

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Tanja Fehm

Reduktion des Tumorstammzellcharakters durch Inhibierung der  
lysosomalen sauren Lipase als innovativer Therapieansatz in der  
Behandlung des triple-negativen Brustkrebses

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Hannah Steigerwald

2025

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Tanja Fehm

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Georg Pongratz

Für meine Eltern, Geschwister, Markus, Alexandra und Thilo

**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:**

H. Steigerwald, T. Bozzetti, M. Tams, J. On, G. Hoffmann, J. Lambertz, K. Weidele, S. Treitschke, F. Reinhard, A. Kulik, N. Krawczyk, D. Niederacher, H. Neubauer, C. Werno, T. Rau, T. Fehm, K. Esser, 2023: Lysosomal acid lipase-activity as a novel target to efficiently address triple-negative breast cancer high malignancy, bioRxiv 2023.10.01.560038. (Preprint), <https://doi.org/10.1101/2023.10.01.560038>

## Zusammenfassung

Der dreifach negative Brustkrebs (engl. „*triple-negative breast cancer*“, TNBC), welcher gekennzeichnet ist durch das Fehlen von Östrogen-, Progesteron- und HER2-Rezeptoren, stellt aufgrund seiner hohen Rate an Therapieresistenzen, Rezidiven und Metastasierung eine besondere Herausforderung in der Therapie dieses Brustkrebssubtyps dar. Grund hierfür sind unter anderem dessen hoher Tumorstammzellcharakter sowie begrenzte Therapieansätze. Aufgrund der ausgeprägten Malignität sowie der erhöhten Rate von prämenopausalen Patientinnen, die am TNBC erkranken, kommt der Erforschung und Entwicklung neuer Therapieansätze eine besondere Bedeutung hinzu. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass insbesondere der erhöhte Metabolismus von neutralen Lipiden zur Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters und somit zur Malignität des TNBC beiträgt. Die Verwertung externer und interner Lipide erfolgt hierbei maßgeblich durch die lysosomale saure Lipase (LIPA), ein Enzym, welches bisher im Hinblick auf die Krebstherapie nur wenig erforscht ist. Ziel dieser Arbeit war es, die saure Lipase als innovativen Therapieansatz in der Behandlung des TNBC zu etablieren, indem auf Zellebene gezeigt wird, dass durch Hemmung der LIPA der Stammzellcharakter dieses Brustkrebssubtyps suffizient reduziert wird, resultierend in einer verminderten Proliferation sowie einer erhöhten Chemosensibilisierung. Hierzu wurden die triple-negativen Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-436 mit dem LIPA-Inhibitor Lalistat2 behandelt und die Expression tumorstammzellassozierter Marker auf Gentranskript-Ebene mittels Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (engl. „*real-time polymerase chain reaction*“, RT-PCR) sowie auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie (engl. „*Fluorescence Activated Cell Sorting*“, FACS) bestimmt. Zudem wurde die Korrelation der Expression der LIPA sowie weiterer zellulärer Lipasen und Stammzellmarker im Brustkrebsgewebe mithilfe der METABRIC-Datenbank im *cBioPortal for Cancer Genomics* untersucht. Auch der Einfluss der Hemmung der LIPA auf die Proliferation von TNBC sowie die Chemosensibilisierung gegenüber Paclitaxel wurde nach Behandlung der genannten Zelllinien mit Lalistat2 durch Messung der Zellviabilität mittels des *CellTiter-Glo-Assays* bestimmt. Hierzu wurde zudem die Wirkung von Lalistat2 mit dem bereits in der klinischen Forschung etablierten Chloroquin verglichen. Als möglicher Wirkungsmechanismus wurde der Effekt von Lalistat2 auf den JAK-STAT-Signalweg mittels Western Blot untersucht.

Zusammengefasst zeigte sich, dass die Hemmung der LIPA mittels Lalistat2 zu einer signifikanten Reduktion der Expression tumorstammzellassozierter Marker wie des Quotienten CD44/CD24 und ALDH1 in MDA-MB-231-Zellen sowie SOX2 in MDA-MB-436-Zellen führt. Dies konnte zudem auf Proteinebene – sowohl durch Behandlung mit Lalistat2 als auch durch den *Knockdown* der LIPA – reproduziert werden. Des Weiteren konnte eine signifikante Korrelation der Expression von LIPA und ALDH1 sowie CD44/CD24 in Brustgewebsproben festgestellt werden, während andere zelluläre Lipasen nur eine geringe oder negative Korrelation zeigten. Neben der Reduktion des Stammzellcharakters kam es zudem zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation der Zellen nach Behandlung mit Lalistat2. Zusätzlich führte die Hemmung der LIPA zu einer signifikanten Reduktion der mittleren inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ) von Paclitaxel und somit zu einer Chemosensibilisierung, welche verglichen zu Chloroquin einen signifikant stärkeren Effekt zeigte. Als möglicher Pathomechanismus wurde eine signifikante Reduktion des aktivierten STAT3 festgestellt. Zusammengefasst stellt die Hemmung der lysosomalen sauren Lipase einen innovativen Therapieansatz in der Behandlung des TNBC durch Adressierung des hohen Stammzellcharakters dar und sollte insbesondere im Hinblick auf die personalisierte Medizin in Zukunft näher beleuchtet werden.

## Abstract

Triple negative breast cancer (TNBC), which is characterized by the lack of estrogen, progesterone and HER2 receptors, presents a particular challenge in the treatment of this breast cancer subtype due to its high rate of therapy resistance, disease recurrence, and metastasis. The reasons for this include its high stemness and limited therapeutic approaches. Due to the pronounced malignancy as well as the increased rate of premenopausal patients developing TNBC, the research and development of new therapeutic approaches is of particular importance. In recent years, it has been shown that increased metabolism of lipids is a main driver of maintenance of high tumor stemness and thus to the malignancy of TNBC. In this context, the utilization of external and internal lipids is mainly carried out by lysosomal acid lipase (LIPA), an enzyme that has so far been little studied regarding cancer therapy.

The aim of this research was to establish the lysosomal acid lipase as an innovative therapeutic approach in the treatment of TNBC by demonstrating in cell culture models that inhibition of LIPA sufficiently reduces the stemness of this breast cancer subtype, resulting in reduced proliferation as well as increased chemosensitization.

For this purpose, the triple negative breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MDA-MB-436 were treated with the LIPA inhibitor Lalistat2 and the expression of stem cell-associated markers such as CD24, CD44, ALDH1, and SOX2, among others, was determined at transcript level by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and at protein level by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). The results were additionally validated by LIPA knockdown. Furthermore, the correlation of LIPA expression as well as other cellular lipases and cellular stem cell markers in breast cancer tissue was investigated using the METABRIC database in the “cBioPortal for Cancer Genomics”. Also, the effect of LIPA inhibition on proliferation as well as chemosensitization to Paclitaxel, a chemotherapeutic agent commonly used in the treatment of TNBC, was determined after treatment of TNBC cell lines with Lalistat2 by measuring cell viability using the CellTiter-Glo assay. For this purpose, the effect of Lalistat2 was also compared with Chloroquine, which is already established in clinical research. As a possible pathomechanism, the effect of Lalistat2 on the JAK-STAT pathway was investigated by Western blot.

In summary, inhibition of LIPA by Lalistat2 was shown to lead to a significant reduction in the expression of stem cell-associated markers such as CD44/CD24 and ALDH1 in MDA-MB-231 and SOX2 in MDA-MB-436. Moreover, this could be reproduced at the protein level by both treatment with Lalistat2 and knockdown of LIPA. Furthermore, a significant correlation of expression of LIPA and ALDH1 as well as CD44/CD24 was detected in breast cancer tissue, whereas other cellular lipases showed only a low or negative correlation. In addition to the reduction of high cancer stemness, there was also a significant reduction in proliferation of the cells after treatment with Lalistat2. Also, inhibition of LIPA led to a significant reduction in the half-maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of paclitaxel and thus to chemosensitization, which showed a significantly stronger effect than chloroquine. As a possible pathomechanism, a significant reduction especially of activated STAT3 was found after inhibition with Lalistat2. Based on these results, lysosomal acid lipase inhibition represents an innovative therapeutic approach in the treatment of TNBC by addressing high cancer stemness and should be further explored in the future, especially in view of personalized medicine.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>ACAT1</b>	Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase
<b>ALDH1</b>	Aldehyddehydrogenase 1
<b>ATGL</b>	Adipozyten-Triglycerid-Lipase
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BRCA1</b>	Brustkrebsgen 1
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>BET</b>	Bromodomänen und extra-terminale Proteine
°C	Grad Celsius
<b>CD44/24</b>	<i>Cluster of differentiation 44/24</i>
<b>DNMT</b>	DNA-Methyltransferase
<b>DMEM</b>	<i>Dulbeccos's modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DPBS</b>	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
<b>EDTA</b>	Ethyldiamintetraessigsäure
<b>EGF</b>	Epidermaler Wachstumsfaktor
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>ESR1</b>	Östrogenrezeptor 1
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> , Durchfluszytometrie
<b>FAS</b>	Fettsäuresynthase
<b>FCS</b>	Fetales Kälberserum
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
<b>h</b>	Stunde
<b>HDL</b>	<i>High Density Lipoprotein</i>
<b>HER2</b>	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor Typ 2
<b>HDAC</b>	Histondeacetylase
<b>HPRT</b>	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
<b>HSL</b>	Hormon-sensitive Lipase
<b>IC50</b>	Mittlere inhibitorische Konzentration
<b>JAK</b>	Januskinase
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LAL</b>	Lalistat
<b>LDL</b>	<i>Low Density Lipoprotein</i>

<b>LIPA</b>	Lysosomale saure Lipase
<b>MFI</b>	Mittlere Fluoreszenz-Intensität
<b>MGLL</b>	Monoacylglycerol-Lipase
<b>mg</b>	Milligramm
<b>ml</b>	Milliliter
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>PD-L1</b>	<i>Programmed cell death ligand-1</i>
<b>PGR</b>	Progesteronrezeptor
<b>(P-)STAT</b>	<i>(Phospho-) Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
<b>qPCR</b>	Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
<b>RIPA Buffer</b>	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
<b>RLU</b>	Relative Lumineszenz-Einheit
<b>siRNA</b>	<i>Small interfering RNA</i>
<b>SOX2</b>	<i>Sex determining region Y-Box 2</i>
<b>TBST</b>	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
<b>TNBC</b>	Dreifach negativer Brustkrebs
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µM</b>	Mikromolar

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Mammakarzinom.....	1
1.2 Der triple-negative Brustkrebs (TNBC) .....	2
1.3 Die Therapie des TNBC .....	3
1.4 Der Einfluss des Fettstoffwechsels auf die Malignität von Brustkrebszellen.....	4
1.5 Die lysosomale saure Lipase und der saure Lipase-Inhibitor Lalistat2 .....	6
1.6 Ziele der Arbeit.....	7
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>9</b>
2.1 Zelllinien und Kultivierung .....	9
2.2 Expressionsanalysen der Tumor-Stammzellmarker .....	9
2.3 <i>Knockdown</i> der sauren Lipase .....	10
2.4 Western Blot.....	10
2.5 FACS-Analysen.....	11
2.6 Bioinformatische Analysen von Brustkrebs-Gewebeproben.....	12
2.7 Bestimmung der Zellviabilität .....	12
2.8 Bestimmung der Zelltoxizität .....	13
2.9 Bestimmung der Neutrallipide.....	13
2.10 Auswertung und statistische Analyse .....	14
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>15</b>
3.1 Festlegung des therapeutischen Fensters von Lalistat2 .....	15
3.2 Die Rolle der LIPA-Aktivität in der Aufrechterhaltung des Tumorstammzellcharakters von TNBC.....	17
3.2.1 Lalistat2 reduziert die Transkripte stammzellassozierter Gene in TNBC .....	17
3.2.2 LIPA-Inhibition und - <i>Knockdown</i> reduzieren die Expression stammzellassozierter Oberflächenproteine in TNBC .....	19
3.3 LIPA und Tumor-Stammzellmarker zeigen eine Koexpression in Brustkrebs-Gewebeproben .....	21
3.4 LIPA-Hemmung führt zu einer verminderten Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges in TNBC .....	23
3.5 LIPA und JAK1 zeigen eine Koexpression in Brustkrebs-Gewebeproben .....	25
3.6 Lalistat2 hemmt die Proliferation von TNBC.....	27
3.7 Paclitaxel führt zu einem Anstieg der Neutrallipide in TNBC .....	28
3.8 Chemosensibilisierung unter Lalistat2 .....	29
3.9 Lalistat2 führt zu einer stärkeren Anti-Tumor-Wirkung auf TNBC in Kombination mit Paclitaxel als Chloroquin .....	31
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>33</b>

4.1	Der Lipidmetabolismus als Angriffspunkt in der Krebstherapie .....	33
4.2	Die LIPA-Hemmung beeinflusst den JAK-STAT-Signalweg.....	35
4.3	Der BRCA-Status als mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Tumormarker-Expressionsmuster in TNBC-Zelllinien nach LIPA-Hemmung .....	36
4.4	Reduktion der Lipophagie durch LIPA-Hemmung als wesentlicher Bestandteil der TNBC-Therapie .....	37
4.5	Bisherige Studien zur sauren Lipase in der Krebstherapie .....	38
4.6	Nebenwirkungen durch LIPA-Hemmung.....	39
4.7	Schlussfolgerungen.....	40
5	Literaturverzeichnis .....	41

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Mammakarzinom

Brustkrebs stellt aufgrund seiner Häufigkeit mit 11,7 % aller Krebsneuerkrankungen eine der klinisch wichtigsten bösartigen Erkrankungen weltweit dar. Bis heute erkrankt eine von acht Frauen an Brustkrebs, was zu 2,3 Millionen positiven Diagnosen pro Jahr und zu einer der wichtigsten Ursachen für krebsbedingte Todesfälle unter Frauen führt [1].

Während Brustkrebs zu 90 bis 95 % sporadisch auftritt, können genetische Mutationen nur bei 5–10 % der Patienten nachgewiesen werden. BRCA 1- und BRCA 2-Mutationen sind hierbei am häufigsten an der Entstehung des genetisch-assoziierten Mammakarzinoms beteiligt. Neben den nicht beeinflussbaren Risikofaktoren für Brustkrebs wie das Alter, Geschlecht und die Dichte des Drüsengewebes gibt es zahlreiche beeinflussbare Risikofaktoren wie Übergewicht, eine ungesunde v.a. fettreiche Ernährung und Hormonersatztherapien. Auf der anderen Seite kann eine vermehrte Anzahl an Schwangerschaften und die Dauer der Stillzeit das Risiko von Brustkrebs reduzieren [2].

Anhand des Aufbaus der Brust, bestehend aus mehreren Läppchen (Lobuli) milchproduzierender Zellen sowie Milchgängen (Ductus), eingebettet in Fett- und Bindegewebe, unterteilt man das invasive, also bereits die Basalmembran überschreitende, Mammakarzinom in das lobuläre und duktale Mammakarzinom. Der aus den Milchgängen hervorgehende duktale Brustkrebs stellt hierbei mit bis zu 75 % die häufigste Form dar, gefolgt vom lobulären Brustkrebs mit 10–15 %, welcher die Milchläppchen betrifft. Zusätzlich gibt es weitere seltene Formen wie das muzinöse, tubuläre und medulläre Mammakarzinom [3].

Brustkrebs ist keine einheitliche Krankheit, sondern wird aufgrund seiner molekularen Pathologie in verschiedene Subtypen eingeteilt. Maßgeblich für die Therapie und Prognose des Mammakarzinoms entscheidend ist die Expression der Hormonrezeptoren für Östrogen und Progesteron sowie des humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors Typ 2 (HER2-Rezeptor). Anhand dieser sowie des Zellteilungsmarkers Ki-67 erfolgt eine molekulare Einteilung des Mammakarzinoms in folgende Subtypen [4, 5]:

- Luminal A: Hormonrezeptor-positiv, HER2-negativ, Ki-67 niedrig
- Luminal B: Hormonrezeptor-positiv, HER2-positiv oder negativ, Ki-67 hoch
- HER2-Subtyp: HER2-positiv, Hormonrezeptor-negativ
- Basaler Subtyp: HER2-negativ, Hormonrezeptor-negativ

Während der mit 40–60 % häufigste Subtyp Luminal A mit einer guten Prognose und einer niedrigen Rezidivrate assoziiert ist, ist der basale Subtyp, welcher 10–20 % aller Brustkrebsfälle ausmacht, durch einen aggressiveren Verlauf gekennzeichnet. Vom basalen Subtyp zu unterscheiden ist der triple-negative Brustkrebs, welcher zwar zu etwa 75 % dem basalen Subtyp entspricht, jedoch nicht anhand der Molekularpathologie, sondern anhand der Immunhistochemie eingeteilt wird [5, 6]. Der triple-negative Brustkrebs, welcher immunhistochemisch durch das Fehlen von Hormon- und HER2-Rezeptoren gekennzeichnet ist, zeigt hierbei ein besonders aggressives Verhalten. Dies führt zu einer der schlechtesten Prognosen unter den Brustkrebs-Subtypen und einem dringenden Therapiebedarf [4]. Im Folgenden wird unser Fokus daher auf den triple-negativen Brustkrebs gelegt.

## 1.2 Der triple-negative Brustkrebs (TNBC)

Der triple-negative Brustkrebs, welcher durch das Fehlen der Expression vom Östrogenrezeptor 1 (ESR1), Progesteronrezeptor (PGR) sowie humanem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor Typ 2 (HER2-Rezeptor) gekennzeichnet ist, macht etwa 15 % aller Subtypen von Patientinnen mit der Diagnose Brustkrebs aus [7]. Während die Therapie von Hormonrezeptor- und HER2-positiven Krebsarten effiziente zielgerichtete Behandlungsoptionen umfasst, stellt TNBC aufgrund des Fehlens zielgerichteter Therapieansätze eine besondere Herausforderung dar. Hierbei besteht die Therapiestrategie überwiegend aus einer Kombination von Operation und Chemotherapie [8]. Entsprechend seiner hohen Malignität, beruhend auf einer erhöhten Rate von Therapieresistenzen, Krankheitsrückfällen und einer frühen Metastasierung, hat TNBC die schlechteste Prognose unter den Brustkrebs-Subtypen [9–11]. Aufgrund der hohen Anzahl von Patientinnen mit TNBC, darunter ein hoher Anteil prämenopausaler junger Frauen (< 40 Jahre) [12], ist es von besonderer Bedeutung, neue wirkungsvolle und zielgerichtete Therapien zur Behandlung dieses aggressiven Subtyps zu etablieren.

Hierbei stellt sich die Frage, welche Faktoren zu der hohen Malignität und Aggressivität des TNBC beitragen, um diese zielgerichtet adressieren zu können. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass vor allem der hohe Stammzellcharakter und der daraus resultierende niedrige Differenzierungsstatus des TNBC gekoppelt an metabolisch dysregulierte Prozesse als Hauptakteure in der Entstehung von Therapieresistenzen, Rezidiven sowie Metastasierung fungieren [13]. Demnach besitzen Tumorstammzellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in verschiedene Gewebe und dies – im Unterschied zu normalen Stammzellen – unkontrolliert ohne externe Stimuli [14]. Werden die Oberflächenmerkmale verschiedener Brustkrebssubtypen betrachtet, fällt auf, dass die Tumorstammzellen des TNBC durch die Expression der Oberflächenmarker  $CD44^{high}/CD24^{low}$  sowie  $ALDH1^{high}$  gekennzeichnet sind, ein

Expressionsmuster, welches mit der größten Malignität aller Brustkrebssubtypen einhergeht [15]. Der Quotient von CD44/CD24 ist hierbei am größten in der basal-mesenchymalen MDA-MB-231-Zelllinie, welche als Modell für TNBC verwendet wird. Während CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> als Oberflächenmarker mit einer verstärkten Zellproliferation sowie Tumorgenese einhergeht, zeigt sich bei Tumorstammzellen, die vermehrt ALDH1 exprimieren, ein ausgeprägtes Potenzial zur Metastasierung. Hierbei zeigt sich eine konstante Expression dieser Oberflächenmarker sowohl im Primärtumor als auch in den Metastasen sowie in zirkulierenden Tumorzellen [15]. Bezogen auf das Ansprechen auf Chemotherapeutika zeigt sich zudem bei Patientinnen mit TNBC und verstärkter Expression von ALDH1 eine erhöhte Rate an Chemotherapieresistenzen [16]. Trotz der immer detaillierteren Erkenntnisse zu den molekularen Charakteristika des TNBC, welche zu dessen hohem Stammzellcharakter beitragen, sind bisher die zugrundeliegenden pathophysiologischen Prozesse ungeklärt. Das Erkennen dieser Mechanismen könnte die Grundlage zur Entwicklung neuer personalisierter Therapien des TNBC darstellen.

### 1.3 Die Therapie des TNBC

Die Behandlung des TNBC stellt aufgrund der hohen Rate an Rezidiven, Metastasenbildung und Therapieresistenzen eine besondere Herausforderung dar. Bisher sind die Therapieansätze des TNBC aufgrund seiner aggressiven Tumoriologie sowie fehlenden Angriffspunkte begrenzt und legen den Fokus auf eine Chemotherapie sowie Operation. Als systemische Therapie wird hierbei in den meisten Fällen auf eine Anthrazyklin-basierte und/oder Taxan-basierte Chemotherapie zurückgegriffen. Diese erfolgt vor allem in Frühstadien neoadjuvant [8]. Ergänzend zu einer Anthracyclin-/Taxan-basierten Chemotherapie konnte in verschiedenen Studien zudem ein positiver Effekt in Bezug auf die pathologische Komplettremission bei der Verwendung einer platinhaltigen-Therapie festgestellt werden [17]. Zusätzlich zur Chemotherapie findet beim metastasierten TNBC der monoklonale VEGF-Inhibitor Bevacizumab Anwendung. Dessen Verwendung führt zwar zu einem verlängerten progressionsfreien Überleben, eine Verbesserung des Gesamtüberlebens konnte jedoch bisher nicht festgestellt werden [18]. Zusätzlich zeigte sich ein hohes Nebenwirkungsprofil [19]. Die heterogene Tumoriologie des TNBC stellt zum einen eine besondere Herausforderung in dessen Therapie dar, ist auf der anderen Seite jedoch auch die Voraussetzung für die Erforschung neuer Therapieansätze. So sind in den letzten Jahren vor allem Immuncheckpoint-Inhibitoren in den Vordergrund der Forschung gerückt. Hintergrund ist, dass Tumorzellen mithilfe einer PD-L1-Expression dem körpereigenen Immunsystem entgehen und somit nicht bekämpft werden können. Monoklonale Antikörper gegen PD-L1 wie Atezolizumab oder gegen den PD1-Rezeptor wie Pembrolizumab in Kombination mit Chemotherapeutika sind dabei vielversprechende Substanzen in der Behandlung des PD-L1-positiven TNBC [8, 18, 20].

Trotz zunehmender Therapiestrategien ist der triple-negative Brustkrebs mit einer der schlechtesten Prognosen aller Brustkrebssubtypen vergesellschaftet [21]. Vor allem die diverse Tumorbiologie innerhalb des TNBC macht deutlich, dass die Erforschung weiterer Therapieansätze von großer Bedeutung ist. Ein bisher in der Therapie des TNBC nur wenig erforschtes Themengebiet stellt hierbei die Beeinflussung des Lipidmetabolismus dar. Das Potenzial, welches sich hieraus ergibt, möchten wir im Folgenden erläutern.

#### 1.4 Der Einfluss des Fettstoffwechsels auf die Malignität von Brustkrebszellen

Die Zusammenhänge des epigenetisch regulierten hohen Stammzellcharakter und folgend niedrigem Differenzierungsstatus und metabolischer Prozesse von Tumorzellen haben in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Diesbezüglich führt insbesondere der erhöhte Lipidmetabolismus, welcher durch JAK/STAT3-regulierte  $\beta$ -Oxidation bedingt ist, zu einem erhöhten Stammzellpotential und Chemotherapieresistenzen in Brustkrebszellen [22]. Es zeigt sich, dass eine erhöhte Ansammlung von Lipiden innerhalb von Tumorzellen mit einem niedrigen Differenzierungsstatus in Brustkrebszellen verknüpft ist, was wiederum zu einer erhöhten Malignität und verstärkten Proliferation der Tumorzellen führt [23]. Hierbei unterstützt die Verfügbarkeit von Lipiden die Zellmembran-Biogenese, die *lipid raft*-Formation sowie die veränderte Zellkommunikation, einhergehend mit Tumor-Proliferation, Zell-Überleben und erhöhter Invasivität [23]. Im Vergleich zu Hormonrezeptor-positiven Brustkrebszellen zeigen Hormonrezeptor-negative Tumorzellen erhöhte Konzentrationen von Triglyceriden und Cholesterinestern sowie eine höhere Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT1)-Expression und -Aktivität, ein Enzym, welches die Veresterung freier Fettsäuren in Cholesterinester im endoplasmatischen Retikulum initiiert [24]. Zudem exprimiert TNBC eine höhere Menge an Phosphatidylcholinen, welche für die Bildung von LDL und HDL-Vesikeln von Bedeutung sind und somit an Arzneimittelausstoßmechanismen und Chemotherapieresistenzen beteiligt sein könnten [25, 26]. Während bei Hormonrezeptor-positiven Tumoren eine erhöhte endogene Neutrallipid-Synthese als Ursache für die vermehrte zelluläre Lipid-Konzentration ausgemacht werden konnte, akkumulieren triple-negative Brustkrebszellen Neutrallipide primär aus exogenen Quellen [27]. Zusätzlich zur Verwertung externer Lipide nutzen Tumorzellen intrazelluläre Neutrallipide aus Speicherdepots, den sogenannten *Lipid Droplets*, mittels Lipophagie, welche eine besondere Form der Autophagie darstellt [28, 29].

Bei *Lipid Droplets* handelt es sich hierbei um intrazelluläre Speicherdepots für Neutrallipide, welche vor allem in zellulären Stresssituationen durch Lipophagie dem Schutz der Tumorzellen vor Apoptoseinduktion dienen, wie zum Beispiel bei zellulärem Stress durch eine Chemotherapie,

und somit zur Aufrechterhaltung des zellulären Stammzellcharakters sowie der Membran- und ER-Homöostase führen. Darüber hinaus werden durch diese Proliferation und Migration der Tumorzellen gefördert [30]. Da insbesondere der Hormonrezeptor-negative Brustkrebs, darunter TNBC, eine hohe Anzahl von *Lipid Droplets* besitzt, erklärt sich die hohe Malignität dieses Subtyps [24]. Aufgrund der Relevanz des Lipidmetabolismus für die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters von Brustkrebszellen, stellt dieser einen vielversprechenden Therapieansatz zur Behandlung vor allem Hormonrezeptor-negativer Brustkrebsarten dar. So zeigt sich in den triple-negativen MDA-MB-231-Zellen, dass eine lipidfreie Umgebung zu einer reduzierten Anzahl von *Lipid Droplets* sowie einer um 85 % abnehmenden Zell-Migration führt [27]. Auch die Verwendung von Statinen, welche die Synthese von Cholesterin hemmen, wurde in der Behandlung des TNBC in den letzten Jahren vermehrt diskutiert. Während eine lipidsenkende Therapie mit Statinen während einer endokrinen Therapie bei Patientinnen mit Hormonrezeptor-positivem Brustkrebs mit einem verbesserten krankheitsfreiem Überleben und Intervall assoziiert ist [31], sind die Ergebnisse beim TNBC widersprüchlich. Auf der einen Seite zeigt sich eine Abnahme der Proliferation der Zellen des p53-mutierten TNBC [32] sowie klinisch ein verbessertes Gesamtüberleben und Brustkrebs-spezifisches Überleben [33], während in anderen Studien wiederum kein verbessertes Gesamtüberleben bezogen auf TNBC festgestellt werden konnte [34].

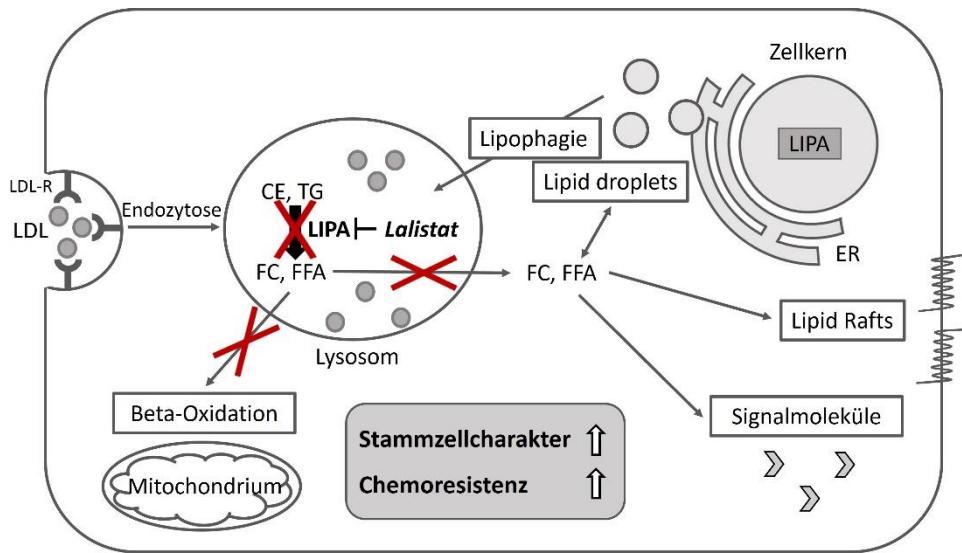
Auch die Lipophagie stellt aufgrund der protektiven Wirkung für Brustkrebszellen einen wichtigen Therapieansatz in der Behandlung des TNBC dar. Besonderes Interesse hat hierbei in den letzten Jahren Chloroquin erhalten. Hierbei handelt es sich um ein Anti-Malaria-Mittel, welches durch Inhibierung der Fusion von Autophagosom und Lysosom die Autophagie hemmt. So zeigt sich durch Verwendung von Chloroquin eine verstärkte Apoptose sowie eine Chemosensibilisierung von TNBC gegenüber Paclitaxel sowie Carboplatin, während klinisch zudem eine Reduktion von zirkulierenden Krebsstammzellen nachgewiesen werden konnte [35]. Außerdem konnte zusätzlich eine Hemmung des JAK/STAT3-Signalweges in TNBC durch Verwendung mit Chloroquin festgestellt werden [35, 36].

Zusammengefasst stellen sowohl die Hemmung der externen Lipidaufnahme als auch die Hemmung der Lipophagie bedeutende Angriffspunkte in der Behandlung des TNBC dar. Ein Enzym, welches hierbei für beide Prozesse der Lipidverwertung von Bedeutung ist, ist die lysosomale saure Lipase (LIPA), da sowohl die Aufarbeitung externer und interner Lipide als auch die Weiterverwertung dieser Lipide die Hydrolyse durch die LIPA erfordert. Trotz dieser zentralen Rolle in der Lipidverwertung, ist die LIPA bezüglich der Enzymaktivität in TNBC kaum erforscht und ist daher im Hinblick auf die Reduktion des Stammzellcharakters sowie die Auswirkungen auf Proliferation und Chemosensibilisierung von TNBC ein vielversprechendes Forschungsgebiet.

## 1.5 Die lysosomale saure Lipase und der saure Lipase-Inhibitor Lalistat2

Bei der lysosomalen sauren Lipase (LIPA) handelt es sich um ein lysosomales Enzym, welches durch das LIPA-Gen kodiert wird und für die Spaltung verschiedener Typen von externen sowie internen Lipoproteinen, darunter Triglyceride und Cholesterinester, zuständig ist [37]. Nachdem LDL mittels LDL-Rezeptor-vermittelter Endozytose in die Brustkrebszelle aufgenommen wurde, erfolgt die Verschmelzung des aus der Zellmembran generierten Endosom mit dem Lysosom. Wie in Abbildung 1 dargestellt kommt es nun zur Hydrolyse von Triglyceriden und Cholesterinestern zu freien Fettsäuren und freiem Cholesterin mittels LIPA [38]. Die hierdurch entstandenen freien Fettsäuren können nun auf verschiedene Weisen verwertet werden. Zum einen werden sie mittels  $\beta$ -Oxidation in den Mitochondrien zur ATP-Produktion verwendet und führen zur Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters sowie der Chemotherapie-Resistenz von Brustkrebszellen, hierbei unter anderem durch den *Janus-activated kinase (JAK)/ Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)* Signalweg [22]. Zum anderen werden freie Fettsäuren in Form von *Lipid droplets* nach erneuter Veresterung durch die Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT1) gespeichert und in zellulären Stresssituationen durch Lipophagie wiederverwertet [39]. Weitere Funktionen freier Fettsäuren finden sich in der Verwendung als Signalmoleküle oder als Lipid Rafts, für die ebenfalls pro-onkogene Wirkungen beschrieben sind [40].

In dieser Arbeit untersuchen wir die Effekte der Hemmung der LIPA mittels des LIPA-Inhibitors Lalistat2 in TNBC. Lalistat2 ist ein spezifischer kompetitiver Inhibitor der lysosomalen sauren Lipase und hemmt somit die Hydrolyse von Cholesterolestern und Triglyceriden in freie Fettsäuren. Ziel ist es, hierdurch den Tumorstammzellcharakter von TNBC zu reduzieren und Brustkrebszellen für eine Chemotherapie zu sensibilisieren.



LDL: Low-density Lipoprotein  
 LDL-R: Low-density Lipoprotein Rezeptor  
 CE: Cholesterinester

FC: Freies Cholesterin  
 FFA: Freie Fettsäuren  
 TG: Triglyceride

ER: Endoplasmatisches Retikulum  
 LIPA: Saure Lipase (Gen/Enzym)

**Abb. 1: Die Funktion der lysosomalen sauren Lipase (LIPA) im Lipidmetabolismus**

Illustrative Darstellung der Funktion der lysosomalen sauren Lipase in einer Zelle sowie die Auswirkungen einer Hemmung mittels des sauren Lipase-Inhibitors Lalistat2 (hemmende Wirkung dargestellt durch durchgestrichene Pfeile).

## 1.6 Ziele der Arbeit

Die Therapie des triple-negativen Brustkrebses stellt aufgrund dessen hoher Malignität und Aggressivität bei gleichzeitig fehlenden zielgerichteten Therapieansätzen eine besondere Herausforderung dar. Während sich bei anderen Brustkrebssubtypen wie den Hormonrezeptor-positiven oder HER2-Rezeptor-positiven Mammakarzinomen aufgrund zielgerichteter Therapien ein gutes Therapieansprechen zeigt, ist TNBC gekennzeichnet durch Therapieresistenzen, Rezidive und eine frühe Metastasierung. Daher und auch aufgrund der hohen Anzahl junger Frauen, die am TNBC erkranken, ist es von immenser Bedeutung, neue zielgerichtete Therapien zu erforschen. Ziel dieser Arbeit ist es, die lysosomale saure Lipase als innovativen Therapieansatz in der Behandlung des TNBC vorzustellen. Hierzu soll die Bedeutung der LIPA als wesentlicher Bestandteil der zellulären Lipidverwertung für die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters von triple-negativen Brustkrebszellen unterstrichen werden, indem die Auswirkungen einer Hemmung oder eines *Knockdowns* der LIPA bezüglich der Reduktion des Tumorstammzellcharakters und der Proliferation sowie der Sensibilisierung gegenüber Chemotherapeutika untersucht werden. Insbesondere im Hinblick auf das zunehmende Forschungsinteresse für die Zusammenhänge von metabolischen Prozessen und epigenetischen Regulationsmechanismen soll mit dieser Arbeit die Schnittstelle von dem epigenetisch

kontrollierten niedrigen Differenzierungsstatus und hohen Stammzellcharakter und dem erhöhten Lipidmetabolismus von TNBC beleuchtet werden. Zur Umsetzung der Ziele werden hierbei die triple-negativen Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 sowie MDA-MB-436 verwendet, bei welchen LIPA entweder mittels des LIPA-Inhibitors Lalistat2 gehemmt oder ein *Knockdown* mittels LIPA-spezifischer siRNA durchgeführt wird. Zunächst soll hierdurch gezeigt werden, dass die Hemmung sowie der *Knockdown* der LIPA und somit des Lipidstoffwechsels eine Reduktion stammzellassozierter Marker bewirkt. Des Weiteren ist es das Ziel, hierdurch eine Reduktion der Proliferation sowie eine Zunahme der Sensibilisierung gegenüber Chemotherapeutika, hier anhand von Paclitaxel, von triple-negativen Brustkrebszellen zu bewirken.

Zusammengefasst soll diese Arbeit die bisher nur bezüglich Krebstherapien wenig erforschte lysosomale saure Lipase als neuen Therapieansatz in der Therapie des TNBC etablieren, insbesondere im Hinblick auf das große Potenzial in der personalisierten Medizin.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zelllinien und Kultivierung

Im Rahmen dieser Promotion wurden die triple-negativen Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) und MDA-MB-436 (ATCC® HTB-130™) verwendet. Alle Zelllinien wurden hierbei von ATCC (LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland) bezogen. Die Zellen wurden mit *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) Medium 1640 (Gibco, UK) zusätzlich 15 % fetalem Kälberserum (FCS) sowie 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco, USA) kultiviert und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Als Modell für gesunde Brustzellen wurde die MCF-10A-Zelllinie (ATCC® CRL-10317™) verwendet und mit *Dulbeccos's modified Eagle Medium* (DMEM) F12 (Gibco, UK) zusätzlich 5 % Pferde-Serum (Gibco, USA), 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco, USA), *Epidermal growth factor* (EGF) von 20 ng/ml (Peprotech), 0,5 mg/ml Hydrocortison (Sigma, #H-0888), 100 ng/ml Cholera-Toxin (Sigma, #C-8052) und 10 µg/ml Insulin (Sigma, #I-1882) kultiviert. Die Inkubation fand bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> statt.

Zweimal wöchentlich wurden alle Zelllinien unter Verwendung von *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) (Gibco, UK) und 0,5 % Trypsin-EDTA (10 %) (Gibco, UK) passagiert.

### 2.2 Expressionsanalysen der Tumor-Stammzellmarker

Um die Expression der Tumor-Stammzellmarker unter Verwendung von Lalistat2 zu untersuchen, wurden die triple-negativen Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-436 mit einer Zelldichte von 6,5x10<sup>5</sup> Zellen pro ml in einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach einer Anwachphase von 24 Stunden folgte die Inkubation der Zellen mit Lalistat2 in einer Konzentration von 50 µM sowie DMSO als Kontrolle für sechs Tage. Nach drei Tagen fand ein Mediumwechsel statt. Anschließend wurde eine mRNA-Isolation mittels *ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep system* (Promega, USA) sowie eine cDNA-Synthese mittels *Superscript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA) nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

Analysen der Genexpression von CD24, CD44, ALDH, PDL1, SOX sowie der *housekeeping*-Gene GAPDH und HPRT fanden mithilfe der entsprechenden Primer (metabion international AG, Deutschland) sowie mithilfe von *LightCycler® 480 SYBR® Green I Master* (Roche, Mannheim, Deutschland) statt.

Alle Messungen wurden unter Verwendung des *LightCycler® 480 Instrument II* (Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte unter Verwendung der  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ -Methode [35]. Zusätzlich wurden alle erhaltenen Werte durch den  $2^{-Cp}$ -Mittelwert der DMSO-Kontrolle (normalisiert auf das entsprechende *housekeeping*-Gen) eines Versuchs dividiert, um eine Standardabweichung für die Kontrolle zu erhalten.

## 2.3 Knockdown der sauren Lipase

Für den *Knockdown* der sauren Lipase wurden MDA-MB-231-Zellen in einer Zelldichte von  $2 \times 10^5$  Zellen pro ml in einer 6-Well-Platte ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Es erfolgte die Behandlung der Zellen mit *Lipofectamine® RNAiMAX Reagent* (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA) nach Herstellerprotokoll. Als zielspezifische siRNA wurde die *Silencer® Select siRNA* (Thermo Fisher, Bestellnummer: 4392420; siRNA ID: s8199) mit der Negativkontrolle (Thermo Fisher, Bestellnummer: 4390843) verwendet. Als Nährmedium wurde *Advanced Medium* (Gibco, UK) zusätzlich Dexamethason in einer Konzentration von 100 nM verwendet. Nach drei Tagen fand ein Mediumwechsel statt und die Zellen wurden für drei weitere Tage mit RPMI-Medium 1640 (Gibco, UK) zusätzlich 15 % fetalem Kälberserum (FCS) sowie 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco, USA) kultiviert.

## 2.4 Western Blot

Zur Bestimmung einer möglichen Reduktion von P-STAT3 und STAT3 unter Behandlung mit Lalistat2 wurden MDA-MB-231-Zellen in einer Zelldichte von  $6,5 \times 10^5$  Zellen pro ml in zwei 6-Well-Platten ausgesät. Nach einer Anwachsphase von 24 Stunden fand eine Inkubation mit Lalistat2 in einer Konzentration von 25  $\mu$ M und 50  $\mu$ M sowie mit 0,05-prozentigem DMSO als Kontrolle für sechs Tage statt. Nach drei Tagen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen mithilfe von *Radioimmunoprecipitation assay buffer* (RIPA Buffer) (ThermoFisher Scientific) lysiert und die Proteinkonzentration über das *Pierce BCA Protein Assay Kit* (ThermoFisher Scientific, USA) bestimmt. Es folgte die Übertragung der Proteinextrakte (25  $\mu$ g) auf das SDS-Gel sowie anschließend auf die PVDF-Membran (BioRad) über Nacht. Für die Inkubation mit dem Primärantikörper wurden der *Anti-P-STAT3-antibody* [Phospho-Stat3 (Tyr705)(D3A7) XP® Rabbit mAb] (CellSignaling) und *Anti-STAT3-antibody* [Stat3 (79D7) Rabbit mAb #4904] (CellSignaling) in einer Verdünnung von 1:1000 in 5 % BSA-

TBST über Nacht verwendet. Dann erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper *Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody* (Cell Signaling, #7074S) über zwei Stunden. Unter Verwendung von *Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare, UK) fand die Visualisierung der (P-)STAT3-Expression mittels der Image Lab Software statt. Zur Validierung der (P-)STAT3-Expression wurde zusätzlich die  $\beta$ -Actin-Expression mittels des Primärantikörpers  *$\beta$ -Actin Mouse mAb* (C4) (Santa Cruz) sowie die GAPDH-Expression mittels *GAPDH antibody mouse mAb* (Santa Cruz, 0411) in einer Verdünnung von 1:2500 bestimmt. Als Sekundärantikörper wurde der *Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody* (Cell Signaling, #7076S) verwendet.

Zur Validierung des *Knockdowns* der sauren Lipase wurde nach Behandlung von MDA-MB-231-Zellen mit LIPA-spezifischer siRNA ein Western Blot wie oben beschrieben durchgeführt. Als Primärantikörper wurde der *Anti-Lysosomal acid lipase/LAL antibody* (abcam, ab154356) in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper *anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody* (Cell Signaling, #7074S). Zur Validierung der sauren Lipase-Expression wurden zusätzlich die  $\beta$ -Actin- und GAPDH-Expression mittels der Primärantikörper *GAPDH (0411) mouse antibody* (Santa Cruz, sc-47724) und  *$\beta$ -actin (C4) mouse antibody* (Santa Cruz, sc-47778) in einer Verdünnung von 1:2500 und *anti-mouse IgG, HRP-linked antibody* (Cell Signaling, #7076S) als Sekundärantikörper bestimmt.

## 2.5 FACS-Analysen

MDA-MB-231-Zellen wurden in einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen pro ml in einer 6-Well-Platte ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 50  $\mu$ M Lalistat2 sowie einer korrespondierenden DMSO-Kontrolle für sechs Tage oder ein LIPA-*Knockdown* wurde wie oben beschrieben indiziert. Nach dem Waschen der Zellen mit DPBS wurden diese mittels *Cell Dissociation Buffer* (Gibco, 13151-014) getrennt. Anschließend erfolgte der Fc-Block mittels *blocking buffer* (Dako, X0909) und die Markierung unter Verwendung der CD24- (Abcam, SN3) und CD44-Antikörper (Novus, MEM-263) im Antikörperverdünnung (Dako, S2022) wie im Herstellerprotokoll angegeben. Die gewaschenen Zellen wurden im FACS-Puffer, bestehend aus DPBS, 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Sigma, E6758) und 0,2 % BSA (Sigma, A9418), gelöst und *Propidium iodide* (Gibco, P1304MP) zur Markierung toter Zellen wurde hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Analyse mittels Durchflusszytometrie. Alle Schritte erfolgten bei 4 °C.

## 2.6 Bioinformatische Analysen von Brustkrebs-Gewebeproben

Für die bioinformatischen Analysen der Koexpression von LIPA mit ALDH1A1 und CD44/CD24 sowie mit JAK1 und IL6 in Brustkrebs-Gewebeproben wurde die METABRIC-Datenbank von *cBioPortal for Cancer Genomics* [43–45] verwendet. Hierbei wurde die mRNA-Expression mittels *Illumina HT-12 v3 microarray* (mRNA-Expression: log2 (Intensitätslevel)) bestimmt.

## 2.7 Bestimmung der Zellviabilität

Zur Bestimmung der Zellviabilität nach Behandlung von TNBC-Zellen mit Lalistat2 in Kombination mit Paclitaxel wurden die verwendeten Zelllinien in einer Zelldichte von  $6,5 \times 10^5$  Zellen pro ml in 384-Well-Platten (Greiner, Deutschland) ausgesät. Nach einer Anwachphasphase von 24 Stunden folgte die Präinkubation mit Lalistat2 (TOCRIS, Bristel, UK), gelöst in DMSO (Sigma, UK), in verschiedenen Konzentrationen (10-75  $\mu$ M) und mit entsprechender DMSO-Kontrolle für drei Tage. Anschließend wurden die Zellen weitere drei Tage mittels einer Kombination von Lalistat2 und NeoTaxan® (Hexal, Holzkirchen, Deutschland) in einer horizontalen 1:2-Verdünnungsreihe von 40  $\mu$ M bis auf 156,25 nM inkubiert.

Zur Messung der Zellviabilität wurde der *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* (Promega, Madison, USA) verwendet.

Um die Effekte von Lalistat2 in einem lipid-reduzierten Medium zu untersuchen, wurde derselbe Versuch unter Verwendung von *Advanced RPMI 1640 Medium* (gibco, UK) zusätzlich 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco, USA) und L-Glutamin (Gibco, UK) als Nährmedium durchgeführt. Hierbei wurde Lalistat2 in einer Konzentration von 25  $\mu$ M verwendet.

Die antiproliferativen Effekte von Lalistat2 wurden untersucht, indem die verwendeten Zelllinien in einer Zelldichte von  $4 \times 10^5$  Zellen pro ml in einer 384-Well-Platte ausgesät und mit Lalistat2 in einer horizontalen 1:2-Verdünnungsreihe von 50  $\mu$ M bis 3,125  $\mu$ M für sechs Tage behandelt wurden. Nach drei Tagen fand ein Mediumwechsel statt. Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte mit *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* (Promega, Madison, USA).

Zum Vergleich des Autophagie-Inhibitors Chloroquin mit Lalistat2 wurden MDA-MB-231-Zellen in einer Zelldichte von  $6,5 \times 10^5$  pro ml für drei Tage mit 25  $\mu$ M oder 50  $\mu$ M Chloroquin (Sigma, Steinheim, Deutschland), 50  $\mu$ M Lalistat2 oder einer Kombination von 50  $\mu$ M Lalistat2 mit 25  $\mu$ M oder 50  $\mu$ M Chloroquin inkubiert. Als Kontrollen wurden die Lösungsmittel von Lalistat2 in Form von DMSO und von Chloroquin in Form von H<sub>2</sub>O in entsprechenden Konzentrationen verwendet. Nachfolgend erfolgte die Behandlung mit Paclitaxel in einer horizontalen 1:2-Verdünnungsreihe von 40  $\mu$ M bis 156,25 nM für weitere drei Tage. Die

Bestimmung der Zellviabilität erfolgte mit *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* (Promega, Madison, USA).

Um den Einfluss von Lalistat2 bezüglich der Zellviabilität auf gesunde Zellen beurteilen zu können, wurde als Modell die Brustzelllinie MCF10A in einer Zelldichte von  $6,5 \times 10^5$  Zellen pro ml in einer 384-Well-Platte ausgesät. Nach einer 24h-Anwachsphase wurden die Zellen für sechs Tage mit Lalistat2 in einer Verdünnungsreihe von 800  $\mu\text{M}$  bis runter auf 3,125  $\mu\text{M}$  inkubiert. Nach drei Tagen wurde hierbei ein Mediumwechsel durchgeführt. Im Anschluss fand ebenfalls eine Messung der Zellviabilität mittels *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* statt.

Alle Messungen fanden unter Verwendung von *The Spark® multimode microplate reader* (Tecan, Schweiz) statt.

## 2.8 Bestimmung der Zelltoxizität

Zur Bestimmung der Zelltoxizität durch Lalistat2 wurden MDA-MB-231 Zellen in einer 384-Platte ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation mit Lalistat2 in einer Verdünnungsreihe von 200  $\mu\text{M}$  bis 0,78125  $\mu\text{M}$  für sechs Tage inklusive eines Mediumwechsels nach drei Tagen. Zur Bestimmung der Zelltoxizität wurde der *CellTox™ Green Cytotoxicity Assay* (Promega, Madison, USA) nach Herstellerprotokoll eingesetzt.

Alle Messungen fanden unter Verwendung von *The Spark® multimode microplate reader* (Tecan, Schweiz) statt.

## 2.9 Bestimmung der Neutrallipide

Zur Bestimmung der Menge der Neutrallipide unter Paclitaxel im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle wurden MDA-MB-231-Zellen in einer Zelldichte von  $6,5 \times 10^5$  Zellen pro ml in einer 384-Well-Platte ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Es erfolgte eine Inkubation der Zellen mit Paclitaxel in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  für sechs Tage. Als Kontrolle fungierte das im Paclitaxel als Lösungsmittel enthaltende Macrogolglycerolricinoleat 35 (Sigma, Taufkirchen, Germany) und Ethanol in entsprechender Konzentration. Im Anschluss wurde zum Nachweis der Neutrallipide, nach Abzentrifugation des Mediums, Bodipy (Sigma) in einer Verdünnung von 1:250 hinzugefügt und die relative Fluoreszenz-Intensität gemessen. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* (Promega, Madison, USA) bestimmt.

Die angegebenen RFI-Werte wurden auf die Zelldichte normalisiert und in Relation zur Kontrolle gesetzt.

## 2.10 Auswertung und statistische Analyse

Alle Auswertungen wurden mithilfe von *GraphPad PRISM* durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung des ungepaarten *Student's t-Test* für Paarvergleiche sowie der *one-way* ANOVA für Gruppenvergleiche. Zum Vergleich der möglichen Gruppenkombinationen wurde der Tukey post-hoc Test verwendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde bei allen durchgeführten Tests als statistisch signifikant angenommen.

### 3 Ergebnisse

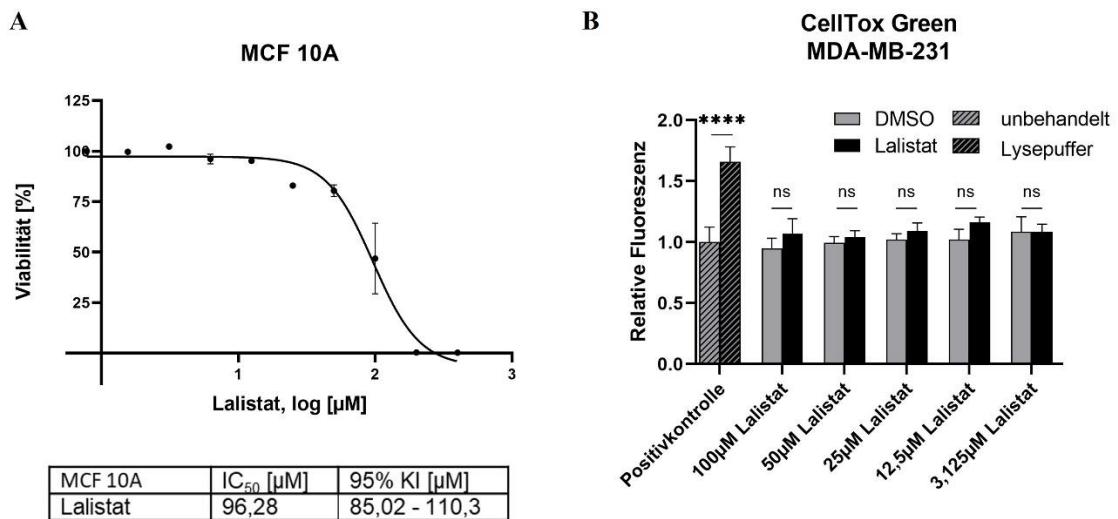
Die in diesem Abschnitt aufgeführten Ergebnisse beziehen sich in Teilen auf unsere auf bioRxiv veröffentlichte Publikation „*Lysosomal acid lipase-activity as a novel target to efficiently address triple-negative breast cancer high malignancy*“ [11].

#### 3.1 Festlegung des therapeutischen Fensters von Lalistat2

Zur Ermittlung der geeigneten Dosierung von Lalistat2, bei welcher der Einfluss auf gesunde Brustzellen möglichst minimal gehalten wird, wurde die IC<sub>50</sub> von Lalistat2 nach Behandlung der MCF 10A Zelllinie als Modell bestimmt. Hierbei ergab sich eine IC<sub>50</sub> von Lalistat2 von 96 µM (Abbildung 2A). Somit befindet sich die maximal verwendete Konzentration von 50 µM Lalistat2 nicht im toxischen Bereich für gesunde Brustzellen.

Um etwaige toxische Effekte bei der alleinigen Behandlung von triple-negativen Brustkrebszellen mit Lalistat2 zu ermitteln, erfolgte zudem die Bestimmung der Zelltoxizität von Lalistat2 in unterschiedlichen Konzentrationen anhand der MDA-MB-231-Zelllinie. Hierfür wurde die Toxizität auf die Zellen mittels relativer Fluoreszenz-Intensität über den *CellTox<sup>TM</sup> Green Cytotoxicity Assay* bestimmt. Es zeigte sich hierbei in den untersuchten Konzentrationen zwischen 3,125 µM und 100 µM kein signifikanter Unterschied der relativen Fluoreszenz, dementsprechend der Toxizität, zwischen Lalistat2 und der entsprechenden DMSO-Kontrolle (Abbildung 2B). Als Positivkontrolle wurde der im Assay enthaltende Lysepuffer verwendet. Dieser führte zu einem signifikanten Anstieg der relativen Fluoreszenz im Vergleich zum Mittelwert der DMSO-Kontrollen.

Dementsprechend verwenden wir in den folgenden Versuchen eine maximale Konzentration von 50 µM Lalistat2.



**Abb. 2: Festlegung des therapeutischen Fensters von Lalistat2**

**(A)** Gezeigt wird die  $\text{IC}_{50}$ -Kurve von Lalistat2, nachdem MCF 10A Zellen mit Lalistat2 in einer Verdünnungsreihe für sechs Tage behandelt und die Zellviabilität mittels *CellTiter-Glo* bestimmt wurde. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte +/- Standardabweichung,  $n = 4$ . Die Tabelle zeigt die  $\text{IC}_{50}$  von Lalistat2 mit 95 %-Konfidenzintervall.

**(B)** MDA-MB-231-Zellen wurden sechs Tage mit Lalistat2 in Konzentrationen von 3,125  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  und entsprechender DMSO-Kontrolle behandelt und die Zelltoxizität wurde mittels *CellToxTM Green Cytotoxicity Assay* bestimmt. Die Positivkontrolle entspricht dem Lysepuffer, welcher im Assay enthalten ist. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte + Standardabweichung,  $n = 4$ . Alle erhaltenen Werte wurden in Relation zu unehandelten Zellen gesetzt. Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung von *one-way* Anova.  $**** = p \leq 0,0001$

## 3.2 Die Rolle der LIPA-Aktivität in der Aufrechterhaltung des Tumorstammzellcharakters von TNBC

### 3.2.1 Lalistat2 reduziert die Transkripte stammzellassozierter Gene in TNBC

Der triple-negative Brustkrebs ist durch die erhöhte Expression des Quotienten CD44/CD24 sowie von ALDH1 gekennzeichnet, was maßgeblich zu der ausgeprägten Malignität dieses Subtyps beiträgt. Insbesondere der gesteigerte Lipidmetabolismus unterstützt hierbei die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters. Dementsprechend soll gezeigt werden, dass die Hemmung des Lipidmetabolismus mittels des LIPA-Inhibitors Lalistat2 zu einer Reduktion der Expression tumorstammzellassozierter Marker führt.

Hierfür wurde nach Inkubation der triple-negativen Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-436 mit 50 µM Lalistat2 für sechs Tage die Expression der Transkripte von CD24, CD44, ALDH1 und SOX2 als tumorstammzellassoziierte Merkmale sowie von PDL1 als immunologischer Marker mittels RT-PCR untersucht.

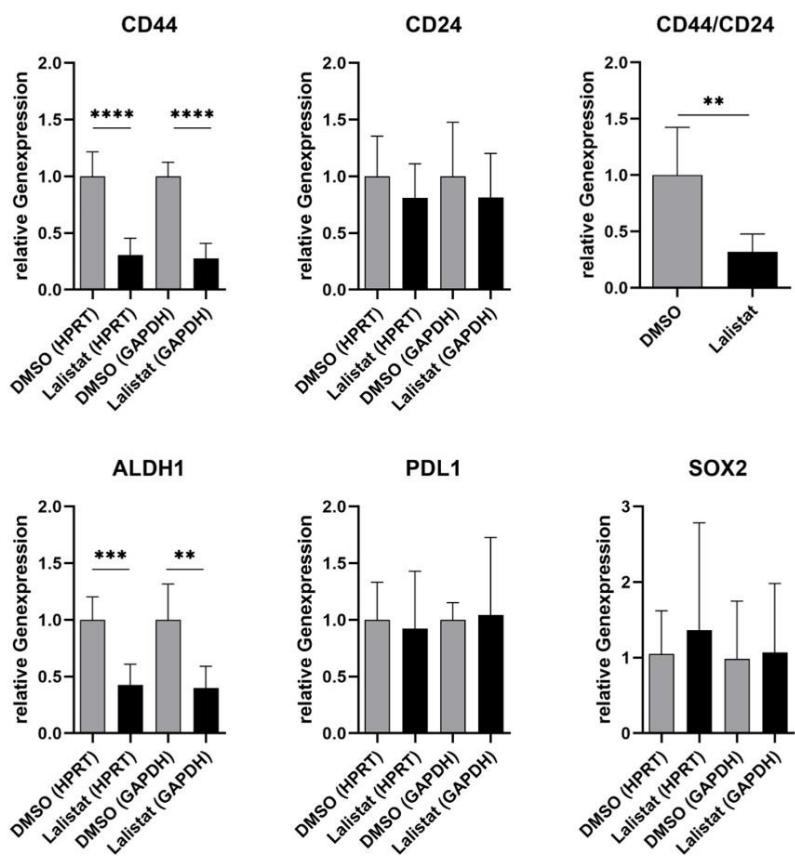
In MDA-MB-231-Zellen (Abbildung 3A) zeigte sich hierbei eine signifikante Reduktion der Transkripte von CD44 ( $p < 0,0001$ ) um das Dreifache sowie infolgedessen des Quotienten von CD44/CD24 von 1 auf 0,3 ( $p = 0,0042$ ).

Verglichen hierzu kam es auch in MDA-MB-436-Zellen (Abbildung 3B) zu einer signifikanten 1,5-fachen Reduktion des Quotienten von CD44/CD24 von 1 auf 0,65 ( $p = 0,0048$ ).

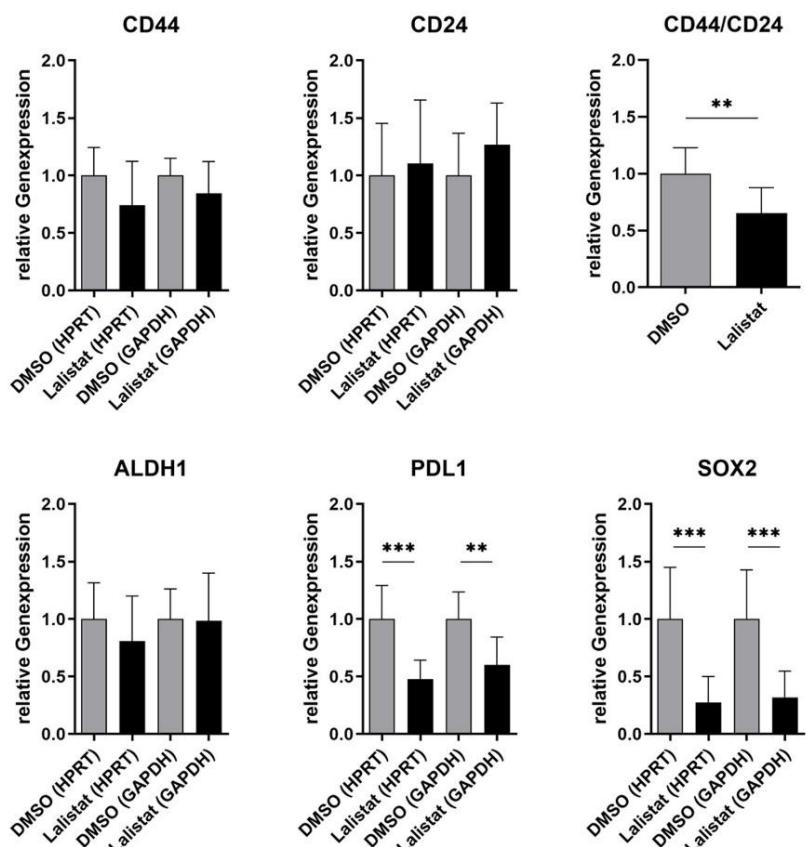
Während sich in den MDA-MB-231-Zellen (Abbildung 3A) nach Behandlung mit Lalistat2 eine signifikante Reduktion von ALDH1 um den Faktor 2,5 zeigte ( $p = 0,0004$  (HPRT)), konnte keine signifikante Abnahme der Expression von PDL1 und SOX2 festgestellt werden.

Im Vergleich hierzu kam es in den MDA-MB-436-Zellen (Abbildung 3B) zu einer signifikanten Abnahme der Expression von SOX2 um das Dreifache von 1 auf 0,3 ( $p = 0,0005$  (HPRT)) sowie von PDL1 um das Zweifache von 1 auf 0,47 ( $p = 0,0002$  (HPRT)); eine signifikante Reduktion von ALDH1 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

**A MDA-MB-231**



**B MDA-MB-436**



### Abb. 3: Lalistat2 reduziert die Transkripte stammzellassozierter Gene in TNBC

MDA-MB-231-Zellen (**A**) und MDA-MB-436-Zellen (**B**) wurden sechs Tage mit 50  $\mu$ M Lalistat2 oder 0,05 %-DMSO als Kontrolle behandelt und die Expression der Transkripte stammzellassozierter Merkmale in Form von CD44, CD24, ALDH1, PDL1 und SOX2 wurden nach mRNA-Isolation und cDNA-Synthese mittels RT-PCR bestimmt. Die Abbildung zeigt den Mittelwert + Standardabweichung, n = 6 (A), n = 9 (B). Alle ermittelten Ergebnisse wurden auf HPRT und GAPDH, verwendet als Housekeeper-Gene, normalisiert und in Relation zum Mittelwert von DMSO gesetzt. Die Werte der relativen Genexpression wurden mittels  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  – Methode ermittelt. Die statistische Analyse erfolgte mittels *Student's t-test*.

\*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$

### 3.2.2 LIPA-Inhibition und -Knockdown reduzieren die Expression stammzellassozierter Oberflächenproteine in TNBC

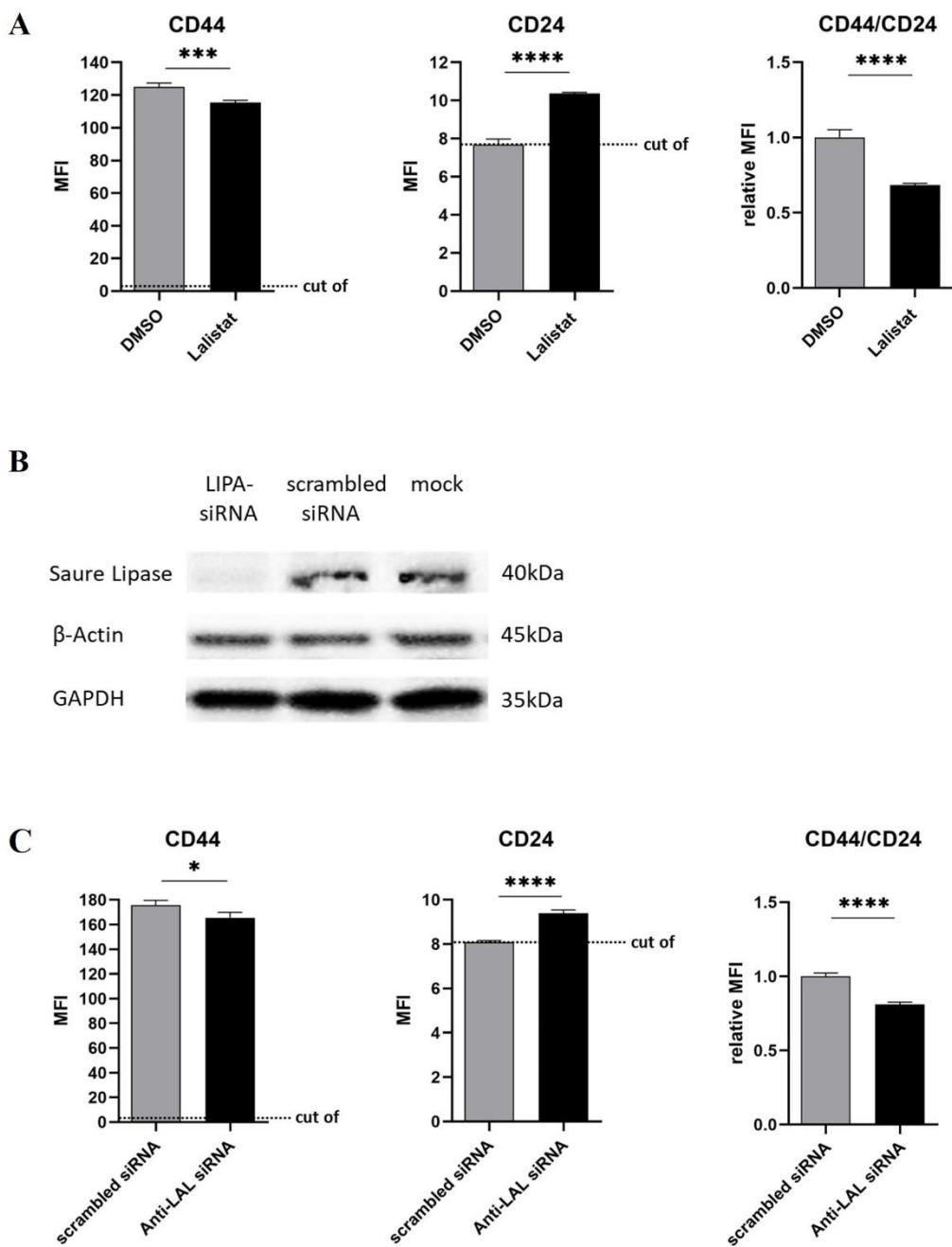
Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Hemmung der LIPA zu einer signifikanten Reduktion tumorstammzellassozierter Marker auf Transkriptebene in TNBC führt, soll nun der Transfer auf Proteinebene erfolgen.

Um die Wirkung auf stammzellassoziierte Oberflächenmerkmale auf Proteinebene zu untersuchen, wurden MDA-MB-231-Zellen für sechs Tage mit 50  $\mu$ M Laslistat2 behandelt und die Expression der Stammzellmarker wurde mittels FACS bestimmt.

Wie in Abbildung 4A ersichtlich kam es zu einer signifikanten Reduktion der Expression von CD44 um 7,7 % von 125,0 auf 115,3 MFI ( $p = 0,0004$ ) und eine Zunahme von CD24 von 7,7 auf 10,4 MFI ( $p < 0,0001$ ). Dies führte zu einer signifikanten Abnahme des Quotienten von CD44/CD24 um das 1,5-fache ( $p < 0,0001$ ).

Ebenso wurden die Effekte auf die Expression stammzellassozierter Oberflächenmerkmale nach Knockdown der LIPA in der MDA-MB-231-Zelllinie untersucht. Der erfolgreiche Knockdown der LIPA konnte mittels Western Blot, wie in Abbildung 4B ersichtlich, gezeigt werden.

Abbildung 4C zeigt, dass es nach Knockdown, ebenso wie nach Inhibition der LIPA durch Lalistat2, zu einer signifikanten Abnahme von CD44 ( $p = 0,0122$ ) sowie des Quotienten von CD44/CD24 ( $p < 0,0001$ ) um ca. 20 % kommt, während die Expression von CD24 ( $p < 0,0001$ ) zunimmt.



**Abb. 4: LIPA-Inhibition und -Knockdown reduzieren die Expression stammzellassozierter Oberflächenproteine in TNBC.**

**(A)** Die Expression der Stammzellmarker CD44 und CD24 sowie des Quotienten von CD44 und CD24 auf Proteinebene wurde bestimmt, nachdem MDA-MB-231-Zellen sechs Tage mit 50  $\mu$ M Lalstat2 und korrespondierender DMSO-Kontrolle inkubiert wurden. Die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) wurde nach Markierung der behandelten Zellen mit CD24- und CD44-Antikörpern mittels FACS bestimmt. Die Werte des Quotienten von CD44 und CD24 wurden in Relation zu DMSO gesetzt. Der Graph zeigt die Mittelwerte + Standardabweichung,  $n = 4$ .

**(B, C)** Ein LIPA-Knockdown wurde durchgeführt, indem MDA-MB-231-Zellen mit Saure-Lipase-spezifischer (LIPA) *Silencer® Select siRNA* sowie einer Negativkontrolle (*scrambled siRNA*) und einer

Lösungsmittel-Kontrolle (mock) für 3 Tage behandelt wurden und anschließend für drei weitere Tage nur mit Medium inkubiert wurden. Als Lösungsmittel-Kontrolle diente das *Lipofectamine® RNAiMAX* Reagenz, welches für die siRNA-Transfektion verwendet wurde. In **(B)** wird das Ergebnis des *Knockdowns* der LIPA als Western Blot unter Verwendung des anti-lysosomalen Saure-Lipase-Antikörpers und der GAPDH- sowie  $\beta$ -Actin-Antikörper als Kontrolle dargestellt. In **(C)** wurden die behandelten Zellen isoliert und mit CD44- sowie CD24-Antikörpern markiert. Dann wurde die mittlere Fluoreszenz-Intensität von CD44 und CD24 mittels FACS gemessen. Als Negativkontrolle diente die *scrambled siRNA*. Die Ergebnisse des Quotienten von CD44 und CD24 wurden in Relation zur Negativkontrolle gesetzt. Die Abbildung zeigt den Mittelwert + Standardabweichung,  $n = 4$ . Die statistische Analyse erfolgte mittels *Student's t-test*. Der *cut-off* entspricht der Hintergrund-Intensität der mittleren Fluoreszenz.

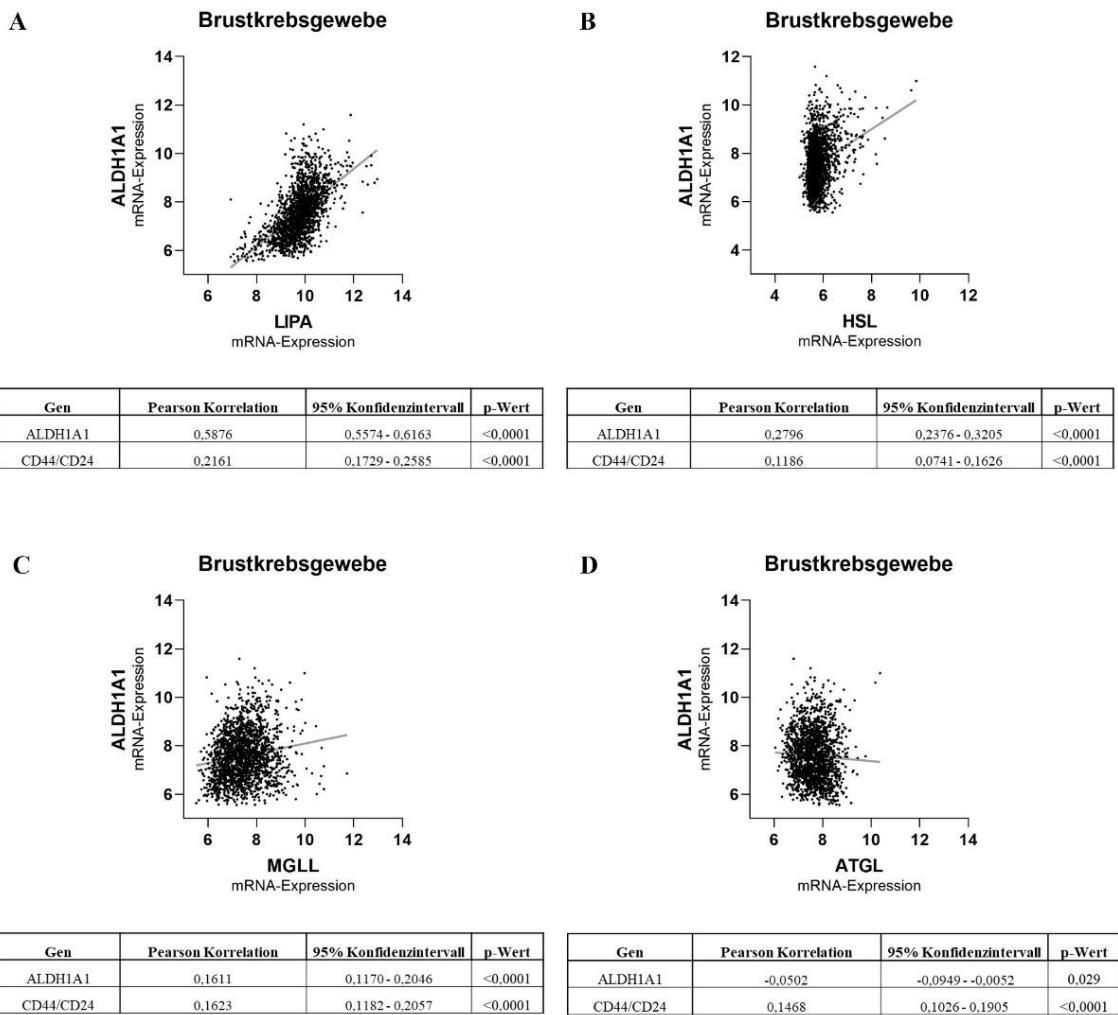
\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$

### 3.3 LIPA und Tumor-Stammzellmarker zeigen eine Koexpression in Brustkrebs-Gewebeproben

Mithilfe der Datenbank METABRIC in *cBioPortal for Cancer Genomics* [43, 44, 44] wurde die Koexpression von den stammzellassoziierten Markern ALDH1A1 sowie CD44/CD24 und am Lipidstoffwechsel beteiligter Lipasen an Brustkrebs-Gewebeproben untersucht.

Wie in Abbildung 5A ersichtlich zeigte sich hierbei eine signifikante Korrelation in der mRNA-Expression von ALDH1A1 und LIPA mit einem Korrelationsfaktor von 0,58 ( $p < 0,0001$ ). Ebenso konnte eine signifikante Korrelation von LIPA und CD44/CD24 gezeigt werden ( $p < 0,0001$ ).

Im Vergleich hierzu zeigte sich bei der Hormon-sensitiven Lipase (Abbildung 5B) und der Monoacylglycerollipase (Abbildung 5C) zwar eine signifikante, jedoch weniger stark ausgeprägte Korrelation dieser beiden Marker. Bei der Adipozyten-Triglycerid-Lipase (Abbildung 5D) konnte zudem keine positive Korrelation mit ALDH1A1 nachgewiesen werden.



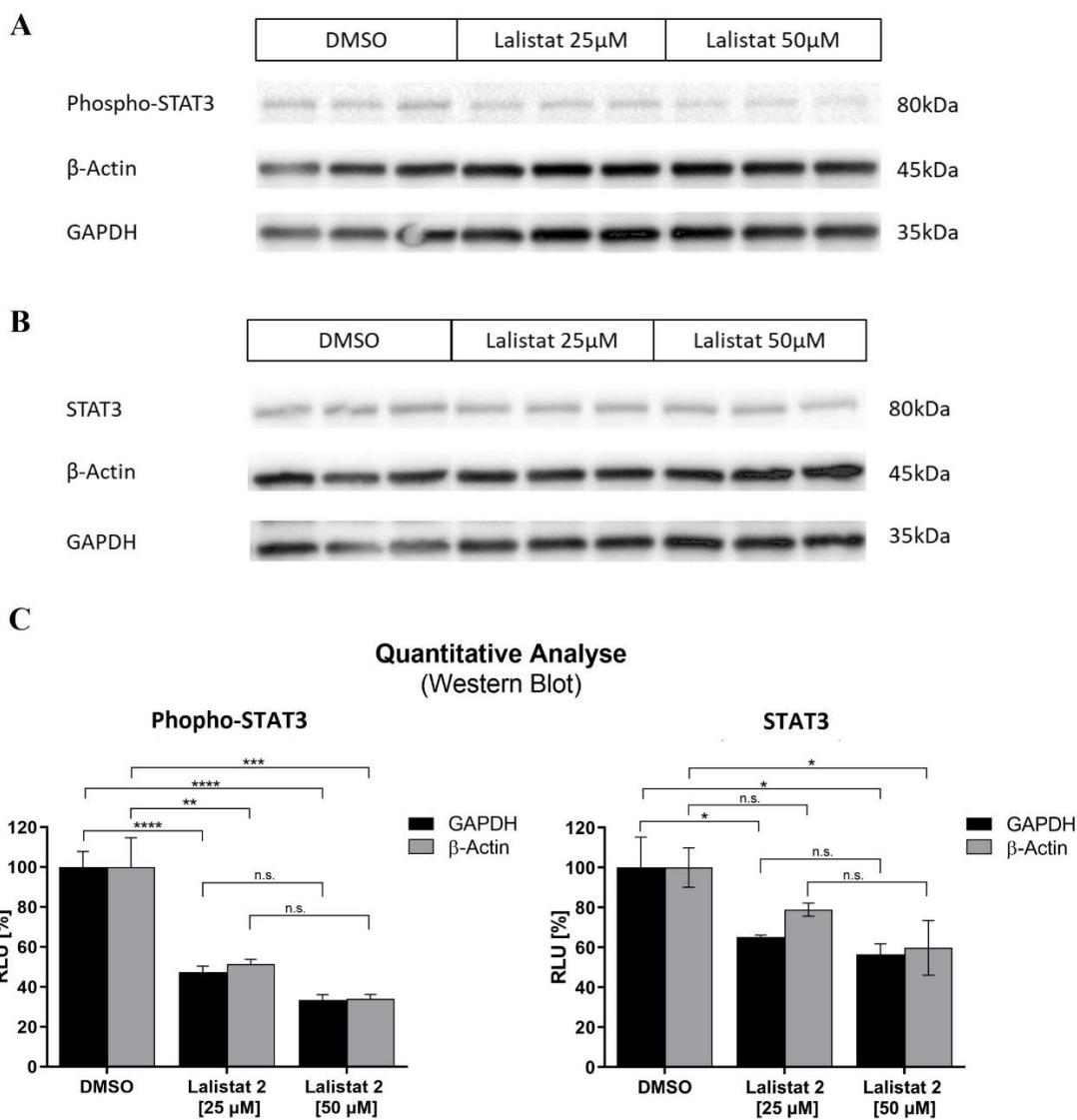
**Abb. 5: LIPA und Tumor-Stammzellmarker zeigen eine Koexpression in Brustkrebs-Gewebepröben**

Die Koexpression der zellulären Lipasen LIPA (A), HSL (B), MGLL (C) sowie ATGL (D) und den Stammzellmarkern ALDH1A1 und des Quotienten CD44/CD24 in Brustkrebs-Gewebepröben wurde mittels der METABRIC Datenbank in *cBioPortal for Cancer Genomics* unter Verwendung des *Illumina HT-12 v3 microarray* bestimmt. Gezeigt werden die Streudiagramme der Koexpression der genannten Lipasen und ALDH1A1 und die Tabellen der Daten der Koexpression.

### 3.4 LIPA-Hemmung führt zu einer verminderten Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges in TNBC

Für die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters durch Aktivierung der Expression stammzellassozierter Marker bei triple-negativem Brustkrebs spielt unter anderem der JAK-STAT-Signalweg eine bedeutende Rolle. Daher haben wir als möglichen Wirkmechanismus den Effekt der Inhibierung der LIPA auf den JAK-STAT-Signalweg auf Proteinebene mithilfe eines Western Blot untersucht.

Wie in Abbildung 6A ersichtlich konnte bei zunehmender Konzentration von Lalistat2 eine verminderte Expression des aktivierte STAT3 (Phospho-STAT) beobachtet werden. In der quantitativen Auswertung (Abbildung 6C) zeigte sich hierbei bei Inhibierung mit 25  $\mu$ M Lalistat2 eine signifikante Reduktion der Expression um 50 % (GAPDH:  $p < 0,0001$ ) verglichen zur DMSO-Kontrolle, während bei Verwendung von 50  $\mu$ M Lalistat2 die Expression von Phospho-STAT3 sogar um das Dreifache abnahm (GAPDH:  $p < 0,0001$ ). Ebenso zeigte sich durch Inhibierung der sauren Lipase eine signifikante, jedoch weniger stark ausgeprägte Reduktion von STAT3 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abbildung 6B). Demnach sank die Expression von STAT3 um etwa 40 % bei Hemmung mit 25  $\mu$ M Lalistat2 und um 50 % bei Verwendung von 50  $\mu$ M Lalistat2 (Abbildung 6C).



**Abb. 6: LIPA-Hemmung führt zu einer verminderten Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges.**  
**(A, B)** Gezeigt werden die Ergebnisse des Western Blots, nachdem MDA-MB-231-Zellen mit 25  $\mu$ M oder 50  $\mu$ M Lalistat2 sowie entsprechender 0,05 %-DMSO-Kontrolle für sechs Tage behandelt wurden und die Zellextrakte mittels Phospho-STAT3- (**A**) oder STAT3-Antikörpern (**B**) sowie GAPDH- und  $\beta$ -Actin-Antikörpern als Ladungskontrollen markiert wurden.

**(C)** Eine quantitative Analyse des Western Blots erfolgte, indem das Volumen von Phospho-STAT3 und STAT3, gemessen als relative Lumineszenz-Einheiten (RLU), auf GAPDH und  $\beta$ -Actin normalisiert und mittels Image Lab 5 dargestellt wurde. Alle erhaltenen Ergebnisse wurden in Relation zur DMSO-Kontrolle gesetzt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte + Standardabweichung, n = 3. Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung von *one-way* Anova.

\* = p  $\leq$  0,05; \*\* = p  $\leq$  0,01; \*\*\* = p  $\leq$  0,001; \*\*\*\* = p  $\leq$  0,0001

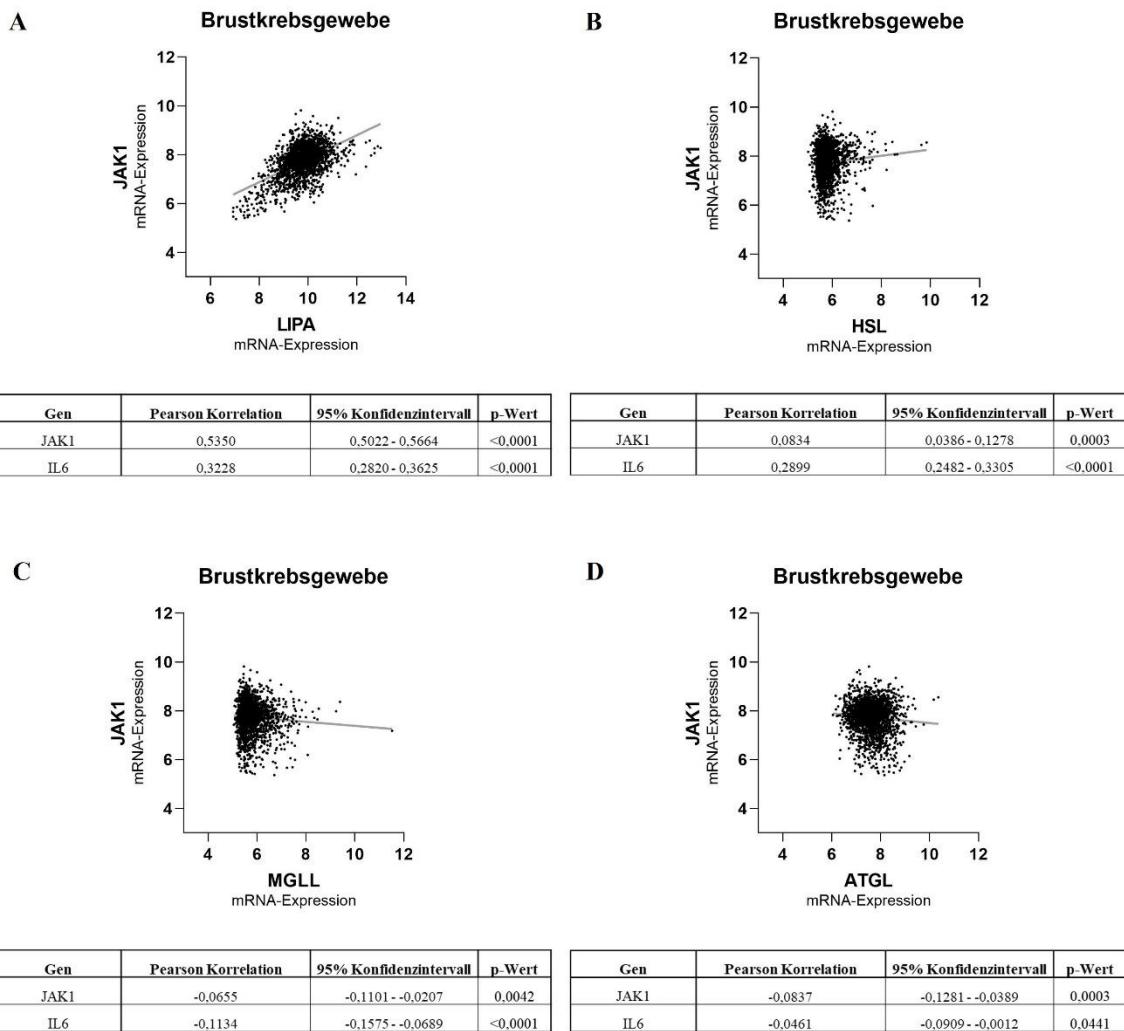
### 3.5 LIPA und JAK1 zeigen eine Koexpression in Brustkrebs-Gewebeproben

Der JAK-STAT-Signalweg stellt einen möglichen Pathomechanismus in der Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters des TNBC dar. Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der LIPA mittels Lalstat2 zu einer signifikanten Reduktion von aktiviertem STAT3 führt (siehe 3.4).

Mithilfe der Datenbank METABRIC in *cBioPortal for Cancer Genomics* [43–45] soll die Koexpression der Januskinase 1 (JAK1) und am Lipidstoffwechsel beteiligter Lipasen an Brustkrebs-Gewebeproben untersucht werden.

Abbildung 7A zeigte eine signifikante positive Korrelation der Transkripte von der LIPA und von JAK1 in Brustkrebs-Gewebeproben mit einem Korrelationsfaktor von 0,53 ( $p < 0,0001$ ).

Während die Hormon-sensitive Lipase (HSL) zwar eine positive, jedoch weniger ausgeprägte Korrelation der Expression von JAK1 zeigt (Abbildung 7B) ( $p = 0,0003$ ), konnte bei der Monoacylglycerollipase (Abbildung 7C) und der Adipozyten-Triglycerid-Lipase (Abbildung 7D) nur eine negative Korrelation mit JAK1 nachgewiesen werden.



**Abb. 7: LIPA und JAK1 zeigen eine Koexpression in Brustkrebs-Gewebepröben**

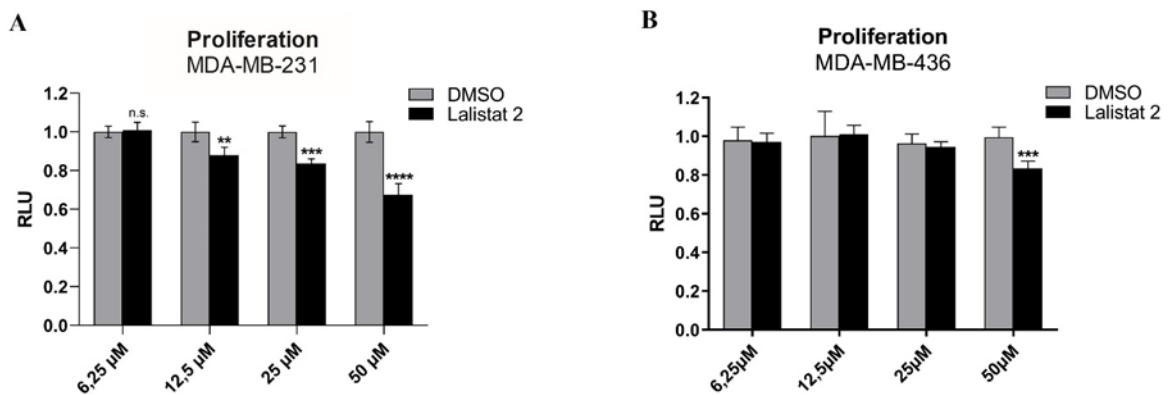
Die Koexpression der zellulären Lipasen LIPA (A), HSL (B), MGLL (C) sowie ATGL (D) und der Januskinase 1 sowie IL6 in Brustkrebs-Gewebepröben wurde mittels der METABRIC Datenbank in *cBioPortal for Cancer Genomics* unter Verwendung des Illumina HT-12 v3 microarray bestimmt. Gezeigt werden die Streudiagramme der Koexpression der genannten Lipasen und JAK1 und die Tabellen der Daten der Koexpression.

### 3.6 Lalistat2 hemmt die Proliferation von TNBC

Als zusätzlicher therapeutischer Effekt von Lalistat2 wurde das Verhalten auf die Proliferation von triple-negativen Brustkrebszellen untersucht. Hierbei wurden MDA-MB-231-Zellen und MDA-MB-436-Zellen für 6 Tage in einer horizontalen 1:2-Verdünnungsreihe mit Lalistat2 behandelt und im Anschluss die Zellviabilität bestimmt.

In Abbildung 8A zeigt sich, dass in MDA-MB-231-Zellen mit zunehmender Konzentration von Lalistat2 die Zellviabilität signifikant reduziert wird. Hierbei konnte bereits ab 12,5  $\mu$ M Lalistat2 eine signifikante Abnahme der Proliferation dieser Zelllinie beobachtet werden ( $p = 0,0099$ ). Unter Verwendung von 50  $\mu$ M Lalistat2 zeigte sich sogar eine Reduktion der Zellproliferation von 32 % verglichen zur DMSO-Kontrolle ( $p < 0,0001$ ).

Auch bei der MDA-MB-436-Zelllinie (Abbildung 8B) konnte nach Behandlung mit 50  $\mu$ M Lalistat2 eine signifikante Reduktion der Zellviabilität von ca. 16 % festgestellt werden ( $p < 0,001$ ). Insgesamt waren die Effekte jedoch weniger stark ausgeprägt als bei der MDA-MB-231-Zelllinie.



**Abb. 8: Lalistat2 hemmt die Proliferation von TNBC**

MDA-MB-231-Zellen (**A**) und MDA-MB-436-Zellen (**B**) wurden mit Lalistat2 in einer Verdünnungsreihe von 50  $\mu$ M bis 6,25  $\mu$ M für sechs Tage inkubiert und die Zellviabilität wurde mittels *CellTiter-Glo* als relative Lumineszenz-Einheit (RLU) bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte +/- Standardabweichung,  $n = 4$  (A) und  $n = 12$  (B). Alle Werte wurden in Relation zu DMSO gesetzt. Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung von *one-way* Anova.

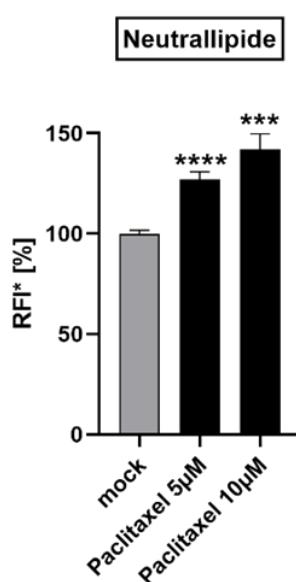
\*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$

### 3.7 Paclitaxel führt zu einem Anstieg der Neutrallipide in TNBC

Der erhöhte Lipidmetabolismus des TNBC trägt maßgeblich zu der hohen Malignität dieses Subtyps bei. Neben der gesteigerten Verwertung externer Lipide nutzen Tumorzellen intrazelluläre Neutrallipide aus Speicherdepots, den sogenannten *Lipid Droplets*. Diese unterstützen vor allem in zellulären Stresssituationen, wie durch den Einfluss einer Chemotherapie, die Aufrechterhaltung der Tumorzellen und stellen somit einen Schutzmechanismus dar.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Verwendung von Paclitaxel, einem gängigen Chemotherapeutikum in der Therapie des TNBC, zu einer Erhöhung der Neutrallipidkonzentration in TNBC führt. Hierzu wurde die MDA-MB-231-Zelllinie drei Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen von Paclitaxel sowie entsprechender Lösungsmittel-Kontrolle inkubiert und anschließend mittels Bodipy die Neutrallipidkonzentration in Form der relativen Fluoreszenzintensität (RFI) in Abhängigkeit der Zelldichte bestimmt.

Wie in Abbildung 9 dargestellt, konnte beobachtet werden, dass Zellen, welche mit Paclitaxel behandelt wurden, eine signifikante Erhöhung der Neutrallipidkonzentration im Vergleich zur Lösungsmittel-Kontrolle zeigten. Zudem ist ersichtlich, dass steigende Konzentrationen von Paclitaxel mit einer zunehmenden RFI und dementsprechend Neutrallipidkonzentration assoziiert sind. So kommt es bei Behandlung mit 5  $\mu$ M Paclitaxel zu einer Steigerung der Neutrallipidkonzentration um 27,1 % ( $p < 0,0001$ ), bei Verwendung von 10  $\mu$ M Paclitaxel sogar um 42 % ( $p = 0,0004$ ) im Vergleich zur Kontrolle.



#### **Abb. 9: Paclitaxel führt zu einem Anstieg der Neutrallipid-Konzentration in TNBC**

MDA-MB-231-Zellen wurden mit Paclitaxel in einer Konzentration von 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M und entsprechender Lösungsmittelkontrolle (Macrogolglycerolricinoleat 35, Ethanol) für sechs Tage inkubiert und es wurde die relative Fluoreszenz-Intensität (RFI) nach Hinzugabe von Bodipy gemessen. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung, n = 4. \*Die angegebenen RFI-Werte wurden auf die Zelldichte normalisiert und in Relation zur Kontrolle gesetzt. Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung von *one-way* Anova. \*\*\* = p  $\leq$  0,001; \*\*\*\* = p  $\leq$  0,0001

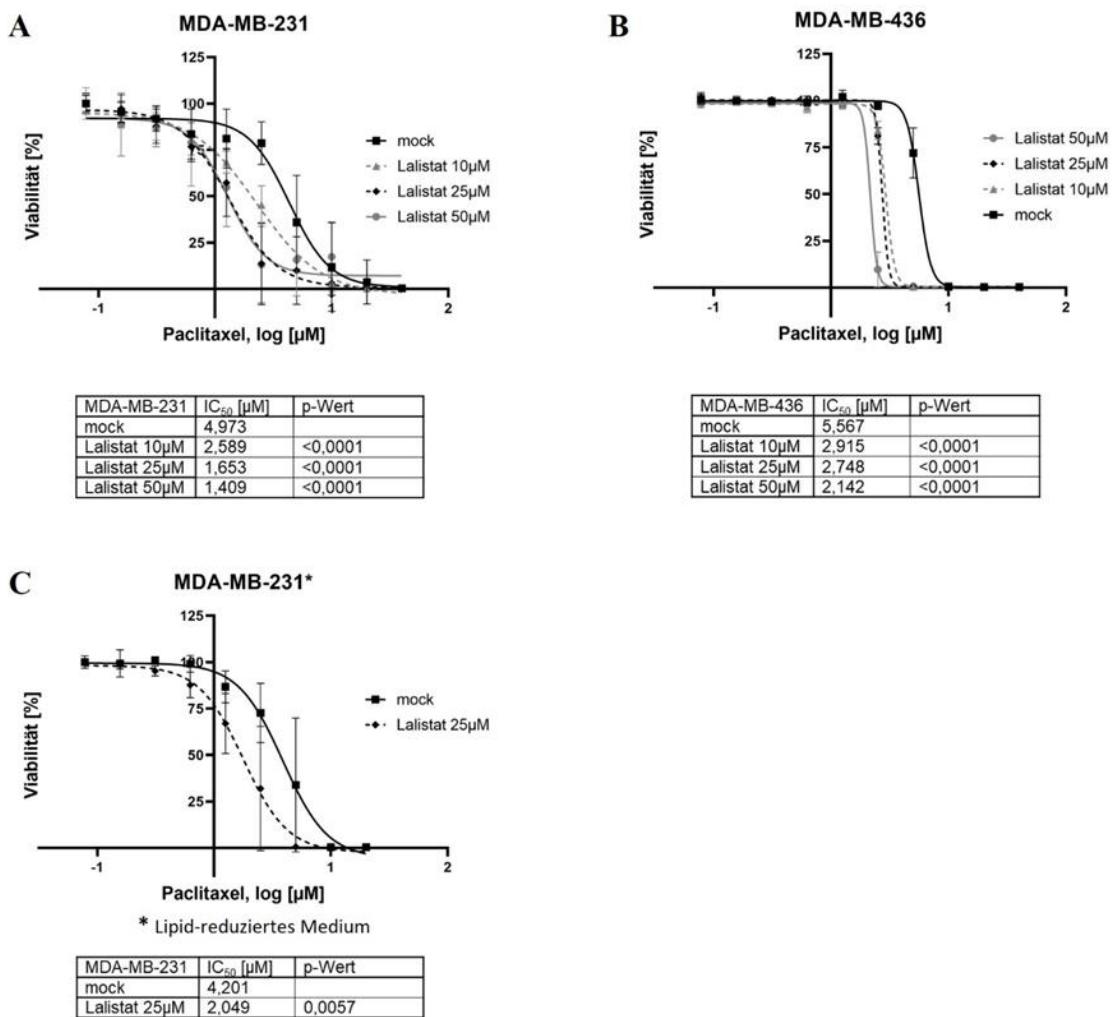
### **3.8 Chemosensibilisierung unter Lalstat2**

Der erhöhte Lipidmetabolismus in TNBC führt zu einer erhöhten Rate an Chemosensibilisierungen, welche vor allem durch lipid-assoziierte Arzneimittelausstoßmechanismen zu erklären sind. Ziel ist es, durch die Hemmung der LIPA-vermittelten Verwertung externer und interner Lipide, eine Chemosensibilisierung zu erreichen. Hierzu haben wir im Folgenden die Auswirkung der Inhibition der LIPA bezüglich der Chemosensibilisierung von Paclitaxel, einem gängigen Chemotherapeutikum in der Therapie von TNBC, untersucht. MDA-MB-231-Zellen und MDA-MB-436-Zellen wurden zunächst drei Tage mit Lalstat2 präinkubiert und dann weitere drei Tage mit einer Kombination von Lalstat2 und Paclitaxel in einer Verdünnungsreihe weiterbehandelt. Im Anschluss wurde die Zellviabilität bestimmt.

Wie in Abbildung 10A ersichtlich zeigte sich bei ansteigender Konzentration von Lalstat2 eine zunehmende Reduktion der mittleren inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ) von Paclitaxel in MDA-MB-231-Zellen. So führt eine Inhibierung mit 10  $\mu$ M Lalstat2 bereits zu einer signifikanten Abnahme der  $IC_{50}$  von Paclitaxel um 47 % im Vergleich zur alleinigen Anwendung von Paclitaxel ( $p < 0,0001$ ). Dieser Effekt lässt sich auf eine Reduktion der  $IC_{50}$  von Paclitaxel um 71 % bei Anwendung von 50  $\mu$ M Lalstat2 steigern ( $p < 0,0001$ ).

Auch in MDA-MB-436-Zellen (Abbildung 10B) lässt sich eine Chemosensibilisierung nachweisen. So kommt es bei Inkubation der Zellen mit 10  $\mu$ M Lalstat2 zu einer signifikanten Reduktion der  $IC_{50}$  von Paclitaxel um 47 % im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Paclitaxel, während 50  $\mu$ M Lalstat2 zu einer 61 %-Reduktion der Viabilität führt ( $p < 0,0001$ ).

Um zusätzliche Effekte neben der Hemmung der externen Lipidverwertung von Lalstat2 zu untersuchen, wurden die Effekte von Lalstat2 im lipidfreien Medium untersucht (Abbildung 10C). Hierbei zeigt sich nach Inkubation von MDA-MB-231 mit 25  $\mu$ M Lalstat2 in Kombination mit Paclitaxel eine signifikante Reduktion der  $IC_{50}$  von Paclitaxel um die Hälfte von 4,2 auf 2,0 ( $p = 0,0057$ ).



**Abb. 10: Chemosensibilisierung unter Lalistat2**

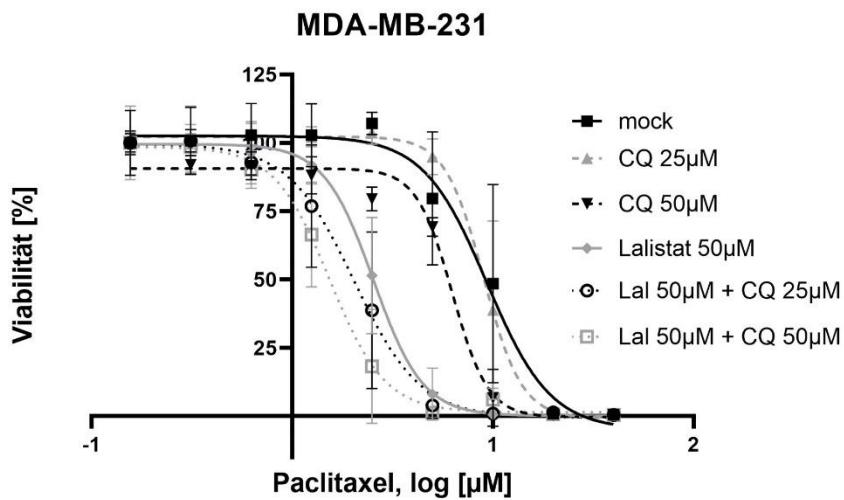
(A-C) MDA-MB-231-Zellen (A, C) und MDA-MB-436-Zellen (B) wurden drei Tage in den angegebenen Konzentrationen von Lalistat2 präinkubiert und anschließend für drei weitere Tage mit Paclitaxel in einer horizontalen 1:2-Verdünnungsreihe weiterbehandelt. Die Zellviabilität wurde mittels *CellTiter-Glo*® bestimmt. In (C) erfolgte die Inkubation im lipid-freien Medium. Die Abbildungen zeigen die IC<sub>50</sub>-Kurven von Paclitaxel. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung, n = 20 (A), n = 4 (B), n = 8 (C). Mock entspricht der korrespondierenden DMSO-Kontrolle mit keinem signifikanten Unterschied zum Medium allein. Die Tabellen zeigen die ermittelten p-Werte, welche den signifikanten Unterschied zur DMSO-Kontrolle wiedergeben. Alle erhaltenen Werte wurden in Relation zur Viabilität unbehandelter Zellen gesetzt. Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung von *one-way* Anova.

### 3.9 Lalstat2 führt zu einer stärkeren Anti-Tumor-Wirkung auf TNBC in Kombination mit Paclitaxel als Chloroquin

Bis heute wurden nur wenige Substanzen, welche den Stammzellcharakter von Tumorzellen adressieren, erforscht. Eine Substanz, die in den vergangenen Jahren vermehrte Aufmerksamkeit erhalten hat, ist Chloroquin. Bei Chloroquin handelt es sich um ein Medikament, welches in der Therapie und Chemoprophylaxe von Malaria verwendet wird, jedoch ebenso Erfolge bei der Behandlung therapieresistenter Tumore gezeigt hat [35]. Zum Vergleich der Effekte von Lalstat2 und der bereits etablierten Substanz Chloroquin bezüglich der Chemosensibilisierung in der systemischen Therapie von TNBC wurde die Zellviabilität von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit Lalstat2 im Vergleich zu Chloroquin in Kombination mit Paclitaxel verglichen. Hierzu wurden MDA-MB-231-Zellen mit Chloroquin und Lalstat2 allein oder gemeinsam in Kombination mit Paclitaxel in einer horizontalen Verdünnungsreihe inkubiert und die Zellviabilität bestimmt.

Während verglichen zur Kontrolle keine relevante Reduktion der  $IC_{50}$  von Paclitaxel nach Behandlung der Zellen mit 25  $\mu$ M Chloroquin gezeigt werden konnte, führte die Verwendung von 50  $\mu$ M Chloroquin zu einer 1,5-fachen Reduktion der  $IC_{50}$  von 9,04  $\mu$ M auf 6,21  $\mu$ M Paclitaxel ( $p = 0,0012$ ) (Abbildung 11). Im Vergleich hierzu führte die Inkubation der TNBC-Zellen mit 50  $\mu$ M Lalstat2 zu einer 3,4-fachen signifikanten Abnahme der  $IC_{50}$  von Paclitaxel bis auf 2,67  $\mu$ M ( $p < 0,0001$ ). Bei einer Kombination von Lalstat2 und Chloroquin zeigte sich sogar eine signifikante Reduktion der  $IC_{50}$  auf 2,21  $\mu$ M bei Verwendung von 50  $\mu$ M Lalstat2 und 25  $\mu$ M Chloroquin ( $p < 0,0001$ ) sowie bis auf 1,66  $\mu$ M Paclitaxel in einer Kombination mit 50  $\mu$ M Chloroquin ( $p < 0,0001$ ). Jedoch konnte hierbei kein signifikanter Unterschied zur Behandlung der Zellen mit 50  $\mu$ M Lalstat2 allein in den angegebenen Konzentrationen festgestellt werden.

Zusammengefasst zeigen die angegebenen Ergebnisse einen stärkeren Effekt auf die Chemosensibilisierung von Paclitaxel in TNBC durch Lalstat2 als durch Chloroquin und eine Kombination beider Inhibitoren könnte diesen Effekt nochmals synergistisch verstärken.



	IC50 [μM]	p-Wert
mock	9,042	
CQ 25 μM	8,941	>0,9999
CQ 50 μM	6,206	0,0012
Lal 50 μM	2,673	<0,0001
Lal 50 μM + CQ 25 μM	2,205	<0,0001
Lal 50 μM + CQ 50 μM	1,656	<0,0001

**Abb. 11: Lalstat2 führt zu einer stärkeren Anti-Tumor-Wirkung in TNBC in Kombination mit Paclitaxel als Chloroquin.**

MDA-MB-231-Zellen wurden drei Tage mit Chloroquin, Lalstat2 allein oder kombiniert in den angegebenen Konzentrationen präinkubiert und dann weitere drei Tage in Kombination mit Paclitaxel in einer Verdünnungsreihe weiterbehandelt. Die Viabilität der Zellen in Abhängigkeit der Paclitaxel-Konzentration wurde mittels *CellTiter-Glo®* bestimmt. Mock entspricht den Lösungsmitteln von Lalstat2 und Chloroquin in Form von DMSO und H<sub>2</sub>O in entsprechender Konzentration. Die Abbildungen zeigen die IC<sub>50</sub>-Kurven von Paclitaxel. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung, n = 12. Die Tabelle zeigt die IC<sub>50</sub>-Werte von Paclitaxel sowie die p-Werte als signifikanten Unterschied zu Mock. Alle Werte wurden in Relation zu den Werten unbehandelter Zellen gesetzt. Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung von *one-way* Anova.

## 4 Diskussion

Der triple-negative Brustkrebs stellt aufgrund seiner aggressiven Tumorbiologie, resultierend in einer hohen Metastasierungs- und Rezidivrate sowie vermehrten Therapieresistenzen, eine besondere Herausforderung in dessen Behandlung dar. Gerade deswegen ist es bei der Entwicklung einer wirksamen und personalisierten Therapie gegen diesen Subtyp von besonderer Bedeutung, neue Angriffspunkte zu finden, die effizient die tumorspezifische Pathologie adressieren. Im Falle des TNBC ist es jedoch noch nicht vollständig geklärt, welche dysregulierten Pathomechanismen für dessen hohe Aggressivität ausschlaggebend sind [46]. Eine wichtige Rolle hierbei stellen epigenetische Aberrationen dar, welche zusätzlich zu genetischen Veränderungen wesentlich zu einer hohen Malignität verschiedener Krebsarten beitragen [47]. Vor allem der hohe Stammzellcharakter und der daraus resultierende niedrige Differenzierungsstatus von TNBC gekoppelt an metabolisch dysregulierte Prozesse fördert die zelluläre Tumorigenität und die Resistenz gegen Apoptose sowie Chemotherapeutika [13, 48]. Die gezielte Beeinflussung des hohen Stammzellpotentials von TNBC stellt daher eine vielversprechende Strategie zur Verbesserung der derzeitigen TNBC-Therapie dar. Auf epigenetische Regulatoren wirkende Medikamente, wie Histondeacetylase- (HDAC), DNA-Methyltransferase- (DNMT) oder Bromodomänen- und extra-terminale Protein (BET)-Inhibitoren, zeigten bereits in der Vergangenheit ein therapeutisches Potenzial bei hämatologischen Malignomen. Während sich jedoch diese epigenetisch wirkenden Substanzen aufgrund deren begrenzten Spezifität noch nicht in der Therapie von soliden Tumoren durchsetzen konnten [11, 49–51], könnte mit Verwendung von LIPA-Inhibitoren gezielt der für den Stammzellcharakter von TNBC bedeutende Lipidmetabolismus adressiert werden.

### 4.1 Der Lipidmetabolismus als Angriffspunkt in der Krebstherapie

Die zunehmende Erkenntnis der Bedeutung des Lipidmetabolismus in der Entstehung und Aufrechterhaltung von Tumorzellen ist Ausgangspunkt der Erforschung von neuen Krebstherapien, welche Enzyme des Lipidmetabolismus adressieren.

Bei Orlistat, einem Inhibitor vor allem der gastrointestinalen Lipidhydrolyse, konnten in den letzten Jahren antikanzerogene Wirkungen festgestellt werden. So konnte eine verminderte Tumorproliferation und verstärkte Induktion der Apoptose von Tumorzellen nachgewiesen werden [52, 53]. Diese Antitumorfunktion beruht jedoch nicht auf der Hemmung hydrolysierender Lipasen, sondern auf der Hemmung der Fettsäuresynthase (FAS). Da die Hemmung der Fettsäuresynthase mit dem HER2-Onkogen in Verbindung gebracht wird, könnte

Orlistat vor allem zur Behandlung HER2/neu-überexprimierender Brustkarzinome verwendet werden [54]. Ein Problem hierbei stellt die niedrige orale Bioverfügbarkeit von Orlistat dar [52, 55].

Auch bei der Adressierung der Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL), einem Enzym, welches den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Lipolyse induziert, konnte ein antikanzerogener Einfluss festgestellt werden. Hierbei konnte jedoch sowohl eine krebshemmende als auch eine krebsfördernde Wirkung der ATGL je nach Tumortyp nachgewiesen werden [56]. Während ATGL zum einen die Funktion eines Tumorsuppressors einnehmen kann und ihr Funktionsverlust mit einer verstärkten Migration, Aktivierung von pro-onkogenen Signalwegen und Produktion bioaktiver Lipide in Tumorzellen (z.B. Lungenkarzinom) einhergeht [57–59], führt auf der anderen Seite eine Überexpression von ATGL im Brustkrebs durch eine verstärkte Fettsäureoxidation zu einer höheren Metastasierungsrate [60].

Trotz dieser grundlegenden Arbeiten konnte sich bisher keiner dieser Wirkstoffe in der Krebstherapie nachhaltig etablieren. Abgesehen von den heterogenen Wirkungen scheint die Ausrichtung auf ein breites Spektrum zellulärer neutraler Lipasen für die Entwicklung einer wirksamen personalisierten Krebstherapie nicht geeignet zu sein; vielmehr sind spezifischere Ansätze erforderlich.

Die lysosomale saure Lipase ist trotz ihrer zentralen Rolle bei der Verwertung von Neutrallipiden zur Bereitstellung für die Fettsäureoxidation und für *Lipid droplets* bisher kaum erforscht. Mithilfe dieser Arbeit konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass LIPA maßgeblich zur Aufrechterhaltung des hohen Stammzellcharakters des TNBC beiträgt. So führte die Inhibition der LIPA zu einer signifikanten Reduktion stammzellassozierter Marker sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene. Dies konnte zudem durch einen *Knockdown* der LIPA validiert werden. Zusätzlich konnte mithilfe der METABRIC Datenbank in *cBioPortal for Cancer Genomics* eine Korrelation der Expression von LIPA und stammzellassozierter Marker wie ALDH1 in Brustkrebs-Gewebeproben festgestellt werden, während andere für den Lipidmetabolismus relevante Lipasen nur eine geringe oder sogar negative Korrelation aufzeigten. Somit kommt der lysosomalen sauren Lipase eine wichtige Bedeutung in der Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters und dementsprechend der ausgeprägten Malignität des triple-negativen Brustkrebses zu.

Zusätzlich zeigt die Inhibition der LIPA weitere positive Effekte in der Behandlung von TNBC, hierunter zählen antiproliferative Effekte sowie eine Chemosensibilisierung gegenüber Paclitaxel. Insbesondere das erhöhte Ansprechen triple-negativer Brustkrebszellen auf Chemotherapeutika stellt bei der hohen Rate an Therapieresistenzen bei TNBC einen herausstechenden Benefit dar.

## 4.2 Die LIPA-Hemmung beeinflusst den JAK-STAT-Signalweg

Als möglichen Pathomechanismus durch die Inhibierung der LIPA konnten wir die JAK-STAT-Signalkaskade identifizieren. So konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der LIPA zu einer signifikanten Reduktion von insbesondere phosphoryliertem STAT3 führt. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass insbesondere die JAK/STAT3-regulierte Verstoffwechselung von Triglyceriden und Cholesterinestern über die Mitochondrien eine Schlüsselrolle bei der Förderung und Aufrechterhaltung der Stammzellenbildung in Brustkrebszellen spielt [22, 61–63]. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Verstoffwechselung von Fettsäuren mittels  $\beta$ -Oxidation maßgeblich an der Entstehung von Chemotherapieresistenzen des TNBC beteiligt ist. Hierbei führt eine Erhöhung von acetyliertem STAT3 zu einer gesteigerten Phospholipidsynthese, die durch eine Erhöhung des mitochondrialen Membranpotentials die Paclitaxel-induzierte Apoptose reduziert [64]. Darüber hinaus führt die Hemmung der  $\beta$ -Oxidation zu einer verringerten Stammzellenbildung und erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika [22].

Da die LIPA für die Hydrolyse von Cholesterinestern und Triglyceriden zu freien Fettsäuren als Quelle für die  $\beta$ -Oxidation erforderlich ist, scheint es denkbar, dass die LIPA-Aktivität über die Induktion der Fettsäureoxidation und der STAT3-Aktivierung zur Aufrechterhaltung der zellulären Tumorstammzellen beiträgt. Diese Hypothese steht im Einklang mit unserer Beobachtung, dass die Hemmung der LIPA zu einer Reduktion von aktiviertem STAT3 sowie zu einer zunehmenden Chemosensibilisierung gegenüber Paclitaxel führt. Im Gegensatz zu anderen zellulären Lipasen wie HSL, MGLL oder ATGL zeigte die bioinformatische Analyse von Brustkrebsgewebe eine deutliche Korrelation der LIPA-Expression mit Aktivatoren der STAT3-Signalkaskade wie JAK1 und IL6.

Ein weiterer Zusammenhang der Hemmung der LIPA und einer STAT3-abhängigen Verringerung der Krebsstammzellen bei TNBC wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Verwendung des LIPA-Inhibitors Lalistat2 zu einer signifikanten Reduktion von den Pluripotenzmarkern SOX2 und ALDH1 führt. Da sowohl die ALDH1- als auch die SOX2-Expression durch STAT3 reguliert wird [61, 65, 66], scheint eine LIPA-abhängige Beeinflussung des Stammzellcharakters von TNBC über den JAK-STAT3-Signalweg umso wahrscheinlicher. Während eine Überexpression von SOX2 hierbei insbesondere im Frühstadium von Brusttumoren nachgewiesen werden konnte und mit Stammzelleigenschaften sowie Therapieresistenzen assoziiert ist, konnten andere Pluripotenzmarker wie NANOG oder OCT4 nicht nachgewiesen werden [67, 68]. Dies deckt sich ebenso mit unseren Ergebnissen, bei denen durch Hemmung der LIPA keine signifikante Reduktion dieser Marker festgestellt werden konnte.

#### 4.3 Der BRCA-Status als mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Tumormarker-Expressionsmuster in TNBC-Zelllinien nach LIPA-Hemmung

Die unterschiedlichen Muster der Veränderungen der Krebsstammzellmarker nach LIPA-Hemmung, die in MDA-MB-231- und MDA-MB-436-Zellen beobachtet wurden, bei denen wir eine Verringerung der ALDH1-Expression in MDA-MB-231-Zellen und eine Verringerung der SOX2-Expression nur in MDA-MB-436-Zellen fanden, lassen sich durch die ausgeprägte Heterogenität dieser beiden Zelllinien erklären, welche sogar stärker ausgeprägt ist als zu der benignen Brustzelllinie MCF10A [69].

Da MDA-MB-436-Zellen im Gegensatz zu MDA-MB-231-Zellen eine BRCA1-Mutation aufweisen, könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass diese genetische Aberration die vom epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) abhängige STAT3-vermittelte Expression von SOX2 begünstigt, um die Krebsstammzellen in diesen Zellen zu fördern. So zeigte sich, dass BRCA1-defiziente Brustkrebszellen eine erhöhte Expression von EGFR aufweisen und umgekehrt die Expression von BRCA1 durch Bindung an den miR-146a-Promoter die EGFR-Expression reduziert [68]. Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) als Ligand des STAT3-Signalweges führt wiederum zu einer Hochregulierung des SOX2-Transkriptionsfaktors in murinen Brustkrebsstammzellen, was vermehrte Chemotherapieresistenzen und eine erhöhte Tumorigenität *in vivo* bedingt [69]. Somit könnten unterschiedliche Signalverzweigungen von STAT3 zu unterschiedlichen Veränderungen der mit Krebsstammzellen assoziierten Genexpressionen in beiden Zelllinien führen. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung von Raff und Kondo untermauert, dass die Umwandlung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen in neurale stammzellenartige Zellen von der Reaktivierung des SOX2-Gens abhängig ist, welche wiederum durch die Bindung des Tumorsuppressorproteins BRCA1 an einen Enhancer im SOX2-Promoter kontrolliert wird [72]. Somit könnte der Verlust von BRCA1 die Tumorentstehung durch unregulierte SOX2-Expression bei Brustkrebs fördern [67].

Zusätzlich konnte die Inaktivierung der Tumorsuppressorgene BRCA1 und BRCA2 mit der Entstehung von Brustkrebs von immunogenem Phänotyp in Verbindung gebracht werden. Interessanterweise zeigte sich bei BRCA1-, jedoch nicht BRCA2-defizientem Brustkrebs eine erhöhte Expression der immunologischen Marker PD-L1 und PD-1 [73]. Dies steht im Einklang mit unserer Beobachtung, dass eine Hemmung des Lipidstoffwechsels mit dem LIPA-Inhibitor Lalistat2 zu einer signifikanten Reduktion von PD-L1 in der BRCA1-mutierten MDA-MB-436-Zelllinie, jedoch nicht in der MDA-MB-231-Zelllinie führte. Unterstützend hierzu zeigen MDA-MB-436-Zellen eine höhere PD-L1-mRNA-Expression als MDA-MB-231-Zellen [74]. Seit bekannt ist, dass ein veränderter Lipidstoffwechsel Auswirkungen auf Immun-Escape-Mechanismen von Tumorzellen hat und diese somit dem Immunsystem entgehen [25, 75], würde

diese zusätzliche immunologische Wirkung der LIPA-Hemmung einen großen Benefit in der Therapie von TNBC darstellen. Auch hier scheint der JAK-STAT-Signalweg als möglicher Pathomechanismus wahrscheinlich, nachdem vermutet wird, dass über diese Signalkaskade die Expression von PD-L1 in TNBC reguliert wird [76] und die Verwendung eines LIPA-Inhibitors zu einer Hemmung genau dieses Weges führt.

Trotz der Heterogenität der von uns in dieser Studien verwendeten *in-vitro*-Zellkulturmodelle für TNBC, MDA-MB-231 und MDA-MB-436, spiegeln beide Zelllinien jedoch die hohe zelluläre Stammzellfähigkeit und das metastatische Potenzial dieses Brustkrebs-Subtyps wider [69]. Tatsächlich zeigten sich insbesondere beim „mesenchymalen stammzellähnlichen“ TNBC-Subtyp, wie er für MDA-MB-231 und MDA-MB-436 beschrieben wurde, 90 % Krebsstammzellen [77]. Somit scheint es wahrscheinlich, dass die hier vorgestellten Daten auch auf Krebsstammzellen anderer Tumorentitäten übertragbar sind und eine pharmakologische Hemmung der LIPA auch eingesetzt werden könnte, um gezielt auf diese Krebs-Subpopulation anderer Krebsarten abzuzielen.

#### 4.4 Reduktion der Lipophagie durch LIPA-Hemmung als wesentlicher Bestandteil der TNBC-Therapie

Neben der Verwertung externer Lipide spielt bei TNBC auch die Verstoffwechselung von internen Lipiden in Form von *Lipid droplets* eine bedeutende Rolle [29, 78]. Diese intrazellulären Lipid-Speicherdepots fördern durch ihre vielfältigen Funktionen die Viabilität von Tumorzellen unter stressvollen Bedingungen. So kommt es insbesondere bei Nährstoffmangel im Krebsgewebe zu einer „Lipophagie“ dieser *Lipid droplets*, welche eine spezielle Form der Autophagie darstellt, um somit das Überleben der Krebszellen zu gewährleisten [30]. Neben ihrer Funktion für die lysosomale Hydrolyse exogener Lipide ist LIPA auch für die Hydrolyse endogener, durch Lipophagie gewonnener neutraler Lipide unverzichtbar [79]. Daher ist es wahrscheinlich, dass LIPA auch das durch Lipophagie vermittelte Zellüberleben fördert. Diese Hypothese deckt sich mit unseren Beobachtungen, dass sich auch unter Verwendung von lipidfreiem Medium eine signifikante Reduktion der Zellviabilität durch eine chemotherapeutische Behandlung mit Paclitaxel in Anwesenheit von Lalistat2 nachweisen ließ. Somit konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische Inhibierung der LIPA im Gegensatz zur ausschließlichen Adressierung der externen Lipidverwertung wahrscheinlich eine doppelte potenzielle Rolle in der Krebstherapie innehalt, indem sie die Nutzung sowohl von exogenen als auch endogenen neutralen Lipiden unterbindet.

Als bereits etablierter Autophagieinhibitor findet Chloroquin in der Krebstherapie bereits Anwendung. Hierbei zeigte sich durch Behandlung von triple-negativen Brustkrebszelllinien mit

Chloroquin eine verstärkte Apoptoseinduktion sowie eine Chemosensibilisierung gegenüber Paclitaxel sowie Carboplatin [35]. Zudem deuten erste Ergebnisse auf eine deutliche Verbesserung der Prognose der Patienten mit TNBC und eine Verringerung der Krebsmetastasierung hin [36]. Auch wenn die genaue Wirkungsweise von Chloroquin noch nicht vollständig geklärt ist, scheint die Hemmung der Autophagie ein Hauptelement bei der durch Chloroquin vermittelten Reduzierung der Krebsstammzellen zu sein. Interessanterweise wird äquivalent zu unseren Beobachtungen bei der Inhibierung der LIPA angenommen, dass Chloroquin die JAK2-Expression verringert, was zu einer geringeren Aktivierung von STAT3 führt [36]. Da auch die Hemmung der LIPA zu einer Reduktion von aktivierte STAT3 führt und die LIPA-Expression mit der JAK1-Expression im Gewebe von Brustkrebspatientinnen korreliert, erscheint es möglich, als würden Lalstat2 und Chloroquin ähnliche Signalwege nutzen. Während die Verwendung von Chloroquin bereits Erfolge in der Krebstherapie zeigen konnte, zeigte sich in unserer Studie sogar, dass der Effekt der Chemosensibilisierung durch Verwendung von dem LIPA-Inhibitor Lalstat2 stärker ausgeprägt ist als bei Chloroquin und darüber hinaus eine Kombination dieser beiden Inhibitoren ein noch größeres Potenzial darstellen könnte.

## 4.5 Bisherige Studien zur sauren Lipase in der Krebstherapie

Im Zusammenhang mit der sauren Lipase veröffentlichten erst kürzlich Raj und Kollegen einen Artikel im Nature, in welchem er und sein Team entdeckten, dass die Adressierung der LIPA eine vielversprechende Therapiestrategie in der Behandlung von soliden Tumoren darstellt [80]. So konnte gezeigt werden, dass ein kleines Molekül, bezeichnet als ERX-41, an LIPA bindet und über Induktion von Stress im endoplasmatischen Retikulum zum Zelltod von Tumorzellen führt. Ursächlich hierfür ist die Hemmung von ER-residenter Proteine, welche für die Proteinfaltung relevant sind. Kongruent zu unseren Ergebnissen konnte in dieser Arbeit ebenfalls nicht gezeigt werden, dass die Monotherapie mit dem LIPA-Inhibitor Lalstat2 in triple-negativen Brustkrebszelllinien Zelltod (siehe Kapitel 3.1) verursacht. Während unsere Arbeit den Hauptfokus auf die Lipaseaktivität der LIPA legt, ist die Wirkung von ERX-41 nicht abhängig von der Enzymaktivität, sondern von der Lokalisation der sauren Lipase im endoplasmatischen Retikulum. Hier adressiert der Wirkstoff eine bisher nicht beschriebene Chaperon-Funktion der LIPA, was wiederum als ursächlich für die Induktion des ER-vermittelten Zellstresses dargestellt wurde. Zusätzlich wurde im Gegensatz zu unserer Studie nicht die mögliche Auswirkung der LIPA-Aktivität auf die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters von TNBC untersucht. Auf der Grundlage der Ergebnisse unserer Studien kommen wir zu dem Schluss, dass die LIPA zusätzlich zu ihrer neu definierten Chaperonfunktion eine wichtige Rolle in der TNBC-Pathophysiologie spielt und wesentlich zur hohen Malignität des TNBC-Phänotyps über metabolische Aberrationen des Lipidmetabolismus, welche zur Aufrechterhaltung des

Stammzellpotentials führen, beträgt. Unterstützend konnte in der Veröffentlichung von Raj und Kollegen gezeigt werden, dass 80 % der primären TNBC-Tumore eine signifikante Expression der LIPA zeigen und dass eine hohe Expression dieses Enzyms mit einem deutlich niedrigerem Gesamtüberleben bei Brustkrebs vergesellschaftet ist [80]. Dies unterstützt wiederum die große Bedeutung der LIPA als Angriffspunkt in der Therapie des TNBC.

## 4.6 Nebenwirkungen durch LIPA-Hemmung

Da die lysosomale saure Lipase ein zentrales Enzym des zellulären Lipidmetabolismus darstellt, stellt sich die Frage, mit welchen Nebenwirkungen bei der Therapie mit einem LIPA-Inhibitor zu rechnen ist. Als Modell für zu erwartende Nebenwirkungen bei Ausschaltung der LIPA dient die Wolman-Krankheit. Hierbei handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbbares lysosomale Speicherkrankheit, welche zu einer Akkumulation von Cholesterolestern und Triglyceriden im Lysosom führt. Durch den vermeintlichen intrazellulären Mangel an freien Fettsäuren kommt es zu einer Hochregulation der endogenen Lipidproduktion und somit zu einer intrazellulären Ansammlung von Lipidvakuolen [81]. Klinisch äußert sich die Wolman-Krankheit mit Malabsorption, gastrointestinalen Beschwerden sowie einer Hepatosplenomegalie und Nebennierenverkalkung bereits im Neugeborenenalter. Ursächlich sind Mutationen im LIPA-Gen, welche zu einem vollständigen Funktionsverlust der LIPA führen [82]. Die Behandlung der Wolman-Krankheit erfolgt über eine Enzymersatztherapie mit Sebelipase alfa, welches alle zwei Wochen substituiert werden muss. Eine erfolgreiche hämatopoetische Stammzelltransplantation kann die Speicherkrankheit beheben [83]. Trotz der erheblichen Nebenwirkungen, welche mit einem vollständigen Funktionsverlust der LIPA einhergehen, bleibt hervorzuheben, dass die Wolman-Krankheit mit einer Reduktion der Enzymaktivität auf unter 5 % einhergeht [84] und eine solch ausgeprägte Hemmung der sauren Lipase mittels des LIPA-Inhibitors Lalstat2 nur schwer erreichbar ist, zumal eine solche Therapie nur für einen kurzen Zeitraum über mehrere Zyklen wie bei einer Chemotherapie geplant wäre. Eine höhere Restenzymaktivität (2–11 %) der LIPA wie bei der Cholesterinesterspeicherkrankheit (CESD) zeigt hierbei eine mildere Symptomatik und kann mit einer normalen Lebenserwartung einhergehen [84]. Zusätzlich könnte eine symptomatische Therapie, wie beispielsweise durch die Verwendung von Statinen, die Nebenwirkungen weiter abmildern. Zukünftig wäre ein weiteres Ziel, den LIPA-Inhibitor gezielt in die Tumorzellen zu transportieren, um diese nur am gewünschten Wirkungsort zu inhibieren und somit die Nebenwirkungen auf ein Minimum zu reduzieren. Hierbei könnten zum Beispiel Nanopartikel einen interessanten Ansatz darstellen [55].

Da der triple-negative Brustkrebs mit einer hohen Malignität und schlechten Prognose sowie Therapieresistenzen einhergeht, würde die Behandlung mit einem LIPA-Inhibitor trotz möglicher

genannter Nebenwirkungen einen deutlichen Benefit in dessen Behandlung erbringen und sollte somit als innovativer Therapieansatz in Betracht gezogen werden.

## 4.7 Schlussfolgerungen

Zusammengefasst zeigen wir mit dieser Arbeit zum ersten Mal, dass die pharmakologische Hemmung der lysosomalen sauren Lipase den Stammzellcharakter von triple-negativen Brustkrebszelllinien signifikant reduziert und zu einer deutlichen Sensibilisierung gegenüber Chemotherapeutika führt. Zusätzlich konnte eine Verminderung der Zellproliferation durch alleinige Hemmung der LIPA beobachtet werden. Als zugrundeliegenden Mechanismus beschreiben wir die Hemmung der Verstoffwechselung von sowohl extern über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommener als auch intern durch Lipophagie von *Lipid droplets* gewonnener Neutrallipide. Der intrazelluläre Mangel an freien Fettsäuren führt, neben den fehlenden und für die  $\beta$ -Oxidation notwendigen Energieträgern, zu einer verminderten STAT3-Aktivierung, welche wiederum zu einer verminderten JAK-STAT3-regulierten  $\beta$ -Oxidation führt. Da diese maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Tumorstammzellen beteiligt ist, zeigt sich eine signifikante Reduktion tumorstammzellassozierter Gene.

In weiterführenden Studien konnte zusätzlich eine Chemosensibilisierung von MDA-MB-231-Zellen gegenüber dem Anthracyclin Doxorubicin sowie gegenüber Paclitaxel in Langzeit-Paclitaxel behandelten Zellen nachgewiesen werden [85]. Zudem konnten bereits erste Erfolge in in-vivo-Experimenten erzielt werden. So verringerte Lalstat2 die Lebensfähigkeit von Zellen in TNBC-Organoiden und inhibierte die Metastasierung im Zebrafischmodell [11]. Somit birgt die lysosomale saure Lipase ein vielversprechendes Potenzial als innovativer Therapieansatz in der Behandlung des TNBC.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians 71:209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
2. Obeagu EI, Obeagu GU (2024) Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. Medicine (Baltimore) 103:e36905. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000036905>
3. Menon G, Alkabban FM, Ferguson T. Breast Cancer. [Updated 2024 Feb 25]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482286/>
4. Orrantia-Borunda E, Anchondo-Nuñez P, Acuña-Aguilar LE, et al. (2022) Subtypes of Breast Cancer. In: Mayrovitz HN (ed) Breast Cancer. Exon Publications, Brisbane (AU). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK583808/> doi: 10.36255/exon-publications-breast-cancer-subtypes
5. Yersal O, Barutca S (2014) Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. World J Clin Oncol 5:412–424. <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.412>
6. Hubalek M, Czech T, Müller H (2017) Biological Subtypes of Triple-Negative Breast Cancer. Breast Care (Basel) 12:8–14. <https://doi.org/10.1159/000455820>
7. Karim AM, Eun Kwon J, Ali T, et al. (2023) Triple-negative breast cancer: epidemiology, molecular mechanisms, and modern vaccine-based treatment strategies. Biochemical Pharmacology 212:115545. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115545>
8. Schneeweiss A, Denkert C, Fasching PA, et al. (2019) Diagnosis and Therapy of Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) – Recommendations for Daily Routine Practice. Geburtshilfe Frauenheilkd 79:605–617. <https://doi.org/10.1055/a-0887-0285>
9. Dawood S (2010) Triple-Negative Breast Cancer. Drugs 70:2247–2258. <https://doi.org/10.2165/11538150-000000000-00000>
10. Ovcaricek T, Frkovic SG, Matos E, et al. (2011) Triple negative breast cancer - prognostic factors and survival. Radiol Oncol 45:46–52. <https://doi.org/10.2478/v10019-010-0054-4>
11. Steigerwald H, Bozzetti T, Tams M, et al. (2023) Lysosomal acid lipase-activity as a novel target to efficiently address triple-negative breast cancer high malignancy. bioRxiv 2023.10.01.560038. (Preprint), <https://doi.org/10.1101/2023.10.01.560038>
12. Zhu JW, Charkhchi P, Adekunte S, Akbari MR (2023) What Is Known about Breast Cancer in Young Women? Cancers (Basel) 15:1917. <https://doi.org/10.3390/cancers15061917>
13. Park S-Y, Choi J-H, Nam J-S (2019) Targeting Cancer Stem Cells in Triple-Negative Breast Cancer. Cancers (Basel) 11:965. <https://doi.org/10.3390/cancers11070965>
14. Kreso A, Dick JE (2014) Evolution of the Cancer Stem Cell Model. Cell Stem Cell 14:275–291. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.02.006>
15. Li W, Ma H, Zhang J, et al (2017) Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. Scientific Reports 7:1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14364-2>

16. Kida K, Ishikawa T, Yamada A, et al (2016) Effect of ALDH1 on prognosis and chemoresistance by breast cancer subtype. *Breast Cancer Res Treat* 156:261–269. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3738-7>
17. von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S, et al (2014) Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol* 15:747–756. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70160-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70160-3)
18. Triple-negativer Brustkrebs (TNBC). In: Journalonko.de. <https://www.journalonko.de/thema/lesen/70>. Accessed 3 Nov 2023. Zugriffsdatum: 05.02.2025.
19. Xun X, Ai J, Feng F, et al (2023) Adverse events of bevacizumab for triple negative breast cancer and HER-2 negative metastatic breast cancer: A meta-analysis. *Front Pharmacol* 14:1108772. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1108772>
20. Ärzteblatt DÄG Redaktion Deutsches (2017) Fortgeschrittenes Triple-negatives Mammakarzinom: Immuntherapien in Prüfung. In: Deutsches Ärzteblatt. <https://www.aerzteblatt.de/archiv/190610/Fortgeschrittenes-Triple-negatives-Mammakarzinom-Immuntherapien-in-Pruefung>. Accessed 7 Aug 2019. Zugriffsdatum: 05.02.2025.
21. Hennigs A, Riedel F, Gondos A, et al (2016) Prognosis of breast cancer molecular subtypes in routine clinical care: A large prospective cohort study. *BMC Cancer* 16:734. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2766-3>
22. Wang T, Fahrmann JF, Lee H, et al (2018) JAK/STAT3-Regulated Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation Is Critical for Breast Cancer Stem Cell Self-Renewal and Chemoresistance. *Cell Metab* 27:136-150.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.11.001>
23. de Gonzalo-Calvo D, López-Vilaró L, Nasarre L, et al (2015) Intratumor cholestryler ester accumulation is associated with human breast cancer proliferation and aggressive potential: a molecular and clinicopathological study. *BMC Cancer* 15:. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1469-5>
24. Antalis CJ, Arnold T, Rasool T, Lee B, Buhman KK, Siddiqui RA (2010) High ACAT1 expression in estrogen receptor negative basal-like breast cancer cells is associated with LDL-induced proliferation. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Aug;122(3):661-70. doi: 10.1007/s10549-009-0594-8. Epub 2009 Oct 23. PMID: 19851860.
25. Zipinotti dos Santos D, de Souza JC, Pimenta TM, et al. (2023) The impact of lipid metabolism on breast cancer: a review about its role in tumorigenesis and immune escape. *Cell Commun Signal* 21:161. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01178-1>
26. Eiriksson FF, Nøhr MK, Costa M, et al. (2020) Lipidomic study of cell lines reveals differences between breast cancer subtypes. *PLoS One* 15:e0231289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231289>
27. Antalis CJ, Uchida A, Buhman KK, Siddiqui RA (2011) Migration of MDA-MB-231 breast cancer cells depends on the availability of exogenous lipids and cholesterol esterification. *Clin Exp Metastasis* 28:733–741. <https://doi.org/10.1007/s10585-011-9405-9>
28. Singh R, Kaushik S, Wang Y, et al. (2009) Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458:1131–1135. <https://doi.org/10.1038/nature07976>

29. Maan M, Peters JM, Dutta M, Patterson AD (2018) Lipid metabolism and lipophagy in cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 504:582–589. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.097>
30. Petan T, Jarc E, Jusović M (2018) Lipid Droplets in Cancer: Guardians of Fat in a Stressful World. *Molecules* 23:1941. <https://doi.org/10.3390/molecules23081941>
31. Borgquist S, Giobbie-Hurder A, Ahern TP, et al. (2017) Cholesterol, Cholesterol-Lowering Medication Use, and Breast Cancer Outcome in the BIG 1-98 Study. *JCO* 35:1179–1188. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.70.3116>
32. O’Grady S, Crown J, Duffy MJ (2022) Statins inhibit proliferation and induce apoptosis in triple-negative breast cancer cells. *Med Oncol* 39:142. <https://doi.org/10.1007/s12032-022-01733-9>
33. Nowakowska MK, Lei X, Thompson MT, et al. (2021) Association of statin use with clinical outcomes in patients with triple-negative breast cancer. *Cancer* 127:4142–4150. <https://doi.org/10.1002/cncr.33797>
34. Shaitelman SF, Stauder MC, Allen P, et al. (2017) Impact of Statin Use on Outcomes in Triple Negative Breast Cancer. *Journal of Cancer* 8:2026–2032. <https://doi.org/10.7150/jca.18743>
35. Liang DH, Choi DS, Ensor JE, et al (2016) The autophagy inhibitor chloroquine targets cancer stem cells in triple negative breast cancer by inducing mitochondrial damage and impairing DNA break repair. *Cancer Lett* 376:249–258. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.04.002>
36. Choi DS, Blanco E, Kim Y-S, et al. (2014) Chloroquine eliminates cancer stem cells through deregulation of Jak2 and DNMT1. *Stem Cells* 32:2309–2323. <https://doi.org/10.1002/stem.1746>
37. Zhang H (2018) Lysosomal acid lipase and lipid metabolism: new mechanisms, new questions, and new therapies. *Curr Opin Lipidol* 29:218–223. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000507>
38. Li F, Zhang H (2019) Lysosomal acid lipase in lipid metabolism and beyond. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 39:850. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312136>
39. Zadoorian A, Du X, Yang H (2023) Lipid droplet biogenesis and functions in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 19:443–459. <https://doi.org/10.1038/s41574-023-00845-0>
40. Beloribi-Djeafaflia S, Vasseur S, Guillaumond F (2016) Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis* 5:e189–e189. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2015.49>
41. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
42. Goni R, García P, Foissac S (2009) The qPCR data statistical analysis. 9
43. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, et al. (2012) The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discov* 2:401–404. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>

44. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, et al. (2013) Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal. *Sci Signal* 6:p11. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>

45. de Bruijn I, Kundra R, Mastrogiacomo B, et al (2023) Analysis and Visualization of Longitudinal Genomic and Clinical Data from the AACR Project GENIE Biopharma Collaborative in cBioPortal. *Cancer Res*. 2023 Dec 1;83(23):3861-3867. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-23-0816. PMID: 37668528; PMCID: PMC10690089.

46. Bai X, Ni J, Beretov J, et al (2021) Triple-negative breast cancer therapeutic resistance: Where is the Achilles' heel? *Cancer Lett* 497:100–111. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.10.016>

47. Greaves M, Maley CC (2012) Clonal evolution in cancer. *Nature* 481:306–313. <https://doi.org/10.1038/nature10762>

48. Lee K-L, Kuo Y-C, Ho Y-S, Huang Y-H (2019) Triple-Negative Breast Cancer: Current Understanding and Future Therapeutic Breakthrough Targeting Cancer Stemness. *Cancers (Basel)* 11:1334. <https://doi.org/10.3390/cancers11091334>

49. Roberti A, Valdes AF, Torrecillas R, et al. (2019) Epigenetics in cancer therapy and nanomedicine. *Clinical Epigenetics* 11:. <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0675-4>

50. Cheng Y, He C, Wang M, et al (2019) Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: mechanisms and advances in clinical trials. *Signal Transduct Target Ther* 4:62. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0095-0>

51. Rossi T, Zamponi R, Chirico M, et al (2023) BETi enhance ATGL expression and its lipase activity to exert their antitumoral effects in triple-negative breast cancer (TNBC) cells. *J Exp Clin Cancer Res* 42:7. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02571-3>

52. Kridel SJ, Axelrod F, Rozenkrantz N, Smith JW (2004) Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Res* 64:2070–2075. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-3645>

53. Jovankić JV, Nikodijević DD, Milutinović MG, et al (2023) Potential of Orlistat to induce apoptotic and antiangiogenic effects as well as inhibition of fatty acid synthesis in breast cancer cells. *European Journal of Pharmacology* 939:175456. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.175456>

54. Menendez JA, Vellon L, Lupu R (2005) Antitumoral actions of the anti-obesity drug orlistat (XenicalTM) in breast cancer cells: blockade of cell cycle progression, promotion of apoptotic cell death and PEA3-mediated transcriptional repression of Her2/neu (erbB-2) oncogene. *Ann Oncol* 16:1253–1267. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdi239>

55. Bhargava-Shah A, Foygel K, Devulapally R, Paulmurugan R (2016) Orlistat and antisense-miRNA-loaded PLGA-PEG nanoparticles for enhanced triple negative breast cancer therapy. *Nanomedicine (Lond)* 11:235–247. <https://doi.org/10.2217/nnm.15.193>

56. Zhang R, Meng J, Yang S, et al (2022) Recent Advances on the Role of ATGL in Cancer. *Front Oncol* 12:944025. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.944025>

57. Tomin T, Fritz K, Gindlhuber J, et al (2018) Deletion of Adipose Triglyceride Lipase Links Triacylglycerol Accumulation to a More-Aggressive Phenotype in A549 Lung Carcinoma Cells. *J Proteome Res* 17:1415–1425. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00782>

58. Al-Zoughbi W, Pichler M, Gorkiewicz G, et al (2016) Loss of adipose triglyceride lipase is associated with human cancer and induces mouse pulmonary neoplasia. *Oncotarget* 7:33832–33840. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9418>
59. Xie H, Heier C, Kien B, et al (2020) Adipose triglyceride lipase activity regulates cancer cell proliferation via AMP-kinase and mTOR signaling. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1865:158737. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158737>
60. Wang YY, Attané C, Milhas D, et al (2017) Mammary adipocytes stimulate breast cancer invasion through metabolic remodeling of tumor cells. *JKI Insight* 2:e87489. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.87489>
61. Lin L, Hutzen B, Lee H-F, et al (2013) Evaluation of STAT3 signaling in ALDH+ and ALDH+/CD44+/CD24- subpopulations of breast cancer cells. *PLoS One* 8:e82821. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082821>
62. Pattabiraman DR, Weinberg RA (2014) Tackling the cancer stem cells – what challenges do they pose? *Nat Rev Drug Discov* 13:497–512. <https://doi.org/10.1038/nrd4253>
63. JCI - The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44+CD24- stem cell-like breast cancer cells in human tumors. <https://www.jci.org/articles/view/44745>. Accessed 17 Feb 2021
64. Li Y-J, Fahrmann JF, Aftabizadeh M, et al (2022) Fatty acid oxidation protects cancer cells from apoptosis by increasing mitochondrial membrane lipids. *Cell Reports* 39:110870. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110870>
65. Hosea R, Hardiany NS, Ohneda O, Wanandi SI (2018) Glucosamine decreases the stemness of human ALDH+ breast cancer stem cells by inactivating STAT3. *Oncol Lett* 16:4737–4744. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9222>
66. Novak D, Hüser L, Elton JJ, et al (2020) SOX2 in development and cancer biology. *Seminars in Cancer Biology* 67:74–82. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.007>
67. Leis O, Eguiara A, Lopez-Arribillaga E, et al (2012) Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. *Oncogene* 31:1354–1365. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.338>
68. Mukherjee P, Gupta A, Chattopadhyay D, Chatterji U (2017) Modulation of SOX2 expression delineates an end-point for paclitaxel-effectiveness in breast cancer stem cells. *Sci Rep* 7:9170. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08971-2>
69. Shen Y, Schmidt BUS, Kubitschke H, et al (2020) Detecting heterogeneity in and between breast cancer cell lines. *Cancer Converg* 4:1. <https://doi.org/10.1186/s41236-020-0010-1>
70. Kumaraswamy E, Wendt KL, Augustine LA, et al (2015) BRCA1 regulation of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in human breast cancer cells involves microRNA-146a and is critical for its tumor suppressor function. *Oncogene* 34:4333–4346. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.363>
71. Yang J, Liao D, Chen C, et al (2013) Tumor-associated macrophages regulate murine breast cancer stem cells through a novel paracrine EGFR/Stat3/Sox-2 signaling pathway. *Stem Cells* 31:248–258. <https://doi.org/10.1002/stem.1281>
72. Kondo T, Raff M (2004) Chromatin remodeling and histone modification in the conversion of oligodendrocyte precursors to neural stem cells. *Genes Dev* 18:2963–2972. <https://doi.org/10.1101/gad.309404>

73. Wen WX, Leong C-O (2019) Association of BRCA1- and BRCA2-deficiency with mutation burden, expression of PD-L1/PD-1, immune infiltrates, and T cell-inflamed signature in breast cancer. *PLoS One* 14:e0215381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215381>

74. Dong B, Ding Y, Huang Q, Guan X (2019) Different Triple-Negative Breast Cancer Tumor Cell Lysates (TCLs) Induce Discrepant Anti-Tumor Immunity by PD1/PDL-1 Interaction. *Med Sci Monit* 25:500–515. <https://doi.org/10.12659/MSM.911689>

75. Zhou Y, Wang H, Luo Y, et al (2023) Effect of metabolism on the immune microenvironment of breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1878:188861. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2023.188861>

76. Chen M, Pockaj B, Andreozzi M, et al (2018) JAK2 and PD-L1 Amplification Enhance the Dynamic Expression of PD-L1 in Triple-negative Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer* 18:e1205–e1215. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2018.05.006>

77. Dai M, Zhang C, Ali A, et al (2016) CDK4 regulates cancer stemness and is a novel therapeutic target for triple-negative breast cancer. *Sci Rep* 6:35383. <https://doi.org/10.1038/srep35383>

78. Jarc E, Kump A, Malavašić P, et al (2018) Lipid droplets induced by secreted phospholipase A2 and unsaturated fatty acids protect breast cancer cells from nutrient and lipotoxic stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1863:247–265. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.12.006>

79. Schulze RJ, Sathyaranayanan A, Mashek DG (2017) Breaking fat: the regulation and mechanisms of lipophagy. *Biochim Biophys Acta* 1862:1178–1187. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.06.008>

80. Liu X, Viswanadhapalli S, Kumar S, et al (2022) Targeting LIPA independent of its lipase activity is a therapeutic strategy in solid tumors via induction of endoplasmic reticulum stress. *Nat Cancer* 3:866–884. <https://doi.org/10.1038/s43018-022-00389-8>

81. Isaac Marin-Valencia, Juan M. Pascual, Chapter 36 - Wolman Disease, Editor(s): Roger N. Rosenberg, Juan M. Pascual, Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease (Fifth Edition), Academic Press, 2015, Pages 403-409, ISBN 9780124105294, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410529-4.00036-X>.

82. Tylki-Szymańska A, Jurecka A (2014) Lysosomal acid lipase deficiency: wolman disease and cholestryl ester storage disease. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)* 35:99–106

83. Baronio F, Conti F, Miniaci A, et al (2021) Diagnosis, treatment, and follow-up of a case of Wolman disease with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Mol Genet Metab Rep* 30:100833. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2021.100833>

84. Hoffman EP, Barr ML, Giovanni MA, Murray MF (1993) Lysosomal Acid Lipase Deficiency. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al (eds) *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle, Seattle (WA)

85. Bozzetti T (2024) Pharmakologische Inhibition der lysosomalen sauren Lipase als neuartiger Ansatz in der adjuvanten Brustkrebstherapie, Heinrich-Heine-Universität. <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=66426>

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich auf dem Weg meiner Doktorarbeit unterstützt und zum erfolgreichen Abschluss dieser beigetragen haben.

Zunächst möchte ich einen großen Dank meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Tanja Fehm für die Vermittlung, Betreuung und immerwährende Beratung während der letzten Jahre aussprechen.

Zudem möchte ich mich bei meinem Zweitbetreuer Prof. Dr. Georg Pongratz bedanken, welcher immer einen guten Ratschlag parat hatte.

Mein herzlichster Dank gilt Dr. nat. med. Knud Esser, welcher mir die Möglichkeit gab, Teil dieses spannenden Projektes zu sein, mir mit seiner großen Expertise immer mit Rat und Tat zur Seite stand und die Zeit im Labor zu einer großartigen Erfahrung gemacht hat.

Zudem möchte ich Andra Kulik für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit und geduldige Einarbeitung sowie hilfreichen Tipps danken.

Ebenso danke ich meinen Kolleginnen Theresa Bozzetti und Jasmin On für die produktive Zusammenarbeit.

Ein großer Dank gilt außerdem dem gesamten Team des Forschungslabors der Frauenklinik Düsseldorf, dessen Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen mir wichtige Impulse bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit mitgegeben haben.

Zuletzt gilt mein größter Dank meinen Eltern, Schwiegereltern, Geschwistern, meinem Mann Markus Steigerwald, meiner besten Freundin Alexandra Eckey sowie meinen besten Freunden Abbas Karout und Marcel Hackmann-Eckey für die fortwährende Unterstützung und Motivation während der gesamten Zeit meines Studiums bis zur Fertigstellung meiner Doktorarbeit und darüber hinaus.