kachexie in Verbindung mit den Effekten von Tumorprodukten wie pro- und antiinflammatorische Zytokinen (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ ) und Hormonen (Melanocortin, Insulin, Cortisol und Glucagon), die das Patientengewebe zerstören, steht (Argilés et al., 2003a; Tisdale, 2002). Diese Zytokine initiieren eine Kaskade an Ereignissen wie direkte Effekte auf den Metabolismus und Unterdrückung des Appetits und indirekte Effekte wie die Akut-Phase-Proteine Antwort. Diese Antwort wurde u.a. bei Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien beschrieben.

Verschiedene Adipokine sind im Rahmen der Akut-Phase-Reaktion an Entzündungen beteiligt. Adipokine wie Leptin, Adiponektin und Visfatin sind Sekretionsprodukte von Adipozyten, es handelt sich um bioaktive, lösliche Faktoren, die im Fettgewebe gebildet und freigesetzt werden. Die Synthese der Akut-Phase-Proteine unterliegt der Regulation durch Zytokine. Adipokine wie Leptin und IL-6 werden v.a. durch TNF- $\alpha$  in Adipozyten stimuliert. TNF- $\alpha$  hat eine inhibierende Wirkung auf die ZAG Expression (Bao et al., 2005). Dies lässt vermuten, dass ZAG, ein dem LMF identischer löslicher Faktor, nicht Teil der pro-inflammatorischen Antwort der Adipozyten ist. Die Akut-Phase-Reaktion besteht aus einer Reihe komplexer Reaktionen, die voranschreitende Gewebeschädigung verhindern, Tumorgewebe isolieren und zerstören sowie Reparaturprozesse in Gang setzen sollen. Sie wird in Zusammenhang mit einem gesteigerten Ruheumsatz, Gewichtsverlust und schlechter Überlebensrate gebracht (Falconer et al., 1994). Studien an gesunden Tieren konnten zeigen, dass IL-1 und TNF- $\alpha$  steigenden Energieverbrauch, erhöhten Proteinumsatz und Gewichtsverlust verursachen (Ling et al., 1997). TNF- $\alpha$  ist wie auch IL-1 ein pro-inflammatorisches Zytokin. Diese beiden Zytokine sind wie auch weitere humorale Faktoren maßgeblich an der

Wechselwirkung zwischen der angeborenen unspezifischen und der adaptiven spezifischen Immunantwort beteiligt. Interleukine besitzen vielfältige Aufgaben in der Regulation der Immunabwehr, der Entzündungsreaktion, der Hämatopoese und der Apoptose.

In verschiedenen experimentellen Ansätzen wurde demonstriert, dass Zytokine fähig sind, Gewichtsverlust zu induzieren (Todorov et al. 1996 ; Hirai et al., 1998; Tisdale, 2002). Nichtsdestotrotz müssen die erhaltenen Resultate vorsichtig interpretiert werden. So hat die einmalige Darreichung von TNF- $\alpha$  an Versuchstieren zu keinem erfolgreichen, also Kachexie induzierenden, Effekt geführt. Wiederholte Gabe verursacht initial einen kachektischen Effekt, doch entwickelt sich bald eine Toleranz gegenüber diesem Zytokin und die Nahrungsaufnahme und das Körpergewicht normalisieren sich wieder. Andere Studien zeigen, dass eine erhöhte TNF- $\alpha$  Dosis für die Aufrechterhaltung des kachektischen Effektes erforderlich ist (Shellock et al., 1986). Injektionen kleiner Dosen TNF- $\alpha$  in die Peripherie oder in das Gehirn von Tieren führen zu einem schnellen Anstieg des Grundumsatzes, die nicht in Verbindung mit steigender metabolischer Aktivität, aber mit Durchblutungssteigerung und thermogenetischer Aktivität im braunen Fettgewebe, das mit dem mitochondrialen UCP-1 assoziiert ist, steht. Vergleichend findet man im kachektischen Zustand beim Menschen steigende Thermogenese im braunen Fettgewebe.

Zytokine könnten in der Entwicklung einer Krebs-assoziierten Anorexie eine Rolle spielen, da sie die Magenmotilität und -entleerung direkt über das gastrointestinale System oder via ZNS über Änderungen der efferenten Signale, die die Sättigung regulieren, beeinflussen. So konnte IL-1 im Speziellen mit Anorexie in Verbindung gebracht werden (Plata-Salaman, 2000). Es blockiert die durch Neuropeptid-Y (NPY) induzierte Nahrungsaufnahme. Dieses Molekül ist bei anorektischen Ratten mit Krebs erniedrigt (Chance et al., 1994). NPY findet sich bei Säugetieren im zentralen und peripheren Nervensystem. Es übt zahlreiche biologische Effekte aus v.a. auf die kardiovaskuläre Regulation, den Stoffwechsel, das Verhalten und endokrine Funktionen. NPY ist beteiligt an der Kontrolle der Nahrungsaufnahme als auch an der Regulation des Trinkens (Beck et al., 1990; Schwartz et al., 2000). Ausdifferenzierte menschliche Adipozyten exprimieren NPY Rezeptoren. NPY hat

beim Menschen einen antilipolytischen Effekt auf die Fettzellen (Valet et al., 1990). NPY kontrolliert die Leptinproduktion in menschlichen weißen Adipozyten, was möglicherweise einen peripheren Feedbackmechanismus kennzeichnet. Ein erhöhter Plasmaspiegel an NPY könnte somit die Leptinsekretion in den Fettzellen erhöhen. Umgekehrt inhibiert Leptin über Rezeptoren des Hypothalamus die Expression und Synthese des NPY im Hypothalamus. Somit führt ein erhöht zirkulierendes Leptin zu einer sinkenden NPY Produktion und zu einer verminderten Nahrungsaufnahme als auch zu einem erhöhten Energieverbrauch, um den Organismus vor einer Fettleibigkeit und Insulinresistenz zu schützen, die beide durch eine fettreiche Diät hervorgerufen werden (Serradeil-Le Gal et al., 2000).

Zytokine beeinflussen zudem den Protein-, Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel (Tisdale et al., 2003). Sie sollen an einigen der metabolischen Störungen in Krebspatienten beteiligt sein. Unter diesen Störungen wurden Änderungen im Lipidstoffwechsel, in der Proteolyse der Skelettmuskulatur, Apoptose und Synthese der Akut-Phase-Proteine beschrieben.

Möglicherweise sind Zytokine indirekt durch Erhöhung des Corticotropin Releasing Hormon Spiegels, ein zentralnervöser Neurotransmitter, der die Nahrungsaufnahme senkt, an der Entstehung einer mit Krebs in Beziehung stehenden Anorexie und dem Symptom der frühzeitigen Sättigung beteiligt. Es gibt bisher noch keinen Beleg, dass Zytokine an der Fettreduktion beteiligt sind (Mulligan et al., 1992a).

Leptin, ein Proteohormon und Zytokin-ähnliches Hormon aus dem Fettgewebe, wird von Fettzellen in das Blut sezerniert und durch das obese-Gen (ob) kodiert (Halaas et al., 1995). Leptin hat Appetit-hemmende Wirkung und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Fettstoffwechsels. Es kann die Bluthirnschranke passieren. Rezeptoren für Leptin finden sich in zwei unterschiedlichen Populationen von Neuronen des Hypothalamus. Die erste Gruppe dieser Neurone produziert die Appetit-stimulierenden Neuropeptide Agouti-Related Protein und NPY, welche durch das Leptin unterdrückt werden. Die zweite Population produziert POMC und Cocain- and Amphetamine-regulated Transcript, beides Transmitterstoffe, die Appetit-zügelnd wirken. Diese werden durch Leptin aktiviert. In dem Maße, wie die Fettdepots des Körpers reduziert werden, nimmt auch die Menge an zirkulierendem Leptin ab, was eine Zunahme des Appetits bewirkt. Leptin ist somit für die Kommunikation zwischen



den Fettzellen und dem ZNS über die Fettreserven zuständig (Shellok et al., 1996; Banks et al., 2006).

Bing et al. (2002) fanden bei Mäusen, denen LMF injiziert wurde, gesunkene Plasmaleptinspiegel. Diese Reduktion war proportional zum Verlust an Körperfett.

Kamoshida et al. (2006) untersuchten immunhistochemisch die Beteiligung von fünf Faktoren an der Entwicklung der Tumorkachexie. Zu diesen gehören Leukemia-Inhibitory Factor (LIF), IL-6, TNF- $\alpha$  sowie vom Tumor stammende Glykoproteine PIF und ZAG. Die Gruppe konnte nicht bestätigen, dass einer der fünf Marker für die Tumorkachexie ursächlich ist. Es scheinen komplexe Mechanismen an der Entstehung der Kachexie beteiligt zu sein.

Neben den Zytokinen wird die Beteiligung von Transkriptionsfaktoren und Molekülen, die vom Tumor stammen, an der Kachexieentstehung vermutet. Bing et al. (2001) erläutern, dass eventuell eine mit der Tumorlast assoziierten Anorexie durch Tumorprodukte vermittelt wird.

### **2.1.6 Folgen einer Kachexie**

Die Hauptkonsequenz eines fortschreitenden Gewichtsverlusts bei Tumorpatienten ist eine verringerte Überlebenschance (Dickson et al., 1999). Glare (2005) zeigte eine negative Korrelation zwischen dem Überleben und den Symptomen Anorexie, Gewichtsverlust, Dysphagie und Xerostomie. Das Vorkommen bestimmter Symptome kann Informationen zur Prognostik liefern. Folgende fünf von 14 beurteilten Symptomen dienen der Voraussage aufs Überleben: Anorexie, Gewichtsverlust, Xerostomie, Dysphagie und Dyspnoe (Glare, 2005). In den derzeitigen bestehenden Modellen, die die Voraussagbarkeit bezüglich der Überlebenschance bei Krebspatienten ermöglichen sollen, ist der Ernährungsstatus immer als prognostischer Faktor enthalten (Glare, 2005).

Die Kachexie ist in ca. 20% der Krebstodesfälle die direkte Todesursache (Warren et al., 1935). Die Kachexie beeinträchtigt die Lebensqualität (DeWys et al., 1980; Hammerlid et al., 1998) und die Prognose, erhöht das Operationsrisiko und die Risiken von Therapie assoziierten unerwünschten Nebenwirkungen (Harvey et al.,

1981) und schwächt das Ansprechen auf die verabreichte Therapie (Chemo- und Radiotherapie) (DeWys et al., 1986).

Die Auswirkungen auf die Lebensqualität können ein allgemein schlechter Gesundheitszustand, verminderter sozialer Kontakt und Rückgang der Leistungsfähigkeit sein (DeWys et al., 1980). Die Kachexie ist mit einer erhöhten Infektanfälligkeit auf Grund einer Immunschwäche verbunden. Sie führt zu Müdigkeit, schlechter Wundheilung und beeinträchtigter zytotoxischer T-Zell-Aktivität (Langer et al., 2001).

### **2.1.7 Therapieansätze**

Die frühzeitige Erkennung und Einschätzung des Ernährungszustandes ist äußerst wichtig, um möglichst rechtzeitig eine Intervention anzustreben (Maureen et al., 2005). Eine frühzeitige Nahrungsergänzung kann eine Mangelernährung korrigieren (aber keine Kachexie!). Dadurch kann die Lebensqualität und bei manchen Patienten die Prognose verbessert werden (Argilés, 2005). Dies ist möglich durch routinemässiges Screening und Einschätzung des Ernährungsstatus. Die Entwicklung und Einführung von Screening- und Beurteilungsmethoden ist für eine wirksame ernährungstherapeutische Behandlung bei Krebspatienten von entscheidender Bedeutung.

Der Ruheenergieumsatz normal ernährter Patienten unter onkologischer Therapie liegt zwischen 20 und 25 kcal/kg aktuelles Körpergewicht und Tag. Der Energiebedarf kann durch den mit der Mangelernährung assoziierten Inflamationsprozess und durch körperliche Aktivität erhöht sein. Trotz eines erhöhten Ruheenergieumsatzes wurde jedoch bei onkologischen Patienten ein mit Gesunden vergleichbarer Gesamtenergieverbrauch gefunden. Als Ursache gilt eine adaptive Abnahme der körperlichen Aktivität bei metabolisch alterierten Tumorpatienten. Daher ist auch bei enteraler oder parenteraler Ernährung i.d.R. eine tägliche Energiezufuhr von 25-35 kcal/kg ausreichend. Die therapeutischen Strategien fokussieren sich auf die Anorexie und die metabolischen Störungen.

Eine besondere Ernährungsform im Sinne einer „Krebsdiät“ – auch im Rahmen einer Tumortherapie – gibt es nicht. Onkologische Patienten können mit einer Vollkost oder „leichten Vollkost“ als abwechslungsreiche Mischkost ernährt werden, die ihren

individuellen Bedürfnissen entsprechend im Sinne einer „Wunschkost“ modifiziert ist. Die leichte Vollkost enthält im Unterschied zur Vollkost keine Lebensmittel oder Speisen, die erfahrungsgemäß Unverträglichkeiten auslösen.

## **2.2 Fettgewebe, Lipolyse und Lipogenese**

### **2.2.1 Das Fettgewebe und seine Funktion**

Fettgewebe ist eine Gewebeart, die energiereiche Lipide speichern kann. Bei der normalgewichtigen Frau bestehen ca. 25% des Körpergewichts aus Fettgewebe, beim Mann ca. 15%. Fettgewebe ist fast ubiquitär im Körper verteilt und zeigt eine große Plastizität im Verlauf des Lebens. Es gibt dabei grundlegende Unterschiede in der Morphologie zwischen subkutanen und intraabdominellen Fettdepots. Das omentale Fett enthält mehr Blutgefäße, Makrophagen und sympathische Nervenfasern als die subkutanen Fettspeicher. Dies deutet auf eine vermehrte metabolische Aktivität der omentalen Depots hin.

Generell ist Fettgewebe gut mit Blut versorgt. Jede Fettzelle hat Kontakt mit mindestens einer Blutkapillare. Man unterscheidet zwei Formen, das weiße, häufiger vorkommende und das braune Fettgewebe, das zusätzlich der Wärmeproduktion dient. Das braune Fettgewebe nimmt im Laufe der Entwicklung ab, Erwachsene besitzen nur wenig braunes Fettgewebe. Bei Tumorpatienten mit Kachexie wurde es mit einem Anteil von 80% im Gegensatz von nur 13% bei gesunden Personen beobachtet (Shellock et al., 1986). Die Hauptaufgaben des weißen Fettgewebes sind Energiespeicherung in Form von Triacylglycerinen (Triglyceride), Wärmeisolierung (subkutane Depots) und mechanischer Schutz als Baufett (intraabdominale Depots). Das Fettgewebe baut sich aus zellulären Komponenten, hauptsächlich aus reifen, lipidreichen Adipozyten auf. Daneben finden sich lipidfreie Präadipozyten, Endothelzellen, Nervenfasern und Makrophagen (Hauner, 2004).

Neben diesen Funktionen ist das Fettgewebe auch ein endokrines und sekretorisches Organ (Ahima & Flier, 2000; Trayhurn & Beatti, 2001). Wie bereits erwähnt produzieren und sezernieren Fettzellen verschiedene lösliche Faktoren, sogenannte Adipokine, aus dem Fettgewebe. Dazu gehören u.a. Adiponectin, TNF- $\alpha$ , IL-6, Lipoproteinlipase, Angiotensinogen und das Proteohormon Leptin. Diese Faktoren wirken lokal oder systemisch auf den Fettstoffwechsel. Sie steuern u.a. die Energiehomöostase, Insulinsensitivität und führen zu einer Entzündungsantwort. Es

gibt Hinweise, dass Unterschiede in Bezug auf die Sekretion von Adipokinen bei subkutanen und omentalen Fettgewebe bestehen. So zeigten Hube et al. (1996) regionale Unterschiede in Bezug auf die Leptin-Expression im Fettgewebe adipöser Frauen. Im omentalen Fettgewebe fanden sie eine niedrigere Expression im Vergleich zum subkutanen abdominellen. Während sich die Expression der Lipoproteinlipase, der hormonsensitiven Lipase, des PPAR $\gamma$  und des TNF- $\alpha$  im omentalen und subkutanen Fettgewebe nicht unterschied (Montague et al., 1998).

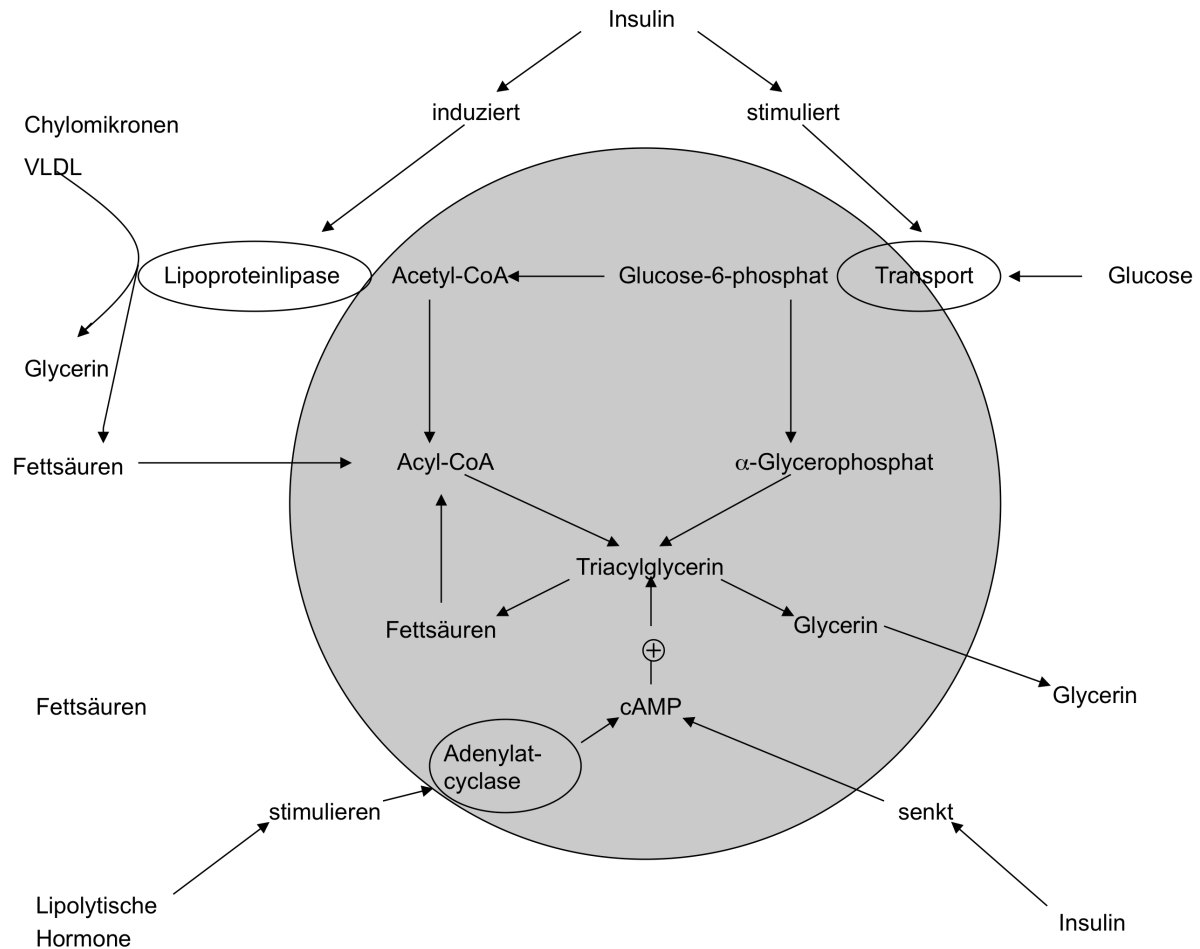
Es besteht ein Zusammenhang zwischen Fettgewebe und dem Immunsystem (Matarese & La Cava, 2004). Die Interaktion scheint über lösliche Mediatoren, die von Immunzellen und Fettzellen stammen, vermittelt zu sein (Wellen & Hotamisligil, 2005). So findet man bei Fettleibigkeit eine Überexpression von TNF- $\alpha$  im Fettgewebe und erhöhte Serumspiegel an TNF- $\alpha$  (Hotamisligil et al., 1993; Dandona et al., 1998). Fettzellen produzieren lösliche Adipokine wie Adiponectin, Leptin und Visfatin. Adipokine sind Zytokine, die hauptsächlich vom weißen Fettgewebe produziert werden. Sie beeinflussen die Energie- und Glucosehomöostase, sie sind beteiligt an der Kontrolle der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichts, sie regulieren neuroendokrine Funktionen und eben auch Immunfunktionen. Es wird vermutet, dass sie eine wichtige Verbindung zwischen Fettleibigkeit, Insulinresistenz und entzündlichen Störung darstellen wie Hotamisligil et al. (1993) anhand des TNF- $\alpha$  zeigten. Das Sekretionsmuster der Fettzellen ändert sich bei Adipositas. So besteht ein Zusammenhang zwischen dem Grad Fettleibigkeit und der Höhe des Adiponectin Serumspiegels. Adiponectin senkt das Körpergewicht (Yang et al., 2001; Yamauchi et al., 2001). Fettleibigkeit wird in Bezug auf Immunparameter mehr und mehr als ein Zustand chronischer Entzündung betrachtet (Caspar-Bauguil et al., 2005). Zytokine wie TNF- $\alpha$ , Il-6 und Il-1 spielen dabei eine wichtige Rolle. Weißes Fettgewebe enthält Leukozyten und Makrophagen. Die Anzahl dieser Zellen im weißen Fettgewebe korreliert direkt mit Fettleibigkeit (Tilg & Moschen, 2006). Charakteristisch für die chronisch, entzündliche Antwort ist dabei eine abnormale Zytokinproduktion, hohe Konzentrationen an Adipozytokinen (v.a. Adiponectin) in der Blutzirkulation und erhöhte Synthese Akut-Phase-Proteine wie das CRP (Wellen & Hotamisligi, 2005). Daneben spielen Leukozyten eine wichtige Rolle in der Regulation der Körperfetteinlagerung. Mäuse, deren Leukozytenadhäsion defekt ist, entwickeln eine Fettleibigkeit (Dong et al., 1997).

### **2.2.2 Metabolische Eigenschaften des Fettgewebes**

Triacylglyceride werden im Fettgewebe gespeichert. Im Fettgewebe laufen ständig die Vorgänge der Lipogenese (Triacylglycerin-Biosynthese) und der Lipolyse (Triacylglycerin-Hydrolyse) nebeneinander ab. Wobei Substratzufuhr bzw. -mangel das Verhältnis der beiden Vorgänge bestimmen. Der Triglyceridmetabolismus besteht aus Aufnahme von Fettsäuren und Glukose, dem Auf- und Abbau der Triglyceride sowie dem Ausschleusen von Fettsäuren und Glycerin. Er ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

Die Lipolyse ist definiert als die hydrolytische Spaltung der Triglyceride aus dem Fettgewebe durch Lipasen und Abgabe von Glycerin und freien Fettsäuren ins Blut. Die Lipolyse wird aktiviert durch Adrenalin, Noradrenalin, Glukagon, ACTH und TSH. Sie wird gehemmt durch Insulin, Prostaglandin E1 und Nicotinsäure.

## Untersuchung zur ZAG-Expression im Fettgewebe von Tumorpatienten



**Abbildung 1: Metabolische Aktivitäten der Fettzellen.** (verändert nach Löffler und Petrides, 1998) Verschiedene Stoffwechselwege führen zum Auf- und Abbau von Triacylglycerinen.

Triglyceride werden im Blutkreislauf in Form von Lipoproteinen, den Chylomikronen, die bei der Nahrungslipid-Resorption entstehen, und den Very Low Density Lipoprotein (VLDL) transportiert. Sie werden u.a. von den Fettzellen zur Energiespeicherung aufgenommen. Das in diesen Lipoproteinen enthaltene Triacylglycerin wird in den Blutkapillaren des Fettgewebes durch die LPL in freie Fettsäuren und Glycerin gespalten. Durch die hormonsensitive Lipase wird die Geschwindigkeit der Lipolyse reguliert. Die Fettsäuren gelangen teils mittels passiver Diffusion (nur mittel- und kurzkettige Fettsäuren) teils über Fettsäure-Transportproteine in die Fettzellen. Neben den Fettsäuren, die aus der Triacylglyceridhydrolyse hervorgehen, werden zusätzlich freie Fettsäuren eingeschleust, die im Blut an Albumin gebunden vorliegen (Richieri & Kleinfeld,

1995). Fettsäuren werden durch  $\beta$ -Oxidation abgebaut, sie werden durch sukzessiven Abbau am  $\beta$ -C-Atom verkürzt. Die für die  $\beta$ -Oxidation benötigten Enzyme sind in der mitochondrialen Matrix lokalisiert. Sie befinden sich so in der Nähe der in der mitochondrialen Innenmembran gelegenen Enzyme der Atmungskette. Bei der  $\beta$ -Oxidation entstehen große Mengen von NADH/H<sup>+</sup> und FADH<sub>2</sub>. Beide Wasserstoff-übertragenden Coenzyme werden in der Atmungskette unter ATP-Gewinn reoxidiert.

Katecholamine, Glukagon und ACTH stimulieren die Freisetzung der Fettsäuren aus den Lipidspeichern über die Aktivierung der Proteinkinase A, die unter anderem die hormonsensitive Lipase durch Phosphorylierung anschaltet (Hales et al., 1978). Die hormonsensitive Lipase spaltet im ersten Schritt des Fettabbaus zunächst eine Fettsäure vom Triglycerid ab. Das verbleibende Diglycerid wird anschließend durch unspezifische Lipasen hydrolysiert. Neben den freien Fettsäuren wird mangels Glycerokinase auch das gesamte freigesetzte Glycerin in die Blutbahn abgegeben. Das Glycerin kann als Maß für die lipolytische Aktivität der Zelle herangezogen werden (Hauner, 1992). Das bei der Lipolyse freigesetzte Glycerin wird in der Leber weiterverwertet. Die nur hier vorkommende Glycerokinase phosphoryliert Glycerin ATP-abhängig zu  $\alpha$ -Glycerophosphat. Dieses wird durch die  $\alpha$ -Glycerophosphatdehydrogenase zu Dihydroxyacetonphosphat oxidiert, dieses kann dann in die Glycolyse oder Gluconeogenese eingeschleust werden.

Ein nicht unbeträchtlicher Teil der durch die Fettzellen während der Lipolyse gebildeten Fettsäuren wird erneut aktiviert und im Reveresterungszyklus mit  $\alpha$ -Glycerophosphat verestert. Der Spiegel an nicht veresterten Fettsäuren in der Fettzelle ist demnach die Resultante aus der Geschwindigkeit von Lipogenese, Lipolyse und Reveresterung. Das Verhältnis dieser drei Größen wird sehr genau reguliert. Es ist von Ernährungsgewohnheiten, der Nahrungszusammensetzung und von hormonellen Einflüssen abhängig.

Fettsäuren dienen verschiedenen Organen, v.a. der Muskulatur, der Leber und dem Myokard als gut oxidierbares Substrat und werden von diesen Geweben gegenüber der Glucose bevorzugt oxidiert.

### **2.3 Zinc- $\alpha$ 2-Glycoprotein (ZAG)**

Zinc- $\alpha$ 2-Glycoprotein ist ein löslicher Faktor. Es wird in Verbindung mit der Tumorkachexie gebracht (McDermott et al., 2006). Es wurde erstmals 1961 im

menschlichen Plasma isoliert (Burgi & Schmid, 1961, 166). Der dem ZAG identischen LMF wurde als erstes aus Kachexie induzierenden „mouse colon adenocarcinoma“ (MAC16) gereinigt. LMF ist beim Menschen in seiner Aminosäuresequenz, seinem Verhalten in der Elektrophorese und in der Immunitätsreaktion dem Plasmaprotein ZAG homolog (Hirai et al., 1998, Todorov et al., 1998). In Anbetracht der hohen Ähnlichkeit mit dem vom Tumor stammenden LMF, welcher im Zusammenhang mit einem dramatischen Fettgewebsverlust bei Tumorkachexie steht, konnte eine durch ZAG stimulierte Lipidreduktion sowohl bei Mäusen in vivo als auch in vitro gezeigt werden (Russell et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass LMF wie auch ZAG die Lipolyse und die Freisetzung von Glycerin aus Adipozyten stimulieren. Dies kann zur Entwicklung einer Kachexie bei Tieren mit einem Tumor, der ZAG (LMF) produziert, führen. ZAG und LMF werden von nun ab in der vorliegenden Arbeit synonym verwendet.

Bao et al. (2005) fanden heraus, dass menschliche Adipozyten das ZAG-Gen exprimieren und ZAG sezernieren. Die ZAG Expression scheint in Relation der Fettmasse zu stehen.

ZAG wurde auch gefunden in menschlichen Körperflüssigkeiten wie Serum, Schweiß, Speichel, Urin, Synovialflüssigkeit, Liquor, Fruchtwasser und Samenflüssigkeit (Burgi & Schmid, 1961; Díez-Itza et al., 1993; Tada et al., 1991, Bundred et al., 1987). Ebenso kommt es vor in sekretorischen Epithelzellen der Leber, der Brustdrüse (Diez-Itza et al., 1993), des gastrointestinalen Traktes, der Schweißdrüsen und der Prostata (Hale et al., 2001). Bing et al. (2002) zeigten, dass ZAG natürlicherweise im weißen und braunen Fettgewebe vorkommt. Die weite Verbreitung des Proteins in den verschiedenen Körperzellen lässt Tada et al. (1991) vermuten, dass es nicht nur eine einzige Quelle für dieses Protein gibt. Das Serum ZAG wird in der Leber synthetisiert. Das ZAG in der Samenflüssigkeit hat seinen Ursprung in der Prostata (Schwick & Haupt, 1981; Ohkubo et al., 1990).

Die Expression des ZAG Gens wurde im weißen Fettgewebe von Mäusen entdeckt, besonders epididymal, perirenal, subkutan und in der Brustdrüse. Es wurde in Nicht-Fettzellen und in reifen Adipozyten gefunden. Das weiße Fettgewebe fungiert hier somit als endokrines Organ (Ahima & Flier, 2000; Frühbeck et al., 2001; Trayhurn & Beattie, 2001).



Bao et al. (2005) fanden ZAG mRNA und ZAG Protein nur in differenzierten Fettzellen, nicht aber in Präadipozyten. ZAG ist ein früher Marker für die Differenzierung menschlicher Adipozyten. Darauf deutet das Vorhandensein von ZAG mRNA und Protein kurz nach der Induktion der Differenzierung hin.

Tzanavari et al. (2007) untersuchten in ihrer Studie die Ontogenese der ZAG Expression im Fettgewebe von Ratten während der postnatalen Entwicklung. Sie zeigten, dass sowohl ZAG mRNA als auch das Protein im subkutanen weißen und braunen Fett am 1.Tag postnatal exprimiert wird. Das starke Signal, das hierbei für die ZAG mRNA und ZAG Protein Expression beobachtet wurde, legt nahe, dass ZAG eine Rolle in der Regulation des Fettgewebismetabolismus in der frühen postnatalen Lebensphase spielt. Die Höhe der ZAG mRNA und des Proteins fielen signifikant bis zum 21. Lebensstag. ZAG ist in die postnatale Entwicklung der Fettgewebismenge involviert und steht in Verbindung mit den metabolischen Veränderungen, die sich im Fettgewebe postnatal ereignen. Die ZAG Expression im weißen Fettgewebe nimmt im Laufe der Entwicklung, wenn die Fettmenge erheblich steigt, ab.

Hirai et al. (1998) haben von einem starken Anstieg der ZAG Konzentration im Organismus von Tieren mit Karzinomen berichtet. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass ZAG in der Leber, im braunen Fettgewebe und im weißen Fettgewebe von Mäusen vorhanden ist. Bei Mäusen, die eine Tumorkachexie aufweisen, ist ZAG mRNA im weißen Fettgewebe deutlich überexprimiert (Bing et al., 2003). ZAG zeigt in bestimmten malignen Tumoren beim Menschen erhöhte Expressionsraten (Bing et al., 2003; Hale et al., 2001; Díez-Itza et al., 1993). Bei Kachexie ist das Expressionsniveau erhöht (Bing et al., 2004; Bing et al., 2006), bei Fettleibigkeit reduziert (Dahlman et al., 2005).

Mäuse, denen ZAG (LMF) injiziert wurde, zeigten einen raschen Gewichtsverlust und eine signifikante Reduktion der gonadalen Fettmasse und des interskapulären braunen Fettgewebes. Die Skelettmuskelmasse blieb unverändert. Die Essensaufnahme war nicht signifikant verändert (Bing et al., 2002).

Die Kachexie bei Mäusen mit einem MAC16 Tumor wird von einem 10fachen Anstieg der ZAG mRNA und des ZAG Proteins im weißen Fettgewebe und einem 20fachen des ZAG Proteins im braunen Fettgewebe begleitet. Die Expression der Gene und

des Proteins wurde auch im menschlichen viszeralen und subkutanen Fettgewebe entdeckt. Hierbei wurden jedoch keine quantitativen Messungen über Veränderungen in Bezug auf die Tumorkachexie gemacht (Sanders & Tisdale, 2004).

Die ZAG-Konzentration ist in der Brustdrüse 30- bis 50mal höher als im Plasma. ZAG ist in 40-50% der benignen und malignen Brustkrebserkrankungen überexprimiert (Bundred et al., 1987; Sanchez et al., 1997; Díez et al., 1993). Dies hebt die Plasmakonzentration über die Schwelle, die für die Lipolyse erforderlich ist. Es gibt einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Höhe des ZAG und dem histologischen Grad des Brusttumors (Díez-Itza et al., 1993). Wobei bei gut differenzierten Tumoren hohe ZAG-Werte gemessen werden konnten. Im Gegensatz dazu zeigen die mässig bis schlecht differenzierten Tumoren einen niedrigeren Wert (Díez-Itza et al., 1993). Desweiteren ist ZAG ein zuverlässiger immunhistochemischer Marker für apokrine Zelldifferenzierung in der menschlichen Brust. Frauen mit weit fortgeschrittenem Brustkrebs hatten höhere Serumspiegel als diejenigen in einem frühen Krankheitsstadium. Mazoujian (1990) konnte zeigen, dass ZAG überwiegend in Tumoren mit apokriner Differenzierung exprimiert wird.

Irmak et al. (2005) konnten einen erhöhten Gehalt an ZAG im Urin von Patienten mit Harn-Blasenkrebs unabhängig vom Tumorstadium zeigen. Auch bei gesunden Probanden wurde ZAG im Urin gefunden, doch war der Gehalt 3fach niedriger. Der größte Anstieg zeigte sich am Übergang vom oberflächlichen pT1 zum invasiven Tumorstadium pT2. Bei dem Vorliegen einer Tumorkachexie wurde ein direkter Zusammenhang zwischen der Expression von ZAG und der Konzentration im Urin gefunden (Irmak et al., 2005).

Bei Patienten mit Prostatakarzinom wurde sowohl im Gewebe des Prostatakarzinoms als auch im Serum der Tumorpatienten erhöhtes ZAG Protein gefunden (Hale et al., 2001). Auch im gesunden Prostatagewebe wurde ZAG entdeckt und macht in der Samenflüssigkeit 30% der Proteine aus (Poortmans & Schmid, 1968). ZAG Protein im Blutstrom wird vorwiegend in der Leber synthetisiert während ZAG im Sperma von der Prostata stammt. Das Serum ZAG ist in der Nukleotidsequenz vollkommen homolog zu dem in der Prostata. Auch hier besteht ein Zusammenhang zwischen der ZAG Produktion und dem Grad der Tumordifferenzierung d.h. fallende oder fehlende ZAG Produktion bei schlecht differenzierten Tumoren. Das vom Tumor produzierte ZAG führt zu einem steigenden

Serumspiegel, was diagnostisch nützlich sein könnte (Hale et al., 2001). Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass die ZAG Produktion und die erhöhten Serumwerte von sekretorischen Epithelzellen, die durch den Tumor aktiviert werden, ausgehen.

### **2.3.1 Biochemische Eigenschaften**

Das ZAG ist ein lösliches, 43 kDA Glycoprotein, welches von normalen Epithelzellen sezerniert wird. ZAG wurde zuerst aus menschlichem Plasma isoliert und gehört zu den Plasmaproteinen (Bürgi & Schmid, 1961). Die Plasmaproteine stellen ein heterogenes Gemisch von bis zu 100 Proteinen, meist Glycoproteinen, dar. Zum überwiegenden Teil werden sie in der Leber und im Lymphgewebe synthetisiert. In der Elektrophorese können sie je nach Ladung und Teilchengröße in folgende Komponenten getrennt werden: Albumine,  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2- Globuline,  $\beta$ -Globuline und  $\gamma$ -Globuline. In der Elektrophorese läuft ZAG in der  $\alpha$ 2 Proteinfraction.

Jirka und Blanicky (1980) berichten von drei Isoformen des ZAG in der Elektrophorese und, dass die Konzentration jeder Isoform im menschlichen Serum von ihrem niedrigsten Wert in der fetalen und frühen neugeborenen Periode auf die höchsten Werte im Kindes- und Erwachsenenalter steigt.

Das Gen für ZAG liegt auf dem Chromosom 7q22.1. Es umfasst vier Exons und drei Introns (Ueyama et al., 1991). Das gesamte ZAG Gen wurde von Freije et al. (1991) entschlüsselt.

Die chemische Zusammensetzung des ZAG ist charakterisiert durch: Polypeptide 85%, Sialinsäure 7% (am Ende der Oligosaccharid-Kette), Mannose und Galaktose 7%, Glukosamine 4%, und Fruktose 0,2%. Bei der Aminosäurezusammensetzung kommen gehäuft Tryptophan 4,7% und Tyrosin 5,9% vor (Bürgi & Schmid, 1961). Wie bereits erwähnt ist die Aminosäuresequenz, das Verhalten in der Elektrophorese und in der Immunreaktion gleich derer des LMF (ZAG) (Hirai et al., 1998).

Araki et al. (1988) bestimmten als erste die vollständige Polypeptidsequenz. ZAG besteht aus einer einzigen Polypeptidkette, die aus 276 Aminosäuren aufgebaut ist und zwei Disulfidbrücken enthält (Araki et al., 1988). Die Aminosäuresequenz und die Struktur besitzen nach Araki et al. (1988) eine große Homologie zur alpha Kette der Histokompatibilitätsantigene Klasse I. Dies könnte nach Tada et al. (1991)

erklären, weshalb ZAG nicht in endokrinen Drüsen, jedoch in exokrinen Drüsen, die vermehrt Kontakt zur „Aussenwelt“ haben, entdeckt wurde.

ZAG zeigt eine Aminosäuresequenz, strukturelle Organisation und Faltung ähnlich der Haupthistokompatibilitäts-Komplexe (MHC) der Klasse I. Auch besteht ein hoher Grad an Ähnlichkeit in der Gensequenz (Araki et al., 1988; Sanchez et al., 1999; Rolli et al., 2007). ZAG ist ein lösliches Protein, nicht an Plasmamembranen gebunden und es ist nicht mit  $\beta$ -2-Mikroglobulin assoziiert. In der Röntgenstrukturanalyse bzw. Röntgenkristallographie ähnelt ZAG einer schweren Kette, bestehend aus den Domänen  $\alpha$ 1- $\alpha$ 3, des MHC der Klasse I, bindet jedoch nicht die leichte Kette,  $\beta$ 2-Mikroglobulin, der Klasse I. Das MHC-System ist ein polymorpher Genkomplex, der Membranproteine codiert, die die Basis der Erkennung von Selbst und Nicht-Selbst durch Lymphozyten bilden. Die MHC-I-Peptidrezeptoren finden sich auf allen kernhaltigen Zellen. Das MHC-I-Protein ist ein monomeres integrales Membranprotein, das drei extrazelluläre Domänen ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 3) besitzt. Für seine Funktion ist anders als beim ZAG eine Assoziation an das  $\beta$ -2-Mikroglobulin notwendig. Wie die Antigen-präsentierenden MHC-I-Proteine hat auch ZAG eine große offene apikale Vertiefung in der Kristallstruktur. Die Struktur und die Umgebung der Vertiefung spiegelt seine Rolle in der Immunregulation und dem Lipidkatabolismus wieder (Sanchez et al., 1999). Das präsentierende Peptid befindet sich in einer Spalte zwischen den Domänen  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2.

Analog zu allen anderen MHC-I-Proteinen, die diese offene Spalte haben (Burmeister et al., 1994), ist die Besetzung durch einen Liganden wahrscheinlich äußerst wichtig für die biologische Funktion des ZAG. Trotz der strukturellen und biochemischen Beweise, dass ZAG einen Liganden bindet, wurde bisher nichts durch Extraktion aus biologischen Flüssigkeiten gefunden (Sanchez et al., 1999). Die Schwierigkeit könnte darin bestehen, dass der Ligand labil oder heterogen ist oder beim Reinigungsprozess leicht verloren geht. Die Spalte enthält eine Nicht-Peptidverbindung, die unter pathologischen Umständen in den Lipidmetabolismus verwickelt sein könnte.

Lindsay et al. (2006) konnten zeigen, dass ZAG hydrophobe Liganden in Lösung bindet, im Speziellen mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Und es gibt Hinweise, dass die Bindungsstelle des Liganden die erwartete in der apolaren Rille ist. Doch wurde

bisher kein Ligand erfolgreich isoliert und identifiziert. Es bleibt offen, ob andere Klassen kleiner hydrophilen und hydrophoben Verbindungen relevant sind. Es ist möglich, dass die natürlichen Liganden von ZAG sehr heterogen sind und das Gleichgewicht zwischen ihnen die natürliche regulatorische Funktion von ZAG moduliert. Es ist in Anbetracht der lipolytischen Effekte wahrscheinlich, dass das Protein in Zusammenarbeit mit einem Rezeptor auf der Zelloberfläche steht, der Kontakt zu einem intrazellulären Signalweg hat. Die lipolytische Wirkung könnte über den  $\beta$ -Adrenorezeptor mit einer Hochregulation von cAMP vermittelt werden (Russell et al., 2002). Sollten die Liganden, die an ZAG binden, physiologische Bedeutung haben, dann würde man erwarten, dass die Beladung des Proteins mit selektiven natürlichen Liganden oder Medikamenten die biologische Aktivität von ZAG modulieren kann.

Nur 59% der ZAG Aminosäuresequenz sind identisch zwischen Menschen und Mäusen (Ueyama et al., 1994). Sanchez et al. (1999) berichten, dass Mensch und Maus jedoch in den spezifischen Regionen der Aminosäuresequenz in bis zu 100% übereinstimmen. Dies gilt auch für die Regionen, die für den Lipidmetabolismus wichtig sind. Bei Mensch und Maus stimuliert ZAG die Lipolyse in den Adipozyten, was zu Glycerolfreisetzung und steigendem Fettverbrauch führt (Hirai et al., 1998).

### **2.3.2 ZAG-Effekte im menschlichen Organismus**

ZAG wird als ein neues Adipokin betrachtet, welches von menschlichen Adipozyten exprimiert und von differenzierten Fettzellen sezerniert wird, nicht aber von Präadipozyten (Bao et al., 2005). ZAG enthält eine sekretorische Signalsequenz (Hale et al., 2001). Es ist möglicherweise in die lokale Regulation der Fettgewebefunktion, am Lipidmetabolismus und an anderen Prozessen des menschlichen Fettgewebe beteiligt (Bao et al., 2005). In vitro Untersuchungen konnten zeigen, dass ZAG dosisabhängig die Lipolyse stimuliert (Hirai et al., 1998). Aus in vivo-Untersuchungen ging hervor, dass ZAG eine schnelle und selektive Reduktion des Körperfettes und einen Anstieg der freien Fettsäuren im Serum durch Aktivierung einer hormonsensitiven Lipase bewirkt. Der beobachtete Effekt des ZAGs auf die Lipolyse der Adipozyten und die gesteigerte Expression im weißen Fettgewebe während des Gewichtsverlustes bei Krebskachexie lässt eher eine überwiegend lokale autokrine/parakrine Wirkweise vermuten.

Eine Behandlung von Mäusen und humanen Adipozyten mit ZAG stimulierte die Lipolyse, die Glycerinfreisetzung und die Adenylatcyclase in der Zellwand der Adipozyten in Abhängigkeit der Dosis. Auch war die Sauerstoffaufnahme im interscapulären braunen Fettgewebe erhöht, was auf eine vermehrte Fettmobilisation und einen erhöhten Fettumsatz hinlenkt (Hirai et al., 1998). Der Glucosespiegel im Blut war erniedrigt. Im Zusammenhang hierzu war die Glucoseoxidation als auch die Lipidoxidation im gesamten Körper erhöht (Russell & Tisdale, 2002).

Rolli et al. (2007) nutzten ZAG knockout Mäuse, um die Pathophysiologie von ZAG aufzuklären. Die Mäuse, denen ZAG fehlte, waren übergewichtig. Die Körpergewichtszunahme ist möglicherweise zurückzuführen auf eine reduzierte Lipolyse in Adipozyten.

Auch Adiponectin, ein weiteres Adipokin, steht im Zusammenhang mit der Wirkung von ZAG. Es wurde berichtet, dass die Überexpression von ZAG in Adipozyten in vitro zu steigender Expression von Adiponectin-mRNA führt (Gohda et al., 2003). Bei Mäusen war die Adiponectin Genexpression in der Entwicklung der Fettleibigkeit unterdrückt (Nadler et al., 2001). Übergewichtige haben einen niedrigeren Adiponectin-Spiegel im Vergleich zu Normalgewichtigen (Yang et al., 2001; Yamauchi et al., 2001). Erniedrigte Mengen an Adiponectin im menschlichen Serum korrelieren mit hohem Körpergewicht. Gewichtsverlust induziert steigende Adiponectinmengen bei Fettleibigkeit (Yang et al., 2001; Yamauchi et al., 2001). Es bestand ein Zusammenhang zwischen reduzierter Genexpression als auch reduzierten Adiponectinplasmaspiegel und der Entstehung der Fettleibigkeit und des Typ2 Diabetes mellitus (Statnick et al., 2000).

Letztlich könnte ZAG auch nützlich in der Behandlung der Fettleibigkeit sein (Russell et al., 2004). ZAG knockout Mäuse wurden genutzt, um die Rolle von ZAG in der Körperfettreduktion zu erforschen. Dabei wurde herausgefunden, dass diese Mäuse übergewichtig waren und folglich das Gegenteil d.h. Überexpression von ZAG zum Gewichtsverlust und eventuell zur Kachexie führt (Rolli et al., 2007). ZAG könnte eine wichtige Rolle in der Regulation des Körpergewichts und bei den altersabhängigen Veränderungen in der genetisch bedingten Fettleibigkeit spielen (Gohda et al., 2003).

### 2.3.3 UCP-1,-2,-3

Wie bereits erwähnt besitzt ZAG die Eigenschaft, die Expression von UCP-1,-2 und -3 bei Mäusen zu induzieren (Bing et al., 2002). UCP ist an der Regulation des Energiegleichgewichts und des Körpergewichts beteiligt. Es könnte an der Steuerung des Lipidmetabolismus und an Mechanismen der Verwertung freier Fettsäuren involviert sein (Ricquier & Bouillaud, 2000). Dieses mitochondriale Transportprotein könnte eine wichtige Rolle im Fettverbrauch bei der Tumorkachexie spielen. UCPs verursachen einen Protonenfluß durch die Mitochondrienmembran. Auf diese Weise wird der Protonengradient entkoppelt, der während der mitochondrialen Atmungskettenphosphorylierung entsteht und zur ATP-Synthese führt. Bei dem durch UCP entstehenden Protonenkurzschluss wird somit auf Kosten der ATP-Synthese Wärme frei. Dabei oxidiert braunes Fettgewebe die entstehenden Fettsäuren selber und kann die freiwerdende Energie zur Wärmeproduktion heranziehen (Ricquier & Bouillaud). Katecholamine stimulieren die Lipolyse im braunen Fettgewebe. Der Effekt der Katecholamine wird über den  $\beta$ 3-Rezeptor, eine Isoform der  $\beta$ -Rezeptoren, vermittelt.

UCP-1 wurde bisher nur im braunen Fettgewebe, Hauptwärmeproduzent bei Nagetieren und menschlichen Neugeborenen, gefunden und hat eine starke Entkopplungsaktivität. (Ricquier & Bouillaud, 2000). Die Übermittlung der UCP-1 Expression geschieht über  $\beta$ 3-Adrenorezeptoren. TNF- $\alpha$  ist auch fähig, die mitochondriale Respiration zu entkoppeln (Busquet et al., 2003). Obgleich TNF- $\alpha$  auch in den Gewichtsverlust verwickelt ist, hemmt er, ungleich ZAG, die Expression von UCP-1 im braunen Fettgewebe fetaler Ratten durch Phosphorylierung des PPAR $\gamma$ -Kernrezeptors (Porras et al., 2002).

UCP-2 und-3 stimulieren die Thermogenese in Gewebe, denen es an UCP-1 mangelt. UCP-2 und-3 haben eine große Ähnlichkeit in den Sequenzen zu UCP-1. UCP-2 wird im gesamten Körper, überwiegend im weißen Fettgewebe aber auch in Muskeln, Herz und Leber exprimiert und spielt möglicherweise eine wichtige Rolle in der Entgiftung der reaktiven Sauerstoffprodukte, weniger in der Entkopplung (Ricquier & Bouillaud, 2000). UCP-3 wurde im braunen Fettgewebe und im Skelettmuskel gefunden. Es dient primär nicht der Entkopplung, aber scheint für die steigende Fettoxidation verantwortlich zu sein (Lee et al., 1999). Die Hauptfunktion von UCP-2 und -3 ist jedoch umstritten. Sie könnten eine ähnliche Rolle wie UCP-1, das die oxidative Phosphorylierung entkoppelt, haben (Adams et al., 2000). Beide

haben erhöhte Expressionsraten im Skelettmuskel von kachektischen Ratten mit Anorexie.

Es gibt Hinweise, dass ZAG die Fähigkeit besitzt, die UCP-Expression, die möglicherweise eine wichtige Rolle im steigenden Lipidkatabolismus und in der Fettverwertung während der Krebskachexie spielt, direkt zu beeinflussen. Die gestiegene Lipidoxidation ist möglicherweise zurückzuführen auf eine Steigerung der UCP-1,-2,-3 mRNA im braunen Fettgewebe und der UCP-2 mRNA im Skelettmuskel (Bing et al., 2002). Bing et al. (2000) konnten bei Mäusen mit dem MAC16-Tumor, der ZAG (LMF) produziert, gestiegene Expressionen von UCP-1 im braunen Fettgewebe und von UCP-2 und -3 im Skelettmuskel finden. Bei Mäusen, denen ZAG (LMF) injiziert wurde, wurden im braunen Fettgewebe gestiegene mRNA Spiegel an UCP-1, -2 und -3 nachgewiesen. ZAG (LMF) stimuliert auch die UCP-2 Expression im Muskel und in der Leber (Bing et al., 2002). ZAG beeinflusst direkt die UCP-Expression des braunen Fettgewebes und der Skelettmuskulatur und ist nicht die Folge von erhöhtem Lipidkatabolismus (Sanders & Tisdale, 2004).

Nicht bekannt ist derzeit, ob Mitochondrien der Muskulatur und des Fettgewebes von Mensch und Tier mit Tumorkachexie eine entkoppelte oxidative Phosphorylierung haben.

ZAG führte bei Mäusen zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der UCP-Expression im braunen, aber nicht im weißen Fettgewebe. UCP-2 stieg zusätzlich im Skelettmuskel und der Leber an. Diese Effekte wurden durch den  $\beta$ 3-Adrenorezeptorantagonist aufgehoben. Bei Mäusen stimuliert eine Überexpression an UCP-3 im Skelettmuskel die Thermogenese und reduziert Körpergewicht und – fett deutlich (Clapham et al., 2000).

UCPs könnten wichtige Regulatoren des Energiegleichgewichts sein. So fanden Millet et al. (1997) bei fettleibigen und normalgewichtigen Personen, die einer Kalorienreduktion unterzogen wurden, gestiegene Werte an UCP-2 und -3 mRNA. Womit sie zeigten, dass es keine Veränderungen gab in der Genregulation im Fettgewebe und in der Skelettmuskulatur Fettleibiger im Vergleich zu Normalgewichtigen. Die Erhöhung der mRNA-Menge dieser Proteine ist möglicherweise eine metabolische Anpassung an das Fasten.



Die UCP-2 mRNA-Höhe in Adipozyten in vivo korreliert positiv mit dem Ruheenergieumsatz bei fettleibigen Frauen (Barbe et al., 1998). Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass eine stark kalorienreduzierte Diät über einen Zeitraum von 25 Tagen, anders als beim kurzfristigen Fasten, nicht mit einer Induktion der UCP-2 mRNA Expression assoziiert ist. Die Höhe der UCP-2 mRNA im Fettgewebe steht möglicherweise in Bezug zu Variationen im Energieverbrauch. Die Expression der UCP-2 und -3 mRNA im Skelettmuskel war bei mageren und fettleibigen Menschen mit stabilem Gewicht gleich. Dasselbe galt für die Expression von UCP-3 mRNA im subkutanen Fettgewebe, während sie bei aktivem Gewichtsverlust stieg. Im Gegensatz dazu sank UCP-3 im Skelettmuskel von Fettleibigen mit Gewichtsreduktion bei stabilem Gewicht (Vidal-Puig et al., 1999). Die Stabilisierung einer Gewichtsreduktion ist beim Menschen mit einem fallenden UCP3 mRNA-Spiegel im Muskel assoziiert. Es ist möglich, dass die reduzierte UCP3-Expression zum sinkenden Energieverbrauch in gewichtsstabilen, gewichtsreduzierten Individuen beiträgt.

Infolge einer Gewichtsreduktion durch Diät war die UCP-2 und-3 Expression signifikant reduziert (Schrauwen et al., 2000). Dies lässt vermuten, dass die Reduktion des UCP-3 Proteins während Gewichtsverlust möglicherweise einem weiteren Verlust vorbeugt. Schrauwen et al. (2001) fanden bei Probanden, die einer fettreichen Diät unterzogen wurden, eine Hochregulation der UCP-2 und UCP-3 mRNA. Sie stellen die Hypothese auf, dass die UCPs an der Fettverbrennung beteiligt sind.

Eine stark kalorienreduzierte Diät führte bei fettleibigen Frauen zu sinkender Expression der UCP-3 mRNA im Fettgewebe und zu reduziertem Energieverbrauch (Pederson et al., 2000).

Paradoxerweise ist die UCP-2 und-3 Expression im Muskel während des Fastens, wenn der Energieverbrauch fällt, gesteigert (Weigle et al, 1998). Diese Proteine könnten eine Rolle bei der exzessiven Lipidmobilisation im Rahmen des Fettkatabolismus der Tumorkachexie spielen.

#### **2.3.4 ZAG-Signalwege**

ZAG als auch LMF stimulieren die Lipolyse direkt in isolierten Adipozyten. Sie stimulierten die Lipolyse durch Aktivierung der Adenylatcyclase in der

Plasmamembran der Fettzellen in einem GTP-abhängigen Prozess (Hirai et al., 1998). Dies tun sie in gleicher Weise wie die lipolytischen Hormone und zwar durch eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels (Hirai et al., 1998). Die cAMP Konzentration in Adipozyten beeinflusst direkt die Höhe der Lipolyse. Der cAMP abhängige Mechanismus wird durch  $\beta 3$ -Rezeptoren vermittelt (Russell et al., 2004). Die Stimulation der Lipolyse durch LMF und ZAG steht in Verbindung mit der Aktivierung der Adenylatcyclase in der Plasmamembran der Adipozyten, die GTP abhängig ist.

Das Adenylatcyclasesystem besteht aus Rezeptoren, heterotrimeren G-Proteinen und Adenylatcyclasen. Eine große Zahl von Signalstoffen bedient sich des Adenylatcyclasesystems und der hormonabhängigen cAMP-Kaskade zur Signaltransduktion. Der extrazelluläre Botenstoff ZAG bindet an spezifische heptahelikale Rezeptoren. Dies führt über ein heterotrimeres G-Protein zu einer Aktivitätszunahme der Adenylatcyclase, die auf der Innenseite der Zellmembran lokalisiert ist und eine katalytische Funktion ausübt:  $\text{ATP} \rightarrow 3',5'\text{-cyclo-AMP (cAMP)} + \text{Pyrophosphat}$ . Es gibt Rezeptoren für stimulierende und hemmende Substanzen und G-Proteine, die stimulieren (Gs) oder inhibieren (Gi). Die G-Proteine, die in der ZAG Signalübertragung involviert sind, sind aus der Gs- und der Gi-Familie. Sie binden das GTP bzw. GDP, sind membranständig und befinden sich auf der Zytosolseite. Sie stimulieren und inhibieren also jeweils die Adenylatcyclase (Levitzki, 1987). Die Plasmamembran der Adipozyten enthält zwei Gs alpha-Untereinheiten und zwei Gi alpha-Untereinheiten, aber keine Go (Hinsch et al., 1988). Bindet ZAG also an den entsprechenden Rezeptor, so wird das Signal an das jeweilige G-Protein, das seinerseits stimuliert bzw. inhibiert, weitergeleitet. Das heißt, es wird die für den stimulierenden Effekt wichtige Untereinheit Gs  $\alpha$  freigesetzt. Diese bindet ein GTP. Die Untereinheiten (UE) Gs  $\alpha$  und Gi  $\alpha$  verfügen über eine intrinsische GTPase-Aktivität. Das Adenylatcyclasesystem wird so aktiviert, d.h. es kommt zur vermehrten Bildung von cAMP. Hierzu ähnlich ist die Informationsübertragung durch inhibitorische Substanzen. Die Bindung erfolgt an einem inhibitorischen Rezeptor, die Dissoziation eines Gi-Proteins aus drei UE folgt. Bindet die inhibitorische  $\alpha$  Untereinheit GTP, wird die Adenylatcyclase in ihre inaktive Form übergeführt und die cAMP-Produktion gehemmt. Es wurde eine ganze Familie unterschiedlicher Adenylatcyclasen nachgewiesen, die durch die  $\alpha$ -UE stimulierender G-Proteine aktiviert werden können. Sie zeichnen sich alle durch einen ähnlichen Aufbau aus

insgesamt 12 Transmembranproteinen aus. Sie haben eine große cytoplasmatische Schleife zwischen der 6. und 7. Domäne, die für die Wechselwirkung mit dem G-Protein verantwortlich ist. Das cAMP seinerseits aktiviert die Proteinkinase A und löst damit spezifische Phosphorylierungskaskaden aus. Erhöhte zelluläre cAMP-Spiegel aktivieren bzw. deaktivieren Stoffwechsellzyme und lösen die Transkription spezifischer Gene aus. Eine große Zahl an Stimuli kontrollieren die Expression des G-Proteins im Fettgewebe. Patienten mit einem Mangel an Gs sind adipös und zeigen eine reduzierte lipolytische Antwort auf Adrenalin (Carel et al., 1999). Islam-Ali et al. (2001) konnten in ihrer Studie eine Veränderung des G-Proteins in Adipozyten bei Patienten mit Tumorkachexie feststellen. Die Änderungen bestehen in einer Reduktion der Gi  $\alpha$ -UE Expression zusammen mit einer Steigerung der Gs  $\alpha$ -UE Expression. Ähnliche Änderungen wurden auch bei Mäusen beobachtet, denen ZAG (LMF) verabreicht wurde. Dies zeigt, dass die beobachteten Änderungen der G-Protein Expression ein direkter Effekt des ZAG (LMF) ist. Tumore, die den ZAG (LMF) sezernieren, maximieren den Fettgewebeskatabolismus durch eine ständige Produktion dieses Stimulus der Lipolyse zusammen mit einer Steigerung von Gs  $\alpha$  /Gi  $\alpha$  und der hormon-sensitiven Lipase (HSL). Die Erhöhung des cAMP durch ZAG (LMF) führt zu einer Aktivierung der HSL, die die Fettzellen für weitere Stimuli sensibilisiert.

### **2.3.5 ZAG-Rezeptoren**

Der Rezeptor für die Interaktion zwischen dem LMF beziehungsweise ZAG und dem Adenylatcyclasesystem wurde bisher nicht charakterisiert, aber es gibt indirekte Hinweise, dass zumindest bei Mäusen eine Stimulation über den  $\beta$ 3-Adrenorezeptor ( $\beta$ 3-AR) und über Dexamethason stattfindet (Bing et al., 2003).

Wie bereits erwähnt, nehmen Mäuse, die mit ZAG (LMF) behandelt wurden, im interscapulären braunen Fettgewebe vermehrt Sauerstoff auf. Pharmakologische Studien weisen darauf hin, dass der  $\beta$ -Rezeptor, der für die Stimulation des Sauerstoffverbrauchs im braunen Fettgewebe verantwortlich ist, ausschließlich ein  $\beta$ 3-Subtyp ist (Howe, 1993).

Neben den klassischen  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2- Adrenorezeptoren wurde dieser dritte Subtyp, der  $\beta$ 3-AR, identifiziert. Dieser ist nur in 40-50% in seiner Aminosäuresequenz mit  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-AR identisch. Diese  $\beta$ 3-Adrenorezeptoren vermitteln die Lipolyse im

weißen Fettgewebe bei Mäusen und Ratten (Arch et al., 1984; Arch & Wilson, 1996) und die Thermogenese im braunen Fettgewebe (Arch, 1989). Auch sind sie für die unerwarteten negativ inotropen Effekte der Katecholamine im Herz verantwortlich (Gauthier et al., 1996). ZAG (LMF) stimuliert die Lipolyse über das Adenylatcyclasesystem. Russell et al. (2002) konnten in ihrer Studie zeigen, dass ZAG (LMF) diese Transduktion über einen  $\beta$ 3-AR ausübt. Obgleich es scheint, dass seine Affinität zu diesem Rezeptor geringer ist als bei klassischen  $\beta$ 3-AR Agonisten (Russell et al., 2002).

Die durch ZAG (LMF) induzierte Lipolyse in Adipozyten des Nebenhodens wurde durch den  $\beta$ -Adrenorezeptorblocker Propranolol abgeschwächt (Khan & Tisdale, 1999). Die biphasische Wirkung von GTP auf die cAMP Produktion, hervorgerufen durch ZAG (LMF), deutet auf einen Rezeptor hin, der in Verbindung mit beiden G-Proteinen, Gs und Gi, steht. Nur  $\beta$ 3, aber nicht  $\beta$ 1-AR interagiert mit dem Gi-Protein der Plasmamembran (Granneman, 1995). In weißen Adipozyten war die Induktion der Lipolyse und die Stimulation der Adenylatcyclase durch einen  $\beta$ 3-AR Antagonist abgeschwächt (Nisoli et al., 1996).

Der Ruheenergieumsatz ist bei Lungen- (Fredrix et al., 1990) und Bauchspeicheldrüsen- (Falconer et al., 1994) Krebspatienten deutlich erhöht. Auch besteht ein Zusammenhang mit erhöhten Herzfrequenzwerten (Hyltander et al., 1990). Diese Patienten reagieren auf eine Adrenalininfusion mit einer gesteigerten kardiovaskulären und metabolischen Antwort (Drott et al., 1987), während die Verabreichung des nicht-spezifischen  $\beta$ -Rezeptorblockers Propranolol ein Rückgang des Grundumsatzes hervorruft (Gambardella et al., 1999). Diese Ergebnisse führen zu der Hypothese, dass das sympathische Nervensystem bei Krebspatienten überaktiv ist und eine Rolle in der Regulation der ZAG Expression spielt.

Noradrenalin und Adrenalin binden u. a. an  $\beta$ 3-Adrenozeptoren in verschiedenen Geweben. Sie erhöhen die Wärmeproduktion dadurch, dass sie über cAMP und die Proteinkinase akut die Lipolyse und UCP-1 aktivieren. UCP-1 ist ein H<sup>+</sup>-Uniport-Carrier, der den H<sup>+</sup>-Gradienten über die innere Mitochondrienmembran kurzschließt und somit die (wärmeproduzierende) Atmungskette von der ATP-Produktion entkoppelt. Chronisch bewirkt die adrenerge Stimulation die Transkription des UCP-

1-Gens, die Bildung von Mitochondrien, eine Hyperplasie des braunen Fettgewebes und die Rekrutierung brauner Fettzellen innerhalb des weißen Fettgewebes.

### **2.3.6 ZAG-Regulation**

Die genaue Regulation der ZAG Produktion im weißen Fettgewebe ist noch unbekannt. Verschiedene Faktoren beeinflussen die Expression des ZAG Gens in menschlichen Adipozyten. Die Regulation der ZAG Expression wird möglicherweise teilweise durch Rosiglitazon, ein selektiver PPAR $\gamma$  Agonist und vor allem durch den TNF- $\alpha$  reguliert (Bao et al., 2005). Das sympathische Nervensystem könnte auch eine Rolle spielen in der Regulation der ZAG Expression und zwar über  $\beta$ 3-Adrenorezeptoren, obgleich Noradrenalin keine Auswirkung auf die Expression zeigte (Bao et al., 2005). Unter Einfluss von Dexamethason konnte ein geringer Anstieg der ZAG mRNA beobachtet werden. Dexamethason und  $\beta$ 3-Adrenorezeptoragonisten wirken stimulierend (Bao et al., 2005).

Rosiglitazon induziert einen dreifachen Anstieg der ZAG mRNA Menge. Der PPAR $\gamma$  scheint somit an der Regulation der ZAG Synthese involviert zu sein.

Den größten Effekt auf die ZAG Synthese hatten Bao et al. (2005) mit dem pro-inflammatorischen Zytokin TNF- $\alpha$ . Es führt zu einem dosis abhängigen Abfall der ZAG mRNA Spiegel. Mit der höchsten Dosis erreichten sie eine vierfache Reduktion. TNF- $\alpha$  wird auch als ein Kachexiemediator betrachtet, er stimuliert die Lipolyse in menschlichen Adipozyten (Kawakami et al., 1987). Unter Annahme der Tatsache, dass ZAG ein Fett-mobilisierender Faktor ist, TNF- $\alpha$  die ZAG Expression in Adipozyten hemmt, haben die zwei Mediatoren der Kachexie verschiedene Effekte auf den Fettstoffwechsel im Fettgewebe.

Patienten mit einer Tumorkachexie haben gegenüber Tumorpatienten ohne Kachexie erhöhte Serumspiegel an Glucocorticoiden (Knapp et al., 1991). Die Cortisol-Konzentration im Serum steigt parallel zum Gewichtsverlust. Diese Hormone können die Proteolyse der Muskulatur (Wing & Goldberg, 1993) und die Lipolyse des Fettgewebes stimulieren (Lacase et al., 1988). Sie gelten somit als mögliche Mediatoren in der Entstehung der Tumorkachexie. Diese Annahme findet keine weitere Berücksichtigung, da der Verlust an Körpergewebe bei Mäusen mit Sarkom nicht durch eine Entfernung der Nebenniere verhindert werden konnte (Svaninger et al., 1987). Die Gabe eines Glucocorticoidrezeptorantagonisten hatte keinen Effekt

auf die Entwicklung einer Kachexie bei Ratten mit Hepatom (Llovera et al., 1996). Doch ist nicht klar, weshalb der Verlauf einer Kachexie nicht im Zusammenhang mit den Glucocorticoiden steht. Bei Mäusen mit Tumorkachexie wurden erhöhte Serumwerte festgestellt. Man konnte zeigen, dass Dexamethason die ZAG Expression in Brustkrebszellen stark induziert (Lopez-Boado et al., 1994). Dies lässt vermuten, dass erhöhte Glucocorticoidspiegel während der Entwicklung einer Kachexie für die steigende ZAG Expression im Fettgewebe verantwortlich sind (Russell & Tisdale, 2002). Man konnte beobachten, dass Dexamethason zu einem Gewichts- und Fettverlust bei Ratten und zu einer Zunahme der Katecholamin-induzierten Lipolyse führt (Pedersen et al., 2003). Russell und Tisdale (2002) konnten zeigen, dass Dexamethason die Lipolyse in isolierten Adipozyten stimuliert und dass dies im Zusammenhang mit einer gesteigerten ZAG Expression in den Zellen und im Medium steht. Dexamethason stimuliert die Adenylatcyclase und die GTP Antwort in der Adipozytenmembran (Lacasa et al., 1988).

Die durch Glucocorticoide erhöhte ZAG Expression im weißen und braunen Fettgewebe führt zur Lipolyse (Russell ST & Tisdale MJ, 2005).

Der Mechanismus, wie die Glucocorticoide die ZAG Expression stimulieren, scheint komplex zu sein, da die Expression in der Zelle und im Medium durch einen  $\beta$ 3-AR Antagonist und durch einen Anti-ZAG Antikörper als auch durch einen Glucocorticoidantagonist abgeschwächt wurde. Dies deutet darauf hin, dass die Hochregulation von ZAG bei Kachexie auf einen erhöhten Spiegel an zirkulierenden Glucocorticoiden zurückzuführen ist (Knapp et al., 1991).

Ein weiterer potentieller Mediator für die steigende ZAG Expression ist Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Dieser soll die Expression in menschlichen Epithelzellen stark hochregulieren (Brysk et al., 1997). Es wird vermutet, dass er für die Entwicklung der Kachexie bei Lungentumoren verantwortlich ist (Matthys et al., 1991b). Doch wird nicht davon ausgegangen, dass die Kachexie bei Mäusen mit einem MAC16 Tumor durch Zytokine vermittelt wird (Mulligan et al, 1992) und dass eine Anorexieentwicklung mit IFN- $\gamma$  assoziiert ist (Matthys et al., 1991a).

## **2.4 Fragestellung**

In der vorliegenden Arbeit lag der Schwerpunkt auf der Untersuchung, inwieweit sich die Expression von ZAG im Fettgewebe von Patienten mit Tumorerkrankungen im Vergleich zu gesunden Probanden unterscheidet. Desweiteren wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen ZAG-Expression (auf RNA Ebene) und Tumorkachexie besteht. Ebenso interessierte eine Assoziation zwischen ZAG-Expression und Alter, Tumorstadium, Fettzellgröße und BMI. Ausserdem wurde untersucht, ob Zusammenhänge zwischen der ZAG-Expression und dem Vorliegen einer Hypertonie oder eines Diabetes mellitus sowie der Serumkonzentration von CRP, Kreatinin, GOT, GPT, Natrium, Kalium und Calcium bestehen.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Expression von ZAG im Fettgewebe von Tumorpatienten**

Um Unterschiede in der ZAG-Expression von Tumorpatienten und Nichttumorpatienten zu analysieren, wurde der mRNA-Gehalt der jeweiligen Fettgewebeproben mit der quantitativen RT-PCR gemessen.

### **3.2 Klinische Charakteristika der Tumorpatienten und der Kontrollgruppe**

Insgesamt wurden 97 Fettgewebeproben von 89 Patienten für die Studie verwendet. 22 Studienteilnehmer litten an einer gastrointestinalen Tumorerkrankung. Darunter fielen Magen-, Colon- oder Rectum-Karzinome. 67 Patienten hatten keine Tumorerkrankung, diese dienten als Kontrollgruppe.

Die Patienten der Kontrollgruppe unterzogen sich elektiven plastisch-chirurgischen oder abdominalchirurgischen Eingriffen. Die Fettgewebeproben wurden während dieser Eingriffe entnommen.

Die Studie wurde mit Zustimmung der Ethikkommission durchgeführt. Die Patienten hatten zuvor ihr Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie gegeben.

Es lagen mir von fast allen Patienten folgende Daten vor: Alter, Geschlecht, Herkunftsort des Fettgewebes (subkutan, omental), BMI und mittlere Fettzellgröße. Bei insgesamt acht Patienten wurde Fettgewebe sowohl subkutan als auch omental entnommen.

Für weitere Korrelationsanalysen wurden von 47 der oben genannten Patienten weitere klinische Daten aus den Krankenakten erhoben. Von diesen litten 17 Patienten litten an einem gastrointestinalen Tumor, 30 hatten keine maligne Grunderkrankung. Die gesammelten Daten umfassten zusätzlich Tumorstadium, Vorliegen einer Hypertonie und/oder Diabetes mellitus und Serumwerte von CRP, Kreatinin, GOT, GPT, Natrium, Kalium und Calcium.

Charakteristika der Studienpopulation sind in Tabelle 4 wiedergegeben. Berechnet wurden Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Range.

<b>Parameter</b>	<b>Tumorpatienten</b> (n=22)	<b>Kontrollgruppe</b> (n=67)
<b>Alter (Jahre)</b>		
MW+/-SD	67,6 +/- 9,1	52,8 +/-16,6
Range	49-81	24-84
<b>Größe (cm)</b>		
MW+/-SD	169,7 +/-8,1	170,6 +/-9,1
Range	150-180	149-190
<b>Gewicht (kg)</b>		
MW+/-SD	77,9 +/-14,8	80,3 +/-20,3
Range	40-118	33,5-170
<b>BMI (Körpergewicht [kg]/ Körperoberfläche [m<sup>2</sup>])</b>		
MW+/-SD	26,7 +/-3,8	27,7 +/-7,3
Range	17,7-36,4	13,8-66,4
<b>Geschlecht</b>		
(weiblich/männlich/n.b.)	9/12/1	35/29/3
Prozentual	41,0%/54,5%/4,5%	52%/43,3%/4,5%

*Tabelle 4: Charakterisierung der Gesamtgruppe der Tumorpatienten und der Kontrollgruppe*

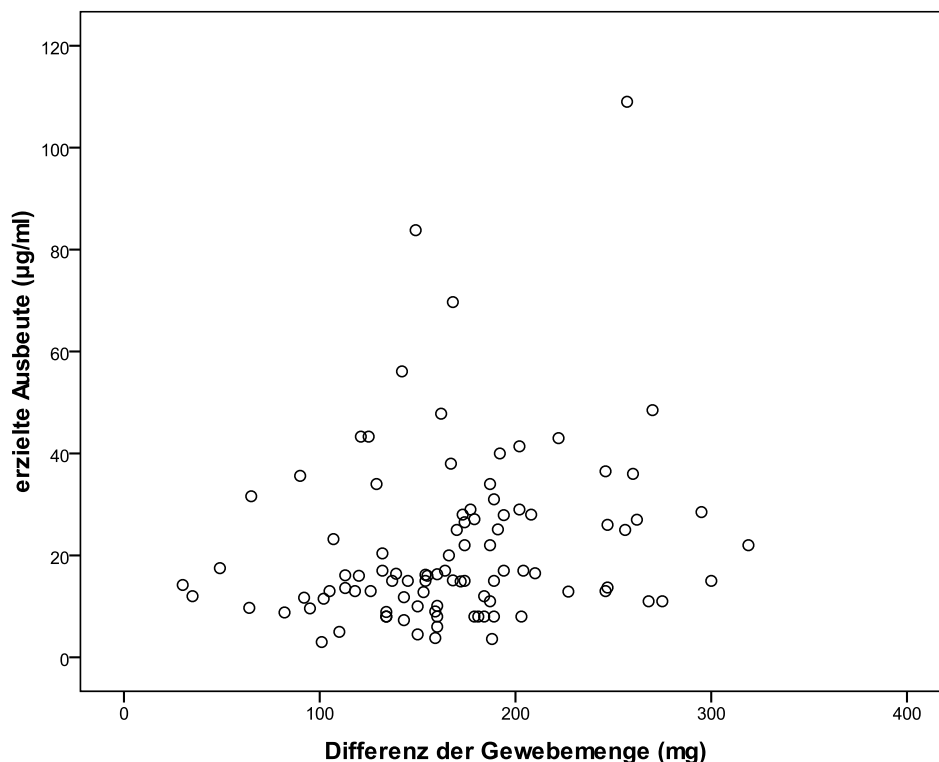


Mittelwert mit Standardabweichung sowie Range von Alter, Größe, Gewicht und BMI der Tumorpatienten im Vergleich zu den Nichttumorpatienten und jeweils Anzahl weiblicher und männlicher Spender sind aufgelistet. In die Gruppe der Tumorpatienten fallen 22 Patienten, die Kontrollgruppe besteht aus 67 Personen.

Wie aus der Tabelle 4 ersichtlich, waren beide Gruppen in Bezug auf die Geschlechterverteilung miteinander vergleichbar. Lediglich das Durchschnittsalter war in der Gruppe der Tumorpatienten im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant höher (67,6 vs. 52,8 Jahre,  $p < 0.001$ ). Körpergröße, Körpergewicht und BMI waren in Tumorpatienten- und Kontrollgruppe ähnlich.

### 3.3 Ausreichende Isolierung von RNA aus menschlichem Fettgewebe

Aus 100-200 mg der Fettgewebeproben wurde die Gesamt-RNA nach einer Modifikation der Methode von Chomcynski und Sacchi (1987) isoliert (s. 5.1.1). Auf diese Weise konnten durchschnittlich  $19,9 \pm 16,4 \mu\text{g RNA/ml}$  Gewebe mit gemessenen E 260/280-Quotient von 1,72 bis 2,47 gewonnen werden. Die isolierte Gesamt-RNA wurde photometrisch quantifiziert. Die RNA-Konzentration wurde bei einer Absorption von 260 nm bestimmt.



*Abbildung 2: Eingesetzte Fettgewebemenge. Signifikante Korrelation zwischen der eingesetzten Gewebemenge (in mg) und der erzielten Ausbeute (in µg/ml) ( $p=0,01$  bzw.  $p<0,05$ )*

In Abbildung 2 ist zu sehen, dass die Korrelation zwischen der eingesetzten Gewebemenge (mg) und der erzielten Ausbeute (µg/ml) signifikant ist ( $p=0,01$  bzw.  $p<0,05$ ). Hier muss der Spearman-Koeffizient verwendet werden, da aufgrund der Einschränkungen (beide Werte größer 0) keine Normalverteilung angenommen werden kann.

### **3.4 ZAG wird im menschlichen Fettgewebe exprimiert**

Je 1 µg Gesamt-RNA wurde unter Verwendung von Random- und Oligo-d(T)-Primern revers transkribiert in cDNA (s. 5.1.3.). In der anschließenden Real Time Quantitativen PCR (RT-PCR) (s. 5.1.4.) wurden Aliquots der cDNA in einen Reaktionsansatz überführt, der spezifische Primer enthielt. Neben dem zu analysierenden Transkript wurde als interner Standard die cDNA der GAPDH amplifiziert, der in den Zellen des Fettgewebes gleich bleibend exprimiert wird. Jede Reaktion wurde dreifach durchgeführt und daraus der Ct Mittelwert jeder Probe für die Datenanalyse verwendet. Der ZAG mRNA Gehalt wurde zu den GAPDH Werten normalisiert und die Ergebnisse wurden prozentual zu einer Kontrolle berechnet. Hierzu wurde die Cycle Threshold  $2^{(\Delta\Delta C_t)}$  Methode verwendet (Livak & Schmittgen 2001) mit GAPDH als Referenzgen. Somit konnten die relative mRNA Menge quantifiziert werden.

### **3.5 Charakterisierung der Real time quantitativen PCR**

Die Real time quantitative PCR (RT-PCR) wurde zum Nachweis der Expressionsaktivität von ZAG durchgeführt. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Die Quantifizierung erfolgt in der exponentiellen Phase der PCR. Die Real-time PCR zeigt relative quantitative Unterschiede in der ZAG Genexpression bezogen auf einen internen Standard. Die Quantifizierung der PCR erfolgt durch die Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem Threshold Cycle oder CT-Wert. Der CT-Wert

ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Die Ergebnisse wurden in Prozent mit der Cycle Threshold  $2^{(\Delta\Delta C_t)}$  (Livak & Schmittgen 2001) mit GAPDH als Referenzgen berechnet.

### 3.6 Auswertungen zur ZAG mRNA-Expression

Die Abbildung 3 zeigt die mittleren ZAG mRNA-Spiegel (bezogen auf die GAPDH-Signale) im Fettgewebe der Tumorpatienten und der Kontrollgruppe. Es ist ersichtlich, dass die ZAG-Expression bei den Tumorpatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht gesteigert war ( $p>0,05$ ).

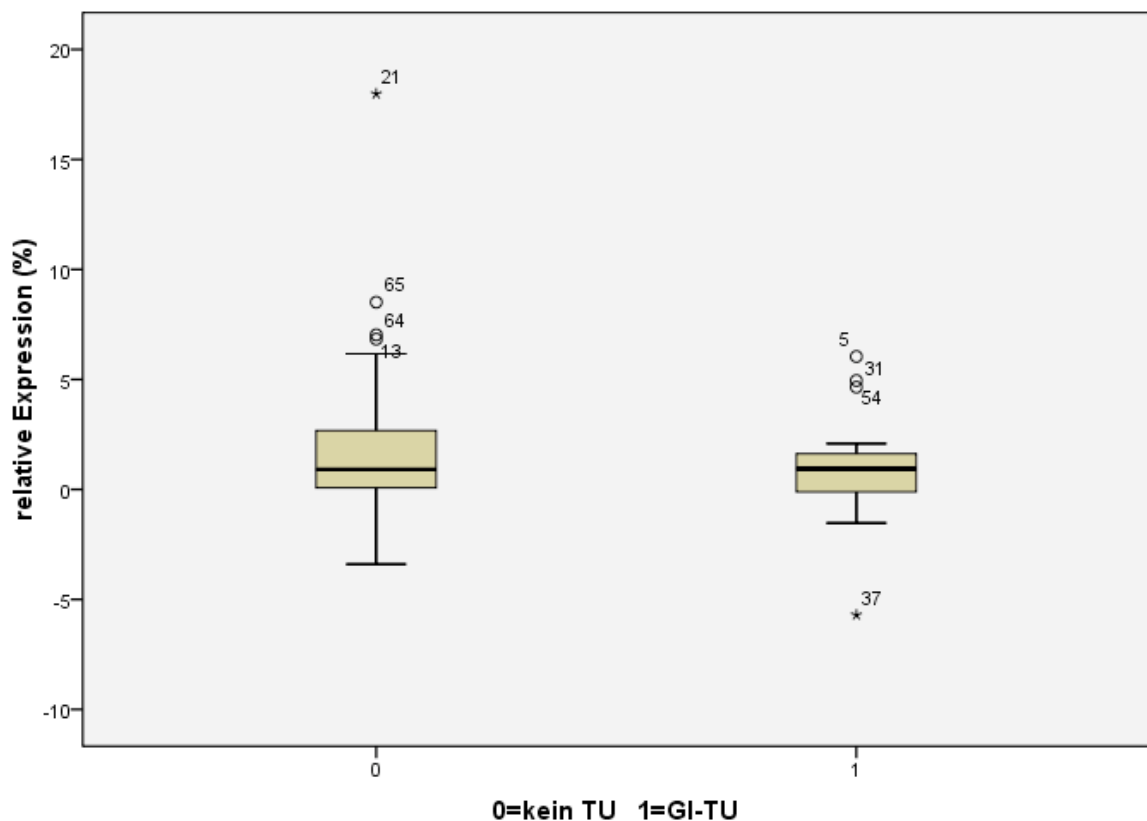


Abbildung 3: Expressionsraten von ZAG im Fettgewebe. Kontrollgruppe (0, n=69) und Tumorpatienten (1, n=26)

Gezeigt sind in Abbildung 4 die Mittelwerte und Standardfehler der relativen Expression, d.h. die ZAG-Expression bezogen auf die GAPDH-Expression im omentalen und subkutanen Fettgewebe.

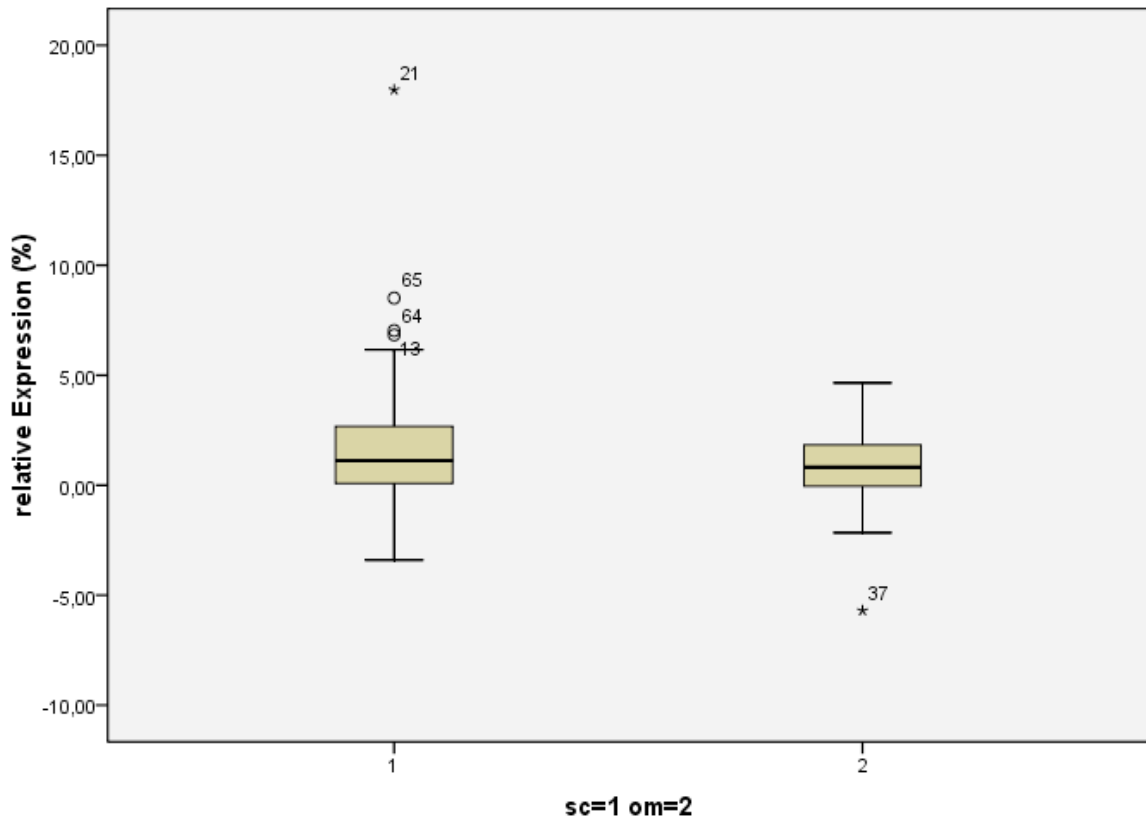


Abbildung 4: Vergleich des ZAG-Expressionsniveau im subkutanen und omentalen Fettgewebe. Gezeigt sind MW und SD der relativen ZAG-Expression, (sc=1, n=66; om=2, n=31)

Die Proben wurden desweiteren hinsichtlich der relativen Expression der mRNA-Werte untersucht. Es scheint, dass die mittleren mRNA-Werte im subcutanem Fettgewebe im Vergleich zu derer des omentalen Fettgewebes leicht erhöht sind. Dieser Unterschied ist mit  $p=0,094$  jedoch nicht signifikant.

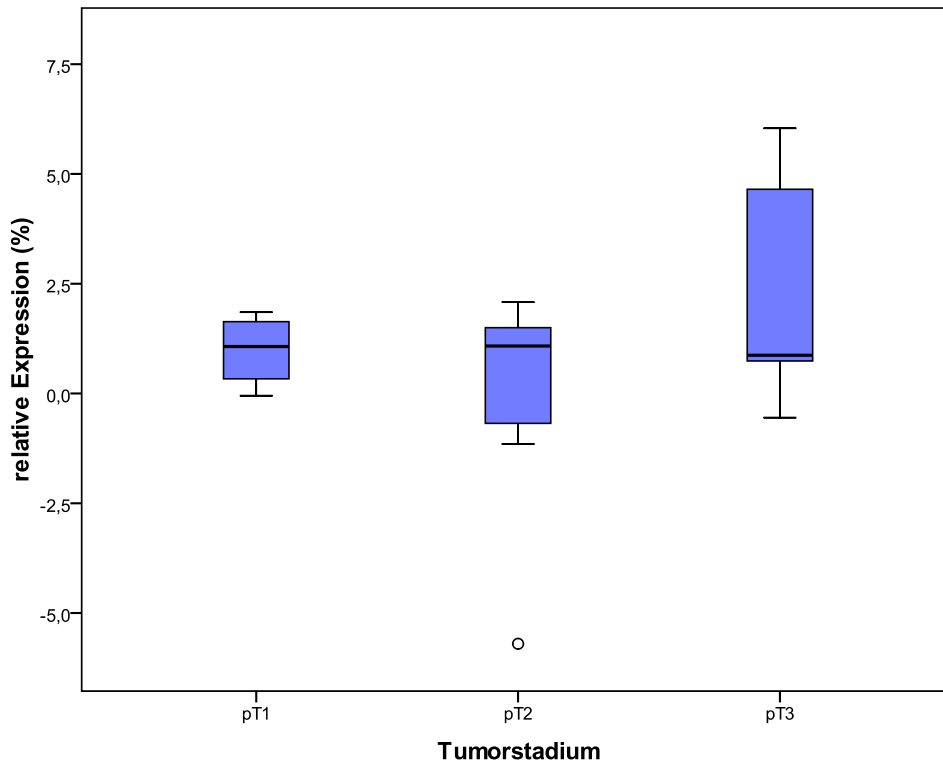


Abbildung 5: ZAG-Expression bei verschiedenen Tumorstadien (pT1, pT2, pT3). In den Box-and-Whisker-Plots sind MW und SD der relativen ZAG-Expression dargestellt. ( $n(pT1)=2$ ,  $n(pT2)=9$ ,  $n(pT3)=9$ )

Weiterhin wurde die ZAG-Expression im Fettgewebe von Patienten mit gastrointestinalen Tumoren in unterschiedlichen TNM-Stadien untersucht. Wie aus Abbildung 5 hervorgeht unterscheiden sich die Werte für die Expression des ZAGs zwischen den verschiedenen Tumorstadien nicht signifikant ( $p>0,05$ ). Jedoch war die Fallzahl ( $n=22$ ) gering. Bei den 22 Patienten mit GI-Tumoren fanden sich bei 2 Patienten pT1, bei 9 pT2 und bei 9 pT3 Tumorstadien.

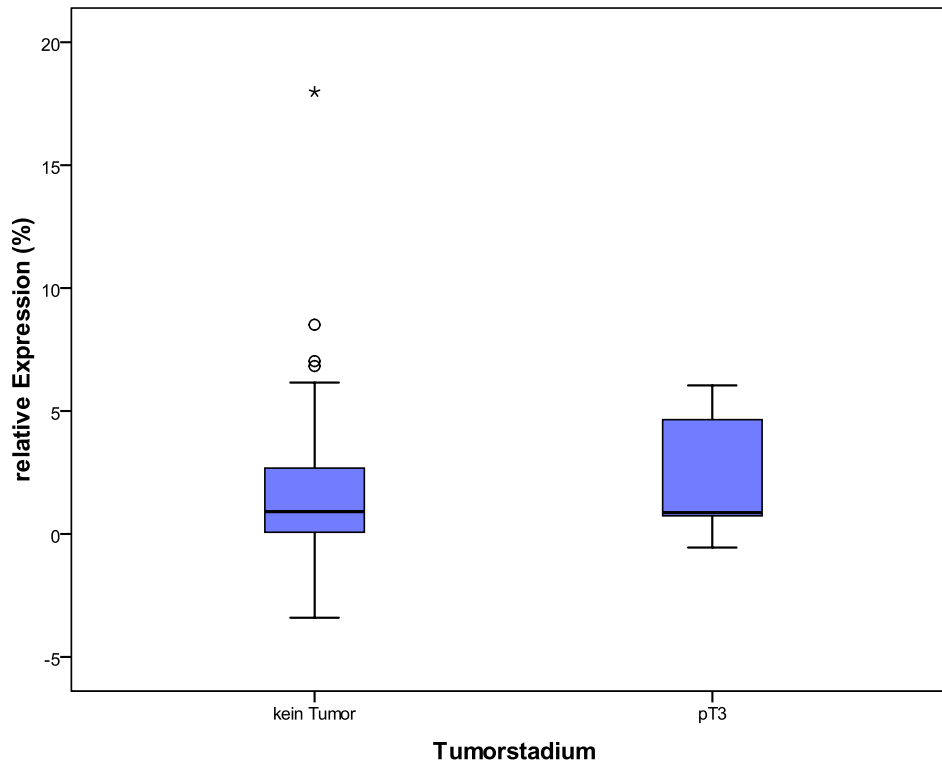


Abbildung 6: Auftragung des ZAG-Expressionsniveaus der Kontrollgruppe und der Patienten mit Tumorstadium pT3. Dargestellt sind MW und SD der relativen ZAG-Expression. ( $n(\text{kein Tumor})=69$ ,  $n(\text{pT3})=9$ )

Desweiteren wurde die ZAG-Expression im Fettgewebe von Patienten mit Tumorstadium pT3 im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Tumorerkrankung gegenübergestellt. Wie in Abbildung 6 zu sehen ist unterscheiden sich die Werte für die Expression des ZAGs nicht signifikant ( $p>0,05$ ).

### 3.7 Korrelationsanalysen

Um den Zusammenhang zwischen der ZAG-Expression und den klinischen Parametern zu beschreiben, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt. Diese erbrachten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der ZAG-Expressionshöhe mit dem Vorliegen eines Diabetes ( $p>0,05$ ) oder einer Hypertonie ( $p>0,05$ ). Auch bei den Serumwerten der Elektrolyte (Natrium, Kalium, Calcium), des CRP, des Kreatinins und der Leberenzyme (GOT, GPT) zeigte sich keine Korrelation zur ZAG-Expression.

Die weitere statistische Betrachtung der gebildeten Gruppen auf der Mittelwert-Ebene führte nicht zu signifikanten Resultaten mit Ausnahme der Prüfgröße „BMI“ und „Gewicht“ ( $p < 0,05$ ). Hierbei ist zu bemerken, dass die Stichprobenanzahl sehr niedrig war ( $n \geq 23$ ).

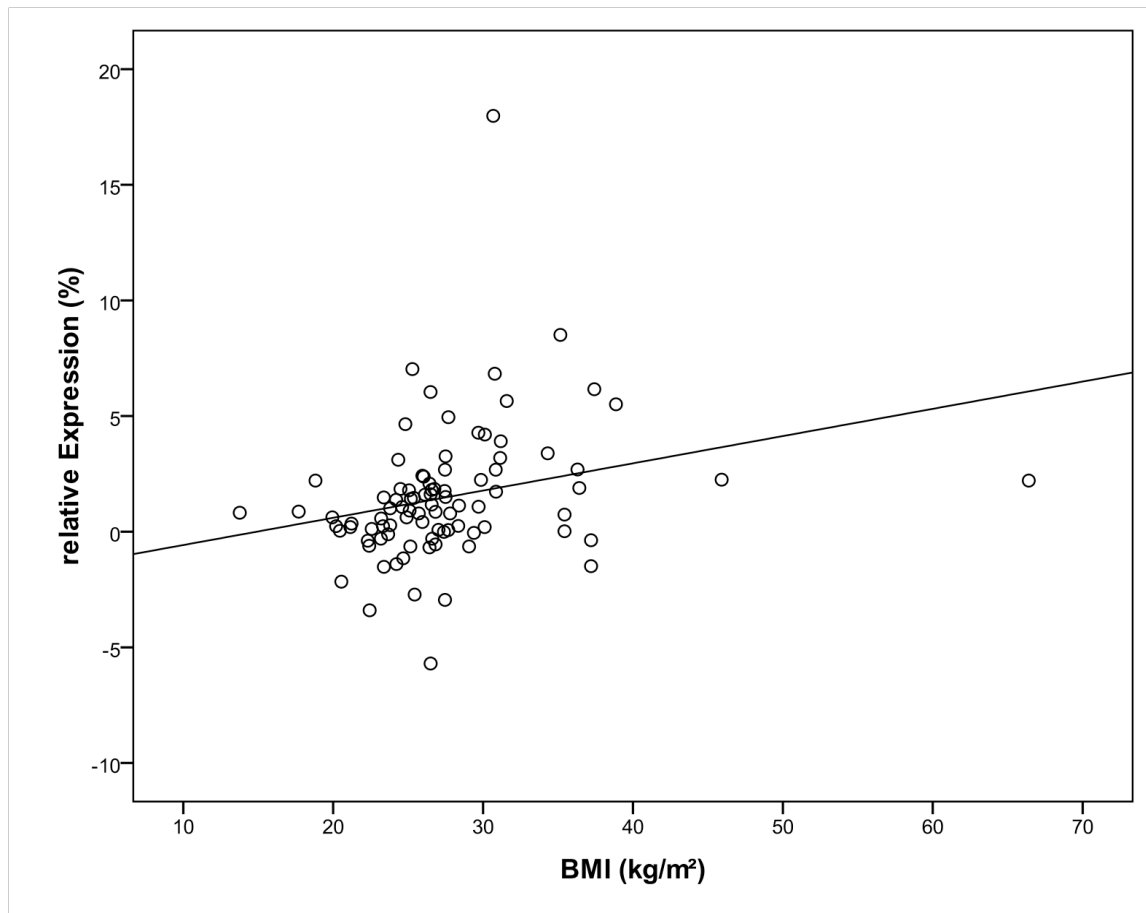


Abbildung 7: Zusammenhang von BMI und ZAG-Expression. Punktwolke mit Regressionsgerade; ein positiver Zusammenhang zwischen BMI und der ZAG-Expressionsrate ist dargestellt. ( $n=90$ )

Die Punktwolke in Abbildung 7 belegt einen Anstieg der ZAG-Expression mit zunehmenden BMI. Eine positive signifikante Korrelation konnte zwischen dem BMI und der ZAG-Expression festgestellt werden. Der Rangkorrelationskoeffizient  $r$  beträgt 0,4 ( $p < 0,05$ ). Der BMI hat somit den größten Einfluss auf die ZAG-Expression. Es besteht eine moderate Korrelation.

## Untersuchung zur ZAG-Expression im Fettgewebe von Tumorpatienten

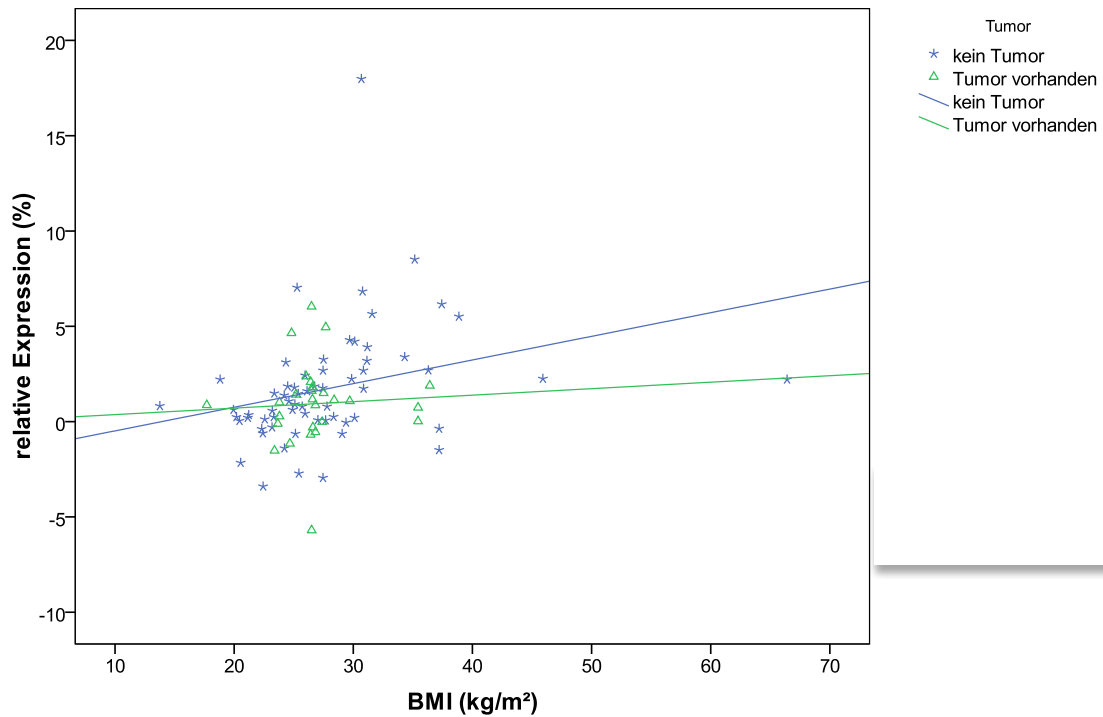


Abbildung 8: Zusammenhang zwischen BMI und Tumorpatienten sowie zwischen BMI und Kontrollgruppe. Die Untergruppen sind im Streudiagramm farblich markiert und mit Regressionsgeraden. ( $n(\text{Tumorpatienten})=26$ ,  $n(\text{Kontrollgruppe})=69$ )

Der positive Zusammenhang zwischen der ZAG-Expression und dem BMI ist wie in Abbildung 8 zu sehen ist, in der Kontrollgruppe stärker ausgeprägt als in der Gruppe der Tumorerkrankten.



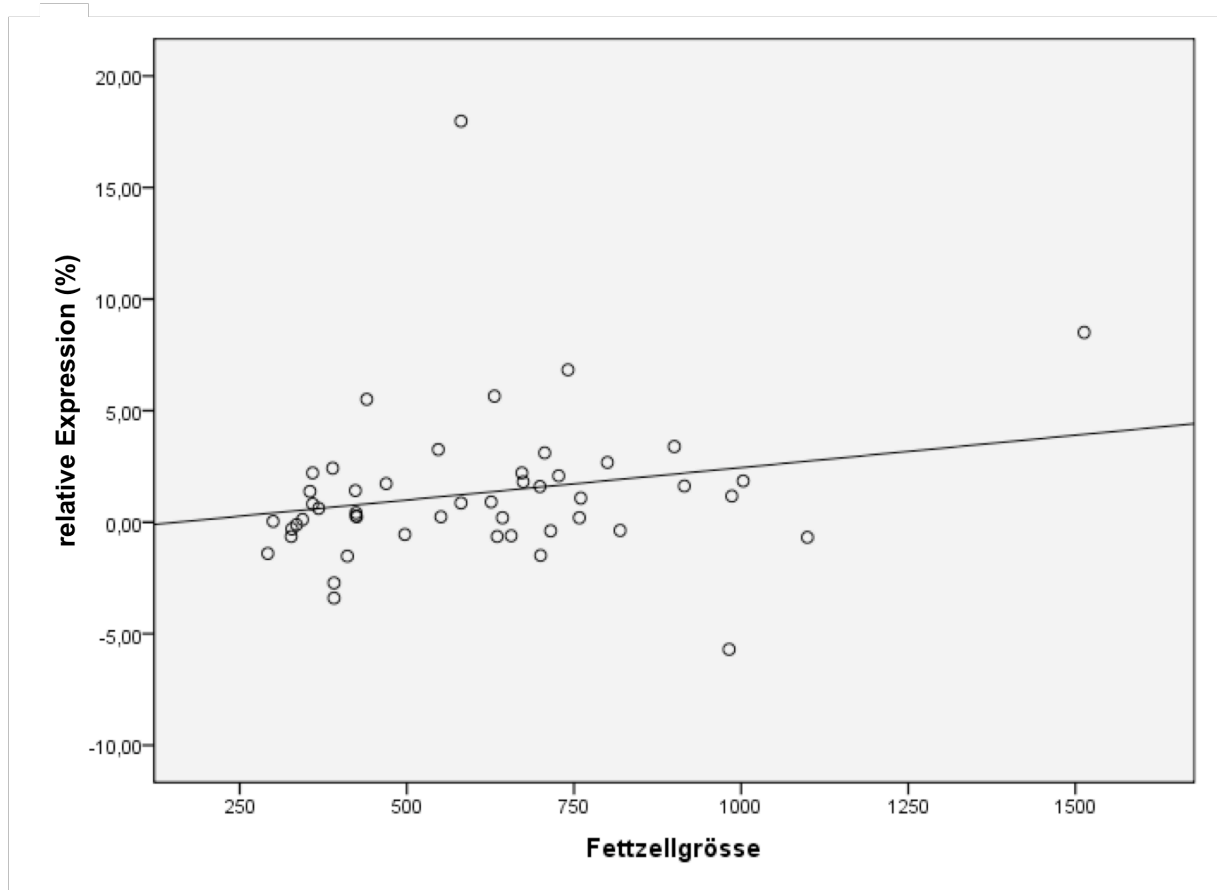


Abbildung 9: Zusammenhang zwischen Fettzellgröße und ZAG Expressionsniveau. Im Streudiagramm ist ein positiver Zusammenhang zwischen Fettzellgröße und ZAG Expressionsniveau dargestellt. (n=49)

Wie in Abbildung 9 ersichtlich kann ein tendenzieller Zusammenhang zwischen der ZAG-Expressionshöhe und der Fettzellgröße aufgrund der Stichprobe nachgewiesen werden ( $r=0,27$ ,  $p=0,065$ ).

<b>Expression</b>	<b>ZAG</b>
Alter (Jahre)	0,08
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	<b>0,4</b>
Fettzellgröße (pl)	<b>0,27</b>
Gewicht (kg)	<b>0,33</b>

*Tabelle 5: Korrelationsanalyse der Expressionsdaten mit klinischen Parametern. Aufgelistet sind die Korrelationskoeffizienten (r) der zusammengefassten Gruppen „Tumor“ und „Nichttumor“. Korrelationskoeffizienten  $> \pm 0,2$  für positive/negative Zusammenhänge sind der Tabelle fettgedruckt.*

In Tabelle 5 sind Korrelationskoeffizienten dargestellt, die aus dem Vergleich der ZAG-Expressionsraten mit ausgewählten klinischen Parametern ermittelt wurden. Ein Zusammenhang zu dem Parameter „Alter“ konnte nicht hergestellt werden. Wie anhand der Abbildungen 7 bis 9 bereits vermutet werden konnte, zeigten die Expressionsraten signifikante Korrelationen mit den Parametern „BMI“, „Gewicht“ und „Fettzellgröße“.

Zur Analyse der ZAG-Expression im subkutanen und omentalen Fettgewebe wurden Verbundene Tests durchgeführt. Von acht der Patienten lag sowohl Fettgewebe subkutaner als auch omentaler Herkunft vor. Es zeigte sich in Bezug auf die ZAG-Expression kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ,  $p = 0,575$ ), wobei beachtet werden muss, dass die Fallzahl sehr gering war ( $n = 8$ ). Auf die Korrelationsanalyse von ZAG und Fettzellgröße dieser Patientengruppe wurde verzichtet, da aufgrund der geringen Fallzahl ( $n = 5$ ) keine Analyse möglich war.

Bei den gematchten Daten zeigte sich bezüglich der ZAG-Expressionshöhe kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen, Tumor- und Nicht-Tumorpatienten. Einem Tumorpatienten wurde jeweils ein Nicht-Tumorpatient mit gleichem Geschlecht und Gewebeherkunftsort (sc, om), ähnlichem Alter und BMI gegenübergestellt.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Gruppenzusammensetzung**

Von den 89 in die Studie eingeschlossenen Patienten litten 22 an einem Tumor des Gastrointestinaltraktes und bildeten die Patientengruppe (TP). Die Kontrollgruppe (KG) setzte sich aus 67 Patienten zusammen, die sich elektiven plastisch-chirurgischen oder abdominal-chirurgischen Operationen unterzogen hatten. Von beiden Gruppen lagen entweder subkutanes und/oder omentales Fettgewebe als Ausgangsmaterial vor, aus dem zunächst die mRNA isoliert und dann mittels sqPCR der ZAG mRNA-Gehalt ermittelt wurde.

Hinsichtlich der Geschlechterverteilung waren Tumorpatienten- und Kontrollgruppe ähnlich. Im Bezug auf das Alter unterschieden sie sich signifikant. Das mittlere Alter betrug  $67,64 \pm 9,1$  Jahre (TP) vs.  $52,82 \pm 16,57$  Jahre (KG),  $p < 0.001$ .

### **4.2 Diskussion der Untersuchungen zur Expression von ZAG im menschlichen Fettgewebe**

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals untersucht, inwieweit die Expression von ZAG mRNA im menschlichen, weißen Fettgewebe von Patienten mit gastrointestinalen Tumoren im Vergleich zu Probanden ohne Tumorerkrankung verändert ist.

Aus Untersuchungen von Bing et al. (2003) ging erstmals hervor, dass ZAG im braunen und weißen Fettgewebe von Mäusen exprimiert wird. Neben der Bestimmung der mRNA-Menge wurde in der zitierten Studie auch die Sekretion des ZAG-Proteins aufgezeigt.

Zum Nachweis der ZAG mRNA musste diese aus dem Fettgewebe präpariert werden. Im Durchschnitt wurden hierfür  $167,6 \pm 57,2$  mg der Fettgewebeprobe eingesetzt. In dieser Studie konnten wir zeigen, dass eine positive Korrelation zwischen eingesetzter Gewebemenge und der erzielten Ausbeute besteht.

Anschließend folgte die cDNA-Synthese in einem separaten Schritt. Zur verbesserten Ausbeute wurden für die cDNA-Synthese sowohl Random- als auch Oligo-d(T)-Primern verwendet. Diese Primerkombination ist optimal zur Erzeugung von Full-Length cDNA (first strand) oder langen Transkripten aus Gesamt-RNA und

benötigt nur geringe Gesamt-RNA als Ausgangsmaterial. Durch den Einsatz von Randomprimern, ein unspezifisches Gemisch von Zufallshexameren, ist die Transkriptionseffizienz höher, jedoch erhöht sich auch die Wahrscheinlichkeit unerwünschter Nebenprodukte in der anschließenden PCR. Es ergibt sich die Möglichkeit, mehrere PCR-Produkte in einem Reaktionsansatz zu amplifizieren. Da die cDNA-Synthese mit Random-Primer durchgeführt wurde, konnte die Quantifizierung der PCR-Produkte unabhängig von der Effizienz der reversen Transkription durch Bildung des jeweiligen GAPDH-Quotienten als relatives Maß für die Expression verwendet werden (Livak & Schmittgen, 2001).

Mit der anschließenden semi-quantitativen Real-Time-PCR konnten aus 1µg Gesamt-RNA quantifizierbare Signale erzeugt werden, die, zu einem internen Standard (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, GAPDH) ins Verhältnis gesetzt, ein Maß für die Höhe der mRNA-Expression darstellen. Die Real-Time-PCR besitzt eine hohe Spezifität und verlässliche Reproduzierbarkeit (Wang et al., 1999). In der semi-quantitativen Real-Time-PCR wurde mit spezifischen Primern cDNA-Fragmente des ZAG und des GAPDH amplifiziert und relativ quantifiziert. Zur Quantifizierung der ZAG-Expression wurde SYBR® Green, ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, verwendet, der nicht interkaliert im Gegensatz zu EtBr. Diese Anwendung ist relativ kostengünstig und sehr empfindlich. SYBR® Green hat jedoch den Nachteil, dass alle doppelsträngig vorliegende DNA nachgewiesen wird, unabhängig von der Sequenz des zu amplifizierenden PCR-Produktes. Aus diesem Grund ist das Design von spezifischen Primern eine absolute Voraussetzung. Von Vorteil sind dagegen die hohen Fluoreszenzsignale die beim Einbau der SYBR® Green Moleküle in die DNA erreicht werden und somit eine sichtbare Auswertung der Detektionskurve gewährleistet. Die Überprüfung der PCR-Produkte auf ihre Spezifität kann, wie in dieser Arbeit, zusätzlich durch eine Schmelzkurvenanalyse geschehen, womit die Qualität der erzeugten PCR-Produkte nachgewiesen wird. Zur Quantifizierung von GAPDH kam eine TaqMan® Sonde, eine Form der FRET-Sonde (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) zum Einsatz. Die Sonde wurde in dieser Arbeit an ihrem Ende mit dem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff FAM markiert. Dies ist eine Methode der spezifischen Realtime-Detektion der PCR-Produkte, da die Sonden sequenzspezifisch an das gesuchte PCR-Produkt hybridisieren. Sie haben somit eine hohe Selektivität, jedoch sind sie weniger sensitiv im Vergleich zu SYBR®

Green. Die ermittelten Ct-Werte ergeben dabei im Vergleich zu den Ct-Werten bei der Detektion mit SYBR® Green höhere Werte. Die Anzahl Zyklen, bei der das gemessene Fluoreszenz-Signal einen vorgegebenen Schmelzwert übersteigt, ergibt den Ct-Wert (C für Cycle).

Die Quantifizierung mittels PCR zeigt gewisse Limitationen. Die Aufarbeitung der Proben muss in streng standardisierter Weise erfolgen. RNA unterliegt schnellen Abbauprozessen und die Präparation muss deshalb unter absolut RNase-freien Bedingungen durchgeführt werden. Weiterhin hängt die Ausbeute an mRNA von der Menge der eingesetzten Zellen, von der Gewebeart, der Methode der Aufarbeitung und der Probenentnahme ab. Auch die Lagerungszeit und -art bestimmen wesentlich die Qualität und Menge der erhaltenen RNA-Konzentrationen. Die Präzision der mRNA-Genexpressionsanalyse wird signifikant durch die Quantität und Qualität des Ausgangsmaterials, der Gesamt-RNA, beeinflusst (Fleige & Pfaffl, 2007). Aufgrund der Instabilität der mRNA ist ein rasches Arbeiten bis zur cDNA-Synthese notwendig. Erst dieses Nukleinsäureprodukt ist stabiler und kann leichter gelagert werden.

Vor der Anwendung der quantitativen RT-PCR ist es empfehlenswert, die Integrität der RNA zu überprüfen, denn erst eine hohe RNA-Qualität erzeugt deutlich niedrigere Ct-Werte als stark degradierte RNA-Proben (Fleige & Pfaffl, 2007). Fleige & Pfaffl (2007) verwendeten die so genannte RNA-Integritätsnummer (RIN) als Qualitätslabel. Hierbei wird der RNA-Qualität ein Zahlenwert, der RIN-Wert, zugeordnet. Gewebe, das einen hohen Anteil an Bindegewebe, vermehrter Enzymaktivität oder, wie in dieser Arbeit, an Fettgewebe hat, zeigen eine hohe Variabilität der Werte. Große Schwankungen ergaben sich in der RNA-Quantität und -Integrität bei der Anwendung unterschiedlicher Extraktionsmethoden. Meistens werden flüssig-flüssig-Extraktionen oder wie in unserem Fall auf Säulen basierende RNA-Extraktionssysteme angewendet, die sich aber in Effizienz und Qualität der RNA von Labor zu Labor unterscheiden (Fleige & Pfaffl, 2007). In dieser Studie wurde zur Qualitätsbestimmung die Messung der optischen Dichte (OD) durchgeführt. Sie dient der Bestimmung der Konzentration an Nukleinsäuren der einzelnen Proben. Zur Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäuren wurde das Verhältnis der OD bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt. Bei 280

nm absorbieren die aromatischen Basen der Aminosäuren von Proteinen das Licht, bei 260 nm die Basen der Nucleinsäuren. Ein Quotient  $OD_{260/280}$  von 1,9-2,1 entspricht reiner RNA, von 1,6-1,8 DNA.

Auch die Reaktion der Reversen Transkription kann eine sehr variable Effektivität haben, die vor allem in der Empfindlichkeit der Reversen Transkriptase gegenüber in der RNA-Präparation verbliebenen Salzen, Alkohol oder Phenol und gegenüber Kontaminationen wie Fett, Zelltrümmer oder erhöhte Konzentration an genomischer DNA begründet liegt. Die Quantifizierung einer bestimmten mRNA kann also nur gelingen, wenn eine Bezugsgröße bekannt ist, die die Menge an eingesetzter Gesamt-mRNA bzw. -cDNA widerspiegelt. Durch die Anwendung der relativen Genexpressionsanalyse kann auch partiell degradierte RNA in der quantitativen RT-PCR eingesetzt werden. Die Normalisierung mit einem internen Standard reduziert die Varianz der Expressionsergebnisse.

Eine solche Bezugsgröße kann die Expression einer anderen mRNA darstellen. Von dieser mRNA, die damit als ein interner Standard eingesetzt wird, wird gefordert, daß sie in den untersuchten Zellen konstant exprimiert wird. Diese Bedingungen werden von verschiedenen konstitutiv exprimierten Genen, den sogenannten „housekeeping“-Genen, wie z.B.  $\beta$ -Actin oder GAPDH, erfüllt. Mit Hilfe einer derartigen mRNA als internen Standard ist es möglich, die unterschiedliche Expression einer anderen mRNA in verschiedenen Proben in Relation zueinander zu quantifizieren. Da jedoch der interne Standard keine absolute Bezugsgröße darstellt, muss eine solche Quantifizierung immer als semiquantitativ angesehen werden. Als interner Standard wurde in dieser Arbeit wie bereits erwähnt GAPDH verwendet. Die Amplifikation dieses „housekeeping gene“ hat sich für das Fettgewebe in Untersuchungen als vorteilhaft erwiesen, es wird gleichmäßig und konstant in den Zellen des Fettgewebes exprimiert. Die Normalisierung zu einer endogenen Kontrolle bietet eine Methode, die Resultate bei Vorliegen unterschiedlich hoher Mengen an eingesetzter RNA zu korrigieren bzw. Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen. In der vorliegenden Arbeit kam sie auch wegen des hohen Probendurchlaufs zur Anwendung. Die sich daraus ergebenden Probleme sind offensichtlich. Sicherlich wird sich in einem dynamischen System wie dem einer Zelle keine mRNA finden lassen, die unabhängig von äußeren Einflüssen exprimiert wird,

so dass diesbezüglich immer Kompromisse eingegangen werden müssen und eine solche Quantifizierung damit immer in Relation zu dem gewählten internen Standard gesehen werden muss.

Beim Vergleich von RT-PCR-Produkten unterschiedlicher mRNAs ist in die Interpretation der Ergebnisse miteinzubeziehen, dass unterschiedliche cDNAs in einer PCR nicht unbedingt in gleichem Maße amplifiziert werden. Diese Unterschiede sind vor allem durch die Verwendung spezifischer und damit unterschiedlicher Primer für die verschiedenen Templates begründet.

In einer einzigen bisher publizierten Studie wurde gezeigt, dass ZAG auch von reifen menschlichen Fettzellen (viszeral und subkutan) exprimiert und sezerniert wird (Bao et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnte die ZAG-Expression im weißen Fettgewebe sowohl subkutan als auch omental bestätigt werden.

Der Nachweis der ZAG-Genexpression und der Proteinsekretion aus reifen, menschlichen Adipozyten und die gesteigerte Expression der ZAG mRNA aus Mausadipozyten bei Vorliegen einer Tumorkachexie (Bing et al., 2004) war der Ausgangspunkt für die vorliegenden Untersuchungen. Die zitierten Studien führten zu der Hypothese, dass beim Menschen ein Zusammenhang zwischen Tumor und ZAG-Überproduktion im Fettgewebe besteht.

Die hier aufgeführten Untersuchungen zeigen, dass bei Menschen das alleinige Vorliegen eines Tumors nicht zu signifikanten Änderungen der ZAG-Expression im Fettgewebe führt. Bei der Auswertung der Expressionsdaten ergaben sich bezogen auf die Mittelwerte der ZAG-Expressionsraten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tumorpatienten und den Studienteilnehmern ohne Tumor.

Mit der vorliegenden Arbeit konnten die veröffentlichten Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen nicht auf das Fettgewebe übertragen werden. Einige Studien berichten von einer Überexpression an ZAG in verschiedenen malignen Tumoren beim Menschen (Mazoujian et al., 1990; Hirai et al., 1998; Diez-Itza et al., 1993; Hale et al., 2001; Brysk et al., 1997, Irmak et al., 2005). Bei Patienten mit Blasenkrebs und

Gewichtsverlust konnte in Urinproben die erhöhte Ausscheidung von ZAG im Vergleich zu gesunde Probanden nachgewiesen werden (Hirai et al., 1998). Todorov et al. (1998) fanden ZAG im Urin kachektischer Patienten, die an gastrointestinalen Karzinomen oder Pankreastumoren litten. Besonders interessant scheint, dass gerade dort, wo sich die Kachexie vordergründig abspielt, nämlich im Fettgewebe, ZAG nicht vermehrt zu sein scheint, jedoch ZAG im Urin, im Prostatagewebe und im Serum von Tumorpatienten erhöht ist.

Fraglich ist allerdings, ob eventuell die ZAG-Expression im Fettgewebe nur bei bestimmten gastrointestinalen Tumoren erhöht ist, jedoch nicht generell bei diesen Tumoren verändert ist. Die Patienten der vorliegenden Untersuchung litten an Magen-, Colon- oder Rectum- Karzinomen. Das vorliegende Ergebnis schließt nicht aus, dass bestimmte Tumorformen zur Erhöhung des ZAGs führen könnten. Todorov et al. (1988) fanden, dass nur die Tumore, die zur Reduktion der Fettmasse fähig sind, mRNA von Zn-alpha2-Glycoprotein exprimieren. So wurde bei den Untersuchungen an Mäusen ein experimentelles Modell verwendet, ein Tumor, MAC16, der zur starken Reduktion der Fettmasse führt und eine Kachexie induziert.

Immunhistochemische Untersuchungen an Mäusen mit menschlichen Tumoren, anhand Xenograft-Modellen, zeigten, dass nur wenige Tumorzellen eines nicht-kachektischen Xenografts (Colonzelllinien) ZAG positiv waren, während eine beachtliche Anzahl ZAG-positiver Zellen in drei nicht-kachektischen Xenografts (Mammazelllinien) beobachtet wurde (Kamoshida et al., 2006). Kamoshida et al. kamen zu dem Schluss, dass ZAG nicht ursächlich für Tumorkachexie ist.

Eine weitere Fragestellung dieser Studie war, ob ein Zusammenhang zwischen ZAG-Gehalt im Fettgewebe und dem Tumorstadium besteht. Es konnte mit den vorliegenden Daten der Patienten mit gastrointestinalen Tumor eine derartige Korrelation nicht demonstriert werden.

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Diez-Itza et al. (1993), bezogen auf die ZAG-Expression in Tumorgewebe, konnten weder bestätigt noch in Frage gestellt werden. Interessanterweise fand diese Arbeitsgruppe bei gut differenzierten Brusttumoren signifikant höhere Proteinmengen an ZAG im Zytosol als bei schlecht differenzierten



Tumoren. Sie fanden zwar diese Korrelation zwischen der ZAG-Expression mit der Tumordifferenzierung, aber diese beeinflusste nicht die Prognose der Patienten. Auch Sanchez et al. (1992) konnten eine solche Korrelation zwischen der Höhe des ZAG-Proteins und dem histologischen Grad des Brusttumors aufzeigen. Die Analyse der ZAG-Expression im Brustgewebe hat zum Vorschein gebracht, dass die ZAG-Genexpression in gutartigen Veränderungen erhöht ist und beim Mammakarzinom variiert. Auch Hale et al. (2001) wiesen erhöhte Expressionsraten im Prostatagewebe mittelgradiger Prostatatumoren im Vergleich zu Tumoren mit hohem Tumorstadium nach. Höhergradige Tumore waren im Vergleich zu moderaten Tumoren ZAG-negativ und ihr ZAG war vermindert. Sie fanden eine ZAG-Produktion bei 73% der Prostatakarzinome. ZAG kommt auch in normalem Prostatagewebe vor (Tada et al., 1991). Eine erhöhte Produktion führt zu systemisch erhöhtem ZAG im Serum. Männer mit einem ZAG produzierenden Prostatakarzinom hatten relativ erhöhte ZAG-Serumspiegel im Vergleich zu Kontrollen, gematcht in Bezug auf Alter und Rasse. Immunhistochemische Studien zeigten einen teilweisen Verlust an ZAG-Expression im Prostatagewebe nach maligner Transformation (Gagnon et al., 1990). Dies steht im Widerspruch zu hohem ZAG und Kachexie. Hale et al. (2001) fanden auch beim Menschen bei tumorfreien Kontrollgruppen erhöhte Serumspiegel, die also nicht in Relation zum Prostatakarzinom standen. Somit könnten die qualitativen Veränderungen aus anderen (pathologischen) Umständen resultieren. Auch zeigt sich eine Abhängigkeit des Tumorstadiums bei Blasenkrebs und der ZAG-Menge im Urin. Die höchsten Mengen sind bei invasiven Stadien wie pT2-3 nachweisbar. ZAG ist auch in 3fach geringerer Menge im Urin gesunder Probanden im Vergleich zu Tumorpatienten nachweisbar.

In der oben erwähnten Arbeit von Bao et al. (2004) wurde nicht darauf eingegangen, inwiefern der Herkunftsort des Fettgewebes, subkutan oder omental, einen Einfluss auf die Expressionshöhe hat. Ein Unterschied im Expressionsniveau zwischen omentalen und subkutanen Fettgewebe kann in den hier aufgeführten Ergebnissen aufgrund der Stichproben weder im Vergleich der Mittelwerte noch in den verbundenen Tests nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass das subkutane Fettgewebe ein guter Index für die ZAG mRNA-Spiegel im gesamten Fettgewebe des menschlichen Körpers darstellt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Body-Mass-Index zur Erfassung des Ernährungszustandes verwendet. Dieser kann als ein sehr einfaches und klinisch praktikables anthropometrisches Verfahren angesehen werden, in dem der Quotient von Körpergewicht in kg zur Körpergröße in m<sup>2</sup> gebildet wird (BMI = KG(kg)/Körpergröße (m<sup>2</sup>)). Dadurch erhält man ein Relativmaß, welches es erlaubt, den Ernährungszustand verschiedener Patienten miteinander zu vergleichen, da das Körpergewicht in Relation zur Körpergröße gesetzt wird. Dabei kann jedoch nicht differenziert werden, welches Kompartiment, Körperfett oder fettfreie Körpermasse, von der Gewichtsveränderung betroffen ist. Fehleinschätzungen sind möglich, da bei Tumorpatienten die verminderte Körpermasse durch eine Zunahme der Weichteil- und Flüssigkeitsmasse kompensiert wird.

Ein interessanter Aspekt der vorliegenden Untersuchungen ist die Tatsache, dass eine signifikante Korrelation der ZAG-mRNA-Werte mit dem BMI ermittelt werden konnte. Es besteht ein positiver Zusammenhang, je höher das Gewicht war, desto höher waren die Werte für die ZAG-mRNA. Obwohl bekannt ist, dass die Expression des ZAGs mit dem Gewichtsverlust negativ korreliert, konnte dies in der vorliegenden Studie somit nicht bestätigt werden (Hirai et al., 1998; Todorov et al., 1998; Russell & Tisdale, 2002). Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich darin, dass sowohl die Gruppe der Tumorpatienten als auch die der Kontrollpatienten erhöhte Body-Mass-Indices hatten und ein Gewichtsverlauf nicht vorlag.

Aus Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen ist bekannt, dass ZAG in isolierten Adipozyten von Mäusen und Menschen die Lipolyse stimulierte, in vivo zur selektiven Reduktion von Körperfett bei Mäusen, zur Erhöhung des Glycerinserumspiegels und zu einem steigendem Gehalt freier Fettsäuren im Serum führte ( Hirai et al., 1998; Todorov et al., 1998; Russell et al., 2004). Muskelmasse sowie Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme blieben unverändert. Hirai et al. (1998) konnten auch zeigen, dass humane weiße Adipozyten gleich auf ZAG (LMF) antworteten, auch wenn die maximale Antwort kleiner war als bei weißen Adipozyten von Ratten.

Nach Transplantation des MAC16 Tumors, der bekanntlich große Mengen an ZAG produziert und bei Mäusen eine Kachexie nachhaltig induziert, fand die Arbeitsgruppe eine signifikante Steigerung der ZAG-Expression und des Proteins im

weißen und braunen Fettgewebe kachektischer Mäuse. In vitro kam es zu erhöhter ZAG-Expression, in vivo zur Kachexieinduktion. Tumore, die kein ZAG produzieren, zeigten keine Kachexieinduktion in vivo (Todorov et al., 1998).

Wie bereits erwähnt, konnte dieser Fragestellung der Kachexieinduktion durch ZAG beim Menschen in der vorliegenden Arbeit nicht nachgegangen werden, da keine ausreichenden Daten zur Erfassung des Ernährungszustandes wie Gewichtsverlauf (mindestens zweimaliger BMI), ungewollter Gewichtsverlust, Gesamteiweiß und Serumproteine z.B. Albumin, Präalbumin, Transferrin vorlagen.

So fanden Ohkubo und Tisdale (1998) nur bei den Tumoren, die bei Krebspatienten eine Fettreduktion verursachten, erhöhte Mengen an ZAG-mRNA. ZAG wurde nur bei Patienten mit gastrointestinalen Tumoren gefunden, die durch Gewichtsverlust kompliziert waren (Groundwater et al., 1999).

Es wurde berichtet, dass die Überexpression von ZAG in Adipozyten in vitro zu steigender Expression von Adiponectin-mRNA führt (Gohda et al., 2003). Die Arbeitsgruppe stellte anhand von Tiermodellen die Hypothese auf, dass, wenn die Fettleibigkeit anhält, die ZAG mRNA Menge steigen könnte, um somit die Umstände des zu hohen Gewichts zu korrigieren und die erhöhten ZAG-Werte über einen steigenden Adiponectinspiegel zu einer Reduktion des Körpergewichts führen. Fettleibigkeit führt also zur erhöhten Expression an ZAG mRNA, diese Erhöhung stellt aber nicht die Ursache sondern die Folge der Fettleibigkeit dar. Beide Gene (Adiponectin und ZAG) kollaborieren möglicherweise mit dem Ziel der Gewichtsreduktion. Das ZAG-Gen spielt möglicherweise eine Rolle in der Regulation des Körpergewichts und in den altersabhängigen Änderungen in der genetisch beeinflussten Fettleibigkeit.

Möglich wäre auch, dass sich in der vorliegenden Untersuchung die Effekte auf die ZAG-Expression überlagern. Die Tumorpatienten sind zwar im Durchschnitt leicht übergewichtig (BMI 26,7 +/- 3,8), doch könnten sie hypothetisch trotzdem einen Gewichtsverlust verzeichnen und somit erhöhte ZAG-Werte haben. Die Nichttumorpatienten, die im Mittelwert einen BMI von 27,7 +/- 7,4 haben, weisen erhöhte ZAG-Werte auf, doch liegt dieser Erhöhung das Übergewicht zugrunde. Im

Gegensatz zu den genannten Ergebnissen berichten Marrades et al. (2008) von Untersuchungen an Mäusen, dass das ZAG-Gen im subkutanen Fettgewebe bei fettleibigen Tieren im Vergleich zu normalgewichtigen herunterreguliert war.

Interessant wäre eine Studie durchzuführen, in der nachgegangen wird, ob ein Zusammenhang zwischen der ZAG-Expression und Tumorkachexie besteht, indem man den Gewichtsverlauf der Patienten beobachtet. Und diesen in Zusammenhang mit der ZAG-Expressionshöhe bringt. Berichtet wurde bisher nur von der Überexpression von ZAG in Adipozyten bei kachektischen Mäusen (Bing et al., 2004). So waren ZAG-Serumspiegel bei Tumorpatienten proportional zum steigenden Ausmaß des Gewichtsverlustes (Groundwater et al., 1999) und reduziert bei Patienten nach dem Ansprechen auf Chemotherapie (Beck et al., 1990). ZAG könnte einen Voraussagewert für die Tumorkachexie besitzen und somit als prognostischer Parameter eine neue Wertigkeit erhalten.

Rolli et al. (2007) konnten unter Nutzung von ZAG knock out Mäusen zeigen, dass das Fehlen von ZAG zu Übergewicht führt. Sie schließen daraus, dass die ZAG-Überproduktion zu Gewichtsverlust und eventuell zur Kachexie führen könnte. ZAG könnte somit auch ein möglicher therapeutischer Angriffspunkt sein, modulierend in den Gewichtsverlauf einzugreifen.

Ein Vorteil der großen Zahl der Kontrollgruppe dieser Untersuchung besteht darin, weitere Korrelationen, wie teils oben beschrieben, in Bezug zur ZAG-Expressionsrate zu untersuchen. Doch konnten keine Zusammenhänge zwischen der ZAG-Expressionshöhe und dem Vorliegen einer Hypertonie oder eines Diabetes mellitus sowie der Serumkonzentration von CRP, Kreatinin, GOT, GPT, Natrium, Kalium und Calcium gefunden werden.

Die vorliegenden Daten zeigten einen schwachen, positiven Zusammenhang zwischen ZAG und der Fettzellgröße. Bekannt ist, dass mit zunehmendem Übergewicht sowohl der Fettzellanteil als auch der mittlere Fettzelldurchmesser stetig ansteigt. Dies würde die Hypothese bestätigen, dass steigende ZAG-Expressionsraten im Zusammenhang mit einem hohen BMI stehen. Zum Zeitpunkt der praktischen Untersuchungen war ein valider Nachweis von ZAG Protein im

Überstand noch nicht kommerziell erhältlich. Die mRNA-Daten müssten allerdings durch Sekretionsstudien aus den Fettgewebsdepots unterstrichen werden, um den fehlenden Zusammenhang zwischen ZAG-mRNA-Expression im Fettgewebe und um den vermuteten Zusammenhang zu den ZAG Plasmaspiegeln bei Tumorpatienten zu bestätigen oder zu widerlegen.

## **5 Methodik und Material**

### **5.1 Biochemische und molekularbiologische Methoden**

In der vorliegenden Arbeit wurden Gewebeproben aus subkutanen und omentalen Fettgewebe eines Patientenkollektivs verwendet. Die Patienten litten an benignen Erkrankungen oder unterzogen sich plastisch-chirurgischen Eingriffen (Kontrollgruppe), 22 litten an malignen Erkrankungen.

Die Patienten waren im Alter zwischen 26 und 85 Jahren und hatten einen Body-Mass-Index zwischen 14 und 66. Im Operationssaal wurden den Spendern intraoperativ etwa 300 mg Fettgewebe entnommen. Die Proben wurden bei -70°C (flüssiger Stickstoff) gelagert. Dadurch sollte eine Aktivität der endogenen RNasen vermieden werden.

#### **5.1.1 Fraktionierung von Fettzellen und Isolierung von Gesamt-RNA aus menschlichem Fettgewebe**

Die folgenden Arbeitsschritte, die im Zusammenhang mit der Präparation von RNA standen, wurden unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt. RNA ist sehr anfällig für enzymatisch katalysierte Hydrolyse. RNasen kommen ubiquitär vor, sie sind sehr stabil und können nach Denaturierung (z.B. durch Autoklavieren) wieder renaturieren.

Für die RNA Präparation aus Fettgewebeproben kam eine modifizierte Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) zur Anwendung. Die Methode basiert auf einer sauren Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion der RNA. Es handelt sich um ein auf Säulen basierendes RNA-Extraktionssystem.

Es wurde das NucleoSpin RNAII Protokoll (Machery-Nagel, Düren), ein kommerzieller RNA-Extraktions-Kit, herangezogen. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Für den Gewebeaufschluss wurden pro 100 mg Gewebe 700 µl RA1-Puffer verwendet. Die Durchführung sah wie folgt aus:

Lösungen:

- RA1 Puffer
- 98%  $\beta$ -Mercaptoethanol
- 70% Ethanol
- MDB
- DNase Reaktionsmix
- RA2 Puffer
- RA3 Puffer
- HPLC-H<sub>2</sub>O

Durchführung:

1. 100-200 mg gefrorenes Fettgewebe von vorliegendem Gewebe mit einem Skalpell abschneiden, möglichst bindegewebs- und blutgefäß-frei, diese Gewebestücke in 700  $\mu$ l RA1 Puffer (verbessert Bindungseigenschaften) und 7  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol aufschliessen
2. Gewebe mit Ultraschall homogenisieren
3. 5 min bei 16 000 x g und Raumtemperatur zentrifugieren
4. 700  $\mu$ l RNA-haltige obere Phase abpipettieren und Lysat in neue NucleoSpin Filter Einheit zur Reinigung und Herabsetzung der Viskosität geben
5. 1 min bei 16 000 x g zentrifugieren
6. Ethanol-fällung: Filter werfen, Lysat enthält RNA, 700  $\mu$ l Ethanol zum Lysat zugeben und durch Pipettieren mischen, 700  $\mu$ l auf NucleoSpin RNA II Säule pipettieren (1400  $\mu$ l à 2 Portionen)
7. 1 min bei 16 000 x g und Raumtemperatur zentrifugieren, Überstand werfen
8. Teile von Schritt 7 wiederholen, d.h. restliche 700  $\mu$ l auf dieselbe Säule pipettieren und zentrifugieren, Überstand werfen und Säule in ein neues Röhrchen platzieren
9. 350  $\mu$ l MDP hinzufügen, um die Salze von der Membran für eine bessere DNase Verdauung zu entfernen
10. 95  $\mu$ l DNase Reaktionsmix hinzufügen und mischen, 15 min bei Raumtemperatur inkubieren
11. 200  $\mu$ l RA2 Puffer zur Inaktivierung der DNase hinzugeben (1. Waschgang)

12. 30 s bei 8 000 x g zentrifugieren, die Säule in ein neues Röhrchen platzieren
13. 600 µl RA3 Puffer dazu pipettieren zum Entfernen der Salze und 30 s bei 8000 x g zentrifugieren, Überstand verwerfen und die Säule wieder in das Röhrchen platzieren (2. Waschgang)
14. 250 µl RA3 Puffer hinzufügen und 2 min bei 16 000 x g zentrifugieren, um die Membran vollständig zu trocknen (3. Waschgang)
15. Säule in ein Nuklease-freies 1.5 ml mikrozentrifugen Röhrchen geben
16. 55 µl HPLC-H H<sub>2</sub>O auf die Membran auftragen (Elution der RNA) und 1 min bei 16 000 x g zentrifugieren
17. mRNA Proben bei -74°C lagern

Während der Isolierung der RNA ist es wichtig, dass diese immer auf Eis aufbewahrt wird.

### **5.1.2 Spektrophotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration**

Zur Messung der Konzentration an Nukleinsäuren der Proben wurde die optische Dichte (OD) bei 260 nm Wellenlänge herangezogen. Zur Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäuren und somit zur Qualitätskontrolle wurde das Verhältnis der OD bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Bei 280 nm absorbieren die aromatischen Basen der Aminosäuren von Proteinen das Licht, bei 260 nm die Basen der Nukleinsäuren. Ein Quotient  $OD_{260/280}$  von 1,9-2,1 entspricht reiner RNA, von 1,6-1,8 DNA.

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde 55 µl Aliquot entnommen und in eine Küvette gegeben. Die OD wurde bei 260 nm und 280 nm gegen den jeweiligen Leerwert 55 µl HPLC-H<sub>2</sub>O gemessen. Die  $OD_{260}$  von 1 entspricht bei RNA einer Konzentration von 40 µg/µl.

### **5.1.3 Reverse Transkription von Total-RNA**

Während der Reversen Transkriptase-Reaktion (RT) wird die gewonnene mRNA in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die cDNA wird hier unter Verwendung von Random-Primern, Oligo-d(T) Primern hergestellt. Durch den Einsatz dieses unspezifischen Gemisches erhöht sich die Wahrscheinlichkeit unerwünschter Nebenprodukte in der anschließenden PCR. Doch ergibt sich die Möglichkeit, mehrere Produkte der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) in einem Reaktionsansatz zu amplifizieren. Im Hinblick auf die in 6.1.4. beschriebene quantitative PCR-Methode lässt sich auf diese Weise ein interner Standard

nachweisen. Außerdem erfolgt die cDNA-Synthese auf diese Weise für alle RNA-Moleküle statistisch. Die Durchführung erfolgt nach einer Modifikation einer Methode von Chomczynski & Sacchi.

Es wurden 1 µl RNA von jeder Probe in der RT-Reaktion eingesetzt.

RT-Ansatz (Endkonzentrationen, 20µl Reaktionsvolumen):

- 1 µl mRNA
- cDNA Synthese Puffer 10x
- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- DMSO oder MgCl<sub>2</sub>
- RNase out
- Oligo-dT Primer
- 200 U Reverse Transkriptase
- H<sub>2</sub>O ad 20µl

Durchführung:

Reagenzien und RNA-Proben auf Eis auftauen und nacheinander zusammenpipettieren.

PCR Programm:

1. 50 min, 42°C (Primer-Annealing)
2. 15 min, 70°C (Inaktivierung der Reaktion)

Die Reaktionsschritte durchliefen 40 Zyklen.

#### **5.1.4 Real Time Quantitative PCR**

Nach der RT wird durch Zugabe eines PCR-Reaktionsansatzes, der einen ZAG spezifischen Primer enthält, die PCR durchgeführt. Es wird ein spezifisches Transkript synthetisiert.

Mit der Real Time Reversen Transkription PCR lassen sich relative Mengen eines PCR-Produktes bezogen auf einen internen Standard quantitativ beurteilen. Als interner Standard werden dafür das Template des GAPDH amplifiziert. Um eine anschließende Quantifizierung zu ermöglichen wird bei der PCR der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet.



Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 6 dargestellt.

ZAG-Ansatz (Endkonzentrationen, ad 20µl)	GAPDH-Ansatz (Endkonzentrationen, ad 20µl)
3 µl DNA-Matrize	3 µl DNA
SYBR Green Master Mix (2fach)	Sonde
0,5 pmol je eingesetztem Primer	TaqMan Mix (2fach)
H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O

*Tabelle 6: Herstellung des Reagenz mit RealMasterMix (Endkonzentrationen, 20µl Reaktionsvolumen) zur Hot Start PCR*

Beim Hot Start wird die PCR erst gestartet, wenn das Reaktionsgemisch die gewünschte Höchsttemperatur erreicht hat. Damit wird erreicht, dass die Polymerisation erst beginnt, wenn die Primer spezifisch an die DNA Sequenz gebunden haben. Somit entstehen weniger Artefakte. Die Polymerase kann dem Reaktionsansatz gleich zu Beginn zugegeben werden.

Es wurden 3 µl Template eingesetzt.

PCR-Programm:

1. 15 min, 95°C (Hitzedenaturierung)
2. 15 sec, 95°C (Denaturierung)
3. 30 sec, 60°C (Primer-Annealing)
4. 1 min, 60°C (Extension, Elongation)
5. 20 min, 72°C (Schmelzkurve)
6. 15 sec, 95°

Die Reaktionsschritte durchliefen 40 Zyklen.

## **5.2 Statistische Auswertung und Datenverarbeitung**

Zur Datenauswertung und deren graphische Darstellung wurden MS EXCEL und SPSS für Windows verwendet. Das Design von Primern und Oligonukleotid-Sonden erfolgte mit Hilfe des Programms Primer Express (ABI, Foster City, CA, USA). Die

Primer und Taqman Sonden wurden mit Hilfe der Primer Express Software (Applied Biosystems) designed.

Zur Fehleranalyse wurde die Standardabweichung und der Standardfehler ermittelt. Signifikante Unterschiede wurden ab einem p-Wert < 0,05 angenommen. Mittelwertvergleiche normalverteilter Größen erfolgte mit dem Student t-Test. Bei fehlender Normalverteilung der Daten und bei kleiner Gruppengröße wurde der two-tailed Mann-Whitney-U-Test (=Wilcoxon Rangsummentest) mit einem zweiseitigen P-Wert für nonparametric probes verwendet. Für verbundene Stichproben wurde bei nicht-normalverteilten Daten der nicht-parametrische Wilcoxon Vorzeichenrangtest hergenommen. Bei den Korrelationsanalysen nicht normalverteilter Variablen wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Für gematchte Daten wurde der Mann-Whitney-Test verwendet.

### 5.3 Geräte, Materialien und Chemikalien

Absolute SYBR Green ROX Mix	ABgene, Surrey, UK
Abzug	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Collecting Tubes NucleoSpin	MN Machery-Nagel, Düren
Eisbox	Gilson, Limburg-Offheim
Ethanol	MN Machery-Nagel, Düren
Kapselgehörschutz	Bilsom, Billeshorn
Mastercycler ep realplex	Eppendorf, Hamburg
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
MDB Puffer	MN Machery-Nagel, Düren
Mercaptoethanol ( $\beta$ -)	Sigma, Steinheim
NucleoSpin Filter units RNA II Columns	MN Machery-Nagel, Düren
PCR detection plate, Thermo-Fast 96 PCR	ABgene, Epsom, UK
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Gilson, Limburg-Offheim
Pipettenspitzen (long filter tips)	Gilson, Limburg-Offheim
RA1 Puffer	MN Machery-Nagel, Düren
RA2 Puffer	MN Machery-Nagel, Düren
RA3 Puffer	MN Machery-Nagel, Düren
TaqMan Universal PCR Master Mix	Roche, New Jersey, USA

Untersuchung zur ZAG-Expression im Fettgewebe von Tumorpatienten

Thermocycler mit  
Fluoreszenzdetektionseinheit

ABI Prism® Sequence  
Detection System 7700  
von Applied Biosystems,  
ABI, Foster City, USA

Tischzentrifuge  
Untersuchungshandschuhe

Eppendorf, Hamburg  
Meditrade, Kiefersfelden

## 6 Zusammenfassung

Der Nachweis der ZAG-Genexpression und der Proteinsekretion aus reifen, menschlichen Adipozyten und die gesteigerte Expression der ZAG mRNA aus Mausadipozyten bei Vorliegen einer Tumorkachexie (Bing et al., 2004) war der Ausgangspunkt für die vorliegenden Untersuchungen. Vorbestehende Untersuchungen führten zu der Hypothese, dass beim Menschen ein Zusammenhang zwischen Tumor und ZAG-Überproduktion im Fettgewebe besteht.

In Deutschland sind Tumorerkrankungen neben Erkrankungen des kardiovaskulären Systems die häufigste Todesursache.

Gerade bei Patienten, die an gastrointestinalen Tumoren erkrankt sind, wird ein Gewichtsverlust beobachtet.

In die vorliegende Studie wurden insgesamt 89 Patienten eingeschlossen. 22 von ihnen waren an Tumoren des Gastrointestinaltraktes erkrankt und bildeten die Patientengruppe. Die Kontrollgruppe setzte sich aus 67 Patienten zusammen, die sich elektiven plastisch-chirurgischen oder abdominal-chirurgischen Operationen unterzogen.

Das Adipokin ZAG wird in Zusammenhang mit der Tumorkachexie gebracht. Es stimuliert die Lipolyse in Adipzyten, was zu einem steigenden Energieverbrauch führt (Hirai et al., 1998). Die Höhe des ZAGs im Serum ist proportional zum Ausmass des Gewichtsverlustes (Groundwater et al., 1990). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die ZAG Expression (auf RNA Ebene) im Fettgewebe von Tumorpatienten untersucht und inwieweit sich diese im Vergleich zu gesunden Probanden unterscheidet. Auch wurde eine Assoziation zwischen der ZAG-Expression und Alter, Tumorstadium, Fettzellgröße, BMI und Gewicht beschrieben. Desweiteren wurde untersucht, ob Zusammenhänge zwischen der ZAG-Expression und dem Vorliegen einer Hypertonie oder eines Diabetes mellitus sowie der Serumkonzentration von CRP, Kreatinin, GOT, GPT, Natrium, Kalium und Calcium bestehen. Bei Patienten- und Kontrollgruppe lagen entweder subkutanes und/oder omentales Fettgewebe als Ausgangsmaterial vor, aus dem zunächst die mRNA isoliert, die RNA mittels der Reversen Transkriptase Reaktion in cDNA umgeschrieben und schliesslich mittels der Real Time Semi-Quantitativen PCR der ZAG mRNA-Gehalt ermittelt wurde.

In der vorliegenden Arbeit konnte die ZAG-Expression im weißen Fettgewebe sowohl subkutan als auch omental gezeigt werden.

Es stellte sich heraus, dass bei den Tumorpatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe die ZAG Expression nicht erhöht ist. Die aufgeführten Untersuchungen zeigen, dass bei Menschen das alleinige Vorliegen eines Tumors nicht zu signifikanten Änderungen der ZAG-Expression im Fettgewebe führt.

Ein Zusammenhang zwischen ZAG-Gehalt im Fettgewebe und den verschiedenen Tumorstadien besteht nicht.

Ein Unterschied im Expressionsniveau zwischen omentalen und subkutanen Fettgewebe kann bei den hier aufgeführten Ergebnissen nicht nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass das subkutane Fettgewebe ein guter Index für die ZAG mRNA-Spiegel im gesamten Fettgewebe des menschlichen Körpers darstellt.

Ein interessanter Aspekt der vorliegenden Untersuchungen ist die Tatsache, dass eine signifikante Korrelation der ZAG-mRNA-Werte mit dem BMI ermittelt werden konnte. Es besteht ein positiver Zusammenhang, je höher das Gewicht war, desto höher waren die Werte für die ZAG-mRNA.

Ein positiver Zusammenhang besteht auch zwischen der Höhe der ZAG-Expression und der Fettzellgröße.

Weitere Untersuchungen sind nötig, um der Frage nachzugehen, ob ein Zusammenhang zwischen der ZAG-Expression und Tumorkachexie besteht, indem man den Gewichtsverlauf der Tumorpatienten beobachtet und diesen in Zusammenhang mit der ZAG-Expressionshöhe bringt.

## 7 Literaturverzeichnis

Abdul-Rahman PS, Lim B, Hashim OH (2007) Expression of high-abundance proteins in sera of patients with endometrial and cervical cancers: analysis using 2-DE with silver staining and lectin detection methods. *Electrophoresis* 28:1989–96

Adams SH (2000) Uncoupling protein homologs emerging views of physiological function. *J Nutr* 130: 711-714

Ahima RS, Flier JS (2000) Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 11: 327-332

Araki T, Gejyo F, Takagaki K, Haupt H, Schwick HG, Bürgi W, Marti T, Schaller J, Rickli E, Brossmer R, Atkinson PH, Putnam FW, Schmid K (1988) Complete amino acid sequence of human plasma Zn- $\alpha$ 2-glycoprotein and its homology to histocompatibility antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 679-683

Arch JRS, Ainsworth AT, Cawthorne MA, Piercy V, Sennitt MV, Thody VE, Wilson C, Wilson S (1984) Atypical beta-adrenoceptor on brown adipose as target for anti-obesity drugs. *Nature* 309: 163-165

Arch JRS (1989) The brown adipocyte beta-adrenoceptor. *Proc Nutr Soc* 48: 215-223

Arch JRS, Wilson S (1996)  $\beta$ 3-adrenoceptors and the regulation of metabolism in adipose tissue. *Biochem Soc Trans* 24: 412-418

Argilés JM, Busquets S, López-Soriano FJ (2003a) Cytokines in the pathogenesis of cancer cachexia. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 6: 401-406

Argilés JM, Moore-Carrasco R, Busquets S, Lopez-Soriano FJ (2003b). Catabolic mediators as targets for cancer cachexia. *Drug Discovery Today* 18: 838-844

Argilés JM (2005) Cancer-associated malnutrition. *European Journal of Oncology Nursing* 9: S39-S50

Argilés JM, Busquets S, García-Martínez C, López-Soriano FJ (2005) Mediators involved in the cancer anorexia-cachexia syndrome : past, present, and future. *Nutrition* 21: 977-985

Banks WA, Farr SA, Morley JE (2006) The effects of high fat diets on the blood-brain barrier transport of leptin: Failure or adaptation?. *Physiology & Behavior* 88: 244-248

Bao Y, Bing C, Hunter L, Jenkins JR, Wabitsch M, Trayhurn P (2005) Zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed and secreted by human (SGBS) adipocytes. *FEBS Letters* 579: 41-47

Barbe P, Millet L, Larrouy D, Galitzky J, Berlan M, Louvet JP, Langin D (1998) Uncoupling protein-2 messenger ribonucleic acid expression during very-low-calorie diet in obese premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2450-2453

Barber MD, Ross JA, Fearon KC (1999) Cancer cachexia. *Surgical Oncology* 8: 133-141

Beck SA, Tisdale MJ (1987) Production of lipolytic and proteolytic factors by a murine tumor-producing cachexia in the host. *Cancer Res* 47: 5919-5923

Beck SA, Groundwater P, Barton C, Tisdale MJ (1990) Alterations in serum lipolytic activity of cancer with response to therapy. *BR J Cancer* 62: 822-825

Beck B, Burlet A, Nicolas JP, Burlet C (1990) Hypothalamic neuropeptide Y (NPY) in obese Zucker rats: implication in feeding and sexual behaviors. *Physiol Behav* 47: 449-453

Berg M, Fraker DL, Alexander HR (1994) Characterization of differentiation factor/leukaemia inhibitory factor effect on lipoprotein lipase activity and mRNA in 3T3-L1 adipocytes. *Cytokine* 6: 425-432

Bing C, Brown M, Collins P, Tisdale MJ, Williams G (2000) Increased gene expression of brown fat UCP1 and skeletal muscle UCP2 and UCP3 in MAC16-induced cancer cachexia. *Cancer Res* 60: 2405-2410

Bing RJ, Miyataka M, Rich KA, Hanson N, Wnag X, Slosser HD, Shi SR (2001) Nitric oxide, prostanoids, cyclooxygenase, and angiogenesis in colon and breast cancer. *Cancer Res* 7:3385-3392

Bing C, Russell ST, Beckett EE, Collins P, Taylor S, Barraclough R, Tisdale MJ, Williams G (2002) Expression of uncoupling proteins -1, -2 and -3 mRNA is induced by an adenocarcinoma-derived lipid-mobilizing factor. *Br J Cancer* 86: 612-618

Bing C, Bao Y, Jenkins J, Sanders P, Manieri M, Cinti S, Tisdale MJ, Trayhurn P (2003) Zinc- $\alpha$ 2-Glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed in adipocytes and is up-regulated in mice with cancer cachexia. *PNAS* 110: 2500-2505

C. Bing, S. Russell, E. Becket, M. Pope, M.J. Tisdale, P. Trayhurn and J.R. Jenkins (2006) Adipose atrophy in cancer cachexia: morphologic and molecular analysis of adipose tissue in tumour-bearing mice, *Br. J. Cancer* 95: 1028–1037

Bosaeus I, Daneryd P, Svanberg E, Lundholm K (2001) Dietary intake and resting energy expenditure in relation to weight loss in unselected cancer patients. *International Journal of Cancer* 93: 380-383

Boyle P, Langman J (2000) ABC of colorectal cancer. *British Journal of Medicine* 321: 805-808

Bozzetti F (2001) Nutrition support in patients with cancer. *Artificial Nutrition Support in Clinical Practice*.



Brown JK, 2002 A systematic review of the evidence on symptom management of cancer-related anorexia and cachexia. *Onco Nurs Forum* 29: 517-532

Bruera E (1997) Anorexia, cachexia, and nutrition. *BMJ* 315: 1219-1222

Brysk MM, Lei G, Selvanayagam P, Brysk H, Trying SK, Arang I (1997) Modulation by interferon- $\gamma$  of zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein gene expression in human epithelial cell lines. *Anticancer Res* 17: 3387-3392

Bundred NJ, Miller WR, Walker RA (1987). An immunohistochemical study of the tissue distribution of the breast cyst fluid protein, zinc  $\alpha$ 2-glycoprotein. *Histopathol* 11: 603-610

Bürgi W, Schmid K (1961) Preparation and Properties of Zn- $\alpha$ 2-glycoprotein of Normal Human Plasma. *The Journal of Biological Chemistry* 236: 1066-1074

Burmeister WP, Gastinel LN, Simister NE, Blum ML, Bjorkman PJ (1994) Crystal structure at 2.2 Å resolution of the MHC-related neonatal Fc receptor. *Nature* 372: 336-343

Busquets S, Aranda X, Ribas-Carbó M, azcon-Bieto J, López-Soriano FJ, Argilés JM (2003) Tumour necrosis factor- $\alpha$  uncouples respiration in isolated rat mitochondria. *Cytokine* 22:1-4

Buss CL (1987) Nutritional support of cancer patients. *Primary Care* 14: 317-335

Cabal-Manzano R (2001) Proteolysis-inducing factor is expressed in tumours of patients with gastrointestinal cancers and correlates with weight loss. *Br J Cancer* 84: 1599-1601

Capra S, Ferguson M, Ried K (2001) Cancer : impact of nutrition intervention outcome – nutrition issues for patients. *Nutrition* 17: 769-772

Carel JC, Stunff CL, Condamine L (1999) Resistance to the lipolytic action of epinephrine: A new feature of protein Gs deficiency. *J Clin*

Caspar-Bauguil S, Cousin B, Galinier A, Segafredo C, Nibbelink M, André M, Casteilla L, Pénicaud L (2005) Adipose tissues as an ancestral immune organ: Site-specific change in obesity. *FEBS Letters* 579: 3487-3492

Chance WT, Balasubramaniam A, Dayal R, Brown J, Fischer JE (1994) Hypothalamic concentration and release of neuropeptide Y into microdialysates is reduced in anorectic tumour-bearing rats. *Life Sci* 54: 1869-1874

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159

Cone RD (1999) The central melanocortin system and energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 10: 211-216

Costa G, Holland JF (1962) Effect of Krebs-2 carcinoma on the lipid metabolism of male Swiss mice. *Cancer Res* 22:1081-1083

Costa G (1963) Cachexia, the metabolic component of neoplastic disease. *Progr Exp Tumour Res* 3:321-369

Costa G, Bewley P, Aargon M, Siebold J (1981) Anorexia and weight loss in cancer patients. *Cancer Treat Rep* 65: 3-7

Cummings DE, Schwartz MW (2000) Melanocortins and body weight: a tale of two receptors. *Nat Genet* 26: 8-9

Dahlman I, Kaaman M, Olsson T, Tan GD, Bickerton AS, Wahlen K, Andersson J, Nordstrom EA, Blomqvist L, Sjogren A, Forsgren M, Attersand A and Arner P (2005) A unique role of monocyte chemoattractant protein 1 among chemokines in adipose tissue of obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 5834–5840

Dandona P, Weinstock R, Thusu K; Abdel-Rahman E, Adljade A, Wadden T (1998) Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2907-2910

DeWys WD (1978) Changes in taste sensation and feeding behaviour in cancer patients. *Journal of Human Nutrition* 32: 447-453

DeWys WD, Begg C, Lavin PT (1980) Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. *Am J Med* 69: 491-497

Dickson TM, Kusnierz-Glaz CR, Blume KG, Negrin RS, Stockerl-Goldstein KE (1999) Impact of admission body weight and chemotherapy dose adjustment on the outcome of autologous bone marrow transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 5:299-305

Diez-Itza I, Sanchez LM, Allende MT, Vizoso F, Ruibal A, Lopez-Otin C (1993) Zn-a2-Glycoprotein levels in breast cancer cytosols and correlation with clinical, histological and biochemical parameters. *European Journal of Cancer* 29: 1256-1260

Dinarello C, Wolff SM (1993) The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med* 328: 106-113

Ding Z, Qu F, Guo W (2007) Identification of sperm forward motility-related proteins in human seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 74:1124–31

Dong ZM, Gutierrez-Ramos JC, Coxon A, MayadasTN, Wagner DD (1997) A new class of obesity genes encodes leukocyte adhesion receptors. *Proc Natl Acad Sci* 94: 7526-7530

Drott C, Waldenström A, Lundholm K (1987) Cardiac sensitivity and responsiveness to beta-adrenergic stimulation in experimental cancer and undernutrition. *J Mol Cell Cardiol* 19: 675-683

Dunlop RJ, Campbell CW (2000) Cytokines and advanced cancer. J Pain Symptom Manage 20: 214-232

Elia M (2000) Guidelines for Detection and Management of Malnutrition, Malnutrition Advisory Group (MAG), Standing Committee of BAPREN, Maidenhead

European Commission health report, 2001.  
[http://europa.eu.int/comm/health/index\\_en.htm](http://europa.eu.int/comm/health/index_en.htm).

Falconer JS, Fearon KC, Plester CE, Ross JA, Carter DC (1994). Cytokines, the acute-phase response, and resting energy expenditure in cachectic patients with pancreatic cancer. Annals of Surgery 219: 325-331

Falconer JS, Fearon KC, Plester CE, Ross JA, Carter DC (1994) Cytokines, the acute-phase response, and resting energy expenditure in cachectic patients with pancreatic cancer. Annals of Surgery 219: 325-331

Fearon KC, Preston T (1990) Body composition in cancer cachexia. Infusionstherapie 17: 63-33

Fearon KCH (1992) The mechanisms and treatment of weight loss in cancer. Proc Nutr Soc 51: 251-265

Fearon KCH (2001) Nutritional support in cancer. Clinical Nutrition 20: 187-190

Fearon KC, Barber MD, Moses AG (2001) The cancer cachexia syndrome. Surg Oncol Clin N Am 10: 109-126

Fleige S, Pfaffl W (2007) Einfluss der RNA-Integrität auf die quantitative real-time RT-PCR. Laborwelt

Fredrix EW, Soeters PB, Deerenberg IM, Kester AD, von Meyenfeldt MF, Saris WH (1990) Resting and sleeping energy expenditure in the elderly. Eur J Clin Nutr 44: 741-747

Fredrix EW, Soeters PB, Wouters EFM, Deerenberg IM, von Meyenfeldt MF, Saris WHM (1990) Energy balance in relation to cancer cachexia. *Clin Nutr* 9 : 319-324

Fredrix EW, Saris WH, Soeters PB, Wouters EF, Kester AD, von Meyenfeldt MF, Westerterp KR (1990) Estimation of body composition by bioelectrical impedance in cancer patients. *Eur J Clin Nutr* 44:749-752

Freije JP, Fueyo A, Uria J, Lopez-Otin C (1991) Human Zn- 2-glycoprotein cDNA cloning and expression analysis in benign and malignant breast tissues. *FEBS Lett* 290:247-9

Freije JP, Fueyo A, Uria JA, Velasco G, Sanchez LM, Lopez-Boado YS, Lopez-Otin C (1993) Human Zn-alpha2-glycoprotein: complete genomic sequence, identification of a related pseudogene and relationship to class I major histocompatibility complex genes. *Genomics* 18: 575-87

Frühbeck G, Gomez-Ambrosi J, Mruzabal FJ, Burrell MA (2001) The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol* 280: E827-E847

Gagnon S, Tetu B, Dube JY, Tremblay RR (1990) Expression of Zn- 2-glycoprotein and PSP-94 in prostatic adenocarcinoma. An immunohistochemical study of 88 cases. *Am J Pathol* 136:1147-52

Gambardella A, Tortoriello R, Pesce L, Tagliamonte MR, Paolisso G, Varricchio M (1999) Intralipid infusion combined with propranolol administration has favourable metabolic effects in elderly malnourished cancer patients. *Metabolism* 48: 291-297

Gauthier C, Tavernier G, Charpentier F, Langin D, Le Marec H (1996) Functional  $\beta$ 3-adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest* 98: 556-562

Glare P (2005) Clinical predictors of survival in advanced cancer. *J Support Oncol* 3: 331-9

Gohda T, Makita Y, Shike T, Tanimoto M, Funabiki K, Horikoshi S, Tomino Y (2003) Identification of epistatic interaction involved in obesity using the KK/Ta mouse as a type 2 diabetes model-Is Zn-alpha(2) glycoprotein-1 candidate gene for obesity? *Diabetes* 52: 2175-2181

Granneman JG (1995) Why do adipocytes make the the  $\beta$ 3-adrenergic receptor? *Cell Sig* 7: 9-15

Grant M, Kravits K (2000) Symptoms and their impact on nutrition. *Seminars in Oncology Nursing* 16: 113-121

Groundwater P, Beck SA, Barton C, Adamson C, Ferrier IN, Tisdale MJ (1999) Alteration of serum and urinary lipolytic activity with weight loss in cachectic cancer patients. *British Journal of Cancer* 62: 816-821

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D (1995) Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269: 543-646

Hale LP, Price DT, Sanchez LM, Demark-Wahnefried W, Madden JF. (2001) Zinc alpha-2-glycoprotein is expressed by malignant prostatic epithelium and may serve as a potential serum marker for prostate cancer. *Clin Cancer Res* 7: 846-53

Hale LP (2002) Zinc alpha-2-glycoprotein regulates melanin production by normal and malignant melanocytes. *J Invest Dermatol* 119: 464-470

Hales CN, Luzio JP, Siddle K (1978) Hormonal control of adipose tissue lipolysis. *Biochem Soc Symp* 43: 97-99

Hammerlid E, Wirblad B, Sandin C (1998) Malnutrition and food intake in relation to quality of life in head and neck cancer patients. *Head Neck* 20: 540-548

Hanada T, Toshinai K, Date Y, Kajimura N, Tsukada T, Hayashi Y (2004) Upregulation of ghrelin expression in cachectic nude mice bearing human melanoma cells. *Metabolism* 53: 84-88

Harvey KB, Moldawer LL, Bistran BR, Blackburn GL (1981) Biological measures for the formulation of a hospital prognostic index. *Am J Clin Nutr* 34: 2013-2022

Hassan I, Waheed A, Yadav S, Singh TP, Ahmad F (2008) Zinc  $\alpha$ 2-Glycoprotein: A Multidisciplinary Protein. *Molecular Cancer Research*: 6: 892-906

Haurer H (1992) Physiology of the fat cell, with emphasis on the role of growth hormone. *Acta Paediatr* 383: 47-51

Haurer H (2004) The new concept of adipose tissue function. *Physiology & Behavior* 83: 653-658

Heber D, Tchekmedyan N (1992) Pathophysiology of cancer: hormonal and metabolic abnormalities. *Oncology* 49 Suppl2: 28-31

He N, Brysk H, Tying SK (2001) Zinc- (2)-glycoprotein hinders cell proliferation and reduces cdc2 expression. *J Cell Biochem* 81:162–9

Hinsch KD, Rosenthal W, Spicher K, Binder T, Gausepohl H, Frank R, Schultz G, Joost HG (1988) Adipose plasma membranes contain two Gi subtypes but are devoid of Go. *FEBS Lett* 238 : 191-196

Hirai K, Hussey HJ, Barber MD, Price SA, Tisdale MJ (1998) Biological evaluation of a lipid-mobilizing factor isolated from the urine of cancer patients. *Cancer Research* 58: 2359-2365

Holmes S, Dickerson JWT (1987) Malignant disease: nutritional implications of disease and treatment. *Cancer Metastasis Reviews* 6: 357-381

Holmes S (1993) Food avoidance in patients undergoing cancer chemotherapy. Supportive Care in cancer 1: 326-330

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. Science 259: 87-91

Howe R (1993)  $\beta$ 3-Adrenergic agonists. Drugs Future 18:529-549

Hube F, Lietz U, Igel M, Jensen PB, Tornqvist H, Joost HG, Hauner H (1996) Difference in leptin mRNA levels between omental and subcutaneous abdominal adipose tissue from obese humans. Horm Metab Res 28 (12): 690-693

Huhmann MB, Cunningham RS (2005) Importance of nutritional screening in treatment of cancer-related weight loss. Lancet Oncol 6:334-343

Hwang CS, Lane MD (1999) Up-regulation of uncoupling protein-3 by fatty acid in C2C12 myotubes. Biochem Biophys Res Commun 258: 464-469

Hyltander A, Drott C, Korner U, Sandstrom R, Lundholm K (1991) Elevated energy expenditure in cancer patients with solid tumours. European Journal of Cancer 27: 9-15

Ingenbleek Y, Van Den Schrieck HG, De Nayer P, De Visscher M (1975). Albumin, transferrin and the thyroxine-binding prealbumin/retinol-binding protein (TBPA-RBP) complex in assessment of malnutrition. Clin Chim Acta 63 (1): 61-67

Irmak S, Tilki D, Heukeshoven J, Oliveira-Ferrer L, Friedrich M, Huland H, Ergün S (2005) Stage-dependent increase of orosomucoid and zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein in urinary bladder cancer. Proteomics 5: 4296-4304

Ishiko O, Sugawa T, Tatsuta I, Shimura K, Naka K (1987) Anemia-inducing substance (AIS) in advanced cancer: inhibitory effect of AIS on the function of erythrocytes and immunocompetent cells. JPN J Cancer Res 78: 596-606



Ishiko O, Yasui T, Hirai K, Honda K, Sumi T, Nishimura S, Ogita S (1999) Lipolytic activity of anemia-inducing substance from tumor-bearing rabbits. *Nutr cancer* 33: 201-205

Islam-Ali B, Khan S, Price SA, Tisdale MJ (2001) Modulation of adipocyte G-protein expression in cancer cachexia by a lipid-mobilising factor (LFM). *British Journal of Cancer* 85: 758-763

Islam-Ali BS, Tisdale MJ (2001a) Effect of a tumour-produced lipid-mobilizing factor on protein synthesis and degradation. *Br J Cancer* 84: 1648-1655

Islam-Ali B, Khan S, Price SA, Tisdale MJ (2001b) Modulation of adipocyte G-protein expression in cancer cachexia by a lipid-mobilizing. *Br J Cancer* 85: 758-763

Jirka M, Blanicky P (1980) Polymorphism of human serum Zn- 2-glycoprotein and its behaviour during ontogenesis using quantitative crossed starch gel immunoelectrophoresis. *Clin Chim Acta* 103:61–6

Kamoshida S, Watanabe K, Suzuki M, Mizutani Y, Sakamoto K, Sugimoto Y, Oka T, Fukushima M, Tsutsumi Y (2006) Expression of cancer cachexia-related factors in human cancer xenografts: an immunohistochemical analysis. *Biomedical Research* 27 (6) 275-281

Kawakami N, Haratani T, Kaneko T, Koizumi A (1987) Relationship between health practices and depressive mood among industrial workers. *29: 55-63*

Khan S, Tisdale MJ (1999) Catabolism of adipose tissue by a tumour-produced lipid mobilizing factor. *Int J Cancer* 80: 444-447

Klein S, Wolfe RR (1990) Whole-body lipolysis and triglyceride-fatty acid cycling in cachectic patients with esophageal cancer. *J Clin Invest* 86: 1403-1408

Knapp ML, Al-Sheibani S, Riches PG, Hanham IWF, Phillips RH (1991) Hormonal factors associated with weight loss in patients with advanced breast cancer. *Ann Clin Biochem* 28:480-486

Korbonits M, Grossman AB (2004) Ghrelin update on a novel hormonal system. *Eur J Endocrinol* 151: 67-70

Kotler DP (2000) Cachexia. *Ann Intern Med* 133: 622-634

Kralovic RC, Zepp EA, Cenedella RJ (1977) Studies of the mechanism of carcass fat depletion in experimental cancer. *Eur J Cancer* 13: 1071-1079

Lacasa D, Agli B, Giudicelli Y (1988) Permissive action of glucocorticoids on catecholamine-induced lipolysis: direct in vitro effects on the fat cell  $\beta$ -adrenoreceptor-coupled-adenylate cyclase system. *Biochem Biophys Res Commun* 153: 489-497

Langer CJ, Hoffman JP, Ottery FD (2001) Clinical significance of weight loss in cancer patients: rationale for the use of anabolic agents in the treatment of cancer-related cachexia. *Nutrition* 17: 1-20

Langstein HN, Doherty GM, Franker DL, Buresh CM, Norton JA (1991) The role of  $\gamma$ -interferon and tumor necrosis factor- $\alpha$  in an experimental rat model of cancer cachexia. *Cancer Res* 51: 2302-2306

Lee FY, Li Y, Zhu H, Yang S, Lin HZ, Trush M, Diehl AM (1999) Tumor necrosis factor increases mitochondrial oxidant production and increases expression of uncoupling protein-2 in the regeneration mice liver. *Hepatology* 29: 677-687

Legaspi A, Jeevanandam M, Starnes HF, Brennan MF (1987) Whole-body lipid and energy metabolism in the cancer patient. *Metabolism* 36: 958-963

Lei G, Arany I, Selvanayagam P (1997) Detection and cloning of epidermal zinc- 2-glycoprotein cDNA and expression in normal human skin and in tumors. *J Cell Biochem* 67:216–22

Lei G, Arany I, Tyring SK (1998) Zinc- 2-glycoprotein has ribonuclease activity. *Arch Biochem Biophys* 355:160–4

Levitzki A (1987) Regulation of adenylat cyclase by hormones and G-proteins. *Fed Eur Biochem Soc Lett* 211: 113-118

Ling PR, Schwartz JH, Bistran BR (1997) Mechanisms of host wasting induced by administration of cytokines in rats. *American Journal of Physiology* 272: 333-339

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the Method. *Methods* 25: 402-408

Llovera M, Garcia-Martinez C, Costelli P, Agell N, Carbo N, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM (1996) Muscle hypercatabolisme during cancer cachexia is not reversed by the glucocorticoid receptor antagonist RU38486. *Cancer Lett* 99:7-14

Lopez-Boado YS, Diez-Itza I, Tolivia J, Lopez-Otin C (1994) Glucocorticoids and androgens up-regulated the Zn-alpha 2-glycoprotein mRNA in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 29: 247-258

López-Soriano J, Carbó N, Tessitore L, López-Soriano FJ, Argilés JM (1999) Leptin and tumour growth in the rat. *Int J Cancer* 81: 726-729

Lorite MJ, Drake JL, Carling G, Tisdale MJ (1998) Mechanism of muscle protein degradation induced by a cancer cachectic factor. *British Journal of Cancer* 78: 850-856

Marrades MP, Martinez JA, Moreno-Aliaga MJ (2008) ZAG, a lipid mobilizing adipokine, is downregulated in human obesity. *J Physiol Biochem* 64: 61-66

Matarese G, La Cava A (2004) The intricate interface between immune system and metabolism. *Trends Immunol* 25: 193-200

Matthys P, Dijkmans R, Proost P, Van Damne J, Heremans H, Sobis H, Billiau A (1991a) Severe cachexia in mice inoculated with interferon- $\gamma$  producing tumour cells. *Int J Cancer* 49: 77-82

Matthys P, Heremans H, Opdenakker G, Billiau A (1991b) Anti-interferon- $\gamma$  antibody treatment, growth of Lewis lung tumours in mice and tumour-associated cachexia. *Eur J Cancer* 27: 182-187

Maureen B, Huhmann MS, Cunningham RS (2005) Importance of nutritional screening in treatment of cancer-related weight loss. *The Lancet Oncology* 6: 334-343

Mazoujian G (1990) Immunohistochemistry of GCDFP-24 and zinc 2 glycoprotein in benign sweat gland tumors. *Am J Dermatopathol* 12:452-7

McDermott LC, Freel JA, West AP, Bjorkman PJ, Kennedy MW (2006) Zn-a2-glycoprotein, an MHC Class I-Related Glycoprotein Regulator of Adipose Tissues: Modification or Abrogation of Ligand Binding By Site-Directed Mutagenesis. *Biochemistry* 45: 2035-2041

McDevitt TM, Tisdale MJ (1992) Tumour-associated hypoglycaemia in a murine cachexia model. *Br J Cancer* 66: 815-820

Millet L, Vidal H, Andreelli F, Larrouy D, Riou JP, Ricquier D, Laville M, Langin D (1997) Increased uncoupling protein-2 and -3 mRNA expression during fasting in obese and lean humans. *J Clin Invest* 100(11): 2665-2670

Molassiotis A, Holmes HS (2005) Management of cancer-associated malnutrition. *European Journal of Oncology Nursing* 9: 33-34

Montague CT, Prins JB, Sanders L, Zhang J, Sewter CP, Digby J, Byrne CD, O'Rahilly S (1998) Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes* 47(9): 1384-1391

Mulligan HD, Mahony SM, Ross JA, Tisdale MJ (1992) Weight loss in a cachexia model is not associated with the cytokines tumour necrosis factor- $\alpha$  or interleukin-6. *Cancer Lett* 65: 239-243

Muscaritoli M, Bossola M, Aversa Z, Bellantone R, Fanelli RF (2006) Prevention and treatment of cancer cachexia: New insights into an old problem. *European Journal of Cancer* 42: 31-41

Nadler ST, Stoehr JP, Schueler KL, Tanimoto G, Yandell BS, Attie AD (2001) The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus. *PNAS* 97: 11371-11376

Nelson K (2000) The Cancer-Anorexia-Cachexia Syndrome. *Seminars in Oncology* 27: 64-69

Nisoli E, Tonello C, Landi M, Carruba MO (1996) Functional studies of the first selective  $\beta$ 3adrenergic receptor antagonist SR59230A in rat brown adipocytes. *Mol Pharmacol* 49: 7-14

Todorov PT, McDevitt TM, Meyer DJ, Ueyama H, Ohkubo I, Tisdale MJ (1988) Purification and characterization of a tumor lipid-mobilizing factor. *Cancer Research* 58: 2353-2358

Ohkubo I, Niwa M, Takashima A (1990) Human seminal plasma Zn-2-glycoprotein: its purification and properties as compared with human plasma Zn-2-glycoprotein *Biochim Biophys Acta* 1034:152-6

Osamu I, Toshiyuki S, Hiroyuki Y, Kouzo H, Ken-ichi H, Yoshinari M, Sachio O (2000) Anemia-Inducing Substance Is Related to Elimination of Lipolytic Hyperactivity by Cyclic Plasma Perfusion in Human Cancer Cachexia *Cancer* 37(2): 169-172

Padilla GV (1986) Psychological aspects of nutrition and cancer. *The Surgical Clinics of North America* 66: 1121-1135

Pederson SB, Borglum JD, Kristensen K, Norrelund H, Otto J, Jorgensen L, Richelsen B (2000) Regulation of uncoupling protein (UCP) 2 and 3 in adipose and muscle tissue by fasting and growth hormone treatment in obese humans. *Int J Obes Metab Disord* 24 (8): 968-975

Pederson SB, Kristensen K, Richelsen B (2003) Anti-glucocorticoid effects of progesterone in vivo on rat adipose tissue metabolism. *Steroids* 68:543-550

Peluso G, Nicolai R, Reda E, Bennati P, Barbarisi P, Calvani M (2000) Cancer and anticancer therapy-induced modifications on metabolism mediated by carnitine system. *J Cell Physiol* 182: 339-350

Plata-Salaman CR (2000) central nervous system mechanisms contributing to the cachexia-anorexia syndrome. *Nutrition* 16: 1009-1012

Pond CM (2003) Paracrine relationships between adipose and lymphoid tissues: implications for the mechanism of HIV-associated adipose redistribution syndrome. *Trends Immunol* 24: 13-18

Poortmans JR, Schmid K (1968) The level of Zn-a<sub>2</sub>-glycoprotein in normal fluids and kidney extract. *J Lab Clin Med* 71: 807-813

Porrás A, Valladares A, Alvarez AM, Roncero C, Benito M (2002) Differential role of PPAR $\gamma$  in the regulation of UCP-1 and adipogenesis by TNF- $\alpha$  in brown adipocytes. *Fed Eur Biochem Soc Lett* 520: 58-62

Price SA, Tisdale MJ (1998) Mechanism of inhibition of a tumour lipid-mobilizing factor by eicosapentaenoic acid. *Cancer Res* 58: 4827-4831

Ravasco P, Monteiro-Grillo I, Vidal PM, Camilo ME (2003) Nutritional deterioration in cancer: the role of disease and diet. *Clin Oncol* 15 (8): 443-450

Richieri GV, Kleinfeld AM (1995) Unbound free fatty acids in human serum. *J. Lipid Res.* 36: 229-240

Ricquier D, Bouillaud F (2000) The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem* 345: 161-179

Rolli V, Radosavljevic M, Astier V, Macquin C, Castan-Laurell I, Visentin V, Guigne C, Carpene C, Valet P, Gilfillan S, Bahram S (2007) Lipolysis is altered in MHC class I zinc-alpha(2)-glycoprotein deficient mice, *FEBS Lett.* **581**: 394–400

Rothwell NJ, Stock MJ (1984) Brown adipose tissue. *Recent Adv. Physiol.* 10: 349-384

Russell ST, Hirai K, Tisdale MJ (2002) Role of  $\beta$ 3-adrenergic receptors in the action of a tumour lipid mobilizing factor. *British Journal of Cancer* 86: 424-428

Russell ST, Tisdale MJ (2002) Effect of a tumour-derived lipid-mobilising factor on glucose and lipid metabolism in vivo. *British Journal of Cancer* 87: 580-584

Russell ST, Zimmerman TP, Domin BA, Tisdale MJ (2004) Induction of lipolysis in vitro and loss of body fat in vivo by zinc-alpha(2)-glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1636: 59-68

Russell, ST, Tisdale, MJ (2005) The role of glucocorticoids in the induction of zinc-alpha(2)-glycoprotein expression in adipose tissue in cancer cachexia. *British Journal of Cancer* 92: 876-881

Russell ST, Tisdale MJ (2005) Effect of eicosapentaenoic acid (EPA) on expression of a lipid mobilizing factor in adipose tissue in cancer cachexia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 72:409–14

Sanchez LM, Vizoso F, Diez-Itza I, Lopez-Otin C (1992) Identification of the major protein components in breast secretions from women with benign and malignant breast diseases. *Cancer Res* 52:95–100

Sanchez LM, Lopez-Otin C, Bjorkman PJ (1997) Biochemical characterization and crystallization of human Zn- $\alpha$ 2-glycoprotein, a soluble class I major histocompatibility complex ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4626-4630

Sanchez LM, Chirino AJ, Bjorkman PJ (1999) Crystal structure of human ZAG, a fat-depleting factor related to MHC molecules. *Science* 283: 1914-1919

Sanchis D, Busquets S, Alvarez B, Ricquier D, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Skeletal muscle UCP2 and UCP3 gene expression in a rat cancer cachexia model. *Fed Eur Biochem Soc Lett* 431 : 415-418

Sanders PM, Tisdale MJ (2004) Effect of zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein (ZAG) on expression of uncoupling proteins in skeletal muscle and adipose tissue. *Cancer Letters* 212: 71-81

Serradeil-Le Gal C, Lafontan M, Raufaste D, Marchand J, Pouzet B, Casellas P, Pascal M, Maffrand J, Le Fur G (2000) Characterization of NPY receptors controlling lipolysis and leptin secretion in human adipocytes. *FEBS Letters* 475: 150-156

Schrauwen P, Schaart G, Saris WH, Sliker LJ, Glatz JF, Vidal H, Blaak EE (2000) The effect of weight reduction on skeletal muscle UCP2 and UCP3 mRNA expression and UCP3 protein content in Type II diabetic subjects. *Diabetologia* 43(11): 1408-1416

Schrauwen P, Hoppeler H, Billeter R, Bakker AH, Pendergast DR (2001) Fiber type dependent upregulation of human skeletal muscle UCP2 and UCP3 mRNA expression by high-fat diet. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25(4): 449-456



Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, Kuijper JL, Foster D, Lasser G (1996) Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes* 45: 531-535

Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404: 661-671

Schwick HG, Haupt H (1981) Purified human plasma proteins of unknown function. *Jpn J Med Sci Biol* 34:299–327

Shellock FG, Riedinger MS, Fishbein MC (1986) Brown adipose tissue in cancer patients: possible cause of cancer-induced cachexia. *J Cancer Res Clin Oncol* 111: 82-85

Shibata S, Miura K (1982) Nephritogenic glycoprotein IX. Plasma Zn-a<sub>2</sub>-glycoprotein as a second source of nephritogenic glycoprotein in urine. *Nephron* 31: 170-180

Statnick MA, Beavers LS, Conner LJ, Corominola H, Johnson D (2000) Decreased expression of apM1 in omental and subcutaneous adipose tissue of humans with type 2 diabetes. *International Journal of Reproduction and Diabetes Research* 1: 51-59

Strain AJ (1979) Cancer cachexia in man: a review. *Invest Cell Pathol* 2: 181-193

Strassmann G, Fong M, Kenney JS, Jacob CO (1992) Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. *J Clin Invest* 89: 1681-1684

Svaninger G, Ghelin J, Lundholm K (1987) Tumor-host wasting not explained by adrenal hyperfunction in tumor-bearing animals. *J Natl Cancer Inst* 79: 1135-1141

Tada T, Ohkubo I, Niwa M, Sasaki M, Tateyama H, Eimoto T (1991) Immunohistochemical localization of Zn-a<sub>2</sub>-glycoprotein in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 39: 1221-1226 (162, 3 5 7 9)

Thompson MP, Cooper ST, Parry BR, Tuckey JA (1993) Increased expression of the mRNA for the hormone-sensitive lipase in adipose tissue of cancer patients. *Biochim Biophys Acta* 1180: 236-242

Tilg H, Moschen AR (2006) Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature* 6:772-783

Tisdale MJ (2001) Cancer anorexia and cachexia. *Nutrition* 17: 438-442

Tisdale MJ (2002) Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2: 862-871

Tisdale MJ (2003) Pathogenesis of cancer cachexia. *J Support Oncol* 1: 159-168

Todorov P, Cariuk P, Mc Devitt T, Coles B, Fearon K und Tisdale M (1996) Characterization of a cancer cachectic factor. *Nature* 379: 739-742

Todorov PT, Mc Devitt TM, Meyer DJ, Ueyama H, Ohkubo I, Tisdale MJ (1998) Purification and characterization of a tumour lipid-mobilizing factor. *Cancer Res* 58: 2352-2358

Trayhurn P, Beattie JH (2001) Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 60: 329-339

Tzanavari T, Bing C, Trayhurn P (2007) Postnatal expression of zinc- $\alpha_2$ -glycoprotein in rat white and brown adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol.* 41 (4-5): 313-316

Ueyama H, Niwa M, Tada T (1991) Cloning and nucleotide sequence of a human Zn- $\alpha_2$ -glycoprotein cDNA and chromosomal assignment of its gene. *Biochem Biophys Res Commun* 177:696–703

Ueyama H, Naitoh H, Ohkubo I (1994) Structure and expression of rat and mouse mRNAs for Zn-alpha 2-glycoprotein. *J. Biochem.*116: 677–681

Varela P, Slobodianik N, Pallaro A, Marcos A, Barbeito S, Taberner P, Marino P,

Franchello A, Ramos O (1997) Some nutritional parameters in adolescent females suffering from obesity or anorexia nervosa: a comparative study. *World Rev Nutr Diet.* 82:168-74.

Van Bokhorst-de van der Schueren MAE (2005) Nutritional support strategies for malnourished cancer patients. *European Journal of Oncology Nursing* 9: 75-83

Van Cutsem E, Arends J (2005) The causes and consequences of cancer-associated malnutrition. *European Journal of Oncology Nursing* 9: 51-63

Vandesompele J, De Paepe A, Speleman F (2002) Elimination of primer-dimer artefacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR. *Anal Biochem*: 307: 63-69

Van der Lee KAJM, Willemsen PMH, Van der Vusse GJ, Bilsen MV (2000) Effects of fatty acids on uncoupling protein-2 expression in the rat heart. *Fed Am Soc Exp Biol J* 14: 495-502

Wellen KE, Hotamisligil GS (2005) Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115: 1111-1119

Vidal-Puig A, Rosenbaum M, Considine RC, Leibel RL, Dohm GL, Lowell BB (1999) Effects of obesity and stable weight reduction on UCP2 and UCP3 gene expression in humans. *Obes Res* 7 (2): 133-140

Vinci E, Rampello E, Zanolli L, Oreste G, Pistone G, Malaguarnera M (2005) Serum Carnitine levels in patients with tumoral cachexia. *European Journal of Internal Medicine* 19: 419-423

von Meyenfeldt M (2005) Cancer-associated malnutrition: An introduction. *European Journal of Oncology Nursing* 9: 35-38

World Health Organization news (WHO) (2003) World Health Organization news release. <http://www.who.int/mediacentre/news/release/2003/pr27/en/>

Williams ML, Torres-Duarte A, Brant LJ, Bhargava P, Marshall J, Wainer IW (2004) The relationship between a urinary cachectic factor and weight loss advanced cancer patients. *Cancer Investigation* 22: 866-870

Wing SS, Goldberg AL (1993) Glucocorticoids activate the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic system in skeletal muscle during fasting. *Am J Physiol* 264: 668-676

Wisse BE, Schwartz MW, Cummings DE (2003) Melanocortin signaling and anorexia in chronic disease states. *Ann NY Acad Sci* 994: 275-281

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitmann ML, Froguel P, Kadowaki T (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 7: 941-946

Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY, Chuang LM (2001) Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 3815-3819

Yi Bao, Chen Bing, Leif Hunter, John R. Jenkins, Martin Wabitsch and Paul Trayhurn (2005) Zinc-alpha2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed and secreted by human (SGBS) adipocytes. *FEBS Letters* 579: 41-47

Young GA, Hill GL (1978) Assessment of protein-calorie malnutrition in surgical patients from plasma proteins and anthropometric measurements. *Am J Clin Nutr* 31 (3): 429-435

Zaki MH, Nemeth JA, Trikha M (2004) CNTO 328, a monoclonal antibody to IL-6, inhibits human tumor-induced cachexia in nude mice. *Int J Cancer* 111: 592-595

## **Danksagung**

Ohne die Unterstützung und Hilfe von vielen Seiten hätte ich diese Arbeit nicht durchführen können.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Univ.- Prof. Dr. med. Hans Hauner, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir dieses interessante Thema gestellt hat.

Meinem Betreuer Herrn Dr. med. Thomas Skurk danke ich für seine grossartige Einführung zu Beginn der Arbeit und für die enorme Unterstützung im weiteren Verlauf bis zur Vollendung.

Ein großer Dank gilt auch den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe am Lehrstuhl der Klinik für Ernährungsmedizin in Freising und dem chirurgischen Team am Klinikum Freising allen voran Dr. med. Florian Zeller.

Ohne das Engagement von Herrn Bernhard Haller vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie am Klinikum rechts der Isar der TU München, ich durfte stets auf seine Unterstützung zählen.

Abschliessend gebührt ein besonderer Dank meiner Familie. Ohne die Wegbereitung meiner lieben Eltern, Eva-Maria und Prof. Dr. med. Manfred Neher wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Sie ermöglichten mir mein Studium, was als Zweitausbildung in keinsten Weise selbstverständlich ist, und waren immer für mich da.

Ein ganz herzlicher Dank gilt meinen grossartigen Geschwistern Philipp, Edith, Friederike und Agnes als auch all ihren lieben Partnern. Sie gaben mir stets fantastische Unterstützung und viel Liebe.

Zuletzt danke ich meinem lieben Freund André Arnold. Er sorgte für den sportlichen Ausgleich und die stete emotionale Begleitung.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift