

Aus dem Lehrstuhl
für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
Direktor: Prof. Dr. Ralph Burkhardt
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Untersuchungen zum Einfluss von sekretierten Faktoren des
Fettgewebes auf die Genexpression von *ANGPTL4* und weiteren
PPAR-Zielgenen in triple-negativen Brustkrebszellen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lena Kreisel

2025

Aus dem Lehrstuhl
für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
Direktor: Prof. Dr. Ralph Burkhardt
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Untersuchungen zum Einfluss von sekretierten Faktoren des
Fettgewebes auf die Genexpression von *ANGPTL4* und weiteren
PPAR-Zielgenen in triple-negativen Brustkrebszellen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lena Kreisel

2025

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Ralph Burkhardt
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Christoph Brochhausen-Delius
Tag der mündlichen Prüfung:	20.02.2026

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
1.1. Brustkrebs – die häufigste Tumorart bei Frauen	3
1.2. Fettgewebe und Adipositas	5
1.2.1. Die Funktion von Fettgewebe	5
1.2.2. Der Einfluss von Adipositas auf das Fettgewebe	6
1.3. Die Rolle von Fettgewebe in der Progression des Mammakarzinoms	7
1.4. Die Rolle von Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs) in Brustkrebszellen	9
1.4.1. Das PPAR-Zielgen Angiopoetin-like-4 (ANGPTL4)	11
1.4.2. Weitere untersuchte PPAR-Zielgene	12
1.5. Fragestellung der Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Materialien und Geräte	15
2.2. Methoden	18
2.2.1. Zellkultur humaner Brustkrebszellen	18
2.2.2. Herstellung von durch Fettgewebe konditioniertem Medium (ACM)	19
2.2.3. Behandlung mit ACM	19
2.2.4. Herstellung von Zellen mit stabiler Überexpression bzw. Depletion (Knockdown) von <i>ANGPTL4</i>	20
2.2.5. RNA Isolation, cDNA Synthese und qPCR	23
2.2.6. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	24
2.2.7. ANGPTL4 Immunfluoreszenz	25
2.2.8. Durchflusszytometrie und Zellsorting	25
2.2.9. Statistik	26

3. Ergebnisse	27
3.1. Der Einfluss von durch Fettgewebe sekretierten Faktoren auf die Genexpression von PPAR-Zielgenen in humanen triple-negativen Brustkrebszellen	27
3.2. Stabiler Knockdown und Überexpression von <i>ANGPTL4</i> in der triple-negativen Brustkrebszelllinie HCC38	35
3.2.1. Stabiler Knockdown von <i>ANGPTL4</i>	35
3.2.2. Stabile Überexpression von <i>ANGPTL4</i>	38
4. Diskussion	44
5. Zusammenfassung	52
6. Literaturverzeichnis	55
7. Anhang	62

1. Einleitung

1.1. Brustkrebs – die häufigste Tumorart bei Frauen

Das Mammakarzinom ist die häufigste diagnostizierte Tumorart und die häufigste krebsbedingte Todesursache bei Frauen (1–3). Eine von acht Frauen erkrankt in ihrem Leben an Brustkrebs (4). Es wird ein Anstieg der Inzidenz um 33,8 % bis 2040 prognostiziert, wodurch die globale Bedrohung und Relevanz weiter zunimmt (5,6). Die Genese des Mammakarzinoms ist multifaktoriell und beinhaltet sowohl nicht beeinflussbare als auch beeinflussbare Faktoren (3,7). Weniger als 10% der Brustkrebs-Fälle sind auf vererbte Genmutationen sowie familiäre Vorbelastung zurückzuführen (2,5). Das weibliche Geschlecht und das fortschreitende Alter sind die beiden wichtigsten, nicht beeinflussbaren Risikofaktoren für die Entstehung von Brustkrebs (6). In epidemiologischen Studien konnte eine Reihe von modifizierbaren Risikofaktoren identifiziert werden, wie z.B. Alkoholkonsum, Adipositas, fettreiche Ernährung, fehlende körperliche Betätigung, Anzahl und Zeitpunkt der Geburten, sowie das Stillen und die Verwendung von Hormonpräparaten (2,5,8–10).

Das Mammakarzinom stellt auf molekularer und zellulärer Ebene eine äußerst heterogene und komplexe Erkrankung dar, wobei die Prognose je nach Subtyp stark variieren kann (11,12). Durch die Anwendung verschiedener histologischer Analysen und molekularbiologischer Methoden konnte das Mammakarzinom in den letzten beiden Jahrzehnten in verschiedene Kategorien eingeteilt werden (13,14). Die zugrunde gelegten Hauptmerkmale sind das Vorhandensein des Hormonrezeptors für Östrogen und/oder Progesteron und die Überexpression des Gens *ERBB2* (Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2) (13,14). Hiermit lässt sich das Mammakarzinom in 3 Klassen einteilen (12). Mit 70% stellt der Hormonrezeptor-positive Subtyp (HR+), bei dem der Östrogenrezeptor und/oder der Progesteronrezeptor exprimiert werden, jedoch ohne eine *ERBB2* Überexpression, den größten Anteil dar (12,13). Hierbei ist die Inzidenz bei postmenopausalen Frauen höher als bei prämenopausalen (13). Den zweitgrößten Anteil hat der Subtyp mit einer *ERBB2* Überexpression (*ERBB2+*) mit 15-20%. Wenn keiner dieser drei Standard Marker exprimiert wird, d.h. weder eine Hormonrezeptor Expression, noch eine *ERBB2* Überexpression zu finden sind, wird dies als triple-negativer Brustkrebs (TNBC) bezeichnet, der 15% aller Brustkrebsfälle ausmacht (12,13). TNBC ist eine sehr aggressive und heterogene Form des Mammakarzinoms, die sich in weitere Subtypen charakterisieren lässt, die

unterschiedlich auf die verschiedenen Behandlungsmethoden ansprechen. Lehman et al. identifizierten 4 Subtypen; 2 basale Subtypen, einen mesenchymalen stammzell-ähnlichen und einen luminalen Androgenrezeptor-Typ (15,16).

Die Diagnosestellung in frühen Erkrankungsstadien erhöht die Überlebenschancen stark (2). Die WHO empfiehlt alle 2 Jahre eine Mammographie für Frauen im Alter zwischen 50 und 69 Jahren, um einen möglichen Tumor früh erkennen zu können (1). Zur Diagnostik werden der lokale Tastbefund, die Mammographie, die Sonographie der Brust und eine Biopsie herangezogen, um den Subtyp identifizieren zu können und aus den verschiedenen Therapiemöglichkeiten die passende Kombination auswählen zu können (2,13). Klinisch kann sich das Mammakarzinom durch tastbare Knoten in der Brust, vergrößerte axilläre Lymphknoten, Asymmetrie der Brüste, Einziehungen der Brustwarze, Sekretion aus der Brustwarze, ein Erythem der Brust oder einer Verdickung und Entzündung der Haut (peau d'orange) zeigen (13).

Die Standardtherapie des nicht-metastasierten Mammakarzinoms besteht aus einer lokalen Tumorresektion mit Erhalt der Brust, einer Resektion der lokalen Lymphknoten in der Axilla bei Befall des Wächterlymphknotens, sowie einer postoperativen Strahlentherapie (13,17). Die früher standardmäßig durchgeführte Mastektomie wird heutzutage nur noch bei sehr großen Tumoren angewandt, wenn die brusterhaltende Operation aufgrund von Komorbiditäten nicht durchgeführt werden kann oder wenn eine postoperative Strahlentherapie nicht möglich ist (13). Neben der lokalen Therapie ist ein weiterer wesentlicher Bestandteil der Therapie eine adjuvante und/oder neoadjuvante Systemtherapie (13,17). Hierbei ist der molekulare Subtyp des Mammakarzinoms von entscheidender klinischer Bedeutung, da jeder Subtyp je nach seinen molekularen Eigenschaften einer hierzu passenden Therapie bedarf (13,17).

Das HR+ Mammakarzinom ist durch die Expression des Östrogen-Rezeptors alpha ($ER\alpha$), ein Steroid Hormon Rezeptor und Transkriptionsfaktor, charakterisiert (13). Der Ligand des $ER\alpha$ ist Östrogen und bei der Bindung werden onkogene Signalwege aktiviert, die die Progression von Brustkrebszellen fördern (13). Durch eine systemische endokrine Therapie über 5-10 Jahre mit z.B. einem selektiven Östrogenrezeptor-Modulator und/oder einem Aromatase-Inhibitor wird durch die Suppression des Östrogensignalwegs die hormonabhängige Tumorprogression gehemmt (12,13,17). Die 5-Jahres Überlebensrate des nicht-metastasierten HR+ Mammakarzinoms in Stadium I ist > 99% und hat somit eine sehr gute Prognose (13).

Der ERBB2+ Subtyp hat mit einer 5-Jahres Überlebensrate von >94% im nicht metastasiertem Stadium I eine ähnlich gute Prognose (13). Die Therapie des ERBB2+ Subtyps besteht aus einer Kombination aus Chemotherapie und der Gabe eines Antikörpers gegen ERBB2 (13).

Das triple-negative Mammakarzinom (TNBC) ist die aggressivste Form mit einem hohen Metastasierungspotential und hat im metastasierten Stadium lediglich eine mittlere Überlebensrate von 10-13 Monaten, ist also mit einer deutlich schlechteren Prognose verbunden als die anderen Subtypen und betrifft häufig jüngere, prämenopausale Frauen (13,16,18). Aufgrund der molekularen Heterogenität ist es eine Herausforderung, zielgerichtete Therapien für das TNBC zu entwickeln und die einzige systemische Therapieoption bei diesem Subtyp ist die Chemotherapie (13,18). Weitere Untersuchungen dieses heterogenen Subtyps auf molekularer Ebene sind daher essentiell, um in Zukunft potentielle Signalwege und Angriffspunkte für zielgerichtete Therapien des TNBC identifizieren zu können.

1.2. Fettgewebe und Adipositas

1.2.1. Die Funktion von Fettgewebe

Das Fettgewebe kann aufgrund seiner Morphologie in drei verschiedene Subtypen unterteilt werden. Das braune Fettgewebe, das vor allem bei Neugeborenen zu finden ist, besitzt eine hohe Anzahl an Mitochondrien und hat die spezielle Fähigkeit, aus im Fettgewebe gespeicherter Energie Wärme zu produzieren (19). Das weiße Fettgewebe, die vorherrschende Fettgewebsart beim Erwachsenen, dient als Speicherort von überschüssiger Energie in Form von Lipiden (19,20). Die dritte Fettgewebsart, das beige Fettgewebe, beschreibt das Vorkommen von braunen Fettgewebszellen in weißem Fettgewebe (19). Diese Fettgewebsart ist Gegenstand aktueller Forschung und muss hinsichtlich Funktion und Ursprung noch genauer charakterisiert werden.

Das Fettgewebe lässt sich auch hinsichtlich seiner Lokalisation in subkutanes und viszerales Fettgewebe klassifizieren. Das subkutane Fettgewebe macht bei normalgewichtigen, gesunden Personen etwa 80% des Gesamtfettgewebes aus und befindet sich unter der Haut. Den kleineren Anteil bei normalgewichtigen, gesunden Menschen bildet das viszerale Fettgewebe, das sich in der Bauchhöhle befindet und die dort befindlichen Organe umgibt (19,21). In beiden Lokalisationen erfüllt das

Fettgewebe multiple Funktionen. Es dient als Speicher für überschüssige Energie in Form von Triglyceriden und stellt die Energie im Falle eines erhöhten Energiebedarfs oder einer zu geringen Energiezufuhr bereit (19,22). Das subkutane Fettgewebe dient aufgrund seiner Lokalisation direkt unter der Haut als Isolationsschicht, als Barriere für Hautinfektionen sowie als Polster bei externem, lokalem mechanischem Stress (19). Neben der Speicherung von Triglyceriden ist das Fettgewebe ein stark endokrin aktives Gewebe, das aus zwei verschiedenen Zellfraktionen besteht (19,21,23). Die Adipozyten können neben der Speicherung und Sekretion von Lipiden auch Hormone wie Adiponektin und Leptin produzieren und freisetzen und somit ihre direkte Umgebung sowie über den Blutstrom auch distale Gewebe und Organe beeinflussen (23). Die stromal-vaskuläre Fraktion setzt sich aus verschiedenen Zelltypen wie Präadipozyten, Endothelzellen, Makrophagen sowie weiteren Immunzellen zusammen (19,23). Auch diese Zellen können eine Reihe von Wachstumsfaktoren und Zytokinen produzieren und freisetzen (19,23). Somit hat das Fettgewebe neben der Beteiligung an der Energiehomöostase auch eine komplexe Funktion im Stoffwechsel und nimmt Einfluss auf viele Prozesse im Körper (23).

Viszerales und subkutanes Fettgewebe unterscheiden sich in ihrer metabolischen und endokrinen Funktion. Das viszerale Fettgewebe zeichnet sich durch einen erhöhten Insulinstoffwechsel, eine verstärkte Triglyceridsynthese und eine stärkere Lipolyse aus (19). Zudem weist es eine höhere Anzahl an Immunzellen auf und damit eine erhöhte Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen (19,20).

1.2.2. Der Einfluss von Adipositas auf das Fettgewebe

Adipositas ist eine Erkrankung, die mehr als 30% der Weltbevölkerung betrifft und somit eine globale gesundheitliche Bedrohung für die Menschheit darstellt (24). Übergewicht und Adipositas sind große Risikofaktoren für die Erkrankung an Diabetes Typ 2, Herz-Kreislauf-Erkrankungen sowie Krebserkrankungen (25). Es stellt nach dem Rauchen von Zigaretten den zweitgrößten beeinflussbaren Risikofaktor für Krebserkrankungen dar (26). Adipositas entsteht, wenn die Energieaufnahme den Energieverbrauch des Körpers über einen längeren Zeitraum übersteigt und die überschüssige Energie in Form von gesteigerter Fettablagerung in Adipozyten gespeichert wird (25). Fettgewebe ist dazu in der Lage, sowohl die Größe des einzelnen Adipozyten zu verändern (Hypertrophie) als auch neue Adipozyten aus Prä-

Adipozyten zu rekrutieren und somit die Zellanzahl zu erhöhen (Hyperplasie) (20). Der Body-Mass-Index (BMI) ist ein Maß für den Schweregrad der Erkrankung und berechnet sich aus dem Verhältnis von Körpergewicht zu Körpergröße (Körpergewicht in [kg]/ Körpergröße in [m]²) (26). Es ergibt sich eine Einteilung in Untergewicht (BMI < 18,5), Normalgewicht (BMI 18,5 – 25), Übergewicht (BMI 25 – 30), Adipositas Grad I (BMI 30 – 40) und Adipositas Grad II (BMI ≥ 40) (25,26). Risikofaktoren für die Entstehung von Adipositas sind z.B. genetische Faktoren, mangelnde Bewegung, gestörtes Essverhalten, psycho-soziale Faktoren und einige Medikamente (25). Durch Adipositas kommt es zu einer pathophysiologischen Veränderung des Fettgewebes. Durch eine vermehrte Einwanderung von Immunzellen werden mehr proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet, die sowohl das Fettgewebe selbst als auch den gesamten Organismus beeinflussen (27). Durch die Vergrößerung des Fettgewebes führt eine vaskuläre Minderversorgung zu lokaler Hypoxie, was die Ausschüttung von proinflammatorischen Botenstoffen weiter steigert (27). Es kommt zu einer peripheren Insulinresistenz und Glukoseintoleranz sowie zu einer gesteigerten Seneszenz der Adipozyten (27). Durch eine mitochondriale Dysfunktion des Fettgewebes wird die oxidative Phosphorylierung und mitochondriale Biogenese gestört, was den gesamten Metabolismus beeinflusst (26,28).

1.3. Die Rolle von Fettgewebe in der Progression des Mammakarzinoms

Epidemiologische Studien zeigen, dass Übergewicht und Adipositas im Zusammenhang mit der Entstehung und Progression von verschiedenen Tumorarten, unter anderem dem Pankreaskarzinom, Endometriumkarzinom, Kolonkarzinom und Mammakarzinom, stehen (29–31). Unter adipösen Patientinnen ist die Prävalenz des triple-negativen Mammakarzinoms merklich höher als bei normalgewichtigen Patientinnen (32,33). Darüber hinaus zeigen sich bei adipösen Patientinnen größere Tumoren mit aggressiverem Wachstumsverhalten und höherem Grading (32,33). Der komplexe Zusammenhang zwischen Adipositas und der höheren Tumormalignität sowie die genauen Mechanismen auf molekularer Ebene sind noch nicht ausreichend untersucht und Gegenstand der aktuellen Forschung.

Die unmittelbare Tumorumgebung spielt eine wichtige Rolle in der Progression der Tumorzellen (34,35). Diese setzt sich unter anderem aus Immunzellen,

Endothelzellen, Fibroblasten und Adipozyten zusammen (34). Beim Mammakarzinom stellen Adipozyten den größten Anteil der Tumorumgebung dar und es kann zur direkten Interaktion zwischen den Tumorzellen und dem Fettgewebe kommen (34,36,37). In Ko-Kultur Experimenten von Adipozyten und Brustkrebszellen konnte ein gesteigertes Wachstum und eine erhöhte Invasionsfähigkeit der Brustkrebszellen gezeigt werden (38). Studien, die Adipozyten in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Tumorzellen untersuchten, konnten feststellen, dass die Adipozyten eine veränderte Morphologie und ein verändertes Sekretionsverhalten aufweisen (siehe Abb.1) (36,39,40). Diese sogenannten „cancer-associated adipocytes“ (CAA) sind im Vergleich zu normalen Adipozyten kleiner, haben eine irreguläre fibroblastenartige Form und einen geringeren Lipidgehalt mit kleineren Lipidtröpfchen (36,39). Tumorzellen fördern die Lipolyse in CAA und es kommt zu einer erhöhten Ausschüttung von freien Fettsäuren, die von den Tumorzellen als Substrat für die Fettsäureoxidation zur Energiegewinnung genutzt werden können (39). Balaban et al. zeigten, dass es in einer Ko-Kultur von triple-negativen Brustkrebszellen mit adipösen Adipozyten zu einer höheren Freisetzung von freien Fettsäuren aus den Adipozyten und konsekutiver Aufnahme der Fettsäuren in die Brustkrebszellen kam, im Vergleich zu einer Ko-Kultur mit nicht adipösen Adipozyten (41). Dies deutet darauf hin, dass die Ausschüttung und Aufnahme von freien Fettsäuren in die Tumorzellen bei Adipositas stärker ausgeprägt ist (41). Die Aufnahme durch Adipozyten bereitgestellter Fettsäuren und die Energiegewinnung durch gesteigerte Beta-Oxidation führen zu einer erhöhten Überlebensfähigkeit der Tumorzellen (42). Dies konnte z.B. an Ovarialkarzinomzellen beobachtet werden, die exogene Fettsäuren aus Adipozyten aufnehmen und diese als externe Energiequelle zur Proliferation nutzen können (43). Neben der Ausschüttung von freien Fettsäuren sekretieren CAA eine Reihe von proinflammatorischen Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen (37,39). Der inflammatorische Phänotyp der CAA ähnelt der chronischen Inflammation des adipösen Fettgewebes und spiegelt die Progression des Mammakarzinoms adipöser Patientinnen wider (39). So führt z.B. eine erhöhte Expression von Interleukin-6 (IL6) in den CAAs zu einer erhöhten Invasionsfähigkeit von Brusttumorzellen (38). Bei Brustkrebspatientinnen korrelierte eine erhöhte Serumkonzentration von IL6 mit einem schlechteren Outcome und einer schlechteren Prognose (38). Diese Beobachtungen zeigen eine wechselseitige Beeinflussung von CAA und Tumorzellen, die zu einem aggressiveren

Tumorverhalten mit gesteigerter Invasion, Proliferation und Migration führen (37,39,40).

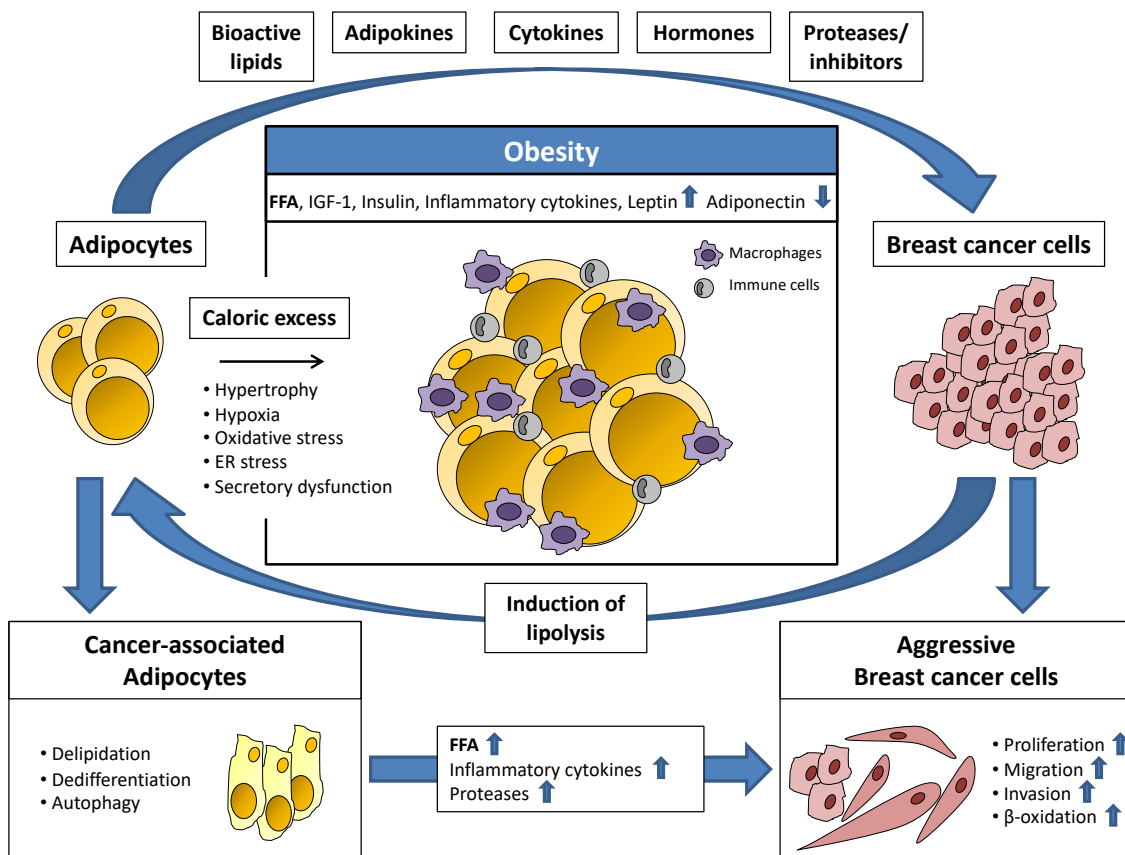


Abbildung 1: Interaktion zwischen Brustkrebszellen und benachbarten Adipozyten unter dem Einfluss von Adipositas. Aus: Blücher und Stadler, *Frontiers in Endocrinology* 2017 (40).

1.4. Die Rolle von Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs) in Brustkrebszellen

Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) sind Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren, die der Gruppe der nukleären Rezeptoren zuzuordnen sind und die Expression von Genen beeinflussen, die u.a. den Lipidmetabolismus, die Zellproliferation und -differenzierung und Entzündungsreaktionen regulieren (42,44,45).

Es können drei verschiedene Subtypen unterschieden werden, PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ , die eine Homologie von ca. 80% aufweisen, sich jedoch in ihrem Vorkommen in unterschiedlichen Geweben, der biologischen Funktion und der Affinität für Liganden unterscheiden (45,46). N-terminal sitzt die DNA-bindende Domäne (DBD) und C-

terminal die Liganden-bindende Domäne (LBD) (45,47). Nach der Bindung von Liganden kommt es zu einer Translokation in den Zellkern und zu einer Heterodimerisation mit dem Retinoid-Rezeptor-X (RXR) (44–46). Dieses Heterodimer bindet an das „*peroxisom proliferator response element*“ (PPRE) in der Promotorregion des Zielgens und kann dadurch die Genexpression der Zielgene regulieren (44,45). Die LBD variiert zwischen den PPAR-Subtypen, was zu einer unterschiedlichen Antwort auf verschiedene Liganden und dadurch zu einer Vielzahl an Funktionen in den unterschiedlichen Geweben führt (45). PPAR α wird in Geweben exprimiert, die die Beta-Oxidation als Energiequelle benötigen, wie z.B. Leber, Herz, Skelettmuskel und braunes Fettgewebe, und spielt somit eine zentrale Rolle im Fettsäurestoffwechsel (42,45). PPAR β/δ wird in den meisten humanen Geweben exprimiert, v.a. in Leber, Fettgewebe, Skelettmuskel, Herz, Gehirn und Niere, in denen es zu einem erhöhten Fettstoffwechsel kommt (45). Die genaue Funktion dieses Subtyps muss jedoch noch weiter untersucht werden. PPAR γ wird vor allem in weißem und braunem Fettgewebe exprimiert und spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation der Adipogenese, der Fettspeicherung und des Glucose-Stoffwechsels (45,47,48). Außerdem ist PPAR γ an der Regulation der Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. TNF- α beteiligt, sowie an der Expression von Genen, die in die Regulation der Insulinsensitivität involviert sind (45).

Liganden, die an PPAR-Rezeptoren binden und diese aktivieren sind u.a. freie Fettsäuren und Eikosanoide (49,50). Durch die weitreichenden physiologischen Einflussbereiche von PPARs u.a. im Lipidmetabolismus, der Zellproliferation und in Entzündungsreaktionen spielen sie eine ebenso wichtige Rolle bei vielen pathologischen Vorgängen wie z.B. Diabetes mellitus Typ 2, Dyslipidämie, dem metabolischen Syndrom und bei Tumorerkrankungen (44). In der Praxis werden bereits erfolgreich Medikamente mit PPAR als Ziel angewendet (44). Selektive PPAR α Agonisten (Fibrate) werden zur Behandlung von Hyperlipidämie und Hypertriglyzeridämie verwendet (44). PPAR γ Agonisten (Thiazolidindione) werden bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt, um die Insulinsensitivität zu steigern (44). Die Expression von PPAR konnte in verschiedenen Tumorarten, Tumorzelllinien und in Zellen des Tumorstromas nachgewiesen werden (50). Der Einfluss von PPAR auf Tumorzellen wird kontrovers in der Literatur diskutiert. In Brustkrebszellen wurden für PPARs komplexe und z.T. sowohl tumorfördernde als auch tumorhemmende

Effekte gezeigt (51). PPAR α fördert die Verstoffwechslung von Fettsäuren und bewirkt somit eine Deckung des erhöhten Energiebedarfs von Tumorzellen (52). In Studien zeigte die Inhibition von PPAR α in Brustkrebszellen eine anti-proliferative Wirkung und die Agonisierung von PPAR α eine wachstumsfördernde Wirkung auf Brustkrebszellen (52). Eine potentiell tumorfördernde Wirkung von PPAR β/δ wurde ebenfalls in verschiedenen Studien gezeigt. Durch eine Behandlung mit einem PPAR β/δ Antagonist wurde eine durch TGF β induzierte erhöhte Invasionsfähigkeit von MDA-MB-231 Zellen stark inhibiert (53). Die Überexpression von PPAR δ in MCF-7 förderte die Migration und das Überleben unter ungünstigen Bedingungen (54). Hingegen konnte in murinen Brustkrebszellen durch eine Behandlung mit PPAR β/δ Liganden eine Inhibition der Zellproliferation erzielt werden (55). Auch PPAR γ spielt in Brustkrebszellen eine vielschichtige Rolle. Abhängig vom Tumorkontext wurden hier ebenfalls tumorsuppressive (z.B. Hemmung der Proliferation, Induktion der Apoptose) als auch tumorfördernde Effekte gezeigt (51,56). Letzteres ist besonders in Zusammenhang mit dem Lipidstoffwechsel von Bedeutung, da PPAR γ die Lipidaufnahme und -speicherung fördert und dies das Überleben und die Progression von Brustkrebszellen fördern kann (57). Diese und weitere Erkenntnisse deuten auf eine hohe Relevanz, aber auch auf eine hohe Komplexität der Wirkung von PPARs in der Progression des Mammakarzinoms, hin. Die genaue Rolle von PPARs sowie mögliche Therapieansätze mit PPAR als Ziel im Tumorkontext sind daher weiterhin Gegenstand aktueller Forschung.

1.4.1. Das PPAR-Zielgen Angiopoetin-like-4 (ANGPTL4)

Angiopoetin-like-4 (ANGPTL4) gehört zu der Familie der Angiopoetine, eine Gruppe von sekretierten Proteinen bestehend aus ANGPTL 1 – 8, die vor allem in der Leber und im Fettgewebe exprimiert werden (45). Die Expression von ANGPTL4 wird u.a. durch PPARs reguliert (45). Es besitzt vielfältige Funktionen im Fettstoffwechsel und spielt auch im Tumorkontext eine große Rolle (52,58,59). Die Struktur von ANGPTL4 setzt sich aus der stark hydrophoben N-terminalen *coiled-coil* Domäne (nANGPTL4) und der großen C-terminalen *fibrinogen-like* Domäne zusammen (cANGPTL4) (58). Hieraus ergeben sich die unterschiedlichen Funktionen. Die N-terminale Domäne spielt vor Allem im Lipidmetabolismus eine Rolle, indem sie die Lipoproteinlipase (LPL) und somit die Hydrolyse von Triglyzeriden im Fastenstatus hemmt. Dadurch kommt es

zum einen zu einem höheren Triglyzeridspiegel im Plasma, zum anderen zu einer verminderten Fettspeicherung im Gewebe (60–62). Die C-terminale Domäne fördert die Proliferation und die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen (58,59). Aufgrund des schnellen Wachstums von Tumorzellen kommt es in Tumoren häufig zu Hypoxie und Mangelversorgung (63). Dadurch wird die ANGPTL4 Expression, u.a. durch Interleukin 1 β , induziert und es kommt zur Angiogenese und Proliferation im Tumorgewebe (52,63). Durch eine Interaktion der C-terminalen Domäne von ANGPTL4 mit verschiedenen Faktoren wie z.B. Integrin β 1, VE-cadherin, Claudin-5 und Fibronectin wird zudem eine Destabilisation von Zell-Zellkontakten eingeleitet, was zu einer erhöhten Angiogenese und Migrationsfähigkeit von Tumorzellen führt (52).

In verschiedenen Tumorarten konnte eine erhöhte ANGPTL4-Expression festgestellt werden, z.B. bei Kopf-Hals Tumoren, Magenkarzinom, epithelialen Tumoren, Ovariakarzinom und dem Mammakarzinom (52,63–65). Kolb et al. zeigten, dass die ANGPTL4-Expression mit der rezidiv-freien Überlebensrate in allen Brustkrebsarten invers korrelierte (65). Zudem konnten sie nach Analyse eines großen Datensatzes in gesundem Brustgewebe einen Zusammenhang zwischen Adipositas und einer erhöhten ANGPTL4-Expression im Vergleich zu Proben von normalgewichtigen Probandinnen feststellen (65). Blücher et al. zeigten, dass die mRNA-Expression von *ANGPTL4* in triple-negativen Brusttumoren im Vergleich zu den luminalen und ERBB2+ Subtypen erhöht ist. Des Weiteren war eine erhöhte ANGPTL4-Expression mit einem reduzierten progressionsfreien Überleben assoziiert, vor allem bei Patienten mit TNBC (59). ANGPTL4 könnte daher als potentiell Target für eine zielgerichtete Tumorthherapie in Betracht gezogen werden. Die genauen molekularen Mechanismen und Zusammenhänge müssen jedoch genauer untersucht werden, ebenso wie der Aspekt des Einflusses von Übergewicht auf die ANGPTL4-Expression in Tumorzellen.

1.4.2. Weitere untersuchte PPAR-Zielgene

PLIN2

Perilipin 2 (PLIN2) ist ein Protein der Perilipin-Familie und ein ubiquitärer Teil der Hülle von Lipidtröpfchen in Adipozyten (66,67). Es ist an der Regulation der Lipidspeicherung und Lipolyse beteiligt. Es hemmt den Abbau von Lipidtröpfchen durch Lipasen und stimuliert dadurch die Speicherung von Lipiden (66,68).

PDK4

Die Pyruvat-Dehydrogenase Kinase 4 (PDK4) ist eines von 4 Isoenzymen der Pyruvat-Dehydrogenase Kinasen (PDK) (69). Sie ist eine Serin/Threonin Kinase und phosphoryliert den Pyruvat-Dehydrogenase Komplex (PDC), wodurch dieser inaktiviert wird (70). Der PDC decarboxyliert Pyruvat zu Acetyl-CoA und verbindet somit die Glykolyse mit dem Citratzyklus und der Atmungskette (70,71). Durch eine in Tumorzellen häufig gesteigerte Expression von PDK4 wird die Einschleusung von Acetyl-CoA in den Citratzyklus gehemmt und es findet eine Veränderung des Metabolismus hin zu einer „aeroben“ Glykolyse statt, d.h. die Zellen wandeln trotz ausreichend vorhandenem Sauerstoff Pyruvat bevorzugt zu Lactat um. Dies wird auch als Warburg-Effekt bezeichnet (72–74).

CPT1A

Die Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1A (CPT1A) ist das geschwindigkeitsbestimmende Schlüsselenzym der mitochondrialen Beta-Oxidation (75,76). Es sitzt in der äußeren Mitochondrienmembran und katalysiert den Transfer von Acyl-CoA Gruppen zu L-Carnitin, woraus Acyl-Carnitin-Ester entstehen, die in dieser Form durch die Membranen in das Mitochondrium, zum Ort der Beta-Oxidation, transportiert werden können (75,76). Die Fettsäure-Oxidation ist ein wichtiger Weg zur Energiegewinnung unter Fastenbedingungen oder bei erhöhtem Energiebedarf (75). Aktuelle Studien zeigen, dass die Fettsäure-Oxidation und das Enzym CPT1A eine wichtige Rolle in der Überlebens- und Wachstumsfähigkeit von Tumorzellen spielen (77).

FASN

Die Fettsäure-Synthase (FASN) ist ein großer Multienzym-Komplex, der als Homodimer vorliegt und mehrere enzymatische Domänen umfasst. Sie katalysiert die Synthese der gesättigten Fettsäure Palmitinsäure (C16:0) aus den Ausgangsstoffen Acetyl-CoA und Malonyl-CoA (78). Sie ist somit das Schlüsselenzym der De-novo Fettsäuresynthese und kann überschüssige Kohlenhydrate in Fettsäuren umwandeln (78–80).

1.5. Fragestellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Fettgewebe auf triple-negative Brustkrebszellen auf molekularer Ebene, anknüpfend an die Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, weiter zu untersuchen. Daraus ergaben sich im Detail folgende Punkte als Fragestellung:

- 1) Welchen Einfluss haben durch Fettgewebe sekretierte Faktoren auf die Genexpression von PPAR-Zielgenen in humanen triple-negativen Brustkrebszellen?

Dazu wurde aus Fettgewebeproben von Patientinnen aus unterschiedlichen BMI-Gruppen, die sich in normalgewichtig, übergewichtig und adipös einteilen ließen, durch Fettgewebe konditionierte Medien (adipose-tissue conditioned media, ACM) hergestellt. Mit diesen konditionierten Medien wurden die beiden triple-negativen Brustkrebszelllinien HCC38 und MDA-MB-231 behandelt. Anschließend wurde eine Genexpressionsanalyse mittels qPCR von ausgewählten PPAR-Zielgenen durchgeführt, um die Auswirkungen von sekretierten Faktoren des Fettgewebes auf das Expressionsmuster dieser Gene untersuchen zu können.

- 2) Welche Rolle spielt das PPAR-Zielgen *ANGPTL4* in der Progression des triple-negativen Mammakarzinoms?

Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ergaben sich Hinweise, dass das PPAR-Zielgen *ANGPTL4* als ein möglicher Kandidat im Hinblick auf eine zukünftige zielgerichtete Tumorthherapie geeignet sein könnte (59). Um die Migrations-, Invasions- und Proliferationsfähigkeit von triple-negativen Brustkrebszellen in Abhängigkeit der *ANGPTL4*-Expression weiter untersuchen zu können, sollte im Rahmen dieser Arbeit eine stabil überexprimierende und eine stabil depletierte Zelllinie HCC38 (triple-negative Brustkrebszelllinie) im Gen *ANGPTL4* hergestellt werden. Mittels lentiviralem Vektor wurden die Zellen transduziert und im Anschluss wurde eine Charakterisierung der *ANGPTL4*-Expression in den hergestellten Zelllinien auf Gen- und Proteinebene anhand von Durchflusszytometrie, qPCR, Immunfluoreszenzfärbung und ELISA durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien und Geräte

Geräte	
Produkt	Produktionsfirma
Fluoreszenz Mikroskop Zeiss ApoTome	Zeiss, Oberkochen
Phasenkontrastmikroskop Zeiss Primovert	
Multiskan Go Spectralphotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab (übernommen von Avantor), Darmstadt
BD FACS Calibur	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
BD FACS ARIA II	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

Zelllinien		
HCC38	#CRL-2341	American Type Culture Collection, Virginia, USA
MDA-MB-231	#HTB-26	

Zellkultur		
Produkt	Bestellnummer	Produktionsfirma
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) GlutaMAX	#31966-021	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA

+ 4,5 g/L D-Glucose + Pyruvate		Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
1x Antibiotic-Antimycotic	#15240-062	
Fetales Rinderserum (FBS)	#S0615	Sigma Aldrich, St Louis, USA
Trypanblau-Lösung 0,4 %	#72-57-1	
DPBS (-CaCl ₂ , -MgCl ₂)	#14190144	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
0,25 % Trypsin-EDTA	#25200-056	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	#P60-36720100	PAN-Biotech, Aidenbach
MycoAlert Mycoplasma Detection	#LT07-318	Lonza, Bern, Schweiz

Assays		
QIAGEN RNAeasy Mini Kits	#74106	QIAGEN, Hilden
DY3485 Duo Set Human Angptl4 ELISA	#DY3485	R&D Systems, Minneapolis, USA

Lentivirale Vektoren		
Dharmacon GIPZ Lentiviral particles		
shANGPTL4_1	V3LHS_396197	Horizon Discovery, Waterbeach, England
shANGPTL4_2	V2LHS_97612	
shANGPTL4_3	V3LHS_396197	
shNTC	V17081706	
shGAPDH	V16120203	

Genecopoeia ORF cDNA lentiviral particles		
ANGPTL4_OE	LPP-W0165-Lv203-050	GeneCopoeia, Rockville, USA
empty_vector	LPP-NEG-Lv203-050	
Puromycin	#A2856.0010	PanReac AppliChem, Darmstadt
Polybrene 8 µg/ml	#TR-1003	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Reverse Transkription, qPCR		
Superscript II reverse Transkriptase	#100004925	Invitrogen, Carlsbad, USA
5X First Strand Buffer	#Y02321	
0,1 M DTT	#Y00147	
Random Hexamer Primer	#N8080127	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz
dNTP-Mix (Stammlösung 10 mM)	#U1511	Promega, Fitchburg, USA
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	#N2518	
HOT FIREPol® EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX), 5X	#08-24-00020	Solis BioDyne OÜ, Tartu, Estland

Immunfluoreszenzfärbung		
ANGPTL4 Primärantikörper (Polyklonal, rabbit) Verdünnung 1:200	#18374-1-AP	Proteintech, Chicago, USA

Anti-Flag M2 Primärantikörper (Monoklonal, mouse) Verdünnung 1:500	#F1804	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Goat anti-Mouse IgG Sekundärantikörper Alexa Fluor 568 Verdünnung 1:1500	#A11031	Invitrogen, Carlsbad, USA
Goat anti-Rabbit IgG Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 Verdünnung 1:1500	#A11008	
DAPI 1 µg/ml in PBS	#D9542	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Normal Goat Serum	#S-1000-20	Vectorlabs, Newark, USA
Prolong Gold Mounting Medium	P36930	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur humaner Brustkrebszellen

Die humanen Brustkrebszelllinien HCC38 und MDA-MB-231 wurden von der American Type Culture Collection ATCC bezogen. Nach dem Auftauen wurden die Zellen für 10-15 Passagen verwendet. Die Zelllinien wurden in regulärem Wachstumsmedium, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kultiviert, das mit 10% Fetalem Rinderserum (FBS) und Antibiotikum-Antimykotikum supplementiert war, und wurden bei 37°C in 5% CO₂ inkubiert. Die an Plastik adhärenen Zellen wurden mit einer Dichte von 13.000 Zellen/cm² in T75 Zellkulturflaschen ausgesät und alle 2-3 Tage je nach Zelldichte passagiert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit DPBS gewaschen und für 5 min mit 0,25 % Trypsin inkubiert. Nach vollständigem Ablösen des Zellrasens wurde die Reaktion mit Wachstumsmedium abgestoppt und die

Zellsuspension in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Durch Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min entstand ein Zellpellet, das nach Absaugen des Überstandes in Wachstumsmedium resuspendiert wurde. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl ermittelt. Anschließend wurden wiederum 13.000 Zellen/cm² in eine Zellkulturflasche mit Wachstumsmedium ausgesät und erneut bis zur Konfluenz kultiviert.

Es erfolgte eine regelmäßige Testung auf Mycoplasmen-Kontamination mit MycoAlert Mycoplasma Detection.

2.2.2. Herstellung von durch Fettgewebe konditioniertem Medium (ACM)

Das Fettgewebe stammte von weiblichen Spenderinnen, die sich einer plastischen Fettschürzenreduktion unterzogen und wurde von der Klinik für plastische, ästhetische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie von Prof. Prantl (Krankenhaus St. Josef, Regensburg) zur Verfügung gestellt (Ethikvotum 19-1453-101, zuletzt aktualisiert unter Referenznummer 24-3640-101). Es wurden Proben von normalgewichtigen Probandinnen mit einem Body Mass Index (BMI) von <25 (n=2), übergewichtigen Probandinnen mit einem BMI von 25-30 (n=3) und von Probandinnen mit starkem Übergewicht mit einem BMI von >30 (n=3) verwendet. Das Fettgewebe wurde von Bindegewebe, Blutgefäßen und Blutresten befreit, in kleinen Stücken aus dem Präparat herausgelöst, zerkleinert und abgewogen. Es wurden 4 g Fettgewebe mit 40 ml DMEM mit 1% BSA und 1% Antibiotikum-Antimykotikum in eine T175 Zellkulturflasche gegeben und für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und bei 4000 rpm für 15 min zentrifugiert. Die Zwischenphase wurde entnommen, um eine Kontamination mit oben aufschwimmenden Adipozyten oder Zelldebris im Pellet zu verhindern, und bei -80°C gelagert.

2.2.3. Behandlung mit ACM

Die Tumorzellen wurden in eine 12-Well Platte mit einer Dichte von 120.000 Zellen pro Well in 2 ml normales Wachstumsmedium ausgesät und wuchsen bis zu einer Konfluenz von 70%. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für 24 h mit ACM bzw. dem Kontrollmedium DMEM mit 1% BSA und Antibiotikum-Antimykotikum inkubiert (siehe Abb.2)

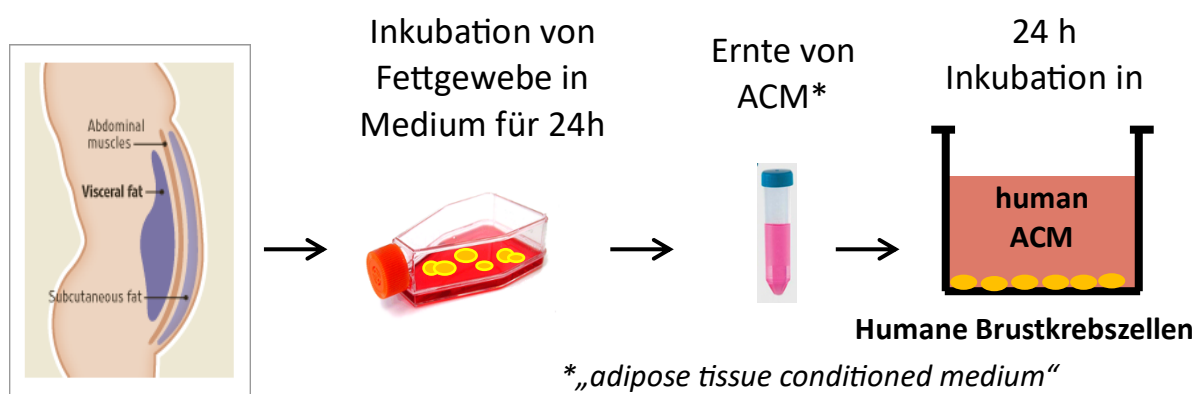
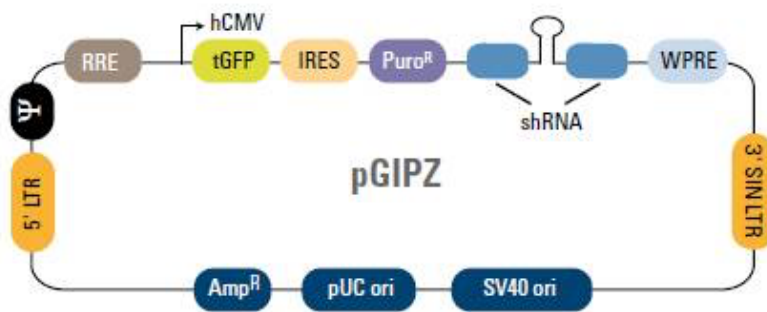


Abbildung 2: Schema der Behandlung von humanen Brustkrebszellen mit durch Fettgewebekonditioniertem Medium (ACM).

2.2.4. Herstellung von Zellen mit stabiler Überexpression bzw. Depletion (Knockdown) von *ANGPTL4*

Der stabile Knockdown des Gens *ANGPTL4* in der humanen Brustkrebszelllinie HCC38 wurde mit den lentiviralen Partikeln „Dharmacon GIPZ Lentiviral particles“ von Horizon Discovery durchgeführt.

Ein solches Vektorkonstrukt besteht aus verschiedenen Bestandteilen, die zur Selektion, der Detektion des Zielgens und der Funktionalität des Vektors in den transduzierten Zellen beitragen. Die shRNA, die sogenannte „*short hairpin RNA*“, trägt die Information für den Knockdown eines Gens. Um das Ablesen der shRNA zu gewährleisten, enthält der Vektor einen Promoter aus dem humanen Cytomegalievirus (CMV). Der Vektor enthält außerdem eine Puromycin-Resistenz für die Selektion erfolgreich transduzierter Zellen. Um die erfolgreiche Aufnahme des Vektors in die Zelle detektieren zu können, ist ein GFP (grün-fluoreszierendes Protein) exprimierendes Element im Vektor integriert (siehe Abb. 3).

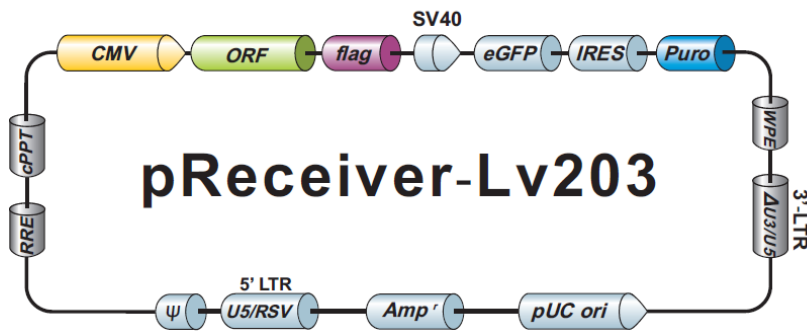


© 2021 Horizon Discovery Ltd

Abbildung 3: Lentiviraler Vektor zum Knockdown des *ANGPTL4* Gens (103).

hCMV: Promotor aus dem humanen Cytomegalie Virus
 tGFP: Turbo grünfluoreszierender Farbstoff
 IRES: Interne ribosomale Eintrittsstelle
 Puro^R: Puromycin Resistenz zur Selektion
 shRNA: short hairpin RNA zum Knockdown des Gens
 WPRE: Posttranskriptionelles Regulationselement
 3' SIN LTR: 3' selbst-inaktivierender „long terminal repeat“
 5' LTR: 5' „long terminal repeat“
 Ψ: Retrovirale „Packaging“ Sequenz

Die Herstellung einer Zelllinie mit einer stabilen Überexpression im Gen *ANGPTL4* in der Zelllinie HCC38 wurde mit dem Vektorkonstrukt pReceiver, der ein *ANGPTL4* open reading frame enthielt, verpackt in „ORF cDNA lentiviral particle“ der Firma Genecopoeia durchgeführt. Dieser Vektor verfügt über die gleichen charakteristischen Bestandteile wie der Vektor für den Knockdown. Auch die überexprimierende Zelllinie kann mit Puromycin selektiert und mit GFP detektiert werden. Zudem enthält das Konstrukt einen Promoter aus dem CMV-Virus, um das Ablesen der eingeschleusten cDNA und das Herstellen des Proteins sicherzustellen. Das *ANGPTL4*-Protein ist zudem mit einem Flag-Tag markiert und kann so in der Immunfluoreszenzfärbung mit einem entsprechenden Anti-Flag Antikörper detektiert werden (siehe Abb. 4).



2012 GeneCopoeia, Inc. All Rights Reserved

Abbildung 4: Lentiviraler Vektor zur Überexpression im Gen *ANGPTL4* (104).

- CMV: Promotor aus dem humanen Cytomegalie Virus
- ORF: „Open reading frame“ mit Protein-kodierender DNA für *ANGPTL4*
- Flag: „Flag-tag“
- SV40: Simian Virus 40 zur Immortalisierung
- eGFP: Grünfluoreszierender Farbstoff zur visuellen Darstellung
- IRES: Interne ribosomale Eintrittsstelle
- Puro: Puromycin Resistenz zur Selektion
- 3' LTR: 3' „long terminal repeat“ zur erhöhten lentiviralen Sicherheit
- 5' LTR: 5' „long terminal repeat“
- Ψ: Retrovirale „Packaging“ Sequenz

Für die Zelllinien mit einem stabilen Knockdown bzw. einer stabilen Überexpression und die jeweiligen Kontrollzelllinien, die mit einem „empty vector“ bzw. einer „non-targeting control“ transduziert wurden, wurde das gleiche Protokoll angewandt. Zusätzlich wurde eine Kontrolltransduktion mit einem shRNA Konstrukt gegen das Gen *GAPDH* durchgeführt, um die Effizienz der Transduktion in der Zelllinie HCC38 zu überprüfen. Für den Knockdown im Gen *ANGPTL4* wurden 3 verschiedene shRNA Konstrukte verwendet.

Die HCC38 Zellen wurden in eine 24-Well Platte mit 20.000 Zellen pro Well in regulärem Wachstumsmedium ausgesät und für 24 h inkubiert. Vor der lentiviralen Transduktion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und das Medium wurde zu DMEM ohne FBS und Antibiotika, jedoch mit Zugabe von 8 µg/ml Polybrene gewechselt. Die lentiviralen Partikel wurden in zwei Versuchsansätzen zu den Zellen hinzugegeben, zum einen mit einem MOI (multiplicity of infection) von 10 und zum anderen mit einem MOI von 25. Der MOI legt fest, wie viele Viruspartikel im Versuchsansatz auf eine Zelle treffen. Hierdurch soll einerseits die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, dass möglichst viele Zellen einen Vektor aufnehmen und somit eine effektive Transduktion stattfindet. Andererseits kann eine zu hohe MOI den Zellen schaden und zum Absterben der

transduzierten Zellen führen. Aus diesem Grund wurde die Transduktion mit einem niedrigeren MOI von 10 und einem höheren MOI von 25 durchgeführt. Nach 6 h Inkubationszeit wurde reguläres Wachstumsmedium zu den Zellen hinzugegeben. Die transduzierten Zellen wurden ab Tag 4 nach Transduktion mit 2 µg/ml Puromycin selektiert. Der Vektor enthält eine Puromycin-Resistenz, dadurch entsteht eine Selektion der Zellen. Lediglich die Zellen, die den Vektor erfolgreich aufgenommen haben, können überleben und sich teilen.

2.2.5. RNA Isolation, cDNA Synthese und qPCR

Die RNA von MDA-MB-231 und HCC38 Zellen wurde mittels des QIAGEN RNAeasy Mini Kits isoliert. Es wurden biologische Triplikate verwendet, hierbei bestand jedes Replikat aus 3 Wells einer 12-Well Platte. Hierzu wurden 120.000 Zellen pro Well in eine 12-Well Platte ausgesät und für 48 h kultiviert. Nach der Inkubationszeit erfolgte, ggf. wie oben beschrieben, der Wechsel zu ACM und es erfolgte eine weitere Inkubation für 24 h. Zur RNA-Ernte wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und pro Well 350 µl RLT Lysis Buffer zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Oberfläche gelöst. Das Lysat wurde in ein Kryo-Tube überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Zur RNA-Isolation wurden die Proben auf Eis aufgetaut und die Lysate durch das Auf- und Abziehen durch eine 20G Nadel homogenisiert. Die Lysate wurden nach Angaben des Herstellers auf die Säulen des RNAeasy Kits aufgetragen. Es erfolgten Waschvorgänge mit 70- und 80 %igem Ethanol sowie die Zugabe von 350 µl RW1 Puffer und 500 µl RPE Puffer. Im letzten Schritt erfolgte die Isolation der RNA durch Zugabe von 15 µl RNase-freiem Wasser auf die Säulenmembran. Die Messung der RNA-Konzentration wurde durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm mit einem Spektralphotometer (Nanodrop) durchgeführt. Die Proben wurden bei -80° gelagert. Im Anschluss erfolgte die Reverse Transkription der RNA in cDNA. 2 µg RNA wurden mithilfe der Superscript II reverse Transkriptase und „Random Hexamer Primer“ für 10 min bei 25°C, 50 min bei 42°C und 15 min bei 70°C revers transkribiert. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

Die qPCR wurde mit 5x HOT FIREPol[®] EvaGreen[®] qPCR Mix Plus (ROX) im QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System bei folgenden Bedingungen durchgeführt: 95°C für 10 min, 40 Zyklen bei 95°C für 15 s, 59°C für 30 s und 72°C für 45 s.

Die relative Genexpression wurde als $2^{-\Delta\Delta ct}$ kalkuliert, wobei die unbehandelten Zellen als Kontrolle dienten und *GAPDH* als Referenzgen verwendet wurde (81). Die Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Primersequenzen

	vorwärts	rückwärts
<i>ANGPTL4</i> (human)	GGGAGAGGCAGAGTGGACTA TTT	TTACTGTCCAGCCTCCATCTGA
<i>GAPDH</i> (human)	GGCCTCCAAGGAGTAAGACC	AGGGGAGATTCAGTGTGGTG
<i>PLIN2</i> (human)	TTGCAGTTGCCAATACCTATG C	CCAGTCACAGTAGTCGTCACA
<i>CPT1A</i> (human)	GACTCTGGAAACGGCCAACT	AGGCCTCACCGACTGTAGAT
<i>FASN</i> (human)	CTGTCTAGGTTTGATGCCTCC T	ACGATGGCTTCATAGGTGACTT
<i>PDK4</i> (human)	GGAAGCATTGATCCTAACTGT GA	GGTGAGAAGGAACATACACGA TG

2.2.6. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Um die Konzentration von sekretiertem ANGPTL4 im Überstand der transduzierten Zelllinien untersuchen zu können, wurde der Duo Set Human ANGPTL4 ELISA nach Herstellerangaben verwendet. Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 180.000 Zellen/Well in 12-Well Platten ausgesät und für 48 h bei 37°C, 5 % CO₂ in Wachstumsmedium kultiviert. Nach 48 h erfolgte ein Mediumwechsel zu serumfreiem Medium und eine erneute Inkubation für 6 h. Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen und bei -80°C gelagert. Es wurden 100 µl der Capture-Antikörperlösung pro Well in eine 96-Well Platte pipettiert und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Lösung komplett abgesaugt und mehrere Waschdurchgänge mit jeweils 400 µl des Wasch-Puffers durchgeführt. Nach dem letzten Waschdurchgang wurde der Wasch-Puffer komplett abgesaugt und die Platte trocken geklopft. Es erfolgte die Zugabe von 300 µl

Blockierlösung und eine Inkubationszeit von 1 h bei Raumtemperatur. Nach Wiederholen der Waschvorgänge erfolgte die Zugabe der Standardverdünnungsreihe sowie der Proben. Nach 2 h Inkubationszeit wurden die Waschvorgänge wiederholt und 100 µl der Detection-Antikörper Lösung in die Wells gegeben. Nach einer erneuten Inkubationszeit von 2 h erfolgten mehrere Waschküchgänge und 100 µl der Streptavidin-HRP Lösung wurde in die Wells pipettiert. Es erfolgte eine 20-minütige Inkubation unter Lichtausschluss und eine Wiederholung des Waschvorgangs. Danach wurden 100 µl der Substrat-Lösung pro Well zugegeben und erneut für 20 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Im Anschluss wurden 50 µl der Stopplösung hinzugegeben und es erfolgte die sofortige Messung der optischen Dichte mit einem Spektralphotometer (Multiskan Go, Thermo Fisher) bei einer Wellenlänge von 450 nm. Mittels der analysierten Standardverdünnungsreihe wurde die Konzentration von ANGPTL4 in den einzelnen Proben ermittelt. Die Analyse erfolgte jeweils in Triplikaten.

2.2.7. ANGPTL4 Immunfluoreszenz

Um die Expression des intrazellulären ANGPTL4 Proteins in den transduzierten Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung darzustellen, wurden die ANGPTL4-überexprimierenden Zellen sowie die Kontrollgruppe empty vector in 12-Well Platten auf Deckgläschen ausgesät und 72 h bis zur Konfluenz inkubiert. Für die Färbung wurden die Zellen für 10 min mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Anschließend erfolgte die Blockierung mit „Normal Goat Serum“ für 30 min und im Anschluss die Zugabe des Primärantikörpers (Rabbit ANGPTL4 Proteintech 18374-1-AP bzw. Mouse monoklonaler Anti-Flag AK Sigma Aldrich F1804). Nach 18 h Inkubationszeit bei RT erfolgten mehrere Waschvorgänge mit 0,1 % Triton-X-100 in PBS und anschließend die Zugabe des Sekundärantikörpers (Goat Anti Rabbit AF488 Invitrogen bzw. Goat Anti Mouse AF568 Invitrogen) in 2 % BSA bzw. 3 % Normal Goat Serum in PBS und die Inkubation unter Lichtabschirmung für 1 h. Nach erneuten Waschvorgängen wurden die Zellkerne mit DAPI (1 µg/ml in PBS) gefärbt und die Deckgläschen auf einen Objektträger aufgebracht. Die Bildarstellung wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop in 10-facher Vergrößerung durchgeführt.

2.2.8. Durchflusszytometrie und Zellsorting

Um die erfolgreiche Aufnahme des Vektors in die Zelle nachzuweisen, wurde ein GFP (grün-fluoreszierendes Protein) exprimierendes Element in den Vektor integriert. Zur

Darstellung der erfolgreichen Aufnahme des lentiviralen Vektors bzw. um die Stärke der GFP-Expression zu messen, wurden die transduzierten HCC38 Zellen für die Durchführung einer Durchflusszytometrie (FACS) ausgesät. Hierzu wurden ca. 1,5 Millionen Zellen in eine 10 cm Petrischale in normalem Wachstumsmedium ausgesät und für 72 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgte ein Waschvorgang mit PBS, im Anschluss wurden 5 ml PBS/2 % FBS zugegeben und der Zellrasen mit einem Zellschaber vom Boden abgeschabt und in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt. Mit Trypanblau wurde eine Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer durchgeführt und anschließend 1 ml der Zellsuspension in ein Eppendorf Gefäß für die Durchführung der FACS-Analyse pipettiert.

Die FACS-Analyse wurde mit dem Gerät BD FACS Calibur (Becton Dickinson) und das Zellsorting mit dem Gerät FACS Aria II (Becton Dickinson) durchgeführt. Freundlicherweise wurde die FACS-Analyse und das Zellsorting von der AG Hoffmann an der „Central FACS Facility“ am Leibniz-Institut für Immuntherapie in Regensburg durchgeführt.

2.2.9. Statistik

Die Daten wurden statistisch mittels Varianzanalyse (ANOVA) und anschließendem Mehrfachvergleich nach Dunnett analysiert. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde ab einem p-Wert von $< 0,05$ angenommen. Das statistische Signifikanzniveau wurde wie folgt gekennzeichnet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Für die statistische Analyse wurde die Software GraphPad Prism 10 verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Der Einfluss von durch Fettgewebe sekretierten Faktoren auf die Genexpression von PPAR-Zielgenen in humanen triple-negativen Brustkrebszellen

Das Drüsengewebe der Brust liegt anatomisch direkt angrenzend an Fettgewebe und es besteht dadurch die Möglichkeit zur direkten Interaktion zwischen dem Fettgewebe und den Drüsengewebszellen bzw. den Brustkrebszellen (34,36,37). In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte festgestellt werden, dass sekretierte Faktoren des Fettgewebes Einfluss auf das Genexpressionsmuster von Brustkrebszellen haben. Hierbei war unter anderem die Induktion von PPAR α Zielgenen zu beobachten (59).

Tabelle 2: ACM-Präparate nach aufsteigendem BMI angeordnet.

Daten der Spenderinnen der Fettgewebsproben, aus denen die verschiedenen ACM-Präparate hergestellt wurden. Es wurde das Gewicht und die Größe zum Entnahmzeitpunkt zur Ermittlung des BMIs erfasst. Bei einigen Spenderinnen lagen zudem Informationen über das ehemalige Gewicht vor Gewichtsabnahme vor.

	Geschlecht	Alter	Gewicht (kg)	Größe (cm)	BMI	Ehemaliges Gewicht (kg)
ACM 1	w	47	54	165	19,8	-
ACM 2	w	24	58	163	21,8	93
ACM 3	w	67	82	175	26,8	104
ACM 4	w	57	81	170	28,0	104
ACM 5	w	28	79	164	29,4	-
ACM 6	w	36	95	167	34,1	>200
ACM 7	w	59	94	163	35,4	109
ACM 8	w	71	146	173	48,8	-

Um diesen Zusammenhang näher untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Fettgewebe-konditioniertes Medium (ACM) hergestellt. Das Fettgewebe zur Herstellung der ACMs stammte von weiblichen Spenderinnen, die sich einer Bauchdeckenstraffung im Rahmen einer Abdominalplastik unterzogen. Die insgesamt 8 Spenderinnen ließen sich in 3 BMI-Gruppen einteilen (siehe Tabelle 2). In eine normalgewichtige Gruppe mit BMI <25 (n=2), in eine übergewichtige Gruppe BMI >25

(n=3) und eine adipöse Gruppe BMI >30 (n=3). Alle Spenderinnen hatten zum Zeitpunkt der OP bereits an Gewicht verloren und hatten in der Vergangenheit einen höheren BMI als zum OP-Zeitpunkt.

Für die Untersuchungen zum Einfluss von ACM auf die Genexpression in Brustkrebszellen wurden die beiden triple-negativen Brustkrebs- Zelllinien HCC38 und MDA-MB-231 verwendet. Die Zellen wurden mit den verschiedenen ACM-Präparaten für 24 h inkubiert. Als Kontrolle diente serumfreies Medium (SFM) versetzt mit 1% BSA. Mittels qPCR wurde die Genexpression von PPAR-Zielgenen nach Behandlung mit ACM im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt.

Im Einzelnen wurden die PPAR-Zielgene Angiopoetin-like 4 (*ANGPTL4*), Perilipin 2 (*PLIN2*), Carnitin-Palmitoyl-Transferase-1A (*CPT1A*), Fettsäure-Synthetase (*FASN*) und die Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 4 (*PDK4*) hinsichtlich ihrer Genexpression nach der Behandlung der Tumorzellen mit ACM untersucht. Alle fünf Gene spielen eine wichtige Rolle im Fettstoffwechsel und im Energiehaushalt (45,68,70,75,78). Im Folgenden sind die relativen Expressionslevel der einzelnen Gene in HCC38 und MDA-MB-231 Brustkrebszellen nach Behandlung mit ACM der aufgeführten Spenderinnen dargestellt.

ANGPTL4

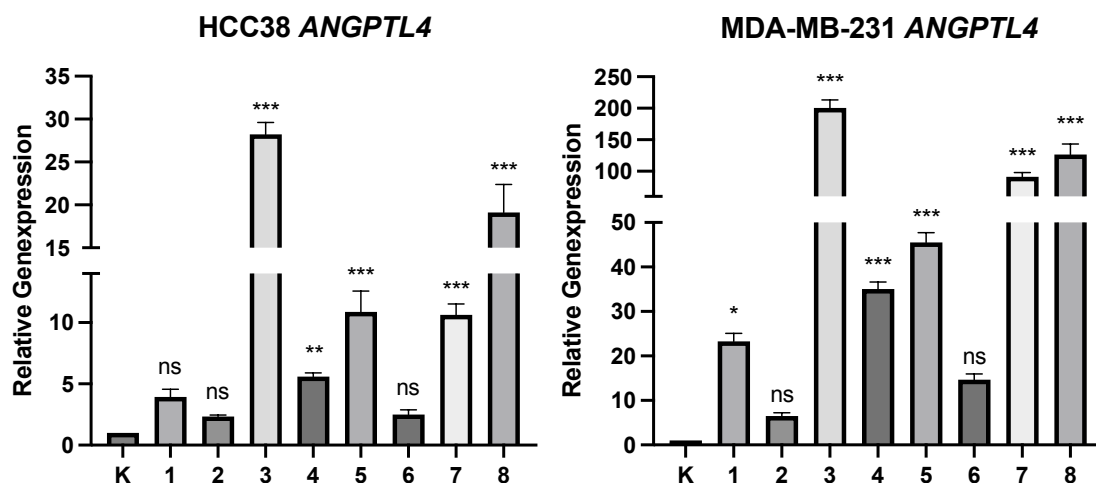


Abbildung 5: Genexpression von *ANGPTL4* in HCC38 und MDA-MB-231 Zellen nach ACM-Behandlung. Die beiden Zelllinien HCC38 und MDA-MB-231 wurden mit 8 verschiedenen ACM-Präparaten (1-8) behandelt, wobei 1 den niedrigsten und 8 den höchsten BMI aufwies. Die Kontrollgruppe K wurde mit serumfreiem Medium (SFM) behandelt. Mittels qPCR wurde die relative Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt (n=3). Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe im Post-hoc Test nach Dunnett: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, ns nicht signifikant.

Das Gen *ANGPTL4* zeigte eine stark ausgeprägte Induzierbarkeit durch ACM-Behandlung mit einer bis zu 28-fachen Steigerung der relativen Genexpression in der Zelllinie HCC38 und bis zu 200-fach in der Zelllinie MDA-MB-231 im Vergleich zur Kontrollbehandlung (siehe Abb. 5). Dabei war die Expression in MDA-MB-231 Zellen bei ACM 3 am höchsten. Bei ACM 1, 4, 5, 7 und 8 war die Expression ebenfalls signifikant erhöht, während ACM der Spenderinnen 2 und 6 eine geringere, nicht signifikante Erhöhung der *ANGPTL4*-Expression bewirkten. In der Zelllinie HCC38 war das Expressionsmuster ähnlich ausgeprägt, auch hier war die Induktion bei ACM 3 am höchsten und eine signifikante Erhöhung bei ACM 4, 5, 7 und 8 zu beobachten. Behandlung mit ACM 1, 2 und 6 zeigte hier eine geringe, nicht signifikante Erhöhung.

PLIN2

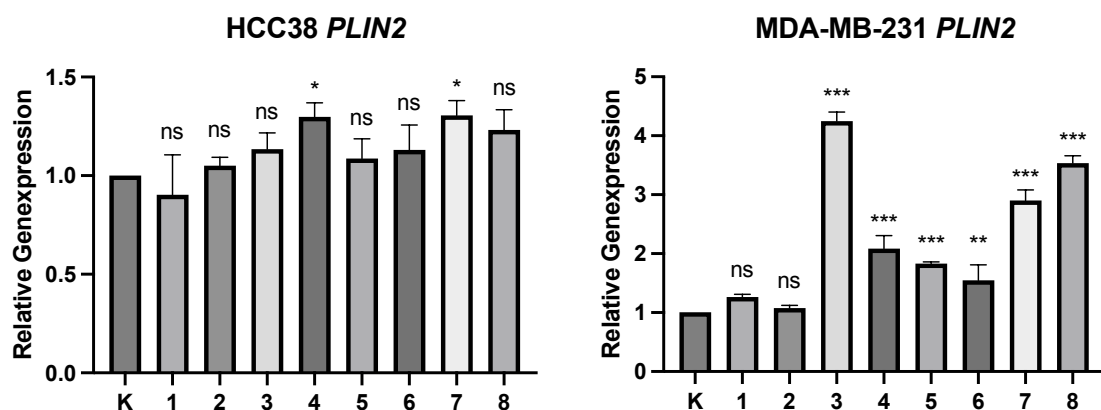


Abbildung 6: Genexpression von *PLIN2* in HCC38 und MDA-MB-231 Zellen nach ACM-Behandlung. Die beiden Zelllinien HCC38 und MDA-MB-231 wurden mit 8 verschiedenen ACM-Präparaten (1-8) behandelt, wobei 1 den niedrigsten und 8 den höchsten BMI aufwies. Die Kontrollgruppe K wurde mit serumfreiem Medium (SFM) behandelt. Mittels qPCR wurde die relative Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt (n=3). Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe im Post-hoc Test nach Dunnett: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, ns nicht signifikant.

Das Gen *PLIN2* zeigte in HCC38 Zellen eine sehr schwache Induzierbarkeit. Hier war nur bei Verwendung von ACM 4 und 7 eine statistisch signifikante Erhöhung der Genexpression nachweisbar (1,3-fach). Die anderen ACMs bewirkten keine Erhöhung der Genexpression. In MDA-MB-231 Zellen konnte mit ACM 3 eine relative Induktion der Genexpression von bis zu 4-fach im Vergleich zur Kontrolle erzielt werden. Die Expression bei Inkubation mit ACM 4, 5, 6, 7 und 8 war ebenfalls signifikant erhöht (1,5-4,2-fach). Bei Verwendung von ACM 1 und 2 konnte keine Induktion der

Genexpression beobachtet werden (siehe Abb. 6). Somit führte die ACM-Behandlung zu einer zellspezifischen Antwort. HCC38 Zellen zeigten nur eine geringe Expressionsänderung, wohingegen in MDA-MB-231 Zellen eine z.T. deutlich signifikante Erhöhung der Expression feststellbar war.

PDK4

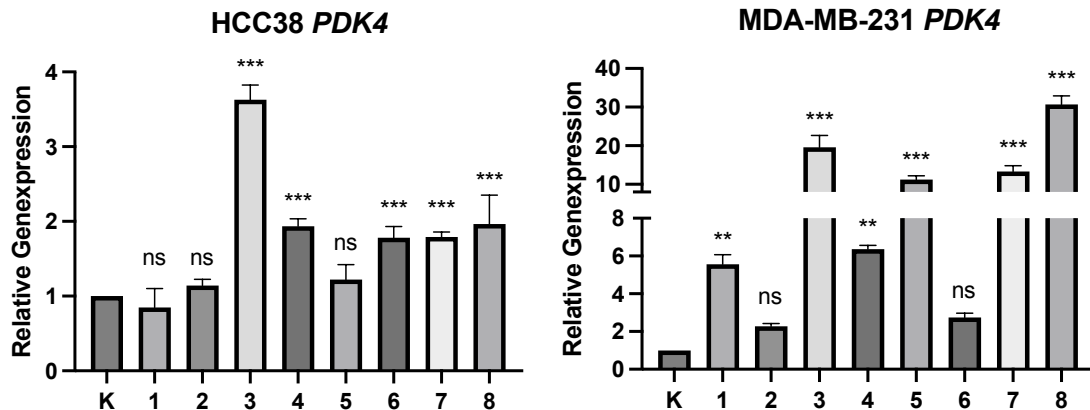


Abbildung 7: Genexpression von PDK4 in HCC38 und MDA-MB-231 Zellen nach ACM-Behandlung. Die beiden Zelllinien HCC38 und MDA-MB-231 wurden mit 8 verschiedenen ACM-Präparaten (1-8) behandelt, wobei 1 den niedrigsten und 8 den höchsten BMI aufwies. Die Kontrollgruppe K wurde mit serumfreiem Medium (SFM) behandelt. Mittels qPCR wurde die relative Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt (n=3). Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe im Post-hoc Test nach Dunnett: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, ns nicht signifikant.

In MDA-MB-231 Zellen war die Expression des Gens *PDK4* signifikant durch Behandlung mit ACM 1, 3, 4, 5, 7 und 8 erhöht, mit bis zu 30-facher Hochregulation durch ACM 8. In HCC38 Zellen war die Hochregulation von *PDK4* durch ACM-Behandlung deutlich geringer ausgeprägt mit einer relativen Genexpression bis zu einem Faktor 3,5 bei Verwendung von ACM 3. ACM 4, 6, 7 und 8 bewirkten eine Erhöhung der Genexpression ca. um den Faktor 2 (siehe Abb. 7).

CPT1A

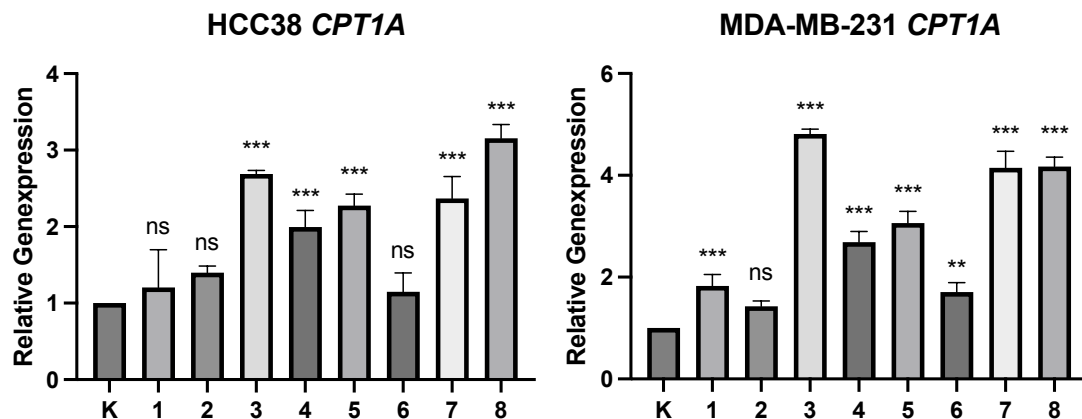


Abbildung 8: Genexpression von CPT1A in HCC38 und MDA-MB-231 Zellen nach ACM-Behandlung. Die beiden Zelllinien HCC38 und MDA-MB-231 wurden mit 8 verschiedenen ACM-Präparaten (1-8) behandelt, wobei 1 den niedrigsten und 8 den höchsten BMI aufwies. Die Kontrollgruppe K wurde mit serumfreiem Medium (SFM) behandelt. Mittels qPCR wurde die relative Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt (n=3). Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe im Post-hoc Test nach Dunnett: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, ns nicht signifikant.

Die Expression des Gens *CPT1A* wurde durch die Behandlung mit ACM verschiedener Spenderinnen in beiden verwendeten Zelllinien ebenfalls hochreguliert. Hier konnte in MDA-MB-231 Zellen eine Steigerung auf das 5-fache bei ACM 3 im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Die ACMs 1, 4, 5, 6, 7 und 8 führten zu einer ca. 2 – 4-fachen Steigerung der Expression. In HCC38 Zellen wurde die Expression von *CPT1A* durch ACM 3, 4, 5, 7 und 8 um den Faktor 2 - 3 stimuliert (siehe Abb.8).

FASN

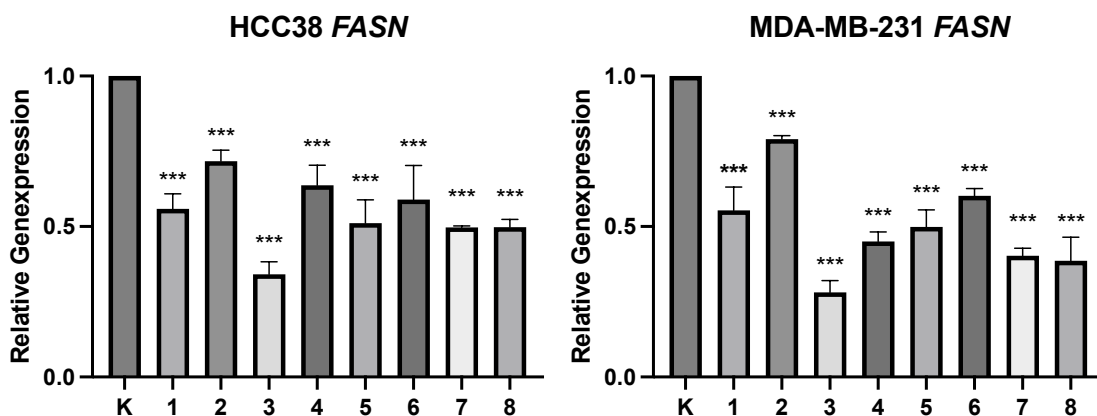


Abbildung 9: Genexpression von *FASN* in HCC38 und MDA-MB-231 Zellen nach ACM-Behandlung. Die beiden Zelllinien HCC38 und MDA-MB-231 wurden mit 8 verschiedenen ACM-Präparaten (1-8) behandelt, wobei 1 den niedrigsten und 8 den höchsten BMI aufwies. Die Kontrollgruppe K wurde mit serumfreiem Medium (SFM) behandelt. Mittels qPCR wurde die relative Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt (n=3). Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe im Post-hoc Test nach Dunnett: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, ns nicht signifikant.

Im Vergleich zu den anderen untersuchten Genen war die Expression von *FASN* in HCC38 und MDA-MB-231 Zellen durch die Inkubation mit ACM signifikant reduziert. Dieser Effekt wurde für alle verwendeten ACMs in beiden Zelllinien beobachtet. Diese Inhibition war für ACM 3 am deutlichsten ausgeprägt, demgegenüber bewirkte ACM 3 in den anderen Genen die höchste Induktion. Umgekehrt wurde durch ACM 2 die Expression von *ANGPTL4*, *PDK4*, *PLIN2* und *CPT1A* nicht signifikant stimuliert und die Reduktion der Expression bei *FASN* war tendenziell gering ausgeprägt (siehe Abb.9).

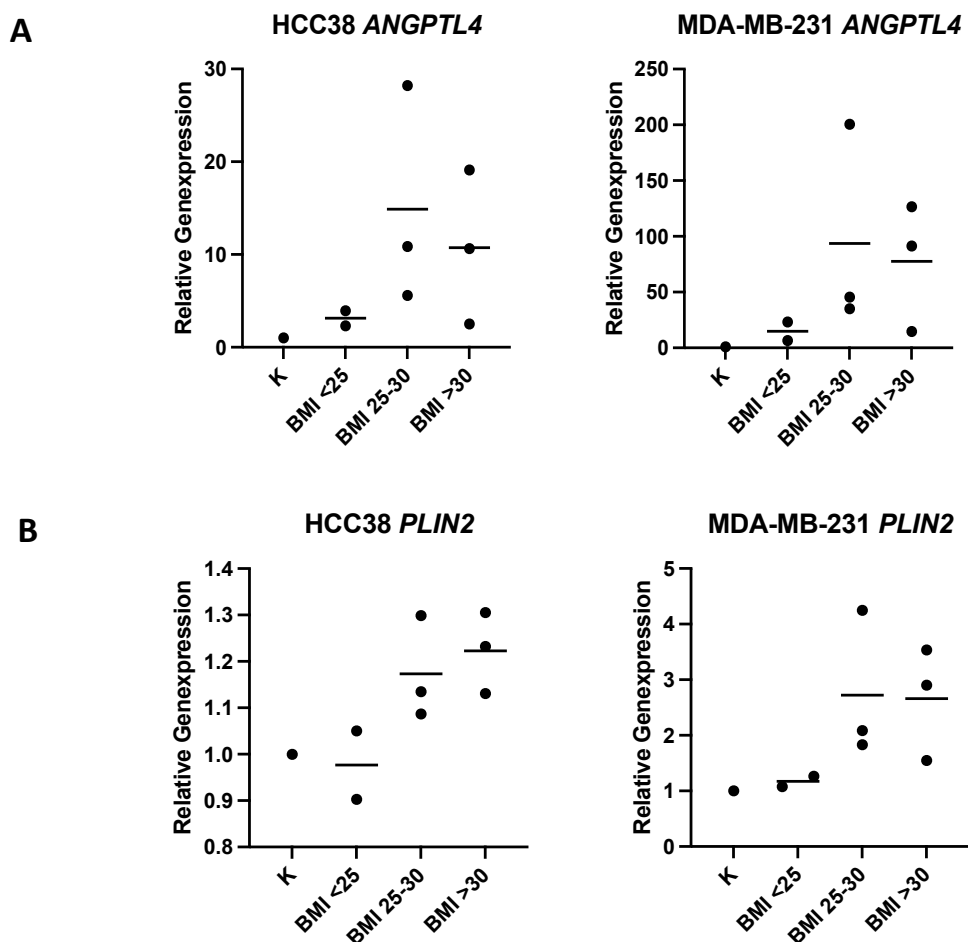
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Genexpression der PPAR-Zielgene *ANGPTL4*, *PLIN2*, *PDK4* und *CPT1A* durch die Behandlung mit ACM verschiedener Spenderinnen in den Brustkrebszelllinien HCC38 und MDA-MB-231 induzierbar war. Die höchste Stimulation (bis zu 200-fach) wurde für *ANGPTL4* beobachtet. Eine deutliche Hochregulation konnte auch für *PDK4* (bis zu 30-fach) gemessen werden, während die Gene *PLIN2* und *CPT1A* auch signifikant, aber in deutlich geringerem Maß (bis zu 5-fach) höher exprimiert wurden im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit nicht-konditioniertem Medium. Die Expression des Gens *FASN* wurde durch die Behandlung mit ACM in beiden Zelllinien herunterreguliert.

Bei Vergleich der Genexpression in den beiden untersuchten Zelllinien war der Expressionsunterschied der untersuchten Gene durch Behandlung mit ACM in MDA-MB-231 Zellen generell höher als in HCC38 Zellen, d.h. die PPAR-Zielgene waren in der MDA-MB-231 Zelllinie besser induzierbar als in HCC38 Zellen. Jedoch zeigten beide Zelllinien eine im Verhältnis vergleichbare Reaktion auf gleiche ACMs.

Betrachtet man die einzelnen ACM-Präparate, so war eine deutliche Donorvariabilität zu beobachten. Beispielsweise wurde durch ACM von Spenderin 2 in keinem Fall eine signifikante Hochregulation der Genexpression ausgelöst, dies war für die Zelllinie HCC38 auch bei ACM von Spenderin 1 der Fall. Dagegen bewirkte ACM der Spenderin 3 in allen hochregulierten Genen den markantesten Effekt.

Um eine mögliche Abhängigkeit der Induzierbarkeit der analysierten PPAR-Zielgene vom BMI der Spenderinnen aufzeigen zu können, wurden die Spenderinnen in 3 BMI-Gruppen zusammengefasst: BMI < 25 (Spenderin 1, BMI 19,8; Spenderin 2, BMI 21,8), BMI 25 - 30 (Spenderin 3, BMI 26,8; Spenderin 4, BMI 28,0; Spenderin 5, BMI 29,4) und BMI > 30 (Spenderin 6, BMI 34,1; Spenderin 7, BMI 35,4; Spenderin 8, BMI 48,8) und die Genexpressionsdaten für die einzelnen hochregulierten Gene den BMI-Gruppen zugeordnet (siehe Abb. 10).

Dabei zeigte sich zwischen den BMI-Gruppen die Tendenz, dass die Brustkrebszellen, die mit ACM aus der übergewichtigen und adipösen BMI-Gruppe behandelt wurden, eine höhere Genexpression im Vergleich zu Brustkrebszellen, die mit ACM aus der normalgewichtigen BMI-Gruppe behandelt wurden, zeigten. Im Gen *FASN* war die umgekehrte Tendenz zu beobachten. Diese Effekte waren jedoch nicht statistisch signifikant. Zwischen der übergewichtigen und adipösen BMI-Gruppe war dagegen keine klare Tendenz zu erkennen und beide Gruppen befanden sich im Mittel auf einem ähnlichen Niveau.



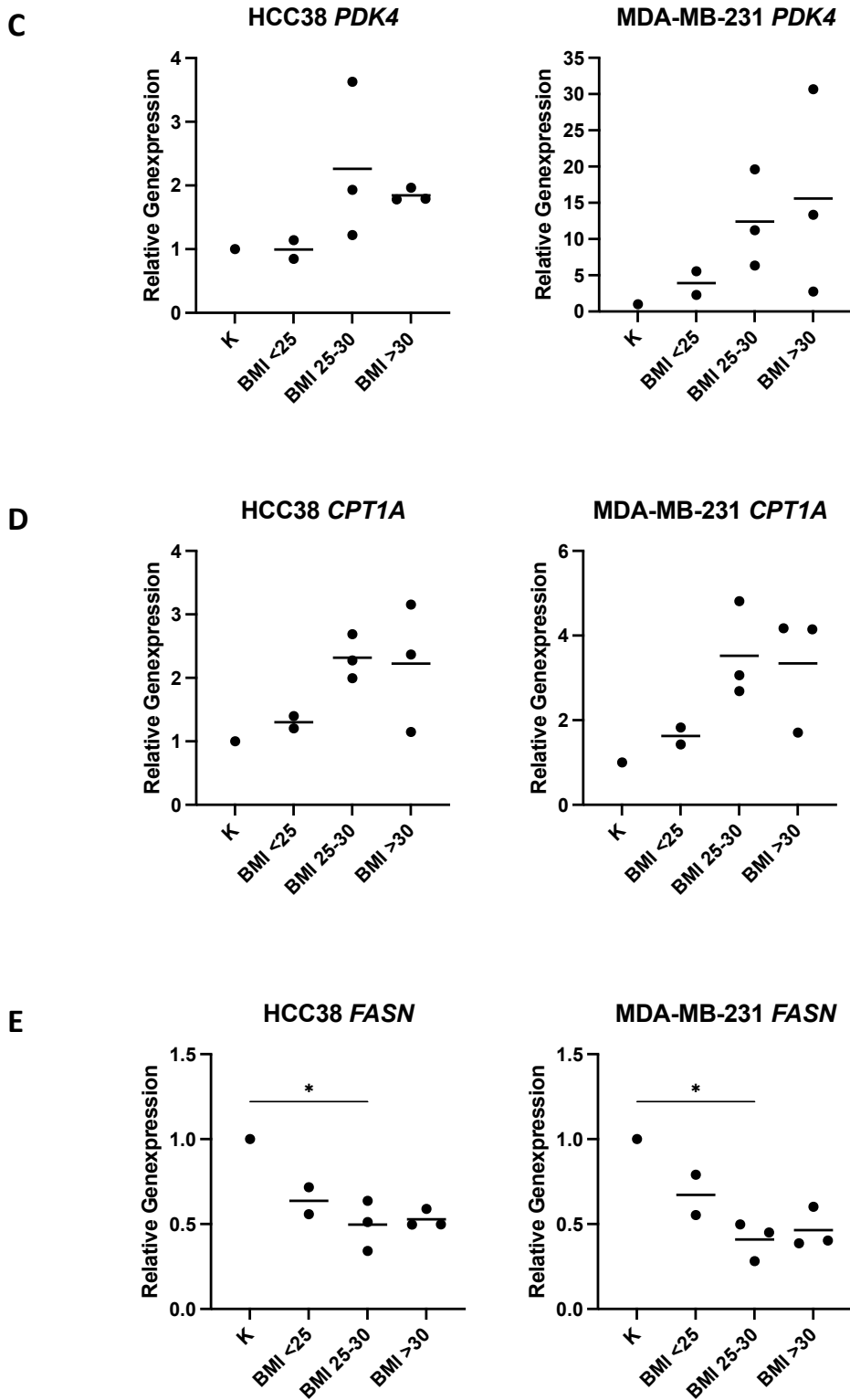


Abbildung 10: Relative Genexpression der PPAR-Zielgene in den BMI-Gruppen.

A) relative Genexpression von *ANGPTL4* im Vergleich zwischen den BMI-Gruppen. B) relative Genexpression von *PLIN2* im Vergleich zwischen den BMI-Gruppen. C) relative Genexpression von *PDK4* im Vergleich zwischen den BMI-Gruppen. D) relative Genexpression von *CPT1A* im Vergleich zwischen den BMI-Gruppen. E) relative Genexpression von *FASN* im Vergleich zwischen den BMI-Gruppen, * $p < 0,05$

3.2. Stabiler Knockdown und Überexpression von *ANGPTL4* in der triple-negativen Brustkrebszelllinie HCC38

3.2.1. Stabiler Knockdown von *ANGPTL4*

Das Gen *ANGPTL4* zeigte bei der Behandlung der beiden triple-negativen Brustkrebszelllinien HCC38 und MDA-MB-231 mit ACM die deutlichste Hochregulation der Genexpression im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte zudem gezeigt werden, dass die Migration und Invasion von Brustkrebszellen mit einem Knockdown im Gen *ANGPTL4* in der Zelllinie MDA-MB-231 stark vermindert war (59). Um die Bedeutung von *ANGPTL4* generell für die Migration- und Invasionsfähigkeit von triple-negativen Brustkrebszellen besser beurteilen zu können, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Herstellung eines stabilen Knockdowns bzw. einer stabiler Überexpression im Gen *ANGPTL4* in einer zweiten humanen triple-negativen Zelllinie (HCC38) und deren Charakterisierung.

Für den Knockdown von *ANGPTL4* wurden HCC38 Zellen mit einem lentiviralen Vektorkonstrukt transduziert, das eine short hairpin RNA mit der Information für den Knockdown des Zielgens trägt.

Es wurden insgesamt 3 unterschiedliche targeting-Sequenzen evaluiert (sh*ANGPTL4* 1-3). Zudem wurde eine Kontrollzelllinie (Non-targeting-Control NTC) hergestellt, die mit dem gleichen Vektorkonstrukt wie die Knockdown-Konstrukte transduziert wurden, mit dem Unterschied, dass die sh-RNA Sequenz kein humanes Transkript erkennt (Non-targeting). Somit konnte eine Kontrolle herangezogen werden, die die gleiche Behandlung wie die Knockdown Zelllinien durchlaufen hatte. Zusätzlich wurde eine Kontrolltransduktion mit lentiviralen Vektoren, die eine shRNA gegen *GAPDH* enthalten, durchgeführt, um die Funktionalität des Vektorkonstruktes in der Zelllinie HCC38 zu überprüfen.

Für jedes Vektorkonstrukt gab es zwei Versuchsansätze mit zwei unterschiedlichen MOIs (multiplicity of infection). Um die Aufnahme des Vektors unter beiden Bedingungen in den Zellen zu erfassen, wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS) die GFP-Fluoreszenz in den transduzierten Zelllinien gemessen und analysiert, wieviel des im Vektor enthaltenen GFPs unter den verschiedenen Bedingungen (3 verschiedene Knockdown-Vektorkonstrukte und Kontrollvektor, jeweils 10 und 25 MOI) zu detektieren war (siehe Abb. 11). Die Anzahl der aufgenommenen lentiviralen Partikel pro Zelle korreliert mit der Höhe der GFP-Expression.

Dabei zeigte sich für den Kontrollvektor NTC und Vektorkonstrukt 3 eine deutlich erhöhte GFP-Expression bei MOI 25 im Vergleich zu MOI 10. Daraus lässt sich schließen, dass für diese Konstrukte bei höherem MOI mehr Partikel pro Zelle aufgenommen wurden. Für Vektorkonstrukt 2 zeigten beide MOIs eine vergleichbare GFP-Expression. Bei der Zelllinie mit Vektorkonstrukt 1 konnte kein Vergleich dargestellt werden, da die Zellen, die mit einem MOI von 10 transduziert wurden, nach Puromycin-Selektion nicht mehr vital waren. In der Kontrolltransduktion gegen das Gen *GAPDH* zeigte sich bei MOI 25 eine etwa doppelt so hohe GFP-Expression im Vergleich zu einer Behandlung mit MOI 10 (siehe Abb. 11).

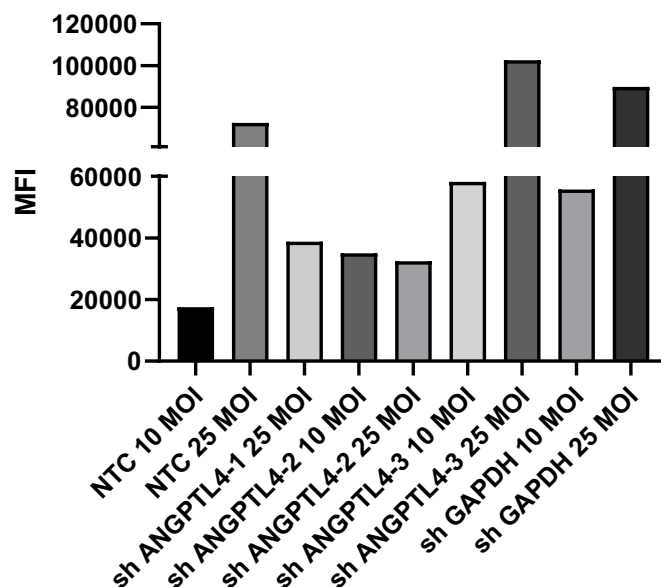


Abbildung 11: Durchflusszytometrie zur Ermittlung der GFP-Fluoreszenz in den verschiedenen transduzierten Knockdown-Zelllinien. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität der transduzierten Zelllinien (NTC, ANGPTL4, GAPH jeweils mit MOI 10 und 25) nach Aufnahme des Vektors mit GFP-Expression.

In der Genexpressionsanalyse ließ sich keine Korrelation zwischen höherem MOI, damit verbundener GFP-Expression und der Effektivität des Knockdowns nachweisen. Bei einem MOI von 10 führte lediglich das Vektorkonstrukt 2 zu einer um 40% verringerten relativen Genexpression im Gen *ANGPTL4* im Vergleich zur Kontrollzelllinie NTC (siehe Abb. 12A). Vektorkonstrukt 3 führte hierbei zu keiner Reduktion der *ANGPTL4*-Expression. Bei einem MOI von 25 konnte mit keinem

Konstrukt eine verringerte Expression des Zielgens erreicht werden (siehe Abb.12B). Im Vergleich zum Wildtyp zeigte sich mit Vektorkonstrukt 2 (MOI 10) eine Reduktion der relativen Genexpression von *ANGPTL4* um 60% (siehe Abb. 12C). Dieser Unterschied lässt sich darauf zurückführen, dass auch die Kontrollzelllinie NTC eine niedrigere Genexpression von *ANGPTL4* im Vergleich zum Wildtyp aufwies.

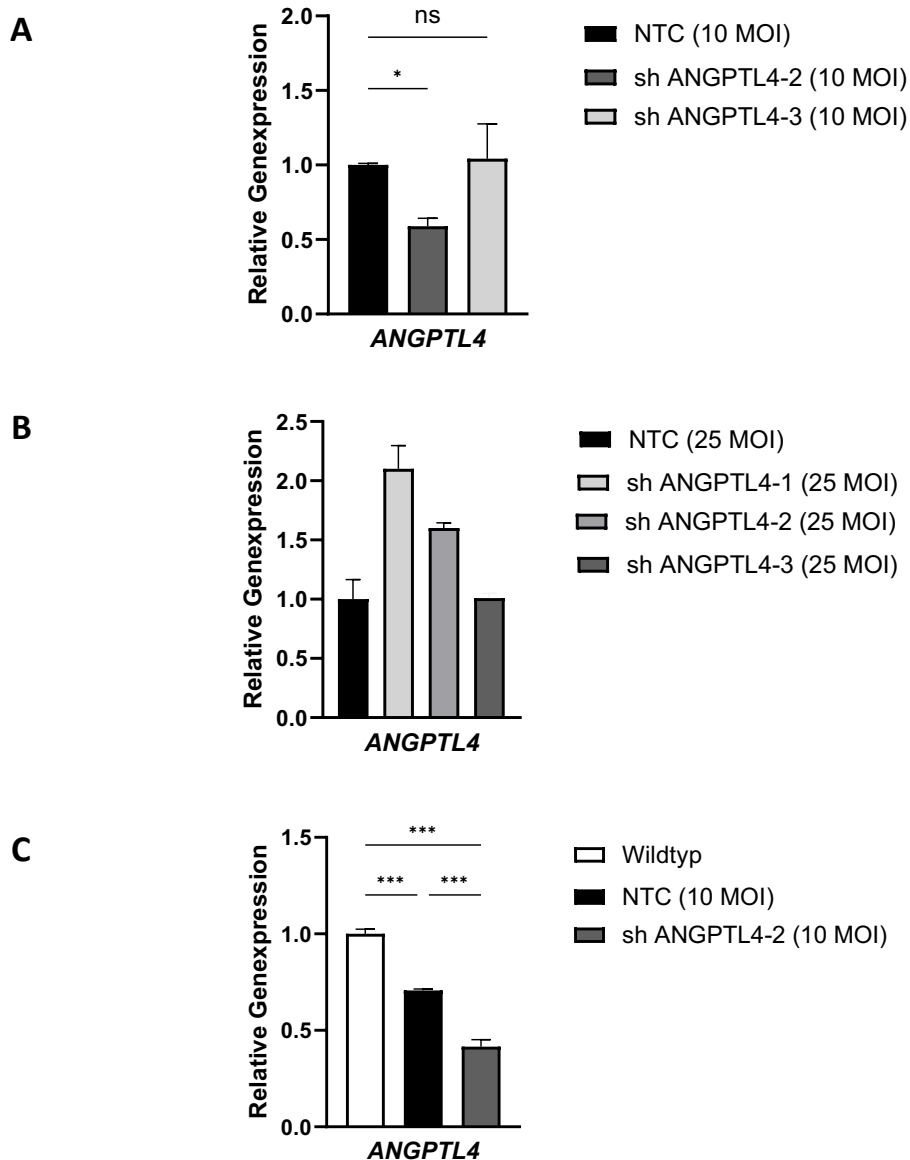


Abbildung 12: Genexpressionsanalyse der transduzierten Zelllinien HCC38 mit *ANGPTL4* Depletion. A) Relative Genexpression von *ANGPTL4* mit den beiden Knockdown-Konstrukten 2 und 3 im Vergleich zur Kontrollzelllinie NTC bei einem MOI von 10. B) Relative Genexpression von *ANGPTL4* der Knockdown-Konstrukte 1, 2 und 3 im Vergleich zur Kontrollzelllinie NTC mit einem MOI von 25. Hier erfolgt keine Darstellung der Signifikanz, da nur ein Knockdown als signifikantes Ergebnis angesehen wurde. C) Relative Genexpression von *ANGPTL4* des Knockdown-Konstruktes 2 und der Kontrollzelllinie NTC mit einem MOI von 10 im Vergleich zum Wildtyp. $p < 0,05$, $** p < 0,01$, $*** p < 0,001$, ns nicht signifikant.

Die Expression von *GAPDH* konnte bei einem MOI von 10 um 40% im Vergleich zum Wildtyp und bei einem MOI von 25 um 20% reduziert werden (siehe Abb. 13). Vergleichbar zu dem Knockdown im Gen *ANGPTL4* mit dem Vektorkonstrukt 2 konnte im Gen *GAPDH* ein effektiverer Knockdown bei einem MOI von 10 erzielt werden. Insgesamt war jedoch die Effektivität der Transduktion in Bezug auf den Knockdown von *GAPDH* relativ gering ausgeprägt, d.h. das Vektorkonstrukt war in der Zelllinie HCC38 nur eingeschränkt funktional.

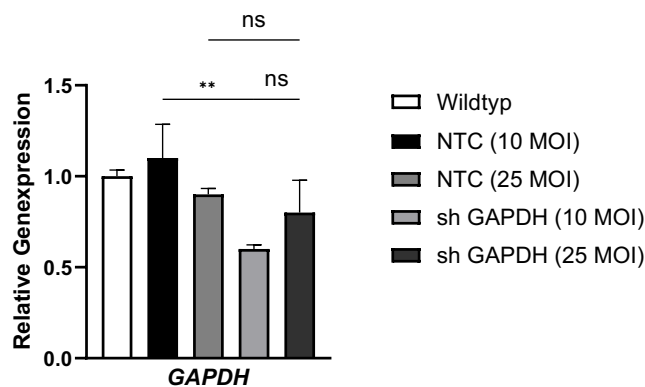


Abbildung 13: Genexpressionsanalyse der transduzierten Zelllinien HCC38 mit Depletion von *GAPDH*. Relative Genexpression der Kontrollzelllinie NTC sowie der *GAPDH* Knockdown-Zelllinie mit MOI 10 und 25 im Vergleich zum Wildtyp. $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns nicht signifikant.

3.2.2. Stabile Überexpression von *ANGPTL4*

Um eine Überexpression von *ANGPTL4* zu erreichen, wurde eine Transduktion mit lentiviralen Partikeln durchgeführt, die ein Vektorkonstrukt mit dem *ANGPTL4* open reading frame (ORF) enthalten. Für die Herstellung der überexprimierenden Zelllinie wurde die Transduktion nur mit einem MOI von 25 durchgeführt. Die Zellen bei einem MOI von 10 zeigten sich im Wachstum eingeschränkt und von der Morphologie stark verändert. Nach Selektion mit Puromycin waren hier kaum noch vitale Zellen vorhanden.

Wie bei den Knockdown-Zelllinien wurde auch hier eine Kontrollzelllinie (empty vector) hergestellt, die mit dem gleichen Vektorkonstrukt behandelt wurde wie die überexprimierende Zelllinie, jedoch ohne die Information für das Zielgen zu enthalten.

In der Durchflusszytometrie zeigte die Kontrollzelllinie empty vector eine ca. 3-fach höhere mittlere GFP-Fluoreszenzintensität als die ANGPTL4 überexprimierende Zelllinie. Dieser Unterschied weist darauf hin, dass die Kontrollzelllinie mehr lentivirale Partikel pro Zelle aufgenommen hat, obwohl beide Zelllinien mit dem gleichen MOI behandelt wurden (siehe Abb. 14).

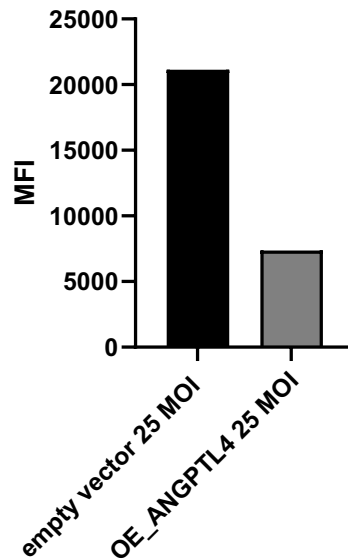


Abbildung 14: Durchflusszytometrie zur Ermittlung der GFP-Fluoreszenz in den transduzierten Zelllinien. Mittlere Fluoreszenzintensität der *ANGPTL4* überexprimierenden Zelllinie und der Kontrollzelllinie empty vector mit einem MOI von 25 nach Aufnahme des Vektors mit GFP-Expression.

In der Genexpressionsanalyse zeigte sich eine sehr hohe Überexpression des *ANGPTL4*-Gens in der überexprimierenden Zelllinie. Die Kontrollzelllinie empty vector zeigte eine reduzierte Genexpression von *ANGPTL4*, im Vergleich zum Wildtyp, die jedoch statistisch nicht signifikant reduziert war.

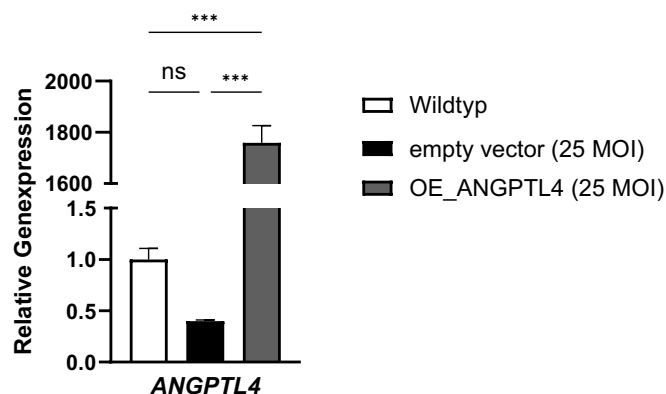


Abbildung 15: Genexpressionsanalyse der transduzierten Zelllinie HCC38 mit Überexpression im Gen *ANGPTL4*. Relative Genexpression im Gen *ANGPTL4* der überexprimierenden Zelllinie und der Kontrollzelllinie empty vector im Vergleich zum Wildtyp. $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns nicht signifikant.

Die überexprimierende Zelllinie zeigte eine 4000-fache Überexpression im Zielgen *ANGPTL4* im Vergleich zur Kontrollzelllinie empty vector und eine 1700-fache Überexpression im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abb. 15).

Um die Expression von *ANGPTL4* in der überexprimierenden Zelllinie auch auf Proteinebene nachzuweisen, wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt. Dabei wurde zunächst ein spezifischer Primärantikörper gegen *ANGPTL4* verwendet, der dann mit einem grün-fluoreszierenden Sekundärantikörper bei einer Wellenlänge von 517 nm in der Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden konnte. Dabei konnte eine deutlich verstärkte Fluoreszenz in der überexprimierenden Zelllinie im Vergleich zur Kontrollzelllinie beobachtet werden. Auch beim Vergleich mit der ebenfalls bei dieser Wellenlänge detektierbaren GFP-Expression war die deutlich höhere Fluoreszenzintensität der überexprimierenden Zelllinie in der *ANGPTL4*-Anfärbung deutlich sichtbar (siehe Abb. 16A). Um die GFP-Fluoreszenz in der immunhistochemischen Färbung ausblenden zu können, wurde die Detektion mit einem zweiten Sekundärantikörper, der bei einer Wellenlänge von 594 nm rot fluoresziert, wiederholt. Auch hier war ein deutlicher Unterschied in der Intensität der Anfärbung der überexprimierenden Zelllinie im Vergleich zur Kontrollzelllinie zu sehen (siehe Abb. 16B).

In einem weiteren Ansatz wurde als Primärantikörper ein Anti-Flag Antikörper verwendet, der an das Flag-Tag bindet, das durch die Informationen auf dem Vektor an *ANGPTL4* gekoppelt wurde und auf diese Weise das Protein nach Zugabe des Sekundärantikörpers in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar macht. Bei Verwendung des Anti-Flag Primärantikörpers zeigte sich bei der Kontrollzelllinie keine Anfärbung. Die überexprimierende Zelllinie zeigte auch hier ein deutlich gesteigertes Fluoreszenzsignal (siehe Abb. 17).

Zusammenfassend konnte durch die Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden, dass die überexprimierende Zelllinie im Vergleich zur Kontrollzelllinie auch auf Proteinebene deutlich mehr *ANGPTL4* exprimierte.

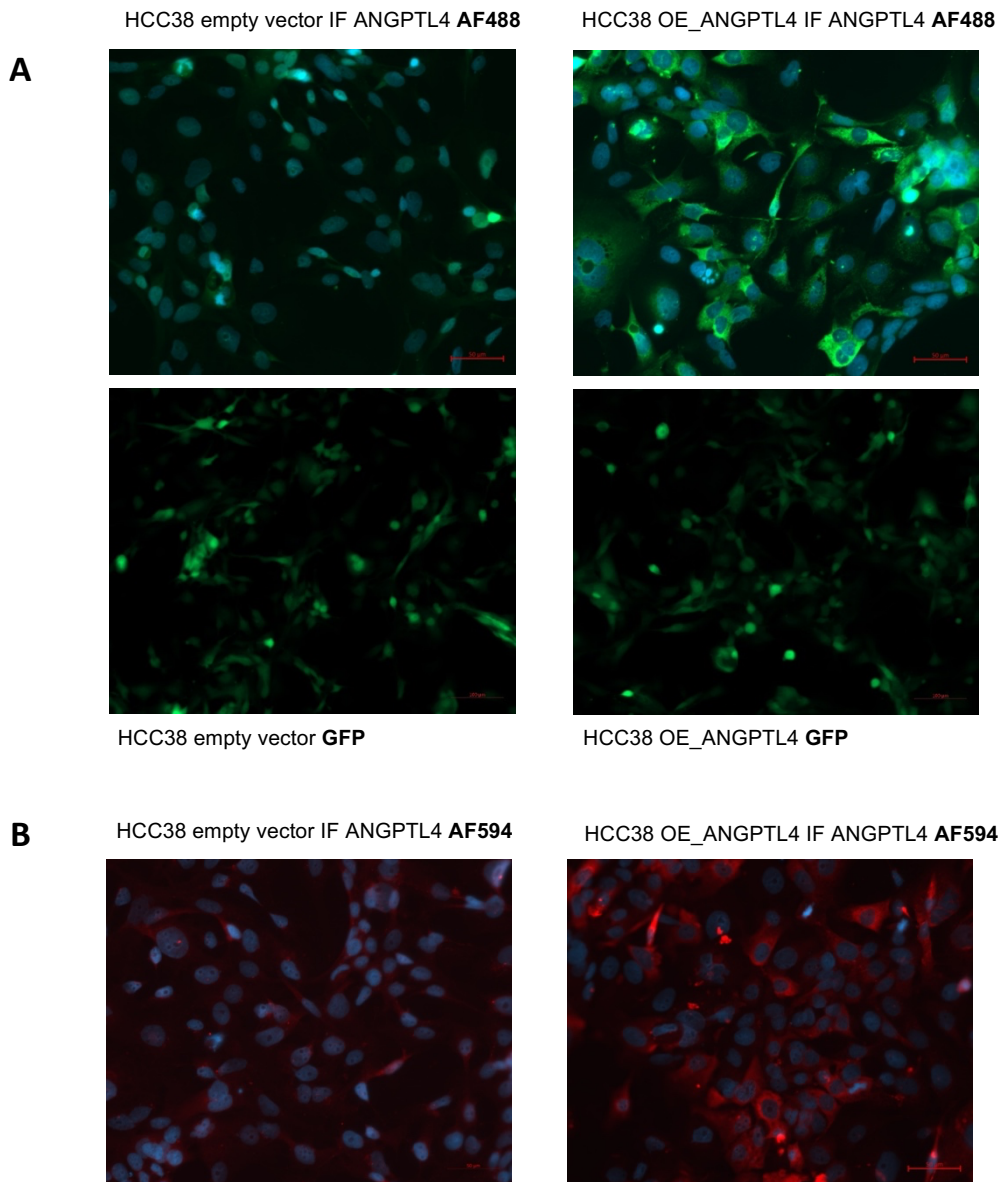


Abbildung 16: Immunfluoreszenzfärbung von ANGPTL4 in der überexprimierenden Zelllinie im Vergleich zur Kontrollzelllinie. A) Immunfluoreszenzfärbung mit spezifischem Primärantikörper gegen ANGPTL4 und Sekundärantikörper mit grünem Immunfluoreszenzfarbstoff AF488 (obere Reihe). Vergleichsdarstellung GFP-Fluoreszenz, da AF488 bei der gleichen Wellenlänge detektiert wird wie GFP (untere Reihe). B) Immunfluoreszenzfärbung mit spezifischem Primärantikörper gegen ANGPTL4 und Sekundärantikörper mit rotem Immunfluoreszenzfarbstoff AF594.

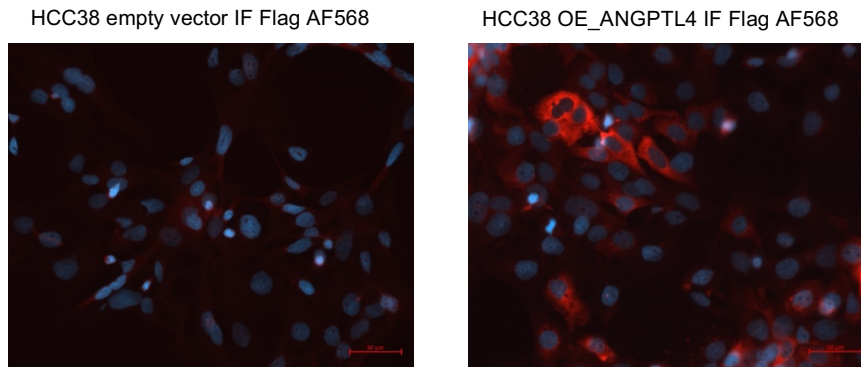


Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung des ANGPTL4-Flag-Tags in der überexprimierenden Zelllinie im Vergleich zur Kontrollzelllinie.

Aufgrund des sehr hohen Gen-Expressionslevels von *ANGPTL4* in der überexprimierenden Zelllinie, das vermutlich weit über einem physiologischen Bereich liegt, erfolgte eine Sortierung der Zellen mittels Durchflusszytometrie. Hierbei wurde aus der überexprimierenden Zelllinie eine Population mit jeweils niedrigem bzw. intermediärem Expressionslevel im Vergleich zur Gesamtpopulation abgetrennt und jeweils als unabhängige Zelllinie weiter kultiviert. Die niedrig exprimierende Zelllinie zeigte eine 1200-fache relative Genexpression im Vergleich zur Kontrollzelllinie empty vector. Im Vergleich zur ungesorteten, überexprimierenden Zelllinie, zeigte sich eine um 27% niedrigere Genexpression. Die Zelllinie mit einer intermediären Expression zeigte eine doppelt so hohe relative Genexpression wie die Zelllinie im niedrig gesorteten Bereich und eine um 30% höhere relative Genexpression als die ungesortete, überexprimierende Zelllinie (siehe Abb. 18A). Die Zelllinie, die mit extrem hoher Genexpression weit über dem physiologischen Bereich gesortet wurde, wurde nicht weiter charakterisiert und verworfen. Die Zelllinie im niedrig gesorteten Bereich könnte bei weiteren Experimenten die zu verwendende Zelllinie darstellen, da die Überexpression im Gen *ANGPTL4* sich in einem moderaten Bereich befindet.

Mittels eines ELISA wurde die Sekretion von ANGPTL4 quantitativ ermittelt. Dabei zeigte sich in Übereinstimmung zur Genexpression eine niedrigere ANGPTL4 Sekretion in der Kontrollzelllinie empty vector im Vergleich zum Wildtyp. Die niedrig gesortete Zelllinie zeigte eine halb so hohe ANGPTL4-Sekretion wie die Zellen, die in die mittlere Kategorie gesortet wurden (siehe Abb.18B).

In der Genexpressionsanalyse zeigte die ungesortete Zelllinie eine niedrigere Genexpression als die Zelllinie im mittleren Bereich. Auf Proteinebene war jedoch eine höhere Sekretion der ungesorteten Zelllinie zu beobachten.

In den beiden gesorteten Zelllinien deckten sich die Genexpressionsdaten weitgehend mit den Daten auf Proteinebene.

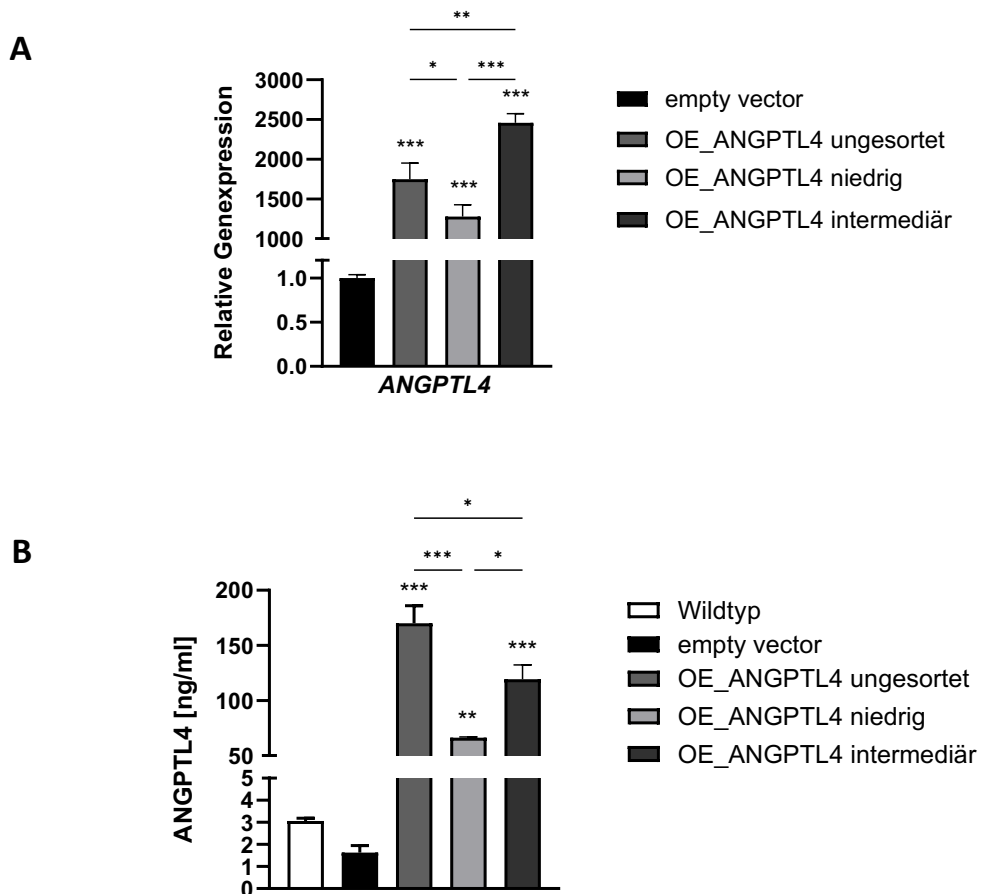


Abbildung 18: Charakterisierung der ANGPTL4 Gen- und Proteinexpression in den über-exprimierenden Zelllinien nach Zellsorting. A) Relative Genexpression der gesorteten Zelllinien im Vergleich zur Kontrollzelllinie empty vector. B) Protein Konzentration aus Zellkulturüberständen der gesorteten Zelllinien sowie des Wildtyps mittels ELISA. $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns nicht signifikant

In dieser Arbeit konnten keine weiteren Versuche mit den transduzierten Zelllinien durchgeführt werden, da diese im Wachstum zum Teil stark verlangsamt waren und sich zu diesem Zeitpunkt für kein Versuchssetting eigneten. Die Zellen wurden in ausreichender Menge für mögliche spätere Versuche eingefroren.

Zusammenfassend wurde in den beschriebenen Transduktionsversuchen in HCC38 Zellen sowohl ein stabiler Knockdown im Gen *ANGPTL4* (Reduktion der Genexpression um den Faktor 0,6 im Vergleich zur Kontrollzelllinie) als auch eine stabil überexprimierende Zelllinie (Erhöhung der Genexpression um den Faktor 1200 im Vergleich zur Kontrollzelllinie) hergestellt. Die überexprimierende Zelllinie wurde anhand von Immunfluoreszenzfärbungen, FACS-Sorting und ELISA erfolgreich charakterisiert.

4. Diskussion

Durch die lokale Nähe von Brustgewebe und Fettgewebe in der weiblichen Brust spielt der direkte Einfluss des Fettgewebes auf die Entstehung und Progression des Mammakarzinoms eine wichtige Rolle (34,36). Adipozyten als Hauptbestandteile des Brustfettgewebes wurden erst kürzlich als aktive Modulatoren des Tumormilieus erkannt, die die Progression des Tumors begünstigen können (34,36). Übergewicht und Adipositas sind hierbei Faktoren, die durch entzündliche und metabolische Veränderungen im Fettgewebe einen deutlichen Einfluss auf das Brustkrebsrisiko und den Krankheitsverlauf haben (23,25).

In diesem Kontext wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von sekretierten Faktoren des Fettgewebes auf die Expression der Gene *PLIN2*, *PDK4*, *CPT1A*, *FASN* und *ANGPTL4* in triple-negativen Brustkrebszellen untersucht, indem diese mit durch Fettgewebe konditioniertem Medium behandelt wurden. Die genannten Gene werden durch PPAR reguliert und sind in den Energiehaushalt und den Lipidstoffwechsel der Zellen involviert (45,68,70,75,78). Die Expression dieser Gene wurde mittels qPCR quantitativ in zwei unterschiedlichen triple-negativen Brustkrebszelllinien (MDA-MB-231 und HCC38) analysiert.

Dabei konnte in den Genen *PLIN2*, *PDK4*, *CPT1A* und *ANGPTL4* eine zum Teil hochsignifikante Hochregulation der Genexpression nachgewiesen werden,

besonders in MDA-MB-231-Zellen. In der Zelllinie HCC38 war die Induktion der untersuchten Gene nach Behandlung mit den verschiedenen ACMs im Durchschnitt geringer ausgeprägt. Die Expression von *FASN* wurde durch die aus dem Fettgewebe sekretierten Faktoren signifikant herunterreguliert.

Perilipin 2 (PLIN2) ist ein wichtiger Bestandteil der Hülle von Lipidtröpfchen und fördert die Speicherung von Triglyceriden in Adipozyten, aber auch in anderen Zellarten (66). In der HCC38-Zelllinie zeigte sich die Induktion im niedrig signifikanten Bereich, in MDA-MB-231 war die relative Genexpression gegenüber der Kontrollbehandlung hochsignifikant erhöht mit einer bis zu 4-fachen Hochregulation.

Dies steht im Einklang mit Literaturdaten, nach denen eine erhöhte PLIN2 Expression mit einem aggressiven Phänotyp in Brustkrebszellen in Zusammenhang gebracht wird (82). So wurde in triple-negative Brustkrebszellen sowohl in histologischen Proben von Patientinnen als auch in der Zellkultur signifikant mehr PLIN2 nachgewiesen als in Hormonrezeptor-positiven Subtypen (82).

Die Pyruvat-Dehydrogenase Kinase 4 (PDK4) ist am sog. Warburg Effekt beteiligt. Dieser bezeichnet einen veränderten Metabolismus von Tumorzellen, hierbei wird trotz ausreichend vorhandenem Sauerstoff Pyruvat zu Lactat umgewandelt, wobei PDK4 eine wichtige Rolle spielt (72,73). PDK4 inhibiert die Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA und verhindert somit die Verbindung von Glykolyse und Citratzyklus (72). In der Tumorzelle findet dadurch ein metabolischer Switch von der mitochondrialen Zellatmung hin zur zytoplasmatischen Glykolyse statt (83). In dieser Arbeit zeigte sich in MDA-MB-231 nach Behandlung mit ACM eine relative Genexpression von bis zu 30-fach erhöht im Vergleich zur Kontrollbehandlung. In HCC38-Zellen war die Expression bis zu einem Faktor 4 erhöht. In der Literatur wurde ein aggressiverer Phänotyp verschiedener Tumorentitäten bei erhöhter PDK4 Expression beschrieben (83–85). Eine erhöhte PDK4 Expression wurde z.B. mit einer Resistenz von Blasen-tumorzellen gegen Chemotherapie und einer Chemo-resistenz sowie einer erhöhten Proliferation und Invasion von Ovarialkarzinomzellen in Zusammenhang gebracht (83,84). Guda et al. zeigten, dass eine erhöhte PDK4 Expression in Brustkrebsgewebeproben mit einer schlechteren Überlebensrate assoziiert ist (74).

Die Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1A (CPT1A) ist das Schlüsselenzym der mitochondrialen Beta-Oxidation, indem es den Transport von freien Fettsäuren durch

die äußere Mitochondrienmembran katalysiert (76). In Versuchen dieser Arbeit wurde die Genexpression von CPT1A in den Tumorzellen durch die Behandlung mit ACM induziert, was darauf hindeutet, dass sekretierte Faktoren oder freie Fettsäuren aus dem Fettgewebe die β -Oxidation von Fettsäuren in den Tumorzellen stimulieren. Dies deutet daraufhin, dass die Interaktion zwischen Fettgewebe und Brustkrebszellen über die Bereitstellung von Fettsäuren die Expression und Aktivität von CPT1A beeinflussen kann, was wiederum zu einer besseren Überlebensfähigkeit der Tumorzellen beitragen kann (77). In diesem Zusammenhang zeigten Jariwala et al., dass aggressive hormonrezeptorpositive Brustkrebszellen eine erhöhte mRNA-Expression von CPT1A im Vergleich zu weniger aggressiven Phänotypen exprimierten (77). Zudem korrelierte eine erhöhte CPT1A Expression in hormonrezeptorpositiven Brustkrebszellen mit einer schlechteren klinischen Prognose (77). In vitro führte eine Überexpression von CPT1A zu einer gesteigerten Proliferation und einer Gensuppression zum Zelltod der Zellen (77). In der triple-negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 führten Knockdown-Versuche im Gen *CPT1A* zu einem verminderten Wachstum sowie einer geringeren Migrationsfähigkeit der Tumorzellen (86). Aiderus et al. fanden demgegenüber, dass es durch eine Überexpression im Gen *CPT1A* in MDA-MB-231 zu einer verringerten Migration und Proliferation der Zellen kommt (87).

Die Fettsäuresynthetase (FASN) ist das Schlüsselenzym der De-novo Fettsäuresynthese (78,80). Nach den vorliegenden Ergebnissen meiner Arbeit führte eine Behandlung von MDA-MB-231 und HCC38 mit ACM zu einer signifikanten Herunterregulation des Gens *FASN* im Vergleich zur Kontrollbehandlung. Interessanterweise führte das ACM-Präparat mit der höchsten Induktionsfähigkeit der anderen untersuchten Gene, die z.T. an der Lipolyse und der Beta-Oxidation beteiligt sind, auch zur stärksten Inhibition von FASN. Dies könnte die Hypothese, die Blücher et al. bereits aufstellten, dass die enthaltenen Fettsäuren im ACM, die von den Tumorzellen aufgenommen und zur Energiegewinnung benutzt werden können, zu einer Herunterregulation der endogenen Fettsäuresynthese durch FASN führen, so wie es auch in normalem Gewebe, wie z.B. Adipozyten, der Fall ist, weiter stützen (59,88). In diesem Zusammenhang zeigten auch Menendez et al., dass Brustkrebszellen, die durch die Behandlung mit einem FASN-Inhibitor nicht mehr überlebensfähig waren, nach der Zugabe von exogenen Fettsäuren wieder überlebensfähig waren (88).

In einer Vielzahl von Tumorentitäten wurde dagegen eine erhöhte Expression von FASN festgestellt (88). Giró-Perafita et al. untersuchten die FASN-Expression in triple-negativen Brusttumoren und fanden eine erhöhte FASN-Expression, die mit einem positiven Lymphknotenstatus korrelierte, jedoch nicht mit dem Gesamtüberleben (89).

Angiopoetin-like 4 (ANGPTL4) wird primär von Hepatozyten und Adipozyten sezerniert und greift durch die Hemmung der Lipoproteinlipase in den Fettstoffwechsel ein (45). ANGPTL4 ist in eine Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen involviert, u.a. Angiogenese, Zelldifferenzierung, Glucosstoffwechsel, Lipidstoffwechsel, Entzündungen, Wundheilung und Karzinogenese (45). Die C-terminale Domäne des ANGPTL4-Moleküls fördert die Proliferation und die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen (58,59). Eine erhöhte ANGPTL4-Expression wurde in verschiedenen Tumorentitäten, z.B. Prostatakarzinom, Lebertumoren, Nierenzellkarzinom, Kolorektalkarzinom und Brustkrebs nachgewiesen (45). In meiner Arbeit konnte durch die Behandlung mit ACM eine bis zu 200-fache relative Genexpression im Gen *ANGPTL4* im Vergleich zur Kontrollbehandlung in MDA-MB-231 induziert werden. Damit war *ANGPTL4* das Gen mit der stärksten Induzierbarkeit der untersuchten PPAR-Zielgene durch sekretierte Faktoren des Fettgewebes. Die Ergebnisse meiner Arbeit stimmen mit vorherigen Ergebnissen der Arbeitsgruppe überein, wo ebenfalls *ANGPTL4* das am stärksten induzierte PPAR-Zielgen durch Behandlung mit ACM oder exogener Fettsäuren war (59). Die Induktion der Genexpression von *ANGPTL4* kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden, u.a. HIF1- α , TGF β und PPAR (45). Blücher et al. untersuchten ACM-Präparate auf deren Fettsäurezusammensetzung und konnten eine Korrelation zwischen der *ANGPTL4*-Expression in MDA-MB-231 nach Behandlung mit dem entsprechenden ACM und dem Fettsäuregehalt feststellen (59). Zudem fanden sie, dass in ACM von adipösen Patientinnen mit einem BMI > 40 eine deutlich höhere Konzentration an Fettsäuren zu messen war, im Vergleich zu ACM von Patientinnen mit einem BMI < 30 (59)

Im Zusammenhang mit Adipositas wiesen Kolb et al. nach, dass es in gesundem Brustgewebe von adipösen Frauen zu einer deutlich erhöhten ANGPTL4-Expression im Vergleich zu normalgewichtigen Frauen kommt (65). Zudem bestand eine inverse Korrelation zwischen der ANGPTL4-Expression und dem progressionsfreien Überleben in allen Brustkrebs Subtypen (59,65). In TNBC zeigte sich die höchste

ANGPTL4-Expression im Vergleich zu anderen Subtypen (59,65). Zudem wird eine erhöhte Expression von ANGPTL4 mit einer erhöhten Metastasierungsrate von Brustkrebszellen in die Lunge in Zusammenhang gebracht (90). Kolb et al. konnten ferner nachweisen, dass im Mausmodell ein Antikörper gegen cANGPTL4 die Adipositas-bedingte Tumorprogression von Brustkrebszellen inhibieren kann (65). Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass sekretierte Faktoren aus dem Fettgewebe die Expression von Genen, die in den Lipidstoffwechsel involviert sind, in Brustkrebszellen beeinflussen. Besonders *ANGPTL4* wies eine hohe Induzierbarkeit auf und könnte damit ein mögliches Kandidatengemisch für eine zielgerichtete Therapie, vor allem im Zusammenhang mit Adipositas, sein.

Adipositas führt zu einer chronischen Inflammation des Fettgewebes und es kommt zu einer vermehrten Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, die den gesamten Metabolismus beeinflussen (27,40). Studien zeigten, dass Patientinnen die mit TNBC und einem BMI > 30 in einem fortgeschrittenerem Tumorstadium diagnostiziert werden, ein höheres Metastasierungsrisiko haben und eine geringere Ansprechrate auf Chemo- und endokrine Therapie 10 Jahre nach der Behandlung im Vergleich zu Patientinnen mit BMI < 25 haben (91). In meiner Arbeit wurden, wie oben beschrieben, die beiden triple-negativen Zelllinien HCC38 und MDA-MB-231 mit sekretierten Faktoren aus dem Fettgewebe von Spenderinnen mit unterschiedlichem BMI behandelt und die Genexpression von ausgewählten PPAR-Zielgenen untersucht. Es konnte für alle untersuchten Gene der Trend beobachtet werden, dass die ACMs aus den beiden BMI-Gruppen im übergewichtigen und adipösen Bereich eine höhere relative Genexpression bzw. beim Gen *FASN* eine niedrigere Genexpression in den Brustkrebszellen induzierten im Vergleich zu den ACMs aus der normalgewichtigen BMI-Gruppe, dieser Unterschied war jedoch nicht im signifikanten Bereich. Sowohl in der BMI-Gruppe 25-30 als auch in der BMI-Gruppe >30 gab es ein ACM-Präparat, das einen besonders starken Effekt zeigte. Bei BMI 25-30 wurde durch ACM 3 eine, im Vergleich zu den anderen Präparaten aus dieser Gruppe, sehr hohe Genexpression induziert. In der BMI-Gruppe >30 fiel ACM 6 aus der Reihe und induzierte eine, im Vergleich zu den anderen Präparaten, sehr geringe Genexpression. Diese Beobachtung deutet auf eine Donorvariabilität der Spenderinnen hin. Der insgesamt einheitliche Trend in allen untersuchten Genen könnte jedoch auf einen Einfluss des BMIs der Spenderinnen auf das Genexpressionsprofil der PPAR-Zielgene hindeuten.

Eine Genexpressionsstudie mit höheren Fallzahlen pro BMI-Gruppe würde eine belastbare Aussage erlauben und diesen interessanten Zusammenhang möglicherweise belegen.

Zudem wurde lediglich der BMI als Kriterium für den Grad des Übergewichts herangezogen. Die Literatur gibt jedoch Hinweise, dass der BMI nur ein begrenzt aussagefähiges Maß für die Korrelation zwischen Gewicht und metabolischem Profil ist (92). Es gibt Patientinnen, die trotz eines BMI > 30 ein gesundes metabolisches Profil aufweisen und keine Insulinresistenz, Typ-2 Diabetes, Hyperlipidämie oder Hypertension haben (92). Auch zwischen verschiedenen Ethnien gibt es Unterschiede in der Korrelation zwischen BMI und Adipositas. Afro-amerikanische Frauen haben eine höhere Muskelmasse im Vergleich zu anderen Ethnien und haben dadurch fälschlicherweise einen höheren BMI (92). Die Carolina Breast Cancer Study verwendete die „*Waist-Hip Ratio*“ (WHR) und zeigte, dass Frauen mit einer erhöhten WHR ein signifikant erhöhtes Risiko hatten an TNBC zu erkranken (93). Gleichzeitig zeigten sie in der gleichen Kohorte, dass ein erhöhter BMI > 30 nicht mit einem erhöhten Risiko für die Erkrankung am TNBC assoziiert war (93).

Einen weiteren interessanten Aspekt stellt die starke Gewichtsabnahme der Patientinnen vor dem Zeitpunkt der Probenentnahme dar, da alle Proben aus Bauchlappenplastiken nach starkem Gewichtsverlust stammten. Die Patientinnen in den BMI-Gruppen > 25 waren zum Zeitpunkt der Probenentnahme adipös/übergewichtig, jedoch hatten sie in der Vergangenheit einen noch höheren BMI aufgewiesen. Auch die normalgewichtige Kontrollgruppe hatte vor der Probenentnahme stark an Gewicht verloren und hatte in der Vergangenheit einen übergewichtigen BMI. Dies könnte einen Einfluss auf die Charakteristika und das Sekretionsprofil des Fettgewebes haben. So konnte gezeigt werden, dass nach starkem Gewichtsverlust Fettstammzellen (adipose-derived stem cells, ASCs) keine normale Zellphysiologie aufwiesen, sondern eine erhöhte Zytokinsekretion sowie Adipogenese zeigten (94). Schmitz et al. untersuchten ebenfalls das Sekretionsprofil von ASCs nach starkem Gewichtsverlust und fanden ein unterschiedliches Sekretionslevel von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, jedoch konnte keine Zuordnung zu BMI-Gruppen erfolgen (95).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Fettgewebe auch nach starkem Gewichtsverlust noch Eigenschaften übergewichtigen Fettgewebes beibehält und einen veränderten Metabolismus aufweisen kann, jedoch multiple Faktoren eine Rolle

spielen können, wie z.B. die Ethnie und das metabolische Profil und diese noch besser untersucht werden müssen und im Studiendesign berücksichtigt werden sollten.

Das Gen *ANGPTL4* zeigte nach der Behandlung mit ACM die höchste relative Genexpression in MDA-MB-231 und HCC38 Zellen und sollte daher in weiteren Versuchen genauer untersucht werden. Im klinischen Kontext konnte eine positive Korrelation zwischen einer hohen *ANGPTL4*-Expression in Brusttumorgeweben und der TumorgroÙe, dem Lymphknotenstatus, Fernmetastasen sowie lokaler Rezidive festgestellt werden (96). Zudem korrelierte eine hohe *ANGPTL4*-Expression mit kürzerem Gesamtüberleben und einem kürzeren progressionsfreiem Überleben im Vergleich zu Patientinnen mit einer niedrigen *ANGPTL4*-Expression (96). Um die isolierten Auswirkungen einer hohen oder niedrigen *ANGPTL4*-Expression genauer untersuchen zu können, wurde in vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe die Zelllinie MDA-MB-231 bereits erfolgreich im Gen *ANGPTL4* transduziert. In MDA-MB-231 konnte ein Knockdown im Gen *ANGPTL4* auf 20 % im Vergleich zur Kontrollzelllinie erreicht werden (59). Mit dieser Zelllinie wurde die Invasions- und Migrationsfähigkeit untersucht und es zeigte sich vor Allem nach ACM-Behandlung eine reduzierte Invasion und Motilität der transduzierten Zellen mit Knockdown im Gen *ANGPTL4* im Vergleich zur Kontrollzelllinie (59). Dagegen beschrieben Cai et al. eine verminderte Invasions- und Migrationsfähigkeit von MDA-MB-231-Zellen mit stabiler Überexpression im Gen *ANGPTL4* (97).

Im Rahmen meiner Arbeit sollte ein stabiler Knockdown bzw. Überexpression im Gen *ANGPTL4* in einer zweiten humanen triple-negativen Zelllinie (HCC38) etabliert werden. Durch lentivirale Transduktion wurde eine Zelllinie mit einem Knockdown im Gen *ANGPTL4* um 40% im Vergleich zur Kontrollzelllinie und eine Zelllinie mit einer Erhöhung der Genexpression im Gen *ANGPTL4* um den Faktor 1200 im Vergleich zur Kontrollzelllinie hergestellt. In meiner Arbeit konnten somit erfolgreich Zelllinien von HCC38 nicht nur mit einem stabilen Knockdown, sondern auch mit einer stabilen Überexpression im Gen *ANGPTL4* etabliert werden. Die Zellen zeigten jedoch nach der Transduktion ein deutlich vermindertes und verlangsamtes Wachstumsverhalten. MDA-MB-231-Zellen zeigten dagegen in vorausgegangenen Versuchen in der Arbeitsgruppe keine Veränderungen im Wachstumsverhalten nach erfolgter Transduktion. Eine mögliche Hypothese für das veränderte Wachstumsverhalten der Zelllinie HCC38 nach lentiviraler Transduktion könnte eine zelllinienspezifische Empfindlichkeit gegenüber dem hier verwendeten Protokoll der Transduktion sein. Die

Literatur beschreibt erfolgreiche lentivirale Transduktionen der Zelllinie HCC38, jedoch gibt es keine Studien zu einer erfolgreichen Transduktion im Gen *ANGPTL4* (98,99). HCC38 und MDA-MB-231 gehören beide zum Subtyp des triple-negativen Mammakarzinoms, jedoch gibt es einige Unterschiede zwischen den Zelllinien. Die Zelllinie MDA-MB-231 wurde aus metastasierten Zellen aus dem Pleuraerguss einer 51-jährigen Patientin mit triple-negativem Brustkrebs isoliert und als Adenokarzinom mit epithelialer Morphologie klassifiziert (100). Sie exprimiert den epidermal growth factor (EGF) und den transforming growth factor alpha ($TGF\alpha$) sowie das Onkogen *wnt7b* (100). Die Zelllinie HCC38 wurde als duktales Karzinom mit der TNM Klassifikation Stadium IIB, Grad 3, Lymphknotenmetastasen 3/28 als Primärtumor aus der Brust einer 51-jährigen Patientin isoliert (101). Die Zellen zeigen eine epitheliale Morphologie und besitzen eine Mutation im *BRCA1* Gen (101,102). Sie exprimieren das epitheliale Glycoprotein 2 (EGP2) und Cytokeratin 19 sowie das Onkogen p53 (101).

Ein wichtiger Unterschied zwischen den beiden Zelllinien ist, dass MDA-MB-231 als metastasierte Zellen aus einem Pleuraerguss und HCC38 aus dem Primärtumor in der Brust isoliert wurden. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Zelllinie MDA-MB-231 einen aggressiveren Phänotyp aufweist, da die Zellen bereits fernmetastasierten.

In dieser Arbeit konnte das Gen *ANGPTL4* in der Zelllinie HCC38 durch lentivirale Transduktion erfolgreich stabil überexprimiert bzw. depletiert werden. Aufgrund des langsamen, eingeschränkten Wachstumsverhaltens der transduzierten Zellen konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit keine weiterführenden Versuche durchgeführt werden.

Weitere Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien mit unterschiedlicher *ANGPTL4*-Expression könnten dazu beitragen, die genauen molekularen Auswirkungen von *ANGPTL4* auf die Proliferations-, Invasions- und Migrationsfähigkeit von triple-negativen Brustkrebszellen besser zu verstehen und damit die Eignung von *ANGPTL4* als Angriffspunkt für eine zielgerichtete Therapie besser evaluieren zu können.

5. Zusammenfassung

Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung und die führende krebsbedingte Todesursache bei Frauen (1–3). Etwa eine von acht Frauen erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs und es wird erwartet, dass die Zahl der Fälle bis 2040 weiter ansteigt (4–6). Brustkrebs hat vielfältige Ursachen, zum einen nicht beeinflussbare Faktoren wie Geschlecht und Alter, zum anderen modifizierbare Risikofaktoren wie Alkoholkonsum, Adipositas und hormonelle Einflüsse (5–10). Auf molekularer Ebene ist Brustkrebs eine heterogene Erkrankung, die in verschiedene Subtypen unterteilt wird (11,12). Die drei Hauptklassen sind Hormonrezeptor-positive Tumoren, ERBB2-positive Tumoren und das triple-negative Mammakarzinom (TNBC) (12,13). TNBC ist besonders aggressiv und schwer zu behandeln und die aktuell einzige systemische Therapieoption ist die Chemotherapie (13,18). Aus diesem Grund sind weitere Untersuchungen auf molekularer Ebene notwendig, um zielgerichtete Therapien entwickeln zu können.

Die Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und Fettgewebe trägt zu einer aggressiveren Tumorbilogie bei (37,39). Adipositas ist hierbei ein bedeutender Risikofaktor für die Entstehung und das Fortschreiten von Brustkrebs (29–31). Fettgewebe, besonders bei adipösen Patienten, kann durch eine vermehrte Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen und freien Fettsäuren das Tumorstadium fördern (37,39,40).

In diesem Zusammenhang spielen Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) eine Rolle, da sie sowohl den Fettstoffwechsel als auch entzündliche Prozesse regulieren (44,45). Insbesondere beeinflussen sie die Expression von Angiopoetin-like-4 (ANGPTL4), einem Protein, das ebenfalls die Tumorstadium fördern kann, indem es die Proliferations-, Invasions- und Migrationsfähigkeit von Tumorzellen erhöht (45,58,59). Die genaue Rolle dieser Faktoren in der Brustkrebsentstehung und -progression wird aktuell intensiv erforscht.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von Fettgewebe auf das Genexpressionsprofil von triple-negativen Brustkrebszellen genauer zu untersuchen. Dabei lag der Fokus auf ausgewählten Genen, die durch PPAR-Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Um die Auswirkungen von sekretierten Faktoren des Fettgewebes auf die Genexpression in den Tumorzellen untersuchen zu können, wurde durch Fettgewebe konditioniertes Medium (ACM) hergestellt. Hierbei wurden Fettgewebeproben von Spenderinnen aus

drei verschiedenen BMI-Gruppen (normalgewichtig, übergewichtig, adipös) verwendet. Mit den daraus hergestellten ACMs wurden die beiden triple-negativen Brustkrebszelllinien HCC38 und MDA-MB-231 behandelt und anschließend mittels qPCR eine Genexpressionsanalyse von ausgewählten PPAR-Zielgenen durchgeführt. Es wurden die fünf PPAR-Zielgene *ANGPTL4*, *CPT1A*, *PLIN2*, *PDK4* und *FASN*, die an der Regulation des Energie- und Fettstoffwechsels beteiligt sind, untersucht. Nach Behandlung mit ACM kam es in allen untersuchten Genen, mit Ausnahme von *FASN*, zu einer signifikanten Induktion der relativen Genexpression im Vergleich zur Kontrollbehandlung. Hierbei zeigte *ANGPTL4* die stärkste Induzierbarkeit der relativen Genexpression sowohl in MDA-MB-231 als auch in HCC38. Insgesamt war die Induktion der Genexpression in MDA-MB-231 Zellen stärker ausgeprägt als in der Zelllinie HCC38. Das Gen *FASN*, ein Schlüsselenzym der de-novo Fettsäuresynthese, wurde durch die Behandlung mit ACM im Vergleich zur Kontrollbehandlung in beiden Zelllinien herunterreguliert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sekretierte Faktoren des Fettgewebes Einfluss auf die Expression von PPAR-Zielgenen, die an der Regulation des Energie- und Fettstoffwechsels beteiligt sind, in TNBC haben. Zudem konnte in allen untersuchten Genen die Tendenz aufgezeigt werden, dass ACM-Präparate aus den beiden übergewichtigen BMI-Gruppen eine stärkere Induktion der Genexpression bewirken als die ACM-Präparate von normalgewichtigen Patientinnen, jedoch in einem nicht-signifikanten Bereich. Hierzu müssten die Untersuchungen mit einer höheren Fallzahl wiederholt werden.

Um das PPAR-Zielgen *ANGPTL4* noch genauer untersuchen zu können, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, eine im Gen *ANGPTL4* stabil überexprimierende Zelllinie HCC38 und eine stabile HCC38 *ANGPTL4* Knockdown Zelllinie herzustellen. In vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe konnte bereits erfolgreich eine Knockdown Zelllinie im Gen *ANGPTL4* mit MDA-MB-231-Zellen hergestellt werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun die Transduktion einer zweiten triple-negativen Brustkrebs Zelllinie erfolgen. Hierzu wurde die Zelllinie HCC38 mittels lentiviraler Transduktion im Gen *ANGPTL4* transduziert und der Erfolg der Transduktion sowie die Expression von *ANGPTL4* auf Gen- und Proteinexpressionsebene in den transduzierten Zelllinien anhand von Durchflusszytometrie (FACS), qPCR, ELISA und Immunfluoreszenzfärbung charakterisiert. Es konnte erfolgreich eine Zelllinie HCC38 mit Knockdown im Gen *ANGPTL4* um 40% im Vergleich zur Kontrollzelllinie und eine

Zelllinie HCC38 mit Überexpression im Gen *ANGPTL4* mit einer bis zu 1200-fachen Expression im Vergleich zur Kontrollzelllinie hergestellt werden. Beide Zelllinien zeigten nach der Transduktion jedoch ein vermindertes, stark verlangsamtes Wachstum und konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr für weiterführende Versuche verwendet werden.

Insgesamt weisen die Ergebnisse dieser Arbeit auf einen deutlichen Einfluss von sekretierten Faktoren des Fettgewebes auf die Expression von PPAR-regulierten Genen, die im Energie- und Fettstoffwechsel eine wichtige Rolle spielen, in triple-negativen Brustkrebszellen hin.

6. Literaturverzeichnis

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209–49.
2. Obeagu EI, Obeagu GU. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. *Medicin*. 2024 Jan 1;103(3):e36905.
3. Wilkinson L, Gathani T. Understanding breast cancer as a global health concern. *Br J Radiol*. 2022 Feb;95(1130).
4. Rojas K, Stuckey A. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clin Obstet Gynecol*. 2016 Dec;59(4):651-672.
5. Armenta-Guirado BI, González-Rocha A, Mérida-Ortega Á, López-Carrillo L, Denova-Gutiérrez E. Lifestyle Quality Indices and Female Breast Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Advances in Nutrition*. 2023 Jul 1;14(4):685–709.
6. Thomas JA, Miller ER, Ward PR. Lifestyle Interventions through Participatory Research: A Mixed-Methods Systematic Review of Alcohol and Other Breast Cancer Behavioural Risk Factors. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Jan 1;19(2).
7. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci*. 2017;13(11):1387.
8. Isabelle Romieu I, Amadou A, Chajes V. The role of diet, physical activity, body fatness, and breastfeeding in breast cancer in young women: Epidemiological evidence. *Revista de Investigacion Clinica*. 2017 Jul 1;69(4):193–203.
9. Alegre MM, Knowles MH, Robison RA, O'Neill KL. Mechanics behind breast cancer prevention - focus on obesity, exercise and dietary fat. Vol. 14, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention; 2013. p. 2207–12.
10. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res*. 2017;50(1).
11. Fallahpour S, Navaneelan T, De P, Borgo A. Breast cancer survival by molecular subtype: a population-based analysis of cancer registry data. *CMAJ Open*. 2017 Sep 25;5(3):E734–9.
12. Barzaman K, Karami J, Zarei Z, Hosseinzadeh A, Kazemi MH, Moradi-Kalbolandi S, et al. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. Vol. 84, *International Immunopharmacology*. Elsevier B.V.; 2020.
13. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. Vol. 321, *JAMA - Journal of the American Medical Association*. American Medical Association; 2019. p. 288–300.
14. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L, et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*. 2015 Nov 1;24:S26–35.
15. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*. 2011 Jul;121(7):2750–67.
16. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada M V., Johnson KN, Shyr Y, et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS One*. 2016 Jun 1;11(6).

17. Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. Vol. 389, *The Lancet*. Lancet Publishing Group; 2017. p. 1134–50.
18. Yao H, He G, Yan S, Chen C, Song L, Rosol TJ, et al. Triple-negative breast cancer: Is there a treatment on the horizon? *Oncotarget*. 2017;8(1):1913–24.
19. Chait A, den Hartigh LJ. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med*. 2020 Feb 25;7.
20. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell*. 2014;156(1–2):20–44.
21. Reddy P, Lent-Schochet D, Ramakrishnan N, McLaughlin M, Jialal I. Metabolic syndrome is an inflammatory disorder: A conspiracy between adipose tissue and phagocytes. Vol. 496, *Clinica Chimica Acta*. Elsevier B.V.; 2019. p. 35–44.
22. An SM, Cho SH, Yoon JC. Adipose Tissue and Metabolic Health. *Diabetes Metab J*. 2023 Sep 1;47(5):595.
23. Khandekar MJ, Cohen P, Spiegelman BM. Molecular mechanisms of cancer development in obesity. Vol. 11, *Nature Reviews Cancer*. 2011. p. 886–95.
24. Caballero B. Humans against Obesity: Who Will Win? *Adv Nut*. 2019 Jan 1;10(suppl_1):S4–9.
25. Hruby A, Hu FB. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics* 2015 Dec 4;33(7):673.
26. Gjermani E, Kirstein AS, Kolbig F, Kirchhof M, Bundalian L, Katzmann JL, et al. Obesity-An Update on the Basic Pathophysiology and Review of Recent Therapeutic Advances. *Biomolecules*. 2021 Oct 1;11(10).
27. Kawai T, Autieri M V., Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2021 Mar 1;320(3):C375–91.
28. Chouchani ET, Kajimura S. Metabolic adaptation and maladaptation in adipose tissue. *Nat Metab*. 2019 Feb 1;1(2):189.
29. Van Kruijsdijk RCM, Van Der Wall E, Visseren FLJ. Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Oct;18(10):2569–78.
30. Strong AL, Burow ME, Gimble JM, Bunnell BA. Concise review: The obesity cancer paradigm: Exploration of the interactions and crosstalk with adipose stem cells. *Stem Cells*. 2015 Feb 1;33(2):318–26.
31. Bokobza E, Hinault C, Tirolle V, Clavel S, Bost F, Chevalier N. The Adipose Tissue at the Crosstalk Between EDCs and Cancer Development. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Jul 20;12.
32. Lee CM, Fang S. Fat Biology in Triple-Negative Breast Cancer: Immune Regulation, Fibrosis, and Senescence. Vol. 32, *Journal of Obesity and Metabolic Syndrome*. Korean Society for the Study of Obesity; 2023. p. 312–21.
33. Sun H, Zou J, Chen L, Zu X, Wen G, Zhong J. Triple-negative breast cancer and its association with obesity. *Mol Clin Oncol*. 2017 Dec 29;7(6):935–42.
34. Akinsipe T, Mohamedelhassan R, Akinpelu A, Pondugula SR, Mistriotis P, Avila LA, et al. Cellular interactions in tumor microenvironment during breast cancer progression: new frontiers and implications for novel therapeutics. *Front Immunol*. 2024;15.
35. Korkaya H, Liu S, Wicha MS. Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. *J Clin Invest*. 2011 Oct 3;121(10):3804–9.
36. Rybinska I, Mangano N, Tagliabue E, Triulzi T. Cancer-associated adipocytes in breast cancer: Causes and consequences. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 1;22(7).

37. Zhao C, Wu M, Zeng N, Xiong M, Hu W, Lv W, et al. Cancer-associated adipocytes: Emerging supporters in breast cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2020 Aug 12;39(1).
38. Dirat B, Bochet L, Dabek M, Daviaud D, Dauvillier S, Majed B, et al. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res*. 2011 Apr 1;71(7):2455–65.
39. Bouche C, Quail DF. Fueling the Tumor Microenvironment with Cancer-Associated Adipocytes. *Cancer Res*. 2023 Apr 15;83(8):1170–2.
40. Blücher C, Stadler SC. Obesity and Breast Cancer: Current Insights on the Role of Fatty Acids and Lipid Metabolism in Promoting Breast Cancer Growth and Progression. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:293.
41. Balaban S, Shearer RF, Lee LS, van Geldermalsen M, Schreuder M, Shtein HC, et al. Adipocyte lipolysis links obesity to breast cancer growth: adipocyte-derived fatty acids drive breast cancer cell proliferation and migration. *Cancer Metab*. 2017 Dec;5(1).
42. Li Y, Pan Y, Zhao X, Wu S, Li F, Wang Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors: A key link between lipid metabolism and cancer progression. *Clinical Nutrition*. 2024 Feb 1;43(2):332–45.
43. Nieman KM, Kenny HA, Penicka C V., Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt MR, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med*. 2011 Nov;17(11):1498–503.
44. Cheng HS, Tan WR, Low ZS, Marvalim C, Lee JYH, Tan NS. Exploration and Development of PPAR Modulators in Health and Disease: An Update of Clinical Evidence. *Int J Mol Sci*. 2019 Oct 2;20(20).
45. Paglia L La, Listì A, Caruso S, Amodeo V, Passiglia F, Bazan V, et al. Potential Role of ANGPTL4 in the Cross Talk between Metabolism and Cancer through PPAR Signaling Pathway. *PPAR Res*. 2017:8187235
46. Vitale SG, Laganà AS, Nigro A, La Rosa VL, Rossetti P, Rapisarda AMC, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor modulation during metabolic diseases and cancers: Master and minions. Vol. 2016:2016:6517313., *PPAR Research*. Hindawi Publishing Corporation; 2016.
47. Wang YX. PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. *Cell Res*. 2010 Feb;20(2):124–37.
48. Wagner N, Wagner KD. The Role of PPARs in Disease. *Cells*. 2020 Oct 28;9(11).
49. Varga T, Czimmerer Z, Nagy L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2011 Aug 1;1812(8):1007–22.
50. Wagner N, Wagner KD. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and the Hallmarks of Cancer. *Cells*. 2022 Aug 1;11(15).
51. Zhao B, Xin Z, Ren P, Wu H. The Role of PPARs in Breast Cancer. *Cells*. 2023 Jan 1;12(1).
52. Cheng HS, Yip YS, Lim EKY, Wahli W, Tan NS. PPARs and tumor microenvironment: The emerging roles of the metabolic master regulators in tumor stromal-epithelial crosstalk and carcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 2021 May 1;13(9).
53. Adhikary T, Brandt DT, Kaddatz K, Stockert J, Naruhn S, Meissner W, et al. Inverse PPAR β/δ agonists suppress oncogenic signaling to the ANGPTL4 gene and inhibit cancer cell invasion. *Oncogene*. 2013 Oct 31;32(44):5241–52.

54. Wang X, Wang G, Shi Y, Sun L, Gorczynski R, Li YJ, et al. PPAR-delta promotes survival of breast cancer cells in harsh metabolic conditions. *Oncogenesis*. 2016 Jun 6;5(6):e232–e232.
55. Foreman JE, Sharma AK, Amin S, Gonzalez FJ, Peters JM. Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ (PPAR β/δ) inhibits cell growth in a mouse mammary gland cancer cell line. *Cancer Lett*. 2010 Feb 2;288(2):219.
56. Hernandez-Quiles M, Broekema MF, Kalkhoven E. PPARgamma in Metabolism, Immunity, and Cancer: Unified and Diverse Mechanisms of Action. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Feb 26;12.
57. Yang PB, Hou PP, Liu FY, Hong W Bin, Chen HZ, Sun XY, et al. Blocking PPAR γ interaction facilitates Nur77 interdiction of fatty acid uptake and suppresses breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Nov 3;117(44):27412–22.
58. Tan MJ, Teo Z, Sng MK, Zhu P, Tan NS. Emerging roles of angiopoietin-like 4 in human cancer. *Molecular Cancer Research*. 2012 Jun;10(6):677–88.
59. Blücher C, Iberl S, Schwagarus N, Müller S, Liebisch G, Höring M, et al. Secreted factors from adipose tissue reprogram tumor lipid metabolism and induce motility by modulating PPAR α /ANGPTL4 and FAK. *Molecular Cancer Research*. 2020 Dec 1;18(12):1849–62.
60. Kersten S. Role and mechanism of the action of angiopoietin-like protein ANGPTL4 in plasma lipid metabolism. *J Lipid Res*. 2021;62.
61. Ruppert PMM, Michielsen CCJR, Hazebroek EJ, Pirayesh A, Olivecrona G, Afman LA, et al. Fasting induces ANGPTL4 and reduces LPL activity in human adipose tissue. *Mol Metab*. 2020 Oct 1;40.
62. Gutgsell AR, Ghodge S V., Bowers AA, Neher SB. Mapping the sites of the lipoprotein lipase (LPL)-angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4) interaction provides mechanistic insight into LPL inhibition. *J Biol Chem*. 2019 Feb 22;294(8):2678–89.
63. Endo M. The roles of ANGPTL families in cancer progression. *J UOEH*. 2019;41(3):317–25.
64. Shen CJ, Chan SH, Lee CT, Huang WC, Tsai JP, Chen BK. Oleic acid-induced ANGPTL4 enhances head and neck squamous cell carcinoma anoikis resistance and metastasis via up-regulation of fibronectin. *Cancer Lett*. 2017 Feb 1;386:110–22.
65. Kolb R, Kluz P, Tan ZW, Borcharding N, Bormann N, Vishwakarma A, et al. Obesity-associated inflammation promotes angiogenesis and breast cancer via angiopoietin-like 4 *Ocogene*. 2019 Mar;38(13):2351-2363.
66. Brasaemle DL. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res*. 2007 Dec;48(12):2547–59.
67. Sztalryd C, Brasaemle DL. The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis. *Biochim Biophys Acta*. 2017 Oct; 1862(10 Pt B):1221.
68. Smith CE, Ordovás JM. Update on perilipin polymorphisms and obesity. *Nutr Rev*. 2012 Oct;70(10):611–21.
69. Jeon JH, Thoudam T, Choi EJ, Kim MJ, Harris RA, Lee IK. Loss of metabolic flexibility as a result of overexpression of pyruvate dehydrogenase kinases in muscle, liver and the immune system: Therapeutic targets in metabolic diseases. Vol. 12, *Journal of Diabetes Investigation*. Blackwell Publishing; 2021. p. 21–31.

70. Stacpoole PW. Therapeutic Targeting of the Pyruvate Dehydrogenase Complex/Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDC/PDK) Axis in Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2017 Nov 1;109(11).
71. Song S, Attia RR, Connaughton S, Niesen MI, Ness GC, Elam MB, et al. Peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) and PPAR gamma coactivator (PGC-1 α) induce carnitine palmitoyltransferase IA (CPT-1A) via independent gene elements. *Mol Cell Endocrinol.* 2010 Aug 8;325(1–2):54.
72. Zhang W, Zhang SL, Hu X, Tam KY. Targeting Tumor Metabolism for Cancer Treatment: Is Pyruvate Dehydrogenase Kinases (PDKs) a Viable Anticancer Target? *Int J Biol Sci.* 2015 Nov 1;11(12):1390–400.
73. Zhang Z, Han S, Ouyang S, Zeng Z, Liu Z, Sun J, et al. PDK4 Constitutes a Novel Prognostic Biomarker and Therapeutic Target in Gastric Cancer. *Diagnostics (Basel).* 2022 May 1;12(5).
74. Guda MR, Asuthkar S, Labak CM, Tsung AJ, Alexandrov I, Mackenzie MJ, et al. Targeting PDK4 inhibits breast cancer metabolism. *Am J Cancer Res.* 2018;8(9):1725.
75. Schlaepfer IR, Joshi M. CPT1A-mediated Fat Oxidation, Mechanisms, and Therapeutic Potential. *Endocrinology.* 2020 Feb 1;161(2).
76. Liang K. Mitochondrial CPT1A: Insights into structure, function, and basis for drug development. *Front Pharmacol.* 2023; 14:1160440.
77. Jariwala N, Mehta GA, Bhatt V, Hussein S, Parker KA, Yunus N, et al. CPT1A and fatty acid β -oxidation are essential for tumor cell growth and survival in hormone receptor-positive breast cancer. *NAR Cancer.* 2021 Sep 1;3(3).
78. Fhu CW, Ali A. Fatty Acid Synthase: An Emerging Target in Cancer. *Molecules.* 2020 Sep 1;25(17).
79. Jones SF, Infante JR. Molecular pathways: Fatty acid synthase. *Clinical Cancer Research.* 2015 Dec 15;21(24):5434–8.
80. Chaturvedi S, Biswas M, Sadhukhan S, Sonawane A. Role of EGFR and FASN in breast cancer progression. *J Cell Commun Signal.* 2023 Dec 1;17(4):1249–82.
81. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods.* 2001;25(4):402–8.
82. Kuniyoshi S, Miki Y, Sasaki A, Iwabuchi E, Ono K, Onodera Y, et al. The significance of lipid accumulation in breast carcinoma cells through perilipin 2 and its clinicopathological significance. *Pathol Int.* 2019;69(8):463–71.
83. Wang J, Qian Y, Gao M. Overexpression of PDK4 is associated with cell proliferation, drug resistance and poor prognosis in ovarian cancer. *Cancer Manag Res.* 2018; 11:251–62.
84. Woolbright BL, Choudhary D, Mikhalyuk A, Trammel C, Shanmugam S, Abbott E, et al. The Role of Pyruvate Dehydrogenase Kinase-4 (PDK4) in Bladder Cancer and Chemoresistance. *Mol Cancer Ther.* 2018 Sep 1;17(9):2004–12.
85. Leclerc D, Pham DNT, Lévesque N, Truongcao M, Foulkes WD, Sapienza C, et al. Oncogenic role of PDK4 in human colon cancer cells. *Br J Cancer.* 2017 Mar 28;116(7):930–6.
86. Park JH, Vithayathil S, Kumar S, Sung PL, Dobrolecki LE, Putluri V, et al. Fatty Acid Oxidation-Driven Src Links Mitochondrial Energy Reprogramming and Oncogenic Properties in Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Rep.* 2016 Mar 8;14(9):2154–65.

87. Aiderus A, Black MA, Dunbier AK. Fatty acid oxidation is associated with proliferation and prognosis in breast and other cancers. *BMC Cancer*. 2018 Aug 9;18(1).
88. Menendez JA, Colomer R, Lupu R. Why does tumor-associated fatty acid synthase (oncogenic antigen-519) ignore dietary fatty acids? *Med Hypotheses*. 2005;64(2):342–9.
89. Giró-Perafita A, Sarrats A, Pérez-Bueno F, Oliveras G, Buxó M, Brunet J, et al. Fatty acid synthase expression and its association with clinicopathological features in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8(43):74391–405.
90. Padua D, Zhang XHF, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR, et al. TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell*. 2008 Apr 4;133(1):66–77.
91. Ewertz M, Jensen MB, Gunnarsdóttir KÁ, Højris I, Jakobsen EH, Nielsen D, et al. Effect of obesity on prognosis after early-stage breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2011 Jan 1;29(1):25–31.
92. Dietze EC, Chavez TA, Seewaldt VL. Obesity and Triple-Negative Breast Cancer: Disparities, Controversies, and Biology. *Am J Pathol*. 2018 Feb;188(2):280–90.
93. Millikan RC, Newman B, Tse CK, Moorman PG, Conway K, Smith L V., et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;109(1):123.
94. Silva KR, Liechocki S, Carneiro JR, Claudio-da-Silva C, Maya-Monteiro CM, Borojevic R, et al. Stromal-vascular fraction content and adipose stem cell behavior are altered in morbid obese and post bariatric surgery ex-obese women. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Apr 14;6(1):72.
95. Schmitz D, Robering JW, Weisbach V, Arkudas A, Ludolph I, Horch RE, et al. Specific features of ex-obese patients significantly influence the functional cell properties of adipose-derived stromal cells. *J Cell Mol Med*. 2022 Aug 1;26(16):4463–78.
96. Zhao J, Liu J, Wu N, Zhang H, Zhang S, Li L, et al. ANGPTL4 overexpression is associated with progression and poor prognosis in breast cancer. *Oncol Lett*. 2020 Sep 1;20(3):2499–505.
97. Cai YC, Yang H, Wang KF, Chen TH, Jiang WQ, Shi YX. ANGPTL4 overexpression inhibits tumor cell adhesion and migration and predicts favorable prognosis of triple-negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2020 Sep 14;20(1).
98. Machado RAC, Stojevski D, De Landtsheer S, Lucarelli P, Baron A, Sauter T, et al. L-plastin Ser5 phosphorylation is modulated by the PI3K/SGK pathway and promotes breast cancer cell invasiveness. *Cell Commun Signal*. 2021 Dec 1;19(1).
99. Xu J, Prospero JR, Choudhury N, Olopade OI, Goss KH. β -Catenin is required for the tumorigenic behavior of triple-negative breast cancer cells. *PLoS One*. 2015 Feb 6;10(2).
100. MDA-MB-231 - HTB-26 | ATCC. [Internet] [cited 2024 Oct 9]. Available from: <https://www.atcc.org/products/htb-26#detailed-product-information>
101. HCC38 - CRL-2314 | ATCC. [Internet] [cited 2024 Oct 9]. Available from: <https://www.atcc.org/products/crl-2314>
102. Smith SE, Mellor P, Ward AK, Kendall S, McDonald M, Vizeacoumar FS, et al. Molecular characterization of breast cancer cell lines through multiple omic approaches. *Breast Cancer Research*. 2017 Jun 5;19(1).

103. GIPZ Lentiviral shRNA. [Internet]. [cited 2024 Oct 9]. Available from: <https://horizondiscovery.com/en/gene-modulation/knockdown/shrna/products/gipz-lentiviral-shrna#supporting-data>
104. ORF Clones, Expression-Ready ORF cDNA Clones | GeneCopoeia™ [Internet] [cited 2024 Oct 9]. Available from: <https://www.genecopoeia.com/product/orf/cdna-clone/orf-clone/>

7. Anhang

Abbildungsverzeichnis

1: Interaktion zwischen Brustkrebszellen und benachbarten Adipozyten unter dem Einfluss von Adipositas.	9
2: Schema der Behandlung von humanen Brustkrebszellen mit durch Fettgewebe-konditioniertem Medium (ACM).	20
3: Lentiviraler Vektor zum Knockdown des <i>ANGPTL4</i> Gens	21
4: Lentiviraler Vektor zur Überexpression im Gen <i>ANGPTL4</i>	22
5: Genexpression von <i>ANGPTL4</i> in HCC38 und MDA-MB-231 Zellen nach ACM-Behandlung.	28
6: Genexpression von <i>PLIN2</i> in HCC38 und MDA-MB-231 Zellen nach ACM-Behandlung.	29
7: Genexpression von <i>PDK4</i> in HCC38 und MDA-MB-231 Zellen nach ACM-Behandlung.	30
8: Genexpression von <i>CPT1A</i> in HCC38 und MDA-MB-231 Zellen nach ACM-Behandlung.	31
9: Genexpression von <i>FASN</i> in HCC38 und MDA-MB-231 Zellen nach ACM-Behandlung.	32
10: Relative Genexpression der PPAR-Zielgene in den BMI-Gruppen.	34
11: Durchflusszytometrie zur Ermittlung der GFP-Fluoreszenz in den verschiedenen transduzierten Knockdown-Zelllinien.	36
12: Genexpressionsanalyse der transduzierten Zelllinien HCC38 mit <i>ANGPTL4</i> Depletion.	37
13: Genexpressionsanalyse transduzierter Zelllinien HCC38 mit Depletion von <i>GAPDH</i> .	38
14: Durchflusszytometrie zur Ermittlung der GFP-Fluoreszenz in den transduzierten Zelllinien.	39
15: Genexpressionsanalyse der transduzierten Zelllinie HCC38 mit Überexpression im Gen <i>ANGPTL4</i> .	40
16: Immunfluoreszenzfärbung von <i>ANGPTL4</i> in der überexprimierenden Zelllinie im Vergleich zur Kontrollzelllinie.	41
17: Immunfluoreszenzfärbung des <i>ANGPTL4</i> -Flag-Tags in der überexprimierenden Zelllinie im Vergleich zur Kontrollzelllinie.	42

18: Charakterisierung der ANGPTL4 Gen- und Proteinexpression in den überexprimierenden Zelllinien nach Zellsorting.	43
---	----

Tabellenverzeichnis

1: Verwendete Primersequenzen	24
2: ACM-Präparate nach aufsteigendem BMI angeordnet.	27

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACM	adipose tissue conditioned medium
AK	Antikörper
AF	Alexa Fluor
Angptl4	Angiopoetin-like 4
ASC	adipose derived stem cell
BMI	body mass index
BRCA1	breast cancer gene 1
BSA	bovine serum albumine
CAA	cancer associated adipocytes
cAngptl4	C-terminales Angptl4
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
CMV	Cytomegalie Virus
CO ₂	Kohlendioxid

CPT1A	Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1A
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DBD	DNA-bindende Domäne
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DTT	Dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
EGP2	Glycoprotein 2
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ER	estrogen receptor
ERBB2	erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
FACS	fluorescence activated cell sorting
FASN	Fettsäure-Synthase
FBS	fetal bovine serum
FFA	free fatty acids
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HIF1 α	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 α
HR	Hormonrezeptor
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G

IL1b	Interleukin 1 β
IL6	Interleukin 6
LBD	Liganden-bindende Domäne
MOI	multiplicity of infection
nAngptl4	N-terminales Angptl4
NTC	Non-Template-Control
PDK4	Pyruvat-Dehydrogenase Kinase 4
PLIN2	Perilipin 2
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE	peroxisom proliferator response element
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RXR	Retinoid Rezeptor X
shRNA	short hairpin ribonucleid acid
SFM	Serum freies Medium
TFG α	transforming growth factor alpha
TGF β	Transforming growth factor β
TNBC	triple negative breast cancer
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
TNM	tumor nodes metastasis
WHR	Waist-Hip Ratio
WHO	world health organization
wnt7b	wnt family member 7b
qPCR	quantitative real-time polymerase chain reaction

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ralph Burkhardt für die Überlassung des Promotionsthemas, der umfassenden Betreuung und der freundlichen Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Herzlich möchte ich mich bei meiner Betreuerin Dr. Sonja C. Stadler bedanken, für die Betreuung meiner Dissertation und den wissenschaftlichen Input.

Für die Einführung in das experimentelle Arbeiten sowie die stetige alltägliche Betreuung und Unterstützung, ein ganz besonderer Dank an Dr. Sabine Iberl.

Bei Bärbel Schell, Birgit Wilhelm und Cornelia Hasenknopf möchte ich mir für die technische Unterstützung und die ständige Bereitschaft, mit Rat und Tat zur Seite zu stehen, bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg für die Gewährung des Promotionsstipendiums und der damit verbundenen finanziellen Unterstützung zur Durchführung dieser Dissertation.

Bei meiner Familie und meinem Freund Paul möchte ich mich für die unermüdliche seelische und moralische Unterstützung bedanken - insbesondere bei meiner Mama, die mich immer zum Weitermachen motiviert und bedingungslos unterstützt hat.

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Ich, Lena Kreisel geboren am 28. Mai 1997 in Pentling, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 25.07.2025

Lena Kreisel