

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

**Untersuchungen zu den Effekten von „adipose tissue conditioned medium“
auf das Lipidprofil und die PPAR-Signalwege in Östrogenrezeptor-
positiven und triple-negativen Brustkrebszelllinien**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Amelie Marie Florian

2026

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

**Untersuchungen zu den Effekten von „adipose tissue conditioned medium“
auf das Lipidprofil und die PPAR-Signalwege in Östrogenrezeptor-
positiven und triple-negativen Brustkrebszelllinien**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Amelie Marie Florian

2026

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Ralph Burkhardt

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Matthias Widbiller

Tag der mündlichen Prüfung:

10. Juli 2026

Für Heni

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung.....	11
1.1 Adipositas.....	11
1.1.1 Definition.....	11
1.1.2 Zusammensetzung des Fettgewebes.....	11
1.1.3 Folgeerkrankungen der Adipositas.....	13
1.2 Brustkrebs.....	14
1.2.1 Epidemiologie	14
1.2.2 Molekularbiologie	14
1.2.3 Risikofaktoren	16
1.2.3.1 Alter.....	16
1.2.3.2 Einfluss der Menarche, Menopause und Schwangerschaft	16
1.2.3.3 Allgemeine Risikofaktoren.....	17
1.2.3.4 MARIE und die Folgestudien.....	17
1.2.4 Therapieoptionen.....	17
1.3 Adipositas und Brustkrebs.....	18
1.3.1 Karzinogenese als Folgeerkrankung der Adipositas	18
1.3.2 Molekulare Mechanismen der Tumorentstehung bei Mammakarzinomen und Adipositas	19
1.3.2.1 Interaktion von Fettgewebe und Brustkrebszellen	19
1.3.2.2 Der Einfluss der Peroxisom Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs).....	22
1.4 Zielsetzung	24
2 Material und Methoden.....	25
2.1 Zelllinien	25
2.2 Zellkulturmedien, Puffer, Lösungen.....	25
2.2.1 Zellkultur.....	25
2.2.2 RNA-Isolation, Reverse Transkription, PCR	26
2.2.3 Primer für qPCR.....	27
2.2.4 Proteinextraktion und Bestimmung der Proteinkonzentration	29
2.2.5 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.....	30
2.2.5.1 Antikörper	31
2.2.5.2 Zusammensetzungen der verwendeten Puffer	32
2.2.6 AdipoRed-Assay	33
2.3 Methoden.....	33
2.3.1 ACM-Gewinnung aus humanem Fettgewebe	33

2.3.2 Zellkultur humaner Brustkrebszelllinien.....	34
2.3.2.1 Lebendzellbestimmung	35
2.3.2.2 Behandlung der Zelllinien mit ACM.....	35
2.3.3 Untersuchung der Genexpression.....	36
2.3.3.1 RNA-Isolierung.....	36
2.3.3.2 Bestimmung des RNA-Gehalts	36
2.3.3.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	37
2.3.3.4 Quantitative PCR.....	38
2.3.4 Die biochemische Analyse von Proteinen mittels Western Blot.....	39
2.3.4.1 Herstellung von Proteinextrakten	39
2.3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	39
2.3.4.3 SDS-Gelelektrophorese	40
2.3.4.4 Proteintransfer, -visualisierung und -detektion	41
2.3.5 AdipoRed-Assay	42
2.3.5.1 Fixierung der Zellen	42
2.3.5.2 AdipoRed-Färbung.....	42
2.3.6 Lipidomics.....	43
2.3.6.1 Gewinnung von Proteinextrakten	43
2.3.6.2 Massenspektrometrische Untersuchung	43
2.3.7 Statistik.....	44
3 Ergebnisse	45
3.1 Untersuchungen zur Einlagerung von Lipiden in den Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231	45
3.2 Lipidomics.....	46
3.2.1 Betrachtung der Haupt-Lipidklassen.....	47
3.2.1.1 Speicherlipide.....	52
3.2.1.2 Membranlipide	53
3.2.2 Betrachtung der Lipidspezies	55
3.2.2.1 Speicherlipide.....	55
3.2.2.2 Membranlipide	58
3.3 Expression von PPAR-Zielgenen in unterschiedlichen humanen Brustkrebszelllinien nach der Inkubation SFM und in Anwesenheit von ACM.....	63
3.3.1 ANGPTL4	63
3.3.2 PDK4.....	64
3.3.3 PLIN2	66

3.3.4 CPT1A.....	67
3.3.5 FAS.....	69
3.3.6 Änderung der PPAR-Zielgen-Expression in Anwesenheit von ACM in östrogenrezeptor-positiven und triple negativen Brustkrebszelllinien im Vergleich	71
3.4 Änderungen der relativen Expression von <i>PPARα</i> , <i>PPARβ/δ</i> , <i>PPARγ</i> in den humanen Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 in Anwesenheit von ACM	72
3.4.1 <i>PPARα</i>	72
3.4.2 <i>PPARγ</i>	74
3.4.3 <i>PPARβ/δ</i>	79
3.4.4 Gegenüberstellung der untersuchten Brustkrebszelllinien hinsichtlich der Änderung ihrer <i>PPAR</i> -Genexpression in Anwesenheit von ACM	81
4 Diskussion	83
4.1 Veränderungen des zellulären Lipidoms nach Inkubation mit ACM sind Zelltyp-spezifisch	83
4.2 Der Einfluss des Hormonrezeptorstatus und der Anwesenheit von ACM auf die Expression ausgewählter PPAR-Zielgene.....	86
4.3 Der Einfluss des Hormonrezeptorstatus und der Anwesenheit von ACM auf die Expression der PPAR-Subtypen.....	89
Literaturverzeichnis.....	92
Danksagung	114
Erklärung zum Promotionsverfahren	115

Abkürzungsverzeichnis

ACM	Adipose tissue conditioned medium
AMPK	Adenosinmonophosphat-abhängige Kinase
ANGPTL4	Angiopoietin-like 4
Anti-Anti	Antibiotikum-Antimykotikum
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BMI	Body Mass Index
BRCA	Breast Cancer
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	complementary DNA
CE	Cholesterinester
Cer	Ceramide
CPT1A	Carnitine-Palmitoyltransferase f1A
CT	Cycle Threshold, Schwellenwertzyklus
ddH2O	doppelt destilliertes Wasser
DBD	DNA-Bindungsdomäne der PPARs
DG	Diglyceride
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Deoxynucleotide Triphosphate
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Östrogenrezeptor
FAS	Fatty Acid Synthase
FC	Freies Cholesterin
FIA	Fließinjektionsanalyse
FIA-MS/MS	Fließinjektionsanalyse mit Triple-Quadrupol-Massenspektrometer
FIA-FTMS	Fließinjektionsanalyse mit Hybrid-Quadrupol-Orbita-Massenspektrometer

FKS	Fetales Kalbserum
FTO	Fatt mass and Obesity associated
HDL	High Density Lipoprotein
HER	Herceptinrezeptor
Hex-Cer	Hexosylceramide
IgG	Immunglobulin G
LBD	Liganden-Bindungsdomäne der PPARs
LDL	Low Density Lipoprotein
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPE	Lysophosphatidylethanolamin
MARIE	Mammakarzinom-Risiko-Erhebung
MSX	Multiplex-Akquisition
NaOH	Natriumhydroxid
NTP	Nucleotide Triphosphate
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDK4	Pyruvatdehydrogenaselipoamidkinaseisozym 4
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerin
PI	Phosphatidylinositol
PI3K	Phospho-Inositol-3 Kinase
PLIN2	Perilipin 2
PPAR	Peroxisome Proliferator-activated Receptor
PPRE	PPAR Responsive Elements
PR	Progesteronrezeptor
PROCAM-Studie	Prospective Cardiovascular Münster Study
PS	Phosphatidylserin
RIPA	Radio-Immunpräzipitationsassay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat

SFM	Serumfreies Medium
SM	Sphingomyeline
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
Src	Sarcoma
TBS-T	Tris Buffered Saline – Tween 20 [®]
TG	Triglyceride
TNBC	Triple Negative Breast Cancer
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
Tyr	Tyrosin
WHO	World Health Organisation

1 Einleitung

1.1 Adipositas

1.1.1 Definition

Fettleibigkeit stellt in der westlichen Welt ein immer größer werdendes Problem dar. 1997 bezeichnete die WHO Adipositas erstmals als ernst zu nehmende Erkrankung (Benecke und Vogel 2003). 53 % der Frauen und 67 % der Männer sind in Deutschland übergewichtig. Besorgniserregend ist außerdem, dass viele Kinder mittlerweile ihr Normgewicht überschreiten und der prozentuelle Anteil übergewichtiger junger Menschen weiter steigt (Mau et al. 2014a; Bentham et al. 2017). Adipositas kann anhand des Body Mass Index (BMI) festgestellt werden. Dieser errechnet sich aus dem Quotienten des Körpergewichts (in Kilogramm) und der Körpergröße zum Quadrat (in Metern) ($BMI = \frac{\text{Körpergewicht (kg)}}{\text{Körpergröße}^2 (m^2)}$). Liegt der berechnete Wert über 25 kg/m², spricht man von Übergewicht. Ab einem BMI von ≥ 30 kg/m² handelt es sich um Adipositas (Mau et al. 2014a).

Die Zunahme an Fettgewebe kann aus einer Hypertrophie der Adipozyten oder einer Vermehrung der Adipozytenzahl (Hyperplasie) resultieren (Hill et al. 2018). Fettleibigkeit wird vor allem mit einer erhöhten Kalorienzufuhr bei gleichzeitigem Bewegungsmangel in Verbindung gebracht. Allerdings haben auch andere Faktoren einen Einfluss auf die Ansammlung von Fettgewebe. 2007 wurde zum ersten Mal eine häufig auftretende genetische Variante im Erbgut entdeckt, die in direkten Zusammenhang zu einer vorhandenen Adipositas gestellt wurde. Hierbei handelte es sich um eine Mutation im FTO-Gen (fatty mass and obesity associated gene) (Frayling et al. 2007; Fawcett und Barroso 2010). Seitdem wurden weitere DNA-Abschnitte lokalisiert, deren Veränderungen bei der Entstehung einer Fettleibigkeit eine Rolle spielen könnten (Frayling et al. 2007; Loos und Yeo 2014; Kostovski et al. 2017).

1.1.2 Zusammensetzung des Fettgewebes

Der übermäßige Anstieg des Körperfettanteils stellt den Organismus vor große Herausforderungen. Eine Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen kann daraus resultieren, wobei die Zusammensetzung des Fettgewebes eine wichtige Rolle spielt. Man differenziert bei Säugetieren zwischen weißem und braunem Fettgewebe. Während bei Säuglingen überwiegend letzteres

vorliegt (ca. 2 bis 5 % des Körpergewichts), besitzen junge Erwachsene mit nur 50 g im Durchschnitt deutlich weniger. Braunes Fettgewebe kann durch Fettsäureoxidation und Wärmeproduktion zur Verbrennung von Kalorien beitragen und das Lipid-Profil im Blut positiv beeinflussen. Der Anteil an entzündungshemmenden Lipiden ist gegenüber proinflammatorischen Lipiden bei Vorhandensein von aktivem braunem Fettgewebe deutlich erhöht. Es ist bei erwachsenen Menschen überwiegend im tiefen Hals- und Nackenbereich und im Brustkorb lokalisiert (Kulterer et al. 2020).

Weißes Fettgewebe besitzt diese positiven Eigenschaften nicht. Das Fettdepot ist meist an Bauch, Gesäß und Oberschenkeln zu finden und dient als Energiespeicher, der dem Körper bei erhöhtem Bedarf zur Verfügung steht (Kulterer et al. 2020). Es spielt eine Rolle im Fett- und Glukosestoffwechsel und beeinflusst andere biologische Reaktionen des menschlichen Körpers – sowohl pathologische als auch physiologische – durch die Freisetzung verschiedener Hormone und Zytokine, den sogenannten Adipokinen. So hat weißes Fettgewebe beispielsweise Auswirkungen auf die Angiogenese, die Blutgerinnung, die Blutdruckkontrolle oder das Immunsystem. Bei einer übermäßigen Kalorienzufuhr oder einem zu geringen Energieverbrauch werden im weißen Fettgewebe Triglyceride in den Adipozyten gespeichert (Wronska und Kmiec 2012).

Man unterscheidet außerdem zwischen viszeralem und subkutanem Fettgewebe. Ersteres ist vor allem in der Bauchhöhle und im Mediastinum zu finden. Eine Adipositas ausgehend von viszeralem Fettgewebe geht mit einem höheren Risiko für Insulinresistenz und Herz-Kreislauf-Erkrankungen einher. Es wurde eine gesteigerte Stoffwechselaktivität im Vergleich zu subkutanem Fettgewebe nachgewiesen. Letzteres sammelt sich in der Unterhaut, ist weniger stoffwechselaktiv und weist bei einer Zunahme ein günstigeres Profil der Plasmalipide auf. Viszerale Adipozyten sezernieren unter anderem inflammatorische Zytokine, während subkutane Adipozyten überwiegend Leptin und Adiponektin produzieren. Dadurch nimmt das Fettgewebe nicht nur die Rolle eines reinen Energiespeichers, sondern auch die eines endokrinen Organs ein. Es ist Teil eines Netzwerks, das die systemische Homöostase aufrechterhält (Wronska und Kmiec 2012).

1.1.3 Folgeerkrankungen der Adipositas

Der steigende Körperfettanteil hat negative Auswirkungen auf das Skelettsystem, den Stoffwechsel und die Organe. So wird als häufigste Begleiterkrankung der Fettleibigkeit eine arterielle Hypertonie beobachtet. Je höher der BMI ist, desto eher erkrankt der Mensch an Bluthochdruck, welcher wiederum die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer koronaren Herzerkrankung und einer Arteriosklerose erhöht (Benecke und Vogel 2003). Das Risiko, einen Herzinfarkt oder Schlaganfall zu erleiden, ist bei adipösen Menschen ebenfalls deutlich höher als bei Personen mit einem BMI $< 25 \text{ kg/m}^2$ (Mau et al. 2014a).

Dies konnte in verschiedenen Studien wie beispielsweise der PROCAM-Studie nachgewiesen werden. Anhand dieser wurden neun Risikofaktoren festgestellt, die das Auftreten eines Herzinfarkts oder Schlaganfalls innerhalb der ersten zehn Jahre begünstigen können. Das Vorliegen eines metabolischen Syndroms erhöht die Wahrscheinlichkeit eines schweren koronaren Ereignisses innerhalb von zehn Jahren um das 2,6-Fache (Assmann et al. 2008).

Eine weitere Folge von Adipositas sind Fettstoffwechselstörungen. Steigt der Spiegel der Triglyceride an, sinkt der des HDL-Cholesterins, womit dem Organismus ein protektiver Effekt verloren geht. Die Konzentration des LDL-Cholesterins nimmt dagegen zu, was wiederum eine Arteriosklerose durch Ablagerungen in Blutgefäßen begünstigen kann. Es kommt zu einer Dysbalance der Lipoproteine im Blut (Weitgasser et al. 2018).

Diabetes Typ 2 zählt ebenfalls zu den Folgeerkrankungen der Adipositas. So erhöht sich das Risiko mit steigendem BMI. Bereits ein Wert von $\geq 23 \text{ kg/m}^2$ führt zu einer Zunahme der Erkrankungswahrscheinlichkeit. Ab einem BMI $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ steigt diese sogar auf das 30-Fache an (im Vergleich zu Personen mit einem BMI $< 22 \text{ kg/m}^2$). Bei bis zu 80 % der Diabetesfälle ging diesen eine Adipositas-Erkrankung voraus, weshalb sich auch der Begriff „Diabesity“ seit einigen Jahren etabliert hat. Für die Prävention und Behandlung von Diabetes wird heute unter anderem eine Steigerung der körperlichen Aktivität und eine Ernährungsumstellung empfohlen (Benecke und Vogel 2003; Mau et al. 2014a; Toplak et al. 2019). Eine fettreduzierte, protein- und ballaststoffreiche Diät nach dem mediterranen Ernährungsmuster ist ideal für die Betroffenen, um ihr Gewicht reduzieren und ihren Blutzuckerspiegel besser kontrollieren zu können. Auch auf die Zusammensetzung der einzelnen Nahrungsmittel sollte geachtet werden. So sind komplexe, langkettige Kohlenhydrate den schnell verfügbaren Monosacchariden vorzuziehen,

um extreme Schwankungen der Blutzuckerwerte zu vermeiden (Benecke und Vogel 2003; Mau et al. 2014b; Toplak et al. 2019).

Zudem erhöhen Übergewicht und Adipositas das Risiko an verschiedenen Krebsarten zu erkranken. Eine 2018 veröffentlichte Studie des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) belegte, dass 7 % der jährlich neu auftretenden Karzinome aufgrund einer Adipositas entstanden sind (Behrens et al. 2018). So litten Menschen mit einem BMI ≥ 30 kg/m² häufiger an einem Nierenzell-, Oesophagus-, Endometrium- oder postmenopausalen Mammakarzinom. Auch ausgehend von Darm-, Leber-, und Bauchspeicheldrüsengewebe kann es vermehrt zu einer Tumorentwicklung kommen. Es existiert ein direkter Zusammenhang zwischen einer Krebsdiagnose und einer vorhandenen Fettleibigkeit. Je adipöser eine Person ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit der Entstehung eines Karzinoms (Lauby-Secretan et al. 2016).

1.2 Brustkrebs

1.2.1 Epidemiologie

Brustkrebs ist die weltweit häufigste Tumorerkrankung bei Frauen und die vorherrschende Ursache für krebsbedingte Todesfälle (Ferlay et al. 2019). 2018 wurde bei fast 70.000 Frauen in Deutschland Brustkrebs neu diagnostiziert. Mit einer Inzidenz von 1 % ist dieser auch bei Männern nachweisbar (Robert Koch-Institut 2021).

Nachdem 2005 das Mammographie-Screening eingeführt wurde, stieg die Zahl der Neuerkrankungen deutlich an. Ein Grund hierfür sind unter anderem die nachgewiesenen, ohne die Untersuchung nicht erkannten Erstdiagnosen des Mammakarzinoms. Seit 2009 sinkt die Neuerkrankungsrate. Die Sterblichkeit infolge eines Brustkrebsleidens geht ebenfalls zurück (Robert Koch-Institut 2021; Katalinic et al. 2020).

1.2.2 Molekularbiologie

Brustkrebs ist auf zellbiologischer Ebene betrachtet eine komplexe Erkrankung, die in verschiedene molekulare Subtypen unterteilt werden kann (Curtis et al. 2012). Die Differenzierung in die aktuellen fünf Hauptgruppen nach genomweiten Microarray-Analysen ist Abbildung 1 zu entnehmen.

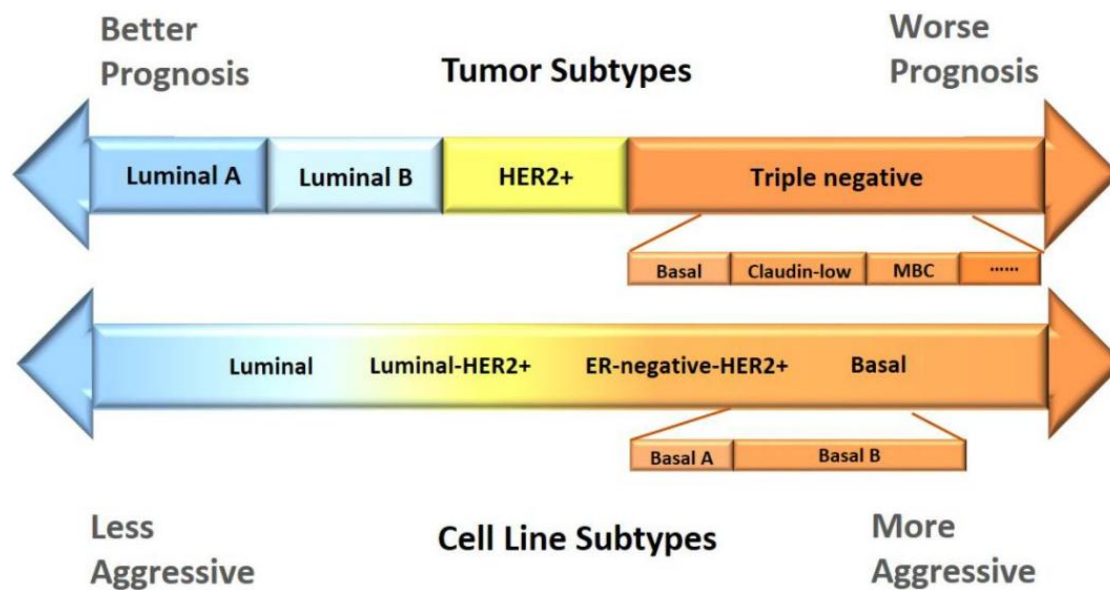


Abbildung 1: Darstellung der aktuell gängigen Subtypen des Mammakarzinoms (Dai et al. 2017).

Durch die verschiedenen molekularen Eigenschaften werden die Subtypen jeweils als eigenständige Tumorentitäten angesehen, die auf unterschiedliche Art und Weise therapiert werden (Sørli et al. 2006; Taherian-Fard et al. 2015).

Das Genexpressionsprofil des Luminal A- und Luminal B-Subtyps ähnelt dem gesunder luminaler Brustepithelzellen. Charakteristisch für diese beiden Hauptgruppen ist die Expression des Östrogen-Rezeptors (ER) und/oder Progesteron-Rezeptors (PR), weshalb sie zu den Hormonrezeptor-positiven (ER+) Mammakarzinomen gezählt werden. Die Unterscheidung der beiden luminalen Subtypen erfolgt anhand der Expression des Proliferationsmarkers Ki67. Es handelt sich hierbei um einen in nahezu allen Phasen des Zellzyklus exprimierten Zellkernmarker (Nielsen et al. 2021). Auf dessen Grundlagen können die in der Wachstumsphase befindlichen Zellen histopathologisch angefärbt werden. Je höher der in Prozent angegebene Ki67-Markierungsindex ist, desto größer ist die Proliferationsrate der Tumorzellen (Scholzen und Gerdes 2000). Während bei Luminal B-Tumoren größere Mengen des Markers detektiert werden, weisen Luminal A-Mammakarzinome nur eine geringe Ki67-Expression auf. Auch der histologische Grad ist beim Luminal B-Subtyp deutlich höher. Beide Faktoren führen dazu, dass die Prognose für Patientinnen mit einem Luminal B-Karzinom wesentlich schlechter ist im Vergleich zu an Luminal A-Brusttumor-Erkrankten (Sørli et al. 2001; Sorlie et al. 2003; Parker et al. 2009; Weigelt et al. 2010).

Über den normal-breast-like Subtyp ist bisher wenig bekannt, wohingegen HER2+ und basal-like Mammakarzinome häufig ein aggressiveres Verhalten aufweisen (Weigelt et al. 2010).

Charakteristisch für basal-like Subtypen ist ein mit dem von basalen Myoepithelzellen vergleichbares Genexpressionsmuster und ein hoher histologischer Grad (Weigelt et al. 2010). Triple negativer Brustkrebs (TNBC) stellt eine Sonderform des basal-like Subtyps dar und weist keinerlei Expression der Oberflächenrezeptoren ER, PR und HER2 auf (ER-/PR-/HER2-) (Rakha et al. 2009; Foulkes et al. 2010; Badve et al. 2011). Es handelt sich um einen aggressiven Brustkrebstyp, der in 10 bis 24 % aller Mammakarzinome nachgewiesen wird und überwiegend prämenopausal bei jüngeren Frauen auftritt (Badve et al. 2011; El Sawaf und Sinn 2011). Die Aggressivität, die dem Tumor zugeschrieben wird, resultiert aus einer hohen Metastasierungswahrscheinlichkeit und einer damit einhergehenden schlechten Prognose (El Sawaf und Sinn 2011; Niwińska et al. 2011; Pogoda et al. 2013).

1.2.3 Risikofaktoren

1.2.3.1 Alter

Unterschiedliche Faktoren spielen für die Erkrankungswahrscheinlichkeit eine Rolle. Ein wichtiger Einflussfaktor ist dabei das Alter einer Frau. Mit steigender Anzahl der Lebensjahre nimmt auch das Brustkrebsrisiko deutlich zu. So sind ca. 43 % der Patientinnen bei der Erstdiagnose zwischen 50 und 70 Jahre alt. Bei 40 % tritt ein Mammakarzinom nach dem 70. Lebensjahr auf und lediglich knapp 17 % der Betroffenen sind jünger als 17 Jahre (Robert Koch-Institut 2021).

1.2.3.2 Einfluss der Menarche, Menopause und Schwangerschaft

Auch durch andere Einflüsse wie eine frühe Menarche, eine späte Menopause oder einen hohen Östrogenspiegel nach Ausbleiben der Regelblutung steigt die Erkrankungswahrscheinlichkeit. Benignome der Brust oder sehr dichtes Brustdrüsengewebe erhöhen das Risiko ebenso (Michailidou et al. 2017; Robert Koch-Institut 2021, 2022). Werden nach den Wechseljahren über einen längeren Zeitraum Hormonersatzpräparate eingenommen und dabei Östrogene und Gestagene kombiniert, entwickeln Frauen ebenfalls häufiger ein Mammakarzinom. Hormonelle Kontrazeptiva spielen lediglich eine untergeordnete Rolle. Schwangerschaften und Stillen zeigen dagegen einen protektiven Effekt (Rosenberg et al. 2009; Robert Koch-Institut 2021, 2022).

1.2.3.3 Allgemeine Risikofaktoren

Neben nicht beeinflussbaren Parametern gibt es auch modifizierbare Risikofaktoren, welche die Prognose hinsichtlich einer Erkrankungswahrscheinlichkeit verschlechtern. Dazu gehören Tabak- und Alkoholkonsum, Bewegungsmangel und Übergewicht (Feigelson et al. 2006; Nichols et al. 2009; Protani et al. 2010; Chang et al. 2013).

1.2.3.4 MARIE und die Folgestudien

Bei der Mammakarzinom-Risiko-Erhebung (MARIE) des DKFZ nahmen von 2002 bis 2005 über 10.000 gesunde und an Brustkrebs erkrankte Frauen zwischen 50 und 74 Jahren teil. Folgende Resultate konnten aus der epidemiologischen Fall-Kontroll-Studie gewonnen werden: Ausgetragene Schwangerschaften vor allem in jungen Jahren, Stillen und körperliche Aktivität wirken protektiv. Die Einnahme von Hormonpräparaten während und nach den Wechseljahren geht mit einem höheren Risiko einher, ein postmenopausales Mammakarzinom zu entwickeln. Rauchen steigert die Erkrankungswahrscheinlichkeit in diesem Fall nicht signifikant (Chang-Claude und Becher 2009).

Die Folgestudien 2009 bzw. 2014 beschäftigten sich mit möglichen Einflussfaktoren auf den Krankheitsverlauf. Positive Auswirkungen haben eine gesunde, obst- und gemüsereiche Ernährung, ein hoher Enterolakton-Spiegel und ein stabiles Gewicht. Bei Enterolakton handelt es sich um das am häufigsten durch die Nahrung aufgenommene Phytoöstrogen. Sowohl ein niedriger Vitamin D-Spiegel als auch ein übermäßiger Nikotin- und Alkoholkonsum können die Prognose negativ beeinflussen (Chang-Claude und Becher 2014, 2019).

1.2.4 Therapieoptionen

Die Standardtherapie für im Frühstadium diagnostizierte Mammakarzinome ist nach wie vor die chirurgische Resektion (Burstein et al. 2021). Eine Strahlentherapie wird üblicherweise nach brusterhaltenden Operationen durchgeführt (Burstein et al. 2021). Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der einzelnen Tumor-Subtypen variieren die alternativ oder zusätzlich möglichen Behandlungsoptionen. ER+ Mammakarzinome werden überwiegend mithilfe einer systemischen, endokrinen Therapie behandelt (Waks und Winer 2019). Hierbei werden

die ER entweder modifiziert bzw. blockiert oder die Konzentration der zirkulierenden Steroidhormone durch Aromatasehemmer gering gehalten (Waks und Winer 2019). Adjuvante Antikörpertherapien sind bei HER2+ Tumoren indiziert. Die verabreichten monoklonalen Antikörper richten sich hierbei gegen die extrazelluläre Domäne des Wachstumsrezeptors 2 (HER2) (Weigelt et al. 2010). Da triple negative Mammakarzinome (TNBC) weder Hormonrezeptoren noch HER2+ exprimieren, ist bei den betroffenen Patientinnen eine systemische Chemotherapie das Mittel der Wahl (Jitariu et al. 2017; Waks und Winer 2019).

1.3 Adipositas und Brustkrebs

Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Brustkrebs steigt bei Vorliegen einer Fettleibigkeit deutlich an. Zahlreiche epidemiologische Studien zeigen, dass Übergewicht und Adipositas mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert sind (Reeves et al. 2007; Ligibel et al. 2014; Ackerman et al. 2017; König et al. 2021) und unabhängige, negative prognostische Faktoren bei einer vorhandenen Brustkrebserkrankung darstellen (Arce-Salinas et al. 2014; Blücher und Stadler 2017). 25 % der Frauen, die an einem postmenopausalen Mammakarzinom leiden, sind adipös (Reeves et al. 2007; Renehan et al. 2008). Eine dreifach höhere Mortalität ist ab einem BMI > 27 kg/m² bei Vorliegen eines Mammakarzinoms gegeben (Minicozzi et al. 2013). Dies betrifft nicht nur die häufigeren ER+ Mammakarzinome, sondern auch die TNBC-Subtypen, welche nach wie vor schlechter zu therapieren sind (Harborg et al. 2021).

1.3.1 Karzinogenese als Folgeerkrankung der Adipositas

Ebenso, wie Hormone während der Menstruation, der Schwangerschaft, der Stillzeit oder der Menopause auf den Körper wirken, verändert sich der Hormonhaushalt bei starkem Übergewicht. Neben Wachstums- und Entzündungsfaktoren werden vor allem aus dem stoffwechselaktiven Bauchfett Östrogene sezerniert. Da diese nach den Wechseljahren natürlicherweise nur in geringen Mengen auftreten, können die Zellen im Brustgewebe durch diesen Überschuss an Steroidhormonen möglicherweise unkontrolliert wachsen und zur Karzinomentstehung beitragen (Mau et al. 2014b).

Adipöse Menschen weisen zudem häufig eine Insulinresistenz in Herz- und Fettgewebe oder der Skelettmuskulatur auf, die eine Hyperglykämie nach sich zieht. Durch eine vermehrte Insulinsekretion versucht die Bauchspeicheldrüse die zu hohen Blutzuckerwerte auszugleichen. Dies führt in weiterer Folge zu erhöhten zirkulierenden Spiegeln dieses Peptidhormons (Khandekar et al. 2011). Diabetes Typ 2 wird mit der Karzinogenese unterschiedlicher Lokalisationen des menschlichen Körpers in Verbindung gebracht. So kann Hyperinsulinämie auch die Entstehung eines Mammakarzinoms begünstigen (Michels et al. 2003). Es wird angenommen, dass dies außerdem einen aggressiveren Tumortyp und ein geringeres Ansprechen auf eine nachfolgende Therapie mit sich bringt (Khandekar et al. 2011).

Wie bereits zuvor erwähnt, kommt es vor allem bei einer abdominalen Adipositas zu einer Veränderung der zirkulierenden Lipidkonzentrationen. So sinkt die HDL-Cholesterin-Konzentration im Blut und während der Spiegel des LDL-Cholesterins, der Triglyceride und der freien Fettsäuren steigen (Weitgasser et al. 2018). Man nimmt an, dass die Tumorzellen diese Lipide und andere zirkulierende Nährstoffe beispielsweise zur Herstellung neuer Membranstrukturen von Nutzen sind. Ebenfalls kann der Cholesterin-Metabolit 27-Hydroxycholesterin durch seine Wirkung als selektiver ER-Modulator das Wachstum eines ER⁺ Mammakarzinoms fördern (Nelson et al. 2013). Es ist belegt, dass eine Hochregulierung der Fettsäuresynthase (FAS) mit einer schlechteren Prognose einer bestehenden Krebserkrankung einhergeht (Nguyen et al. 2010). FAS fungiert als Katalysator im ersten Schritt der Fettsäurebiosynthese. Das Enzym soll Krebszellen einen selektiven Vorteil verschaffen, indem es die Produktion von Phospholipiden in Tumorzellen steigert, die diese für ihre Membran benötigen (Baenke et al. 2013; Schroeder et al. 2021).

1.3.2 Molekulare Mechanismen der Tumorentstehung bei Mammakarzinomen und Adipositas

1.3.2.1 Interaktion von Fettgewebe und Brustkrebszellen

Sekundäre Folgen einer Fettleibigkeit können einen Einfluss auf die Entstehung eines Mammakarzinoms haben. Die Zunahme an Fettgewebe führt zu einer Störung der Energiemöostase und zu einer Konzentrationsänderung bestimmter Zytokine (Fried et al. 1998). Jüngeren Forschungen zufolge ist Adiponektin an der zytotoxischen Autophagie beteiligt, der eine

inhibitorische Wirkung in Bezug auf Brustkrebs zugeschrieben wird (Chung et al. 2017). Die Konzentration des Adiponektins sinkt mit steigendem BMI (Barb et al. 2007).

Die aus der energetischen Dysbalance resultierende chronische Inflammation kann die Funktionsfähigkeit unterschiedlicher Gewebe beeinflussen (Khandekar et al. 2011). Die Adipositas begünstigt eine chronische Entzündung des Fettgewebes, wobei es zu einer vermehrten Makrophagenaktivierung und -infiltration in das neu entstandene Fettgewebe kommt (Khandekar et al. 2011; Johnson et al. 2012; Vaysse et al. 2017; Dietze et al. 2018). Man vermutet, dass dieser Vorgang zur Tumorentstehung und -progression beitragen kann. Proinflammatorische Zytokine begünstigen einerseits die Rekrutierung von Makrophagen und anderen Immunzellen (Khandekar et al. 2011; Johnson et al. 2012; Vaysse et al. 2017; Dietze et al. 2018). Andererseits üben diese Faktoren sowohl lokal als auch distal eine direkte Wirkung auf die Zellen des Mammakarzinoms aus (Khandekar et al. 2011; Blücher und Stadler 2017). Werden proliferierende Makrophagen in Malignomen der Brust nachgewiesen, geht man von einem hohen Tumorgrad und einer schlechteren Prognose aus (Campbell et al. 2011; Morris et al. 2011).

Der Fettstoffwechsel ist für die Struktur, den Energiestoffwechsel und die Signalübertragung von entscheidender Bedeutung. So spielen Lipide nicht nur eine wichtige Rolle für die Integrität der Zellmembran, sondern sind darüber hinaus grundlegend an der intrazellulären Energiespeicherung und interzellulären Signalübertragung beteiligt (Wallace und Metallo 2020; Yoon et al. 2021; Taborda Ribas et al. 2024). Auch treten Änderungen der Lipidzusammensetzung im Brustkrebsgewebe im Vergleich zu derjenigen im gesunden Gewebe auf (Taborda Ribas et al. 2024). Bei Patienten mit einem BMI ≥ 30 kg/m² ändert sich nicht nur die Zusammensetzung des Fettgewebes, sondern auch die zellulären Eigenschaften der Adipozyten. In Abbildung 2 sind die Wechselwirkungen und der gegenseitige Einfluss der beiden Erkrankungen Adipositas und Brustkrebs schematisch dargestellt. So weisen die Fettgewebszellen unter anderem einen hypertrophen Phänotyp, Hypoxie, oxidativen Stress und ein verändertes Sekretionsverhalten auf. Es werden vermehrt proinflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren und freie Fettsäure sezerniert, die zusätzlich fördernd auf die Progression eines Mammakarzinoms wirken (Khandekar et al. 2011; Blücher und Stadler 2017; Balaban et al. 2017).

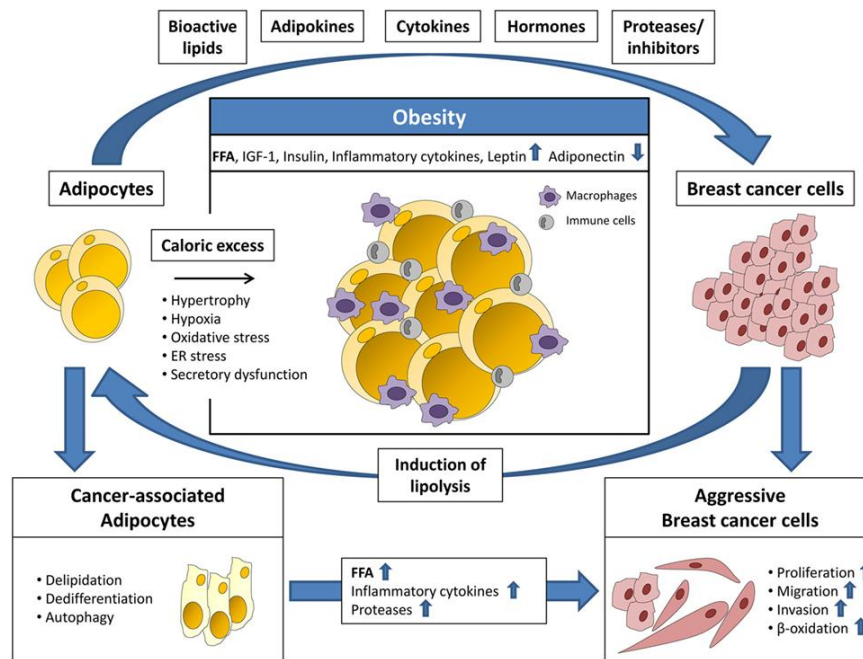


Abbildung 2: Interaktion von adipös veränderten Fettgewebe und Brusttumorzellen (Blücher und Stadler 2017).

Die erhöhte Freisetzung freier Fettsäuren aus den Adipozyten wird durch die Anwesenheit der Tumorzellen und die damit verbundene Induktion der Lipolyse zusätzlich verstärkt (Balaban et al. 2017). Obwohl viele Studien zu dem Ergebnis kamen, dass Krebszellen primär endogene Fettsäuren verwerten (Zaidi et al. 2013; Kinlaw et al. 2016), konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass die Aufnahme, Speicherung und Verwertung exogener Lipide in Tumorzellen ebenso von Bedeutung ist (Nieman et al. 2011; Balaban et al. 2017). So stellten Nieman et al. eine Steigerung des Wachstums und der β -Oxidation von Ovarialkarzinomzellen durch die Aufnahme freier Fettsäuren benachbarter Adipozyten fest (Nieman et al. 2011). Weitere Studien beschäftigen sich mit der Auswirkung freier Fettsäuren auf die Tumorprogression eines Mammakarzinoms. Hierzu wurden humane Brustkrebszellen direkt mit Lipiden inkubiert (Soto-Guzman et al. 2010; Serna-Marquez et al. 2013; Rodriguez-Monteros et al. 2018). Es wurde gezeigt, dass sowohl exogen zugeführte Linolsäure (Byon et al. 2009; Serna-Marquez et al. 2013; Serna-Marquez et al. 2017; Gonzalez-Reyes et al. 2018) als auch Ölsäure (Hardy et al. 2000; Soto-Guzman et al. 2010; Navarro-Tito et al. 2010; Li et al. 2014), zu einer Steigerung der β -Oxidation in Brustkrebszellen und einer erhöhten Proliferation, Migration und Invasion führte. Durch die Zugabe von Ölsäure kam es in humanen Brustkrebszellen zu einer Aktivierung der AMPK (Adenosinmonophosphat-abhängigen Kinase) und dadurch im weiteren Verlauf zu einer gesteigerten β -Oxidation und ATP-Synthese (Li et al. 2014).

1.3.2.2 Der Einfluss der Peroxisom Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs)

Neueste Untersuchungen zeigten Veränderungen der Expression der Gene, die bei der PPAR-Signalübertragung und dem Fettstoffwechsel von Bedeutung sind (Blücher et al. 2020). Bei Peroxisom Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs) handelt es sich um ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren nuklearer Hormonrezeptoren, welche die Regulation bestimmter Zielgenexpressionen steuern (La Paglia et al. 2017). Diese Gene spielen in Bezug auf den Lipid- und Glukosestoffwechsel und die Adiponektin-Expression eine wichtige Rolle. Es wurde eine erhöhte Expression der PPAR-Zielgene bei Brustkrebszellen nachgewiesen, welche zuvor mit Fettgewebssproben co-kultiviert worden waren (Blücher et al. 2020).

Bei Peroxisom Proliferator-aktivierten Rezeptoren lassen sich drei Subtypen unterscheiden: PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ . Diese weisen eine Überstimmung von 80 % auf und bestehen u.a. aus einer DNA-Bindungsdomäne (DBD) und einer Liganden-Bindungsdomäne (LBD) (Lamas Bervejillo und Ferreira 2019). Durch die Erkennung einer bestimmten Sequenz aus sechs Nukleotiden, den sogenannten PPAR responsive elements (PPRE), in der Promoterregion der Zielgene ist die DBD in der Lage, die Expression dieses codierenden DNA-Abschnitts zu erkennen und zu regulieren (Lamas Bervejillo und Ferreira 2019). Unterschiede zwischen den einzelnen PPAR-Subtypen sind in der LBD zu finden. Ein Bestandteil dieser Domäne ist die Ligandenbindestelle. Die hohe Variabilität dieses Abschnitts zwischen PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ und die Tatsache, dass in unterschiedlichen Geweben verschiedene Liganden vorherrschen, sind der Grund für das gewebespezifische Vorkommen der einzelnen PPAR-Subtypen (La Paglia et al. 2017; Lamas Bervejillo und Ferreira 2019). So ist PPAR α , welcher wichtige Funktionen im Fettsäureabbau übernimmt, die vorherrschende Form in Geweben mit einer hohen β -Oxidationsrate, wie Leber, Herz, Skelettmuskel sowie in weißem und braunem Fettgewebe (Pyper et al. 2010; Kersten 2014). Auch in Zellen, die an Entzündungsreaktionen beteiligt sind, überwiegt die Expression dieses PPAR-Subtyps (Lamas Bervejillo und Ferreira 2019). PPAR β/δ ist in den meisten humanen Geweben anzutreffen, wobei bis zum aktuellen Zeitpunkt dessen genaue Funktion noch nicht abschließend geklärt werden konnte. Auffällig ist allerdings, dass er vor allem in lipidstoffwechselaktiven Geweben wie Adipozyten, Leber, Skelettmuskel, Herz und Gehirn exprimiert wird (Wagner und Wagner 2010; Neels und Grimaldi 2014; Giordano Attianese und Desvergne 2015; Vázquez-Carrera 2016). Da PPAR γ eine Rolle bei der Adipogenese, Fettspeicherung und dem Glukosemetabolismus übernimmt, ist dieser

Subtyp vor allem in weißem und braunem Fettgewebe zu finden (Wang 2010; Aprile et al. 2014; Soccio et al. 2015).

Zu den Liganden der PPARs zählen freie Fettsäuren und Eikosanoide (Harmon et al. 2011). Neben kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes mellitus wurden sie in neueren Studien auch mit der Tumorprogression in Verbindung gebracht (Seargent et al. 2004; Shen et al. 2017). So wurde eine Induktion der PPARs in Tumorzellen durch exogene freie Fettsäuren beschrieben (Shen et al. 2017). Ölsäure scheint in Tumorzellen alle PPAR-Subtypen zu aktivieren und nachfolgend auch einen Einfluss auf die Expression weiterer Faktoren auszuüben (Shen et al. 2017). Der PPAR α -abhängigen Hochregulierung von *ANGPTL4* wird in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle zugesprochen. Die *ANGPTL4*-Expression ist bei aggressiven Tumorentitäten erhöht (Huang et al. 2011). Das gleichnamige Protein ist einerseits für den Fettstoffwechsel, andererseits für die Entstehung eines Karzinoms, dessen Wachstum und Metastasierung von Bedeutung (La Paglia et al. 2017). Welche molekularen Mechanismen dem zugrunde liegen und welche Rolle Adipositas dabei spielt, ist noch nicht abschließend geklärt.

1.4 Zielsetzung

Diese Arbeit widmet sich der Analyse molekularer und metabolischer Veränderungen sowie der Charakterisierung der Lipidzusammensetzung von Brustkrebszellen nach Inkubation in adipose tissue conditioned medium (ACM). Das ACM wurde durch die Aufbereitung von humanem adipösem Fettgewebe gewonnen. Die Brustkrebszellen wurden in vitro entweder in Anwesenheit von ACM oder nach Inkubation in Kontrollmedium (SFM) untersucht.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen analysiert:

1. Veränderungen der Lipidkomposition mittels massenspektrometrischer Lipidomics-Analysen
2. Die Expression ausgewählter PPAR-Zielgene und deren mögliche Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus
3. Die Expression der PPAR-Subtypen sowie die Bedeutung des Hormonrezeptorstatus für deren Regulation

Hierzu wurden insgesamt vier Brustkrebszelllinien untersucht, darunter zwei Östrogenrezeptor-positive (ER+) (MCF7, T47D) sowie zwei triple negative (TNBC) (HCC38, MDA-MB231) Brustkrebszelllinien.

Zuvor durchgeführte Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die Inkubation humaner Brustkrebszellen in ACM eine Hochregulation der PPAR-Zielgene bewirkte (Blücher et al. 2020). Es liegen allerdings bis zum aktuellen Zeitpunkt keine Untersuchungen vor, ob und inwieweit der Hormonrezeptorstatus der Tumorzellen hierbei eine Rolle spielt. Die vier Brustkrebszelllinien wurden hierzu im Zuge dieser Arbeit auf Genexpressions- und Proteinebene betrachtet, die zellulären Veränderungen in Anwesenheit und Abwesenheit von ACM herausgearbeitet und die nachweisbaren Unterschiede bezüglich des Hormonrezeptorstatus dargestellt.

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinien

Zelllinie	Klassifikation	ER	PR	HER2
MCF7	Luminal A	+	+	-
T47D	Luminal A	+	+	-
HCC38	Claudin-low / triple negative B	-	-	-
MDA-MB231	Claudin-low / triple negative B	-	-	-

2.2 Zellkulturmedien, Puffer, Lösungen

2.2.1 Zellkultur

Produktname	Bestellnummer	Produktionsfirma
DMEM (1X) + GlutaMAX™-I (+) 4,5 g/L D-Glucose (+) Pyruvate	31966-021	Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
0,25 % Trypsin-EDTA (1X)	25200-056	
Anti-Anti (100X) (Antibiotic-Antimycotic)	15240-062	
DPBS (1X) (-CaCl ₂ , -MgCl ₂)	14190-094	
Trypan Blue Solution (0,4 %)	72-57-1	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Bovine Serum Albumin ($\geq 98\%$)	1003310873	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fetal Constance, sterile filtered	AC-SM	Anprotec, Bruckberg, Deutschland

2.2.2 RNA-Isolation, Reverse Transkription, PCR

RLT-Buffer (Lysis Buffer)	1015762	QUIAGEN RNeasy Mini Kits, QUIAGEN GmbH, Hilden, Germany
RW1-Buffer (Lysis Buffer)	1015763	
RPE-Buffer (Wash Buffer)	1019966	
Nuclease-free water	1039498	
Ethanol (100 %)	64-17-5	PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt, Deutschland
SuperScript [®] II Reverse Transkriptase	100004925	Invitrogen, Carlsbad, USA
5X First Strand Buffer	Y02321	Invitrogen, Carlsbad, USA
0.1 M DTT	Y00147	
Random Hexamer Primer	N8080127	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz
dNTP-Mix (Stammlösung 10mM)	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

2.2.3 Primer für qPCR

hGAPDH-F (GGCCTCCAAGGAGTAAGACC)	44-5043-1/2	Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany
hGAPDH-R (AGGGGAGATTCAGTGTGGTG)	44-5043-2/2	
hPDK4-F3 (GGAAGCATTGATCCTAACTGTGA)	46-4289-10/19	
hPDK4-R3 (GGTGAGAAGGAACATACACGATG)	46-4289-11/19	
hCPT1A_F1 (GCCTCGTATGTGAGGCAAAA)	15-5389-30/39	
hCPT1A_R1 (TCATCAAGAAATGTGCGCACG)	15-5389-31/39	
hPPARg1_Fwd (CTCTCCGTAATGGAAGACCACT)	19-3168-1/4	
hPPARg1/2_Rev (TCTGCAACCACTGGATCTGTTC)	19-3168-2/4	
hPPARg2_Fwd (CTGATACACTGTCTGCAAACATA)	40-2223-5/13	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
hFAS_F (CTGTCTAGGTTTGATGCCTCCT)	D8592-039	

hFAS_R (ACGATGGCTTCATAGGTGACTT)	D8592-040	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
hPPARa_Fwd (CAGAACAAGGAGGCGGAGGTC)	3004097293-140	
hPPARa_Rev (TTCAGGTCCAAGTTTGCGAAGC)	3004097293-150	
PPARD-F (CTGATACACTGTCTGCAAACATA)	6103892	Eurogentec, Seraing, Belgien
PPARD-R (TTCGGTCTTCTTGATCCGCTGCAT)	6103893	
hANGPTL4-F4 (GGGAGAGGCAGAGTGGACTATTT)	6679212	
hANGPTL4-R4 (TTACTGTCCAGCCTCCATCTGA)	6679213	
hPLIN2-F2 (TTGCAGTTGCCAATACCTATGC)	6178228	
hPLIN2-R2 (CCAGTCACAGTAGTCGTCACA)	6178229	

2.2.4 Proteinextraktion und Bestimmung der Proteinkonzentration

Tris ($\geq 99\%$)	2449.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS ultra pure	2326.2	
Sodium chloride	567441	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden am Taunus, Deutschland
Igepal [®]	I3021-50ML	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sodiumdesoxycholat	30970-500G	
PhosphoStop Easypack Phosphatase Inhibitor Cocktail	4906837001	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tables	11836153001	
Albumin Standard	23209	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DC Protein Assay Reagent A	500-0113	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, USA
DC Protein Assay Reagent B	500-0114	
DC Protein Assay Reagent S	500-0115	

2.2.5 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Glycine	3187.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HCl (1N) (1 mol/L)	K025.1	
Tween®20	P7949-500ML	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bovine Serum Albumin	1003287736	
Ponceau S	P-3504	
NuPage® Sample Reducing Agent (10X)	NP0009	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPage® LDS Sample Buffer (4X)	NP0007	
NuPage® Antioxidant	NP0005	
LiChrosolv® Methanol	67-56-1	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure (100 %)	1.00063.1000	
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	26616	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Immobilion® Classico Western HRP Substrate	WBLUC0100	Millipore GmbH, Billerica, USA
Immobilion® Crescendo Western HRP Substrate	WBLUR0100	Millipore GmbH, Billerica, USA

Supersignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate • SuperSignal™ West Femto Luminol/Enhancer • SuperSignal™ West Femto Stable Peroxide	34095	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
---	-------	---

2.2.5.1 Antikörper

anti-GAPDH (clone 6C5) (mouse monoclonal) (Verdünnung 1:100.000)	10R-G109a	Fitzgerald Industries International, Acton, USA
anti-PPAR γ (C26H12) (rabbit monoclonal) (Verdünnung 1:1000)	2435S	Cell Signaling, Cambridge, UK
anti-PPAR β (mouse monoclonal) (Verdünnung 1:1000)	sc-74517	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
anti-PPAR α (mouse monoclonal) (Verdünnung 1:1000)	sc-398394	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Horse anti-Mouse IgG (H+L) Peroxidase	PI-2000	Vector Laboratories, Stuttgart, Deutschland
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L), cross adsorbed secondary antibody, HRP	31458	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.2.5.2 Zusammensetzungen der verwendeten Puffer

RIPA- (Radio-Immunpräzipitationsassay-) Puffer (Ansatz für 50ml)

- 50 mM Tris 1 M (pH 8,0) 2500 µl
- 50 mM NaCl (Stammlösung 5 M) 1500 µl
- 1 % Igepal 500 µl
- 0,5 % Natriumdesoxycholat 2500 µl
- 0,1 % SDS (Natriumdodecylsulfat) 500 µl

Die Pufferansatzlösung wurde mit 42,5 ml Aqua dest. aufgefüllt. Destilliertes Millipore®-Wasser aus der Milli-QUF Plus-Anlage der Firma Millipore® wurde verwendet.

- 7xPhosphoStop Easypack Phosphatase Inhibitor Cocktail 7150 µl
(für 1 ml RIPA 143 µl 7xPhosphoSTOP)
- 25xComplete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tables (für 1 ml RIPA 40 µl Protease Inhibitor Cocktail) 2000 µl

Laufpuffer für SDS-Gelelektrophorese (10X)

- 0,25 M TrisBase
- 1,92 M Glycine
- 34 mM SDS
- auf 5 l Aqua dest.

Transferpuffer für Western Blot (10X)

- 12 mM TrisBase
- 96 mM Glycine
- auf 2 l Aqua dest.

TBS-T für Western Blot (10X)

- 1,5 M NaCl
- 0,2 M TrisBase
- auf 1 l Aqua dest.
- 1 ml Tween[®]20

2.2.6 AdipoRed-Assay

16 % Formaldehyde Solution, Methanol-free	28906	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DPBS (1X) (+CaCl ₂ , +MgCl ₂)	1404-091	Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DPBS (1X) (-CaCl ₂ , -MgCl ₂)	14190-094	
AdipoRed™ Assay Reagent	PT-7009	Lonza, Walkersville, USA

2.3 Methoden

2.3.1 ACM-Gewinnung aus humanem Fettgewebe

Um adipose tissue conditioned medium (ACM) gewinnen zu können, wurde subkutanes, abdominales, humanes, weibliches Fettgewebe verwendet, das bei kosmetischen Operationen wie z.B. Bauchdeckenstraffungen entfernt wurde. Nach vorangegangener Aufklärung und Einverständniserklärung der Patientinnen wurde das Fettgewebe von Prof. Dr. Dr. Prantl, Direktor der Klinik für plastische und ästhetische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie am Caritas Krankenhaus St. Josef in Regensburg, zur Verfügung gestellt (Ethikvotum 19-1453-101, zuletzt aktualisiert unter Referenznummer 24-3640-101). Das Fettgewebe stammte von fünf Patientinnen, die zwischen 33 und 71 Jahren alt waren und einen BMI von 32 bis 49 aufwiesen.

Alle Laborarbeiten in diesem Zusammenhang wurden unter der Sterilbank HERAsafe 2030i von Thermo Fisher Scientific durchgeführt.

Die Fettgewebprobe wurde mit der Hautseite nach unten in eine große Plastikpetrischale gelegt, mit DPBS befeuchtet und die Oberfläche von Blutresten und Bindegewebe freipräpariert. Danach wurden kleinere Fettstücke abgetrennt. Diese wurden zunächst in einer Petrischale, die nur DPBS enthielt, gereinigt und anschließend in einem mit 25 ml DPBS gefülltem, sterilem Falcon-Tube noch einmal gespült. Nach den beiden Reinigungsschritten wurde das Fettgewebe in ein steriles auf 37 °C erwärmtes Falcon-Tube mit 25 ml DMEM gegeben. Das mit Flüssigkeit gefüllte Tube wurde zuvor ohne Fett gewogen, um bei der anschließenden Messung die Masse an zugegebenem Fettgewebe ermitteln zu können. Jeweils 4 g des Fettgewebes wurden in Stücke von 50 bis 100 mg weiter zerkleinert. Diese wurden an der Oberfläche eingeritzt und in T175-Zellkulturflaschen überführt, worin sich bereits 40 ml SFM, bestehend aus DMEM, 1 % BSA und 1 % Anti-Anti befand. Die nachfolgende Inkubationszeit im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ betrug 24 h, wobei eine Zellkulturflasche mit alleinigem SFM ohne Fettgewebe als Mediumkontrolle diente.

Nach 24 h wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen in ein Falcon-Röhrchen überführt und bei 4000 rpm für 15 min zentrifugiert. Bei der anschließenden ACM-Ernte wurde darauf geachtet, die Zwischenphase des Mediums, jedoch weder das Pellet noch die oberflächlichen Adipozyten mit einer Spritzenkanüle abzusaugen. Diese Zwischenphase wurde in eine autoklavierte Schottflasche abgefüllt, anschließend aliquotiert und bei - 80 °C gelagert.

2.3.2 Zellkultur humaner Brustkrebszelllinien

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden an vier verschiedenen humanen Brustkrebszelllinien durchgeführt. Es handelte sich hierbei um die Östrogenrezeptor-positiven (ER+/PR+/HER-; nachfolgend abgekürzt als ER+) MCF7 und T47D und die triple negativen (ER-/PR-/HER-; nachfolgend abgekürzt als TNBC) HCC38 und MDA-MB231 Zellen. Als Standardmedium diente DMEM, das mit 10 % FKS und 1 % Anti-Anti versetzt wurde. Die Zellkulturen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte inkubiert und das Zellwachstum täglich mikroskopisch kontrolliert. Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen von drei bis vier Tagen gesplittet, sobald der Zellrasen etwa 70 bis 80 % des Zellkulturflaschenbodens bedeckte. Dazu wurde das Nährmedium abgesaugt und die adhärennten Zellen einmal mit DPBS gewaschen, um mögliche Rückstände des Mediums zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 4 ml einer 0,25 %-igen Trypsin-EDTA-Lösung versetzt. Nach einer fünfminutigen

Inkubation im Brutschrank erfolgte eine mikroskopische Kontrolle des Ablösens der Zellen, bevor die Reaktion durch Zugabe derselben Menge an Standardmedium gestoppt wurde. Die nun vorhandene Zellsuspension wurde in Falcon-Röhrchen überführt und für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und die Zellen nach sorgfältiger Resuspension des Zellpellets in 1 ml Medium mit einer Verdünnung von 1:3 erneut in T75-Zellkulturflaschen ausgesät. Hierzu wurden je 10 ml DMEM (+ 10 % FKS, + 1 % Anti-Anti) in den einzelnen Zellkulturflaschen vorgelegt und jeweils 333 µl der jeweiligen Zellsuspension hinzugegeben. Danach wurden die Zellkulturen erneut im Brutschrank inkubiert.

2.3.2.1 Lebendzellbestimmung

Die Ermittlung der Zellzahl pro Milliliter erfolgte durch die standardisierte manuelle Zählung mithilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop.

Um eine ausreichende Konfluenz der Zellen für die geplanten Experimente gewährleisten zu können, wurden in den 6-Well-Platten jeweils 170.000 Zellen pro Well der MCF7, T47D und HCC38 Zellen ausgesät, sodass eine Konfluenz von 70 % vor der Zugabe des mit ACM angereicherten Mediums erreicht wurde. Eine Zellzahl von 100.000 MDA-MB231 Zellen pro Well führte zu einem vergleichbar dichten Zellrasen. Bei Versuchsansätzen mit einer 12-Well-Platte wurden je 85.000 Zellen pro Well an MCF7 und HCC38 Zellen gewählt. Einen ähnlich dichten Zellrasen erhielt man bei 75.000 T47D und 50.000 MDA-MB231 Zellen pro Well.

2.3.2.2 Behandlung der Zelllinien mit ACM

In allen Versuchsreihen wurden die vier Zelllinien parallel und auf dieselbe Weise behandelt.

Die Zellen wurden in 6-Well- bzw. 12-Well-Platten ausgesät und für 48 h in dem Standardmedium inkubiert. Dabei wurde das Zellwachstum regelmäßig mikroskopisch kontrolliert. 48 h nach Zellaussaat wurde das Medium abgesaugt, alle Wells mit DPBS gewaschen und in jeweils drei der sechs Wells SFM bzw. ACM zugegeben. Nach 24 h wurden die Zellen nochmals vorsichtig mit DPBS gereinigt. Danach konnte die Isolierung von RNA bzw. Proteinen erfolgen oder eine Fixierung der Zellen für einen nachfolgenden AdipoRed-Assay durchgeführt werden.

2.3.3 Untersuchung der Genexpression

2.3.3.1 RNA-Isolierung

Die Zellaussaat erfolgte für diese Versuchsreihe auf 6-Well-Platten. Alle Schritte wurden ab dem Zeitpunkt der RNA-Ernte unter Kühlung auf Eis durchgeführt. Für die RNA-Isolierung wurden das RNeasy[®] Kit der Firma Quiagen verwendet.

Nach der Auflösung der Zellen mittels 350 µl RLT-Lysis-Buffer pro Well, wurde das Zelllysats mit Zellschabern gesammelt und in ein QIAshredder Spin Säulchen pipettiert. Die anschließende Zentrifugation für 2 min bei 14.500 rpm diente der Homogenisierung der Lysate. Der Durchfluss wurde mit dem gleichen Volumen (350 µl) an 70 %igem Ethanol gemischt und auf Mini Spin Säulchen pipettiert. Das Versetzen des homogenisierten Zelllysats mit Ethanol im Mischungsverhältnis 1:1 schaffte optimale Bindungsbedingungen für die RNA an die Kieselsäuremembran des RNeasy[®] Mini Säulchens. In dieses wurden jeweils 700 µl des Durchfluss-Ethanol-Gemisches pipettiert und für 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde die Flüssigkeit verworfen, die sich während des Zentrifugationsschrittes im Collection Tube gesammelt hatte. Anschließend folgten weitere Waschschrte, um Verunreinigungen zu entfernen. Zunächst wurden die Säulchen mit je 700 µl des RW1-Buffers und 500 µl des RPE-Buffers gewaschen, wobei die Tubes ebenfalls für je 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert wurden. Die Zugabe von 500 µl des RPE-Buffers wurde ein weiteres Mal wiederholt, allerdings wurde dieser Reinigungsschritt für 2 min bei 10.000 rpm durchgeführt. Der Unterstand wurde nach jeder Zentrifugation verworfen.

Nach den drei Waschschrten wurden die Säulen in ein frisches Collection Tube überführt und erneut für 2 min bei 14.500 rpm zentrifugiert, um diese zu trocknen. Das Collection Tube wurde gegen ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß konnte die RNA durch die Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser und der anschließenden einminütigen Zentrifugation bei 10.000 rpm aus den Säulchenmembranen eluiert werden.

2.3.3.2 Bestimmung des RNA-Gehalts

Die Konzentration (in ng/µl) und die Reinheit der gewonnenen RNA wurde für jede Probe mit dem NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 der Firma Thermo Scientific (Waltham, USA) bei 260 nm und 280 nm gemessen. Als Leerkontrolle wurden zunächst 1,5 µl RNase-freies Wasser

aufgetragen, dessen Werte bei den entsprechenden Wellenlängen bestimmt und der Nullwert festgelegt.

2.3.3.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Für die cDNA-Synthese wurde 1 µg RNA eingesetzt und mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von schlussendlich 10 µl verdünnt. Auch hier wurde ausschließlich auf Eis gearbeitet, um vorzeitige und unerwünschte Reaktionen zu vermeiden. Von einem ersten Mastermix – bestehend aus Random Hexamer Primern (500 µg/ml) und einem dNTP-Mix (500 µM) im Mischungsverhältnis 1:1 – wurden jeweils 2 µl in PCR-Tubes (0,2 ml; Eppendorf) pipettiert, bevor diese kurz anzentrifugiert und anschließend im Thermocycler für 5 min bei 65 °C inkubiert wurden. Danach wurden die Tubes für mindestens 1 min auf Eis gestellt und erneut kurz anzentrifugiert, um sicherzustellen, dass alle Bestandteile in Lösung waren.

Bei dem zweiten Mastermix, der sich aus einem RT-Puffer, 0,1 M DTT, RNasin und Superscript im Mischungsverhältnis von 4:2:1:1 zusammensetzte, war v.a. die Reverse Transkriptase (Superscript) von Bedeutung, bei der es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase handelte. Während Diethiothreitol der Stabilisierung dieses Enzyms diene, bewirkte RNasin eine Inhibition der RNasen. Ein Volumen von 8 µl des zweiten Mastermixes wurden jeweils in die PCR-Tubes zugegeben, bevor sie ein weiteres Mal im Thermocycler inkubiert wurden. Dabei durchliefen die Tubes unterschiedliche Temperaturstufen – wie in der nachfolgenden Tabelle 1 beschrieben.

10 min	25 °C
50 min	42 °C
15 min	70 °C
Store	4°C

Tabelle 1: RT-PCR-Bedingungen während des zweiten Inkubationsschrittes im Thermocycler.

Die gewonnenen 20 µl cDNA wurden mit 80 µl Nuklease-freiem Wasser in 1,5 ml-Tubes verdünnt und bei 4 °C bzw. zur Langzeitlagerung bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.3.3.4 Quantitative PCR

Bei der Real Time oder auch quantitativen PCR (qPCR) werden die entstehenden PCR-Produkte mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und die Anreicherung dieser gemessen. Hierfür wurde der HOT FIREPol® EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne) verwendet. Er bestand aus einer chemisch modifizierten HOT FIREPol-DNA-Polymerase, einem 5x EvaGreen qPCR-Puffer (mit 12,5 mM MgCl₂), dNTPs und dem fluoreszierenden EvaGreen-Farbstoff. In eine durch die doppelsträngige DNA gebildete kleine Furche lagert sich der Farbstoff ein.

Hierzu wurden jeweils 2,5 µl der cDNA-Proben in eine MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate (Applied Biosystems®) pipettiert und mit 10 µl des zuvor hergestellten Mastermixes versetzt. Die Mix-Lösung setzte sich zusammen aus dem Forward- und Reverse-Primer für das jeweilige Gen (je 300 nM Endkonzentration), dem zuvor genannten HOT FIREPol® EvaGreen qPCR Mix Plus und Nuklease-freiem Wasser.

Durch das Aufbringen einer adhäsiven Folie (MicroAmp™ Optical Adhesive Film (Applied Biosystems®)) wurden die Platten versiegelt, anschließend für 1 min bei 15.000 rpm zentrifugiert und in das QuantStudio™ 7 Flex Real Time PCR Gerät (Applied Biosystems®) eingebracht. Das nachfolgend beschriebene Programm wurde für die qPCR-Läufe mit je 40 Zyklen verwendet:

- Hold-Stage: 95 °C, 10 min (Anstieg 1,6 °C/sec)
- PCR-Stage: 95 °C, 15 sec (Anstieg 1,6 °C/sec)
59 °C, 30 sec (Anstieg 1,6 °C/sec)
72 °C, 45 sec (Anstieg 1,6 °C/sec)
- Melt Curve-Stage: 95 °C, 15 sec (Anstieg 1,6 °C/sec)
49 °C, 1 min (Anstieg 1,6 °C/sec)
95 °C, 15 sec (Anstieg 0,05 °C/sec)

Der eingesetzte EvaGreen-Farbstoff reagiert allerdings nicht nur mit der Zielsequenz. Die Interaktionen mit Primer-Dimeren oder PCR-Nebenprodukten können die Spezifität des PCR-Produkts beeinträchtigen. Deshalb war eine Überprüfung dieser durch eine Schmelzkurvenana-

lyse im Anschluss an die PCR nötig. Die qPCR-Aufzeichnung und Auswertung erfolgte mithilfe der QuantStudio Design & Analysis Software. Zur Bestimmung der relativen Genexpression wurde die komparative CT-Methode eingesetzt, auch Delta-Delta-CT-Methode genannt. Als humanes Referenzgen wurde GAPDH herangezogen.

2.3.4 Die biochemische Analyse von Proteinen mittels Western Blot

2.3.4.1 Herstellung von Proteinextrakten

Für die Herstellung von Zellextrakten wurden die Brustkrebszelllinien in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und in DMEM plus 10 % FKS und 1 % Anti-Anti inkubiert. Folgende Zellzahlen wurden für diese Versuche eingesetzt: Es wurden jeweils 170.000 Zellen pro Well der Brustkrebszelllinien MCF7, T47D und HCC38 verwendet. Da die MDA-MB231 Zellen unter denselben Bedingungen und bei Inkubation in demselben Medium eine stärkere Teilungsrate aufwiesen, wurde die Zellzahl für diese Zelllinie auf 100.000 Zellen pro Well reduziert.

Nach 48 h wurde das verbrauchte Zellkulturmedium abgesaugt und die einzelnen Wells vorsichtig mit jeweils 2 ml DPBS gespült. Anschließend wurden jeweils 2 ml ACM oder SFM zugegeben. Die SFM-Behandlung erfolgte an den Kontrollzellen. Die Medien wurden nach 24 h abgesaugt und mögliche Rückstände durch Waschen mit jeweils 2 ml DPBS entfernt. Schließlich wurden die Zellen in jeweils 200 µl eiskaltem RIPA-Puffer lysiert und mit einem Zellschaaber gelöst.

Alle nachfolgenden Schritte wurden unter Kühlung auf Eis durchgeführt, die Zelllysate wurden in vorgekühlte 1,5 ml-Eppendorf-Tubes pipettiert und für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden anschließend in neue, gekühlte Tubes überführt und das Pellet verworfen. Anschließend wurden die Proteine bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Es wurde eine Standardkurve aus unterschiedlichen Verdünnungen einer BSA-Stocklösung (Bovine Serum Albumine) mit Ausgangskonzentrationen von 2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1,0 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,50 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml und 0 mg/ml BSA hergestellt. Die Proteinkonzentrationsmessung wurde mithilfe eines BCA-Protein-Assay-Kits (Biorad) vorgenommen,

wobei eine Doppelbestimmung angewendet wurde. Dieser Art der Ermittlung des Proteingehalts lag folgende Reaktion zugrunde: Cu^{2+} -Ionen wurden durch Proteine im alkalischen Milieu zu Cu^{1+} -Ionen reduziert. Cu^{1+} bildete mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Komplex, der kolorimetrisch nachgewiesen werden konnte. Es wurden zur Herstellung der BCA-Lösung die Arbeitslösungen des RC DCTM Protein Assay Kits (Biorad) nach Angaben des Herstellers verwendet.

In eine 96-Well-Platte wurden zunächst je 5 µl der Standard- bzw. Proteinproben pipettiert, bevor in jedes Well 25 µl der Arbeitslösung A+ und anschließend 200 µl der Arbeitslösung B hinzugegeben wurden. Die Platte wurde in das vorbereitete Mikroplatten-Messgerät (CLARIOstar Plus, bmg Labtech) eingebracht. Nach einer 15-minütigen Inkubation abgedeckt bei Raumtemperatur konnte die photometrische Messung der Absorption bei 750 nm und die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgen.

2.3.4.3 SDS-Gelelektrophorese

Mithilfe der Gelelektrophorese wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Durch die Zugabe von SDS (Natriumdodecylsulfat) und der daraus resultierenden negativen Gesamtladung aller Proteine flossen diese zur Anode. Die größeren Moleküle bewegten sich langsamer und wurden im oberen Teil des Gels zurückgehalten, während kleinere Proteine schneller in den unteren Gelabschnitt wanderten.

Es wurde jeweils die maximal mögliche Menge an Protein (20-40 µg) bei einem schlussendlichen Probenvolumen von 40 µl pro Tasche eingesetzt. Nachdem die lysierten Proteine mit Lichrosolv[®] Reinstwasser und je 10 µl NuPage[®] LDS Sample Buffer (4X) und 4 µl des NuPage[®] Sampel Reducing Agent (10X) (Invitrogen) versetzt worden waren, wurden die Eiweißproben bei 80 °C für 3 min im Thermoblock denaturiert.

Das NovexTM WedgeWellTM 4-12 % Tris-Glycine Gel (1.0 mm X 10 well; Invitrogen) wurde mit jeweils 40 µl Probenvolumen beladen. Das zugegebene NuPage[®] Antioxidans stabilisierte den reduzierten Zustand der Proteine und verhinderte, dass empfindliche Aminosäuren reoxidierten. Die Elektrophorese lief in der dafür vorgesehenen, mit Laufpuffer (10X) gefüllten Kammer (XCell Sure LockTM Mini-Cell; Invitrogen) 70 min bei 225 V und 22 A.

2.3.4.4 Proteintransfer, -visualisierung und -detektion

Danach wurde das Sammelgel gemeinsam mit einer in Methanol aktivierten PVDF-Membran (Immobilon[®] Transfer Membrane; Sigma-Aldrich) in die Blotkammer eingebracht. Es erfolgte der Transfer der Proteinbanden auf die Membran entsprechend ihrer Lage auf dem Gel. Zusammen mit Filterpapieren und Schwämmen, die zuvor mit Transferpuffer getränkt worden waren, schichtete man sie unter Vermeidung von Luftblasen in die Blotkammer. Der zweistündige Proteintransferprozess fand bei einer Stromstärke von 200 mA statt.

Der Transfer wurde durch eine Ponceau S-Färbung überprüft. Nach der Inkubation der Membran für eine Minute in der Färbelösung wurde diese mithilfe von ddH₂O wieder entfärbt. Lediglich die vorhandenen Proteinbanden erschienen weiterhin rot.

Die Membranen wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer fünfprozentigen BSA-Lösung (5 g BSA auf 100 ml Waschpuffer TBS-T) blockiert, bevor die jeweiligen Primärantikörperverdünnungen hinzugegeben wurden. Der vorgeschaltete Blockierungsvorgang diente der Besetzung unspezifischer Bindungsstellen. Die Antikörperinkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler. Weitere Informationen zu den verwendeten Primärantikörpern sind Kapitel 2.2.5.1 Antikörper (Materialien) zu entnehmen.

Am darauffolgenden Tag wurde die Membran mit dem Waschpuffer TBS-T dreimal für 10min gewaschen und mit den entsprechenden Sekundärantikörpern donkey anti-rabbit IgG oder horse anti-mouse IgG, die in derselben Blockierlösung wie zuvor die Primärantikörpern verdünnt wurden, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der zehnminütige Waschvorgang fand danach drei weitere Male analog statt. Anschließend wurden die Banden durch Zugabe des entsprechenden Entwicklungsreagenz sichtbar gemacht und mithilfe des ChemiDoc[™] MP Imaging System (Biorad) festgehalten. Je nach erwarteter Intensität der Proteinbanden wurden die Membranabschnitte mit Immobilon[®] Classico Western HRP Substrates (Millipore[®]) oder Immobilon[®] Crescendo Western HRP Substrates (Millipore[®]) versehen. Die Darstellung schwach hervortretender Banden ließ sich mithilfe des SuperSignal[™] West Femto Maximum Sensitivity Substrates (Thermo Fisher Scientific) verbessern.

2.3.5 AdipoRed-Assay

2.3.5.1 Fixierung der Zellen

Die vier Zelllinien wurden für diese Versuchsreihe auf 12-Well-Platten ausgesät. Nach 48 h erfolgte der Mediumwechsel von DMEM zu ACM bzw. SFM, wie oben beschrieben. Weitere 24 h später wurden die Brustkrebszellen – nach einem vorangegangenen Waschschrift mit PBS(+) – mit 500 µl einer vierprozentigen Paraformaldehydlösung fixiert. Hierzu inkubierten die Platten 10 min bei Raumtemperatur, bevor die Fixierlösung erneut mit PBS(+) abgewaschen wurde.

2.3.5.2 AdipoRed-Färbung

Mithilfe des für die Färbung verwendeten AdipoRedTM Assay Reagenz (Lonza) ließ sich die intrazelluläre Lipidakkumulation quantifizieren. Aufgrund der Lipophilie konnte der Farbstoff in die Fetttröpfchen diffundieren, die nachfolgend bei 572 nm fluoreszierten.

Für diesen Versuchsansatz wurden 720 µl des AdipoRedTM Assay Reagenz zu 12 ml PBS(+) gegeben und hiervon je 1 ml in jedes Well pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 bis 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden zwei Waschschriffe durchgeführt – zuerst mit PBS(+), im Anschluss mit PBS(-).

Die Fluoreszenzmessung bei ex 485 nm / 572 nm erfolgte an 20 x 20 Punkten pro Well in dem Photometer Mikroplatten-Messgerät (CLARIOstar Plus, bmg Labtech). Um die gemessenen Fluoreszenzintensitäten untereinander vergleichen zu können, wurden die Proteine im Anschluss mittels Cell Lysis Buffer geerntet und deren Konzentration ebenfalls bestimmt. Der verwendete Puffer setzte sich zusammen aus 0,1 % SDS und 0,1 M NaOH.

Die Auswertung und die Feststellung einer statistischen Signifikanz der Differenz der einzelnen Quotienten $\frac{\text{Fluoreszenzintensität (FI)}}{\text{Proteinkonzentration (µg/µl)}}$ erfolgte mit Graph Pad Prism. Die angewandten statistischen Tests sind Kapitel 2.3.7 Statistik zu entnehmen.

2.3.6 Lipidomics

2.3.6.1 Gewinnung von Proteinextrakten

Für diese Versuchsreihe wurden die MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 Zellen ebenfalls auf 6-Well-Platten mit je 2 ml DMEM-Nährlösung ausgesät. Die Lösung wurde nach 48 h durch 2 ml ACM bzw. SFM ersetzt und die Zellkulturplatten für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden die Proteine mithilfe von 500 µl SDS (0,2 %) pro Well geerntet. Nachdem SFM bzw. ACM vorsichtig mit einer Pipette entfernt worden war, wurden die einzelnen Wells mit jeweils 2 ml DPBS gewaschen und anschließend mit 500 µl SDS (0,2 %) versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit auf einem Rüttler wurden die entstandenen Zelllysate mithilfe eines Zellschabers gelöst und in ein vorgekühltes 1,5 ml-Eppendorf-Tube überführt. Weitere 500 µl steriles Wasser wurden in die Wells pipettiert. Die möglicherweise vorhandenen Rückstände an Zellextrakten wurden mittels Zellschaber erneut gesammelt und in dasselbe Eppendorf-Tube gegeben, in welchem sich die zuvor gewonnenen Zelllysate bereits befanden. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration bestimmt, wie es bereits zuvor in Kapitel 2.3.5.2 erläutert wurde.

2.3.6.2 Massenspektrometrische Untersuchung

Die folgenden Experimente zur qualitativen und quantitativen Analyse der Lipidzusammensetzung in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um PD Dr. Gerhard Liebisch und Dr. Marcus Höring (Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universitätsklinikum Regensburg) durchgeführt. Für die quantitative Lipidomanalytik wurden vor der Lipidextraktion interne Standards hinzugefügt. Zur Lipidgewinnung wurden jeweils 100 µg Protein gemäß dem Protokoll von Bligh und Dyer eingesetzt (BLIGH und DYER 1959).

Im Anschluss wurden die Lipide mithilfe der direkten Fließinjektionsanalyse (FIA) mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (FIA-MS/MS) und einem hochauflösenden Hybrid-Quadrupol-Orbita-Massenspektrometer (FIA-FTMS) untersucht. Für die Durchführung der FIA-MS/MS wurde der Positiv-Ionen-Modus gewählt unter Verwendung des zuvor beschriebenen analytischen Aufbaus (Liebisch et al. 2004; Liebisch et al. 2006). Die einzelnen Lip-

idklassen wurden unter Zuhilfenahme verschiedener Fragment-Ionen mit jeweils unterschiedlichen Masse-Ladungsverhältnissen analysiert (Liebisch et al. 1999; Liebisch et al. 2002; Matyash et al. 2008).

Die Analyse der Glycerophospholipidarten erfolgte basierend auf der Annahme, dass lediglich geradzahlige Kohlenstoffketten berücksichtigt werden. Die FIA-FTMS-Methode wurde in einer Veröffentlichung von Höring et al. kürzlich detailliert beschrieben (Höring et al. 2020; Höring et al. 2021). Die Aufzeichnung der Triglyceride (TG), Diglyceride (DG) und Cholesterinester (CE) wurde im Positiv-Ionen-Modus als $[M+NH_4]^+$ mit einer Zielauflösung von 140.000 (bei 200 m/z) durchgeführt. Eine speziesspezifische Reaktion der CE erforderte eine Korrektur derselben (Höring et al. 2019). Im negativen Ionen-Modus als $[M+NH_4]^-$ wurden Phosphatidylcholine (PC) und Sphingomyeline (SM) unter Verwendung identischer Auflösungseinstellungen analysiert. Das freie Cholesterin (FC) und der entsprechende interne Standard (FC[D7]) wurde mithilfe der Multiplex-Akquisition (MSX) bestimmt (Höring et al. 2019).

2.3.7 Statistik

Für die statistische Analyse der gewonnenen Daten wurde Graph Pad Prism verwendet. Zur Testung der statistischen Signifikanz zwischen zwei Gruppen wurde ein T-Test durchgeführt. Mithilfe eines One Way ANOVA erfolgte der Vergleich mehrerer Gruppen untereinander. Nachfolgend wurde hier jeweils ein Tukey-Test als Post-hoc-Test angewandt. Das Signifikanzniveau wurde bei einem Wert von $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Einlagerung von Lipiden in den Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231

Mithilfe eines fluoreszenzbasierten Verfahrens (AdipoRed-Assay) wurde die intrazelluläre Akkumulation von Neutrallipiden in den beiden ER⁺ Brustkrebszelllinien MCF7 und T47D sowie in den beiden TNBC HCC38 und MDA-MB231 quantifiziert. Die quantitative Bestimmung der intrazellulären Konzentration von Neutrallipiden erfolgte nach der Inkubation der Zellen in einem Kontrollmedium (SFM), sowie in Anwesenheit von ACM.

Die vier Zelllinien wiesen nach der Inkubation in SFM signifikant unterschiedliche Konzentrationen an Neutrallipiden auf (Abbildung 3A). Nach der Inkubation in SFM waren die Lipidkonzentrationen in den ER⁺ Zelllinien höher als in den TNBC. Die höchste Lipidkonzentration wurde in T47D Zellen nachgewiesen (Abbildung 3A, Tabelle 2). In Anwesenheit von ACM zeigte sich in allen vier Zelllinien eine deutliche Akkumulation von Neutrallipiden. Die relative Zunahme der Neutrallipide war für alle vier Zelllinien statistisch signifikant (Abbildung 3B, Tabelle 2). Die höchsten Konzentrationen in Anwesenheit von ACM, sowie die höchste relative Zunahme der Lipidkonzentration (3,8-fach) konnte in T47D Zellen nachgewiesen werden (Tabelle 2). Der Konzentrationsanstieg der drei anderen untersuchten Brustkrebszelllinien bewegte sich zwischen 2,4 bis 3,2-fach.

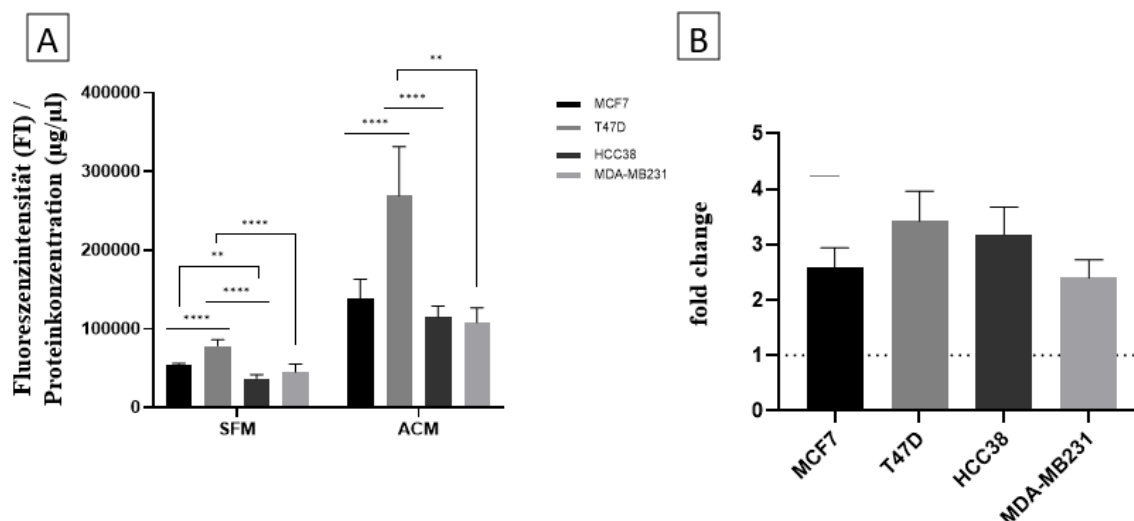


Abbildung 3: Bestimmung der intrazellulären Konzentration von Neutrallipiden mittels AdipoRed-Assay. (A) Die Abbildung zeigt die Fluoreszenzintensität (FI) normalisiert auf die zelluläre Proteinkonzentration (µg/µl) der Zelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 Zellen nach der Inkubation im Kontrollmedium SFM bzw. dem mit ACM angereicherten Medium. (B) Relative Zunahme (fold change) der Fluoreszenzintensität nach Inkubation in ACM versus SFM.

	SFM	ACM	Fold Change	P-Wert
MCF7	53.032	137.575	2,6	<0,001
T47D	78.152	268.966	3,8	<0,001
HCC38	36.513	114.875	3,2	<0,001
MDA-MB231	46.001	107.774	2,4	<0,001

Tabelle 2: Vergleich der intrazellulären Neutrallipid-Konzentrationen in SFM und nach Zugabe von ACM (AdipoRed Assay). In der Tabelle sind die Fluoreszenzintensitäten (FI) der vier Brustkrebszelllinien normalisiert auf die zellulären Proteinkonzentrationen (µg/µl) nach der Inkubation in SFM bzw. ACM aufgeführt. Der Fold Change beschreibt die relative Zunahme der intrazellulären Neutrallipidkonzentration. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

3.2 Lipidomics

Für eine detaillierte Betrachtung der zellulären Lipidkomposition wurden quantitative massenspektrometrische Analysen des zellulären Lipidoms der vier Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 durchgeführt.

3.2.1 Betrachtung der Haupt-Lipidklassen

Zunächst erfolgte eine Analyse der Hauptklassen der Lipide (Abbildung 4 und 5). Ein Vergleich der Lipidklassen zwischen den vier Zelllinien einerseits nach der Inkubation in SFM andererseits in Anwesenheit von ACM ist in Abbildung 4 („line scatter“ Diagramm) dargestellt. Die Verteilung der Hauptlipidklassen innerhalb einer Zelllinie ist in Abbildung 5 dargestellt.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des AdipoRed-Assays zur Quantifizierung der Neutrallipide zeigte sich in Anwesenheit von ACM in allen Zelllinien eine deutliche Zunahme der intrazellulären Triglycerid-Konzentration (Abbildung 4 und 5). Die höchsten Triglycerid-Konzentrationen sowohl nach der Inkubation in SFM als auch in Anwesenheit von ACM wurden in den T47D Zellen nachgewiesen. Auch für die ebenfalls zu den Speicherlipiden gehörenden Diglyceride zeigte sich nach der Inkubation in SFM ein ähnliches Muster: In den T47D Zellen wurden die höchsten DG-Konzentrationen nachgewiesen. Diese sank allerdings in Anwesenheit von ACM, während in den TNBC Zelllinien die Anwesenheit von ACM einen DG-Konzentrationsanstieg bewirkte (Abbildung 4 und 5).

Die Analyse der Sterole (Cholesterinester (CE) und Freies Cholesterin (FC)) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den ER+ und TNBC Zellen (Abbildung 4 und 5). Die Anwesenheit von ACM führte tendenziell zu geringeren Konzentrationen an freiem Cholesterin.

Zu den Membranlipiden gehören die Klassen der Sphingo- und der Glycerophospholipide. Den Sphingolipiden werden die Ceramide (Cer), Hexosylceramide (HexCer) und Sphingomyeline (SM) zugeordnet. Für die zelluläre Cer-Konzentration konnten wir Unterschiede zwischen den ER+ und TNBC Zelllinien feststellen. Bereits nach der Inkubation im Kontrollmedium SFM waren die Cer-Konzentrationen in den TNBC höher als in ER+ Zelllinien. Die Anwesenheit von ACM führte zu einem weiteren Anstieg in den TNBC Zelllinien HCC38 und MDA-MB231 um den Faktor 1,2 bzw. 1,4, wohingegen die Cer-Konzentrationen in den ER+ Zellen unverändert blieb. Auch die SM-Konzentrationen waren in den TNBC Zellen höher (Abbildung 4 und 5).

Die Glycerophospholipide Lysophosphatidylcholin (LPC) und Lysophosphatidylethanolamin (LPE) wiesen in den TNBC höhere Konzentrationen auf als in den ER+ Zellen. Die Anwesenheit von ACM hatte keinen signifikanten Einfluss auf die LPC- und LPE-Konzentrationen in

allen vier untersuchten Brustkrebszelllinien. Ein vergleichbares Muster, mit höheren Konzentrationen in den TNBC Zelllinien HCC38 und MDA-MB231, zeigte sich auch für die Phosphatidsäure (PA), Phosphatidylserin (PS) und die Phosphatidylethanolamin basierten Plasmalogen (PE P). Zudem führte die Anwesenheit von ACM in beiden TNBC Zelllinien zu einem Konzentrationsanstieg der PE P um den Faktor 1,3. Die höchsten Lipidkonzentrationen wurden in allen vier untersuchten Brustkrebszelllinien für die Phosphatidylcholine (PC) nachgewiesen (Abbildung 4 und 5). In den ER⁺ Brustkrebszelllinien wurden sowohl nach der Inkubation im Kontrollmedium SFM als auch in Anwesenheit von ACM vergleichbare Konzentrationen beobachtet. In den TNBC Zelllinien stieg die PC-Konzentration in Anwesenheit von ACM um 25 bis 30 % an (Abbildung 4 und 5).

Die Phosphatidylethanolamine (PE) zeigten als einzige der untersuchten Lipidklassen in den ER⁺ höhere Konzentrationen als in den TNBC Zellen. Der PE-Konzentrationsanstieg in Anwesenheit von ACM war dahingegen in keiner Zelllinie statistisch signifikant (Abbildung 4 und 5).

Keine konsistenten Unterschiede zwischen den ER⁺ und TNBC Zelllinien zeigten sich für Cardiolipin (CL), Phosphatidylcholinether (PC O), Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylinositol (PI). Außerdem wurden für diese Lipidklassen keine Konzentrationsänderungen in Anwesenheit von ACM im Vergleich zur Kontrollgruppe nach der Inkubation in SFM beobachtet (Abbildung 4 und 5). Detaillierte Betrachtungen der Speicher- und Membranlipide werden im Folgenden dargestellt.

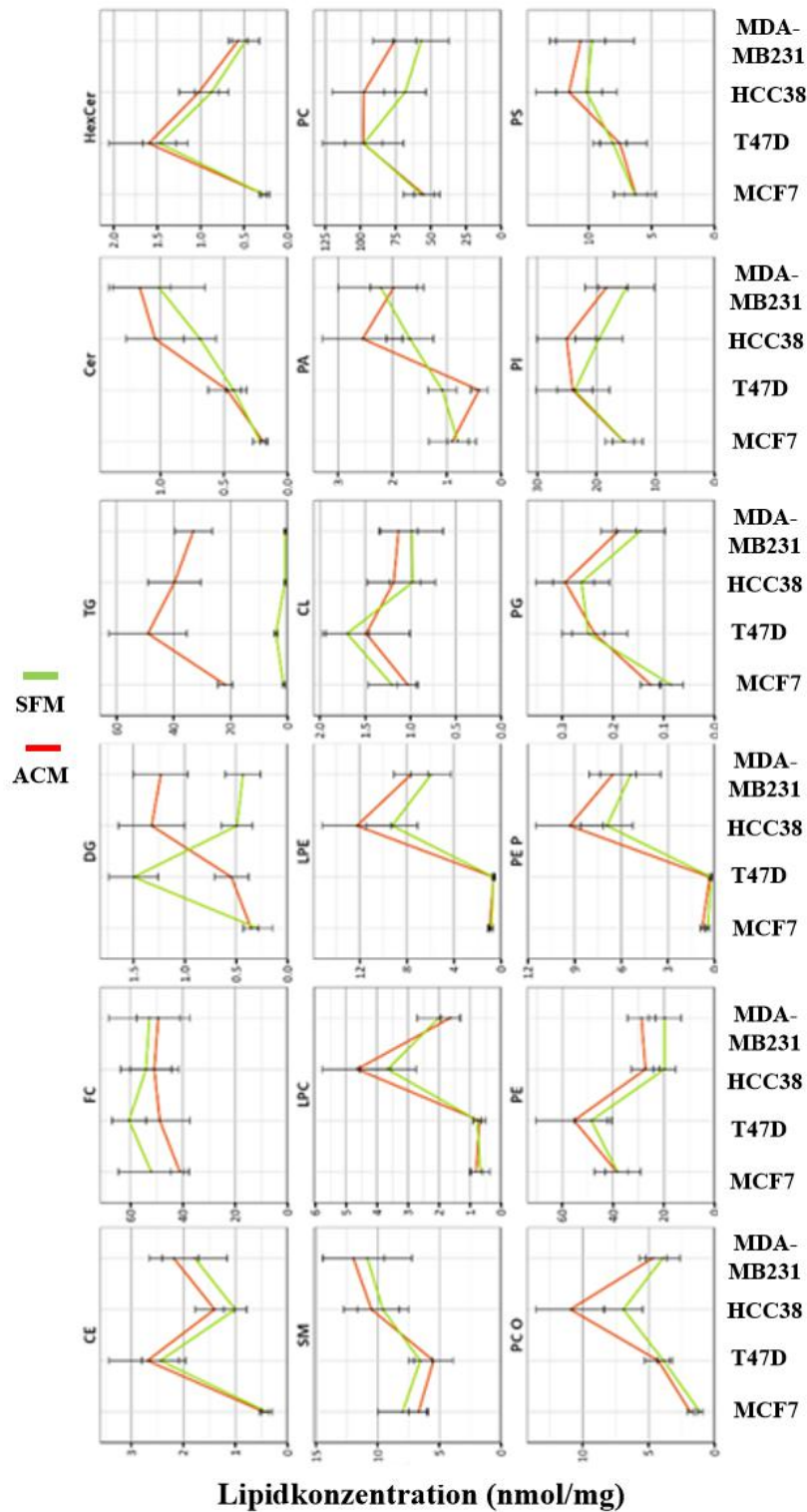
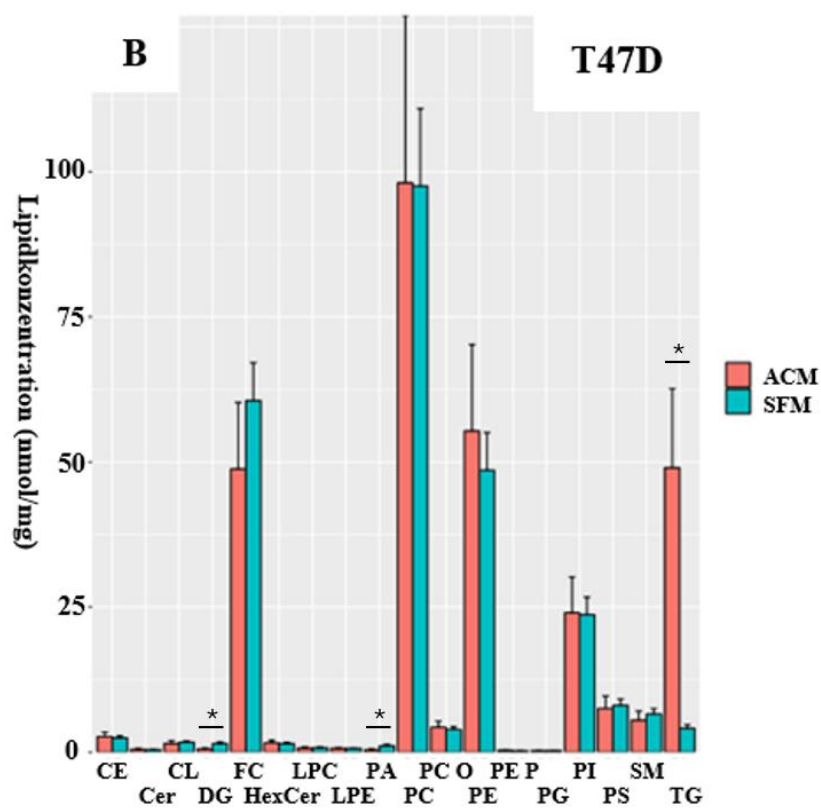
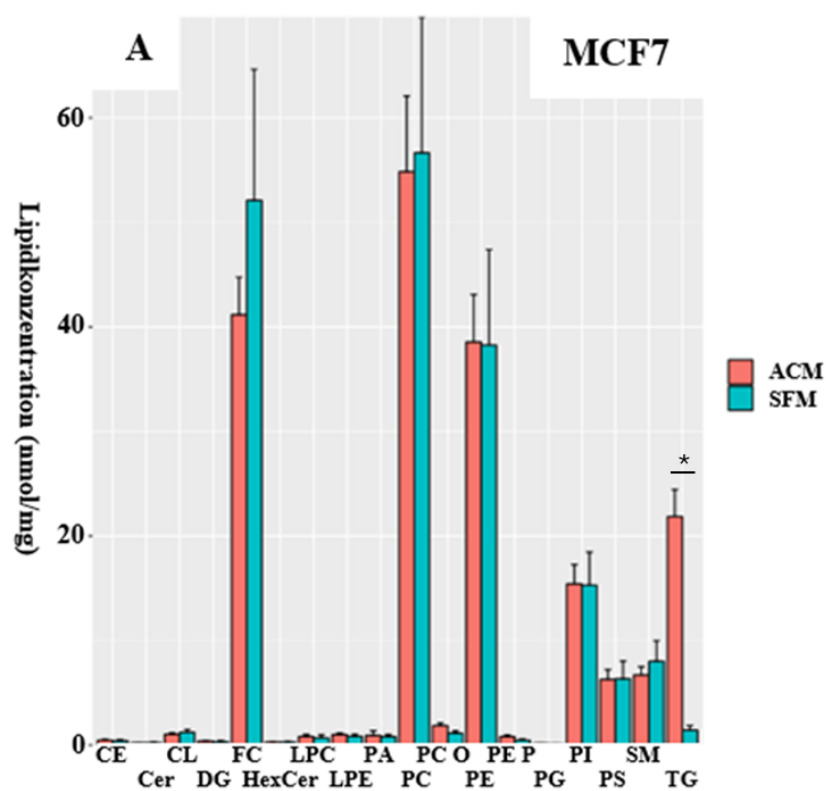


Abbildung 4: Vergleich der Konzentrationen der Hauptlipidklassen in ER+ und TNBC Zelllinien. Dargestellt sind die Konzentrationen der Sterol- (CE, FC), Speicher- (DG, TG) und Membranlipide (Cer, HexCer, SM, LPC, LPE, CL, PA, PC, PC O, PE, PE P, PI, PS) für die Zelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 nach der Inkubation im Kontrollmedium SFM (grün) bzw. ACM (rot). Man beachte die unterschiedliche Skalierung der y-Achsen (Lipidkonzentration in nmol/mg Zellprotein).



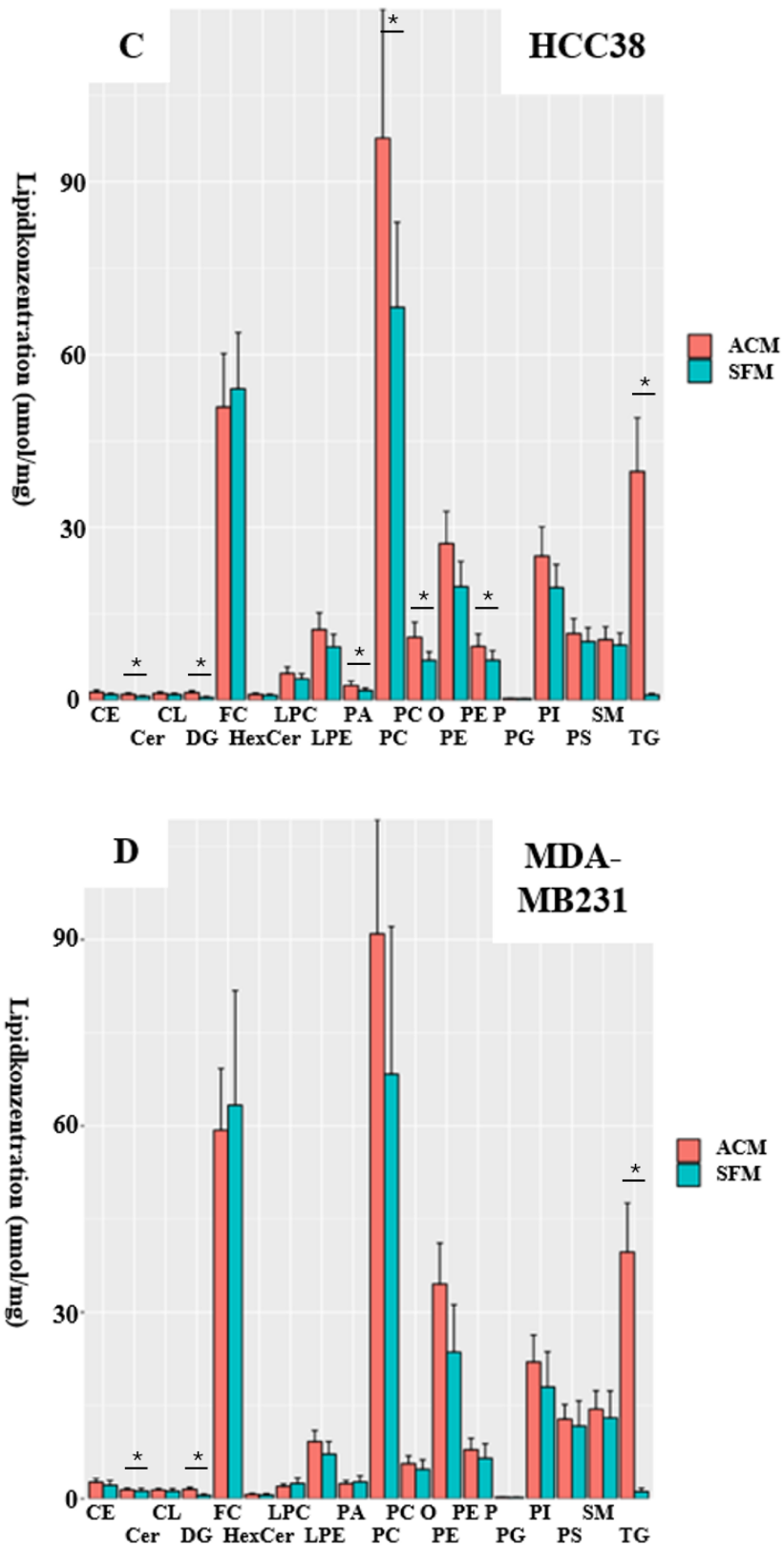


Abbildung 5: Vergleich der Konzentrationen der Hauptlipidklassen in den Brustkrebszelllinien MCF7 (A), T47D (B), HCC38 (C) und MDA-MB231 (D). Die Abbildung zeigt die Lipidkonzentrationen (nmol/mg Protein) in den vier Brustkrebszelllinien nach der Inkubation in SFM (grün) bzw. in Anwesenheit von ACM (rot). Statistisch signifikante Änderung in Anwesenheit von ACM im Vergleich zur Inkubation in SFM sind gekennzeichnet (* entspricht $p < 0,05$). Die y-Achsen weisen zur besseren Darstellungsmöglichkeit unterschiedliche Skalierungen auf.

3.2.1.1 Speicherlipide

	Triglyceride				Diglyceride			
	SFM	ACM	Fold Change	P- Wert	SFM	ACM	Fold Change	P-Wert
MCF7	1,4	21,8	15,4	<0,0001	0,3	0,4	1,2	0,7015
T47D	4,1	49,0	12,0	<0,0001	1,5	0,5	0,4	<0,0001
HCC38	0,9	39,7	42,9	<0,0001	0,5	1,3	2,7	<0,0001
MDA-MB231	0,9	33,1	35,9	<0,0001	0,8	0,9	1,1	0,7314

Tabelle 3: Konzentration der Speicherlipide (nmol/mg Protein) in den ER+ und triple negativen Zellen in Abhängigkeit vom Medium (SFM, ACM). Die Tabelle zeigt die Konzentrationen der Triglyceride und Diglyceride in den vier Zelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 nach der Inkubation in SFM und in Anwesenheit von ACM. Der Fold Change ist aufgrund der Übersicht über Konzentrationszu- und -abnahme in den Zelllinien mit aufgeführt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Bereits die zuvor erläuterten Untersuchungen im Rahmen des AdipoRed-Assays zeigten Unterschiede in der Akkumulation von Neutrallipiden zwischen den vier Brustkrebszelllinien. Bei den nachgewiesenen Neutrallipiden handelte es sich vor allem um intrazelluläre Triglyceride (TG). Für diese Lipidklasse wurden die stärksten Konzentrationsunterschiede nachgewiesen (Tabelle 3). Nach der Inkubation in SFM zeigten die TNBC Zelllinien HCC38 und MDA-MB231 tendenziell geringere TG-Konzentrationen als die ER+ Zellen. Die Anwesenheit von ACM führte in den ER+ Zellen zu einem 12,0 bzw. 15,4-fachen Anstieg der TG-Konzentration. In den TNBC Zellen war die Konzentrationszunahme vergleichsweise stärker ausgeprägt (HCC-38: 42,9-fach; MDA-MB231: 35,9-fach). Der Konzentrationsanstieg in Anwesenheit von ACM war in den TNBC HCC38 statistisch signifikant verschieden zu demjenigen in den ER+ MCF7 Zellen ($p=0,001$). Ein signifikanter Unterschied der Konzentrationszunahme zeigte sich ebenso zwischen den MDA-MB231 und ER+ Zellen (MCF7: $p = 0,02$; T47D: $p = 0,0005$).

Die DG-Konzentrationsänderung unterschied sich zwischen den ER+ und TNBC Zelllinien nicht (Tabelle 3). Interessanterweise wiesen die T47D Zellen nach der Inkubation in SFM die höchste DG-Konzentration auf – ähnliches wurde für die TG-Konzentration nach der SFM-Inkubation beobachtet. Jene sank in Anwesenheit von ACM um den Faktor 3. Während in der TNBC Zelllinie HCC38 die Anwesenheit von ACM einen statistisch signifikanten 2,7-fachen DG-Konzentrationsanstieg bedingte, waren die Konzentrationsänderungen in den ER+ MCF7 und TNBC MDA-MB231 Zellen jedoch tendenziell vergleichbar und nicht statistisch signifikant (Tabelle 3).

3.2.1.2 Membranlipide

	PC O				PA			
	SFM	ACM	Fold Change	P-Wert	SFM	ACM	Fold Change	P-Wert
MCF7	1,1	1,8	1,7	0,3298	15,3	15,4	1,0	0,7207
T47D	3,9	4,3	1,1	0,5925	23,7	24,0	1,0	0,0201
HCC38	6,9	10,9	1,6	< 0,0001	19,5	25,0	1,3	0,0034
MDA-MB231	3,9	4,7	1,2	0,2769	15,2	18,1	1,2	0,6594

Tabelle 4: Konzentration der Membranlipide (nmol/mg Protein) in den ER+ und TNBC Zellen in Abhängigkeit vom Medium (SFM, ACM). Aufgeführt sind die Konzentrationen der Phosphatidylcholinether (PC O) und Phosphatidylsäure (PA) in den MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 Zellen nach Inkubation im Kontrollmedium SFM und in Anwesenheit von ACM. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Auch die Konzentrationen der Membranlipide unterschieden sich in den untersuchten ER+ und TNBC Brustkrebszelllinien im Vergleich nach der Inkubation in SFM und in Anwesenheit von ACM. Die geringsten Konzentrationen des Glycerophospholipids PC O wurden in den ER+ MCF7 Zellen beobachtet (Tabelle 4). Die TNBC HCC38 Zellen zeigten die höchsten PC O-Konzentrationen und eine statistisch signifikante Zunahme (1,6-facher Anstieg) in Anwesenheit von ACM. Die Lipidkonzentrationen in den T47D und MDA-MB231 Zellen blieben auch in Anwesenheit von ACM vergleichsweise konstant. Somit zeigten lediglich die TNBC Zelllinie HCC38 einen statistisch signifikanten Unterschied in Anwesenheit von ACM im Vergleich zur Inkubation der Zellen in SFM (Tabelle 4). Auch wurden statistisch signifikante Unterschiede der PC O-Konzentration in Abhängigkeit des Hormonrezeptorstatus nachgewiesen. So waren die PC O-Konzentrationen nach der Inkubation in SFM in den TNBC HCC38 und ER+ MCF7 ($p < 0,0001$) bzw. T47D Zellen ($p = 0,001$) signifikant verschieden. Auch in Anwesenheit von ACM wurden signifikant unterschiedliche PC O-Konzentrationen beobachtet (HCC38-MCF7: $p < 0,0001$; HCC38-T47D: $p < 0,0001$). Die PC O-Konzentration in den MDA-MB231 Zellen unterschied sich statistisch signifikant zu derjenigen in den MCF7 Zellen – sowohl nach der Inkubation in SFM ($p = 0,0028$) als auch in Anwesenheit von ACM ($p = 0,002$).

Die PA-Konzentration waren nach der Inkubation in SFM in den ER+ T47D Zellen am höchsten (Tabelle 4). Während die PA-Konzentrationen in den ER+ Zelllinien in Anwesenheit von ACM weitestgehend konstant blieben, wiesen die TNBC HCC38 Zellen in Anwesenheit von ACM einen signifikanten 1,3-fachen Anstieg der PA-Konzentration auf ($p = 0,0034$) (Tabelle

4). Auch die MDA-MB231 Zellen zeigten in Anwesenheit von ACM tendenziell höhere PA-Konzentrationen. Die PA-Konzentrationen waren sowohl nach der Inkubation in SFM als auch in Anwesenheit von ACM unterschiedlich in den ER+ MCF7 (SFM: $p = 0,0004$, ACM: $p = 0,0003$) bzw. T47D (SFM: $p = 0,0080$, ACM: $p < 0,0001$) zu denjenigen in der TNBC Zelllinie MDA-MB231. Statistisch signifikant verschieden waren auch die PA-Konzentrationen in den HCC38 in Anwesenheit von ACM im Vergleich zu den ER+ Zellen (MCF7: $p < 0,0001$, T47D: $p = 0,0154$).

	PE P				Cer			
	SFM	ACM	Fold Change	P-Wert	SFM	ACM	Fold Change	P-Wert
MCF7	0,4	0,8	1,8	0,6396	0,2	0,2	0,9	0,8396
T47D	0,2	0,3	1,5	0,8907	0,4	0,5	1,1	0,6332
HCC38	6,9	9,3	1,3	0,0027	0,7	1,0	1,4	0,0013
MDA-MB231	5,4	6,6	1,2	0,1039	1,0	1,2	1,2	0,0099

Tabelle 5: Konzentration der Membranlipide (nmol/mg Protein) in den ER+ und TNBC Zellen in Abhängigkeit vom Medium (SFM, ACM). Aufgeführt sind die Konzentrationen der Phosphatidylethanolamin-basierten Plasmalogen (PE P) und der Ceramide (Cer) in den MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 Zellen nach Inkubation im Kontrollmedium SFM und in Anwesenheit von ACM. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Interessanterweise zeigten sich bereits nach der Inkubation in SFM deutlich (13 bis 34-fach) höhere PE P-Konzentrationen in den TNBC als in den ER+ Zellen (Tabelle 5). Die PE P-Konzentrationen stiegen in Anwesenheit von ACM in allen vier Zelllinien an, wobei lediglich die 1,3-fache Konzentrationszunahme der HCC38 Zellen statistische Signifikanz aufwies ($p = 0,0027$). Auch in Anwesenheit von ACM zeigten sich die Unterschiede in Abhängigkeit des Hormonrezeptorstatus: So waren die PE P-Konzentrationen in Anwesenheit von ACM in den TNBC ebenso signifikant höher als in den ER+ Zellen (je $p < 0,0001$).

Auch zeigten die TNBC Zellen einen statistisch signifikanten Konzentrationsanstieg der zu den Sphingolipiden zählenden Ceramide (Cer) in Anwesenheit von ACM (HCC38: 1,4-fach, $p = 0,0013$; MDA-MB231: 1,2-fach, $p = 0,0099$). Dies konnte für die ER+ Zellen nicht beobachtet werden (Tabelle 5). Auch waren die Cer-Konzentrationen in den TNBC Zellen sowohl nach der Inkubation in SFM als auch in Anwesenheit von ACM signifikant höher als in den ER+

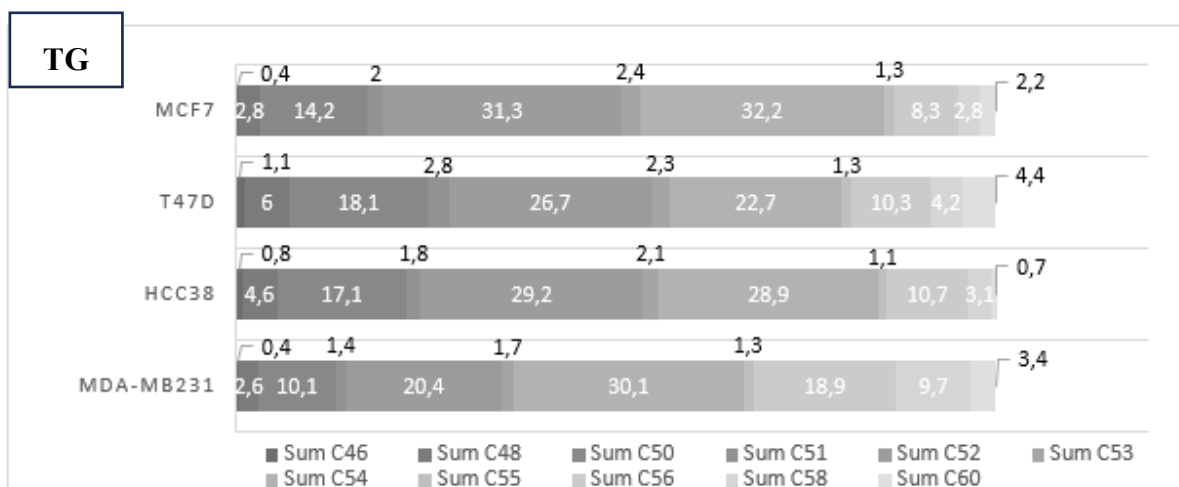
Zellen (MDA-MB231: SFM: MCF7: $p < 0,0001$; T47D: $p = 0,0013$; ACM je $p < 0,0001$) (HCC38 je $p < 0,0001$).

3.2.2 Betrachtung der Lipidspezies

Im Anschluss wurde eine detaillierte Analyse der zuvor genannten Lipidklassen hinsichtlich der zugrundeliegenden Lipid-Spezies, der durchschnittlichen Kettenlänge und des Sättigungsgrads durchgeführt. Die nachfolgenden Angaben der prozentualen Anteile beziehen sich auf Untersuchungen der vier Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 nach der Inkubation in konditioniertem Medium (mit ACM).

3.2.2.1 Speicherlipide

Auch hier wurden zunächst die Speicherlipide DG und TG betrachtet und untersucht, ob sich deren Komposition bezüglich der Kettenlänge und des Sättigungsgrades abhängig vom Hormonrezeptorstatus unterschied.



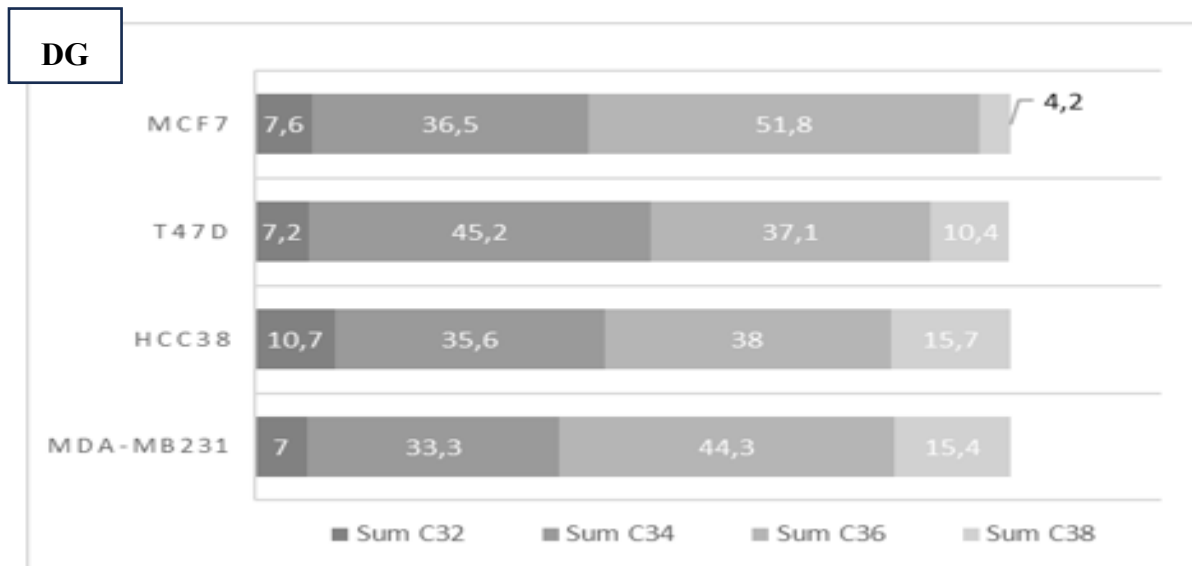


Abbildung 6: Prozentuale Anteile der Speicherlipidkettenlängen. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der unterschiedlichen Kettenlängen der Triglyceride (TG) (C46 – C60) und Diglyceride (DG) (C32 – C38) in den vier Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 in Anwesenheit von ACM. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den ER+ und TNBC Zellen wurden nachgewiesen für die DG mit einer Kettenlänge von 38 Kohlenstoffatomen ($p < 0,0001$).

Sowohl in den ER+ MCF7 und T47D Zellen als auch in den TNBC HCC38 und MDA-MB231 Zellen waren die TG-Spezies mit einer mittleren Kettenlänge und einer geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen (C52 (33,3% - 45,2%), C54 (37,1% - 51,8%)) vorherrschend (Abbildung 6). Die kurzkettigen Lipidmoleküle (C46 (0,4% - 1,1%), C48 (2,6% - 6%)) wurden zu geringeren Anteilen nachgewiesen. Auch die längerkettigen TG waren mit 2,8% - 9,7% (C58) bzw. 0,7% - 4,4% (C60) zu geringeren Anteilen anzutreffen als die Lipide mit mittlerer Kettenlänge (Abbildung 6). Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des prozentualen Anteils der einzelnen TG-Kettenlängen zwischen den ER+ und TNBC Zellen.

Die DG wiesen in den allen vier Brustkrebszelllinien zumeist eine Kettenlänge von 34 (33,3% - 45,2%) und 36 Kohlenstoffatomen (37,1% - 51,8%) auf (Abbildung 6). Während die prozentualen Anteile der C32-Ketten (7,0% - 10,7%) in den MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 Zellen nicht statistisch signifikant verschieden waren, wurden in den TNBC Zellen größere prozentuale Anteile der längerkettigen DG (C38) als in den ER+ Zellen beobachtet ($p < 0,0001$).

Bei der Betrachtung der Anteile der unterschiedlichen Sättigungsgrade der Speicherlipide ergaben sich folgende Ergebnisse:

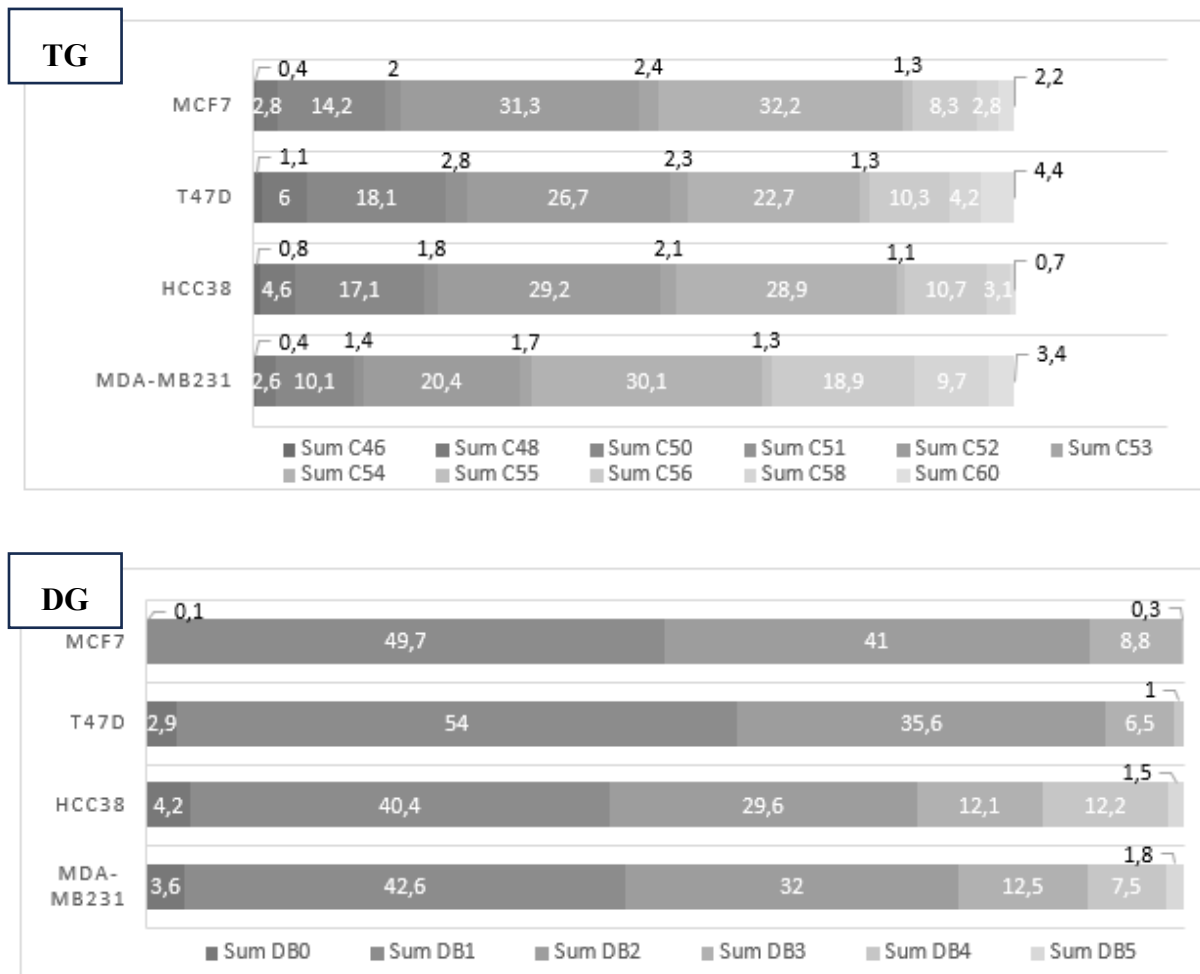


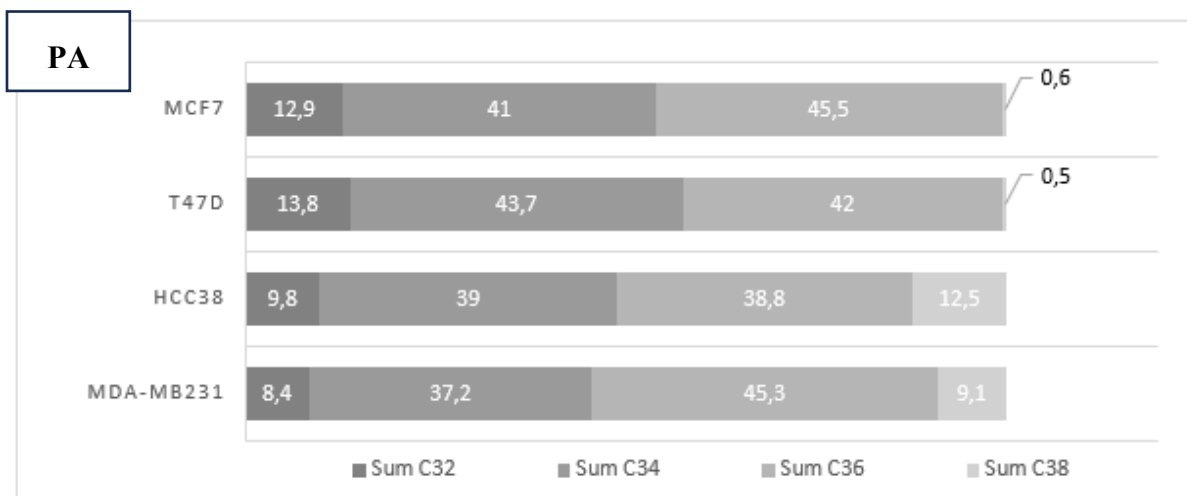
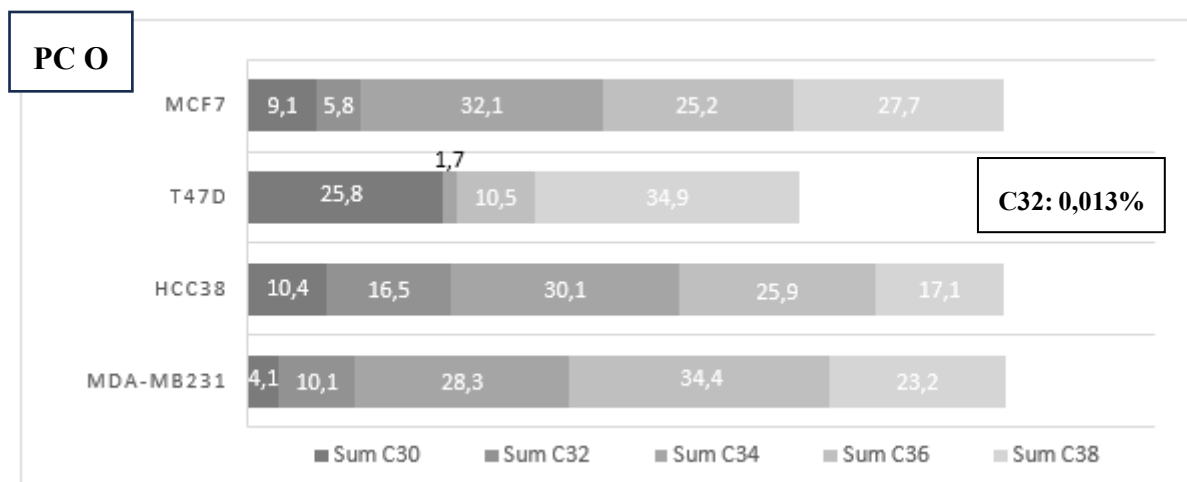
Abbildung 7: Prozentuale Anteile der Sättigungsgrade der Speicherlipide. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der unterschiedlichen Sättigungsgrade der Triglyceride (TG) und Diglyceride (DG) in den vier Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 in Anwesenheit von ACM. Statistisch signifikante Unterschiede in Abhängigkeit des Hormonrezeptorstatus waren gegeben für die TG mit fünf bis acht Doppelbindungen, für die DG mit drei und vier Doppelbindungen.

Während die zwei- (28,2% - 41,8%) und dreifach (24,0% - 40,7%) ungesättigten TG in allen vier untersuchten Brustkrebszelllinien im Vergleich am häufigsten anzutreffen waren, zeigten sich für die geringeren Sättigungsgrade (DB5 bis DB8) statistisch signifikante Unterschiede zwischen den ER+ und TNBC Zellen (Abbildung 7). So waren die fünffach ungesättigten TG in den TNBC HCC38 (8,5%) und MDA-MB231 (10,2%) häufiger vertreten als in den MCF7 (5,2%) und T47D Zellen (2,9%) ($p < 0,0001$). Gleiches galt für die TG-Moleküle mit sechs (MCF7: 2,8%, T47D: 0,8%, HCC38: 5,0%, MDA-MB231: 8,3%), sieben (MCF7: 1,5%, T47D: 0,16%, HCC38: 2,5%, MDA-MB231: 5,5%) und acht (MCF7: 0,05%, T47D: 0,003%, HCC38: 0,8%, MDA-MB231: 1,9%) Doppelbindungen (DB6, DB7, DB8 je $p < 0,0001$). Die Untersuchung der Sättigungsgrade der DG-Moleküle zeigte die prozentual höchsten Anteile der ein-

(40,4% - 54,0%) und zweifach (29,6% - 41,0%) ungesättigten Lipide (Abbildung 7). Dies galt sowohl für die ER+ als auch die TNBC Zellen. Statistisch signifikant unterschiedlich waren die prozentualen Anteile der drei- und vierfach ungesättigten DG in den ER+ und den TNBC Zelllinien. So wurden in den HCC38 (DB3: 12,1%, DB4: 12,2%) und MDA-MB231 Zellen (DB3: 12,5%, DB4: 7,5%) die Lipide mit geringeren Sättigungsgraden häufiger nachgewiesen als in den MCF7 (DB3: 8,8%, DB4: 0,3%) und T47D Zellen (DB3: 6,5%, DB4: 1,0%) (DB3, DB4 je $p < 0,0001$).

3.2.2.2 Membranlipide

Nach den Speicherlipiden wurden ebenso die Membranlipide bezüglich ihrer Kettenlängen und Sättigungsgrade untersucht.



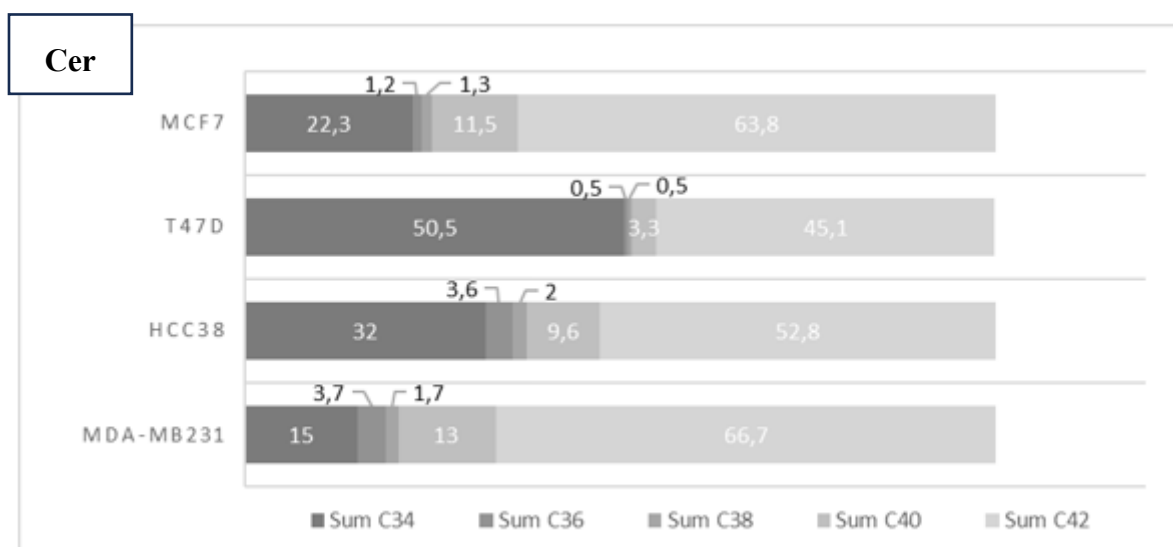
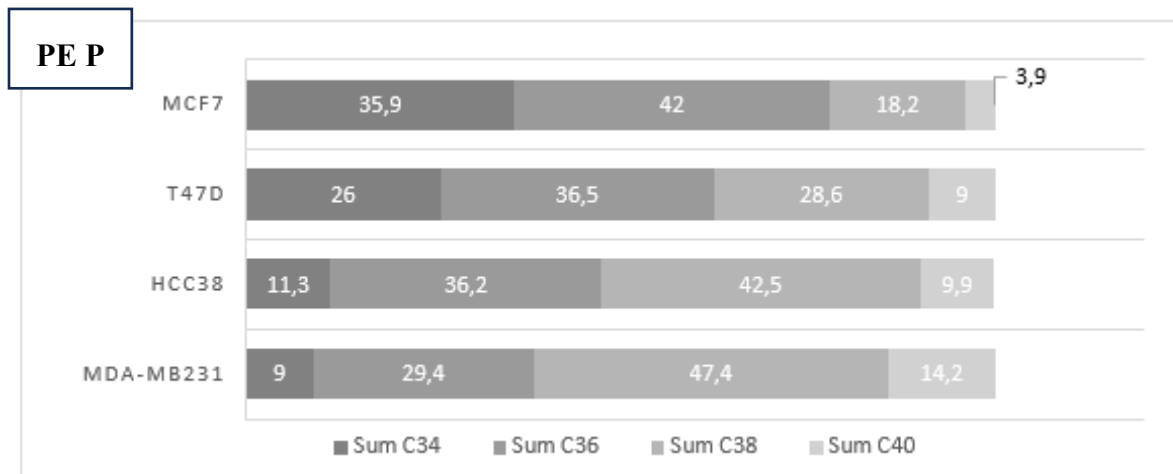


Abbildung 8: Prozentuale Anteile der Membranlipidkettenlängen. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der unterschiedlichen Kettenlängen der Phosphatidylcholinether (PC O), Phosphatidylsäure (PA), Phosphatidylethanolamin basierten Plasmalogen (PE P) und Ceramide (Cer) in den vier Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 in Anwesenheit von ACM.

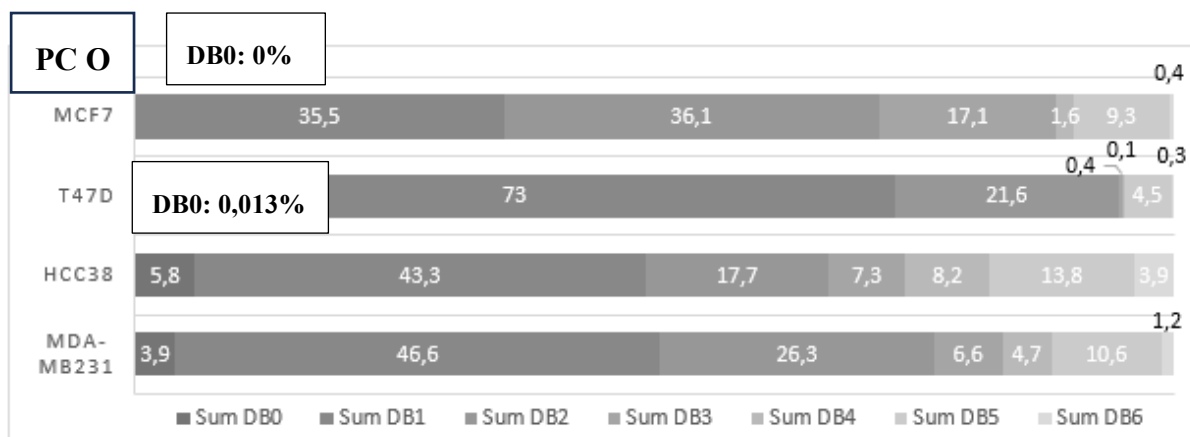
Die PC O-Kettenlängen mit mindestens 34 Kohlenstoffatomen waren in den MCF7 (C34: 32,1%, C36: 25,2%, C38: 27,7%) und in den TNBC HCC38 (C34: 30,1%, C36: 25,9%, C38: 17,1%) und MDA-MB231 Zellen (C34: 28,3%, C36: 34,4%, C38: 23,3%) am häufigsten anzutreffen (Abbildung 8). Die T47D Zellen zeigten mit einem prozentualen Anteil von 34,9% zu meist Kettenlängen mit 38 Kohlenstoffatomen. In den T47D Zellen wurden im Gegensatz zu den anderen drei untersuchten Brustkrebszellen die C30-Kettenlänge vergleichsweise häufig nachgewiesen (25,8%). Da sich dies nur auf die T47D Zellen bezog, konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in Abhängigkeit des Hormonrezeptorstatus der Zellen belegt werden.

Signifikant unterschiedliche prozentuale Anteile zeigten die C32-Ketten – in den TNBC HCC38 (16,5%) und MDA-MB231 Zellen (10,1%) wurden diese häufiger nachgewiesen als in den ER+ MCF7 (5,8%) und T47D Zellen (0,013%) ($p < 0,0001$).

Die PA-Moleküle wiesen in allen vier untersuchten Brustkrebszelllinien prozentual am häufigsten Kettenlängen mit 34 (37,2% - 43,7%) und 36 (38,8% - 45,5%) Kohlenstoffatomen auf (Abbildung 8). In den ER+ Zellen (MCF7: 0,6%, T47D: 0,5%) waren die länger-kettigen PA-Moleküle (C38) zu statistisch signifikant geringeren prozentualen Anteilen aufzufinden als in den TNBC HCC38 (12,5%) und MDA-MB231 Zellen (9,1%) ($p < 0,0001$).

Statistisch signifikante Unterschiede der PE P-Kettenlängen zwischen den ER+ und TNBC Zelllinien zeigten sich für die Lipidmoleküle mit 34 und 38 Kohlenstoffatomen (Abbildung 8). In MCF7 (35,9%) und T47D Zellen (26,0%) wurden die kürzeren PE P (C34) häufiger nachgewiesen als in HCC38 (9,8%) und MDA-MB231 Zellen (8,4%) ($p < 0,0001$). Die TNBC Zelllinien wiesen dagegen statistisch signifikant größere prozentuale Anteile der längeren Lipidmoleküle (C38) (HCC38: 42,5%, MDA-MB231: 47,4%) auf als die ER+ Zelllinien (MCF7: 8,2%, T47D: 28,6%) ($p < 0,0001$).

Die Cer wiesen sowohl in den ER+ als auch in den TNBC Zelllinien vermehrt längere Molekülketten (C42) auf (45,1% - 66,7%) (Abbildung 8). In den T47D Zellen wurden zudem die kurzkettigen Lipide (C34) mit 50,5% festgestellt. Da die Anteile der C34-Lipidketten in den MCF7 (22,3%), HCC38 (32,0%) und MDA-MB231 Zellen (15,0%) jedoch nicht statistisch signifikant verschieden waren, war kein Einfluss des Hormonrezeptorstatus auf die Cer-Kettenlängen nachweisbar.



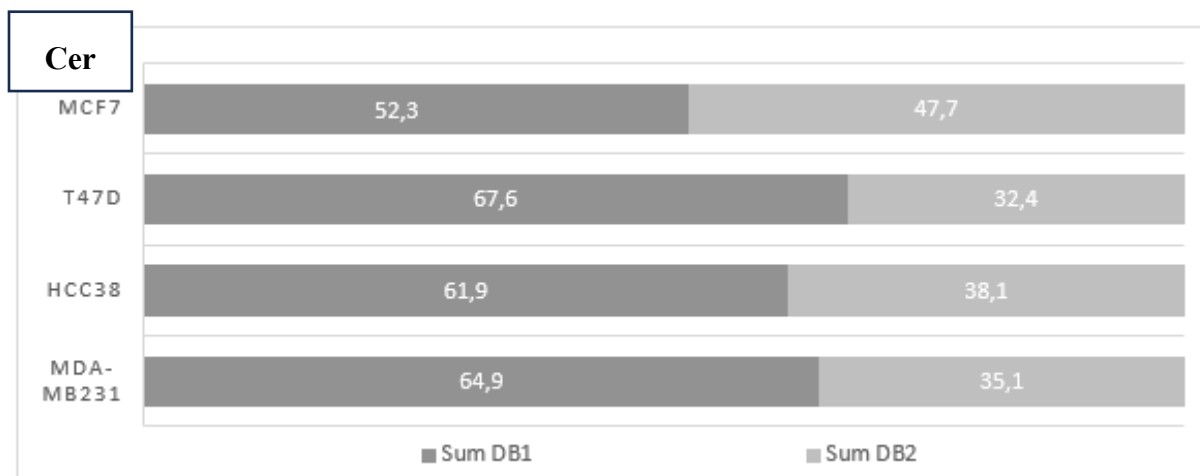
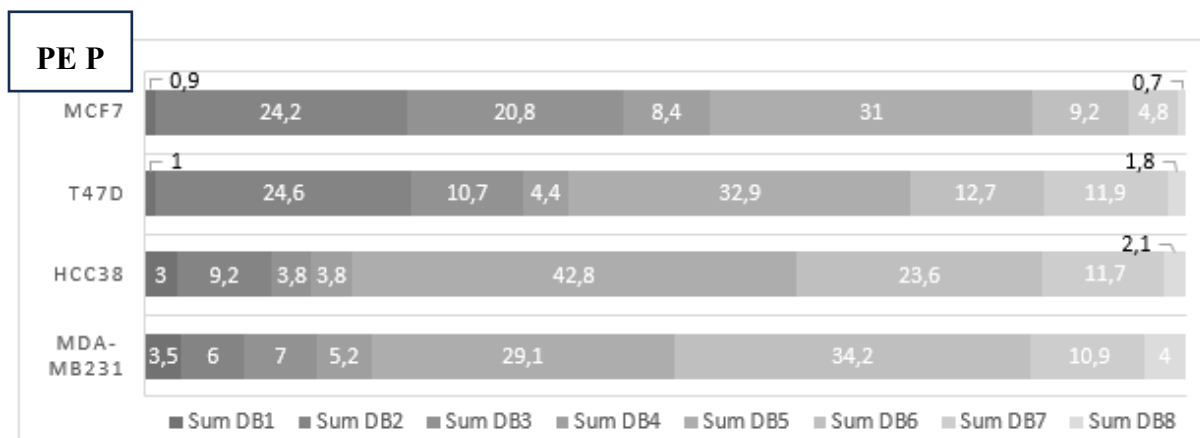
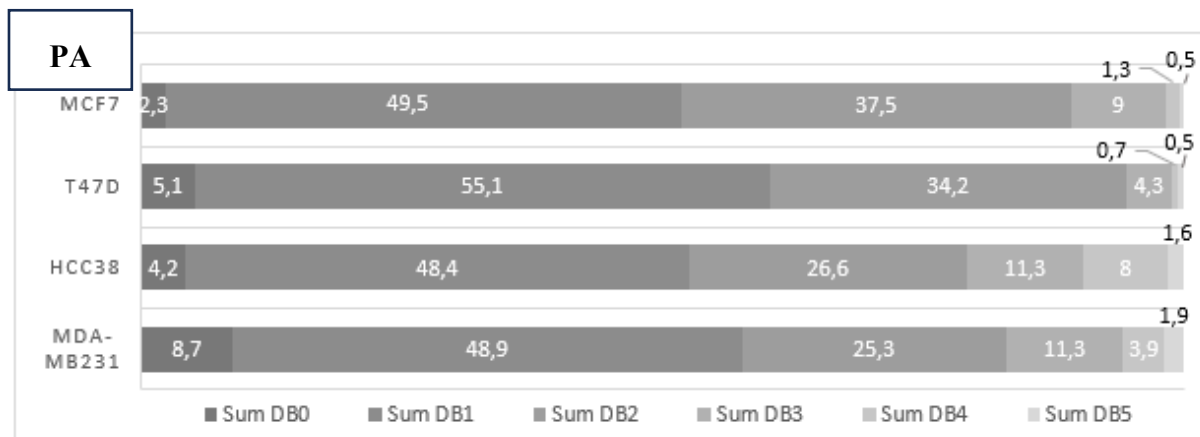


Abbildung 9: Prozentuale Anteile der Sättigungsgrade der Membranlipide. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Sättigungsgrade der PC O, PA, PE P und Cer in den vier Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 in Anwesenheit von ACM.

Die Untersuchung der Sättigungsgrade der Membranlipide lieferte folgende Ergebnisse: Die ein- (35,5% - 73,0%) und zweifach (17,7% - 36,1%) ungesättigten PC O-Moleküle wurden in allen vier untersuchten Brustkrebszelllinien prozentual am häufigsten beobachtet (Abbildung

9). In den TNBC Zelllinien HCC38 (DB0: 5,8%, DB4: 7,3%) und MDA-MB231 (DB0: 3,9%, DB4: 6,6%) zeigten sich signifikant höhere Anteile der gesättigten und vierfach ungesättigten PC O. In den ER+ MCF7 (DB0: 0%, DB4: 1,6%) und T47D Zellen (DB0: 0,013%, DB4: 0,4%) waren diese zu prozentual geringeren Anteilen anzutreffen ($p < 0,0001$).

Die PA-Moleküle wiesen in jeder der vier betrachteten Zelllinien am häufigsten eine (48,4% - 25,3%) oder zwei (25,3% - 37,5%) Doppelbindungen auf (Abbildung 9). In den TNBC HCC38 (DB3: 11,3%, DB4: 8%) und MDA-MB231 Zellen (DB3: 11,3%, DB4: 3,9%) waren die prozentualen Anteile der drei- und vierfach ungesättigten PA statistisch signifikant höher als in den ER+ MCF7 (DB3: 9% ($p = 0,0007$), DB4: 1,3% ($p < 0,0001$)) und T47D Zellen (DB3: 4,3%, DB4: 0,7% (je $p < 0,0001$)).

In allen vier Brustkrebszelllinien wurden zumeist fünffach ungesättigte PE P (29,1% - 42,8%) nachgewiesen (Abbildung 9). Ein statistisch signifikanter Unterschied in Abhängigkeit des Hormonrezeptorstatus zeigte sich für folgende Sättigungsgrade: Die Lipide mit einer oder sechs Doppelbindungen wurden in den TNBC HCC38 (DB1: 3,0%, DB6: 23,6%) und MDA-MB231 Zellen (DB1: 3,5%, DB6: 34,2%) häufiger beobachtet als in den ER+ MCF7 (DB1: 0,9%, DB6: 9,2%) und T47D Zellen (DB1: 1,0%, DB6: 12,7%) ($p < 0,0001$). Wohingegen die zwei- und dreifach ungesättigten PE P in den ER+ (DB2: 24,2% bzw. 24,6%, DB3: 20,8% bzw. 10,7%) prozentual größere Anteile bildeten als in den TNBC Zellen (DB2: 9,2% bzw. 6,0%, DB3: 3,8% bzw. 7,0%) ($p < 0,0001$).

Die Sättigungsgrade der Cer-Moleküle unterschieden sich in allen vier untersuchten Brustkrebszelllinien nicht statistisch signifikant (Abbildung 9).

3.3 Expression von PPAR-Zielgenen in unterschiedlichen humanen Brustkrebszelllinien nach der Inkubation SFM und in Anwesenheit von ACM

Es wurde untersucht, inwiefern die Anwesenheit von ACM im Nährmedium Einfluss auf die Expression von ausgewählten PPAR-Zielgenen nimmt. Hierzu wurde mithilfe der quantitativen Echtzeit-PCR die relative Genexpression in den vier Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 analysiert. Die Expression der PPAR-Zielgene wurde nach Inkubation im Kontrollmedium SFM und in Anwesenheit von ACM gemessen.

3.3.1 ANGPTL4

Eine Expression von *ANGPTL4* war in allen vier untersuchten Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38, MDA-MB231 nachweisbar. Die relative *ANGPTL4*-Expression unterschied sich in den einzelnen Zelllinien sowohl nach der Inkubation in SFM als auch in Anwesenheit von ACM (Abbildung 10).

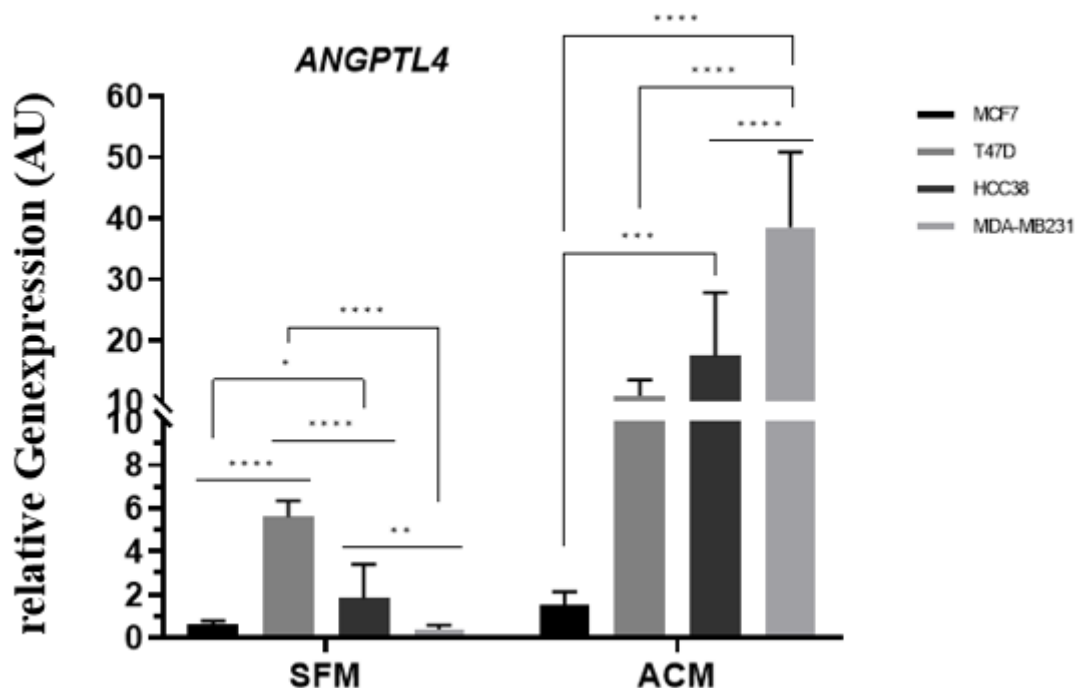


Abbildung 10: ANGPTL4. Dargestellt ist die relative *ANGPTL4*-Expression (in AU) in den Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 nach der Inkubation in SFM und in Anwesenheit von ACM (Mittelwert $\pm$ SEM). Es wurde ein One Way ANOVA (Post-hoc Tukey-Test) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt (* für $p = 0,05$ bis $0,0332$; ** $p = 0,0332$ bis $0,0021$; *** $p = 0,0021$ bis $0,0002$; **** $p < 0,0001$).

Nach Inkubation der Zellen im Kontrollmedium SFM wiesen die MDA-MB231 Zellen die geringste relative Genexpression im Mittel auf – gefolgt von den ER+ MCF7 Zellen (Tabelle 6). In den HCC38 und T47D Zellen war *ANGPTL4* bereits nach der Inkubation im Kontrollmedium SFM signifikant höher exprimiert. In Anwesenheit von ACM unterschied sich die relative *ANGPTL4*-Expression zwischen den ER+ und TNBC Zelllinien. Während sich in den MCF7 und T47D Zellen die *ANGPTL4*-Expression in Anwesenheit von ACM verdoppelte, stieg sie in den TNBC Zelllinien um ein Vielfaches an. So wurde in den HCC38 Zellen eine zehnfach und in den MDA-MB231 Zellen eine bis zu 100-fach höhere relative Genexpression nachgewiesen (Tabelle 6).

	SFM	ACM	Fold Change	P-Wert
MCF7	0,6	1,5	2,6	0,0006
T47D	5,6	10,9	1,9	0,0003
HCC38	1,8	17,5	11,2	0,0002
MDA-MB231	0,4	38,5	103,6	< 0,0001

Tabelle 6: *ANGPTL4*. Dargestellt ist eine Übersicht der relativen Genexpression (in AU) des PPAR-Zielgens *ANGPTL4* in den Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 nach der Inkubation im Kontrollmedium SFM und in Anwesenheit von ACM. Der Fold Change ist zur Beurteilung des relativen Genexpressionsniveaus mit aufgeführt. Die Mittelwerte der *ANGPTL4* mRNA Expression sind als arbitrary units (AU) normalisiert auf betaActin. Eine statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ festgelegt. Es wurde ein One Way ANOVA (Post hoc Tukey-Test) durchgeführt.

3.3.2 PDK4

PDK4 codiert das Enzym Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase und war in allen vier Brustkrebszelllinien exprimiert (Abbildung 11).

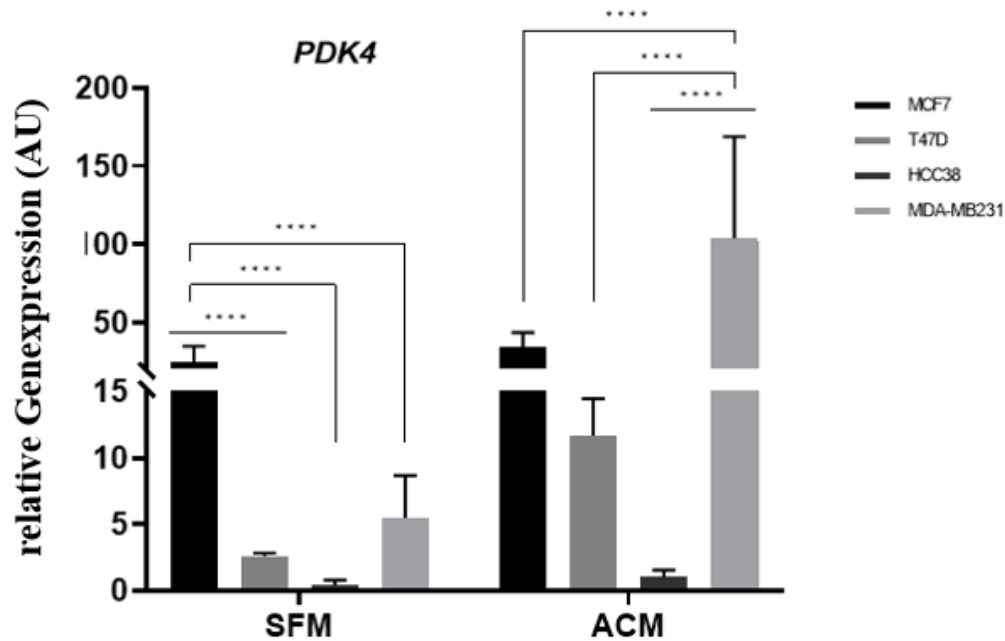


Abbildung 11: PDK4. Dargestellt ist die relative PDK4-Expression (in AU) in den Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 nach der Inkubation in SFM und in Anwesenheit von ACM (Mittelwert $\pm$ SEM). Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt (* für $p = 0,05$ bis $0,0332$; ** $p = 0,0332$ bis $0,0021$; *** $p = 0,0021$ bis $0,0002$; **** $p < 0,0001$).

Nach der Inkubation im Kontrollmedium SFM wiesen die ER+ MCF7 Zellen die höchste relative *PDK4*-Expression auf (Tabelle 7). In den TNBC Zelllinien wurde *PDK4* geringfügiger exprimiert – ebenso in den ER+ T47D Zellen. Die relative Genexpression für dieses PPAR-Zielgen stieg in allen Zelllinien in Anwesenheit von ACM an (Abbildung 11, Tabelle 7). Die stärkste Zunahme der relativen *PDK4*-Expression in Anwesenheit von ACM verzeichneten die MDA-MB231 Zellen mit einem 19-fachen Anstieg. In den HCC38 Zellen verdreifachte sich die Expression. Ein 1,5 bzw. vierfacher Anstieg wurde in den ER+ MCF7 bzw. T47D Zellen nachgewiesen. Somit zeigte sich auch für *PDK4* eine deutliche Induzierbarkeit durch ACM.

	SFM	ACM	Fold Change	P-Wert
MCF7	24,6	34,0	1,5	0,0443
T47D	2,6	11,7	4,4	< 0,0001
HCC38	0,4	1,0	2,8	0,0094
MDA-MB231	5,5	103,8	18,7	< 0,0001

Tabelle 7: PDK4. Dargestellt ist eine Übersicht der relativen Genexpression (in AU) des PPAR-Zielgens PDK4 in den Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 nach der Inkubation im Kontrollmedium SFM und in Anwesenheit von ACM. Der Fold Change ist zur Beurteilung des relativen Genexpressionsniveaus mit aufgeführt. Die Mittelwerte der ANGPTL4 mRNA Expression sind als arbitrary units (AU) normalisiert auf betaActin. Eine statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ festgelegt. Es wurde ein One Way ANOVA (Post hoc Tukey-Test) durchgeführt.

3.3.3 PLIN2

Eine Expression des PPAR-Zielgens *PLIN2* konnte in allen vier untersuchten Brustkrebszelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 12).

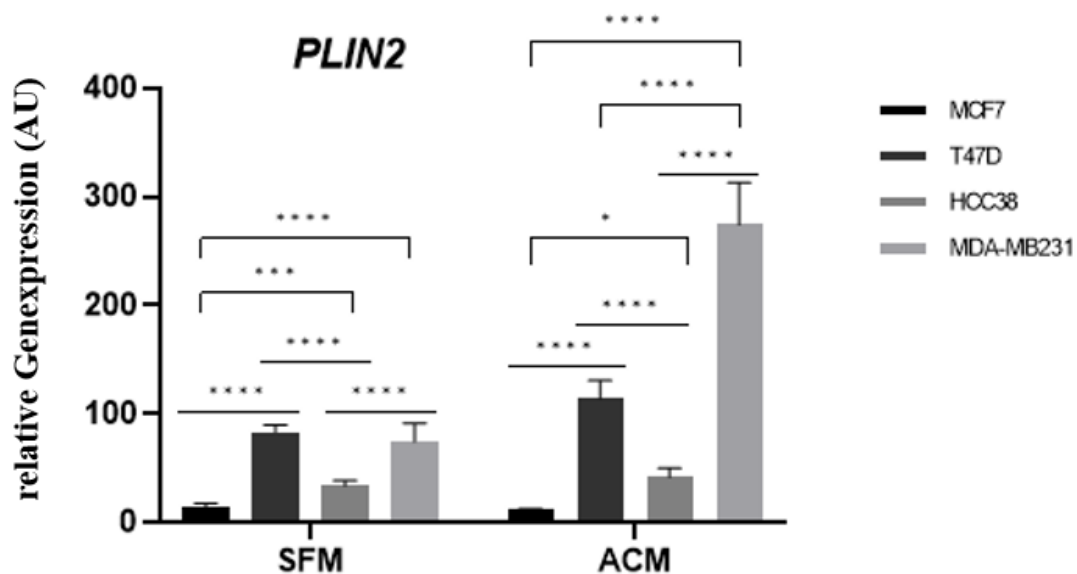


Abbildung 12: PLIN2. Dargestellt ist die relative PLIN2-Expression (in AU) in den Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 nach der Inkubation in SFM und in Anwesenheit von ACM (Mittelwert $\pm$ SEM). Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt (* für $p = 0,05$ bis $0,0332$; ** $p = 0,0332$ bis $0,0021$; *** $p = 0,0021$ bis $0,0002$; **** $p < 0,0001$).

PLIN2 wurde bereits nach der Inkubation in SFM v.a. in den T47D und den MDA-MB231 Zellen vergleichsweise stark exprimiert (Tabelle 8). Eine signifikant geringere relative Genexpression wiesen die HCC38 und die MCF7 Zellen auf. In Anwesenheit von ACM vervierfachte sich die relative *PLIN2*-Expression in den MDA-MB231 Zellen. Der Genexpressionsanstieg war in den HCC38 und den ER+ Zellen geringer ausgeprägt und in den MCF7 nicht statistisch signifikant (Abbildung 12, Tabelle 8). Es wurde kein Unterschied zwischen den ER+ und TNBC Zelllinien bezüglich der relativen *PLIN2*-Expression und deren Änderung in Anwesenheit von ACM festgestellt.

	SFM	ACM	Fold Change	P-Wert
MCF7	13,6	12,0	0,9	0,2656
T47D	83,1	114,0	1,4	0,0002
HCC38	33,5	41,6	1,2	0,0137
MDA-MB231	74,1	274,4	3,8	< 0,0001

Tabelle 8: *PLIN2*. Dargestellt ist eine Übersicht der relativen Genexpression (in AU) des PPAR-Zielgens *PLIN2* in den Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 nach der Inkubation im Kontrollmedium SFM und in Anwesenheit von ACM. Der Fold Change ist zur Beurteilung des relativen Genexpressionsniveaus mit aufgeführt. Die Mittelwerte der *ANGPTL4* mRNA Expression sind als arbitrary units (AU) normalisiert auf betaActin. Eine statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ festgelegt. Es wurde ein One Way ANOVA (Post hoc Tukey-Test) durchgeführt.

3.3.4 CPT1A

Alle vier eingesetzten Brustkrebszelllinien exprimierten *CPT1A* (Abbildung 13), welches das Enzym Carnitin Palmitoyl Transferase 1A codiert.

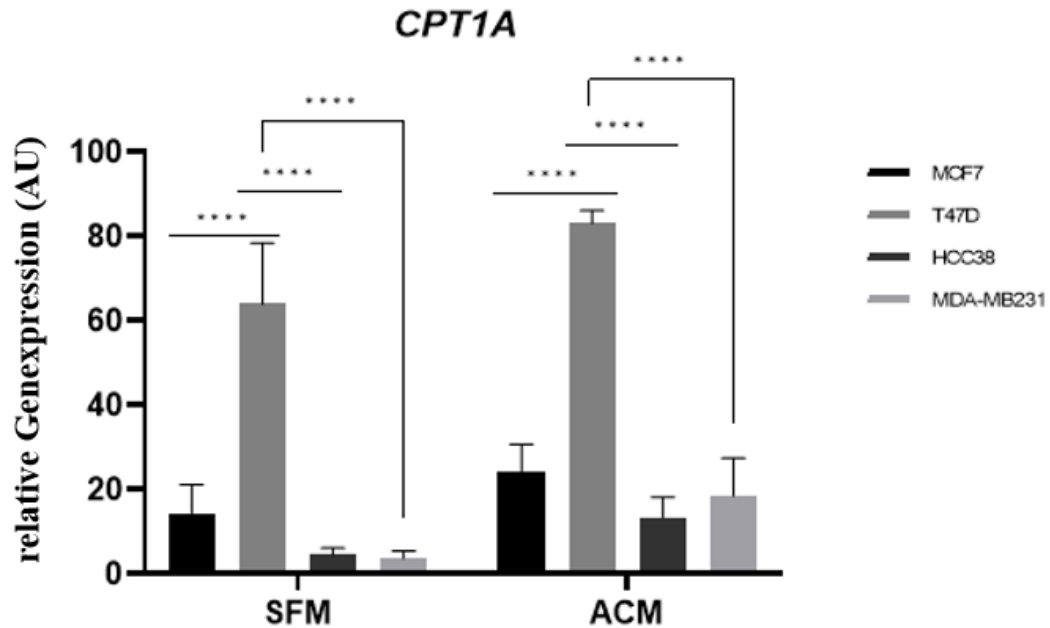


Abbildung 13: CPT1A. Dargestellt ist die relative *ANGPTL4*-Expression (in AU) in den Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 nach der Inkubation in SFM und in Anwesenheit von ACM (Mittelwert $\pm$ SEM). Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt (* für $p = 0,05$ bis $0,0332$; ** $p = 0,0332$ bis $0,0021$; *** $p = 0,0021$ bis $0,0002$; **** $p < 0,0001$).

Nach Inkubation im Kontrollmedium SFM zeigten die TNBC Zelllinien HCC38 und MDA-MB231 eine signifikant geringere relative *CPT1A*-Expression als die ER+ MCF7 und T47D Zellen (Tabelle 9). In Anwesenheit von ACM stieg die relative *CPT1A*-Expression in allen vier Brustkrebszelllinien an. MCF7 und T47D Zellen verzeichneten einen 1,5-fachen bzw. 1,3-fachen Anstieg. Die *CPT1A*-Expression verdreifachte sich in Anwesenheit von ACM in den HCC38 und verfünffachte sich in den MDA-MB231 Zellen. Die T47D Zellen wiesen bereits nach der Inkubation in SFM eine höhere *CPT1A*-Expression als die drei anderen untersuchten Brustkrebszelllinien auf. Auch in Anwesenheit von ACM exprimierten die T47D Zellen das Gen vergleichsweise stark (Abbildung 13, Tabelle 9). Der Anstieg der relativen *CPT1A*-Expression war allerdings in den TNBC um ein Vielfaches höher als in beiden ER+ Brustkrebszelllinien.

	SFM	ACM	Fold Change	P-Wert
MCF7	14,3	24,2	1,5	0,0365
T47D	64,0	83,1	1,3	0,0275
HCC38	4,6	13,4	3,0	0,0001
MDA-MB231	3,8	18,6	5,0	< 0,0001

Tabelle 9: CPT1A. Dargestellt ist eine Übersicht der relativen Genexpression (in AU) des PPAR-Zielgens CPT1A in den Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 nach der Inkubation im Kontrollmedium SFM und in Anwesenheit von ACM. Der Fold Change ist zur Beurteilung des relativen Genexpressionsniveaus mit aufgeführt. Die Mittelwerte der ANGPTL4 mRNA Expression sind als arbitrary units (AU) normalisiert auf betaActin. Eine statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ festgelegt. Es wurde ein One Way ANOVA (Post hoc Tukey-Test) durchgeführt.

3.3.5 FAS

Auch das PPAR-Zielgen *FAS*, welches das Enzym fatty acid synthase codiert, war in allen vier Brustkrebszelllinien exprimiert (Abbildung 14).

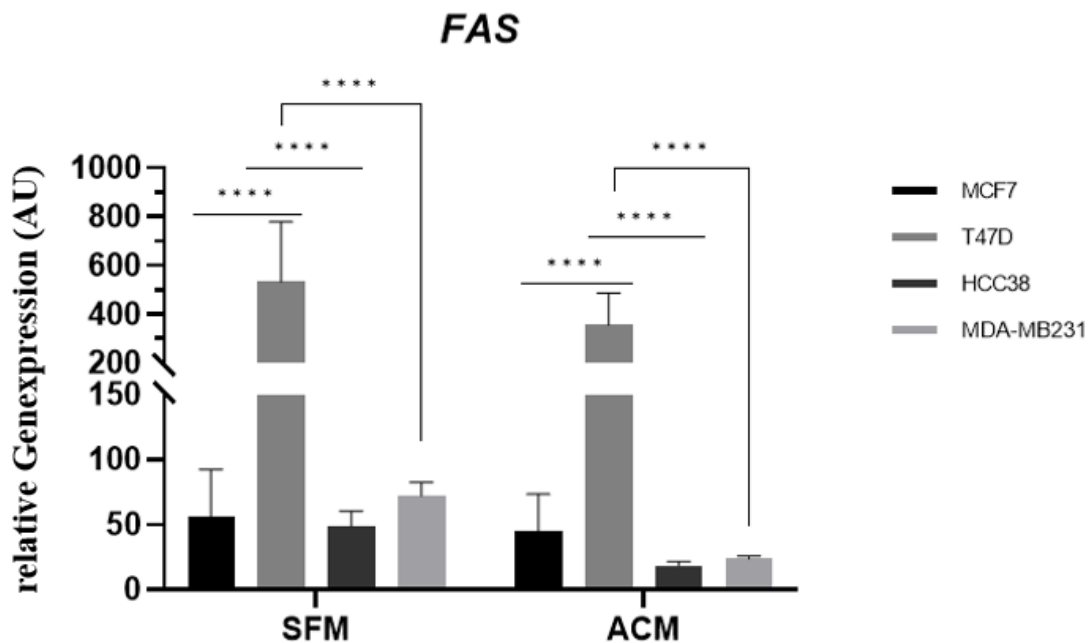


Abbildung 14: FAS. Dargestellt ist die relative ANGPTL4-Expression (in AU) in den Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 nach der Inkubation in SFM und in Anwesenheit von ACM (Mittelwert $\pm$ SEM). Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt (* für $p = 0,05$ bis $0,0332$; ** $p = 0,0332$ bis $0,0021$; *** $p = 0,0021$ bis $0,0002$; **** $p < 0,0001$).

Nach der Inkubation im Kontrollmedium SFM war die relative *FAS*-Expression in den T47D Zellen am höchsten (Tabelle 10). MCF7 Zellen und die beiden TNBC Zelllinien HCC38 und MDA-MB231 wiesen eine signifikant niedrigere *FAS*-Expression auf. In Anwesenheit von ACM sank in allen vier untersuchten Brustkrebszelllinien die relative *FAS*-Expression (Abbildung 14, Tabelle 10). Auch in Anwesenheit von ACM wiesen die T47D Zellen die im Vergleich höchste relative *FAS*-Expression auf. In den beiden TNBC Zelllinien wurde *FAS* in Anwesenheit von ACM zu einem Drittel im Vergleich zu den in SFM inkubierten Zellen exprimiert (Tabelle 13). Die geringere relative Genexpression in Anwesenheit von ACM war in den MCF7 Zellen nicht statistisch signifikant (Tabelle 10). Das Vorhandensein freier Fettsäuren führte vermutlich dazu, dass die Brustkrebszelllinien aufgrund des ausreichenden exogenen Angebots die endogene Fettsäuresynthese und die damit verbundene Expression des zugehörigen Gens verringerten.

	SFM	ACM	Fold Change	P-Wert
MCF7	56,1	45,3	0,86	0,4621
T47D	532,3	354,4	0,69	0,0508
HCC38	48,7	18,4	0,38	< 0,0001
MDA-MB231	71,9	23,6	0,33	< 0,0001

Tabelle 10: *FAS*. Dargestellt ist eine Übersicht der relativen Genexpression (in AU) des PPAR-Zielgens *FAS* in den Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 nach der Inkubation im Kontrollmedium SFM und in Anwesenheit von ACM. Der Fold Change ist zur Beurteilung des relativen Genexpressionsniveaus mit aufgeführt. Die Mittelwerte der *ANGPTL4* mRNA Expression sind als arbitrary units (AU) normalisiert auf *betaActin*. Eine statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ festgelegt. Es wurde ein One Way ANOVA (Post hoc Tukey-Test) durchgeführt.

3.3.6 Änderung der PPAR-Zielgen-Expression in Anwesenheit von ACM in östrogenrezeptor-positiven und triple negativen Brustkrebszelllinien im Vergleich

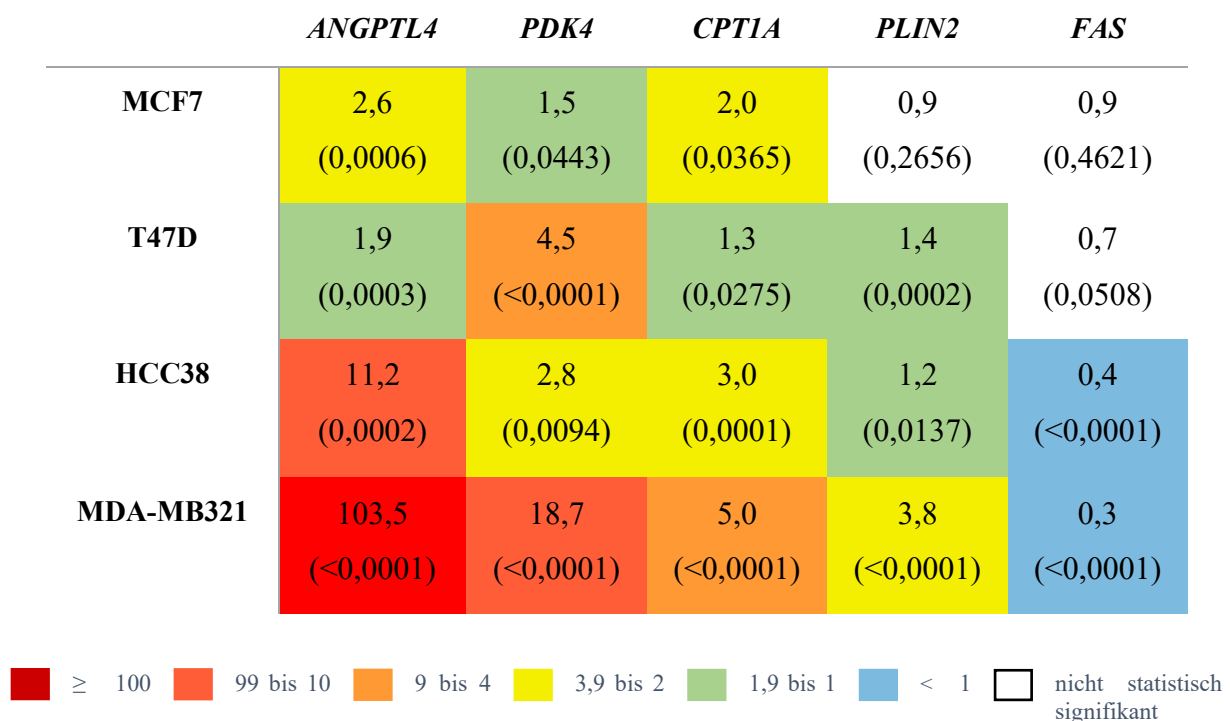


Abbildung 15: Zusammenfassung relativen Genexpressionsänderung der untersuchten PPAR-Zielgene. In der Heat Map dargestellt ist der jeweilige Fold Change (P-Wert) der PPAR-Zielgene in den Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 in Anwesenheit von ACM. Die Farbskalierung liefert einen Überblick über die Veränderungen der relativen PPAR-Zielgenexpression (in AU) in Anwesenheit von ACM.

In Abbildung 15 sind die Fold Change-Werte für die vier Brustkrebszelllinien und alle untersuchten PPAR-Zielgene als Übersicht aufgeführt. Die Heat Map liefert einen Überblick, wie ausgeprägt der Anstieg bzw. Abfall der relativen Genexpression der verschiedenen PPAR-Zielgene in den unterschiedlichen Zelllinien war.

Die Anwesenheit von ACM führte in den TNBC Zelllinien HCC38 und MDA-MB231 zu einer größeren relativen Expressionsänderung der PPAR-Zielgene als in den ER+ MCF7 und T47D Zellen. Das galt sowohl für die stärkere Hochregulierung der Expression von *ANGPTL4*, *CPT1A* und *PLIN2* als auch für die geringere *FAS*-Expression in Anwesenheit von ACM.

Die stärkste Reaktion auf die Anwesenheit von ACM zeigte sich für allen untersuchten PPAR-Zielgenen in den TNBC MDA-MB231 Zellen. Am schwächsten war die PPAR-Zielgenexpression (mit Ausnahme von *PDK4*) in den ER+ T47D Zellen in Anwesenheit von ACM. In den

T47D Zellen scheint die Anwesenheit von ACM wenig Einfluss auf die Expression der PPAR-Zielgene auszuüben.

3.4 Änderungen der relativen Expression von *PPARα*, *PPARβ/δ*, *PPARγ* in den humanen Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 in Anwesenheit von ACM

Aufgrund der festgestellten Veränderungen der relativen *PPAR*-Zielgen-Expression in Anwesenheit von ACM wurden die Gen- und Proteinexpression der drei *PPAR* Subtypen *PPARα*, *PPARβ/δ* und *PPARγ* betrachtet.

3.4.1 *PPARα*

Das in Geweben mit hoher Fettsäureoxidationsrate vorherrschende *PPARα*-Gen wurde in allen vier untersuchten Brustkrebszelllinien exprimiert (Abbildung 16).

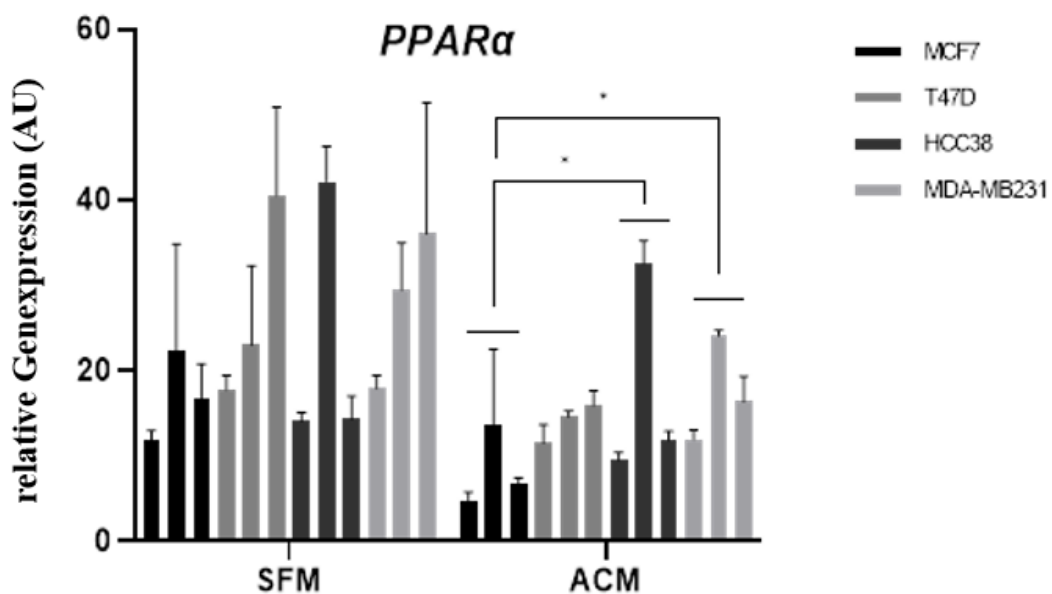


Abbildung 16: *PPARα*. Dargestellt ist die relative *PPARα*-Expression (in AU) in den Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 nach der Inkubation in SFM und in Anwesenheit von ACM (Mittelwert $\pm$ SEM). Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt (* für $p = 0,05$ bis $0,0332$). Aufgrund der Heterogenität der *PPAR*-Expression zwischen den einzelnen Versuchen wurden die Einzelergebnisse in separaten Balken dargestellt.

Nach der Inkubation im Kontrollmedium SFM ähnelten sich die berechneten Mittelwerte der *PPARα*-Expression in den beiden TNBC Zelllinien HCC38 und MDA-MB231 (Abbildung 16, Tabelle 11). Auch das Expressionsniveau der T47D Zellen war vergleichbar. In den MCF7 Zellen wurde *PPARα* am geringsten exprimiert – sowohl nach der Inkubation im Kontrollmedium SFM als auch in Anwesenheit von ACM. Die relative *PPARα*-Expression halbierte sich in den MCF7 Zellen in Anwesenheit von ACM. In den T47D und den MDA-MB231 Zellen wurde *PPARα* in Anwesenheit von ACM geringer (33 %) exprimiert als in den im Kontrollmedium SFM inkubierten T47D und MDA-MB231 Zellen. Der Rückgang der relativen Genexpression in Anwesenheit von ACM in den HCC38 Zellen war nicht statistisch signifikant (Tabelle 11). Es wurde kein Unterschied bezüglich der relativen *PPARα*-Expression zwischen den ER+ und TNBC Brustkrebszelllinien festgestellt. Ein niedrigeres Expressionsniveau der MCF7 Zellen wurde sowohl nach der Inkubation im Kontrollmedium als auch in Anwesenheit von ACM beobachtet.

	SFM	ACM	Fold Change	P-Wert
MCF7	16,9	8,4	0,5	0,0220
T47D	27,2	14,1	0,6	0,0070
HCC38	23,5	18,0	0,8	0,3729
MDA-MB231	27,9	17,5	0,6	0,0263

Tabelle 11: *PPARα*. Dargestellt ist eine Übersicht der relativen *PPARα*-Expression (in AU) in den Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 nach der Inkubation im Kontrollmedium SFM und in Anwesenheit von ACM. Der Fold Change ist zur Beurteilung des relativen Genexpressionsniveaus mit aufgeführt. Die Mittelwerte der *ANGPTL4* mRNA Expression sind als arbitrary units (AU) normalisiert auf *betaActin*. Eine statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ festgelegt. Es wurde ein One Way ANOVA (Post hoc Tukey-Test) durchgeführt.

Zur Untersuchung der Proteinexpression wurden Western Blot-Analysen mit Zellextrakten der jeweiligen Zelllinie nach der Inkubation in SFM und in Anwesenheit von ACM durchgeführt (Abbildung 17). *PPARα* konnte mittels des Western Blots in allen vier Brustkrebszelllinien detektiert werden. Die *PPARα*-Expression war auf Proteinebene jedoch in MDA-MB231 Zellen schwächer ausgeprägt als in den drei anderen untersuchten Zelllinien. Die stärksten *PPARα* Proteinbanden fanden sich in T47D-Zellen. Diese Beobachtungen standen im Gegensatz zu den qPCR-Untersuchungsergebnissen. Hier wurde in den TNBC Brustkrebszelllinien eine höhere

relative *PPARα*-Genexpression als in den ER+ MCF7 Zellen nachgewiesen. In Bezug auf die T47D Zellen stimmten die Untersuchungsergebnisse sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene überein.

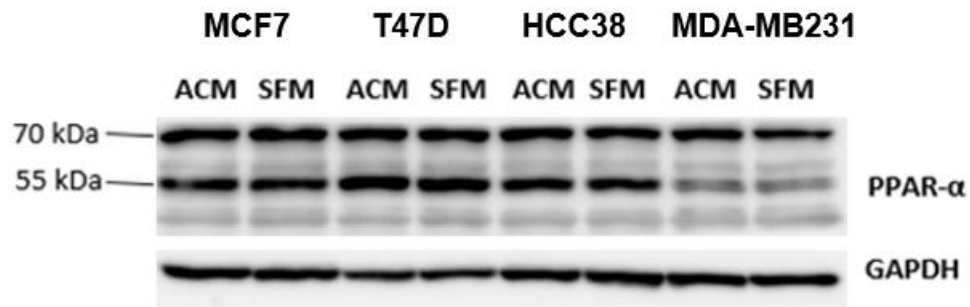


Abbildung 17: *PPARα* – Western Blot. Die Expression von *PPARα* (Molekulargewicht von 55 kDa) war in allen vier untersuchten Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 detektierbar. Als Referenz wurde GAPDH verwendet.

3.4.2 *PPARγ*

Bei dem zweiten untersuchten Subtypen *PPARγ* lassen sich die zwei Isoformen *PPARγ₁* und *PPARγ₂* unterscheiden. *PPARγ₁* wird ubiquitär exprimiert und konnte auch in den vier untersuchten Brustkrebszellen nachgewiesen werden (Abbildung 18).

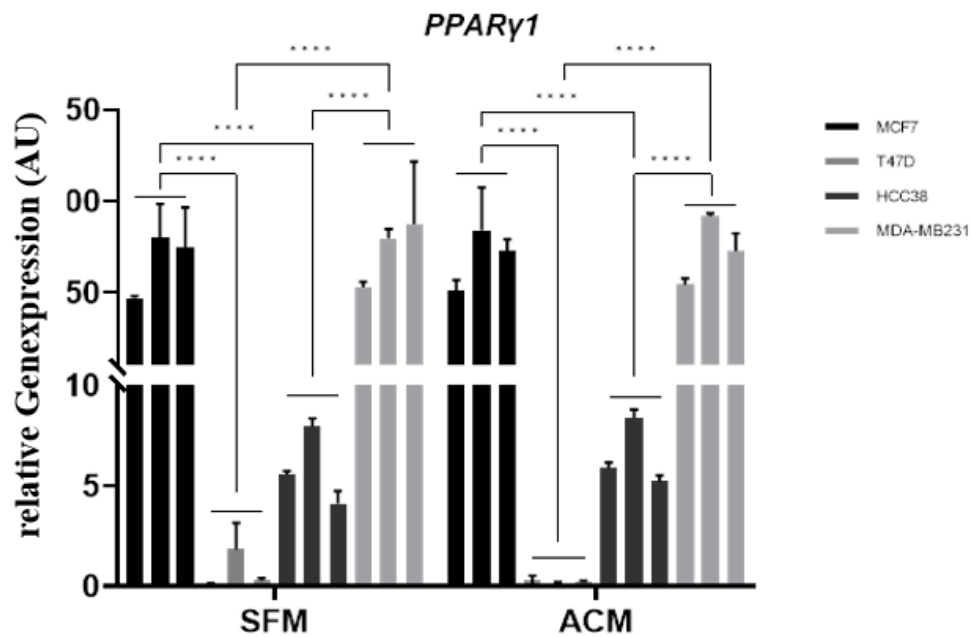


Abbildung 18: PPAR γ 1. Dargestellt ist die relative PPAR γ 1-Expression (in AU) in den Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 nach der Inkubation in SFM und in Anwesenheit von ACM (Mittelwert $\pm$ SEM). Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt (**** entspricht $p < 0,0001$). Aufgrund der Heterogenität der PPAR-Expression zwischen den einzelnen Versuchen wurden die Einzelexperimente in separaten Balken dargestellt.

Während nach der Inkubation im Kontrollmedium SFM MCF7 und MDA-MB231 Zellen eine vergleichbar hohe relative PPAR γ 1-Expression aufwiesen, wurde PPAR γ 1 in den HCC38 Zellen signifikant geringer exprimiert (Tabelle 12). In T47D Zellen wurde die niedrigste relative Genexpression nachgewiesen. In Anwesenheit von ACM kam es in keiner der vier untersuchten Brustkrebszelllinien zu einer statistisch signifikanten Veränderung der relativen PPAR γ 1-Expression (Abbildung 18, Tabelle 12). Es wurde kein Unterschied zwischen den ER+ und TNBC Zelllinien festgestellt, da das Expressionsniveau in den MCF7 und MDA-MB231 Zellen vergleichbar war.

	SFM	ACM	Fold Change	P-Wert
MCF7	67,2	69,1	1,0	0,8395
T47D	0,8	0,2	1,0	0,1392
HCC38	5,9	6,5	1,1	0,4347
MDA-MB231	73,3	72,9	1,0	0,9672

Tabelle 12: PPAR γ_1 . Dargestellt ist eine Übersicht der relativen PPAR γ_1 -Expression (in AU) in den Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 nach der Inkubation im Kontrollmedium SFM und in Anwesenheit von ACM. Der Fold Change ist zur Beurteilung des relativen Genexpressionsniveaus mit aufgeführt. Die Mittelwerte der ANGPTL4 mRNA Expression sind als arbitrary units (AU) normalisiert auf betaActin. Eine statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ festgelegt. Es wurde ein One Way ANOVA (Post hoc Tukey-Test) durchgeführt.

PPAR γ_2 wird hauptsächlich in Adipozyten exprimiert, konnte aber in drei der vier untersuchten Brustkrebszelllinien nachgewiesen werden. Lediglich in T47D Zellen wurde keine PPAR γ_2 -Expression nachgewiesen (Abbildung 19).

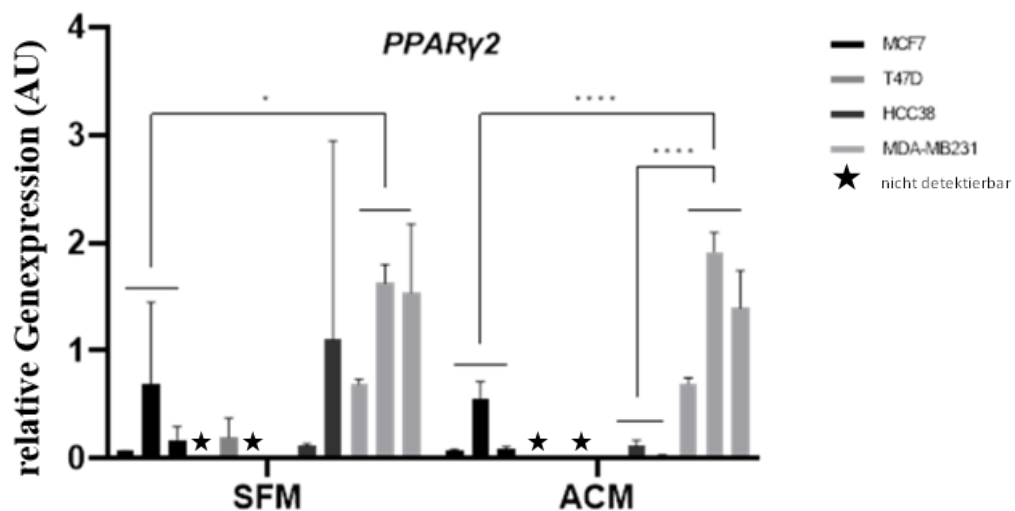


Abbildung 19: PPAR γ_2 . Dargestellt ist die relative PPAR γ_2 -Expression (in AU) in den Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 nach der Inkubation in SFM und in Anwesenheit von ACM (Mittelwert $\pm$ SEM). Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt (* entspricht $p = 0,05$ bis $0,0332$; ** $p = 0,0332$ bis $0,0021$; *** $p = 0,0021$ bis $0,0002$; **** $p < 0,0001$). Die PPAR γ_2 -Expression in den T47D Zellen war nicht detektierbar. Aufgrund der Heterogenität der PPAR-Expression zwischen den einzelnen Versuchen wurden die Einzelexperimente in separaten Balken dargestellt.

Nach der Inkubation im Kontrollmedium SFM wiesen MCF7 und HCC38 eine geringe PPAR γ_2 -Expression auf (Tabelle 13). Am stärksten wurde PPAR γ_2 in den MDA-MB231 Zellen exprimiert. Nach der Inkubation im Kontrollmedium SFM wurde in den TNBC Zelllinien eine

doppelte bzw. vierfache relative Genexpression im Vergleich zu den detektierbaren ER+ MCF7 Zellen nachgewiesen. Der Rückgang der relativen Genexpression in Anwesenheit von ACM in den MCF7 und HCC38 Zellen war nicht statistisch signifikant (Tabelle 13). In den TNBC MDA-MB231 Zellen änderte sich die *PPAR* γ ₂-Expression nicht in Anwesenheit von ACM.

	SFM	ACM	Fold Change	P-Wert
MCF7	0,3	0,26	0,8	0,7964
T47D	nicht detektierbar	nicht detektierbar	–	–
HCC38	0,6	0,1	0,03	0,3233
MDA-MB231	1,3	1,3	1,0	0,8491

Tabelle 13: *PPAR* γ ₂. Dargestellt ist eine Übersicht der relativen *PPAR* γ ₂-Expression (in AU) in den Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 nach der Inkubation im Kontrollmedium SFM und in Anwesenheit von ACM. Der Fold Change ist zur Beurteilung des relativen Genexpressionsniveaus mit aufgeführt. Die Mittelwerte der *ANGPTL4* mRNA Expression sind als arbitrary units (AU) normalisiert auf betaActin. Eine statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ festgelegt. Es wurde ein One Way ANOVA (Post hoc Tukey-Test) durchgeführt.

Auch für *PPAR* γ wurden Western Blot-Analysen für weitere Untersuchungen auf Proteinebene durchgeführt (Abbildung 20). Die Proteinbanden für *PPAR* γ ₁ (53 kDa) und *PPAR* γ ₂ (57 kDa) waren nicht bei allen Zelllinien detektierbar. In T47D Zellen konnte *PPAR* γ ₂ nicht detektiert werden. *PPAR* γ ₁ war in allen Brustkrebszellen schwach detektierbar, wobei die Expression in MDA-MB231 und T47D Zellen geringer erschien als in MCF7 und HCC38 Zellen. Die Proteinbanden für *PPAR* γ ₂ ließen Unterschiede zwischen den einzelnen Brustkrebszelllinien erkennen. Die stärkste Bandenausprägung wiesen hier MDA-MB231 Zellen auf. Schwächer war *PPAR* γ ₂ in MCF7 Zellen exprimiert. Kaum detektiert werden konnte *PPAR* γ ₂ in HCC38 Zellen. T47D Zellen zeigten keine Expression von *PPAR* γ ₂. Die Ausprägungen der Proteinbanden waren für beide *PPAR* γ -Isoformen sowohl nach der Inkubation in SFM als auch in Anwesenheit von ACM vergleichbar. Die Untersuchungen auf Proteinebene bestätigten die Beobachtungen, die aus den RT-PCR-Experimenten auf RNA-Ebene gewonnen werden konnten.

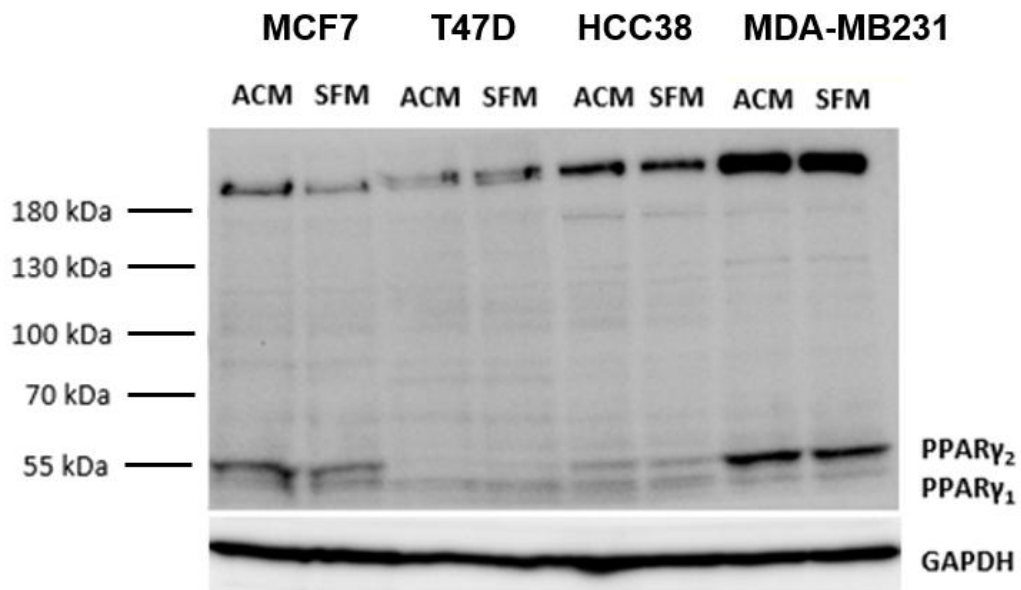


Abbildung 20: PPAR $\gamma_{1/2}$ – Western Blot. Die Expression von PPAR γ_1 (Molekulargewicht von 53 kDa) und PPAR γ_2 (Molekulargewicht von 57 kDa) war in den Brustkrebszelllinien MCF7, HCC38 und MDA-MB231 detektierbar. In den T47D Zellen konnte keine Expression festgestellt werden. Als Referenz wurde GAPDH verwendet.

3.4.3 PPAR β/δ

PPAR β/δ wurde in allen vier Brustkrebszelllinien exprimiert (Abbildung 21).

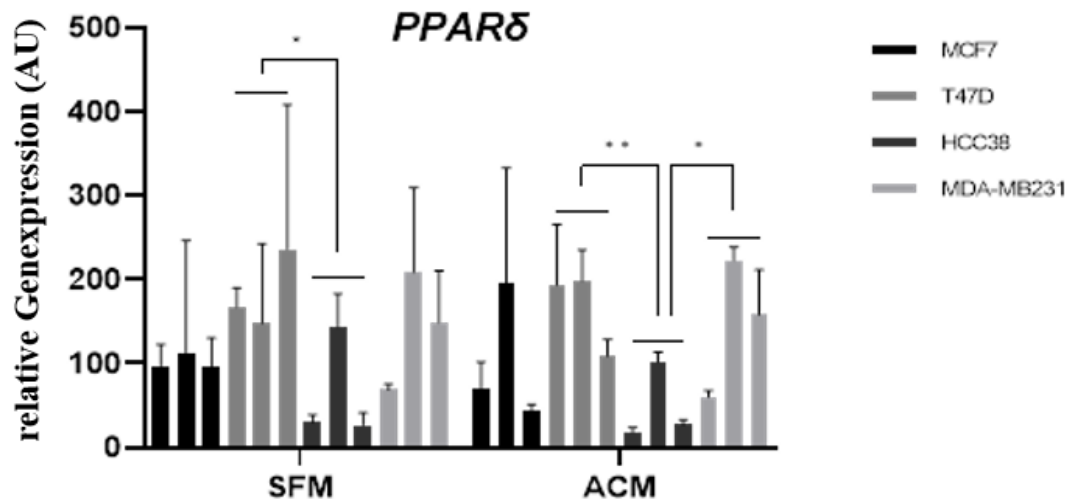


Abbildung 21: PPAR δ . Dargestellt ist die relative PPAR δ -Expression (in AU) in den Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 nach der Inkubation in SFM und in Anwesenheit von ACM (Mittelwert $\pm$ SEM). Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt (* entspricht $p = 0,05$ bis $0,0332$; ** $p = 0,0332$ bis $0,0021$; *** $p = 0,0021$ bis $0,0002$; **** $p < 0,0001$). Aufgrund der Heterogenität der PPAR-Expression zwischen den einzelnen Versuchen wurden die Einzelerperimente in separaten Balken dargestellt.

PPAR β/δ stellte den am stärksten exprimierten PPAR-Subtyp in den vier untersuchten Brustkrebszelllinien dar (Tabelle 14). Nach der Inkubation in SFM wurde das PPAR β/δ am stärksten in den T47D Zellen exprimiert – gefolgt von den MDA-MB231 und MCF7 Zellen. Die niedrigste relative PPAR β/δ -Expression zeigten die TNBC HCC38 Zellen. In der Anwesenheit von ACM blieb das relative Genexpressionsniveau sowohl in den beiden ER+ als auch TNBC Zelllinien weitestgehend konstant. Die Änderungen waren für alle vier Brustkrebszelllinien nicht statistisch signifikant (Tabelle 14).

	SFM	ACM	Fold Change	P-Wert
MCF7	102,0	102,4	1,0	0,9925
T47D	183,8	167,0	1,0	0,6869
HCC38	66,7	49,0	0,8	0,4804
MDA-MB231	142,2	146,9	1,0	0,9022

Tabelle 14: PPAR δ . Dargestellt ist eine Übersicht der relativen PPAR δ -Expression (in AU) in den Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 nach der Inkubation im Kontrollmedium SFM und in Anwesenheit von ACM. Der Fold Change ist zur Beurteilung des relativen Genexpressionsniveaus mit aufgeführt. Die Mittelwerte der ANGPTL4 mRNA Expression sind als arbitrary units (AU) normalisiert auf betaActin. Eine statistische Signifikanz wurde für $p > 0,05$ festgelegt. Es wurde ein One Way ANOVA (Post hoc Tukey-Test) durchgeführt.

Die im Anschluss durchgeführten Western Blot-Analysen zeigten, dass PPAR β/δ (55 kDa) auf Proteinebene in allen vier Brustkrebszelllinien exprimiert war (Abbildung 22). In T47D Zellextrakte konnte die stärkste Expression nachgewiesen werden. Geringer war die PPAR β/δ -Expression in MDA-MB231 Zellen. Die schwächste PPAR β/δ -Expression wiesen die MCF7 und HCC38 Zellen auf. Die PPAR β/δ -Expression unterschied sich nach der Inkubation im Kontrollmedium SFM im Vergleich zur Anwesenheit von ACM in allen vier untersuchten Brustkrebszelllinien nicht statistisch signifikant.

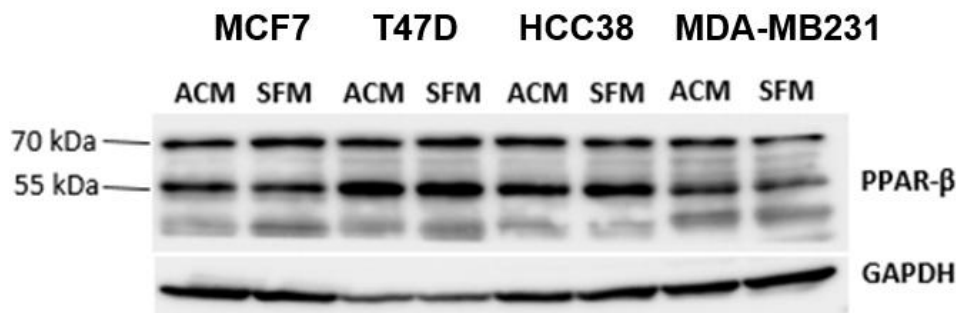


Abbildung 22: PPAR β/δ – Western Blot. Die Expression von PPAR β/δ (Molekulargewicht von 55 kDa) war in allen vier untersuchten Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 detektierbar. Als Referenz wurde GAPDH verwendet.

Die Ergebnisse der Western Blot-Analysen stimmten mit den Beobachtungen auf RNA-Ebene überein. Alle Zellen exprimierten PPAR β/δ , wobei die T47D Zellen in beiden Fällen die

höchste Expression aufwiesen. Da sowohl die Expression auf RNA- und Proteinebene in den drei anderen untersuchten Brustkrebszelllinien ähnlich war, wurde kein Unterschied hinsichtlich des Hormonrezeptorstatus in Bezug auf PPAR β/δ nachgewiesen. Änderungen in Anwesenheit von ACM traten weder bei den Untersuchungen auf Proteinebene noch in den RT-PCR-Experimenten (RNA-Ebene) auf. Diese Beobachtung trifft auf alle untersuchten PPAR-Subtypen zu.

3.4.4 Gegenüberstellung der untersuchten Brustkrebszelllinien hinsichtlich der Änderung ihrer *PPAR*-Genexpression in Anwesenheit von ACM

Abbildung 23 liefert einen vergleichenden Überblick über die Änderungen der relativen *PPAR*-Genexpressionen (fold change (in AU)) für die ER⁺ und TNBC Brustkrebszelllinien.

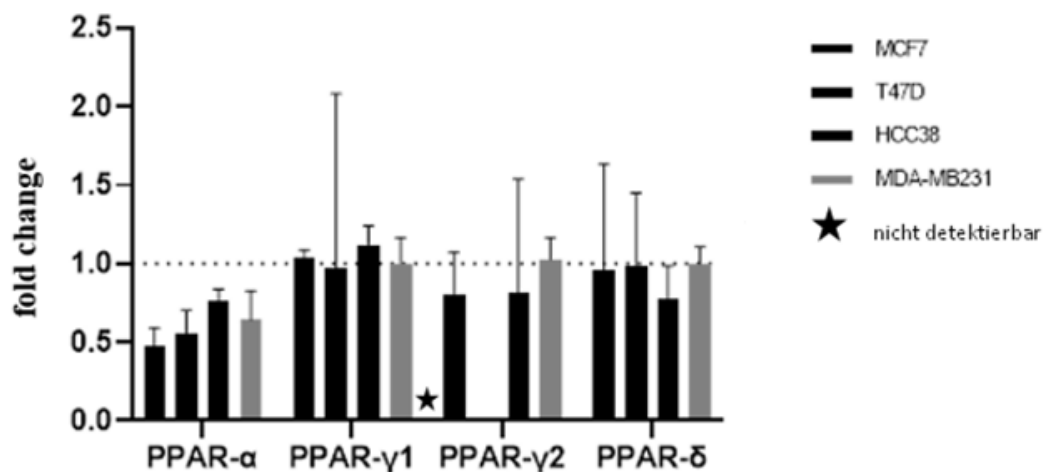


Abbildung 23: Änderung der *PPAR*-Genexpression in Anwesenheit von ACM. Dargestellt sind hier als Übersicht und Zusammenfassung die Genexpressionsänderung der *PPARs* in Anwesenheit von ACM (fold change).

Anders als bei den Untersuchungen der *PPAR*-Zielgene änderte sich die Expression der *PPAR*-Gene selbst in Anwesenheit von ACM kaum. Lediglich der Rückgang der *PPAR α* -Expression in den ER⁺ MCF7, T47D und TNBC MDA-MB231 Zellen war statistisch signifikant. In Anwesenheit von ACM halbierte sich die relative Genexpression in diesen drei untersuchten Brustkrebszelllinien. Interessanterweise war *PPAR γ 2* in den T47D Zellen auf RNA- als auch auf Pro-

teinebene nicht detektierbar. Die fehlende relative *PPAR* γ ₂-Expression stellte den einzigen Unterschied zwischen den untersuchten Brustkrebszelllinien dar. Ansonsten verhielten sich die ER+ und TNBC Zellen hinsichtlich ihrer Änderung der relativen *PPAR*-Genexpression ähnlich und es kam zu keiner signifikanten Expressionsänderung in Anwesenheit von ACM.

4 Diskussion

Adipositas ist mit einer Vielzahl ernsthafter gesundheitlicher Probleme und Folgeerkrankungen assoziiert. Adipozyten im Brustfettgewebe wird eine Rolle in der Pathogenese des Mammakarzinoms, dessen Progression und Metastasierung zuteil (Wu et al. 2023). Die unterschiedliche Karzinogenese in Abhängigkeit des Hormonrezeptorstatus führte uns zu der Fragestellung, wie sich sekretierte Faktoren des Fettgewebes auf die Expression von PPARs und von ausgewählten PPAR-Zielgenen in den vier Brustkrebszelllinien MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 auswirken und inwiefern sich ER⁺ und TNBC Zellen dahingehend unterscheiden. Außerdem wurde untersucht welche Veränderungen der zellulären Lipidkomposition in den Brustkrebszellen in Anwesenheit von ACM auftreten.

4.1 Veränderungen des zellulären Lipidoms nach Inkubation mit ACM sind Zelltyp-spezifisch

In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten bereits Veränderungen des zellulären Lipidmetabolismus sowie eine gesteigerte β -Oxidationsrate in TNBC Zellen in Anwesenheit von ACM gezeigt werden (Blücher et al. 2020). ER⁺ Brustkrebszellen wurden in diesem Zusammenhang nicht untersucht. Ebenso ist bisher nicht bekannt, welche Auswirkungen die Anwesenheit von ACM auf die zelluläre Lipidkomposition in ER⁺ und TNBC Zellen hat. In der vorliegenden Arbeit konnte mittels massenspektrometrisch basierter Lipidomics gezeigt werden, dass die Anwesenheit von ACM zu einer Steigerung der Akkumulation an Neutralfetten, insbesondere der TG, in allen vier untersuchten Brustkrebszelllinien (MCF7, T47D, HCC38, MDA-MB231) führte. Wir beobachteten zudem unterschiedliche TG-Konzentrationen in Abhängigkeit des Hormonrezeptorstatus. Während die TNBC basal (bei Kultivierung im Kontrollmedium SFM) geringere TG-Konzentrationen als die ER⁺ Zellen aufwiesen, war der Anstieg der TG-Konzentration in Anwesenheit von ACM in den TNBC deutlich stärker ausgeprägt als in den ER⁺ Zellen. Die von uns untersuchten TNBC zeigten somit in Anwesenheit von ACM höhere intrazelluläre TG-Konzentrationen als die ER⁺ Zellen. TNBC Zellen nehmen die zur Verfügung stehenden extrazellulären TG auf und speichern diese intrazellulär (Yoon et al. 2021; Taborda Ribas et al. 2024). In Vorarbeiten konnte unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen,

dass ACM-behandelte TNBC Zellen einen ausgeprägten aggressiveren Zellphänotyp mit gesteigerten Wundheilungs-, Proliferations- und Invasionsfähigkeiten aufweisen (Blücher et al. 2020). Diese Zelleigenschaften stehen vermutlich in direktem Zusammenhang mit der erhöhten intrazellulären TG-Akkumulation in Anwesenheit von ACM. ER+ Zellen weisen hingegen in Anwesenheit von ACM eine geringere TG-Akkumulation als TNBC Zellen auf. Die Regulation der Fettsäureaufnahme wird durch ER abhängige Signalwege beeinflusst. Östrogen bindet an die ER und reguliert Gene, die am Fettsäuretransport in die Zelle beteiligt sind. Die effektive intrazelluläre TG-Aufnahme sinkt (Miziak et al. 2023). ACM ist ein aus humanem Fettgewebe gewonnenes Präparat. Es scheinen entsprechende Liganden vorhanden zu sein, die an ER binden und somit den Transport von Fettsäuren in die ER+ Zellen regulieren können. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die geringere TG-Akkumulation in den ER+ Zellen im Vergleich zu den TNBC in Anwesenheit von ACM.

Konzentrationsunterschiede zwischen ER+ und TNBC Zellen wurden auch für andere Lipidklassen wie DG, Cer und einige Glycerophospholipide (LPC, LPE, PA, PE P, PC) beobachtet. In TNBC Zellen zeigten sich höhere Konzentrationen dieser Lipide als in ER+ Zellen. Unsere Erkenntnisse stimmen mit den Lipidomanalysen von Hilvo et al. überein (Hilvo et al. 2011). In der Studie von Hilvo et al. wurden die Experimente an ER+ (ZR-75-1), TNBC Zellen (MDA-MB468) und der benignen MCF10A Zelllinie durchgeführt. Die Zelllinien wurden dazu in nicht weiter modifizierten Zellkulturmedium kultiviert und lipidomische Analysen in Abhängigkeit des ER Status durchgeführt. Auch sie beschrieben höhere Konzentrationen der membranständigen Phospholipide in den TNBC als in ER+ Zellen. Dies trifft kongruent zu unseren Ergebnissen v.a. auf die PE P und PC zu (Hilvo et al. 2011). Wir untersuchten – neben des Einflusses des Hormonrezeptorstatus – auch die Auswirkungen einer lipidreichen Umgebung (ACM) auf die Lipidakkumulation in den eingesetzten Brustkrebszellen. Die Anwesenheit von ACM führte zu einem Anstieg der Phospholipidkonzentration. Der höhere Phospholipidanteil in TNBC im Vergleich zu ER+ Zellen bleibt bestehen. Eine erhöhte Konzentration an Phospholipiden geht mit einer Änderung der Membraneigenschaften einher. Die Membranfluidität und -durchlässigkeit steigt (Sezgin et al. 2015; Sezgin et al. 2017), was zu verbesserten Metastasierungs- und Invasionsfähigkeiten der Krebszelle beiträgt (Vogel et al. 2024).

Wir stellten auch höhere Cer-Konzentrationen in den TNBC als in den ER+ Zellen fest. Dieser Befund zeigte sich bereits bei Inkubation der Zellen in Kontrollmedium. Diskrepanz hierzu be-

schrieben Hilvo et al. geringere Cer-Konzentration in den TNBC als in ER+ Zellen bei vergleichbaren Zellkulturbedingungen (Hilvo et al. 2011), allerdings handelte es sich um unterschiedliche Brustkrebszelllinien. Die Zugabe von ACM führte zu einem weiteren Anstieg der Cer-Konzentration in den TNBC Zellen, nicht jedoch in den ER+ Zellen. Für Cer konnte bereits ein positiver Effekt auf die Proliferation von Brustkrebszellen nachgewiesen werden (Hartmann et al. 2012). Daher scheint es möglich, dass der durch die Anwesenheit von ACM induzierte Anstieg der Cer-Konzentration in TNBC deren Proliferation fördert. Dies könnte darauf hindeuten, dass Tumore in einer lipidreichen Umgebung (adipöse Patienten) schneller wachsen. Vor allem langkettigen Cer wurde diese Eigenschaft zugesprochen (Hartmann et al. 2012). In allen vier von uns untersuchten Brustkrebszelllinien traten vermehrt langkettige Cer auf. Cer mit einer längeren Molekülkette scheinen unabhängig vom Hormonrezeptorstatus aufzutreten.

Alle anderen von uns untersuchten Membranlipide weisen in den TNBC längere Molekülketten auf als in den ER+ Zellen. Wir beobachteten in TNBC Zellen außerdem vermehrt mehrfach ungesättigte Fettsäuren im Vergleich zu ER+ Zellen. Diskrepant dazu zeigten frühere Untersuchungen keinen Unterschied bezüglich des Sättigungsgrades der Membranlipide in ER+ und TNBC Zellen (Hilvo et al. 2011). Hierbei handelte es sich jedoch um andere als die von uns eingesetzten Brustkrebszellen. Membranlipide beeinflussen u.a. die Fluidität und Permeabilität, wodurch sich mit unterschiedlicher Kettenlänge auch die biophysikalischen Eigenschaften einer Zelle ändern (Ollila et al. 2007). Eine steigende Membranlipidkettenlänge führt zu einer Erhöhung der Membranfluidität und einer Reduktion der Permeabilität, welche wiederum Einfluss auf die Aktivität von Rezeptoren und Signalkaskaden ausüben (Ollila et al. 2007; Hilvo et al. 2011). Auch der Sättigungsgrad der Membranlipide übt einen entscheidenden Einfluss auf die biophysikalischen Eigenschaften der Membran aus. So enthalten flüssigere Membranbereiche vermehrt ungesättigte Lipide, während eine erhöhte Anzahl an gesättigten Lipiden die Membrandichte erhöht (Sezgin et al. 2015; Ballweg et al. 2020).

In welchem Ausmaß die unterschiedlichen Sättigungsgrade die Migration und Proliferation von Brusttumorzellen in Abhängigkeit des Hormonrezeptorstatus beeinflussen und welche Rolle eine lipidreiche Umgebung dabei spielt, sollte durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

4.2 Der Einfluss des Hormonrezeptorstatus und der Anwesenheit von ACM auf die Expression ausgewählter PPAR-Zielgene

Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die Anwesenheit von ACM zur Hochregulierung der Expression der *PPAR*-Zielgene *ANGPTL4*, *PLIN2*, *PDK4* und *CPT1A* in TNBC führt (Blücher et al. 2020). Da in den vorangegangenen Experimenten nur TNBC Zellen betrachtet wurden, stellte sich die Frage, welche Rolle der Hormonrezeptorstatus bei der Expression dieser *PPAR*-Zielgene spielt und ob auch die Expression anderer *PPAR*-Zielgene durch die Anwesenheit von ACM beeinflusst wird.

Die Anwesenheit von ACM führte zu einer gesteigerten *ANGPTL4*-Expression sowohl in den TNBC Zelllinien HCC38 und MDA-MB231 als auch den ER+ Zelllinien MCF7 und T47D. Die Induktion der *ANGPTL4*-Genexpression war jedoch in den TNBC signifikant stärker ausgeprägt. Dies deutet darauf hin, dass der Verlust des Hormonrezeptorstatus zu einer Steigerung der Induzierbarkeit der *ANGPTL4*-Expression in TNBC Zellen führt. Die Ursache hierfür könnte in einer möglicherweise hormonrezeptorabhängigen Expression der PPAR-Gene selbst liegen. Die Expression der hier untersuchten PPAR-Zielgene wird nicht exklusiv durch PPARs gesteuert. Deshalb könnten auch andere Transkriptions- und Signalwege, die in TNBC und ER+ Zellen unterschiedlich sind, einen Einfluss auf deren Expression ausüben. Bereits untersucht wurden in diesem Zusammenhang u.a. der HIF-1 α - oder MAPK/PI3K-AKT-Signalweg. Eine Aktivierung von Stress- und Hypoxie-Pfaden (z.B. HIF-1 α) kann in TNBC Zellen zu einer Hochregulierung der *ANGPTL4*-Expression führen (Chen et al. 2014; Xu 2019). In ER+ Zellen sind diese meist geringer aktiv. Zudem wurden in den TNBC Zellen überaktive MAPK/PI3K-AKT-Signalwege nachgewiesen. Diese könnten zu einer stärkeren Induktion der *ANGPTL4*-Expression beitragen (Zhang et al. 2024a). Die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein-kinase (MAPK) ist Teil eines redoxbasierten Überlebensmechanismus, der das Wachstum und das Überleben von Krebszellen begünstigt (Zhu et al. 2011; La Paglia et al. 2017). Mehrere Studien beschrieben die Anwesenheit und Hochregulation von *ANGPTL4* in soliden Tumoren verschiedener Gewebetypen im Vergleich zu gesundem Gewebe. So identifizierten sie eine gesteigerte *ANGPTL4*-Expression nicht nur in Brustkrebs, sondern auch im Nierenzellkarzinom, Plattenepithelkarzinom, Hepatokarzinom sowie bei Darm- und Prostatakrebs (Nakayama et al. 2010; Nakayama et al. 2011; Shibata et al. 2010; Wang et al. 2010; Le Jan et al. 2003; La Paglia et al. 2017).

Auch die Expression des PPAR-Zielgens *PLIN2* scheint bei mehreren Malignomen fehlreguliert zu sein; u.a. wurde *PLIN2* in hepatozellulären Karzinomen häufig hochreguliert (Liu et al. 2022). Wir stellten bei Kultur im Kontrollmedium eine erhöhte *PLIN2*-Expression in den ER+ T47D Zellen und den TNBC MDA-MB231 Zellen fest. Ein Unterschied in Abhängigkeit des Hormonrezeptorstatus konnte demnach nicht belegt werden. Die Anwesenheit von ACM führte lediglich in den MDA-MB231 Zellen zu einem deutlichen signifikanten Anstieg der *PLIN2*-Expression. Interessanterweise änderte sich in den HCC38 Zellen die *PLIN2*-Expression in Anwesenheit von ACM wenig. Es wird diskutiert, dass es sich bei MDA-MB231 um eine aggressivere Brustkrebszelllinie als bei HCC38 handelt. Wang et al. berichteten, dass MDA-MB231 Zellen im Vergleich zu HCC38 Zellen durch Doxorubicin induzierte Zellstressveränderungen besser tolerieren, was sich in einer stabilen ROS-Konzentration sowie einer erhöhten Zellproliferation und -invasion äußert (Wang et al. 2024; Nakamura und Takada 2021). Luo et al. beschrieben den Zusammenhang zwischen einer *PLIN2*-Überexpression und einer erhöhten Migration und Invasion von Tumorzellen (Luo et al. 2025). Schlechtere Eigenschaften des Tumors scheinen sowohl in vitro als auch in vivo mit einer gesteigerten *PLIN2*-Expression einherzugehen (Zhang et al. 2021; Luo et al. 2025).

Die Expression des PPAR-Zielgens *PDK4* stieg in Anwesenheit von ACM sowohl in den TNBC als auch den ER+ Brustkrebszelllinien an. Den stärksten Anstieg der *PDK4*-Expression wiesen die TNBC MDA-MB231 Zellen auf. Einen Zusammenhang zwischen der Überexpression an *PDK4* in Anwesenheit von Fettsäuren in MDA-MB231 Zellen beschrieben auch Pettersen et al. (Pettersen et al. 2019). MDA-MB231 Zellen, die mit einer modifizierten Fettsäure (Tetradecylthioessigsäure) behandelt wurden, wiesen eine erhöhte *PDK4*-Expression und eine gesteigerte Fettsäureoxidationsrate im Vergleich zu unbehandelten MDA-MB231 Zellen auf (Pettersen et al. 2019). Die in dem lipidreichen ACM enthaltenen Fettsäuren könnten den Brustkrebszellen unabhängig vom Hormonrezeptorstatus als wertvolle Energieträger dienen. Dwyer et al. beobachteten in MCF7 und MDA-MB231 eine höhere *PDK4*-Expression im Vergleich zu nicht tumorigenen MCF10A Zellen (Dwyer et al. 2023). Auch zuvor erwähnte andere Transkriptions- und Signalwege könnten die *PDK4*-Expression mit beeinflussen. Es ist bekannt, dass metabolische Gene wie *PDK4* durch Zellstress bzw. Hypoxie (über HIF- α) induziert werden (Lee et al. 2012). Eine Hemmung der *PDK4* führte nachweislich zu einer geringeren Migration der TNBC Zellen (Dwyer et al. 2023).

Ein wichtiges Schrittmacherenzym der Fettsäureoxidation ist CPT1A, welches durch das PPAR-Zielgen *CPT1A* codiert wird (Jariwala et al. 2021). Wir wiesen basal im Kontrollmedium SFM eine höhere *CPT1A*-Expression in den ER+ Zellen als in den TNBC Zellen nach. Auch Jariwala et al. beschrieben 2021 übereinstimmend dazu eine erhöhte *CPT1A*-Expression in ER+ Zellen (u.a. MCF7 und T47D) im Vergleich zu ER- und nicht tumorigenen MCF10A Zellen unter Standardbedingung (Jariwala et al. 2021). In lipidreicher Umgebung (ACM) zeigten v.a. die TNBC Zellen eine gesteigerte *CPT1A*-Expression. Eine erhöhte CPT1A-Aktivität fördert die mitochondriale Fettsäureoxidation durch einen erleichterten Transport langkettiger Fettsäuren über die innere Mitochondrienmembran und unterstützt somit die Energiegewinnung aus Fettsäuren (Houten et al. 2016; Liang 2023). Weshalb die Anwesenheit von ACM v.a. Einfluss auf die *CPT1A*-Expression in den TNBC und weniger in den ER+ Zellen hat, bleibt zu klären und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Eine *CPT1A*-Hemmung und eine daraus resultierende Reduktion der Fettsäureoxidation erwies sich bereits bei verschiedenen Krebsarten wie Leukämien, des Glioblastoms, des Nasopharynxkarzinoms und des epithelialen Ovarialkarzinoms als möglicher Therapieansatz (Shi et al. 2016; Cirillo et al. 2014; Du et al. 2019; Zhu et al. 2019) und könnte demzufolge auch für die Behandlung von Brustkrebs von Bedeutung sein.

FAS ist ein PPAR-Zielgen, dessen Expression in lipidreicher Umgebung (ACM) in allen vier untersuchten Brustkrebszelllinien unabhängig des Hormonrezeptorstatus sank. Die Anwesenheit des lipidreichen ACMs verringert möglicherweise die FAS-vermittelte *de-novo*-Lipogenese. In unseren Untersuchungen war die *FAS*-Expression in MCF7 Zellen und den beiden TNBC Linien vergleichbar. Die T47D Zellen zeigten sowohl basal im Kontrollmedium SFM als auch in Anwesenheit von ACM eine deutlich höhere *FAS*-Expression als die MCF7 und TNBC Zellen. Interessanterweise scheint die Supprimierung der *FAS*-Expression in lipidreicher Umgebung somit in den ER+ T47D Zellen geringer ausgeprägt zu sein. In ER+ Zellen wurde – trotz reichlich vorhandener Fettsäuren in der Mikroumgebung – eine ausgeprägte *de-novo*-Fettsäuresynthese beobachtet (Kusakabe et al. 2000; Menendez und Lupu 2007; Ward et al. 2025). Diese Beobachtung führt gemeinsam mit unseren Ergebnissen zu der Annahme, dass die T47D Zellen in Anwesenheit von ACM die *de-novo*-Fettsäuresynthese in höherem Maße weiter betreiben als die MCF7 und TNBC Zellen. In den MCF7 und MDA-MB231 Zellen wurde zudem bereits eine *FAS*-hemmende Wirkung von α -Mangostin beschrieben. Durch α -Mangostin sinkt demnach die *FAS*-Expression in den untersuchten Brustkrebszellen (Li et al. 2014).

Es fehlt bislang allerdings jeglicher Zusammenhang zur Adipositas bzw. lipidreicher Umgebung. Es wäre ein interessanter Ansatz dies weiter zu verfolgen.

4.3 Der Einfluss des Hormonrezeptorstatus und der Anwesenheit von ACM auf die Expression der PPAR-Subtypen

Nachdem die untersuchten ER⁺ und TNBC Zellen teils eine unterschiedliche basale und durch ACM induzierbare Expression von PPAR-Zielgenen zeigten, stellten wir uns die Frage, inwiefern der Hormonrezeptorstatus und die Anwesenheit von ACM die Expression der PPAR-Gene selbst beeinflusst. MCF7, T47D, HCC38 und MDA-MB231 Zellen wurden auf RNA- und Proteinebene untersucht, um feststellen zu können ob die Genexpression mit der Proteinmenge korreliert. Es zeigte sich eine hohe Variabilität der Ergebnisse bei dreimaliger Durchführung der qPCR- und Western Blot-Analysen. Dennoch lassen sich grundsätzliche Schlüsse aus den durchgeführten Experimenten ziehen.

PPAR α spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Fettsäureoxidation, der Lipoproteinsynthese und bei Entzündungsreaktionen (Lee et al. 1995; Mei et al. 2009; Mukherjee et al. 2008; Pyper et al. 2010). Im Kontext von Tumorerkrankungen wurde eine *PPAR* α -Überexpression bereits beim hepatozellulären Karzinom beschrieben (Mukherjee et al. 2008; Pyper et al. 2010). Eine PPAR α Aktivierung durch Ligandenbindung führt zur transkriptionellen Hochregulation von Zielgenen die Enzyme kodieren, welche an der Aufnahme von Fettsäuren, dem Transport in die Mitochondrien, der β -Oxidation und der daraus resultierenden ATP-Produktion und Ketogenese beteiligt sind (Wang et al. 2020; Małodobra-Mazur et al. 2024). Als PPAR α -Liganden fungieren u.a. Fettsäuren und Fettsäurederivate (Hostetler et al. 2005; Narala et al. 2010). In den ER⁺ MCF7 Zellen war die *PPAR* α -Expression auf RNA-Ebene im Vergleich zu den anderen untersuchten Brustkrebszellen am niedrigsten. Die geringste PPAR α -Proteinmenge war in Zellextrakten der MDA-MB231 Zellen nachweisbar. Unabhängig des Hormonrezeptorstatus kam es bei Anwesenheit von ACM in drei der vier eingesetzten Brustkrebszelllinien zu einer signifikanten Reduktion der *PPAR* α -Expression auf mRNA-Ebene, während die Proteinexpression unverändert blieb. Diese Diskrepanz zwischen Genexpressions- und Proteinebene deutet auf eine komplexe, mehrstufige Regulation von PPAR α hin. Als ligandabhängiger nukleärer Rezeptor wird die Proteinhalbwertszeit und Stabilität von PPAR α

maßgeblich durch die Bindung endogener Liganden beeinflusst werden (Blanquart et al. 2002). ACM stellt eine reichhaltige Quelle für freie Fettsäuren und Lipidderivate dar (Blücher et al. 2020), die als natürliche PPAR α -Liganden fungieren können. Die Bindung dieser Liganden kann zu einer Konformationsänderung des Rezeptors führen, die dessen proteasomalen Abbau reduziert und somit zur Stabilisierung des PPAR α -Proteins beiträgt (Glass und Rosenfeld 2000; Dennis et al. 2001; Blanquart et al. 2002). In diesem Kontext wäre eine unveränderte PPAR α Proteinexpression trotz reduzierter mRNA-Level plausibel.

Ein weiterer relevanter Aspekt ist eine mögliche negative Rückkopplungsregulation der PPAR α -Expression. So konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung nukleärer Rezeptoren zur Suppression ihrer eigenen Transkription führen kann, um eine überschießende Signalaktivierung zu verhindern (Liu et al. 2006; Kersten 2014). Vor diesem Hintergrund könnte eine durch ACM vermittelte Aktivierung von PPAR α in den Brustkrebszellen eine Abnahme der PPAR α mRNA-Expression induzieren, ohne dass dies mit einer Reduktion der Proteinmenge einhergeht.

Nicht zuletzt könnten auch methodische Unterschiede in der Sensitivität zwischen qPCR- und Western Blot-Analysen zur beobachteten Diskrepanz beitragen. Auf Proteinebene lassen sich mithilfe von Western Blot-Analysen in der Regel lediglich größere Konzentrationsunterschiede feststellen, während qPCR-Analysen der mRNA-Expression eine deutlich höhere Sensitivität aufweisen und bereits geringe Konzentrationsunterschiede nachweisen können (Ghosh et al. 2014; Park et al. 2014).

Auf die PPAR $\gamma_{1/2}$ und PPAR β/δ -Expression hatte weder die Anwesenheit von ACM noch der Hormonrezeptorstatus einen Einfluss – sowohl auf Genexpressions- als auch auf Proteinebene. Interessanterweise wiesen die T47D Zellen sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene eine sehr geringe (PPAR γ_1) bzw. eine nicht detektierbare (PPAR γ_2) Expression auf. Dieses Erkenntnis der ER⁺ T47D Zelllinie ist so bislang in der Literatur noch nicht beschrieben. T47D Zellen scheinen PPAR $\gamma_{1/2}$ entbehren zu können. Während PPAR γ_1 ubiquitär exprimiert wird, ist die Expression PPAR γ_2 v.a. auf das Fettgewebe beschränkt (Escher et al. 2001; Werman et al. 1997). PPAR γ reguliert die Fettspeicherung und den Glukosemetabolismus entscheidend mit (Aprile et al. 2014; Soccio et al. 2015; Cataldi et al. 2021). Auch PPAR β/δ spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Fettsäure- und Glukosestoffwechsels (Neels und Grimaldi 2014; Daoudi et al. 2011; Doktorova et al. 2017). Möglicherweise übernimmt PPAR β/δ in den T47D

Zellen kompensatorisch die Funktion der *PPAR* $\gamma_{1/2}$. Unsere Ergebnisse zur Expression von *PPAR* β/δ stützen diese These: Die *PPAR* β/δ -Expression war auf RNA- und Proteinebene in den T47D Zellen (im Kontrollmedium und in Anwesenheit von ACM) höher als in den drei anderen untersuchten Brustkrebszelllinien. Die detaillierten zugrunde liegenden Mechanismen und die nur für T47D abweichend auftretenden *PPAR* $\gamma_{1/2}$ - und *PPAR* β/δ -Expressionen sollten Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Die Rolle der einzelnen PPAR-Subtypen wird im Zusammenhang mit Tumorgenese, Tumorstoffwechsel und der Proliferation von Tumorzellen kontrovers diskutiert (Lamas Bervejillo und Ferreira 2019; Rubenstrunk et al. 2007; Zhang et al. 2024b). Im Allgemeinen scheinen PPARs sowohl tumorfördernde als auch -hemmende Effekte aufzuweisen (Ahmadian et al. 2013; Zhang et al. 2024b). Die Dysregulation von *PPAR* γ -Zielgenprofilen ist beispielsweise eng mit der Tumorgenese verbunden (Caruso et al. 2023; Liu et al. 2024). Eine *PPAR* γ -Aktivierung wird jedoch in anderen Quellen als krebsverhindernd beschrieben (Peters et al. 2012) und der Einsatz von *PPAR* γ -Agonisten sogar als Therapeutikum bei Lungenkarzinomen diskutiert (Reddy et al. 2016; Chi et al. 2021). Die Eigenschaften der PPARs scheinen kontext- und subtypabhängig zu sein (Lamas Bervejillo und Ferreira 2019; Rubenstrunk et al. 2007; Zhang et al. 2024b). Zugrundeliegende Mechanismen gilt es aufzuschlüsseln. Unsere Arbeit liefert eine erste Einschätzung zur Rolle der PPARs bei Brustkrebs.

Literaturverzeichnis

- Ackerman, Sarah E.; Blackburn, Olivia A.; Marchildon, François; Cohen, Paul (2017): Insights into the Link Between Obesity and Cancer. In: *Current obesity reports* 6 (2), S. 195–203. DOI: 10.1007/s13679-017-0263-x.
- Ahmadian, Maryam; Suh, Jae Myoung; Hah, Nasun; Liddle, Christopher; Atkins, Annette R.; Downes, Michael; Evans, Ronald M. (2013): PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. In: *Nature medicine* 19 (5), S. 557–566. DOI: 10.1038/nm.3159.
- Aprile, M.; Ambrosio, M. R.; D'Esposito, V.; Beguinot, F.; Formisano, P.; Costa, V.; Ciccociola, A. (2014): PPARG in Human Adipogenesis: Differential Contribution of Canonical Transcripts and Dominant Negative Isoforms. In: *PPAR research* 2014, S. 537865. DOI: 10.1155/2014/537865.
- Arce-Salinas, C.; Aguilar-Ponce, J. L.; Villarreal-Garza, C.; Lara-Medina, F. U.; Olvera-Caraza, D.; Alvarado Miranda, A. et al. (2014): Overweight and obesity as poor prognostic factors in locally advanced breast cancer patients. In: *Breast cancer research and treatment* 146 (1), S. 183–188. DOI: 10.1007/s10549-014-2977-8.
- Assmann, G.; Schulte, H.; Seedorf, U. (2008): Cardiovascular risk assessment in the metabolic syndrome: results from the Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) Study. In: *International journal of obesity (2005)* 32 Suppl 2, S11-6. DOI: 10.1038/ijo.2008.29.
- Badve, Sunil; Dabbs, David J.; Schnitt, Stuart J.; Baehner, Frederick L.; Decker, Thomas; Eusebi, Vincenzo et al. (2011): Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 24 (2), S. 157–167. DOI: 10.1038/modpathol.2010.200.
- Baenke, Franziska; Peck, Barrie; Miess, Heike; Schulze, Almut (2013): Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. In: *Disease models & mechanisms* 6 (6), S. 1353–1363. DOI: 10.1242/dmm.011338.
- Balaban, Seher; Shearer, Robert F.; Lee, Lisa S.; van Geldermalsen, Michelle; Schreuder, Mark; Shtein, Harrison C. et al. (2017): Adipocyte lipolysis links obesity to breast cancer growth: adipocyte-derived fatty acids drive breast cancer cell proliferation and migration. In: *Cancer & metabolism* 5, S. 1. DOI: 10.1186/s40170-016-0163-7.

Ballweg, Stephanie; Sezgin, Erdinc; Doktorova, Milka; Covino, Roberto; Reinhard, John; Wunnicke, Dorith et al. (2020): Regulation of lipid saturation without sensing membrane fluidity. In: *Nature communications* 11 (1), S. 756. DOI: 10.1038/s41467-020-14528-1.

Barb, Diana; Williams, Catherine J.; Neuwirth, Anke K.; Mantzoros, Christos S. (2007): Adiponectin in relation to malignancies: a review of existing basic research and clinical evidence. In: *The American journal of clinical nutrition* 86 (3), s858-66. DOI: 10.1093/ajcn/86.3.858S.

Behrens, Gundula; Gredner, Thomas; Stock, Christian; Leitzmann, Michael F.; Brenner, Hermann; Mons, Ute (2018): Cancers Due to Excess Weight, Low Physical Activity, and Unhealthy Diet. In: *Deutsches Arzteblatt international* 115 (35-36), S. 578–585. DOI: 10.3238/arztebl.2018.0578.

Benecke, Andrea; Vogel, Heiner (2003): Themenheft 16 "Übergewicht und Adipositas". Unter Mitarbeit von Robert Koch-Institut. Robert Koch-Institut. Online verfügbar unter <https://e-doc.rki.de/handle/176904/3165>.

Bentham et al. (2017): Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. In: *Lancet (London, England)* 390 (10113), S. 2627–2642. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)32129-3.

Blanquart, Christophe; Barbier, Olivier; Fruchart, Jean-Charles; Staels, Bart; Glineur, Corine (2002): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) turnover by the ubiquitin-proteasome system controls the ligand-induced expression level of its target genes. In: *J. biol. chem.* 277 (40), S. 37254–37259. DOI: 10.1074/jbc.M110598200.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. In: *Canadian journal of biochemistry and physiology* 37 (8), S. 911–917. DOI: 10.1139/o59-099.

Blücher, Christina; Iberl, Sabine; Schwagarus, Nancy; Müller, Silvana; Liebisch, Gerhard; Höring, Marcus et al. (2020): Secreted Factors from Adipose Tissue Reprogram Tumor Lipid Metabolism and Induce Motility by Modulating PPAR α /ANGPTL4 and FAK. In: *Molecular cancer research : MCR* 18 (12), S. 1849–1862. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-19-1223.

Blücher, Christina; Stadler, Sonja C. (2017): Obesity and Breast Cancer: Current Insights on the Role of Fatty Acids and Lipid Metabolism in Promoting Breast Cancer Growth and Progression. In: *Frontiers in endocrinology* 8, S. 293. DOI: 10.3389/fendo.2017.00293.

Burstein, H. J.; Curigliano, G.; Thürlimann, B.; Weber, W. P.; Poortmans, P.; Regan, M. M. et al. (2021): Customizing local and systemic therapies for women with early breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for treatment of early breast cancer 2021. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 32 (10), S. 1216–1235. DOI: 10.1016/j.annonc.2021.06.023.

Byon, Chang Hyun; Hardy, Robert W.; Ren, Changchun; Ponnazhagan, Selvarangan; Welch, Danny R.; McDonald, Jay M.; Chen, Yabing (2009): Free fatty acids enhance breast cancer cell migration through plasminogen activator inhibitor-1 and SMAD4. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 89 (11), S. 1221–1228. DOI: 10.1038/labinvest.2009.97.

Campbell, Michael J.; Tonlaar, Nathan Y.; Garwood, Elisabeth R.; Huo, Dezheng; Moore, Dan H.; Khramtsov, Andrey I. et al. (2011): Proliferating macrophages associated with high grade, hormone receptor negative breast cancer and poor clinical outcome. In: *Breast cancer research and treatment* 128 (3), S. 703–711. DOI: 10.1007/s10549-010-1154-y.

Caruso, Joseph A.; Wang, Xianhong; Murrow, Lyndsay M.; Rodriguez, Carlos Ivan; Chen-Tanyolac, Chira; Vu, Lisa et al. (2023): Loss of PPAR γ activity characterizes early protumorigenic stromal reprogramming and dictates the therapeutic window of opportunity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 120 (42), e2303774120. DOI: 10.1073/pnas.2303774120.

Cataldi, Simona; Costa, Valerio; Ciccodicola, Alfredo; Aprile, Marianna (2021): PPAR γ and Diabetes: Beyond the Genome and Towards Personalized Medicine. In: *Current diabetes reports* 21 (6), S. 18. DOI: 10.1007/s11892-021-01385-5.

Chang, Su-Hsin; Pollack, Lisa M.; Colditz, Graham A. (2013): Obesity, mortality, and life years lost associated with breast cancer in nonsmoking US Women, National Health Interview Survey, 1997-2000. In: *Preventing chronic disease* 10, E186. DOI: 10.5888/pcd10.130112.

Chang-Claude, Jenny; Becher, Heiko (2009): Studienergebnisbericht MARIE-Studie. Online verfügbar unter https://www.dkfz.de/de/epidemiologie-krebserkrankungen/download/MARIE_Studienbericht_2009_Website.pdf.

Chang-Claude, Jenny; Becher, Heiko (2014): MARIEplusStudienbericht2014pdf. Online verfügbar unter https://www.dkfz.de/de/epidemiologie-krebserkrankungen/download/MARIEplus_Studienbericht_2014.pdf.

Chang-Claude, Jenny; Becher, Heiko (2019): MARIEStudienbericht2019pdf. Online verfügbar unter https://www.dkfz.de/de/epidemiologie-krebserkrankungen/download/MARIE_Studienbericht_2019.pdf.

Chen, Xi; Iliopoulos, Dimitrios; Zhang, Qing; Tang, Qianzi; Greenblatt, Matthew B.; Hatzia-postolou, Maria et al. (2014): XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway. In: *Nature* 508 (7494), S. 103–107. DOI: 10.1038/nature13119.

Chi, Tiange; Wang, Mina; Wang, Xu; Yang, Ke; Xie, Feiyu; Liao, Zehuan; Wei, Peng (2021): PPAR- γ Modulators as Current and Potential Cancer Treatments. In: *Frontiers in oncology* 11, S. 737776. DOI: 10.3389/fonc.2021.737776.

Chung, Seung J.; Nagaraju, Ganji Purnachandra; Nagalingam, Arumugam; Muniraj, Nethaji; Kuppusamy, Panjamurthy; Walker, Alyssa et al. (2017): ADIPOQ/adiponectin induces cytotoxic autophagy in breast cancer cells through STK11/LKB1-mediated activation of the AMPK-ULK1 axis. In: *Autophagy* 13 (8), S. 1386–1403. DOI: 10.1080/15548627.2017.1332565.

Cirillo, Alessandra; Di Salle, Anna; Petillo, Orsolina; Melone, Mariarosa A. B.; Grimaldi, Giovanna; Bellotti, Alfredo et al. (2014): High grade glioblastoma is associated with aberrant expression of ZFP57, a protein involved in gene imprinting, and of CPT1A and CPT1C that regulate fatty acid metabolism. In: *Cancer biology & therapy* 15 (6), S. 735–741. DOI: 10.4161/cbt.28408.

Collignon, Joëlle; Lousberg, Laurence; Schroeder, Hélène; Jerusalem, Guy (2016): Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions - PubMed. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27284266/>, zuletzt aktualisiert am 20.05.2016.

Curtis, Christina; Shah, Sohrab P.; Chin, Suet-Feung; Turashvili, Gulisa; Rueda, Oscar M.; Dunning, Mark J. et al. (2012): The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. In: *Nature* 486 (7403), S. 346–352. DOI: 10.1038/nature10983.

Dai, Xiaofeng; Cheng, Hongye; Bai, Zhonghu; Li, Jia (2017): Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. In: *Journal of Cancer* 8 (16), S. 3131–3141. DOI: 10.7150/jca.18457.

Daoudi, Mehdi; Hennuyer, Nathalie; Borland, Michael G.; Touche, Veronique; Duhem, Christian; Gross, Barbara et al. (2011): PPAR β/δ activation induces enteroendocrine L cell GLP-1 production. In: *Gastroenterology* 140 (5), S. 1564–1574. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.01.045.

Dennis, A. P.; Haq, R. U.; Nawaz, Z. (2001): Importance of the regulation of nuclear receptor degradation. In: *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 6, D954-9. DOI: 10.2741/dennis.

Dietze, Eric C.; Chavez, Tanya A.; Seewaldt, Victoria L. (2018): Obesity and Triple-Negative Breast Cancer: Disparities, Controversies, and Biology. In: *The American journal of pathology* 188 (2), S. 280–290. DOI: 10.1016/j.ajpath.2017.09.018.

Doktorova, Marcela; Zwarts, Irene; van Zutphen, Tim; van Dijk, Theo H.; Bloks, Vincent W.; Harkema, Liesbeth et al. (2017): Intestinal PPAR δ protects against diet-induced obesity, insulin resistance and dyslipidemia. In: *Scientific Reports* 7 (1), S. 846. DOI: 10.1038/s41598-017-00889-z.

Du, Qianqian; Tan, Zheqiong; Shi, Feng; Tang, Min; Xie, Longlong; Zhao, Lin et al. (2019): PGC1 α /CEBPB/CPT1A axis promotes radiation resistance of nasopharyngeal carcinoma through activating fatty acid oxidation. In: *Cancer science* 110 (6), S. 2050–2062. DOI: 10.1111/cas.14011.

Dwyer, Amy R.; Perez Kerkvliet, Carlos; Truong, Thu H.; Hagen, Kyla M.; Krutilina, Raisa I.; Parke, Deanna N. et al. (2023): Glucocorticoid Receptors Drive Breast Cancer Cell Migration and Metabolic Reprogramming via PDK4. In: *Endocrinology* 164 (7). DOI: 10.1210/endoctr/bqad083.

Elsawaf, Zeinab; Sinn, Hans-Peter (2011): Triple-Negative Breast Cancer: Clinical and Histological Correlations. In: *Breast care (Basel, Switzerland)* 6 (4), S. 273–278. DOI: 10.1159/000331643.

- Escher, P.; Braissant, O.; Basu-Modak, S.; Michalik, L.; Wahli, W.; Desvergne, B. (2001): Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. In: *Endocrinology* 142 (10), S. 4195–4202. DOI: 10.1210/endo.142.10.8458.
- Fawcett, Katherine A.; Barroso, Inês (2010): The genetics of obesity: FTO leads the way. In: *Trends in genetics : TIG* 26 (6), S. 266–274. DOI: 10.1016/j.tig.2010.02.006.
- Feigelson, Heather Spencer; Patel, Alpa V.; Teras, Lauren R.; Gansler, Ted; Thun, Michael J.; Calle, Eugenia E. (2006): Adult weight gain and histopathologic characteristics of breast cancer among postmenopausal women. In: *Cancer* 107 (1), S. 12–21. DOI: 10.1002/cncr.21965.
- Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Mathers, C.; Parkin, D. M.; Piñeros, M. et al. (2019): Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods (8).
- Foulkes, William D.; Smith, Ian E.; Reis-Filho, Jorge S. (2010): Triple-negative breast cancer. In: *The New England journal of medicine* 363 (20), S. 1938–1948. DOI: 10.1056/NEJMr1001389.
- Frayling, Timothy M.; Timpson, Nicholas J.; Weedon, Michael N.; Zeggini, Eleftheria; Freathy, Rachel M.; Lindgren, Cecilia M. et al. (2007): A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. In: *Science (New York, N.Y.)* 316 (5826), S. 889–894. DOI: 10.1126/science.1141634.
- Fried, S. K.; Bunkin, D. A.; Greenberg, A. S. (1998): Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83 (3), S. 847–850. DOI: 10.1210/jcem.83.3.4660.
- Ghosh, Rajeshwary; Gilda, Jennifer E.; Gomes, Aldrin V. (2014): The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. In: *Expert review of proteomics* 11 (5), S. 549–560. DOI: 10.1586/14789450.2014.939635.
- Giordano Attianese, Greta M. P.; Desvergne, Béatrice (2015): Integrative and systemic approaches for evaluating PPAR β/δ (PPARD) function. In: *Nuclear receptor signaling* 13, e001. DOI: 10.1621/nrs.13001.

Glass, C. K.; Rosenfeld, M. G. (2000): The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. In: *Genes & development* 14 (2), S. 121–141. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10652267/>.

Gonzalez-Reyes, Christian; Marcial-Medina, Cleofas; Cervantes-Anaya, Nancy; Cortes-Reynosa, Pedro; Salazar, Eduardo Perez (2018): Migration and invasion induced by linoleic acid are mediated through fascin in MDA-MB-231 breast cancer cells. In: *Mol Cell Biochem* 443 (1-2), S. 1–10. DOI: 10.1007/s11010-017-3205-8.

Harborg, Sixten; Zachariae, Robert; Olsen, Julia; Johannsen, Maja; Cronin-Fenton, Deirdre; Bøggild, Henrik; Borgquist, Signe (2021): Overweight and prognosis in triple-negative breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. In: *NPJ breast cancer* 7 (1), S. 119. DOI: 10.1038/s41523-021-00325-6.

Hardy, S.; Langelier, Y.; Prentki, M. (2000): Oleate activates phosphatidylinositol 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects. In: *Cancer Res* 60 (22), S. 6353–6358.

Harmon, Gregory S.; Lam, Michael T.; Glass, Christopher K. (2011): PPARs and lipid ligands in inflammation and metabolism. In: *Chemical reviews* 111 (10), S. 6321–6340. DOI: 10.1021/cr2001355.

Hartmann, Daniela; Lucks, Jessica; Fuchs, Sina; Schiffmann, Susanne; Schreiber, Yannick; Ferreirós, Nerea et al. (2012): Long chain ceramides and very long chain ceramides have opposite effects on human breast and colon cancer cell growth. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44 (4), S. 620–628. DOI: 10.1016/j.biocel.2011.12.019.

Hill, Jessica H.; Solt, Claudia; Foster, Michelle T. (2018): Obesity associated disease risk: the role of inherent differences and location of adipose depots. In: *Hormone molecular biology and clinical investigation* 33 (2). DOI: 10.1515/hmbci-2018-0012.

Hilvo, Mika; Denkert, Carsten; Lehtinen, Laura; Müller, Berit; Brockmöller, Scarlet; Seppänen-Laakso, Tuulikki et al. (2011): Novel theranostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression. In: *Cancer Res* 71 (9), S. 3236–3245. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3894.

Höring, Marcus; Ejlsing, Christer S.; Hermansson, Martin; Liebisch, Gerhard (2019): Quantification of Cholesterol and Cholesteryl Ester by Direct Flow Injection High-Resolution Fourier

Transform Mass Spectrometry Utilizing Species-Specific Response Factors. In: *Analytical chemistry* 91 (5), S. 3459–3466. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b05013.

Höring, Marcus; Ejsing, Christer S.; Krautbauer, Sabrina; Ertl, Verena M.; Burkhardt, Ralph; Liebisch, Gerhard (2021): Accurate quantification of lipid species affected by isobaric overlap in Fourier-transform mass spectrometry. In: *Journal of lipid research* 62, S. 100050. DOI: 10.1016/j.jlr.2021.100050.

Höring, Marcus; Ekroos, Kim; Baker, Paul R. S.; Connell, Lisa; Stadler, Sonja C.; Burkhardt, Ralph; Liebisch, Gerhard (2020): Correction of Isobaric Overlap Resulting from Sodiated Ions in Lipidomics. In: *Analytical chemistry* 92 (16), S. 10966–10970. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c02408.

Hostetler, Heather A.; Petrescu, Anca D.; Kier, Ann B.; Schroeder, Friedhelm (2005): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacts with high affinity and is conformationally responsive to endogenous ligands. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (19), S. 18667–18682. DOI: 10.1074/jbc.M412062200.

Huang, Royston-Luke; Teo, Ziqiang; Chong, Han Chung; Zhu, Pengcheng; Tan, Ming Jie; Tan, Chek Kun et al. (2011): ANGPTL4 modulates vascular junction integrity by integrin signaling and disruption of intercellular VE-cadherin and claudin-5 clusters. In: *Blood* 118 (14), S. 3990–4002. DOI: 10.1182/blood-2011-01-328716.

Jariwala, Nidhi; Mehta, Gaurav A.; Bhatt, Vrushank; Hussein, Shaimaa; Parker, Kimberly A.; Yunus, Neha et al. (2021): CPT1A and fatty acid β -oxidation are essential for tumor cell growth and survival in hormone receptor-positive breast cancer. In: *NAR Cancer* 3 (3), zcab035. DOI: 10.1093/narcan/zcab035.

Jitariu, Adriana-Andreea; Cîmpean, Anca Maria; Ribatti, Domenico; Raica, Marius (2017): Triple negative breast cancer: the kiss of death. In: *Oncotarget* 8 (28), S. 46652–46662. DOI: 10.18632/oncotarget.16938.

Johnson, Amy R.; Milner, J. Justin; Makowski, Liza (2012): The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. In: *Immunological reviews* 249 (1), S. 218–238. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2012.01151.x.

Katalinic, Alexander; Eisemann, Nora; Kraywinkel, Klaus; Noftz, Maria R.; Hübner, Joachim (2020): Breast cancer incidence and mortality before and after implementation of the German

mammography screening program. In: *International journal of cancer* 147 (3), S. 709–718. DOI: 10.1002/ijc.32767.

Kersten, Sander (2014): Integrated physiology and systems biology of PPAR α . In: *Molecular metabolism* 3 (4), S. 354–371. DOI: 10.1016/j.molmet.2014.02.002.

Khandekar, Melin J.; Cohen, Paul; Spiegelman, Bruce M. (2011): Molecular mechanisms of cancer development in obesity. In: *Nature reviews. Cancer* 11 (12), S. 886–895. DOI: 10.1038/nrc3174.

Kinlaw, William B.; Baures, Paul W.; Lupien, Leslie E.; Davis, Wilson L.; Kuemmerle, Nancy B. (2016): Fatty Acids and Breast Cancer: Make Them on Site or Have Them Delivered. In: *Journal of cellular physiology* 231 (10), S. 2128–2141. DOI: 10.1002/jcp.25332.

König, David; Savic Prince, Spasenija; Rothschild, Sacha I. (2021): Targeted Therapy in Advanced and Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. An Update on Treatment of the Most Important Actionable Oncogenic Driver Alterations. In: *Cancers* 13 (4). DOI: 10.3390/cancers13040804.

Kostovski, Marko; Tasic, Velibor; Laban, Nevena; Polenakovic, Momir; Danilovski, Dragan; Gucev, Zoran (2017): Obesity in Childhood and Adolescence, Genetic Factors. In: *Prilozi (Makedonska akademija na naukite i umetnostite. Oddelenie za medicinski nauki)* 38 (3), S. 121–133. DOI: 10.2478/prilozi-2018-0013.

Kulterer, Oana C.; Niederstaetter, Laura; Herz, Carsten T.; Haug, Alexander R.; Bileck, Andrea; Pils, Dietmar et al. (2020): The Presence of Active Brown Adipose Tissue Determines Cold-Induced Energy Expenditure and Oxylipin Profiles in Humans. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 105 (7). DOI: 10.1210/clinem/dgaa183.

Kusakabe, T.; Maeda, M.; Hoshi, N.; Sugino, T.; Watanabe, K.; Fukuda, T.; Suzuki, T. (2000): Fatty acid synthase is expressed mainly in adult hormone-sensitive cells or cells with high lipid metabolism and in proliferating fetal cells. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 48 (5), S. 613–622. DOI: 10.1177/002215540004800505.

La Paglia, Laura; Listi, Angela; Caruso, Stefano; Amodeo, Valeria; Passiglia, Francesco; Bazzan, Viviana; Fanale, Daniele (2017): Potential Role of ANGPTL4 in the Cross Talk between

Metabolism and Cancer through PPAR Signaling Pathway. In: *PPAR research* 2017, S. 8187235. DOI: 10.1155/2017/8187235.

Lamas Bervejillo, María; Ferreira, Ana María (2019): Understanding Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: From the Structure to the Regulatory Actions on Metabolism. In: *Advances in experimental medicine and biology* 1127, S. 39–57. DOI: 10.1007/978-3-030-11488-6_3.

Lauby-Secretan, Béatrice; Scoccianti, Chiara; Loomis, Dana; Grosse, Yann; Bianchini, Franca; Straif, Kurt (2016): Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. In: *The New England journal of medicine* 375 (8), S. 794–798. DOI: 10.1056/NEJMSr1606602.

Le Jan, Sébastien; Amy, Céline; Cazes, Aurélie; Monnot, Catherine; Lamandé, Noël; Favier, Judith et al. (2003): Angiopoietin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma. In: *The American journal of pathology* 162 (5), S. 1521–1528. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64285-X.

Lee, Ja Hee; Kim, Eun-Jin; Kim, Don-Kyu; Lee, Ji-Min; Park, Seung Bum; Lee, In-Kyu et al. (2012): Hypoxia induces PDK4 gene expression through induction of the orphan nuclear receptor ERR γ . In: *PloS one* 7 (9), e46324. DOI: 10.1371/journal.pone.0046324.

Lee, S. S.; Pineau, T.; Drago, J.; Lee, E. J.; Owens, J. W.; Kroetz, D. L. et al. (1995): Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. In: *Molecular and cellular biology* 15 (6), S. 3012–3022. DOI: 10.1128/mcb.15.6.3012.

Li, Shuai; Zhou, Ti; Li, Cen; Dai, Zhiyu; Di Che; Yao, Yachao et al. (2014): High metastatic gastric and breast cancer cells consume oleic acid in an AMPK dependent manner. In: *PloS one* 9 (5), e97330. DOI: 10.1371/journal.pone.0097330.

Liebisch, G.; Drobnik, W.; Reil, M.; Trümbach, B.; Arnecke, R.; Olgemöller, B. et al. (1999): Quantitative measurement of different ceramide species from crude cellular extracts by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). In: *Journal of lipid research* 40 (8), S. 1539–1546. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10428992/>.

Liebisch, Gerhard; Binder, Marion; Schifferer, Rainer; Langmann, Thomas; Schulz, Berta; Schmitz, Gerd (2006): High throughput quantification of cholesterol and cholesteryl ester by

electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). In: *Biochimica et biophysica acta* 1761 (1), S. 121–128. DOI: 10.1016/j.bbali.2005.12.007.

Liebisch, Gerhard; Drobnik, Wolfgang; Lieser, Bernd; Schmitz, Gerd (2002): High-throughput quantification of lysophosphatidylcholine by electrospray ionization tandem mass spectrometry. In: *Clinical chemistry* 48 (12), S. 2217–2224. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12446479/>.

Liebisch, Gerhard; Lieser, Bernd; Rathenberg, Jan; Drobnik, Wolfgang; Schmitz, Gerd (2004): High-throughput quantification of phosphatidylcholine and sphingomyelin by electrospray ionization tandem mass spectrometry coupled with isotope correction algorithm. In: *Biochimica et biophysica acta* 1686 (1-2), S. 108–117. DOI: 10.1016/j.bbali.2004.09.003.

Ligibel, Jennifer A.; Alfano, Catherine M.; Courneya, Kerry S.; Demark-Wahnefried, Wendy; Burger, Robert A.; Chlebowski, Rowan T. et al. (2014): American Society of Clinical Oncology position statement on obesity and cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 32 (31), S. 3568–3574. DOI: 10.1200/JCO.2014.58.4680.

Liu, Guang-Hui; Qu, Jing; Shen, Xun (2006): Thioredoxin-mediated negative autoregulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha transcriptional activity. In: *Molecular biology of the cell* 17 (4), S. 1822–1833. DOI: 10.1091/mbc.e05-10-0979.

Liu, Qian; Zhang, Jing; Guo, Chenchen; Wang, Mengcheng; Wang, Chenfei; Yan, Yilv et al. (2024): Proteogenomic characterization of small cell lung cancer identifies biological insights and subtype-specific therapeutic strategies. In: *Cell* 187 (1), 184-203.e28. DOI: 10.1016/j.cell.2023.12.004.

Liu, Wuguang; Liu, Xiaolong; Liu, Ying; Ling, Ting; Di Chen; Otkur, Wuxiyar et al. (2022): PLIN2 promotes HCC cells proliferation by inhibiting the degradation of HIF1 α . In: *Experimental cell research* 418 (1), S. 113244. DOI: 10.1016/j.yexcr.2022.113244.

Loos, Ruth J. F.; Yeo, Giles S. H. (2014): The bigger picture of FTO: the first GWAS-identified obesity gene. In: *Nature reviews. Endocrinology* 10 (1), S. 51–61. DOI: 10.1038/nrendo.2013.227.

Luo, Hui; She, Xiaolu; Zhang, Yubo; Xie, Bingfan; Zhang, Shibo; Li, Qianqian et al. (2025): PLIN2 Promotes Lipid Accumulation in Ascites-Associated Macrophages and Ovarian Cancer Progression by HIF1 α /SPP1 Signaling. In: *Advanced science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany)* 12 (12), e2411314. DOI: 10.1002/advs.202411314.

Małodobra-Mazur, Małgorzata; Ołdakowska, Monika; Dobosz, Tadeusz (2024): Exploring PPAR Gamma and PPAR Alpha's Regulation Role in Metabolism via Epigenetics Mechanism. In: *Biomolecules* 14 (11). DOI: 10.3390/biom14111445.

Matyash, Vitali; Liebisch, Gerhard; Kurzchalia, Teymuraz V.; Shevchenko, Andrej; Schwudke, Dominik (2008): Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. In: *Journal of lipid research* 49 (5), S. 1137–1146. DOI: 10.1194/jlr.D700041-JLR200.

Mau et al. (2014a): Adipositas-Haeufigkeit-und-gesundheitliche-Folgen 2014. Online verfügbar unter https://www.dkfz.de/de/krebspraevention/Downloads/pdf/FzK/FzK_2014_Adipositas-Haeufigkeit-und-gesundheitliche-Folgen.pdf, zuletzt geprüft am 12.12.2022.

Mau et al. (2014b): FzK2014Adipositas-und-Brustkrebspdf. Online verfügbar unter https://www.dkfz.de/de/krebspraevention/Downloads/pdf/FzK/FzK_2014_Adipositas-und-Brustkrebs.pdf.

Mei, Chun-li; He, Ping; Cheng, Bei; Liu, Wei; Wang, Yan-fu; Wan, Jing-jing (2009): Chlamydia pneumoniae induces macrophage-derived foam cell formation via PPAR alpha and PPAR gamma-dependent pathways. In: *Cell biology international* 33 (3), S. 301–308. DOI: 10.1016/j.cellbi.2008.12.002.

Menendez, Javier A.; Lupu, Ruth (2007): Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. In: *Nature reviews. Cancer* 7 (10), S. 763–777. DOI: 10.1038/nrc2222.

Michailidou, Kyriaki; Lindström, Sara; Dennis, Joe; Beesley, Jonathan; Hui, Shirley; Kar, Siddhartha et al. (2017): Association analysis identifies 65 new breast cancer risk loci. In: *Nature* 551 (7678), S. 92–94. DOI: 10.1038/nature24284.

Michels, Karin B.; Solomon, Caren G.; Hu, Frank B.; Rosner, Bernard A.; Hankinson, Susan E.; Colditz, Graham A.; Manson, JoAnn E. (2003): Type 2 diabetes and subsequent incidence of breast cancer in the Nurses' Health Study. In: *Diabetes care* 26 (6), S. 1752–1758. DOI: 10.2337/diacare.26.6.1752.

Minicozzi, Pamela; Berrino, Franco; Sebastiani, Federica; Falcini, Fabio; Vattiato, Rosa; Cioccoloni, Francesca et al. (2013): High fasting blood glucose and obesity significantly and independently increase risk of breast cancer death in hormone receptor-positive disease. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 49 (18), S. 3881–3888. DOI: 10.1016/j.ejca.2013.08.004.

Mirzania, Mehrzad (2016): Approach to the Triple Negative Breast Cancer in New Drugs Area. In: *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research* 10 (2), S. 115–119.

Miziak, Paulina; Baran, Marzena; Błaszczak, Ewa; Przybyszewska-Podstawka, Alicja; Kałafut, Joanna; Smok-Kalwat, Jolanta et al. (2023): Estrogen Receptor Signaling in Breast Cancer. In: *Cancers* 15 (19). DOI: 10.3390/cancers15194689.

Morris, Patrick G.; Hudis, Clifford A.; Giri, Dilip; Morrow, Monica; Falcone, Domenick J.; Zhou, Xi Kathy et al. (2011): Inflammation and increased aromatase expression occur in the breast tissue of obese women with breast cancer. In: *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* 4 (7), S. 1021–1029. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0110.

Mukherjee, Ranjan; Locke, Kenneth T.; Miao, Bowman; Meyers, Daniel; Monshizadegan, Hossain; Zhang, Rongan et al. (2008): Novel peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists lower low-density lipoprotein and triglycerides, raise high-density lipoprotein, and synergistically increase cholesterol excretion with a liver X receptor agonist. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 327 (3), S. 716–726. DOI: 10.1124/jpet.108.143271.

Nakamura, Hajime; Takada, Kohichi (2021): Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. In: *Cancer science* 112 (10), S. 3945–3952. DOI: 10.1111/cas.15068.

Nakayama, Toshiyuki; Hirakawa, Hiroshi; Shibata, Kenichiro; Abe, Kuniko; Nagayasu, Takeshi; Taguchi, Takashi (2010): Expression of angiopoietin-like 4 in human gastric cancer: ANGPTL4 promotes venous invasion. In: *Oncology reports* 24 (3), S. 599–606. DOI: 10.3892/or_00000897.

Nakayama, Toshiyuki; Hirakawa, Hiroshi; Shibata, Kenichiro; Nazneen, Arifa; Abe, Kuniko; Nagayasu, Takeshi; Taguchi, Takashi (2011): Expression of angiopoietin-like 4 (ANGPTL4)

in human colorectal cancer: ANGPTL4 promotes venous invasion and distant metastasis. In: *Oncology reports* 25 (4), S. 929–935. DOI: 10.3892/or.2011.1176.

Narala, Venkata R.; Adapala, Ravi K.; Suresh, Madathilparambil V.; Brock, Thomas G.; Peters-Golden, Marc; Reddy, Raju C. (2010): Leukotriene B4 is a physiologically relevant endogenous peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (29), S. 22067–22074. DOI: 10.1074/jbc.M109.085118.

Navarro-Tito, Napoleon; Soto-Guzman, Adriana; Castro-Sanchez, Luis; Martinez-Orozco, Raul; Salazar, Eduardo Perez (2010): Oleic acid promotes migration on MDA-MB-231 breast cancer cells through an arachidonic acid-dependent pathway. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42 (2), S. 306–317. DOI: 10.1016/j.biocel.2009.11.010.

Neels, Jaap G.; Grimaldi, Paul A. (2014): Physiological functions of peroxisome proliferator-activated receptor β . In: *Physiological reviews* 94 (3), S. 795–858. DOI: 10.1152/physrev.00027.2013.

Nelson, Erik R.; Wardell, Suzanne E.; Jasper, Jeff S.; Park, Sunghee; Suchindran, Sunil; Howe, Matthew K. et al. (2013): 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology. In: *Science (New York, N.Y.)* 342 (6162), S. 1094–1098. DOI: 10.1126/science.1241908.

Nguyen, Paul L.; Ma, Jing; Chavarro, Jorge E.; Freedman, Matthew L.; Lis, Rosina; Fedele, Giuseppe et al. (2010): Fatty acid synthase polymorphisms, tumor expression, body mass index, prostate cancer risk, and survival. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (25), S. 3958–3964. DOI: 10.1200/JCO.2009.27.0793.

Nichols, Hazel B.; Trentham-Dietz, Amy; Egan, Kathleen M.; Titus-Ernstoff, Linda; Holmes, Michelle D.; Bersch, Andrew J. et al. (2009): Body mass index before and after breast cancer diagnosis: associations with all-cause, breast cancer, and cardiovascular disease mortality. In: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 18 (5), S. 1403–1409. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-08-1094.

Nielsen, Torsten O.; Leung, Samuel C. Y.; Rimm, David L.; Dodson, Andrew; Acs, Balazs; Badve, Sunil et al. (2021): Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Updated Recommendations

From the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. In: *Journal of the National Cancer Institute* 113 (7), S. 808–819. DOI: 10.1093/jnci/djaa201.

Nieman, Kristin M.; Kenny, Hilary A.; Penicka, Carla V.; Ladanyi, Andras; Buell-Gutbrod, Rebecca; Zillhardt, Marion R. et al. (2011): Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. In: *Nature medicine* 17 (11), S. 1498–1503. DOI: 10.1038/nm.2492.

Niwińska, Anna; Olszewski, Wojciech; Murawska, Magdalena; Pogoda, Katarzyna (2011): Triple-negative breast cancer with brain metastases: a comparison between basal-like and non-basal-like biological subtypes. In: *Journal of neuro-oncology* 105 (3), S. 547–553. DOI: 10.1007/s11060-011-0616-3.

Ollila, Samuli; Hyvönen, Marja T.; Vattulainen, Ilpo (2007): Polyunsaturation in lipid membranes: dynamic properties and lateral pressure profiles. In: *The journal of physical chemistry. B* 111 (12), S. 3139–3150. DOI: 10.1021/jp065424f.

Park, Sangjung; Wang, Hye-Young; Kim, Sunghyun; Ahn, Sungwoo; Lee, Dongsup; Cho, Yoonjung et al. (2014): Quantitative RT-PCR assay of HER2 mRNA expression in formalin-fixed and paraffin-embedded breast cancer tissues. In: *International journal of clinical and experimental pathology* 7 (10), S. 6752–6759. Online verfügbar unter <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4230085/>.

Parker, Joel S.; Mullins, Michael; Cheang, Maggie C. U.; Leung, Samuel; Voduc, David; Vickery, Tammi et al. (2009): Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (8), S. 1160–1167. DOI: 10.1200/JCO.2008.18.1370.

Peters, Jeffrey M.; Shah, Yatrik M.; Gonzalez, Frank J. (2012): The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. In: *Nature reviews. Cancer* 12 (3), S. 181–195. DOI: 10.1038/nrc3214.

Pettersen, Ina Katrine Nitschke; Tusubira, Deusdedit; Ashrafi, Hanan; Dyrstad, Sissel Elisabeth; Hansen, Lena; Liu, Xiao-Zheng et al. (2019): Upregulated PDK4 expression is a sensitive marker of increased fatty acid oxidation. In: *Mitochondrion* 49, S. 97–110. DOI: 10.1016/j.mito.2019.07.009.

Pogoda, Katarzyna; Niwińska, Anna; Murawska, Magdalena; Pieńkowski, Tadeusz (2013): Analysis of pattern, time and risk factors influencing recurrence in triple-negative breast cancer patients. In: *Medical oncology (Northwood, London, England)* 30 (1), S. 388. DOI: 10.1007/s12032-012-0388-4.

Protani, Melinda; Coory, Michael; Martin, Jennifer H. (2010): Effect of obesity on survival of women with breast cancer: systematic review and meta-analysis. In: *Breast cancer research and treatment* 123 (3), S. 627–635. DOI: 10.1007/s10549-010-0990-0.

Pyper, Sean R.; Viswakarma, Navin; Yu, Songtao; Reddy, Janardan K. (2010): PPARalpha: energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. In: *Nuclear receptor signaling* 8, e002. DOI: 10.1621/nrs.08002.

Rakha, Emad A.; Elsheikh, Somaia E.; Aleskandarany, Muhammed A.; Habashi, Hany O.; Green, Andrew R.; Powe, Desmond G. et al. (2009): Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. In: *Clin Cancer Res* 15 (7), S. 2302–2310. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2132.

Reddy, Aravind T.; Lakshmi, Sowmya P.; Reddy, Raju C. (2016): PPAR γ as a Novel Therapeutic Target in Lung Cancer. In: *PPAR research* 2016, S. 8972570. DOI: 10.1155/2016/8972570.

Reeves, Gillian K.; Pirie, Kirstin; Beral, Valerie; Green, Jane; Spencer, Elizabeth; Bull, Diana (2007): Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 335 (7630), S. 1134. DOI: 10.1136/bmj.39367.495995.AE.

Renahan, Andrew G.; Tyson, Margaret; Egger, Matthias; Heller, Richard F.; Zwahlen, Marcel (2008): Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. In: *Lancet (London, England)* 371 (9612), S. 569–578. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60269-X.

Robert Koch-Institut (2021): Krebs in Deutschland für 2017/2018 2021. Online verfügbar unter https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/kid_2021_c50_brust.pdf;jsessionid=928C1D1A832EF56C445987E691874666.internet062?__blob=publicationFile.

Robert Koch-Institut (2022): Brustkrebs (Mammakarzinom) 2022. Online verfügbar unter https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html, zuletzt geprüft am 30.09.2022.

Rodriguez-Monterrosas, Cecilia; Diaz-Aragon, Ricardo; Cortes-Reynosa, Pedro; Salazar, Eduardo P. (2018): Linoleic acid induces an increased response to insulin in MDA-MB-231 breast cancer cells. In: *Journal of cellular biochemistry* 119 (7), S. 5413–5425. DOI: 10.1002/jcb.26694.

Rosenberg, L.; Czene, K.; Hall, P. (2009): Obesity and poor breast cancer prognosis: an illusion because of hormone replacement therapy? In: *British journal of cancer* 100 (9), S. 1486–1491. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605025.

Rubenstrunk, Anne; Hanf, Rémy; Hum, Dean W.; Fruchart, Jean-Charles; Staels, Bart (2007): Safety issues and prospects for future generations of PPAR modulators. In: *Biochimica et biophysica acta* 1771 (8), S. 1065–1081. DOI: 10.1016/j.bbalip.2007.02.003.

Scholzen, Thomas; Gerdes, Johannes (2000): The Ki-67 protein: From the known and the unknown. In: *J. Cell. Phys.* 182 (3), S. 311–322. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9.

Schroeder, Barbara; Vander Steen, Travis; Espinoza, Ingrid; Venkatapoorna, Chandra M. Kurapaty; Hu, Zeng; Silva, Fernando Martín et al. (2021): Fatty acid synthase (FASN) regulates the mitochondrial priming of cancer cells. In: *Cell death & disease* 12 (11), S. 977. DOI: 10.1038/s41419-021-04262-x.

Seargent, Jill M.; Yates, Elisabeth A.; Gill, Jason H. (2004): GW9662, a potent antagonist of PPARgamma, inhibits growth of breast tumour cells and promotes the anticancer effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone, independently of PPARgamma activation. In: *British journal of pharmacology* 143 (8), S. 933–937. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705973.

Serna-Marquez, Nathalia; Diaz-Aragon, Ricardo; Reyes-Uribe, Emmanuel; Cortes-Reynosa, Pedro; Salazar, Eduardo Perez (2017): Linoleic acid induces migration and invasion through FFAR4- and PI3K-/Akt-dependent pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells. In: *Medical oncology (Northwood, London, England)* 34 (6), S. 111. DOI: 10.1007/s12032-017-0969-3.

Serna-Marquez, Nathalia; Villegas-Comonfort, Socrates; Galindo-Hernandez, Octavio; Navarro-Tito, Napoleon; Millan, Alejandro; Salazar, Eduardo Perez (2013): Role of LOXs and

COX-2 on FAK activation and cell migration induced by linoleic acid in MDA-MB-231 breast cancer cells. In: *Cellular oncology (Dordrecht)* 36 (1), S. 65–77. DOI: 10.1007/s13402-012-0114-4.

Sezgin, Erdinc; Gutmann, Theresia; Buhl, Tomasz; Dirkx, Ron; Grzybek, Michal; Coskun, Ünal et al. (2015): Adaptive lipid packing and bioactivity in membrane domains. In: *PloS one* 10 (4), e0123930. DOI: 10.1371/journal.pone.0123930.

Sezgin, Erdinc; Levental, Ilya; Mayor, Satyajit; Eggeling, Christian (2017): The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 18 (6), S. 361–374. DOI: 10.1038/nrm.2017.16.

Shen, Chih-Jie; Chan, Shih-Hung; Lee, Chung-Ta; Huang, Wan-Chen; Tsai, Jhih-Peng; Chen, Ben-Kuen (2017): Oleic acid-induced ANGPTL4 enhances head and neck squamous cell carcinoma anoikis resistance and metastasis via up-regulation of fibronectin. In: *Cancer letters* 386, S. 110–122. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.11.012.

Shi, Jinlong; Fu, Huaping; Jia, Zhilong; He, Kunlun; Fu, Lin; Wang, Weidong (2016): High Expression of CPT1A Predicts Adverse Outcomes: A Potential Therapeutic Target for Acute Myeloid Leukemia. In: *EBioMedicine* 14, S. 55–64. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.11.025.

Shibata, Kenichiro; Nakayama, Toshiyuki; Hirakawa, Hiroshi; Hidaka, Shigekazu; Nagayasu, Takeshi (2010): Clinicopathological significance of angiopoietin-like protein 4 expression in oesophageal squamous cell carcinoma. In: *Journal of clinical pathology* 63 (12), S. 1054–1058. DOI: 10.1136/jcp.2010.078600.

Soccio, Raymond E.; Chen, Eric R.; Rajapurkar, Satyajit R.; Safabakhsh, Pegah; Marinis, Jill M.; Dispirito, Joanna R. et al. (2015): Genetic Variation Determines PPAR γ Function and Anti-diabetic Drug Response In Vivo. In: *Cell* 162 (1), S. 33–44. DOI: 10.1016/j.cell.2015.06.025.

Sorlie, Therese; Tibshirani, Robert; Parker, Joel; Hastie, Trevor; Marron, J. S.; Nobel, Andrew et al. (2003): Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (14), S. 8418–8423. DOI: 10.1073/pnas.0932692100.

Sørli, T.; Perou, C. M.; Tibshirani, R.; Aas, T.; Geisler, S.; Johnsen, H. et al. (2001): Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (19), S. 10869–10874. DOI: 10.1073/pnas.191367098.

Sørli, Therese; Wang, Yulei; Xiao, Chunlin; Johnsen, Hilde; Naume, Bjørn; Samaha, Raymond R.; Børresen-Dale, Anne-Lise (2006): Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. In: *BMC Genomics* 7 (1), S. 127. DOI: 10.1186/1471-2164-7-127.

Soto-Guzman, Adriana; Navarro-Tito, Napoleon; Castro-Sanchez, Luis; Martinez-Orozco, Raul; Salazar, Eduardo Perez (2010): Oleic acid promotes MMP-9 secretion and invasion in breast cancer cells. In: *Clin Exp Metastasis* 27 (7), S. 505–515. DOI: 10.1007/s10585-010-9340-1.

Taborda Ribas, Hennrique; Sogayar, Mari C.; Dolga, Amalia M.; Winnischofer, Sheila M. B.; Trombetta-Lima, Marina (2024): Lipid profile in breast cancer: From signaling pathways to treatment strategies. In: *Biochimie* 219, S. 118–129. DOI: 10.1016/j.biochi.2023.11.008.

Taherian-Fard, Atefeh; Srihari, Sriganesh; Ragan, Mark A. (2015): Breast cancer classification: linking molecular mechanisms to disease prognosis. In: *Briefings in bioinformatics* 16 (3), S. 461–474. DOI: 10.1093/bib/bbu020.

Toplak, Hermann; Leitner, Deborah Raphaela; Harreiter, Jürgen; Hoppichler, Friedrich; Wascher, Thomas C.; Schindler, Karin; Ludvik, Bernhard (2019): „Diabesity“ – Adipositas und Typ-2-Diabetes (Update 2019). In: *Wiener klinische Wochenschrift* 131 (Suppl 1), S. 71–76. DOI: 10.1007/s00508-018-1418-9.

Vaysse, Charlotte; Lømo, Jon; Garred, Øystein; Fjeldheim, Frøydis; Løfteroed, Trygve; Schlichting, Ellen et al. (2017): Erratum: Inflammation of mammary adipose tissue occurs in overweight and obese patients exhibiting early-stage breast cancer. In: *NPJ breast cancer* 3, S. 35. DOI: 10.1038/s41523-017-0030-x.

Vázquez-Carrera, Manuel (2016): Unraveling the Effects of PPAR β/δ on Insulin Resistance and Cardiovascular Disease. In: *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 27 (5), S. 319–334. DOI: 10.1016/j.tem.2016.02.008.

Vogel, Felix C. E.; Chaves-Filho, Adriano B.; Schulze, Almut (2024): Lipids as mediators of cancer progression and metastasis. In: *Nature cancer* 5 (1), S. 16–29. DOI: 10.1038/s43018-023-00702-z.

Wagner, Kay-Dietrich; Wagner, Nicole (2010): Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) acts as regulator of metabolism linked to multiple cellular functions. In: *Pharmacology & therapeutics* 125 (3), S. 423–435. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2009.12.001.

Waks, Adrienne G.; Winer, Eric P. (2019): Breast Cancer Treatment: A Review. In: *JAMA* 321 (3), S. 288–300. DOI: 10.1001/jama.2018.19323.

Wallace, Martina; Metallo, Christian M. (2020): Tracing insights into de novo lipogenesis in liver and adipose tissues. In: *Seminars in cell & developmental biology* 108, S. 65–71. DOI: 10.1016/j.semcdb.2020.02.012.

Wang, Yaping; Nakajima, Takero; Gonzalez, Frank J.; Tanaka, Naoki (2020): PPARs as Metabolic Regulators in the Liver: Lessons from Liver-Specific PPAR-Null Mice. In: *International Journal of Molecular Sciences* 21 (6), S. 2061. DOI: 10.3390/ijms21062061.

Wang, Yong-Xu (2010): PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. In: *Cell research* 20 (2), S. 124–137. DOI: 10.1038/cr.2010.13.

Wang, Yuechen; Harada-Shoji, Narumi; Kitamura, Narufumi; Yamazaki, Yuto; Ebata, Akiko; Amari, Masakazu et al. (2024): Mitochondrial dynamics as a novel treatment strategy for triple-negative breast cancer. In: *Cancer medicine* 13 (2), e6987. DOI: 10.1002/cam4.6987.

Wang, Zhuomin; Han, Bo; Zhang, Zhuang; Pan, Jian; Xia, Hui (2010): Expression of angiopoietin-like 4 and tenascin C but not cathepsin C mRNA predicts prognosis of oral tongue squamous cell carcinoma. In: *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* 15 (1), S. 39–46. DOI: 10.3109/13547500903261362.

Ward, Ashley V.; Riley, Duncan; Cospers, Kirsten E.; Finlay-Schultz, Jessica; Brechbuhl, Heather M.; Libby, Andrew E. et al. (2025): Lipid metabolic reprogramming drives triglyceride storage and variable sensitivity to FASN inhibition in endocrine-resistant breast cancer cells. In: *Breast cancer research : BCR* 27 (1), S. 32. DOI: 10.1186/s13058-025-01991-1.

Weigelt, Britta; Baehner, Frederick L.; Reis-Filho, Jorge S. (2010): The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. In: *The Journal of Pathology* 220 (2), S. 263–280. DOI: 10.1002/path.2648.

Weitgasser, Raimund; Ratzinger, Michaela; Hemetsberger, Margit; Siostrzonek, Peter (2018): LDL-Cholesterin und kardiovaskuläre Ereignisse: je niedriger desto besser? In: *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)* 168 (5-6), S. 108–120. DOI: 10.1007/s10354-016-0518-2.

Werman, A.; Hollenberg, A.; Solanes, G.; Bjorbaek, C.; Vidal-Puig, A. J.; Flier, J. S. (1997): Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (32), S. 20230–20235. DOI: 10.1074/jbc.272.32.20230.

Wronska, A.; Kmiec, Z. (2012): Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. In: *Acta physiologica (Oxford, England)* 205 (2), S. 194–208. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2012.02409.x.

Wu, Chenghui; Dong, Shuwen; Huang, Renhong; Chen, Xiaosong (2023): Cancer-Associated Adipocytes and Breast Cancer: Intertwining in the Tumor Microenvironment and Challenges for Cancer Therapy. In: *Cancers* 15 (3). DOI: 10.3390/cancers15030726.

Xu, Ren (2019): P4HA1 is a new regulator of the HIF-1 pathway in breast cancer. In: *Cell stress* 3 (1), S. 27–28. DOI: 10.15698/cst2019.01.173.

Yoon, Haejin; Shaw, Jillian L.; Haigis, Marcia C.; Greka, Anna (2021): Lipid metabolism in sickness and in health: Emerging regulators of lipotoxicity. In: *Molecular cell* 81 (18), S. 3708–3730. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.08.027.

Zaidi, Nousheen; Lupien, Leslie; Kuemmerle, Nancy B.; Kinlaw, William B.; Swinnen, Johannes V.; Smans, Karine (2013): Lipogenesis and lipolysis: the pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids. In: *Progress in lipid research* 52 (4), S. 585–589. DOI: 10.1016/j.plipres.2013.08.005.

Zhang, Huan-Ping; Jiang, Rui-Yuan; Zhu, Jia-Yu; Sun, Ke-Na; Huang, Yuan; Zhou, Huan-Huan et al. (2024a): PI3K/AKT/mTOR signaling pathway: an important driver and therapeutic target in triple-negative breast cancer. In: *Breast cancer (Tokyo, Japan)* 31 (4), S. 539–551. DOI: 10.1007/s12282-024-01567-5.

Zhang, Jiyun; Tang, Miru; Shang, Jinsai (2024b): PPAR γ Modulators in Lung Cancer: Molecular Mechanisms, Clinical Prospects, and Challenges. In: *Biomolecules* 14 (2), S. 190. DOI: 10.3390/biom14020190.

Zhang, Xuede; Su, Lei; Sun, Kai (2021): Expression status and prognostic value of the perilipin family of genes in breast cancer. In: *American journal of translational research* 13 (5), S. 4450–4463.

Zhu, Jinrong; Wu, Geyan; Song, Libing; Cao, Lixue; Tan, Zhanyao; Tang, Miaoling et al. (2019): NKX2-8 deletion-induced reprogramming of fatty acid metabolism confers chemoresistance in epithelial ovarian cancer. In: *EBioMedicine* 43, S. 238–252. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.04.041.

Zhu, Pengcheng; Tan, Ming Jie; Huang, Royston-Luke; Tan, Chek Kun; Chong, Han Chung; Pal, Mintu et al. (2011): Angiopoietin-like 4 protein elevates the prosurvival intracellular O₂(-):H₂O₂ ratio and confers anoikis resistance to tumors. In: *Cancer cell* 19 (3), S. 401–415. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.01.018.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Ralph Burkhardt, und meiner Betreuerin, Frau Dr. Sonja Stadler, bedanken. Sie waren jederzeit um den Fortschritt der Arbeit bemüht, hatten stets ein offenes Ohr für Fragen und unterstützen mich mit all Ihrem Wissen bei jeglicher Problemlösung.

Ebenso gilt mein Dank allen Labormitarbeitern der Klinischen Chemie. Sie standen mir bei der Durchführung aller Experimente und der Versuchsauswertung mit Ihrem Rat zur Seite. Darüber hinaus bedanke ich mich auch bei der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Gerhard Liebisch und Dr. Marcus Höring für die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Lipidomics-Analysen.

Für Ihre immerwährende Unterstützung und großes Verständnis danke ich Herrn Dr. Christoph Schulze, Herrn Dr. Dominik Schulze, Frau Dr. Claudia Büttner-Schulze und dem gesamten Team der Zahnarztpraxis Dres. Schulze. Jederzeit stärkten Sie mir den Rücken und leisteten somit einen großen Beitrag zur Vollendung dieser Arbeit.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Sie waren mir zu jedem Zeitpunkt eine große Stütze, haben jeden Fortschritt der Arbeit mit mir gefeiert und mich bei Rückschlägen bestärkt. Ohne Ihre Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Dafür danke ich Ihnen von Herzen.

Erklärung zum Promotionsverfahren

Ich, Amelie Marie Florian, geboren am 08.05.1997 in Bad Kötzing, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne zulässige 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 Angaben der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde vorgelegt.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)