

# Die Rolle von CD44 in der Regulation von onkogenem YAP in Lebertumorzellen in vitro

Julia Maria Schwenke

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen  
Universität München zur Erlangung einer  
Doktorin der Medizin (Dr. med.)  
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: apl. Prof. Dr. Lutz Renders

Prüfende der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Ursula Ehmer
2. Prof. Dr. Carolin Mogler

Die Dissertation wurde am 01.02.2024 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die TUM School of Medicine and Health am 03.07.2024 angenommen.

## **Inhaltsverzeichnis**

I	Abbildungsverzeichnis.....	IV
II	Tabellenverzeichnis.....	V
III	Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1	Einleitung.....	1
1.1	Primäre Lebertumoren .....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Ätiologie .....	1
1.1.3	Therapieoptionen und Prognose .....	2
1.2	Grundlagen hepatischer Karzinogenese.....	4
1.2.1	Leberregeneration und Homöostase .....	4
1.2.2	Fibrose und Zirrhose .....	4
1.2.3	Bedeutung von Tumorstammzellen .....	5
1.2.4	Heterogenität des HCCs und häufige Mutationen.....	5
1.3	Der Hippo-Signalweg in der hepatischen Karzinogenese .....	7
1.3.1	Der Hippo-Signalweg: Komponenten und Funktion .....	7
1.3.2	YAP als Effektor des Hippo-Signalwegs .....	9
1.4	CD44.....	13
1.5	RhoA.....	16
1.6	Vordaten der Arbeitsgruppe .....	18
2	Ziele der Studie .....	21
3	Materialien.....	22
3.1	Verwendete Zelllinien .....	22
3.2	Behandlung der Zellen .....	22
3.2.1	Antikörperbehandlung .....	22
3.2.2	Weitere Behandlung.....	23
3.3	Medien und Antibiotika .....	23
3.4	Verbrauchsmaterialien .....	24
3.5	Reagenzien .....	25
3.6	Selbst hergestellte Lösungen und Puffer .....	28
3.7	Antikörper.....	28
3.8	Humane Primer für quantitative real-time PCR.....	29
3.9	Technische Geräte und Kits .....	29
3.10	Software .....	31
4	Methoden .....	33
4.1	Zellkultur .....	33
4.1.1	Allgemeine Methoden zur Kultivierung .....	33
4.1.2	Ganzzellextrakte .....	33
4.1.3	Nukleäre Zellextrakte .....	33
4.1.4	Behandlung der Zellen für den Proteinnachweis mittels Western Blot .....	34

4.2	MTT-Proliferationsassay.....	34
4.2.1	Allgemeines Vorgehen .....	34
4.2.2	Antikörperbehandlung .....	34
4.2.3	Behandlung mit Doxorubicin.....	35
4.2.4	Behandlung mit Rhosin .....	35
4.2.5	Adhäsionsassay .....	35
4.3	Proteindetektion mittels Western Blot.....	36
4.3.1	Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung.....	36
4.3.2	Herstellung der Polyacrylamidgele .....	36
4.3.3	Proteinnachweis.....	37
4.4	YAP Immunfluoreszenz-Färbung.....	38
4.5	Isolation und Detektion von Ribonukleinsäuren .....	38
4.5.1	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese.....	38
4.5.2	Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) .....	39
4.6	Immunhistochemie humaner HCC-Proben .....	39
5	Ergebnisse .....	41
5.1	Charakterisierung und Auswahl der verwendeten HCC-Zelllinien.....	41
5.2	Analyse des Einflusses des CD44-Antikörpers IM7 auf HCC-Zellen.....	44
5.2.1	Einfluss der IM7-Behandlung auf die Proliferation .....	44
5.2.2	Einfluss von IM7 auf die Proteinexpression .....	46
5.2.3	Einfluss von Doxorubicin auf die CD44-Antikörpertherapie.....	47
5.3	Beeinflussung der Zellen durch den RhoA-Inhibitor Rhosin.....	50
5.3.1	Einfluss von Rhosin auf die Zellproliferation .....	50
5.3.2	Beeinflussung der YAP-Proteinexpression durch Rhosin .....	53
5.3.3	Beeinflussung von YAP-Zielgenen durch Rhosin .....	62
5.4	Korrelation von CD44 und YAP in HCC-Gewebeschnitten .....	65
6	Diskussion .....	67
7	Zusammenfassung .....	75
8	Literaturverzeichnis.....	76
9	Publikationsverzeichnis .....	84
10	Danksagung .....	85

## I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Kernkomponenten des Hippo-Signalwegs, angelehnt an (F. X. Yu & Guan, 2013).....	7
Abbildung 2: Regulation von Rho-GTPase-Proteinen, angelehnt an (Porter, Papaioannou, & Malliri, 2016).....	16
Abbildung 3: Daten des TKO-Mausmodells .....	19
Abbildung 4: Daten der CRISPR-Cas9-mutierten TKO-Tumorzelllinien .....	20
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Hippo-Signalwegs und möglicher YAP-Inhibitoren .....	21
Abbildung 6: Charakterisierung humaner HCC-Zelllinien im Hinblick auf CD44-, YAP- und Phospho-YAP-Proteinexpression .....	42
Abbildung 7: Charakterisierung der Proteinexpression von TKO2.1-, HepG2-, HuH7- und Mahlavu-Zellen bei unterschiedlichen Konfluenzen .....	43
Abbildung 8: Effekt der IM7-Behandlung auf die Zellproliferation.....	45
Abbildung 9: Effekt der IM7-Behandlung auf die YAP-Proteinexpression .....	47
Abbildung 10: Doxorubicin-Behandlung und Kombinationsbehandlung mit IM7.....	49
Abbildung 11: Einfluss der Rhosin-Behandlung auf die Zellproliferation .....	51
Abbildung 12: Adhäsionsassay der HepG2- und Mahlavu-Zellen .....	53
Abbildung 13: Western Blots der Zelllinie Mahlavu nach Rhosin-Behandlung .....	54
Abbildung 14: Western Blots der Zelllinie HepG2 nach Rhosin-Behandlung.....	55
Abbildung 15: Western Blots der Zelllinien TKO2.1 und HuH7 nach Rhosin-Behandlung....	56
Abbildung 16: Nukleäre und zytoplasmatische Proteinexpression in HepG2- und Mahlavu-Zellen nach Rhosin-Behandlung.....	57
Abbildung 17: YAP-Immunfluoreszenzfärbung von HepG2-Zellen.....	59
Abbildung 18: YAP-Immunfluoreszenzfärbung von Mahlavu-Zellen.....	60
Abbildung 19: YAP-Immunfluoreszenzfärbung von HuH7-Zellen.....	61
Abbildung 20: YAP-Immunfluoreszenzfärbung von TKO2.1-Zellen.....	62
Abbildung 21: Beeinflussung von YAP-Zielgenen durch Rhosin-Behandlung .....	64
Abbildung 22: Immunhistochemie von YAP und CD44 an humanen HCC-Schnitten .....	66

## II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: BCLC-Staging des HCCs, angelehnt an (Bellissimo et al., 2015).....	3
Tabelle 2: Verwendete Zelllinien.....	22
Tabelle 3: Antikörper zur Behandlung der Zellen .....	23
Tabelle 4: Weitere verwendete Therapeutika .....	23
Tabelle 5: Medien und Antibiotika für die Zellkultivierung .....	23
Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien .....	25
Tabelle 7: Reagenzien.....	28
Tabelle 8: Lösungen und Puffer.....	28
Tabelle 9: Antikörper .....	29
Tabelle 10: Humane Primer für qPCR .....	29
Tabelle 11: Geräte und Kits .....	31
Tabelle 12: Softwareprogramme .....	32
Tabelle 13: Polyacrylamidgel-Herstellung.....	36
Tabelle 14: Verwendung der Primärantikörper für Western Blots .....	37

### III Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
AKT	Proteinkinase B
AMOTL2	Angiomotin Like 2
ANKRD1	Ankyrin Repeat Domain 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer Staging System
BSA	Bovines Serumalbumin
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
CD	Cluster of differentiation
CD44s	Standard-Isoform des CD44
CD44v	CD44-variante Isoformen
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CSC	Cancer Stem Cells/ Krebsstammzellen
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
CTNNB1	Catenin Beta 1-Gen
CYR61	Cysteine-rich angiogenic inducer 61
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Elektrochemilumineszenz-Immunoassay
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EMT	Epithelial-mesenchymal Transition
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
ERK	Extracellular signal-regulated Kinases
ERM	Proteinfamilie aus Ezrin, Radixin und Moesin
EZM	Extrazelluläre Matrix

FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor/ Fibroblasten Wachstumsfaktor
5-FU	5-Fluoruracil
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAP	GTPase-activating protein
GDI	GDP dissociation inhibitor
GEF	GTP Exchange Factor/ GTP-Austauschfaktor
GPCR	G-protein-coupled receptor/ G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Hours/ Stunden
H <sub>2</sub> O	Wasser
HA	Hyaluronic Acid/ Hyaluronsäure
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Salzsäure
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGF	Hepatocyte growth factor/ Hepatozyten Wachstumsfaktor
HSC	Hepatische Sternzellen
HSP 90	Hitzeschockprotein 90
IgG	Immunglobulin Klasse G
IGFBP3	Insulin-like growth factor-binding protein 3
IL-6	Interleukin-6
JAG1	Jagged Canonical Notch Ligand 1
JAK	Januskinase
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
l	Liter
LATS1/2	Large Tumor Suppressor Kinase 1/2
M	Molar
m	Milli (10 <sup>-3</sup> )
mA	Milliampere
MAP	Mitogen-activated Protein
MET	Mesenchymal-epithelial Transition
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar

mRNA	Messenger-RNA
MST1/2	Mammalian Sterile 20-like Kinase 1/2
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MWA	Mikrowellenablation
n	Nano ( $10^{-9}$ )
NaCl	Natriumchlorid
NAFLD	Non-Alcoholic Fatty Liver Disease/ Nicht alkoholische Fettlebererkrankung
NASH	Non-Alcoholic Steatohepatitis/ Nicht alkoholische Steatohepatitis
NF2	Neurofibromatose Typ 2
NFW	Nuklease-freies Wasser
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NOTCH2	Neurogenes Locus-Notch-Homolog-Protein 2
n.s.	Nicht signifikant
p	Phospho-
PBS	Phosphate-Buffered Saline/ Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction/ Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PenStrep	Penicillin Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PH	Partielle Hepatektomie
Phospho-	phosphoryliert
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
P-YAP	Phosphoryliertes YAP
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RB	Retinoblastoma
rcf	Relative centrifugal force/ relative Zentrifugalbeschleunigung
RFA	Radiofrequenzablation
RhoA	Ras homolog gene family member A
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RNA	Ribonucleic Acid/ Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-assoziierte Proteinkinase
ROS	Reactive oxygen species/ Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Revolutions per minute/ Umdrehungen pro Minute



s.	siehe
Sav	Salvador
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate/ Natriumdodecylsulfat
Ser127	Serin 127
sgRNA	Single guide RNA
SH3	Src-homology 3 Domäne
siRNA	Small interfering RNA
SIRT	Selektive intraarterielle Radiotherapie
SPP1	Secreted Phosphoprotein 1
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SYBR	Asymmetrischer Cyanin-Farbstoff
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TAZ	Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif
TBS	Tris-Buffered Saline/ Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBS-T	Tris-buffered Saline + 2% Tween
TEAD	TEA Domain family member
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
TKO	Triple Knock-Out
TNM	Klassifikation zur Tumoreinteilung
TP53	Kodierendes Gen für das Tumorsuppressorprotein p53
TRIS	Trisaminomethan
Trp58	Tryptophan 58
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
YAP	Yes-Associated Protein

# 1 Einleitung

## 1.1 Primäre Lebertumoren

### 1.1.1 Epidemiologie

Primäre Lebermalignome waren 2020 die weltweit sechsthäufigste diagnostizierte Malignomart mit einer Inzidenz von 906.000 und verantwortlich für 830.000 Todesfälle. Die Inzidenz- und Mortalitätsraten sind für Männer jeweils zwei- bis dreimal höher. Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) macht mit 75-85 % der Fälle den größten Anteil primärer Lebermalignome aus, 10-15 % sind intrahepatische Cholangiokarzinome (CCC) oder Mischtumore aus HCC und CCC (Sung et al., 2021).

Von 1990 bis 2015 ist die Inzidenz von malignen Lebertumoren um 75 % gestiegen. Ursachen sind neben einer veränderten Altersstruktur und dem Bevölkerungswachstum eine Zunahme von Risikofaktoren wie die Zirrhoseentwicklung nach einem Anstieg der Hepatitis C-Infektionen Anfang der zweiten Hälfte des vorigen Jahrhunderts sowie eine Zunahme der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (Global Burden of Disease Liver Cancer, 2017). Die Erkrankungsrate ist weltweit ungleichmäßig verteilt. Mit einer Inzidenz von >20/100.000 ist sie am höchsten in Subsahara-Afrika und Ostasien, Ländern mit endemischem Vorkommen von Hepatitis B-Virusinfektionen. Südeuropäische Länder haben dagegen eine mittlere Inzidenz von 10-20/100.000. In Nord- und Südamerika sowie in Nordeuropa ist die Erkrankungsrate mit <5/100.000 dagegen deutlich niedriger (El-Serag, 2012; Mittal & El-Serag, 2013).

### 1.1.2 Ätiologie

Etwa 90 % der HCC-PatientInnen in der westlichen Welt haben eine Zirrhose oder Fibrose der Leber (Moon et al., 2019). Die größten Risikofaktoren für die Zirrhose und HCC-Entwicklung sind eine chronische Infektion mit Hepatitis B- oder C-Viren, mit Aflatoxin kontaminierte Nahrung, Alkoholabusus, Übergewicht und Typ-2-Diabetes (Bray et al., 2018). Das Lebenszeitrisiko für die Entwicklung eines HCCs beträgt bei einer Leberzirrhose ca. 30 %. Pro Jahr entwickeln etwa 1-8 % der Zirrhose-PatientInnen ein HCC, wobei es vor allem bei der chronischen Hepatitis B und den metabolisch bedingten Lebererkrankungen auch zu einer HCC-Entwicklung ohne Zirrhose kommen kann (European Association for the Study of the Liver, 2018).

Es wird angenommen, dass viele HCC-Fälle mit unklarer Ätiologie auf eine nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) und nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) zurückzuführen sind. Bei 30-40 % der chronischen Lebererkrankungen bzw. HCCs fehlt eine eindeutig virale oder alkoholbedingte Ätiologie, wobei diese PatientInnen häufiger Eigenschaften wie Übergewicht und Diabetes zeigen (El-Serag & Rudolph, 2007; Massarweh & El-Serag, 2017).

### 1.1.3 Therapieoptionen und Prognose

Die wichtigsten klinischen Prognosefaktoren sind der Tumorstatus, die Leberfunktion und der allgemeine Gesundheitszustand der PatientInnen. Es gibt mehrere Staging-Systeme zur klinischen Klassifikation des HCCs (European Association for the Study of the Liver, 2018). Das am häufigsten genutzte Staging-System in der westlichen Welt ist das Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) System (s. Tabelle 1). Es berücksichtigt sowohl die intrahepatische Tumorausdehnung als auch prognostisch relevante Parameter wie eine Makrogefäßinvasion oder extrahepatische Tumormanifestationen (Bellissimo, Pinzone, Cacopardo, & Nunnari, 2015). Das Überleben ist stark abhängig vom BCLC-Stadium. Die Therapieoptionen umfassen je nach vorliegendem Stadium eine chirurgische Resektion, Lebertransplantation, sowie lokale nicht-chirurgische Therapien wie Radiofrequenz- oder Mikrowellenablation (RFA oder MWA), transarterielle Chemoembolisation (TACE), selektive interne Radiotherapie (SIRT) und auch eine systemische Therapie mit Immunkombinationstherapien oder Tyrosinkinaseinhibitoren (Vogel et al., 2018). PatientInnen mit einem frühen HCC-Stadium (Stadium 0 und A) kommen für kurative Therapiemaßnahmen wie eine Resektion, Ablation oder Lebertransplantation in Betracht. Im intermediären oder fortgeschrittenen Stadium (BCLC B oder C) werden palliative lokoregionäre Verfahren, wie eine TACE oder SIRT, und systemische Therapien angewandt. Bei Stadium D wird die Prognose durch die Lebergrunderkrankung und den Allgemeinzustand bestimmt und nicht durch die Tumorerkrankung. Somit ist nur eine bestmögliche unterstützende Behandlung möglich und sinnvoll (Severi, van Malenstein, Verslype, & van Pelt, 2010; Vogel, Martinelli, clinicalguidelines@esmo.org, & Committee, 2021). Nur 10-20 % der HCC-PatientInnen sind geeignet für eine operative Intervention, aber auch diese haben häufig Rezidive und das postoperative 5-Jahres-Überleben liegt bei 30-40 %. Leider hat eine konventionelle Chemotherapie für die Behandlung von PatientInnen mit einem fortgeschrittenen HCC nur einen limitierten Effekt auf die Verbesserung des Gesamtüberlebens (Ji & Wang, 2012).

Zahlreiche randomisierte klinische Studien haben Chemotherapien bzw. systemische Therapien für das HCC evaluiert, jedoch war über viele Jahre nur eine Substanz, Sorafenib, für eine systemische Therapie verfügbar (Llovet et al., 2016). Sorafenib ist ein Multikinase-Inhibitor, der die Raf-Kinase, den VEGF-Rezeptor und PDGF-Rezeptor blockiert (Bellissimo et al., 2015). Mittlerweile sind auch andere Tyrosinkinaseinhibitoren wie Lenvatinib etabliert. Die Standarderstlinientherapie ist heute eine Checkpointinhibitor-Kombinationstherapie mit Atezolizumab und Bevacizumab (Finn et al., 2020; Vogel et al., 2021). Auch eine duale Checkpoint-Inhibition mit Durvalumab und Tremelimumab kann eingesetzt werden (C. Yang et al., 2023).

Trotz dieser vielen verfügbaren Systemtherapien ist die Prognose immer noch eingeschränkt. Die Therapieempfehlungen für die einzelnen Stadien können je nach Tumor- und

PatientInnencharakteristika angepasst werden. Unter anderem wird ein Einsatz der Systemtherapie in früheren Tumorstadien bereits in klinischen Studien evaluiert (Vogel et al., 2018).

<b>Stadium</b>	<b>Kennzeichen</b>
<b>0</b>	Einzelner Knoten <2 cm, erhaltene Leberfunktion
<b>A</b>	1-3 Knoten <3 cm, erhaltene Leberfunktion
<b>B</b>	Multinoduläres HCC, nicht resektabel, erhaltene Leberfunktion
<b>C</b>	Portale Invasion und/oder extrahepatische Metastasierung (N1, M1), erhaltene Leberfunktion
<b>D</b>	Eingeschränkte Leberfunktion (Child-Pugh C), ECOG 3-4

**Tabelle 1: BCLC-Staging des HCCs, angelehnt an (Bellissimo et al., 2015)**

## 1.2 Grundlagen hepatischer Karzinogenese

### 1.2.1 Leberregeneration und Homöostase

In der Leber gibt es zahlreiche unterschiedliche Zelltypen. Zum einen Parenchymzellen, die Hepatozyten, und zum anderen Nicht-Parenchymzellen wie Cholangiozyten, Kupfferzellen und Sternzellen (Hong, Cai, Jiang, Zhou, & Chen, 2015). Die Hepatozyten machen etwa 60-80 % der Lebermasse aus und sind ruhende Zellen in der normalen Leber. Bei einem Leberschaden oder einer Reduktion der Lebermasse haben sie allerdings die Fähigkeit, ihren Zellumsatz enorm zu steigern und haben ein großes proliferatives Potential. Wenn die Replikationskapazität der Hepatozyten aber gestört ist, beispielsweise durch eine chronische Hepatitis oder Leberzirrhose, wird die Proliferation anderer Zelltypen wie etwa der sogenannten Ovalzellen in der Periportalregion beobachtet (Sia, Villanueva, Friedman, & Llovet, 2017). Ovalzellen wurden lange als mutmaßliche hepatische Stammzellen diskutiert, die unter bestimmten Bedingungen in der Lage sind, sowohl in Hepatozyten als auch in Cholangiozyten zu differenzieren. Die Expansion von Ovalzellen, auch als dukuläre Reaktion bezeichnet, wird bei einer Lebervergrößerung und in der Leber mit hepatozellulären Karzinomen häufig beobachtet (Hong et al., 2015). Die Funktion dieser Zellen ist aber weiterhin nicht genau geklärt und ihre Rolle in der Leberregeneration sowie in der Karzinogenese wird kontrovers diskutiert (Sato et al., 2019). Durch ihre große Plastizität sind Hepatozyten mit ihrer Fähigkeit, zu dedifferenzieren und in gallengangähnliche Zellen zu transdifferenzieren, mögliche Ursprungszellen für die Entstehung eines HCCs und auch eines CCCs. Aber auch die vorbeschriebenen Ovalzellen, die in präklinischen Modellen als bipotente Progenitorzellen diskutiert wurden, kommen als Initiatoren der Karzinogenese infrage (Sia et al., 2017).

### 1.2.2 Fibrose und Zirrhose

Besonders in der Leber trägt auch das Mikromilieu zur Tumorentstehung bei, da hier 90 % der Tumore in einer chronischen Entzündungsumgebung entstehen (Sia et al., 2017). Diese chronische Entzündung in der Leber kann sowohl durch eine virale Hepatitis als auch durch Alkohol und metabolische Lebererkrankungen verursacht werden (W. Kim et al., 2018). Durch den andauernden Leberschaden entwickelt sich zunächst eine Fibrose und schließlich eine Leberzirrhose. Die extrazelluläre Matrix (EZM) lagert sich vermehrt ab und akkumuliert. Das führt zur Veränderung vaskulärer Strukturen und Einschränkung der Hepatozytenfunktionen. Die Fibrose ist gekennzeichnet durch wiederholten Zelltod und eine kompensatorische Regeneration von Hepatozyten. Durch den kontinuierlichen Proliferationsreiz kann es auch zu vermehrten Mutationen im Genom der Hepatozyten kommen, was durch chromosomale Instabilität zur Karzinogenese beitragen könnte (Moon et al., 2019). Die Formation von fibrotischer EZM stört außerdem die epitheliale Zellpolarität und die Wachstumsfaktoren im

profibrotischen Milieu stimulieren die Proliferation der Parenchymzellen. Das wiederum schafft Bedingungen für die Tumorentstehung (Noguchi, Saito, & Nagase, 2018).

### 1.2.3 Bedeutung von Tumorstammzellen

Das Schlüsselereignis, das es Tumorzellen erlaubt, invasiv zu wachsen, ist die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) (Yeung & Yang, 2017). Der Übergang vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp fördert die Zellinvasion und damit die Metastasierung im HCC. Die Parenchymzellen verlieren ihre Verbindung zu den Nachbarzellen und ihre Polarität, aber sie erlangen die Bewegungsfähigkeit und Invasivität von mesenchymalen Zellen. Die Zellen zeigen nach der EMT eine Überexpression von unterschiedlichen Stammzellmarkern, darunter CD44 (Gao et al., 2015).

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen mit der Kapazität zur Selbsterneuerung durch mitotische Zellteilung und der Fähigkeit zur Differenzierung in reife Zellen. Sie sind verantwortlich für Gewebeerneuerung und -reparatur (L. B. Xu & Liu, 2014).

Tumorstammzellen (*cancer stem cells*, CSC) sind eine kleine Subpopulation im Primärtumor, die Tumorentstehung, Rekurrenz, Metastasierung und Medikamenten- und Strahlenresistenz hervorrufen können. CSC zeigen wie Stammzellen eine Apoptoseresistenz und eine veränderte Expression von Transkriptionsfaktoren, die wiederum zur EMT beitragen (Asai et al., 2019; Wang, Zhao, Hackert, & Zoller, 2018). CSC-Marker im HCC sind unter anderem EpCAM, CD133, CD90, CD44, CD24, CD13 und Ov6. In Lebertumoren wurden Zellen mit der Expression von CSC-Markern identifiziert, allerdings ist diese Zellpopulation sehr heterogen und zeigt variable Phänotypen der verschiedenen Marker. Der Nachweis dieser potentiellen CSC korreliert jedoch mit der Überlebensdauer der PatientInnen nach Resektion und dem Ansprechen auf eine Chemotherapie (Yamashita & Wang, 2013). Die Progenitorzeleigenschaften können auch als ein prognostischer Marker für den Behandlungserfolg nach einer Lebertransplantation dienen. In einer Studie zeigte sich bei der Expression von Progenitorzellmarkern in den Tumoren der Explantatleber eine 5-Jahres-Rezidivrate von 53 % und ein Gesamtüberleben von 45 %, während es ohne Marker nur 19 % Rezidive in fünf Jahren gab und das 5-Jahres-Gesamtüberleben 67 % betrug (Castelli, Pelosi, & Testa, 2017).

Dementsprechend könnte die Entwicklung von zielgerichteten Therapien gegen CSC eine neue Methode zur Verbesserung des Überlebens von HCC-PatientInnen darstellen, da CSC möglicherweise von konventionellen Chemotherapien nicht erfasst werden (Ji & Wang, 2012).

### 1.2.4 Heterogenität des HCCs und häufige Mutationen

Das HCC zeigt eine große Heterogenität, sowohl in Anbetracht der verschiedenen Risikofaktoren als auch wegen seines biologischen Verhaltens und des Therapieansprechens.

Die Existenz von Tumorstammzellen im HCC kann möglicherweise einen Teil der Heterogenität, Metastasierung und des Wiederauftretens nach Resektion erklären (Ji & Wang, 2012).

In einer Studie von Friemel et al. wurde eine intratumorale Heterogenität in 87 % der HCC-Fälle beschrieben. Die intratumorale Heterogenität im Hinblick auf die Morphologie war assoziiert mit einem größeren Tumor und fortgeschrittenerem Tumorstadium. Hinsichtlich *TP53*- und *CTNNB1*-Mutationen wurde ein heterogener Mutationsstatus bei 22 % der HCCs gefunden. Diese Ergebnisse deuten auf eine hohe genetische Instabilität im HCC hin (Friemel et al., 2015). Auch in einer weiteren Studie wurde eine größenabhängige intratumorale Heterogenität im HCC beschrieben. Diese Heterogenität war sehr variabel innerhalb der PatientInnen und hatte große Auswirkungen auf die Therapie, da verschiedene Subpopulationen innerhalb eines Tumors unterschiedlich sensitiv auf Medikamente reagieren können. Die Heterogenität des HCCs ist somit eine wichtige Herausforderung für die Klassifikation und kann wahrscheinlich zu Therapieversagen und Medikamentenresistenz beitragen (Castelli et al., 2017).

Es wurden elf Signalwege identifiziert, die in mehr als 5 % der HCCs verändert sind. Dazu zählen TERT-Promoter Mutationen, die die Telomerase-Expression aktivieren, Mutationen in Wnt/ $\beta$ -Catenin-, PI3K/AKT/mTOR-, TP53- und MAP-Kinase-Signalwegen, in Genen, die für die hepatische Differenzierung, die epigenetische Regulation und das Chromatinremodeling von Bedeutung sind, sowie Veränderungen in Signalproteinen der oxidativen Stressresponse und im IL-6/JAK/STAT- und TGF- $\beta$ -Signalweg (Schulze et al., 2015).

Ein weiterer Signalweg, der im HCC verändert sein kann, ist der Hippo-Signalweg mit seinem nukleären Effektorprotein Yes Associated Protein (YAP) (Hong et al., 2015). In einer Studie zeigen über 50 % der untersuchten HCCs erhöhte nukleäre YAP-Proteinlevel. Im Gegensatz zu dieser häufigen Überexpression ist die Amplifikation des *YAP*-Genlocus auf dem Chromosom 11q22 mit 5-15 % relativ selten. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die erhöhten YAP-Proteinlevel aufgrund einer Dysregulation von YAP-Regulatoren wie dem Hippo-Signalweg entstehen (Zhao et al., 2007). Überraschenderweise gibt es wenig dokumentierte genetische Mutationen der Hauptkomponenten des Hippo-Signalwegs. Das kann durch zwei Gründe erklärt werden. Zum einen hat der Hippo-Signalweg redundante negative Regulatoren, sodass mehrere Mutationen benötigt werden, um den Signalweg zu inaktivieren. Außerdem wurden andere Mechanismen der Signalwegsalteration festgestellt, wie beispielsweise Veränderungen der Kopienzahl, Translokationen und epigenetische Veränderungen. Auch kann eine YAP-Aktivierung durch andere wachstumsregulierende Signalwege entstehen (Barron & Kagey, 2014).

### 1.3 Der Hippo-Signalweg in der hepatischen Karzinogenese

#### 1.3.1 Der Hippo-Signalweg: Komponenten und Funktion

Erste Bestandteile des Hippo-Signalwegs wurden bereits ab 1995 in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt. Im Jahr 2003 konnten dann die relevanten Hauptkomponenten des Signalwegs identifiziert werden (Wantae Kim & Jho, 2018; J. R. Misra & Irvine, 2018). Die Komponenten der Hippo-Signalkaskade sind konserviert in Säugetieren. Das Protein YAP wurde als nukleärer Effektor des Hippo-Signalwegs bei Säugetieren identifiziert (Dong et al., 2007).

Im Folgenden wird zum Großteil nur die Terminologie des Signalwegs der Säugetiere genutzt und auch nur auf die Vorgänge dort eingegangen (s. Abb. 1).

Der Hippo-Signalweg besteht aus vorgeschalteten regulatorischen Elementen, den Kernkomponenten MST und LATS und den nachgeschalteten Effektormolekülen YAP und TAZ (Liu et al., 2018). Im Signalweg phosphoryliert die MST1/2-Kinase mit der Hilfe des Adaptorproteins Salvador (Sav) (Cleary et al., 2013) die beiden LATS-Kinasen LATS1 und LATS2, was wiederum zu deren Aktivierung und zur Phosphorylierung und Inaktivierung von YAP bzw. TAZ führt. YAP und TAZ binden verschiedene Transkriptionsfaktoren und regulieren dadurch deren Aktivität. Erhöhte Level von LATS1/2 und MST1/2 und die damit verbundene Inaktivierung von YAP führen zu einem Zellzyklusarrest und zur Apoptose (Saucedo & Edgar, 2007). Die YAP-Phosphorylierung durch LATS fördert die zytoplasmatische Retention und Degradierung von YAP, was in einer Hemmung der Zellbeweglichkeit, Proliferation und Onkogenese resultiert (Guo, Wang, & Liang, 2015).

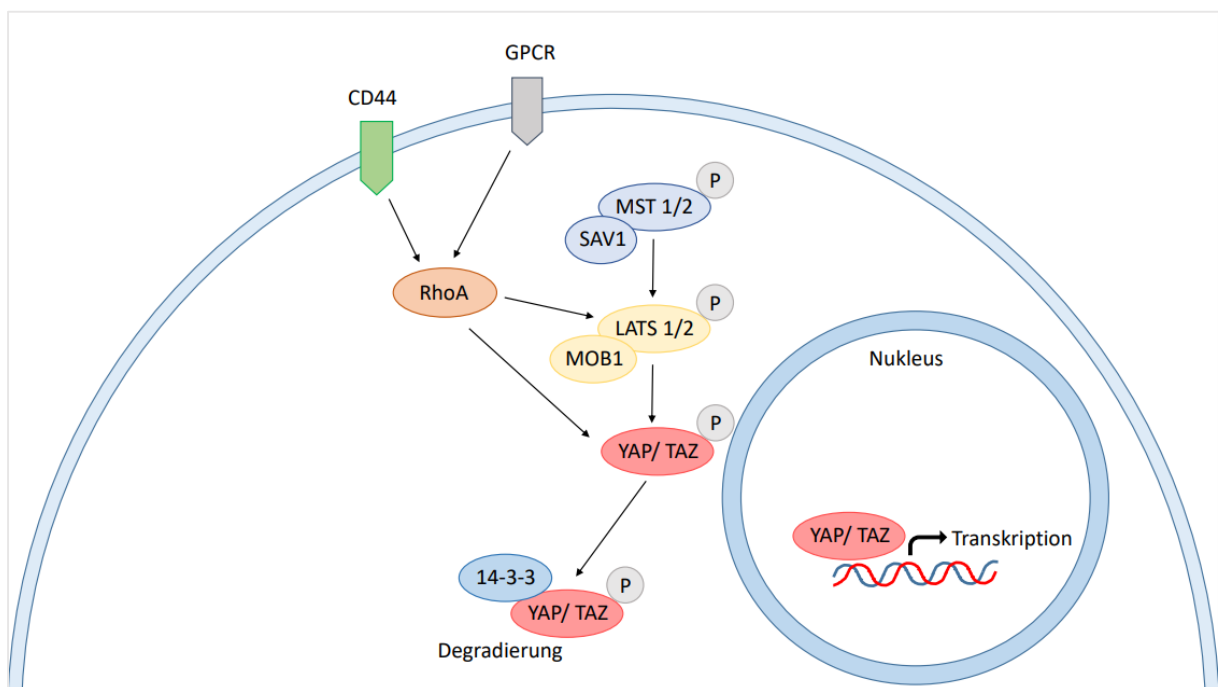


Abbildung 1: Die Kernkomponenten des Hippo-Signalwegs, angelehnt an (F. X. Yu & Guan, 2013)



Der Hippo-Signalweg hat zwei physiologische Funktionen. Zum einen die Koordination des Übergangs von Zellproliferation zu einem Ruhezustand der Zellen und zum anderen die Aufrechterhaltung einer zellulären Differenzierung. Die physiologische Funktion des Hippo-Signalwegs in der Organgrößenregulation bei Säugetieren wurde durch transgene und *Knock-out*-Mäuse aufgezeigt. Eine Überexpression von aktiviertem YAP oder ein *Knock-out* von *Mst1/2* oder *Sav1* führten zu einer Vergrößerung der Leber und schließlich zur HCC-Entwicklung (Pan, 2010; Zhou et al., 2009). Der Hippo-Signalweg wird in der Leber sowohl für die Aufrechterhaltung der Hepatozytendifferenzierung als auch für die Unterdrückung der Aktivierung von sogenannten Ovalzellen benötigt, deren Expansion häufig mit Lebervergrößerung und Tumorbildung assoziiert ist. Entscheidend für die Leberregeneration ist eine Inaktivierung des Hippo-Signalwegs und eine vermehrte Expression und Aktivität von YAP. Nach einer partiellen Hepatektomie (PH) steigen innerhalb von 24 Stunden die Expressionslevel und die Aktivität von YAP an, bevor die Hepatozyten mit ihrer Proliferation beginnen. Die MST- und LATS-Aktivität ist am Tag nach der PH vermindert, aber normalisiert sich bei Wiederherstellung der ursprünglichen Lebergröße wieder, sodass eine überschießende Proliferation und Tumorentstehung verhindert wird (Hong et al., 2015).

Der Hippo-Signalweg hat eine tumorsuppressive Funktion. Eine Dysregulation des Hippo-Signalwegs findet sich in einer Vielzahl von humanen Malignomen und korreliert mit einer schlechten Prognose (W. Kim et al., 2017; Saucedo & Edgar, 2007). Mäuse mit hepatischer Inaktivierung des Hippo-Signalweges zeigen verschiedene Grade der Hepatozytenproliferation und eine Expansion von Ovalzellen in der Region der portalen Trias, die möglicherweise die Ursprungszellen für die HCC- und CCC-Entstehung in diesem Modell sein können (Manmadhan & Ehmer, 2019). In der Leber von *Mst1/2*-mutierten Mäusen entwickelt sich innerhalb von vier Monaten ohne chemische Induktion ein HCC. Es ist außergewöhnlich, dass sich das HCC in *Mst1/2-Knock-out*-Mäusen so schnell ohne den Einfluss von Umweltfaktoren entwickelt. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass ein Verlust von MST1/2 und die Hochregulation der YAP-Aktivität entscheidend sind für die Tumorentstehung (W. Kim et al., 2017). Auch eine Dysregulation der LATS-Expression trägt zu Beginn und Progression verschiedener maligner Tumoren bei. Die Herunterregulation von LATS und erhöhte Expression von YAP wurden im humanen HCC beobachtet. Dabei steigerte eine Inhibition von LATS die Interaktion von YAP und TEAD-Transkriptionsfaktoren (Guo et al., 2015). Insgesamt zeigen etwa 30 % der humanen HCCs eine geringe YAP-Phosphorylierung der inhibitorischen Regulationsseite Ser127 und ein Großteil der HCCs zeigt einen Verlust von aktiviertem MST1 (Zhou et al., 2009).

Der Hippo-Signalweg wird durch zahlreiche unterschiedliche extrazelluläre Signalpeptide und Rezeptoren reguliert, insbesondere spielt aber ein Netzwerk von Zellmembrankomponenten und anderen Mechanismen eine Rolle, von denen viele auch in die Regulation von

Zelladhäsion und Polarität involviert sind (Johnson & Halder, 2014; F. X. Yu & Guan, 2013). Mehrere metabolische Regulatoren, Hormone und Wachstumsfaktoren agieren als extrazelluläre Signale durch verschiedene Klassen von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), die wiederum die YAP/TAZ-Aktivität induzieren oder unterdrücken können (Totaro, Panciera, & Piccolo, 2018). Studien an *Drosophila* haben außerdem die zwei membranassoziierten Proteine Merlin (Mer) und Expanded (Ex) dem Signalweg zugeschrieben (Schulze et al., 2015). Beide Proteine enthalten FERM-Domänen, die mit dem Zytoskelett und Membranproteinen interagieren, womit Mer und Ex wahrscheinlich Signale von der Membran übermitteln können. Beide haben überlappende Funktionen und unterdrücken das Zellwachstum (Saucedo & Edgar, 2007). Auch für diese regulatorischen Elemente bestehen homologe Proteine bei Säugetieren. Der am besten charakterisierte Regulator in Säugetieren ist NF2/Mer (Pan, 2010). *NF2* kodiert für das Merlin-Tumorsuppressorprotein, das über eine Modulation der LATS-Kinaseaktivität den Hippo-Signalweg reguliert. Wie bereits erwähnt, sind Mutationen von Hippo-Signalwegskomponenten selten, eine Ausnahme davon ist *NF2* (Johnson & Halder, 2014). *NF2* bildet einen Komplex mit LATS1/2 an der Plasmamembran und verbessert dadurch die Phosphorylierung von LATS durch MST (Patel, Camargo, & Yimlamai, 2017). Damit führt eine Merlin-Expression zu einer zytoplasmatischen Translokation von YAP und zur Unterbrechung der Transkription im Nukleus (Zhao et al., 2007). *NF2* spielt außerdem eine wichtige Rolle in der Kontaktinhibition, die durch Zelloberflächenrezeptoren wie CD44 oder Adherens-Junctions vermittelt wird (Pan, 2010).

### 1.3.2 YAP als Effektor des Hippo-Signalwegs

Das *YAP*- oder *YAP1*-Gen ist auf dem humanen Chromosom 11q22 lokalisiert. *YAP* hat eine molekulare Masse von 65 kDa. Das Protein besteht aus 488 Aminosäuren und besitzt eine Bindungsregion für TEAD, zwei WW-Domänen, ein SH3-Bindungsmotiv, eine Transkriptionsaktivierungsdomäne und eine C-terminales PDZ-Bindungsmotiv. Die WW-Domänen interagieren mit PPXY-Motiven von verschiedenen Transkriptionsfaktoren (Liu et al., 2018). *YAP* und *TAZ* sind die nukleären Effektoren des Hippo-Signalwegs. Dabei hat *YAP* eine duale Funktion, indem es Zellproliferation fördert und Apoptose unterdrückt (Dong et al., 2007; Overholtzer et al., 2006).

Die Funktionen von *YAP* werden durch multiple posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Acetylierung und Methylierung moduliert (Guo et al., 2015). Die Phosphorylierungsstellen regulieren die Position und Aktivität von *YAP* in der Zelle. Die am besten erforschte Serin-Phosphorylierungsstelle ist Ser127. Wenn *YAP* an dieser Aminosäure phosphoryliert wird, bindet es an das Gerüstmolekül 14-3-3 und wird schließlich zum Proteasom zur Degradierung transportiert (Patel et al., 2017). Der Hippo-Signalweg

antagonisiert damit die nukleäre YAP-Funktion durch eine Phosphorylierung an Ser127 durch LATS und fördert die zytoplasmatische Lokalisation (Dong et al., 2007). Der Transkriptionskoaktivator TAZ ist in seiner Sequenz 45 % homolog zu YAP. Auch TAZ wird negativ reguliert durch MST, aber im HCC sind die Level niedrig (Zhou et al., 2009). YAP und TAZ haben redundante Rollen in der Leber und binden an die gleichen genomischen Zielstrukturen (Patel et al., 2017).

YAP/TAZ enthalten keine intrinsische DNA-Bindungsdomäne, aber binden durch die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren an die Promoter der Zielgene (F. X. Yu & Guan, 2013). In proliferierenden Zellen bildet YAP ein Heterodimer mit TEAD-Transkriptionsfaktoren im Nukleus und initiiert damit die promitotische Genexpression (H. Li et al., 2012). Die TEAD-Transkriptionsfaktoren sind die primären Bindungspartner von YAP. Diese sind assoziiert mit anti-apoptotischen, pro-proliferativen und Stammzell-Genprogrammen. Neben den TEAD-Proteinen kann YAP aber auch andere Transkriptionsfaktoren wie p73, PEBP2a und ErbB4 binden (Yimlamai, Fowl, & Camargo, 2015). TEAD-Transkriptionsfaktoren haben nur eine minimale transkriptionelle Aktivität und brauchen Koaktivatoren wie YAP, um die Expression von Zielgenen zu induzieren. Die Interaktion mit TEAD wird wiederum benötigt für die nukleäre Retention von YAP. Die Zielgene wie *CTGF*, *JAG1* und *NOTCH2* sind involviert in Zellwachstum, Proliferation und Homöostase und damit auch wichtig für die Leberregeneration (Huh, Kim, Jeong, & Park, 2019; Patel et al., 2017; Zhao et al., 2008).

Es gibt vielfältige YAP/TAZ-Regulationsmechanismen unabhängig von der klassischen MST-LATS-Kaskade, wie Mechanotransduktion, Rho-GTPasen, Inflammation und Metabolismus (Totaro et al., 2018). YAP und TAZ werden unter anderem durch mechanische Signale wie EZM-Steifheit, Zellform und Zytoskelettspannung reguliert (Zanconato, Cordenosi, & Piccolo, 2016). Durch die enge Assoziation mit dem Aktinzytoskelett kann YAP Änderungen der Zellspannung erfassen (Yimlamai et al., 2015). Angiomotin-Proteine agieren als mechanische Mediatoren zwischen F-Aktin-Strukturen und YAP/TAZ (Totaro et al., 2018). In Zellen, die durch eine steife EZM gedehnt werden, translozieren YAP/TAZ in den Nukleus und steigern die transkriptionelle Aktivität. Diese Regulation ist abhängig von Rho-GTPasen und der Spannung des Zytoskeletts. Die Aktivierung von YAP/TAZ durch eine steife EZM in fibrotischen Geweben kann die Proliferation und das Überleben von Tumorzellen fördern. Auch andere extrinsische Signale wie oxidativer Stress und Hypoxie steigern die YAP/TAZ-Aktivität und fördern die Tumorentstehung (Noguchi et al., 2018). Des Weiteren reguliert der Zelldichtestatus die YAP-Lokalisation in der Zelle. Bei geringer Zelldichte ist YAP vor allem im Nukleus lokalisiert, bei hoher Dichte transloziert YAP in das Zytoplasma (Zhao et al., 2007). Der Zell-Zell-Kontakt von Säugetierzellen in Kultur induziert die Phosphorylierung und Inaktivierung von YAP, während eine Überexpression von YAP oder Inaktivierung von

LATS/NF2 die Kontaktinhibition umgeht (Zhou et al., 2009). Eine epitheliale Architektur mit Zell-Zell Verbindungen und apikal-basaler Polarität ist damit ein starker YAP-Inhibitor (Totaro et al., 2018).

YAP und TAZ werden für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz von embryonalen Stammzellen benötigt. Damit spielt YAP eine wichtige Rolle in der frühen Embryonalentwicklung. Das wird bestätigt durch die Beobachtung, dass bei Mäusen ein systemisches Ausschalten von YAP letal ist und der Embryo die Entwicklung an Tag 8,5 anhält (F. X. Yu & Guan, 2013). In der Leber besitzen Gallengangszellen die höchsten YAP-Proteinlevel. Die YAP-Aktivität ist entscheidend für die normale Gallengangsentwicklung. Leberspezifische *YAP-Knock-out*-Mäuse werden mit hypoplastischen Gallengängen geboren. Diese Mäuse entwickeln eine Hepatitis und Fibrose aufgrund cholestatischer Leberschäden durch das unreife Gallengangssystem (Yimlamai et al., 2015). YAP wird außerdem benötigt für die Homöostase der Leber. Ein Verlust von YAP in der Leber resultiert in Defekten im Überleben der Hepatozyten (N. Zhang et al., 2010). Eine Geweberegeneration involviert oft die Aktivierung von Stammzellen und eine Progenitorzellexpansion. YAP und TAZ regulieren diese Balance zwischen Stammzellen und differenzierten Zellen. Generell ist die YAP/TAZ-Aktivität verbunden mit Stamm- und Progenitorzellexpansion und Inhibition von Differenzierung. Ob dies auch für die Leber zutrifft, ist noch nicht abschließend geklärt (Johnson & Halder, 2014). YAP ist auch ein wichtiger Regulator der Aktivierung von hepatischen Sternzellen (HSC) und deren Differenzierung zu Myofibroblasten (Noguchi et al., 2018). Damit kann eine YAP/TAZ-Aktivierung in der Leber über eine Aktivierung der HSC als Antwort auf einen chronischen Leberschaden die hepatische Fibrose fördern. Aktiviertes YAP/TAZ steigert die EZM-Ablagerung und damit die Gewebesteifheit, was den Fibroseprozess begünstigt (Moon et al., 2019). Zusätzlich kann YAP direkt die Expression der Glutaminsynthase steigern. Das bewirkt einen Anstieg der Nukleotidbiosynthese, wodurch ein Nukleotidpool für das YAP-vermittelte Wachstum bereitgestellt wird (Patel et al., 2017).

Es sind zwei verschiedene Dysregulationsmechanismen von YAP bei malignen Tumoren beschrieben. Zum einen kann YAP nukleär akkumulieren durch eine Inaktivierung des Hippo-Signalwegs, Mutationen der Phosphorylierungsstelle und durch eine Störung des nukleär-zytoplasmatischen Transports. Zum anderen kann es durch Genamplifikation, erhöhte Transkription oder Proteinstabilisierung zu einer Überexpression von YAP ohne nukleäre Akkumulation kommen. Die Überexpression von aktiviertem YAP führt zu Organomegalie gefolgt von Tumorformation. Eine Überexpression kommt in einer Vielzahl humaner Tumorzellen und primärer Tumoren vor (Dong et al., 2007; Pan, 2010).

Die Transformation von normalen in maligne Zellen durch eine YAP/TAZ-Deregulation umfasst neben einer verbesserten Zellproliferation und einem verbesserten Zellüberleben den Erwerb

eines Malignom-Phänotyps mit Expression von Stammzellmarkern, EMT, Medikamentenresistenz und Inhibition von Seneszenzprogrammen (Han et al., 2014; Johnson & Halder, 2014). Die YAP-Überexpression ist ein frühes Ereignis in der humanen Lebertumorentstehung und ist entscheidend für die klonale Expansion von Hepatozyten und möglicherweise auch Ovalzellen (Perra et al., 2014; S. Zhang & Zhou, 2019).

Hepatozyten, die hohe YAP-Level exprimieren, dedifferenzieren und erwerben Eigenschaften von hepatischen Progenitorzellen (Patel et al., 2017). Die Level des YAP-Proteins und der mRNA sind in der Mehrheit der HCC-Gewebe erhöht verglichen mit nicht-tumörösem Gewebe (Han et al., 2014). Weiterhin spielt die YAP-Überexpression eine wichtige Rolle für die Doxorubicinresistenz im HCC. So resultiert eine Überexpression von YAP in einer Resistenz gegen Doxorubicin-induzierte Apoptose in HCC-Zelllinien, während die Suppression der YAP-Expression den gegenteiligen Effekt bewirkt und die Sensitivität für Doxorubicin steigert (Huo et al., 2013). Auch auf das Tumormikromilieu hat YAP eine Wirkung. Die Aktivierung von YAP in *Mst1/2-Knock-out*-Lebern erhöht die Produktion proinflammatorischer Zytokine, was die Akkumulation von Tumor-assoziierten Makrophagen triggert und die Immunantwort gegen veränderte Hepatozyten unterdrückt (S. Zhang & Zhou, 2019).

## 1.4 CD44

CD44 ist ein transmembranäres Glykoprotein mit zahlreichen verschiedenen Funktionen. Das humane *CD44*-Gen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 enthält 20 Exons, die für verschiedene Spleißvarianten genutzt werden (Borland, Ross, & Guy, 1998). Die CD44-Standardform CD44s wird kodiert durch die konstanten Exons 1-5 und 16-20 und hat eine molekulare Masse von 80-85 kDa. Alternatives Spleißen ist die Grundlage für die strukturelle und funktionelle Vielfalt des Proteins. Die multiplen unterschiedlichen CD44v-Isoformen entstehen durch eine Insertion der variablen Exons 6-15 an der extrazellulären Region. CD44s ist auf den meisten Zellen exprimiert, während CD44v-Isoformen hauptsächlich während Inflammationsprozessen oder auf Tumorzellen exprimiert werden (H. Xu et al., 2015). Die variablen Isoformen aus den zehn konstanten Exons und einer Kombination der neun variablen Exons haben zusätzliche Bindestellen, die die Interaktion von CD44 mit der Mikroumgebung fördern (C. Chen, Zhao, Karnad, & Freeman, 2018). Das CD44-Protein besteht aus drei funktionellen Domänen: einer extrazellulären Domäne, einer transmembranären und einer intrazellulären Domäne. Die ersten fünf Exons kodieren für einen Teil des Proteins mit einer Ligandenbindungsstelle, hauptsächlich für Hyaluronsäure (HA). Andere Liganden sind u.a. die EZM-Komponenten Kollagen, Osteopontin, Integrin, Fibronectin, Laminin und Matrixmetalloproteasen (Yan, Zuo, & Wei, 2015). Des Weiteren kann CD44 auch Transmembrankomplexe mit Molekülen wie EGFR, ERBB2 und VEGFR bilden (Birzele et al., 2015).

Die extrazelluläre Domäne ist die variabelste Region des CD44-Moleküls, wodurch die Affinität und Bindung beeinflusst wird. Die Inklusion der variablen Exons ist zum Teil auch abhängig von mitogenen oder onkogenen Signalen, die das alternative Spleißen regulieren (Yan et al., 2015). Die CD44-Ektodomäne kann mit Chondroitinsulfat oder Heparansulfat versehen werden, wodurch CD44 Wachstumsfaktoren wie FGF, VEGF oder HGF binden kann. Der kurze zytoplasmatische Teil von CD44 bindet Ankyrin, ERM-Proteine und Merlin (S. Misra et al., 2011). Zusätzlich kann die intrazelluläre Domäne auch direkt der Signaltransduktion dienen, indem sie von der Membran abgespalten wird, in den Nukleus transloziert und dort als Transkriptionsfaktor die Genexpression reguliert (Birzele et al., 2015; Yan et al., 2015). Die transmembranäre Region unterstützt die CD44-Oligomerisierung und Assoziation mit extrazellulären Liganden und transmembranären sowie zytoplasmatischen Molekülen (Z. Wang et al., 2018).

Die Fähigkeit, Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) zu binden, ist eine wichtige Funktion von CD44. Hyaluronsäure, ein Glykosaminoglykan, ist eine Hauptkomponente der EZM in vielen Geweben und ein wichtiger Ligand von CD44 (Borland et al., 1998). Die Signaltransduktion von CD44 kann über zwei verschiedene Mechanismen funktionieren. HA-unabhängige Signaltransduktion beruht auf einer Interaktion der intrazellulären Domäne von

CD44 mit Zytoskelettproteinen oder Membran-assoziierten Kinasen. Die Assoziation wird häufig reguliert durch die Interaktion mit ERM-Proteinen, die die Verbindung mit dem Zytoskelett einleiten. Die HA-abhängige Signalvermittlung funktioniert über zwei CD44-Moleküle, die sich vernetzen und damit wiederum anderen CD44-assoziierten Molekülen erlauben, sich zu vernetzen (C. Chen et al., 2018; Jordan, Racine, Hennig, & Lokeshwar, 2015).

CD44 spielt eine entscheidende Rolle bei zellulärem Verhalten wie Adhäsion, Migration, Invasion und Überleben (Cichy & Pure, 2003). Als Zelloberflächenrezeptor, der Zell-Zell- und Zell-EZM-Interaktionen vermittelt, ist CD44 wichtig für die physikalische und funktionelle Interaktion zwischen Tumorzellen und deren Mikromilieu (Y. Xu, Stamenkovic, & Yu, 2010).

Mehrere Studien haben gezeigt, dass CD44 in vielen Tumorzellen sowie in normalen und Krebsstammzellen hoch exprimiert ist (Fan et al., 2018; Y. Zhang et al., 2014). CD44 hat vermutlich eine wichtige Bedeutung bei der adaptiven Plastizität von Krebszellen und damit auch bei epithelial-mesenchymaler bzw. mesenchymal-epithelialer Transition (EMT und MET). Ein dynamischer Wechsel von CD44-Isoformen könnte durch die Regulation von EMT und MET die Tumorformation und Metastasenbildung beeinflussen (C. Chen et al., 2018). CD44 fördert die EMT in mehreren Tumorentitäten wie auch in Lebermalignomen durch eine Hochregulation von mesenchymalen Markern und Herunterregulation epithelialer Marker (H. Xu et al., 2015). Inflammation und Tumore sind oft assoziiert mit proteolytischer Spaltung von CD44, was in einem löslichen extrazellulären CD44-Teil resultiert, der Zellmigration reguliert und einem intrazellulären Teil, der in den Zellkern transloziert und dort die Transkription verschiedener Gene fördert, einschließlich des *CD44*-Gens selbst (Nikitovic, Tzardi, Berdiaki, Tsatsakis, & Tzanakakis, 2015).

In der Leber ist die CD44-Expression unter normalen Bedingungen auf Zellen myeloiden Ursprungs beschränkt, wie Kupferzellen und Lymphozyten. Hepatozyten exprimieren normalerweise kein CD44, aber während der malignen Transformation in HCC-Progenitorzellen wird CD44 hochreguliert und fungiert als CSC-Marker (Dhar et al., 2018). CD44 spielt eine entscheidende Rolle in der Tumorentstehung und ermöglicht der Signaltransduktion, sich über einen Proliferationsstopp bei DNA-Schädigungen hinwegzusetzen. Dadurch wird die Balance in Richtung Überleben und Proliferation verschoben (Dhar et al., 2018). CD44 ist assoziiert mit Tumorzellinvasion und Migration und die Expression ist verbunden mit vermehrtem Auftreten extrahepatischer Metastasen und verkürztem Überleben (Ji & Wang, 2012). Auch eine Assoziation von CD44 mit einer erhöhten Rate vaskulärer Invasion, einem schlechteren histologischen Grading und mit dem Alter der PatientInnen wurden berichtet (Fan et al., 2018). Damit deutet viel darauf hin, dass CD44 als prognostischer Faktor im HCC genutzt werden kann. Auch in anderen Tumorentitäten kann

CD44 einen prognostischen Faktor für TumorpatientInnen darstellen (H. Xu, Niu, Yuan, Wu, & Liu, 2020).

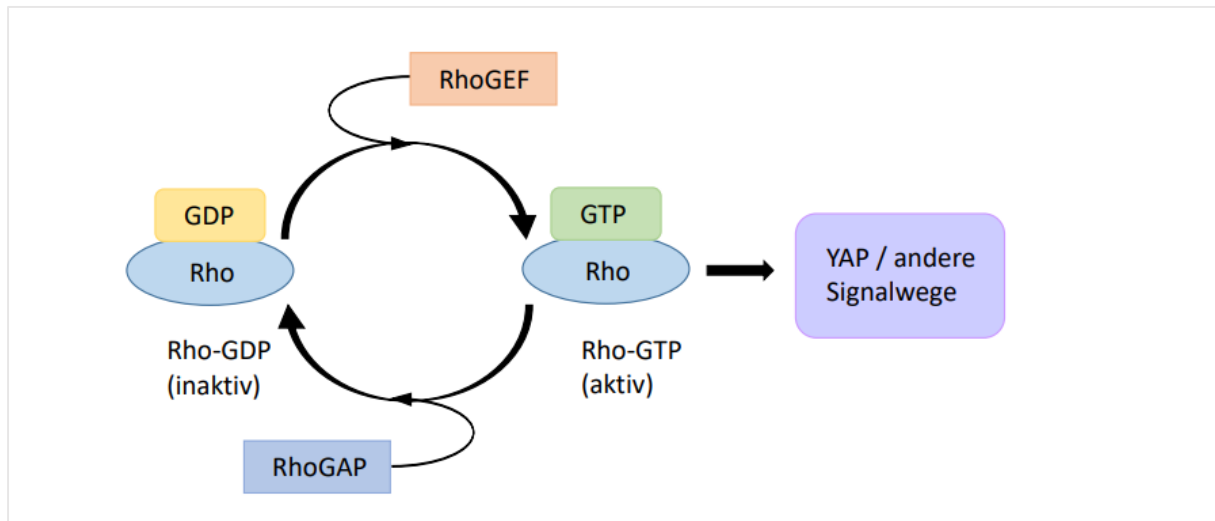
CD44 kann durch eine Inhibition der YAP-Phosphorylierung YAP aktivieren und somit entgegengesetzt zum Hippo-Signalweg wirken (S. Yu et al., 2015). Durch diese positive Regulation des YAP-Proteinlevels kann CD44 die HCC-Progression fördern (J. Zhang et al., 2021). Die Wirkung auf den Hippo-Signalweg übt CD44 unter anderem durch die Interaktion mit Merlin, einem ERM-verwandten tumorsuppressiven Protein aus (Morrison et al., 2001). CD44 reguliert die Merlin-Phosphorylierung je nach Zelldichte und fördert die Expression von YAP (Fan et al., 2018; Morrison et al., 2001). Wenn CD44 durch die HA-Bindung aktiviert wird, wird Merlin phosphoryliert und dissoziiert von CD44. Nach der Dissoziation reguliert CD44 die YAP-Expression möglicherweise über RhoA, was eine erhöhte Apoptoseresistenz zur Folge hat (Z. Wang et al., 2018).

Die CD44-Expression korreliert in HCC-Gewebeproben positiv mit der YAP-Expression und beide Proteine sind assoziiert mit einem jüngeren Alter zum Diagnosezeitpunkt und einem schlechten pathologischen Grading (Fan et al., 2018). Ein *Knock-down* von *CD44* mittels siRNA führt zu einer signifikanten Abnahme der YAP-Expression ohne Änderung der Expression von MST1, LATS1 und P-LATS1 in HepG2-Zellen. Der *CD44-Knock-down* fördert die Apoptose und inhibiert Proliferation und Zellzyklusprogression. Außerdem werden die mRNA-Transkriptionslevel von den bekanntesten YAP-Zielgenen *CTGF* und *CYR61* reduziert (Y. Zhang et al., 2014). Das Ausschalten von *CD44* resultiert aber nicht nur in niedrigerem YAP-Gesamtprotein, sondern auch in einer Zunahme von Phospho-YAP im Verhältnis zu Gesamt-YAP und in zytoplasmatischer Translokation von YAP bei hoher Zelldichte (S. Yu et al., 2015).



## 1.5 RhoA

Die Familie der Rho-GTPasen sind wichtige intrazelluläre Signalmoleküle, die unter anderem die Zytoskelettorganisation, Genexpression, Zellzyklusprogression und Zellbeweglichkeit regulieren. Die Proteine wechseln zwischen der GTP-gebundenen aktiven und GDP-gebundenen inaktiven Form (s. Abb. 2). Viele regulatorische Elemente nehmen Einfluss darauf über GEFs. Diese aktivieren die Rho-Proteine durch die Freisetzung von GDP, wodurch GTP binden kann. GAPs inaktivieren Rho-GTPasen über die Stimulation der Hydrolyse von GTP (Shang et al., 2012).



**Abbildung 2: Regulation von Rho-GTPase-Proteinen, angelehnt an (Porter, Papaioannou, & Malliri, 2016)**

Rho-GTPasen spielen eine Schlüsselrolle in der Integration von mechanischen Signalen in nachgeschaltete intrazelluläre Signale. Sie binden an viele Effektorproteine und spielen eine zentrale Rolle in der Regulation des Zytoskeletts und der Genexpression. Dadurch beeinflussen Rho-Proteine Zellfunktionen wie Adhäsion, Polarität, Invasion, Zellzyklusprogression und Überleben (Sadok & Marshall, 2014). Die Aktivierung von Rho-GTPasen induziert die Phosphorylierung der ROCK-Kinase, die als Regulator und Aktivator für ERK1/2, NFκB, AKT und YAP wirkt (Tsubaki et al., 2021).

Zwar sind Rho-GTPasen in vielen Tumorentitäten überexprimiert oder überaktiviert, aber somatische Mutationen von RhoA sind selten. Das weist den regulatorischen Mechanismen von Rho-GTPasen eine besondere Rolle zu (Lin & Zheng, 2015). Rho-Proteine beeinflussen die Karzinogenese durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und Regulation von Genen, die die Zellzyklusprogression beeinflussen, Zellproliferation erhöhen und Apoptose reduzieren. Zusätzlich zur Förderung der Karzinogenese tragen veränderte Rho-GTPasen auch durch eine Regulation von Zelladhäsion, Motilität, Metastasierung und Angiogenese zur Krankheitsprogression bei (Smithers & Overduin, 2016).

Ras homolog gene family member A (RhoA) ist ein kleines GTPase-Protein der Rho-Familie. RhoA ist involviert in die Aktinorganisation, Myosinkontraktilität, Zellzyklus-Aufrechterhaltung, zelluläre Polarisation und transkriptionelle Kontrolle (Bai et al., 2019). RhoA ist ein Onkogen, das durch die Verstärkung von Zellproliferation, Angiogenese, Invasion und Metastasierung die Tumorprogression induziert (Prieto-Dominguez, Parnell, & Teng, 2019). In der Literatur wurde eine Überexpression von RhoA in verschiedenen Tumoren im Vergleich zu normalem Gewebe gefunden, was oft mit der Tumoraggressivität korrelierte (Orgaz, Herraiz, & Sanz-Moreno, 2014; Porter et al., 2016; Privat et al., 2020). RhoA ist in unterschiedlichen Tumoren überexprimiert wie zum Beispiel beim Mammakarzinom, in Bronchialkarzinomen und im malignen Melanom und korreliert auch mit der Metastasierungsrate (Tsubaki et al., 2021). RhoA ist außerdem assoziiert mit einer Gefäßinvasion, fortgeschrittenem pTNM-Stadium und Progression bei Tumoren (Bai et al., 2019). Des Weiteren spielt RhoA auch eine Rolle in der Metastasierung von HCC-Zellen (Lin & Zheng, 2015). Die mRNA- und Proteinexpression von RhoA ist signifikant höher in HCC-Gewebe als in normalem Lebergewebe. Diese hohe RhoA-Expression ist assoziiert mit einer schlechteren Prognose (Bai et al., 2019). Die hohe Prävalenz einer Rho-GTPase-Überexpression in humanen Tumoren spricht für eine Beteiligung dieser Proteine in der Karzinogenese und Tumorprogression. Auch CD44-assoziierte Zytoskelettproteine und Tumorzell-spezifische Phänotypen sind abhängig von Rho-GTPase-Signalereignissen (Bourguignon, 2008). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass CD44 die YAP-Expression über RhoA reguliert. Eine herunterregulierte CD44-Expression konnte die gesamte RhoA- und RhoGEF-H1-Expression inhibieren, während die RhoGAP-Expression verstärkt wurde. Durch mehrere Studien gab es außerdem Hinweise darauf, dass Rho-GTPasen über das Aktinzytoskelett die LATS-Kinase inhibieren und darüber den Hippo-Signalweg modulieren können. Auch eine Regulation unabhängig von LATS wurde beschrieben (Johnson & Halder, 2014; Y. Zhang et al., 2014).

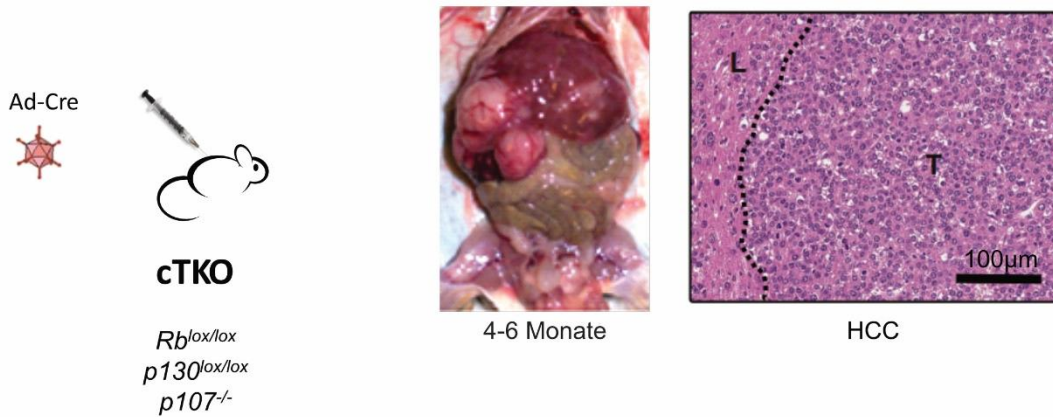
## 1.6 Vordaten der Arbeitsgruppe

Der Retinoblastoma (RB)-Checkpoint ist ein anderer wichtiger Tumorsuppressorsignalweg, der bei DNA-Schäden und Telomerverkürzung die Proliferation hemmt. In über 80 % der HCC-Fälle ist der RB-Signalweg gestört (El-Serag & Rudolph, 2007). Mutationen des *RB*-Gens selbst sind selten, aber der RB-Signalweg ist in humanen HCCs oft schon früh funktionell inaktiviert. Der Verlust der Funktion der *Rb*-Genfamilie in der Mäuseleber führt zu der Expansion einer periportalen Zellpopulation, die Charakteristika von Ovalzellen aufweisen. Innerhalb weniger Monate kommt es zu der Entwicklung von HCCs aus dieser Zellpopulation. Reife Hepatozyten zeigen nur eine transiente DNA-Replikation und keine klonale Expansion. Dieses Ergebnis spricht für die Hypothese, dass HCCs abhängig von den genetischen Veränderungen nicht nur aus Hepatozyten, sondern auch aus Ovalzellen oder einer ihnen ähnlichen periportalen Zellpopulation entstehen können (Holczbauer et al., 2013; Viatour et al., 2011).

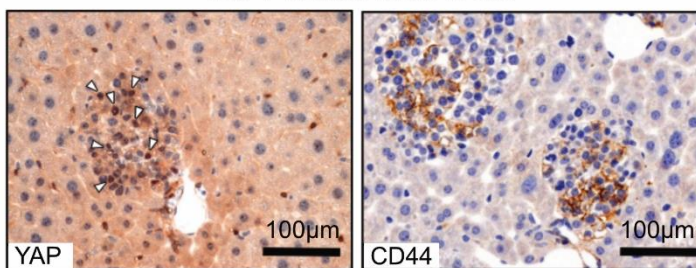
In einem in unserem Labor etablierten HCC-Mausmodell (cTKO: *Rb<sup>lox/lox</sup>*, *p130<sup>lox/lox</sup>*, *p107<sup>-/-</sup>*) werden die drei Gene *Rb*, *p130* und *p107* der *Rb*-Genfamilie inaktiviert, wodurch die Mäuse Lebertumoren entwickeln, die histopathologisch dem humanen HCC entsprechen (Abb. 3A). Mithilfe dieses Modells kann vier Wochen nach Ad-Cre-Injektion eine Proliferation periportalere Zellen der Leber nachgewiesen werden, welche eine starke YAP- und CD44-Expression zeigen (Abb. 3B). Außerdem kann eine positive Korrelation der CD44-Proteinexpression mit der relativen mRNA-Expression YAP-abhängiger Zielgene (*Cyr61*, *Spp1*) in TKO-Tumoren gezeigt werden (Abb. 3C). Eine Korrelation der YAP- und CD44-Expression lässt sich auch in anderen Mausmodellen für das HCC nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Auf Basis dieser Ergebnisse erschien eine weitere Evaluation der Bedeutung einer möglichen CD44/YAP-Signalachse in der HCC-Karzinogenese vielversprechend.

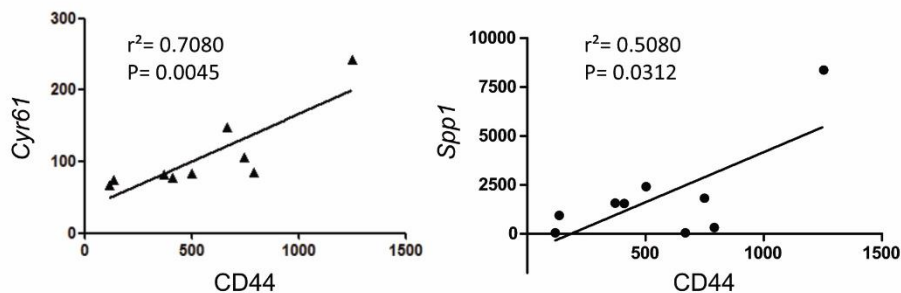
A Leberspezifische *Rb*-Familiendeletion



B TKO 4 Wochen nach Ad-Cre



C Relative mRNA-Expression in TKO-Tumoren



**Abbildung 3: Daten des TKO-Mausmodells**

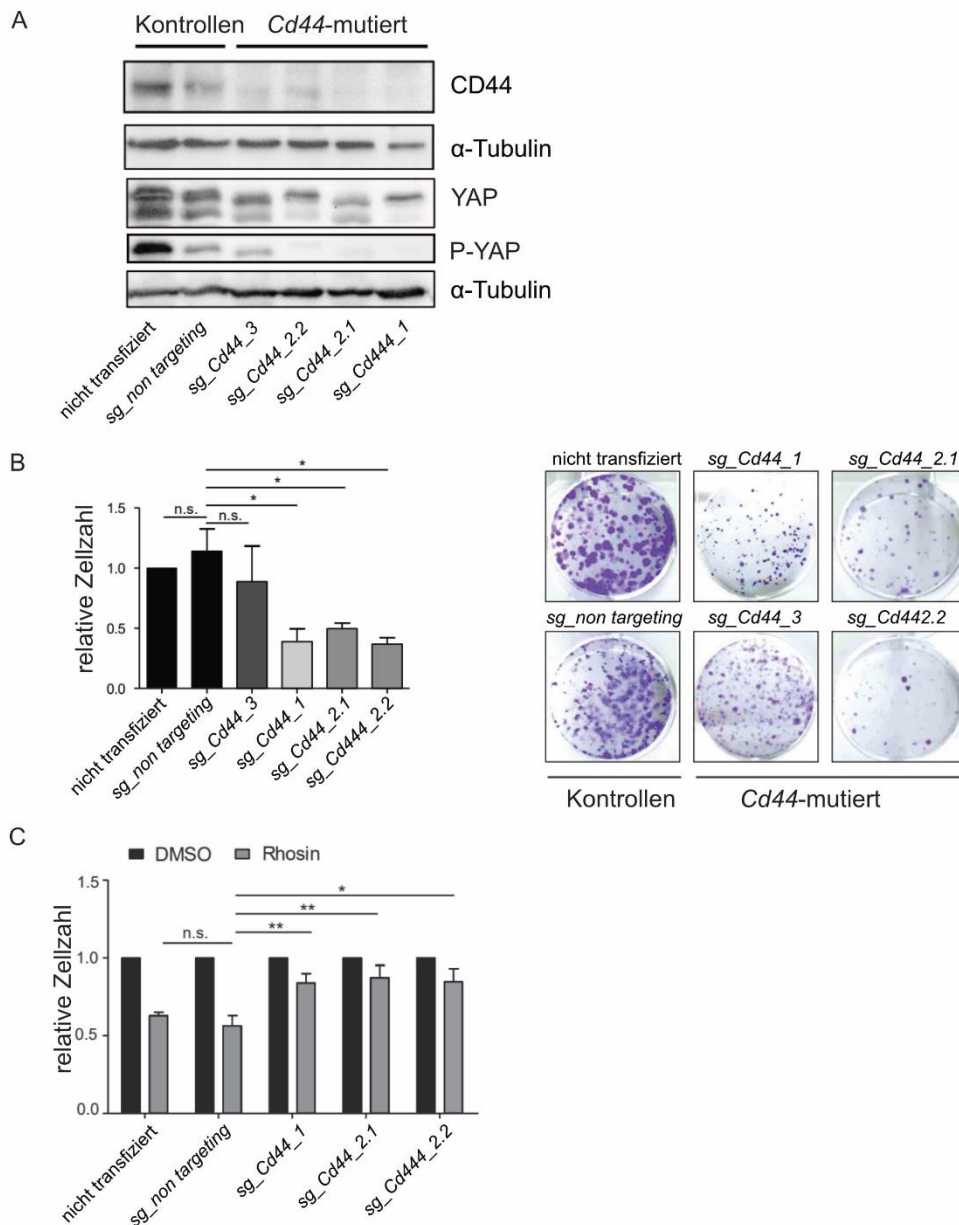
A: Schematische Darstellung der leberspezifischen Deletion der *Rb*-Genfamilie des TKO-Modells.

B: Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen CD44 und YAP von TKO-Lebern vier Wochen nach Ad-Cre-Injektion.

C: Quantifizierung relativer mRNA-Expression von YAP-abhängigen Zielgenen *Cyr61* und *Spp1* abhängig von der CD44-Expression.

Aus HCC-Tumorzellen aus dem cTKO-Mausmodell wurden durch CRISPR/Cas9-vermittelte Genmutation mehrere *Cd44*-mutierte Zelllinien generiert. Auf Proteinebene ließ sich eine verminderte Expression von CD44 nachweisen sowie eine Reduktion der YAP-Expression in der Mehrzahl der mutierten Zelllinien (Abb. 4A). Entsprechend ließ sich in den Zelllinien auch eine verminderte Expression YAP-abhängiger Zielgene nachweisen (Daten nicht gezeigt) sowie eine reduzierte Proliferation (Abb. 4B). Diese Daten zeigten eine CD44-abhängige Reduktion der Proliferation von murinen HCC-Tumorzellen, die mit einer Reduktion der YAP- Aktivität korreliert.

In *Cd44*-mutierten TKO-Zelllinien konnte außerdem eine Reduktion von RhoA nachgewiesen werden. Eine Behandlung von primären und *Cd44*-mutierten TKO-Tumorzellen mit dem RhoA-Inhibitor Rhosin zeigte eine deutliche Reduktion der Proliferation in den Kontroll-Zelllinien, nicht jedoch in *Cd44*-mutierten Tumorzelllinien (Abb. 4C). Insgesamt weisen diese Ergebnisse auf einen relevanten Einfluss von CD44 auf die Proliferation in TKO-Tumorzellen hin, der über eine RhoA-abhängige Aktivierung von onkogenem YAP vermittelt wird.



**Abbildung 4: Daten der CRISPR-Cas9-mutierten TKO-Tumorzelllinien**

A: Proteinnachweis von CD44, YAP und Phospho-YAP mittels Western Blot der *Cd44*-mutierten TKO-Zelllinien (verschiedene sgRNAs *sg\_Cd44\_1*, *2.1*, *2.2* und *3* mit nicht transfizierten Zellen und *sg\_non targeting* als Kontrolle).  $\alpha$ -Tubulin als Ladekontrolle.  
 B: Auswertung des Proliferationsassays von *Cd44*-mutierten TKO-Zellen (verschiedene sgRNAs *sg\_Cd44\_1*, *2.1*, *2.2* und *3*) (\* $p < 0,05$ , n.s.=nicht signifikant,  $n=3$ ) und Ergebnis eines Colony Formation-Assays der *Cd44*-mutierten Zelllinien jeweils mit Vergleich zur Kontrolle.  
 C: Auswertung des Proliferationsassays von *Cd44*-mutierten TKO-Zellen nach Rhosin-Behandlung (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , n.s.=nicht signifikant,  $n=3$ ).



### 3 Materialien

#### 3.1 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Gewebe	Charakteristika
<b>TKO2.1</b>	Murines HCC	Triple <i>Knock-out</i> der <i>Rb</i> -Genfamilie ( <i>Rb</i> , <i>p130</i> , <i>p107</i> ) in der Leber
<b>skHep1</b>	Humanes Adenokarzinom der Leber, endothelialer Ursprung diskutiert	Von einem 52-jährigen männlichen Kaukasier (1971)
<b>HepG2</b>	Humanes Hepatoblastom/ HCC	Von einem 15-jährigen männlichen Kaukasier (1975)
<b>HuH7</b>	Humanes HCC	Von einem 57-jährigen männlichen Japaner mit einem gut differenzierten HCC (etabliert 1982)
<b>PLC/PRF/5</b>	(Alexander) Hepatom-Zellen	Von einem 24-jährigen Afrikaner, exprimiert Oberflächenantigen des Hepatitis B-Virus (1976)
<b>SNU-398</b>	Pleomorphes HCC	Von einer 41-jährigen weiblichen Asiatin, Infektion mit Hepatitis B-Virus (1990)
<b>Mahlavu</b>	Humanes HCC	Von einer weiblichen Südafrikanerin, Infektion mit Hepatitis B-Virus (1982)

Tabelle 2: Verwendete Zelllinien

#### 3.2 Behandlung der Zellen

##### 3.2.1 Antikörperbehandlung

Für die Behandlung der Zellen wurde ein monoklonaler CD44-Antikörper und eine passende IgG-Isotypkontrolle der Firma invitrogen von ThermoFisher eBioscience genutzt. Der IM7-Antikörper reagiert mit allen Isoformen von CD44.

	Host/ Isotype	Speziesreaktivität	Inhaltsstoffe
<b>IM7, Functional Grade</b> #16-0441-82	Ratte/ IgG2b, kappa	Mensch, Maus	Kein Konservierungsmittel, Endotoxin-Level: <0,001 ng/µg, Antikörper-Konzentration: 1 mg/ml

<b>Rat IgG2b kappa Isotype Control</b> (eB149/10H5) #16-4031-81	Ratte/ IgG2b, kappa	Published: Maus, Ratte	Kein Konservierungsmittel, Endotoxin-Level: <0,001 ng/µg, Antikörper-Konzentration: 1 mg/ml
---	------------------------	---------------------------	--

**Tabelle 3: Antikörper zur Behandlung der Zellen**

### 3.2.2 Weitere Behandlung

<b>Doxorubicin, Hydrochloride</b> Cat #324380	Calbiochem GmbH, Bad Soden am Taunus, Deutschland
<b>Rho Inhibitor, Rhosin</b> CAS 1173671-63-0 Target: RhoGEF-Bindungsdomäne	Calbiochem GmbH, Bad Soden am Taunus, Deutschland

**Tabelle 4: Weitere verwendete Therapeutika**

### 3.3 Medien und Antibiotika

Dimethyl Sulfoxide D2438- 50 ml	Sigma Life Science, Deutschland
Gibco DMEM Dulbecco´s Modified Eagle Medium REF 41965-039 500 ml	Life Technologies Limited, Paisley, UK
Gibco DPBS Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline REF 14190-094 500 ml	Life Technologies Limited, Paisley, UK
Gibco Fetal Bovine Serum, Qualified, Heat Inactivated REF 10500-064 500 ml	Life Technologies Limited, Paisley, UK
Gibco Penicillin Streptomycin REF 15140-122 100 ml	Life Technologies Corporation, Grand Island, NY USA
Gibco RPMI 1640 Medium (1X) REF 21875-034 500 ml	Life Technologies Limited, Paisley, UK
Gibco Trypsin-EDTA (0,25 %) REF 25200-056	Life Technologies Limited, Paisley, UK

**Tabelle 5: Medien und Antibiotika für die Zellkultivierung**



### 3.4 Verbrauchsmaterialien

100 Sterican Einmal-Injektions-Kanüle Gr. 18 REF 4657683	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Ethanol 70% Alkopharm 70 Brüggemann	Pharma Aldenhoven GmbH & Co. KG, Deutschland
Aqua B. Braun Ecotainer LOT 183458001	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Countess cell counting chamber slides C10283	Invitrogen, OR, USA
CryoPure Gefäß 1,6 ml weiß REF 72.380	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Demineralisiertes Wasser Art.Nr. DEMW-10000-1	Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland
Immobilon- FL Membrane CAT.NO: IPFL00010, Pore Size: 0,45 µm	Merck Millipore Ltd., Irland
Injekt 10 ml Spritze REF 4606108V	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Latex Powder-Free Examination Gloves	Microtouch, Ansell, Yarra City, Australia
Nitrile, Powder-Free Medical Examination Gloves	Abena, Aabenraa, Dänemark
MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (0,1 ml) REF 4346906	Applied Biosystems by life technologies, USA
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems by life technologies, USA
Multimark 1523 permanent	Faber Castell, Deutschland
Multiply-µStrip Pro 8er-Kette REF 72.991.002	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Objektträger Menzel Gläser Superfrost Plus REF J1800AMNZ	Thermo Scientific, USA (country of origin)
Parafilm® M Verschlussfolie	Bemis Company, USA
Pipette 5 ml, steril (REF 606180) Pipette 10 ml, steril (REF 607180) Pipette 25 ml, steril (REF 760180) Pipette 50 ml, steril (REF 768180)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

Pipettenspitze 1000 µl, 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitze mit Filter 1000 µl, 100 µl	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl	Labsolute, Th. Geyer, Renningen, Deutschland
Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere 10 µl	Labsolute, Renningen, Deutschland
Research plus Pipetten 1000 µl, 100 µl, 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Röhrchen 15 ml (REF 188271) Röhrchen 50 ml (REF 227261)	Cellstar, greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
SafeSeal Reagiergefäße 1,5 ml (REF 72.706) 2 ml (REF 72.72.695.500)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Schlauchfolie #5106555	Omnilab, Deutschland
TC-Platte 96 Well (REF 83.3924) TC-Platte 12 Well (REF 83.3921) TC-Platte 6 Well (REF 83.3920)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Tissue Culture Coverslips 13 mm No.83.1840.002	Sarstedt, USA
Whatman 3MM CHR CAT No. 3030917	GE Healthcare UK Limited, UK
Zellkulturschale 100x20 mm REF 353003	Falcon, A Corning Brand, Durham, USA

**Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien**

### 3.5 Reagenzien

0,5 M EDTA pH 8,0 REF AM9260G	Invitrogen by Thermo Fisher, Vilnius, Litauen
2-Propanol >99,8 % Art.-Nr. 6752.3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Vectastain® ABC Kit	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Albumin Fraktion V Art.-Nr. 8076.4	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (RPN2232)	GE Healthcare, UK
Ammoniumperoxodisulfat >98 % Art.-Nr. 9592.3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Antigen Unmasking Solution (Citric acid based) REF H-3300	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Collagen I, Rat Tail 3 mg/ml REF A10483-01	Gibco, Life Technologies Corporation, NY, USA
Complete, EDTA-free Protease inhibitor cocktail tablets REF 11873580001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid Rotipuran Art.-Nr. 4720.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
EGTA E4378- 100G	Sigma-Aldrich, USA
Essigsäure 100 % Art.-Nr. 6755.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol Rotipuran Art.-Nr. 9065.3	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glycin Pufferan >99,9 %, p.a. Art.-Nr. 3908.3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Goat Serum G9663	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Hämatoxylin	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
HEPES Pufferan >99,5 % Art.-Nr. 9105.3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lämmli SDS-Probenpuffer, 6x	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Methanol >99,9 %, Blotting-Grade Art.-Nr. 0082.3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine (TEMED) T9281	Sigma Life Science, USA
Natriumazid	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Natriumchlorid (NaCl) Art.-Nr. P029.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder Prod. #26619	Invitrogen by Thermo Fisher, Vilnius, Litauen
Pertex Eindeckmedium	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
PhosStop Phosphatasehemmer Cat. No. 04 906 845 001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Pierce ECL Western Blotting Substrate REF 32209	Thermo Scientific, USA
Pierce RIPA Buffer REF 89900	Thermo Scientific, USA
PowerSYBR Green PCR Master Mix	Life Technologies LTD, UK
Rotifair TBS 7,6 Art.-Nr. 1244.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Histol (HistoClear)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Histofix 4 % - phosphatgepufferte Formaldehydlösung 4 % Art.-Nr. P087.3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese NF-Acrylamid/ Bis-Lösung 30 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS Pellets >99 % Art.-Nr. CN30.3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SignalStain® Ab Diluent	Cell Signaling Technology, USA
Skim Milk Powder for blotting 42590.01 500g	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide 98 % M2128-1G	Sigma-Aldrich, MO, USA
TRIS Pufferan >99,9 %, Ultra Qualität Art.-Nr. 5429.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Trypan Blue stain 0.4 % REF T10282	Invitrogen, Life Technologies Corporation, OR, USA
TWEEN 20 P1379-500ml	Sigma-Aldrich, Frankreich

Vectashield HardSet Antifade Mounting Medium With DAPI REF H-1500	Vector Laboratories, Inc., CA, USA
Wasserstoffperoxid 30 % Rotipuran	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

**Tabelle 7: Reagenzien**

### 3.6 Selbst hergestellte Lösungen und Puffer

Blockinglösung Immunfluoreszenz	5 % Goat Serum, 1 % BSA, gelöst in PBS
Blockinglösung Immunhistochemie	5 % Goat Serum, 10 % Avidin, gelöst in PBS
Blockinglösung Western Blot	5 % oder 10 % Skim Milk, gelöst in TBS-T
Laufpuffer Western Blot	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS
Puffer A (Nukleäre Extraktion)	10 mM Hepes pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA
Puffer C (Nukleäre Extraktion)	20 mM Hepes pH 7,9, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA
Sammelgelpuffer Western Blot	0,5 M TrisHCl pH 6,8
Strippinglösung	25 mM Glycin-HCl pH 2,0, 1 % SDS
TBS 10fach	87,66 g NaCl, 4,24 g Tris, 26 g Tris-HCl, mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen
TBS-T	1 l TBS 1fach, 2 ml TWEEN 20
Transferpuffer Western Blot	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol
Trenngelpuffer Western Blot	1,5 M TrisHCl, pH 8,8

**Tabelle 8: Lösungen und Puffer**

### 3.7 Antikörper

Primärantikörper	Hersteller
Anti-CD44 antibody ab15107	Abcam, UK
CD44 Antikörper (Klon 156-3C11)	Cell Signaling, USA
YAP Antibody #4912	Cell Signaling, USA
YAP Antibody D8X1X Rabbit mAb #14074	Cell Signaling, USA
Phospho-YAP (Ser127) Antibody #4911	Cell Signaling, USA
Monoclonal Anti-alpha-Tubulin, clone DM1A	Sigma-Aldrich, USA

HSP 90 (F-8): sc-13119	Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
Lamin A/C Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
<b>Sekundärantikörper</b>	
Biotinylated Goat anti-Rabbit IgG (H+L)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Biotinylated Goat anti-Mouse IgG (H+L)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit REF A11034	Life Technologies Corporation, USA

**Tabelle 9: Antikörper**

### 3.8 Humane Primer für quantitative real-time PCR

Die Sequenzen der Primer wurden über die Roche Universal Probe Library ausgewählt und von Eurofins MWG GmbH (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Sie wurden mit destilliertem Wasser auf eine Endkonzentration von 10 µM verdünnt.

Gen	Primer Name	Sequenz (5' – 3')
Angiotensin like 2 ( <i>AMOTL2</i> ), transcript variant 1	h_AMOTL2_F (20)	TGGGGAAGAACTGGACAGAG
	h_AMOTL2_R (19)	ACACAGCTGCCTGGACAAT
Ankyrin Repeat Domain 1 ( <i>ANKRD1</i> )	h_ANKRD1_F (21)	GATCGAATTCCGTGATATGCT
	h_ANKRD1_R (20)	AAACATCCAGGTTTCCTCCA
Connective tissue growth factor ( <i>CTGF</i> )	h_CTGF_F (20)	CTCCTGCAGGCTAGAGAAGC
	h_CTGF_R (21)	GATGCACTTTTTGCCCTTCTT
Cysteine rich angiogenic inducer 61 ( <i>CYR61</i> )	h_CYR61_F (20)	AAGAAACCCGGATTTGTGAG
	h_CYR61_R (19)	GCTGCATTTCTTGCCCTTT
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase ( <i>GAPDH</i> )	h_GAPDH_F (22)	ACAACCTTTGGTATCGTGGAAGG
	h_GAPDH_R (19)	GCCATCACGCCACAGTTTC
Insulin like growth factor binding protein 3 ( <i>IGFBP3</i> )	h_IGFBP3_F (18)	AACGCTAGTGCCGTCAGC
	h_IGFBP3_R (19)	CGGTCTTCTCCGACTCAC

**Tabelle 10: Humane Primer für qPCR**

### 3.9 Technische Geräte und Kits

Autoklav 2549 EL	Tuttnauer Europe B.V., Breda, Niederlande
------------------	---

Avidin/Biotin Blocking Kit REF SP-2001	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Bio-Rad Molecular Imager ChemiDoc XRS+	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Corning Stripettor Ultra Pipet Controller	Corning, NY, USA
Countess II automatischer Zellzähler	Invitrogen, Life Technologies, USA
DAB (3,3'-diaminobenzidine) Peroxidase Substrat Kit	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
EcoVac Vakuumpumpe	Schuett-biotec GmbH, Göppingen, Deutschland
Forma 900 Series Upright Ultra-Low Temperature Freezers (-80°C)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
FS 3604 Folienschweißgerät	Severin Elektrogeräte GmbH, Deutschland
Glasware, Schott Duran	Schott AG, Mainz, Deutschland
Sicherheitswerkbank HERA safe KS 18 Klasse II	Thermo Electron Corporation, USA
Heraeus CO <sub>2</sub> Inkubator BB15	Thermo Scientific (Austria) GmbH, Wien, Österreich
Heraeus Instruments kelvitron t Inkubator	Thermo Fisher, MA, USA
Mastercycler nexus gradient Katalog-Nr. 6331000017	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Maxwell 16 LEV simply RNA Tissue Kit REF AS1280	Promega, Madison, USA
Maxwell® 16 Instrument (AS2000)	Promega, Madison, USA
Mikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss, Fisher Scientific, Deutschland
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss, Fisher Scientific, Deutschland
Mikroskopkamera AxioCam MRm	Carl Zeiss, Fisher Scientific, Deutschland
Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Mini Trans-Blot® Module, and PowerPac™ Basic Power Supply #1658033	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Multiskan FC Version 1.00.96	Thermo Scientific, MA USA

Nano Drop 2000 Spektralphotometer	Thermo Scientific, MA, USA
neoLab Mini-Zentrifuge Spectrafuge 3-1810	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
PC-410D Stirrer with Digital Display No. 07770151	Corning, NY, USA
pH-Meter 521	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
Pierce BCA Protein Assay Kit Prod #23227	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL USA
Pipettierhelfer accu-jet pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Präzisionswaage PCB, 2.5 kg	Kern & Sohn GmbH, Balingen- Frommern, Deutschland
ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit E6560L	New England Biolabs, MA, USA
Shaker DRS-12	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
StepOnePlus Real-Time PCR System Katalog-Nr. 4376600	Applied Biosystems by life technologies, USA
Thermomixer Comfort mit 2 ml Thermoblock	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., NY, USA
Zentrifuge 5424 R, 5702 R und 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

**Tabelle 11: Geräte und Kits**

### 3.10 Software

Programm	Herkunft
AxioVision 4.8	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Image Lab 6.0.1 Software	Bio-Rad Laboratories, USA
NanoDrop 2000/2000c	Thermo Scientific, MA, USA
StepOnePlus Software v2.3	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
GraphPad Prism 5	La Jolla, CA, USA
ImageJ	Wayne Rasband, Public Domain
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA



Affinity Designer	Serif, Nottingham, UK
ImageScope x64	Aperio Software, UK

**Tabelle 12: Softwareprogramme**

## 4 Methoden

### 4.1 Zellkultur

#### 4.1.1 Allgemeine Methoden zur Kultivierung

Die Zelllinien TKO2.1, HepG2 und SNU-398 wurden in einer 100 mm-Zellkulturplatte mit RPMI-Medium kultiviert. Für die Zelllinien HuH7, PLC5 und Mahlavu wurde DMEM-Medium verwendet. Die Zellkulturmedien wurden dabei vor Gebrauch mit je 50 ml FBS (10 %) und 5 ml Penicillin-Streptomycin (1 %) versetzt. Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit 100 % Luftfeuchtigkeit. Das weitere Vorgehen, wie die Handhabung und das Auftauen gefrorener Zellen, das Subkultivieren und die Kryokonservierung, erfolgte nach Vorgaben der Produktblätter der einzelnen verwendeten Zelllinien.

#### 4.1.2 Ganzzellextrakte

Zur Herstellung von Ganzzellextrakten wurden die Zellen zunächst mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und danach mit Trypsin-EDTA (0,25 %) vom Boden der Zellkulturplatten (6-Well-Platten) gelöst. Das Trypsin wurde mit komplettem Zellkulturmedium (10 % FBS, 1 % PenStrep) inaktiviert und die Flüssigkeit in ein Zentrifugenröhrchen bzw. Eppendorf-Gefäß transferiert. Dieses wurde für 5 Minuten bei 0,5 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 1 ml PBS aufgelöst, um es erneut mit gleichen Einstellungen zu zentrifugieren. Anschließend wurde das PBS abgesaugt und das entstandene Pellet bis zum Transfer in einen -80 °C-Gefrierschrank auf Eis gelagert.

#### 4.1.3 Nukleäre Zellextrakte

Für die nukleäre Extraktion der Proteine aus den Zelllinien wurden diese mit kaltem PBS gewaschen und mit Trypsin von der 6-Well-Zellkulturplatte gelöst. Anschließend wurden die Zellen in kalter PBS-Lösung aufgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt, worin sie 10 Minuten bei 4 °C und 1100 rpm zentrifugiert wurden. Dann wurde das Zellpellet mit 1 ml kaltem PBS in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und darin nochmals bei 4 °C für 2 Minuten mit 1600 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 400 µl Puffer A mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren aufgenommen und resuspendiert. Die Proben wurden in dieser Lösung für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen durch wiederholte Aspiration mit einer 26G-Nadel mechanisch aufgeschlossen. Durch Zentrifugieren bei 4 °C und 6800 rpm für 2 Minuten wurden die Zellkerne pelletiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Dieser wurde erneut zentrifugiert (mit 14.000 rpm für 20 Minuten bei 4 °C) und der neu entstandene Überstand (entspricht der zytoplasmatischen Proteinfraction) in einem neuen Gefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Kernpellet wurde zweimal mit 400 µl Puffer A gewaschen und danach in 60 µl Puffer C (mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren) aufgenommen. Diese Suspension

wurde 60 Minuten auf dem Schüttler im Kühlraum eluiert und dann bei 4 °C für 20 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand entspricht der nukleären Proteinfraction und wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, das wieder in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde. Anschließend wurden beide Proteinfractionen bei -80 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

#### 4.1.4 Behandlung der Zellen für den Proteinnachweis mittels Western Blot

Die Behandlung mit dem monoklonalen CD44-Antikörper IM7 und der dazugehörigen Isotypkontrolle erfolgte mit einer Vorinkubation von 30 Minuten (in Zellkulturmedium mit 0,1 % FBS) mit einer Dosis von 200 µg/ml mit einer darauffolgenden Verdünnung im Verhältnis von 1:10. Anschließend wurden die Zellen auf einer 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät und nach 24 h, 48 h und 72 h wurden die Zellpellets für Ganzzellextrakte hergestellt.

Für die Rhosin-Behandlung wurden die Zelllinien zunächst in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Nach 24 h erfolgte dann die Behandlung mit 60 µM Rhosin und gleichem Volumen DMSO als Kontrollbehandlung. Nach verschiedenen Behandlungszeitpunkten (3-48 h) wurden Zellpellets für die Proteindetektion gewonnen (s.o.).

## 4.2 MTT-Proliferationsassay

### 4.2.1 Allgemeines Vorgehen

Die verwendeten Zellen wurden mit Trypsin von einer 100 mm-Zellkulturplatte gelöst, mit Medium resuspendiert und dann in ein Zentrifugenröhrchen transferiert. Für die Zellzählung wurden je 10 µl pro Zellreihe entnommen und 1:1 mit 10 µl Trypanblau gemischt für die Zählkammer des Countess-Zählgerätes von invitrogen. Die Zellen wurden anschließend mit unterschiedlichen Zelldichten auf Standard 96-Well-Platten ausgesät.

Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden 10 µl des MTT-Reagens pro Well hinzugegeben und nochmals für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Dann wurde das Medium abgesaugt und je 200 µl einer Lösung aus DMSO und reinem Ethanol (1:1) pro Well hineingegeben. Die Zellkulturplatte wurde mit dieser Lösung 15-20 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend die Absorption mittels Multiskan FC Mikrotiterplatten-Photometer von ThermoScientific bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die Auswertung der Absorptionswerte erfolgte mit Excel und die graphische Darstellung der Quantifizierung mittels GraphPad Prism.

### 4.2.2 Antikörperbehandlung

Für die Behandlung mit dem CD44-Antikörper IM7 und der korrespondierenden Isotypkontrolle wurden je nach Zelllinie unterschiedliche Zellzahlen in einem Eppendorf-Gefäß mit serumfreiem, serumreduziertem oder komplettem Zellkulturmedium bei 37 °C präinkubiert.

Dabei wurde das Gefäß in 10-minütigen Abständen leicht bewegt, damit die Zellen sich nicht absetzen. Zur Optimierung der Antikörperbehandlung wurde diese Präinkubation neben der Verwendung von verschiedenen Medien auch in ihrer Dauer variiert. So wurden die Zelllinien mindestens 30 Minuten bis zu maximal 4 Stunden mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen von 5 µg/ml bis 200 µg/ml vorinkubiert.

Anschließend wurde die Zellsuspension 1:10 verdünnt mit Standardmedium (10 % FBS, 1 % PenStrep). Von dieser Lösung wurden Triplikate mit je 100 µl pro Well auf eine 96-Well-Zellkulturplatte pipettiert und die Platte wurde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### 4.2.3 Behandlung mit Doxorubicin

Bei der Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin wurden die Zellen in einer Dichte von 10.000-20.000 Zellen pro Well ausgesät. Nach 24 h Inkubation bei Standardzellkultur-Bedingungen wurde das Medium abgesaugt und Zellkulturmedium mit 0,5 µl Doxorubicin in verschiedenen Konzentrationen bzw. 0,5 µl DMSO zu den Zellen pipettiert. Nach weiteren 48 h bzw. 72 h wurde das MTT-Reagens hinzugefügt und die Absorptionswerte der Platten gemessen und ausgewertet. Für die Kombinationstherapie der Antikörper mit Doxorubicin wurden die Zellen zuerst für 30 Minuten mit 200 µg/ml IM7 oder IgG-Isotypkontrolle bei 37 °C präinkubiert, danach auf 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät und nach weiteren 5 h wurde Doxorubicin (10 µM) bzw. DMSO hinzugefügt. Die Auswertung erfolgte nach 48 h und 72 h der Kombinationsbehandlung.

#### 4.2.4 Behandlung mit Rhosin

Für die Behandlung mit dem RhoA-Inhibitor Rhosin wurden die Zellen in einer Dichte von 5.000-10.000 Zellen pro Well auf einer 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät und 24 h bei Standardzellkultur-Bedingungen inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und Zellkulturmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen von Rhosin (10-100 µM) bzw. unterschiedlichen Mengen DMSO hinzugefügt. Nach weiteren 48 h und 72 h wurden die Absorptionswerte gemessen.

#### 4.2.5 Adhäsionsassay

Zur Durchführung eines Adhäsionsassays wurden zunächst die 96-Well-Zellkulturplatten beschichtet. Dies erfolgte mit einer Lösung aus 100 µl Kollagen Typ1 in 0,02 M Essigsäure mit einer Konzentration von 50 µg/ml über Nacht unter der Zellkulturbank. Am nächsten Morgen wurde die restliche Flüssigkeit abgesaugt und alle beschichteten Wells dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Platte luftgetrocknet und die Zellen darauf ausgesät.

Um eine Konfluenz zum Zeitpunkt der Aussaat zu vermeiden, wurden die Zellen am Vortag subkultiviert. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen trypsiniert, gezählt und die benötigte Zellmenge zentrifugiert und mit Zellkulturmedium (0,1 % FBS) resuspendiert.

Für die Behandlung mit IM7 bzw. IgG (200 µg/ml) und Rhosin (60 µM) erfolgte jeweils eine Präinkubation für 30 Minuten in Zellkulturmedium mit 0,1 % FBS bei 37 °C. Die Zellen wurden danach ausgesät und die Platte für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Um nicht-adhärente Zellen zu entfernen, wurde dreimal mit Medium gewaschen. Zuletzt wurde komplettes Zellkulturmedium auf die verbliebenen Zellen gegeben und die Platte für 24 h bei Standard-Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden mikroskopische Bilder der Zellen aufgenommen und ein MTT-Assay (s.o.) durchgeführt.

### 4.3 Proteindetektion mittels Western Blot

#### 4.3.1 Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung

Zur Proteinextraktion aus den bei -80 °C gelagerten Zellpellets wurden diese auf Eis je nach Größe der Pellets mit 50-200 µl RIPA-Puffer mit 1:25 Protease- und Phosphatase-Inhibitor gelöst. Für die Homogenisierung wurden die Proben über insgesamt 20 Minuten in 5-minütigen Abständen gevortext und auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 4 °C und 15.000 rpm zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet. Aus diesem wurden 7 µl verwendet zur Bestimmung der Proteinkonzentration mithilfe des Pierce BCA Protein Assay Kits. Gemessen wurde die Konzentration bei 570 nm im Multiskan FC Mikrotiterplatten-Photometer (ThermoScientific).

Je nach Proteinkonzentration der Proben wurden sie verdünnt mit RIPA-Lysepuffer und es wurde Lämmli-Puffer hinzugefügt.

#### 4.3.2 Herstellung der Polyacrylamidgelle

	<b>Trenngel 10 %</b>	<b>Trenngel 12,5 %</b>	<b>Sammelgel</b>
<b>Acrylamide 30 %</b>	3,3 ml	4,3 ml	1,6 ml
<b>TRIS pH 8.8 1,5 M</b>	2,5 ml	2,5 ml	-
<b>TRIS pH 6.8 0,5 M</b>	-		1,3 ml
<b>SDS 10 %</b>	100 µl	100 µl	100 µl
<b>APS 10 %</b>	50 µl	50 µl	100 µl
<b>TEMED</b>	10 µl	10 µl	10 µl
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	4,0 ml	3,0 ml	6,9 ml

**Tabelle 13: Polyacrylamidgel-Herstellung**

### 4.3.3 Proteinnachweis

Die Beladung der Polyacrylamidgele erfolgte mit 20-30 µl der Proben und 10 µl Marker. Leere Taschen und das restliche Volumen der Markertasche wurden mit einfachem Lämmli-Puffer aufgefüllt, um ein gleiches Volumen in allen Taschen zu erreichen. Vor der Beladung wurden die Proben und der Lämmli-Puffer für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht und kurz zentrifugiert. Die Auftrennung der Proteine innerhalb des Gels erfolgte bei konstanter Spannung (zu Beginn 70-80 V, später 100-110 V) in einer Elektrophoresekammer mit Laufpuffer. Anschließend wurden die Proteine in einer weiteren Kammer für 2 Stunden bei 400 mA und mittels Transferpuffer auf eine Transfermembran übertragen. Danach wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Blockinglösung (5 % bzw 10 % Trockenmilchpulver in TBS-T) inkubiert zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen. Nach der Inkubation wurde die Blockinglösung mit TBS-T abgespült und die Membranen mit verschiedenen Primäantikörperlösungen über Nacht bei 4 °C inkubiert.

<b>Primäantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Sekundäantikörper</b>
<b>Anti-CD44 antibody ab15107</b>	1:2000 in 5 % Skim Milk	Anti-Rabbit 1:5000 in 5 % Skim Milk
<b>YAP antibody D8X1X rabbit mAb #14074</b>	1:1000 in 5 % BSA-TBS-T	Anti-Rabbit 1:5000 in 5 % Skim Milk
<b>Phospho-YAP (Ser127) Antibody #4911</b>	1:1000 in 5 % BSA-TBS-T	Anti-Rabbit 1:5000 in 5 % Skim Milk
<b>Monoclonal Anti-alpha-Tubulin, clone DM1A</b>	1:1000 in 5 % Skim Milk	Anti-Mouse 1:5000 in 5 % Skim Milk
<b>Anti-HSP90</b>	1:200 in 5 % Skim Milk	Anti-Mouse 1:5000 in 5 % Skim Milk
<b>Anti-Lamin A/C</b>	1:1000 in 5 % Skim Milk	Anti-Rabbit 1:5000 in 5 % Skim Milk

**Tabelle 14: Verwendung der Primäantikörper für Western Blots**

Am nächsten Tag wurde die Membran zuerst dreimal für 15 Minuten mit TBS-T gewaschen. Nach dem Waschen erfolgte die Inkubation der Membran mit der Sekundäantikörperlösung für eine Stunde lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Anschließend wurde nochmals dreimal für 15 Minuten lichtgeschützt mit TBS-T gewaschen. Für die Detektion der Proteinbanden wurde die Membran lichtgeschützt eine Minute mit ECL-Lösung bzw. 5 Minuten mit ECL Prime-Lösung inkubiert. Danach wurden mittels Bio-Rad Molecular Imager ChemiDoc XRS+ Bilder der Proteinbanden aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mittels ImageJ und Excel zur Quantifizierung der Banden. Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde GraphPad Prism verwendet.

#### **4.4 YAP Immunfluoreszenz-Färbung**

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zelllinien zuerst in unterschiedlichen Dichten in einer 12-Well-Zellkulturplatte auf einem Glas-Coverslip ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Behandlung mit dem CD44-Antikörper IM7 (200 µg/ml) und dem RhoA-Inhibitor Rhosin (60 µM) und den dazugehörigen Kontrollen. Nach bestimmten Inkubationszeitpunkten wurde das Medium abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurden sie 20 Minuten bei Raumtemperatur in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und nochmals dreimal mit PBS gewaschen. Für die Färbung wurden im ersten Schritt die Zellmembranen mit 0,4 % Triton-X in PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Im nächsten Schritt wurde wiederum dreimal mit PBS gewaschen und anschließend zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz mit 50 mM Glycin in PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde nochmals dreimal mit PBS gewaschen.

Nun wurden die Coverslips vorsichtig aus der 12-Well-Zellkulturplatte herausgenommen und in eine große, mit Parafilm ausgekleidete Zellkulturplatte transferiert. Die Coverslips wurden in der Platte für 1 h mit 5 % Goat Serum-PBS-T geblockt und danach mit dem primären YAP-Antikörper D8H1X zunächst für 1 h bei 37 °C und anschließend über Nacht bei 4 °C in einem feuchten Milieu inkubiert.

Am nächsten Tag wurde zunächst fünfmal mit PBS gewaschen, indem jeweils 100 µl des PBS auf ein Coverslip gegeben und wieder abgesaugt wurden. Dann wurde die einstündige Inkubation mit dem sekundären Fluoreszenz-Antikörper (Rabbit 488 in 5 % Goat Serum-PBS-T) gestartet. Es wurde nochmals fünfmal gewaschen, bevor die Coverslips mit je einem Tropfen Vectashield+DAPI auf einen Objektträger gelegt wurden. Nach einer Stunde wurden die Coverslips mit Nagellack umrahmt und damit versiegelt, um Austrocknung zu vermeiden. Die Objektträger wurden bei 4 °C mindestens über Nacht aufbewahrt und an den darauffolgenden Tagen wurden mittels Fluoreszenzmikroskop Bilder aufgenommen.

Die Auswertung erfolgte über Zellzählungen der aufgenommenen Mikroskopbilder mit 40-facher Vergrößerung. Bei der Zählung wurden die Zellen für die Auswertung in drei verschiedene Gruppen eingeteilt: eine Gruppe mit YAP-Expression betont im Zellkern, eine Gruppe mit YAP-Färbung gleichermaßen in Kern und Zytoplasma und eine Gruppe mit überwiegend zytoplasmatischem YAP. In der grafischen Darstellung wurden die beiden letzten Gruppen zusammengefasst als eine Gruppe mit hoher zytoplasmatischer YAP-Expression. Zellen mit Mitosefiguren wurden bei der Zählung nicht berücksichtigt.

#### **4.5 Isolation und Detektion von Ribonukleinsäuren**

##### **4.5.1 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese**

Die Behandlung der Zellen mit Rhosin sowie die Gewinnung von Ganzzellextrakten erfolgte analog zur Behandlung für den Proteinnachweis mittels Western Blot. Die bei -80 °C

aufbewahrten Zellpellets wurden 5 Minuten auf Eis aufgetaut. Zur Isolierung der RNA wurden die Pellets mit je 200 µl Homogenisierungspuffer (mit 10 µl Thioglycerol auf 1 ml Homogenisierungslösung) gelöst. Anschließend wurden die Proben 3 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. In einem separaten Eppendorf-Gefäß wurden pro Probe je 200 µl Lysis-Buffer bereitgestellt und die zentrifugierten Proben dort hinein pipettiert. Entsprechend des Herstellerprotokolls des Maxwell 16LEV simplyRNA Kits wurde alles zur Analyse durch das Maxwell Analysegerät vorbereitet und das einstündige Isolierungsprogramm gestartet. Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde im Anschluss mithilfe des NanoDrop-Spektralphotometers quantifiziert.

Die Proben wurden danach entweder bei -80 °C gelagert oder direkt für die Synthese von cDNA verwendet. Für die cDNA-Synthese wurde das Protoscript First Strand Synthesis-Kit verwendet und 0,5-1 µg RNA für die reverse Transkription eingesetzt. Die erhaltene cDNA wurde mit 20 µl Nuklease-freiem Wasser (NFW) verdünnt und bei -20 °C gelagert.

#### 4.5.2 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Für ausgewählte YAP-abhängige Zielgene und ein Referenzgen wurden genspezifische Primer verwendet. Es wurde ein Reaktionsmix aus dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green (10 µl), Nuklease-freiem Wasser (7 µl) und den Forward und Reverse Primern angesetzt (je 1 µl). Auf 62,7 µl dieses Ansatzes wurden 3,3 µl der synthetisierten cDNA gegeben. Anschließend wurden die Proben zur Analyse in 20 µl Triplikaten auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Die quantitative real-time PCR wurde mithilfe des StepOnePlus real-time PCR-Systems durchgeführt. Als Referenzgen wurde *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) verwendet. Am Ende der PCR-Reaktion wurde eine Schmelzkurve erstellt, um sicherzustellen, dass tatsächlich nur ein Produkt amplifiziert wurde.

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels StepOnePlus Software und Excel über die  $\Delta\Delta CT$ -Methode.

#### 4.6 Immunhistochemie humaner HCC-Proben

Zur immunhistochemischen Analyse der Gewebeschnitte nach Avidin-Biotin-Komplex Technik (ABC-Technik) wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert und rehydratisiert. Für die Antigendemaskierung wurden die Schnitte in einer Unmasking-Lösung (Vector Laboratories; 9,4 ml Stock-Lösung gelöst in 1000 ml destilliertem Wasser) mithilfe einer Mikrowelle erst für 3 Minuten bei maximaler Wattzahl und anschließend für 16 Minuten bei 50 % Wattstufe gekocht. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T (phosphatgepufferte Salzlösung mit 0,2 % Tween) für je 5 Minuten wurde die endogene Peroxidase mithilfe einer Wasserstoffperoxidlösung (3 %) für 10 Minuten unter Lichtausschluss blockiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS-T (je 5 Minuten) wurden die Schnitte für 60 Minuten



in einer Blockinglösung (5 % Goat Serum, 10 % Avidin) inkubiert und anschließend erneut gewaschen (dreimalig PBS-T, je 5 Minuten). Nun wurde die Erstantikörperlösung (Antikörper verdünnt in Signal Stain Diluent, 10 % Biotin) aufgetragen. Nach Inkubation des Erstantikörpers für 30 Minuten bei 37 °C gefolgt von einer Inkubation über Nacht bei 4 °C wurden die Schnitte mit PBS-T gewaschen (dreimalig je 5 Minuten) und anschließend der biotinylierte Zweitantikörper (verdünnt in PBS) aufgetragen. Nach Inkubation des Zweitantikörpers für 60 Minuten bei Raumtemperatur wurden unspezifisch gebundene Antikörper durch einen weiteren Waschschrift mit PBS-T (dreimal je 5 Minuten) abgewaschen und die Schnitte für 30 Minuten mit ABC-Lösung (enthält Avidin und Horseradish Peroxidase) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS-T (dreimal 5 Minuten) wurde unter mikroskopischer Kontrolle die DAB-Färbelösung aufgetragen und inkubiert. Die Farbreaktion wurde in destilliertem Wasser gestoppt, sobald ein ausreichendes Signal sichtbar war. Anschließend wurden die Schnitte für 2 Sekunden mit Hämatoxylin gegengefärbt, mit Leitungswasser für 5-10 Minuten klargespült und durch die aufsteigende Ethanolreihe (70 %, 96 %, 100 %; jeweils zweimal für 30 Sekunden) nochmals dehydratisiert. Nach der Färbung wurden die Schnitte mit dem Pertex-Eindeckmedium beschichtet und mit einem Deckglas versehen.

Die Durchführung der Färbungen für CD44 erfolgte mit Unterstützung des Instituts für Pathologie der Technischen Universität München (TUM), die Färbungen für YAP wurden mit Unterstützung von Frau Dr. Ulrike Bauer der Klinik für Innere Medizin II des Klinikums rechts der Isar der TUM durchgeführt.

## 5 Ergebnisse

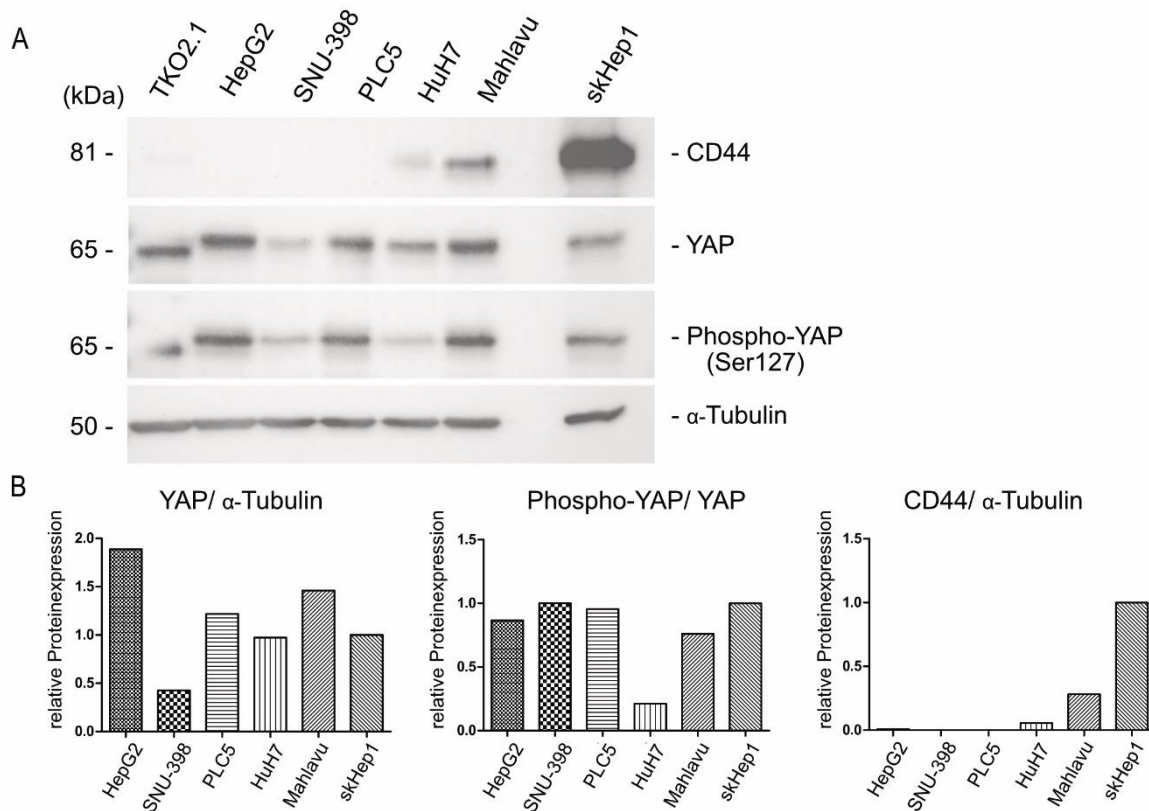
### 5.1 Charakterisierung und Auswahl der verwendeten HCC-Zelllinien

Vor der Testung der verschiedenen Therapien sollten zunächst die verwendeten Zelllinien in unbehandelter Form untersucht werden. Zum einen, um die Zellen im Hinblick auf ihre Proteinexpressionsmuster einzuteilen, zum anderen um eine mögliche Korrelation von CD44- und YAP-Proteinexpression zu untersuchen. Zur Charakterisierung der verschiedenen humanen HCC-Zelllinien wurden Western Blots mit unbehandelten Ganzzellextrakten der Zellen durchgeführt und hinsichtlich der Proteinexpression von YAP, Phospho-YAP (Ser127) und CD44 untersucht.

Abbildung 6 zeigt die Western Blots der Zelllinien TKO2.1, HepG2, SNU-398, PLC5, HuH7, Mahlavu und skHep1 (Abb. 6A) mit dazugehöriger Quantifizierung von YAP und CD44 im Verhältnis zu  $\alpha$ -Tubulin und Phospho-YAP im Verhältnis zu YAP (Abb. 6B). Das YAP-Gesamtprotein konnte in allen humanen HCC-Zelllinien in unterschiedlicher Höhe nachgewiesen werden, wobei die Expression in HepG2- und Mahlavu-Zellen am höchsten und in SNU-398-Zellen am niedrigsten war. Um die Aktivität von YAP darzustellen, wurde bei der Auswertung der Western Blots das Verhältnis von inaktivem phosphoryliertem Protein (Phospho-YAP, Ser127) zu dem YAP-Gesamtprotein gebildet. Im Hinblick auf dieses Verhältnis war der aktive YAP-Anteil der Zellen HuH7 am höchsten, gefolgt von Mahlavu- und HepG2-Zellen.

Die CD44-Proteinexpression variierte stark zwischen den verschiedenen Zelllinien. Während bei TKO2.1, HepG2, SNU-398 und PLC5 nahezu kein CD44 mittels Western Blot nachgewiesen werden konnte, exprimierten HuH7 und Mahlavu mäßig viel und skHep1 am stärksten das CD44-Protein. Insgesamt bestand bei den verwendeten Zelllinien in diesem Western Blot keine erkennbare Korrelation zwischen der Höhe der YAP-Proteinexpression und der des CD44-Proteinlevels. Mögliche Gründe hierfür sind u.a. das Einwirken anderer Signalwege auf die YAP-Expression bei geringer CD44-Expression der Zellen. Auch wenn keine Korrelation nachgewiesen werden konnte, wird eine funktionelle Relevanz nicht ausgeschlossen.

Für die weiteren Experimente wurden aufgrund dieser Ergebnisse vor allem die Zelllinien HepG2, HuH7 und Mahlavu als Vertreter mit hoher aktiver YAP-Expression und unterschiedlich hohem CD44-Proteinexpressionslevel verwendet. Die Zelllinie skHep1 wurde für die weiteren Untersuchungen trotz der sehr hohen CD44-Proteinexpression nicht mehr verwendet, da diese Zellen eher Eigenschaften eines cholangiozellulären Karzinoms besitzen bzw. auch ein endothelialer Ursprung der Zelllinie diskutiert wird.



**Abbildung 6: Charakterisierung humaner HCC-Zelllinien im Hinblick auf CD44-, YAP- und Phospho-YAP-Proteinexpression**

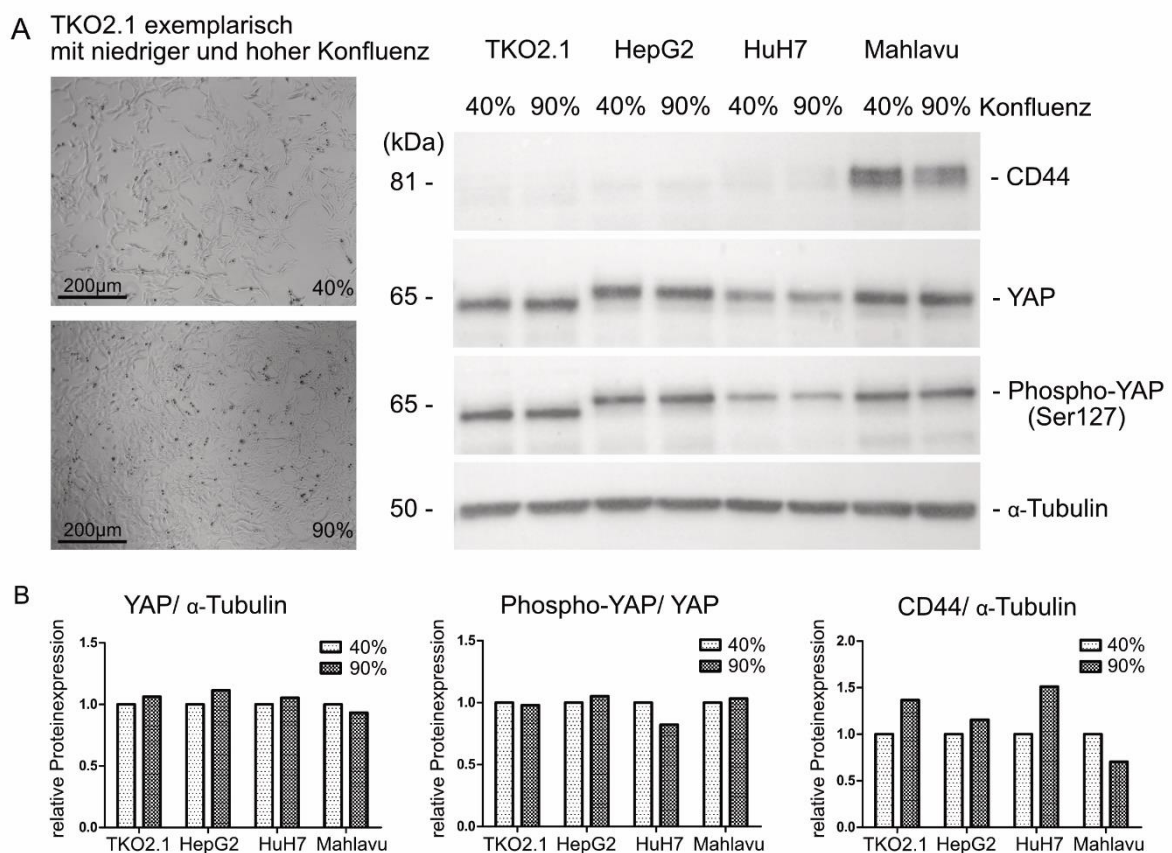
A: Proteinnachweis von CD44, YAP und Phospho-YAP der Zelllinien TKO2.1, HepG2, SNU-398, PLC5, HuH7, Mahlavu und skHep1 mittels Western Blot.  $\alpha$ -Tubulin als Ladekontrolle.  
 B: Quantifizierung der relativen Proteinexpression von YAP im Verhältnis zu  $\alpha$ -Tubulin, Phospho-YAP zu YAP und CD44 zu  $\alpha$ -Tubulin der humanen Zelllinien (n=1).

Um den Einfluss von unterschiedlichen Konfluenzen auf die Proteinexpression auch im Hinblick auf eine mögliche Kontaktinhibition zu untersuchen, wurden die Zellen in verschiedenen Dichten ausgesät und mit 40 % bzw. 90 % Konfluenz zur Proteinextraktion verwendet. Repräsentative lichtmikroskopische Bilder zeigen TKO2.1-Zellen mit den verwendeten unterschiedlichen Zelldichten (Abb. 7A links). Die dazugehörigen Proteinbanden zeigen die CD44-, YAP-, Phospho-YAP (Ser127)- und  $\alpha$ -Tubulin-Proteinexpression der Zelllinien TKO2.1, HepG2, HuH7 und Mahlavu jeweils nebeneinander mit niedrigerer und höherer Konfluenz (Abb. 7A rechts).

Durch Quantifizierung konnten bei diesem Experiment keine signifikanten Unterschiede der Expression von YAP und Phospho-YAP bei unterschiedlichen Zelldichten dargestellt werden (Abb. 7B). Auch auf das Verhältnis von inaktivem Phospho-YAP zu aktivem YAP hatten die verschiedenen Konfluenzen somit keinen Einfluss. Die CD44-Proteinexpression war bei TKO2.1-, HepG2- und HuH7-Zellen mittels Western Blot nur minimal nachweisbar, weshalb die Quantifizierung nicht sinnvoll verwendet werden konnte. Bei der Zelllinie Mahlavu führte

eine höhere Konfluenz der Zellen lediglich zu einer minimalen, nicht signifikanten Abnahme der CD44-Proteinexpression.

Es wurde bereits nachgewiesen, dass die Zelldichte-abhängige Aktivierung des Hippo-Signalwegs dysfunktional in manchen HCC-Zelllinien (HepG2) ist. Weiterhin wurde eine nukleäre Lokalisation von YAP und eine fehlende Veränderung der Phospho-YAP-Expression bei hoher Konfluenz beobachtet (H. Li et al., 2012). Das steht im Einklang mit den hier gezeigten Ergebnissen. Ein Zusammenhang mit CD44 ist möglich, kann aber aufgrund der niedrigen Expression bei HepG2-Zellen im Western Blot nicht evaluiert werden. Die Ergebnisse der anderen Zelllinien weisen ebenfalls auf eine dysfunktionale Inaktivierung von YAP in Tumorzellen hin.



**Abbildung 7: Charakterisierung der Proteinexpression von TKO2.1-, HepG2-, HuH7- und Mahlavu-Zellen bei unterschiedlichen Konfluenzen**

A: Exemplarische mikroskopische Darstellung der TKO2.1-Zelllinie bei niedriger (40 %) und hoher Konfluenz (90 %) sowie Proteinnachweis von CD44, YAP und Phospho-YAP bei TKO2.1-Zellen und humanen Zelllinien HepG2, HuH7 und Mahlavu in unterschiedlichen Zelldichten mittels Western Blot.

B: Quantifizierung der relativen Proteinexpression YAP/  $\alpha$ -Tubulin, Phospho-YAP/ YAP und CD44/  $\alpha$ -Tubulin mit den dargestellten unterschiedlichen Konfluenzen (n=1).

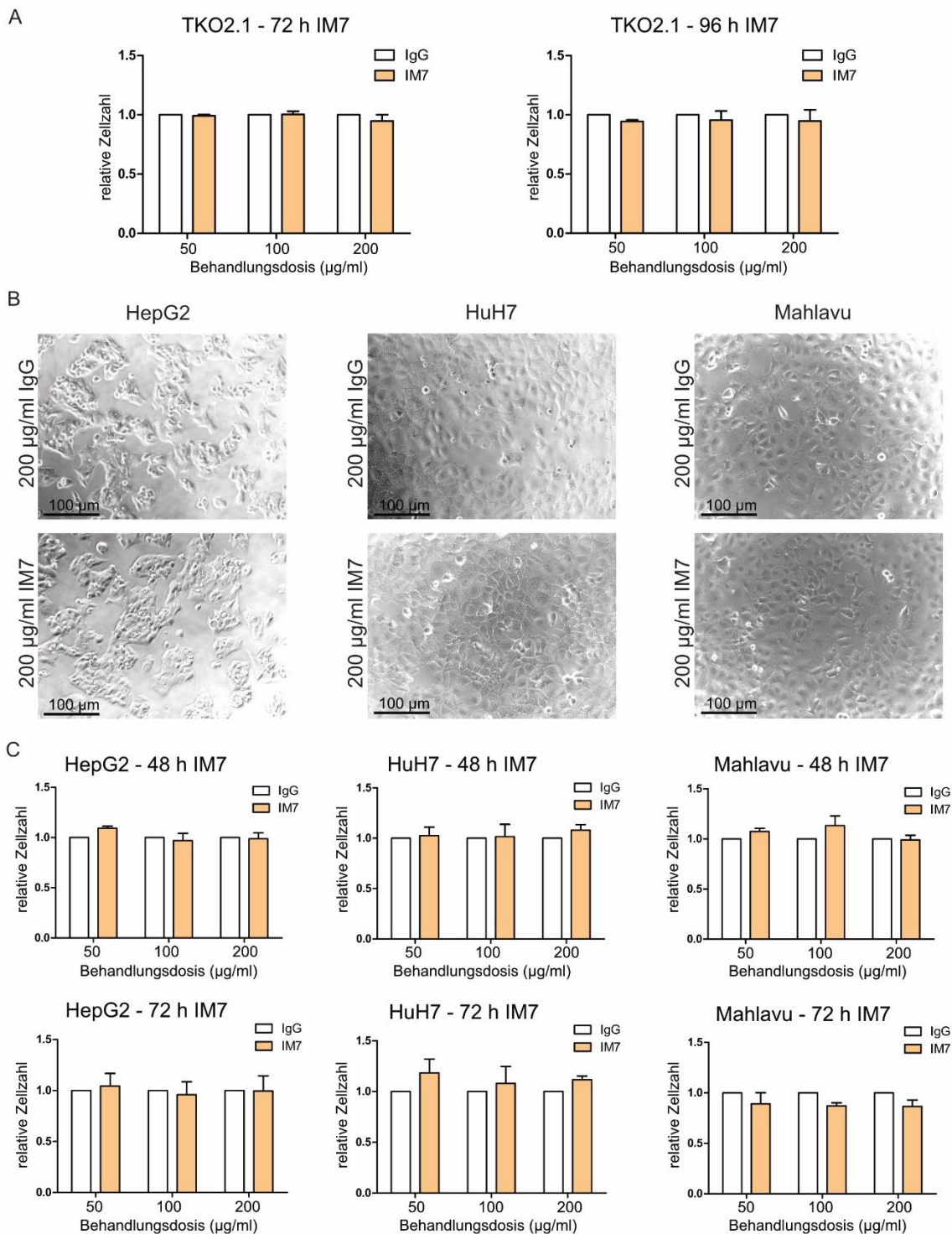
## 5.2 Analyse des Einflusses des CD44-Antikörpers IM7 auf HCC-Zellen

### 5.2.1 Einfluss der IM7-Behandlung auf die Proliferation

Um die funktionelle Relevanz von CD44 in den murinen TKO2.1-Zellen und humanen HCC-Zelllinien zu ermitteln, wurde ein CD44-Antikörper als Behandlung ausgewählt. Der monoklonale Antikörper IM7 reagiert mit allen Isoformen von humanem und murinem CD44 und bindet an ein extrazelluläres Epitop des Oberflächenmoleküls CD44. Der Antikörper IM7 ist einer der wichtigsten monoklonalen Anti-CD44-Antikörper bei der Mediation von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen. IM7 wurde bereits in der Tumorthherapie genutzt und reduzierte *in vitro* die Proliferation von ovariellen Tumorzellen in einer Konzentration von 100 ng/ml (Y. Yang et al., 2017).

Die Anwendung des CD44-Antikörpers IM7 wurde in dieser Arbeit auf unterschiedliche Arten getestet, da in der Literatur verschiedene Methoden mit teils hohen benötigten Konzentrationen beschrieben wurden (Uchino et al., 2010; Y. Yang et al., 2017). Die Varianten umfassten eine Präinkubation der Zellen von 30 Minuten bis zu 4 Stunden mit und ohne Zusatz von Serum, sowie mit unterschiedlichen Dosierungen von 50 µg/ml, 100 µg/ml und 200 µg/ml. In Abbildung 8 sind exemplarisch die Daten einiger dieser durchgeführten MTT-Proliferationsassays dargestellt. Für die murine TKO2.1-Zelllinie konnte bei keiner dieser unterschiedlichen Behandlungsvarianten eine Veränderung in Richtung einer Proliferationsreduktion durch den Antikörper im Vergleich zu der Isotypkontrolle festgestellt werden, sowohl nach 72 h als auch nach 96 h Behandlungsdauer (Abb. 8A).

Bei den humanen Zelllinien HepG2, HuH7 und Mahlavu wurden ebenfalls verschiedene Dosen von 50-200 µg/ml verwendet mit einer Präinkubation von 30 Minuten in Zellkulturmedium mit 0,1 % FBS. Auch hier konnte bei keiner der drei Zelllinien ein eindeutiger Effekt im Sinne einer Reduktion der Zellproliferation festgestellt werden. Dies konnte weder morphologisch anhand der mikroskopischen Bilder nach 48 h (Abb. 8B), noch nach Analyse der Proliferation mittels MTT-Assay nach 48 h und 72 h Behandlung mit IM7 bzw. Isotypkontrolle nachgewiesen werden (Abb. 8C). Eine Erhöhung der Dosis auf bis zu 200 µg/ml zeigte dabei ebenso wenig eine Beeinflussung der Zellproliferation wie eine Behandlung mit 50 µg/ml.



**Abbildung 8: Effekt der IM7-Behandlung auf die Zellproliferation**

A: Auswertung des Proliferationsassays von TKO2.1-Zellen nach 72 h und 96 h Behandlung mit unterschiedlichen Dosen (50,100 und 200 µg/ml) IM7 und IgG, Darstellung der Mittelwerte der Triplikate mit Standardabweichung (n=1).

B: Mikroskopische Bilder von HepG2-, HuH7- und Mahlavu-Zellen nach 48 h Behandlung mit 200 µg/ml IM7 und IgG.

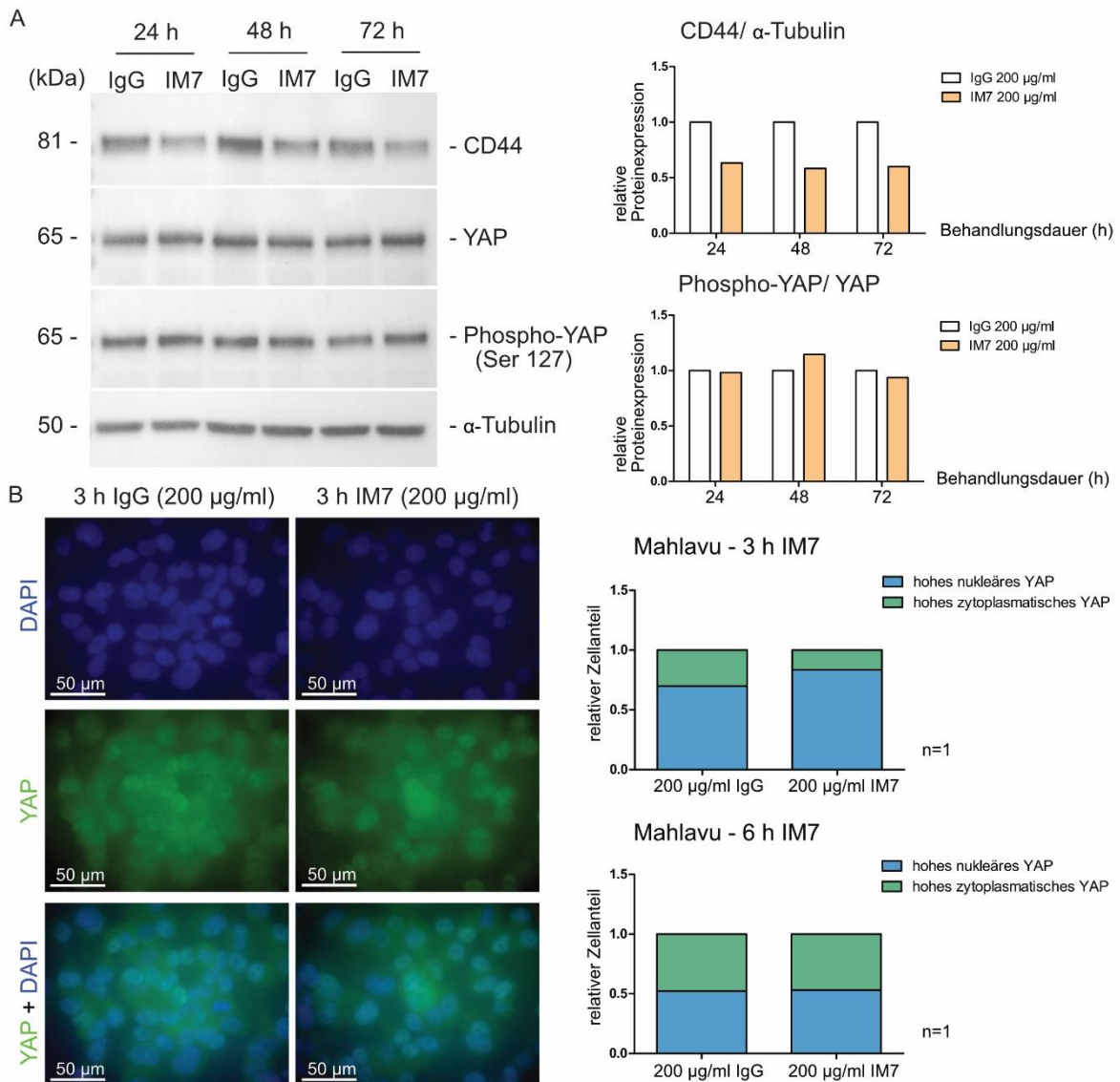
C: Auswertung der Proliferationsassays der humanen Zelllinien HepG2, HuH7 und Mahlavu nach 48 h und 72 h Behandlung mit IM7 bzw. Isotypkontrolle in unterschiedlichen Dosen von 50, 100 und 200 µg/ml, Darstellung der Mittelwerte der Triplikate mit Standardabweichung (n=1).

### 5.2.2 Einfluss von IM7 auf die Proteinexpression

Zur Evaluation des Effektes von IM7 auf die Proteinexpression wurde die humane Zelllinie Mahlavu mit der höchsten zuvor festgestellten CD44-Expression ausgewählt (siehe Abb. 6 Charakterisierung humaner HCC-Zelllinien). Da sich im MTT-Assay kein Einfluss auf die Zellproliferation gezeigt hatte, sollte evaluiert werden, ob der Antikörper auf Proteinebene überhaupt eine Wirkung zeigt. Die Mahlavu-Zellen wurden mit IM7 und unspezifischem IgG als Isotypkontrolle behandelt und nach 24 h, 48 h und 72 h der Therapie mittels Western Blot auf ihre Proteinexpression untersucht (Abb. 9A). Hier konnte eine Reduktion der CD44-Proteinexpressionlevel zu allen drei Behandlungszeitpunkten festgestellt werden. Um zu analysieren, ob bereits eine Reduktion der CD44-Proteinlevel um ca. 50 % einen Effekt auf die YAP-Expression hat, wurden die Proteinlevel von YAP und Phospho-YAP untersucht. Sowohl die YAP- als auch die Phospho-YAP-Proteinexpression blieben zu allen Zeitpunkten nahezu unverändert. Damit konnte kein Einfluss der CD44-Antikörpertherapie auf das P-YAP/YAP-Verhältnis mittels Western Blot erfasst werden, möglicherweise, weil eine Reduktion der Proteinlevel um lediglich 50 % nicht ausreichend ist.

Auch in einer YAP-Immunfluoreszenzfärbung (Abb. 9B) von Mahlavu-Zellen nach 3 h und 6 h Behandlung mit IM7 und Isotypkontrolle konnte kein Effekt auf die YAP-Expression und Proteinverteilung innerhalb der Zellen festgemacht werden. So war nach Quantifizierung bei 3 h IM7-Behandlung sogar ein minimal höherer Anteil Zellen mit hohem nukleären YAP-Anteil zu finden als nach Kontrollbehandlung. Nach 6 h war kein Unterschied in der YAP-Proteinexpression der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zu sehen.

Da nach diesen Untersuchungen keine signifikanten Ergebnisse der Behandlung mit dem CD44-Antikörper zu erwarten waren, wurden die Western Blots und Immunfluoreszenzfärbungen je nur einmal durchgeführt. Anhand dieser Untersuchungen ist davon auszugehen, dass die geringe Reduktion des CD44-Proteinlevels durch IM7 offenbar nicht ausreicht, um einen Effekt auf die YAP-Expression auszuüben.



**Abbildung 9: Effekt der IM7-Behandlung auf die YAP-Proteinexpression**

A: CD44-, YAP- und Phospho-YAP-Proteinnachweis mittels Western Blot von der Zelllinie Mhlavu mit 24 h, 48 h und 72 h IM7- bzw. IgG-Behandlung, dazugehörige Quantifizierung von CD44 im Verhältnis zu  $\alpha$ -Tubulin und Phospho-YAP zu YAP (n=1).

B: YAP-Immunfluoreszenzfärbung von Mhlavu-Zellen nach 3 h IM7- bzw. IgG-Behandlung und Quantifizierung der Zellzählung nach 3 h und 6 h Behandlung (n=1).

### 5.2.3 Einfluss von Doxorubicin auf die CD44-Antikörpertherapie

Da sich in den vorangehenden Versuchen kein Effekt von IM7 auf die Zellproliferation und YAP-Expression zeigte, wurde nun untersucht, wie sich eine zusätzliche Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin auf die CD44-Antikörpertherapie der HCC-Zelllinien auswirkt.

Das Anthrazyklin Doxorubicin gehört zur Gruppe der am häufigsten verwendeten Chemotherapeutika im Rahmen einer TACE im HCC. Doxorubicin interkaliert in die DNA-Doppelhelix, hemmt die Topoisomerase II und generiert reaktive Sauerstoffspezies (ROS), womit es apoptotische Signalwege induziert (Buschauer, Koch, Wiggermann, Muller, &

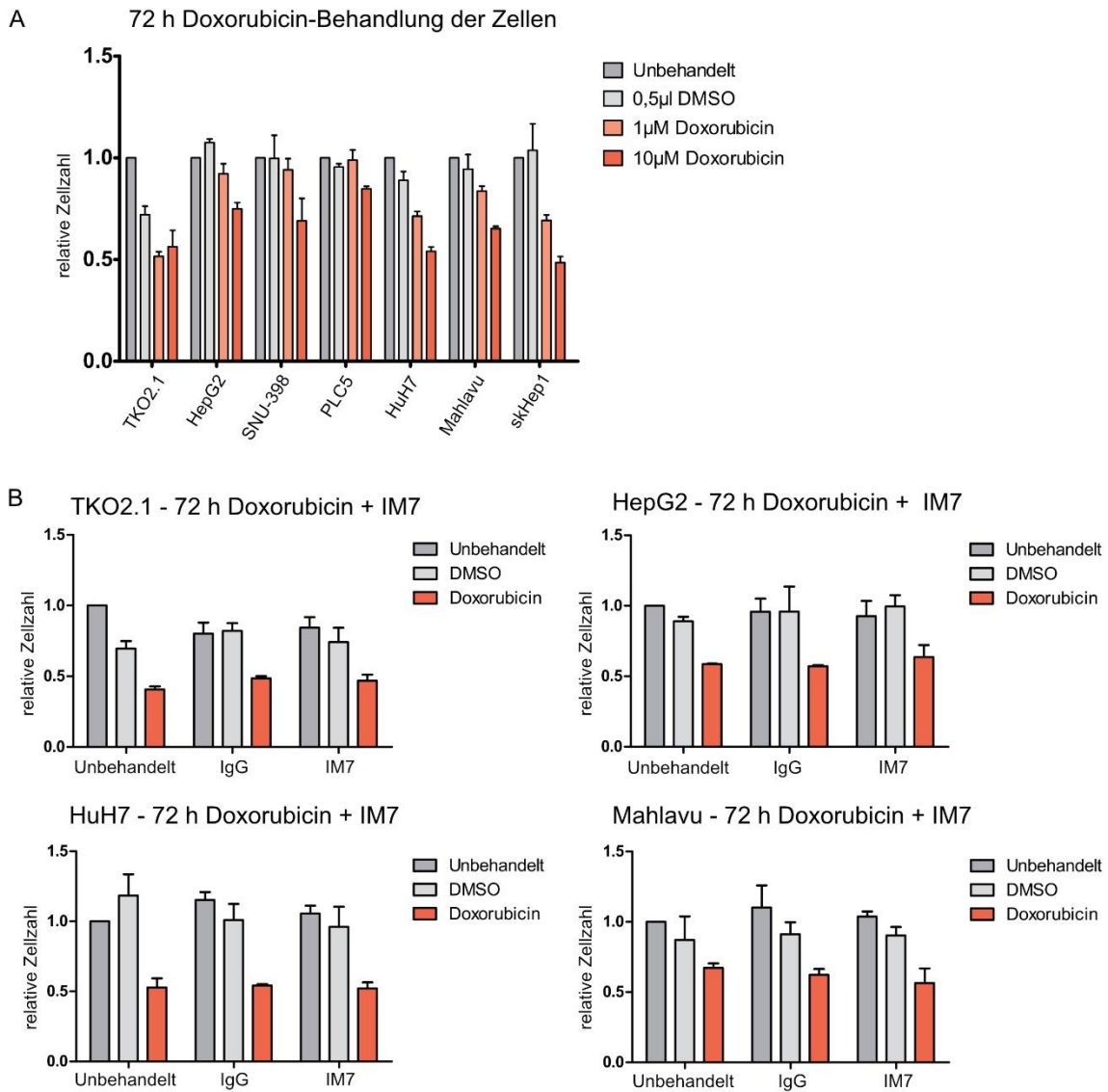


Hellerbrand, 2018). Durch die Induktion von DNA-Schäden wirkt Doxorubicin sensitivierend für eine Radiotherapie (Supiot et al., 2005). Zusätzlich wurde Doxorubicin bereits genutzt, um die Empfänglichkeit von Tumorzellen (malignes Melanom und Mammakarzinom) für Immuntherapien zu erhöhen und die zytotoxische Wirkung zu verbessern (Sawasdee et al., 2022; Wennerberg et al., 2013). Aufgrund dieser Eigenschaften wurde mithilfe einer Kombinationsbehandlung untersucht, ob diese die Wirkung einer CD44-Antikörpertherapie beeinflussen kann.

Zuerst wurden die Zelllinien zur Dosisfindung mit 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin und DMSO als Kontrolle behandelt (Abb. 10A). Mit 1  $\mu\text{M}$  Doxorubicin zeigte sich bei den Zelllinien HepG2, SNU-398 und PLC5 keine Reduktion der Proliferation nach 72 h im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, während die restlichen Zelllinien (TKO2.1, HuH7, Mahlavu und skHep1) bereits bei dieser Dosis eine Reduktion der Zellzahl zeigten. Bei allen humanen Zelllinien konnte eine dosisabhängige Proliferationsreduktion festgestellt werden mit einer stärkeren Proliferationshemmung unter 10  $\mu\text{M}$  Doxorubicin. Es wurde deshalb diese Dosis für die Kombinationsbehandlung mit dem CD44-Antikörper IM7 und Doxorubicin für alle weiteren Versuche gewählt.

Durch die kombinierte Therapie von IM7 und Doxorubicin sollte die Wirksamkeit der CD44-Antikörpertherapie auf die HCC-Zelllinien bei begleitender Doxorubicin-Chemotherapie evaluiert werden (Abb. 10B). Nach 72 h der Kombinationstherapie war weiterhin eine Proliferationsreduktion durch Doxorubicin im Vergleich zur DMSO-Kontrolle bei allen getesteten Zelllinien (TKO2.1, HepG2, HuH7, Mahlavu) erkennbar. Die CD44- und IgG-Antikörpertherapie konnte allerdings wie in den vorangegangenen MTT-Assays keine Hemmung des Zellwachstums bewirken. Weiterhin konnte auch kein Einfluss der Doxorubicintherapie auf die Wirkung der IM7- bzw. IgG-Behandlung festgestellt werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse scheint die CD44-Hemmung weiterhin nicht ausreichend für einen therapeutischen Effekt. Auch der Versuch einer Sensitivierung der Zellen durch Doxorubicin bewirkt keine Proliferationsreduktion der untersuchten HCC-Zellen im Vergleich zur Isotypkontrolle.



**Abbildung 10: Doxorubicin-Behandlung und Kombinationsbehandlung mit IM7**

A: Quantifizierung von MTT-Assays der Zelllinien TKO2.1, HepG2, SNU-398, PLC5, HuH7, Mahlavu und skHep1 nach 72 h Behandlungsdauer mit unterschiedlichen Dosen von Doxorubicin und DMSO als Kontrolle, Darstellung als Mittelwert der Triplikate mit Standardabweichung (n=1).

B: Quantifizierung der MTT-Assays der Kombinationsbehandlung bestehend aus Doxorubicin (10 µM) und IM7 bzw. IgG (200 µg/ml) über 72 h an den Zelllinien TKO2.1, HepG2, HuH7 und Mahlavu, Darstellung als Mittelwert der Triplikate mit Standardabweichung (n=1).

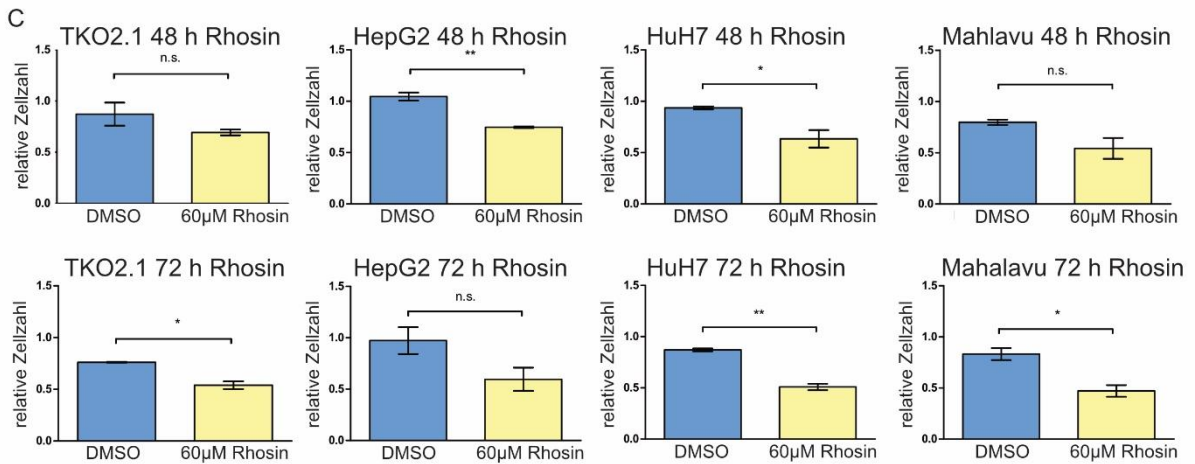
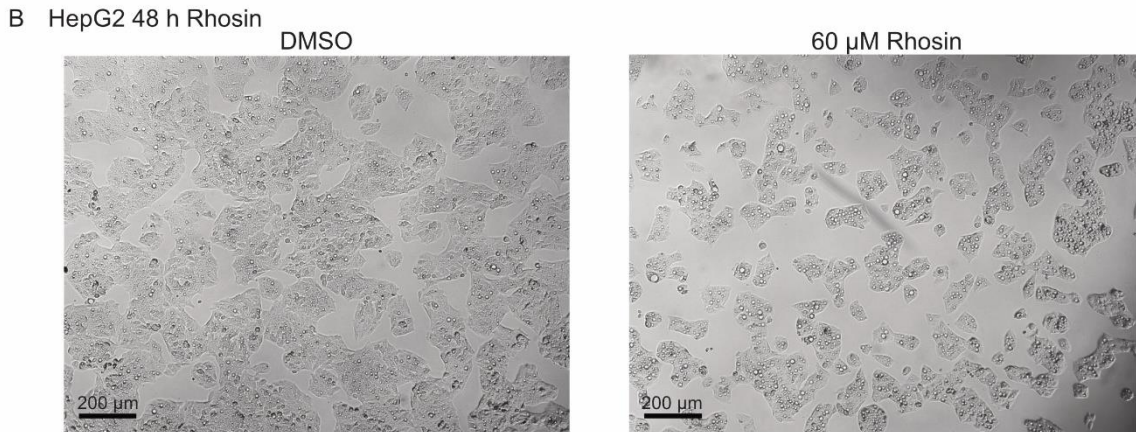
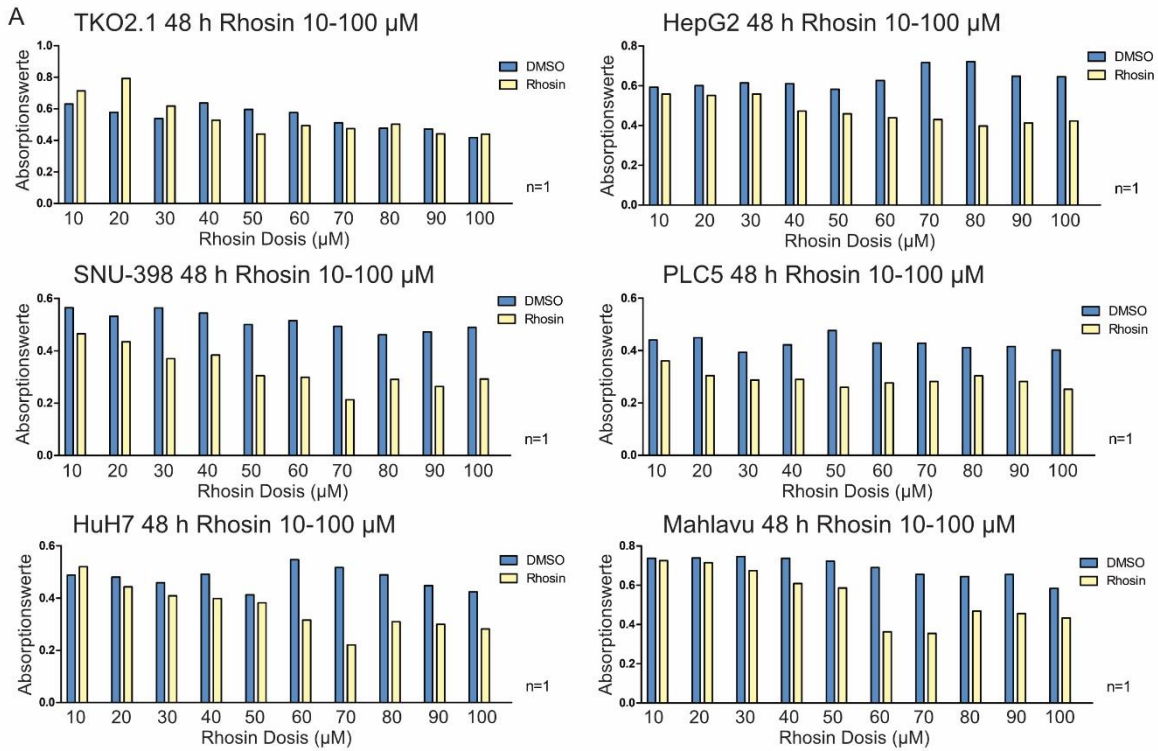
### 5.3 Beeinflussung der Zellen durch den RhoA-Inhibitor Rhosin

#### 5.3.1 Einfluss von Rhosin auf die Zellproliferation

Da eine Beeinflussung der CD44/RhoA/YAP-Achse auf Höhe von CD44 mittels CD44-Antikörper keine Proliferationsinhibition und Reduktion der YAP-Proteinexpression erzielte, aber aufgrund der Vordaten im murinen Modell mit gezieltem *Knock-down* von *Cd44* ausreichend Hinweise auf einen Einfluss von CD44 auf die YAP-Expression bestehen, ist am ehesten von einer nicht ausreichenden Antikörperwirkung auszugehen. Es wurde daher im zweiten Schritt eine Beeinflussung der CD44/RhoA/YAP-Achse über eine Inhibition des kleinen GTPase-Proteins RhoA durch den Inhibitor Rhosin getestet. Rhosin wurde durch ein Ligandenscreening als RhoA-Inhibitor identifiziert. Es bindet an die Oberfläche von RhoA über Trp58, unterdrückt die Interaktion mit aktivierenden GEFs und blockiert RhoA-vermittelte Zytoskelettaktivität und die Invasivität von Mammakarzinom-Zellen (Smithers & Overduin, 2016).

Um eine optimale Dosis zu finden, wurden zunächst die Zelllinien TKO2.1, HepG2, SNU-398, PLC5, HuH7 und Mahlavu mit Rhosin und DMSO in Konzentrationen zwischen 10-100  $\mu\text{M}$  behandelt und die Ergebnisse der MTT-Assays nach 48 h und 72 h ausgewertet (Abb. 11A). Ab einer Dosis von 40  $\mu\text{M}$  Rhosin kam es bei allen Zelllinien zu einer Inhibierung der Zellproliferation nach 48 h. Die Zelllinie TKO2.1 reagierte am stärksten auf die DMSO-Kontrolle, wobei ab einer Dosis von 70  $\mu\text{M}$  kein großer Unterschied zwischen der Rhosin-Behandlung und DMSO sichtbar war. Auch nach 72 h ( $n=1$ , Daten nicht gezeigt) zeigten die Zelllinien eine dosisabhängige Proliferationsreduktion durch Rhosin, allerdings reagierten die Zellen zu diesem Behandlungszeitpunkt auch stärker auf das als Kontrolle verwendete DMSO. Aufgrund dieser Daten wurde die Rhosin-Behandlung in den folgenden Experimenten mit einer Dosis von 60  $\mu\text{M}$  fortgeführt. Diese Rhosin-Dosis führte bei allen Zellen zu einer Proliferationsreduktion im Vergleich zur DMSO-Kontrollbehandlung.

Repräsentative lichtmikroskopische Bilder der Zelllinie HepG2 nach 48 h Behandlungsdauer mit DMSO-Kontrolle und Rhosin zeigten bereits einen antiproliferativen Effekt der Rhosin-Behandlung (Abb. 11B). Hier konnte bei der Behandlung mit 60  $\mu\text{M}$  Rhosin im Vergleich mit einer DMSO-Kontrolle sowohl nach 48 h als auch nach 72 h (nicht dargestellt) ein deutlicher Unterschied in der Zelldichte festgestellt werden. Mikroskopische Bilder der anderen Zelllinien (Bilder nicht gezeigt) ließen ebenfalls eine Beeinflussung der Zelldichte durch die Rhosin-Behandlung feststellen. Insgesamt wurde auch bei allen Zelllinien nach Quantifizierung der MTT-Assays (Abb. 11C) eine signifikante Inhibition der Proliferation entweder nach 48 h oder 72 h durch die Rhosin-Behandlung nachgewiesen. Die stärkste Reduktion nach 48 h zeigte die HepG2-Zelllinie, nach 72 h wurden v.a. HuH7- und Mahlavu-Zellen in ihrem Wachstum gehemmt.



**Abbildung 11: Einfluss der Rhosin-Behandlung auf die Zellproliferation**

A: Auswertung der MTT-Assays der Zelllinien TKO2.1, HepG2, SNU-398, PLC5, HuH7 und Mahlavu mit Rhosin-Dosen von 10-100  $\mu\text{M}$  nach 48 h mit DMSO-Kontrolle zur Findung der optimalen Behandlungsdosis (n=1).

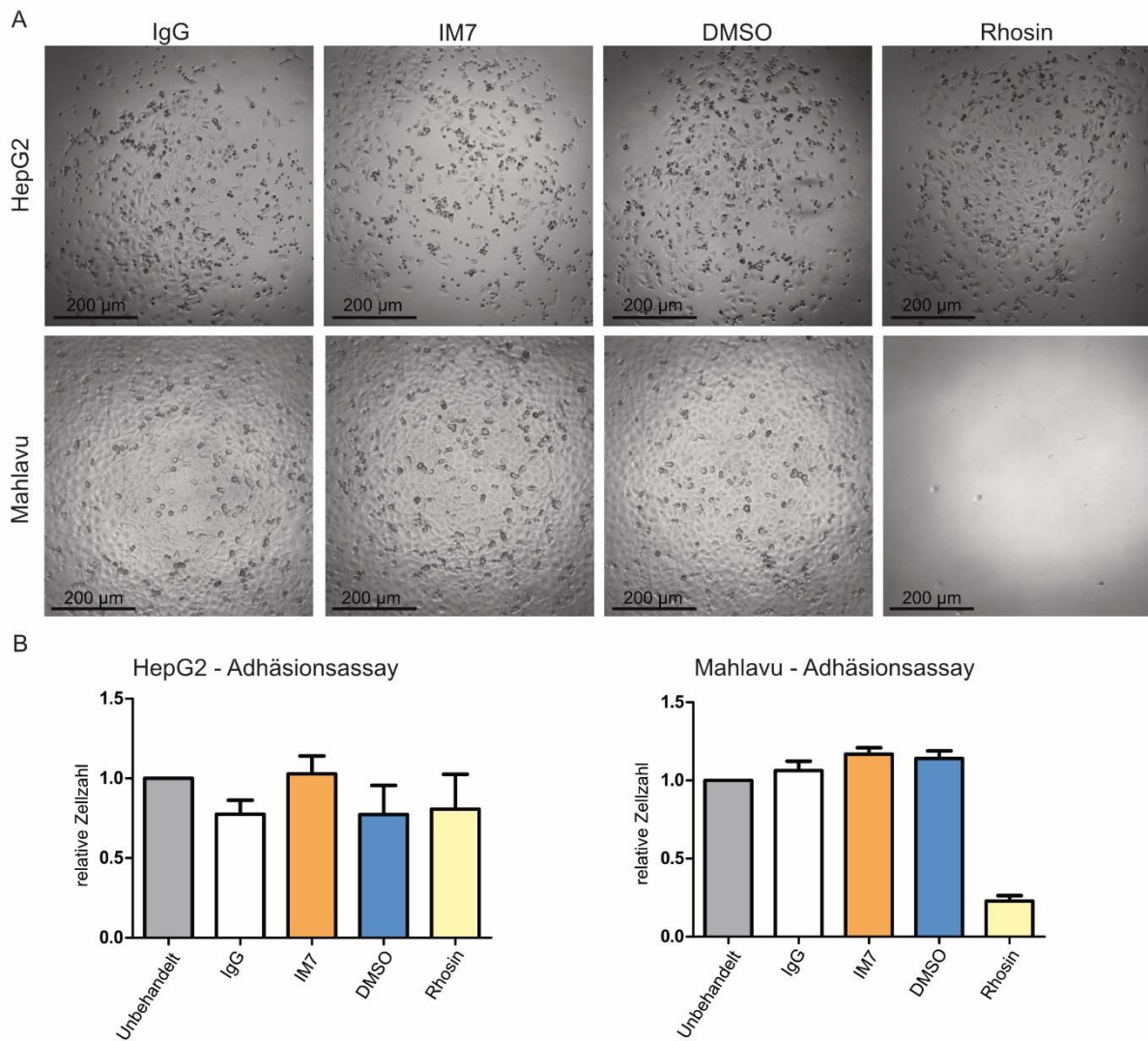
B: Exemplarische mikroskopische Bilder der Zelllinie HepG2 nach 48 h DMSO- bzw. Rhosin-Behandlung (60  $\mu\text{M}$ ).

C: Auswertung der MTT-Assays von TKO2.1-, HepG2-, HuH7- und Mahlavu-Zellen nach 48 h und 72 h Rhosin-Behandlung (60  $\mu\text{M}$ ) mit Signifikanzbestimmung mittels t-Test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , n.s. nicht signifikant), Darstellung als Mittelwert mit Standardabweichung (n=3).

Um einen möglichen Einfluss der Behandlungen, sowohl mit dem CD44-Antikörper IM7 als auch mit Rhosin, auf die Adhäsionsfähigkeit der Zellen zu untersuchen, wurde ein Adhäsionsassay mit HepG2- und Mahlavu-Zellen durchgeführt und die Anzahl der lebensfähigen Zellen danach mittels Mikroskopie (Abb. 12A) und MTT-Assay (Abb. 12B) evaluiert.

Der CD44-Antikörper RG7356 konnte bereits in einem *in vitro* Zelladhäsionsassay die Adhäsion von CD44-positiven Zellen konzentrationsabhängig hemmen (Birzele et al., 2015). Bei der Behandlung mit dem CD44-Antikörper IM7 konnte allerdings sowohl mikroskopisch als auch bei der Quantifizierung des MTT-Assays bei beiden Zelllinien kein Unterschied der Adhäsionsfähigkeit im Vergleich zur verwendeten Isotypkontrolle festgestellt werden.

Auch die Rhosin-Behandlung hatte bei den HepG2-Zellen keinen Einfluss auf die Zelladhäsion, bei Mahlavu-Zellen kam es jedoch zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Adhäsionsfähigkeit der Zellen nach der durchgeführten Rhosin-Therapie. Hier waren mikroskopisch nur vereinzelt adhärenente Zellen zu erkennen, während bei der DMSO-Kontrolle nahezu eine konfluente Zelldichte bestand. Auch bei der Quantifizierung konnte unter Rhosin-Behandlung eine relative Abnahme der Zellzahl auf etwa ein Viertel der Kontrolle nachgewiesen werden.



**Abbildung 12: Adhäsionsassay der HepG2- und Mahlavu-Zellen**

A: Mikroskopische Bilder von HepG2-Zellen (oben) und Mahlavu-Zellen (unten) nach IM7-Behandlung (Dosis 200 µg/ml) bzw. Isotypkontrolle und Rhosin (60 µM) oder DMSO-Kontrolle nach 24 h.

B: Quantifizierung des Adhäsionsassays nach 24 h im Vergleich zu unbehandelten Zellen, Darstellung als Mittelwert der Triplikate mit Standardabweichung (n=1).

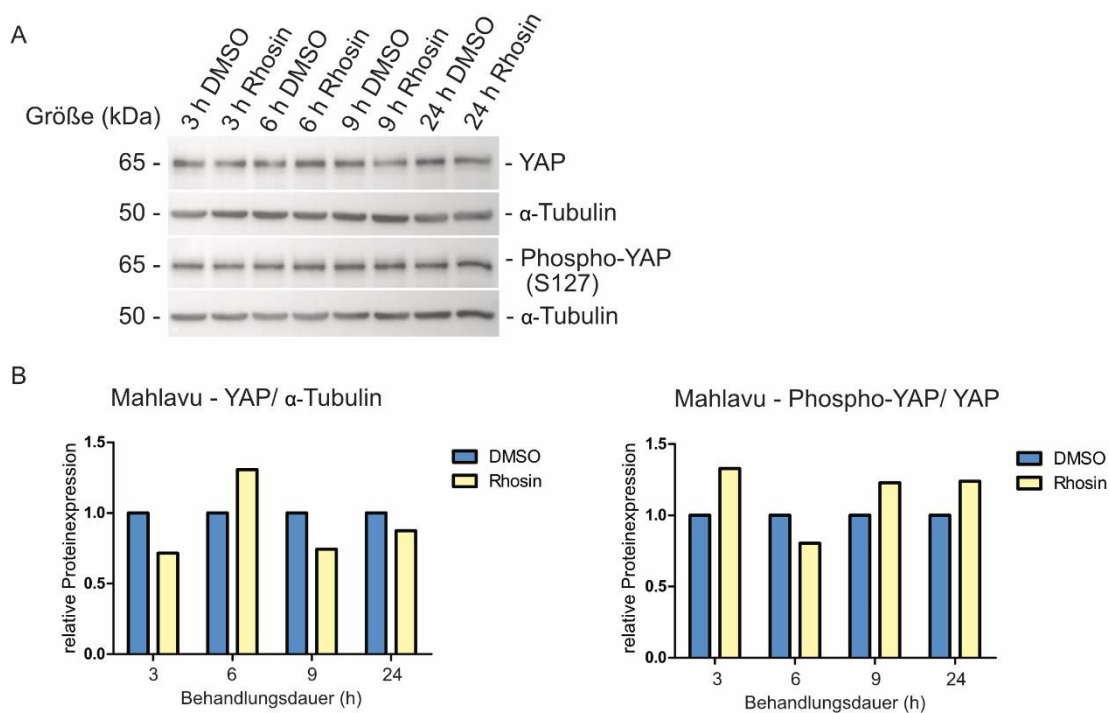
### 5.3.2 Beeinflussung der YAP-Proteinexpression durch Rhosin

Um eine mögliche Beeinflussung der YAP- bzw. Phospho-YAP-Proteinexpression durch die Rhosin-Behandlung zu untersuchen, wurden zunächst Western Blots aus Ganzzelextrakten der Zelllinien HepG2, Mahlavu, HuH7 und TKO2.1 nach unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten durchgeführt.

Anhand der Bilder der Western Blot-Proteinbanden war kein eindeutiger Unterschied der YAP- oder Phospho-YAP-Proteinexpression bei allen vier Zelllinien ersichtlich (Abb. 13-15). Bei mehrfach durchgeführten Western Blots waren die minimalen Unterschiede der YAP-Proteinexpression teilweise nicht reproduzierbar. Für die Zelllinie Mahlavu wurde außerdem die Rhosin-Behandlung mit zwei verschiedenen Zelldichten evaluiert, um einen möglichen

Einfluss der Konfluenz auf die Wirksamkeit von Rhosin zu untersuchen (Daten nicht gezeigt). Durch Quantifizierung der Proteinbanden nach Rhosin-Behandlung konnten für beide Zelldichten ähnliche Ergebnisse im Hinblick auf YAP- und Phospho-YAP-Proteinexpression und P-YAP/YAP-Ratio nachgewiesen werden. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Zelldichte keinen relevanten Einfluss auf die Western Blot-Ergebnisse nach Rhosin-Behandlung ausübt. Für die Zelllinien HepG2, HuH7 und TKO2.1 wurde daraufhin nur eine Zelldichte für die weiteren Versuche verwendet.

In Abbildung 13 sind die Ergebnisse der Western Blots von Mahlavu-Zellen nach Rhosin-Behandlung dargestellt. Die Proteinbanden (Abb. 13A) und die Quantifizierung (Abb. 13B) zeigten allenfalls eine leichte Reduktion der YAP-Proteinexpression nach 9 h Rhosin-Behandlung. Das Verhältnis von inaktivem Phospho-YAP zu YAP ist zu diesem Behandlungszeitpunkt gering erhöht.

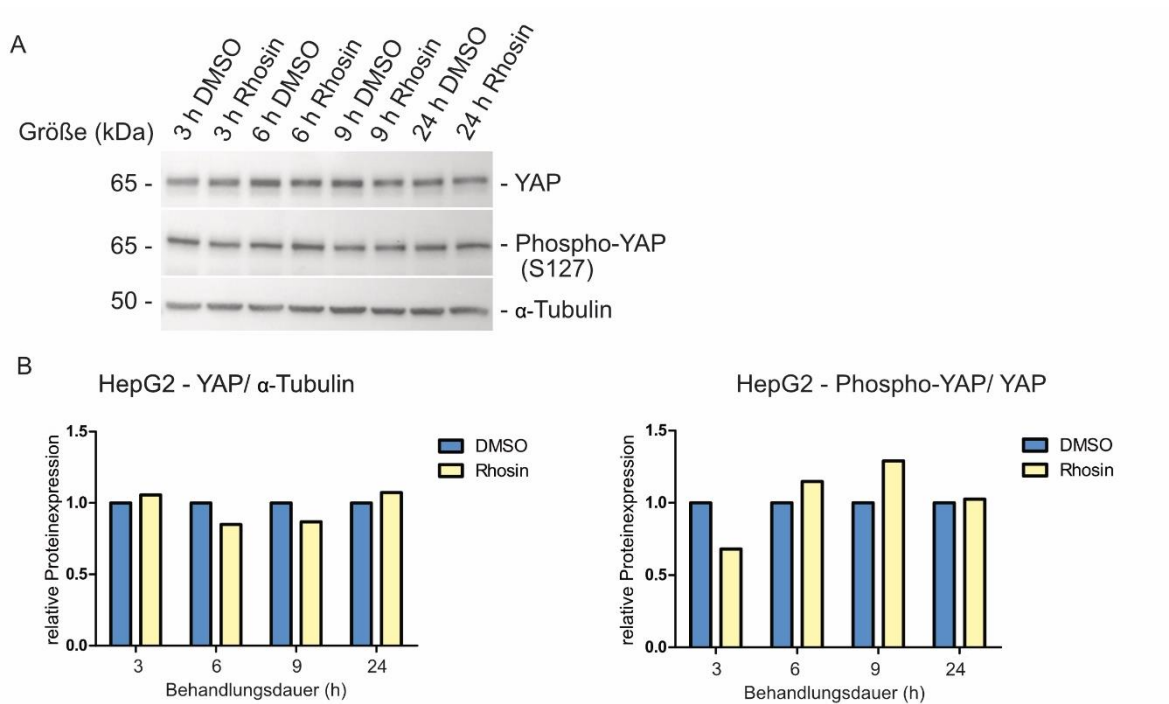


**Abbildung 13: Western Blots der Zelllinie Mahlavu nach Rhosin-Behandlung**

A: Proteinnachweis von YAP, Phospho-YAP und  $\alpha$ -Tubulin mittels Western Blot der Zelllinie Mahlavu nach 3 h, 6 h, 9 h und 24 h Behandlung mit Rhosin (60  $\mu$ M) bzw. DMSO als Kontrolle.

B: Dazugehörige Quantifizierung von YAP im Verhältnis zu  $\alpha$ -Tubulin und Phospho-YAP im Verhältnis zu YAP (n=1).

Bei den HepG2-Zellen führte die Rhosin-Behandlung über 6 h und 9 h auch zu einer minimalen Abnahme der YAP-Proteinexpression (Abb. 14A). Die Quantifizierung (Abb. 14B) zeigte analog dazu eine leichte Zunahme des Phospho-YAP/YAP-Verhältnisses durch Rhosin.

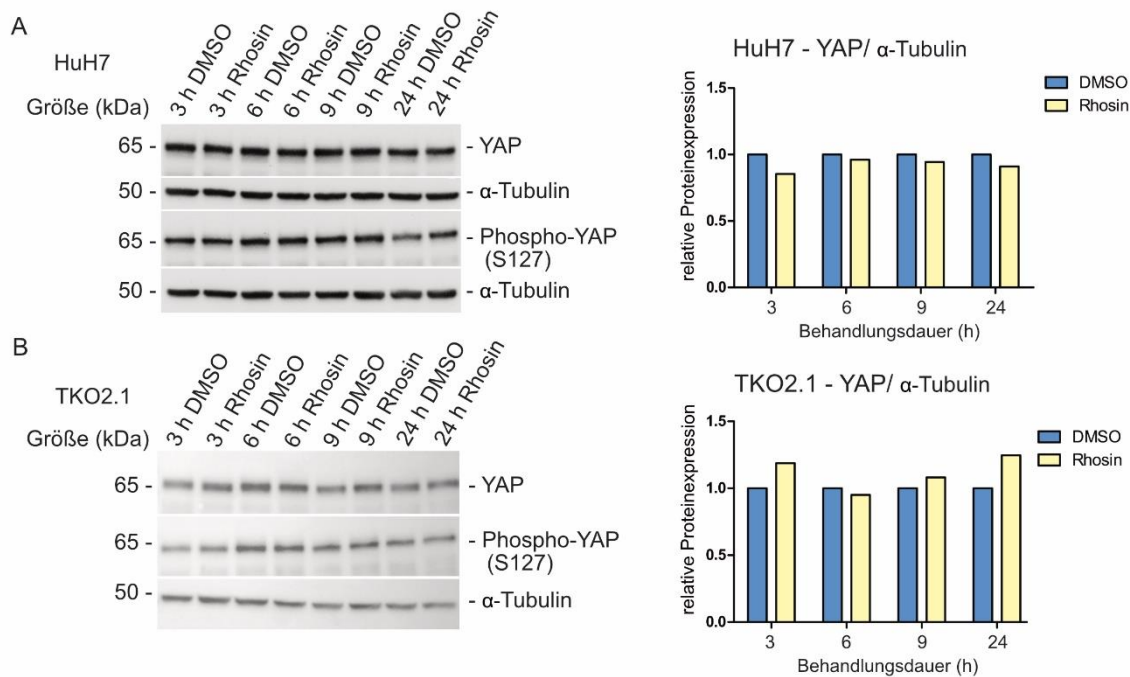


**Abbildung 14: Western Blots der Zelllinie HepG2 nach Rhosin-Behandlung**

A: Proteinnachweis von YAP, Phospho-YAP und  $\alpha$ -Tubulin mittels Western Blot der Zelllinie HepG2 nach 3 h, 6 h, 9 h und 24 h Behandlung mit Rhosin (60  $\mu$ M) bzw. DMSO als Kontrolle.  
B: Quantifizierung der Western Blots mit Darstellung des Verhältnisses von YAP zu  $\alpha$ -Tubulin und Phospho-YAP im Verhältnis zu YAP (n=1).

Für die Zelllinie HuH7 (Abb. 15A) war anhand der Western Blot-Proteinbanden und auch mittels Quantifizierung kein relevanter Unterschied zwischen Rhosin- und DMSO-Behandlung identifizierbar. Auch bei den TKO2.1-Zellen (Abb. 15B) waren keine wesentlichen Unterschiede in der YAP-Proteinexpression durch die Rhosin-Behandlung zu erkennen. Über alle Zelllinien hinweg war insgesamt also keine eindeutige Veränderung durch die Rhosin-Behandlung feststellbar, auch wenn einzelne Zeitpunkte und Zelllinien eine geringe Reduktion der YAP-Proteinexpression und eine Zunahme des Verhältnisses von Phospho-YAP zu YAP zeigten.





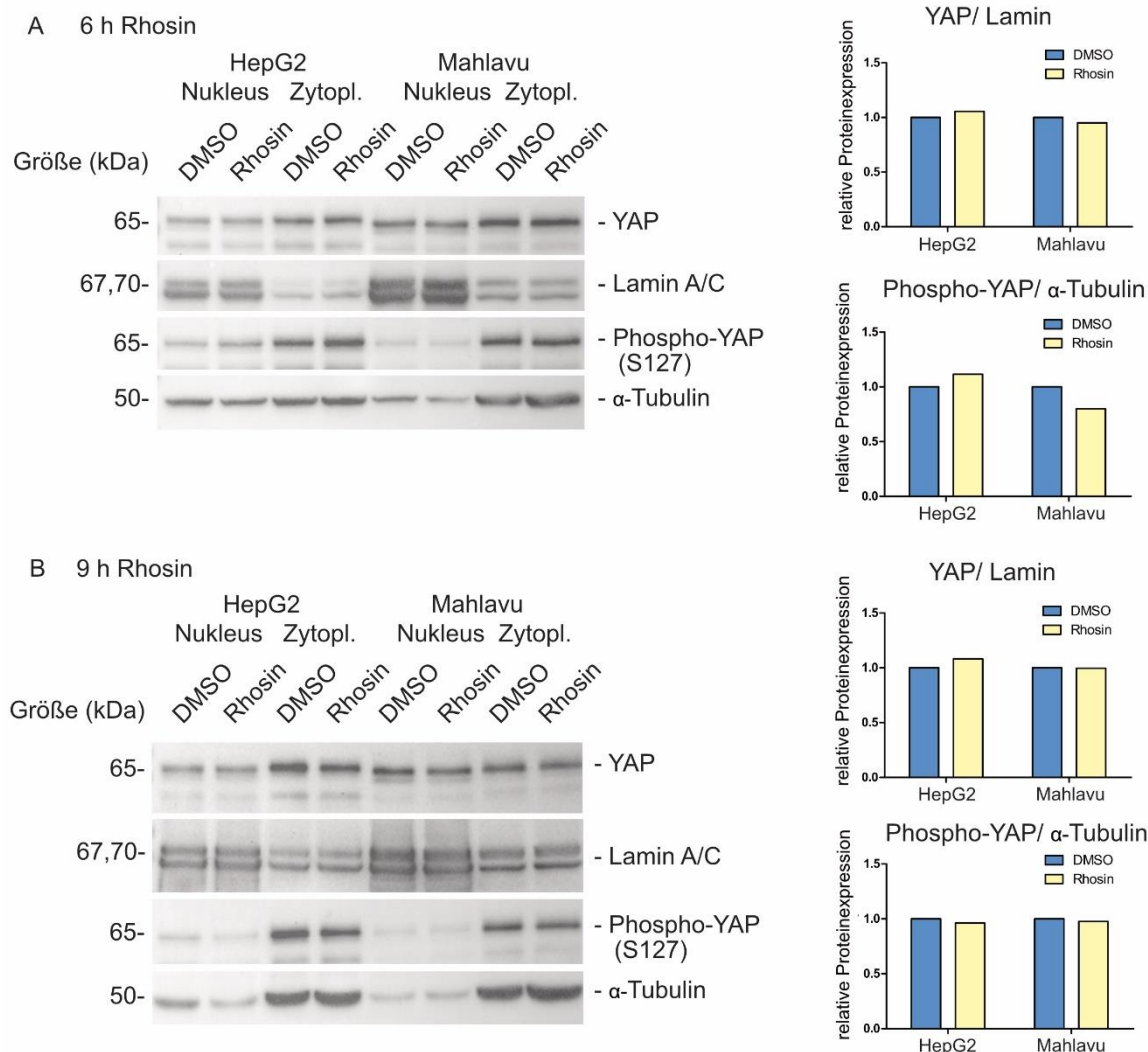
**Abbildung 15: Western Blots der Zelllinien TKO2.1 und HuH7 nach Rhosin-Behandlung**

A: Proteinnachweis von YAP, Phospho-YAP und  $\alpha$ -Tubulin mittels Western Blot der Zelllinie HuH7 nach 3 h, 6 h, 9 h und 24 h Behandlung mit Rhosin (60  $\mu$ M) bzw. DMSO als Kontrolle mit Quantifizierung des Verhältnisses von YAP zu  $\alpha$ -Tubulin (n=1).

B: Proteinnachweis von YAP, Phospho-YAP und  $\alpha$ -Tubulin mittels Western Blot von Zelllinie TKO2.1 nach 3 h, 6 h, 9 h und 24 h Behandlung mit Rhosin (60  $\mu$ M) bzw. DMSO als Kontrolle mit Quantifizierung des Verhältnisses von YAP zu  $\alpha$ -Tubulin (n=1).

Da in den Western Blots aus Ganzzellextrakten mögliche Unterschiede in der Proteinexpression in Zytoplasma und Zellkern gegebenenfalls nicht ausreichend abgebildet werden, sollte mithilfe von nukleärer Extraktion untersucht werden, ob sich der Anteil von transkriptionell aktivem YAP im Nukleus bzw. der Anteil von inaktivem zytoplasmatischen Phospho-YAP durch die Behandlung mit Rhosin verändert. Abbildung 16 zeigt die Western Blots von YAP und Phospho-YAP mit Lamin A/C als nukleäre Proteinladekontrolle und mit der zytoplasmatischen Ladekontrolle  $\alpha$ -Tubulin. Dabei wurden die Zelllinien HepG2 und Mahlavu und die Rhosin-Behandlungszeitpunkte von 6 h und 9 h verwendet. Es konnte keine eindeutige Veränderung der Proteinexpressionen gezeigt werden, allerdings konnte anhand der Verteilung der Proteinladekontrollen (Lamin A/C im Zellkern und  $\alpha$ -Tubulin im Zytoplasma) davon ausgegangen werden, dass die nukleäre Extraktion und Darstellung der subzellulären Fraktion nur zum Teil erfolgreich war, da sich Lamin A/C auch zum Teil in der zytoplasmatischen Fraktion nachweisen ließ.

Bei HepG2- sowie Mahlavu-Zellen war nach 6 h (Abb. 16A) und 9 h (Abb. 16B) Rhosin-Behandlung weder im Zellkern noch im Zytoplasma ein relevanter Unterschied der Proteinexpressionen von Phospho-YAP bzw. YAP feststellbar.



**Abbildung 16: Nukleäre und zytoplasmatische Proteinexpression in HepG2- und Mahlavu-Zellen nach Rhosin-Behandlung**

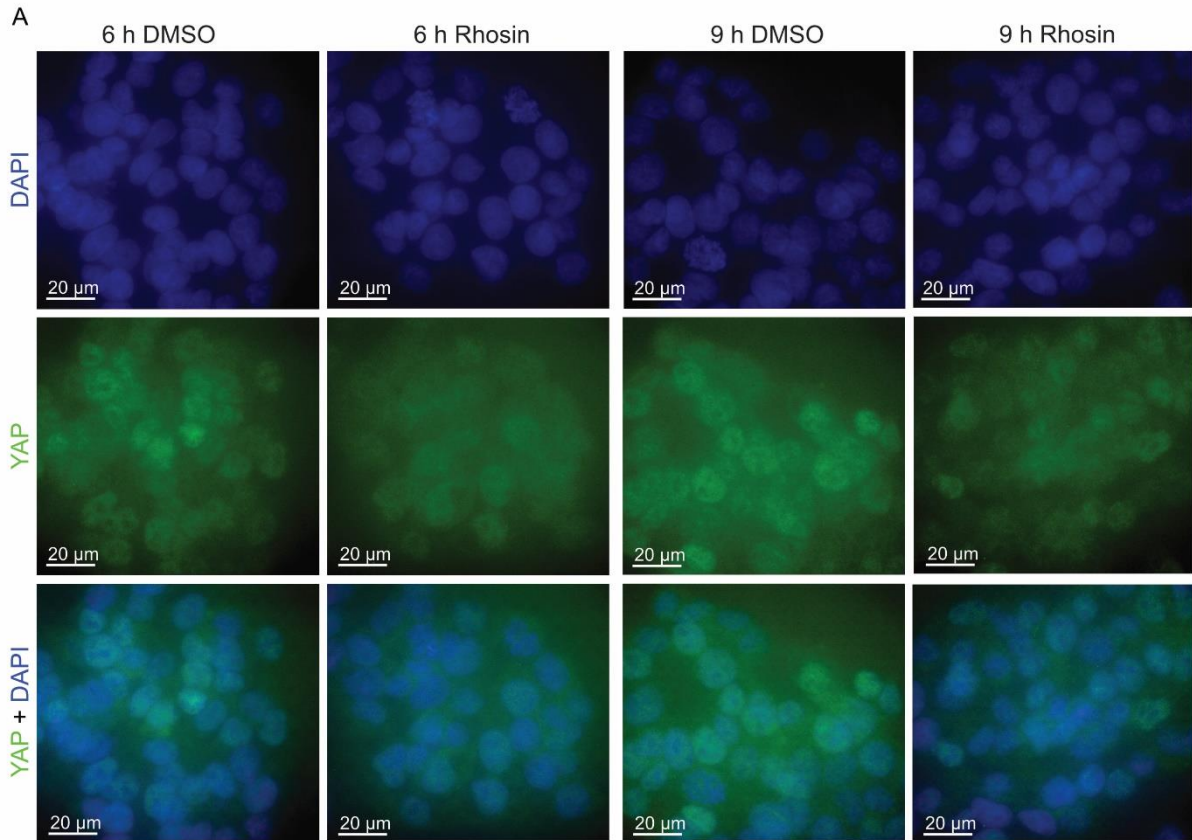
A: Proteinnachweis mittels Western Blot von YAP, Phospho-YAP, Lamin A/C und  $\alpha$ -Tubulin in Nucleus und Zytoplasma nach 6 h Rhosin-Behandlung (60  $\mu$ M) bzw. DMSO-Kontrolle der Zelllinien HepG2 und Mahlavu mit Quantifizierung der relativen Proteinexpression von YAP im Verhältnis zu Lamin und Phospho-YAP zu  $\alpha$ -Tubulin (n=1).

B: Proteinnachweis mittels Western Blot von YAP, P-YAP, Lamin A/C und  $\alpha$ -Tubulin in Nucleus und Zytoplasma nach 9 h Rhosin-Behandlung (60  $\mu$ M) bzw. DMSO-Kontrolle der Zelllinien HepG2 und Mahlavu mit dazugehöriger Quantifizierung der relativen Proteinexpression von YAP im Verhältnis zu Lamin und Phospho-YAP zu  $\alpha$ -Tubulin (n=1).

Die Änderung der YAP-Proteinexpression zeigte mittels Western Blot bei allen Zelllinien nur minimale Unterschiede, wobei ein getrennter Nachweis in Zytoplasma und Kern nur eingeschränkt möglich war. Daher sollte mithilfe von YAP-Immunfluoreszenzfärbungen ermittelt werden, ob die durchgeführte Rhosin-Behandlung die Verteilung von YAP innerhalb der Zelle signifikant beeinflussen kann. Die Behandlung erfolgte über 6 h und 9 h jeweils mit 60  $\mu$ M Rhosin und einer DMSO-Kontrolle für die humanen Zelllinien HepG2, Mahlavu, HuH7 und die murine Zelllinie TKO2.1.

Abbildung 17 zeigt exemplarische Bilder der Immunfluoreszenzfärbungen der HepG2-Zellen und die dazugehörige graphische Darstellung der Analyse der Zellzählungen zu den verschiedenen Behandlungszeitpunkten. Nach 6 h und 9 h Behandlung mit Rhosin wurde sowohl anhand der Bilder (Abb. 17A) als auch mittels Quantifizierung (Abb. 17B) eine Reduktion von nukleärem YAP deutlich. Die Bilder zeigten zu beiden Behandlungszeitpunkten eine weniger starke YAP-Färbung, insbesondere nukleär. Die Quantifizierung der Zellzählungen stellte eine signifikante Verschiebung der YAP-Proteinexpression mit Erhöhung der zytoplasmatischen YAP- und gleichzeitig Reduktion der nukleären YAP-Expression dar (n=3).

Diese Ergebnisse bestätigten eine Reduktion von nukleärem YAP und eine Zunahme des Phospho-YAP/YAP-Verhältnisses nach 6 h und 9 h Rhosin-Behandlung, die bereits in den durchgeführten Western Blots der HepG2-Zellen angedeutet wurden (siehe Abb. 14 und 16).



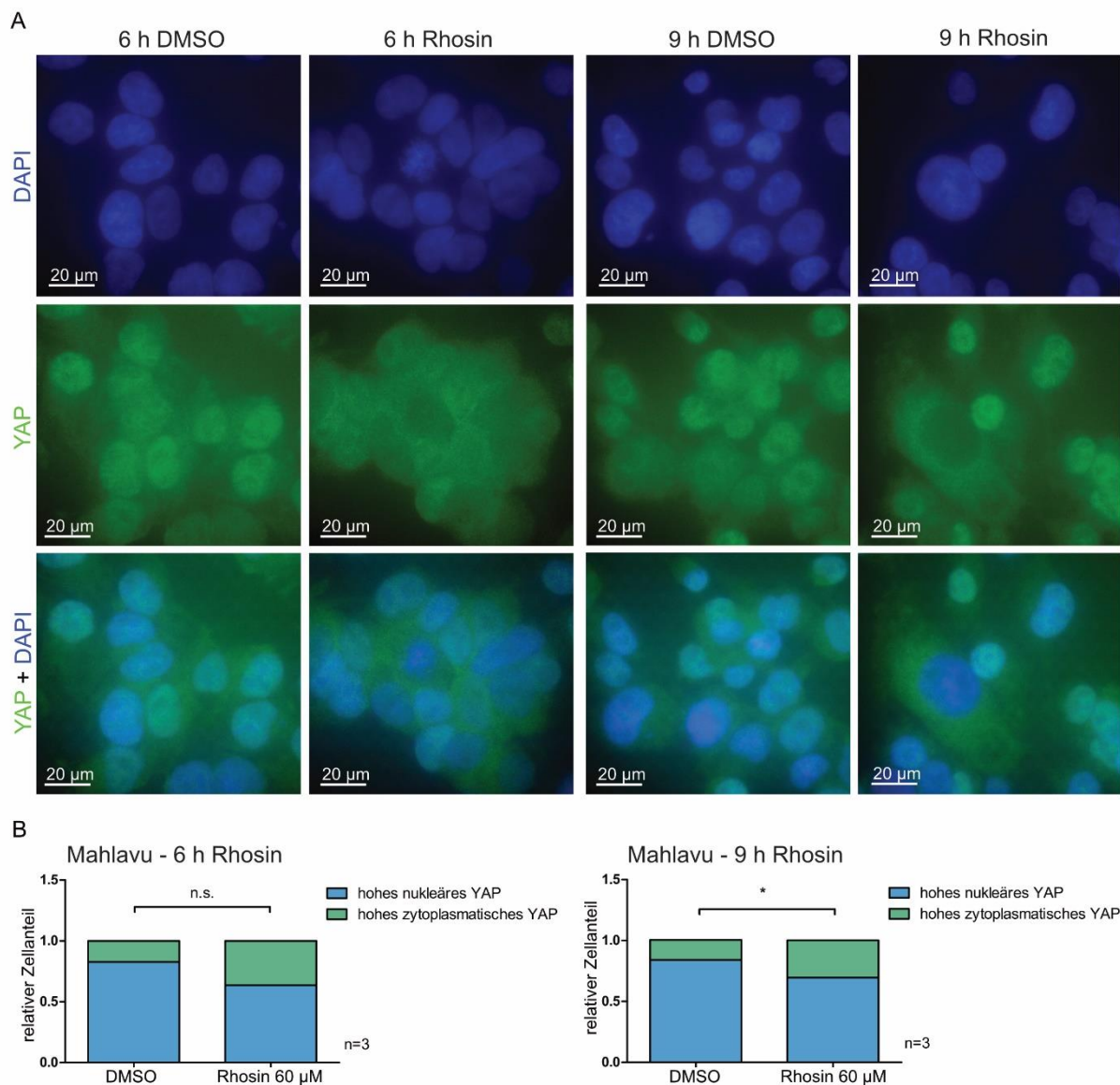
**Abbildung 17: YAP-Immunfluoreszenzfärbung von HepG2-Zellen**

A: Immunfluoreszenz-Bilder der HepG2-Zellen nach 6 h und 9 h DMSO- bzw. Rhosin-Behandlung (60 µM), Kerne blau gefärbt mit DAPI, YAP in grün.

B: Quantifizierung der nukleären bzw. zytoplasmatischen YAP-Proteinexpression nach 6 h und 9 h Rhosin-Behandlung (60 µM) mit Signifikanzbestimmung mittels t-Test (\* $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ).

Analog zu der Immunfluoreszenzfärbung der HepG2-Zellen wurden auch YAP-Immunfluoreszenzfärbungen der Zelllinie Mahlavu durchgeführt (Abb. 18). Nach 6 h Rhosin-Behandlung konnte im Vergleich zur DMSO-Kontrolle eine reduzierte nukleäre und erhöhte zytoplasmatische YAP-Proteinexpression nachgewiesen werden, allerdings ohne eine Signifikanz der Ergebnisse. Die mikroskopischen Bilder der Immunfluoreszenz (Abb. 18A) zeigten zu diesem Zeitpunkt schon vereinzelt nukleäre Aussparungen der YAP-Färbung. Nach 9 h Rhosin-Behandlung kam es zu einer signifikanten Reduktion der nukleären YAP-Expression (Abb. 18B). Auch zu diesem Behandlungszeitpunkt war anhand der Bilder eine

geringere nukleäre YAP-Färbung erkennbar im Sinne einer weniger deutlichen Darstellung der Kerne mittels grünen Fluoreszenzsignals und vereinzelter Aussparungen des Zellkerns.



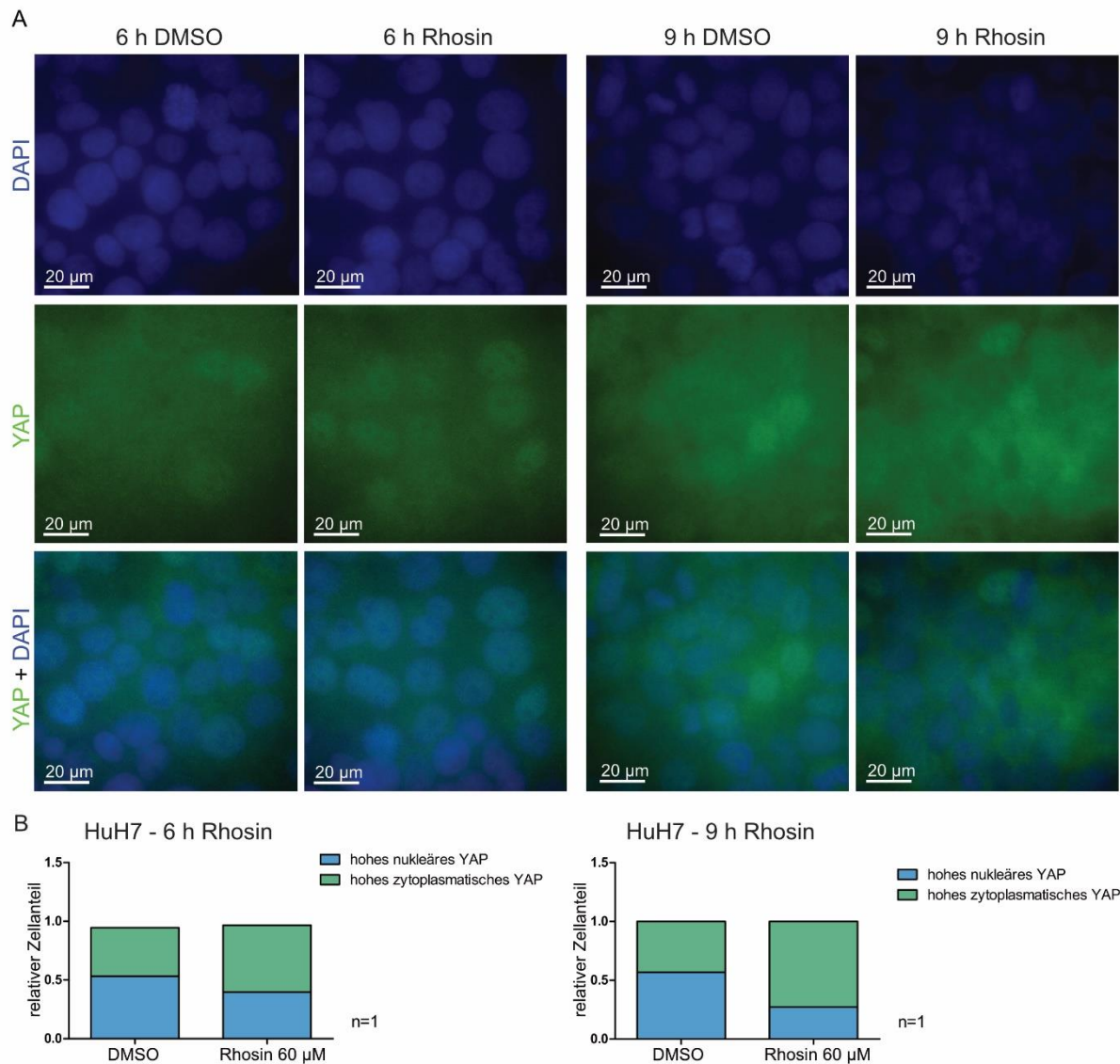
**Abbildung 18: YAP-Immunfluoreszenzfärbung von Mahlavu-Zellen**

A: Immunfluoreszenz-Bilder der Mahlavu-Zellen nach 6 h und 9 h DMSO- bzw. Rhosin-Behandlung (60  $\mu$ M), Kerne blau gefärbt mit DAPI, YAP in grün.

B: Quantifizierung der nukleären bzw. zytoplasmatischen YAP-Proteinexpression nach 6 h und 9 h Rhosin-Behandlung (60  $\mu$ M) mit Signifikanzbestimmung mittels t-Test (\* $p < 0.05$ , n.s. nicht signifikant, n=3).

Die HuH7-Zellen zeigten sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Rhosin-Behandlung eine eher unscharf begrenzte und undeutliche nukleäre YAP-Färbung (Abb. 19A). Aufgrund der hier sehr dichten, teils in Gruppen zusammengelagerten, Zellen war außerdem die Zellzählung und genaue Abgrenzung der einzelnen Zellen erschwert. Anhand der Bilder waren im Bereich der dichten Zellballen schon bei der DMSO-Kontrolle teilweise nukleäre

Aussparungen in der YAP-Färbung sichtbar. Nach Quantifizierung (Abb. 19B) nach 6 h und 9 h Rhosin-Behandlung war im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu beiden Zeitpunkten der Zellanteil mit hohem zytoplasmatischen YAP leicht erhöht. Allerdings zeigte hier im Vergleich zu den anderen verwendeten Zelllinien schon der Ausgangswert der Kontrolle einen hohen Anteil (nahezu 50 %) von Zellen mit hohem zytoplasmatischen YAP-Protein.



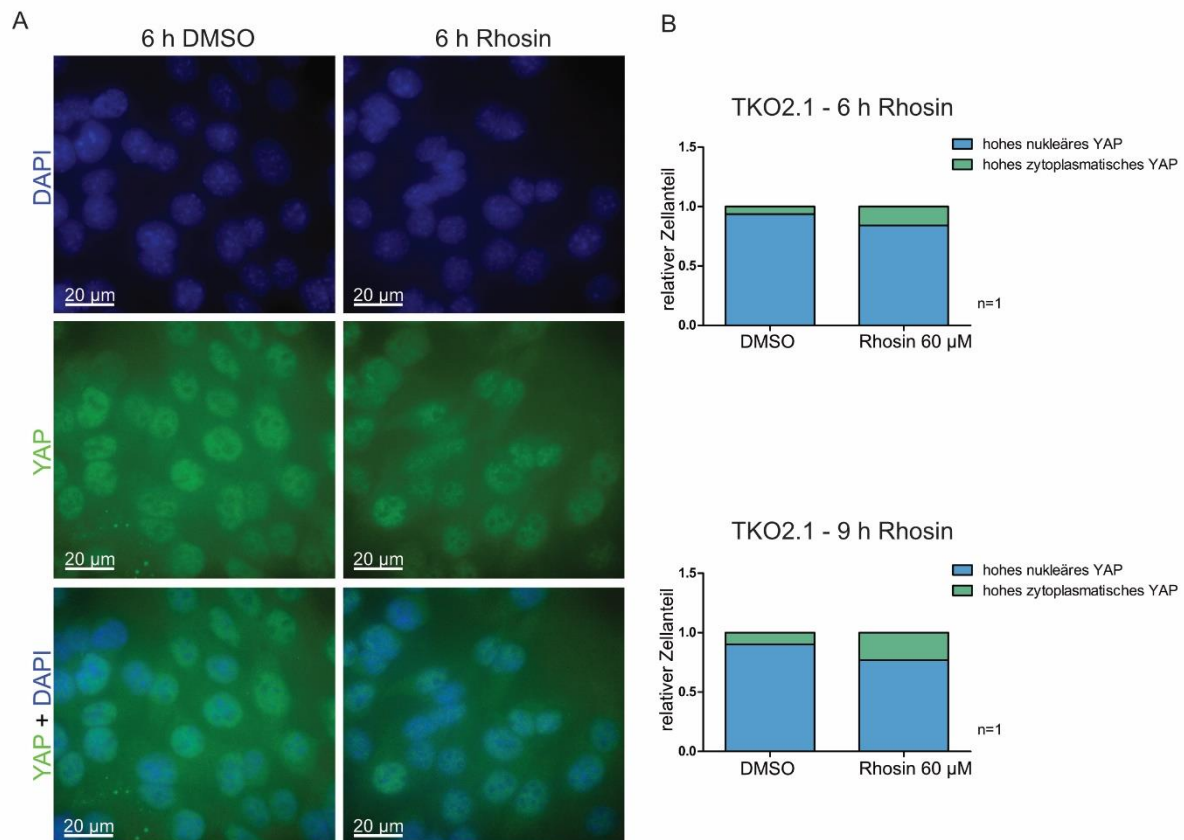
**Abbildung 19: YAP-Immunfluoreszenzfärbung von HuH7-Zellen**

A: Immunfluoreszenz-Bilder der HuH7-Zellen nach 6 h und 9 h DMSO- bzw. Rhosin-Behandlung (60 µM), Kerne blau gefärbt mit DAPI, YAP in grün.

B: Quantifizierung der nukleären bzw. zytoplasmatischen YAP-Proteinexpression nach 6 h und 9 h Rhosin-Behandlung (60 µM) (n=1).

Bei TKO2.1-Zellen konnte anhand der Immunfluoreszenz-Bilder (Abb. 20A) ebenfalls eine Veränderung der YAP-Proteinexpression nach Rhosin-Therapie (6-9 h) festgestellt werden. Die Quantifizierung (Abb. 20B) nach 6 h und 9 h Rhosin-Behandlung der Zellen zeigte eine

Zunahme von Zellen mit höherem zytoplasmatischen YAP und damit eine Abnahme von nukleärem YAP.



**Abbildung 20: YAP-Immunfluoreszenzfärbung von TKO2.1-Zellen**

A: Immunfluoreszenz-Bilder der murinen HCC-Tumorzellen TKO2.1 nach 6 h DMSO- bzw. Rhosin-Behandlung (60 µM), Kerne blau gefärbt mit DAPI, YAP in grün.

B: Quantifizierung der nukleären bzw. zytoplasmatischen YAP-Proteinexpression nach 6 h und 9 h Rhosin-Behandlung (60 µM) (n=1).

### 5.3.3 Beeinflussung von YAP-Zielgenen durch Rhosin

Parallel zur Analyse der Auswirkungen einer Rhosin-Therapie auf die Proteinexpression, wurden die Zelllinien nach durchgeführter Behandlung auf ihre mRNA-Expression hin untersucht. Graphische Darstellungen der Daten der untersuchten Gene sind in Abbildung 21 relativ zur Kontrolle mit DMSO-Behandlung aufgeführt.

Für die ausgewählten Zielgene von YAP/TAZ (*CYR61*, *CTGF*, *ANKRD1*, *AMOTL2* und *IGFBP3*) wurde eine signifikante positive Korrelation mit der YAP-Proteinexpression in Tumorzelllinien beschrieben (Y. Wang et al., 2018).

*CYR61* und *CTGF* sind die am besten charakterisierten YAP-Zielgene. *CYR61* und *CTGF* sind Mitglieder der CCN-Proteinfamilie und wurden zuerst als sezernierte Proteine identifiziert, die durch Wachstumsfaktoren oder Onkogene induziert werden oder in transformierten Zellen dereguliert sind. Die Genexpression reagiert sehr sensitiv auf Umweltfaktoren. In Tumoren von

verschiedenen Organen und Geweben wurde eine veränderte Expression von CCN-Proteinen beobachtet, so auch im HCC (C. C. Chen & Lau, 2009). Unter anderem von dem direkten YAP-Zielgen *CTGF* wurden bereits erhöhte Level in humanen Malignomen gefunden. Ein *Knock-down* von *CTGF* zeigte Effekte in der Tumorbehandlung. Durch das Ausschalten von *CTGF* wurde YAP-stimuliertes Zellwachstum blockiert und ein Anti-CTGF-Antikörper konnte Tumorwachstum und Metastasierung inhibieren (Zhao et al., 2008).

Eine mögliche Beeinflussung dieses speziellen YAP-abhängigen Zielgens durch eine Behandlung mit dem RhoA-Inhibitor Rhosin könnte damit die bereits festgestellte Proliferationshemmung der Zelllinien unter Rhosin-Therapie sehr gut erklären.

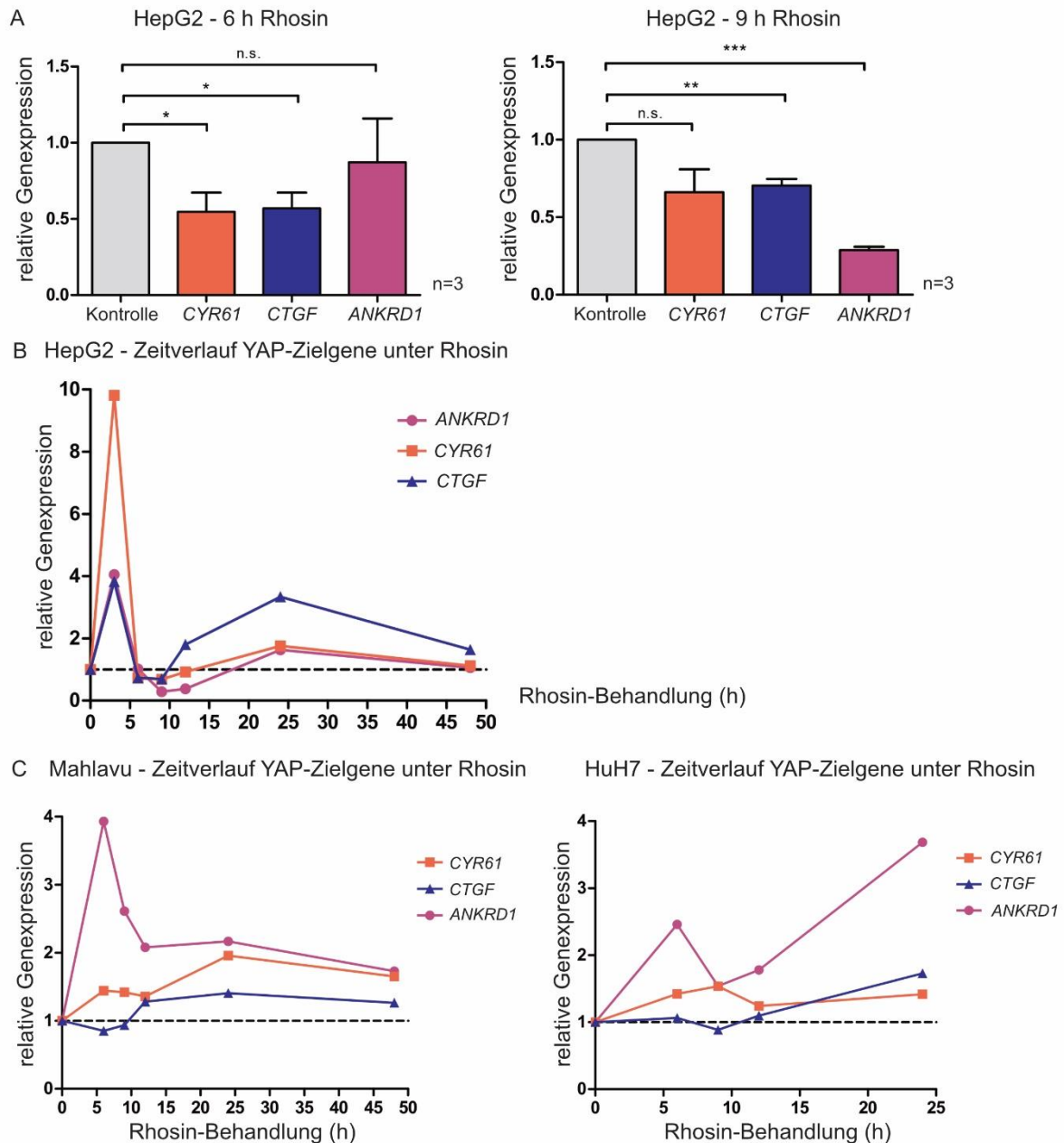
Als Referenzgen wurde *Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)* verwendet, eines der am häufigsten verwendeten Referenzgene zur Normalisierung der qPCR-Daten (Waxman & Wurmbach, 2007).

Die qPCR-Daten von HepG2-Zellen (Abb. 21A) zeigten nach 6 h Behandlung mit Rhosin einen signifikanten Rückgang der Genexpression von *CYR61* und *CTGF* verglichen mit der Kontrolle mit DMSO. Auch nach 9 h Behandlung war eine signifikante Reduktion der mRNA-Level von YAP-Zielgenen (*CTGF* und *ANKRD1*) erkennbar. Interessanterweise kam es im weiteren Zeitverlauf (Abb. 21B) schon nach 12 h erneut zu einer Zunahme der *CTGF*-Expression und nach 24 h auch zu einer Expressionssteigerung von *CYR61* und *ANKRD1*. Nach 48 h Behandlung mit Rhosin waren die Level der Zielgene annähernd wieder auf Ausgangsniveau. Im Zeitverlauf dargestellte Werte der Expressionsänderung (Fold Change) bei HepG2-Zellen zeigten für alle drei dargestellten Zielgene *CYR61*, *CTGF* und *ANKRD1* eine Expressionsabnahme nach 6 h und 9 h, gefolgt von einer am ehesten kompensatorischen erneuten Zunahme nach 12-24 h und einer nahezu vollständigen Normalisierung der Expressionslevel nach 48 h.

Bei den Zelllinien Mahlavu und HuH7 (Abb. 21C) konnte durch die Rhosin-Behandlung weder zu frühen Zeitpunkten von 6-9 h noch zu den späteren Zeitpunkten von 12-48 h ein eindeutiger Rückgang der Genexpression der verwendeten fünf Zielgenen *CYR61*, *CTGF*, *ANKRD1*, *AMOTL2* und *IGFBP3* festgestellt werden (Daten der Gene *AMOTL2* und *IGFBP3* nicht gezeigt). Damit sprachen die humanen HCC-Zelllinien im Hinblick auf die Beeinflussung YAP-abhängiger Zielgene sehr heterogen auf die Rhosin-Therapie an.

Ein möglicher Grund dafür könnte die zelllinienspezifische Veränderung der Genexpression nach Rhosin-Behandlung sein. Womöglich sind für diese Zelllinien im Gegensatz zu HepG2-Zellen andere, hier nicht untersuchte, YAP-Zielgene relevant.





**Abbildung 21: Beeinflussung von YAP-Zielgenen durch Rhosin-Behandlung**

A: Quantifizierung der relativen Genexpression der YAP-Zielgene (*CYR61*, *CTGF*, *ANKRD1*) unter Rhosin-Behandlung (60  $\mu$ M) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nach 6 h und 9 h Behandlungsdauer für die Zelllinie HepG2 mit Signifikanzbestimmung mittels t-Test (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001, n.s. nicht signifikant), Darstellung als Mittelwert mit Standardabweichung (n=3).

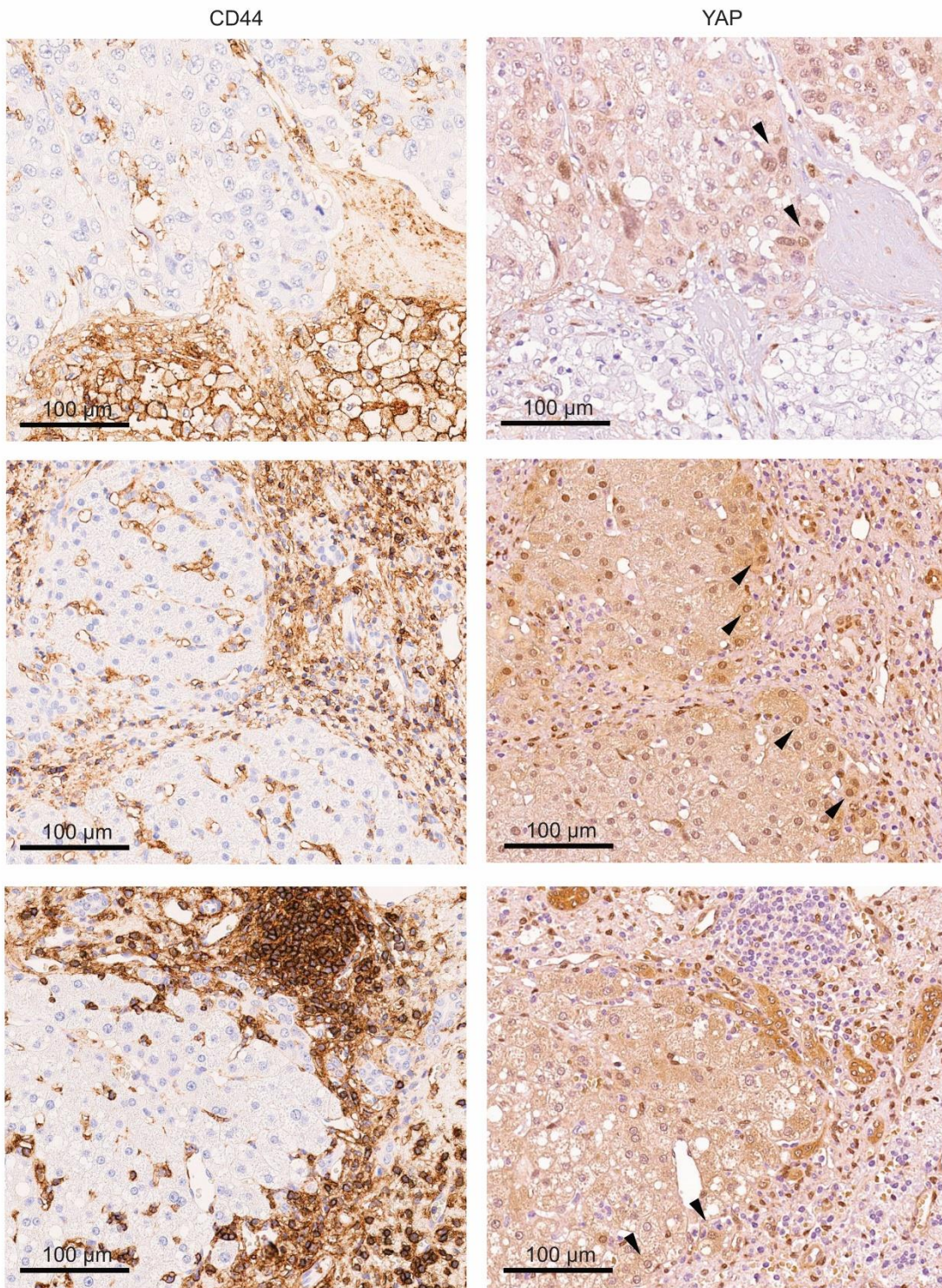
B: Darstellung des Zeitverlaufes der YAP-Zielgenexpression (*CYR61*, *CTGF*, *ANKRD1*) bei HepG2-Zellen nach Rhosin-Therapie (60  $\mu$ M, 3-48 h).

C: Darstellung der YAP-Zielgenexpression (*CYR61*, *CTGF*, *ANKRD1*) im Zeitverlauf für die Zelllinien Mahlavu und HuH7 nach Rhosin-Therapie (60  $\mu$ M) (n=1).

#### **5.4 Korrelation von CD44 und YAP in HCC-Gewebeschnitten**

In murinen HCC-Modellen konnte bereits eine Korrelation von YAP- und CD44-Expression gezeigt werden (s. Vordaten der Arbeitsgruppe). In Ergänzung zu den funktionellen Daten aus murinen und humanen Zelllinien, die die Bedeutung einer CD44/RhoA/YAP-Achse auch im Menschen nahelegen, wurde zusätzlich humanes HCC-Gewebe hinsichtlich einer YAP- und CD44-Proteinexpression untersucht. Abbildung 22 zeigt exemplarisch ausgewählte Bilder immunhistochemischer Färbungen von CD44 (linke Bildhälfte) und YAP (rechte Bildhälfte) von PatientInnen mit einem HCC.

In hepatozytär differenzierten Zellen zeigte sich nur in vereinzelten PatientInnenproben eine hohe CD44-Proteinexpression oder eine hohe nukleäre YAP-Expression. Dagegen war eine sehr hohe Expression von CD44 und intensive nukleäre YAP-Expression in zahlreichen Zellen des Tumorstromas nachzuweisen. Auffällig an diesen CD44-positiven Stromazellen war eine Nähe zu Hepatozyten mit hoher nukleärer YAP-Expression (Pfeilmarkierungen in Abb. 22). Womöglich spielen diese Stromazellen über eine nicht-zellautonome Induktion von YAP eine Rolle in der HCC-Tumorgenese, was Gegenstand weiterer Untersuchungen ist.



**Abbildung 22: Immunhistochemie von YAP und CD44 an humanen HCC-Schnitten**

## 6 Diskussion

Maligne Tumoren der Leber sind die vierthäufigste Ursache von Malignom-assoziierten Todesfällen weltweit. Nach Schätzungen werden im Jahr 2030 mehr als eine Million Menschen an malignen Tumoren der Leber sterben (Galicia-Moreno et al., 2021). Das HCC ist die häufigste primäre maligne Tumorentität der Leber. Die meisten PatientInnen mit einem HCC haben eine schlechte Prognose wegen einer Diagnose im intermediären oder fortgeschrittenen Stadium und der weiterhin eingeschränkten Therapieoptionen in diesen Stadien (Luo, Wu, & He, 2021). Konventionelle Tumorthérapien wie Chemotherapeutika richten sich vor allem gegen Zellen mit einer hohen Proliferationsrate, was durch einen Mangel an Spezifität auch zu einer Schädigung von normalem Gewebe mit hoher Zellteilungsrate führt. Das Ziel tumorspezifischer Medizin ist eine Entwicklung zielgerichteter Medikamente, die die biologischen Eigenschaften des Tumors ausnutzen und selektiv einen bestimmten Signalweg oder ein bestimmtes Molekül angreifen (Ma, Yang, Wang, Wei, & Qin, 2015). Aufgrund ihrer ausgeprägten molekulargenetischen Heterogenität und Komplexität stellen HCCs eine große Herausforderung dar und bisherige Therapieoptionen zeigen zwar eine deutliche Verbesserung des Überlebens, die Prognose bleibt aber vor allem im fortgeschrittenen Stadium limitiert (Finn et al., 2020). Neuartige, effektive systemische Therapieansätze wie sog. Targeted therapies werden dringend benötigt.

Dabei haben insbesondere die Signalwege eine besondere Bedeutung, die nicht nur eine funktionelle Rolle in der Tumorbilogie spielen, sondern auch einer therapeutischen Intervention zugänglich sind. Aktuelle Analysen haben zu einem Verständnis der molekularen Kennzeichen des HCCs beigetragen, die in die Initiation und Progression des HCCs involviert sind. Dadurch konnten entscheidende Signalwege und molekulare Veränderungen im HCC identifiziert werden (Luo et al., 2021). Genomische Analysen haben bei einigen Tumorentitäten sogenannte Treibermutationen für Tumorentität und Progression aufgedeckt. Jedes HCC hat durchschnittlich 40 genomische Aberrationen, von denen aber nur wenige gehäuft vorkommen. Eindeutige Treibermutationen wurden bisher nicht identifiziert. Häufige Mutationen sind z.B. *TERT*-Mutationen oder *TP53*-Mutationen, die zurzeit nicht gezielt therapeutisch angreifbar sind (Llovet et al., 2016).

Die Kenntnis der vorliegenden Mutationen und tumorbiologischen Vorgänge sind für den Einsatz zielgerichteter Therapeutika essenziell. In der Literatur gibt es bereits zahlreiche Hinweise für eine Beteiligung des Hippo-YAP-Signalwegs in der Organisation von Größenregulation, Zellproliferation und Apoptose. In Anbetracht der Rolle des tumorsuppressiven Hippo-Signalwegs und seinen Effektoren YAP/TAZ in der Karzinogenese ist es berechtigt, diesen Signalweg als ein potenzielles Ziel für eine antitumoröse Therapie anzusehen (Ma et al., 2015).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine Dysregulation des Hippo-Signalwegs zur HCC-Entwicklung führt (W. Kim et al., 2017; Saucedo & Edgar, 2007). Die YAP-Aktivierung ist assoziiert mit einer höheren Aggressivität und einem höheren TNM-Stadium des HCCs (Han et al., 2014; H. Li et al., 2012). Im Vergleich zu primären humanen Hepatozyten zeigen auch HCC-Zelllinien (HepG2, Hep3B) eine höhere YAP-Expression, sowie eine vermehrte nukleäre YAP-Lokalisation. Ein *YAP-Knock-down* mittels siRNA resultierte in reduziertem Überleben von HCC-Tumorzellen und einer Reduktion von *CTGF*-mRNA-Expression (H. Li et al., 2012). Auch in einem Mausmodell zum fortgeschrittenen HCC führte eine *YAP*-Reduktion durch siRNA-Nanopartikel zu einer Hepatozytendifferenzierung (Fitamant et al., 2015). Diese Daten unterstützen die Idee, dass eine Reduktion der YAP-Aktivität als Basis für eine HCC-Therapie genutzt werden kann. Mit hoher Wahrscheinlichkeit spielt die Aktivierung von YAP damit zumindest in einer Subgruppe der humanen HCCs eine wichtige Rolle.

Während YAP/TAZ an verschiedene Transkriptionsfaktoren binden können, ist die Interaktion mit TEAD-Transkriptionsfaktoren am wichtigsten für die Karzinogenese, da sie die Proliferation und Metastasierung fördert (Zhao et al., 2008).

Es existiert bereits ein Therapeutikum zur Inhibition von YAP. Verteporfin bindet an YAP und stört dadurch die Fähigkeit, TEAD zu binden. Durch Verteporfin konnten in einem *in vivo*-Modell bereits YAP-induzierte maligne Lebertumore effizient behandelt werden (Yimlamai et al., 2015). Die Hemmung der Interaktion zwischen YAP/TAZ und TEAD inhibiert das maligne Verhalten von Tumorzellen, allerdings hat Verteporfin auch viele off-target Effekte und eine große Toxizität (Noguchi et al., 2018). Die Entwicklung von alternativen Wirkstoffen, die YAP hemmen, ist von großem Interesse für die Tumorthherapie. Die Modifizierung von vorgeschalteten Molekülen des Hippo-Signalwegs stellt eine weitere mögliche Option dar, um die YAP/TAZ-Funktion zu beeinflussen. Die Identifizierung spezifischer Rezeptoren, die den YAP-Signalweg regulieren, wie GPCR und EGFR, bieten neue Möglichkeiten, diesen Signalweg funktionell anzugreifen. Die meisten dieser Rezeptoren sind allerdings nicht Signalweg-spezifisch und die Komplexität dieser Signalnetzwerke könnte diesen Therapieansatz limitieren (Cunningham & Hansen, 2022).

Auch das Oberflächenmolekül CD44 ist als ein dem YAP-Signalweg vorgeschaltetes Regulationselement ein mögliches Ziel für Tumorthapien. Eine erhöhte CD44-Expression wurde in verschiedenen malignen Geweben wie in Tumoren der Leber, des Kolorektums und des Ösophagus festgestellt (Fan et al., 2018; Medrano-Gonzalez, Rivera-Ramirez, Montano, & Rendon-Huerta, 2021). Die CD44-Expression ist im HCC im Vergleich zu normalem Lebergewebe erhöht. HCC-PatientInnen mit einer höheren CD44-Expression haben dabei eine schlechtere Prognose gezeigt als diejenigen mit niedrigerer CD44-Expression (Fan et al., 2018; J. Zhang et al., 2021).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die funktionelle Rolle von CD44 in der YAP-Regulation unabhängig vom Hippo-Signalweg untersucht. Ein bereits in einzelnen Publikationen vorbeschriebener alternativer CD44/RhoA/YAP-Signalweg kann durch verfügbare spezifische Therapeutika bereits auf Ebene des Oberflächenmoleküls CD44 als auch auf Ebene des RhoA-GTPase-Proteins angegriffen werden (Shang et al., 2012; Tsubaki et al., 2021; Yan et al., 2015). Als Basis diente dabei das in der Arbeitsgruppe etablierte TKO-Modell, welches auf einem *Knock-out* der drei Mitglieder der RB-Proteinfamilie beruht. In diesem Modell zeigten sowohl HCCs als auch Tumorvorläuferläsionen eine Korrelation der YAP- und CD44-Proteinexpression. Mithilfe von CRISPR/Cas9-vermittelter *Cd44*-Genmutationen an murinen HCC-Zelllinien des TKO-Mausmodells konnte eine CD44-abhängige Proliferationsreduktion gezeigt werden, die mit einer Reduktion der YAP-Aktivität einhergeht. So zeigten die *Cd44*-mutierten Tumorzelllinien eine verminderte Proteinexpression von CD44 und YAP sowie eine Reduktion der Proliferation und eine verminderte Expression YAP-abhängiger Zielgene. Dies deutet auf eine signifikante Rolle der CD44/YAP-Signalachse im HCC hin.

Wie oben erläutert, stellt CD44 als ein dem YAP-Signalweg vorgeschaltetes Molekül einen möglichen Therapieangriffspunkt für die indirekte Beeinflussung der YAP-Aktivität in der hepatischen Karzinogenese dar. In HuH7 HCC-Zellen, welche CD44s exprimieren, stört ein Ausschalten des *CD44*-Gens die Spheroidformation und verbessert die Sensitivität für Sorafenib und 5-FU. Dies geht einher mit einer Herunterregulation von Krebsstammzellgenen wie *CD133* und *EpCAM* (H. Xu et al., 2020). Ein *Knock-down* von *CD44* reduziert in HCC-Zellen außerdem die mRNA-Transkriptionslevel von *CTGF* und *CYR61*, welche zu den am besten charakterisierten YAP-abhängigen Zielgenen zählen (Y. Zhang et al., 2014).

Es wurden verschiedene Strategien entwickelt, über die CD44 beeinflusst werden kann. Unter anderem existieren monoklonale Antikörper gegen CD44 wie Bivatuzumab und Mechanismen zur Hemmung der HA-CD44-Interaktion (H. Xu et al., 2020; Yan et al., 2015). Die Effekte von Anti-CD44-Antikörpern können über zwei verschiedene Arten hervorgerufen werden. Sie können den CD44-Oberflächenrezeptor binden und durch kompetitive Hemmung neutralisieren, aber auch konjugiert werden mit Radioisotopen, Toxinen oder Chemotherapeutika, um CD44-exprimierende Zellen selektiv zu zerstören (S. Misra, Hascall, Markwald, & Ghatak, 2015).

*In vitro* konnten für CD44-Antikörper bereits zahlreiche Effekte nachgewiesen werden, z.B. supprimierten sie die Proliferation von A549-Zellen im Bronchialkarzinom oder blockierten die Zellaggregation beim malignen Melanom (H. Xu et al., 2020). Das invasive Potential von Mammakarzinom-Zellen mit einem mesenchymalen Phänotyp konnte durch CD44-spezifische Antikörper (IM7) inhibiert werden. Biokonjugate aus HA z.B. mit Paclitaxel können an Tumorzellen mit CD44-Überexpression binden und können eine starke antiproliferative

Wirkung bei Tumorzellen erzielen z.B. in humanen Mamma-, Kolon-, Ovarial-, Magen-, Ösophagus- und Lungenmalignomen (C. Chen et al., 2018). Die größten beschriebenen Nachteile der Antikörpertherapie mit dem Antikörper IM7 sind die Toxizität und eine nicht nachhaltige Stimulation (Y. Yang et al., 2017).

Anti-CD44-Antikörper wurden bereits sowohl in präklinischen Modellen als auch in klinischen Phase-I-Studien als mögliche Tumorthherapie evaluiert. In CLL-Zellen, die hohe Level an CD44 exprimieren, war ein spezifischer, humanisierter monoklonaler Antikörper zytotoxisch für leukämische B-Zellen ohne die Lebensfähigkeit von normalen B-Lymphozyten zu beeinflussen (Jordan et al., 2015). Im Pankreaskarzinom, bei dem die CD44-Expression mit einer schlechten Prognose korreliert, konnte in zwei Xenograft-Mausmodellen die intravenöse Anwendung eines monoklonalen CD44-Antikörpers das Tumorwachstum und die Metastasierung hemmen (L. Li et al., 2014). Allerdings gibt es bisher keine weiterführenden klinischen Studien zu diesem Therapieansatz.

Der Antikörper RG7356 bindet an alle CD44-Isoformen an die konstante Region der extrazellulären Domäne und inhibiert die Interaktion zwischen CD44 und HA. Allerdings ist das klinische Ansprechen auf diese Antikörpertherapie abhängig vom CD44-Isoformstatus der PatientInnen (Birzele et al., 2015). RG7356 wurde bereits in einer klinischen Studie bei PatientInnen mit fortgeschrittenen CD44-exprimierenden soliden Tumoren angewandt. Dabei wurde die intravenöse Therapie mit RG7356 zwar gut toleriert, aber zeigte nur eine mäßige klinische Effizienz (Menke-van der Houven van Oordt et al., 2016).

In dieser Arbeit konnte die IM7-Antikörperbehandlung muriner und humaner Tumorzelllinien *in vitro* keine Proliferationsreduktion der HCC-Zelllinien oder verminderte Adhäsionsfähigkeit bewirken. Jedoch gibt es vereinzelt positive Ergebnisse einer CD44-Antikörperbehandlung in anderen Tumorentitäten. Zum Beispiel konnte eine CD44-Antikörpertherapie in Chondrosarkomzellen *in vitro* Apoptose induzieren. So resultierte bereits die Behandlung mit 50 µg/ml IM7 für 72 h bei einer Chondrosarkom-Zelllinie in einer reduzierten Zellviabilität, vermutlich durch eine Induktion von Apoptose, im Vergleich zur IgG-Kontrolle (Yoshida, Yasuda, Hiramitsu, Ito, & Nakamura, 2008). Auch im HCC konnten bereits Effekte durch die CD44-Antikörpertherapie erzielt werden. Die zielgerichtete Therapie mit einem CD44-neutralisierenden Antikörper induzierte dosisabhängig (Höchstdosis 24 µg/ml) die Apoptose von der humanen HCC-Zelllinie MHCC97L. Die systemische Therapie mit dem CD44-Antikörper in immundefizienten Mäusen unterdrückte die Tumorformation von subkutan oder hepatisch injizierten HCC-Zelllinien und inhibierte die Metastasenbildung (Z. F. Yang et al., 2008). Des Weiteren konnte in den hier durchgeführten Experimenten kein verbessertes Ansprechen auf die CD44-Antikörpertherapie bei begleitender Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin erreicht werden. Zusätzlich zum fehlenden Einfluss auf die

Proliferation konnte durch die CD44-Antikörpertherapie auch auf die YAP-Proteinexpression kein Einfluss gezeigt werden.

Mögliche Ursachen für diese Unwirksamkeit der durchgeführten CD44-Antikörpertherapie im Gegensatz zu den Ergebnissen in *Cd44*-mutierten Zelllinien können eine unzureichend hohe Dosierung sein oder die Notwendigkeit wiederholter Antikörpergaben, die für eine adäquate Bindung und Proteinhemmung notwendig sind, da für die IM7-Antikörpertherapie bereits das Problem einer nicht nachhaltigen Stimulation beschrieben ist (Y. Yang et al., 2017).

Weiterhin könnte der extrazelluläre Angriffspunkt des Antikörpers, der nicht in eine intrazelluläre Hemmung von onkogenem YAP umgesetzt wird, ein Problem für die Therapie darstellen. Auch ein beschriebenes unterschiedliches Therapieansprechen der Zelllinien aufgrund von verschiedenen exprimierten CD44-Isoformen könnte die Wirksamkeit von IM7 beeinflussen (Birzele et al., 2015). Allerdings konnte, wie bereits erwähnt, bei anderen Tumorentitäten teilweise auch bei niedrigerer Dosierung ein therapeutischer Effekt im Sinne einer Induktion von Apoptose und Reduktion von Proliferation nachgewiesen werden. Gründe dafür könnten eine höhere CD44-Expression in diesen Entitäten sein oder eine Expression anderer CD44-Isoformen. Im HCC wurde bereits die Expression verschiedener Isoformen von CD44 nachgewiesen. 34 % exprimierten CD44s, 49 % CD44v5, 38 % CD44v7-8, 27 % CD44v6 und 24 % CD44v10. Die Expression aller CD44-Isoformen korrelierte mit dem Tumorgrading (Endo & Terada, 2000). Möglicherweise kann ein Isoform-spezifischer CD44-Antikörper eine effektivere Hemmung der jeweiligen exprimierten CD44-Isoform erreichen als ein Antikörper wie IM7, der gegen alle Isoformen gerichtet ist.

Obwohl eine Antikörpertherapie mit IM7 bei CD44-positiven Kolonkarzinom-Zellen *in vitro* keine Reduktion der Proliferation bewirkt hat, konnte eine Vortherapie mit IM7 *in vivo* eine Reduktion der Tumorbildung in der Leber bei Mäusen nach Tumorzell-Injektion erzielen (Ogoshi et al., 1998). Deshalb sollte weiterhin die Wirksamkeit einer CD44-Antikörpertherapie *in vivo* auch im HCC evaluiert werden.

Insgesamt scheint die Therapie mit dem CD44-Antikörper IM7 kein vielversprechender Ansatz für alle HCCs zu sein, wobei eine mögliche Rolle in bestimmten Subgruppen nicht ausgeschlossen werden kann.

Zwar konnte durch eine Beeinflussung der CD44/RhoA/YAP-Achse mittels CD44-Antikörper keine Wirkung erzielt werden, aber in Vorversuchen in murinen Zelllinien konnte ein deutlicher Effekt auf Zellwachstum und YAP-Expression durch einen funktionellen *Cd44-Knock-out* erzielt werden. Da dieser Effekt wahrscheinlich durch RhoA vermittelt wurde und ein CD44/RhoA/YAP-Signalweg im HCC vorbeschrieben war (Lin & Zheng, 2015; Yadav, Kashaninejad, & Nguyen, 2020; Y. Zhang et al., 2014), wurde anschließend die Inhibition von



RhoA mittels des Inhibitors Rhosin getestet und der Einfluss auf die YAP-Expression in HCC-Zelllinien evaluiert.

Etwa 1 % des humanen Genoms kodiert für Proteine, die entweder Rho-GTPasen regulieren oder durch eine Interaktion mit diesen reguliert werden. Die große Vielfalt biologischer Funktionen der verschiedenen Rho-GTPasen entsteht durch die Bindung verschiedener Effektoren. Diese Effektoren umfassen Serin-Threonin-Kinasen, Tyrosinkinasen, Lipidkinasen, Lipasen, Oxidasen und Strukturproteine (Cardama, Gonzalez, Maggio, Menna, & Gomez, 2017). Rho-GTPasen sind entscheidende intrazelluläre Signalmoleküle, deren veränderte Aktivität für verschiedene humane Pathologien verantwortlich ist. Das kleine GTPase-Protein RhoA ist involviert in Tumorprogression und Metastasierung und erhöhte Level von RhoA wurden in mehreren Tumoren beschrieben (Shang et al., 2012). Rho-GTPasen sind häufig überexprimiert oder aktiviert in Tumoren, aber selten selbst mutiert. Deshalb wird diese Aktivierung wahrscheinlich durch regulatorische Elemente verursacht. Das weist auf eine entscheidende Rolle von regulatorischen Proteinen wie RhoGEFs und RhoGAPs/RhoGDIs für die Tumorentstehung hin (Lin & Zheng, 2015).

Rho-GTPasen können darin involviert sein, die Transkriptionsregulatoren YAP/TAZ als Antwort auf Zytoskelettspannung zu aktivieren (Smithers & Overduin, 2016). Es gibt Hinweise, dass RhoA das HCC-Wachstum über eine RhoA/F-Aktin/Hippo-YAP-Signalachse fördert (Bai et al., 2019). Rho-GTPasen wie RhoA interagieren auch mit dem Hippo-Signalweg selbst, indem sie z.B. die LATS-Kinase inhibieren (Yadav et al., 2020). Im Mammakarzinom interagiert CD44 mit RhoA-spezifischen GEFs, um RhoA zu aktivieren, was Zellwachstum und Metastasierung fördert. Eine Hemmung von RhoA blockiert die metastatische Aktivität von CD44 (Lin & Zheng, 2015). In HepG2 HCC-Zellen wirkt CD44 über RhoA auf die YAP-Expression ein (Y. Zhang et al., 2014). Damit weist viel auf eine wichtige Rolle der CD44/RhoA/YAP-Signalachse in der Tumorgenese hin. Eine spezifische medikamentöse Hemmung von RhoA im HCC wurde bisher aber nicht getestet.

RhoA stellt somit wie auch CD44 ein potenzielles Therapieziel dar, um die YAP-Aktivität indirekt zu hemmen. Allerdings ist es schwierig, Rho-GTPasen zielgerichtet anzugreifen, da sie eine globuläre Struktur mit wenig Oberflächenzielen besitzen, die für eine Bindung von niedermolekularen Substanzen mit hoher Affinität geeignet sind (Shang et al., 2012).

Für die Inhibition dieser Moleküle gibt es daher neue Strategien wie die Inhibition der Bindung zwischen GTPasen und GEFs, der Verstärkung der GAP-Aktivität und der Blockade der Bindung an zelluläre Membranen (Prieto-Dominguez et al., 2019).

Rhosin enthält zwei aromatische chemische Fragmente, die an zwei benachbarte Oberflächenfurchen auf RhoA binden, die für die GEF-Interaktion benötigt werden. Es bindet über Trp58 an die Oberfläche von RhoA und unterdrückt die Interaktion mit GEFs. Damit blockiert Rhosin zum Beispiel die RhoA-vermittelte Zytoskelettaktivität und Invasivität von

Mammakarzinom-Zellen (Shang et al., 2012). Rhosin hat bereits in murinen metastatischen Melanom- und Mammakarzinom-Zelllinien die RhoA- und RhoC-Aktivierung und die nukleäre Lokalisation von YAP supprimiert. Dadurch wurden Zelladhäsion, Migration, Invasion und Metastasierung reduziert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Inhibierung des RhoA/YAP-Signalwegs durch Rhosin einen therapeutischen Ansatz für PatientInnen darstellen könnte (Tsubaki et al., 2021).

Daten unserer Arbeitsgruppe in der Anwendung von Rhosin in unserem murinen HCC-Modell zeigten eine Proliferationsreduktion der primären TKO-Zellen durch die Rhosin-Therapie. Die mittels CRISPR-Cas9 *Cd44*-mutierten Zelllinien, die ohnehin bereits eine Proliferationsreduktion durch die *Cd44*-Mutation zeigten, sprachen allerdings nicht auf eine zusätzliche Behandlung mit Rhosin an. Diese Tatsache weist drauf hin, dass CD44 über eine RhoA-abhängige Beeinflussung der YAP-Aktivität auf die Tumorzellproliferation einwirkt.

Auf Basis dieser beschriebenen Effektivität des RhoA-Inhibitors Rhosin in murinen HCC-Zellen wurde dieser auch in humanen Zelllinien getestet. Hier zeigte sich in allen humanen HCC-Zellen eine Reduktion der Zellproliferation durch die Behandlung. Innerhalb der verwendeten humanen HCC-Zelllinien konnte interessanterweise kein Zusammenhang zwischen der Höhe der CD44-Expression und dem Ansprechen auf die Rhosin-Therapie festgestellt werden. Mittels Immunfluoreszenzfärbungen konnte gezeigt werden, dass Rhosin die nukleäre YAP-Proteinexpression in zwei humanen HCC-Zelllinien (HepG2 und Mahlavu) signifikant senkt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den oben erwähnten beschriebenen Anwendungen von Rhosin an murinen Melanom- und Mammakarzinom-Zelllinien (Prieto-Dominguez et al., 2019; Tsubaki et al., 2021).

Die Untersuchung von YAP-abhängigen Zielgenen nach Behandlung ergab allerdings nur für HepG2-Zellen eine signifikante Senkung der mRNA-Level der Zielgene *CYR61*, *CTGF* und *ANKRD1* zu frühen Rhosin-Behandlungszeitpunkten (6 h, 9 h). Für weitere untersuchte Zelllinien (Mahlavu, HuH7) kam es zu keiner signifikanten Beeinflussung der untersuchten YAP-Zielgene. Womöglich übt Rhosin in Mahlavu-Zellen einen proliferationshemmenden Einfluss über alternative YAP-abhängige Zielgene aus bzw. in HuH7-Zellen über einen alternativen Signalweg. Diese Tatsache verdeutlicht die Heterogenität des HCCs und zeigt, dass die Aktivität der CD44/RhoA/YAP-Signalachse wahrscheinlich komplex ist und nicht immer einen zentralen Mechanismus im HCC darstellen muss.

In weiteren Untersuchungen wäre es sinnvoll, die Gründe für das unterschiedliche Ansprechen der Zelllinien auf Rhosin im Hinblick auf die YAP-Expression zu identifizieren. Eine mögliche Erklärung könnten unterschiedliche Level an YAP-Gesamtprotein in den verschiedenen Zelllinien sein. Bei HepG2- und Mahlavu-Zellen, die eine signifikante Reduktion von YAP

mittels Immunfluoreszenz zeigten, konnten höhere YAP-Proteinlevel nachgewiesen werden als in HuH7-Zellen. Darüber hinaus wäre ein weiterer wichtiger Schritt, die Anwendung von Rhosin im *in vivo*-Tiermodell genauer zu analysieren und dessen therapeutisches Potential zu bestätigen. Weitere Studien müssen die Effizienz und Durchführbarkeit einer RhoA-Inhibition in einem klinischen Rahmen evaluieren.

Zusätzlich wurden immunhistochemische Färbungen von YAP und CD44 an zwölf humanen HCC-Proben durchgeführt und im Rahmen dieser Dissertation interpretiert.

In der Literatur zeigten über 85 % der HCC-Proben eine starke nukleäre YAP-Färbung mittels Immunhistochemie. Diese war assoziiert mit Tumoraggressivität und höherem TNM-Stadium (H. Li et al., 2012). In HCC-Geweben wurde außerdem eine Korrelation von CD44-Expression und YAP-Expression beschrieben (Fan et al., 2018). Entgegen diesen Beobachtungen anderer Studien und vorherigen Ergebnisse aus den Mausmodellen, zeigten die hier durchgeführten immunhistochemischen Färbungen keine klare Korrelation von CD44- und YAP-Expression, sondern eine Assoziation von CD44-positiven Stromazellen und Parenchymzellen mit hoher nukleärer YAP-Expression.

Gründe für diese abweichenden Ergebnisse sind möglicherweise die große Heterogenität des HCCs und unter Umständen ein abweichendes PatientInnenkollektiv im Vergleich zu sonst vorherrschenden Studien aus dem asiatischen Raum.

Die in dieser Dissertation vorgestellten und diskutierten Daten stammen überwiegend aus *in vitro* Experimenten mit drei verschiedenen verwendeten humanen HCC-Zelllinien, die mit einer CD44-Antikörpertherapie und Rhosin behandelt wurden. Wegen der teilweise sehr hohen Variabilität der erhaltenen Daten, bedingt durch die große Heterogenität der humanen HCCs, ist dabei auch eine Einbeziehung von weiteren HCC-Zelllinien für zukünftige Untersuchungen in Betracht zu ziehen. Hinsichtlich der Rolle des CD44/RhoA/YAP-Signalwegs für die Tumorentwicklung konnte die Auswertung der verfügbaren Daten einen ersten Hinweis auf eine Relevanz zumindest in einer Subgruppe von HCCs geben. So konnte nach Rhosin-Behandlung eine reduzierte Proliferation der HCC-Zelllinien beobachtet werden, während die Daten hinsichtlich der YAP-Proteinexpression und Expression YAP-abhängiger Zielgene eine hohe Variabilität aufwiesen. Die Aufarbeitung möglicher molekularbiologischer Mechanismen für diesen Effekt im Hinblick auf eine Beeinflussung der CD44/RhoA/YAP-Signalachse muss aber im Rahmen zukünftiger Forschungsarbeiten noch ergänzend evaluiert werden.

## 7 Zusammenfassung

Die Aktivierung von onkogenem YAP ist ein frühes Ereignis der hepatischen Karzinogenese. Hierfür wurden mehrere Mechanismen beschrieben, darunter der Hippo-Signalweg oder ein CD44/RhoA-abhängiger Signalweg. Humane HCC-Zelllinien wurden mit dem CD44-Antikörper IM7 und dem RhoA-Inhibitor Rhosin behandelt. Während IM7 *in vitro* keine Wirkung auf die Proliferation und YAP-Proteinexpression hatte, reduzierte Rhosin die Proliferation der Zelllinien, bewirkte einen Anstieg von inaktivem, zytoplasmatischem YAP und verringerte die Expression von YAP-Zielgenen.

Activation of oncogenic YAP is an early event of hepatic carcinogenesis. Several mechanisms of activation have been described, including the Hippo signaling pathway or a CD44/RhoA-dependent signaling pathway. Human HCC cell lines were treated with the CD44 antibody IM7 and the RhoA inhibitor Rhosin. While IM7 had no effect on proliferation and YAP protein expression *in vitro*, Rhosin reduced proliferation, induced an increase in inactive cytoplasmic YAP and decreased the expression of YAP target genes.

## 8 Literaturverzeichnis

- Asai, R., Tsuchiya, H., Amisaki, M., Makimoto, K., Takenaga, A., Sakabe, T., . . . Shiota, G. (2019). CD44 standard isoform is involved in maintenance of cancer stem cells of a hepatocellular carcinoma cell line. *Cancer Med*, *8*(2), 773-782. doi:10.1002/cam4.1968
- Bai, Y., Xie, F., Miao, F., Long, J., Huang, S., Huang, H., . . . Zhao, H. (2019). The diagnostic and prognostic role of RhoA in hepatocellular carcinoma. *Aging (Albany NY)*, *11*(14), 5158-5172. doi:10.18632/aging.102110
- Barron, D. A., & Kagey, J. D. (2014). The role of the Hippo pathway in human disease and tumorigenesis. *Clin Transl Med*, *3*, 25. doi:10.1186/2001-1326-3-25
- Bellissimo, F., Pinzone, M. R., Cacopardo, B., & Nunnari, G. (2015). Diagnostic and therapeutic management of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, *21*(42), 12003-12021. doi:10.3748/wjg.v21.i42.12003
- Birzele, F., Voss, E., Nopora, A., Honold, K., Heil, F., Lohmann, S., . . . Cannarile, M. (2015). CD44 Isoform Status Predicts Response to Treatment with Anti-CD44 Antibody in Cancer Patients. *Clin Cancer Res*, *21*(12), 2753-2762. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2141
- Borland, G., Ross, J. A., & Guy, K. (1998). Forms and functions of CD44. *Immunology*, *93*(2), 139-148. doi:10.1046/j.1365-2567.1998.00431.x
- Bourguignon, L. Y. (2008). Hyaluronan-mediated CD44 activation of RhoGTPase signaling and cytoskeleton function promotes tumor progression. *Semin Cancer Biol*, *18*(4), 251-259. doi:10.1016/j.semcancer.2008.03.007
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, *68*(6), 394-424. doi:10.3322/caac.21492
- Buschauer, S., Koch, A., Wiggemann, P., Muller, M., & Hellerbrand, C. (2018). Hepatocellular carcinoma cells surviving doxorubicin treatment exhibit increased migratory potential and resistance to doxorubicin re-treatment in vitro. *Oncol Lett*, *15*(4), 4635-4640. doi:10.3892/ol.2018.7887
- Cardama, G. A., Gonzalez, N., Maggio, J., Menna, P. L., & Gomez, D. E. (2017). Rho GTPases as therapeutic targets in cancer (Review). *Int J Oncol*, *51*(4), 1025-1034. doi:10.3892/ijo.2017.4093
- Castelli, G., Pelosi, E., & Testa, U. (2017). Liver Cancer: Molecular Characterization, Clonal Evolution and Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel)*, *9*(9). doi:10.3390/cancers9090127
- Chen, C., Zhao, S., Karnad, A., & Freeman, J. W. (2018). The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *J Hematol Oncol*, *11*(1), 64. doi:10.1186/s13045-018-0605-5
- Chen, C. C., & Lau, L. F. (2009). Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins. *Int J Biochem Cell Biol*, *41*(4), 771-783. doi:10.1016/j.biocel.2008.07.025
- Cichy, J., & Pure, E. (2003). The liberation of CD44. *J Cell Biol*, *161*(5), 839-843. doi:10.1083/jcb.200302098
- Cleary, S. P., Jeck, W. R., Zhao, X., Chen, K., Selitsky, S. R., Savich, G. L., . . . Chiang, D. Y. (2013). Identification of driver genes in hepatocellular carcinoma by exome sequencing. *Hepatology*, *58*(5), 1693-1702. doi:10.1002/hep.26540

- Cunningham, R., & Hansen, C. G. (2022). The Hippo pathway in cancer: YAP/TAZ and TEAD as therapeutic targets in cancer. *Clin Sci (Lond)*, *136*(3), 197-222. doi:10.1042/CS20201474
- Dhar, D., Antonucci, L., Nakagawa, H., Kim, J. Y., Glitzner, E., Caruso, S., . . . Karin, M. (2018). Liver Cancer Initiation Requires p53 Inhibition by CD44-Enhanced Growth Factor Signaling. *Cancer Cell*, *33*(6), 1061-1077 e1066. doi:10.1016/j.ccell.2018.05.003
- Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S. A., . . . Pan, D. (2007). Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell*, *130*(6), 1120-1133. doi:10.1016/j.cell.2007.07.019
- El-Serag, H. B. (2012). Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, *142*(6), 1264-1273 e1261. doi:10.1053/j.gastro.2011.12.061
- El-Serag, H. B., & Rudolph, K. L. (2007). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, *132*(7), 2557-2576. doi:10.1053/j.gastro.2007.04.061
- Endo, K., & Terada, T. (2000). Protein expression of CD44 (standard and variant isoforms) in hepatocellular carcinoma: relationships with tumor grade, clinicopathologic parameters, p53 expression, and patient survival. *J Hepatol*, *32*(1), 78-84. doi:10.1016/s0168-8278(00)80192-0
- European Association for the Study of the Liver. (2018). EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, *69*(1), 182-236. doi:10.1016/j.jhep.2018.03.019
- Fan, Z., Xia, H., Xu, H., Ma, J., Zhou, S., Hou, W., . . . Bi, F. (2018). Standard CD44 modulates YAP1 through a positive feedback loop in hepatocellular carcinoma. *Biomed Pharmacother*, *103*, 147-156. doi:10.1016/j.biopha.2018.03.042
- Finn, R. S., Qin, S., Ikeda, M., Galle, P. R., Ducreux, M., Kim, T. Y., . . . Investigators, I. M. (2020). Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*, *382*(20), 1894-1905. doi:10.1056/NEJMoa1915745
- Fitamant, J., Kottakis, F., Benhamouche, S., Tian, H. S., Chuvin, N., Parachoniak, C. A., . . . Bardeesy, N. (2015). YAP Inhibition Restores Hepatocyte Differentiation in Advanced HCC, Leading to Tumor Regression. *Cell Rep*, *10*(10), 1692-1707. doi:10.1016/j.celrep.2015.02.027
- Friemel, J., Rechsteiner, M., Frick, L., Bohm, F., Struckmann, K., Egger, M., . . . Weber, A. (2015). Intratumor heterogeneity in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, *21*(8), 1951-1961. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0122
- Galicia-Moreno, M., Silva-Gomez, J. A., Lucano-Landeros, S., Santos, A., Monroy-Ramirez, H. C., & Armendariz-Borunda, J. (2021). Liver Cancer: Therapeutic Challenges and the Importance of Experimental Models. *Can J Gastroenterol Hepatol*, *2021*, 8837811. doi:10.1155/2021/8837811
- Gao, Y., Ruan, B., Liu, W., Wang, J., Yang, X., Zhang, Z., . . . Dou, K. (2015). Knockdown of CD44 inhibits the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma both in vitro and in vivo by reversing epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget*, *6*(10), 7828-7837. doi:10.18632/oncotarget.3488
- Global Burden of Disease Liver Cancer, C., Akinyemiju, T., Abera, S., Ahmed, M., Alam, N., Alemayohu, M. A., . . . Fitzmaurice, C. (2017). The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015. *JAMA Oncol*, *3*(12), 1683-1691. doi:10.1001/jamaoncol.2017.3055

- Guo, C., Wang, X., & Liang, L. (2015). LATS2-mediated YAP1 phosphorylation is involved in HCC tumorigenesis. *Int J Clin Exp Pathol*, *8*(2), 1690-1697. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25973055>
- Han, S. X., Bai, E., Jin, G. H., He, C. C., Guo, X. J., Wang, L. J., . . . Zhu, Q. (2014). Expression and clinical significance of YAP, TAZ, and AREG in hepatocellular carcinoma. *J Immunol Res*, *2014*, 261365. doi:10.1155/2014/261365
- Holczbauer, A., Factor, V. M., Andersen, J. B., Marquardt, J. U., Kleiner, D. E., Raggi, C., . . . Thorgeirsson, S. S. (2013). Modeling pathogenesis of primary liver cancer in lineage-specific mouse cell types. *Gastroenterology*, *145*(1), 221-231. doi:10.1053/j.gastro.2013.03.013
- Hong, L., Cai, Y., Jiang, M., Zhou, D., & Chen, L. (2015). The Hippo signaling pathway in liver regeneration and tumorigenesis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, *47*(1), 46-52. doi:10.1093/abbs/gmu106
- Huh, H. D., Kim, D. H., Jeong, H. S., & Park, H. W. (2019). Regulation of TEAD Transcription Factors in Cancer Biology. *Cells*, *8*(6). doi:10.3390/cells8060600
- Huo, X., Zhang, Q., Liu, A. M., Tang, C., Gong, Y., Bian, J., . . . Chen, J. (2013). Overexpression of Yes-associated protein confers doxorubicin resistance in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*, *29*(2), 840-846. doi:10.3892/or.2012.2176
- Ji, J., & Wang, X. W. (2012). Clinical implications of cancer stem cell biology in hepatocellular carcinoma. *Semin Oncol*, *39*(4), 461-472. doi:10.1053/j.seminoncol.2012.05.011
- Johnson, R., & Halder, G. (2014). The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov*, *13*(1), 63-79. doi:10.1038/nrd4161
- Jordan, A. R., Racine, R. R., Hennig, M. J., & Lokeshwar, V. B. (2015). The Role of CD44 in Disease Pathophysiology and Targeted Treatment. *Front Immunol*, *6*, 182. doi:10.3389/fimmu.2015.00182
- Kim, W., & Jho, E.-H. (2018). The history and regulatory mechanism of the Hippo pathway. *BMB reports*, *51*(3), 106-118. doi:10.5483/bmbrep.2018.51.3.022
- Kim, W., Khan, S. K., Gvozdenovic-Jeremic, J., Kim, Y., Dahlman, J., Kim, H., . . . Yang, Y. (2017). Hippo signaling interactions with Wnt/beta-catenin and Notch signaling repress liver tumorigenesis. *J Clin Invest*, *127*(1), 137-152. doi:10.1172/JCI88486
- Kim, W., Khan, S. K., Liu, Y., Xu, R., Park, O., He, Y., . . . Yang, Y. (2018). Hepatic Hippo signaling inhibits protumoural microenvironment to suppress hepatocellular carcinoma. *Gut*, *67*(9), 1692-1703. doi:10.1136/gutjnl-2017-314061
- Li, H., Wolfe, A., Septer, S., Edwards, G., Zhong, X., Abdulkarim, A. B., . . . Apte, U. (2012). Deregulation of Hippo kinase signalling in human hepatic malignancies. *Liver Int*, *32*(1), 38-47. doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02646.x
- Li, L., Hao, X., Qin, J., Tang, W., He, F., Smith, A., . . . Xu, L. (2014). Antibody against CD44s inhibits pancreatic tumor initiation and postradiation recurrence in mice. *Gastroenterology*, *146*(4), 1108-1118. doi:10.1053/j.gastro.2013.12.035
- Lin, Y., & Zheng, Y. (2015). Approaches of targeting Rho GTPases in cancer drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*, *10*(9), 991-1010. doi:10.1517/17460441.2015.1058775
- Liu, H., Du, S., Lei, T., Wang, H., He, X., Tong, R., & Wang, Y. (2018). Multifaceted regulation and functions of YAP/TAZ in tumors (Review). *Oncol Rep*, *40*(1), 16-28. doi:10.3892/or.2018.6423
- Llovet, J. M., Zucman-Rossi, J., Pikarsky, E., Sangro, B., Schwartz, M., Sherman, M., & Gores, G. (2016). Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*, *2*, 16018. doi:10.1038/nrdp.2016.18

- Luo, X. Y., Wu, K. M., & He, X. X. (2021). Advances in drug development for hepatocellular carcinoma: clinical trials and potential therapeutic targets. *J Exp Clin Cancer Res*, *40*(1), 172. doi:10.1186/s13046-021-01968-w
- Ma, Y., Yang, Y., Wang, F., Wei, Q., & Qin, H. (2015). Hippo-YAP signaling pathway: A new paradigm for cancer therapy. *Int J Cancer*, *137*(10), 2275-2286. doi:10.1002/ijc.29073
- Manmadhan, S., & Ehmer, U. (2019). Hippo Signaling in the Liver - A Long and Ever-Expanding Story. *Front Cell Dev Biol*, *7*, 33. doi:10.3389/fcell.2019.00033
- Massarweh, N. N., & El-Serag, H. B. (2017). Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Cancer Control*, *24*(3), 1073274817729245. doi:10.1177/1073274817729245
- Medrano-Gonzalez, P. A., Rivera-Ramirez, O., Montano, L. F., & Rendon-Huerta, E. P. (2021). Proteolytic Processing of CD44 and Its Implications in Cancer. *Stem Cells Int*, *2021*, 6667735. doi:10.1155/2021/6667735
- Menke-van der Houven van Oordt, C. W., Gomez-Roca, C., van Herpen, C., Coveler, A. L., Mahalingam, D., Verheul, H. M., . . . Le Tourneau, C. (2016). First-in-human phase I clinical trial of RG7356, an anti-CD44 humanized antibody, in patients with advanced, CD44-expressing solid tumors. *Oncotarget*, *7*(48), 80046-80058. doi:10.18632/oncotarget.11098
- Misra, J. R., & Irvine, K. D. (2018). The Hippo Signaling Network and Its Biological Functions. *Annu Rev Genet*, *52*, 65-87. doi:10.1146/annurev-genet-120417-031621
- Misra, S., Hascall, V. C., Markwald, R. R., & Ghatak, S. (2015). Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. *Front Immunol*, *6*, 201. doi:10.3389/fimmu.2015.00201
- Misra, S., Heldin, P., Hascall, V. C., Karamanos, N. K., Skandalis, S. S., Markwald, R. R., & Ghatak, S. (2011). Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *FEBS J*, *278*(9), 1429-1443. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08071.x
- Mittal, S., & El-Serag, H. B. (2013). Epidemiology of hepatocellular carcinoma: consider the population. *J Clin Gastroenterol*, *47 Suppl*, S2-6. doi:10.1097/MCG.0b013e3182872f29
- Moon, H., Cho, K., Shin, S., Kim, D. Y., Han, K. H., & Ro, S. W. (2019). High Risk of Hepatocellular Carcinoma Development in Fibrotic Liver: Role of the Hippo-YAP/TAZ Signaling Pathway. *Int J Mol Sci*, *20*(3). doi:10.3390/ijms20030581
- Morrison, H., Sherman, L. S., Legg, J., Banine, F., Isacke, C., Haipek, C. A., . . . Herrlich, P. (2001). The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. *Genes Dev*, *15*(8), 968-980. doi:10.1101/gad.189601
- Nikitovic, D., Tzardi, M., Berdiaki, A., Tsatsakis, A., & Tzanakakis, G. N. (2015). Cancer microenvironment and inflammation: role of hyaluronan. *Front Immunol*, *6*, 169. doi:10.3389/fimmu.2015.00169
- Noguchi, S., Saito, A., & Nagase, T. (2018). YAP/TAZ Signaling as a Molecular Link between Fibrosis and Cancer. *Int J Mol Sci*, *19*(11). doi:10.3390/ijms19113674
- Ogoshi, T., Ishii, S., Mizoi, T., Harada, N., Sato, W., Saito, K., . . . Matsuno, S. (1998). CD44H participates in the intrahepatic growth of murine colon 26 adenocarcinoma cells. *Jpn J Cancer Res*, *89*(11), 1160-1168. doi:10.1111/j.1349-7006.1998.tb00511.x
- Orgaz, J. L., Herraiz, C., & Sanz-Moreno, V. (2014). Rho GTPases modulate malignant transformation of tumor cells. *Small GTPases*, *5*, e29019. doi:10.4161/sgtp.29019
- Overholtzer, M., Zhang, J., Smolen, G. A., Muir, B., Li, W., Sgroi, D. C., . . . Haber, D. A. (2006). Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22



- amplicon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(33), 12405-12410.  
doi:10.1073/pnas.0605579103
- Pan, D. (2010). The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev Cell*, 19(4), 491-505. doi:10.1016/j.devcel.2010.09.011
- Patel, S. H., Camargo, F. D., & Yimlamai, D. (2017). Hippo Signaling in the Liver Regulates Organ Size, Cell Fate, and Carcinogenesis. *Gastroenterology*, 152(3), 533-545. doi:10.1053/j.gastro.2016.10.047
- Perra, A., Kowalik, M. A., Ghiso, E., Ledda-Columbano, G. M., Di Tommaso, L., Angioni, M. M., . . . Columbano, A. (2014). YAP activation is an early event and a potential therapeutic target in liver cancer development. *J Hepatol*, 61(5), 1088-1096. doi:10.1016/j.jhep.2014.06.033
- Porter, A. P., Papaioannou, A., & Malliri, A. (2016). Deregulation of Rho GTPases in cancer. *Small GTPases*, 7(3), 123-138. doi:10.1080/21541248.2016.1173767
- Prieto-Dominguez, N., Parnell, C., & Teng, Y. (2019). Drugging the Small GTPase Pathways in Cancer Treatment: Promises and Challenges. *Cells*, 8(3). doi:10.3390/cells8030255
- Privat, M., Cavard, A., Zekri, Y., Ponelle-Chachuat, F., Molnar, I., Sonnier, N., & Bignon, Y. J. (2020). A high expression ratio of RhoA/RhoB is associated with the migratory and invasive properties of basal-like Breast Tumors. *Int J Med Sci*, 17(17), 2799-2808. doi:10.7150/ijms.43101
- Sadok, A., & Marshall, C. J. (2014). Rho GTPases: masters of cell migration. *Small GTPases*, 5, e29710. doi:10.4161/sgtp.29710
- Sato, K., Marzioni, M., Meng, F., Francis, H., Glaser, S., & Alpini, G. (2019). Ductular Reaction in Liver Diseases: Pathological Mechanisms and Translational Significances. *Hepatology*, 69(1), 420-430. doi:10.1002/hep.30150
- Saucedo, L. J., & Edgar, B. A. (2007). Filling out the Hippo pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(8), 613-621. doi:10.1038/nrm2221
- Sawasdee, N., Wattanapanitch, M., Thongsin, N., Phanthaphol, N., Chiawpanit, C., Thuwajit, C., . . . Panya, A. (2022). Doxorubicin sensitizes breast cancer cells to natural killer cells in connection with increased Fas receptors. *Int J Mol Med*, 49(3). doi:10.3892/ijmm.2022.5095
- Schulze, K., Imbeaud, S., Letouzé, E., Alexandrov, L. B., Calderaro, J., Rebouissou, S., . . . Zucman-Rossi, J. (2015). Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet*, 47(5), 505-511. doi:10.1038/ng.3252
- Severi, T., van Malenstein, H., Verslype, C., & van Pelt, J. F. (2010). Tumor initiation and progression in hepatocellular carcinoma: risk factors, classification, and therapeutic targets. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31(11), 1409-1420. doi:10.1038/aps.2010.142
- Shang, X., Marchioni, F., Sipes, N., Evelyn, C. R., Jerabek-Willemsen, M., Duhr, S., . . . Zheng, Y. (2012). Rational design of small molecule inhibitors targeting RhoA subfamily Rho GTPases. *Chemistry & biology*, 19(6), 699-710. doi:10.1016/j.chembiol.2012.05.009
- Sia, D., Villanueva, A., Friedman, S. L., & Llovet, J. M. (2017). Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. *Gastroenterology*, 152(4), 745-761. doi:10.1053/j.gastro.2016.11.048
- Smithers, C. C., & Overduin, M. (2016). Structural Mechanisms and Drug Discovery Prospects of Rho GTPases. *Cells*, 5(2). doi:10.3390/cells5020026
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and

- Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71(3), 209-249. doi:10.3322/caac.21660
- Supiot, S., Gouard, S., Charrier, J., Apostolidis, C., Chatal, J. F., Barbet, J., . . . Cherel, M. (2005). Mechanisms of cell sensitization to alpha radioimmunotherapy by doxorubicin or paclitaxel in multiple myeloma cell lines. *Clin Cancer Res*, 11(19 Pt 2), 7047s-7052s. doi:10.1158/1078-0432.CCR-1004-0021
- Totaro, A., Panciera, T., & Piccolo, S. (2018). YAP/TAZ upstream signals and downstream responses. *Nat Cell Biol*, 20(8), 888-899. doi:10.1038/s41556-018-0142-z
- Tsubaki, M., Genno, S., Takeda, T., Matsuda, T., Kimura, N., Yamashita, Y., . . . Nishida, S. (2021). Rhosin Suppressed Tumor Cell Metastasis through Inhibition of Rho/YAP Pathway and Expression of RHAMM and CXCR4 in Melanoma and Breast Cancer Cells. *Biomedicines*, 9(1). doi:10.3390/biomedicines9010035
- Uchino, M., Kojima, H., Wada, K., Imada, M., Onoda, F., Satofuka, H., . . . Murakami, Y. (2010). Nuclear beta-catenin and CD44 upregulation characterize invasive cell populations in non-aggressive MCF-7 breast cancer cells. *BMC Cancer*, 10, 414. doi:10.1186/1471-2407-10-414
- Viatour, P., Ehmer, U., Saddic, L. A., Dorrell, C., Andersen, J. B., Lin, C., . . . Sage, J. (2011). Notch signaling inhibits hepatocellular carcinoma following inactivation of the RB pathway. *J Exp Med*, 208(10), 1963-1976. doi:10.1084/jem.20110198
- Vogel, A., Cervantes, A., Chau, I., Daniele, B., Llovet, J. M., Meyer, T., . . . Committee, E. G. (2018). Hepatocellular carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 29(Suppl 4), iv238-iv255. doi:10.1093/annonc/mdy308
- Vogel, A., Martinelli, E., clinicalguidelines@esmo.org, E. G. C. E. a., & Committee, E. G. (2021). Updated treatment recommendations for hepatocellular carcinoma (HCC) from the ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol*, 32(6), 801-805. doi:10.1016/j.annonc.2021.02.014
- Wang, Y., Xu, X., Maglic, D., Dill, M. T., Mojumdar, K., Ng, P. K., . . . Liang, H. (2018). Comprehensive Molecular Characterization of the Hippo Signaling Pathway in Cancer. *Cell Rep*, 25(5), 1304-1317 e1305. doi:10.1016/j.celrep.2018.10.001
- Wang, Z., Zhao, K., Hackert, T., & Zoller, M. (2018). CD44/CD44v6 a Reliable Companion in Cancer-Initiating Cell Maintenance and Tumor Progression. *Front Cell Dev Biol*, 6, 97. doi:10.3389/fcell.2018.00097
- Waxman, S., & Wurmbach, E. (2007). De-regulation of common housekeeping genes in hepatocellular carcinoma. *BMC Genomics*, 8, 243. doi:10.1186/1471-2164-8-243
- Wennerberg, E., Sarhan, D., Carlsten, M., Kaminsky, V. O., D'Arcy, P., Zhivotovsky, B., . . . Lundqvist, A. (2013). Doxorubicin sensitizes human tumor cells to NK cell- and T-cell-mediated killing by augmented TRAIL receptor signaling. *Int J Cancer*, 133(7), 1643-1652. doi:10.1002/ijc.28163
- Xu, H., Niu, M., Yuan, X., Wu, K., & Liu, A. (2020). CD44 as a tumor biomarker and therapeutic target. *Exp Hematol Oncol*, 9(1), 36. doi:10.1186/s40164-020-00192-0
- Xu, H., Tian, Y., Yuan, X., Wu, H., Liu, Q., Pestell, R. G., & Wu, K. (2015). The role of CD44 in epithelial-mesenchymal transition and cancer development. *Onco Targets Ther*, 8, 3783-3792. doi:10.2147/OTT.S95470
- Xu, L. B., & Liu, C. (2014). Role of liver stem cells in hepatocarcinogenesis. *World J Stem Cells*, 6(5), 579-590. doi:10.4252/wjsc.v6.i5.579

- Xu, Y., Stamenkovic, I., & Yu, Q. (2010). CD44 attenuates activation of the hippo signaling pathway and is a prime therapeutic target for glioblastoma. *Cancer Res*, *70*(6), 2455-2464. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2505
- Yadav, S., Kashaninejad, N., & Nguyen, N. T. (2020). RhoA and Rac1 in Liver Cancer Cells: Induction of Overexpression Using Mechanical Stimulation. *Micromachines (Basel)*, *11*(8). doi:10.3390/mi11080729
- Yamashita, T., & Wang, X. W. (2013). Cancer stem cells in the development of liver cancer. *J Clin Invest*, *123*(5), 1911-1918. doi:10.1172/JCI66024
- Yan, Y., Zuo, X., & Wei, D. (2015). Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem Cells Transl Med*, *4*(9), 1033-1043. doi:10.5966/sctm.2015-0048
- Yang, C., Zhang, H., Zhang, L., Zhu, A. X., Bernards, R., Qin, W., & Wang, C. (2023). Evolving therapeutic landscape of advanced hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *20*(4), 203-222. doi:10.1038/s41575-022-00704-9
- Yang, Y., Zhao, X., Li, X., Yan, Z., Liu, Z., & Li, Y. (2017). Effects of anti-CD44 monoclonal antibody IM7 carried with chitosan polylactic acid-coated nano-particles on the treatment of ovarian cancer. *Oncol Lett*, *13*(1), 99-104. doi:10.3892/ol.2016.5413
- Yang, Z. F., Ho, D. W., Ng, M. N., Lau, C. K., Yu, W. C., Ngai, P., . . . Fan, S. T. (2008). Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell*, *13*(2), 153-166. doi:10.1016/j.ccr.2008.01.013
- Yeung, K. T., & Yang, J. (2017). Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. *Mol Oncol*, *11*(1), 28-39. doi:10.1002/1878-0261.12017
- Yimlamai, D., Fowl, B. H., & Camargo, F. D. (2015). Emerging evidence on the role of the Hippo/YAP pathway in liver physiology and cancer. *J Hepatol*, *63*(6), 1491-1501. doi:10.1016/j.jhep.2015.07.008
- Yoshida, M., Yasuda, T., Hiramitsu, T., Ito, H., & Nakamura, T. (2008). Induction of apoptosis by anti-CD44 antibody in human chondrosarcoma cell line SW1353. *Biomed Res*, *29*(1), 47-52. doi:10.2220/biomedres.29.47
- Yu, F. X., & Guan, K. L. (2013). The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes Dev*, *27*(4), 355-371. doi:10.1101/gad.210773.112
- Yu, S., Cai, X., Wu, C., Wu, L., Wang, Y., Liu, Y., . . . Chen, L. (2015). Adhesion glycoprotein CD44 functions as an upstream regulator of a network connecting ERK, AKT and Hippo-YAP pathways in cancer progression. *Oncotarget*, *6*(5), 2951-2965. doi:10.18632/oncotarget.3095
- Zanconato, F., Cordenonsi, M., & Piccolo, S. (2016). YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell*, *29*(6), 783-803. doi:10.1016/j.ccell.2016.05.005
- Zhang, J., He, X., Wan, Y., Zhang, H., Tang, T., Zhang, M., . . . Chen, L. (2021). CD44 promotes hepatocellular carcinoma progression via upregulation of YAP. *Exp Hematol Oncol*, *10*(1), 54. doi:10.1186/s40164-021-00247-w
- Zhang, N., Bai, H., David, K. K., Dong, J., Zheng, Y., Cai, J., . . . Pan, D. (2010). The Merlin/NF2 tumor suppressor functions through the YAP oncoprotein to regulate tissue homeostasis in mammals. *Dev Cell*, *19*(1), 27-38. doi:10.1016/j.devcel.2010.06.015
- Zhang, S., & Zhou, D. (2019). Role of the transcriptional coactivators YAP/TAZ in liver cancer. *Curr Opin Cell Biol*, *61*, 64-71. doi:10.1016/j.ceb.2019.07.006
- Zhang, Y., Xia, H., Ge, X., Chen, Q., Yuan, D., Chen, Q., . . . Bi, F. (2014). CD44 acts through RhoA to regulate YAP signaling. *Cell Signal*, *26*(11), 2504-2513. doi:10.1016/j.cellsig.2014.07.031

- Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R. S., Yang, Q., Kim, J., . . . Guan, K. L. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev*, 21(21), 2747-2761. doi:10.1101/gad.1602907
- Zhao, B., Ye, X., Yu, J., Li, L., Li, W., Li, S., . . . Guan, K. L. (2008). TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev*, 22(14), 1962-1971. doi:10.1101/gad.1664408
- Zhou, D., Conrad, C., Xia, F., Park, J. S., Payer, B., Yin, Y., . . . Bardeesy, N. (2009). Mst1 and Mst2 maintain hepatocyte quiescence and suppress hepatocellular carcinoma development through inactivation of the Yap1 oncogene. *Cancer Cell*, 16(5), 425-438. doi:10.1016/j.ccr.2009.09.026

## **9 Publikationsverzeichnis**

Ein Teil der in dieser Arbeit präsentierten Daten wurde in Form eines Abstracts und wissenschaftlichen Posters mit peer-review Prozess auf dem 33rd European Congress of Pathology 2021 vorgestellt:

J Schwenke, S Manmadhan, B Kohnke-Ertel, C Rupp, P Shokoohi, U Bauer, M Ringelhan, C Mogler, RM Schmid, U Ehmer: Role of CD44/RhoA in the regulation of oncogenic YAP in hepatic carcinogenesis. *Virchows Archiv, European Journal of Pathology*, Vol. 479, Supplement 1, August 2021

## **10 Danksagung**

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Ursula Ehmer für die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe Grundlagenforschung zu betreiben und damit diese Doktorarbeit zu verfassen und für die hervorragende Betreuung.

Besonders möchte ich mich auch bei Herrn PD Dr. Fabian Geisler bedanken für das ausgezeichnete Mentoring, die Unterstützung bei der Projektplanung und das wertvolle Feedback während der Projektdurchführung.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Frau Birgit Kohnke-Ertel und Saumya Manmadhan für die fortwährende Unterstützung bei methodischen und wissenschaftlichen Fragestellungen bedanken. Des Weiteren gilt mein Dank Frau Carina Rupp und Herrn Pooya Shokoohi für die Unterstützung bei der Durchführung der Laborarbeiten.

Von ganzem Herzen möchte ich auch meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich in jeder Lebenslage unterstützen.