Aus dem Zentrum für Neurochirurgie der Universität zu Köln
Klinik für Allgemeine Neurochirurgie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. R. Goldbrunner

Die Expression von YAP1 und TAZ als prognostische Marker in niedriggradigen Gliomen und Hirnmetastasen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Jill Greta Dicke
aus Wermelskirchen

promoviert am 15. Juni 2026

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
2026

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. R. H. Goldbrunner
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. H. Kashkar
3. Gutachter: Privatdozentin Dr. rer. nat. B. Vollenbröcker

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Herrn Dr. med. Marco Timmer

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt.
Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Patientenproben wurden von der Klinik für allgemeine Neurochirurgie der Uniklinik Köln entnommen und durch das Institut für Neuropathologie der Uniklinik Köln klassifiziert.

Die sachgerechte Aufbewahrung und Katalogisierung der Tumorproben ist durch das Labor für experimentelle Neurochirurgie und Neuroonkologie erfolgt, insbesondere durch die leitende biologisch-technische Assistentin Frau Saskia Kuhl.

Die Erhebung der Rezidiv- und Überlebensdaten erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Saskia Kuhl, die Auswertung und graphische Darstellung dieser Daten wurde von mir selbst durchgeführt.

Für die Polymerasekettenreaktion (PCR)-Experimente erfolgte das Design der YAP1/TAZ Primer und die RNA-Isolation aus den Tumorproben durch Frau Saskia Kuhl. Die cDNA-Synthese sowie Durchführung und Auswertung der PCR wurde von mir ausgeführt.

Die Proteine für die Western Blot Analyse wurden durch Frau Saskia Kuhl isoliert und die Western Blot-Versuche sowie deren Auswertung von mir durchgeführt.

Die Auswertung und Analyse des „The Cancer Genome Atlas“ erfolgte durch mich anhand der Webseite „cBioPortal for cancer genomics“ (http://www.cbioportal.org).

Die statistischen Analysen der Daten wurden unter Verwendung von GraphPad Prism (Version 9) von mir durchgeführt. Die generierten Ergebnisse wurden mit dem Laborleiter Herrn Dr. med. Marco Timmer besprochen. Das Erstellen der Abbildungen erfolgte durch mich, das Manuskript wurde von mir geschrieben.

Herr Dr. med. Marco Timmer hat das Manuskript kommentiert.

Die Arbeit wurde von Herrn Prof. Dr. med. Roland Goldbrunner als Doktorvater und Herrn Dr. med. Marco Timmer als Laborleiter betreut.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 24.06.2025
Unterschrift: .....

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei allen Personen, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt haben.

Insbesondere danke ich Frau Saskia Kuhl für ihre Betreuung bei der Durchführung der Experimente. Zudem danke ich Frau Laura Hero für die gemeinsame Zeit während der Promotionsdurchführung und meiner Familie für ihre immerwährende Unterstützung. Außerdem danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Roland Goldbrunner und Herrn Dr. med. Marco Timmer für die Betreuung dieser Promotion.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 7

1. ZUSAMMENFASSUNG 8

2. EINLEITUNG 10

2.1. Gliome 10
2.1.1. Übersicht, Epidemiologie 10
2.1.2. Symptome 10
2.1.3. Diagnostik 10
2.1.4. Therapie 12
2.1.5. Überleben 13

2.2. Metastasen 13
2.2.1. Epidemiologie 13
2.2.2. Metastasierungswege 13
2.2.3. Therapie 14

2.3. Hippo Signalweg 15
2.3.1. Physiologische Funktion 15
2.3.2. Regulation 16
2.3.3. Rolle in Karzinomen 16
2.3.4. Rolle in Gliomen 17
2.3.5. Therapieresistenz 17

2.4. Ziel und Fragestellung der Arbeit 18

3. PUBLIKATION 19

5. DISKUSSION 34

5.1. YAP/TAZ in niedriggradigen Gliomen 34
5.1.1. Ergebnisse 34
5.1.2. Unterschiedliche Expressionsmuster in Astrozytomen und Oligodendrogliomen 34

5.2. YAP/TAZ in Metastasen 35
5.2.1. Ergebnisse 35
5.2.2. Bedeutung in der EMT 35
5.2.3. Bedeutung in der Therapie 36

5.3. Limitationen der Arbeit **37**

6. LITERATURVERZEICHNIS 38

Abkürzungsverzeichnis

1p/19q Kodeletion	Kodeletion des kurzen Arms von Chromosom 1 und des langen Arms von Chromosom 19
5-FU	5-Fluoruracil
+7/-10	zusätzlich vorhandenes Chromosom 7 und gleichzeitiger Verlust von Chromosom 10
ABCG	ABC subfamily G member 2
AKT	Protein Kinase B
ALK	Anaplastische Lymphomkinase
AXL	AXL receptor tyrosine kinase
BIRC	baculoviral IAP repeat containing
BRAF	Protoonkogen B-Raf
CDKN	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor
CK	Casein kinase
CTGF	connective tissue growth factor
CYR	cysteine rich angiogenic inducer
DAMP	damage associated pattern
DNA	desoxyribonucleid acid
EGFR	epidermal growth factor receptor
ERK	extracellular signal-regulated kinases
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
FLAIR	Fluid Attenuated Inversion Recovery
GSC	glioma stem cells
GPCR	G-protein coupled receptors
HER	humaner epidermaler Wachstumsfaktor
IDH	Isocitratdehydrogenase
KPS	Karnofsky Index
LATS	large tumor suppressor
MCL	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1
MGMT	O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MOB	MOB kinase activator
MRT	Magnetresonanztomographie
MST	mammalian STE20-like protein kinase
MYC	MYC protooncogene bHLH transcriptions factor
NSCLS	nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
PCR	polymeras chain reaction
PCV	Procarbazin, Lomustin, Vincristin
pTERT	telomerase reverse transcriptase-Promoter Mutation
rB	Retinoblastom Protein
SAV	Salvador homologue
SMAD	small Mothers against decapentaplegic
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAZ	transcriptional coactivator with PDZ binding motif
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TEAD	Transcriptional enhancer factor domains
TMZ	Temozolomide
TNF	Tumornekrosefaktor
WHO	World Health Organization
YAP	yes-associated protein

1. Zusammenfassung

Zu den Low Grade Gliomen gehören unter anderem Astrozytome und Oligodendrogliome Grad 2.[1] Sie tragen definitionsgemäß eine IDH1- oder IDH2-Mutation, das Oligodendrogliom zusätzlich eine 1p/19q-Deletion.[1] Die Patienten sind häufig von jüngerem Alter, für Diffuse Astrozytome beträgt das mediane Erkrankungsalter 47 Jahre, für Oligodendrogliome 43 Jahre. Mit einem 5-Jahresüberleben von 51,6% beim diffusen Astrozytom und 82,7% beim Oligodendrogliom weisen diese niedrig-gradigen Gliome deutlich höhere Überlebensraten als das Glioblastom auf.[2] Allerdings können viele Komplikationen auftreten, die mit einer verringerten Lebensqualität einhergehen, besonders nach einer neurochirurgischen Intervention. Die weiteren Therapieoptionen bestehen aus Bestrahlung und Chemotherapie, auch dies weist Nebenwirkungen auf. Gefürchtet ist die Progression eines Astrozytoms in ein sekundäres Glioblastom, die Mediane Überlebenszeit beträgt dann nur noch wenige Monate.[3] Hirnmetastasen weisen eine deutlich höhere Inzidenz als hirneigene Tumore auf. Am häufigsten zeigen sich Metastasen des Bronchial- und Mammakarzinoms sowie des Malignen Melanoms. Treten Hirnmetastasen auf, so verringert sich die Überlebenszeit auf Wochen bis Monate, außerdem ist die Lebensqualität aufgrund der raumfordernden Prozesse im Gehirn stark reduziert, zumal häufig multiple Läsionen auftreten.[4] Die Therapieoptionen bestehen auch dort aus Resektion und Bestrahlung, gegebenfalls kann je nach Tumorentität auch eine gezielte Chemotherapie durchgeführt werden, was zu einer etwas verlängerten Überlebenszeit führen kann.[5] Damit ein solider Tumor metastasieren kann, müssen die Tumorzellen zunächst die EMT durchlaufen.[6] YAP und TAZ sind Effektoren des Hippo Pathways und physiologisch an der Regulation von Gewebswachstum, Zellproliferation, Zelldifferenzierung sowie Apoptose und EMT beteiligt. Der Hippo Pathway umfasst mehrere Kinasen und wird von Veränderungen in mechanischem Stress, Zellkontakten, Zell-Zell-Verbindungen und Zell-Polarität reguliert. Bei Aktivierung des Signalwegs werden YAP und TAZ nicht in den Zellkern verlagert, sondern im Zytoplasma sequestriert oder proteosomal degradiert. Können sie jedoch im Zellkern an Transkriptionsfaktoren binden, so werden Gene für Merkmale erhöhter Zellproliferation und Tumorgenese transkribiert.[7] Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass YAP und TAZ in verschiedenen Tumorentitäten überexprimiert werden und eine erhöhte Expression mit einem geringeren Ansprechen auf Chemotherapie assoziiert ist.[8–10]

Wir konnten zeigen, dass eine erhöhte Expression von YAP in Astrozytomen und Oligodendrogliomen mit einem verkürztem Gesamtüberleben assoziiert ist. Das zeigte sich sowohl in Daten der TCGA als auch im eigenen Patientenkollektiv. Zudem konnten wir zeigen, dass YAP und TAZ in Hirnmetastasen des Bronchialkarzinoms, Mammakarzinoms und Malignen Melanoms unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen.

YAP und TAZ spielen eine wichtige und vielfältige Rolle in der Tumorgenese, Metastasierung, Progress und Resistenz gegenüber Therapien, letztendlich also im Überleben von Tumorpatienten. Eine Messung des Expressionsstatus von YAP und TAZ könnte so als prognostischer Marker hinsichtlich des Therapieansprechens, des Metastasierungspotenzials und des Gesamtüberlebens gelten. Eine Inhibierung von YAP/TAZ und/oder deren Up- und Downstream-Genen scheint ein vielversprechender Therapieansatz zu sein.[10]

2. Einleitung

2.1. Gliome

2.1.1. Übersicht, Epidemiologie

Hirneigene Tumore gehören zu den zehnthäufigsten Krebs-assoziierten Todesursachen. [11] Gliome gehören zu den primären Hirntumoren und machen ca. 26% dieser Gruppe aus.[12] Die für Erwachsene typischen, diffusen Gliome werden weiterhin nach ihren histologischen und molekulargenetischen Eigenschaften durch die *2021 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System* in Astrozytome, Oligodendrogliome und Glioblastome eingeteilt.[13] Etwa die Hälfte der malignen Hirntumore sind Glioblastome, ca. 30% sind niedrig-gradige Gliome, also Gliome Grad 1 oder 2.[14] Besonders jüngere Altersgruppen sind häufig von Hirntumoren betroffen, in der Gruppe der 0-14-jährigen sind Hirntumore die häufigste Tumorentität, bei Personen im Alter von 15-39 Jahren die zweithäufigste. [2] Das mediane Erkrankungsalter von Patienten mit Grad 2 Tumoren liegt bei 30-40 Jahren, das bei Glioblastomen bei 60-70 Jahren.[12] Maligne Hirntumore weisen mit einem Fünfjahres-Überleben von 36% zudem eine hohe Mortalität auf.[14]

2.1.2. Symptome

Etwa die Hälfte der Patienten mit diagnostizierten Hirntumoren klagte über diffuse Kopfschmerzen. Zudem sind Symptome durch den erhöhten intrakraniellen Druck wie Übelkeit, Nüchternerbrechen oder Erschöpfung häufig, gegebenenfalls zeigt sich außerdem ein Papillenödem. Je nach Lokalisation des Tumors können fokal-neurologische Defizite auftreten. Treten diese in der dominanten Hirnsphäre auf, so können sich Sprachstörungen zeigen, bei Tumoren des Frontallappens zeigen sich Störungen der Informationsverarbeitung sowie Wesensveränderungen.[1] Epileptische Anfälle treten bei 74% der Patienten mit niedrig-gradigen Gliomen auf.[15]

2.1.3. Diagnostik

2.1.3.1. MRT-Diagnostik

Bei Auftreten von Symptomen, die einen Hirntumor suggerieren, sollte eine Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie (MRT) sowie Gadolinium-basiertem Kontrastmittel erfolgen.[1] Maligne Hirntumore zeichnen sich wegen der starken Vaskularisation durch eine inhomogene Kontrastmittelaufnahme in der T1-Sequenz aus. Zudem sprechen nekrotische Zonen sowie eine unregelmäßige Begrenzung für eine Malignität des Tumors. Sind die Liquorräume infiltriert, so können auch Liquorzirkulationsstörungen mit nachfolgendem Hydrozephalus auftreten. In der T2/ Fluid Attenuated Inversion Recovery (FLAIR)-Sequenz zeigt sich häufig ein peritumorales Ödem. [14]

2.1.3.2. Histologische Klassifikation

Die histopathologische Diagnose erfolgt meist nach primärer Resektion in diagnostischem sowie therapeutischen Ansatz. Wird keine Resektion angestrebt, so kann die Gewinnung von Gewebe mittels stereotaktischer Biopsie erfolgen. Dabei sollten Serienbiopsien vorgenommen werden, da typische histopathologische und molekulargenetische Merkmale innerhalb des Tumorgewebes inhomogen ausgeprägt sein können. Das Gewebe wird sowohl histopathologisch als auch molekulargenetisch untersucht. [1]

Zeigt sich histopathologisch ein diffuses oder oligodendrogliales Gliom, so wird dieses weiter molekulargenetisch untersucht.

2.1.3.2.1. IDH-Mutation

Physiologisch katalysiert die Isocitratdehydrogenase (IDH) die oxidative Decarboxylierung von Isocitrat zu 2-Oxoglutarat. Treten Mutationen der IDH1/IDH2 auf, so verlieren sie die normale enzymatische Funktion und produzieren 2-Hydroxyglutarat. Dieses führt zu Veränderungen der Prozesse der Dioxygenasen, welche Histone und DNA demethylieren. So könnte eine IDH-Mutation die Tumorgenese fördern.[16]

2.1.3.2.2. 1p/19q-Kodeletion

Eine 1p/19q-Kodeletion bezeichnet den Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 und des langen Arms von Chromosom 19 durch unbalancierte Translokation und definiert die Gruppe der Oligodendriogliome. Die genauen biologischen Effekte auf Gliome sind noch weitesgehend unklar, allerdings ist diese Kodeletion mit einem erhöhten Ansprechen auf Chemotherapie und Radiotherapie und somit mit einer höheren Überlebenszeit assoziiert. [17]

2.1.3.2.3. MGMT-Promotor-Hypermethylierung

Die O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Promotor-Hypermethylierung (MGMT) ist ein molekularer Biomarker, der bei Therapiefindungen eine wichtige Rolle spielen kann. Wird das MGMT-Gen durch Hypermethylierung des Promotors weniger expremiert, so können DNA-Schädigungen nicht repariert werden. Dies ist besonders beim Einsatz von Alkylanzien wie Temozolomid von Vorteil und ist somit ein positiver Prädiktor für das Therapieansprechen sowie daraus resultierend eine verlängerte Überlebenszeit.[18]

2.1.3.2.4. Oligodendrogliome

Oligodendrogliome weisen in der histologischen Untersuchung einen runden Nucleus, perinukleäre Halos und ein verzweigtes Kapillarmuster auf. Sie tragen eine IDH1- oder -2-Mutation sowie die 1p/19q-Kodeletion. Bei WHO Grad 2 zeigt sich wenig oder keine mitotische Aktivität und keine Nekrose oder mikrovaskuläre Proliferation. Liegen jedoch eine erhöhte zelluläre Dichte, nukleäre Atypien, erhöhte mitotische Aktivität und Nekrosen und/oder mikrovaskuläre Proliferation vor, so wird das Oligodendrogliom mit Grad 3 klassifiziert. Die Unterteilung in Grad 2 und 3 Oligodendrogliome wird jedoch kontrovers diskutiert. [14]

2.1.3.2.5. Astrozytome

Astrozytome tragen ebenfalls die IDH1/2-Mutation, sind jedoch 1p/19q-intakt. In der Histologie zeigt sich ein oval bis verlängerter Nucleus und ein eosinophiles Zytoplasma. Für eine Einteilung in Grad 2 und 3 gelten die gleichen Kriterien wie beim Oligodendrogliom, zusätzlich muss jedoch der Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor (CDKN)-2A und CDKN2B intakt sein. Bei Grad 4 zeigt sich ebenfalls eine erhöhte zelluläre Dichte, deutliche nukleäre Atypien, eine hohe mitotische Aktvität sowie Nekrosen und/oder mikrovaskuläre Proliferation. Zusätzlich bedeutet eine homozygote Deletion von CDKN2A und/oder CDKN2B, dass ein Astrozytom Grad 4 vorliegt. Dies wird in manchen Nomenklaturen auch als sekundäres Glioblastom definiert, da es sich aus einem bestehenden diffusen oder anaplastischen Astrozytom entwickelt. [13]

Glioblastome weisen den IDH-Wildtyp auf, die Astrozyten zeigen das gleiche histologische Muster wie beim Astrozytom. Ein Glioblastom wird immer als Grad 4 Tumor klassifiziert, zusätzliche Kriterien sind eine epidermal growth factor receptor-Amplifikation (EGFRamp), eine telomerase reverse transcriptase-Promoter Mutation (pTERTmut) oder ein zusätzlich Chromosom 7 und gleichzeitiger Verlust von Chromosom 10 (+7/-10) definieren das Glioblastom. Dieses wird auch als primäres Glioblastom bezeichnet, da es de-novo entsteht und nicht aus anderen Astrozytomen hervorgeht. [14]

2.1.4. Therapie

2.1.4.1. Oligodendrogliome

Bei Oligodendrogliomen sollte eine Resektion des Tumors angestrebt werden. Nach makroskopisch totaler Resektion sowie bei jungen Patienten unter 40 Jahren mit inkompletter Resektion kann zunächst eine watch-and-wait-Strategie begonnen werden. Ist jedoch weitere Therapie nötig, wie beispielsweise bei Grad 3 Oligodendrogliomen, so besteht diese aus Radiotherapie gefolgt von Chemotherapie mit Procarbazin, Lomustin und Vincristin (PCV). Diese Kombination führt zu einem verdoppelten Gesamtüberleben im Gegensatz zur Radiotherapie alleine. Die alleinige Anwendung von Radiotherapie oder von Chemotherapie zeigt keinen Überlebensvorteil. Bei einem Progress sollte immer eine erneute Resektion des Tumorgewebes in Betracht gezogen werden, zudem kann ein Therapieversuch mit Temozolomid erfolgen.[1]

2.1.4.2. Astrozytome

Bei Patienten mit Astrozytomen sollte die Resektion so ausgedehnt wie möglich erfolgen. Grad 2 Astrozytome sollten nach Resektion mit Radiotherapie gefolgt von Polychemotherapie mit PCV behandelt werden. Liegt ein Grad 3 Astrozytom vor, sollte nach der Radiotherapie jedoch eine erhaltende Chemotherapie mit Temozolomid erfolgen.[1]

2.1.4.3. Glioblastome

Auch bei Glioblastomen sollte eine möglichst ausgedehnte Resektion angestrebt werden. Die weitere Therapie ist von Patientenfaktoren wie dem Karnofsky-Index, dem Alter sowie dem

MGMT-Promoter-Status abhängig. Bei Patienten unter 70 Jahren sowie Karnofsky-Index (KPS) >70 sollte eine Radiochemotherapie mit Temozolomid erfolgen. Die Radiotherapie sollte bei Patienten mit KPS <70 als hypofraktionierte Therapie erfolgen. Patienten >70 Jahren sollten bei Vorliegen der MGMT-Promotor-Hypermethylierung mit Temozolomid allein oder als Radiochemotherapie behandelt werden. Ist der MGMT-Status negativ, so sollte eine alleinige Radiotherapie, gegebenenfalls hypofraktioniert, erfolgen. [1]

2.1.5. Überleben

Die Überlebensrate von Gliomen ist stark von Patientenfaktoren, WHO-Grad sowie der gewählten weiteren Therapie abhängig. Diffuse Astrozytome zeigen ein medianes 5-Jahres-Überleben von 51,6%, dies ist nach Altersgruppe jedoch stark variabel. Patienten im Alter von 0-14 Jahren zeigen Raten von 83%, die Altersgruppe der 15-39-Jährigen ein Überleben von 76,1%. In der Gruppe der >40-Jährigen beträgt das 5-Jahres-Überleben jedoch nur noch 32,3%.[2]

Oligodendrogliome zeigen insgesamt eine bessere Prognose, so beträgt das durchschnittliche 5-Jahres-Überleben 82,7%. Mit höherem Alter sinkt auch dort die Überlebenswahrscheinlichkeit auf 75,5%, dies ist jedoch nicht so stark ausgeprägt wie beim diffusen Astrozytom.[2]

Die schlechtesten Überlebensraten zeigen Glioblastom-Patienten, nach einem Jahr ist bereits etwa die Hälfte der Patienten verstorben. Das 5-Jahres-Überleben beträgt nur 6,8%. Auch dort haben Patienten im Alter von 0-14 Jahren einen Überlebensvorteil, nach fünf Jahren leben noch 21,8% der Patienten. [2]

2.2. Metastasen

2.2.1. Epidemiologie

In den USA treten pro Jahr etwa 200.000 Fälle von Hirnmetastasen auf.[4] Davon sind 40-50% Metastasen des Bronchialkarzinoms, 15-20% des Mammakarzinoms und 5-10% des malignen Melanoms.[19] Die Inzidenz von Hirnmetastasen ist drei- bis zehnmal so hoch wie bei hirneigenen Tumoren[5], die Dunkelziffer liegt vermutlich noch höher, da bei vielen sehr kranken Patienten keine weitere Diagnostik mehr durchgeführt wird.[4] Hirnmetasten weisen eine sehr hohe Mortalität auf, werden diese nicht therapiert, so beträgt das mediane Überleben bei mehreren Metastasen nur fünf Wochen. Werden alle Therapieoptionen wie Resektion, Ganzhirnbestrahlung oder stereotaktische Radiotherapie ausgeschöpft, so kann sich die mediane Überlebenszeit bei ausgewählten Patienten auf 3-18 Monate steigern.[20]

2.2.2. Metastasierungswege

Um metastasieren zu können, müssen Tumorzellen in der Lage sein, den Verbund der Primariuszellen zu verlassen, um in die Blutbahn invadieren zu können. Zunächst muss die

Basalmembran überwunden werden, dies geschieht durch proteolytische Enzyme, die die Tumorzellen sekretieren. So können die migrierenden Zellen die Basalmembran durchdringen und kleinste Gefäße infiltrieren, um in den Blutkreislauf zu gelangen. Dies kann auch über lymphatische Gefäße geschehen. Sie können als einzelne Tumorzellen oder im Verbund mit anderen Blutzellen wie Thrombozyten oder Lymphozyten im Blut zirkulieren. Gelangen sie in das Kapillarbett anderer Organe, so können sie dieses durch ihre Größe embolisieren oder erkennen Oberflächenmoleküle. Nach Extravasation können sie angiogenetische Programme der mikrovaskulären Endothelzellen aktivieren und so die weitere Versorgung mit Nährstoffen sicherstellen sowie die Dissemination von weiteren Tumorzellen fördern.[20]

Reaktive Astrozyten werden durch Damage-associated molecular Patterns (DAMP) aktiviert und sekretieren Plasmin, um die Tumorzellen zu zerstören. Einzelne Tumorzellen können jedoch Serpin sekretieren, welches die Aktivierung der Protease verhindert. Sie verbleiben dann perivaskulär neben neuralen Stammzellen, vermutlich da sie dort eine hohe Verfügbarkeit an Sauerstoff und Nährstoffen vorfinden und Kontakt zur Basallamina von Kapillaren sowie zu den angiokrinen Faktoren von Endothelialzellen haben. [21]

Diese entstandenen Mikrometasten können über Jahre hinweg ruhen und teilweise erst Jahrzehnte nach der Erstdiagnose makroskopisch sichtbar und symptomatisch werden. Dies ist besonders bei Primärtumoren der Mamma und beim malignen Melanom der Fall. Das Wachstum der Mikrometastasen scheint von der Mikroumgebung abhängig zu sein. Tumorzellen können mit reaktiven Astrozyten interagieren und durch Protocadherin 7 gap junctions aufbauen, die einen Austausch von Ionen und second messengern ermöglichen. So wird das Wachstum weiter gefördert und die Resistenz gegenüber Chemotherapie-induzierter Apoptose gesteigert.[21]

2.2.3. Therapie

Die Therapieoptionen sind von Patientenfaktoren, Anzahl und Lokalisation der Metastasen sowie der Krankheitsaktivität abhängig. Eine Resektion sollte bei ein bis drei solitären Metastasen, großen Läsionen (>3cm), solchen mit zystischen oder nekrotischen Anteilen sowie mit Ödem- oder Masseneffekt in Erwägung gezogen werden. Außerdem sollte dies bei Metastasen der posterioren Fossa mit Hydrozephalus und Läsionen in eloquenten Arealen angestrebt werden. Die Primärerkrankung sollte dabei inaktiv oder kontrolliert sein oder gute Therapieoptionen für den soliden Tumor zur Verfügung stehen und der KPS >60 betragen.

Stereotaktische Radiochirurgie kommt bei Metastasen, deren Lokalisation eine offene Resektion erschweren, bei Durchmessern <3-3,5cm sowie bei Komorbiditäten der Patienten in Frage. Nach stereotaktischer oder offener Resektion muss nicht zwingend eine Ganzhirnbestrahlung erfolgen, da der Überlebensvorteil gering ist und ein Risiko für neurokognitive Dysfunktionen besteht. Die Ganzhirnbestrahlung stellt jedoch eine Therapieoption für Patienten mit kurzer Lebenserwartung dar.[5]

Auch die medikamentöse Therapie kann eine Option bei der Behandlung von Hirnmetastasen sein, die Wirkstoffe müssen jedoch die Blut-Hirn-Schranke überwinden können. In der Therapie von Metastasen des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLS) sind Platinkomponenten und andere Agenzien wie Etoposid, Vinorelbin oder Pemetrexed etabliert. Liegt eine EGFR-Mutation oder Mutation der anaplastischen Lymphomkinase vor, zeigt die Anwendung von Tyrosinkinaseinhibitoren ein sehr gutes Ansprechen und ein erhöhtes progressions-freies Überleben und Gesamtüberleben. Dies stellt eine alleinige Therapieoption anstelle von Ganzhirnbestrahlung dar, kann jedoch auch in Kombination angewendet werden. In humanen epidermalen Wachstumsfaktor 2-positiven Mammakarzinomen sollte eine kontinuierliche HER2-Blockade angestrebt werden, Patienten könnten zudem von einem Einsatz von Lapatinib profitieren.
Bei Patienten mit Hirnmetastasen eines malignen Melanoms können Ipilimumab oder Protoonkogen B Raf-Inhibitoren zum Einsatz kommen, auch Fotemustin oder Temozolomid können alleine oder in Kombination mit Ganzhirnbestrahlung angewendet werden.[5]

2.3. Hippo Signalweg

2.3.1. Physiologische Funktion

Der Hippo Signalweg ist ein hochkonservierter Signalweg und reguliert Zellwachstum, Zellteilung und Apoptose. Die Serin/Threonin-Kinasen mammalian STE20-like protein kinase 1 und 2 (MST1 und MST2) binden an das Regulatorprotein Salvador homologue 1 (SAV1) und bilden einen aktiven Enzymkomplex. Dieser phosphoryliert und aktiviert die large tumor suppressor 1/2 (LATS1/2) Kinasen sowie deren Untereinheiten, MOB kinase activator 1A (MOB1A/B). Die Effektoren von LATS1/2 und MOB1A/B sind die homologen Onkoproteine yes-associated protein (YAP) und transcriptional coactivator with PDZ binding motif (TAZ). Werden diese phosphoryliert so bilden sie protein 14-3-3-binding sites und werden nicht mehr in den Zellkern verlagert. Außerdem werden sie mit Ubiquitin markiert. Daraus resultierend verbleiben sie im Zytoplasma und werden proteolysiert.[9]
Werden sie jedoch in den Zellkern verlagert, regulieren sie verschiedene Transkriptionsfaktoren wie Transcriptional enhancer factor domains (TEAD) oder small Mothers against decapentaplegic (SMAD). Deren Zielgene MYC protooncogene bHLH transcriptions factor (MYC) , baculoviral IAP repeat containing 5 (BIRC5), AXL receptor tyrosine kinase (AYL), connective tissue growth factor (CTGF) oder cysteine rich angiogenic inducer 1 (CYR61) fördern die Zellproliferation sowie epithelial-mesenchymale Transition (EMT).[22] Nach Durchführung von Studien zur Überexpression von YAP/TAZ lässt sich sagen, dass der Hippo Signalweg eine zentrale Rolle in der Embryoentwicklung und Gewebshomöostase zu haben scheint und den Zellzyklus, Apoptose und Zelldifferenzierung kontrolliert.[22]

2.3.2. Regulation

Der Hippo Pathway kann durch verschiedene Faktoren inhibiert werden. Das Protein Merlin wird durch das Neurofibromatose Typ 2-Gen (NF2) kodiert und an Zell-Zell-junctions in Epithelzellen exprimiert. Es stabilisiert die Interaktion zwischen MST1/2 und LATS1/2 und inaktiviert somit YAP/TAZ. Ein weiterer upstream Regulator des Hippo Signalwegs ist das Protein Scribble, welches die Zellpolarität bestimmt. Es bringt die Hippo Kinasen MST, LATS und TAZ an der Zellmembran zusammen. Sind die Zell-Zell-junctions oder die apikobasale Polarität fehlerhaft, so ist das ein erstes Merkmal für die EMT. Diese führt zu einer Delokalisation von Scribble und somit zu einer Inaktivierung des Hippo Signalwegs.

G-protein coupled receptors (GPCR) können LATS1 und LATS2 direkt aktivieren und regulieren somit den Signalweg. Weitere Faktoren sind DNA-Schädigungen, Kontaktinhibierung, Mechanotransduktion und Interaktionen mit Wnt-, Notch- und Hedgehog-Signalwegen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Hippo Signalweg durch Veränderung im mechanischen Stress, Zell-Verbindungen, Zell-Polarität und Zellkontakten reguliert wird.[9,22]

2.3.3. Rolle in Karzinomen

Da YAP und TAZ in Zellproliferation, mesenchymaler Transition, Invasion, Metastasierung sowie Stammzell-Erhaltung und Chemoresistenz involviert sind, spielen sie eine wichtige Rolle bei Entstehung und Proliferation solider Tumoren.

Hyperaktivierung von YAP/TAZ führt in Modellen zu unkontrolliertem Zellwachstum, indem sie den Zellzyklus schneller durchlaufen. Ein Ausschalten von LATS2, also eine Aktivierung von YAP/TAZ, vermindert Retinoblastom-Protein-induzierte Marker (Rb) der Zellseneszenz. Zudem kann LATS2 p53 aktivieren und p53 wiederum zu einer erhöhten Expression von LATS2 führen. Dies zeigt, dass eine unkontrollierte YAP/TAZ-Expression, die Tumorsuppressor Checkpoints umgehen und somit zu unkontrolliertem Zellwachstum führen kann.[9]

Ein weiteres Merkmal der Tumorgenese ist die Resistenz gegenüber Apoptose. Der Hippo Signalweg hat einen Einfluss auf die Apoptose, indem er den inhibitor of apoptosis 1 kontrolliert. Wird außerdem YAP überexprimiert, so wird die Tumornekrosefaktor (TNF)- und FAS-induzierte Apoptose blockiert. Kommen Chemotherapeutika zum Einsatz, so führt auch dort eine Überexprimierung von YAP zu einer erhöhten Resistenz.

In Stammzellen konnte ebenfalls eine erhöhte Expression von YAP und TEAD-Transkriptionsfaktoren festgestellt werden. YAP und TAZ fördern die Pluripotenz von embryotischen Stammzellen und TAZ reguliert die mesenchymale Stammzell-Differenzierung. Somit scheinen YAP und TAZ Stammzell-ähnliche Eigenschaften zu haben und somit die Tumorgenese zu fördern.[9]

Da YAP und TAZ auch Gene aktivieren, die die epitheliale mesenchymale Transition fördern, scheinen sie auch eine Rolle in der Metastasierung von soliden Tumoren zu spielen. Tumorzellen müssen diese durchlaufen, um vom Primärtumor dissoziieren zu können. Eine YAP-Überexpression fördert die EMT sowie die Resistenz gegen Anoikos. Die Expression von YAP und TAZ scheint in metastasierten Tumoren höher zu sein als in nicht-metastasierten, außerdem ist die Expression von LATS1/2, die YAP/TAZ inhibieren, geringer. Der Verlust von E-cadherin, was für eine EMT spricht, kann auch zu einer erhöhten Expression von YAP/TAZ führen. [9]

2.3.4. Rolle in Gliomen

Auch in der Pathogenese von Gliomen scheinen YAP und TAZ eine große Rolle zu spielen. So kann eine Überexpression von TAZ mit einer schlechteren Prognose assoziiert werden und eine Inhibierung von TAZ vermindert die Tumorigenität in SCID Mäusen.[23] Zudem sind die Expression von TAZ und der Tumorgrad positiv korreliert und fand sich in höhergradigen Tumoren sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern, wohingegen TAZ in niedriggradigen Tumoren eher nur im Zytoplasma zu finden war.[24] TAZ kann die Entstehung von Tumoren mit mesenchymalen Merkmalen und ausgedehnter Nekrose fördern.[25] Indem TAZ über c-MYC EGFR und die downstream pathways Protein kinase B (Akt) und extracellular signal-regulated kinases (ERK) aktiviert, wird die Zellproliferation und Tumorentstehung in Glioblastomzelllinien erhöht.[26] Auch die Chemoresistenz von Glioblastomen gegenüber Temozolomid wird durch eine erhöhte Expression von TAZ gefördert, indem Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1 (MCL-1) aktiviert wird. Ein Knockdown von TAZ führt wiederum zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber TMZ.[27] Zudem könnte eine TAZ-Überexpression auch zu erhöhter Radioresistenz in Glioblastomen führen. [28]

Das Ortholog YAP fördert ebenfalls die EMT in Glioblastomzelllinien und kann den Gliomstammzell-Typ (GSC) erhalten. Außerdem scheint es mit dem PI3-K/AKT/mTOR Signalweg zu interagieren, denn die Expressionsraten von mTOR und YAP korrelieren positiv miteinander. Außerdem sind erhöhte Expressionsraten beider Proteine negativ mit Tumorgrad und Überleben der Patienten korreliert.[29] Eine erhöhte Expression von YAP sorgt für eine erhöhte intratumorale Heterogenität in Glioblastomen und fördert die klonale Dominanz von Tumorzellen mit erhöhter YAP-Expression durch ein stärkeres Wachstum sowie erhöhte Apoptose in Zellen mit weniger Expression.[30] Zudem scheint der molekulare Subtyp von Gliomen auch mit der YAP-Expression zusammenzuhängen, so finden sich beispielsweise in den sehr aggressiven IDHwt-Glioblastomen erhöhte YAP-Expressionsraten.[31] Wird die YAP-Expression in Modellen hochreguliert, so fördert dies die Zellmigration und -invasion. [32]

2.3.5. Therapieresistenz

YAP und TAZ scheinen eine wichtige Rolle in der Resistenz von Tumoren gegenüber Chemotherapeutika, targeted therapy und Radiotherapie zu haben. Im NSCLC führt eine

erhöhte YAP/TAZ-Expression zu eine Resistenz gegenüber Cisplatin, ein Knockdown der Proteine sensibilisiert die Tumorzellen wieder gegen Cisplatin. [33] Zudem scheinen diese Proteine auch einen Resistenz gegenüber Taxolen[34] sowie 5-Fluoruracil (5-FU) im Kolorektalen Karzinom zu fördern[35]. Im Ösophaguskarzinom sind YAP-induzierte Zellen weniger sensibel gegenüber 5-FU und Docetaxel, im Pankreaskarzinom fördert eine erhöhte TAZ-Expression die Resistenz gegenüber Doxorubicin.[36,37]

Der Goldstandard der Therapie von Glioblastomen besteht zurzeit aus einer möglichst ausgedehnten Resektion des Tumorgewebes mit nachfolgender Radiochemotherapie. Dabei kommt der alkylierende Wirkstoff Temozolomid zum Einsatz, der die DNA-Replikation der Tumorzellen stören soll. Eine Anwendung von Temozolomid mit Radiotherapie verlängert das Überleben von Glioblastompatienten im Median auf 14,6 Monate im Gegensatz zu einer alleinigen Radiotherapie (12,1 Monate).[38] Glioblastome zeigen jedoch oft eine Resistenz gegenüber Temozolomid. Die Resistenzmechanismen sind häufig Dysregulationen der Apoptose-induzierenden Gene und Proteine.[39] Eine erhöhte TAZ-Expression führt zu einer erhöhten Resistenz gegenüber TMZ, vermutlich über eine Hochregulation von MCL-1.[27] Dieses spielt eine wichtige in der Wirkung in der TMZ-induzierten Apoptose, ein Knockdown von MCL-1 führt zu einer erhöhten Sensitivität von Glioblastomzellen gegen TMZ.[40] Die TMZ-Sensitivität scheint positiv mit der MGMT-Expression und multidrug-resistance protein ABC subfamily G member 2 (ABCG2) zu korrelieren, deren Expression wird wiederum von Casein-Kinase 2- Signal transducer and activator of transcription 3 (CK2-STAT3) und dem Hippo Pathway reguliert.[41] Ein Einsatz von Verteporfin, welches den YAP-TEAD-Komplex inhibiert, könnte ebenso einen antiproliferativen Effekt auf Gliomzellen haben.[42]

2.4. Ziel und Fragestellung der Arbeit

Molekulargenetische Marker zeigen einen hohen Einfluss auf Klassifizierung und weitere Merkmale der Tumore, wie Überleben, Ansprechen auf Therapie und Fortschreiten der Erkrankung. Hirneigene Tumore und Hirnmetastasen zeigen eine hohe Krankheitslast sowie eine hohe Sterblichkeit bei gleichzeitig eingeschränkten Therapiemöglichkeiten. In den letzten Jahren konnte bei YAP/TAZ bereits der Einfluss des Expressionsmusters in soliden Tumoren unter anderem auf das Überleben von Patienten, die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika sowie den Einfluss auf Metastasierung gezeigt werden. Besonders bei Hirntumoren ist dies relevant, da es nur wenige Therapieoptionen gibt.

YAP und TAZ nehmen durch ihre Rolle in der EMT einen großen Einfluss auf die Entstehung von Metastasen sowie durch Einfluss auf Apoptotische-Faktoren Einfluss auf Resistenz gegenüber Chemotherapeutika. Beide Mechanismen sind noch unzureichend untersucht.

3. Publikation

3.1 Higher YAP1 Levels Are Associated With Shorter Survival of Patients With Low Grade Astrocytoma

ANTICANCER RESEARCH *44*: 3005-3011 (2024)
doi:10.21873/anticanres.17113

Higher YAP1 Levels Are Associated With Shorter Survival of Patients With Low Grade Astrocytoma

JILL DICKE, LAURA HERO, SASKIA KUHL, LUKAS GÖRTZ, ROLAND GOLDBRUNNER and MARCO TIMMER

Laboratory of Neurooncology and Experimental Neurosurgery, Department of General Neurosurgery, Center for Neurosurgery, Faculty of Medicine and University Hospital, University of Cologne, Cologne, Germany

Abstract. *Background/Aim: Glioblastoma multiforme (GBM) is one of the most lethal types of brain cancer with a median survival of only 12 months due to its aggressiveness and lack of effective treatment options. Astrocytomas and oligodendrogliomas are classified as low-grade gliomas (LGG) and have the potential to progress into secondary GBM. YAP1 and TAZ are transcriptional co-activators of the hippo pathway and play an important role in tumorigenesis by controlling cell proliferation and differentiation. The aim of this study was to analyze whether YAP1 and TAZ influence the survival in patients with astrocytoma and oligodendroglioma. Patients and Methods: A total of 22 patient samples of astrocytoma and 11 samples of oligodendroglioma were analyzed using real-time PCR. We utilized open-access data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) focusing on "brain lower grade glioma". mRNA expression rates were used to validate our findings on survival analysis. Results: Expression of YAP1 was twice as high in astrocytoma than in oligodendroglioma, whereas there was no difference in TAZ. In oligodendrogliomas, the expression of TAZ was higher in relapsed than in primary tumors. Patients with astrocytoma having a high YAP1 expression had a significantly shorter overall survival than patients with lower expression (median survival 161 vs. 86 months, p=0.0248). These findings were validated with survival analysis of TCGA data. Conclusion: High YAP1 expression shows a high correlation with poorer overall survival in LGG. YAP1 has higher levels of expression in astrocytomas than in oligodendrogliomas.*

Correspondence to: Dr. Marco Timmer, Laboratory of Neurooncology and Experimental Neurosurgery, Department of General Neurosurgery, Center for Neurosurgery, University Hospital Cologne, Kerpener Strasse 62, 50937 Cologne, Germany. Tel: +49 022147882802, Fax: +49 02214786257, e-mail: marco.timmer@uk-koeln.de

Key Words: YAP1, TAZ, low grade glioma, astrocytoma, oligodendroglioma.

Glioblastoma multiforme (GBM) accounts for approximately 50% of all neuroepithelial tumors and is known as the most aggressive type, with a 5-year-survival rate of only 6.8% [95% confidence interval (CI)=6.7-7.0] (1). Low-grade gliomas (WHO grade II) can progress into secondary GBM, which represents 5% of all GBMs (2), often leading to a significant change in overall survival (OS). Because of the lack of effective treatment options, it is important to find new targets for therapy. Yes-associated protein 1 (YAP1) and its homologue transcriptional activator with PDZ-binding motif (TAZ) are transcriptional co-activators of the hippo pathway. This pathway plays an important role in the regulation of tissue growth during organ growth and regeneration. It consists of different Serin-Threonine-kinases: STE20-like protein kinase 1 and 2 (MST1/2), large tumor suppressor 1 and 2 (LATS1/2), and adapter-protein Salvador-1 (SAV1). Autophosphorylation of MST1/2 and SAV1 results in phosphorylation and activation of LATS1/2, which phosphorylates four serins of the orthologue oncoproteins YAP and TAZ. The resulting 14-3-3-binding on YAP/TAZ leads to polyubiquitination and sequestration in the cytoplasm. When the hippo-pathway is inhibited, YAP/TAZ accumulate in the nucleus and bind to transcription factors SMAD, TEAD or RUNX2 whose target genes code for proteins involved in cell proliferation, differentiation, and epithelial-mesenchymal transition (EMT). Alterations in YAP/TAZ-expression-levels have been found in different solid tumors, such as lung, breast, hepatocellular, and ovarian cancer (3). Knockdown of TAZ in GBM cell lines results in reduced invasion and migration, whereas its up-regulation enhances these drivers of tumorigenesis (4, 5). Elevated levels of TAZ are related to poor differentiation and prognosis in patients with glioma (5) which could be linked to the promotion of Temozolomide-resistance by TAZ through up-regulation of MCL-1 (6). YAP1-over-expression induces invasion and migration in GBM cells and is also related to poorer prognosis (7). Heterogenous YAP1-expression in cell cultures and spheroids induced growth through clonal dominance and a knockdown of YAP1 inhibits tumor growth

Table I. *Clinical and molecular characteristics of low-grade glioma patients.*

	Astrocytoma	Oligodendroglioma
Samples	22	11
Primary	10	6
Relapsed	12	5
Sex		
Female	10	7
Male	12	4
Age at surgery		
≤40	17	1
>40	5	10
Side		
Left	9	6
Right	13	5
Radiotherapy		
Radiotherapy	2	0
Brachytherapy	4	4
None	6	4
No data	10	3
Mean OS in months	112.6	149.5
95%CI of mean	83.02-142.1	98.16-200.7
Mean PFS in months	42.44	15.87
95%CI	26.12-58.77	52.73

PFS: Progression-free survival; CI: confidence interval.

in vitro and *in vivo* (8, 9). In this study, we examined the influence of YAP1 and TAZ expression on survival in patients with astrocytoma and oligodendroglioma by measuring mRNA expression rates *in vivo*.

Patients and Methods

Patient samples. Samples of primary (n=29) and recurrent (n=31) low grade glioma were obtained during neurosurgical resection at the Department of Neurosurgery (Table I). After surgery they were immediately frozen in liquid nitrogen and long-time stored at –80˚C. Histological diagnosis was made by an independent neuropathologist using the WHO Classification of 2007. The study was approved by the ethics committee of the University Hospital (application no. 03-170) and performed in accordance with the Declaration of Helsinki.

PCR. For RNA isolation, 25 mg of each sample were homogenized with TissueLyser LT (Qiagen, Hilden, Germany) and the RNA extracted with the RNeasy Mini Kit (#74104, Qiagen). One μg of RNA was used for cDNA synthesis with the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). We used the Rotor Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen) and 5 μl of the synthesized cDNA (concentration 1:50) of each sample to perform qPCR using Rotor Gene Q (Qiagen). The pCR conditions were as follows: denaturation for 5 min at 95˚C followed by 50 cycles of a two-step protocol (95˚C for 5s and 60˚C for 10s). Non-template-controls were used for control, and beta-actin was used for normalization. Each sample was measured in triplicates. The nucleotide sequences of the primers were the following: TAZ-FW 5'-GGCTGGGAGATGACCTTCAC-3', TAZ-RV 5'-CTGAGTGGG GTGGTTCTCGT-3', YAP1-FW 5'-CACAGCTCAGCATCTTCGAC-3', YAP1-RV 5'-TATTCTGCTGCACTGGTGGA-3' (all by Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany).

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using Prism 9 software (GraphPad software, San Diego, CA, USA). Unpaired t-test was used for comparison of YAP1 in astrocytomas *vs*. oligodendrogliomas and for comparison of TAZ and YAP1 expression in primary and relapsed oligodendrogliomas. Comparison of TAZ expression in astrocytomas and oligodendrogliomas and comparison of TAZ and YAP1 expression in primary and relapsed astrocytomas was performed using Mann–Whitney test. For the comparison of survival curves, log-rank test (Mantel–Cox) was used.

TCGA data analysis. Analysis of TCGA Data was performed using cBio-Portal for Cancer Genomics (10, 11). The study "Brain Lower Grade Glioma (TCGA, PanCancer Atlas)" was selected and only patients with mRNA expression data (RSEM, Batch normalized from Illumina HiSeq_RNASeqV2, {log2}) were included in the analysis. The Onco Query Language "TAZ:EXP>1" and "YAP1:EXP>1" were used to select patients with mRNA expression >1 standard deviation greater than the mean. For the comparison of TAZ and YAP1 expression and survival analysis, the groups "astrocytoma" and "oligodendroglioma" were selected.

Results

Differences in TAZ/YAP1 expression. Analysis of the TCGA data showed a significantly higher expression of TAZ in astrocytomas than in oligodendrogliomas (Figure 1A; A: mean 8.765; O: mean 8.631, 95%CI=8.551-8.712; p=0.0245, Mann–Whitney test). YAP1 expression was also higher in astrocytomas than in oligodendrogliomas (Figure 1B; A: mean 10.01, 95%CI=9.866-10.15; O: mean 9.1, 95%CI=8.929-9.272; p<0.0001, Mann–Whitney test).

In our patient samples, astrocytomas showed no significantly higher levels of TAZ expression than oligodendrogliomas (Figure 2A; p=0.3752, Mann–Whitney test). YAP1 expression in astrocytomas was twice as high as in oligodendrogliomas with a mean of 1.578 *vs*. 0.7003 (Figure 2B; p=0.0177, Unpaired *t*-test).

The comparison of TAZ expression between primary and relapsed astrocytoma showed no statistically significant differences with a mean of 0.5840 for primary and a mean of 0.6218 for relapsed tumors (Figure 3A; p=0.4562, Mann–Whitney test). For YAP1, there were also no significantly higher levels of expression in relapsed (mean 1.889) than in primary tumors (mean 1.206) in astrocytomas (Figure 3B; p=0.1398, Unpaired t-test). In oligodendrogliomas, relapsed tumors showed significantly higher expression levels of TAZ than primary tumors (Figure 3C; p=0.0305, Unpaired *t*-test) with means of 0.4464 and 0.1667. For YAP1-expression, there were no statistically significant differences (Figure 3D; p=0.3271, Unpaired *t*-test).

Survival analysis. Data on survival were available for 16 patients with astrocytoma and for 10 patients with

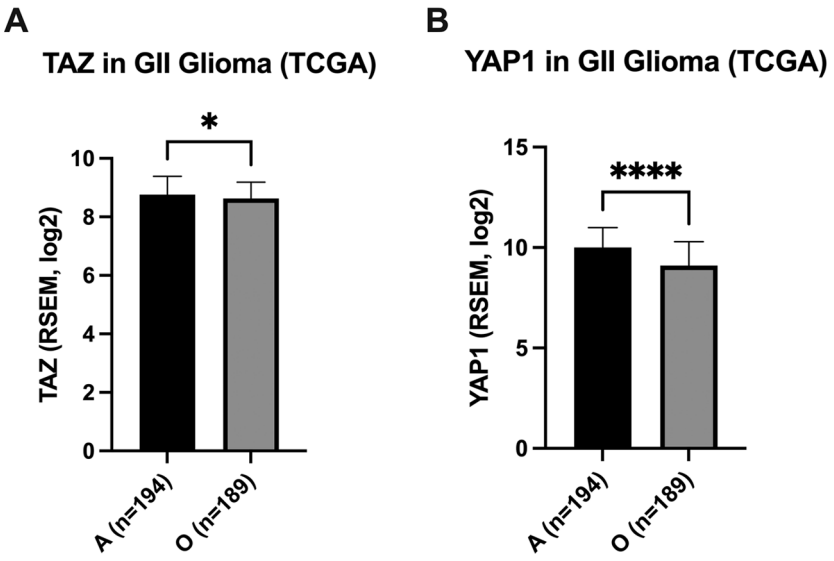


Figure 1. *Expression of TAZ and YAP1 and overall survival (OS) in GII glioma, analysis of TCGA data. Expression of TAZ is significantly higher in astrocytomas than in oligodendrogliomas (Figure 1A; A: mean 8.765, 95%CI=8.677-8.852; O: mean 8.631, 95%CI=8.551-8.712; p=0.0245, Mann–Whitney test). In astrocytomas, expression of YAP1 is significantly higher than in oligodendrogliomas (Figure 1B; A: mean 10.01, 95%CI=9.866-10.15; O: mean 9.1, 95%CI=8.929-9.272; p<0.0001, Mann–Whitney test). OS of patients with astrocytoma is significantly shorter than of patients with oligodendroglioma (Figure 1C; median survival 62.17 vs. 95.57 months; Hazard ratio=1.747, 95%CI=1.177-2.593; p=0.0048, Log-rank test).*

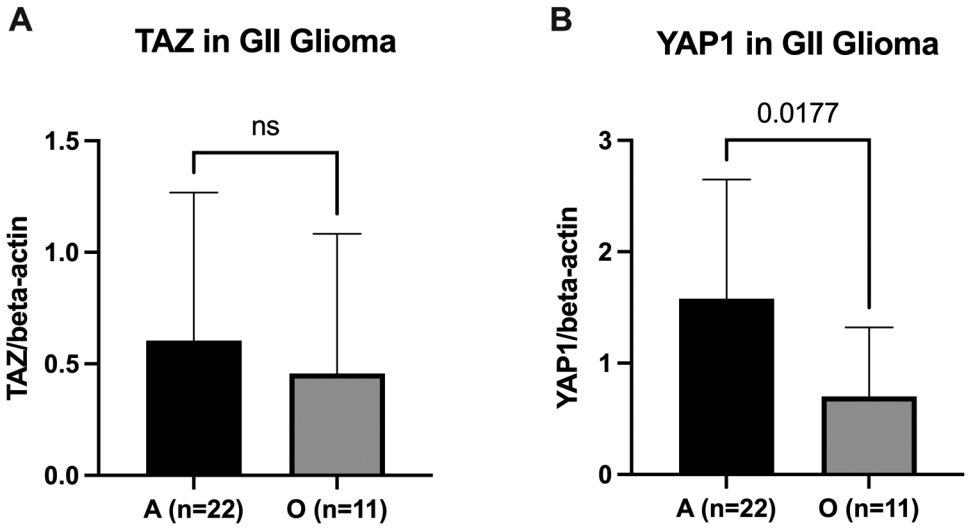


Figure 2. *TAZ- and YAP1-expression in GII gliomas, detected by real-time PCR in astrocytomas (=A) and oligodendrogliomas (=O). Regarding TAZ, there is no statistically significant difference between these histological subtypes (Figure 2A, A: mean 0.646, 95%CI=0.3105-0.8988; O: 0.4573, 95%CI=0.03678-0.8778; p=0.3752, Mann–Whitney test). In A the expression of YAP1 is twice as high as in O (Figure 2B, A: mean 1.578, 95%CI=1.104-2.053; O: 0,7003, 95%CI=0.2834-1.117; p=0.0177, Unpaired t-test).*

oligodendroglioma. Level of expression was defined as *x>median* for high expression and *x<median* as low expression. In astrocytomas, patients with low TAZ expression showed a significantly longer OS than patients with high TAZ expression (Figure 4A; median survival 149 *vs*. 84 months, p=0.0422). The OS of patients with low YAP1-expression was also longer than that of patients with high YAP1 expression (Figure 4B; median survival 161 *vs*. 86 months, p=0.0248). In oligodendrogliomas, there were no significant differences in OS in patients with low *vs*. high

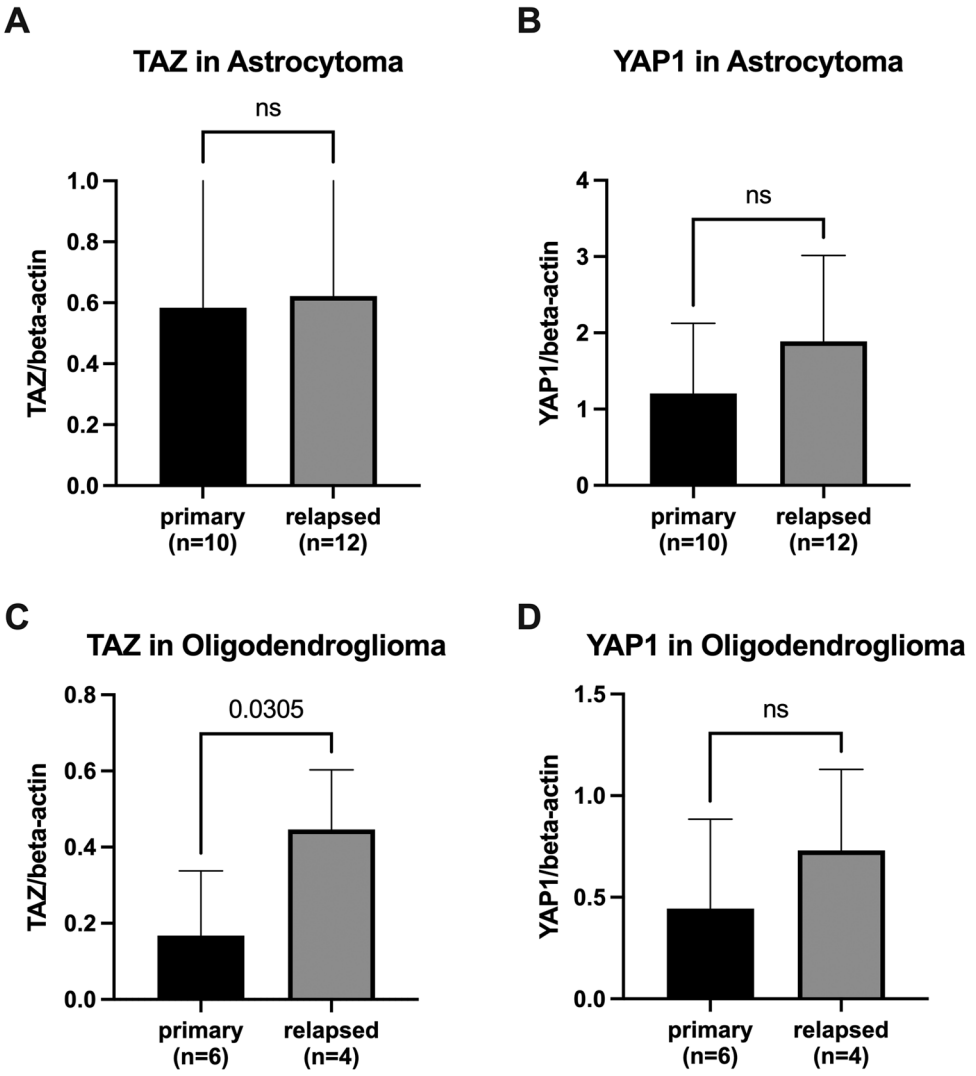


Figure 3. *TAZ- and YAP1-expression in primary vs. relapsed astrocytomas (=A) and oligodendrogliomas (=O), detected by real-time PCR. In astrocytomas, no statistically significant difference in TAZ and YAP1 expression exists between primary and relapsed tumors (TAZ: Figure 3A; primary: mean 0.5840, 95%CI=0.06203-1.106; relapsed: mean: 0.6218, 95%CI=0.2181-1.026; p=0.4562, Mann–Whitney test; YAP1: Figure 3B; primary: mean 1.206, 95%CI=0.5475-1.864; relapsed: mean 1.889, 95%CI=1.174-2.604; p=0.1398, Unpaired t-test). The expression of TAZ in relapsed oligodendrogliomas is 2.5 times higher than that in primary tumors (Figure 3C; primary: mean 0.1667, 95%CI=-0.01174-0.3452; relapsed: mean 0.4464, 95%CI=0.1973-0.6956; p=0.0305, Unpaired t-test). Regarding the expression of YAP1, there was no difference between primary and relapsed (Figure 3D; primary: mean 0.444, 95%CI=-0.01846-0.9065; relapsed: mean 0.7306, 95%CI=0.0967-1.364; p=0.3271, Unpaired t-test).*

TAZ expression (Figure 4C; median survival 154 *vs.* 186 months, p=0.3709) and with low *vs.* high YAP1-expression (Figure 4D; median survival 131 *vs.* 191 months, p=0.2497).

Analysis of TCGA data showed a non-significantly longer OS in patients with LGG and altered TAZ expression (Figure 5A; median survival 62.17 *vs.* 87.45 months). In LGG with altered YAP1 expression, the OS was significantly shorter in patients with altered expression (Figure 5B; median survival 32.35 *vs.* 94.52 months, p<0.0001). The same result was found in the subgroups of astrocytoma (Figure 5C; median survival 32.35 *vs.* 67.46 months, p=0.0206; Figure 4C) and oligodendrogliomas (Figure 5D; median survival 21.01 *vs.* 114.1 months, p=0.0028).

Discussion

YAP1 and TAZ have been shown to play an important role in tumorigenesis by regulating cell proliferation, invasion, and differentiation. In various other tumors, high expression of YAP1 and TAZ has been related to increased aggressiveness

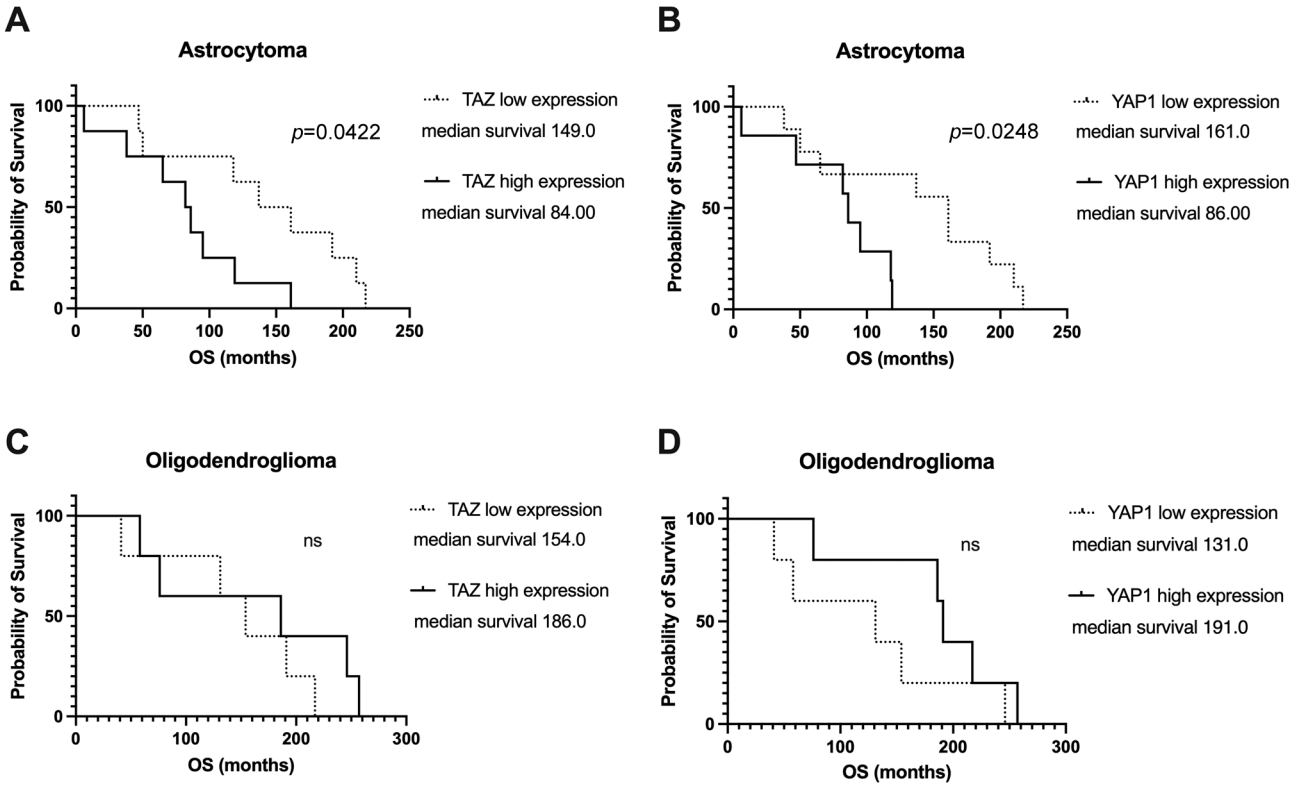


Figure 4. *Survival in LGG patients with low- and high-expression of TAZ and YAP1 using Kaplan–Meier analysis. Level of expression was defined as low=x<median and high=x>median. Data were available for 16 patients with astrocytoma and 10 patients with oligodendroglioma. Patients with astrocytoma and low-expression of TAZ have a significantly longer overall survival (OS) than patients with high TAZ expression (Figure 4A; median survival 149 vs. 84 months; hazard ratio=0.4093, 95%CI=0.1391-1.205; p=0.0422, Log-rank test). Regarding YAP1, OS of patients with low expression levels was longer than those with high expression levels (Figure 4B; median survival 161 vs. 86 months; hazard ratio=0.3797, 95%CI=0.1181-1.221; p=0.0248, Log-rank test). In oligodendrogliomas, there was no correlation between the level pf TAZ expression and OS (Figure 4C; median survival 154 vs. 186 months; hazard ratio=0.1.667, 95%CI=0.4634-5.998; p=0.3709, Log-rank test). There was also no correlation between OS and different YAP1 expression levels in oligodendrogliomas (Figure 4D; median survival 131 vs. 191 months; hazard ratio=1.972, 95%CI=0.5312-7.322; p=0.2497, Log-rank test).*

and poorer prognosis (12). In 2018, Guichet *et al*. examined the relation between YAP1-expression and OS by immunohistochemical analysis and showed a lower OS in patients with higher YAP1 staining. In our study, we obtained consistent results by measuring mRNA expression rates using real-time PCR in tumor tissue. We could confirm and validate our findings with analysis of TCGA data, showing a high statistical significance. This poorer OS could be explained by a higher progression rate of astrocytomas into secondary GBM. It is reported that a hyperactivation of YAP1/TAZ by miRNA and a following activation of the downstream genes of the hippo pathway leads to increased development towards glioblastoma stem cells (13).

In our samples, expression of YAP1 was twice as high in astrocytomas than in oligodendrogliomas; these findings were confirmed by analysis of the TCGA data set. Astrocytomas have a shorter OS than oligodendrogliomas with a 5-year relative survival rate of 51.6% (95%CI=50.9-52.3%) *vs*. 82.7% (95%CI=81.9-83.5) (1). This also shows a correlation between higher YAP1-expression and survival rate and indicates one more time that YAP1-expression could be used as a prognostic molecular marker. Recently, Zhao *et al*. (14) investigated the role of YAP1 in autophagy mechanisms in glioma cells, indicating that YAP1 promotes cell autophagy via promoting transcription and translocation of HMGB1 from the nucleus to cytoplasm. When using the autophagy inhibitor chloroquine, the YAP1-driven promotion on glioma progression was decreased, indicating that patients with gliomas with high YAP1 expression could benefit from treatment with autophagy inhibitors.

However, for TAZ, we found no correlation of a higher expression and a poorer OS in LGG; the TCGA data also did not show this correlation. This may indicate that TAZ has a more important role in high grade glioma (HGG) rather than

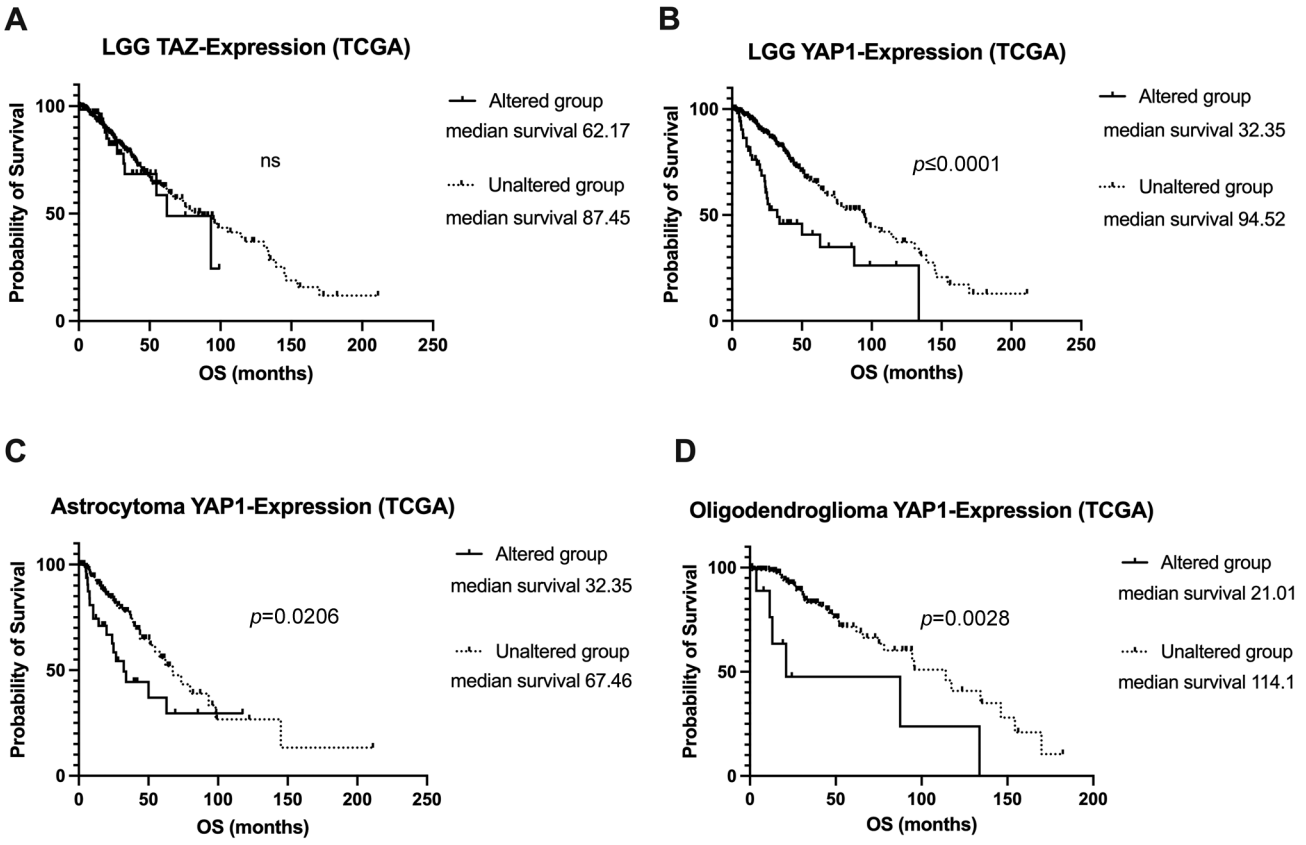


Figure 5. *Survival in LGG patients with altered and unaltered TAZ and YAP1 expression using Kaplan–Meier analysis of TCGA data. Patients with altered TAZ expression do not have longer overall survival (OS) compared to patients with unaltered expression (Figure 5A; median survival 62.17 vs. 87.45 months; hazard ratio=1.157, 95%CI=0.6422-2.085; p=0.6033, Log-rank test). An altered YAP1 expression correlates significantly with a shorter OS in LGG patients (Figure 5B; median survival 32.35 vs. 94.52 months; hazard ratio=2.609, 95%CI=1.437-4.737; p<0.0001, Log-rank test). OS in the subgroups of astrocytomas and oligodendrogliomas was also shorter in those with altered YAP1expression (A: Figure 5C; median survival 32.35 vs. 67.46 months; hazard ratio=1.921, 95%CI=0.979-3.768; p=0.0206, Log-rank test; O: Figure 5D; median survival 21.01 vs. 114.1 months; hazard ratio=3.409, 95%CI=0.812-14.31; p=0.0028, Log-rank test).*

in LGG, which is in agreement with the study of Li *et al*. (4) where a higher TAZ expression is found in tumors with less differentiated tissue. Nevertheless, TAZ should be further investigated because of its role in resistance to temozolomide, which currently is the standard therapy for patients with glioblastoma. Over-expression of TAZ leads to an up-regulation of MCL-1, which is essential for the apoptotic effect of temozolomide (6). The study of Zhang *et al*. showed that TAZ is inactivated by irradiation and leads to senescence through the Wnt pathway, in contrast to YAP1, which was not inactivated by irradiation. Therefore, inhibition of TAZ could enhance the effect of radiotherapy (15).

With YAP1 and TAZ being crucial drivers of tumorigenesis and suspected regulators of cell stemness and plasticity (16, 17), these transcriptional co-activators seem to be a promising therapeutic targets in gliomas where an effective treatment is still lacking.

Thus, YAP1 plays an important role in LGG and not only in HGG and should be considered as molecular marker and target in therapy. It would be interesting to further examine which exact function it has in the progression from LGG to HGG and in the survival of glioma patients.

Conflicts of Interest

The Authors have no conflicts of interest to declare in relation to this study.

Authors' Contributions

JD: Experimental work, writing manuscript, statistics, LH: experimental work, statistics, SK: statistics, critical review of the manuscript, LG: critical review of the manuscript, RG: critical review of the manuscript, MT: idea, writing manuscript, overview.

Acknowledgements

Jill Dicke was supported by a fellowship of 'Köln Fortune'. The Authors thank B. Disler for the experimental help.

Funding

Jill Dicke was supported by a fellowship of 'Köln Fortune'.

References

1 Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, Patil N, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS: CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2012-2016. Neuro Oncol 21(Suppl 5): v1-v100, 2019. DOI: 10.1093/neuonc/noz150

2 Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW: An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. Science 321(5897): 1807-1812, 2008. DOI: 10.1126/science.1164382

3 Piccolo S, Dupont S, Cordenonsi M: The biology of YAP/TAZ: Hippo signaling and beyond. Physiological Rev 94(4): 1287-1312, 2014. DOI: 10.1152/physrev.00005.2014

4 Li W, Dong S, Wei W, Wang G, Zhang A, Pu P, Jia Z: The role of transcriptional coactivator TAZ in gliomas. Oncotarget 7(50): 82686-82699, 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.12625

5 Li PD, Wang XJ, Shan Q, Wu YH, Wang Z: Evaluation of TAZ expression and its effect on tumor invasion and metastasis in human glioma. Asian Pacific J Tropical Med 7(10): 757-760, 2014. DOI: 10.1016/S1995-7645(14)60131-0

6 Tian T, Li A, Lu H, Luo R, Zhang M, Li Z: TAZ promotes temozolomide resistance by upregulating MCL-1 in human glioma cells. Biochem Biophys Res Commun 463(4): 638-643, 2015. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.05.115

7 Zhang Y, Xie P, Wang X, Pan P, Wang Y, Zhang H, Dong Y, Shi Y, Jiang Y, Yu R, Zhou X: YAP promotes migration and invasion of human glioma cells. J Mol Neurosci 64(2): 262-272, 2018. DOI: 10.1007/s12031-017-1018-6

8 Liu Z, Yee PP, Wei Y, Liu Z, Kawasawa YI, Li W: Differential YAP expression in glioma cells induces cell competition and promotes tumorigenesis. J Cell Sci 132(5): jcs225714, 2019. DOI: 10.1242/jcs.225714

9 Wang Y, Pan P, Wang Z, Zhang Y, Xie P, Geng D, Jiang Y, Yu R, Zhou X: β-catenin-mediated YAP signaling promotes human glioma growth. J Exp Clin Cancer Res 36(1): 136, 2017. DOI: 10.1186/s13046-017-0606-1

10 Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N: The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. Cancer Discov 2(5): 401-404, 2012. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-12-0095

11 Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N: Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. Sci Signal 6(269): pl1, 2013. DOI: 10.1126/scisignal.2004088

12 Thompson BJ: YAP/TAZ: Drivers of tumor growth, metastasis, and resistance to therapy. BioEssays 42(5): e1900162, 2020. DOI: 10.1002/bies.201900162

13 Zhu G, Wang Y, Mijiti M, Wang Z, Wu PF, Jiafu D: Upregulation of miR-130b enhances stem cell-like phenotype in glioblastoma by inactivating the Hippo signaling pathway. Biochem Biophys Res Commun 465(2): 194-199, 2015. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.07.149

14 Zhao M, Zhang Y, Jiang Y, Wang K, Wang X, Zhou D, Wang Y, Yu R, Zhou X: YAP promotes autophagy and progression of gliomas via upregulating HMGB1. J Exp Clin Cancer Res 40(1): 99, 2021. DOI: 10.1186/s13046-021-01897-8

15 Zhang L, Cheng F, Wei Y, Zhang L, Guo D, Wang B, Li W: Inhibition of TAZ contributes radiation-induced senescence and growth arrest in glioma cells. Oncogene 38(15): 2788-2799, 2019. DOI: 10.1038/s41388-018-0626-0

16 Castellan M, Guarnieri A, Fujimura A, Zanconato F, Battilana G, Panciera T, Sladitschek HL, Contessotto P, Citron A, Grilli A, Romano O, Bicciato S, Fassan M, Porcù E, Rosato A, Cordenonsi M, Piccolo S: Single-cell analyses reveal YAP/TAZ as regulators of stemness and cell plasticity in Glioblastoma. Nat Cancer 2(2): 174-188, 2021. DOI: 10.1038/s43018-020-00150-z

17 Xu W, Song W, Wang YU, Zan Y, Zhang M, Li M, Huang Q, Zhao W, Sun YU, Hoffman RM, Wu J: Efficacy of YAP1-gene knockdown to inhibit alveolar-epithelial-cell senescence and alleviate idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). Cancer Genomics Proteomics 18(3 Suppl): 451-459, 2021. DOI: 10.21873/cgp.20271

Received February 28, 2024
Revised March 19, 2024
Accepted March 20, 2024

3.2 Expression of YAP1 and TAZ in Melanoma-, Bronchial- and Breast Carcinoma Brain Metastasis: Primary vs. Relapsed Tumors

ANTICANCER RESEARCH *45*: 1807-1812 (2025)
doi: 10.21873/anticanres.17560

Expression of YAP1 and TAZ in Melanoma-, Bronchial- and Breast Carcinoma Brain Metastasis: Primary *vs*. Relapsed Tumors

JILL DICKE, LAURA HERO, SASKIA KUHL, ROLAND GOLDBRUNNER and MARCO TIMMER

Laboratory of Neurooncology and Experimental Neurosurgery, Department of General Neurosurgery, Center for Neurosurgery, Faculty of Medicine and University Hospital, University of Cologne, Cologne, Germany

Abstract

Background/Aim: Brain metastases from the most common primary sites – lung carcinoma, breast carcinoma, and melanoma – are more frequent than primary brain tumors. YAP1/TAZ are regulators of tissue growth and epithelial-mesenchymal transition (EMT) within the hippo pathway. The aim of the study was the evaluation of the role of YAP1/TAZ in brain metastasis.

Materials and Methods: Expression levels of YAP1 and TAZ were measured in samples of primary and relapsed brain metastases from patients with melanoma, breast carcinoma, and bronchial carcinoma using qPCR and western blot.

Results: Expression of YAP1 and TAZ was highest in melanoma followed by bronchial carcinoma and lowest in breast carcinoma. For YAP1, expression in primary metastasis was higher than in relapsed metastasis.

Conclusion: Because of the important role of YAP1/TAZ in EMT, targeting these genes could be a promising approach to reduce the risk of metastasis.

Keywords: YAP1, TAZ, melanoma, bronchial carcinoma, breast cancer, brain metastasis.

Introduction

There are more than 200,000 cases of brain metastases each year in the US (1) originating from the most common primary sites lung carcinoma (40-50%), breast cancer (15-20%) and skin (5-10%) (2). Due to neurological deterioration and limited treatment options, these patients have a poor prognosis, with a median survival of only a few weeks (3).

Yes-associated protein 1 (YAP1) and its homolog transcriptional activator with PDZ-binding motif (TAZ) are transcriptional co-activators of the hippo pathway which play an important role in the regulation of tissue growth during organ growth and regeneration as well as in epithelial-mesenchymal transition (EMT). Alterations in YAP1- and TAZ-expression levels have been found in solid tumors like lung cancer, breast cancer, and melanoma, as well as in primary brain tumors (4). This study aimed to

Dr. Marco Timmer, Laboratory of Neurooncology and Experimental Neurosurgery, Department of General Neurosurgery, Center for Neurosurgery, University Hospital Cologne, Kerpener Strasse 62, 50937 Cologne, Germany. Tel: +49 (0)22147882802, Fax: +49 (0)2214786257, e-mail: marco.timmer@uk-koeln.de

Received January 29, 2025 | Revised March 21, 2025 | Accepted March 24, 2025

analyze the expression of YAP1 and TAZ in brain metastases of these tumors.

Materials and Methods

Patient samples. Samples of metastasis of melanoma (n=13), breast cancer (n=20) and bronchial carcinoma (n=32) were obtained during neurosurgical resection at the Department of Neurosurgery of the University Hospital of Cologne, Germany. Immediately after surgery they were frozen in liquid nitrogen and long-time stored at –80˚C. The ethics committee of the University Hospital Cologne approved the study in accordance with the Declaration of Helsinki (application no. 03-170).

PCR. Twenty-five mg of each specimen was homogenized with TissueLyser LT (Qiagen, Hilden, Germany) for RNA isolation. For RNA extraction, the RNeasy Mini Kit (#74104, Qiagen) was used, followed by the QuantiTect Reverse Transcription Kit (#20531, Qiagen) for cDNA synthesis using 1 μg of RNA. qPCR was performed with Rotor Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen) and 5 μl of the synthesized cDNA (concentration 1:50). We used non-template control and beta-actin for normalization; each sample was measured three times using Rotor Gene Q (Qiagen) starting with the denaturation for 5 min at 95˚C followed by 50 cycles of a two-step protocol (95˚C for 5 s and 60˚C for 10 s). The nucleotide sequences of the primers were the following: TAZ-FW 5'-GGCTGGGAGATGACCTTCAC-3', TAZ-RV 5'-CTGAGTGGGGTGGTTCTCGT-3', YAP1-FW 5'-CACAGCTCAGC ATCTTCGAC-3', YAP1-RV 5'-TATTCTGCTGCACTGGTGGA-3' (all by Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany).

Western blot. For protein isolation, samples of melanoma (n=13), breast cancer (n=9) and bronchial carcinoma (n=13) were suspended for one hour in RIPA buffer on ice followed by centrifugation (15 min, max. speed, 4˚C). They were stored at –80˚C until usage. A total of 50 μg of each sample was mixed with NuPAGE SDS Sample Buffer and NuPAGE Sample reducing agent (both from Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). After 10 min of denaturation at 70˚C, proteins were separated with Tris/Glycine/SDS Buffer and prefabricated Mini PROTEAN TGX stain-free gels using the Bio-Rad system at 200 mV for 28 min (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Germany). Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards (#1610373, Bio-Rad Laboratories GmbH) was used as protein standard. Gels were blotted on nitrocellulose blotting membranes (#10600002, Cytiva Europe GmbH, Freiburg, Germany) with the Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories GmbH) at 25 mV for 10 min. Membranes were blocked in 5% dry non-fat milk with 3% BSA dissolved in TBST for 90 min. Melanoma samples were bleached in 10% H_2O_2 for 15 min. Membranes were incubated with the following primary antibodies: TAZ 1:500 in 5% dry non-fat milk with 3% BSA dissolved in TBST for 2 h (#83669, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), YAP1 1:1,000 in 5% dry non-fat milk with 3% BSA dissolved in TBST for 2 h (#ab39361, abcam, Cambridge, UK), beta-actin 1:10,000 in TBST for 30 min (#A1978, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The membranes were incubated in anti-mouse-antibody (#7076, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) for YAP1 and beta-actin and in anti-rabbit-antibody (#7074, Cell Signaling Technology) for TAZ, each in a concentration of 1:10,000 in TBST for 30 min. For visualization of bands, Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories GmbH) and ChemiDoc imaging system (Bio-Rad Laboratories GmbH) was used. Bands were analyzed with ImageLab software (Bio-Rad Laboratories GmbH).

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using Prism 9 software (GraphPad software, San Diego, CA, USA). Kruskal–Wallis test was used for comparison of expression levels of different metastases. For analysis of paired patient samples, the Wilcoxon test was performed.

Results

Expression of YAP1/TAZ. In qPCR, TAZ expression was significantly higher in melanoma than in breast carcinoma ($p<0.0001$; Kruskal–Wallis test) and

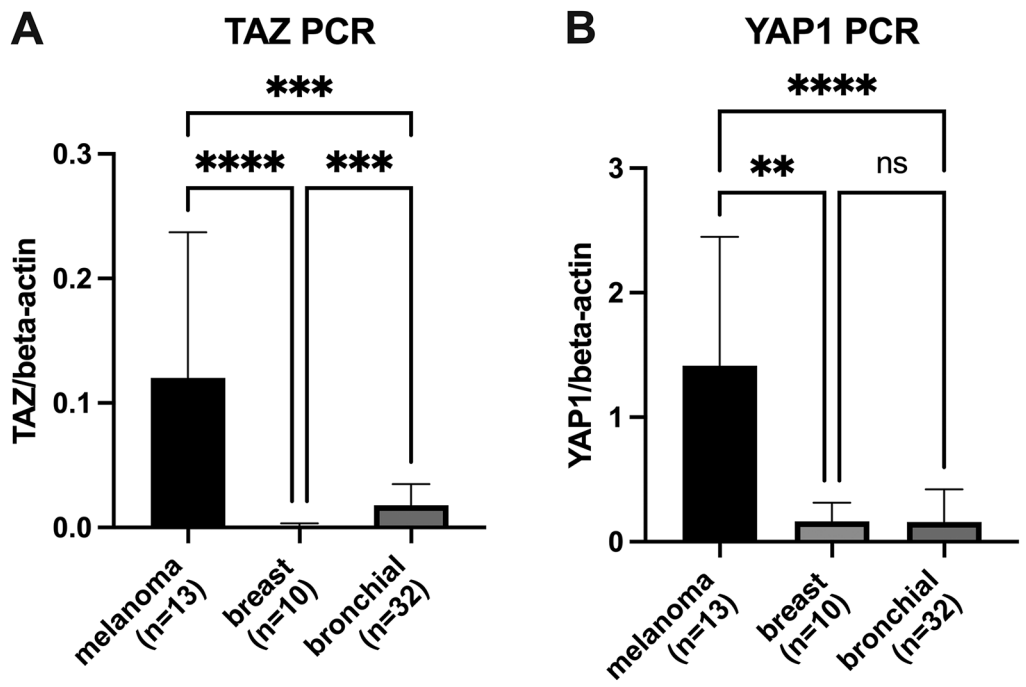


Figure 1. *Expression of TAZ/YAP1 in brain metastases of melanoma (n=13), breast (n=10) and bronchial carcinoma (n=32) detected using qPCR. TAZ-Expression is highest in melanoma (1A; melanoma: mean 0.1201, 95%CI=0.04936-0.1908; breast: mean 0.001652, 95%CI=0.0003808-0,002923; bronchial: mean 0.01785, 95%CI=0.01174-0.02395). YAP1 expression is highest in melanoma, as well (1B; melanoma: mean 1,413, 95%CI=0.7864-2.039; breast: 0.1625, 95%CI=0.07878-0.2462; bronchial: mean 0.1599, 95%CI=0.06537-0.2543).*

bronchial carcinoma (p=0.0009, Kruskal–Wallis test). Additionally, TAZ expression was higher in bronchial carcinoma than in breast carcinoma (p=0.0009, Kruskal–Wallis test) (Figure 1A). For YAP1, expression was significantly higher in melanoma than in bronchial carcinoma (p<0.0001, Kruskal–Wallis test) and breast carcinoma (p=0.0014, Kruskal–Wallis test). There was no significant difference in YAP1-expression between bronchial and breast carcinoma (p>0.999, Kruskal–Wallis test) (Figure 1B).

In western blotting, expression of TAZ was twice as high in melanoma than in bronchial carcinoma (p=0.028, Unpaired t-test). Expression was lowest in breast carcinoma (vs. melanoma p<0.0001, Kruskal–Wallis test; vs. bronchial p=0.0032, Kruskal–Wallis test) (Figure 2A). YAP1-expression was statistically significantly higher in bronchial carcinoma than in melanoma (p=0.0003; Kruskal–Wallis test) and higher in breast cancer than in melanoma (p=0.0541, Kruskal–Wallis test). Expression of YAP1 was higher in bronchial carcinoma than in breast carcinoma, but the difference was not statistically significant (p=0.8207, Kruskal–Wallis test) (Figure 2B).

Expression of YAP1/TAZ in paired samples. Comparison of TAZ expression in paired tumor samples using qPCR indicated no difference between primary and relapsed samples (p=0.615, Wilcoxon-test) (Figure 3A). For YAP1 expression, there was no statistically significant difference as well (p=0.8314, Wilcoxon-test) (Figure 3B).

In western blot, TAZ was not expressed differently in primary compared to relapsed metastasis (p=0.6150, Wilcoxon-test) (Figure 3C). YAP1 expression was twice as high in primary metastasis than in relapsed metastasis (p=0.0129, Wilcoxon-test) (Figure 3D).

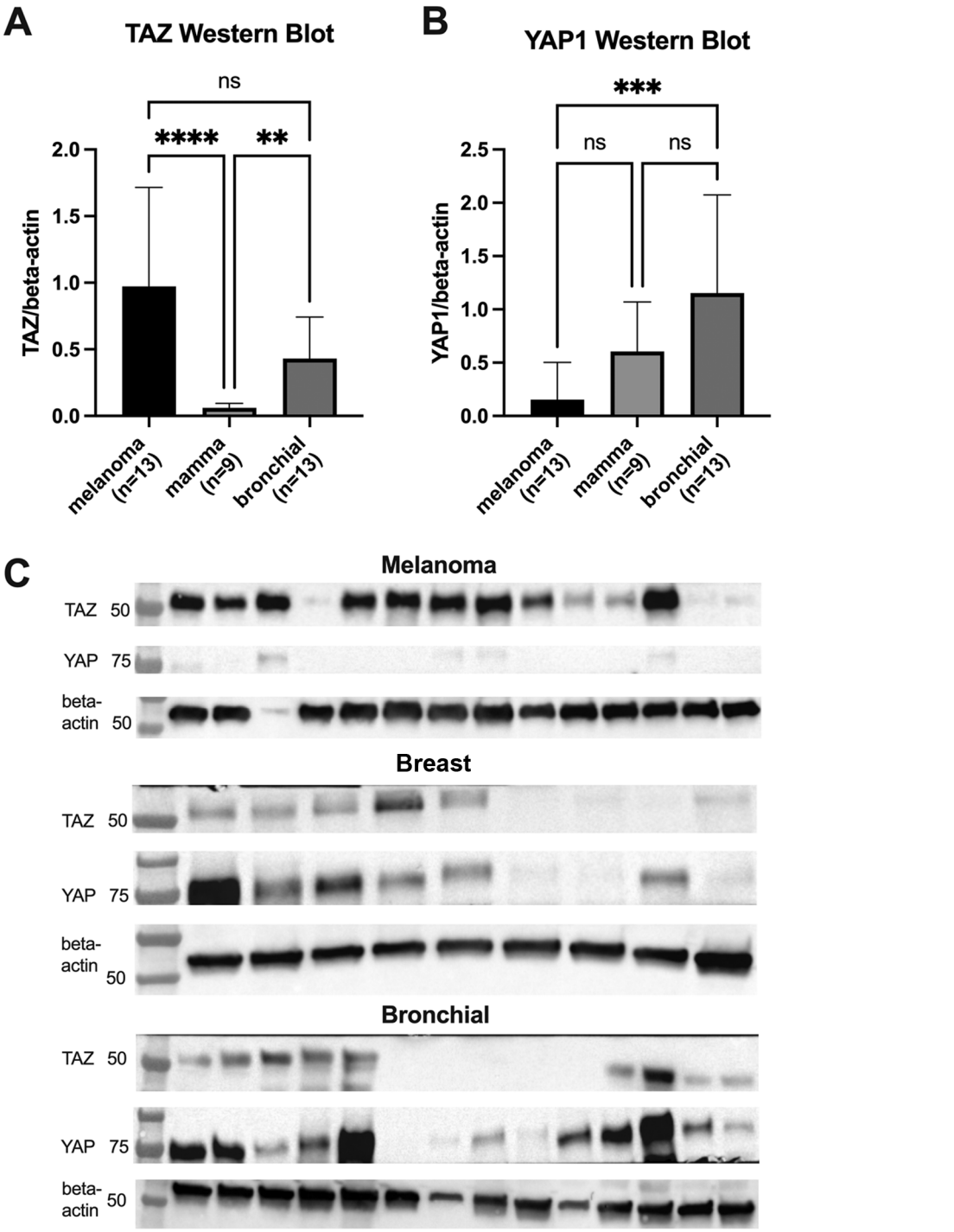


Figure 2. *Expression of TAZ/YAP1 in brain metastases of melanoma (n=13), breast (n=9) and bronchial carcinoma (n=13) detected using western blot. TAZ expression is highest in melanoma (A; melanoma: mean 0.9723, 95%CI=0.5229-1.422; breast: mean 0.06050, 95%CI=0.03526-0.08574; bronchial: mean 0.4310, 95%CI=0.2511-0.6109). YAP1 expression is highest in bronchial carcinoma (B; melanoma: mean 0.1509, 95%CI=-0.05086-0.3528; breast: mean 0.6061, 95%CI=0.2492-0.9630; bronchial: mean 1.153, 95%CI=0.6213-1685). Expression of TAZ/YAP1 as western blot stains (C).*

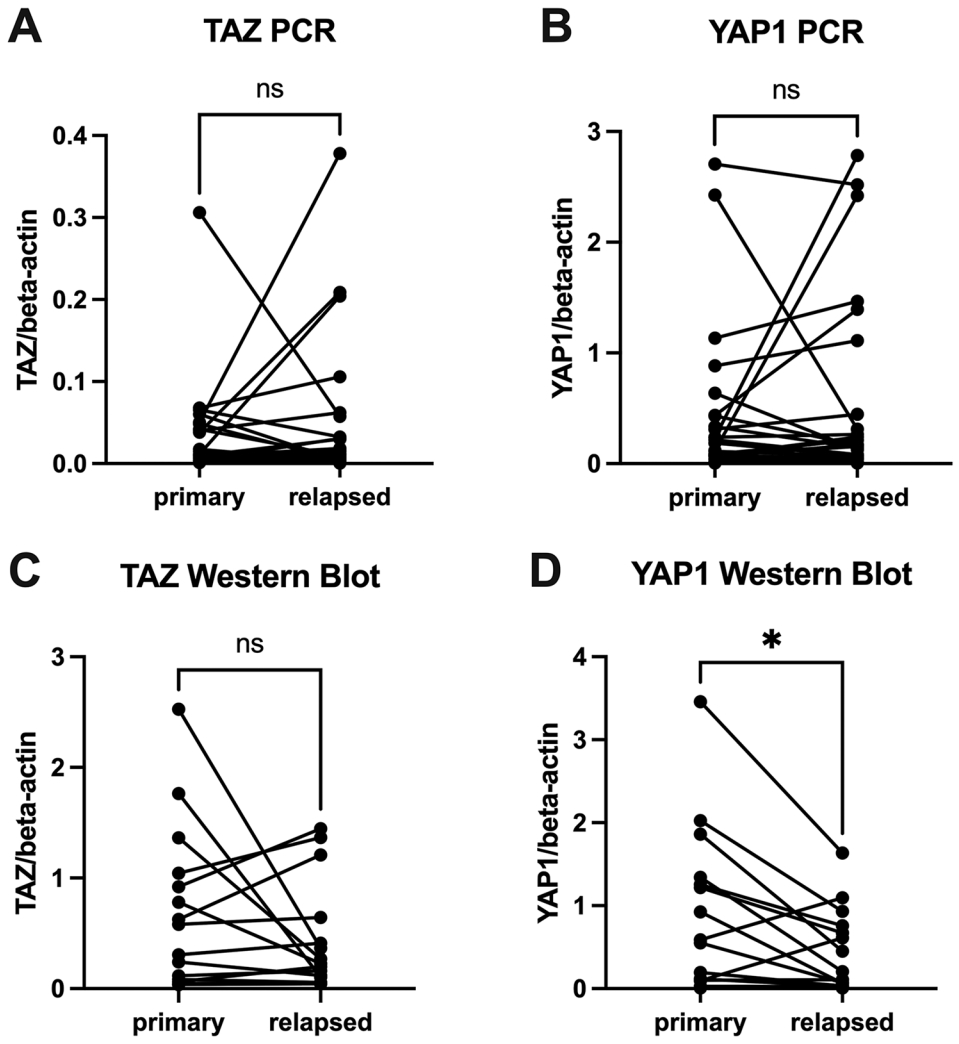


Figure 3. *Expression of TAZ/YAP1 in paired metastases examined using qPCR (n=25) and western blot (n=17). Expression level of TAZ and YAP1 is not different between primary and relapsed metastasis according to qPCR (TAZ: A; primary: mean 0.03339, 95%CI=0.008226-0.05855; relapsed: mean 0.0489, 95%CI=0.01206-0.08575; p=0.6150, Wilcoxon test; YAP1: B; primary: mean 0.005508, 95%CI=0.1398-0.6586; relapsed: mean 0.5139, 95%CI=0.1929-0.8348; p=0.8314, Wilcoxon test). Western blot analysis for TAZ shows no different level of expression (C; primary: mean 0.6586, 95%CI=0.2727-1.044; relapsed: mean 0.42, 95%CI=0.1611-0.6789; p=0.9399, Wilcoxon test) while YAP1 is significantly higher expressed in primary metastases (D; primary: mean 0.8123, 95%CI=0.3187-1.306; relapsed: mean 0.3949, 95%CI=0.1459-0.644; p=0.0129, Wilcoxon test).*

Discussion

Our qPCR analysis showed that melanoma has higher expression levels of YAP1/TAZ than breast and lung carcinoma. Additionally, expression levels differ between primary and relapsed brain metastases. There are hints that the incidence of brain metastases is increasing because of better treatment options of visceral tumors but a poor permeability of these agents through the brain blood barrier (3). High YAP1/TAZ have been linked to poorer survival rates and more aggressiveness in glioblastoma (5). In melanoma and breast cancer, higher YAP1-expression can be linked to more metastases (6) and more resistance to immunotherapy (7). Knockdown of YAP1/TAZ resulted in less migration and

invasion in cell culture and can re-sensitize tumor cells to chemotherapy especially to cisplatin (8). In breast and lung cancer, YAP1/TAZ seem to up-regulate PD-L1 expression, which results in less response to PD-L1 inhibitors (9). It is assumed that when tumors metastasize, their cells undergo EMT before they can dissociate from the primary site (10). Because of YAP1/TAZ are drivers of EMT, it is likely that tumors with high expression levels form more metastases, which is supported by findings that in high-grade metastatic breast cancer, YAP1 and TAZ activity is increased (11, 12).

Targeting YAP1 or TAZ could be a promising approach for treating not only primary site carcinomas but also brain metastasis in patients with relapsed tumors who have already been treated with various lines of therapy and may have developed resistance. Because of the important role of YAP1/TAZ in EMT, which seems to be necessary for tumor cells before forming metastases, inhibition of these genes could reduce metastatic potential. Thus, the inhibition of EMT-activating proteins using a flavonoid derivative has already been shown to negatively impact the migration and invasion behavior of pancreatic tumor cells (13). It would be interesting to further examine the difference in YAP1/TAZ-expression between tumor samples from primary carcinoma sites and brain metastasis and to relate them to the different therapy regimes.

Conflicts of Interest

The Authors have no conflicts of interest to declare in relation to this study.

Authors' Contributions

JD, experimental work, wrote manuscript, statistics; LH, edited manuscript, statistics; SK, experimental work, wrote manuscript; RG, correction of manuscript; MT, idea, manuscript, statistics.

Acknowledgements

Jill Dicke was supported by a fellowship of 'Köln Fortune'.

References

1 Gavrilovic IT, Posner JB: Brain metastases: epidemiology and pathophysiology. J Neurooncol 75(1): 5-14, 2005. DOI: 10.1007/s11060-004-8093-6
2 Lassman AB, DeAngelis LM: Brain metastases. Neurol Clin 21(1): 1-23, 2003. DOI: 10.1016/S0733-8619(02)00035-X
3 Cruz-Muñoz W, Kerbel RS: Preclinical approaches to study the biology and treatment of brain metastases. Semin Cancer Biol 21(2): 123-130, 2011. DOI: 10.1016/j.semcancer.2010.12.001
4 Piccolo S, Dupont S, Cordenonsi M: The biology of YAP/TAZ: Hippo signaling and beyond. Physiol Rev 94(4): 1287-1312, 2014. DOI: 10.1152/physrev.00005.2014
5 Orr BA, Bai H, Odia Y, Jain D, Anders RA, Eberhart CG: Yes-associated protein 1 is widely expressed in human brain tumors and promotes glioblastoma growth. J Neuropathol Exp Neurol 70(7): 568-577, 2011. DOI: 10.1097/NEN.0b013e31821ff8d8
6 Lamar JM, Stern P, Liu H, Schindler JW, Jiang ZG, Hynes RO: The Hippo pathway target, YAP, promotes metastasis through its TEAD-interaction domain. Proc Natl Acad Sci USA 109(37): E2441-E2450, 2012. DOI: 10.1073/pnas.1212021109
7 Kim MH, Kim CG, Kim SK, Shin SJ, Choe EA, Park SH, Shin EC, Kim J: YAP-induced PD-L1 expression drives immune evasion in BRAFi-resistant melanoma. Cancer Immunol Res 6(3): 255-266, 2018. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0320
8 Thompson BJ: YAP/TAZ: Drivers of tumor growth, metastasis, and resistance to therapy. BioEssays 42(5): e1900162, 2020. DOI: 10.1002/bies.201900162
9 Janse van Rensburg HJ, Azad T, Ling M, Hao Y, Snetsinger B, Khanal P, Minassian LM, Graham CH, Rauh MJ, Yang X: The Hippo pathway component TAZ promotes immune evasion in human cancer through PD-L1. Cancer Res 78(6): 1457-1470, 2018. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3139
10 Simpson CD, Anyiwe K, Schimmer AD: Anoikis resistance and tumor metastasis. Cancer Lett 272(2): 177-185, 2008. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.05.029
11 Cordenonsi M, Zanconato F, Azzolin L, Forcato M, Rosato A, Frasson C, Inui M, Montagner M, Parenti AR, Poletti A, Daidone MG, Dupont S, Basso G, Bicciato S, Piccolo S: The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. Cell 147(4): 759-772, 2011. DOI: 10.1016/j.cell.2011.09.048
12 Akrida I, Makrygianni M, Nikou S, Mulita F, Bravou V, Papadaki H: Hippo pathway effectors YAP, TAZ and TEAD are associated with EMT master regulators ZEB, Snail and with aggressive phenotype in phyllodes breast tumors. Pathol Res Pract 262: 155551, 2024. DOI: 10.1016/j.prp.2024.155551
13 Wang Z, Pan X, Ma X, Zhang Y, Gao Y, Guo Y, Zhou Y: FV-429 suppresses cancer cell migration and invasion by EMT *via* the Hippo/YAP1 pathway in pancreatic cancer cells. Anticancer Drugs, 2025. DOI: 10.1097/CAD.0000000000001718

5. Diskussion

Die Arbeit untersucht die Expression der Hippo Signalweg Proteine YAP und TAZ in WHO Grad 2 diffusen Gliomen und Hirnmetastasen des Bronchialkarzinoms, des Mammakarzinoms sowie des Malignen Melanoms. Zudem wird die Rolle als möglicher Prognosefaktor in niedriggradigen Gliomen in unserer Patientengruppe und in der „brain lower grade glioma study“ des The Cancer Genome Atlas (TCGA) aufgezeigt. Zuletzt werden Zusammenhänge der Expression von YAP und TAZ mit Temozolomid-Therapie diskutiert.

5.1. YAP/TAZ in niedriggradigen Gliomen

5.1.1. Ergebnisse

In TCGA-Datensätzen konnten wir zeigen, dass YAP und TAZ jeweils in Astrozytomen höher exprimiert sind als in Oligodendrogliomen. An unseren Patientenproben zeigte sich ebenfalls, dass YAP in Astrozytomen höher exprimiert ist als in Oligodendrogliomen, für TAZ zeigte sich dies nicht. Im Vergleich von primären Tumoren zu Rezidiven zeigte sich nur bei der TAZ-Expression in Oligodendrogliomen ein Unterschied, in Rezidiven findet sich eine höhere Expression als in primären Tumoren.

In der Analyse der Daten von Astrozytom-Patienten zeigte sich, dass eine höhere Expression von YAP zu einem geringeren Gesamtüberleben führt. Dies zeigte sich ebenso für die Expression von TAZ. Bei Oligodendriogliomen zeigte sich ein Zusammenhang von höheren Expressionsraten von YAP oder TAZ mit einer kürzeren Überlebensdauer. Dies konnte mit TCGA-Daten bestätigt werden, auch dort zeigte sich ein signifikant kürzeres Überleben von Patienten mit höheren YAP-Expressionsraten, sowohl bei Astrozytomen als auch bei Oligodendrogliomen.

5.1.2. Unterschiedliche Expressionsmuster in Astrozytomen und Oligodendrogliomen

Patienten mit Astrozytomen zeigen ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben als Patienten mit Oligodendrogliomen (5-Jahres-Überleben 51,6% vs. 82,7%).[2] Astrozytome sind aggressiver und können sich in ein sekundäres Glioblastom entwickeln. Wir konnten höhere Expressionsraten von YAP und TAZ in Astrozytomen als in Oligodendrogliomen nachweisen, dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Gruppen, die einen Zusammenhang zwischen höheren Expressionsraten und erhöhtem Tumorgrad feststellen konnten.[24,31] YAP und TAZ sind Treiber von erhöhter Invasion, Metastasierungen und Aggressivität von Tumoren.[22] Zudem kann eine Inhibierung dieser Proteine in die Tumorgenität dieser Zellen verringern.[43] Eine Hyperaktivierung von YAP und TAZ durch miR-130b fördert die Expression der downstream Gene CTGF und Pluripotenzfaktoren. Dadurch wird die Bildung des GCS-Typ und somit die Progression in ein Glioblastom weiter gefördert. Es stellt sich die Frage, ob Astrozytome mit einer höheren Expressionsrate von YAP und TAZ auch eher in ein sekundäres

Glioblastom fortschreiten können. Da sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Überlebens in Patienten mit hoher vs. niedriger Expression zeigt, könnten YAP und TAZ ebenfalls als prognostische Marker dienen. Da der Hippo-Signalweg über viele verschiedene Wege aktiviert werden kann, wäre es interessant zu untersuchen, über welche Wege genau dies zu einer erhöhten YAP/TAZ-Expression führt. Somit könnte man neue Ansatzpunkte für Therapieoptionen finden. Aufgrund ihrer Rolle in der Tumorgenese und Zellproliferation würden sich diese auch als Zielproteine für eine targeted therapy anbieten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Inhibition von YAP-TEAD durch Verteporfin das Wachstum von Gliomzellen inhibieren kann.[42,44] Eine erhöhte Expression von YAP/TAZ ist ebenfalls mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Strahlentherapie assoziiert, die zum Goldstandard der Therapien von niedriggradigen Gliomen gehört. So konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine Inhibition von TAZ in Glioblastomzelllinien zu einem erhöhten Ansprechen auf Radiotherapie führt.[45] Dies konnte ebenfalls für eine Inhibition von YAP gezeigt werden.[45] Weiterführend könnte man Untersuchungen durchführen, ob sich dieser Effekt auch bei nieddriggradigen Gliomen reproduzieren ließe. So könnten bei Patienten mit einer erhöhten Expression von YAP oder TAZ eine Inhibition dieser Proteine durchgeführt werden, um ein besseres Ansprechen auf Radiotherapie zu ermöglichen. Außerdem ließe sich mit der Bestimmung der Expression von YAP/TAZ weitere Faktoren bestimmen, um die Prognose von Patienten mit niedriggradigen Gliomen präziser vorherzusagen.

5.2. YAP/TAZ in Metastasen

5.2.1. Ergebnisse

In der qPCR konnten wir feststellen, dass die Expression von TAZ in Metastasen des Malignen Melanoms am höchsten ist, gefolgt vom Bronchialkarzinom und dem Mammakarzinom. Dies konnten wir auch auf translationaler Ebene im Western Blot feststellen. Die Expression von YAP ist im Malignen Melanom ebenfalls am höchsten, im Mamma- und Bronchialkarzinom war sie etwa gleich. Auf translationaler Ebene zeigte sich die höchste Expression im Bronchialkarzinom, gefolgt von Mammakarzinom und Malignen Melanom.

Im Vergleich der Expressionsmuster in erstmalig aufgetretenen Metastasen vs. in rezidivierenden zeigte sich nur für die Expression von YAP auf translationaler Ebene ein signifikanter Unterschied. Dort ist die Expression in Rezidiven geringer als in erstmalig aufgetretenen Metastasen.

5.2.2. Bedeutung in der EMT

Es wird angenommen, dass Tumorzellen zunächst die Epithelial-mesenchymale Transition durchlaufen müssen, um metastasieren zu können. In der Embryonalentwicklung bilden sich durch EMT das Mesoderm und das primäre Mesenchym aus dem Primitivstreifen sowie Zellen der Neuralleiste.[46] Während der EMT verlieren die Zellen die Eigenschaften von

Epithelialzellen und lösen Zellkontakte auf und verringern die Expression von Adhäsionsmolekülen (E-Cadherin, Occludin, Cytokeratin, Claudin). Außerdem verlieren sie ihre Polarität, um durch die Basallamina migrieren zu können. Nach Intravasation und Extravasation in das Parenchym entfernter Organe, redifferenzieren die Tumorzellen durch mesenchymal-epitheliale Transition und die Mikroumgebung und können Mikro- und Makrometastasen bilden. Zudem scheint EMT den Zellen stammzellähnliche Eigenschaften wie erhöhte Selbsterneuerung, Tumorogenesis und Resistenz gegen Apoptose und Chemotherapie zu verleihen.[47,48] Der Hippo Signalweg kann durch Veränderungen der Mikroumgebung der Zellen hinsichtlich Zellpolarität, Zell-Zell-Kontakten, Zellpolarität oder Veränderungen der Extrazellularen Matrix aktiviert oder auch deaktiviert werden. So spielen also auch die Effektorproteine YAP und TAZ eine Rolle in der EMT, es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression in diversen Karzinom-Entitäten mit EMT korreliert.[49] Zudem ist eine Überexpression von YAP/TAZ mit einer höheren Aggressivität der Primärtumore und schlechterem Überleben, unter anderem im Mammakarzinom, verbunden, folglich auch mit mehr Metastasenbildung.[50] Eine hohe Tumoraggressivität zeichnet sich durch starke Invasion und schnelles Wachstum aus, beides Faktoren die durch EMT und folglich durch YAP und TAZ beeinflusst werden. Eine Inhibierung von YAP/TAZ führt hingegen zu weniger Migration und Invasion von Tumorzellen, dies würde also zu weniger Metastasierung führen. Es wäre interessant zu untersuchen, ob Primärtumore, die mit Inhibitoren von YAP/TAZ behandelt werden, auch weniger Metastasen bilden. Zudem könnte man die Expressionsmuster von YAP/TAZ also prognostische Marker hinsichtlich des Metastasierungspotenzials verwenden und so beispielsweise Patienten mit erhöhter Expression auch häufiger Screeninguntersuchungen für Fernmetastasen unterziehen. Auch ein Vergleich der Expressionsraten von YAP/TAZ im Primärtumor vs. in der Hirnmetastase wäre eine sinnvolle Ergänzung der Untersuchung. Zudem könnte man die Expressionsraten von YAP/TAZ im Primärtumor vor und nach Metastasierung beispielsweise im Mausmodell untersuchen, um eine Erhöhung der Expression als Treiber für Metastasierung zu identifizieren.

5.2.3. Bedeutung in der Therapie

Erhöhte Expressionsraten von YAP/TAZ werden mit erhöhten Resistenzlagen für diverse klassische Chemotherapeutika, Tyrosinkinaseinhibitoren und Antikörper in Verbindung gebracht. Dies ist in verschiedensten Tumorentitäten wie dem Kolorektalkarzinom, Ösophaguskarzinom, Pankreaskarzinom, Hepatozellulärem Karzinom sowie speziell auch im Bronchialkarzinom, Mammakarzinom und Malignen Melanom der Fall.[23] Besonders in der Therapie von Hirnmetastasen ist dies interessant, da Primärtumore, die Hirnmetastasen entwickelt haben, oftmals schon mit mehreren Therapielinien behandelt wurden und sich darunter Resistenzentwicklungen und Progress zeigen. Eine Inhibierung von YAP/TAZ scheint die Tumore wieder sensibel gegenüber Chemotherapeutika zu machen, wie zum Beispiel an

Zellen des Lungenkarzinoms mit Cisplatin gezeigt.[8] Interessant ist auch, dass YAP/TAZ Faktoren für EMT erhöhen, die die Basallamina durchlässiger machen, um aus dem Primarius Metastasen bilden zu können. Man würde annehmen, dass die jeweiligen Wirkstoffe durch diese durchlässigere Basallamina besser in den Primarius gelangen und so ihre Wirkung besser entfalten könnten. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein, denn mit einer solchen Inhibierung könnten Synergismen in der Behandlung von Primärtumoren aber auch Hirnmetastasen gefördert werden und ein neuer Angriffspunkt gefunden werden.

5.3. Limitationen der Arbeit

Die vorliegende Arbeit verwendete Low Grade Gliome, die nach der WHO-Klassifikation von 2007 eingeteilt wurde, das heißt der IDH- und 1p/19q-Status wurde in der Auswertung nicht berücksichtigt. Zudem wurden die Patienten der Low Grade Gliome und der Hirnmetastasen vor Resektion mit unterschiedlichen Therapieregimen behandelt, was ebenfalls zu einem unterschiedlichen Überleben führen kann. Zuletzt untersuchten wir nur eine kleine Patientenkohorte, wir konnten unsere Daten der LGG jedoch mit Daten der TCGA untermauern.

6. Literaturverzeichnis

1 Weller M, van den Bent M, Preusser M, *et al.* EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol* 2021; **18**: 170–86.
2 Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012–2016. *Neuro-Oncology* 2019; **21**: v1–100.
3 Ohgaki H, Kleihues P. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clinical Cancer Research* 2013; **19**: 764–72.
4 Gavrilovic IT, Posner JB. Brain metastases: epidemiology and pathophysiology. *J Neurooncol* 2005; **75**: 5–14.
5 Soffietti R, Abacioglu U, Baumert B, *et al.* Diagnosis and treatment of brain metastases from solid tumors: guidelines from the European Association of Neuro-Oncology (EANO). *Neuro-Oncology* 2017; **19**: 162–74.
6 Achrol AS, Rennert RC, Anders C, *et al.* Brain metastases. *Nat Rev Dis Primers* 2019; **5**: 5.
7 Piccolo S, Dupont S, Cordenonsi M. The Biology of YAP/TAZ: Hippo Signaling and Beyond. *Physiological Reviews* 2014; **94**: 1287–312.
8 Thompson BJ. YAP/TAZ: Drivers of Tumor Growth, Metastasis, and Resistance to Therapy. *BioEssays* 2020; **42**: 1900162.
9 Harvey KF, Zhang X, Thomas DM. The Hippo pathway and human cancer. *Nat Rev Cancer* 2013; **13**: 246–57.
10 Nakatani K, Maehama T, Nishio M, *et al.* Targeting the Hippo signalling pathway for cancer treatment. *J Biochem* 2016; : mvw074.
11 Schneider T, Mawrin C, Scherlach C, Skalej M, Firsching R. Gliomas in Adults. *Dtsch Arztebl Int* 2010; **107**: 799–808.
12 Davis ME. Epidemiology and Overview of Gliomas. *Semin Oncol Nurs* 2018; **34**: 420–9.
13 Louis DN, Perry A, Wesseling P, *et al.* The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol* 2021; **23**: 1231–51.
14 Schaff LR, Mellinghoff IK. Glioblastoma and Other Primary Brain Malignancies in Adults: A Review. *JAMA* 2023; **329**: 574–87.
15 Chen H, Judkins J, Thomas C, *et al.* Mutant IDH1 and seizures in patients with glioma. *Neurology* 2017; **88**: 1805–13.
16 Han S, Liu Y, Cai SJ, *et al.* IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Br J Cancer* 2020; **122**: 1580–9.
17 Weller M, Stupp R, Hegi ME, *et al.* Personalized care in neuro-oncology coming of age: why we need MGMT and 1p/19q testing for malignant glioma patients in clinical practice. *Neuro Oncol* 2012; **14 Suppl 4**: iv100-108.
18 Chen Y, Hu F, Zhou Y, Chen W, Shao H, Zhang Y. MGMT promoter methylation and glioblastoma prognosis: a systematic review and meta-analysis. *Arch Med Res* 2013; **44**: 281–90.
19 Lassman AB, DeAngelis LM. Brain metastases. *Neurologic Clinics* 2003; **21**: 1–23.
20 Langley RR, Fidler IJ. The Biology of Brain Metastasis. *Clinical Chemistry* 2013; **59**: 180–9.
21 Valiente M, Ahluwalia MS, Boire A, *et al.* The Evolving Landscape of Brain Metastasis. *Trends Cancer* 2018; **4**: 176–96.
22 Masliantsev K, Karayan-Tapon L, Guichet P-O. Hippo Signaling Pathway in Gliomas. *Cells* 2021; **10**: 184.
23 Reggiani F, Gobbi G, Ciarrocchi A, Ambrosetti DC, Sancisi V. Multiple roles and context-specific mechanisms underlying YAP and TAZ-mediated resistance to anti-cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 2020; **1873**: 188341.
24 Li W, Dong S, Wei W, *et al.* The role of transcriptional coactivator TAZ in gliomas. *Oncotarget* 2016; **7**: 82686–99.
25 Yee PP, Wei Y, Kim S-Y, *et al.* Neutrophil-induced ferroptosis promotes tumor necrosis in glioblastoma progression. *Nat Commun* 2020; **11**: 5424.

26 Yang R, Wu Y, Zou J, *et al.* The Hippo transducer TAZ promotes cell proliferation and tumor formation of glioblastoma cells through EGFR pathway. *Oncotarget* 2016; **7**: 36255–65.
27 Tian T, Li A, Lu H, Luo R, Zhang M, Li Z. TAZ promotes temozolomide resistance by upregulating MCL-1 in human glioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2015; **463**: 638–43.
28 Zhang L, Cheng F, Wei Y, *et al.* Inhibition of TAZ contributes radiation-induced senescence and growth arrest in glioma cells. *Oncogene* 2019; **38**: 2788–99.
29 Liu M, Lin Y, Zhang X-C, *et al.* Phosphorylated mTOR and YAP serve as prognostic markers and therapeutic targets in gliomas. *Lab Invest* 2017; **97**: 1354–63.
30 Liu Z, Yee PP, Wei Y, Liu Z, Kawasawa YI, Li W. Differential YAP expression in glioma cells induces cell competition and promotes tumorigenesis. *J Cell Sci* 2019; **132**. DOI:10.1242/jcs.225714.
31 Guichet P-O, Masliantsev K, Tachon G, *et al.* Fatal correlation between YAP1 expression and glioma aggressiveness: clinical and molecular evidence. *The Journal of Pathology* 2018; **246**: 205–16.
32 Zhang Y, Xie P, Wang X, *et al.* YAP Promotes Migration and Invasion of Human Glioma Cells. *J Mol Neurosci* 2018; **64**: 262–72.
33 Song J, Xie L-X, Zhang X-Y, *et al.* Role of YAP in lung cancer resistance to cisplatin. *Oncol Lett* 2018; **16**: 3949–54.
34 Li W, Cao Y, Xu J, *et al.* YAP transcriptionally regulates COX-2 expression and GCCSysm-4 (G-4), a dual YAP/COX-2 inhibitor, overcomes drug resistance in colorectal cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2017; **36**: 144.
35 Touil Y, Igoudjil W, Corvaisier M, *et al.* Colon cancer cells escape 5FU chemotherapy-induced cell death by entering stemness and quiescence associated with the c-Yes/YAP axis. *Clin Cancer Res* 2014; **20**: 837–46.
36 Song S, Honjo S, Jin J, *et al.* The Hippo Coactivator YAP1 Mediates EGFR Overexpression and Confers Chemoresistance in Esophageal Cancer. *Clin Cancer Res* 2015; **21**: 2580–90.
37 Downregulation of MicroRNA-455-3p Links to Proliferation and Drug Resistance of Pancreatic Cancer Cells via Targeting TAZ - PubMed. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29499934/ (accessed Oct 16, 2023).
38 Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; **352**: 987–96.
39 Johannessen T-CA, Bjerkvig R. Molecular mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Expert Review of Anticancer Therapy* 2012; **12**: 635–42.
40 Gratas C, Séry Q, Rabé M, Oliver L, Vallette FM. Bak and Mcl-1 are essential for Temozolomide induced cell death in human glioma. *Oncotarget* 2014; **5**: 2428–35.
41 Liu X, Chen J, Li W, Hang C, Dai Y. Inhibition of Casein Kinase II by CX-4945, But Not Yes-associated protein (YAP) by Verteporfin, Enhances the Antitumor Efficacy of Temozolomide in Glioblastoma. *Transl Oncol* 2019; **13**: 70–8.
42 Al-Moujahed A, Brodowska K, Stryjewski TP, *et al.* Verteporfin inhibits growth of human glioma in vitro without light activation. *Sci Rep* 2017; **7**. DOI:10.1038/s41598-017-07632-8.
43 Bhat KPL, Salazar KL, Balasubramaniyan V, *et al.* The transcriptional coactivator TAZ regulates mesenchymal differentiation in malignant glioma. *Genes Dev* 2011; **25**: 2594–609.
44 Barrette AM, Ronk H, Joshi T, *et al.* Anti-invasive efficacy and survival benefit of the YAP-TEAD inhibitor Verteporfin in preclinical glioblastoma models. *Neuro Oncol* 2021; : noab244.
45 Xu X, Chen Y, Wang X, Mu X. Role of Hippo/YAP signaling in irradiation-induced glioma cell apoptosis. *CMAR* 2019; **Volume 11**: 7577–85.
46 JCI - The basics of epithelial-mesenchymal transition. https://www.jci.org/articles/view/39104 (accessed Oct 19, 2023).
47 Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol* 2017; **14**: 611–29.
48 Mani SA, Guo W, Liao M-J, *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates

cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; **133**: 704–15.
49 Janse van Rensburg HJ, Yang X. The roles of the Hippo pathway in cancer metastasis. *Cellular Signalling* 2016; **28**: 1761–72.
50 Akrida I, Bravou V, Papadaki H. The deadly cross-talk between Hippo pathway and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in cancer. *Mol Biol Rep* 2022; **49**: 10065–76.