

DEUTSCHE STIFTUNG FÜR
**JUNGE
ERWACHSENE
MIT KREBS**

ABSCHLUSSBERICHT

Promotionsstipendium der Deutschen Stiftung für Junge Erwachsene mit Krebs

Titel des Promotionsprojektes

Die Rolle des Hippo Signalling Pathway und seiner Effektoren YAP und TAZ in pädiatrischen Hirntumoren bei jungen Erwachsenen im Alter von 15 bis 25 Jahren

Laura Marie Hero

Medizinische Fakultät der Universität zu Köln
Uniklinik Köln – Zentrum für Neurochirurgie

Sehr geehrte Freunde und Förderer der Deutschen Stiftung für Junge Erwachsene mit Krebs,

ich möchte mich zunächst herzlich für die Unterstützung durch die Stiftung während meiner Promotionsarbeit bedanken. Im Jahr 2020 während der Corona-Pandemie eine Promotionsarbeit beginnen zu wollen war, wie Sie sich sicher vorstellen können, keine einfache Aufgabe. Noch dazu erforderte das Projekt, welches ich mir ausgesucht hatte, experimentelles Arbeiten im Labor. Bei Kontaktbeschränkungen und zwischenzeitlich immer wieder geschlossenen Laborräumen war Planungsflexibilität angesagt, zu Beginn angestrebte Zeitpläne waren kaum einzuhalten. Es gab immer wieder Phasen, in denen ein schnelles Voranschreiten gut möglich war, und Phasen, wo es nahezu zum Stillstand kam. Bis zuletzt kam es zusätzlich immer wieder zu Lieferschwierigkeiten, die uns zur Umplanung zwangen, und die das Projekt weiter verzögerten.

Umso dankbarer bin ich über die Förderung durch ihre Stiftung. Diese ermöglichte es mir zunächst ein und später noch ein zweites Freisemester zu nehmen und mich ganz auf die Promotionsarbeit zu konzentrieren. Zusätzlich konnte ich Erfahrungen auf der DGHO-Jahrestagung und der Tagung der DGNC (Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie) sammeln, und dort sogar mein Projekt vorstellen. Da ich im Anschluss jedoch auch mein Studium fortsetzen wollte, war vor allem gegen Ende der Arbeit das Erreichen der zunächst gesetzten Ziele nicht mehr möglich.

Die Tumorforschung ist aktuell eine der verbreitetsten und vielversprechendsten Forschungszeige. In regelmäßigen Abständen werden Molekulare Marker entdeckt und als „der Durchbruch“ in der Krebsforschung postuliert. Randgruppen sind jedoch häufig wenig vertreten, weshalb die Gruppe der Jugendlichen und jungen Erwachsenen für mich bei der Erarbeitung meines Promotionsthemas ein großes Anliegen war. In dieser Altersgruppe treten sowohl kindliche als auch erwachsene Hirntumorarten auf, der größte Teil meiner Promotionsarbeit wurde also später der Altersvergleich zwischen diesen drei Gruppen.

Ich bin trotz allem mit den Ergebnissen meiner Arbeit sehr zufrieden. Ich hoffe Ihnen mit dem angehängten Bericht einen guten Überblick über meine Promotionsarbeit verschaffen zu können.

Mit den besten Grüßen



Laura Hero

Hintergrund

Inhalt meiner Forschungsarbeit war die Untersuchung von verschiedenen Hirntumoren auf molekularer Ebene. Tumore aus verschiedenen Altersgruppen weisen häufig unterschiedliche Charakteristiken auf und haben dementsprechend eine unterschiedliche Auswirkung auf das Überleben der Patienten.¹

Die Proteine YAP (Yes-associated Protein) und TAZ (Transcriptional Co-Activator With PDZ-Binding Motif) sind zueinander homolog, das heißt sie haben eine sehr ähnliche bis nahezu identische Funktion in der Zelle. Sie sind als sogenannte Co-Aktivatoren an der Transkription von DNA beteiligt und kontrollieren so die Vermehrung aber auch den Untergang von Zellen.^{1,2} YAP und TAZ gelten als vielversprechende Proteine in der Krebsforschung, da sie bereits bei vielen verschiedenen Krebsarten als Molekularer Marker identifiziert werden konnten und dort häufig mit einem schnellen Wachstum und einem schlechten Outcome der Patienten in Verbindung gebracht werden konnten.¹⁻³ Es gibt jedoch auch Tumoren in denen YAP und TAZ als positiver Marker für die Prognose der Patienten identifiziert werden konnte. Dort ist vor allem ein Subtyp der sogenannten Ependymome zu nennen, welcher bei Kindern auftritt.⁴ Dies machte den Altersvergleich vor allem bei dieser Gruppe und bei anderen Hirntumoren sehr spannend.

Ziel meiner Forschungsarbeit war also bei verschiedenen sowohl gut- als auch bösartigen Hirntumoren die Unterschiede in der Bildung von YAP und TAZ zu ermitteln und die Auswirkungen der Marker auf das Wachstum der Zellen zu untersuchen.

Aufbau und Durchführung der Promotionsarbeit

Im Frühjahr und Sommer 2020 begann ich zunächst mit der ausführlichen theoretischen Auseinandersetzung mit meinem Promotionsthema. Anschließend erfolgte die Auswahl geeigneter Proben aus der Tumorbank des Zentrums für Neurochirurgie. Diese Tumorbank besteht seit 1990 und bietet dementsprechend eine breite Auswahl an unterschiedlichen Tumorarten. Nach der Generierung erster Ergebnisse konnte ich später zusätzlich meine Stichprobe erweitern, sodass ich insgesamt auf 87 verschiedene Proben und 9 verschiedene Tumorarten kam.

Bei den Proben untersuchte ich zunächst die Proteinexpression von YAP und TAZ mittels sogenanntem Western Blot, später erfolgte die Untersuchung auf Gen-Ebene mittels PCR. Als weitere Expressionsanalyse gibt es die sogenannte Immunhistochemie. Dafür werden Antikörper der zu untersuchenden Proteine – in meinem Fall YAP und TAZ – benötigt, welche dann farblich dargestellt werden können. Trotz mehrfacher Versuche konnten wir für YAP und TAZ leider keinen geeigneten Antikörper finden, sodass eine Durchführung der Immunhistochemie mit den vorhandenen Ressourcen bis zuletzt leider nicht möglich war.

Nach Auswertung der Expressionsanalysen erfolgte die Erhebung klinischer Daten aus dem Patientensystem der Uniklinik Köln sowie die statistische Auswertung dieser im Bezug zur

Expression von YAP und TAZ. Aufgrund des Alters der verschiedenen Tumorproben und einem unterschiedlichen Stand an Digitalisierung von Patientenakten, ergaben sich hier leider keine signifikanten Ergebnisse. Aufgrund dessen startete ich die Suche nach klinischen Daten in der TCGA-Datenbank (The Cancer Genome Atlas Program) des US-amerikanischen National Cancer Institute. Dies ist eine zusammengetragene Datenbank, in der das Genom von über 11.000 primären Tumoren aufgeschlüsselt wurde und anhand verschiedener Auswertungsmöglichkeiten direkt mit den klinischen Parametern der Patienten in Verbindung gebracht werden kann. Da kindliche Hirntumore, insbesondere solche bei jungen Erwachsenen, jedoch eine Randgruppe darstellen, konnte auch hier keine ausreichend große Stichprobe und somit keine signifikanten Ergebnisse generiert werden.

Als letzten Schritt meiner experimentellen Arbeiten erfolgte die Zellkultur zur Untersuchung der Auswirkung von YAP und TAZ auf das Wachstum von lebenden Tumorzellen. Nach ausgiebiger Literaturrecherche entschieden wir uns für die Medulloblastom-Zellkultur Daoy, welche durch eine US-amerikanische Firma vertrieben wird. Nach einer Lieferzeit von fast 6 Monaten erfolgte zunächst die Kultivierung der Zellen. Nach mehrfachen Kontaminationen startete ich immer wieder neue Versuche, teilweise frustriert. Insbesondere die Untersuchung der Wirkung von Chemotherapeutika gestaltete sich schwierig, da die Zellen bereits beim ersten Schritt starben. Im letzten halben Jahr testete ich die Ausschaltung der Gene für YAP und TAZ mittels siRNA (silencer RNA), welche durch einen Vektor in die Zellen eingeschleust wird. Die Versuche führte ich mit unterschiedlichen Konzentrationen der siRNA durch. Anschließend ermittelte ich erneut die Genexpression (Abb.1) und beobachtete das Wachstum der Zellen unter dem Mikroskop mit einem sogenannten Scratch-Assay (exemplarisch gezeigt in Abb. 2-4). Leider ergab sich durch die Beimpfung der Zellen mittels siRNA keine signifikante Reduktion der Expression von YAP und TAZ im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 1). Außerdem waren hohe Konzentrationen der siRNA mit dem verwendeten Protokoll teilweise zu toxisch für die Zellen (Abb. 2-4), weshalb eine weitere Steigerung der Konzentration nicht sinnvoll war. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die Ausschaltung der Gene in den in vivo-Untersuchungen mit den vor Ort gegebenen Ressourcen zurzeit nicht möglich ist.

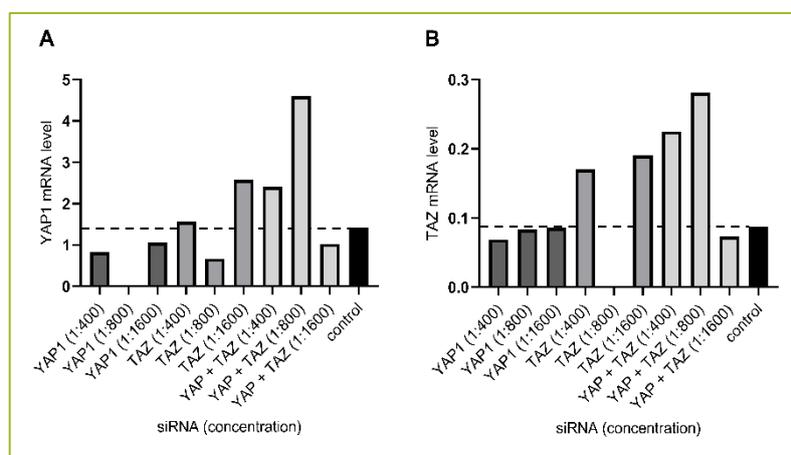


Abbildung 1 Expression von YAP und TAZ in Zellkulturen nach Behandlung mit siRNA



Abbildung 2 Zellkultur mit gut wachsenden, vitalen Zellen



Abbildung 3 Zellkultur und Scratch-Assay mit überwiegend vitalen, jedoch langsam wachsenden Zellen



Abbildung 4 Zellkultur und Scratch-Assay mit überwiegend toten Zellen ohne sichtbares Wachstum

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit dem Programm Graph Pad Prism. Aufgrund der unterschiedlichen Signifikanz der Ergebnisse sowie der unterschiedlichen Anzahl an Tumorproben in den unterschiedlichen Altersgruppen erfolgte die Auswertung des Altersvergleichs bei insgesamt vier verschiedenen Tumorarten: bei Astrozytomen und Ependymomen, zwei eher gutartigen Tumorarten, sowie bei den bösartigen Tumorarten Medulloblastom und Glioblastom. Zusätzlich konnten wir in unserer Tumorbank eine ausreichend große Stichprobe an eher seltenen pädiatrischen Tumoren generieren. Da hier jedoch keine Tumorproben von Erwachsenen zur Verfügung standen, konnte hier leider kein Altersvergleich gezogen werden.

Meine Ergebnisse verfasste ich insgesamt in zwei Manuskripte. Diese wurden für verschiedene Paper eingereicht und können hoffentlich in Kürze publiziert werden. Außerdem konnte ich Teile der Ergebnisse bereits 2022 auf der Jahrestagung der DGNC vortragen. Ein geplantes drittes Paper über die *in vivo* Untersuchungen kann ich aktuell aufgrund der frustrierten Versuche der Zellkultur nicht verfassen. Falls die Gegebenheiten sich vor Ort ändern, bin ich gewillt nach Abschluss meines Studiums die experimentellen Arbeiten erneut aufzunehmen.

Ergebnisse

Expression von YAP und TAZ im Altersvergleich

Wir untersuchten insgesamt 63 Patientenproben, welche wir in 3 verschiedene Altersgruppen unterteilten: pädiatrische Patienten bis 18 Jahre, junge Erwachsene zwischen 18 und 25 Jahren und Erwachsene über 25 Jahre. Die Tumore stammten von vier verschiedenen Tumorarten, nämlich pilozytischen Astrozytomen, Ependymomen, Medulloblastomen und Glioblastomen.

Bei pilozytischen Astrozytomen, den häufigsten gutartigen Hirntumoren bei Kindern, zeigte sich eine signifikant erhöhte Genexpression von YAP in der Gruppe der Erwachsenen. Außerdem lässt sich eine Tendenz erkennen, dass mit dem Alter die Genexpression von YAP ansteigt, dies war jedoch nicht signifikant. Auch die Proteinexpression von YAP war bei Erwachsenen mit pilozytischen Astrozytomen erhöht, jedoch zeigte sich auch hier keine Signifikanz (Abb. 5).

Bei Ependymomen zeigte sich eine genau umgekehrte Tendenz. Sowohl die mRNA von YAP als auch von TAZ waren in der pädiatrischen Gruppe erhöht, bei TAZ war dies signifikant zu der Gruppe der jungen Erwachsenen und zu den Erwachsenen (Abb. 6).

In Medulloblastomen und Glioblastomen, beides maligne Tumorarten, zeigte sich tendenziell eine höhere Expression mit steigendem Alter. Bei Medulloblastomen zeigte sich sowohl bei YAP, als auch bei TAZ eine signifikant höhere Genexpression bei den Erwachsenen im Vergleich zu der pädiatrischen Gruppe (Abb. 7). Glioblastome, wie die pilozytischen Astrozytome ebenfalls von den sogenannten Gliazellen abstammende Hirntumore, zeigten auch eine ähnliche Tendenz wie letztere. Dabei war jedoch nur die Proteinexpression von YAP in der Gruppe der Erwachsenen signifikant erhöht im Vergleich zur pädiatrischen Gruppe (Abb. 8).

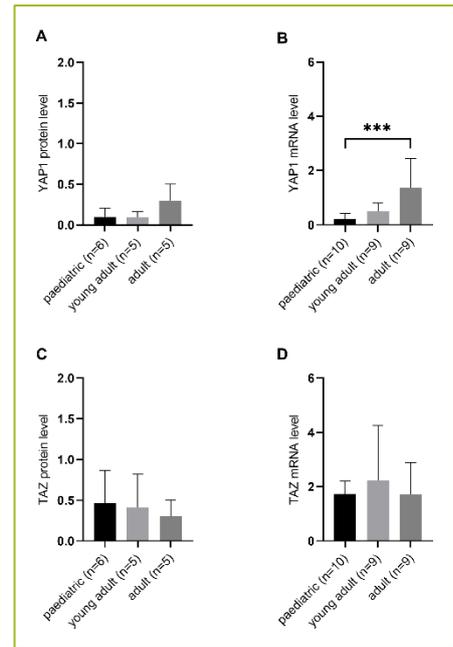


Abbildung 5 Expression von YAP und TAZ bei Pilozytischen Astrozytomen

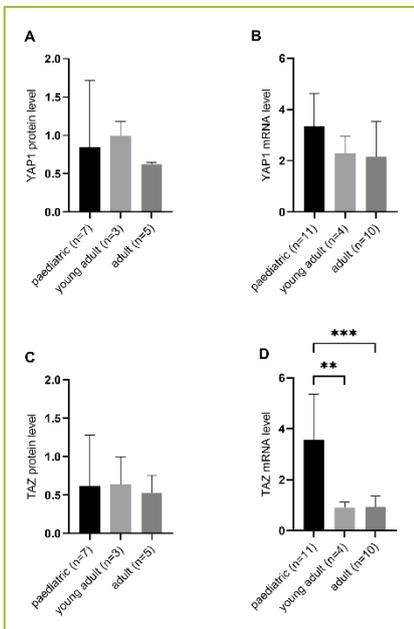


Abbildung 6 Expression von YAP und TAZ bei Ependymomen

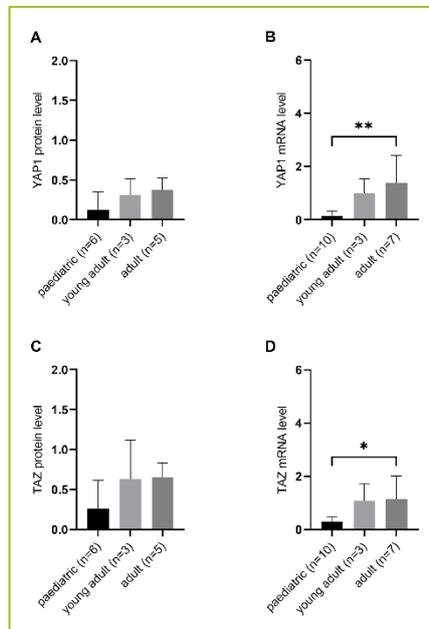


Abbildung 7 Expression von YAP und TAZ bei Medulloblastomen

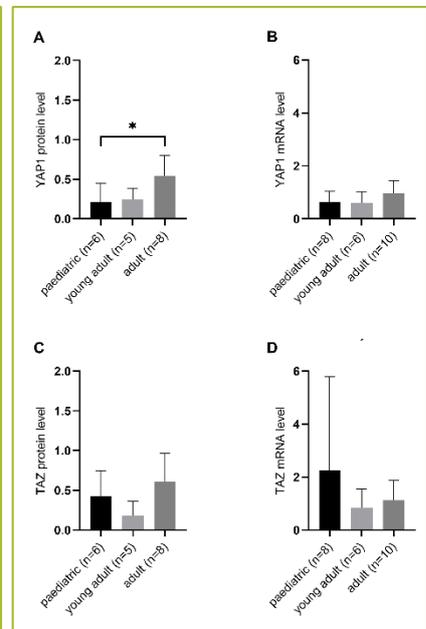


Abbildung 8 Expression von YAP und TAZ bei Glioblastomen

Expression von YAP und TAZ in seltenen, gutartigen pädiatrischen Hirntumoren
 Die Untersuchung der Expression von YAP und TAZ erfolgte bei insgesamt 24 Proben verschiedener Tumorarten. Dazu gehörten Dysembryoplastische neuroepitheliale Tumore (DNET), Plexuspapillome, Gangliogliome, Neurofibrome und Craniopharyngeome. Wir verglichen die Expressionsraten zunächst mit gesundem Kontrollgewebe (Abb. 9) und anschließend die Gruppen untereinander (Abb. 10).

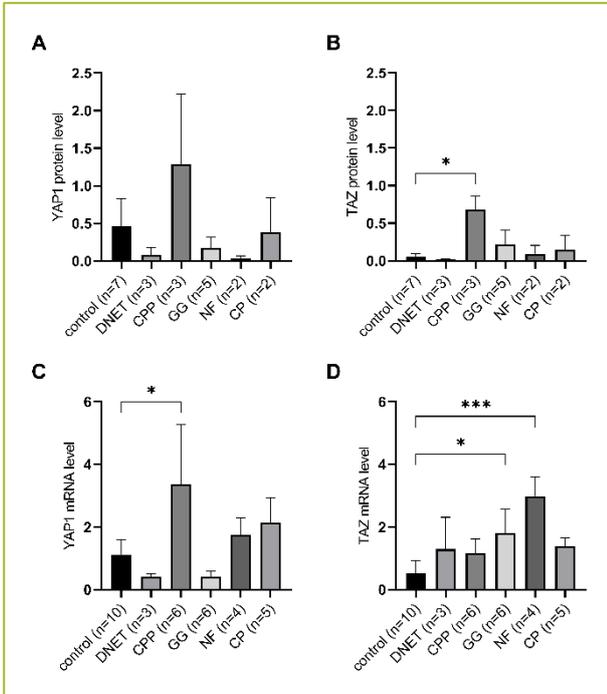


Abbildung 9 Expression von YAP und TAZ bei gutartigen pädiatrischen Hirntumoren im Vergleich zu Kontrollgewebe

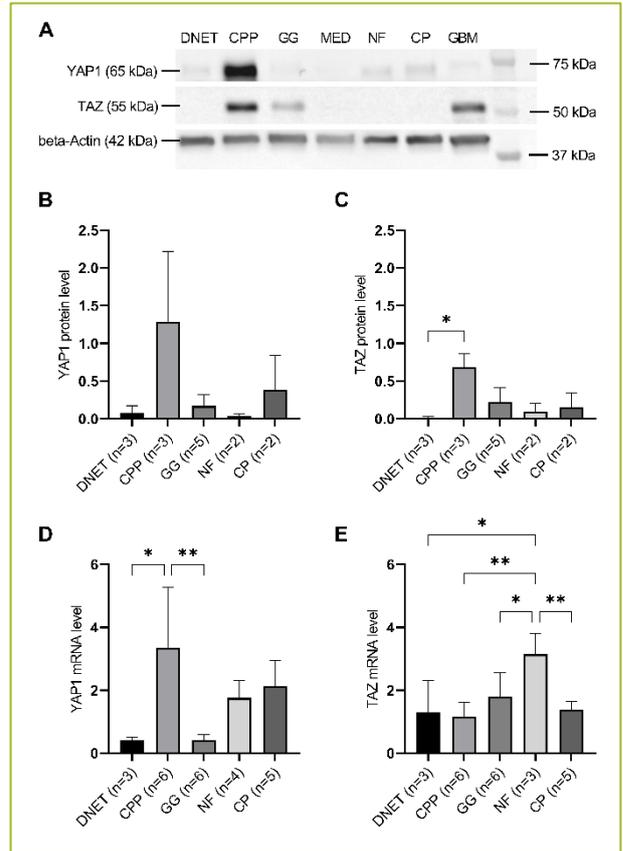


Abbildung 10 Expression von YAP und TAZ bei gutartigen pädiatrischen Hirntumoren im Vergleich untereinander

Insbesondere bei Plexuspapillomen sahen wir erhöhte Expressionsraten von YAP und TAZ. Die Proteinexpression von TAZ war dabei sowohl im Vergleich zum Kontrollgewebe (Abb. 9A und B) als auch im Vergleich zur Gruppe der Dysembryoplastischen neuroepithelialen Tumore signifikant erhöht (Abb. 10C). Rein makroskopisch konnte man im Western Blot außerdem sehen, dass die Banden von TAZ bei den gutartigen Plexuspapillomen sogar stärker sichtbar waren als bei bösartigen Tumoren wie Glioblastome oder Medulloblastome (Abb. 10C). Wir sahen außerdem einen signifikanten Unterschied der mRNA-Expression von YAP in Plexuspapillomen im Vergleich zum Kontrollgewebe (Abb. 9C), zu den Dysembryoplastischen neuroepithelialen Tumoren sowie Gangliogliomen (Abb. 10D).

Außerdem sahen wir, dass die mRNA von TAZ in Gangliogliomen und Neurofibromen stark exprimiert wurde, verglichen mit der Kontrollgruppe war dies signifikant (Abb. 9D). In Neurofibromen zeigte sich außerdem eine signifikant erhöhte Genexpression von TAZ im Vergleich zu jeder anderen Gruppe (Abb. 10E).

Versuch der Zellkultur mit Medulloblastomzellen (Daoy)

In der kulturellen Anzucht der Medulloblastomzellkultur ließen wir zunächst mehrere Passagen wachsen und testeten im Anschluss unterschiedliche Konzentrationen von siRNA aus und überprüften mittels PCR, ob dadurch die mRNA von YAP beziehungsweise TAZ ausreichend herunterreguliert wurde. Wie weiter oben erwähnt ergab sich mit den uns aktuell verfügbaren Methoden leider keine signifikant geringere Expression von YAP und TAZ in den behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen, weshalb ein Weiterarbeiten mit sogenannten Invasions- oder Wachstums-Assays zum aktuellen Zeitpunkt nicht möglich ist.

Schlussfolgerungen

Erhöhte Expressionsraten von YAP und TAZ in den verschiedenen Tumoren könnten darauf hinweisen, dass die beiden Proteine als Teil des sogenannten Hippo Pathways eine Rolle in der Tumorentstehung der verschiedenen Tumore spielen. Außerdem ist es möglich, dass die unterschiedlichen Expressionsraten eine Ursache für das unterschiedliche Überleben der Patienten in den verschiedenen Altersgruppen darstellen. Zur weiteren Untersuchung dieses Sachverhaltes wäre sowohl eine *in vivo* Untersuchung verschiedener Zellreihen weiterhin denkbar. Außerdem wäre eine Auswertung der Proben anhand von klinischen Daten sinnvoll, dies war mir jedoch sowohl aus ethischen als auch aus technischen Gründen bisher nicht möglich.

Literatur

1. Cobbaut M, Karagil S, Bruno L, et al. Dysfunctional Mechanotransduction through the YAP/TAZ/Hippo Pathway as a Feature of Chronic Disease. *Cells*. 2020;9(1).
2. Li P-D, Wang X-J, Shan Q, Wu Y-H, Wang Z. Evaluation of TAZ expression and its effect on tumor invasion and metastasis in human glioma. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2014;7(10):757-760.
3. Li W, Dong S, Wei W, et al. The role of transcriptional coactivator TAZ in gliomas. *Oncotarget*. 2016;7(50):82686-82699.
4. Jones DTW, Banito A, Grünewald TGP, et al. Molecular characteristics and therapeutic vulnerabilities across paediatric solid tumours. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(8):420-438.