

Mariam Haffa

Dr. sc. hum.

Characterization of distinct human adipose tissue depots – Implications for obesity-associated metabolic disturbances and colorectal cancer

Fach/Einrichtung: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)

Doktormutter: Prof. Dr. Cornelia M. Ulrich

The pandemic rise of obesity is a major global health challenge, as it is strongly linked to the increased incidence of multiple chronic diseases. In fact, excessive body weight is considered to be an evident cause for an elevated risk to develop colorectal cancer and a potential modifier of colorectal cancer prognosis. However, the underlying molecular mechanisms are incompletely understood. Emerging evidence from epidemiological and experimental studies has delineated distinct factors that are critical for adipose tissue inflammation and energy homeostasis as key drivers of obesity-associated metabolic disturbances that may fuel colorectal tumors. Distinct adipose tissue depots differ in their metabolic profiles and the discrimination between depots, and measurements of visceral fat mass in particular, have been shown to allow for a more precise risk prediction than the body mass index, the most common anthropometric proxy. While mechanistic studies are primarily based on rodent models, that only poorly mirror the human pathophysiology, or on human subcutaneous adipose tissue, only few, small-scale studies of visceral adipose tissue from colorectal cancer patients are available.

To address this scientific gap, the present work aimed at characterizing human mesenteric visceral and abdominal subcutaneous adipose tissue from colorectal cancer patients with regard to their metabolic activity and associations with anthropometric measurements, demographic data, and clinicopathological characteristics in a molecular epidemiological approach. Based on these findings, candidate adipokines, that were associated with visceral adipose tissue, were selected to elucidate their effects on colorectal cancer cell viability in *in vitro* studies.

This study demonstrated that visceral and subcutaneous adipose tissue strongly differed in their transcriptome profiles and that visceral adipose tissue presented elevated gene

expression of key regulators of inflammatory signaling. Results from comparative obesity analyses further showed that increased visceral fat area, assessed via computed tomography, but not the body mass index was associated with metabolic gene expression patterns and modestly increased CD68⁺ immune cell infiltration in visceral adipose tissue. In contrast, subcutaneous fat area and body mass index showed similar associations with subcutaneous adipose tissue gene expression. Obesity-associated metabolic gene expression patterns were distinct between depots with more pronounced alterations in subcutaneous adipose tissue.

Further, men and women differed in body fat distribution patterns and metabolic gene expression profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue corroborating published data. Moreover, body mass index was associated with distinct colorectal tumor characteristics. Patients with distant metastasis originating from tumors of the right colon demonstrated pre- and post-surgical weight loss, likely due to a more aggressive tumor that fosters cancer-associated cachexia. Microsatellite-stable tumor patients had higher body mass index measures than microsatellite-unstable tumor patients, hinting at a potential discrepancy in molecular tumorigenesis among lean and overweight / obese colorectal cancer patients. Colon-adjacent visceral adipose tissue was stronger infiltrated by CD68⁺ and CD3⁺ immune cells than rectum-adjacent visceral adipose tissue, and neoadjuvant radiotherapy was identified to induce shifts in expression of genes that regulate apoptosis and cell cycle in visceral adipose tissue. These previously undisclosed tumor-related findings require further in-depth investigations in larger cohorts.

Follow-up analyses of selected candidate adipokines demonstrated that visceral adipose tissue contributed to systemic protein levels of insulin-like growth factor 1, serum amyloid A and monocyte chemoattractant protein 1. Increased visceral fat area was associated with dysregulated systemic levels of insulin-like growth factor 1, a critical key regulator of metabolic disturbances. In cellular *in vitro* assays, recombinant insulin-like growth factor 1 stimulated cell proliferation of primary colorectal cancer spheroids. These findings substantiate the function of insulin-like growth factor 1 as a crucial tumor-promoting growth factor that potentially links visceral obesity to colorectal tumorigenesis.

Together, this work revealed that risk profiles for metabolic diseases, including adipose tissue inflammation and dysregulated energy homeostasis, were more pronounced in visceral than subcutaneous adipose tissue, associated with visceral obesity assessed by direct quantification of visceral adipose tissue mass, poorly reflected by the body mass index and distinct between men and women. These insights refine our understanding of the obese metabolic state and provide a biological rationale for the necessity to differentiate between

distinct adipose tissue depots for a better risk prediction of metabolic health and prognosis of colorectal cancer patients.

Der weltweite Anstieg der Prävalenzraten von Übergewicht und das damit zusammenhängende, erhöhte Risiko für zahlreiche chronische Erkrankungen stellen ein globales Gesundheitsproblem dar. Übergewicht wird als evidente Ursache für die Entstehung und als möglicher Einflussfaktor für die Prognose von kolorektalen Tumoren angesehen. Allerdings sind die zugrundeliegenden, molekularen Mechanismen bisher unvollständig aufgeklärt. In epidemiologischen und experimentellen Studien wurden Biomoleküle identifiziert, die die Fettgewebsentzündung und den systemischen Energiehaushalt regulieren, und damit zur Entwicklung von übergewichtsassoziierten metabolischen Erkrankungen beitragen. Diese Faktoren können hierbei die Entstehung und das Wachstum von kolorektalen Tumoren beeinflussen. Einzelne Fettgewebekompartimente unterscheiden sich in ihren inflammatorischen und metabolischen Profilen und die Differenzierung zwischen diesen Kompartimenten, sowie die Quantifizierung von Viszeralfett im Speziellen, erlauben eine deutlich genauere Risikoprognose im Vergleich zur Bestimmung des Body Mass Index, dem meist genutzten Messwert zur Ermittlung von Übergewicht. Allerdings konnten bisherige mechanistische Studien, die sich vorrangig den Untersuchungen von humanem Subkutanfett oder Nagetiermodellen bedienten, ein nur unzureichendes Abbild der humanen Pathophysiologie darstellen. Humanstudien, in denen das Viszeralfett von Patienten mit einem kolorektalen Karzinom umfassend analysiert wurde, gibt es hingegen nur wenige.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die metabolische Aktivität von humanem Viszeral- und Subkutanfett in Patienten mit kolorektalem Karzinom zu untersuchen und die Zusammenhänge mit anthropometrischen Messungen, demographischen Daten und tumorrelevanten pathologischen Charakteristika in einem molekular epidemiologischen Ansatz zu analysieren. Basierend auf diesen Daten, sollten die Effekte von ausgewählten, mit dem Viszeralfett assoziierten Adipokinen auf die Viabilität von Kolorektalkarzinomzellen in *in vitro* Studien untersucht werden.

Die vorliegende Studie zeigte wesentliche Unterschiede in der genomweiten Genexpression zwischen Viszeral- und Subkutanfett, wobei Gene, die wichtige Entzündungsfaktoren kodieren, im Viszeralfett deutlich höher exprimiert waren. In vergleichenden Analysen konnte des Weiteren gezeigt werden, dass eine erhöhte Viszeralfettmasse, quantifiziert mittels Computertomographie, nicht aber erhöhte Body Mass Index Werte, mit metabolischen Genexpressionsveränderungen und einem leichten Anstieg der CD68⁺ Immunzellinfiltration im Viszeralfett assoziiert war. Im Gegensatz hierzu waren

eine erhöhte Subkutanfettmasse und erhöhte Body Mass Index Werte mit ähnlichen Genexpressionsveränderungen im Subkutanfett assoziiert. Diese genomweiten Genexpressionsprofile waren im Subkutanfett stärker ausgeprägt als im Viszeralfett.

Darüber hinaus konnten Unterschiede in der Fettverteilung und der metabolischen Genexpression im Viszeral- und Subkutanfett zwischen Männern und Frauen aufgezeigt werden, die bereits veröffentlichte Beobachtungen bestätigten. Des Weiteren wurden Zusammenhänge zwischen Body Mass Index Werten und spezifischen pathologischen Tumorcharakteristika identifiziert. Patienten mit metastasiertem, rechtsseitigem Kolonkarzinom verloren vor und nach der Diagnose und Tumorresektion an Körpergewicht, was durch die Abnahme von Body Mass Index Werten nachgewiesen werden konnte. Diese Beobachtung ist vermutlich auf das aggressivere rechtsseitige Kolonkarzinom zurückzuführen, das die Progression von Tumorkachexie stärker begünstigen könnte als das linksseitige Kolon- oder das Rektumkarzinom. Patienten mit mikrosatellitenstabilen Tumoren hatten außerdem höhere Body Mass Index Werte im Vergleich zu Patienten mit mikrosatelliteninstabilen Tumoren. Dies deutet auf mögliche Unterschiede in der molekularen Tumorentstehung zwischen schlanken und übergewichtigen Kolorektalkarzinompatienten hin. Darüber hinaus wurde eine erhöhte Infiltrierung von CD68⁺ und CD3⁺ Immunzellen im Viszeralfett des Kolons im Vergleich zum Viszeralfett des Rektums, und eine veränderte Expression von Apoptose- und Zellzyklusgenen im Viszeralfett nach neoadjuvanter Radiotherapie beobachtet. Diese bisher kaum beschriebenen Zusammenhänge zwischen Tumorcharakteristika und dem Körpergewicht oder molekularen Merkmalen des Viszeralfetts erfordern weitergehende Validierungen in größeren Kohorten.

Ausgewählte Kandidatengene wurden in weiteren funktionellen Untersuchungen analysiert. Hier konnte gezeigt werden, dass die Genexpression der Adipokine Insulin-like growth factor 1, Serum amyloid A und Monocyte chemoattractant protein 1 im Viszeralfett mit den Serumkonzentrationen der entsprechenden Proteine korrelierte, was auf eine wesentliche Beteiligung des Viszeralfetts in der systemischen Regulation dieser Faktoren hindeutet. Patienten mit erhöhter Viszeralfettmasse zeigten außerdem veränderte Serumwerte von Insulin-like growth factor 1, einem kritischen Mediator von metabolischen Erkrankungen. In zellulären *in vitro* Versuchen konnte durch Zugabe von rekombinantem Insulin-like growth factor 1 die Zellproliferation von Kolorektaltumor-Sphäroiden stimuliert werden. Diese Ergebnisse untermauern die bedeutende Funktion von Insulin-like growth factor 1 als tumorfördernden Wachstumsfaktor und potentiellen Bindeglied zwischen übermäßiger Viszeralfettmasse und der Entstehung und Progression von kolorektalen Tumoren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Entzündungsreaktionen in Fettgewebekompartimenten und ein gestörter Energiehaushalt, beides Merkmale eines metabolischen Risikoprofils, im Viszeralfett stärker ausgeprägt waren als im Subkutanfett. Im Viszeralfett korrelierten metabolische und zelluläre Veränderungen mit der Viszeralfettmasse und wurden nur begrenzt durch Messungen des Body Mass Indexes abgebildet. Außerdem unterschieden sich Männer und Frauen in ihrer metabolischen Genexpression in beiden Fettkompartimenten. Diese Ergebnisse tragen zu einem besseren Verständnis der metabolischen Veränderungen in verschiedenen Fettkompartimenten von fettleibigen Individuen bei. Außerdem bieten sie eine biologische Rationale für die Notwendigkeit, zwischen einzelnen Fettkompartimenten zu unterscheiden, um eine bessere Einschätzung für das Risiko metabolischer Störungen und die Prognose von Patienten mit einem kolorektalen Karzinom zu ermöglichen.