

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
(Prof. Dr. med. J. Gallwas)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Einfluss von YAP auf die Invasion von mesenchymal transformierten Tumorzellen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Lena Goetz

aus

Grevenbroich

Göttingen 2020

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in

Ko-Betreuer/in:

Prüfungskommission

Referent/in Prof. Dr. rer. nat. C. Gründker

Ko-Referent/in:

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel " Einfluss von YAP auf die Invasion von mesenchymal transformierten Tumorzellen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Hellinger JW, Hüchel S, Goetz L, Bauerschmitz G, Emons G, Gründker C (2019): Inhibition of CYR61-S100A4 Axis Limits Breast Cancer Invasion. *Front Oncol* 9, 1074

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Mammakarzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	1
1.1.2 Einteilung des Mammakarzinoms	1
1.1.3 Metastasierung	2
1.2 Die epitheliale-mesenchymale Transition.....	3
1.2.1 Allgemeine Informationen und verschiedene Typen.....	3
1.2.2 Die EMT im Kontext der Metastasierung.....	4
1.2.3 Zytoskelett und F-Aktin.....	5
1.3 Yes-assoziiertes Protein (YAP)	6
1.3.1 Der Hippo-Signalweg	7
1.3.2 YAP in Krebszellen.....	7
1.3.3 S100A4 und Cyr61	9
1.4 Fragestellung und Zielsetzung.....	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Material	11
2.1.1 Geräte.....	11
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	13
2.1.3 Chemikalien.....	13
2.1.4 Puffer und Lösungen	14
2.1.5 Kultur-, Einfrier- und Versuchsmedien.....	16
2.1.6 Zelllinien	17
2.1.7 Kits und Assays	18
2.1.8 Software	19
2.2 Methoden.....	19
2.2.1 Zellbiologische Methoden	19
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	23
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden	29
2.2.4 Fluoreszenz-Methoden.....	32
2.2.5 Statistische Analysen.....	33
3 Ergebnisse	34
3.1 Expression von YAP1 auf molekularbiologischer und proteinbiochemischer Ebene nach <i>knockdown</i> von YAP1 mittels siRNA-Transfektion	34

3.2	Untersuchung der Invasivität der Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7-EMT in Kokultur nach <i>knockdown</i> von YAP1 mittels siRNA-Transfektion	36
3.3	Untersuchung der Proliferation der Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7-EMT nach <i>knockdown</i> von YAP1 mittels siRNA-Transfektion	38
3.4	Untersuchung der Fähigkeit zur F-Aktin-Polymerisation der Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7-EMT nach <i>knockdown</i> von YAP1 mittels siRNA-Transfektion	40
3.5	Expression von S100A4 in den Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MCF-7-EMT auf proteinbiochemischer Ebene, nach <i>knockdown</i> von YAP1 mittels siRNA-Transfektion	42
4	Diskussion	44
4.1	Nachweis des <i>knockdown</i> von YAP1 auf RNA- und Proteinebene in den Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7-EMT	44
4.2	Auswirkung des <i>knockdown</i> von YAP1 auf die invasiven Eigenschaften der Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7-EMT	45
4.3	Auswirkung des <i>knockdown</i> von YAP1 auf die proliferativen Eigenschaften der Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7-EMT	46
4.4	Auswirkung des <i>knockdown</i> von YAP1 auf die F-Aktin-Polymerisation der Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7-EMT	47
4.5	Auswirkung des <i>knockdown</i> von YAP1 auf die Expression von S100A4 in den Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7-EMT als Beispiel der Signalkaskade	49
4.6	Fazit	51
5	Zusammenfassung	52
6	Literaturverzeichnis	54

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Nachweis der reduzierten YAP1-Expression nach erfolgter transienter siRNA-Transfektion.....	35
Abbildung 2: Nachweis der verminderten Invasivität nach erfolgter transienter siRNA-Transfektion.....	37
Abbildung 3: Nachweis der nicht signifikant veränderten Proliferation nach erfolgter transienter siRNA-Transfektion.....	39
Abbildung 4: Nachweis der verminderten Fähigkeit zur F-Aktin-Polymerisation nach erfolgter transienter siRNA-Transfektion.....	41
Abbildung 5: Nachweis der reduzierten S100A4-Expression nach erfolgter transienter siRNA-Transfektion.....	43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte	11
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien	13
Tabelle 3: Verwendete Puffer und Lösungen	14
Tabelle 4: Verwendete Inhibitoren	16
Tabelle 5: Verwendete Kulturmedien, Funktion und Zusätze	17
Tabelle 6: Verwendete Zelllinien, nach Herkunft und Histologie	18
Tabelle 7: Verwendete Kits und Assays	18
Tabelle 8: Verwendete Software	19
Tabelle 9: Verwendete Versuchsmedien, Funktionen und Zusätze	24
Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide	28
Tabelle 11: Verwendete Reagenzien für die qPCR (Pipettierschema)	28
Tabelle 12: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE-Gelelektrophorese	30
Tabelle 13: Verwendete Primärantikörper für das Western-Blot-Verfahren	31
Tabelle 14: Verwendete Sekundärantikörper für das Western-Blot-Verfahren	32

Abkürzungsverzeichnis

ABP	<i>actin-binding protein</i>
ARHGAP29	<i>Rho GTPase-activating protein 29</i>
BRCA1/2	<i>Breast Cancer 1/2</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
cs-FCS	<i>charcoal stripped FCS</i>
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
CYR61	<i>cysteine-rich angiogenic inducer 61</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ER	Estrogen-Rezeptor
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HER2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
LATS1	<i>large tumor suppressor kinase 1</i>
LIMK	<i>LIM domain kinase</i>
MAP4K	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase</i>
MET	mesenchymal-epitheliale Transition
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MST 1/2	<i>mammalian sterile-20-like</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>

PR	Progesteron-Rezeptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
Sav1	<i>Salvador homolog 1</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TAZ	<i>transcription co-activator with a PDZ binding motif</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TBST	Tween-TBS-Puffer
TEAD	<i>transcriptional enhanced associate domain</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin (TEMEDA)
TNBC	<i>triple-negative breast cancer</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	5(6)-Tetramethylrhodaminisothiocyanat
w	mit (<i>with</i>)
w/o	ohne (<i>without</i>)

1 Einleitung

1.1 Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Weltweit ist das Mammakarzinom bei der Frau, die am häufigsten auftretende Krebserkrankung. Insgesamt liegt Brustkrebs bezüglich der Häufigkeit bei Männern und Frauen auf Platz Fünf. Jährlich erkranken in Deutschland ca. 72.000 Frauen neu an Brustkrebs (2016), das mittlere Erkrankungsalter liegt dabei bei ca. 65 Jahren. Das RKI prognostiziert für 2020 eine Zunahme der Neuerkrankungen auf ca. 78.000. Die Zahl der Sterbefälle bei Brustkrebs liegt bei etwa 18.000 pro Jahr (Robert-Koch-Institut 2016). Metastasen treten bei etwa einer von vier Patientinnen auf.

Nicht alle Risikofaktoren für ein Mammakarzinom sind derzeit bekannt. Einige Faktoren konnten jedoch schon identifiziert werden, die die Entstehung des Mammakarzinoms beeinflussen. Einen fördernden Einfluss haben beispielsweise eine frühe Menarche (vor dem 12. Lebensjahr), eine späte Menopause (nach dem 55. Lebensjahr) und Nulliparität (Antoniou und Easton 2006). Weitere Risikofaktoren sind möglicherweise Adipositas, Alkohol- und Nikotinabusus sowie eine fettreiche Ernährung; diese Faktoren konnten jedoch noch nicht endgültig bestätigt werden. Genetische Risikofaktoren wie Mutationen in den Genen BRCA1, BRCA2 und p53 sind zwar bekannt, allerdings entstehen nur 5-10% der Mammakarzinome genetisch bedingt (Bradbury und Olopade 2007).

1.1.2 Einteilung des Mammakarzinoms

Es gibt verschiedenen Möglichkeiten das Mammakarzinom zu klassifizieren. Eine Möglichkeit ist die Einteilung nach der Histopathologie des Tumors. Hier erfolgt die Einteilung in das nichtinvasive Karzinom, auch Carcinoma in situ, und das invasive Karzinom. Eine wei-

tere genauere Einteilung erfolgt aufgrund des Ursprungsgewebes in duktales (vom Milchgangsepithel ausgehend) und lobuläres Karzinom (vom Drüsengewebe ausgehend). Am häufigsten ist das invasive duktales Mammakarzinom mit 80%, gegenüber dem invasiven lobulären Mammakarzinom mit 10% (Riede et al. 2009, S. 529).

Eine weitere Einteilung ist nach dem Rezeptorstatus des Tumors möglich. Hier wird das Vorliegen des Östrogenrezeptors (ER-alpha), des Progesteronrezeptors (PR) und des HER2/neu-Rezeptors mittels Immunhistochemie bestimmt (Melcher et al. 2012). Bei 75-80% der Mammatumore ist der Nachweis der Hormonrezeptoren positiv, sie exprimieren ER-alpha und/oder PR. Eine Her2/neu-Expression zeigt sich bei ca. 15-20% der Mammakarzinome (Dawson et al. 2009; Föst et al. 2011).

Ca. 15-20% aller Mammakarzinome sind *triple negativ* was bedeutet, dass sie weder den ER-alpha- noch den PR-Rezeptor exprimieren und auch keine Expression des Her2/neu-Rezeptors zeigen (Schubert et al. 2011). Diese Tumore zeichnen sich durch eine schlechtere Heilungschance und eine erhöhte Sterberate aus, da sie keine gezielte hormonelle oder immunologische Therapie zulassen.

Das Staging des Mammakarzinoms erfolgt nach der gängigen TNM-Klassifikation anhand der Größe des Primärtumors (T), des Lymphknotenbefalls (N) und der Metastasierung (M).

Die Prognose für Patientinnen mit einem Mammakarzinom hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie zum Beispiel dem TNM-Status, der Histopathologie und dem Rezeptorstatus.

1.1.3 Metastasierung

Die Metastasierung beschreibt die Verbreitung der Krebszellen in Gewebe und Organen, über ihr Ursprungsgewebe hinaus, und die Tumorformation an einem neuen Ort. Sie ist der vorherrschende Grund für die Mortalität bei Krebspatienten und -patientinnen (Seyfried und Huysentruyt 2013). Der Großteil der Brustkrebspatientinnen verstirbt also im Krankheitsverlauf nicht am Primärtumor, sondern an den Metastasen.

Die sogenannte Metastasierungskaskade beinhaltet eine Reihe von Schritten. Die drei Hauptprozesse sind die Invasion, die Intravasation und die Extravasation (Martin et al. 2013).

Das Mammakarzinom metastasiert häufig schon in frühen Stadien und die Metastasierung findet vor allem hämatogen und lymphogen statt. Am häufigsten sind Knochenmetastasen, Lebermetastasen und Lungenmetastasen (Weigelt et al. 2005).

Metastasierter Brustkrebs gilt prognostisch als ungünstig. Es bestehen zwar eine Reihe von Therapiemöglichkeiten, um die Symptome zu lindern, die Lebensqualität der Patientinnen zu verbessern und die Lebenszeit zu verlängern. Heilbar ist er aber nicht mehr.

Aktuell gibt es also keine Therapie, um den metastasierten Brustkrebs zu heilen. Daher ist die Erforschung metastasierungsrelevanter Faktoren und die Entdeckung therapeutischer Möglichkeiten, die Metastasierung zu verhindern, in Zukunft ein zentraler Punkt der Forschung.

1.2 Die epitheliale-mesenchymale Transition

1.2.1 Allgemeine Informationen und verschiedene Typen

Die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) wurde erstmals von Greenburg und Hay (1982) beschrieben. Die Untersuchung verschiedener epithelialer Zellen in Kollagen ergab, dass sich die epithelialen Zellen hin zu länglichen Zellen veränderten, welche sich vom Explantat loslösen und das Kollagen invadieren konnten. Epitheliale Zellen zeigen normalerweise eine Polarität mit einer apikalen Seite und einer basalen Seite, welche mit der Basallamina, also mit der extrazellulären Matrix, verbunden ist. Da der epitheliale, bzw. mesenchymale Phänotyp einer Zelle normalerweise stabil besteht, war das Erlangen von mesenchymalen Eigenschaften und der Fähigkeit zur Migration der adulten epithelialen Zellen und der epithelialen Tumorzellen eine Neuheit.

Seit der Erstbeschreibung der EMT im Jahr 1982 wurde dieser Prozess vielfach erforscht und beschrieben. Die EMT wird heutzutage als ein dynamischer, vorübergehender und plastischer Prozess beschrieben (Nieto 2017). Mit dem Durchlaufen dieses Prozesses kommt es zum Verlust von Zell-Zell-Adhäsionen, dem Verlust der Zellpolarität und zum Zugewinn mesenchymaler Eigenschaften (Warren et al. 2018). Die Zellen machen zahlreiche biochemische Veränderungen durch und erlangen so einen mesenchymalen Phänotyp, inklusive einer gesteigerten Migrationskapazität, Invasivität und unter anderem einer gesteigerten Apoptose-Resistenz (Kalluri und Weinberg 2009). Für die Einleitung und den erfolgreichen Abschluss der EMT sind eine Reihe von molekularen Prozessen nötig wie z. B. die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die Reorganisation des Zytoskeletts und die Expression von Zytoskelettproteinen.

Die EMT spielt eine wichtige Rolle in der Embryogenese und Organentwicklung, in der adulten Gewebsregeneration, aber auch in der Tumorentwicklung und Metastasierung. Da die EMT in unterschiedlichen Prozessen von besonderer Bedeutung ist und teilweise unterschiedlich abläuft, wird sie in drei verschiedene Typen unterteilt.

Die EMT-Typ 1 findet in der Embryogenese statt und beinhaltet die Implantation, Embryoformation und Organentwicklung. Während der embryonalen Entwicklung können Zellen mithilfe der EMT über längere Distanz migrieren, so ihr endgültiges Ziel erreichen und sich dort zu verschiedenen Zelltypen differenzieren (Nieto 2017). Die Epithelzellen verlieren ihre epithelialen Eigenschaften, indem sie ihre Zellkontakte auflösen und Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherin herunterregulieren. Dadurch können sie migrieren und die Basalmembran passieren. Im Zielgebiet angekommen, können sie sich zu verschiedenen Zelltypen oder im Rahmen der mesenchymal-epithelialen Transition (MET) wieder zu Epithelzellen differenzieren.

Die EMT-Typ 2 läuft bei der Wundheilung, der Geweberegeneration und der Organfibrose ab. Hier erfolgt die EMT im Rahmen von Reparaturprozessen, um Gewebe nach einem Trauma oder einem Entzündungsprozess wiederherzustellen. Im Typ 2 stoppt der Prozess der EMT, wenn die Entzündung eingedämmt ist. Außer es handelt sich um eine Organfibrose aufgrund einer andauernden Entzündung. Hier führt die EMT letztendlich zu einer Zerstörung des Organs (Kalluri und Weinberg 2009).

Die EMT-Typ 3 findet im Rahmen von neoplastischen Prozessen wie Tumorformation statt und kann die Tumorzellen durch die morphologischen und biochemischen Veränderungen zu Invasion und Metastasierung befähigen.

1.2.2 Die EMT im Kontext der Metastasierung

Die Rolle der EMT bei der Metastasierung von Tumorzellen ist vielfach in der Literatur erwähnt. Dennoch ist sie nicht endgültig geklärt, da die Komplexität dieses Prozesses und die Schwierigkeit einer *in-vivo*-Analyse eine abschließende Klärung erschweren (Nieto 2017).

Es wurde beschrieben, dass Tumorzellen embryologische Programme wie die EMT reaktivieren können und so ihre Aggressivität gesteigert wird. Die EMT wird nicht nur mit Zellmotilität in Verbindung gebracht, sondern auch mit gesteigerten Stammzeleigenschaften und Medikamentenresistenz. Sie kann also Metastasierung, Tumorrezidive und Therapiere-

sistenz in Krebs fördern (Aiello und Kang 2019). Da verschiedenen Tumortypen auf unterschiedliche EMT-Effektoren angewiesen sind, sind die genauen Zusammenhänge von EMT und Metastasierung nicht vollständig beschrieben.

Die Metastasierung ist der führende Grund für die Mortalität bei Krebspatienten. Die Metastasierungskaskade beinhaltet eine Reihe von Schritten, die durchlaufen werden müssen, damit der Tumor erfolgreich metastasieren kann. Die drei Hauptprozesse sind die Invasion, die Intravasation und die Extravasation. Der Verlust der Zell-Zell-Kontakte erlaubt es den Tumorzellen, sich vom Primärtumor zu lösen, und der Verlust von Zell-Matrix-Kontakten befähigt die Zellen einen motilen Phänotyp zu erlangen und ermöglicht so die Invasion des umliegenden Stromas. Die Metastasierung ähnelt der EMT. Auch hier kommt es unter anderem zum Verlust der Zell-Zell-Kontakte, zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und zur Reorganisation des Zytoskeletts. Die EMT ist wie die Metastasierung bzw. Invasion charakterisiert durch den Verlust von endothelialen Junctionsproteinen, wie E-Cadherin, Claudin und Occludin, und die gesteigerte Expression von mesenchymalen Markern wie N-Cadherin, Vimentin und Fibronectin, sowie einer Reorganisation des Zytoskeletts. Die Gesamtheit dieser Prozesse führt zum Verlust der apikal-basalen Polarität und zum Erlangen einer spindelförmigen Morphologie (Martin et al. 2013).

Die von der EMT abgeleiteten, mesenchymalen, migratorischen Tumorzellen bilden Fernmetastasen, welche histopathologisch wieder dem epithelialen Primärtumor ähneln und nicht mehr den mesenchymalen Phänotyp haben, der zu den metastasierenden Zellen passt. Daher muss am Sekundärort die MET ablaufen, um die Metastase zu bilden (Kalluri und Weinberg 2009).

1.2.3 Zytoskelett und F-Aktin

Das Zytoskelett der Zelle spielt eine wichtige Rolle bei der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen. Wie bereits beschrieben, ist die Metastasierung eng verwandt mit der EMT und MET, und der Phänotypenwechsel zu einem mesenchymalen Phänotyp beinhaltet die Akquirierung von migratorischen Potentialen. Die Zellbewegung ist über die Entwicklung invasiver Strukturen wie Invadopodia, Lamellipodia und Filopodia möglich und die Entstehung dieser ist abhängig von der Reorganisation des Aktinzytoskeletts der Zelle. Das Aktin liegt in den Zellen in zwei verschiedenen Formen vor, in globulärem G-Aktin und fibrillärem F-Aktin. Das G-Aktin liegt als Monomer vor, während das F-Aktin eine lange polare Kette

von Polymeren ist, resultierend aus der G-Aktin-Polymerisation. Die Reorganisation des Zytoskeletts und die Transition zwischen den beiden Aktinformen spielt eine signifikante Rolle in wichtigen Prozessen der Zelle, wie der Zytokinese und der Zelldifferenzierung. Beide Aktinformen sind aber auch in pathologischen Abläufen, wie der Transformation von Zellen zu Krebszellen, wichtig. Die Aktinfilamentbildung und der Um- und Abbau dieser, wird durch die *actin-binding proteins* (ABP) kontrolliert. Diese können die Dynamik der Polymerisation beeinflussen, dies gelingt z. B. durch die Stabilisierung des Aktinnetzwerkes oder die Bildung neuer freier Enden als Polymerisationsstellen. Die ABP sind durch intrazelluläre Signalkaskaden streng kontrolliert. Hier sind die Rho-GTPasen die Hauptregulatoren der Aktindynamik und des Aktinumbaus bei der EMT. Cofilin ist ein ABP, welches die Aktinfilamente depolymerisiert und so neue freie Enden bzw. Polymerisationsstellen schafft. Es wird über LIMK reguliert, welches die Aktin-bindende Fähigkeit des Cofilins blockiert und so das Zytoskelett stabilisiert (Izdebska et al. 2018).

1.3 Yes-assoziiertes Protein (YAP)

Das Yes-assoziierte Protein (YAP) ist ein translationaler Ko-Aktivator und wurde erstmals von Sudol (1994) beschrieben. YAP ist wichtig für die Koordination von Zellproliferation und Zelltod und sorgt so für die passende Organgröße während der Embryogenese (Dong et al. 2007).

YAP bewegt sich zwischen Zytoplasma und Nucleus. Hier fördert es die Zellproliferation und das Organwachstum. Es spielt sowohl in der frühen Embryonalentwicklung als auch in adulten Organen eine wichtige Rolle bei Entwicklung, Wachstum und Regeneration von Gewebe. Eine Hemmung von YAP verhindert die Zellproliferation und fördert die Differenzierung der Zellen für eine adäquate Organgröße. Eine zu geringe Expression von YAP kann zu Entwicklungsdefekten, Gewebeatrophie und einer gestörten Gewebereparatur führen. Demgegenüber fördert eine zu hohe YAP-Expression das Überwachstum von Gewebe und die Tumorformation (Warren et al. 2018). YAP wird durch den Hippo-Signalweg negativ reguliert (Dong et al. 2007).

1.3.1 Der Hippo-Signalweg

Die Koordination von Zellproliferation und Zelltod, in embryonalen sowie adulten Zellen, ist von großer Bedeutung. Der Hippo-Signalweg reguliert die Organgröße und erhält die Gewebestabilität über die Überwachung von Zellproliferation und Apoptose (Fu et al. 2017). Mutationen im Hippo-Signalweg und veränderte Expression von dessen Komponenten, fördern die Migration, Invasion, Malignität und die Chemotherapie-Resistenz (Wei et al. 2018).

Die Erforschung des Hippo-Signalweges begann 1994 mit der Entdeckung des Wts Gens in der *Drosophila* und kurz darauf mit der Entdeckung des Wts Genhomologs LATS1/2 im Menschen (Wei et al. 2018). Die Hauptkomponenten des Hippo-Signalweges sind MST1/2, SAV1/2, LATS1/2 und Mob1. MST1/2 phosphoryliert LATS1/2 und bildet einen LATS1/2-MST1/2-Komplex (dieser Prozess wird durch SAV1 und Mob1 unterstützt) (Harvey und Tapon 2007). Das aktivierte LATS1/2 phosphoryliert dann YAP und TAZ (*transcription-co-activator-with-a-PDZ-binding-motif*), welche durch die Phosphorylierung im Zytoplasma zurückgehalten und degradiert werden und dadurch inaktiviert werden. Über die Inaktivierung von YAP kommt es zur Hemmung der Zellproliferation. Wenn der Hippo-Signalweg nicht aktiv ist und YAP/TAZ nicht phosphoryliert werden, wandern sie in den Nucleus. Im Nucleus üben sie dann ihre Onkogen-Funktionen durch Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren der TEAD (*TEA-domain*) Familie aus und fördern die Expression von Genen, die in der Zellproliferation und der EMT involviert sind (Wei et al. 2018). MST1/2 ist nicht der einzige Aktivator von LATS1/2. MAP4K1/2/3 und MAP4K4/6/7 arbeiten parallel zu MST1/2, um LATS1/2 zu aktivieren (Meng et al. 2015).

Der Hippo-Signalweg ist also ubiquitär in den Zellen vorhanden und seine Aktivität ist streng reguliert. Physiologisch spielt er eine zentrale Rolle, um die Balance zwischen Zellproliferation und Apoptose zu halten. Eine Dysregulation ist mit dem Auftreten und der Entwicklung von Tumoren, sowie der Karzinogenese assoziiert (Wei et al. 2018).

1.3.2 YAP in Krebszellen

Der Hippo-Signalweg und sein *downstream target* YAP sind potente Regulatoren der Organgröße und die Dysregulation kann zur Tumorgenese führen (Dong et al. 2007).

Die Expression und die nukleäre Lokalisation von YAP ist in vielen Karzinomarten stark gesteigert (Zhao et al. 2007). Im Nucleus fördert YAP über die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren, vor allem mit denen der *TEA domain*, unter anderem die Zellproliferation und die EMT (Zhao et al. 2008). Die Aktivierung von YAP bzw. TAZ fördert die Karzinombildung, die Tumorprogression und die Metastasierung von Karzinomen. YAP und TAZ regulieren Tumornischen, indem sie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion und die Produktion von sekretorischen Proteinen wie Amphiregulin, CYR61 und CTGF modulieren. Die induzierte Expression von YAP/TAZ kann die Transition von epithelialen Zellen zu metastatischen Zellen via EMT auslösen. Im Gegensatz dazu führt die Inaktivierung von YAP/TAZ in verschiedenen Krebsmodellen zur Umkehr von allgemeinen Malignomeigenschaften. Diese sind z. B. EMT, verstärkte Migration, Anoikis-Resistenz und verstärktes Metastasierungspotential (Warren et al. 2018). Lamar et al. (2012) haben gezeigt, dass eine gesteigerte YAP-Expression *in vivo* zu einem signifikant gesteigerten Tumorwachstum in verschiedenen Mammakarzinomzelllinien führt und im Mausmodell zu einer signifikant gesteigerten Anzahl und Größe der Metastasen. Die erhöhte Expression von YAP führte hier auch zu einer gesteigerten Invasion der Zellen im Mausmodell.

Shi et al. konnten zeigen, dass YAP in HCC-Zellen hochreguliert war und die Zellmigration gefördert hat. Eine Deletion von YAP führte zur Hemmung der Migration der Zellen. Über verschiedene Zwischenschritte führt die Hemmung von YAP zu einer Hemmung von Cofilin (Shi et al. 2017). Cofilin ist ein *actin-binding protein*, welches das Aktin des Zytoskeletts depolymerisiert und darüber unter anderem neue freie Enden für die Polymerisation und Depolymerisation schafft (Bravo-Cordero et al. 2013). Die Phosphorylierung bzw. die Hemmung von Cofilin durch YAP sorgt dafür, dass dieses keinen Einfluss mehr auf die F-Aktin-Polymerisation und die Lamellipodia-Formation nehmen konnte und so die Migration behindert wurde (Shi et al. 2017).

Der Hippo-Signalweg und YAP zeigen sich als vielversprechende Angriffspunkte für neue medikamentöse Therapien (Park und Guan 2013) mit den Hauptangriffspunkten der *upstream* Effektoren des Hippo-Signalweges und der YAP-TEAD Kaskade. Es gibt allerdings noch keine passenden zugelassenen Medikamente in der Krebstherapie.

Eine Entwicklung von neuen Medikamenten bzw. die Nutzung von schon zu anderen Zwecken zugelassenen Medikamenten für die YAP-Hemmung in Krebszellen ist ein vielversprechendes Ziel in der Behandlung von metastasierten Mammakarzinomen.

1.3.3 S100A4 und Cyr61

S100A4 (*S100 calcium binding protein A4*) und CYR61 (*cysteine-rich angiogenic inducer 61*) spielen eine wichtige Rolle in der EMT, der Invasion und der Metastasierung, indem sie die Zellmotilität fördern (Gründker et al. 2016).

CYR61 ist ein matrizelluläres Protein, welches eine Reihe von Abläufen in der Zelle beeinflusst z. B. die Adhäsion, die Migration und die Proliferation, aber auch die Differenzierung und die Apoptose. Darüber hinaus spielt es eine große Rolle im primären Tumorwachstum, der lokalen Invasion und der Tumorangiogenese. Eine gesteigerte Expression von CYR61 wird mit einer aggressiveren Tumorprogression assoziiert und eine Stilllegung von CYR61 hat zu einer signifikant verminderten Metastasierung geführt (Huang et al. 2017). Die Transkriptionsfaktoren der *TEAD* Familie regulieren die Expression einer Reihe von Proteinen, zu denen auch CYR61 gehört. YAP fungiert hier als translationaler Ko-Aktivator, welcher mit TEAD interagiert (Zhou et al. 2016)

S100A4 ist ein intrazellulär lokalisiertes Protein, welches zur Familie der *S100 calcium binding proteins* gehört. S100A4 bindet Calcium und ändert dadurch seine Konformation. Dadurch kann es mit seinen *downstream targets* interagieren und so weitere biochemische Reaktionen auslösen. Es hat also keine Enzymaktivität, sondern wirkt über eine Interaktion mit seinen Zielproteinen (Fei et al. 2017). Physiologisch reguliert es eine Reihe von zellulären Prozessen, wie die Differenzierung und die Progression des Zellzyklus. Es konnte gezeigt werden, dass S100A4 die Tumorzellmigration und die EMT fördert und dass eine reduzierte Expression von S100A4 zu einer verringerten Migration und Tumorzell-EMT führt (Stein et al. 2006).

Gründker et al. konnten zeigen, dass die Expression von S100A4 und CYR61 in der mesenchymal transformierten, aggressiven Mammakarzinomzelllinie MCF-7-EMT signifikant gesteigert war. Darüber hinaus war die Invasion gesteigert und die Behandlung der Zelllinien MCF-7-EMT und MDA-MB-231 mit Anti-S100A4-Antikörpern und Anti-CYR61-Antikörpern führte zu einer signifikant verminderten Invasion. Die Behandlung der Zellen mit GnRH-Agonisten bewirkte die signifikante Abnahme der Invasion und der Expression von S100A4 und CYR61 (Gründker et al. 2016). Zudem konnte gezeigt werden, dass CYR61 mit S100A4 interagiert und die Verminderung von CYR61 zu einer verminderten Expression von S100A4 führt (Hellinger et al. 2019).

Die genaue zelluläre Auswirkung von YAP auf S100A4 wurde bislang noch nicht weiter untersucht. Dies ist etwas, das in zukünftigen Experimenten untersucht werden muss.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Die Metastasierung verschlechtert, wie bereits beschrieben, die Prognose einer Krebserkrankung. Fernmetastasierte Karzinome sind zum Großteil nicht mehr heilbar. Zur Metastasierung gehören viele verschiedene einzelne Schritte und es gibt viele beeinflussende Faktoren, an denen angegriffen werden könnte. Bis heute gibt es keine effektive Therapie, die Metastasierung zu verhindern bzw. zu hemmen. Daher wäre die Möglichkeit der Hemmung der Metastasierung ein wichtiger therapeutischer Fortschritt.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass YAP in Krebszellen erhöht exprimiert ist und in vielen verschiedenen Schritten der Tumorentwicklung und Metastasierung eine Rolle spielt.

In dieser Arbeit soll die Rolle von YAP in den mesenchymal transformierten, aggressiven Mammakarzinomzellen näher untersucht werden.

Nach dem *knockdown* von YAP mittels Transfektion mit siRNA soll untersucht werden, wie sich die verminderte Expression von YAP auf die Invasivität der Zellen auswirkt. Als Modell dient hier ein Kokultur-System mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG-63. In vorherigen Experimenten konnte bereits durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass dieses Kokultur-System die Invasivität der Zellen stark steigert. Nun soll die Auswirkung der verminderten Expression von YAP auf die Invasion im oben genannten Kokultur-System untersucht werden.

Darüber hinaus soll der Einfluss der verminderten YAP-Expression auf die Fähigkeit zur Polymerisation von F-Aktin untersucht werden. Da das Zytoskelett eine wichtige Rolle bei der Metastasierung spielt, ist im Einfluss von YAP auf F-Aktin eine Möglichkeit zu sehen, wie YAP die Invasivität der Zellen beeinflussen könnte.

Des Weiteren soll die Auswirkung der verminderten YAP-Expression auf die Expression von S100A4 als ein *downstream target* von YAP untersucht werden. S100A4 spielt eine wichtige Rolle in der Tumorbildung und Metastasierung. Daher soll der Einfluss von einer verminderten YAP-Expression auf die S100A4-Expression untersucht werden.

Ziel dieser Arbeit ist es also, die Rolle von YAP auf die Invasivität der mesenchymal transformierten Mammakarzinomzellen zu untersuchen und dadurch die Auswirkungen von YAP in den Tumorzellen besser zu verstehen und mögliche neue Therapieansätze zu entdecken.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Folgende Geräte (Tabelle 1) wurden für die Experimente verwendet.

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage BP 161	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Arium Mini (Reinstwasseranlage)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Autoklav KSG 112	KSG Olching (KSG-Sterilisatoren, Olching), Olching, Deutschland
Bio Photometer 6131 (8,5 mm Lichtstrahlhöhe)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Biofuge pico	Heraeus, Hanau, Deutschland
Bunsenbrenner Flammy S	Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen, Deutschland
C-Digit Western Blot Scanner	Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA
CO ₂ -Inkubator SANYO (Modell MCO-18AC)	Sanyo Electric Co., Ltd., Osaka, Japan
Eismaschine (S.No. 083308)	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen, Deutschland
ErgoOne FAST Pipette Controller	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Olympus IX51 + Olympus U-RFL-T (Brenner)	Olympus, Shinjuku, Präfektur Tokio, Japan

Gerät	Hersteller
Flüssigstickstoffbehälter Arpege 140	Air Liquide, Paris, Frankreich
Kühl- und Gefrierschränke: <ul style="list-style-type: none"> - -80°C - -30°C - -25°C - Kühl-Gefrierkombi - Kühl-Gefrierkombi (8°C/-22°C) Kühlschrank	GFL, Burgwedel, Deutschland Liebherr, Biberach, Deutschland, Liebherr, Biberach, Deutschland Bosch, Stuttgart, Deutschland Liebherr, Biberach, Deutschland Liebherr, Biberach, Deutschland
Labofuge 400R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Li-COR Odyssey Sa Imaging Systems	Biosciences, Lincoln, USA
Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Minizentrifuge MCF-2360	LMS, Hongo, Tokyo, Japan
Multi-Detection Microplate Reader	BioTek, Winooski, USA
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipetman <ul style="list-style-type: none"> - 1000 µl - 200 µl - 100 µl - 20 µl 	Gilson, Middleton, Wisconsin, USA
qTower 2.2	Analytikjena, Jena, Deutschland
Reax top Schüttel- und Mischgerät	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Schüttelwasserbad 1083	GFL, Burgwedel, Deutschland
Sterilwerkbank	Clean Air Technik B.V., Woerden, Niederlande// Clean Air by Baker, Utrecht, Niederlande
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen, Deutschland
EcoVac Vakuumpumpe	Schuett biotec, Göttingen, Deutschland

Gerät	Hersteller
Vibrax Schüttelplatte	Serono, Genf, Schweiz

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Bemis (Neeah, Wisconsin, USA), Brand GmbH + Co. KG (Wertheim, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich), Kimberly-Clark Professional (Roswell, Georgia, USA), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Merck Millipore Ltd. (Burlington, Massachusetts, USA), Paul Hartmann AG (Heidenheim an der Brenz, Deutschland), Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland), STARLAB GmbH (Hamburg, Deutschland), Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) und Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, Deutschland) bezogen.

Die Materialien wurden vor jeder Benutzung gereinigt oder autoklaviert, falls es sich nicht um Sterilgut handelte.

2.1.3 Chemikalien

Die für die Experimente verwendeten Chemikalien (Tabelle 2) wurden von den unten aufgeführten Firmen bezogen.

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
alamarBlue	BioRad, Puchheim, Deutschland
Bio-Rad Protein Assay	BIO-RAD, München, Deutschland
BSA	New England Biolabs, Ipswich (USA)
DAPI	Novus Biologicals, Littleton (USA)
ddH ₂ O (aus Reinstwasseranlage)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

Chemikalien	Hersteller
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	USB, Cleveland (USA)
Ethanol (EtOH)	Th. Geyer Ingredients, Höxter, Deutschland
Formaldehyd (3,7%)	Sigma, Steinheim, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri (USA)
Methanol (MeOH)	Th. Geyer Ingredients, Höxter, Deutschland
Phalloidin-TRITC	Sigma, Steinheim, Deutschland
Poly-D-Lysin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri (USA)

2.1.4 Puffer und Lösungen

Die Komponenten, Hersteller und Zusammensetzungen der, in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen, sind in der Tabelle 3 aufgeführt.

Die verwendeten Inhibitoren sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 3: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Komponenten/ Hersteller/ Zusammensetzung
Blocking Solution	1X TBS, 0,1% Tween-20, 5% Milchpulver
CellLytic™ Buffer	Sigma, St. Louis (USA)
Charcoal-stripped fetale calf serum	Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
DPBS w/o Calcium, w/o Magnesium	Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

Puffer und Lösungen	Komponenten/ Hersteller/ Zusammensetzung
FBS superior (fetale bovine serum)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Fluoreszenzfärbelösung	(DPBS, 2% BSA, 0,25% Triton X-100)
Glutamin (L-Alanyl-L-Glutamine)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Hämalaunlösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Holo-Transferrin (t0665), gelöst in PBS (1mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Insuman Rapid: Insulin human (40 I.E./ml)	Sanofi, Paris, Frankreich
Laufpuffer	100 ml 5x Elpho-Puffer + 400 ml H ₂ O + 5 ml 10% SDS
Puffer für Polyacrylamid-Gele:	
Lösung B	Tris, pH 8,8
Lösung C	10 % SDS
Lösung D	Tris, pH 6,8
Lyse-Puffer	0,1% Triton X-100 in PBS + Proteasehemmermix + 37 mg/l Na-Orthoyanate
Lysepuffer	10 ml Cell-Lytic Lysis Reagenz (Sigma) + 0,1% Phosphatase-Inhibitor, 0,1% Protease-Inhibitor
Penicillin-Streptomycin	Gibco Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Prosieye 50 Gel Solution 50% Acrylamid (Lösung A)	Lonza, Rockland (USA)
Red-Mix/Laemmli (2x)	5 ml Ampuwa + 5 ml LDS Sample Buffer (Nu Page) + 1 ml Sample Reducing Agent (Nu Page)

Puffer und Lösungen	Komponenten/ Hersteller/ Zusammensetzung
SDS Elektrophorese Puffer	100 ml (5x Elpho-Puffer) + 400 ml ddH ₂ O + 5 ml SDS 10% (Lösung C)
TBS	30 g Tris Base + 80 g NaCl + 2 g KCl ad 1000 ml (pH 7,6)
TBST	0,1% Tween in TBS
Transfektionsreagenz (sc-29528)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA
Transferpuffer	3,03 g Tris + 14,41 g Glycin + 20% Methanol ad 1000 ml H ₂ O (pH 8,3)
Trypsin-EDTA	c-c-pro GmbH, Oberdorla, Deutschland

Tabelle 4: Verwendete Inhibitoren

Inhibitoren	Hersteller
Protease-Inhibitor	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Phosphatase-Inhibitor	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

2.1.5 Kultur-, Einfrier- und Versuchsmedien

Für die Kultivierung der Mammakarzinomzellen, wurde MEM-Earl (Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen) mit stabilem Glutamin und Phenolrot (Referenz L0416-500) von Biowest (Nuaille, Frankreich) verwendet.

Auch das Einfriermedium wurde durch Verwendung des oben genannten, fertig bezogenen Mediums hergestellt.

Für die Kultivierung der Osteosarkomzellen (Kokulturzellen) wurde DMEM (Gibco Dulbecco's Modified Eagles Medium) mit Phenolrot, L-Glutamin und hoher Glucosekonzentration (Referenznummer 41965-039) von Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) hergestellt.

Folgende Zusätze (Tabelle 5) wurden den Medien beigelegt:

Tabelle 5: Verwendete Kulturmedien, Funktion und Zusätze

Funktion	Nährmedium	Nährmedium Kokultur	Einfriermedium
Zelllinie	MDA-MB-231, MCF-7-EMT	MG-63	MDA-MB-231, MCF-7-EMT
Medium	MEM-Earl w Phenolrot	DMEM w Phenolrot w L-Glutamin	MEM-Earl w Phenolrot
Zusätze	10 % FCS	10 % FCS	75% Nährmedium mit Zusätzen
	1% P/S	1 % P/S	20% FCS
	0,1 % Transferrin	0,1 % Transferrin	5% DMSO (Dimethylsulfoxid)
	26 IU Insulin	26 IU Insulin	

2.1.6 Zelllinien

Folgende Zelllinien (Tabelle 6) wurden für die Arbeit von der *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA (USA)) verwendet. Die Mammakarzinomzelllinien (MDA-MB-231 und MCF-7-EMT) wurden für die Experimente genutzt.

Die Osteosarkomzelllinie MG-63 wurde bei einem Versuch als Kokultur-Zelllinie genutzt.

Tabelle 6: Verwendete Zelllinien, nach Herkunft und Histologie

Zelllinie	Herkunft	Histologie	Referenz
MDA-MB-231	Pleuraerguss	Adenokarzinom, Mamma	Cailleau et al., (1978), ATCC
MCF-7-EMT	Pleuraerguss	Adenokarzinom, Mamma	Ziegler et al., (2014), ATCC
MG-63	Primärtumor	Osteoblasten-ähnliches Osteosarkom	Billiau et al., (1977), ATCC

2.1.7 Kits und Assays

Für die Experimente dieser Arbeit wurden Kits und Assays verschiedener Hersteller verwendet (Tabelle 7).

Tabelle 7: Verwendete Kits und Assays

Kit oder Assay	Hersteller, Sitz
Fast Gene RNA Basic Kit 250 preps (Cat. No. FG-80250)	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland
RNase-Free DNase Set (Ref. 79254)	Qiagen GmbH, Venlo, Niederlande
QuantiNova™ Internal Control RNA and Assay (Mat. No. 1093674)	Qiagen GmbH, Venlo, Niederlande
QuantiNova™ Reverse Transcription Kit (Ref. 205413)	Qiagen GmbH, Venlo, Niederlande
QuantiNova™ SYBR® Green PCR Kit (Cat. No. 208056)	Qiagen GmbH, Venlo, Niederlande

2.1.8 Software

Für die Auswertung der Experimente sowie für die Verschriftlichung dieser Arbeit wurde folgende Software (Tabelle 8) verwendet.

Tabelle 8: Verwendete Software

Software	Hersteller
AxioVisio 3.1	Zeiss, Jena und Oberkochen, DE
GEN5 1.08	BioTek, Winooski, Vermont (USA)
GraphPad Prism 6.01	GraphPad Software, San Diego (USA)
ImageJ 1.50i und 1.52a	Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda (USA)
Image Studio 4.0	Li-Cor, Lincoln (USA)
Microsoft Office 16.12 für Mac	Microsoft, Redmond (USA)
qPCR soft 1.1	AnalytikJena, Jena
Zotero	Roy Rosenzweig Center for History and New Media der George Mason University, Washington DC (USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung und Passagieren der Zellen

Alle Arbeiten für die Zellkultur wurden unter einer Sterilwerkbank mit autoklaviertem oder gereinigtem Material durchgeführt.

Die Zellen wurden bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5% Kohlendioxid kultiviert.

Das Medium (Tabelle 5) wurde 2x pro Woche gewechselt. Bei einer Konfluenz von 70-80% wurden die Zellen passagiert bzw. für einen Versuch verwendet. Dafür wurde das Medium abgesaugt und die adhärennten Tumorzellen mit 5 ml DPBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin für 10 Min. im Brutschrank inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 7 ml Nährmedium aufgenommen und es wurden je nach angestrebter Verdünnung 1-5 ml zurück in die Zellkulturflaschen gegeben. Zum vorhandenen Volumen wurde die benötigte Menge Medium für ein Gesamtvolumen von 10 ml gegeben.

Die restliche Zellsuspension wurde für Versuche verwendet.

2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Durchführung der Versuche war die Bestimmung der Zellzahl nötig, um im zweiten Schritt eine etablierte Zellzahl (pro Zelllinie) aussäen zu können.

Dafür wurden die Zellen wie in 2.2.1.1 beschrieben gewaschen, trypsiniert und resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 10 µl Trypanblau (1:2-Verdünnung) in ein Reagiergefäß gegeben. Danach wurden 10 µl dieser Trypanblau-Zellsuspension zwischen Deckglas und Neubauer-Zählkammer gegeben.

Die Neubauer-Zählkammer besteht aus neun Quadraten à 1 mm² mit einer Tiefe von 0,1 mm. Dies entspricht einem Füllvolumen von 0,1 µl.

Es wurden vier große Eckquadrate ausgezählt und die Zellzahl pro ml ausgerechnet:

$$\text{Konzentration (Zellen/ml)} = \frac{\text{Zellzahl} \times 2}{4} \times 10^4$$

Die ausgerechnete Zellzahl wurde durch die gewünschte Zellzahl im Endvolumen geteilt, um den Verdünnungsfaktor zu errechnen.

Die gewünschte Menge an Endvolumen wurde durch den Verdünnungsfaktor geteilt.

Das Zellsuspensionsvolumen wurde von der gewünschten Menge an Endvolumen abgezogen, und das Differenzvolumen an Medium hinzugegeben.

2.2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Zur langfristigen Lagerung wurde das Zellpellet (zuvor behandelt wie in 2.2.1.1 beschrieben) in einer geeigneten Menge Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen aliquottiert. Die Zellen wurden für mindestens 24 Stunden bei -80°C langsam in Nalgene Mr. Frosty

Einfriergefäß (nach Angaben des Herstellers) eingefroren und anschließend zur weiteren Lagerung in $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ flüssigen Stickstoff überführt.

Für die wiederholte Kultivierung von kryokonservierten Zellen wurden diese in der Hand bzw. im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und tropfenweise in vorgelegtes Nährmedium gegeben und wie unter Kapitel 1.2.1.1 beschrieben kultiviert. Um das verbliebene DMSO von den Zellen zu entfernen, wurde das Medium am Folgetag erneuert.

2.2.1.4 Invasionsanalyse

2.2.1.4.1 Matrigelbeschichtung und Ansäen

Die hier genutzte Invasionsanalyse wurde nach einer Methode von Albini et al. (1987) und von Parish et al. (1992) durchgeführt. Die ursprüngliche Methode wurde durch Jiang et al. (1995) und von Alten et al. (2006) modifiziert. Die hier verwendete Boyden-Kammer wurde erstmals von Stephen Boyden (1962) beschrieben, allerdings wurde die Kammer in modifizierter Form nach Alten et al. (2006) verwendet. In der hier durchgeführten Invasionsanalyse wurde Matrigel als rekonstruierte Basalmembran verwendet. Diese Vorgehensweise geht auf Kleinman et al. (1986) und Terranova et al. (1986) zurück.

Die Mammakarzinomzellen wurden wie unter Kapitel 1.2.2.1.1 beschrieben angesät und mit siRNA transfiziert. Das Matrigel (Matrigel™ Basalmembranmatrix, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) wurde 1:2 mit phenolrot-freiem DMEM verdünnt; anschließend wurden $30\text{ }\mu\text{l}$ dieser Lösung auf die Inserts aufgetragen. Für jede Behandlungsgruppe wurden jeweils sechs Inserts vorbereitet. Nach der Beschichtung der Inserts wurden diese für ca. 60 Minuten im Inkubator (37°C , 5% CO_2) getrocknet.

Die transfizierten Mammakarzinomzellen, sowie die Osteosarkomzellen (MG-63) wurden wie unter Kapitel 1.2.1.2 beschrieben, trypsiniert und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in entsprechender Menge Kulturmedium resuspendiert und die Zellen wurden gezählt.

Die siRNA transfizierten Mammakarzinomzellen wurden in einer Konzentration von 25.000 Z/ml bzw. 10.000 Z/Well in $400\text{ }\mu\text{l}$ in die beschichteten Inserts angesät. Die Osteosarkomzellen wurden in einer Konzentration von 33.333 Z/ml (20.000 Z/Well in $600\text{ }\mu\text{l}$) in Kokulturmedium (Tabelle 9) in Wells einer 24-Well-Platte angesät.

Nach 24 Stunden wurden die Inserts in die Wells umgesetzt und die Zellen für 96h kokultiviert.

2.2.1.4.2 Färbung und Fixierung

Nach 96h in Kokultur wurden die Inserts aus der Well-Platte genommen und nach folgendem Schema gefärbt: 1. mit 400 μ l PBS für 5 min gewaschen, 2. mit 400 μ l dH₂O gespült, 3. mit 400 μ l 100%igem Methanol für 10 min fixiert, 4. mit 400 μ l dH₂O gespült, 5. mit 400 μ l Hämalaun für 5 min gefärbt (der basische Farbstoff Hämatoxylin bindet an die anionischen Nukleinsäuren im Nukleus (Welsch et al., 2014) und macht so die Zellen sichtbar für die Auswertung unter dem Mikroskop.), 6. mit 400 μ l dH₂O gespült, 7. mit 400 μ l Leitungswasser gebläut und 8. mit 400 μ l dH₂O gespült.

Die 24-Well-Platte wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, um eine Ungleichverteilung oder Kontamination der Kokultur ausschließen zu können.

Nach dem letzten Färbeschritt wurden die nicht invadierten Zellen von den Inserts abgenommen und die Inserts wurden auf einen Objektträger gesetzt, ausgestanzt und mit Aquatex eingedeckelt.

2.2.1.4.3 Analyse der invadierten Mammakarzinomzellen

Die Auswertung der Inserts erfolgte mittels Mikroskopie (AxioVert siehe Tabelle 1). Dafür wurde das Insert in vier Quadranten geteilt und von jedem Quadranten von der zellreichsten Stelle ein Ausschnitt abgebildet. Die Zellzahl je Ausschnitt (vier pro Insert) wurde mittels der „Multi-Point“-Funktion von ImageJ ausgezählt.

Aus den Zellzahlen der vier Quadranten wurde der Mittelwert gebildet. Die Mittelwerte der behandelten Gruppe wurden ins Verhältnis zum Gesamtmittelwert der Kontrollgruppe gesetzt. Die Ergebnisse wurden statistisch, mithilfe von GraphPad Prism und einem ungepaarten, zweiseitigen t-Test im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ausgewertet. Hierbei wurde ein p-Wert von 0.05 als signifikant gewertet.

2.2.1.5 Proliferationsanalyse

Die, wie unter Kapitel 1.2.2.1.1 beschrieben, transfizierten Mammakarzinomzellen wurden in einem Well einer 6-Well-Platte in 2 ml (25.000 Z/ml) Gesamtvolumen angesät. Nach 96h wurden die Zellen mit 3 ml DPBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin für 10 min inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml Medium wurden die Zellen für 5 min bei 1300 rcf zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und das Zellpellet in einer entsprechenden Menge Medium resuspendiert. Danach wurden die Zellen wie oben gezählt. Die ermittelte

Zellzahl der behandelten Gruppe (YAP-1 spezifische siRNA) wurde ins Verhältnis zur ermittelten Zellzahl der Kontrollgruppe (unspezifische siRNA Kontrolle) gesetzt. Die Ergebnisse wurden statistisch, mithilfe von GraphPad Prism und einem ungepaarten, zweiseitigen t-Test im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ausgewertet. Hierbei wurde ein p-Wert von 0.05 als signifikant gewertet.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 siRNA-*knockdown*

2.2.2.1.1 Ansäen der Zellen und Transfektion

Der, für die Experimente nötige *knockdown* von YAP-1, wurde mit einer siRNA-Transfektion durchgeführt. Diese Methode der transient verminderten Expression, funktioniert aufgrund der sogenannten RNA-Interferenz, welche erstmals durch Izant und Weintraub (1984) allgemein beschrieben wurde. Fire et al. (1991) beschrieb sie erstmals unter diesem Begriff.

Über die Verwendung von siRNA in Säugetierzellen wurde erstmalig durch Elbashir et al. publiziert (2001). Die hier verwendete Methode der Transfektion, wurde von Girgert et al. (2012) modifiziert.

Dafür wurde eine etablierte Zellzahl - 250.000 Z/ml (MDA-MB-231) bzw. 500.000 Z/ml (MCF-7-EMT) - in 2 ml P/S-freiem Medium (Tabelle 9) in 25 cm²-Flaschen angesät. Für die Transfektion wurden YAP-1 spezifische siRNA (sc-38637) und unspezifische siRNA-Kontrolle (sc-37007) sowie eine Fluorescein-Kontrolle (sc-36869) (Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas, USA)) in einer Konzentration von 10 µM in RNase-freiem Wasser gelöst.

Nach 24 Stunden wurden die Mammakarzinomzellen wie nachfolgend beschrieben transfiziert: 100 µl Transfektionsmedium (*Gibco Opti-MEM Reduced Serum Medium* (Referenz 31985-062), Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)) wurden mit 4 µl Transfektionsreagenz (sc-29528) versetzt. In einem zweiten Reagiergefäß wurden 100 µl Transfektionsmedium (sc-36868) mit 4 µl Kontroll-siRNA (sc-37007) bzw. YAP-1-siRNA (sc-38637) versetzt. Die 104 µl Transfektionsreagenz-Medium-Mischung wurden der siRNA-Transfektionsmedium-Mischung zugegeben und bei Raumtemperatur für 45 min im Dunkeln inkubiert.

Die angesäten Mammakarzinomzellen wurden für 10 min bei 37°C und 5% CO₂ mit 2 ml Transfektionsmedium gewaschen.

Der Transfektionsmischung wurden 800 µl des Transfektionsmediums hinzugefügt und die Mammakarzinomzellen für 6 h bei 37°C und 5% CO₂ damit inkubiert. Anschließend wurde je 1 ml des doppelkonzentrierten Mediums (Tabelle 9) hinzugegeben. Nach weiteren 18h wurde das Medium auf normales Nährmedium (Tabelle 5) gewechselt.

Tabelle 9: Verwendete Versuchsmedien, Funktionen und Zusätze

	P/S-freies Medium	Doppelt- konzentriertes Medium	FCS-freies Medium	Kokulturm- edium
Funk- tion	Versuchsmedium (siRNA <i>knock- down</i>)	Versuchsmedium (siRNA <i>knock- down</i>)	Versuchsm- edium (F-Aktin)	Versuchsmedium (Invasionsassay)
Zelllinie	MDA-MB-231, MCF-7-EMT	MDA-MB-231, MCF-7-EMT	MDA-MB-231, MCF-7-EMT	MG-63, MDA-MB-231, MCF-7-EMT
Me- dium	MEM w Phenol- rot	MEM w Phenol- rot	MEM w Phe- nolrot	DMEM w/o Phe- nolrot
Zusätze	10 % P/S	20 % FCS	-	10 % cs-FCS
	-	2 % P/S	1 % P/S	1 % P/S
	0,1 % Transferrin	0,1 % Transferrin	0,1 % Transfer- rin	1 % L-Gln
	26 IU Insulin	26 IU Insulin	26 IU Insulin	

2.2.2.1.2 Kontrolle des *knockdown*

In der ersten Runde des *knockdown* für die Zelllinie MDA-MB-231 wurde zusätzlich zu den zwei Behandlungsgruppen (YAP und Kontrolle) noch eine weitere Probe generiert, welche mit einer Fluorescein-Kontrolle (sc-36869) (von Santa-Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas, USA)) transfiziert wurde. Dies machte es möglich, die Aufnahme der siRNA in die Zellen visuell darzustellen. Dafür wurden die Zellen wie oben beschrieben transfiziert und

zu den verschiedenen Zeitpunkten (t_0 , t_{48} und t_{120}) unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die fotografische Dokumentation des Ergebnisses erfolgte mittels Axiovisio.

2.2.2.2 Zelllyse, RNA-Isolation und Quantifizierung

2.2.2.2.1 Zelllyse

Für die Zelllyse wurde das FastGene® RNA Basic Kit (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland) wie vom Hersteller angegeben genutzt.

Die Zellen wurden wie unter Kapitel 1.2.2.1.1 beschrieben transient transfiziert und 120 h nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen mittels 600 μ l Lysepuffer (FastGene RNA Basic Kit) versetzt mit 10 μ l pro ml Mercaptoethanol unter Schütteln für 10 min bei RT lysiert. Das Lysat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.2.2.2 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem FastGene RNA Basic Kit (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Die Funktionsweise der Methode basiert auf einer Auftrennung von RNA, DNA und Proteinen mittels Silikatmembran in einer speziellen Trennsäule.

Die eingefrorenen Proben wurden langsam auf Eis aufgetaut. Das Lysat wurde im Verhältnis 1:2 mit 70 % igem Ethanol (600 μ l) gemischt. Die Probe wurde auf die Trennsäule, welche in einem Abfallröhrchen stand, aufgetragen und für 1 min bei $>8000g$ zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit dem restlichen Volumen des Lysat-Ethanol-Gemisches wiederholt. Im Anschluss folgten drei Schritte zum DNase Verdau mit 1. 350 μ l RW1 Puffer und einer Zentrifugation bei $>8000g$ für 30 s (danach Umsetzen der Trennsäule in ein neues Röhrchen), 2. 80 μ l DNase-Lösung (10 μ l DNase 1 mit 70 μ l RDD Puffer) mit einer Inkubationszeit von 15 min bei RT und 3. 350 μ l RW1 Puffer und einer Zentrifugation bei $>8000g$ für 15 s (danach Umsetzen der Trennsäule in ein neues Röhrchen).

Nach dem DNase Verdau folgte ein Waschschrift mit 700 μ l RW2-Puffer und einer Zentrifugation bei $>8000g$ für 30 s und nach dem Umsetzen der Trennsäule in ein neues Röhrchen wurde die Trennsäule für 1 min bei $>8000g$ trocken zentrifugiert. Zuletzt wurden 50 μ l RNase-freies Wasser (RE) direkt auf die Säule gegeben; nach der Zentrifugation für 1 min

bei >8000g wurde die Trennsäule verworfen und die Proben (Überstand im Röhrchen) wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.2.2.2.3 Quantifizierung der RNA

Die RNA-Konzentration der Probe wurde photometrisch mit dem BioPhotometer der Firma Eppendorf bestimmt. Die isolierte RNA wurde 1:10 in RNase-freiem Wasser verdünnt. Die Konzentration, sowie die Quotienten A260/280 (Reinheit der Probe) und A260/230 (Verunreinigung) wurden bestimmt.

2.2.2.3 Reverse Transkription

Für die quantitative Analyse der mRNA-Expression von Zielgenen wurde die zuvor, wie unter Kapitel 1.2.2.2.2 beschriebene, isolierte RNA in komplementäre DNA-Stränge (cDNA: complementary desoxyribonucleid acid) umgeschrieben. Hierfür wurde das *QuantiNova™ Reverse Transcription Kit* von Qiagen (Qiagen GmbH, Venlo, Niederlande) unter Anwendung der Herstellerangaben eingesetzt. Der hier verwendete Prozess der reversen Transkriptase mittels RNA-abhängiger DNA-Polymerase wurde von Baltimore (1970) und Temin und Mizutani (1970) entdeckt.

Für die reverse Transkription wurden 2 µg RNA in RNase-freiem Wasser in einem Gesamtvolumen von 13 µl verdünnt. Zur Entfernung der genomischen DNA erfolgte die Zugabe von 2 µl gDNA Removal Mix (zur Entfernung der genomischen DNA) hinzugegeben. Die Proben wurden anschließend im Thermocycler für 2 min auf 45°C erhitzt. Dann wurden der Probe 5 µl Master Mix (1ul RT Enzyme + 4 µl RT Mix) hinzugegeben. Im Thermocycler wurden die Proben zunächst für 3 min auf 25 °C (Primer Annealing), anschließend für 10 min auf 45°C (Reverse Transkription) und zuletzt für 5 min auf 85°C, erhitzt (Inaktivierung reverse Transkription).

2.2.2.4 Polymerasekettenreaktion

Für die PCR wurde das QuantiNova SybrGreen PCR Kit und QuantiTect Primer Assay QNIC von Qiagen verwendet.

Die qPCR basiert auf der klassischen Polymerasekettenreaktion von Mullis et al. (Mullis et al. 1986). Bei der qPCR werden spezifische DNA-Abschnitte, einer geringen Ausgangsmenge von DNA, vervielfältigt und quantifiziert.

Die Polymerasekettenreaktion dient der Vervielfältigung spezifischer DNA-Fragmente. Ein DNA-Molekül wird millionenfach kopiert und mittels einer Fluoreszenz-Markierung wird die Konzentration gemessen (Intensität der Fluoreszenz).

Die Proben hatten nach der reversen Transkription (Kapitel 1.2.2.3) eine RNA/cDNA Konzentration von 0,1 µg/µl. Für eine RNA/cDNA Konzentration von 0,0125 µg/µl (1:8 Verdünnung) wurden 20 µl cDNA mit 138,4 µl H₂O und 1,6 µl QuantiNova Yellow Template Diluting Buffer gemischt. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Zusätzlich wurde in jedem Versuch der reversen Transkription eine RNA Probe mit einer internen Probe versehen (*QuantiNova™ Internal Control RNA and Assay*, Qiagen GmbH, Venlo, Niederlande). Zudem wurde eine Probe nur mit dieser internen Kontrolle, gelöst in RNase-freiem Wasser, revers transkribiert. Dies dient der internen Kontrolle, da sich mit der QN IC RNA eine mögliche Inhibition der reversen Transkriptase sichtbar machen lässt. Dafür wurde eine Probe aus 1 µl QN IC RNA und 12 µl RNase-freiem Wasser und eine weitere Probe aus 1 µl QN IC RNA, RNase-freiem Wasser und 2 µg einer hoch konzentrierten RNA-Probe ebenfalls in cDNA transkribiert. Durch die Analyse der detektierten Ct-Werte wurde eine mögliche Inhibition der reversen Transkriptase (Unterschied > 2 Zyklen) beurteilt.

Zunächst wurde die Reaktionslösung, bestehend aus *MasterMix*, *forward primer*, *reverse primer*, H₂O und *template RNA* (siehe Pipettierschema Tabelle 11), für 120s auf 95°C erhitzt, um die Polymerase zu aktivieren. Außerdem wurden so die DNA-Moleküle aufgebrochen und liegen so für die weitere Synthese frei (Denaturierung). Bei 60°C erfolgt dann das *Annealing* der spezifischen Primer (siehe Tabelle 10), sowie die Elongation des komplementären Stranges mit der DNA-Polymerase in 5'-3'-Richtung. Dieser Vorgang wurde für 40 Zyklen wiederholt.

Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide

	YAP	GAPDH
Forward 5'-3'	TCCCAGATGAACGTCACAGC	GAAGGTCGGAGTCAACGGAT
Reverse 3'-5'	TCATGGCAAAAACGAGGGTCA	TGGAATTTGCCATGGGTGGA
Denaturierung	5 s, 95 °C	5 s, 95 °C
Annealing & Elongation	15 s, 60 °C	15 s, 60 °C
Tm	60	60
Exonspannend	Ja	Ja
Länge des Amplifikates in bp	187	159

Tabelle 11: Verwendete Reagenzien für die qPCR (Pipettierschema)

Reagenz	finale Konz.	QNIC Kontrolle 7x(µl)	Probe 1x (µl)
2xQuantiNova SYBR Green PCR Master Mix	1x	70	10
20 pmol/µl (µM) forward primer	0,7 µM	-	0,7
20 pmol/µl (µM) reverse primer	0,7 µM	-	0,7
QNICPrimer (10x)	1x	14	-
H2O ad 16 µl	-	28	4,6
Gesamt		112	16
Template RNA	<100ng	14	4

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

Die Proteinexpression von YAP-1, S100A4 und GAPDH nach transientser siRNA Transfektion wurde mittels Western-Blot quantifiziert.

2.2.3.1 Zellkultivierung zur Proteinisolierung

Die Zellen wurden, wie in Kapitel 2.2.2.1.1 beschrieben, angesät und transfiziert. 120 h nach erfolgter Transfektion wurden die Proteine isoliert.

2.2.3.2 Proteinisolierung und -vorbereitung

Für die Proteinisolierung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit 2 ml PBS-EDTA (200 mg Tetrasulfonium in 100 ml PBS) für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die adhärenen Zellen mit dem Zellscaber abgelöst, die Zellkulturflasche mit 3 ml DPBS gespült und die Zellsuspension für 5 min bei 1300 rcf pelettiert. Das Zellpelett wurde in 50 μ l Lysepuffer, bestehend aus 10 ml Cellyse M (Sigma) supplementiert mit 0,01% Protease Inhibitor (Sigma) und 0,01%/100 μ l Phosphatase Inhibitor (Sigma), resuspendiert. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.3.3 Proteinbestimmung

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford verwendet. Als Standard wurde BSA (bovines Serumalbumin) in verschiedenen Konzentrationen, parallel zu den Proben mit unbekannter Konzentration, analysiert, um deren Konzentration anhand einer linearen Regression der Absorption, bei bekannten Konzentrationen zu errechnen. Zu Beginn wurden 5 μ l Proteinlösung mit 45 μ l Ampuwa versetzt (1:10 Verdünnung). Der Rest der Proteinlösung wurde 1:2 mit Lämmli-Puffer, bestehend aus 5ml Ampuwa, 5 ml LDS Sample Buffer (ThermoFisher) und 1ml NuPage Sample Reducing Agent (ThermoFisher), versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Jeweils 10 μ l der Proteinverdünnung, sowie der Standards, wurden in Doppelbestimmung auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Pro Well wurden anschließend 200 μ l BioRad-Lösung hinzugegeben (1:5 Verdünnung in AMPUWA) und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte mittels Multi-Detektions-Reader bei einer Absorption von 595 nm.

2.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-PAGE (*Sodium-dodecyl-sulfate*-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) werden Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Dafür werden die Proteine in ein pH-neutrales Sammelgel gegeben und durch Anlegung des elektrischen Feldes in einem Trenngel, entsprechend ihres Molekulargewichtes, separiert.

Die BioRad-Apparatur wurde entsprechend der Herstelleranweisungen verwendet. Sie wurde mit 500 ml Elektrophorese-Puffer gefüllt. Das Trenngel und das Sammelgel wurden wie in Tabelle 12 aufgeführt gegossen. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C im Schüttler denaturiert. Danach wurden 40 µg der Proteinproben in die Geltaschen pipettiert. Für die Proteinidentifizierung nach Molekulargewicht wurden 7 µl des Molekularmassemarkers (PeqLab) in eine Geltasche aufgetragen. Für 30 min wurde die Elektrophorese dann bei 80 V durchgeführt, anschließend für weitere 60 min bei 100 V.

Tabelle 12: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE-Gelelektrophorese

Material	Sammelgel 5%	Trenngel 7,5 %
Lösung A (50% Acrylamid)	0,75 ml	2,3 ml
Lösung B	-	2,8 ml
Lösung C	75 µl	110 µl
Lösung D	1,9 ml	-
dd H ₂ O	5 ml	5,7 ml
TEMED	22,5 µl	20 µl
APS 10%	37 µl	37 µl

2.2.3.5 Western Blot

Das Western-Blot-Verfahren dient der Detektierung von spezifischen Proteinen und wurde von Burnette (1981) entwickelt. Die Proteine wurden, nach der Auftrennung ihrer Größe nach durch die SDS-PAGE-Gelelektrophorese, von dem Trenngel auf eine PVDF-Membran (Immobilon Pore 0,45 µm, Millipore, USA) übertragen. Zur Aktivierung wurde die PVDF-Membran für 60 sec in Methanol geschwenkt, danach in ddH₂O gewaschen und im Verlauf für 5 min in TBST geschwenkt. Die, für den Aufbau nötigen, Filterpapiere und Schwämme wurden zuvor in Transferpuffer geschwenkt. Die Apparatur wurde in folgender

Reihenfolge zusammengebaut: 1 Schaumstoffschwamm, 3 Lagen Filterpapier, Trenngel, PVDF-Membran, 3 Lagen Filterpapier und 1 Schaumstoffschwamm. Die Blotdauer betrug 60 min, bei einer angelegten Spannung von 100 V.

2.2.3.6 Detektion, Visualisierung und Auswertung

Nachdem die Proteine auf die Membran transferiert waren, wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Membran durch eine 1-stündige Inkubation mit 5%igem Milchpulver in TBST bei RT unter Schütteln blockiert. Danach wurde die Membran dreifach mit TBST für jeweils 5 min gewaschen und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem Primär-Antikörper (siehe Tabelle 13) inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal mit TBST (für 10 min) gewaschen und anschließend für 60 min mit einem HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörper (siehe Tabelle 14) inkubiert. Die Membran wurde zweifach mit TBST gewaschen. Die Antikörperbindung wurde mittels Chemilumineszenz-Lösung detektiert (Westar Supernova, Cyanagen, Bologna, Italien). Die Intensität der detektierten Banden wurde mit Hilfe vom Image Studio quantifiziert und auf das Verhältnis der Intensität der detektierten Bande des Referenzproteins GAPDH, normalisiert.

Für eine weitere Proteindetektion wurden die gebundenen Antikörper durch das Strippen der Membran gelöst. Dafür wurde die Membran für 2 min in TBS/Tween 0,1% gewaschen, für 15 Sekunden in 25 ml Stripping Puffer (Interchim, Montluçon, Frankreich) gegeben und danach dreimal für 5 min in TBS/Tween gewaschen. Nach einer erneuten Blockierung der unspezifischen Antikörperbindestellen, mittels 5%iger Milchpulverlösung in TBST, wurde die Membran wiederholt über Nacht mit einem Primärantikörper inkubiert.

Tabelle 13: Verwendete Primärantikörper für das Western-Blot-Verfahren

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung	Hersteller
Anti-YAP1	<i>mouse</i>	1:250	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Anti-S100A4	<i>rabbit</i>	1:500	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Anti-GAPDH	<i>rabbit</i>	1:1000	CST, Cambridge, Großbritannien

Tabelle 14: Verwendete Sekundärantikörper für das Western-Blot-Verfahren

Antikörper	Beschreibung	Herkunft/Verdünnung	Hersteller
<i>Anti-Rabbit</i>	ECL Anti-rabbit IgG HRP	Donkey; 1:20.000 – 1:50.000	GE Healthcare, Freiburg
<i>Anti-Mouse</i>	ECL Anti-mouse IgG HRP	Sheep; 1:20.000 – 1:50.000	GE Healthcare, Freiburg

2.2.4 Fluoreszenz-Methoden

Im Rahmen der im Folgenden beschriebenen Methode, wurde die Fähigkeit der Zellen zur F-Aktin-Polymerisation nach Aktivierung mittels FBS, überprüft.

2.2.4.1 Zellkultivierung zur F-Aktin-Faser-Quantifizierung

Für die Quantifizierung der gebildeten F-Aktin-Fasern nach transienter siRNA Transfektion, (wie unter Kapitel 1.2.2.1.1 beschrieben) wurden die Mammakarzinomzellen in einer Konzentration von 40.000 Z/ml (20.000 Z/Well) auf mit Poly-D-Lysin (0.1mg/ml in DPBS) beschichteten Deckgläschen, oder in einem Well einer 24-Well Platte in Kulturmedium, angesät. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für weitere 24 h in FBS-freiem Medium kultiviert. Zur Aktivierung der F-Aktin-Polymerisation, wurden die Mammakarzinomzellen 5 min mit 10%igem FBS-Kulturmedium inkubiert (500 µl normales Medium pro Well).

Zur Analyse und Quantifizierung der F-Aktin-Fasern, wurden die Zellen nach der Stimulierung mit F-Aktin für 30 min mit 3,7%igem Formaldehyd bei Raumtemperatur fixiert (500 µl/Well). Zum Waschen und Permeabilisieren der fixierten Mammakarzinomzellen, wurden zweimalig 500 µL Fluoreszenzfärbelösung (siehe Tabelle 3) in die Wells gegeben. Daraufhin wurden die Zellen für 1h im Dunkeln bei RT mit Phalloidin-TRITC in Fluoreszenzfärbelösung (2 µg/ml entspricht 1 µl/W) inkubiert. Es folgten zwei Waschstritte mit

500 $\mu\text{l}/\text{W}$ Fluoreszenzfärbelösung, sowie zwei Waschschrte mit 500 $\mu\text{l}/\text{W}$ DPBS. Anschließend folgte die TRITC-Extraktion mit 500 $\mu\text{l}/\text{W}$ Methanol für 1 h im Dunkeln bei RT und die Fluoreszenzmessung (Extinktion max. 557 nm / Emission max. 576 nm) mittels BiometraBioTEK. Um die Eigenfluoreszenz von Methanol zu detektieren wurden zwei Wells mit Methanol gefüllt und deren Fluoreszenz gemessen. Die Fluoreszenz der Mammakarzinomzellen behandelt mit YAP-1 spezifischer siRNA wurde auf die Fluoreszenz der Mammakarzinomzellen mit unspezifischer siRNA normalisiert.

Die angesäten Mammakarzinomzellen auf mit Poly-D-Lysin beschichteten Objektträgern wurden nach erfolgter FBS Stimulierung, wie bereits beschrieben fixiert, permeabilisiert und gefärbt. Die Mammakarzinomzellen wurden für 1 h im Dunkeln mit Phalloidin-TRITC in Fluoreszenzfärbelösung (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 $\mu\text{l}/\text{W}$), sowie mit DAPI in Fluoreszenzfärbelösung (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0,5 $\mu\text{l}/\text{W}$) inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit 500 $\mu\text{l}/\text{W}$ Fluoreszenzfärbelösung, sowie zwei Waschschrte mit 500 $\mu\text{l}/\text{W}$ DPBS. Anschließend wurden die Deckgläschen auf einem Objektträger mit ProLong Diamond eingedeckelt, für mindestens 24 h bei 4°C im Dunkeln getrocknet und unter dem Fluoreszenz-Mikroskop analysiert.

2.2.5 Statistische Analysen

Bei allen Versuchen wurden mindestens drei biologische und technische Replikate durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel und GraphPad Prism. Es wurde ein ungepaarter, zweiseitiger T-test der behandelten Gruppe bezogen, auf die entsprechende Kontrolle angewandt. Ein P-Wert <0.05 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von YAP1 auf molekularbiologischer und proteinbiochemischer Ebene nach *knockdown* von YAP1 mittels siRNA-Transfektion

YAP1 ist ein transkriptionaler Ko-Aktivator, welcher sowohl in der frühen embryonalen Entwicklung als auch in adulten Organen eine wichtige Rolle in Entwicklung, Wachstum und Regeneration spielt. Eine unangemessene YAP1-Aktivität zeigt sich in fast allen Krebs-assoziierten Prozessen (Warren et al. 2018). Eine gesteigerte YAP1-Aktivität zeigte eine metastasierungsfördernde Wirkung im Brustkrebs (Lamar et al. 2012). Zahlreiche Studien beschreiben, dass YAP-1 diverse Prozesse der Metastasierungskaskade, wie zum Beispiel die EMT, die Invasion oder auch die Intra- und Extravasation, beeinflusst (Warren et al. 2018). Die genaue zelluläre Wirkung einer veränderten YAP1-Aktivität in mesenchymal transformierten und aggressiven Mammakarzinomzellen ist aber bis jetzt noch nicht beschrieben worden. Aus diesem Grund haben wir den Einfluss einer verminderten YAP-Expression auf die Invasivität von mesenchymal transformierten und aggressiven Mammakarzinomzellen untersucht.

Vor der Durchführung der Experimente zur Auswirkung des *knockdown* von YAP1 auf die Invasivität der Tumorzellen, wurde der Nachweis des *knockdown* durch die siRNA-Transfektion auf RNA- und Proteinebene erbracht.

Dafür wurden die Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MCF-7-EMT nach der transienten siRNA-Transfektion auf molekularbiologischer und proteinbiochemischer Ebene auf die Expression von YAP1-mRNA bzw. YAP1 untersucht und mit einer Kontrollgruppe verglichen, welche mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurde. Bei beiden Methoden diente GAPDH als Referenzgen zur Normierung.

Mittels quantitativer real-time PCR (siehe Kapitel 2.2.2) konnte gezeigt werden, dass YAP1, nach transienter siRNA-Transfektion in MDA-MB-231 (0.3 ± 0.06 SEM vs. siRNA-Kontrolle; $p < 0.001$; $n = 3$) und MCF-7-EMT (0.61 ± 0.09 SEM vs. siRNA-Kontrolle; $p < 0.01$; $n = 5$) ($K = 1$) signifikant vermindert exprimiert wird (siehe Abbildung 1B und 1D)

Mittels Western Blot (siehe Kapitel 2.2.3) wurde nachgewiesen, dass nach transienter siRNA-Transfektion auf Proteinebene YAP1 sowohl in MDA-MB-231 (66.2 ± 10.23 % SEM vs.

siRNA-Kontrolle; $p < 0.05$; $n = 5$), als auch in MCF-7-EMT (20.75 ± 5.78 % SEM vs. siRNA Kontrolle; $p < 0.0001$; $n = 4$) vermindert exprimiert wird (siehe Abbildung 1A und 1C).

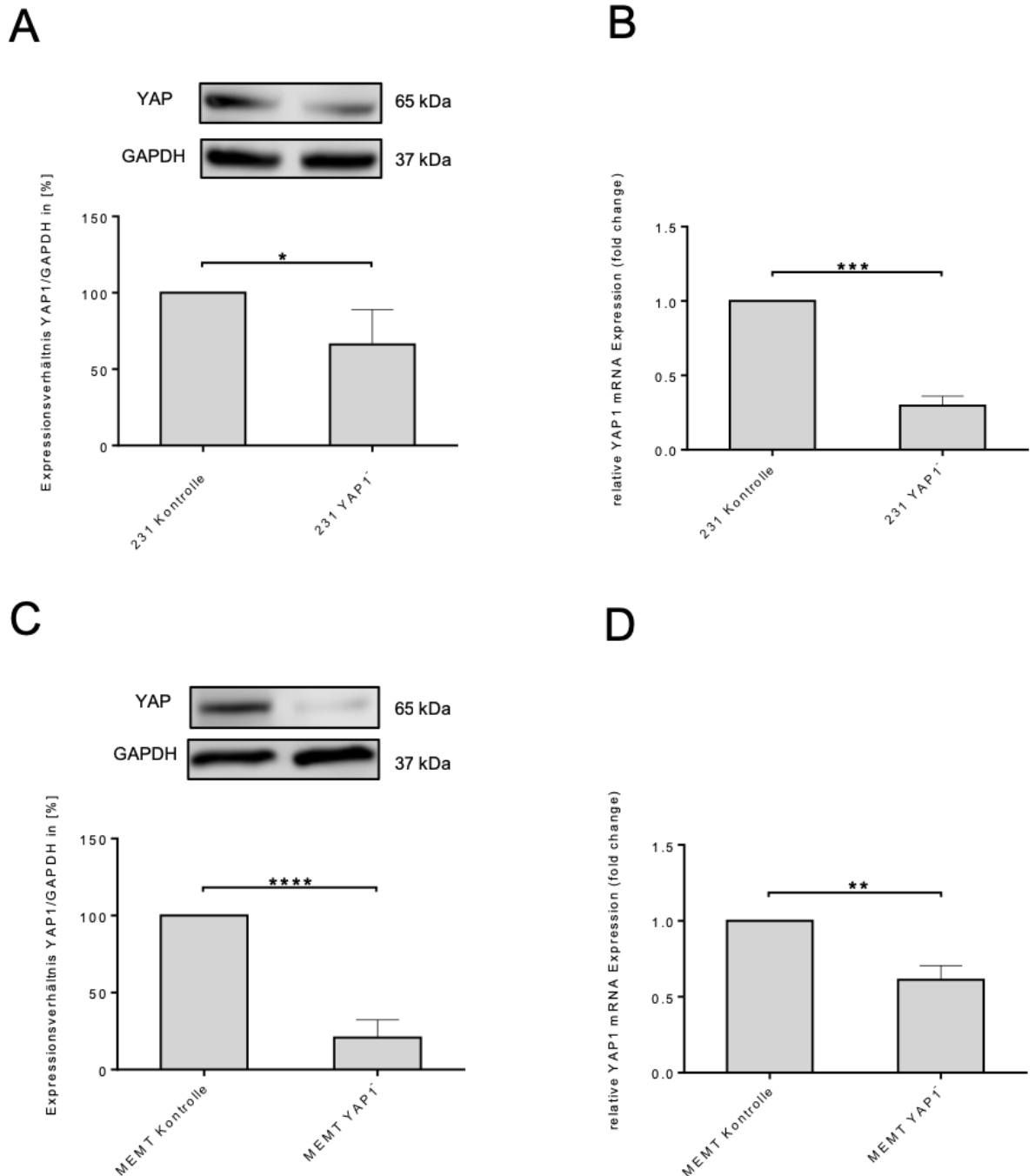


Abbildung 1: Nachweis der reduzierten YAP1-Expression nach erfolgreicher transienter siRNA-Transfektion.

A: Proteineexpression von YAP1 in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231. Die Expression von YAP1 auf Proteinebene wurde durch das Western-Blot-Verfahren bestimmt und auf die GAPDH-Expression normalisiert. In der Kontrolle wurden MDA-MB-231 mit unspezifischer siRNA transfiziert und in der Behandlungsgruppe mit YAP1-spezifischer siRNA transfiziert.

B: Genexpression von YAP1 in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231. Die Expression von YAP1 auf RNA-Ebene wurde durch quantitative real-time PCR analysiert und auf die GAPDH Expression normalisiert.

In der Kontrolle wurden MDA-MB-231 mit unspezifischer siRNA transfiziert und in der Behandlungsgruppe mit YAP1-spezifischer siRNA transfiziert.

C: Proteinexpression von YAP1 in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7-EMT. Die Expression von YAP1 auf Proteinebene wurde durch das Western-Blot-Verfahren bestimmt und auf die GAPDH-Expression normalisiert. In der Kontrolle wurden MCF-7-EMT mit unspezifischer siRNA transfiziert und in der Behandlungsgruppe mit YAP1-spezifischer siRNA transfiziert.

D: Genexpression von YAP1 in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7-EMT. Die Expression von YAP1 auf RNA-Ebene wurde durch das qPCR-Verfahren bestimmt und auf die GAPDH-Expression normalisiert. In der Kontrolle wurden MCF-7-EMT mit unspezifischer siRNA transfiziert und in der Behandlungsgruppe mit YAP1-spezifischer siRNA transfiziert.

Angegeben sind MW \pm SEM; Signifikanzen wurden mittels t-Test, ungepaart errechnet; (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$, (****) $p < 0.0001$

3.2 Untersuchung der Invasivität der Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7-EMT in Kokultur nach *knockdown* von YAP1 mittels siRNA-Transfektion

Um den Einfluss einer verminderten YAP1-Expression auf das Invasionsverhalten der Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7-EMT zu untersuchen, erfolgte die Untersuchung mittels Invasionsassay in Kokultur mit der Osteosarkom-Zelllinie MG-63 (siehe Kapitel 2.2.1.3). In früheren Experimenten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass dieses Kokultur-System die allgemeine Invasivität der Zellen steigert (Ziegler et al. 2014).

Die Zelllinie MDA-MB-231 zeigte nach erfolgter transients Transfektion und Kokultivierung mit MG-63 für 96 h eine signifikant verminderte Invasivität (Abb. 2A, B; 66.40 ± 7.36 % SEM vs. siRNA-Kontrolle; $p < 0.01$; $n = 3$) (siehe Abbildung 2A und 2B).

Durch eine verminderte YAP1-Expression wurde auch die Invasivität der mesenchymal transformierten Mammakarzinomzelllinien MCF-7-EMT signifikant vermindert (Abb. 2C, D; 55.23 ± 5.01 % SEM vs. siRNA Kontrolle; $p < 0.0001$; $n = 3$).

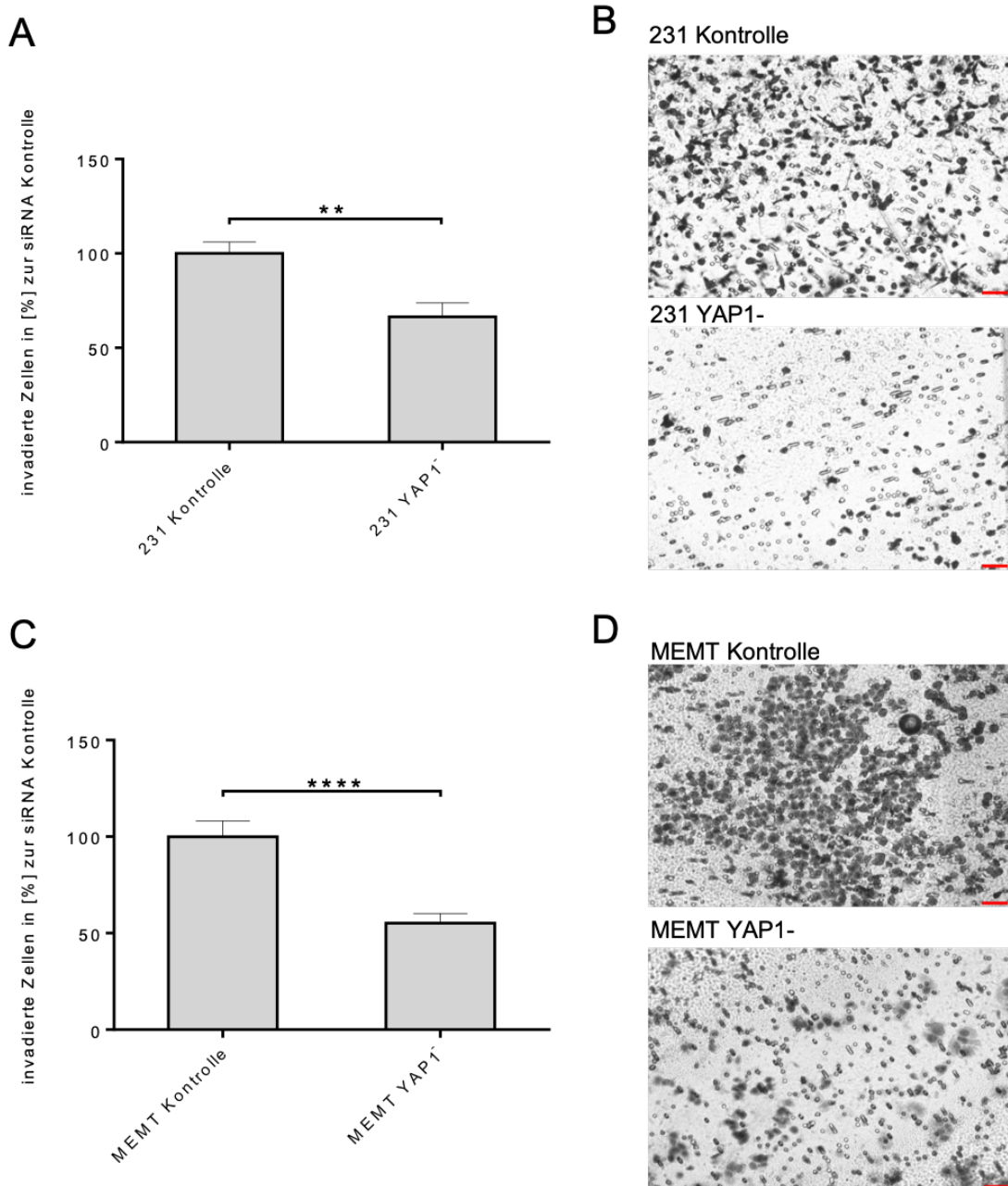


Abbildung 2: Nachweis der verminderten Invasivität nach erfolgter transienter siRNA-Transfektion.

A: Analyse von transient transfizierten invadierten Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 nach erfolgter Kokultivierung mit den Osteosarkomzellen MG-63 für 96h. Die Anzahl der YAP-Zellen (YAP1 spezifische siRNA) wurde auf die Kontrollzellzahl (unspezifische siRNA) normiert.

B: Repräsentative Filterausschnitte nach Anfärben der invadierten MDA-MB-231-Zellen mit Hämatoxylin.

C: Analyse von transient transfizierten invadierten Mammakarzinomzellen MCF-7-EMT nach erfolgter Kokultivierung mit den Osteosarkomzellen MG-63 für 96h. Die Anzahl der YAP-Zellen (YAP1 spezifische siRNA) wurde auf die Kontrollzellzahl (unspezifische siRNA) normiert.

D: Repräsentative Filterausschnitte nach Anfärben der invadierten MCF-7-EMT-Zellen mit Hämatoxylin.

Angegeben sind MW \pm SEM; Signifikanzen wurden mittels t-Test, ungepaart errechnet; (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.0001$

Maßstab balken: $100 \mu\text{m} = 0,4285 \text{ cm}$

3.3 Untersuchung der Proliferation der Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7-EMT nach *knockdown* von YAP1 mittels siRNA-Transfektion

YAP1 beeinflusst, neben der Metastasierung, auch die Zellproliferation und das Tumorstadium in vielen Tumorarten (Zhao et al. 2008). Der Einfluss einer verringerten YAP1-Expression auf die Proliferation mesenchymal transformierter und aggressiver Mammakarzinomzellen, wurde bis dato noch nicht untersucht. Da eine verringerte YAP-1-Expression sich auf die Proliferation der Tumorzellen auswirken könnte und des Weiteren ein verändertes Proliferationsverhalten der Zellen Auswirkungen auf die Invasionseigenschaften der Zellen haben könnte, haben wir die Proliferation der Tumorzellen untersucht.

Um den Einfluss des YAP1-*knockdown* auf die Proliferation als mögliche Ursache für veränderte Invasionseigenschaften untersuchen zu können, wurde das Proliferationsverhalten der Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7-EMT nach erfolgter siRNA-Transfektion untersucht und mit der Proliferation der mit der Kontroll-siRNA behandelten Kontrollgruppe verglichen (siehe Kapitel 2.2.1.4)

Sowohl bei der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 (117.0 ± 16.99 % SEM; $n = 4$), als auch bei der Mammakarzinomzelllinie MCF-7-EMT (90.93 ± 9.06 ; $n = 3$) konnte keine signifikante Veränderung der Proliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe ($K = 100\%$) gezeigt werden (siehe Abbildung 3A und 3B).

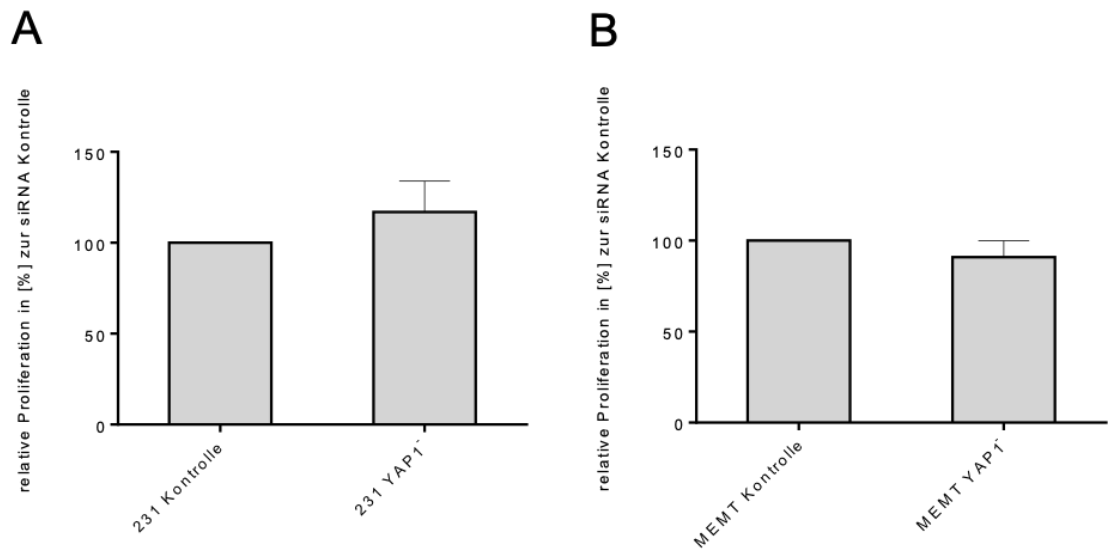


Abbildung 3: Nachweis der nicht signifikant veränderten Proliferation nach erfolgter transienter siRNA-Transfektion.

A: Proliferationsanalyse der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231. In der Kontrolle wurden MDA-MB-231 mit unspezifischer siRNA transfiziert und in der Behandlungsgruppe mit YAP1-spezifischer siRNA transfiziert und anschließend kultiviert. Zum Zeitpunkt t120 nach der Transfektion wurden die adhärennten Zellen gelöst und mittels Neubauer-Zählkammer gezählt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Proliferation, zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe.

B: Proliferationsanalyse der Mammakarzinomzelllinie MCF-7-EMT. In der Kontrolle wurden MCF-7-EMT mit unspezifischer siRNA transfiziert und in der Behandlungsgruppe mit YAP1-spezifischer siRNA transfiziert und anschließend kultiviert. Zum Zeitpunkt t120 nach der Transfektion wurden die adhärennten Zellen gelöst und mittels Neubauer-Zählkammer gezählt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Proliferation, zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe.

Angegeben sind MW \pm SEM; Signifikanzen wurden mittels t-Test, ungepaart errechnet.

3.4 Untersuchung der Fähigkeit zur F-Aktin-Polymerisation der Mammarkarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7-EMT nach *knockdown* von YAP1 mittels siRNA-Transfektion

Für die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung, müssen sich die Tumorzellen vom Primärtumor lösen. Dafür durchlaufen Tumorzellen oft den Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition (Warren et al. 2018). Mit dem Durchlaufen des Prozesses der EMT, kommt es zum Verlust der Zell-Zell-Adhäsion, Zellpolarität und zum Zugewinn mesenchymaler Eigenschaften (Warren et al. 2018). Hierbei spielt die Reorganisation des Zytoskeletts eine wichtige Rolle.

Aus diesem Grund erfolgte die Untersuchung der Fähigkeit zur F-Aktin-Polymerisation, nach Stimulierung, mittels FCS in der Behandlungsgruppe (YAP1-siRNA) und in der Kontrollgruppe (Kontroll-siRNA).

Dafür wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, mittels Fluometrie und Immunfluoreszenz untersucht.

Die MDA-MB-231-Zelllinie zeigte, nach verminderter YAP1-Expression, eine signifikant verminderte Fähigkeit zur F-Aktin-Polymerisation (Abb. 4A, B; 0.28 ± 0.08 relative Fluoreszenz-Einheit vs. siRNA-Kontrolle; $p < 0.001$; $n = 3$). Auch in der Zelllinie MCF-7-EMT führte eine verminderte YAP1-Expression zu einer signifikanten Abnahme der F-Aktin-Polymerisation (Abb. 4C, 4D; 0.35 ± 0.13 relative Fluoreszenz-Einheit vs. siRNA-Kontrolle; $p < 0.01$; $n = 3$).

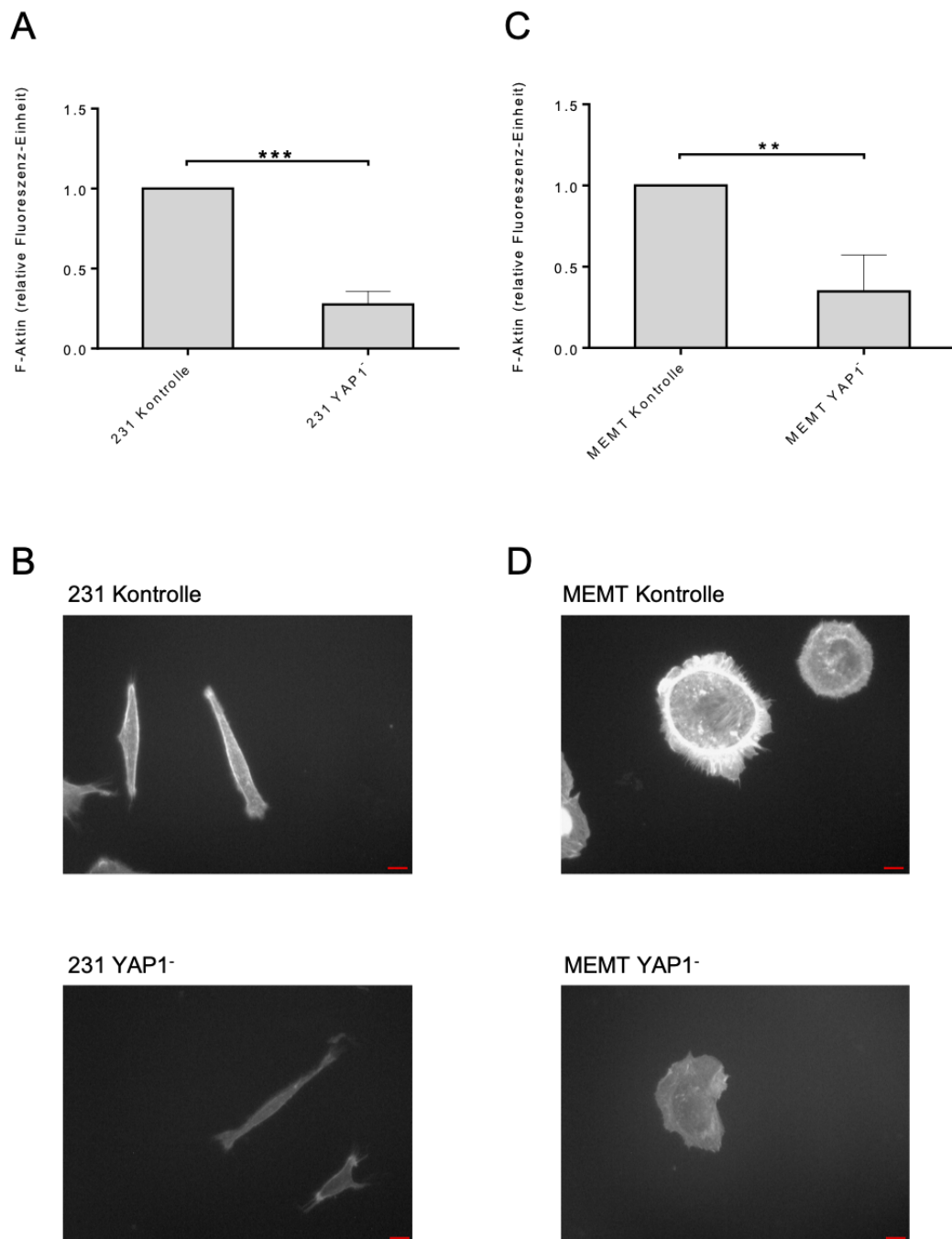


Abbildung 4: Nachweis der verminderten Fähigkeit zur F-Aktin-Polymerisation nach erfolgter transienter siRNA-Transfektion.

A: Analyse der Polymerisationsfähigkeit von F-Aktin in transient transfizierten Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 nach Stimulierung mittels FCS-haltigem Medium. In der Kontrolle wurden MDA-MB-231 mit unspezifischer siRNA transfiziert und in der Behandlungsgruppe mit YAP1-spezifischer siRNA transfiziert.

B: Repräsentatives Foto der F-Aktin-Fluoreszenz in der mit unspezifischer siRNA transfizierten Kontrollgruppe und der mit YAP1-spezifischen siRNA transfizierten Behandlungsgruppe der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231.

C: Analyse der Polymerisationsfähigkeit von F-Aktin in transient transfizierten Mammakarzinomzellen MCF-7-EMT nach Stimulierung mittels FCS-haltigem Medium. In der Kontrolle wurden MCF-7-EMT mit unspezifischer siRNA transfiziert und in der Behandlungsgruppe mit YAP1-spezifischer siRNA transfiziert.

D: Repräsentatives Foto der F-Aktin-Fluoreszenz in der mit unspezifischer siRNA transfizierten Kontrollgruppe und der mit YAP1-spezifischer siRNA transfizierten Behandlungsgruppe der Mammakarzinomzelllinie MCF-7-EMT.

Angegeben sind MW \pm SEM; Signifikanzen wurden mittels t-Test, ungepaart errechnet; (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$

Maßstab balken: $20 \mu\text{m} = 0,341 \text{ cm}$

3.5 Expression von S100A4 in den Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MCF-7-EMT auf proteinbiochemischer Ebene, nach *knockdown* von YAP1 mittels siRNA-Transfektion

In vorherigen Studien konnte der Einfluss von YAP1 auf Cyr61 (Zhou et al. 2016), sowie der Einfluss von Cyr61 auf S100A4, (Hellinger et al. 2019) gezeigt werden. Deswegen wurde zur Untersuchung der Signalkaskade, der Einfluss des YAP1-*knockdown* auf die Expression von S100A4 auf Proteinebene untersucht.

Dazu wurde der Western Blot, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, für die Expression von S100A4 durchgeführt.

In der Zelllinie MDA-MB-231 zeigte sich in der, mit YAP1-siRNA behandelten Gruppe, eine signifikant verminderte Expression von S100A4 (Abb. 5A; $53.50 \pm 16.80\%$ vs. siRNA-Kontrolle; $p < 0.05$; $n=4$).

Auch in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7-EMT führte eine verminderte YAP1-Expression zu einer signifikant verminderten Expression von S100A4 (Abb. 5 B; $23.00 \pm 3.22 \%$ vs. siRNA-Kontrolle; $p < 0.0001$; $n=4$)

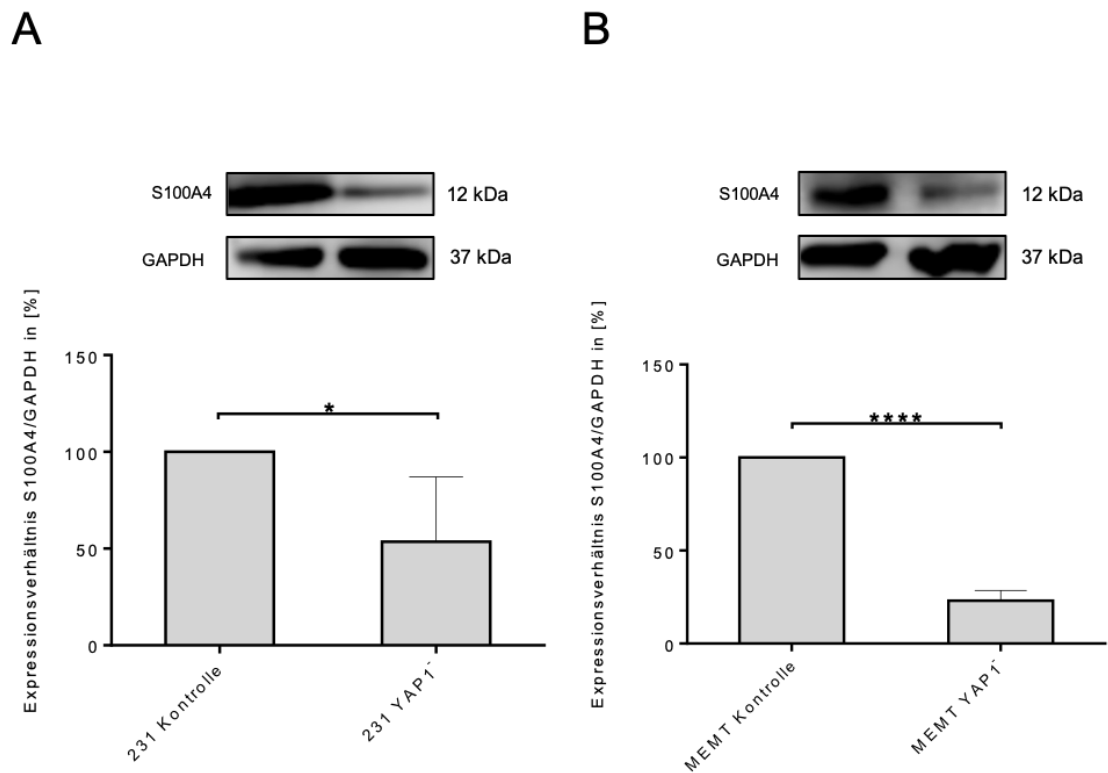


Abbildung 5: Nachweis der reduzierten S100A4-Expression nach erfolgter transienter siRNA-Transfektion.

A: Proteinexpression von S100A4 in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231. Die Expression von S100A4 auf Proteinebene wurde durch das Western-Blot-Verfahren bestimmt und auf die GAPDH-Expression normalisiert. In der Kontrolle wurden MDA-MB-231 mit unspezifischer siRNA transfiziert und in der Behandlungsgruppe mit YAP1-spezifischer siRNA transfiziert.

B: Proteinexpression von S100A4 in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7-EMT. Die Expression von S100A4 auf Proteinebene wurde durch das Western-Blot-Verfahren bestimmt und auf die GAPDH-Expression normalisiert. In der Kontrolle wurden MCF-7-EMT mit unspezifischer siRNA transfiziert und in der Behandlungsgruppe mit YAP1-spezifischer siRNA transfiziert.

Angegeben sind MW \pm SEM, Signifikanzen wurden mittels t-Test, ungepaart errechnet; (*) $p < 0.05$, (***) $p < 0.0001$

4 Diskussion

Das Yes-assoziierte Protein (YAP) ist ein translationaler Koaktivator und wurde erstmals von Sudol (1994) beschrieben. Es wird über den Hippo-Signalweg negativ reguliert, indem es über eine Phosphorylierung im Cytoplasma zurückgehalten wird. Eine Dephosphorylierung führt zu einer Translokation in den Nucleus (Dong et al. 2007). Hier fördert YAP dann, über die Interaktion mit TEAD, die Expression verschiedener Zielgene und letztendlich die Zellproliferation, das Organwachstum, aber auch die onkogenische Transformation und die epithelial-mesenchymale Transition (Zhao et al. 2008).

Der Hippo-Signalweg und YAP sind wichtige Regulatoren der frühen Embryonalentwicklung, der Entwicklung, des Wachstums, der Reparatur und der Regeneration verschiedener Gewebetypen. YAP ist außerdem eine wichtige Komponente in Karzinombildung, Tumorprogression und Metastasierung und in sehr vielen Karzinomen hochreguliert bzw. nukleär lokalisiert (Warren et al. 2018).

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern sich ein *knockdown* von YAP auf die invasiven Eigenschaften der mesenchymal transformierten und aggressiven Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7-EMT auswirkt. Des Weiteren wurden die behandelten Zellen auf eine Veränderung in ihrem Proliferationsverhalten untersucht. Um mögliche Auswirkungen des *knockdown* von YAP auf das Zytoskelett in den Zellen erfassen zu können, wurde darüber hinaus die F-Aktin-Polymerisation als Komponente des Zytoskeletts untersucht. Im letzten Schritt wurde die Expression von S100A4, ein *downstream target* von YAP, in den *knockdown* Zellen untersucht, um die Signalkaskade genauer beschreiben zu können.

4.1 Nachweis des *knockdown* von YAP1 auf RNA- und Proteinebene in den Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7-EMT

Für die Untersuchung der Auswirkung des *knockdown* von YAP1 in den Mammakarzinomzellen, musste zuerst der Nachweis des stabilen *knockdown* für die Dauer der geplanten Experimente erbracht werden. Die Zellen wurden dafür mit YAP1- bzw. Kontroll-siRNA transfiziert und nach 120h wurde die Expression von YAP1 auf RNA- und Proteinebene untersucht (siehe Kapitel 2.2.2 und 2.2.3). Sowohl die Untersuchung mittels quantitativer real-time

PCR als auch die mittels Western Blot, zeigten eine signifikante Abnahme der Expression von YAP1 in den Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7-EMT (siehe Kapitel 3.1).

Diese Ergebnisse dienen als Grundlage für die weiterführenden Experimente.

4.2 Auswirkung des *knockdown* von YAP1 auf die invasiven Eigenschaften der Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7-EMT

Um die Auswirkung des YAP1-*knockdown* auf die invasiven Eigenschaften der Mammakarzinomzellen zu untersuchen, wurde ein Invasionsassay mit einem Kokultursystem verwendet. Dieses Kokultursystem ist ein *In-vitro*-Modell für die gerichtete Invasion und wurde in unserer Abteilung entwickelt. Die Tumorzellen wurden mit den osteoblastenähnlichen Zellen MG-63 kokultiviert und die gerichtete Invasion, durch eine rekonstruierte Basalmembran, wurde untersucht. Die Grundlage war, dass gezeigt wurde, dass die Invasivität durch die Kokultur signifikant gesteigert werden konnte und man so ein geeignetes *In-vitro*-Modell hat, um die Invasion von Tumorzellen genauer beobachten zu können (von Alten et al. 2006).

Im Rahmen der hier durchgeführten Invasionsanalyse, konnte gezeigt werden, dass die Invasion der Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7-EMT nach erfolgter siRNA-Transfektion mit YAP1-siRNA bzw. mit Kontroll-siRNA signifikant abnimmt.

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die YAP-vermittelte Transkriptionsaktivität wichtig für Entwicklung und Erhalt von Neoplasien ist und dass die Inaktivierung von YAP in verschiedenen Krebsmodellen allgemeine Malignomeigenschaften umkehren kann. Dazu gehören z. B. die EMT, die verstärkte Migration und das verstärkte Metastasierungspotenzial (Moroishi et al. 2015).

Lamar et al. (2012) haben beschrieben, dass eine gesteigerte bzw. unkontrollierte YAP-Expression, das Metastasierungspotenzial von Brustkrebszellen dramatisch steigert. Dies geschieht auch unabhängig davon, ob das Tumorstadium beeinflusst wird. YAP interagiert mit der *TEAD-interaction domain* und es konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte YAP-Aktivität die TEAD-abhängige Transkription fördert. Es wurde eine gesteigerte Invasion der Zellen beschrieben. Die Experimente wurden allerdings an murinen Mammakarzinomzellen

(A375, 67NR, NMuMG) durchgeführt. Für die humanen Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 wurde, im Gegensatz zu dieser Arbeit, kein Invasionsassay durchgeführt. Des Weiteren wurde beschrieben, dass metastatische Zelllinien (u. a. MDA-MB-231) eine höhere TEAD-Transkriptionsaktivität zeigen, als nicht-metastatische Zelllinien (u. a. MCF-7). In dieser Arbeit wurde die, zuvor von unserer Arbeitsgruppe generierte, Zelllinie MCF-7-EMT (Ziegler et al. 2014) verwendet. Diese Zelllinie zeigt, im Vergleich zum Wildtyp, eine signifikant gesteigerte Invasivität. Im durchgeführten Invasionsassay zeigte sich bei den MCF-7-EMT nach siRNA-Transfektion eine signifikant verminderte Invasion, im Vergleich zur Kontrolle. Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass die MCF-7-EMT-Zellen im Vergleich zum Wildtyp eine gesteigerte YAP- und TEAD-Transkriptionsaktivität aufweisen. Um dies zu überprüfen sind weitere Experimente in der Zukunft erforderlich.

4.3 Auswirkung des *knockdown* von YAP1 auf die proliferativen Eigenschaften der Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7-EMT

Um die Auswirkung des *knockdown* von YAP1 auf die Proliferation der Mammakarzinomzellen zu untersuchen und eine mögliche Ursache für das geänderte Invasionsverhalten näher betrachten zu können, wurde eine Proliferationsanalyse der Zellen durchgeführt.

In verschiedenen Studien wurde schon zuvor beschrieben, dass YAP in vielen Karzinomzellen eine proliferationsfördernde Wirkung hat. Danach fördert YAP die Transkription von verschiedenen Genen, die u. a. für Zellproliferation und Stammzellerhaltung zuständig sind. Sehr hohe Expressionslevel von YAP fördern die Überproliferation von Gewebe und das Tumorwachstum (Warren et al. 2018).

Lamar et al. (2012) untersuchten unter anderem die Proliferation in murinen Mammakarzinomzellen (67NR und NMuMG) mit gesteigerter YAP-Expression und konnten zeigen, dass die gesteigerte bzw. unkontrollierte YAP-Expression zu einer Steigerung der Proliferation *in vitro* führte. Humane Mammakarzinomzelllinien wurden, jedoch nicht auf ihr Proliferationsverhalten hin, untersucht.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich die verminderte YAP-Expression durch die Transfektion mit YAP1-siRNA bzw. Kontroll-siRNA, nicht signifikant auf die Proliferation der mesenchymalen Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7-EMT auswirkt. Dies

zeigt, dass der Effekt von YAP auf Metastasierung und Invasion nicht (nur) ein Ergebnis der Fähigkeit zur Steigerung des Wachstums und der Proliferation ist, sondern auch weiterer Mechanismen.

Ob YAP in verschiedenen anderen Karzinomzelllinien eine unterschiedliche Wirkung auf die Proliferation hat, ob der mesenchymale Phänotyp der hier verwendeten Tumorzellen eine Rolle spielt und in wieweit sich dies auf die Metastasierung auswirkt, muss in weiteren Studien untersucht werden.

4.4 Auswirkung des *knockdown* von YAP1 auf die F-Aktin-Polymerisation der Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7-EMT

Die möglichen Veränderungen im Zytoskelett von Zellen mit verminderter YAP-Expression wurden untersucht, da für die Invasion unter anderem auch Umbau bzw. Reorganisation des Zytoskeletts notwendig sind (Martin et al. 2013).

Die Auswirkung des *knockdown* von YAP1 auf das Zytoskelett wurde in dieser Arbeit am Beispiel des Zytoskelett-Bestandteils F-Aktin untersucht. Dafür wurde die Fähigkeit zur Polymerisation von F-Aktin, nach Aktivierung mittels FBS in den, mit YAP-siRNA bzw. mit Kontroll-siRNA transfizierten Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7-EMT, untersucht. Den Zellen wurde nach der Behandlung Phalloidin-TRITC zugegeben. Anschließend wurde die Farbstoffintensität mittels Fluometrie gemessen und quantifiziert. Außerdem wurden Zellen auf Objektträgern angesät und mit Phalloidin-TRITC, sowie DAPI behandelt, um mittels Immunfluoreszenz eine fotografische Darstellung des Ergebnisses vornehmen zu können.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich der *knockdown* von YAP1 in den Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 UND MCF-7-EMT signifikant auf die Polymerisationsfähigkeit von F-Aktin auswirkt. In beiden Zelllinien war, bei verminderter YAP-Expression, die Fähigkeit zur F-Aktin-Polymerisation signifikant vermindert.

Damit Tumorzellen invadieren bzw. metastasieren können, müssen sie eine Reihe von morphologischen Veränderungen durchlaufen, welche unter anderem das Zytoskelett betreffen (Martin et al. 2013). Zu der sogenannten Metastasierungskaskade gehören verschiedene

Schritte, welche durchlaufen werden müssen, um die Metastasierung des Tumors zu ermöglichen. Die drei Hauptprozesse sind die Invasion, die Intravasation und die Extravasation.

Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) wurde erstmals von Greenburg und Hay (1982) als ein Prozess beschrieben, in dem epitheliale Zellen mesenchymale Eigenschaften erlangen und die Verbindungen zu den benachbarten Zellen verlieren.

Die Metastasierung als Tumorformation, durch Tumorzellen eines Primärtumors an einem Sekundärort, ist eng verwandt mit der EMT bzw. der mesenchymal-epithelialen Transition (MET) (Izdebska et al. 2018). Der Phänotypenwechsel der Tumorzelle, hin zu einem mesenchymalen Phänotyp beinhaltet unter anderem das Erlangen von Migrationsfähigkeiten. Die Motilität der Zelle wird u. a. ermöglicht, durch die Entwicklung invasiver Strukturen, in Form von Membranausstülpungen wie Invadopodia, Lamellipodia und Filopodia. Die Veränderung hin zu solchen Strukturen, ist abhängig von der Reorganisation des Aktinzytoskeletts. Bei der EMT kommt es zu Änderungen in der Organisation des kortikalen Aktinzytoskeletts. Daraufhin kommt es zu einer polarisierten Ansammlung des Zytoskeletts und zur Formung von oben genannten protrusiven und invasiven Strukturen, welche die Verlängerung der Zelle und die Änderung der direktionalen Bewegungsdynamik ermöglichen (Izdebska et al. 2018). Es konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass in Lamellipodia die Menge des polymerisierten Aktins um ein Vielfaches höher ist, als die Menge der monomeren Form (Koestler et al. 2009). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass invasive Tumorzellen, nach der Zugabe eines Wachstumsfaktors (EGF), zur Stimulation der Zellmigration, nach wenigen Minuten Lamellipodia ausbilden (Segall et al. 1996).

Der Prozess der Aktinmikrofilamentbildung und des Aktinabbaus, ist durch Aktin-bindende Proteine (ABP) kontrolliert. Diese können die Polymerisation des F-Aktins beeinflussen. Dies geschieht u. a. durch die Lösung der Aktinmonomere aus dem Proteinkomplex, durch Blockierung der Enden der Mikrofilamente oder durch Bildung von neuen Polymerisationsstellen. Ein ABP ist Cofilin, welches über den Abbau der Aktinfilamente durch Förderung der F-Aktin-Depolymerisation, neue freie Enden an Aktinfilamenten generiert. Diese stehen dann für die Polymerisation und Depolymerisation zu Verfügung (Bravo-Cordero et al. 2013 ; Izdebska et al. 2018).

Auch wenn schon einige Male ein Zusammenhang zwischen YAP und F-Aktin bzw. dem Zytoskelett der Zelle, als Erklärung der veränderten Migration/Invasion beschrieben wurde (Bai et al. 2016 ; Mason et al. 2019), so sind die genaueren zellulären Signalwege nicht komplett erforscht. Shi et al. (2017) zeigt, dass YAP in HCC-Zellen hochreguliert ist und die

vermehrte Expression die Zellmigration fördert, sowie die Deletion zu einer Migrationshemmung führte. Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass der *knockdown* von YAP über verschiedene Zwischenschritte zu einer Phosphorylierung und damit einer Hemmung von Cofilin führte. Die Phosphorylierung von Cofilin hat dann einen weiteren Einfluss von Cofilin auf die F-Aktinpolymerisation und die Lamellipodia-Formation gehemmt und so eine Lamellipodia-basierte Migration verhindert. Der Mechanismus hinter dem Zusammenhang von YAP und Cofilin ist weiterhin nicht vollständig geklärt. Eine Hypothese ist, dass die Mitophagie und dadurch erhöhte intrazelluläre Calciumlevel, eine entscheidende Rolle spielen.

Qiao et al. (2017) publizierten, dass YAP die F-Aktin Formation teilweise über den ARH-GAP29-RhoA-LIMK-Cofilin-Weg hemme. Hier führte eine Hemmung des Cofilins allerdings zu einer Stabilisierung des Zytoskeletts, sowieso zu einer vermehrten Anfärbbarkeit der Aktinfilamente. Der Einfluss von Cofilin auf das Zytoskelett wird vielfach diskutiert. Obwohl es zu einer Depolymerisation führt (was vereinbar mit den Ergebnissen von Qiao et al. (2017) ist), schafft es darüber auch wieder neue freie Enden, die dann für die Polymerisation zu Verfügung stehen (Izdebska et al. 2018). Eine Erklärung für die verschiedenen Ergebnisse, wären die verschiedenen Methoden der F-Aktinanalyse. In dieser Arbeit wurde die Fähigkeit der *knockdown*-Zellen zur Polymerisation von F-Aktin nach Aktivierung mittels FBS untersucht und durch eine Fluometrie-Messung quantifiziert. Qiao et al. (2017) werten hingegen die F-Aktin/G-Aktin Ratio mittels Zentrifugation und Western Blot aus. Des Weiteren haben Qiao et al. humane Magenkrebszellen MKN28 untersucht. In dieser Arbeit wurden die mesenchymal transformierten Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MCF-7-EMT verwendet. Eine mögliche Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse, wäre also auch eine zellspezifische Wirkung der verminderten YAP-Expression auf die F-Aktin-Polymerisation, bzw. auf den mesenchymalen Phänotypen der Zellen.

Durch welchen spezifischen Mechanismus YAP nun die Polymerisationsfähigkeit der Tumorzellen beeinflusst, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

4.5 Auswirkung des *knockdown* von YAP1 auf die Expression von S100A4 in den Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7-EMT als Beispiel der Signalkaskade

Die genauen molekularen Mechanismen, wie die verminderte Expression von YAP, spezifisch die Invasivität und die F-Aktin-Polymerisation vermindert, sind nicht endgültig geklärt.

Deswegen wurde in dieser Arbeit die Auswirkung der verminderten Expression von YAP, auf die Expression von S100A4, als Beispiel eines *downstream targets* untersucht. Dafür wurden die mesenchymal transformierten, aggressiven Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7-EMT mit YAP-siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert und nach 120 h mittels Western Blot auf die S100A4-Expression hin untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine verminderte YAP-Expression die Expression von S100A4 in den Mammakarzinomzellen signifikant vermindert.

S100A4 ist ein Mitglied der *S100 calcium binding protein family*, welche erstmals 1965 von Moore (1965) beschrieben wurde. S100A4 kommt in verschiedenen Zellkompartimenten und sowohl intra- als, auch extrazellulär vor. Es zeigt keine Enzymaktivität, sondern wirkt über eine Interaktion mit seinen Zielproteinen. S100A4 bindet Calcium und ändert dadurch seine Konformation. So kann es mit seinen Zielproteinen interagieren und eine Reihe biologischer Effekte auslösen (Fei et al. 2017). S100A4 spielt eine wichtige Rolle in der Invasion und Metastasierung. Davies et al. (1993) konnten zeigen, dass eine Transfektion von S100A4 das Potenzial zur Tumorgenese steigert und einen metastatischen Phänotyp *in vivo*. Eine gesteigerte S100A4-Expression in *triple* negativen Brustkrebszellen, führt zu einer gesteigerten Migration (Grottke et al. 2016). Eine verminderte S100A4 Expression hat die Invasion und Metastasierung in Brustkrebs signifikant gehemmt (Hernández et al. 2013).

In vorherigen Arbeiten unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass S100A4 und Cyr61 in Biopsien von Brusthyperplasien und Brustkrebs stark exprimiert sind. Außerdem konnte die Invasivität der aggressiven Mammakarzinomzellen MCF-7-EMT und MDA-MB-231, durch den *knockdown* von S100A4 und Cyr61, signifikant vermindert werden. Dieser Effekt zeigte sich auch bei der Behandlung der Zellen mit dem GnRH-Agonisten Triptorelin (Gründker et al. 2016). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Cyr61 mit S100A4 interagiert und eine verminderte Expression von Cyr61 zu einer verminderten Expression von S100A4 führt (Hellinger et al. 2019).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass YAP einen Einfluss auf die S100A4-Expression hat. Dadurch könnte u. a. der Einfluss der verminderten YAP Expression auf die Invasion und die F-Aktin-Polymerisation erklärt werden. Es bleibt zu erforschen, ob der *knockdown* von YAP den vermuteten Einfluss auf die Cyr61-Expression hat. Außerdem muss in weiteren Experimenten erforscht werden, ob die YAP Expression, durch die Behandlung mit GnRH-Agonisten, beeinflusst wird und so möglicherweise der Einfluss des GnRH-Agonisten auf die Expression von S100A4 und Cyr61 zu erklären ist.

4.6 Fazit

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich eine verminderte YAP-Expression signifikant auf die Invasivität von mesenchymal transformierten, aggressiven Mammakarzinomzellen auswirkt. Auch die Fähigkeit zur F-Aktin-Polymerisation der Zellen, wird durch eine verminderte YAP-Expression signifikant vermindert. Die Wirkung auf das Zytoskelett der Zelle und speziell auf F-Aktin könnte ein Mechanismus sein, wie YAP die Invasivität der Zellen beeinflusst.

Dass eine verminderte YAP-Expression auch die Expression von S100A4 signifikant reduziert hat, und S100A4, vielfach zuvor beschrieben, einen signifikanten Einfluss auf die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen hat, zeigt, dass YAP über seine downstream targets Einfluss auf die Invasion und Metastasierung nehmen könnte.

Die gewonnenen Erkenntnisse lassen vermuten, dass YAP eine entscheidende Rolle in der EMT, der Invasion und der Metastasierung von Mammakarzinomzellen spielt, und dass eine verminderte YAP-Expression *in vivo*, ein Ansatz für die Hemmung der Invasion sein könnte.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass GnRH-Agonisten über eine RhoA-Aktivierung und eine Expressionshemmung von S100A4 und Cyr61 Einfluss auf die Invasion haben. In dieser Arbeit konnte dargelegt werden, dass YAP einen Einfluss auf die S100A4-Expression hat, daher könnte die Anwendung von GnRH-Agonisten eine Therapieoption darstellen. Dies muss allerdings erst in zukünftigen Experimenten untersucht werden. Dafür muss der Einfluss von GnRH-Agonisten auf die YAP-Expression zunächst untersucht und bestätigt werden.

5 Zusammenfassung

Das metastasierte Mammakarzinom gilt als prognostisch sehr ungünstig und ist nicht mehr heilbar. Es bestehen zwar Therapiemöglichkeiten für die Behandlung der Symptome und für die Verbesserung der Lebensqualität der Patientinnen, jedoch gibt es bis heute keine ursächliche Behandlungsmöglichkeit der Metastasierung. Daher ist die Erforschung der Metastasierung und der beeinflussenden Faktoren, in Zukunft ein wichtiger Punkt weitergehender Untersuchungen.

Das Yes-assoziierte Protein (YAP) ist in vielen Krebszellen verstärkt exprimiert und wird mit einem aggressiveren Phänotyp und einer verstärkten Invasivität der Tumorzellen assoziiert.

Die Expression von Yes-assoziierte Protein in den mesenchymal transformierten, aggressiven Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7-EMT, wurde durch die Transfektion mit YAP-siRNA bzw. mit Kontroll-siRNA gehemmt. Der Nachweis der verminderten YAP-Expression, erfolgte mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion auf RNA-Ebene und mittels Western Blot auf Proteinebene.

Die Analyse der Invasion der Zellen erfolgte mithilfe des Invasionsassays in Kokultur mit den Osteoblasten-ähnlichen Zellen MG-63. In einer vorherigen Arbeit unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass dieses System die Invasivität signifikant steigert.

Zum Nachweis der Auswirkung des *knockdown* von Yes-assoziiertem Protein auf das Proliferationsverhalten der Zellen, wurde eine Proliferationsanalyse durchgeführt.

Um die Fähigkeit der Zellen zur Polymerisation von F-Aktin zu untersuchen, wurden die Zellen nach der Kultivierung in FBS-freiem Medium mittels FBS aktiviert. Danach erfolgte die quantitative Auswertung mittels Fluometrie, sowie die fotografische Auswertung mittels Immunfluoreszenz.

Die Untersuchung des Einflusses der verminderten YAP-Expression auf die Expression von S100A4, erfolgte ebenfalls mittels Western Blot-Verfahren.

Es konnte gezeigt werden, dass die verminderte YAP-Expression in den Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7-EMT zu einer signifikant verminderten Invasion führt, auf die Proliferation dieser mesenchymal transformierten Zellen hingegen keinen Einfluss hat.

Darüber hinaus wirkt sich die reduzierte Expression von Yes-assoziiertem Protein auf die Polymerisationsfähigkeit von F-Aktin aus; denn diese war signifikant vermindert.

Des Weiteren war die Expression von S100A4 in den Mammakarzinomzellen, durch den *knockdown* von Yes-assoziiertem Protein, signifikant vermindert.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Yes-assoziiertes Protein eine entscheidende Rolle bei der Metastasierung von Mammakarzinomzellen spielt und die weitere Erforschung von Yes-assoziiertem Protein, sowie der Möglichkeit der medikamentösen Hemmung von Yes-assoziiertem Protein *in vivo*, in Zukunft eine große Rolle spielen wird.

6 Literaturverzeichnis

- Aiello NM, Kang Y (2019): Context-dependent EMT programs in cancer metastasis. *J Exp Med* 216, 1016–1026
- Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, McEwan RN (1987): A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* 47, 3239–3245
- Antoniou AC, Easton DF (2006): Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene* 25, 5898–5905
- Bai H, Zhu Q, Surcel A, Luo T, Ren Y, Guan B, Liu Y, Wu N, Joseph NE, Wang TL et al. (2016): Yes-associated protein impacts adherens junction assembly through regulating actin cytoskeleton organization. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 311, 396–411
- Baltimore D (1970): RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226, 1209–1211
- Boyden S (1962): The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 115, 453–466
- Bradbury AR, Olopade OI (2007): Genetic susceptibility to breast cancer. *Rev Endocr Metab Disord* 8, 255–267
- Bravo-Cordero JJ, Magalhaes MAO, Eddy RJ, Hodgson L, Condeelis J (2013): Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 405–415
- Burnette WN (1981): „Western blotting“: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112, 195–203
- Davies BR, Davies MP, Gibbs FE, Barraclough R, Rudland PS (1993): Induction of the metastatic phenotype by transfection of a benign rat mammary epithelial cell line with the gene for p9Ka, a rat calcium-binding protein, but not with the oncogene EJ-ras-1. *Oncogene* 8, 999–1008
- Dawson SJ, Provenzano E, Caldas C (2009): Triple negative breast cancers: clinical and prognostic implications. *Eur J Cancer* 45, 27–40
- Dong J, Feldmann G, Huang J, Wu S, Zhang N, Comerford SA, Gayyed MF, Anders RA, Maitra A, Pan D (2007): Elucidation of a universal size-control mechanism in Drosophila and mammals. *Cell* 130, 1120–1133
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494–498

- Fei F, Qu J, Zhang M, Li Y, Zhang S (2017): S100A4 in cancer progression and metastasis: A systematic review. *Oncotarget* 8, 73219–73239
- Fire A, Albertson D, Harrison SW, Moerman DG (1991): Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development* 113, 503–514
- Föst C, Duwe F, Hellriegel M, Schweyer S, Emons G, Gründker C (2011): Targeted chemotherapy for triple-negative breast cancers via LHRH receptor. *Oncol Rep* 25, 1481–1487
- Fu V, Plouffe SW, Guan KL (2017): The Hippo pathway in organ development, homeostasis, and regeneration. *Curr Opin Cell Biol* 49, 99–107
- Girgert R, Emons G, Gründker C (2012): Inactivation of GPR30 reduces growth of triple-negative breast cancer cells: possible application in targeted therapy. *Breast Cancer Res Treat* 134, 199–205
- Greenburg G, Hay ED (1982): Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol* 95, 333–339
- Grottke A, Ewald F, Lange T, Nörz D, Herzberger C, Bach J, Grabinski N, Gräser L, Höppner F, Nashan B et al. (2016): Downregulation of AKT3 Increases Migration and Metastasis in Triple Negative Breast Cancer Cells by Upregulating S100A4. *PLoS ONE* 11, e0146370
- Gründker C, Bauerschmitz G, Schubert A, Emons G (2016): Invasion and increased expression of S100A4 and CYR61 in mesenchymal transformed breast cancer cells is downregulated by GnRH. *Int J Oncol* 48, 2713–2721
- Harvey K, Tapon N (2007): The Salvador-Warts-Hippo pathway - an emerging tumour-suppressor network. *Nat Rev Cancer* 7, 182–191
- Hellinger JW, Hüchel S, Goetz L, Bauerschmitz G, Emons G, Gründker C (2019): Inhibition of CYR61-S100A4 Axis Limits Breast Cancer Invasion. *Front Oncol* 9, 1074
- Hernández JL, Padilla L, Dakhel S, Coll T, Hervas R, Adan J, Masa M, Mitjans F, Martínez JM, Coma S et al. (2013): Therapeutic targeting of tumor growth and angiogenesis with a novel anti-S100A4 monoclonal antibody. *PLoS ONE* 8, e72480
- Huang YT, Lan Q, Lorusso G, Duffey N, Rüegg C (2017): The matricellular protein CYR61 promotes breast cancer lung metastasis by facilitating tumor cell extravasation and suppressing anoikis. *Oncotarget* 8, 9200–9215
- Izant JG, Weintraub H (1984): Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis. *Cell* 36, 1007–1015
- Izdebska M, Zielińska W, Grzanka D, Gagat M (2018): The Role of Actin Dynamics and Actin-Binding Proteins Expression in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Its Association with Cancer Progression and Evaluation of Possible Therapeutic Targets. *Biomed Res Int* 2018, 1-13

- Jiang W, Hiscox S, Hallett M, Scott C, Horrobin D, Puntis M (1995): Inhibition of hepatocyte growth factor-induced motility and in vitro invasion of human colon cancer cells by gamma-linolenic acid. *Br J Cancer* 71, 744–752
- Kalluri R, Weinberg RA (2009): The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119, 1420–1428
- Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, Martin GR (1986): Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* 25, 312–318
- Koestler SA, Rottner K, Lai F, Block J, Vinzenz M, Small JV (2009): F- and G-Actin Concentrations in Lamellipodia of Moving Cells. *PLoS ONE* 4, e4810
- Lamar JM, Stern P, Liu H, Schindler JW, Jiang ZG, Hynes RO (2012): The Hippo pathway target, YAP, promotes metastasis through its TEAD-interaction domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E2441–E2450
- Martin TA, Ye L, Sanders AJ, Lane J, Jiang WG: Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective. In: Jandial R (Hrsg): *Metastatic Cancer: Clinical and Biological Perspectives*. Landes Bioscience, Austin (TX) 2013, 135-168
- Mason DE, Collins JM, Dawahare JH, Nguyen TD, Lin Y, Voytik-Harbin SL, Zorlutuna P, Yoder MC, Boerckel JD (2019): YAP and TAZ limit cytoskeletal and focal adhesion maturation to enable persistent cell motility. *J Cell Biol* 218, 1369–1389
- Melcher C, Scholz C, Jäger B, Hagenbeck C, Rack B, Janni W (2012): Breast Cancer: State of the Art and New Findings. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 72, 215–224
- Meng Z, Moroishi T, Mottier-Pavie V, Plouffe SW, Hansen CG, Hong AW, Park HW, Mo JS, Lu W, Lu S et al. (2015): MAP4K family kinases act in parallel to MST1/2 to activate LATS1/2 in the Hippo pathway. *Nat Commun* 6, 8357
- Moore BW (1965): A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem and Biophys Res Commun* 19, 739–744
- Moroishi T, Hansen CG, Guan KL (2015): The emerging roles of YAP and TAZ in cancer. *Nat Rev Cancer* 15, 73–79
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263–273
- Nieto MA (2017): Context-specific roles of EMT programmes in cancer cell dissemination. *Nat Cell Biol* 19, 416–418
- Parish CR, Jakobsen KB, Coombe DR (1992): A basement-membrane permeability assay which correlates with the metastatic potential of tumour cells. *Int J Cancer* 52, 378–383
- Park HW, Guan KL (2013): Regulation of the Hippo pathway and implications for anticancer drug development. *Trends Pharmacol Sci* 34, 581–589

- Qiao Y, Chen J, Lim YB, Finch-Edmondson ML, Seshachalam VP, Qin L, Jiang T, Low BC, Singh H, Lim CT, Sudol M (2017): YAP Regulates Actin Dynamics through ARHGAP29 and Promotes Metastasis. *Cell Rep* 19, 1495–1502
- Riede UN, Baak JP, Mattern D: Brustdrüse. In: Riede UN, Werner M, Freudenberg N: Basiswissen Allgemeine und Spezielle Pathologie. Springer, Heidelberg 2009, 522-531
- Robert-Koch-Institut: Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. 274
- Schubert A, Hawighorst T, Emons G, Gründker C (2011): Agonists and antagonists of GnRH-I and -II reduce metastasis formation by triple-negative human breast cancer cells in vivo. *Breast Cancer Res Treat* 130, 783–790
- Segall JE, Tyrech S, Boselli L, Masseling S, Helft J, Chan A, Jones J, Condeelis J (1996): EGF stimulates lamellipod extension in metastatic mammary adenocarcinoma cells by an actin-dependent mechanism. *Clin Exp Metastasis* 14, 61–72
- Seyfried TN, Huysentruyt LC (2013): On the Origin of Cancer Metastasis. *Crit Rev Oncog* 18, 43–73
- Shi C, Cai Y, Li Y, Li Y, Hu N, Ma S, Hu S, Zhu P, Wang W, Zhou H (2017): Yap promotes hepatocellular carcinoma metastasis and mobilization via governing cofilin/F-actin/lamellipodium axis by regulation of JNK/Bnip3/SERCA/CaMKII pathways. *Redox Biol* 14, 59–71
- Stein U, Arlt F, Walther W, Smith J, Waldman T, Harris ED, Mertins SD, Heizmann CW, Allard D, Birchmeier W et al. (2006): The metastasis-associated gene S100A4 is a novel target of beta-catenin/T-cell factor signaling in colon cancer. *Gastroenterology* 131, 1486–1500
- Sudol M (1994): Yes-associated protein (YAP65) is a proline-rich phosphoprotein that binds to the SH3 domain of the Yes proto-oncogene product. *Oncogene* 9, 2145–2152
- Temin HM, Mizutani S (1970): RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226, 1211–1213
- von Alten J, Fister S, Schulz H, Viereck V, Frosch K-H, Emons G, Gründker C (2006): GnRH analogs reduce invasiveness of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 100, 13
- Warren JSA, Xiao Y, Lamar JM (2018): YAP/TAZ Activation as a Target for Treating Metastatic Cancer. *Cancers (Basel)* 10, 115
- Wei C, Wang Y, Li X (2018): The role of Hippo signal pathway in breast cancer metastasis. *Onco Targets Ther* 11, 2185–2193
- Weigelt B, Peterse JL, van't Veer LJ (2005): Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 5, 591–602

Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, Xie J, Ikenoue T, Yu J, Li L et al. (2007): Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev* 21, 2747–2761

Zhao B, Ye X, Yu J, Li L, Li W, Li S, Yu J, Lin JD, Wang CY, Chinnaiyan AM et al. (2008): TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev* 22, 1962–1971

Zhou Y, Huang T, Cheng ASL, Yu J, Kang W, To KF (2016): The TEAD Family and Its Oncogenic Role in Promoting Tumorigenesis. *Int J Mol Sci* 17(2), 138

Ziegler E, Hansen MT, Haase M, Emons G, Gründker C (2014): Generation of MCF-7 cells with aggressive metastatic potential in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat* 148, 269–277

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. rer. nat. Gründker für die Möglichkeit der Promotion in einem interessanten Thema, für die Leitung der Arbeit und für die sehr gute Betreuung meiner Promotion danken.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank meiner Betreuerin, Frau Dr. Johanna Hellinger, die mich bei der Durchführung der Experimente und der Verschriftlichung der Arbeit unterstützt hat und als Ansprechpartnerin jederzeit für mich erreichbar war. Ohne ihre umfassende Betreuung wäre das Gelingen dieser Arbeit so nicht möglich gewesen.

Ich möchte allen Mitarbeitern des Labors für molekulare Gynäkologie und allen anderen Doktorandinnen danken. Besonders erwähnen möchte ich Frau Sonja Blume, die mich bei den Arbeiten im Labor unterstützt hat und mir bei Fragen jederzeit geholfen hat.

Lebenslauf

Am 22. Februar 1994 wurde ich als jüngste Tochter meiner Eltern Sonja Goetz und Gerd Goetz in Grevenbroich geboren.

Von 2000-2004 ging ich auf die Erich-Kästner-Grundschule in Grevenbroich. Nach der Grundschule besuchte ich ab der 5. Klasse das Pascal-Gymnasium Grevenbroich. Während meiner Schulzeit besuchte ich im Rahmen eines Auslandsaufenthaltes während der 11. Klasse ein halbes Jahr eine High School in Bealeton, Virginia, USA. Im Juli 2013 erwarb ich die allgemeine Hochschulreife.

Nach dem Abitur absolvierte ich ein freiwilliges soziales Jahr auf der Rettungswache Neuss-Süd des Deutschen Roten Kreuzes. Im Rahmen dieses FSJ machte ich die Ausbildung zur Rettungssanitäterin.

Zum Sommersemester 2015 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Dort bestand ich im März 2017 das Physikum. Im April 2020 legte ich das zweite Staatsexamen ab.

Im Zeitraum vom August 2018 bis März 2019 führte ich die experimentellen Arbeiten für meine Promotion in der Arbeitsgruppe der molekularen Gynäkologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Gründker der Georg-August-Universität Göttingen durch.