

**Intrazelluläre TEAD– und Hippo-
Signalweg–Expression im duktalem
Adenokarzinom des Pankreas und der Leber:
Prognostische Bedeutung für Metastasierung
sowie Leberregeneration nach ALPPS**

Kumulative Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

Universität Hamburg

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie

Vorgelegt von

Mirco Küchler

Hamburg, 2025

Für Maria und Motte

*Danke für Eure Liebe, Eure Zuversicht, Euren Halt und
vor allem für Eure Geduld und Euer Verständnis.*

Ihr seid mein größtes Glück und meine unerschöpfliche Inspiration



„The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not 'Eureka!' but 'That's funny...'"

Isaac Asimov¹

¹Das Zitat wird Isaac Asimov zugeschrieben, ist aber nach aktuellen Recherchen in seinen Werken nicht eindeutig belegbar.

Tag der mündlichen Prüfung: 06.05.2026

Gutachter:

Professor Dr. med. Dr. med. habil. Jonas Schmidt-Chanasit

Professor Dr. med. Karl Jürgen Oldhafer

Publikationsliste

Die Dissertation basiert auf den folgenden publizierten Artikeln. Meine persönliche Beteiligung an jedem Artikel ist auf der folgenden Seite beschrieben

- I. R. Drexler, **M. Küchler**, K. C. Wagner, T. Reese, B. Feyerabend, M. Kleine und K. J. Oldhafer. ***The Clinical Relevance of the Hippo Pathway in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma***. In: *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 147.2 (Okt. 2020), S. 373–391. ISSN: 1432–1335. DOI: 10.1007/s00432-020-03427-z

- II. R. Drexler, R. Fahy, **M. Küchler**, K. C. Wagner, T. Reese, M. Ehmke, B. Feyerabend, M. Kleine und K. J. Oldhafer. ***Association of Subcellular Localization of TEAD Transcription Factors with Outcome and Progression in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma***. In: *Pancreatology* 21.1 (Jan. 2021), S. 170–179. ISSN: 1424–3903. DOI: 10.1016/j.pan.2020.12.003

- III. **M. Küchler**, M. Ehmke, K. Jaquet, P. Wohlmuth, J. M. Feldhege, T. Reese, T. Hartmann, R. Drexler, T. Huber, T. Burmester und K. J. Oldhafer. ***Transcription enhanced associate domain factor 1 (TEAD1) predicts liver regeneration outcome of ALPPS-treated patients***. In: *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 27 (4 Apr. 2025), S. 470–479. ISSN: 1477–2574. DOI: 10.1016/j.hpb.2024.12.007. ppublish

Autorenbeiträge:

I. Idee und Konzept: RD und **MKÜ**; Etablierung und Validierung Immunhistologie: RD, **MKÜ** und BF; Datenerhebung: RD, **MKÜ** und BF; Analyse und Interpretation der Daten: RD und **MKÜ**; Statistische Analyse und Abfassung des Manuskripts: RD und **MKÜ**; Technischer- und materieller Support: TR, BF und MKL; Studienkonzept und Supervision: KO und KW; Beschaffung von Finanzmitteln: KO und KW; Kritische Überarbeitung des Manuskripts: RD, **MKÜ**, KW, TR, BF, MKL und KO.

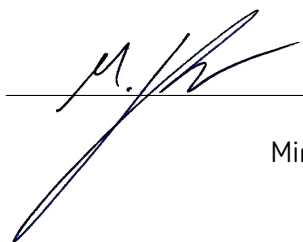
Alle Autoren haben das Manuskript gelesen und freigegeben.

II. Studienidee: **MKÜ** und RD; Datenerhebung: RD, RF und **MKÜ**; Analyse und Interpretation: RD, RF und **MKÜ**; Statistische Analyse und Abfassung des Manuskripts: RD, RF und **MKÜ**; Technischer- und materieller Support: ME, TR, BF und MKL; Studienkonzept und -design: **MKÜ**, KO und KW; Beschaffung von Finanzmitteln: KO und KW; Supervision: KO und KW; Kritische Überarbeitung des Manuskripts: RD, RF, **MKÜ**, ME, TR, BF, MKL, KO und KW.

Alle Autoren haben das Manuskript gelesen und freigegeben.

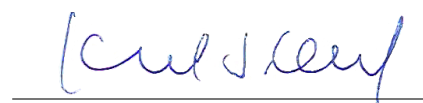
III. Studienidee und -konzept: **MKÜ**; Etablierung und Validierung Immunhistologie: **MKÜ**, ME und RD; Datenerhebung: **MKÜ**, ME und TH; Analyse und Interpretation: **MKÜ**, ME, TH, RD, KJ und TR; Statistische Analyse: **MKÜ**, RD, PW und JF; Abfassung des Manuskripts: **MKÜ**; Technischer- und materieller Support: ME, TH, RD, KJ und TR; Beschaffung von Finanzmitteln: **MKÜ** und KO; Supervision: TB und KO; Kritische Überarbeitung des Manuskripts: **MKÜ**, ME, KJ, PW, JF, TR, TH, RD, TH, TB und KO; Einarbeitung und Überarbeitung nach erster Revision: **MKÜ**, PW und JF.

Alle Autoren haben das Manuskript gelesen und freigegeben.



Mirco Küchler

Hiermit bestätige ich die Richtigkeit dieser Beiträge:



Prof. Dr. Karl Jürgen Oldhafer

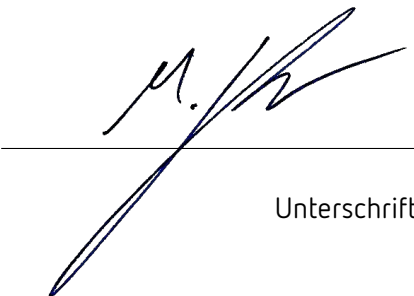
Eidesstattliche Versicherung

Declaration on oath

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt zu haben. Sofern im Zuge der Erstellung der vorliegenden Dissertationsschrift generative Künstliche Intelligenz (gKI) basierte elektronische Hilfsmittel verwendet wurden, versichere ich, dass meine eigene Leistung im Vordergrund stand und dass eine vollständige Dokumentation aller verwendeten Hilfsmittel gemäß der Guten wissenschaftlichen Praxis vorliegt. Ich trage die Verantwortung für eventuell durch die gKI generierte fehlerhafte oder verzerrte Inhalte, fehlerhafte Referenzen, Verstöße gegen das Datenschutz- und Urheberrecht oder Plagiate.

I hereby declare and affirm that this doctoral dissertation is my own work and that I have not used any aids and sources other than those indicated. If electronic resources based on generative artificial intelligence (gAI) were used in the course of writing this dissertation, I confirm that my own work was the main and value-adding contribution and that complete documentation of all resources used is available in accordance with good scientific practice. I am responsible for any erroneous or distorted content, incorrect references, violations of data protection and copyright law or plagiarism that may have been generated by the gAI.

Hamburg, den 14. September 2025



Unterschrift

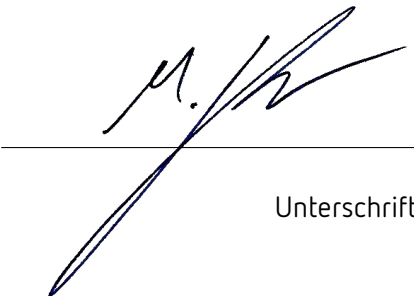
Erklärung zur Übereinstimmung von Druck- und Digitalfassung

Declaration of Conformity between Printed and Digital Versions

Ich versichere, dass dieses gebundene Exemplar der Dissertation und das in elektronischer Form eingereichte Dissertationsexemplar sowie das beim Studienbüro des Fachbereichs Biologie zur Archivierung eingereichte gedruckte gebundene Exemplar der Dissertationsschrift inhaltlich und formal identisch sind. Es wurden keinerlei Änderungen, Kürzungen oder Ergänzungen vorgenommen. Alle Exemplare entsprechen sich vollständig in Text, Abbildungen und Verzeichnissen.

I hereby declare that this bound copy of the dissertation and the electronically submitted version of the dissertation and the printed bound copy of the dissertation submitted to the Student Office of the Department of Biology for archiving are identical in content and form. No changes, deletions, or additions have been made. All copies are fully identical with respect to text, figures, and lists.

Hamburg, den 14. September 2025



Unterschrift

Zusammenfassung

Das *Pankreaskarzinom* (PDAC) wird zunehmend als systemische und weniger als lokale Erkrankung betrachtet. Hintergrund ist die Beobachtung, dass die Metastasierung bei PDAC-Patient:innen schon sehr früh beginnt. Dies wird durch die Veränderung des biochemischen Umfelds in anderen Organsystemen als dem Pankreas, insbesondere in der Leber, ermöglicht und spielt eine wichtige Rolle bei der Schaffung eines Umfelds für die Metastasierung. Der *Hippo-Signalweg* (Hippo) ist ein zentraler Signalweg zur Regulierung von Zellproliferation, Apoptose, Organgröße und Organhomöostase. Seine Rolle in der Progression und Metastasierung von PDAC ist mittlerweile gut etabliert. Im aktiven Zustand hemmt der Hippo-Signalweg die nukleäre Translokation seines Effektors *yes-associated Protein* (YAP), was die Progression von PDAC verlangsamt und die Metastasierung unterdrückt. Sobald der Signalweg jedoch inaktiv wird, wird YAP nicht mehr phosphoryliert und gelangt in den Zellkern. Dort bildet es einen Komplex mit den *Transkriptionsfaktoren der TEAD Familie* (TEAD1–4). Dies zusammen ist essenziell für die Aktivierung/Transkription von Zielgenen. Weder YAP noch TEAD1–4 besitzen allein eine ausreichend hohe Transkriptionsaktivität. Die aktivierten Zielgene können Tumorwachstum, Zellproliferation und die Metastasierung fördern, was die zentrale Rolle dieses Signalwegs bei der Krankheitsprogression und Regeneration verdeutlicht. Seit Jahren schon ist das Hauptaugenmerk der Wissenschaft auf eine effiziente Therapie oder Diagnosemöglichkeit für PDAC gerichtet.

Besonders TEAD2 hat sich in unseren Studien als unabhängiger prognostischer Faktor für das *Gesamtüberleben* (OS) und das *krankheitsfreie Überleben* (DFS) bei PDAC-Patient:innen herausgestellt. Therapeutische Ansätze, die die Funktion der TEAD1–4-Transkriptionsfaktoren beeinflussen, könnten einen vielversprechenden Fortschritt in der Behandlung von PDAC darstellen. Hierzu zählen Strategien wie die direkte Hemmung bestimmter TEAD-Transkriptionsfaktoren, der Einsatz von spezifischen TEAD-Konkurrenten oder die Manipulation des *nucleocytoplasmatic shuttlings* (NCS), um TEAD1–4 im Zytoplasma zu sequestrieren. Diese therapeutischen Interventionen könnten sowohl auf Hippo/YAP-abhängige als auch auf unabhängige Regulationsmechanismen von TEAD1–4 abzielen. Weitere prospektive Studien sind erforderlich, um die Wirksamkeit und Sicherheit dieser Ansätze zu überprüfen.

Bei metastasiertem PDAC stellt zudem die Behandlung der Metastasen in der Leber häufig

Probleme dar. Für die Patient:innen werden zumeist Leberhypertrophie-Konzepte angewendet. Ein zweizeitiges Verfahren dafür ist die *Associating Liver Partition and Portal vein ligation for Staged hepatectomy* (ALPPS). Diese Technik induziert Leberegeneration unter anderem über eine Inaktivierung des Hippo-Signalwegs und begünstigt so die Zellproliferation der Hepatozyten. Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine erhöhte nukleäre Expression von TEAD1 und TEAD4 vor einer ALPPS-Operation mit einer beeinträchtigten Leberregeneration assoziiert ist. Zudem scheint die zytoplasmatische Expression von TEAD1 in Hepatozyten in nicht näher beschriebener Weise, das DFS zu beeinflussen. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von TEAD1–4 für die Regulation des Hippo-Signalweg Outputs und das Potential für die klinische Entscheidungsfindung, insbesondere bei der Planung von ALPPS-Operationen und der Vorauswahl bzw. Eignung von Patient:innen.

Ein detailliertes Verständnis der Rolle des Hippo-Signalwegs und der TEAD1–4-Transkriptionsfaktoren sowohl im Tumorgewebe als auch im Lebergewebe ist erforderlich, um deren weitreichende Bedeutung zu erfassen. Die Analyse der TEAD1–4-Expression und ihrer intrazellulären Verteilung könnte zukünftig als Marker für die prognostische Beurteilung und die individuelle Behandlungsplanung dienen. Besonders vielversprechend ist die Möglichkeit, die regenerative Kapazität der Leber vor einem operativen Eingriff zu bewerten, um das Risiko postoperativer Komplikationen zu minimieren. Diese Ansätze könnten nicht nur die Prognose von Patient:innen mit PDAC verbessern, sondern auch die Therapieplanung bei anderen Erkrankungen, die durch eine gestörte Regeneration oder Metastasierung gekennzeichnet sind, revolutionieren.

Abstract

Pancreatic carcinoma (PDAC) is increasingly regarded as a systemic rather than a local disease. The background for this viewpoint is the observation that metastasis in PDAC–patients begins very early. This is enabled by changes in the biochemical environment of organs other than the pancreas, particularly in the liver, and plays an important role in creating a suitable environment for metastasis. The *Hippo signaling pathway* (Hippo) is a central pathway for the regulation of cell proliferation, apoptosis, organ size, and organ homeostasis. Its role in the progression and metastasis of PDAC is now well established. In its active state, the Hippo–signaling pathway inhibits the nuclear translocation of its effector, *yes-associated protein* (YAP), which slows the progression of PDAC and suppresses metastasis. However, once the pathway becomes inactive, YAP is no longer phosphorylated and translocates into the nucleus. There, it forms a complex with the *transcription factors of the TEAD family* (TEAD1–4). This complex is essential for the activation/transcription of target genes. Neither YAP nor TEAD1–4 alone possess sufficiently high transcriptional activity. The activated target genes can promote tumor growth, cell proliferation, and metastasis, emphasizing the central role of this signaling pathway in disease progression and regeneration. For years, scientific attention has been devoted to an efficient therapy or diagnostic option for PDAC.

In particular, TEAD2 has emerged in our studies as an independent prognostic factor for *overall survival* (OS) and *disease-free survival* (DFS) in patients with PDAC. Therapeutic approaches that influence the function of the TEAD1–4–transcription factors could represent a promising advancement in the treatment of PDAC. Such strategies include the direct inhibition of specific TEAD–transcription factors, the use of specific TEAD competitors, or the manipulation of *nucleocytoplasmic shuttling* (NCS) to sequester TEAD1–4 in the cytoplasm. These therapeutic interventions could target both Hippo/YAP-dependent and independent regulatory mechanisms of TEAD1–4. Further prospective studies are required to assess the efficacy and safety of these approaches.

In metastatic PDAC, the treatment of metastases in the liver frequently presents challenges. For these patients, liver hypertrophy concepts are commonly employed. A two-stage procedure for this is the *Associating Liver Partition and Portal vein ligation for Staged hepatectomy* (ALPPS). This technique induces liver regeneration, among others, via inactivation of the Hippo–signaling

pathway and thereby facilitates the proliferation of hepatocytes. Our results show that increased nuclear expression of TEAD1 and TEAD4 prior to an ALPPS-operation is associated with impaired liver regeneration. In addition, cytoplasmic expression of TEAD1 in hepatocytes appears to influence DFS in ways not yet clearly described. These findings underscore the importance of TEAD1–4 in regulating the Hippo–signaling pathway output and its potential for clinical decision-making, especially in planning ALPPS operations and in the preselection or suitability of patients.

A detailed understanding of the role of the Hippo–signaling pathway and TEAD1–4 transcription factors in both tumor and liver tissue is necessary to grasp their far-reaching significance. Analysis of TEAD1–4–expression and their intracellular distribution could in the future serve as a marker for prognostic assessment and individualized treatment planning. Particularly promising is the possibility of assessing the regenerative capacity of the liver prior to surgical intervention in order to minimize the risk of postoperative complications. These approaches could not only improve the prognosis of patients with PDAC, but also revolutionize treatment planning in other diseases characterized by impaired regeneration or metastasis.

Danksagungen

Die letzten Jahre waren eine unglaubliche Reise – voller Herausforderungen, spannender Erkenntnisse, einiger Kehrtwenden und so mancher Nachtschicht. Ohne die Unterstützung vieler großartiger Menschen wäre ich nie so weit gekommen. Deshalb möchte ich hier ganz einfach „Danke“ sagen – an alle, die mich auf diesem Weg begleitet, motiviert und durch so manches Tief getragen haben.

Mein großer Dank gilt **Herrn Prof. Dr. Thorsten Burmester** und **Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. habil. Jonas Schmidt-Chanasit** für die engagierte Betreuung dieser Arbeit – weit über die eigenen Fachgrenzen hinaus. Trotz externer Anbindung, teilweise fachfremder Themen und des Wechsels durch eine Emeritierung haben mir beide stets mit Offenheit, Vertrauen und wertvoller Unterstützung zur Seite gestanden.

Ebenso danke ich **Prof. Dr. med. Karl J. Oldhafer** herzlich für seine fachliche Expertise und seine Bereitschaft, mir Freiraum und Vertrauen im Labor zu schenken. Seine stetige Unterstützung und Begleitung in allen Phasen dieser Arbeit haben mich nicht nur fachlich, sondern auch persönlich weitergebracht.

Mein herzlichster Dank gilt **Dr. rer. nat. Kai Jaquet** — ohne dessen “Biologen müssen zusammenhalten“-Mentalität hätte ich die Chance auf diese Promotion nie erhalten. Danke für alles, was ich durch Dich lernen durfte, für die anregenden Diskussionen, Deine fachlichen Einschätzungen und Deine nie nachlassende Ermutigung. Deine tägliche Kaffee-Routine und Dein unerschütterlicher Glaube an mich haben mich nicht nur fachlich, sondern auch persönlich tief geprägt.

Ein weiterer besonderer Dank gilt **Dr. med. Richard Drexler** für seinen unbändigen Wissensdurst und das stetige Streben nach Antworten auf unsere Hypothesen. Seine eigene Entschlossenheit und Sein Wissenshunger haben mich immer wieder motiviert.

Ein besonderes Dankeschön geht auch an **Manuela** für ihre wertvolle Hilfe und ihren unermüdlichen Einsatz beim “Blöcke-Suchen”. Vor allem aber danke ich ihr, dass sie die erste Anfrage zur Materialanforderung nicht weitergeleitet hat — so haben wir uns durch Zufall wiedergefunden und konnten unsere frühere Freundschaft durch diese Arbeit neu beleben.

Mein besonderer fachlicher und persönlicher Dank gilt auch **Dagmar** und **Mareike** für ihre engagierte technische und praktische Unterstützung während der gesamten Forschungsarbeit. Wir haben voneinander gelernt und gemeinsam aus den bescheidenen Möglichkeiten des Labors

das Beste gemacht. Auch wenn wir heute nicht mehr zusammen in einem Labor sitzen, hat mich unsere gemeinsame Zeit nachhaltig beeinflusst.

Ebenfalls danke ich herzlich **Maria M.**, die mir mit Freundlichkeit und Humor den letzten Motivationsschub fürs Finalisieren dieser Arbeit gegeben hat. Unsere kleine Wette, wer die eigene Abschlussarbeit zuerst einreicht, hat mir den entscheidenden Ansporn verliehen, die Arbeit endlich unter Dach und Fach zu bringen — danke für diese kleine, feine Challenge.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch **Björn** für das sorgfältige Korrekturlesen meiner Arbeit — trotz der thematischen Ferne hat er den Text mit wachem Blick und wertvollen Hinweisen bereichert. Seine konstruktiven Kommentare, sein Gespür für verständliche Sprache und sein Engagement haben mir in den letzten Schritten sehr geholfen.

Darüber hinaus möchte ich allen danken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben — insbesondere den *Asklepios Kliniken St. Georg und Barmbek* für die Bereitstellung der infrastrukturellen und personellen Voraussetzungen sowie der *Universität Hamburg* für die wissenschaftliche und organisatorische Begleitung meines Promotionsvorhabens.

Meinen Freunden danke ich für ihre Geduld, ihren unerschütterlichen Rückhalt und ihre stetige Motivation während dieser Zeit.

Meinen Eltern **Karin** und **Michael** danke ich von Herzen für ihre beständige und bedingungslose Unterstützung auf meinem gesamten Bildungsweg. Mit eurer vertrauensvollen Begleitung und der Selbstverständlichkeit, mit der ihr mir Möglichkeiten eröffnet und mich in allem gefördert habt, was mir wichtig war, habt ihr mir den Rücken gestärkt. Was ich erreicht habe, wäre ohne euch nicht möglich gewesen.

Maria:

“Danke für alles!”

Ohne deine Geduld, deine liebevolle Unterstützung und dein unermüdliches Engagement wäre diese Zeit in jeder Hinsicht nicht denkbar gewesen. Danke für deine Zuversicht, dein Lachen, deine Motivation und deine ganz persönlichen Sprichwörter, die mir immer wieder Kraft gegeben haben.

Deine Kraft und deine Art, an mich zu glauben, haben mich immer wieder beflügelt — ❤

Motte:

“Danke das es Dich gibt!”

Dein Strahlen schenkt mir Kraft und zaubert in jeden Tag etwas ganz Besonderes. Du bist mein Sonnenschein, der mich daran erinnert, wie schön und wertvoll die kleinen Momente sind. Sei bunt und laut und wunderbar — immer und überall 💜

Inhaltsverzeichnis

Publikationsliste	VII
Eidesstattliche Versicherung	IX
Erklärung zur Übereinstimmung von Druck- und Digitalfassung	XI
Zusammenfassung	XIII
Abstract	XV
Danksagungen	XVII
Inhaltsverzeichnis	XXI
Abkürzungsverzeichnis	XXIII
1 Einleitung	1
1.1 Das Adenokarzinom des Pankreas	1
1.1.1 Inzidenz	1
1.1.2 Aufbau und Mikroarchitektur des PDAC	1
1.1.3 Diagnose und Behandlungsmöglichkeiten	1
1.1.4 Metastasenbildung	2
1.2 Metastasen	3
1.2.1 Definition	3
1.2.2 Schritte der Metastasierung	3
1.3 Die Leber	5
1.3.1 Organbeschreibung	5
1.3.2 Funktion	6
1.3.3 Leberaufbau und Bestandteile	6
1.4 Leberregeneration	9
1.4.1 Regenerativ Aktive Komponenten	9
1.4.2 Wie regeneriert die Leber?	10
1.4.3 Behandlungskonzepte	11
1.5 Der Hippo-Signalweg	13
1.5.1 Aufgaben	13
	XIX

1.5.2	Bestandteile und Signalkaskaden	14
1.5.3	Haupteffektor YAP	14
1.5.4	Fehlregulation in der Tumorbilogie	14
1.6	TEAD	15
1.6.1	Aufbau und Funktion	15
1.6.2	Entwicklungsbiologische Aufgaben	15
1.6.3	Reaktionspartner und Aufgaben in der Leber	15
1.6.4	Regulatorische Prinzipien	17
1.6.5	Fehlregulation und die onkologischen Effekte	18
2	Ziele und Entwicklung der vorliegenden Arbeit	19
3	Publikationen	21
3.1	The clinical relevance of the Hippo pathway in pancreatic ductal adenocarcinoma	21
3.2	Association of subcellular localization of TEAD transcription factors with outcome and progression in pancreatic ductal adenocarcinoma	41
3.3	Transcription enhanced associate domain factor 1 (TEAD1) predicts liver regeneration outcome of ALPPS-treated patients	53
4	Diskussion	65
4.1	Der Hippo-Signalweg im Adenokarzinom des Pankreas	65
4.1.1	Aufgaben des Hippo-Signalwegs	65
4.1.2	Immunhistologische Analyse des Hippo-Signalwegs in PDAC	67
4.1.3	Prognostische Bedeutung der pLATS-, pYAP- und YAP-Expressionen . . .	67
4.1.4	Bedeutung der TEAD-Transkriptionsfaktoren und ihre intrazelluläre Lokalisation	69
4.2	TEAD 1–4 Expression in PDAC und Lebermetastasen	71
4.2.1	Intrazelluläre Lokalisation und prognostische Relevanz von TEAD in PDAC	71
4.2.2	Regulatorische Netzwerke und therapeutische Angriffspunkte der TEAD—Familie	75
4.2.3	Nukleäre Translokation von TEAD2, 3 und Auswirkungen auf Metastasierung und Leberfunktion	76
4.3	TEAD als möglicher Prognosefaktor in der Leberregeneration	77
4.3.1	TEAD-Expression in tumorfreiem Lebergewebe und Verlauf in ALPPS-Schritten	77
4.3.2	Einfluss von TEAD1 und TEAD4 auf Leberregenerationsmetriken	81
4.3.3	Prognostische Relevanz der TEAD Expression in gesundem Lebergewebe	83

5 Conclusion	85
Literaturverzeichnis	86
Abbildungsverzeichnis	107

Abkürzungsverzeichnis

Abk.	Deutsch	Englisch	Seite(n)
ABS.GR	Absolutes Leberwachstum	absolut liver growth	81, 83, 85
	assoziierte Leberpartition und	associating liver partition and	12, 13, 19, 80,
ALPPS	Pfortaderligatur zur	portal vein ligation for staged	82, 83, 85,
	zweizeitigen Leberresektion	hepatectomy	XIV–XVI
AP-1	Aktivator Protein 1	Activator protein 1	17
BMP	knochenmorphogenetisches Protein	bone morphogenetic protein	14
CAPRA	präoperativer ALPPS-Risiko-Score	Comprehensive ALPPS Preoperative Risk Assessment	83, 85
CT	Computertomographie	computed tomography	1
CTGF	Bindegewebswachstumsfaktor	connective tissue growth factor	73
			17, 65, 67–69,
DFS	krankheitsfreies Überleben	disease-free survival	71, 76, 81, 85, XIII–XVI
DH	Grad der Hyperthrophie	degree of hyperthrophy	81
DNA-BD	DNA-Bindungsdomäne	DNA binding domain	16, 75, 76
DTZ	disseminierte Tumorzelle	disseminated tumor cell	4
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor	epidermal growth factor	16
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor	epidermal growth factor receptor	10, 75
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition	epithelial-mesenchymal transition	2, 3, 15, 18, 73
EZM	extrazelluläre Matrix	extracellular matrix	1, 3
FLR	verbliebenes Restlebervolumen	future liver remnant	11–13, 83
FLRBWR	Verhältnis von zukünftigem Leberrest zum Körpergewicht	future liver remnant to bodyweight ratio	81, 83, 85
HCC	hepatozelluläres Karzinom	hepatocellular carcinoma	7
HER3	Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 3	Human epidermal growth factor receptor 3	18
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor	hepatocyte growth factor	10

Abk.	Deutsch	Englisch	Seite(n)
Hippo	Hippo-Signalweg	Hippo signaling pathway	13–16, 18, 19, 65–70, 74–78, 81, 82, 85, XIII–XVI
HSPCs	hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen	hematopoietic stem and progenitor cells	9
IL-10	Interleukin-10	interleukin-10	8
IL-6	Interleukin-6	interleukin-6	8, 9
IRS	Immunreaktiver-Score	Immunoreactivity Score	65, 74, 77
KCs	Kupffer-Zellen	Kupffer cells	6, 8–10
KGR	Kinetische Wachstumsrate	kinetic growthrate	81, 83, 85
LATS1/2	Tumorsuppressor-Kinase	large tumor suppressor kinase	14
LPS	Lipopolysaccharide	lipopolysaccharide	8
MMP	Matrixmetalloproteasen	matrix metalloproteinases	3, 8
MRT	Magnetresonanztomographie	magnetic resonance imaging	1
MRTF	Myokardin-assoziiertes Transkriptionsfaktor	myocardin related transcription factor	73
MST1/2	mammalische STE20-ähnliche Proteinkinase	mammalian STE20-like protein kinase	14, 67
NCS	Nukleozytoplasmatischer Transport	nucleocytoplasmic shuttling	17, 74–76, XIII, XV
Notch	Notch-Signalweg	Notch signaling pathway	14
OS	Gesamtüberleben	overall survival	15, 17, 65, 67–69, 71, 76, 85, XIII, XV
p38 MAPK	p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase	p38 mitogen-activated protein kinase	16, 17
PDAC	duktales Adenokarzinom des Pankreas	pancreatic ductal adenocarcinoma	1–3, 15, 18, 19, 65–67, 69–76, 85, XIII–XVI
PGEZ	Pankreasgang-Epithelzellen	pancreatic duct epithelial cells	2
PVE	Pfortaderembolisation	portal vein embolization	11, 12
PVL	Pfortaderligatur	portal vein ligation	11, 12

Abk.	Deutsch	Englisch	Seite(n)
ROR1	Rezeptor-Tyrosinkinase-ähnlicher Orphan-Rezeptor 1	Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1	18
T1c	TEAD1 im Zytoplasma	cytoplasmic TEAD1 expression	83
T1n	TEAD1 im Zellkern	nuclear TEAD1 expression	83
T4n	TEAD4 im Zellkern	nuclear TEAD4 expression	83
TAZ	Transkriptions-Coaktivator mit PDZ-Bindungsmotiv	transcriptional coactivator with PDZ-binding motif	10, 15, 16
TCF4	Transkriptionsfaktor 4	transcription factor 4	17
TEAD	TEAD-Transkriptionsfaktor	transcriptional enhanced associate domain factor	10, 14–19, 68–71, 73–83, 85, XIII–XVI
TEAD1–4	Familie der TEAD-Transkriptionsfaktoren	transcriptional enhanced associate domain factor family	15–18, 68–72, 74–79, 81–83, 85, XIII–XVI
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor β	transforming growth factor beta	14, 16, 75, 85
TLR	toll-ähnlicher Rezeptor	toll-like receptor	8
TNF- α	Tumornekrosefaktor α	tumor necrosis factor alpha	9
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor	vascular endothelial growth factor	3, 4, 10
VGLL1–4	Mitglieder der vestigial-like Familie 1–4	vestigial-like family member 1–4	16, 17
WNT	WNT-Signalweg	wingless/int-1 signaling pathway or Wnt signaling pathway	14, 16, 17, 75, 85
YAP	yes-assoziiertes Protein	yes-associated protein	10, 14–19, 66–70, 74, 76, 78, 80, 81, XIII, XV
ZEB1	Zinkfinger-Enhancer-bindendes Protein 1	Zinc-finger-enhancer binding protein 1 or zinc finger E-box binding homeobox 1	73

1 Einleitung

1.1 Das Adenokarzinom des Pankreas

1.1.1 Inzidenz

Das *duktale Adenokarzinom des Pankreas* (PDAC) bleibt auch im Jahr 2025 eine schwer behandelbare und herausfordernde Erkrankung mit geringer Überlebenswahrscheinlichkeit. 10 von 100,000 Einwohner:innen erkranken pro Jahr neu und seit 2023 steht das PDAC in Deutschland an zweiter Stelle der krebsbedingten Todesursachen [1–3]. Die Inzidenz nimmt in den letzten Jahren zu und die 5-Jahres-Überlebensrate hat sich seit Langem nicht signifikant verbessert und liegt nur zwischen 5–8 %. Die operative Resektion stellt nach wie vor die einzige kurative Behandlungsmethode dar [1, 3–5].

1.1.2 Aufbau und Mikroarchitektur des PDAC

Das PDAC ist makroskopisch ein unscharf begrenzter solider Tumor. Das Gewebe ist aus atypisch konfigurierten, deformierten und diffus verteilten Drüsen aufgebaut, die von einem desmoplastischen Stroma umgeben sind [6–8]. Das Stroma kann bis zu 90 % der gesamten Tumormasse ausmachen und besteht aus der *extrazellulären Matrix* (EZM) und anderen Zelltypen. Charakteristisch für das PDAC ist zudem eine inter- und intratumorale Heterogenität in Bezug auf das Wachstumsmuster, die Stromaeigenschaften und die zytologischen Charakteristika. Diese Heterogenität kann sogar bei aneinandergrenzenden Tumordrüsen beobachtet werden [7]. Je nach Phänotyp des Tumors sind auch andersartige Aufbauten zu beobachten. So ist zum Beispiel ein mesenchymaler Phänotyp mit einem einzellig-dissoziierten Tumormuster assoziiert [8, 9].

1.1.3 Diagnose und Behandlungsmöglichkeiten

Die Diagnose des PDAC erfolgt zumeist über bildgebende Verfahren wie *Computertomographie* (CT) oder *Magnetresonanztomographie* (MRT), wobei hier zwischen Untersuchungen mit und ohne Kontrastmittelgabe unterschieden werden muss. Sowohl die kontrastmittelgestützte CT als auch die MRT ermöglichen eine hochgenaue Diagnostik des PDAC [8, 10]. Trotz stetiger Weiterentwicklung der bildgebenden Verfahren ist die histologische Diagnostik durch eine:n Patho-

login:en nach wie vor die einzige mikroskopische Validierungsmethode [8]. Da 50 % der Patient:innen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose schon hepatische Metastasen zeigen, erfüllen nur 15–20 % der diagnostizierten Patient:innen die Voraussetzung für eine kurative Behandlung [11, 12]. Jedoch hängen sowohl Therapie als auch Überlebenswahrscheinlichkeit der jeweiligen Patient:innen stark vom Krankheitsstadium bei Erstdiagnose ab [13]. Bisher gibt es keine wirksamen Früherkennungsmaßnahmen und 70 % der Patient:innen versterben an den Folgen der Metastasierung [14–16].

1.1.4 Metastasenbildung

Das PDAC ist ein sehr früh metastasierendes Karzinom, wobei 80 % der Metastasen sich in der Leber finden. Es sind auch Metastasen in Lunge, Peritoneum und Gehirn bekannt, jedoch sind die Lebermetastasen mit der schlechtesten Prognose assoziiert [17, 18]. Lange wurde eine bestimmte Kombination aus Schlüsselmutationen als Voraussetzung gesehen, um das Karzinom zur Metastasierung zu befähigen. Jedoch zeigen neuere Forschungsergebnisse, dass dieses Modell die sehr frühe und aggressive Metastasierung des PDAC nicht völlig erklären kann [19–22]. Rhim und Kolleg:innen konnten in einem endogenen PDAC-Mausmodell zeigen, dass schon prä-maligne *Pankreasgangepithelzellen* (PGEZ) eine phänotyp Veränderung von epithelial zu mesenchymal durchlaufen und so vom Pankreas in die Leber einwandern können [23]. Dieser fundamentale Prozess wird als *epitheliale-mesenchymale Transition* (EMT) bezeichnet. Die EMT ermöglicht es Epithelzellen, Teile ihrer charakteristischen Eigenschaften zu verändern. Dazu gehört die Auflösung von Zell-Zell-Verbindungen und der Verlust der Zellpolarität. Gleichzeitig entwickeln sie für Mesenchymzellen charakteristische Eigenschaften. Diese umfassen unter anderem die erhöhte Produktion von Matrixproteinen wie Kollagen und Fibronectin. Dadurch können die Zellen sich wie Mesenchymzellen durch das Gewebe bewegen. Dieser Mechanismus konnte anschließend durch Nachweis von zirkulierenden PGEZ auch in Menschen mit zystischen Pankreasläsionen nachgewiesen werden [24]. Diese Ergebnisse unterstreichen die Theorie der frühen Metastasierung des PDAC. Wie die PGEZ anschließend in der Leber solide Metastasen bilden, ist aktuell Gegenstand weiterer Forschung [23].

1.2 Metastasen

1.2.1 Definition

Metastasen sind Tochtergeschwülste des Primärtumors, welche durch frei zirkulierende Tumorzellen entstehen können. Während es für viele – lokal begrenzte – Primärtumore heute ein gutes und mitunter nicht lebenslimitierendes Behandlungskonzept gibt, ist die Bildung von Metastasen durchweg mit einer zum Teil deutlich schlechteren Prognose assoziiert [25]. Die meisten Patient:innen sterben eher durch die Metastasen als durch den primären Tumor selbst [26]. Metastasierung ist ein organselektiver, mehrstufiger Prozess, welcher mit frei zirkulierenden Tumorzellen startet und mit einer Tochtergeschwulst des Tumors an neuer Position endet [27]. Bei dem Vorgang der Metastasierung werden zwei grundlegende Arten unterschieden, die lymphogene und die hämatogene Metastasierung.

Speziell beim PDAC werden entweder die Lymphknotenstationen im peripankreatischen Fettgewebe infiltriert (lymphogene Metastasierung) oder die zirkulierenden Tumorzellen gelangen über das hämatogene System in die Leber (hämatogene Metastasierung). Auch Metastasen in der Lunge, im Skelett oder seltener dem Gehirn sind bekannt, jedoch zählt die Lebermetastase zu den häufigsten des PDAC [28].

1.2.2 Schritte der Metastasierung

1.2.2.1 Zell Flucht

Damit Tumorzellen zu zirkulierenden Tumorzellen werden können, müssen sie den soliden abgegrenzten Tumor verlassen. Sie verlassen den epithelialen Zellverband und nehmen mittels EMT einen mesenchymalen Phänotyp an (Abbildung 1.1; a). Die EMT beinhaltet unter anderem das Auflösen interzellulärer Kontakte und die Sekretion von *Matrixmetalloproteasen* (MMP), welche wiederum die Degradation der Basalmembran und der EZM begünstigen (Abbildung 1.1; b) [22, 27].

1.2.2.2 Intravasion

Durch Tumorangiogenese und neoplastische Zellen, welche den *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) sezernieren, wird das Einwachsen von Kapillaren in den Tumor gefördert. Die Tumorkapillaren unterscheiden sich grundlegend von physiologischen Blutgefäßen, da ihre Wand-

struktur durchlässiger ist. Diese vaskuläre Permeabilität wird durch Exosomen von tumorassoziierten Fibroblasten erhöht. Die mesenchymalen Tumorzellen gelangen so in die Blutzirkulation (Abbildung 1.1; c) [27, 29].

1.2.2.3 Überlebensstrategien

In der Zirkulation angelangte Tumorzellen interagieren mit tumorassoziierten Fibroblasten, neutrophilen Granulozyten und Blutplättchen, um die Immunflucht zu fördern. Sie bilden einen Embolus und haben zudem die Fähigkeit, den Anoikis-Zelltod zu verhindern (Abbildung 1.1; d) [27].

1.2.2.4 Extravasation

In den Kapillaren des Sekundärorgans ermöglicht das Anbinden an das Endothel mittels Liganden-Rezeptor-Interaktion das Einwandern der zirkulierenden Tumorzelle (Abbildung 1.1; e). Alternativ kann die Zelle auch über die Expression von VEGF eine Hyperpermeabilität des Endothels induzieren (Abbildung 1.1; f) [29].

1.2.2.5 Metastasierung

Im Sekundärorgan angekommen, können mehrere verschiedene Verläufe beobachtet werden:

1. Die *disseminierte Tumorzelle* (DTZ) geht für eine unbestimmte Zeit in eine Ruhephase (Dormanz) und wird erst wieder reaktiviert, wenn es zu einer tumorinduzierten Veränderung der Mikroumgebung innerhalb des Sekundärorgans kommt oder die Zelle intrinsische Adaptionsprozesse durchläuft.
2. Die DTZ wird mit einer lokalen Immunzelle konfrontiert und eliminiert.
3. Die DTZ ist nach Einwanderung in das Sekundärorgan direkt perfekt angepasst und beginnt zu proliferieren (Abbildung 1.1; g) [25, 30].

Zusammen betrachtet ist der Prozess der Invasions-Metastasierung höchst ineffizient. Weniger als 0,01 % der zirkulierenden Tumorzellen bilden eine klinisch detektierbare Metastase aus [22, 31].

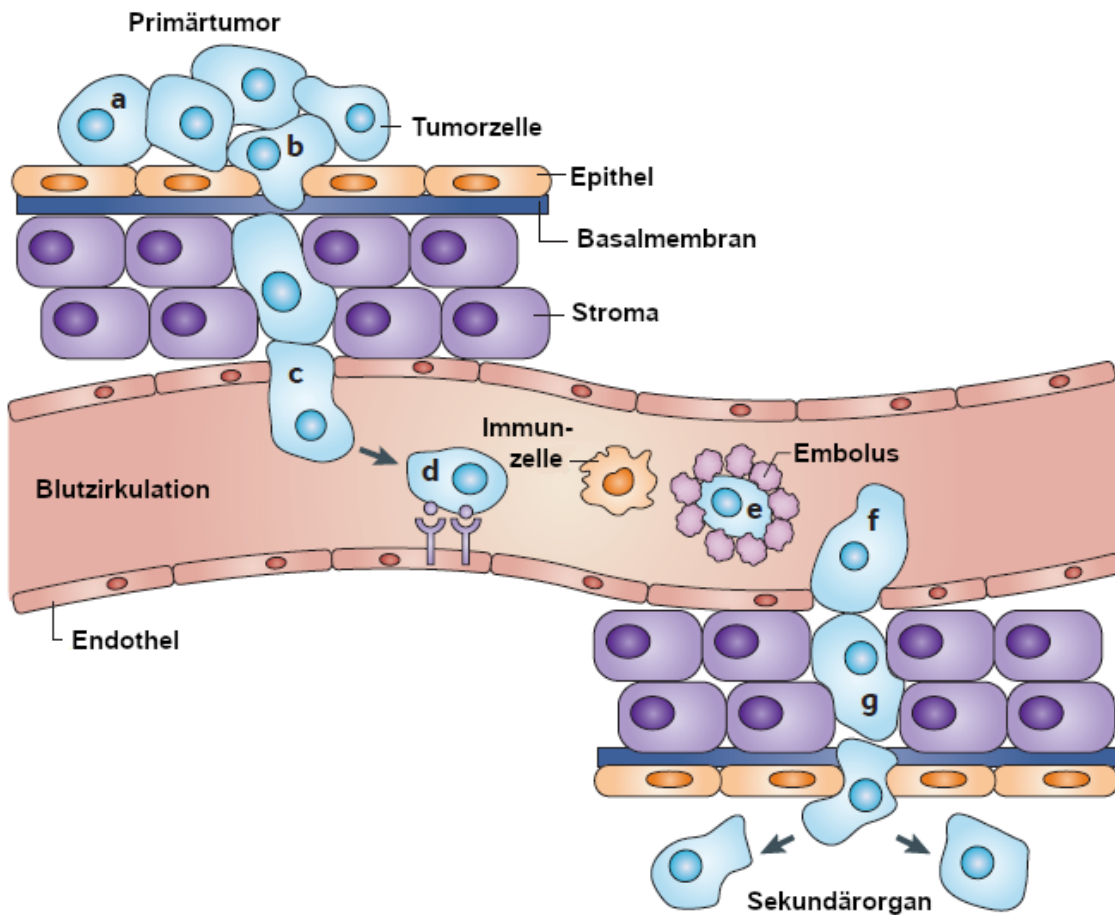


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Invasions-Metastasierungskaskade von Karzinomen. **a** Solide Tumorzellen lösen sich aus dem Zellverband und durchlaufen eine epitheliale zu mesenchymale Transition. **b** Durch Sezernierung von Matrixmetalloproteinasen dringen die Zellen durch die Basalmembran in das Stroma ein. **c** Durch Tumorkapillaren und eine reduzierte Zellwandstabilität invasieren die mesenchymalen Tumorzellen die Blutgefäße. **d** Zirkulierende Tumorzellen bilden einen Embolus und versuchen so ihre Immunflucht zu fördern. **e** Tumorzellen können durch Liganden-Rezeptorinteraktion an das Gefäßendothel binden und in Sekundärorgane einwandern. **f** Zirkulierende Tumorzellen können auch durch Extravasation im Kapillarsystem des Sekundärorgans einwandern. **g** Im Sekundärorgan kommt es zur Kolonisation und Metastasenbildung. Modifiziert aus [29].

1.3 Die Leber

1.3.1 Organbeschreibung

Die humane Leber ist im rechten Oberbauch lokalisiert und liegt zwischen dem Zwerchfell (kranial), der Gallenblase, der rechten Niere und der rechten Nebenniere (kaudal) sowie dem Duodenum, Magen und Ösophagus (medial). Sie ist beim Erwachsenen durchschnittlich 1,4–1,8 kg schwer, hat eine rötlich-braune Oberfläche, welche jedoch von einer derben Bindegewebskapsel umgeben ist, die wiederum gänzlich vom Bauchfell überzogen ist [28].

1.3.2 Funktion

Die Leber ist ein zentrales Stoffwechselorgan, welches auch als Speicher für Vitamine, Eisen, Kupfer, Lipide und Glykogen fungiert. Sie produziert Albumin und Gerinnungsfaktoren sowie verschiedene Hormone (Erythropoetin und Thrombopoetin) und Hormonvorstufen (z. B.: Angiotensinogen). Sie kann mittels des Glykogenstoffwechselweges sowohl den Blutzuckerspiegel senken (Glucose zu Glykogen umbauen und speichern) als auch wieder erhöhen (Glykogen zu Glucose umbauen und ans Blut abgeben), sofern Bedarf besteht. Zudem übernimmt die Leber wichtige Entgiftungsaufgaben im humanen System, z. B. durch den Harnstoffzyklus, welcher Ammoniak eliminiert, der beim Eiweißstoffwechsel anfällt und verstoffwechselt Alkohol, Medikamente, andere giftige Substanzen und ermöglicht deren Biotransformation und Exkretion. Sie produziert täglich bis zu 1,5 l Gallenflüssigkeit, welche über die feinen Gallengänge in die Gallenblase transportiert wird. Die Gallenblase fungiert als Zwischenspeicher und leitet die Galle in den Darm, wo sie sowohl der Exkretion von Stoffwechselendprodukten als auch der Aufnahme von Fetten im Darm dient [28].

1.3.3 Leberaufbau und Bestandteile

Die Leber kann entweder in vier Lappen unterteilt werden (rechter und linker Leberlappen, Lobus quadratus und Lobus caudatus) oder in acht Segmente, wobei diese durch den Verlauf der Pfortader und der Lebervenen bestimmt werden. Die Leber wird sowohl von einer Arterie (Arteria hepatica) mit sauerstoffreichem als auch von einer Vene (Vena portae) mit sauerstoffarmem, aber nährstoffreichem Blut versorgt. Die beiden Gefäße verästeln sich in den jeweiligen Lebersegmenten immer weiter, um in den Sinusoiden aufeinander zu treffen. Über eine erhöhte Membranpermeabilität an den Sinusoiden gewährleisten die einzelnen Leberparenchymzellen (Hepatozyten) die Aufrechterhaltung der verschiedenen Stoffwechselaufgaben der Leber. Über die Vena cava inferior wird das durch die Leber geleitete Blut wieder Richtung linker Vorhof (Herz) abtransportiert [32].

Auf zellulärer Ebene besteht das Leberparenchym aus Hepatozyten, Oval-Zellen, Makrophagen (Kupffer-Zellen (KCs) oder sternförmige Zellen), hybrid Hepatozyten, Gefäßzellen, Bindegewebe und anderen kleineren Zellpopulationen.

1.3.3.1 Hepatozyten

Hepatozyten stellen die Hauptzellart des funktionellen Lebergewebes dar [33, 34]. Sie können sowohl haploid (einfacher Chromosomensatz), diploid (doppelter Chromosomensatz) als auch polyploid (mehrfacher Chromosomensatz) vorliegen. Zudem muss zwischen mono-nuklearen (ein Zellkern) oder bi-nuklearen (zwei Zellkerne) Hepatozyten unterschieden werden. Die Rolle von Hepatozyten und ihre Polyploidie ist weitestgehender Konsens, jedoch ist immer noch unklar, wie genau die Multikern-Hepatozyten entstehen und welche Faktoren die Produktion unterstützen und begünstigen [35]. Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass für die Polyploidie von Hepatozyten die E2F Transkriptionsfaktoren und ihre Regulation der PIDDosomen verantwortlich sind [36]. Die genaue Regulation der Polyploidie und ihr physiologischer Vorteil sind bisher noch nicht vollständig verstanden. Es wird vermutet, dass mehrkernige Hepatozyten durch ein Tumorsuppressor-Reservoir vor Tumorgenese geschützt sind [37–39]. Dafür spricht, dass beim *hepatozellulären Karzinom* (HCC) die Anzahl der polyploiden Hepatozyten verringert und die Population der diploiden Hepatozyten erhöht ist [40, 41].

Während der Embryonalentwicklung induziert die Polyploidie von Hepatozyten eine Endpunktdifferenzierung und fördert so den Verlust von Pluripotenz. In Bezug auf die Leberregeneration konnte ein positiver Effekt von polyploiden Hepatozyten zumindest in der Mausleber noch nicht bestätigt werden [38]. Allerdings kann durch partielle Hepatektomie und anderem Verlust von Lebermasse die Anzahl von polyploiden Hepatozyten im Gewebe erhöht werden.

Hepatozyten sind regenerativ aktiv und können sich bis zu 69-mal teilen [33, 34]. Chen und Kolleg:innen (2020) konnten zeigen, dass nicht nur eine kleine stammzellähnliche Subpopulation von Hepatozyten zur Proliferation befähigt ist, sondern alle Hepatozyten dazu in der Lage sind [42]. Speziell die diploiden Hepatozyten können durch hypertrophes Wachstum bei Lebergewebeverlust regenerieren. So verändert sich die tumorsuppressive Wirkung der Leber in Abhängigkeit der Anzahl an polyploiden Hepatozyten [38, 42, 43]. Es gibt ebenfalls Nachweise, dass Hepatozyten in Cholangiozyten differenzieren können, um neue Gallengänge zu formen [44, 45] und Yimlamai et al. (2014) haben gezeigt, dass Hepatozyten zur Dedifferenzierung in Oval-Zellen und Progenitor-Zellen in der Lage sind [46].

Hepatozyten-Therapien werden schon seit 20 Jahren angewendet, um z. B. Metabolismus-Defekte bei Neugeborenen zu heilen oder um Patient:innen bei akutem Leberversagen zu therapieren [47, 48].

1.3.3.2 Oval-Zellen

Oval-Zellen wurden erstmals von Evarts und Kolleg:innen im Jahr 1993 beschrieben. Sie sind wenig differenziert, besitzen eine hohe Proliferationsfähigkeit und können in unterschiedliche Zelltypen differenzieren [49]. Sie können zumeist erst nachgewiesen werden, nachdem Hepatozyten ihre Teilungsfähigkeit durch Krankheit oder Stress eingebüßt haben [44, 50–52]. Sie werden als „putative hepatic stem cells“ bezeichnet und können sowohl in Hepatozyten als auch in Cholangiozyten differenzieren [51, 52].

1.3.3.3 Kupffer-Zellen

Kupffer-Zellen (KCs) machen 80 % bis 90 % aller Makrophagen und 35 % der nicht-parenchymalen Zellen in der Leber aus. Sie können über F4/80 und CD116 in zwei verschiedene Subgruppen (zirkulierende und festsitzende Zellpopulationen) eingeteilt werden [53–55]. Des Weiteren ist es möglich, den Entwicklungsstand der KCs (Monozyt zu Makrophage) über die Expression von Carboxypeptidase M und Chitotriosidase zu verfolgen und anhand der sezernierten MMP ihren Weg durch das Gewebe zu verfolgen [56].

Lange Zeit wurden die Lebermakrophagen als homogene Population angesehen (bezeichnet als: F4/80+-Zellen). Neuere Daten zeigen aber, dass es nicht nur entzündliche (M1) und entzündungshemmende (M2) Makrophagen gibt, sondern eine ausgeprägte Heterogenität bei der Entstehung und Funktion von Lebermakrophagen vorliegt [56]. Man unterscheidet heute zwischen Leber ansässigen, im Knochenmark entstandenen und elterlichen Makrophagen. Die Population der Lebermakrophagen besteht hauptsächlich aus leberresidenten Phagozyten. Diese haben ihren Ursprung im Dottersack, können aber auch aus dem Knochenmark rekrutierte Monozyten enthalten [57]. Beide Subpopulationen haben unterschiedliche Funktionen. Die KCs übernehmen eine Wächter- („Sentinel“) Funktion und sorgen für die Aufrechterhaltung der Homöostase, während die rekrutierten Monozyten eine wichtige Rolle in akuten und chronischen Erkrankungen der Leber spielen [57].

KCs exprimieren immunaktive sensorische Rezeptoren (*toll-like Rezeptors*, TLR) und können zum Beispiel über die Stimulation mit *Lipopolysacchariden* (LPS) an der angeborenen Immunabwehr teilnehmen und die proinflammatorischen Zytokine *Interleukin-6* (IL-6) und *Interleukin-10* (IL-10) produzieren [58]. IL-6 steuert die Produktion von Akut-Phase-Proteinen in Hepatozyten [59]. Meng und Kolleg:innen analysierten den Unterschied zwischen Hämatopoese und Lymphogenese in der erwachsenen Leber und im Knochenmark. Sie konnten zeigen, dass KCs durch

eine Wechselwirkung zwischen ICAM-1 und LFA-1 auch die Zell-Zell-Adhäsion fördern und so die Proliferation und Differenzierung adulter leberansässiger *hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen* (HSPCs) beeinflussen können. Die angeregten HSPCs differenzieren anschließend zu einem hohen Anteil in T- und B-Lymphozyten [60].

Auch in der Leberregeneration nehmen KCs eine Schlüsselposition ein, jedoch ist bisweilen nicht vollständig geklärt, ob sie bei jeglicher Regeneration der Leber eingeschaltet werden oder nur in bestimmten Regenerationsfällen wie nach einer Hepatektomie. Sie werden über *Tumor-nekrose-faktor- α* (TNF- α) angesteuert und beginnen IL-6 zu sezernieren, was den Übergang der Hepatozyten von der G0- zur G1-Phase induziert und die Hepatozyten-Proliferation fördert [61–63]. Dazu passt, dass inaktivierte KCs die Leberregeneration verlangsamen oder hemmen [64], wobei es hier auch konträre Ergebnisse mittels einer Studie von Kinoshita und Kolleg:innen gibt, in der gezeigt wurde, dass inaktivierte KCs die Leberregeneration fördern [65]. Konsens ist, dass KCs an der komplexen Signalübertragung beteiligt sind, es in der Leber aber unterschiedliche Mechanismen gibt, die eine Regeneration auslösen können.

Nicht-Parenchymzellen sind zudem entscheidend für die Signaltransduktion sowie für die Synthese und Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die eine komplexe und regulatorische Rolle im Prozess der Leberregeneration einnehmen [66–71].

1.3.3.4 Hybrid Hepatozyten

Hybrid Hepatozyten exprimieren unter anderem CD45 und CD31 auf ihrer Zelloberfläche und treten kurz nach der Geburt auf. Sie können bis zum Lebensende nachgewiesen werden. Sie zeigen sowohl spezifische Hepatozyten- als auch Cholangiozytengene [72]. Font-Burgada und Kolleg:innen (2015) konnten ein chronisches Leberschädigungsmodell in der Maus etablieren und nachweisen, dass neue Hepatozyten aus Hybrid Hepatozyten entstehen können [72].

1.4 Leberregeneration

1.4.1 Regenerativ Aktive Komponenten

Die Leber ist das einzige Organ im menschlichen Körper, welches seine eigene Zellmasse stetig regeneriert. Diese Regenerationsfähigkeit ist unter anderem wichtig, um die hohe Stoffwechselleistung der Leber aufrecht zu erhalten [73]. Heinke et al. (2022) konnten nachweisen, dass die meisten Leberzellen nicht einmal 3 Jahre alt sind und sich 70 % der Lebermasse jährlich erneu-

ert [73]. Die Regenerationsfähigkeit der Leber beruht auf dem Zusammenspiel verschiedener Komponenten, welche sich in mehrere Kategorien einteilen lassen:

- Zelltypen:
 - *Kupffer-Zellen* (KCs)
 - Hepatozyten
 - Oval-Zellen
 - Hybrid-Hepatozyten
- Zytokine:
 - *yes-assoziiertes Protein* (YAP)
 - *Transkriptions-Coaktivator mit PDZ-Bindungsmotiv* (TAZ)
 - β -Catenin
 - Notch-1
 - Smad7
- Wachstumsfaktoren:
 - *vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor* (VEGF)
 - *Hepatozyten-Wachstumsfaktor* (HGF)
 - *epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor* (EGFR)
- Signalwege:
 - Hippo-Signalweg
 - Notch-Signalweg
 - WNT-Signalweg
 - TGF- β -Signalweg
- Transkriptionsfaktoren:
 - *Transkriptionsfaktor der TEAD-Familie 1–4* (TEAD)

Alle Kategorien können von einzelnen oder mehreren Faktoren begünstigt werden und beeinflussen sich zum Teil gegenseitig [63, 74–76].

1.4.2 Wie regeneriert die Leber?

Kountouras und Kolleg:innen (2001) konnten im Tiermodell die wichtigsten Schritte der Leberregeneration aufzeigen. Nach einer Hepatektomie der Leber beginnen die Hepatozyten etwa 12–16 Stunden post-OP wieder mit der Synthese von DNA. Dieser Vorgang erreicht nach 24–48

Stunden sein Maximum. Die Hepatozyten beginnen sich zu teilen und regenerieren so die fehlende Lebermasse. Etwa 3–7 Tage nach der Hepatektomie ist die Lebermasse vollständig regeneriert. Die Hepatozyten-Teilung nimmt ab und die Bildung neuer Blutgefäße und Gallengänge beginnt. Das regenerierte Lebergewebe unterscheidet sich zu diesem Zeitpunkt morphologisch noch stark von einer funktionsfähigen Leber [77]. 8–10 Tage nach der Hepatektomie ist die Leberfunktion wieder vollständig hergestellt [35].

Bei histologischen Untersuchungen in der Rattenleber nach einer durch Hepatektomie induzierten Leberregeneration konnten Miyaoka und Kolleg:innen (2012) feststellen, dass einige der Hepatozyten zwar die Mitose durchlaufen, aber nicht die darauffolgende Cytokinese, und daraus eine vermehrte Anzahl an diploiden/binuklearen Hepatozyten resultiert [78]. Zudem konnte die gleiche Arbeitsgruppe im Mausmodell den Nachweis erbringen, dass die regenerative Antwort nach Hepatektomie durch die Größe des resezierten Gewebes variiert. Durch den Vergleich der Regeneration nach einer 30 % und einer 70 % Hepatektomie konnte gezeigt werden, dass die Leberregeneration nach einer 30 % Hepatektomie ausschließlich auf Hypertrophie der verbliebenen Hepatozyten beruht, während nach einer 70 % Hepatektomie es auch zur Teilung der Hepatozyten kommt [78]. Sofern die Teilungs- und Regenerationsfähigkeit der Hepatozyten erschöpft ist, beginnen andere Zelltypen die Regeneration der Leber zu unterstützen. So konnte nachgewiesen werden, dass bei Erschöpfung der Hepatozyten-Antwort die Oval-Zellen aktiviert werden (7 Tage) und anschließend binnen 7 Tagen zu neuen Hepatozyten differenzieren [79, 80].

1.4.3 Behandlungskonzepte

Die enorme regenerative Fähigkeit der Leber wird bei Leberteilresektionen zur Reduktion der Tumorlast verschiedener Tumore genutzt [81]. Ein wichtiger Faktor für einen erfolgreichen postoperativen Verlauf ist die Funktion des *verbliebenen Restlebertolumens* (FLR). Bei jungen und komplett gesunden Patient:innen sollte die FLR über 20 % liegen, bei Patient:innen mit Begleiterkrankungen und Veränderungen des Leberparenchyms über 40 %. Auch bei älteren Patient:innen sollte die FLR höher angesetzt werden. Bei Patient:innen mit nicht ausreichender FLR kommen Methoden zum Einsatz, die die Leberregenerationsfähigkeit ausnutzen und zu einer Zunahme der FLR führen (Hypertrophie-Konzepte). Nach entsprechender Hypertrophie kann die Leberresektion erfolgen und so ein postoperatives Leberversagen vermieden werden. Hierzu gehören klassischerweise die *Pfortaderembolisation* (PVE) und die *Pfortaderligatur* (PVL) [82].

Auch zweizeitige Leberresektionsverfahren gehören dazu. Sie sind besonders dann indiziert, wenn sich auch im FLR eine Tumormanifestation befindet. Beim klassischen zweizeitigen Vorgehen wird zunächst ein Leberlappen – am ehesten der Lappen mit der größten Tumorlast – reseziert und nach entsprechender Wartezeit der Tumor im verbliebenen Lappen entfernt [82]. Eine Alternative hierzu ist die Entfernung der Tumorlast im FLR und Ligatur der kontralateralen Pfortader im ersten Schritt, gefolgt von der Resektion des kontralateralen Leberlappens nach entsprechender Hypertrophie [83].

Ein daraus resultierendes zweizeitiges Verfahren ist die *assoziierte Leberpartition und Pfortaderligatur zur zweizeitigen Leberresektion* (ALPPS; Abbildung 1.2), welches einen In-Situ-Split mit Pfortaderdurchtrennung (zur Hypertrophieinduktion der FLR) beinhaltet und so eine signifikante Lebervolumensteigerung in kurzer Zeitperiode ermöglicht [83–85]. Bei Patient:innen mit Tumorlast im rechten Leberlappen und relativ kleinem linken Leberlappen ohne erhöhte Tumorlast kann die PVE oder PVL zur Induktion einer Hypertrophie der linken Leberhälfte genutzt werden. Ohne die Hypertrophie ist die Funktionalität des verbleibenden FLR nicht ausreichend. Nach einem kurzen Intervall (etwa 7–10 Tage) wird das FLR-Volumen mittels Lebervolumetrie und -funktionstests (z. B.: Limaxtest) gemessen. Bei ausreichendem Wachstum des FLR erfolgt der zweite Schritt – eine erweiterte Hemihepatektomie des tumortragenden rechten Lebergewebes.

ALPPS induziert Leberregeneration auch bei nicht resektablen Patient:innen [82]. Dieses Verfahren wird zumeist – aber nicht ausschließlich – bei Patient:innen mit kolorektalen Lebermetastasen verwendet, da es zudem auch sehr gute Ergebnisse bei onkologischen Charakteristika erzielt [86, 87]. Obwohl die Regenerationsfähigkeit der Leber seit Jahrzehnten umfassend untersucht wurde und bekannt ist, dass Hepatozyten 24 Stunden nach der Resektion zu proliferieren beginnen [88], ist wenig über die exakten Mechanismen nach ALPPS bekannt. Verschiedene Studien zeigen, dass die Leberregeneration nach einer größeren Leberresektion hauptsächlich innerhalb der ersten Woche auftritt [89, 90]. Analog dazu wurde eine Verlangsamung der Leberhypertrophie nach 7 Tagen auch nach dem 1. Schritt von ALPPS berichtet [91]. Anschließend wird der Funktionszugewinn immer geringer, je weiter sich die Leber auf ihre ursprüngliche Größe regeneriert [92].

Santibañes et al. (2016) konnten in einer klinisch-histologischen Studie zeigen, dass die Größe der Hepatozyten nach ALPPS zunahm [93]. Dies steht im Einklang mit der Theorie, dass die Zunahme der Zellgröße die erste Reaktion von Hepatozyten auf den Verlust der Lebermasse ist.

Die Reaktion erreicht einen Tag nach der partiellen Hepatektomie (PH) ihren Höhepunkt [78]. Die durch ALPPS gestartete FLR-Regeneration wird unter anderem durch die Inhibierung des *Hippo-Signalwegs* (Hippo) induziert, was zu einem hyperplastischen Wachstum der Hepatozyten-Population führt [94, 95].

Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS)

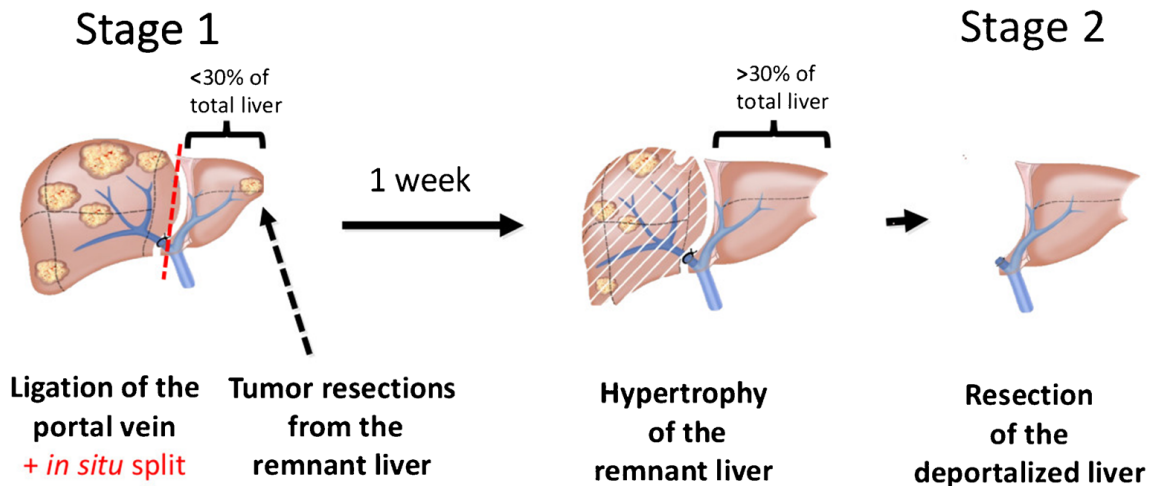


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der ALPPS Operationstechnik. Das Verfahren der assoziierten Leberpartition und Pfortaderligatur zur zweizeitigen Leberresektion (ALPPS) ist auch operativ ein zweizeitiges Hepatektomieverfahren. Im ersten Schritt wird der zukünftige Leberrest (*future liver remnant*, FLR) von Metastasen „gereinigt“. Anschließend erfolgt die Ligatur der Pfortader und die Durchtrennung des Lebergewebes. Nach einer etwa 14-tägigen Wartezeit und bei ausreichend regenerierter Leberfunktion wird im zweiten Schritt die deportalisierte Leber entfernt. [96].

1.5 Der Hippo-Signalweg

1.5.1 Aufgaben

Der *Hippo-Signalweg* (Hippo) hat je nach Entwicklungsstadium unterschiedliche Aufgaben. In der Embryonalentwicklung steuert er die Entwicklung von Organen. Er hemmt die Differenzierung, fördert die Proliferation, limitiert die Organgröße und steuert die Orientierung der Zellen entsprechend der späteren Körperachse [97–99].

Im Erwachsenenalter bestehen die Aufgaben des Hippo-Signalwegs zumeist in der Gewebehomöostase, der Aktivierung von adulten Stammzellen und dem Einleiten von Zellen in den programmierten Zelltod [99]. Sollte es zu einer Gewebeschädigung kommen, ist der Hippo-

Signalweg maßgeblich an der Regeneration des Gewebes und der Wundheilung beteiligt [98, 100].

1.5.2 Bestandteile und Signalkaskaden

Der Hippo-Signalweg besteht aus einem großen Netzwerk von Proteinen und umfasst eine Core-Kinase-Kaskade. Ist der Signalweg aktiv, phosphoryliert die *Serin/Threonin-mammalische STE20-ähnliche Proteinkinase* (MST1/2) über das Adapterprotein Salvador (Sav1) die *Tumorsuppressor-Kinase* (LATS1/2). Die so aktivierte LATS1/2 phosphoryliert allein oder mittels des Adapterproteins Mats (Mob1) das *yes-assoziierte Protein* (YAP), den Effektor des Hippo-Signalwegs [98, 99]. Phosphoryliertes YAP (pYAP) wird vom Zellkern ins Zytoplasma transportiert, wo sich pYAP mit dem 14–3–3-Protein anreichert, was zu einer zytoplasmatischen Sequestrierung führt [101–106]. Wenn der Signalweg inaktiv ist, unterbleibt die Signalkaskade und unphosphoryliertes YAP befindet sich im Zellkern und kann dort mit der *Transkriptionsfaktorfamilie der transcriptional enhanced associated domain factors 1–4* (TEAD) interagieren [107, 108].

1.5.3 Haupteffektor YAP

Yes-assoziiertes Protein (YAP) ist der Haupteffektor des Hippo-Signalwegs, hat aber ohne einen Co-Faktor nur eine sehr geringe Transkriptionsaktivität. Mittels eines passenden Co-Faktors kann ein Komplex gebildet werden, der es YAP ermöglicht, die Zielgentranskription auszuführen. Einer der bekanntesten Co-Faktoren für YAP ist die TEAD1–4-Familie [109]. Der YAP-TEAD-Komplex reguliert direkt die Expression von vielen zentralen Komponenten weiterer Signalwege wie z. B. WNT, TGF- β , Notch und BMP [47].

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zudem nachweisen, dass YAP eine Doppelfunktion übernimmt: Es fördert die Proliferation und hemmt die Apoptose [110]. Dies steht im Gegensatz zu klassischen Onkogenen, welche sowohl Proliferation als auch Apoptose fördern können. Gleichzeitig kann eine fehlregulierte YAP-Expression auch die Metastasierung fördern [111].

1.5.4 Fehlregulation in der Tumorbilogie

Mehrere Studien berichten von einer YAP-Überexpression bei Krebserkrankungen und zeigten erfolgreich, dass eine höhere Expression oder Aktivität von YAP mit einem schlechteren Patientenüberleben bei verschiedenen Tumorentitäten zusammenhängt [112–118]. Darüber hinaus

gibt es Hinweise darauf, dass allein YAP ausreicht, um die Krebsmetastasierung voranzutreiben [111, 119–130].

Speziell bei PDAC-Patient:innen scheint der Hippo-Signalweg eine Schlüsselrolle beim Fortschreiten der Erkrankung mit Metastasenbildung einzunehmen [131] und auch die Überexpression von YAP korreliert mit einem schlechteren *Gesamtüberleben* (OS) [132–135].

1.6 TEAD

1.6.1 Aufbau und Funktion

Es gibt vier verschiedene, hochkonservierte TEA-Domain Family Member Gene (TEAD1–4). Alle TEADs sind ubiquitär vorhanden und jedes einzelne TEAD hat eigene spezifische Expressionsverteilungen, was die Vermutung nahelegt, dass jedes TEAD für spezifische Aufgaben innerhalb der Zelle verantwortlich ist [136–139]. TEAD1–4 konnten in fast allen Säugetiergeweben nachgewiesen werden. Sie besitzen eine DNA-Bindestelle am N-Terminus und eine YAP-Bindestelle am C-Terminus (Abbildung 1.3) [108, 140, 141]. TEAD allein hat eine sehr geringe Transkriptionsaktivität [142, 143], kann aber mit einem geeigneten Co-Faktor verschiedene Gene transkribieren und so Zellgröße, -teilung, -migration, EMT und Gewebekomöostase beeinflussen [144, 145]. Auch hat TEAD eine ausschlaggebende Funktion beim Wechsel vom Zellteilungsmodus in die G0 Phase (arrested Cellcycle) [146] und zeigt gewebeabhängige Expressionsmuster [136–139].

1.6.2 Entwicklungsbiologische Aufgaben

Jedes Mitglied der TEAD-Familie hat sowohl entwicklungsbiologische als auch gewebespezifische Aufgaben [141, 147, 148]. Sie werden mit der Proliferation, der Embryonalentwicklung, der Kardiogenese, der Neuralleisten- und Notochord-Entwicklung in Verbindung gebracht [140, 149–151].

1.6.3 Reaktionspartner und Aufgaben in der Leber

Die Transkriptionsaktivität von TEAD1–4 ist weitestgehend gehemmt und stark von der Bindung an Co-Faktoren abhängig. Einer der bekanntesten Co-Faktoren ist YAP oder sein Paralog *Transkriptions-Coaktivator mit PDZ-Bindungsmotiv* (TAZ). YAP/TAZ sind die Haupteffektoren des Hippo-Signalwegs. Dessen Zielgene steuern unter anderem Organgröße und Geweberegeneration [152, 153]. Die Steuerung von YAP erfolgt über seinen Phosphorylierungsstatus. Ist YAP

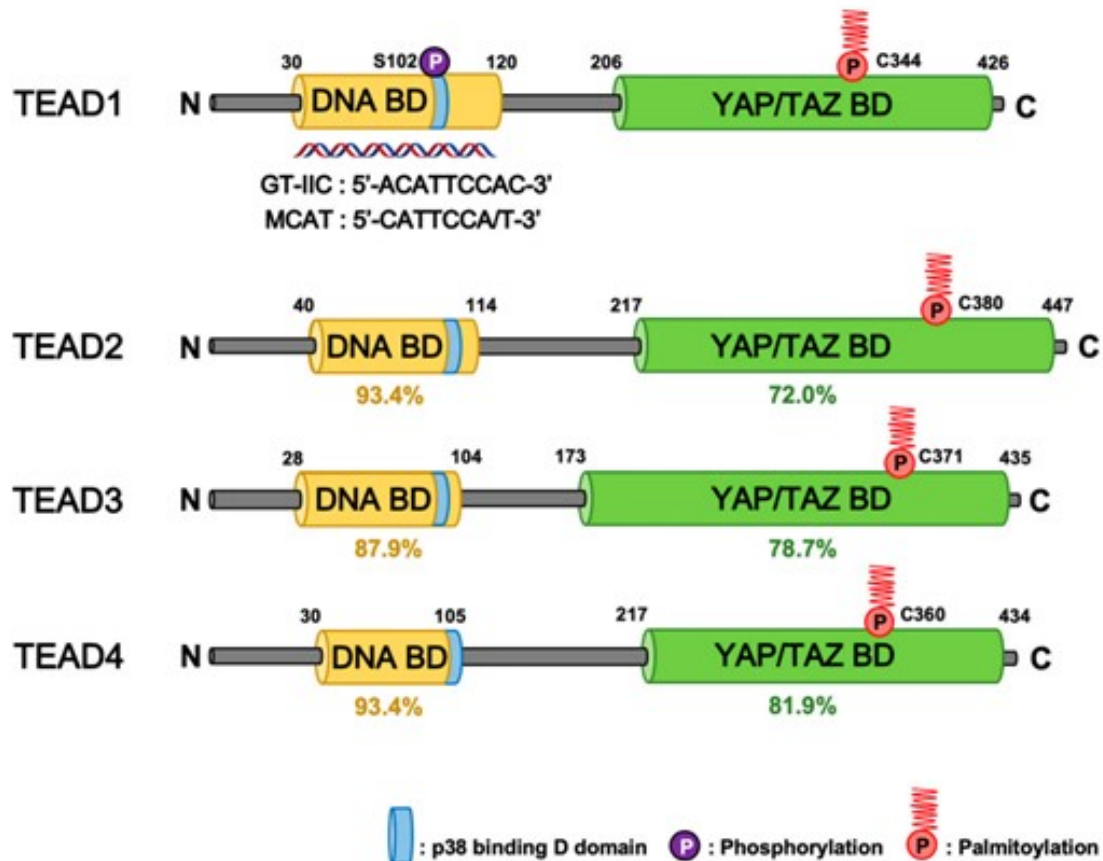


Abbildung 1.3: Aufbau und Domänenarchitektur der humanen Transkriptionsfaktoren der TEAD-Familie 1–4 (TEAD1–4). Am N-Terminus sitzt die DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) und am C-Terminus die YAP/TAZ-Bindungsdomäne (YAP/TAZ-BD). Innerhalb der TEAD-Familie weisen alle Bindedomänen eine hohe Ähnlichkeit auf. Bei TEAD2, 3, 4 gibt der Prozentsatz (%) die Ähnlichkeit von DNA-BD und YAP/TAZ-BD im Vergleich zu denen von TEAD1 an [108]. Zu den möglichen Modifikationen nach Translation gehören Palmitoylierung und Phosphorylierung, die in der YAP/TAZ-BD bzw. DNA-BD auftreten. Die Palmitoylierung ist für die ordnungsgemäße Funktion von TEAD erforderlich. Die zytoplasmatische Translokation von TEAD erfolgt durch Protein-Protein-Interaktion mit der *p38 Mitogen-aktivierten Proteinkinase* (p38 MAPK), die das p38-Bindungsmotiv innerhalb der DNA-BD aller TEADs bindet. Modifiziert, aus [144].

phosphoryliert befindet es sich im Zytoplasma und kann nicht in den Zellkern. Ist es unphosphoryliert bildet es im Zellkern mit TEAD einen Komplex und sorgt so für eine Transkription der Gene für Zellwachstum, Proliferation und Überleben [154–156]. Mittlerweile sind auch Hippo unabhängige Regulatoren und Modulatoren bekannt geworden. So ist die TEAD-Aktivität auch durch „upstream“ Signalwege wie WNT, TGF- β und *epidermaler Wachstumsfaktor* (EGF)-Signalwege beeinflusst [144]. Zudem ist der WNT Signalweg einer der am besten charakterisierten „upstream“ Signalweg, welcher TEAD reguliert [144, 157].

Die Vestigal-like Proteinfamilie (VGLL1–4) wurde ebenfalls als weiterer Co-Faktor für TEAD1–

4 nachgewiesen [158–161]. Studien konnten zeigen, dass durch die Bindung von VGLL1–4 an TEAD die YAP-Bindungsstellen am TEAD überlagert werden, was für eine Konkurrenz zwischen YAP und VGLL1–4 spricht [162, 163]. Neben dem Konkurrenzgedanken könnte es sich aber auch um eine funktionelle Auswahl des Bindungspartners von TEAD1–4 handeln, um bestimmte physiologische Prozesse zu begünstigen [164]. Der *Transkriptionsfaktor 4* (TCF4) konnte als Co-Faktor nachgewiesen werden und führt bei Bindung an TEAD4 zu einer Expression von Zielgenen des WNT-Signalwegs [165]. Die P160 Familie der Steroidrezeptoren wurde als Interaktionspartner nachgewiesen [166]. Auch das *Aktivator Protein 1* (AP-1) scheint ein wichtiger Co-Faktor für die Tumorprogression und das Tumorstadium zu sein [123, 167].

1.6.4 Regulatorische Prinzipien

Die Regulation von TEAD kann sowohl über Co-Faktoren erfolgen als auch über posttranslationale Veränderungen wie Phosphorylierung oder Palmitoylierung. Auch die Veränderung der intrazellulären Verteilung durch osmotischen oder oxidativen Stress der Mutterzelle, mechanische Faktoren und Zelldichte sind als Regulationsfaktoren beschrieben [107, 164, 168]. Die Lokalisation von TEAD1–4 wird hierbei durch p38 MAPK beeinflusst. Bei osmotischem Stress bindet sie direkt an TEAD und transportiert es aus dem Zellkern ins Zytoplasma [168, 169]. Eigene Arbeiten konnten eine signifikante Korrelation zwischen der intrazellulären TEAD1–4 Lokalisation, dem *krankheitsfreien Überleben* (DFS) und dem OS von Pankreaskarzinom-Patient:innen aufzeigen [170].

Darüber hinaus hat die Entdeckung der molekularen Mechanismen von TEAD, wie posttranslationale Modifikationen und *nukleo-zytoplasmatisches Shuttling* (NCS), die Bedeutung der Transkriptionsaktivität von TEAD1–4 unterstrichen [107, 148, 171, 172]. Es ist nur logisch, dass sich TEAD im Zellkern befindet, damit es mit verschiedenen Co-Faktoren interagieren und seine volle Transkriptionsaktivität entfalten kann. Es gibt ein breites Spektrum von Stressoren wie osmotischer Stress, hohe Zelldichte und Zellsuspension, die eine zytoplasmatische Translokation von TEAD1–4 induzieren [107]. Andere zelluläre Ereignisse wie Energiemangel, oxidativer Stress oder zytotoxische Agenzien führen zu einer Hemmung der TEAD1–4-Transkriptionsleistung, verändern jedoch nicht die subzelluläre Lage oder das Expressionsniveau von TEAD1–4 [144].

1.6.4.1 Intrazelluläre Verteilung

Es wird angenommen, dass TEAD1–4 das funktionelle Ergebnis des Hippo-Signalwegs über die intrazelluläre Lokalisierung reguliert [107] und sich der YAP-TEAD-Komplex nur im Zellkern bilden kann [173]. Allerdings gibt es hierfür auch gegenteilige Ergebnisse von Lin und Kolleg:innen [164]. Alle TEADs können im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert sein (eigene Daten), nur TEAD4 kann zusätzlich noch in den Mitochondrien nachgewiesen werden [140]. Die Regulation der intrazellulären Lokalisation ist nicht vollständig geklärt. Es gibt verschiedene Faktoren, die die TEAD1–4-Lokalisation beeinflussen:

- hyperosmotischer Stress [107, 168, 169]
- hohe Zelldichte und Zellablösung [164]

Im Fall von TEAD4 induzieren hohe TEAD4-Expressionsniveaus zudem die nukleäre Lokalisierung von TEAD4 [148].

1.6.5 Fehlregulation und die onkologischen Effekte

Überexpression von TEAD1–4 kann in verschiedensten Tumorentitäten wie z.B. Lungen-, Eierstock- und Brustkrebs nachgewiesen werden [174–178]. Die Aktivierung bestimmter TEAD-Zielgene steuert die Metastasierung verschiedener Tumorentitäten und geht mit einer schlechteren Überlebensprognose einher [179]. Bei Kolonkarzinomen kann die TEAD-abhängige Metastasierung sowohl über den Hippo-Signalweg als auch Hippo-unabhängig erfolgen. In beiden Fällen begünstigt eine Überexpression von TEAD1–4 die EMT als auch die Invasion von Tumorzellen, was wiederum die Metastasierungsaktivität begünstigt [123, 180]. In der Knochenmetastasierung induziert die TEAD-Aktivierung ROR1-HER3-vermittelte Osteoklastendifferenzierung über den Hippo-Signalweg [127]. Zudem konnten weitere Studien im PDAC zeigen, dass die Störung der YAP-TEAD-Interaktion therapeutische Bedeutung haben könnte, um Tumorzellwachstum und metastasierende Prozesse zu hemmen [181–183]. Gleichzeitig reguliert der YAP-TEAD-Komplex die Entstehung von multipotenten Pankreasvorläuferzellen [184].

2 Ziele und Entwicklung der vorliegenden Arbeit

Die hier vorgelegte kumulative Dissertation beschäftigt sich mit dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) und der Erstbeschreibung der Rolle des Hippo-Signalwegs im Fortschreiten der Erkrankung (Mitautorenschaft I [131]). Über die immunhistologische Expressionsauswertung aller wichtigen Hippo-Signalweg-Komponenten wurden wir auf die Expressionsverteilung der *transcription enhanced associated domain factor* (TEAD)-Proteinfamilie aufmerksam. TEAD 1–4 sind die Hauptkomplex-Bildungspartner vom *yes-assoziierten Protein* (YAP), dem Effektor des Hippo-Signalwegs. Bei mehrfach Färbungen mit Immunfluoreszenzfarbstoffen fiel uns die unterschiedliche Expression einzelner TEADs im Tumorgewebe und angrenzendem Lebergewebe auf. Wir postulierten eine Abhängigkeit der TEAD-Expression und ihrer Lokalisation im Hinblick auf den Fortschritt der Metastasierung des PDAC, woraufhin wir die Verteilung der TEAD-Expression und ihre prognostische Belastbarkeit in Bezug auf das Fortschreiten der PDAC-Metastasierung untersucht haben. Hierbei fiel ebenfalls eine Korrelation zwischen Primärtumor-TEAD-Expression und Metastasen-TEAD-Expression auf (Mitautorenschaft II, [170]). Bei den daraufhin durchgeführten immunhistologischen Untersuchungen stellten wir ebenfalls Expressionsunterschiede der TEADs in tumorfernem „gesunden“ Lebergewebe fest. Im Hinblick auf die eigentliche Funktion des Hippo-Signalwegs (Regenerations- und Organgrößenkontrolle) stellten wir die Vermutung auf, dass anhand der Expression und der Lokalisation der TEADs in tumorfreiem Lebergewebe Rückschlüsse auf die aktuelle regenerative Fähigkeit der Leber zum Zeitpunkt der Probennahme bestehen könnten. Es wurden Gewebeproben von 44 Patient:innen immunhistologisch untersucht, welche eine zweizeitige Leberresektion (ALPPS) erhalten haben (Erstautorenschaft, [185]).

3 Publikationen

3.1 The clinical relevance of the Hippo pathway in pancreatic ductal adenocarcinoma

Richard Drexler, **Mirco Küchler**, Kim C. Wagner, Tim Reese, Bernd Feyerabend, Moritz Kleine und Karl J. Oldhafer

Angenommen in *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*
(10. Oktober 2020)



The clinical relevance of the Hippo pathway in pancreatic ductal adenocarcinoma

Richard Drexler^{1,2} · Mirco Küchler^{1,2} · Kim C. Wagner^{1,2} · Tim Reese^{1,2} · Bernd Feyerabend³ · Moritz Kleine⁴ · Karl J. Oldhafer^{1,2}

Received: 23 September 2020 / Accepted: 10 October 2020
© The Author(s) 2020

Abstract

Purpose The Hippo pathway has broadened in cancer research in the past decade and revealed itself to be an important driver for tumorigenesis and metastatic spread. In this study, we investigated the clinical relevance of the Hippo pathway with regard to metastatic invasion, patients' outcome and histopathological features.

Methods Protein expression of components of the Hippo pathway were analyzed by immunohistochemistry (IHC) using paraffin-embedded tissue from 103 patients who had been diagnosed with pancreatic ductal adenocarcinoma and had undergone surgery. Results were correlated with clinicopathological data, disease-free and overall survival.

Results Immunohistochemistry studies in pancreatic tumour tissues revealed a significant upregulation of MST1, MST2, pLATS, pYAP and 14-3-3, representing the active Hippo pathway, in non-metastasized patients ($p < 0.01$). In turn, the pathway is more inactive in metastasized patients and relating liver metastases as LATS1, LATS2, YAP, transcriptional factors TEAD2 and TEAD3 were upregulated in these patients ($p < 0.01$). A higher pYAP expression was associated with a favorable OS and DFS.

Conclusion The Hippo pathway is inactive in metastasized patients releasing the pro-metastatic and proliferative potential of the pathway. Furthermore, our study underlines the prognostic relevance of the Hippo pathway as a shift in the balance towards the inactive pathway predicts an unfavorable OS and DFS.

Keywords Hippo pathway · Pancreatic cancer · Metastasis · PDAC · Prognosis

Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) remains a challenging disease with a poor prognosis. The 5-year survival rate is between 4 and 8% with surgical resection remaining the only curative option (Ilic and Ilic 2016; Ferlay et al. 2013). At the time of diagnosis only 15–20% of patients

are eligible for surgery and up to 50% of patients display hepatic metastasis (Siegel et al. 2018; Vincent et al. 2011). Ultimately 70% of the patients die from metastatic disease (Hogendorf et al. 2018; Ryan et al. 2014a, b).

The Hippo pathway consists of a large network of proteins, which control end organ size of different tissues, by regulating proliferation, cell growth, and apoptosis (Yu et al. 2015; Zhao et al. 2007; Saucedo and Edgar 2007). The pathway comprises of a core kinase cascade, starting with an activation of a pair of serine/threonine kinases mammalian STE20-like protein kinase (MST1/2), which activate another set of kinases, pair large tumour suppressor kinase (LATS). LATS1/2 phosphorylates the transcriptional activator Yes-associated protein (YAP), causing it to be transported from the nucleus to the cytoplasm. As a result, phosphorylated YAP (pYAP) accumulates with 14-3-3 protein, which causes cytoplasmatic sequestration (Boggiano et al. 2011; Poon et al. 2011; Glantschnig et al. 2002; Hergovich et al. 2006; Meng et al. 2015; Chan et al. 2005, p. 20). When the

✉ Richard Drexler
richard.drexler@semmelweis-hamburg.de

✉ Karl J. Oldhafer
k.oldhafer@asklepios.com

¹ Asklepios Campus Hamburg, Semmelweis University
Budapest, Hamburg, Germany

² Division of HPB Surgery, Department of Surgery, Asklepios
Hospital Barmbek, Hamburg, Germany

³ MVZ Hanse Histologikum GmbH, Hamburg, Germany

⁴ Department of General, Visceral and Transplant Surgery,
Hannover Medical School, Hannover, Germany

pathway is inactive, YAP can be found in the nucleus and interacts with transcription factors there, like TEAD 1–4 (Holden and Cunningham 2018; Lin et al. 2017a, b). The localization and phosphorylation of YAP are often used as a measure of Hippo pathway activity. Several studies prove that an overexpression of YAP is active in human cancer and successfully demonstrate that a higher expression or activity of YAP is linked with worse patient prognoses in various tumour entities (Wu et al. 2017; Poma et al. 2018; Yu et al. 2015; Harvey et al. 2013; Liu et al. 2018a, b; Zhang et al. 2015a, b; Zanconato et al. 2016). Furthermore, there is evidence that YAP is sufficient to drive cancer metastasis (Lamar et al. 2012; Nallet-Staub et al. 2014; Lau et al. 2014; Gu et al. 2016; Li et al. 2017, p. 1; Kim et al. 2017; Liu et al. 2016, p. 4, 2018a, b; Diepenbruck et al. 2014; Wang et al. 2018; Han et al. 2017, p. 16; Qiao et al. 2017; Zhou et al. 2016). In PDAC, the Hippo pathway has a pivotal role in disease progression, with formation of metastasis and YAP overexpression, which both correlate with an unfavorable OS (Xie et al. 2015; Salcedo Allende et al. 2017; Chen et al. 2015; Zhang et al. 2014). Here, we present the expression of all major proteins of the Hippo pathway in the largest trial population to date. The immunohistochemical results are linked with clinicopathological data including OS and DFS, which demonstrates the clinical impact of the pathway on patients with PDAC.

Materials and methods

Ethics approval

All patients' data were fully anonymized, and the study was performed according to the standards set in the Declaration of Helsinki 1975. The tumour tissue used was remaining from material that initially had been collected for diagnostic purposes. All diagnostic procedures had already been fully completed when the samples were retrieved for the study. The study was approved by the Ethics Committee Hamburg, Germany (approval number PV5510).

Patients' characteristics

A total of 103 patients (female, $n=51$; male, $n=52$; median age, 67.8 years) diagnosed with PDAC, all of whom had undergone surgery between 2010 and 2018 at the Department of Surgery, Asklepios Hospital Barmbek-Hamburg (Germany) were included. The diagnosis was histologically confirmed and TNM classification was assessed according to the AJCC 7th edition. The R-status was obtained pathologically via the circumferential resection margin. All patients had a follow-up either up to their death ($n=76$), or their most recent contact ($n=27$) on June 30, 2020.

Immunohistochemical analysis

Immunohistochemistry was employed to determine the intracellular localization and expression of all proteins. Immunohistochemical staining was performed using paraffin-embedded tissue. The tissue sections (4 μm) were deparaffinized in xylene and rehydrated in a descending alcohol set followed by heated antigen retrieval with 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0) or Tris–EDTA buffer (pH 8.0) for 5 or 30 min, respectively. Coverplates™ (ThermoFisher Scientific) were also used. Endogenous peroxidase activity was suppressed with Peroxide Block (Zytomed Systems). Primary monoclonal antibodies were diluted with Antibody Diluent (Zytomed Systems). Sections were covered with antibody and incubated at 4 °C for 24 h. Subsequently, ZytoChem Plus (HRP) Polymer Bulk Kit (Zytomed Systems) were used before staining with DAB (diaminobenzidin) Substrate Kit (Zytomed Systems). Gill's hematoxylin III (Carl Roth) was used as a counterstaining agent, including a 10 s hydrochloric acid bath (5%) for differentiation. Sections were then dehydrated and mounted with EcoMount (Zytomed Systems).

Following primary antibodies were used: MST1 (1:150, Abcam (UK), ab51134), MST2 (1:100, Abcam (UK), ab52641), LATS1 (1:150, Abcam (UK), ab234820), LATS2 (1:50, Abcam (UK), ab135794), pLATS1 + 2 (1:50, Abcam (UK), ab111344), YAP (1:100, Abcam (UK), ab52771), pYAP-S127 (1:100, Abcam (UK), ab76252), 14-3-3- σ (1:50, Abcam (UK), ab14123), TEAD1 (1:500, Abcam (UK), ab133533), TEAD2 (1:75, Abcam (UK), ab196669), TEAD3 (1:500, Abcam (UK), ab237766) and TEAD4 (1:250, Abcam (UK), ab97460).

Methods of evaluation

An immunoreactive score (IRS) was implemented for the evaluation of protein expression, which was based on the intensity and quantity of immune staining in the pancreatic cancer cells. The IRS score was applied as described by Kaemmerer and Remmele et al. (Kaemmerer et al. 2012; Remmele and Stegner 1987).

The intensity of staining was graded as negative (0), mild (1), moderate (2) and intense (3). The percentage of positive cells was evaluated as 0 (no positive cells), 1 (< 10% positive cells), 2 (10–50% positive cells), 3 (51–80% positive cells) and 4 (> 80% positive cells). The IRS score was obtained by multiplying these two individual scores. As a result, every tissue sample was classified into negative (IRS points 0–1), weak (2–3), mild (4–8) or strong (9–12). Two independent reviewers then evaluated the protein expression without prior knowledge of the patient characteristics.

Statistical analysis

Differences in continuous variables were analyzed with the Mann–Whitney *U* test and differences in proportions were analyzed with the Chi-square test or Fisher exact test. Overall and disease-free survival was evaluated with the Kaplan–Meier method. Univariate and multivariate Cox proportional hazards models were used to assess the effects of variables on OS and DFS and to also compute mortality hazard ratios (HR). The Spearman rank order correlation was used for the pairwise correlation analyses of expression between proteins. A two-sided *p* value less than 0.05 was considered as statistically significant. All analyses were performed using SPSS Inc. (Chicago, IL, USA).

Results

Study population

A total of 103 patients who had been diagnosed with PDAC and undergone surgery between 2010 and 2018 were enrolled in this study. The patients had a median age of 67.8 years and 51 were female (49.5%). Features are listed in Table 1. Eight patients (7.8%) received neoadjuvant chemotherapy with FOLFIRINOX due to locally advanced PDAC. The majority of the tumours was located in the pancreas head (78.6%). Due to the most common tumour location, a pancreaticoduodenectomy (PDPP) was performed in the most cases (67.9%). Most patients suffered from a T3 stage (67.9%), nodal-positive (75.7%) and poorly differentiated (65.0%) tumour. The study population included patients in all possible variations of tumour stages and progression. Forty-two patients (40.8%) suffered from metastatic disease at the time of surgery. Of these metastasized patients, the majority presented with liver metastases (83.3%), while four patients had distant lymph node metastasis (9.5%) and three patients had peritoneal carcinomatosis (7.2%). Seven of these patients were evaluated as not resectable during surgery. After surgery, 88 patients (85.4%) were treated with adjuvant chemotherapy, mainly gemcitabine.

Expression of kinases MST1/2, LATS1/2 and pLATS

The Hippo pathway comprises of a core kinase cascade, starting with the activation of a pair of kinases—MST1/2, which phosphorylate and activate another pair of kinases—LATS1/2. A positive expression of all kinases was found in the majority of cases: MST1 was found in 71.8%, MST2 in 84.5%, LATS1 in 89.3%, LATS2 in 66.0% and pLATS in 65.1%. MST1, MST2 and LATS1 expression was upregulated compared with the corresponding healthy pancreatic tissue ($p < 0.01$, Table 2). In contrast, pLATS was downregulated

in cancer cells ($p < 0.01$, Table 2). The association between the expression of kinases and tumour characteristics revealed significant correlations in our study (Table 1). In metastasized patients we observed a significantly lower IRS score of MST1, MST2 and pLATS ($p < 0.01$), which represents the active conformation of the Hippo pathway. In contrast, LATS1 and LATS2 were upregulated in metastasized patients ($p < 0.01$).

Of the metastasized patients, 29 corresponding liver metastases were examined. We did not find any significant difference between the expression of all kinases in pancreatic cancer cells of the metastasized primary tumour and the cells in the corresponding metastasis (Table 2). Notably LATS2 was expressed more frequently in the healthy liver tissue compared to the pancreatic cancer cells within the liver parenchyma (< 0.01).

Alongside the metastatic status, MST2 IRS score was found to be significantly lower in tumours with lymphatic invasion ($p = 0.04$) and in tumours with a diameter larger than 3.5 cm ($p < 0.01$). Furthermore, a lower IRS score of pLATS was significantly correlated with lymphatic invasion, nodal-positive and more undifferentiated tumours ($p < 0.01$).

Expression of YAP, pYAP and 14-3-3

Expression of pYAP was detected in the cytoplasm, while YAP was mainly expressed in the nucleus of pancreatic cancer cells (Fig. 1). Both components, YAP and pYAP, were upregulated in PDAC compared to the corresponding healthy pancreatic tissue ($p < 0.01$). We observed a higher IRS score of YAP in patients receiving neoadjuvant chemotherapy ($p < 0.04$, Table 1B).

A lower expression of pYAP and the interacting 14-3-3 protein in pancreatic cancer cells was associated with the presence of metastases at time of surgery ($p < 0.01$, Table 1B). In contrast, YAP was more frequently expressed in these metastasized patients ($p < 0.01$, Table 1B). As already elucidated with the upstream kinases LATS1, LATS2 and pLATS, there was no significant difference regarding the expression of YAP, pYAP and 14-3-3 between the metastasized primary tumour and the relating liver metastases. Furthermore, the proteins had a similar expression in the surrounding liver parenchyma (Table 2).

Expression of transcriptional factors TEAD1-4

In the inactive Hippo pathway, YAP is located in the nucleus and can interact with transcription factors TEAD1, TEAD2, TEAD3 and TEAD4 resulting in cell growth and proliferation. Therefore, we evaluated the nuclear expression of TEAD1, TEAD2, TEAD3 and TEAD4. All forms of TEAD were found to be upregulated in PDAC compared with corresponding healthy pancreatic tissue (Table 2).

Table 1 A, B Correlation between tumour characteristics and IRS score of major components of the Hippo pathway

(A) Feature	N	MST1					MST2					LATS1					LATS2					pLATS				
		0	1	2	3	p	0	1	2	3	p	0	1	2	3	p	0	1	2	3	p					
Gender	103																									
Female	51	13	14	17	7	0.68	8	8	26	9	0.82	4	18	20	9	0.27	17	13	19	2	0.22	15	12	18	6	0.61
Male	52	16	12	20	4		8	12	24	8		7	19	12	14		18	9	17	8		21	9	18	4	
Neoadjuvant chemotherapy	95	26	23	35	11	0.17	14	17	47	17	0.35	11	35	39	20	0.75	33	22	33	7	0.06	31	20	34	10	0.18
No	8	3	3	2	0		2	3	3	0		0	2	3	3		2	0	3	3		5	1	2	0	
Yes																										
Type of resection	70	17	18	26	9	0.39	13	12	34	11	0.89	8	23	26	13	0.41	24	18	25	3	<0.01	24	17	25	4	0.23
PPDP	18	9	4	4	1		2	4	9	3		2	6	4	6		4	1	7	6		8	2	6	2	
Left-sided resection	15	3	4	7	1		1	4	7	3		1	8	2	4		7	3	4	1		4	2	5	4	
Total pancreatectomy																										
Tumour pathological stage	8	4	0	4	0	0.55	0	3	2	3	0.35	0	3	4	1	0.47	4	0	3	1	0.33	2	0	4	2	0.11
T1	12	3	3	4	2		1	3	7	1		1	4	4	3		5	1	6	0		6	2	3	1	
T2	70	19	19	23	9		14	11	33	12		8	23	24	15		19	18	25	8		25	18	20	7	
T3	13	3	4	6	0		1	3	8	1		2	7	0	37		7	3	2	1		3	1	9	0	
T4																										
Nodal status	25	6	8	8	3	0.34	3	3	13	6	0.31	2	12	7	4	0.09	10	4	8	3	0.24	5	4	9	7	<0.01
N0	70	18	16	28	8		12	13	35	10		8	25	23	14		23	18	22	7		24	17	26	3	
N1	8	5	2	1	0		1	4	2	1		1	0	2	5		2	0	6	0		7	0	1	0	
N2																										
Metastatic status	61	4	11	35	11	<0.01	3	5	37	16	<0.01	11	34	13	3	<0.01	32	18	10	1	<0.01	2	14	35	10	<0.01
M0	42	25	15	2	0		13	15	13	1		0	3	19	20		3	4	26	9		34	7	1	0	
M1																										
Tumour differentiation	7	2	0	3	2	0.13	0	1	5	1	0.89	1	4	2	0	0.21	5	1	1	0	0.42	1	3	2	1	0.02
Well-differentiated	24	5	6	11	2		4	3	14	3		0	11	7	6		7	8	7	2		4	10	7	3	
Moderately differentiated	67	21	16	23	7		11	15	29	12		9	22	22	14		22	12	25	8		30	6	26	5	
Poorly differentiated	5	1	4	0	0		1	1	2	1		1	0	1	3		1	1	3	0		1	2	1	1	
Anaplastic																										
Lymphatic invasion	42	7	11	20	4	0.11	5	6	19	12	0.04	4	18	15	5	0.17	15	13	10	4	0.13	9	9	15	9	<0.01
L0	61	22	15	17	7		11	14	31	5		7	19	17	18		20	9	26	6		27	12	21	1	
L1																										
Perineural invasion	10	3	1	5	1	0.65	1	1	6	2	0.78	1	5	2	2	0.78	5	3	1	1	0.36	2	3	3	2	0.48
Pn0	93	26	25	32	10		15	19	44	15		10	32	30	21		30	19	35	9		34	18	33	8	
Pn1																										

Table 1 (continued)

(A) Feature	N	MST1			MST2			LATS1			LATS2			pLATS							
	103	0	1	2	3	p	0	1	2	3	p	0	1	2	3	p					
Venous invasion																					
V0	50	14	12	19	5	0.97	7	8	27	8	0.72	5	19	17	9	0.74					
V1	53	15	14	18	6		9	12	23	9		6	18	15	14						
Resection margin																					
R0	68	15	18	26	9	0.23	12	6	36	14	<0.01	8	27	22	11	0.21					
R1	35	14	8	11	2		4	14	14	3		3	10	10	12						
Tumour size [cm] ^a , median ±SMD: 3.5 ± 1.47																					
≤3.5	49	16	8	16	9	0.12	5	4	28	12	<0.01	6	15	19	9	0.14					
>3.5	34	10	10	13	1		3	13	15	3		3	14	6	11						
Tumour localization																					
Head	81	18	20	32	11	0.21	13	16	37	15	0.81	10	29	27	15	0.45					
Body	7	3	1	3	0		1	1	4	1		0	3	2	2						
Tail	11	6	3	2	0		2	1	7	1		1	4	3	3						
Body +tail	4	2	2	0	0		0	2	2	0		0	1	0	3						
(B) Feature	N	YAP			14-3-3			TEAD1			TEAD2			TEAD3			TEAD4				
	103	0	1	2	3	p	0	1	2	3	p	0	1	2	3	p	0	1	2	3	p
Gender																					
Female	51	15	8	15	13	0.61	16	13	17	5	0.49	11	7	28	5	0.31	16	21	13	0	0.58
Male	52	21	5	15	11		15	9	18	10		15	11	19	7		21	17	14	1	
Neoadjuvant chemotherapy																					
No	95	30	12	30	23	0.07	29	21	34	11	0.04	21	17	46	11	0.11	32	37	25	1	0.46
Yes	8	6	1	0	1		2	1	1	4		5	1	1	1		5	1	2	0	
Type of resection																					
PPDP	70	22	10	21	17	0.47	20	14	24	12	0.59	16	10	34	10	0.32	20	29	20	1	0.43
Left-sided resection	18	10	2	4	2		4	4	8	2		6	6	6	0		10	4	4	0	
Total	15	4	1	5	5		7	4	3	1		4	2	7	2		7	6	3	0	
pancrea-tectomy																					
Tumour pathological stage																					
T1	8	2	0	3	3	0.51	2	3	1	2	0.61	2	3	3	0	0.14	3	2	3	0	0.85
T2	12	5	2	2	3		3	3	3	3		4	0	8	0		3	7	2	0	
T3	70	27	9	18	16		21	12	28	9		18	14	30	8		26	23	20	1	
T4	13	2	2	7	2		5	4	3	1		2	1	6	4		5	6	2	0	

Table 1 (continued)

(B) Feature	N	pYAP			YAP			14-3-3			TEAD1			TEAD2			TEAD3			TEAD4																
	103	0	1	2	3	p	0	1	2	3	p	0	1	2	3	p	0	1	2	3	p	0	1	2	3	p										
Nodal status																																				
N0	25	8	2	6	9	0.09	8	4	8	5	0.24	5	3	17	0	0.04	6	8	11	0	0.23	13	4	5	3	0.12	9	5	10	1	0.89	4	7	12	2	0.03
N1	70	24	8	24	14		22	15	26	7		17	15	28	10		29	25	15	1	23	22	17	8		21	19	27	3		26	26	18	0		
N2	8	4	3	0	1		1	3	1	3		4	0	2	2		2	5	1	0	1	2	5	0		3	1	3	1		4	1	3	0		
Metastatic status																																				
M0	61	8	3	27	23	<0.01	29	15	13	4	<0.01	3	9	37	12	<0.01	26	23	12	0	0.12	31	17	11	2	<0.01	26	19	16	0	<0.01	23	23	14	1	0.12
M1	42	28	10	3	1		2	7	22	11		23	9	10	0		11	15	15	1	6	11	16	9		7	6	24	5		11	11	19	1		
Tumour differentiation																																				
Well-dif- erentiated	7	1	0	3	3	0.53	2	1	2	2	0.84	1	2	4	0	0.64	3	3	1	0	0.61	5	1	1	0	0.02	5	1	1	0	0.34	2	1	3	1	0.24
Moderately differenti- ated	24	7	1	9	7		8	6	9	1		4	5	11	4		8	10	5	1	8	6	7	3		10	5	9	0		10	8	6	0		
Poorly dif- ferentiated	67	26	11	17	13		19	15	22	11		20	9	31	7		24	22	21	0	24	21	14	8		16	18	28	5		19	23	24	1		
Anaplastic	5	2	1	1	1		2	0	2	1		1	2	1	1		2	3	0	0	0	0	5	0		2	1	2	0		3	2	0	0		
Lymphatic invasion																																				
L0	42	8	4	15	15	0.01	11	12	10	9	0.09	7	7	24	4	0.22	13	17	12	0	0.67	17	12	8	5	0.58	15	10	16	1	0.75	10	15	15	2	0.16
L1	61	28	9	15	9		20	10	25	6		19	11	23	8		24	21	15	1	20	16	19	6		18	15	24	4		24	19	18	0		
Perineural invasion																																				
Pn0	10	2	2	5	1	0.29	4	1	1	4	0.06	2	1	6	1	0.81	3	4	3	0	0.96	6	2	2	0	0.34	5	3	2	0	0.42	4	3	3	0	0.94
Pn1	93	34	11	25	23		27	21	34	11		24	17	41	11		34	34	24	1	31	26	25	11		28	22	38	5		30	31	30	2		
Venous invasion																																				
V0	50	15	4	19	12	0.17	16	12	13	9	0.39	13	8	26	3	0.29	16	20	13	1	0.63	20	14	11	5	0.76	17	11	20	2	0.92	14	14	20	2	0.14
V1	53	21	9	11	12		15	10	22	6		13	10	21	9		21	18	14	0	17	14	16	6		16	14	20	3		20	20	13	0		
Resection margin																																				
R0	68	16	9	23	20	<0.01	24	12	21	11	0.26	13	13	34	8	0.25	25	25	17	1	0.88	28	16	18	6	0.37	24	17	24	3	0.69	24	20	22	2	0.55
R1	35	20	4	7	4		7	10	14	4		13	5	13	4		12	13	10	0	9	12	9	5		9	8	16	2		10	14	11	0		
Tumour size [cm] ^a , median ± SMD: 3.5 ± 1.47																																				
≤3.5	49	13	8	14	14	0.44	15	10	16	8	0.86	11	8	26	4	0.11	18	14	17	0	0.17	15	16	9	9	0.11	13	16	19	1	0.25	16	11	20	2	0.18
>3.5	34	14	3	10	7		9	9	12	4		9	7	10	8		13	15	6	0	11	8	13	2		12	6	13	3		11	14	9	0		

Table 1 (continued)

(B) Feature	N	pYAP			YAP			14-3-3			TEAD1			TEAD2			TEAD3			TEAD4																
		0	1	2	3	p	0	1	2	3	p	0	1	2	3	p	0	1	2	3	p															
		Tumour localization																																		
Head	81	24	12	25	20	0.23	26	18	25	12	0.24	18	12	39	12	0.45	23	34	23	1	0.26	31	23	21	6	0.16	28	23	27	3	0.12	27	27	26	1	0.09
Body	7	3	1	1	2		2	3	1	1		3	1	3	0		4	2	1	0		3	2	0	2		1	2	4	0		1	4	1	1	
Tail	11	7	0	4	0		3	1	5	2		3	4	4	0		7	1	3	0		2	1	5	3		4	0	6	1		6	2	3	0	
Body+tail	4	2	0	0	2		0	0	4	0		2	1	1	0		3	1	0	0		1	2	1	0		0	0	3	1		0	1	3	0	

IRS score: 0 negative, 1 weakly positive, 2 mildly positive, 3 strongly positive expression

^aData available for 83 patients (80.6%)

A significantly higher TEAD2 and TEAD3 expression was observed in metastasized patients ($p < 0.01$, Table 1B). No significant associations were found for TEAD1, while TEAD4 was more frequently expressed in nodal-negative tumours ($p = 0.03$, Table 1B).

The liver metastases showed similar intensities of expression, as found in metastasized primary tumours. However, TEAD1, TEAD2 and TEAD4, but not TEAD3, were upregulated in the liver metastases in comparison with the respective surrounding liver parenchyma (Table 2).

Activity of the Hippo pathway as an indicator for post-surgical prognosis

Data for overall survival was available for all 103 patients with 27 people (26.2%) living at the end of the study. Data regarding the time of recurrence was available to us for 84 of the patients and of these 84 patients, 56 patients (66.7%) suffered a recurrence. The majority (66.1%) had liver metastases. Seven patients suffered lung metastases (12.5%), five patients from peritoneal carcinomatosis (8.9%) and another seven patients from local recurrence (12.5%).

Focusing on the association between the activity of the Hippo pathway and the survival of the patients, we created a ratio of YAP and pYAP, which compared the IRS score directly between both parameters and is also representative of pathway activity. A higher IRS score of YAP than pYAP (YAP > pYAP) resulted in a significantly shorter OS with a median survival of 13.0 months. In turn, a pYAP > YAP ratio was prognostically favorable with a median OS of 28.0 months ($p = 0.003$, Fig. 2h). Furthermore, patients with a mildly or strongly positive IRS score of pLATS ($p = 0.037$, Fig. 2e) and pYAP ($p = 0.001$, Fig. 2f) had a significant longer OS. In contrast, an upregulation of transcription factor TEAD2 corresponds to a worse prognosis regarding the OS ($p = 0.025$, Fig. 2k). However, the YAP expression itself was not significantly associated with the OS ($p = 0.558$, Fig. 2g). In a multivariate analysis, pYAP expression (HR: 0.51; 95% CI 0.22–2.01; $p = 0.07$) and metastatic status (HR: 0.47; 95% CI 0.18–1.22; $p = 0.03$) was associated with OS (Table 3).

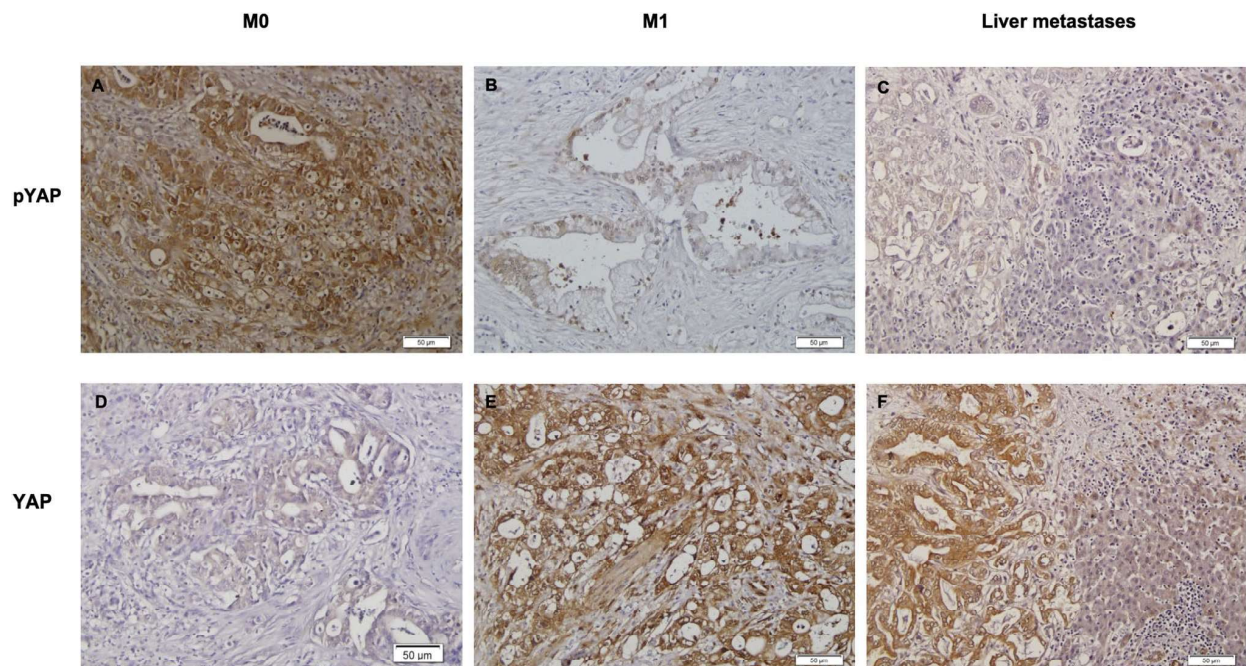
The activity of the Hippo pathway seems to be an important factor in predicting the time until recurrence. As observed for the OS, a YAP > pYAP ratio was significantly associated with a shorter DFS than a pYAP > YAP ratio ($p = 0.004$, Fig. 3h). The median DFS in patients with a higher IRS score of YAP was 9.0 months, as compared with 17.0 months in patients with a pYAP > YAP ratio. In addition, a negative or weakly positive IRS score of YAP itself was correlated with a shorter DFS ($p = 0.001$, Fig. 3g). Of all other components of the Hippo pathway, only LATS1 ($p = 0.013$, Fig. 3d) and TEAD1 ($p = 0.019$, Fig. 3k) had a statistical significance in predicting time until recurrence.

Table 2 Overview of Hippo pathway proteins in PDAC, corresponding pancreatic tissue, liver metastasis and surrounding liver tissue of metastasized patients

Antibody	PDAC	Healthy pancreatic tissue	<i>p</i>	PDAC	Liver metasta- sis	<i>p</i>	Liver metasta- sis	Healthy liver tissue	<i>p</i>
MST1									
Negative	29	18	<0.01	17	23	0.64	23	5	0.33
Weak	26	45		11	3		3	10	
Mild	37	35		1	2		2	8	
Strong	11	5		0	1		1	6	
MST2									
Negative	16	13	<0.01	9	16	0.08	16	13	0.19
Weak	20	20		11	11		11	15	
Mild	50	64		9	1		1	0	
Strong	17	6		0	1		1	1	
LATS1									
Negative	11	1	<0.01	2	1	0.89	1	1	0.83
Weak	37	34		6	7		7	8	
Mild	32	68		13	15		15	15	
Strong	23	0		8	6		6	5	
LATS2									
Negative	35	7	0.12	2	3	0.35	3	1	<0.01
Weak	22	38		5	10		10	5	
Mild	36	54		18	15		15	22	
Strong	10	4		4	1		1	1	
pLATS									
Negative	30	6	<0.01	23	23	0.58	23	10	0.08
Weak	12	25		6	3		3	7	
Mild	22	35		0	3		3	12	
Strong	10	8		0	0		0	0	
pYAP									
Negative	36	33	<0.01	18	20	0.15	20	18	0.72
Weak	13	38		8	7		7	9	
Mild	28	26		2	2		2	2	
Strong	23	3		1	0		0	0	
YAP									
Negative	31	48	<0.01	2	6	0.06	6	12	0.08
Weak	22	36		6	4		4	6	
Mild	35	19		15	13		13	11	
Strong	15	0		6	6		6	0	
14-3-3									
Negative	26	18	<0.01	16	21	0.58	21	11	0.08
Weak	18	27		6	6		6	12	
Mild	47	49		7	2		2	6	
Strong	12	9		0	0		0	0	
TEAD1									
Negative	37	60	<0.01	4	20	0.26	20	27	<0.01
Weak	38	32		9	5		5	2	
Mild	27	11		15	3		3	0	
Strong	1	0		1	1		1	0	

Table 2 (continued)

Antibody	PDAC	Healthy pancreatic tissue	<i>p</i>	PDAC	Liver metastasis	<i>p</i>	Liver metastasis	Healthy liver tissue	<i>p</i>
TEAD2									
Negative	37	45	<0.01	2	5	0.67	5	5	<0.01
Weak	28	23		9	6		6	11	
Mild	27	30		11	15		15	12	
Strong	11	5		7	3		3	1	
TEAD3									
Negative	33	72	<0.01	4	9	0.55	9	13	0.55
Weak	25	26		5	8		8	12	
Mild	40	5		16	11		11	4	
Strong	5	0		4	1		1	0	
TEAD4									
Negative	34	76	0.02	7	13	0.32	13	17	0.03
Weak	34	22		7	11		11	10	
Mild	33	5		15	5		5	2	
Strong	2	9		0	0		0	0	

**Fig. 1** a–f Immunohistochemical staining of pYAP and YAP. Representative images of pYAP and YAP in non-metastasized (a, d) and metastasized patients (b, e) with their corresponding liver metastases (c, f). Scale bar, 50 µm

Applying multivariate analysis, ratio YAP > pYAP (HR: 7.39; 95% CI 1.89–29.5; $p=0.005$), YAP expression (HR: 0.2; 95% CI 0.04–0.96; $p=0.04$), pYAP expression (HR: 5.55; 95% CI 1.09–28.4; $p=0.04$), tumour pathological

stage (HR: 3.23; 95% CI 1.57–6.63; $p=0.003$) and nodal status (HR: 0.09; 95% CI 0.03–0.36; $p=0.001$) was associated with DFS (Table 4).

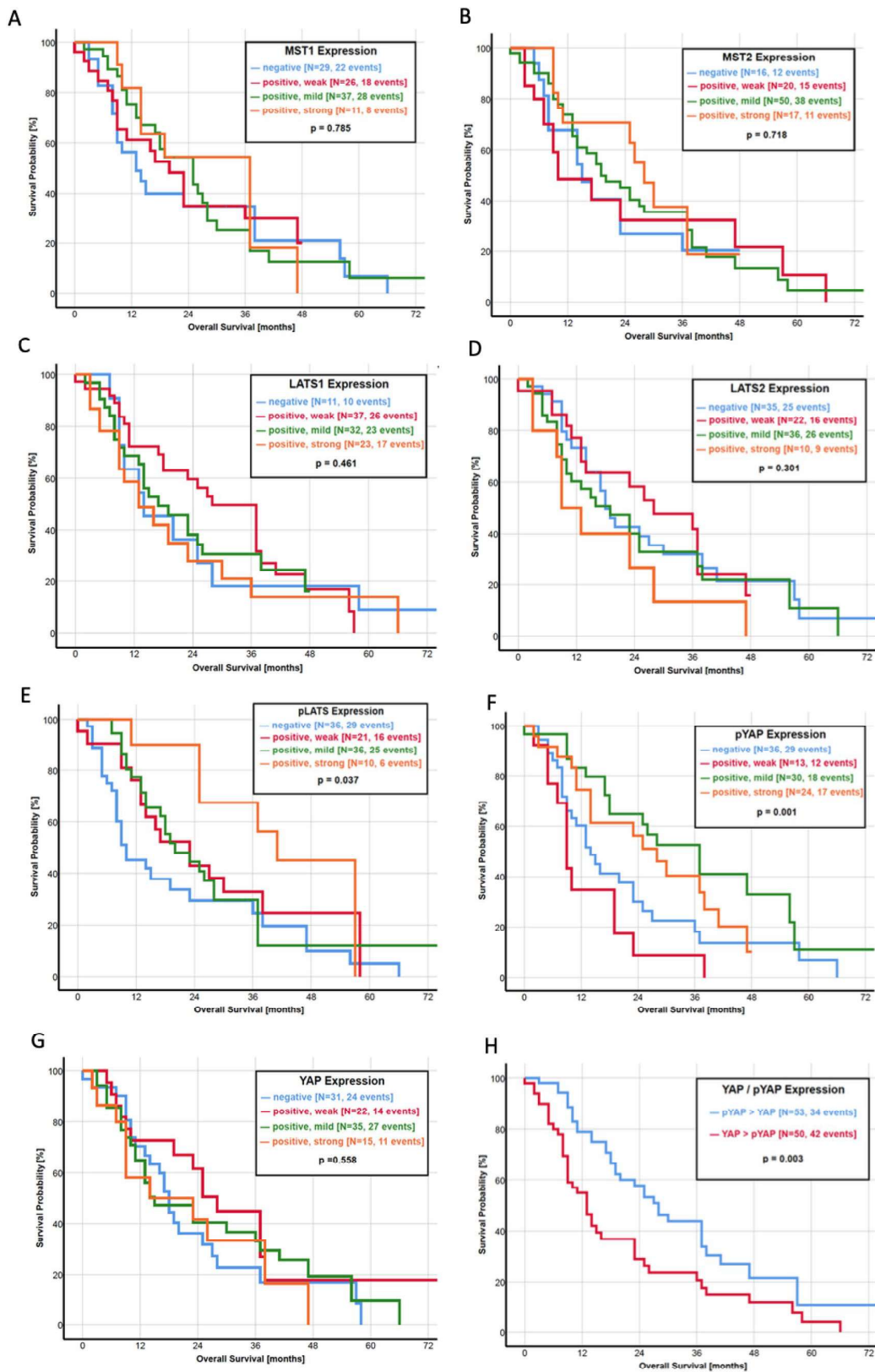


Fig. 2 **a–m** Kaplan–Meier curves of overall survival for each protein of the Hippo pathway. **a** MST1, **b** MST2, **c** LATS1, **d** LATS2, **e** pLATS, **f** pYAP, **g** YAP, **h** ratio YAP/pYAP, **i** 14-3-3 protein, **j** TEAD1, **k** TEAD2, **l** TEAD3 and **m** TEAD4

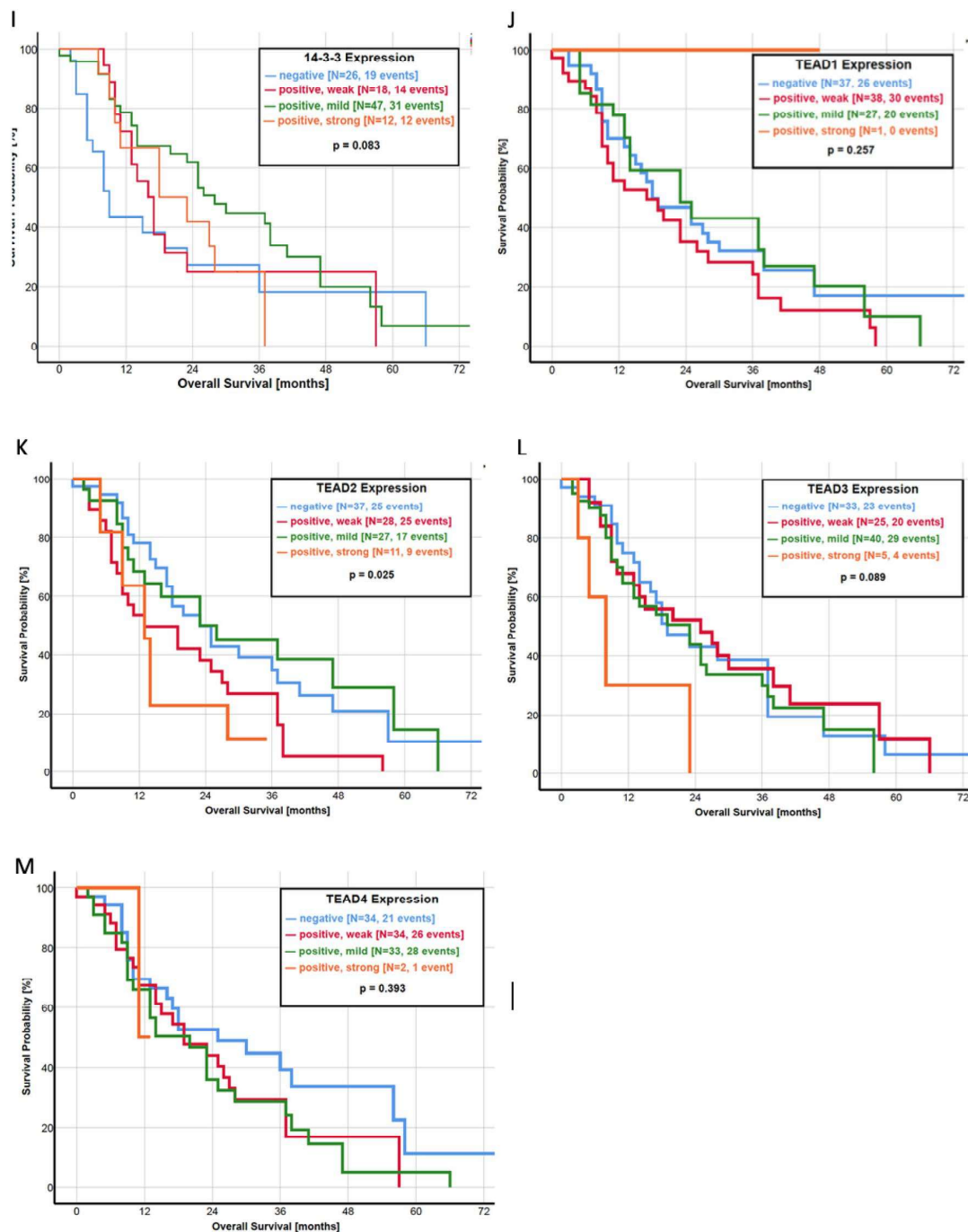


Fig. 2 (continued)

Discussion

PDAC is one of the most aggressive oncological diseases with limited therapeutic options for patients who often present with metastases at the time of diagnosis. This renders the prognosis by and large as unfavorable. Finding

an efficient therapy to inhibit further metastases remains an almost insurmountable challenge but is necessary for improving patient survival. Therefore, understanding the molecular mechanisms that underlie metastatic processes is fundamental. In our study, we used immunohistochemical techniques to assess expression levels of the most important

Table 3 Cox proportional hazard for overall survival ($n = 103$)

Variable	No.	Median OS [months]	Univariate		Multivariate	
			Hazard ratio (95% CI)	<i>p</i> value	Hazard ratio (95% CI)	<i>p</i> value
Ratio pYAP/YAP expression						
pYAP> YAP	53	19.0	1.00		1.00	
YAP> pYAP	50	13.0	1.34 (0.86–2.11)	0.20	1.57 (0.53–4.71)	0.42
YAP expression						
Negative	31	17.0	1.00		1.00	
Positive, weak	22	24.0	0.66 (0.34–1.28)	0.22	0.34 (0.13–0.89)	0.78
Positive, mild	35	14.0	0.89 (0.51–1.56)	0.69	1.19 (0.16–1.54)	0.12
Positive, strong	15	13.0	1.01 (0.52–2.20)	0.84	1.03 (0.19–2.43)	0.49
pYAP expression						
Negative	36	13.0	1.00		1.00	
Positive, weak	13	9.0	1.79 (0.90–3.56)	0.09	1.27 (0.49–3.24)	0.62
Positive, mild	28	25.5	0.47 (0.26–0.84)	0.01	0.41 (0.17–0.99)	0.04
Positive, strong	23	21.0	0.69 (0.36–1.23)	0.19	1.42 (0.40–4.96)	0.59
Tumour pathological stage						
T1	8	19.0	1.00		1.00	
T2	12	10.0	1.66 (0.39–6.97)	0.49	0.94 (0.19–4.47)	0.94
T3	70	9.0	2.64 (0.83–8.46)	0.10	1.30 (0.37–4.62)	0.69
T4	13	13.0	2.74 (0.75–10.1)	0.13	2.14 (0.56–8.23)	0.27
Nodal status						
N0	25	23.0	1.00		1.00	
N1	70	16.0	1.74 (0.95–3.19)	0.08	1.90 (0.94–3.85)	0.13
N2	8	9.0	2.85 (0.91–8.98)	0.07	3.09 (0.84–11.4)	0.52
Metastasis status						
M0	61	20.0	1.00		1.00	
M1	42	11.5	1.66 (1.05–2.62)	0.03	2.19 (0.71–6.83)	0.17
Tumour differentiation						
Well-differentiated	7	33.0	1.00		1.00	
Moderately differentiated	24	20.0	2.19 (0.72–6.65)	0.17	2.06 (0.58–7.33)	0.26
Poorly differentiated	67	14.0	3.10 (1.10–8.65)	0.03	2.65 (0.84–8.39)	0.09
Anaplastic	5	16.0	1.96 (0.43–8.87)	0.38	1.51 (0.28–8.23)	0.64
Resection margin						
R0	68	17.0	1.00		1.00	
R1	35	14.0	1.24 (0.77–2.01)	0.37	1.08 (0.61–1.92)	0.78

CI confidence interval

Hippo pathway components in 103 patients diagnosed with PDAC and treated with curative intention at our department. To the best of our knowledge, this is the largest cohort study investigating all major components of the Hippo pathway and correlating expression levels with clinicopathological results including OS and DFS.

The Hippo pathway is known for regulating cell proliferation, tissue homeostasis and organ size. Its role has broadened in cancer research in the past decade and it has been found to be a promoter of tumorigenesis and tumour migration (van Rensburg and Yang 2016; Han 2019; Moroishi et al. 2015; Lei et al. 2008). There is evidence that an inactivated pathway results in a higher nuclear YAP expression

and in turn an unfavorable prognosis. All of this incurs a higher probability of spread of metastases in numerous malignancies (van Rensburg and Yang 2016; Zygulska et al. 2017; Yu et al. 2015; Harvey et al. 2013). Focusing on PDAC, Allende et al. associated a YAP overexpression with liver metastases and a poorer survival under 30 months in 64 curative treated patients (Salcedo Allende et al. 2017). Furthermore, different studies emphasize the importance of a YAP-driven cancer progression in PDAC in vitro and in vivo (Xie et al. 2015; Yang et al. 2015; Diep et al. 2012; Kapoor et al. 2014).

Returning to our study, we observed a significant upregulation of nearly all Hippo pathway components, except

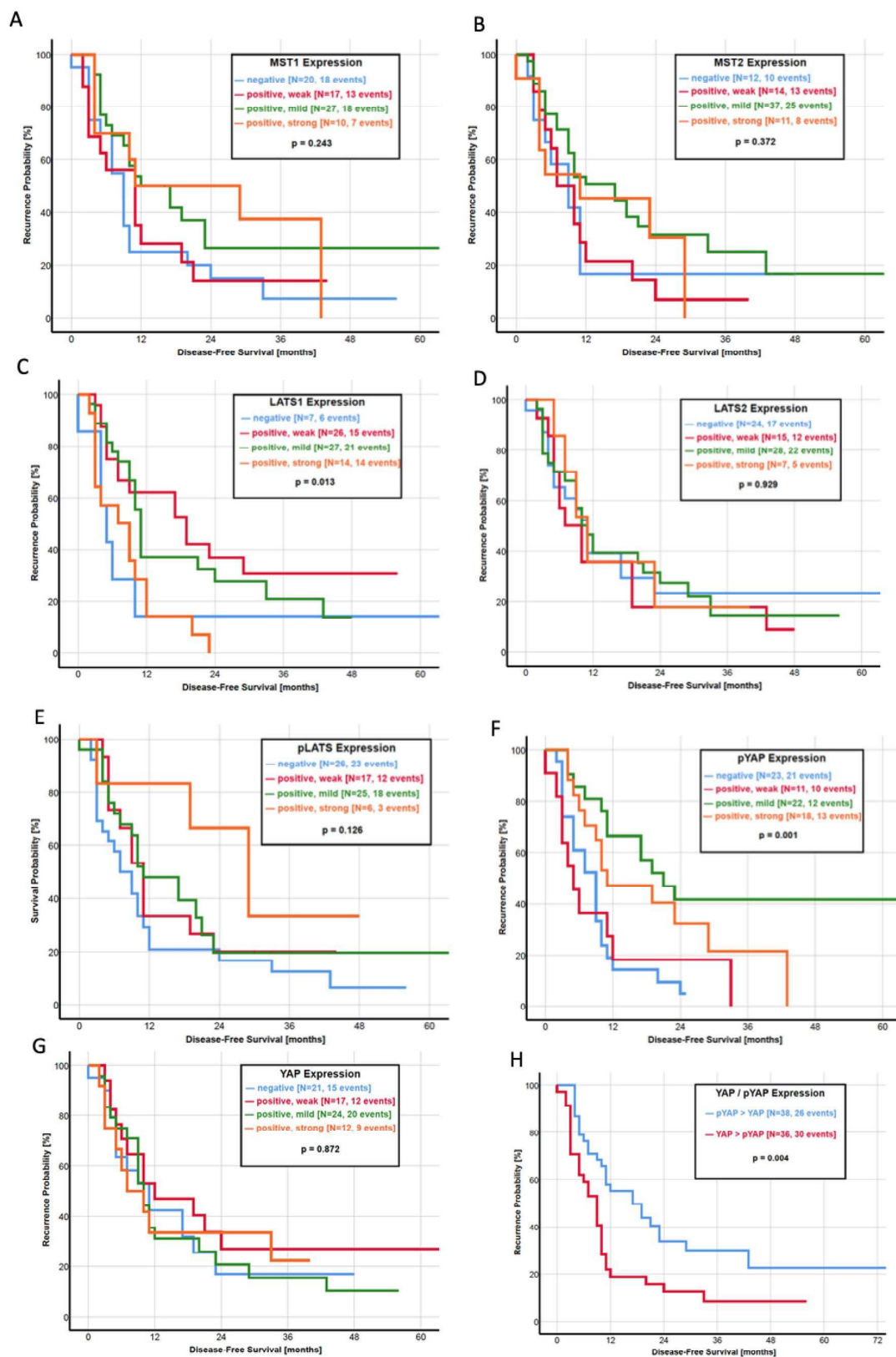


Fig. 3 a–n Kaplan–Meier curves of disease-free survival for HSP27 and each protein of the Hippo pathway. **a** HSP27, **b** MST1, **c** MST2, **d** LATS1, **e** LATS2, **f** pLATS, **g** pYAP, **h** YAP, **i** ratio YAP/pYAP, **j** 14-3-3 protein, **k** TEAD1, **l** TEAD2, **m** TEAD3 and **n** TEAD4

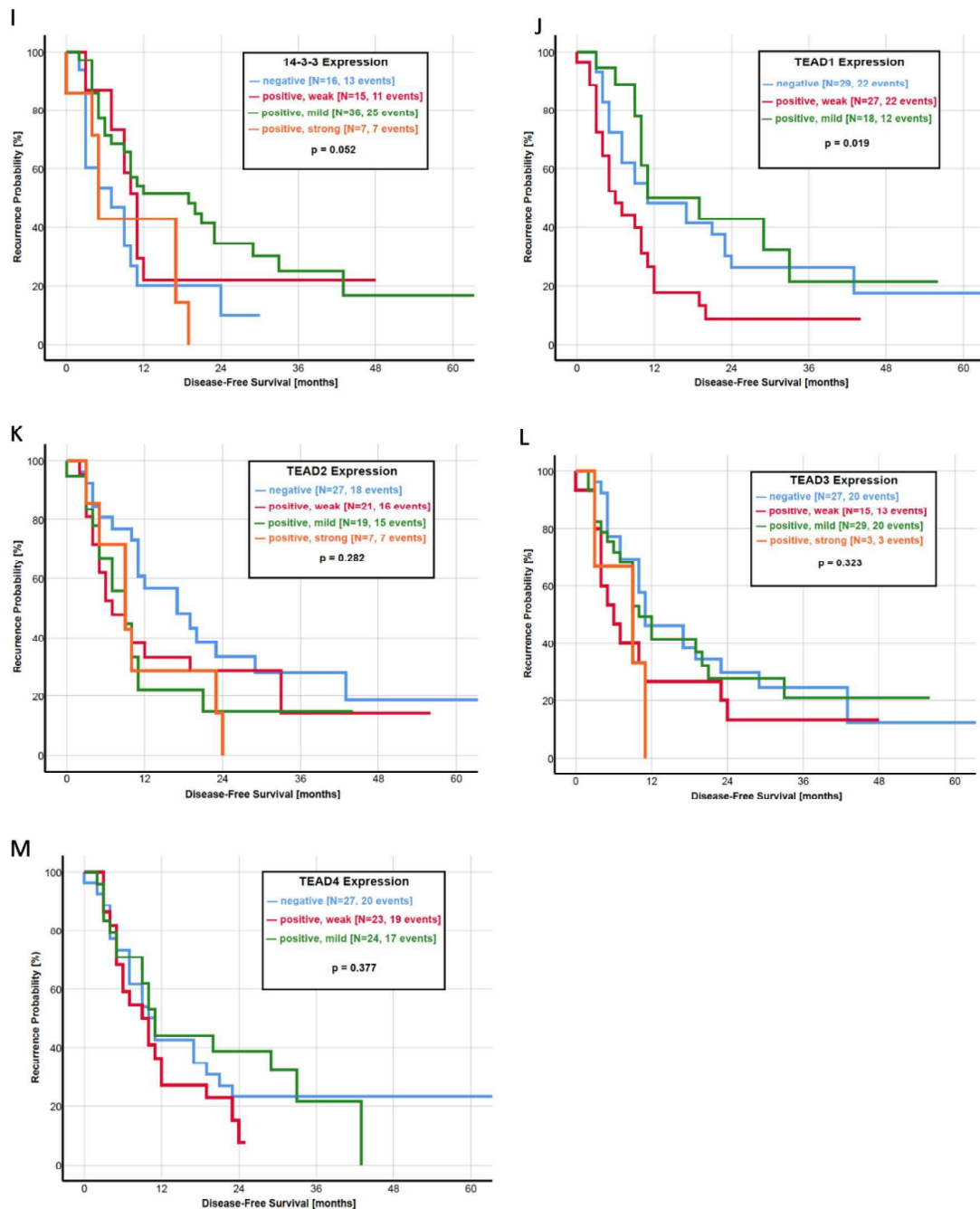


Fig. 3 (continued)

LATS2, in PDAC compared to healthy pancreatic tissue. Regarding the impact of the Hippo pathway upon tumour characteristics, we found a highly significant inactive shift in patients with metastases (Table 1). The proteins MST1, MST2, pLATS, pYAP and 14-3-3, representing the active pathway, were more frequently expressed in non-metastasized patients. In turn, we observed a significant

upregulation of LATS1, LATS2 and YAP in patients suffering metastases. These results are comparable to previous findings by Allende et al. where YAP was found to be over-expressed in metastasized patients (Salcedo Allende et al. 2017). Our results confirm the involvement of the whole Hippo pathway in metastatic processes of PDAC and proves previous experimental results in a real-life cohort study (Xie

Table 4 Cox proportional hazard model for disease-free survival ($n = 75$)

Variable	No.	Median DFS [months]	Univariate		Multivariate	
			Hazard ratio (95% CI)	<i>p</i> value	Hazard ratio (95% CI)	<i>p</i> value
Ratio pYAP/YAP expression						
pYAP> YAP	39	11.0	1.00		1.00	
YAP> pYAP	36	9.0	1.26 (0.75–2.14)	0.39	3.18 (0.62–16.3)	0.02
YAP expression						
Negative	21	9.0	1.00		1.00	
Positive, weak	17	12.0	0.77 (0.36–1.65)	0.49	0.57 (0.13–2.50)	0.45
Positive, mild	24	9.5	1.01 (0.52–1.98)	0.97	0.93 (0.17–5.24)	0.94
Positive, strong	13	10.0	1.71 (0.69–3.09)	0.12	1.92 (0.24–15.3)	0.04
pYAP expression						
Negative	24	8.5	1.00		1.00	
Positive, weak	11	5.0	1.01 (0.47–2.14)	0.99	0.33 (0.09–1.25)	0.10
Positive, mild	22	18.0	0.27 (0.13–0.57)	<0.01	0.10 (0.03–0.35)	<0.01
Positive, strong	18	10.5	0.48 (0.24–0.98)	0.04	0.27 (0.04–1.65)	0.16
Tumour pathological stage						
T1	7	19.0	1.00		1.00	
T2	11	10.0	2.69 (0.71–10.2)	0.14	1.83 (0.34–9.75)	0.48
T3	50	9.0	2.62 (0.81–8.50)	0.11	1.72 (0.44–6.70)	0.44
T4	7	13.0	3.83 (0.95–15.4)	0.06	6.08 (1.15–32.3)	0.03
Nodal status						
N0	18	18.0	1.00		1.00	
N1	49	10.0	1.63 (0.81–3.29)	0.17	2.03 (0.87–4.70)	0.10
N2	8	3.0	6.91 (2.60–18.3)	<0.01	9.59 (2.52–36.5)	<0.01
Metastasis status						
M0	44	11.0	1.00		1.00	
M1	31	9.0	1.62 (0.95–2.75)	0.07	1.17 (0.22–6.12)	0.85
Tumour differentiation						
Well-differentiated	4	32.5	1.00			
Moderately differentiated	18	11.5	6.31 (0.82–48.5)	0.07	6.92 (0.77–62.1)	0.08
Poorly differentiated	51	9.0	7.92 (1.08–58.2)	0.04	7.55 (0.89–64.4)	0.06
Anaplastic	2	22.0	3.42 (0.21–55.2)	0.39	9.04 (0.41–200.6)	0.16
Resection margin						
R0	50	10.0	1.00		1.00	
R1	25	10.0	1.09 (0.63–1.91)	0.74	1.77 (0.97–3.23)	0.08

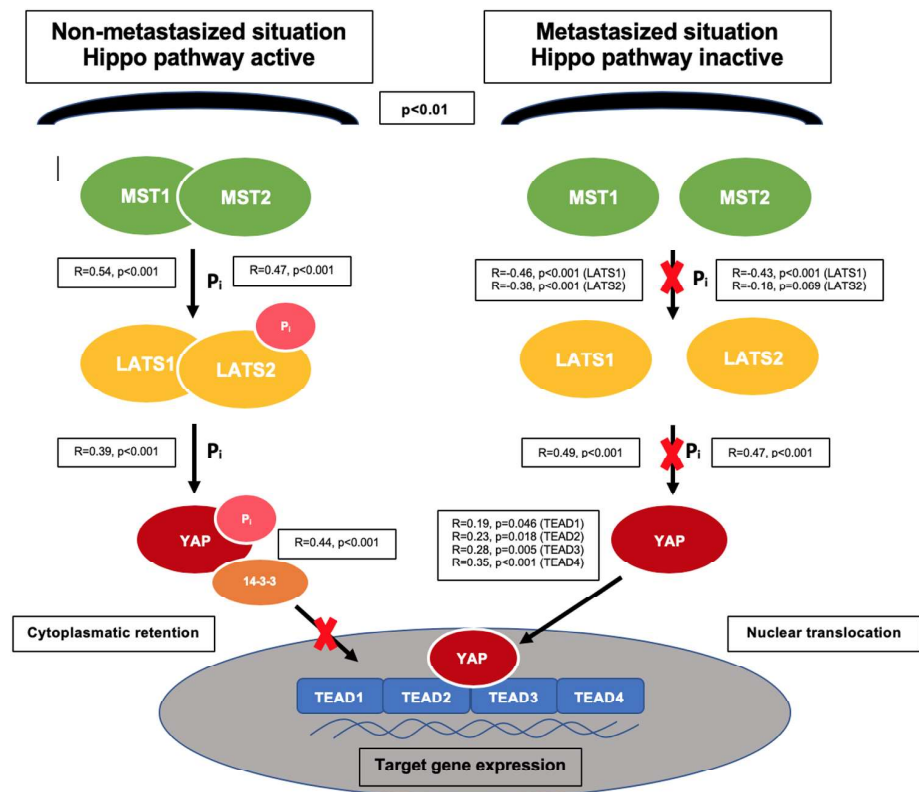
CI confidence interval

et al. 2015; Yang et al. 2015; Wei et al. 2017; Yuan et al. 2016). In addition, we observed similar expression levels of all proteins in the relating liver metastases compared to their metastasized primary tumours. When comparing the expression of the metastasis with the surrounding liver tissue, we could not find a significant difference indicating a dysregulation of the Hippo pathway in the whole liver parenchyma. A supposed predisposition for more liver metastases growing but not detectable at time of surgery is hypothesized.

In the current literature, only three studies investigate the impact of Hippo pathway components on patient survival. Allende et al. found a significantly lower expression of YAP in patients with an OS under 30 months, but no differences

in Kaplan–Meier analysis of OS and DFS (Salcedo Allende et al. 2017). A recently published study by Zhou et al. revealed YAP as an independent prognostic marker as a higher protein expression was associated with a shorter OS and DFS in 140 patients (Zhou et al. 2020). Another study led by Rozengurt et al. identified multiple YAP/TEAD-regulated genes as predictors with unfavorable survival by using the Human Protein Atlas (Rozengurt et al. 2018). As our study presents all of the important Hippo pathway components in the largest study population to this date, we correlated the expression of every single protein with the OS and DFS. Kaplan–Meier analysis revealed a favorable OS in patients with a higher expression of pLATS and pYAP

Fig. 4 Illustration of the pathway in non-metastasized and metastasized patients according to our immunohistochemical results. *p* value refers to the difference of protein expression in regard to the metastatic status. Correlations are shown between expression of pathway components and their immediate downstream targets. Spearman rank order correlation was used for the pairwise correlation analyses



(Fig. 2). In addition, patients with a higher expression of pYAP than YAP had a significantly longer OS. Almost similar results were observed regarding the DFS, where a higher pYAP expression and a pYAP > YAP ratio significantly correlated with a longer DFS (Fig. 3). These results underline the clinical importance of the Hippo pathway activity, measured by YAP and pYAP correlating to patient survival.

The effects of the Hippo pathway on proliferation, cell growth and homeostasis are mainly regulated by the nuclear transcription factors of the TEAD family including TEAD1, TEAD2, TEAD3 and TEAD4. It is widely accepted that TEAD takes plays a significant role in human cancer and the dissemination of cancer cells. However, TEAD activity and expression varies between different malignancies and has to be evaluated separately (Lamar et al. 2012; Holden and Cunningham 2018; Lin et al. 2017a, b; Huh et al. 2019). We therefore investigated the expression of each TEAD member to identify the major target of YAP after nuclear translocation in PDAC. Firstly, we found that all forms of TEAD were upregulated in PDAC compared with healthy pancreatic tissue. However, TEAD2 and TEAD3 were more frequently expressed in metastasized patients and their correlating liver metastasis, thus indicating that YAP promotes metastasis mainly through TEAD2 and TEAD3 (Fig. 4).

Focusing on prospective results, we envision huge potential in targeting the Hippo pathway to improve the prognosis

of patients suffering from PDAC by preventing the metastatic spread or slowing down the rate of metastasis.

Numerous options of inhibiting the signaling pathway have been investigated as each component of the pathway could be potentially influenced. As there is evidence that crossover with other pathways exist, targeting YAP or the YAP-TEAD interaction as downstream effectors would be the preferable option (Holden and Cunningham 2018; Warren et al. 2018; Wu and Yang 2018). In addition, concentrating on YAP target genes is another promising approach as directly targeting YAP, e.g. with verteporfin. When further investigated, verteporfin was found to act as a competitor to TEAD binding site on YAP and is capable of disrupting the YAP-TEAD interaction (Liu-Chittenden et al. 2012). However, treatment with verteporfin is associated with substantial toxic side effects (Konstantinou et al. 2017; Zhang et al. 2015a, b). Nonetheless no active agents targeting YAP-driven genes promoting cancer growth, progression and metastasis have been approved for clinical use in PDAC, but it is a highly promising objective in the era of targeted therapy.

In conclusion, our study clearly shows that the Hippo pathway is inactive in metastasized patients resulting in nuclear translocation of YAP and an enhanced target gene expression via transcriptional factors TEAD2 and TEAD3 with pro-metastatic and proliferative effects. Furthermore,

we revealed that the Hippo pathway has a huge impact on disease progression with metastatic spread and is clinically highly relevant as a shift in the balance towards the inactive pathway predicts an unfavorable OS and DFS. Therefore, we are confident that targeting the Hippo pathway could improve the outcome of patients suffering from PDAC and this role needs to be elucidated in prospective studies.

Acknowledgements This study was supported by a scientific grant from the Guenter Haenisch Foundation. The results were presented at the 51st Meeting of the European Pancreatic Club (EPC), Bergen, Norway, 26–29 June 2019. This work is part of the M.D. thesis of R. Drexler.

Author contributions RD and MKÜ for acquisition of data, analysis and interpretation of data, statistical analysis and drafting of the manuscript; TR, BF and MKL for technical and material support; KO and KW for study concept and design, obtainment of funding and study supervision. All authors read and approved the final manuscript.

Funding Open access funding provided by Semmelweis University. This work was supported by a scientific grant from the Guenter Haenisch Foundation.

Data availability All data generated that are relevant to the results presented in this article are included in this article. Other data that were not relevant for the results presented here are available from the corresponding author R. Drexler upon reasonable request.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest No potential conflict of interest were disclosed by the other author.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Boggiano JC, Vanderzalm PJ, Fehon RG (2011) Tao-1 phosphorylates Hippo/MST kinases to regulate the Hippo-Salvador-Warts tumor suppressor pathway. *Dev Cell* 21(5):888–895. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.028>
- Chan EHY, Nousiainen M, Chalamalasetty RB, Schäfer A, Nigg EA, Silljé HHW (2005) The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. *Oncogene* 24(12):2076–2086. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208445>
- Chen M, Wang M, Xu S, Guo X, Jiang J (2015) Upregulation of MiR-181c contributes to chemoresistance in pancreatic cancer by inactivating the Hippo signaling pathway. *Oncotarget* 6(42):44466–44479. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6298>
- Diep CH, Zucker KM, Hostetter G, Watanabe A, Chengcheng Hu, Munoz RM, Von Hoff DD, Han H (2012) Down-regulation of yes associated protein 1 expression reduces cell proliferation and clonogenicity of pancreatic cancer cells. *PLoS ONE* 7(3):e32783. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032783>
- Diepenbruck M, Waldmeier L, Ivanek R, Berninger P, Arnold P, van Nimwegen E, Christofori G (2014) Tead2 expression levels control the subcellular distribution of Yap and Taz, zyxin expression and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* 127(Pt 7):1523–1536. <https://doi.org/10.1242/jcs.139865>
- Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F (2013) Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 49(6):1374–1403. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.12.027>
- Glantschnig H, Rodan GA, Reszka AA (2002) Mapping of MST1 kinase sites of phosphorylation. Activation and autophosphorylation. *J Biol Chem* 277(45):42987–42996. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208538200>
- Gu JJ, Rouse C, Xia Xu, Wang J, Onaitis MW, Pendergast AM (2016) Inactivation of ABL kinases suppresses non-small cell lung cancer metastasis. *JCI Insight* 1(21):e89647. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.89647>
- Han Y (2019) Analysis of the role of the Hippo pathway in cancer. *J Transl Med* 17(1):116. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1869-4>
- Han S, Wang D, Tang G, Yang X, Jiao C, Yang R, Zhang Y et al (2017) Suppression of MiR-16 promotes tumor growth and metastasis through reversely regulating YAP1 in human cholangiocarcinoma. *Oncotarget* 8(34):56635–56650. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17832>
- Harvey KF, Zhang X, Thomas DM (2013) The Hippo pathway and human cancer. *Nat Rev Cancer* 13(4):246–257. <https://doi.org/10.1038/nrc3458>
- Hergovich A, Schmitz D, Hemmings BA (2006) The human tumour suppressor LATS1 is activated by human MOB1 at the membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 345(1):50–58. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.244>
- Hogendorf P, Durczyński A, Strzelczyk J (2018) Metastatic pancreatic cancer. *J Invest Surg* 31(2):151–152. <https://doi.org/10.1080/08941939.2017.1291774>
- Holden JK, Cunningham CN (2018) Targeting the Hippo pathway and cancer through the TEAD family of transcription factors. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers10030081>
- Huh H, Kim D, Jeong H-S, Park H (2019) Regulation of TEAD transcription factors in cancer biology. *Cells* 8(6):600. <https://doi.org/10.3390/cells8060600>
- Ilic M, Ilic I (2016) Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 22(44):9694–9705. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i44.9694>
- Kaemmerer D, Peter L, Lupp A, Schulz S, Sängler J, Baum RP, Prasad V, Hommann M (2012) Comparing of IRS and Her2 as immunohistochemical scoring schemes in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Int J Clin Exp Pathol* 5(3):187–194
- Kapoor A, Yao W, Ying H, Hua S, Liewen A, Wang Q, Zhong Yi et al (2014) Yap1 activation enables bypass of oncogenic Kras addiction in pancreatic cancer. *Cell* 158(1):185–197. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.003>
- Kim T, Hwang D, Lee D, Kim JH, Kim SY, Lim DS (2017) MRTF potentiates TEAD-YAP transcriptional activity causing metastasis. *EMBO J* 36(4):520–535. <https://doi.org/10.15252/embj.201695137>
- Konstantinou EK, Notomi S, Kosmidou C, Brodowska K, Al-Moujahed A, Nicolaou F, Tsoka P et al (2017) Verteporfin-induced

- formation of protein cross-linked oligomers and high molecular weight complexes is mediated by light and leads to cell toxicity. *Sci Rep* 7:46581. <https://doi.org/10.1038/srep46581>
- Lamar JM, Stern P, Liu H, Schindler JW, Jiang Z-G, Hynes RO (2012) The Hippo pathway target, YAP, promotes metastasis through its TEAD-interaction domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(37):E2441–2450. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212021109>
- Lau AN, Curtis SJ, Fillmore CM, Rowbotham SP, Mohseni M, Wagner DE, Beede AM et al (2014) Tumor-propagating cells and Yap/TAZ activity contribute to lung tumor progression and metastasis. *EMBO J* 33(5):468–481. <https://doi.org/10.1002/embj.201386082>
- Lei Q-Y, Zhang H, Zhao B, Zha Z-Y, Bai F, Pei X-H, Zhao S, Xiong Y, Guan K-L (2008) TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the Hippo pathway. *Mol Cell Biol* 28(7):2426–2436. <https://doi.org/10.1128/MCB.01874-07>
- Li C, Wang S, Xing Z, Lin A, Liang Ke, Song J, Qingsong Hu et al (2017) A ROR1-HER3-LncRNA signalling axis modulates the hippo-YAP pathway to regulate bone metastasis. *Nat Cell Biol* 19(2):106–119. <https://doi.org/10.1038/ncb3464>
- Lin KC, Moroishi T, Meng Z, Jeong H-S, Plouffe SW, Sekido Y, Han J, Park HW, Guan K-L (2017a) Regulation of Hippo pathway transcription factor TEAD by P38 MAPK-induced cytoplasmic translocation. *Nat Cell Biol* 19(8):996–1002. <https://doi.org/10.1038/ncb3581>
- Lin KC, Park HW, Guan K-L (2017b) Regulation of the Hippo pathway transcription factor TEAD. *Trends Biochem Sci* 42(11):862–872. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.09.003>
- Liu Y, Wang G, Yang Y, Mei Z, Liang Z, Cui A, Wu T, Liu C-Y, Cui L (2016) Increased TEAD4 expression and nuclear localization in colorectal cancer promote epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a YAP-independent manner. *Oncogene* 35(21):2789–2800. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.342>
- Liu H, Suya Du, Lei T, Wang H, He X, Tong R, Wang Yi (2018a) Multifaceted regulation and functions of YAP/TAZ in tumors (review). *Oncol Rep* 40(1):16–28. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6423>
- Liu J, Ye L, Li Q, Xianqiu Wu, Wang B, Ouyang Y, Yuan Z, Li J, Lin C (2018b) Synaptopodin-2 suppresses metastasis of triple-negative breast cancer via inhibition of YAP/TAZ activity. *J Pathol* 244(1):71–83. <https://doi.org/10.1002/path.4995>
- Liu-Chittenden Y, Huang B, Shim JS, Chen Q, Lee S-J, Anders RA, Liu JO, Pan D (2012) Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes Dev* 26(12):1300–1305. <https://doi.org/10.1101/gad.192856.112>
- Meng Z, Moroishi T, Mottier-Pavie V, Plouffe SW, Hansen CG, Hong AW, Park HW et al (2015) MAP4K family kinases act in parallel to MST1/2 to activate LATS1/2 in the Hippo pathway. *Nat Commun* 6(October):8357. <https://doi.org/10.1038/ncomms9357>
- Moroishi T, Hansen CG, Guan K-L (2015) The emerging roles of YAP and TAZ in cancer. *Nat Rev Cancer* 15(2):73–79. <https://doi.org/10.1038/nrc3876>
- Nallet-Staub F, Marsaud V, Li L, Gilbert C, Dodier S, Bataille V, Sudol M, Herlyn M, Mauviel A (2014) Pro-invasive activity of the hippo pathway effectors YAP and TAZ in cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 134(1):123–132. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.319>
- Poma AM, Torregrassa L, Bruno R, Basolo F, Fontanini G (2018) Hippo pathway affects survival of cancer patients: extensive analysis of TCGA data and review of literature. *Sci Rep* 8(1):10623. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28928-3>
- Poon CLC, Lin JI, Zhang X, Harvey KF (2011) The sterile 20-like kinase Tao-1 controls tissue growth by regulating the Salvador-Warts-Hippo pathway. *Dev Cell* 21(5):896–906. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.09.012>
- Qiao Y, Chen J, Lim YB, Finch-Edmondson ML, Seshachalam VP, Qin L, Jiang T et al (2017) YAP regulates actin dynamics through ARHGAP29 and promotes metastasis. *Cell Rep* 19(8):1495–1502. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.075>
- Remmele W, Stegner HE (1987) Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Der Pathologe* 8(3):138–140
- Rozengurt E, Sinnott-Smith J, Eibl G (2018) Yes-associated protein (YAP) in pancreatic cancer: at the epicenter of a targetable signaling network associated with patient survival. *Signal Transduct Target Ther* 3(1):11. <https://doi.org/10.1038/s41392-017-0005-2>
- Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N (2014a) Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med* 371(22):2140–2141. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1412266>
- Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N (2014b) Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med* 371(11):1039–1049. <https://doi.org/10.1056/NEJMr14104198>
- Salcedo Allende MT, Zeron-Medina J, Hernandez J, Macarulla T, Balsells J, Merino X, Allende H, Tabernero J, Agüeras SRYC (2017) Overexpression of yes associated protein 1, an independent prognostic marker in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma, correlated with liver metastasis and poor prognosis. *Pancreas* 46(7):913–920. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000867>
- Saucedo LJ, Edgar BA (2007) Filling out the Hippo pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(8):613–621. <https://doi.org/10.1038/nrm2221>
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2018) Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 68(1):7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21442>
- van Rensburg HJJ, Yang X (2016) The roles of the Hippo pathway in cancer metastasis. *Cell Signal* 28(11):1761–1772. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.08.004>
- Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M (2011) Pancreatic cancer. *Lancet* 378(9791):607–620. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62307-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62307-0)
- Wang T, Mao B, Cheng C, Zou Z, Gao J, Yang Y, Lei T et al (2018) YAP promotes breast cancer metastasis by repressing growth differentiation factor-15. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1864(5 Pt A):1744–1753. <https://doi.org/10.1016/j.bbadi.s.2018.02.020>
- Warren J, Xiao Y, Lamar J (2018) YAP/TAZ activation as a target for treating metastatic cancer. *Cancers* 10(4):115. <https://doi.org/10.3390/cancers10040115>
- Wei H, Zongzhen Xu, Liu F, Wang F, Wang X, Sun X, Li J (2017) Hypoxia induces oncogene yes-associated protein 1 nuclear translocation to promote pancreatic ductal adenocarcinoma invasion via epithelial-mesenchymal transition. *Tumour Biol* 39(5):1010428317691684. <https://doi.org/10.1177/1010428317691684>
- Wu L, Yang X (2018) Targeting the Hippo pathway for breast cancer therapy. *Cancers* 10(11):422. <https://doi.org/10.3390/cancers10110422>
- Wu J, Liu T, Rios Z, Mei Q, Lin X, Cao S (2017) Heat shock proteins and cancer. *Trends Pharmacol Sci* 38(3):226–256. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.11.009>
- Xie D, Cui J, Xia T, Jia Z, Wang L, Wei W, Zhu A, Gao Y, Xie K, Quan M (2015) Hippo transducer TAZ promotes epithelial mesenchymal transition and supports pancreatic cancer progression. *Oncotarget* 6(34):35949–35963. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5772>
- Yang S, Zhang L, Purohit V, Shukla SK, Chen X, Yu F, Fu K et al (2015) Active YAP promotes pancreatic cancer cell motility, invasion and tumorigenesis in a mitotic phosphorylation-dependent manner through LPAR3. *Oncotarget* 6(34):36019–36031. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5935>

- Yu F-X, Zhao B, Guan K-L (2015) Hippo pathway in organ size control, tissue homeostasis, and cancer. *Cell* 163(4):811–828. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.044>
- Yuan Y, Li D, Li H, Wang L, Tian G, Dong Y (2016) YAP overexpression promotes the epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Mol Med Rep* 13(1):237–242. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4550>
- Zanconato F, Cordenonsi M, Piccolo S (2016) YAP/TAZ at the roots of cancer. *Cancer Cell* 29(6):783–803. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.05.005>
- Zhang W, Nandakumar N, Shi Y, Manzano M, Smith A, Graham G, Gupta S et al (2014) Downstream of mutant KRAS, the transcription regulator YAP is essential for neoplastic progression to pancreatic ductal adenocarcinoma. *Sci Signal* 7(324):ra42. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005049>
- Zhang H, Ramakrishnan SK, Triner D, Centofanti B, Maitra D, Györfy B, Sebolt-Leopold JS et al (2015a) Tumor-selective proteotoxicity of verteporfin inhibits colon cancer progression independently of YAP1. *Sci Signal* 8(397):ra98. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aac5418>
- Zhang K, Qi H-X, Zhi-Mei Hu, Chang Y-N, Shi Z-M, Han X-H, Han Y-W et al (2015b) YAP and TAZ take center stage in cancer. *Biochemistry* 54(43):6555–6566. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01014>
- Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, Xie J et al (2007) Inactivation of YAP oncoprotein by the hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev* 21(21):2747–2761. <https://doi.org/10.1101/gad.1602907>
- Zhou Z, Zhu J-S, Gao C-P, Li L-P, Zhou C, Wang H, Liu X-G (2016) SiRNA targeting YAP gene inhibits gastric carcinoma growth and tumor metastasis in SCID mice. *Oncol Lett* 11(4):2806–2814. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4319>
- Zhou Q, Bauden M, Andersson R, Dingyuan Hu, Marko-Varga G, Jianfeng Xu, Sasor A et al (2020) YAP1 is an independent prognostic marker in pancreatic cancer and associated with extracellular matrix remodeling. *J Transl Med* 18(1):77. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02254-7>
- Zygulska AL, Krzemieniecki K, Pierzchalski P (2017) Hippo pathway - brief overview of its relevance in cancer. *J Physiol Pharmacol* 68(3):311–335

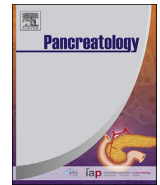
Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

3.2 Association of subcellular localization of TEAD transcription factors with outcome and progression in pancreatic ductal adenocarcinoma

Richard Drexler*, Rebecca Fahy*, **Mirco Küchler**, Kim C. Wagner, Tim Reese, Mareike Ehmke, Bernd Feyerabend, Moritz Kleine und Karl J. Oldhafer

*Geteilte Erstautorenschaft

Angenommen in *Pancreatology*
(01. Dezember 2020)



Association of subcellular localization of TEAD transcription factors with outcome and progression in pancreatic ductal adenocarcinoma

Richard Drexler ^{a, b, *, 1}, Rebecca Fahy ^{a, b, 1}, Mirco Küchler ^{a, b}, Kim C. Wagner ^{a, b},
Tim Reese ^{a, b}, Mareike Ehmke ^b, Bernd Feyerabend ^c, Moritz Kleine ^d, Karl J. Oldhafer ^{a, b}

^a Asklepios Campus Hamburg, Semmelweis University Budapest, Hamburg, Germany

^b Department of Surgery, Division of HPB Surgery, Asklepios Hospital Barmbek, Hamburg, Germany

^c MVZ Hanse Histologikum GmbH, Hamburg, Germany

^d Department of General, Visceral and Transplant Surgery, Hannover Medical School, Hannover, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 June 2020

Received in revised form

25 November 2020

Accepted 1 December 2020

Available online 8 December 2020

Keywords:

TEAD

PDAC

Metastasis

Prognosis

Transcription factor

ABSTRACT

Background: Transcriptional enhanced associated domain (TEAD) transcription factors are nuclear effectors of several oncogenic signalling pathways including Hippo, WNT, TGF- β and EGFR pathways that interact with various cancer genes. The subcellular localization of TEAD regulates the functional output of these pathways affecting tumour progression and patient outcome. However, the impact of the TEAD family on pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and its clinical progression remain elusive.

Methods: A cohort of 81 PDAC patients who had undergone surgery was established. Cytoplasmic and nuclear localization of TEAD1, TEAD2, TEAD3 and TEAD4 was evaluated with the immunoreactive score (IRS) by immunohistochemistry (IHC) using paraffin-embedded tissue. Results were correlated with clinicopathological data, disease-free and overall survival.

Results: Nuclear staining of all four TEADs was increased in pancreatic cancer tissue. Patients suffering from metastatic disease at time of surgery showed a strong nuclear staining of TEAD2 and TEAD3 ($p < 0.05$). Furthermore, a nuclear > cytoplasmic ratio of TEAD2 and TEAD3 was associated with a shorter overall survival and TEAD2 emerged as an independent prognostic factor for disease-free survival.

Conclusion: Our study underlines the importance of TEAD transcription factors in PDAC as a nuclear localization was found to be associated with metastatic disease and an unfavourable prognosis after surgical resection.

© 2020 Published by Elsevier B.V. on behalf of IAP and EPC.

Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most lethal cancers and remains a challenging disease with a poor prognosis. The 5-year survival rate is between 4 and 8%, with surgical resection remaining the only curative option [1]. At the time of diagnosis only 15–20% of patients are eligible for surgery and up to 50% of patients display hepatic metastasis [2]. Ultimately 70% of patients die from metastatic disease [3].

The transcriptional enhanced associated domain (TEAD) family consists of four highly conserved TEAD/TEF transcription factors (TEAD 1, TEAD 2, TEAD 3 and TEAD 4). The TEA binding domain is

common to all four and transcriptional coactivators are necessary for transcription activation [4]. TEADs integrate with and regulate many signal transduction pathways [5]. It has been proven that TEADs are the central transcription factors of the Hippo pathway with most studies from the last few years focusing on the interaction between Yes-associated protein (YAP) and TEAD [6–8]. Hippo independent regulators and modulators have only recently come to light. However, TEAD activity is also influenced by upstream signal transduction pathways, such as Wnt, TGF- β and epidermal growth factor pathways [5]. Furthermore, the discovery of TEADs molecular mechanisms, such as post-translational modifications and nucleocytoplasmic shuttling, have highlighted the importance of TEAD's transcriptional activity [9–12]. It is indispensable that TEAD is located in the cell nucleus in order for interaction with various cofactors and to allow for its full transcriptional activity. There is a broad spectrum of stressors like osmotic stress, high cell density and cell suspension, inducing TEAD

* Corresponding author. Lohmühlenstraße 5-9, 20099, Hamburg, Germany.

E-mail address: richard.drexler@semmelweis-hamburg.de (R. Drexler).

¹ These authors contributed equally to this work.

Table 1

Comparison of nuclear and cytoplasmic staining of TEAD1–4 in tumour tissue with adjacent non-tumorous tissue and corresponding liver metastases [1]. data show the comparison of protein levels between the primary tumour and their corresponding liver metastases of 23 synchronous metastasized patients. IRS score is classified as 0 (negative), 1 (positive, weak staining), 2 (positive, mild staining) and 3 (positive, strong staining). All statistically significant variables are highlighted in bold. *Statistical test: chi-square test.*

Transcription factor, n (%)	PDAC (n = 81)	Adjacent non-tumorous tissue (n = 81)	p	PDAC (n = 23) [1]	Corresponding liver metastasis (n = 23) [1]	p
TEAD1 nuclear						
negative	32 (39.5)	53 (65.4)	<0.01	15 (65.3)	19 (82.7)	0.87
weak	24 (29.6)	15 (18.5)		5 (21.7)	3 (13.0)	
mild	14 (17.3)	13 (16.0)		3 (13.0)	1 (4.3)	
strong	11 (13.6)	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	
TEAD1 cytoplasmic						
negative	40 (49.4)	50 (61.8)	<0.01	11 (47.8)	17 (74.0)	0.11
weak	27 (33.3)	24 (29.6)		9 (39.2)	5 (21.7)	
mild	14 (17.3)	7 (8.6)		3 (13.0)	1 (4.3)	
strong	0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	
TEAD2 nuclear						
negative	26 (32.1)	55 (67.9)	<0.01	8 (34.8)	8 (34.8)	0.74
weak	20 (24.7)	15 (18.5)		4 (17.4)	4 (17.4)	
mild	19 (23.5)	9 (11.1)		6 (26.1)	8 (34.8)	
strong	16 (19.7)	2 (2.5)		5 (21.7)	3 (13.0)	
TEAD2 cytoplasmic						
negative	36 (44.4)	37 (45.7)	<0.01	17 (74.0)	12 (52.2)	0.47
weak	18 (22.2)	18 (22.2)		3 (13.0)	4 (17.4)	
mild	13 (16.1)	21 (25.9)		2 (8.7)	6 (26.1)	
strong	14 (17.3)	5 (6.2)		1 (4.3)	1 (4.3)	
TEAD3 nuclear						
negative	43 (53.1)	63 (77.8)	<0.01	13 (56.5)	17 (74.0)	0.51
weak	25 (30.9)	14 (17.3)		6 (26.1)	2 (8.7)	
mild	11 (13.6)	4 (4.9)		4 (17.4)	3 (13.0)	
strong	2 (2.4)	0 (0.0)		0 (0.0)	1 (4.3)	
TEAD3 cytoplasmic						
negative	26 (32.1)	49 (60.5)	<0.01	8 (34.8)	14 (60.9)	0.85
weak	21 (25.9)	21 (25.9)		8 (34.8)	6 (26.1)	
mild	31 (38.3)	11 (13.6)		7 (30.4)	3 (13.0)	
strong	3 (3.7)	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	
TEAD4 nuclear						
negative	41 (50.6)	56 (69.1)	0.02	11 (47.8)	17 (74.0)	0.51
weak	15 (18.5)	20 (24.7)		5 (21.7)	2 (8.7)	
mild	20 (24.7)	5 (6.2)		6 (26.1)	3 (13.0)	
strong	5 (6.2)	0 (0.0)		1 (4.3)	1 (4.3)	
TEAD4 cytoplasmic						
negative	27 (33.3)	29 (35.8)	0.32	8 (34.8)	16 (69.7)	0.89
weak	32 (39.5)	35 (43.2)		6 (26.1)	3 (13.0)	
mild	17 (21.0)	14 (17.3)		7 (30.4)	3 (13.0)	
strong	5 (6.2)	3 (3.7)		2 (8.7)	1 (4.3)	

cytoplasmic translocation [12]. However, other cellular events like energy starvation, oxidative stress or cytotoxic agents lead to the inhibition of TEAD transcriptional outputs, but do not alter TEADs' subcellular location or level of expression [5]. One underlying mechanism is a p38 MAPK-induced cytoplasmic translocation of TEAD in a Hippo-independent manner, indicating that influencing the nucleocytoplasmic shuttling of TEAD could be an effective therapeutic target [12].

As the functional output of several interacting pathways, TEAD plays a major role during organ development, cell growth, regeneration and tissue homeostasis. This is achieved through their transcriptional target genes, such as *connective tissue growth factor (CTGF)*, *Cysteine-rich angiogenic inducer (Cyr61)* and *Myc*. TEAD hyperactivity and overexpression has been observed in multiple stages of cancer progression and it is well known that TEAD contributes to tumour initiation, promotes cancer progression, epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis [5]. Overexpression of TEAD can be seen in various malignancies, such as medulloblastoma, lung, ovarian and breast cancer [13–17].

Additional data have shown that the activation of TEAD target genes mediate metastases in various malignancies. In breast cancer the activation of *CTGF* enhances the colonisation of malignant cells and *myocardin-related transcription factor (MRTF)* induced breast cancer cell metastases to the lung [18,19]. In colorectal cancer TEAD activation is triggered by RAR- γ via the Hippo pathway, which in

turn promotes EMT, invasion and metastasis [20]. Nonetheless higher TEAD expression and its localization in the nucleus of colorectal cancer cells induced EMT and metastasis via a Hippo-independent mechanism [21]. In bone metastasis the activation of TEAD induces ROR1-HER3-mediated osteoclast differentiation through the Hippo-YAP pathway [22].

Interestingly in PDAC, a few studies revealed that disrupting the YAP-TEAD interaction could be a promising therapeutic target to suppress tumour cell growth and metastatic processes [23–25]. In addition, Cebola et al. unveiled a central role of TEAD and YAP as regulators of multipotent pancreatic progenitors [26]. Rozengurt et al. found that numerous TEAD target genes have been associated with an unfavourable prognosis [27]. However, no study investigated the prognostic impact of TEAD staining itself in PDAC.

The aim of our study was to demonstrate the clinical impact of TEADs in patients with PDAC, regardless of their upstream signalling pathways.

Materials and methods

Ethics approval

All patients' data were fully anonymised, and the study was performed according to the standards set in the Declaration of Helsinki 1975. The tumour tissue used was remaining from material that

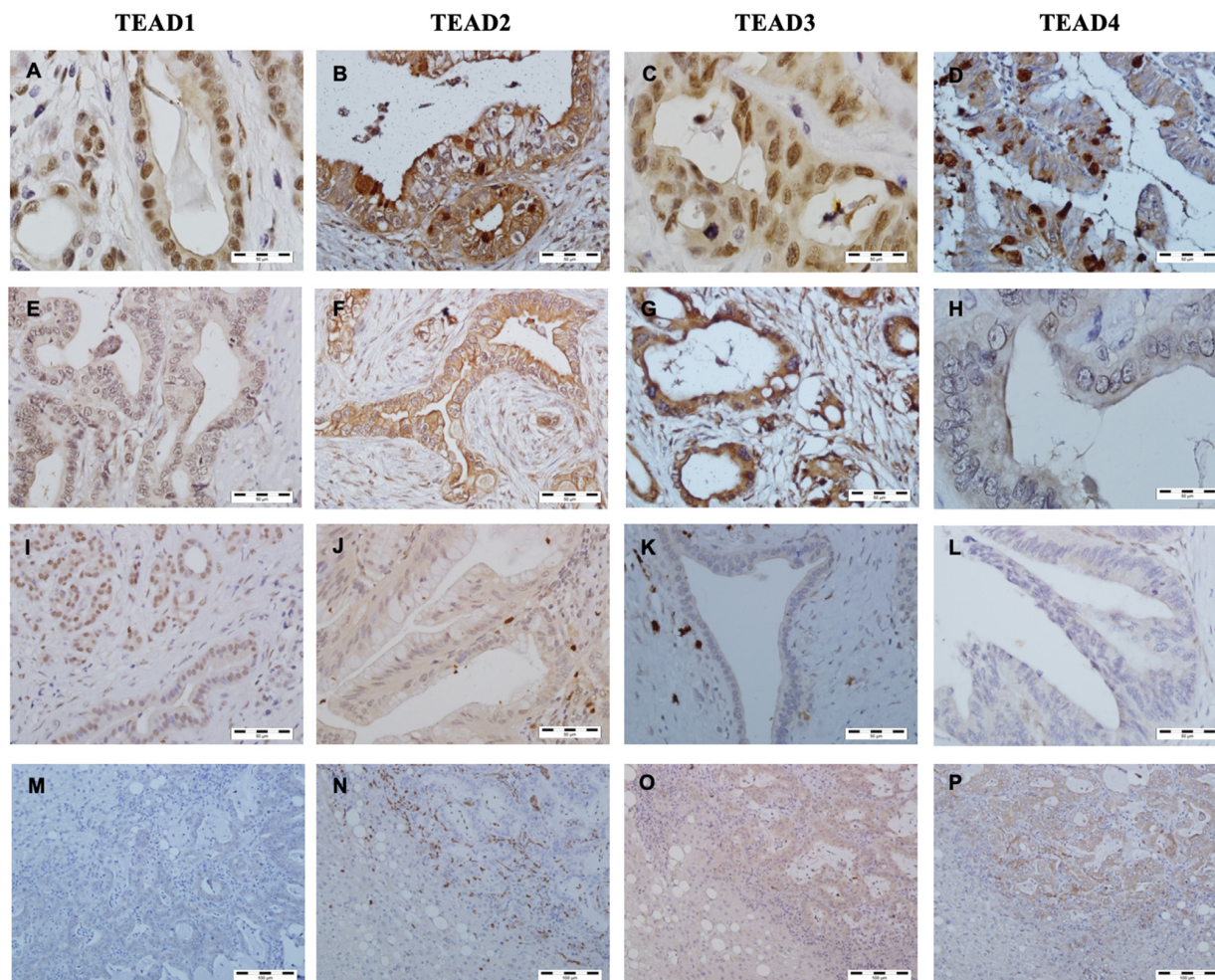


Fig. 1. Representative images of immunohistochemistry staining of TEAD1, TEAD2, TEAD3 and TEAD4 in PDAC, adjacent non-tumorous tissue and liver metastases. (A)–(D) represents a predominantly nuclear staining of each transcription factor in pancreatic cancer cells. Original magnification 40x, scale bar 50µm. (E)–(H) shows a predominantly cytoplasmic staining of each transcription factor in pancreatic cancer cells. Original magnification 40x, scale bar 50µm. (I)–(L) represents the staining in adjacent non-tumorous tissue. Original magnification 40x, scale bar 50µm. (M)–(P) pictures the staining of each transcription factor in a corresponding liver metastasis. Original magnification 20x, scale bar 100µm.

initially had been collected for diagnostic purposes. All diagnostic procedures had already been fully completed when the samples were retrieved for the study. The study was approved by the Ethics Committee Hamburg, Germany (approval number PV5510).

Patients characteristics

A total of 81 patients (female, $n = 41$; male, $n = 40$; median age, 65.2 years) diagnosed with PDAC, all of whom had undergone surgery between 2012 and 2018 at the Department of Surgery, Asklepios Hospital Barmbek-Hamburg (Germany) were included. Patients' clinicopathological characteristics are shown in Table 1. The diagnosis was histologically confirmed and TNM classification was assessed according to the AJCC 7th edition. The R-status was obtained pathologically via the circumferential resection margin. All patients had a follow-up either up to their death ($n = 56$), or their most recent contact ($n = 25$) on April 30, 2020.

Immunohistochemical analysis

Immunohistochemistry was employed to determine the

subcellular localization and staining of the proteins. Immunohistochemical staining was performed using paraffin-embedded tissue. The tissue sections (4 µm) were deparaffinized in xylene and rehydrated in a descending alcohol set followed by heated antigen retrieval with Tris-EDTA buffer (pH 8.0) for 5 min. Endogenous peroxidase activity was suppressed with Peroxide Block (Zytomed Systems). Primary monoclonal antibodies were diluted with Antibody Diluent (Zytomed Systems). Sections were covered with antibody and incubated at 4 °C for 24 h. Subsequently, ZytoChem Plus (HRP) Polymer Bulk Kit (Zytomed Systems) were used before staining with DAB (diaminobenzidine) Substrate Kit (Zytomed Systems). Gill's hematoxylin III (Carl Roth) was used as a counterstaining agent, including a 10 s hydrochloric acid bath (5%) for differentiation. Sections were then dehydrated and mounted with EcoMount (Zytomed Systems). Following primary antibodies were used: TEAD1 (1:500, Abcam (UK), ab133533), TEAD2 (1:75, Abcam (UK), ab196669), TEAD3 (1:500, Abcam (UK), ab237766) and TEAD4 (1:250, Abcam (UK), ab97460). Negative and positive controls were used as recommended by Abcam (UK).

Table 2

Correlation between tumour characteristics and the ratio of TEAD1, TEAD2, TEAD3 and TEAD4. TEAD ratio results from direct comparison of nuclear and cytoplasmic IRS score. IRS score is classified as 0 (negative), 1 (positive, weak staining), 2 (positive, mild staining) and 3 (positive, strong staining). All statistically significant variables are highlighted in bold. Nuc: nuclear; Cyt: cytoplasmic [1]; data was available for 62 patients. Statistical test: chi-square test.

Feature, n (%)	TEAD1 ratio			TEAD2 ratio			TEAD3 ratio			TEAD4 ratio		
	Nuc > Cyt	Cyt > Nuc	p	Nuc > Cyt	Cyt > Nuc	p	Nuc > Cyt	Cyt > Nuc	p	Nuc > Cyt	Cyt > Nuc	p
Gender												
Female	25 (61.0)	16 (39.0)	0.93	24 (58.5)	17 (41.5)	0.75	15 (36.6)	26 (63.4)	0.38	18 (43.9)	23 (56.1)	0.41
Male	24 (60.0)	16 (40.0)		22 (55.0)	18 (45.0)		11 (27.5)	29 (72.5)		14 (35.0)	26 (65.0)	
Neoadjuvant treatment												
No	46 (61.3)	29 (38.7)	0.59	42 (56.0)	33 (44.0)	0.61	23 (30.7)	52 (69.3)	0.33	28 (37.3)	47 (62.7)	0.16
Yes	3 (50.0)	3 (50.0)		4 (66.7)	2 (33.3)		3 (50.0)	3 (50.0)		4 (66.7)	2 (33.3)	
Tumour pathological stage												
T1	2 (28.6)	5 (71.4)	0.09	3 (42.9)	4 (57.1)	0.71	4 (57.1)	3 (42.9)	0.19	3 (42.9)	4 (57.1)	0.75
T2	4 (40.0)	6 (60.0)		6 (60.0)	4 (10.0)		1 (10.0)	9 (90.0)		4 (40.0)	6 (60.0)	
T3	38 (69.1)	17 (30.9)		33 (60.0)	22 (40.0)		19 (34.5)	36 (65.5)		20 (36.4)	35 (63.6)	
T4	5 (55.6)	4 (44.4)		4 (44.4)	5 (55.6)		2 (22.2)	7 (77.8)		5 (55.6)	4 (44.4)	
Nodal status												
N0	10 (47.6)	11 (52.4)	0.36	11 (52.4)	10 (47.6)	0.53	7 (33.3)	14 (66.7)	0.84	10 (47.6)	11 (52.4)	0.49
N1	36 (65.5)	19 (34.5)		31 (56.4)	24 (43.6)		18 (32.7)	37 (67.3)		21 (38.2)	34 (61.8)	
N2	3 (60.0)	2 (40.0)		4 (80.0)	1 (20.0)		1 (20.0)	4 (80.0)		1 (20.0)	4 (80.0)	
Metastatic status												
M0	34 (69.4)	15 (30.6)	0.04	24 (49.0)	25 (51.0)	0.031	11 (22.4)	38 (77.6)	0.02	18 (36.7)	31 (63.3)	0.53
M1	15 (46.9)	17 (53.1)		22 (68.8)	10 (31.3)		15 (53.1)	11 (46.9)		14 (43.8)	18 (56.3)	
Lymphatic invasion												
L0	20 (57.1)	15 (42.9)	0.59	19 (54.3)	16 (45.7)	0.69	11 (31.4)	24 (68.6)	0.91	13 (37.1)	22 (62.9)	0.70
L1	29 (63.0)	17 (37.0)		27 (58.7)	19 (41.3)		15 (32.6)	31 (67.4)		19 (41.3)	27 (58.7)	
Venous invasion												
V0	30 (68.2)	14 (31.8)	0.12	26 (59.1)	18 (40.9)	0.65	13 (29.5)	31 (70.5)	0.59	16 (36.4)	28 (63.6)	0.53
V1	19 (51.4)	18 (48.6)		20 (54.1)	17 (45.9)		13 (35.1)	24 (64.9)		16 (43.2)	21 (56.8)	
Perineural infiltration												
Pn0	30 (68.2)	14 (31.8)	0.69	4 (44.4)	5 (55.6)	0.43	4 (44.4)	5 (55.6)	0.40	5 (55.6)	4 (44.4)	0.29
Pn1	19 (51.4)	18 (48.6)		42 (58.3)	30 (41.7)		22 (30.6)	50 (69.4)		27 (37.5)	45 (62.5)	
Resection margin												
R0	36 (64.3)	20 (35.7)	0.29	32 (57.1)	24 (42.9)	0.92	20 (35.7)	36 (64.3)	0.29	22 (39.3)	34 (60.7)	0.95
R1	13 (52.0)	12 (48.0)		14 (56.0)	11 (44.0)		6 (24.0)	19 (76.0)		10 (40.0)	15 (60.0)	
Tumour differentiation												
Well-differentiated	5 (71.4)	2 (28.6)	0.86	1 (14.3)	6 (85.7)	0.03	0 (0.0)	7 (100.0)	0.03	2 (28.6)	5 (71.4)	0.86
Moderately differentiated	11 (64.7)	6 (35.3)		8 (47.1)	9 (52.9)		3 (17.6)	14 (82.4)		6 (35.3)	11 (64.7)	
Poorly differentiated	31 (57.4)	23 (42.6)		34 (63.0)	20 (37.0)		23 (42.6)	31 (57.4)		23 (42.6)	31 (57.4)	
Anaplastic	2 (66.7)	1 (33.3)		3 (100.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	3 (100.0)		1 (33.3)	2 (66.7)	
Tumour size [1]												
< 3.5 cm	27 (65.9)	14 (34.1)	0.76	21 (51.2)	20 (48.8)	0.66	13 (31.7)	28 (68.3)	0.52	14 (34.1)	27 (65.9)	0.50
> 3.5 cm	13 (61.9)	8 (38.1)		12 (57.1)	9 (42.9)		5 (23.8)	16 (76.2)		9 (42.9)	12 (57.1)	

Methods of evaluation

An immunoreactive score (IRS) was implemented for the evaluation of protein staining in pancreatic cancer cells, which was based on the intensity and quantity of immune staining. The IRS score was applied as described by Kaemmerer and Remmele and colleagues [28,29]. Subcellular localization and staining levels were determined for both cytoplasmic and nuclear fractions by the intensity of staining graded as negative (0), mild (1), moderate (2) and intense (3). In addition, the percentage of positive cells was evaluated as 0 (no positive cells), 1 (<10% positive cells), 2 (10–50% positive cells), 3 (51–80% positive cells) and 4 (>80% positive cells). The IRS score was obtained by multiplying these two individual scores. As a result, every tissue sample was classified into negative (IRS points 0–1), weak (2–3), mild (4–8) or strong (9–12). Two independent reviewers then evaluated the protein staining without prior knowledge of the patient characteristics. Furthermore, a ratio was set up for each TEAD by comparing the protein staining between nuclear and cytoplasmic localization. The TEAD ratio results from direct comparison of nuclear and cytoplasmic IRS score. In the following, a predominantly nuclear staining is classified as nuc > cyt and a predominantly cytoplasmic staining as cyt > nuc. In total, 81 patients diagnosed with PDAC were evaluated using the

IRS. We separately scored the protein staining in pancreatic cancer cells and adjacent non-tumorous tissue for each patient. Furthermore, we evaluated the protein levels of TEAD in corresponding liver metastases of 23 synchronous metastasized patients.

Statistical analysis

Differences in continuous variables were analysed with the Mann-Whitney *U* test and differences in proportions were analysed with the chi-square-test or Fisher exact test. Overall and disease-free survival was evaluated with the Kaplan-Meier method. Univariate and multivariate Cox proportional hazards models were used to assess the effects of variables on OS and DFS and to also compute mortality hazard ratios (HR). A two-sided *p*-value less than 0.05 was considered as statistically significant. All analyses were performed using SPSS Inc. (Chicago, IL, USA).

Results

Study population

A total of 81 patients who had been diagnosed with PDAC and undergone surgery between 2012 and 2018 were enrolled in this

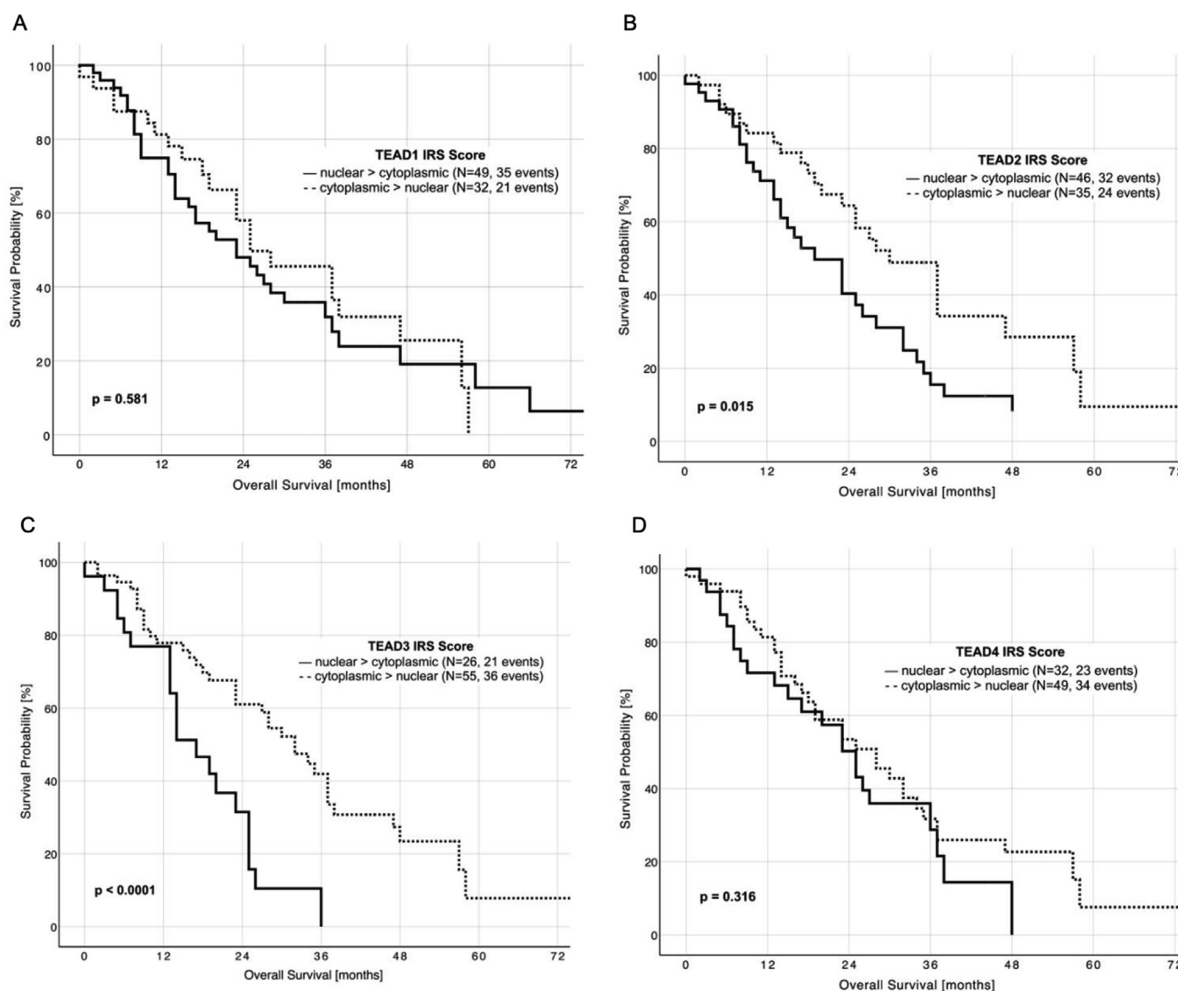


Fig. 2. Kaplan-Meier survival analyses of overall survival (OS) of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) based on the subcellular localization of TEAD1–4. (A) No significant difference was observed for nuclear or cytoplasmic protein levels of TEAD1 ($p = 0.581$, log-rank test). (B) Patients with a higher IRS of nuclear TEAD2 had a significantly shorter OS ($p = 0.015$, log-rank test). The median OS of patients with a nuclear > cytoplasmic TEAD2 ratio was 16.0 months versus 28.0 months in patients with a cytoplasmic > nuclear TEAD2 ratio. (C) Patients with a predominantly nuclear staining of TEAD3 had an unfavourable OS ($p < 0.0001$, log-rank test). The median OS for a higher nuclear staining of TEAD3 was 14.0 months compared to 27.0 months in patients with cytoplasmic > nuclear TEAD3 ratio. (D) The subcellular localization of TEAD4 had no significant association with the OS ($p = 0.316$, log-rank test).

study. The patients had a median age of 65.2 years and 41 were female (50.6%). 6 patients (7.4%) received neoadjuvant chemotherapy with mFOLFIRINOX. The majority of the tumours was located in the pancreas head (80.2%). Due to the most common tumour location, a pancreaticoduodenectomy (PDPP) was performed in the most cases (71.6%). Most patients suffered from a T3 stage (67.9%), nodal-positive (74.1%) and poorly differentiated (66.7%) tumour. 32 patients (39.5%) suffered from liver metastases at the time of surgery.

Protein levels of TEAD in PDAC

We examined the nuclear and cytoplasmic TEAD staining in pancreatic cancer cells using the IRS score and compared the staining in both, nucleus and cytoplasm, directly to each other by creating a ratio. Staining of TEAD was seen in all 81 patients but varying in intensity and subtype (Fig. 1). Representative images of immunohistochemical staining are shown in Fig. 1. A predominantly nuclear staining of each transcription factor is illustrated in

Fig. 1A–D while a predominantly cytoplasmic staining can be seen in Fig. 1E–H.

Compared to the adjacent non-tumorous tissue, the staining of TEAD1, TEAD2 and TEAD3 was increased in both, the nucleus and cytoplasm of pancreatic cancer cells (Fig. 1I–L, Table 1, $p < 0.01$). Nuclear TEAD4 was significantly increased in pancreatic cancer cells ($p = 0.02$). However, we did not observe any significant difference of cytoplasmic TEAD4 staining between cancer cells and adjacent non-tumorous tissue ($p = 0.32$). Regarding tumour characteristics, we found a lower IRS score of nuclear TEAD1 ($p < 0.001$) and a higher cytoplasmic > nuclear ratio in metastasized patients ($p = 0.04$). In contrast, the IRS score of nuclear TEAD2 and TEAD3 was significantly higher in metastasized patients ($p < 0.01$). The TEAD2 and TEAD3 ratio was shifted towards the nuclear fraction in these patients ($p < 0.05$). In addition, a higher nuclear > cytoplasmic ratio of TEAD2 and TEAD3 was found in more undifferentiated tumours ($p = 0.03$). The protein level of TEAD4 was not associated with any feature (Table 2).

Table 3**Cox proportional hazard model for overall survival (n=81).** All statistically significant variables are highlighted in bold. CI: confidence interval.

Variable	No.	Median OS [months]	Univariate		Multivariate	
			Hazard ratio (95% CI)	p-value	Hazard ratio (95% CI)	p-value
TEAD1 IRS score						
Nuclear > Cytoplasmic	49	19.0	1.00		1.00	
Cytoplasmic > Nuclear	32	21.0	1.16 (0.67–2.02)	0.59	1.12 (0.54–2.47)	0.71
TEAD2 IRS score						
Nuclear > Cytoplasmic	46	16.0	1.00		1.00	
Cytoplasmic > Nuclear	35	28.0	0.42 (0.13–1.48)	0.03	0.89 (0.47–1.62)	0.039
TEAD3 IRS score						
Nuclear > Cytoplasmic	26	14.0	1.00		1.00	
Cytoplasmic > Nuclear	55	27.0	0.33 (0.18–0.61)	<0.001	0.29 (0.13–0.62)	0.002
TEAD4 IRS score						
Nuclear > Cytoplasmic	32	21.5	1.00		1.00	
Cytoplasmic > Nuclear	49	19.0	0.72 (0.41–1.26)	0.26	0.88 (0.42–1.82)	0.73
Tumour pathological stage						
T1	7	25.0	1.00		1.00	
T2	10	14.0	2.85 (0.52–15.75)	0.23	5.47 (0.82–36.61)	0.08
T3	55	19.0	3.02 (0.73–12.52)	0.13	3.69 (0.71–19.02)	0.12
T4	9	18.0	3.96 (0.82–19.16)	0.09	5.16 (0.91–29.36)	0.06
Nodal status						
N0	21	23.0	1.00		1.00	
N1	55	19.0	1.79 (0.87–3.68)	0.12	1.65 (0.73–3.73)	0.23
N2	5	7.0	3.81 (0.79–18.44)	0.09	3.12 (0.52–19.39)	0.21
Metastasis status						
M0	49	25.0	1.00		1.00	
M1	32	13.5	1.60 (0.94–2.73)	0.08	1.56 (0.79–3.06)	0.19
Tumour differentiation						
Well-differentiated	7	33.0	1.00		1.00	
Moderately differentiated	17	23.0	1.91 (0.59–6.21)	0.28	1.34 (0.33–5.41)	0.68
Poorly differentiated	54	16.0	2.73 (0.96–7.73)	0.06	1.39 (0.39–4.91)	0.61
Anaplastic	3	34.0	0.75 (0.08–6.77)	0.79	0.61 (0.06–6.63)	0.68
Resection margin						
R0	56	20.5	1.00		1.00	
R1	25	18.0	1.08 (0.60–1.92)	0.81	0.92 (0.46–1.83)	0.80

Protein levels of TEAD in liver metastases

We pondered the question if the transcription factors are equally higher stained in the corresponding liver metastases of synchronous metastasized patients (Fig. 1M–P, Table 1). To address that, we investigated the liver metastases of 23 patients and compared the IRS with them of the corresponding primary tumour. No significant difference was found, and all transcription factors had comparable nuclear and cytoplasmic IRS score as well as similar distributions between nucleus and cytoplasm in the liver metastases compared to their primary tumour (Table 1, $p > 0.05$).

Association of TEAD with outcome

Data for OS was available for all 81 patients with 25 patients (30.9%) still living. Data regarding the time of recurrence was available to us for 60 of the patients and of these 60 patients, 41 patients (68.3%) suffered a recurrence. Using Kaplan-Meier analysis, there was no significant association between TEAD1 and the OS of the cohort (Fig. 2A). More interestingly, a significant correlation was found between the TEAD2 and TEAD3 protein level and patient OS (Fig. 2B and C). Patients with a higher IRS score of nuclear TEAD2 and TEAD3 compared to the cytoplasmic staining had a significant shorter OS. The median OS of patients with a nuclear > cytoplasmic TEAD2 ratio was 16.0 months while a cytoplasmic > nuclear TEAD2 ratio came along with a median OS of 28.0 months ($p = 0.015$). Almost equal results were observed for TEAD3 ratio with a median OS of 14.0 months for nuclear > cytoplasmic patients compared to 27.0 months in patients with cytoplasmic > nuclear TEAD3 ratio ($p < 0.0001$). In a multivariate analysis, TEAD2 ratio (HR: 0.89; 95% CI: 0.47 to 1.62; $p = 0.039$) and TEAD3 ratio (HR: 0.29; 95% CI: 0.13 to 0.62; $p = 0.002$) was associated with OS (Table 3). However, TEAD4

was not significantly associated with OS (Fig. 2D).

Focusing on the DFS of our study population, a shift to the nuclear fraction of TEAD seems to be an important factor in predicting the time until recurrence as TEAD1, TEAD2 and TEAD4 were significantly associated with the DFS while TEAD3 showed no correlation (Fig. 3A–D). As observed for the OS, a nuclear > cytoplasmic TEAD2 ratio was associated with a significantly shorter DFS ($p = 0.008$, Fig. 3B). The median DFS in patients with a higher IRS score of nuclear TEAD2 in comparison to cytoplasmic TEAD2, was 10.0 months as compared with 19.0 months in patients with a cytoplasmic > nuclear TEAD2 ratio. In addition, a nuclear > cytoplasmic ratio of TEAD1 and TEAD4 was associated with a shorter DFS (Fig. 3A,D). However, TEAD3 seems to be only a predictor for the OS, but not for DFS (Fig. 3C). Applying multivariate analysis, only the TEAD2 ratio (HR: 0.42; 95% CI: 0.18 to 0.97; $p = 0.042$) emerged as an independent factor for DFS (Table 4).

Discussion

In our study, we used immunohistochemical techniques to assess protein levels and subcellular localization of all members of the TEAD family. This was carried out on 81 patients diagnosed with PDAC. As TEAD could only interact with their target genes when located in the cell nucleus, we wondered if a nuclear localization of TEAD is associated with tumour progression and an unfavourable prognosis following surgery. To our knowledge, this study is the first investigating the clinical impact of TEAD staining in PDAC.

Several studies have investigated the relevance of TEAD in various malignancies and found TEAD as an important promoter for tumour initiation, cancer progression and metastatic spread [5,30].

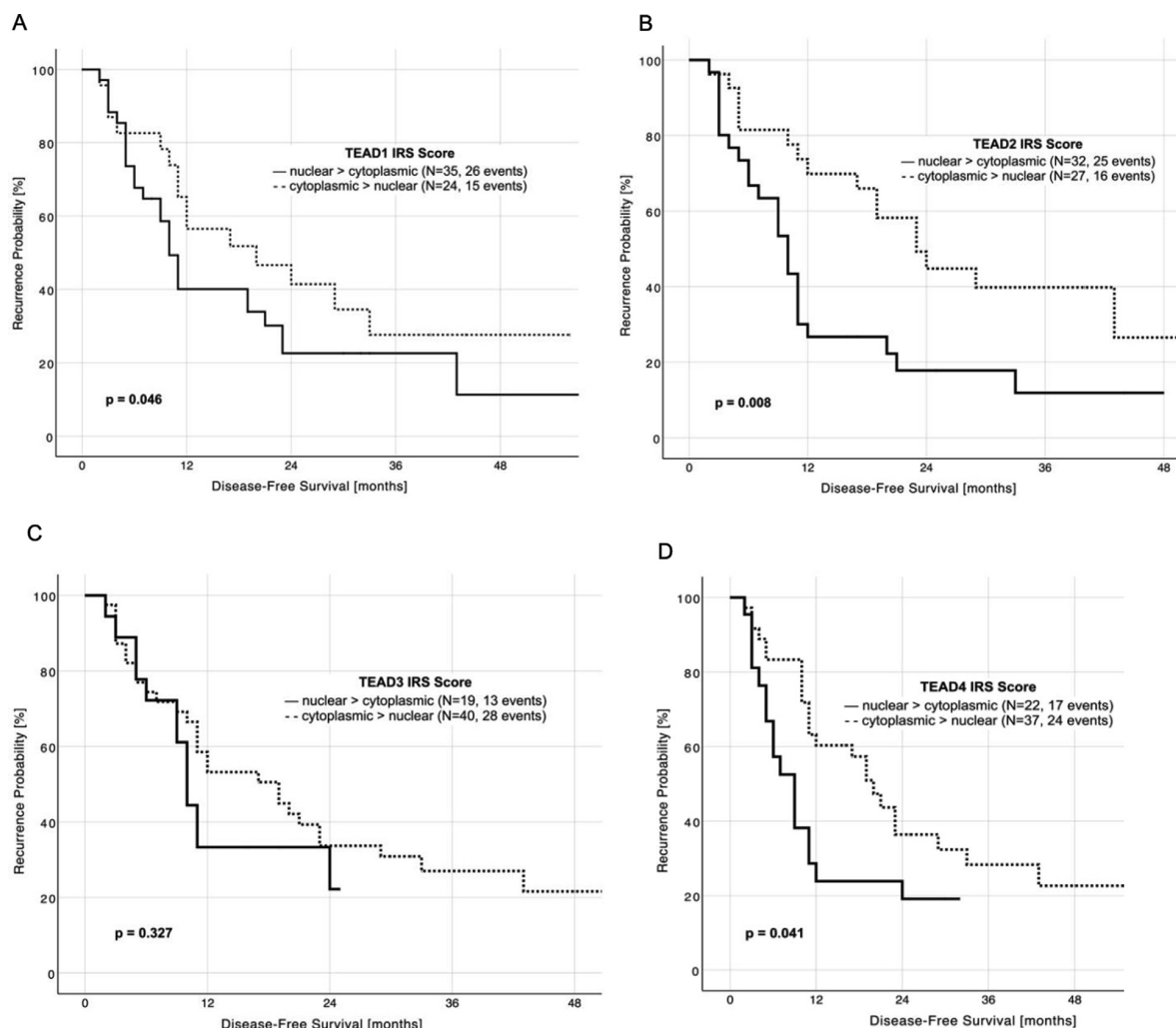


Fig. 3. Kaplan-Meier survival analyses of disease-free survival (DFS) of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) based on the subcellular localization of TEAD1-4. (A) Predominantly nuclear staining of TEAD1 was significantly associated with a shorter DFS in our study population ($p = 0.046$, log-rank test). (B) Patients with a nuclear > cytoplasmic TEAD2 ratio had a significantly shorter DFS (median DFS: 10.0 months) than patients with a cytoplasmic > nuclear ratio (median DFS: 19.0 months) ($p = 0.008$, log-rank test). (C) The subcellular localization of TEAD4 had no significant association with the DFS ($p = 0.327$, log-rank test). (D) Patients with a predominantly nuclear staining of TEAD4 had an unfavourable DFS ($p < 0.041$, log-rank test).

As a result, a stronger TEAD staining is associated with a poor prognosis in gastric, colorectal, prostate and breast cancer [16,17,21,31–34]. However, these results indicate that each member of the TEAD family has its own role in different tumour entities and they must be considered separately for every malignancy.

Our results are consistent with the aforementioned studies of other tumour entities, attributing TEAD with a central role in tumour progression, which results in an unfavourable prognosis for patients with PDAC. We found TEAD1, TEAD2 and TEAD3 were significantly increased in the nucleus and cytoplasm of pancreatic cancer cells when compared to adjacent non-tumorous pancreatic tissue. Furthermore, we determined whether TEAD was more prevalent in the cytoplasm or in the nucleus. Kaplan-Meier analysis revealed that a higher IRS score of the nuclear fraction compared to the cytoplasmic fraction of TEAD2 and TEAD3 is associated with a poor OS and a nuclear shift of TEAD1, TEAD2 and TEAD4 is concomitant with a shorter DFS. In multivariate analysis, TEAD2 and TEAD3 emerged as independent factors for the OS and TEAD2 was an independent prognostic factor for the DFS. These results prove that the TEAD family plays an important role in PDAC tumour

progression with a significant impact on patient outcome. Moreover, our results indicate that TEAD2 could be the most relevant member of the TEAD family in PDAC, as it was revealed as an independent prognostic factor for OS and DFS.

Early micrometastatic spread is a major restrictive factor that contributes to the poor prognosis of patients with resectable PDAC [35]. Current literature has established that PDAC is a systemic disease, even when it presents as a local disease [36]. These results underscore that poor overall outcomes are more likely attributable to the metastatic character of PDAC. Bearing this in mind, we hypothesised that TEAD could be involved in the formation of metastasis in PDAC, also contributing to the poor outcome. Various studies shed light on TEADs transcriptional output driving cell transformation by stimulating EMT [37–40]. Moreover, the prometastatic effect of TEAD target genes, such as *CTGF* and *MRTF*, was proven in breast cancer and colorectal cancer [18–20,22]. In particular case of PDAC, most studies focussed on the YAP-TEAD-interaction as a driver for metastasis and tumour progression, but the role of each TEAD in metastatic processes in a real-life cohort remains elusive.

Table 4**Cox proportional hazard model for disease-free survival (n=60).** All statistically significant variables are highlighted in bold. CI: confidence interval.

Variable	No.	Median DFS [months]	Univariate		Multivariate	
			Hazard ratio (95% CI)	p-value	Hazard ratio (95% CI)	p-value
TEAD1 IRS score						
Nuclear > Cytoplasmic	35	10.0	1.00		1.00	
Cytoplasmic > Nuclear	25	16.0	0.65 (0.34–1.23)	0.048	0.53 (0.13–0.95)	0.091
TEAD2 IRS score						
Nuclear > Cytoplasmic	35	10.0	1.00		1.00	
Cytoplasmic > Nuclear	25	19.0	0.68 (0.36–1.29)	0.039	0.42 (0.18–0.97)	0.042
TEAD3 IRS score						
Nuclear > Cytoplasmic	19	10.0	1.00		1.00	
Cytoplasmic > Nuclear	41	13.0	0.72 (0.37–1.42)	0.34	0.54 (0.23–1.23)	0.17
TEAD4 IRS score						
Nuclear > Cytoplasmic	22	8.0	1.00		1.00	
Cytoplasmic > Nuclear	38	17.0	0.52 (0.27–0.98)	0.04	0.72 (0.32–1.61)	0.42
Tumour pathological stage						
T1	6	21.5	1.00		1.00	
T2	10	9.5	3.76 (0.78–18.15)	0.10	6.27 (0.99–39.7)	0.051
T3	39	11.0	2.93 (0.69–12.37)	0.14	1.42 (0.23–8.79)	0.71
T4	5	13.0	5.29 (0.96–19.19)	0.046	13.83 (1.69–21.62)	0.015
Nodal status						
N0	16	19.0	1.00		1.00	
N1	39	11.0	1.63 (0.74–3.61)	0.27	2.97 (1.05–8.46)	0.041
N2	5	3.0	10.49 (3.15–34.97)	<0.001	15.46 (3.02–19.23)	0.001
Metastasis status						
M0	35	17.0	1.00		1.00	
M1	25	9.0	1.91 (1.03–3.54)	0.039	3.69 (1.32–10.37)	0.013
Tumour differentiation						
Well-differentiated	4	32.5	1.00		1.00	
Moderately differentiated	15	19.0	5.83 (0.75–45.8)	0.09	19.66 (1.74–32.15)	0.016
Poorly differentiated	41	10.0	7.07 (0.95–52.4)	0.06	18.99 (1.77–23.01)	0.015
Resection margin						
R0	41	11.0	1.00		1.00	
R1	19	12.0	1.06 (0.45–1.69)	0.69	1.12 (0.13–1.58)	0.26

Focusing on our study, we observed a higher IRS score of nuclear TEAD2 and nuclear TEAD3 in patients suffering from liver metastasis at time of surgery. The ratio of nuclear and cytoplasm staining of TEAD2 and TEAD3 was shifted towards the nuclear fraction in metastasized patients. In addition, TEAD2 and TEAD3 were predominantly shifted towards the nucleus of the metastatic cancer cells in the liver. These findings were consistent with the staining in the primary tumours. These results support our hypothesis, that the TEAD family takes a sufficient role in metastatic formation and tumour progression. According to our findings, TEAD2 and TEAD3 might be important drivers of PDAC progression as these transcription factors were found to be more localized in the nucleus in progressive disease resulting in an unfavourable outcome. Furthermore, the upregulation and nuclear localization of TEAD2 and TEAD3 in the relating liver metastases underlines the importance of the TEAD family in metastatic seeding by disseminated pancreatic cancer cells and are consistent with a study by Er et al. who found a L1CAM-ILK-YAP-TEAD signalling axis essential for metastatic colonisation [44].

A key point of our study was the evaluation of the TEAD protein levels depending on the subcellular localization, as only nuclear TEAD can interact with target genes and the role of cytoplasmic TEAD is not understood. Our results revealed that patients suffering from metastatic and progressive disease had a nuclear shift of TEAD2 and TEAD3. This regulation of nucleocytoplasmic shuttling warrants great interest and future study. TEADs have minimal inherent transcriptional activity and therefore require coactivators to stimulate target gene expression for releasing their protumorigenic and prometastatic potential [4]. One extensively studied coactivator is YAP. The YAP-TEAD complex is the nuclear transcriptional module of the Hippo pathway and it is well established that YAP-TEAD is sufficient to drive cancer metastasis and promotes tumour progression

of PDAC [45–49]. However, there is evidence that the activity and subcellular localization of TEAD is also regulated in a Hippo-independent manner [5,12,21]. The Wnt pathway is a well-established upstream signal transduction pathway, which regulates TEAD via both Hippo dependent and independent mechanisms [50–52]. Another interesting pathway participating in the TEAD regulation is the TGF- β pathway. The interaction between the TGF- β and Hippo pathways is centred on the relationship between Smad and TEAD [5]. As a result, TGF- β induces an increased expression and activity of TEAD [42,53,54]. All of this evidence emphasizes TEADs importance as an effector of the TGF- β pathway during tumour genesis. Lastly, TEAD is also a mediator of the EGFR-RAS-RAF-MAPK pathway as one of the most commonly deregulated pathways in human malignancies [5,55]. However, our study focussed on the transcriptional output of TEAD itself regardless of interactions with upstream signalling pathways. Based on our results, TEAD2 and TEAD3 are highly clinically relevant in PDAC and therefore, we see a huge potential in regulating the activity or the nucleocytoplasmic shuttling as a novel therapeutic approach. Inhibiting the interaction of TEAD with its target genes would have the great advantage of silencing several pathways at once, as TEAD is the crossroad of many oncogenic signals.

Each TEAD is mainly composed of structured domains [56]. The development of a TEAD antagonist may prove to be a formidable challenge, as the inhibitor needs to gain nuclear access and bind to TEAD with high affinity and specificity. Unlike well-established enzymes, which possess one active site, there are multiple potential vectors for antagonising TEAD therapeutically. As there is no clear consensus on the functional role of each paralog, it is uncertain if an inhibitor must be specific for one member of the family or specific for all human TEAD proteins. According to our results, the inhibition of TEAD2 and TEAD3 could make a huge impact as these

were found to be prometastatic and prognostically relevant. However, TEAD1 and TEAD4 were also increased in our study population when compared with the adjacent non-tumorous tissue but without having a major impact on patients' outcome. Targeting the DNA Binding Domain (DBD) of TEAD selectively has not yet been reported on and thus far there are no inhibitors currently available [57–59]. This region is pan specific to all TEADs but the highly charged nature of the protein-DNA interaction would not easily lend itself to disruption from a small molecule, thus potentially limiting the membrane permeability required to gain access to the nucleus [57,60].

The most promising therapeutic option available is the targeting of the TEAD-YAP interface. This class of drugs target YAP itself or the TEAD-YAP interaction includes verteporfin, K-975 and VGLL4 [63–66]. Verteporfin was found to act as a competitor to TEADs binding site on YAP and is capable of disrupting the YAP-TEAD interaction [67]. This drug is certainly the most favoured YAP inhibitor, however caution should be exercised as some of the tumour inhibitory effects have been described as YAP independent [68,69]. K-975 is another potent TEAD inhibitor that disrupts the YAP-TEAD interaction and had antineoplastic properties in mesothelioma cell lines [70,71]. Jiao et al. presented VGLL4-mimicking peptide which directly competes with YAP for binding TEAD and seems a promising therapeutic agent in gastric cancer [63]. However, these therapeutic agents are not sufficient against the transcriptional output of TEAD induced in a YAP-independent manner and, according to the current literature cannot completely inhibit the nuclear activity of TEAD.

Conclusion

Our study demonstrated that a nuclear shift of TEAD2 and TEAD3 could have a major impact on metastatic and progressive disease in PDAC. Furthermore, TEAD2 has emerged as an independent prognostic factor for OS and DFS and emphasizes the clinical relevance of the TEAD family. According to our results, inhibiting TEAD proteins directly or influencing the nucleocytoplasmic shuttling towards a cytoplasmic sequestration of TEADs could be a novel and very promising therapeutic approach. This inhibition would target both the Hippo/YAP-dependent and independent regulation mechanism of TEAD.

Declaration of competing interest

No potential conflicts of interest were disclosed by the authors.

Acknowledgements

This work is part of the M.D. thesis of R. Drexler and the diploma thesis of R. Fahy.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.pan.2020.12.003>.

Funding information

This study was supported by a scientific grant from the Guenter Haenisch Foundation.

Author contributions

R.D., R.F. and M.K. for acquisition of data, analysis and interpretation of data, statistical analysis and drafting of the manuscript;

M.E., T.R., B.F. and M.K.L. for technical and material support; K.O. and K.W. for study concept and design, obtainment of funding and study supervision. All authors read and approved the final manuscript.

Data availability

All data generated that are relevant to the results presented in this article are included in this article. Other data that were not relevant for the results presented here are available from the corresponding author R. Drexler upon reasonable request.

References

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Canc* 2015 Mar 1;136(5):E359–86.
- [2] Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet* 2011 Aug 13;378(9791):607–20.
- [3] Hogendorf P, Durczyński A, Strzelczyk J. Metastatic pancreatic cancer. *J Invest Surg* 2018 Apr;31(2):151–2.
- [4] Xiao JH, Davidson I, Matthes H, Garnier J-M, Chambon P. Cloning, expression, and transcriptional properties of the human enhancer factor TEF-1. *Cell* 1991 May;65(4):551–68.
- [5] Huh H, Kim D, Jeong H-S, Park H. Regulation of TEAD transcription factors in cancer biology. *Cells* 2019 Jun 17;8(6):600.
- [6] Meng Z, Moroishi T, Guan K-L. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev* 2016 Jan 1;30(1):1–17.
- [7] Moon S, Yeon Park S, Woo Park H. Regulation of the Hippo pathway in cancer biology. *Cell Mol Life Sci* 2018 Jul;75(13):2303–19.
- [8] Park JH, Shin JE, Park HW. The role of hippo pathway in cancer stem cell biology. *Mol Cell* 2018 Feb 28;41(2):83–92.
- [9] Gupta MP, Kogut P, Gupta M. Protein kinase-A dependent phosphorylation of transcription enhancer factor-1 represses its DNA-binding activity but enhances its gene activation ability. *Nucleic Acids Res* 2000 Aug 15;28(16):3168–77.
- [10] Jiang SW, Dong M, Trujillo MA, Miller LJ, Eberhardt NL. DNA binding of TEA/ATTS domain factors is regulated by protein kinase C phosphorylation in human choriocarcinoma cells. *J Biol Chem* 2001 Jun 29;276(26):23464–70.
- [11] Home P, Saha B, Ray S, Dutta D, Gunewardena S, Yoo B, et al. Altered subcellular localization of transcription factor TEAD4 regulates first mammalian cell lineage commitment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012 May 8;109(19):7362–7.
- [12] Lin KC, Moroishi T, Meng Z, Jeong H-S, Plouffe SW, Sekido Y, et al. Regulation of Hippo pathway transcription factor TEAD by p38 MAPK-induced cytoplasmic translocation. *Nat Cell Biol* 2017 Jul 28;19(8):996–1002.
- [13] Fernandez-L A, Northcott PA, Dalton J, Fraga C, Ellison D, Angers S, et al. YAP1 is amplified and up-regulated in hedgehog-associated medulloblastomas and mediates Sonic hedgehog-driven neural precursor proliferation. *Genes Dev* 2009 Dec 1;23(23):2729–41.
- [14] Zhang W, Gao Y, Li P, Shi Z, Guo T, Li F, et al. VGLL4 functions as a new tumor suppressor in lung cancer by negatively regulating the YAP-TEAD transcriptional complex. *Cell Res* 2014 Mar;24(3):331–43.
- [15] Xia Y, Zhang Y-L, Yu C, Chang T, Fan H-Y. YAP/TEAD co-activator regulated pluripotency and chemoresistance in ovarian cancer initiated cells. *PLoS One* 2014;9(11):e109575.
- [16] Wang C, Nie Z, Zhou Z, Zhang H, Liu R, Wu J, et al. The interplay between TEAD4 and KLF5 promotes breast cancer partially through inhibiting the transcription of p27Kip1. *Oncotarget* 2015 Jul 10;6(19):17685–97.
- [17] Han W, Jung E-M, Cho J, Lee JW, Hwang K-T, Yang S-J, et al. DNA copy number alterations and expression of relevant genes in triple-negative breast cancer. *Gene Chromosome Canc* 2008 Jun;47(6):490–9.
- [18] Chen D, Sun Y, Wei Y, Zhang P, Rezaeian AH, Teruya-Feldstein J, et al. LIFR is a breast cancer metastasis suppressor upstream of the Hippo-YAP pathway and a prognostic marker. *Nat Med* 2012 Oct;18(10):1511–7.
- [19] Kim T, Hwang D, Lee D, Kim J, Kim S, Lim D. MRTF potentiates TEAD - YAP transcriptional activity causing metastasis. *EMBO J* 2017 Feb 15;36(4):520–35.
- [20] Guo P-D, Lu X-X, Gan W-J, Li X-M, He X-S, Zhang S, et al. RAR γ down-regulation contributes to colorectal tumorigenesis and metastasis by depressing the hippo-yap pathway. *Canc Res* 2016 Jul 1;76(13):3813–25.
- [21] Liu Y, Wang G, Yang Y, Mei Z, Liang Z, Cui A, et al. Increased TEAD4 expression and nuclear localization in colorectal cancer promote epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a YAP-independent manner. *Oncogene* 2016;35(21):2789–800.
- [22] Li C, Wang S, Xing Z, Lin A, Liang K, Song J, et al. A ROR1-HER3-lncRNA signalling axis modulates the Hippo-YAP pathway to regulate bone metastasis. *Nat Cell Biol* 2017;19(2):106–19.
- [23] Wei H, Wang F, Wang Y, Li T, Xiu P, Zhong J, et al. Verteporfin suppresses cell survival, angiogenesis and vasculogenic mimicry of pancreatic ductal

- adenocarcinoma via disrupting the YAP-TEAD complex. *Canc Sci* 2017 Mar;108(3):478–87.
- [24] Zhou Q, Bauden M, Andersson R, Hu D, Marko-Varga G, Xu J, et al. YAP1 is an independent prognostic marker in pancreatic cancer and associated with extracellular matrix remodeling. *J Transl Med* 2020 Dec;18(1):77.
- [25] Yoo Lee, Jun Noh, Lee Jung, et al. The YAP1–NMU Axis is associated with pancreatic cancer progression and poor outcome: identification of a novel diagnostic biomarker and therapeutic target. *Cancers* 2019 Sep 30;11(10):1477.
- [26] Cebola I, Rodríguez-Seguí SA, Cho CH-H, Bessa J, Rovira M, Luengo M, et al. TEAD and YAP regulate the enhancer network of human embryonic pancreatic progenitors. *Nat Cell Biol* 2015 May;17(5):615–26.
- [27] Rozengurt E, Sinnott-Smith J, Eibl G. Yes-associated protein (YAP) in pancreatic cancer: at the epicenter of a targetable signaling network associated with patient survival. *Sig Transduct Target Ther* 2018 Dec;3(1):11.
- [28] Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe* 1987 May;8(3):138–40.
- [29] Kaemmerer D, Peter L, Lupp A, Schulz S, Sängler J, Baum RP, et al. Comparing of IRS and Her2 as immunohistochemical scoring schemes in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Int J Clin Exp Pathol* 2012;5(3):187–94.
- [30] Zhou Y, Huang T, Cheng A, Yu J, Kang W, To K. The TEAD family and its oncogenic role in promoting tumorigenesis. *IJMS* 2016 Jan 21;17(1):138.
- [31] Knight JF, Shepherd CJ, Rizzo S, Brewer D, Jhavar S, Dodson AR, et al. TEAD1 and c-Cbl are novel prostate basal cell markers that correlate with poor clinical outcome in prostate cancer. *Br J Canc* 2008 Dec 2;99(11):1849–58.
- [32] Zhang C, Liang K, Zhou G, Zhang Q, Li J. Expression of hippo pathway in colorectal cancer. *Saudi J Gastroenterol* 2014;20(3):188.
- [33] Zhou Y, Huang T, Zhang J, Wong CC, Zhang B, Dong Y, et al. TEAD1/4 exerts oncogenic role and is negatively regulated by miR-4269 in gastric tumorigenesis. *Oncogene* 2017 Nov;36(47):6518–30.
- [34] Zhou G-X, Li X-Y, Zhang Q, Zhao K, Zhang C-P, Xue C-H, et al. Effects of the hippo signaling pathway in human gastric cancer. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* 2013 Sep 30;14(9):5199–205.
- [35] Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 2012 Jan;148(1–2):349–61.
- [36] Hishinuma S, Ogata Y, Tomikawa M, Ozawa I, Hirabayashi K, Igarashi S. Patterns of recurrence after curative resection of pancreatic cancer, based on autopsy findings. *J Gastrointest Surg* 2006 Apr;10(4):511–8.
- [37] Zhang H, Liu C-Y, Zhao Z-Y, Zhao B, Yao J, Zhao S, et al. TEAD transcription factors mediate the function of TAZ in cell growth and epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2009 May 15;284(20):13355–62.
- [38] Zhao B, Ye X, Yu J, Li L, Li W, Li S, et al. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev* 2008 Jul 15;22(14):1962–71.
- [39] Overholtzer M, Zhang J, Smolen GA, Muir B, Li W, Sgroi DC, et al. Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 Aug 15;103(33):12405–10.
- [40] Lamar JM, Stern P, Liu H, Schindler JW, Jiang Z-G, Hynes RO. The Hippo pathway target, YAP, promotes metastasis through its TEAD-interaction domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012 Sep 11;109(37):E2441–50.
- [42] Hiemer SE, Szymaniak AD, Varelas X. The transcriptional regulators TAZ and YAP direct transforming growth factor β -induced tumorigenic phenotypes in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2014 May 9;289(19):13461–74.
- [44] Er EE, Valiente M, Ganesh K, Zou Y, Agrawal S, Hu J, et al. Pericyte-like spreading by disseminated cancer cells activates YAP and MRTF for metastatic colonization. *Nat Cell Biol* 2018 Aug;20(8):966–78.
- [45] Ansari D, Ohlsson H, Althini C, Bauden M, Zhou Q, Hu D, et al. The hippo signaling pathway in pancreatic cancer. *Anticancer Res* 2019 Jul;39(7):3317–21.
- [46] Tang J-Y, Yu C-Y, Bao Y-J, Chen L, Chen J, Yang S-L, et al. TEAD4 promotes colorectal tumorigenesis via transcriptionally targeting YAP1. *Cell Cycle* 2018;17(1):102–9.
- [47] Kim T, Hwang D, Lee D, Kim J-H, Kim S-Y, Lim D-S. MRTF potentiates TEAD-YAP transcriptional activity causing metastasis. *EMBO J* 2017 15;36(4):520–35.
- [48] Diepenbruck M, Waldmeier L, Ivanek R, Berninger P, Arnold P, van Nimwegen E, et al. Tead2 expression levels control the subcellular distribution of Yap and Taz, zyxin expression and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* 2014 Apr 1;127(Pt 7):1523–36.
- [49] Xie D, Cui J, Xia T, Jia Z, Wang L, Wei W, et al. Hippo transducer TAZ promotes epithelial mesenchymal transition and supports pancreatic cancer progression. *Oncotarget* 2015 Nov 3;6(34):35949–63.
- [50] Azzolin L, Zanconato F, Bresolin S, Forcato M, Basso G, Bicciato S, et al. Role of TAZ as mediator of Wnt signaling. *Cell* 2012 Dec 21;151(7):1443–56.
- [51] Azzolin L, Panciera T, Soligo S, Enzo E, Bicciato S, Dupont S, et al. YAP/TAZ incorporation in the β -catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell* 2014 Jul;158(1):157–70.
- [52] Cai J, Maitra A, Anders RA, Taketo MM, Pan D. β -Catenin destruction complex-independent regulation of Hippo-YAP signaling by APC in intestinal tumorigenesis. *Genes Dev* 2015 Jul 15;29(14):1493–506.
- [53] Pefani D-E, Pankova D, Abraham AG, Grawenda AM, Vlahov N, Scrase S, et al. TGF- β targets the hippo pathway scaffold RASSF1A to facilitate YAP/SMAD2 nuclear translocation. *Mol Cell* 2016 Jul;63(1):156–66.
- [54] Varelas X, Sakuma R, Samavarchi-Tehrani P, Peerani R, Rao BM, Dembowy J, et al. TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal. *Nat Cell Biol* 2008 Jul;10(7):837–48.
- [55] Lee T-F, Tseng Y-C, Chang W-C, Chen Y-C, Kao Y-R, Chou T-Y, et al. YAP1 is essential for tumor growth and is a potential therapeutic target for EGFR-dependent lung adenocarcinomas [Internet]. *Oncotarget* 2017 Oct 27 [cited 2020 May 2];8(52). Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/19647>.
- [56] Jacquemin P, Hwang J-J, Martial JA, Dollé P, Davidson I. A novel family of developmentally regulated mammalian transcription factors containing the TEA/ATTS DNA binding domain. *J Biol Chem* 1996 Sep 6;271(36):21775–85.
- [57] Holden JK, Cunningham CN. Targeting the hippo pathway and cancer through the TEAD family of transcription factors. *Cancers* 2018 Mar 20;10(3).
- [58] Anbanandam A, Albarado DC, Nguyen CT, Halder G, Gao X, Veeraraghavan S. Insights into transcription enhancer factor 1 (TEF-1) activity from the solution structure of the TEA domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 Nov 14;103(46):17225–30.
- [59] Li Z, Zhao B, Wang P, Chen F, Dong Z, Yang H, et al. Structural insights into the YAP and TEAD complex. *Genes Dev* 2010 Feb 1;24(3):235–40.
- [60] Guo L, Teng L. YAP/TAZ for cancer therapy: opportunities and challenges (review). *Int J Oncol* 2015 Apr;46(4):1444–52.
- [63] Jiao S, Wang H, Shi Z, Dong A, Zhang W, Song X, et al. A peptide mimicking VGLL4 function acts as a YAP antagonist therapy against gastric cancer. *Canc Cell* 2014 Feb 10;25(2):166–80.
- [64] Calses PC, Crawford JJ, Lill JR, Dey A. Hippo pathway in cancer: aberrant regulation and therapeutic opportunities. *Trends Canc* 2019 May;5(5):297–307.
- [65] Zanconato F, Battilana G, Cordenonsi M, Piccolo S. YAP/TAZ as therapeutic targets in cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2016;29:26–33.
- [66] Elisi GM, Santucci M, D'Arca D, Lauriola A, Marverti G, Losi L, et al. Repurposing of drugs targeting YAP-TEAD functions. *Cancers* 2018 Sep 14;10(9).
- [67] Liu-Chittenden Y, Huang B, Shim JS, Chen Q, Lee S-J, Anders RA, et al. Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes Dev* 2012 Jun 15;26(12):1300–5.
- [68] Zhang H, Ramakrishnan SK, Triner D, Centofanti B, Maitra D, Györfy B, et al. Tumor-selective proteotoxicity of verteporfin inhibits colon cancer progression independently of YAP1. *Sci Signal* 2015 Oct 6;8(397):ra98.
- [69] Dasari VR, Mazack V, Feng W, Nash J, Carey DJ, Gogoi R. Verteporfin exhibits YAP-independent anti-proliferative and cytotoxic effects in endometrial cancer cells. *Oncotarget* 2017 Apr 25;8(17).
- [70] Pobbati AV, Hong W. A combat with the YAP/TAZ-TEAD oncoproteins for cancer therapy. *Theranostics* 2020;10(8):3622–35.
- [71] Kaneda A, Seike T, Uemori T, Myojo K, Aida K, Danjo T, et al. Abstract 3086: discovery of a first-in-class TEAD inhibitor which directly inhibits YAP/TAZ-TEAD protein-protein interaction and shows a potent anti-tumor effect in malignant pleural mesothelioma. *Exp Mol Therapeut Am Assoc Canc Res* 2019. 3086–3086.

3.3 Transcription enhanced associate domain factor 1 (TEAD1) predicts liver regeneration outcome of ALPPS-treated patients

Mirco Küchler, Mareike Ehmke, Kai Jaquet, Peter Wohlmuth, Johannes M. Feldhege, Tim Reese, Thilo Hartmann, Richard Drexler, Tessa Huber, Thorsten Burmester und Karl J. Oldhafer

Angenommen in *HPB: The Official Journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*

(09. Dezember 2024)

ORIGINAL ARTICLE

Transcription enhanced associate domain factor 1 (TEAD1) predicts liver regeneration outcome of ALPPS-treated patients

Mirco Küchler^{1,2}, Mareike Ehmke^{1,2}, Kai Jaquet^{1,2}, Peter Wohlmuth^{1,2}, Johannes M. Feldhege^{1,2}, Tim Reese^{1,3}, Thilo Hartmann^{1,2}, Richard Drexler⁴, Tessa Huber⁵, Thorsten Burmester⁶ & Karl J. Oldhafer^{1,3}

¹Institute for Clinical Research (IKF), Semmelweis University, Campus Hamburg, ²Division of Cell Biology, Core Lab Facility, Asklepios Hospital St Georg, ³Division of HPB Surgery, Department of Surgery, Asklepios Hospital Barmbek, ⁴Division of Neurosurgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, ⁵Department of Gynecology and Obstetrics, University Hospital Zurich, Switzerland, and ⁶Division of Molecular Animal Physiology, Department of Biology, University Hamburg, Germany

Abstract

Background: The two-stage surgical technique of associated liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS) enables extensive liver resection and promotes future liver remnant regeneration (FLR), in part by inhibiting the Hippo signalling pathway. Its main effector, Yes-associated protein (YAP), has low intrinsic transcriptional activity and requires the transcription enhanced associated domain factor (TEAD) family members as cofactors for target gene transcription. We evaluated the intracellular localization and expression of TEAD1-4, hypothesized to regulate the activity of YAP and, consequently, liver regeneration.

Methods: The intracellular localization of TEAD1-4 was characterized in tumor-free liver (TFL) tissue samples from 44 ALPPS patients obtained during the two stages of ALPPS surgery. Expression levels were correlated with clinical and pathological data as well as liver regeneration metrics.

Results: TEAD family members are simultaneously expressed in individual hepatocytes and show relations with liver regeneration, clinical outcome and outcome parameters when comparing TFL tissue obtained at different stages of ALPPS surgery. Furthermore, differences in TEAD expression and localization within hepatocytes appeared to be independent of global factors.

Conclusion: TEAD1-4 expression correlates with liver regeneration outcomes. Specifically, cytoplasmic and nuclear expression scores of TEAD1 serve as predictive markers for clinical outcomes following ALPPS.

Received 5 June 2024; accepted 9 December 2024

Correspondence

Mirco Küchler, Institute for Clinical Research (IKF), Semmelweis University, Campus Hamburg, Germany.
E-mail: MK-415@gmx.de (M. Küchler)

Correspondence

Karl J. Oldhafer, Institute for Clinical Research (IKF), Semmelweis University, Campus Hamburg, Germany. E-mail: K.Oldhafer@asklepios.com (K.J. Oldhafer)

Lay summary

ALPPS is a two-step surgical technique designed to enhance liver regeneration by inhibiting the Hippo pathway in patients with oncological liver conditions. Members of the TEAD1-4 family are essential co-factors for the transcription of target genes activated by Hippo pathway effectors. Our study demonstrates that TEAD1-4 expression at different intracellular locations can serve as a predictive indicator of liver regeneration.

Introduction

Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS) is a two-step surgical technique.¹ Step 1 involves a combination of portal vein occlusion (PVC) and in-situ liver partitioning. After sufficient regeneration of the future liver remnant (FLR), the diseased hemi-liver is resected in step 2.^{1,2} ALPPS facilitates extensive liver resections in patients who would otherwise be considered non-resectable.³ While primarily employed in patients with colorectal liver metastasis (CRLM) due to its favorable oncological outcomes,⁴ ALPPS can also be applied to other indications.⁵ The ALPPS technique engages multiple regeneration mechanisms. For instance, the rapid reduction in liver tissue mass during in-situ splitting leads to a decrease in cell density, while portal vein occlusion results in increased blood pressure. These factors contribute to the inhibition of the Hippo signaling pathway,⁶ which plays a crucial role in regulating organ size and growth.^{6–9} When this pathway is inhibited, its downstream effector, Yes-associated protein (YAP), is dephosphorylated, allowing it to accumulate in the nuclei of liver cells, particularly hepatocytes. For YAP to transcribe its target genes, it must form a complex with a transcription factor, most notably the TEAD1–4 family of transcriptional enhanced associated domain factors.¹⁰

TEAD1–4 are highly conserved and are expressed in a cell- and tissue-specific manner across nearly all mammalian tissues. These transcription factors have a DNA-binding domain at the N-terminus and a YAP-binding domain at the C-terminus.^{11,12} TEAD alone has minimal transcriptional activity,^{13,14} but when paired with a co-factor, it can influence cell growth, proliferation, epithelial–mesenchymal transition (EMT), migration, and tissue homeostasis.^{15,16} TEAD proteins also play a critical role in the transition from proliferation to cell cycle arrest¹⁷ and exhibit tissue-specific expression patterns.^{18,19} Each TEAD member has distinct developmental and tissue-specific functions.^{11,20–22} The WNT pathway, among others, is a well-characterized upstream signaling pathway that regulates TEAD activity.^{15,23}

TEAD1–4 are also recognized for their roles in tumor progression. Dysregulation or overexpression of these transcription factors is associated with pro-oncogenic effects and poor clinical outcomes across various cancer types.^{24–34} For example, Drexler et al. (2021) identified TEAD2 localization as an independent prognostic factor for disease-free survival (DFS) and metastasis in pancreatic cancer.³⁴

TEAD is thought to regulate the Hippo pathway's outcomes through its intracellular localization.³⁵ While the YAP-TEAD complex is believed to form exclusively in the nucleus,³⁶ there are conflicting findings, such as those from Lin and colleagues, who suggest alternative locations.³⁷ TEAD proteins can localize in both the cytoplasm and nucleus, with TEAD4 also observed within mitochondria.³⁸ The regulation of TEAD localization is not fully understood, and various factors, including hyper-osmotic stress,^{35,39,40} cell density, and detachment,³⁷ influence this localization. Notably, high levels of TEAD4 expression

induce its nuclear localization.²² The expression and localization of TEAD1–4 in the context of ALPPS intervention steps have not yet been explored. It remains unclear whether TEAD expression is influenced by global factors such as age, gender, or primary diagnosis, and whether their localization can predict clinical outcomes in ALPPS-treated patients, including the duration of the interstage (time between step 1 and step 2) and the effectiveness of liver regeneration.

In this study, we analyze the expression of TEAD1–4 in ALPPS surgical specimens and assess its potential prognostic value in relation to liver regeneration, overall survival, and disease-free survival in ALPPS patients.

Material & methods

Ethics approval

All patient data were fully anonymized, and the study was performed according to the standards set in the Declaration of Helsinki 1975. The study was approved by the Ethics Committee Hamburg, Germany (approval number WF061/21).

Study population and tissue samples

A total of 44 Patients (31 male/13 female) with a median (Q1, Q3) age of 61 years (53, 70) had undergone ALPPS surgery at Asklepios Hospital Barmbek, Germany, between March 2011 and May 2017. Thirty four of them were primary diagnosed with colorectal liver metastasis (CLRM) and 10 had non CLRM diseases (including: HCC, CCC, breast cancer, pancreatic cancer, malignant melanoma, leiomyosarcoma; for patients characteristics and clinical data see [Supplementary Table 1](#)).

Liver tissue samples were taken at step 1 and step 2 respectively. Each liver specimen was examined by a pathologist to make sure that only functional and tumor-free liver tissue (TFL-tissue) was analyzed. All included patients had follow-up till the December 31st of 2021 or death.

ALPPS-technique

The ALPPS procedure is a two-stage liver resection technique that involves an extensive hypertrophy of the FLR. During the first step, the portal vein of the liver lobe with most of the tumor burden is ligated and a transection of the liver parenchyma is performed in the intended line of resection. If tumor infiltration is present in the FLR, local resections are performed to achieve a tumor free FLR. During the interstage period, only the tumor free FLR is supplied with portal venous blood, inducing a hypertrophy of the FLR. After 2–4 weeks, the volume of the FLR is analyzed with CT-scans. If the volume of the FLR is sufficient, the deportalized liver lobe is removed during the second step.

Multiple immunofluorescence staining

Multiple immunofluorescence staining (4-fold) was employed to verify TEAD1–4 expression within single hepatocytes on liver sections. We used different conjugation kits to conjugate our

established primary antibodies (see [Supplementary Table 1](#) for further information).

Paraffin embedded tissue sections (4 μm) were deparaffinized and rehydrated followed by heated antigen retrieval. Afterwards sections were processed, coated with primary antibody solution and incubated in the dark. Next, slides were washed, counter-stained and mounted with Canada balm. Slides were evaluated and imaged using fluorescence Microscope BX-40, (Olympus, Germany) with EXFO X-Cite Series 120 Q Lamp (Olympus, Germany) and a DP72 Camera (Olympus, Germany). For a detailed staining protocol please refer to the [supplementary information](#).

Immunohistochemical analyses

Immunohistological analyses were established to investigate intracellular localization and expression of TEAD1-4. Sliced paraffin-embedded liver tissue sections (4 μm) were used for immunohistochemistry. Paraffin embedded tissue sections (4 μm) were deparaffinized and rehydrated followed by heated antigen retrieval.

Then, sections were covered with dilution of a single primary antibody (see [Supplementary Table 1](#)) incubated for 24h at 4 °C. Next, slides were washed and coated with secondary antibody kit. Finally, DAB staining and hematoxylin counterstaining were processed, followed by mounting with Coverslips. Evaluation and imaging was done using IX-70 Microscope (Olympus, Germany) and UC-90 Camera (Olympus, Germany). For a detailed staining protocol please refer to the [supplementary information](#).

Methods of evaluation – IRS

An immuno reactive score (IRS) was implemented for the evaluation of TEAD expression, based on the intensity and quantity of immune staining. The IRS was applied as described by Kaemmerer (2012) and Remele and Stegner (1987).^{41,42} The score was determined separately for cytoplasmic (c) and nuclear (n) fractions. The intensity of staining was graded as negative (0), mild (1), moderate (2) and intense (3). The percentage of positive cells was evaluated as 0 (no positive cells), 1 (<10 % positive cells), 2 (10–50 % positive cells), 3 (51–80 % positive cells) and 4 (>80 % positive cells). The IRS was obtained by multiplying these two individual scores. Three independent reviewers, including an experienced pathologist, evaluated expressions without prior knowledge of patient characteristics and clinical background (see [Supplementary Table 1](#) for IRS data).

Statistics

Descriptive methods were used to describe patient's cohort. Continuous data were shown with means and standard deviations as well as medians and 25th and 75th percentiles. Categorical data were presented as absolute and relative frequencies. Overall survival and disease-free survival were estimated using the Kaplan–Meier method.^{43,44} Survival tables and plots were

shown.⁴⁵ Effects of demographic data and comorbidities on TEAD expressions were examined using linear regression models.⁴⁶ Results were presented using parameter estimates, 95 % confidence intervals and p-values. TEAD expression scores were analyzed using correlation plots based on Spearman correlations.⁴⁷ A linear mixed model with patients as random effects and ALPPS step, TEAD expression and intracellular localization as fixed effects was estimated to determine parameter effects on IR Scores using the R package glmmTMB.⁴⁸ Cox proportional hazards model was used to associate TEAD expression scores with overall and disease-free survival. Results were presented using hazard ratios (90 % and 95 % confidence intervals) and p-values. Because of our small sample group, we considered p-value <0.1 as mentionable.

Results

We examined 44 patients undergoing two-step ALPPS-intervention. Our patient cohort showed an overall survival after 12, 24, 36 months of 76, 60, 46 % including a median OS of 30 [7:12] months and a disease-free survival rate of 55, 21, 7 % including a median DFS of 12 [7:18] months ([Fig. 1](#)).

To answer the question of multiple TEAD expression and their localization within hepatocytes, we used immunofluorescence colouring. Results showed a simultaneous expression of TEAD1, 2, 3, 4 within single hepatocytes ([Fig. 2](#)). Furthermore, we observed TEADs expressed in different intracellular locations (cytoplasm vs nucleus).

The immunohistological results ([Fig. 3](#)) showed distinct expression patterns of TEADs within the same ALPPS step ([Fig. 3](#), black arrows). Differences in expression were also observed between ALPPS step 1 and step 2 within the same TEAD ([Fig. 3](#), blue arrows) and between different TEADs ([Fig. 3](#), white arrows). Some TEADs showed stable expression levels across the ALPPS steps ([Fig. 3](#), green arrows). The graphical representation of the TEAD expression values between ALPPS step 1 and 2 highlights the differences ([Fig. 4](#); Arrow colors are the same as in; [Fig. 3](#)).

We considered if TEAD1-4 expression within hepatocytes is influenced by global factors like gender, age, primary diagnosis, or comorbidities. We calculated linear models for baseline data. Only gender was related to cytoplasmic TEAD4 (T4c; $p = 0.083$). Female gender showed an almost one-unit higher expression score compared to men (0.983 [0.133, 2.097], parameter estimate and 95 % confidence interval). All other TEAD expression profiles were independent with regard to the measured baseline data.

To determine if TEAD1-4 expression scores are linked to clinical liver regeneration values, we used a linear model. The following values are used to evaluate the success of liver regeneration: absolute growth of FLR (ABS.GR), relative growth of FLR (REL.GR), degree of hypertrophy (DH), kinetic growth rate (KGR) and future liver remnant to bodyweight ratio (FLRBWR).

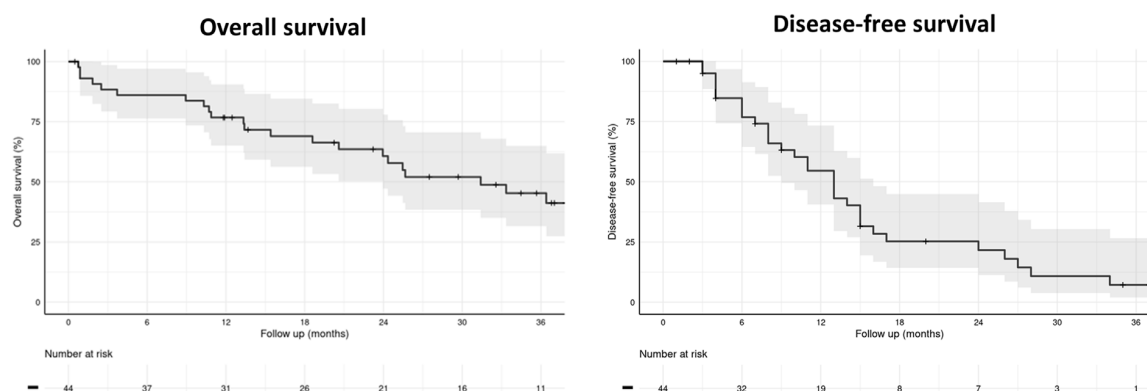


Figure 1 Overall and disease-free survival of ALPPS-patient cohort. Kaplan-Meier curves including patients at risk for ALPPS patient cohort. OS after 12, 24, 36 months = 76, 60, 46 %. DFS after 12, 24, 36 months = 55, 21, 7 %

To assess possible prognostic power between TEAD expression and regeneration values we included only expression scores of step 1 (Fig. 5).

Our results showed negative relations between cytoplasmic TEAD1 (T1c) and KGR, FLRBWR. If T1c expression score is raised by one unit, KGR is decreased by 5 % (-0.011 unit; $p = 0.028$) and FLRBWR is decreased by 7 % (-0.035 unit; $p = 0.024$). Then, we found nuclear TEAD4 (T4n) expression is related to ABS.GR. If T4n expression score is increased by one unit, ABS.GR is decreased by 4 % (-21.077 ml; $p = 0.027$).

With a confidence interval at 90 % (in accordance with a significance level of 10 %) all mentioned liver regeneration values were negatively affected by T1c. ABS.GR ($p = 0.06$ | estimate: -14.239 | which is equal to -2.6 % of entire liver tissue), REL.GR ($p = 0.051$ | estimate = -0.066 | -5.7 %) and DH ($p = 0.054$ | estimate = -0.009 | -3.4 %).

Next, we calculated correlations for TEAD1-4 cytoplasmic and nuclear expressions of step 2 with liver regeneration values. Spearman correlation coefficient (SCC) only showed a weak negative correlation between FLRBWR and cytoplasmic TEAD3 (T3c; -0.356). All other SCC's did not reach the border for low relation ($SCC > 0.3$) (not shown).

To examine the effects of TEAD1-4 expression at step 1 on clinical process and outcome parameters we calculated SCC's for TEAD1-4 c/n expressions and length of hospital stay after step 1 (VWD), interstage (time [weeks] between step 1 and 2), KGR, and absolut FLR to BWR ratio (AFLR) (Fig. 6).

We found correlations between T1c and AFLR (-0.369) as well as KGR (-0.386) and nuclear TEAD1 (T1n) and AFLR (-0.430) and KGR (-0.324).

Because TEAD1 is connected to all considered regeneration values we calculated the effects of changed basic conditions like localization and expression of other TEADs for step 1 and 2 individually.

At step 1 the average score for T1c compared to TEAD2, 3, 4 increased the score by 2.777 (± 0.332), 2.277 (± 0.332), 2.970

(± 0.332) significantly ($p < 0.001$). If T1c and T1n expression is considered the estimated score decreased significantly ($p < 0.001$) by 0.936 (± 0.235).

The average score for T1c at step 2 compared to TEAD2, 3, 4 increased the score by 1.489 (± 0.349), 1.129 (± 0.349), 1.640 (± 0.349) significantly ($p = 0.001$). If T1c and T1n expression is considered the estimated score decreased significantly ($p < 0.001$) by 1.261 (± 0.247).

The linear mixed model showed significant main effects for ALPPS step 1 or 2, TEAD1-4 expression and intracellular localization (all $p < 0.001$). Post-hoc contrasts were also estimated for the model using the emmeans R package⁴⁹ showing that expression also differs between ALPPS step 1 and 2 ($p < 0.001$), in intracellular localization ($p < 0.001$) and for TEAD1 when compared with TEAD2 or 3 or 4 (all $p < 0.001$).

To assess the impact of T1-4 c/n expression within step 1 and 2 against OS and DFS, we calculated one dimensional linear models of OS and DFS vs examined TEAD1-4 expression scores. None of the investigated TEADs showed relations to overall survival. For DFS our model showed that an increase of T1c expression score at step 1 by one unit, increased the risk of an event by 18.8 % ($p = 0.081$).

For step 2 specimens our model showed that a one unit higher T1c expression score significantly increases the risk of an event by 20.9 % ($p = 0.017$). Otherwise, an increase of T3n expression score at step 2 by one decreases the risk of an event by 11 % ($p = 0.099$).

Discussion

The TEAD family of transcription factors is highly conserved and specialized, playing essential roles in developmental processes.^{50,51} After embryogenesis, TEADs contribute to various tissues by acting as cofactors and forming complexes with downstream effectors to regulate target gene transcription.¹³ TEADs also interact with other signaling pathways, including

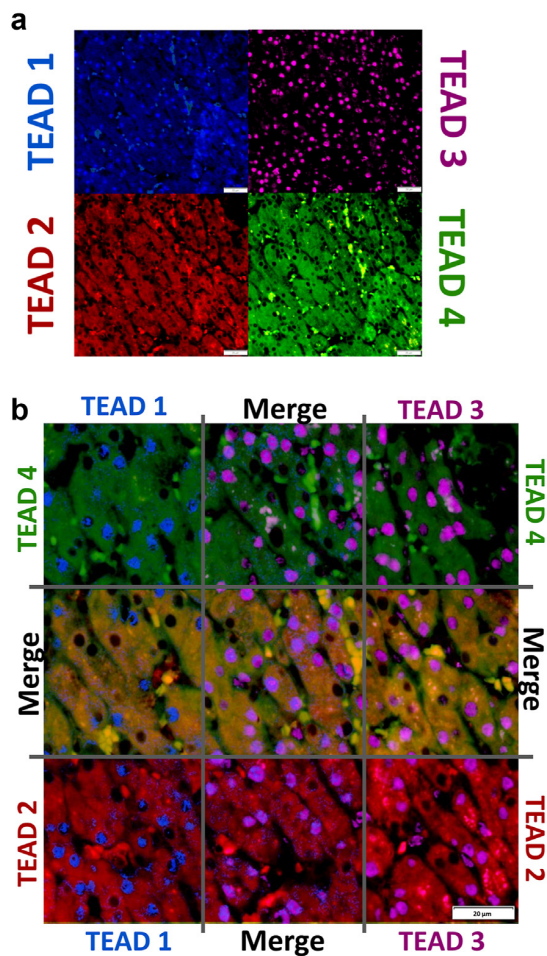


Figure 2 4 fold Immunofluorescence staining of a liver tissue specimen from ALPPS step 2. a: representative image of immunofluorescence staining with TEAD1 at 350 nm, TEAD2 at 568 nm, TEAD3 at 647 nm and TEAD4 at 488 nm. All images are at 20x magnification, color of TEAD3 changed to purple for better differentiation. All Images taken without changing the image spot. b: Merged picture of 4 fold staining with TEADs in their titled color. Top merge square shows TEAD1+3+4. Right merge square shows TEAD2+3+4. Left merge square shows TEAD1+2+4. Bottom merge square shows TEAD1+2+3. Center square shows merge of all TEADs. The figure is not intended to show significant differences or to highlight specific TEAD expression combinations. See [Supplementary Fig. 1](#) for additional information

VGLL1-4, WNT, TGF, Notch, and BMP.^{37,52} Notably, the absence of TEAD in the nucleus halts DNA transcription, regardless of downstream effector activity. In liver regeneration, hepatocytes are the principal drivers, with the Hippo signaling pathway, particularly its effector YAP, playing a central role in regulating organ size. Dysregulation of this pathway can lead to

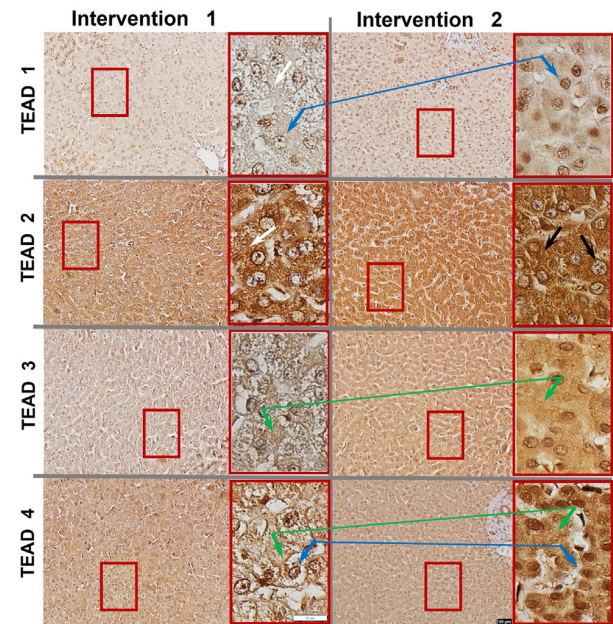


Figure 3 Immunohistological Analysis of TEAD1-4 Expression in ALPPS steps 1 and 2. Representative images at 10x and 32x magnification show the localization and expression levels of TEAD1-4 in liver tissues from patients undergoing ALPPS. Scale bars are consistent across images. Distinct TEAD expression patterns were observed within the same step (A, black arrows), between step 1 and step 2 within the same TEAD (B, blue arrows) and across different TEADs (C, white arrows). Some TEADs exhibited stable expression levels across steps (D, green arrows).

(A) TEAD2 showed higher expression within the cytoplasm in step 2 compared to the nucleus [12.00 (10.67, 12.00) vs. 7.33 (4.25, 10.67)]. (B) TEAD1 exhibited increased expression in hepatocyte nuclei in step 2 [8.00 (7.17, 11.25)] compared to step 1 [6.67 (3.67, 8.08)], and TEAD4 maintained similar expression levels in both steps [step 2: 10.67 (8.00, 12.00); step 1: 8.00 (8.00, 11.25)]. (C) cytoplasmic TEAD2 (T2c) expression was higher in step 2 [10.67 (9.33, 12.00)] compared to step 1 [5.33 (4.00, 8.00)]. (D) cytoplasmic TEAD3 (T3c) and cytoplasmic TEAD4 (T4c) expression remained unchanged between step 1 [9.33 (8.00, 10.67)] and step 2 [9.33 (8.00, 12.00)].

Data are presented as median [Q1, Q3]. Arrows indicate related expression changes or consistency. Detailed immunohistochemical analysis provides insights into TEAD dynamics during liver regeneration in ALPPS

malformations and degenerative growth, and has also been associated with tumorigenesis due to the proliferation of degenerated cells.⁶

This study aimed to evaluate the expression and intracellular localization of all four TEAD transcription factors in human liver tissues, and to investigate their relationship with liver

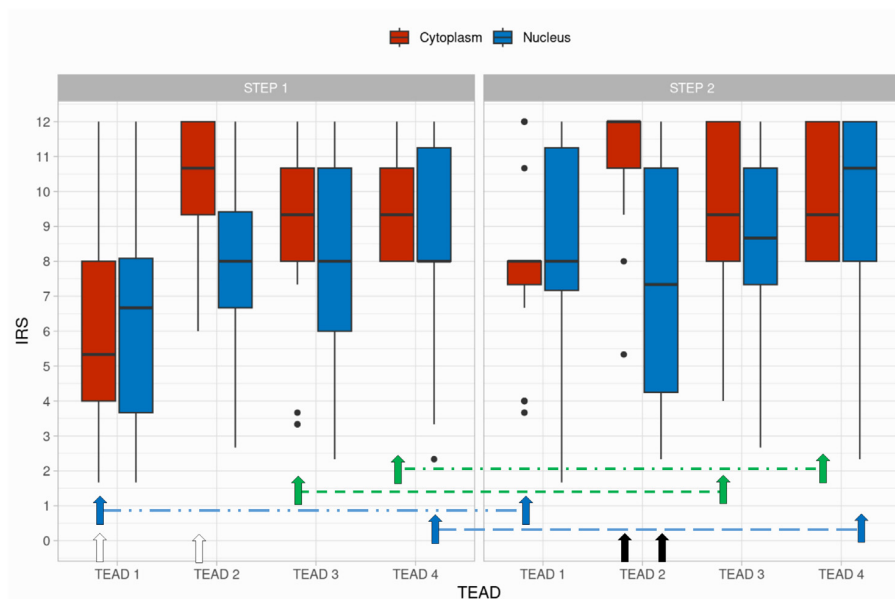


Figure 4 Boxplot for the expression of TEAD1-4 in ALPPS step 1 and 2, shown separately for cytoplasm and nuclear localization. The boxplots underline the immunohistological findings of the differences between the TEAD expressions. For the sake of clarity, the arrows are shown in the same color as in Fig. 3. **Black arrows:** Different expression of TEAD2 depending on the intracellular localization. **Blue arrows:** Expression shifts between steps 1 and 2 within cytoplasmic TEAD1 and nuclear TEAD4 - corresponding arrows are at the same level/height and connected by patterned lines. **White arrow:** different expression values for cytoplasmic TEAD1 and 2 within step 1. **Green arrows:** cytoplasmic TEAD3 and 4 expressions that remained at the same score level regardless of the ALPPS step - corresponding arrows are at the same level and connected by patterned lines. Due to the small sample size, no statistical analyses were calculated for the simple expression scores collected

regeneration outcomes in patients undergoing ALPPS surgery. By correlating TEAD1-4 expression patterns with clinical liver regeneration metrics, we sought to assess the prognostic potential of TEADs in improving patient selection and surgical planning. Our key findings include: (1) Immunofluorescence revealed simultaneous expression of TEAD1-4 in individual hepatocytes, with distinct intracellular localizations; (2) Cytoplasmic TEAD1 and nuclear TEAD4 were negatively correlated with liver regeneration; (3) Cytoplasmic and nuclear TEAD1 expressions were consistently higher than TEAD2-4 at both step 1 and step 2, indicating distinct regulatory roles; (4) TEAD expression was not significantly influenced by patient gender, age, or diagnosis.

Compared to the CAPRA study⁵³ involving 451 patients, our complication rates after step 1 of ALPPS (15.9 %) were higher than those reported in CAPRA (11.3 %). However, our 90-day mortality rate was lower at 11.6 % compared to 14.5 % in CAPRA. Additionally, our overall survival rates at 12 and 24 months (Fig. 1) are consistent with other ALPPS studies,^{54,55} though the disease-free survival (DFS) rate at 36 months was slightly lower. The reduced DFS rate at 36 months is likely influenced by the small number of patients at risk, with each event having a significant impact on the statistics.

Hepatocytes are central to liver regeneration, primarily regulated by the Hippo signaling pathway and its key effector, YAP.

This pathway controls organ size and, when dysregulated, can lead to malformations and degenerative growth, including tumorigenesis.⁶ TEAD, as a DNA-binding factor, plays a crucial role in regulating target gene transcription and thus the output of the Hippo pathway. Without TEAD, the pathway is unable to execute its transcriptional functions.^{6,50,51} In fact, TEAD is the primary binding partner for YAP in mouse liver tissue.³⁶ Our multi-color immunofluorescence analysis confirmed that TEAD1-4 are co-expressed in individual hepatocytes (Fig. 2), emphasizing their evolutionary importance in diverse cellular processes.^{37,56} Moreover, no significant association was found between TEAD expression and patient characteristics such as sex, age, or primary diagnosis. The independent and simultaneous expression of all four TEADs in relation to patient characteristics and intracellular localization underscores their diverse roles in liver function.

Upon liver injury or resection, YAP translocates from the cytoplasm to the nucleus within 4 h, triggering regenerative responses.⁶ However, TEAD1 remains in the cytoplasm as a co-factor or is actively transported there after YAP enters the nucleus.^{57,58} This observation supports the hypothesis that the intracellular distribution of TEAD plays a crucial role in regulating Hippo pathway output.^{35,51} Additionally, some studies suggest that the YAP-TEAD complex forms in the cytoplasm and only later migrates to the nucleus.³⁵ Our results confirm that TEAD1-4

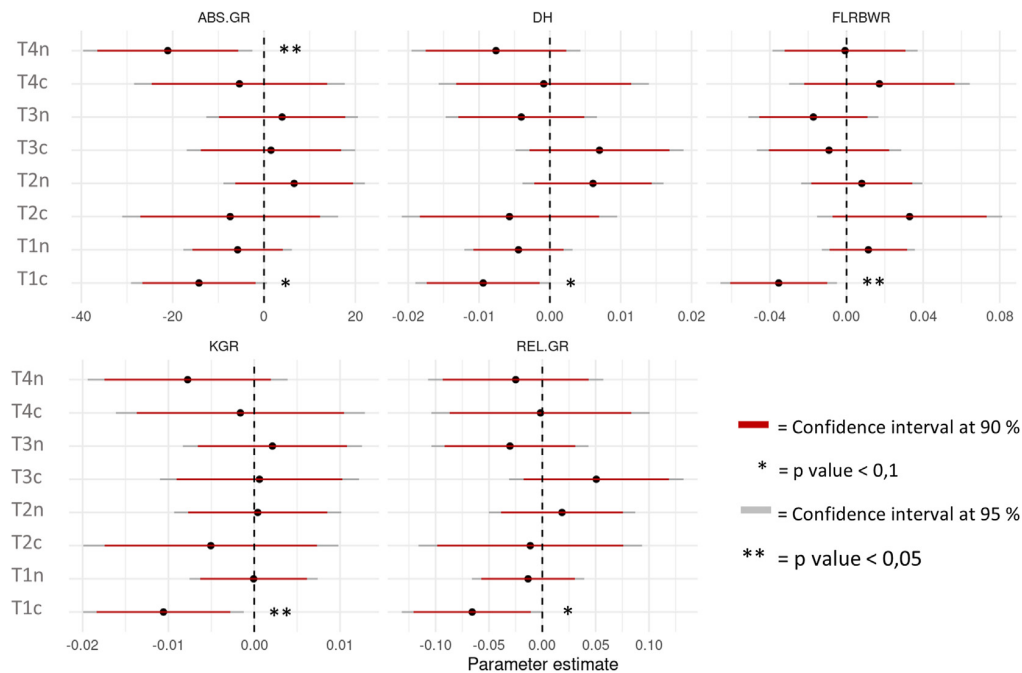


Figure 5 Forest plots of TEAD1-4 expressions at step 1 (OP1) and liver regeneration values. Nuclear TEAD4 (T4n) showed a negative effect on ABS.GR ($p = 0.027$). Cytoplasmic TEAD1 (T1c) expression showed significant negative effects to KGR ($p = 0.028$) and FLRBWR ($p = 0.024$). With a confidence interval of 90 % all other liver regeneration values are significantly affected by T1c expression (ABS.GR ($p = 0.06$), DH ($p = 0.054$) and REL.GR ($p = 0.051$)). Confidence interval 90 % = red lines; Confidence interval 95 % = gray lines; with ABS.GR = absolute growth, DH = Degree of hypertrophy, FLRBWR = future liver remnant to body weight ratio; KGR = kinetic growth rate; REL.GR = relative growth

localize to both the cytoplasm and nucleus. We were also able to show that the expression of TEAD1-4 differs between ALPPS step 1 and 2 in different variants (Fig. 4). Furthermore, recent studies show YAP binding to TEAD1,⁵⁹ while other studies indicate that YAP forms a complex with TEAD4.⁶⁰

In our analysis, TEAD1 had a significant negative effect on liver regeneration. This was evident through clinically relevant parameters, such as absolute liver growth, degree of hypertrophy, future liver remnant to body weight ratio (FLRBWR) and kinetic growth rate (KGR). Cytoplasmic TEAD1 was consistently associated with a negative prognostic outcome: a one-unit increase in TEAD1 expression reduced KGR by 5 % and FLRBWR by 7 %, indicating slower liver growth and reduced liver size relative to body weight (Fig. 5). Although liver size alone is not an indicator of functionality, reduced growth increases the risk of post-operative liver failure.^{61,62} Additionally, elevated nuclear TEAD4 expression decreased absolute liver growth (ABS.GR) by 4 %. Establishing baseline TEAD expression levels will be essential for future clinical application.

TEAD1's role in liver regeneration appears distinct from that of TEAD2-4, as evidenced by its independent expression pattern in our tissue samples. TEAD1's expression was closely linked to clinical outcomes, particularly its negative impact on liver regeneration and DFS. However, while a statistical correlation was

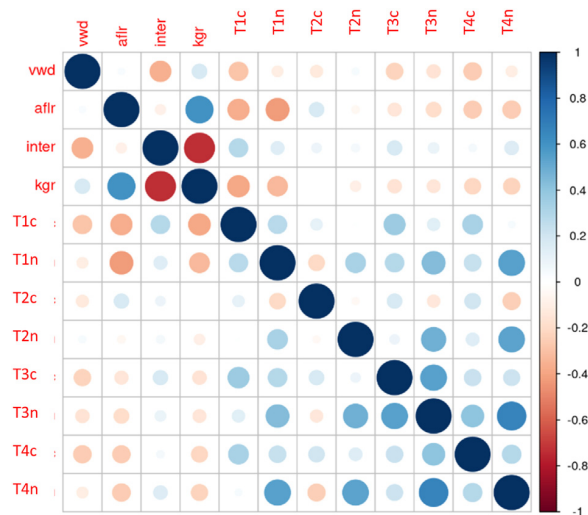


Figure 6 Correlation plot for clinical values and TEAD1-4 expression scores of step 1. Plot shows dependencies for clinical values as well as negative correlations for TEAD1c/n underlining the negative relation to FLR growth and kinetic growth rate (KGR)

observed between TEAD1 expression and DFS, the mechanism remains unclear. There are likely many factors contributing to DFS beyond the expression of a single protein. Nonetheless, the observation that individual TEAD family members have specific roles in different tissues is consistent with prior findings.^{27,30,34,63}

In addition, the mixed model analysis further demonstrated that TEAD1 expression was significantly higher than that of TEAD2, TEAD3, and TEAD4 ($p < 0.001$), with substantial variation between ALPPS steps 1 and 2, influenced by intracellular localization (cytoplasmic vs. nuclear). This prompts the question of why TEAD1 shows elevated expression levels relative to other TEADs in liver tissue. A plausible hypothesis is that TEAD1 has a specialized function in the regenerative response following ALPPS, potentially serving as a crucial mediator of the Hippo-YAP signaling pathway during hepatocyte proliferation and tissue remodeling. Future studies are essential to elucidate the specific regulatory mechanisms and functional significance of TEAD1's predominant role in this context, which could have implications for enhancing clinical outcomes in liver surgery and regenerative medicine.⁶⁴

These findings indicate that TEAD1, TEAD3, and TEAD4 are involved in liver regeneration and may serve as predictors of clinical outcomes. However, the aim of our study was not to develop a clinical prediction model, but rather to identify relationships between TEAD expression and liver regeneration. Increased T1c expression was correlated with poorer KGR and FLRBWR, while elevated T4n expression was associated with reduced ABS.GR. To the best of our knowledge, this is the first study to demonstrate these associations in human liver tissues.

Investigating T1c/n and T4n expression may offer prognostic insight into KGR, FLRBWR, and ABS.GR of the future liver remnant (FLR), making these TEADs potential laboratory parameters for predicting liver regeneration outcomes. In combination with the CAPRA score, which was introduced in 2022 to estimate the risk of postoperative liver failure based on various patient factors,⁵³ TEAD expression could be integrated into clinical practice to improve patient selection for ALPPS. By enhancing preoperative planning with TEAD expression data, clinicians may be better equipped to predict a patient's ability to regenerate liver tissue at the cellular level, leading to improved outcomes.

Further studies with larger cohorts and comprehensive experimental setups are necessary to clarify why elevated T1c and T4n expression negatively impact liver regeneration in ALPPS patients. A more detailed understanding of TEAD's regulatory role in liver tissue could ultimately refine its use as a prognostic tool in clinical settings.

Limitations

This study only included two sampling times, limiting our ability to assess changes in TEAD expression during liver regeneration.

Conclusion

All four TEADs are expressed in hepatocytes and are present in both the cytoplasm and nucleus. Increased expression of cytoplasmic and nuclear TEAD1 and nuclear TEAD4 prior to ALPPS surgery negatively impacts liver regeneration. A combination of CAPRA scores and TEAD expression could improve clinical decision-making, particularly in selecting patients suitable for ALPPS and planning the timing of step 2 surgery.

Acknowledgements

We thank Manuela Marest and Dagmar Willkowi for their technical support and assistance, with special thanks to Manuela Marest for locating and providing the missing blocks.

Authors' contributions

M.K. for study concept and design, data acquisition, analysis, interpretation of data, figure design, obtainment of funding and drafting of the manuscript; M.E. and T.H. data acquisition, analysis, technical and material support; R.D. analysis, discussion of results, technical and material support; P.W. and J.F. analysis, discussion of results, statistical analysis, figure design; K.J. and T.R. analysis, technical and material support, result discussion; T.B. supervision and critical revision; K.O. supervision, critical revision and obtainment of funding

All Authors read and approved the final manuscript.

Consent for publication

Not applicable.

Funding

This work was supported by grants from the Asklepios Forschungsförderung (#3893/#3892).

Availability of data and materials

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the [supplementary information](#) (see [Table 2](#) and [Table 3](#) for raw data) for this article.

Conflict of interest

None declared.

Ethics approval and consent to participate

All patient data were fully anonymized, and the study was performed according to the standards set in the Declaration of Helsinki 1975. The study was approved by the Ethics Committee Hamburg, Germany (approval number WF061/21).

References

1. Schnitzbauer Andreas A, Lang Sven A, Goessmann Holger, Nadalin Silvio, Baumgart Janine, Farkas Stefan A *et al.* (March 2012) Right portal vein ligation combined with in situ splitting induces rapid left lateral liver lobe hypertrophy enabling 2-staged extended right hepatic resection in small-for-size settings. *Ann Surg* 255: 405–414.

2. de Santibañes Eduardo, Clavien Pierre-Alain. (March 2012) Playing play-doh to prevent postoperative liver failure: the "alpps" approach. *Ann Surg* 255:415–417.
3. Clavien Pierre-Alain, Petrowsky Henrik, DeOliveira Michelle L, Graf Rolf. (April 2007) Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *N Engl J Med* 356:1545–1559.
4. Hasselgren Kristina, Røsok Bård I, Larsen Peter N, Sparrelid Ernesto, Lindell Gert, Schultz Nicolai A *et al.* (March 2021) Alpps improves survival compared with tsh in patients affected of crlm: survival analysis from the randomized controlled trial ligro. *Ann Surg* 273:442–448.
5. Wen Xu-Dong, Xiao Le. (2021) Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy in the treatment of colorectal cancer liver metastases. *World J Gastrointest Surg* 13:814–821.
6. Nguyen-Lefebvre Anh Thu, Selzner Nazia, Wrana Jeffrey L, Bhat Mamatha. (May 2021) The hippo pathway: a master regulator of liver metabolism, regeneration, and disease. *Faseb J : Off Pub Fed Am Soc Experim Biol* 35e21570.
7. Shi Huawen, Yang Guangchao, Zheng Tongsen, Wang Jiabei, Li Lulu, Liang Yingjian *et al.* (December 2015) A preliminary study of alpps procedure in a rat model. *Sci Rep* 5.
8. James L. Grijalva, Megan Huizenga, Kaly Mueller, Steven Rodriguez, Joseph Brazzo, Fernando Camargo *et al.* (2014) Dynamic alterations in hippo signaling pathway and yap activation during liver regeneration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 307:G196–G204.
9. Moya Iván M, Halder Georg. (2019) Hippo–yap/taz signalling in organ regeneration and regenerative medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20: 211–226.
10. Hong Wanjin, Guan Kun-Liang. (September 2012) The yap and taz transcription co-activators: key downstream effectors of the mammalian hippo pathway. *Semin Cell Dev Biol* 23:785–793.
11. Gibault Floriane, Sturbaut Manon, Bailly Fabrice, Melnyk Patricia, Cotelte Philippe. (December 2017) Targeting transcriptional enhanced associate domains (teads): Miniperspective. *J Med Chem* 61:5057–5072.
12. Kaneko KJ, DePamphilis ML. (1998) Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development and the tead family of transcription factors. *Dev Genet* 22:43–55.
13. Vassilev Alex, Kaneko Kotaro J, Shu Hongjun, Zhao Yingming, DePamphilis Melvin L. (May 2001) Tead/tef transcription factors utilize the activation domain of yap65, a src/yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes Dev* 15:1229–1241.
14. Jia Hao Xiao, Davidson Irwin, Matthes Hans, Garnier Jean-Marie, Chambon Pierre. (1991) Cloning, expression, and transcriptional properties of the human enhancer factor tef-1. *Cell* 65:551–568.
15. Huh Hyunbin, Kim Dong, Jeong Han-Sol, Park Hyun. (2019) Regulation of tead transcription factors in cancer biology. *Cells* 8:600.
16. Zhang Heng, Liu Chen-Ying, Zha Zheng-Yu, Bin Zhao, Yao Jun, Zhao Shimin *et al.* (May 2009) Tead transcription factors mediate the function of taz in cell growth and epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem* 284:13355–13362.
17. Benhaddou A, Keime C, Ye T, Morlon A, Michel I, Jost B *et al.* (February 2012) Transcription factor tead4 regulates expression of myogenin and the unfolded protein response genes during c2c12 cell differentiation. *Cell Death Differ* 19:220–231.
18. Azakie A, Larkin SB, Farrance IK, Grenningloh G, Ordahl CP. (April 1996) Dtef-1, a novel member of the transcription enhancer factor-1 (tef-1) multigene family. *J Biol Chem* 271:8260–8265.
19. Jacquemin P, Martial JA, Davidson I. (May 1997) Human tef-5 is preferentially expressed in placenta and binds to multiple functional elements of the human chorionic somatomammotropin-b gene enhancer. *J Biol Chem* 272:12928–12937.
20. Vares Guillaume, Wang Bing, Tanaka Kaoru, Shang Yi, Taki Keiko, Nakajima Tetsuo *et al.* (2011) Gene silencing of tead3 abrogates radiation-induced adaptive response in cultured mouse limb bud cells. *J Radiat Res* 52:39–46.
21. Liu Xin, Zhao Dezheng, James Lauralee, Li Jian, Zeng Huiyan. (April 2011) Requirement of the nuclear localization of transcription enhancer factor 3 for proliferation, migration, tube formation, and angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. *Faseb J : Off Pub Fed Am Soc Experim Biol* 25:1188–1197.
22. Home Pratik, Saha Biswarup, Ray Soma, Dutta Debasree, Gunewardena Sumedha, Yoo Byunggil *et al.* (April 2012) Altered sub-cellular localization of transcription factor tead4 regulates first mammalian cell lineage commitment. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 7362–7367.
23. Guillermin Oriane, Angelis Nikolaos, Sidor Clara M, Ridgway Rachel, Baulies Anna, Kucharska Anna *et al.* (July 2021) Wnt and src signals converge on yap-tead to drive intestinal regeneration. *EMBO J* 40e105770.
24. Ute Schütte, Bisht Savita, Heukamp Lukas C, Kebschull Moritz, Florin Alexandra, Haarmann Jens *et al.* (April 2014) Hippo signaling mediates proliferation, invasiveness, and metastatic potential of clear cell renal cell carcinoma. *Transl Oncol* 7:309–321.
25. Landin Malt André, Cagliero Julie, Legent Kevin, Silber Joël, Zider Alain, Flagiello Domenico. (2012) Alteration of tead1 expression levels confers apoptotic resistance through the transcriptional up-regulation of livin. *PLoS One* 7e45498.
26. Knight JF, Shepherd CJ, Rizzo S, Brewer D, Jhavar S, Dodson AR *et al.* (2008) Tead1 and c-cbl are novel prostate basal cell markers that correlate with poor clinical outcome in prostate cancer. *Br J Cancer* 99: 1849–1858.
27. Liu Y, Wang G, Yang Y, Mei Z, Liang Z, Cui A *et al.* (2016) Increased tead4 expression and nuclear localization in colorectal cancer promote epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a yap-independent manner. *Oncogene* 35:2789–2800.
28. Zhou Y, Huang T, Zhang J, Wong CC, Zhang B, Dong Y *et al.* (2017) Tead1/4 exerts oncogenic role and is negatively regulated by mir-4269 in gastric tumorigenesis. *Oncogene* 36:6518–6530.
29. Zhou Guang-Xi, Li Xiao-Yu, Qi Zhang, Zhao Kun, Zhang Cui-Ping, Xue Chang-Hu *et al.* (2013) Effects of the hippo signaling pathway in human gastric cancer. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* 14: 5199–5205.
30. Han Wonshik, Jung Eun-Mi, Cho Jihyoung, Lee Jong Won, Hwang Ki-Tae, Yang Song-Ju *et al.* (2008) Dna copy number alterations and expression of relevant genes in triple-negative breast cancer. *Gene Chromosome Cancer* 47:490–499.
31. Wang Chunyan, Nie Zhi, Zhou Zhongmei, Zhang Hailin, Liu Rong, Wu Jing *et al.* (2015) The interplay between tead4 and klf5 promotes breast cancer partially through inhibiting the transcription of p27kip1. *Oncotarget* 6:17685–17697.
32. Zhang Qun, Fan Hang, Zou Qian, Liu Hongda, Wan Bing, Zhu Suhua *et al.* (July 2018) Tead4 exerts pro-metastatic effects and is negatively regulated by mir6839-3p in lung adenocarcinoma progression. *J Cell Mol Med* 22:3560–3571.

33. Zhou Yuhang, Huang Tingting, Cheng Alfred SL, Yu Jun, Kang Wei, Fai To Ka. (January 2016) The tead family and its oncogenic role in promoting tumorigenesis. *Int J Mol Sci* 17.
34. Drexler Richard, Fahy Rebecca, Küchler Mirco, Wagner Kim C, Reese Tim, Ehmke Mareike *et al.* (January 2021) Oldhafer. Association of subcellular localization of tead transcription factors with outcome and progression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreatology : Off J Int Ass Pancreatol (IAP)* 1:170–179. Epub: 2020 December 8.
35. Lin Kimberly C, Moroishi Toshiro, Meng Zhipeng, Jeong Han-Sol, Plouffe Steven W, Sekido Yoshitaka *et al.* (2017) Regulation of hippo pathway transcription factor tead by p38 mapk-induced cytoplasmic translocation. *Nat Cell Biol* 19:996–1002.
36. Kwon Hyeryun, Kim Jiyoung, Jho Eek-Hoon. (October 2022) Role of the hippo pathway and mechanisms for controlling cellular localization of yap/taz. *FEBS J* 19:5798–5818. Epub: 2021 June 13.
37. Kimberly C. Lin, Hyun Woo Park, Kun-Liang Guan. (2017) Regulation of the hippo pathway transcription factor tead. *Trends Biochem Sci* 42: 862–872.
38. Kaneko Kotaro J, DePamphilis Melvin L. (September 2013) Tead4 establishes the energy homeostasis essential for blastocoel formation. *Development* 140:3680–3690.
39. Cargnello Marie, Roux Philippe P. (March 2011) Activation and function of the mapks and their substrates, the mapk-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev : MMBR (Microbiol Mol Biol Rev)* 75:50–83.
40. Ben-Levy R, Hooper S, Wilson R, Paterson HF, Marshall CJ. (September 1998) Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate mapkap kinase-2. *Curr Biol : CB* 8:1049–1057.
41. Kaemmerer Daniel, Peter Luisa, Lupp Amelie, Schulz Stefan, Sanger Jarg, Baum Richard Paul *et al.* (2012) Comparing of irs and her2 as immunohistochemical scoring schemes in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Int J Clin Exp Pathol* 5:187–194.
42. Remmele W, Stegner HE. (May 1987) Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (irs) for immunohistochemical estrogen receptor detection (er-ica) in breast cancer tissue. *Pathologe* 8:138–140.
43. Therneau Terry M. (2021) *A package for survival analysis in R*.
44. Therneau Terry M. (June 2001) *Survival: Survival analysis*.
45. Kassambara Alboukadel, Kosinski Marcin, Biecek Przemyslaw. (2021) *Survminer: drawing Survival Curves using 'ggplot2'*. *R package version 0.4.9.999*.
46. Fox John. (2019) *An R companion to applied regression*. SAGE, Los Angeles, third edition, pp. 539–549, pp. 539–549.
47. Taiyun Wei, Simko Viliam. (April 2024) *corrplot: Visualization of a correlation matrix*.
48. Brooks E, Mollie, Kristensen Kasper, van Benthem J, Koen Arni Magnusson, Berg W *et al.* (2017) Benjamin. glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. *The R Journal* 9:378.
49. Russell V. (2024) *Lenth. Emmeans : estimated marginal means, aka least-squares means. R package version 1.10.4.900001*. <https://rvinlenth.github.io/emmeans/>.
50. Bin Zhao, Ye Xin, Yu Jindan, Li Li, Li Wei-quan, Li Siming *et al.* (1962–1971, July 2008) Tead mediates yap-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev* 22.
51. Ota Mitsunori, Sasaki Hiroshi. (December 2008) Mammalian tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of hippo signaling. *Development* 135:4059–4069.
52. Gram Hansen Carsten, Moroishi Toshiro, Guan Kun-Liang. (September 2015) Yap and taz: a nexus for hippo signaling and beyond. *Trends Cell Biol* 25:499–513.
53. Capobianco Ivan, Oldhafer Karl J, Fard-Aghaie Mohammed-Hossein, Robles-Campos Ricardo, Brusadin Roberto, Petrowsky Henrik *et al.* (February 2022) Development and internal validation of the comprehensive alpps preoperative risk assessment (capra) score: is the patient suitable for associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (alpps)? *Hepatobiliary Surg Nutr* 11:52–66.
54. Nashat Wanis Kerollos, Ardiles Victoria, Alvarez Fernando A, Enrique Tun-Abraham Mauro, Linehan David, de Santibaes Eduardo *et al.* (2018) Intermediate-term survival and quality of life outcomes in patients with advanced colorectal liver metastases undergoing associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy. *Surgery* 163: 691–697.
55. Petrowsky Henrik, Fritsch Ralph, Guckenberger Matthias, De Oliveira Michelle L, Dutkowski Philipp, Clavien Pierre-Alain. (December 2020) Modern therapeutic approaches for the treatment of malignant liver tumours. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 17:755–772.
56. Jeffrey K Holden, Cunningham Christian N. (2018) Targeting the hippo pathway and cancer through the tead family of transcription factors. *Cancers* 10.
57. Matthew Franklin J, Ghosh Rajarshi P, Shi Quanming, Reddick Michael P, Liphardt Jan T. (September 2020) Concerted localization-resets precede yap-dependent transcription. *Nat Commun* 11.
58. Cagliero Julie, Forget Antoine, Daldello Enrico, Silber Joël, Zider Alain. (December 2012) The hippo kinase promotes scalloped cytoplasmic localization independently of warts in a crm1/exportin1 dependent manner in drosophila. *Faseb J* 27:1330–1341.
59. Zhang Shuaishuai, Guo Manlan, Jiang Xiaowen, Tang Lan, Wu Ting, Bi Guofang *et al.* (February 2023) Pxr triggers yap-tead binding and sirt2-driven yap deacetylation and polyubiquitination to promote liver enlargement and regeneration in mice. *Pharmacol Res* 188106666.
60. Chen Liming, Chan Siew Wee, Zhang XiaoQian, Walsh Martin, Lim Chun Jye, Hong Wanjin *et al.* (February 2010) Structural basis of yap recognition by tead4 in the hippo pathway. *Genes Dev* 24:290–300.
61. Tomassini Federico, Dâ Asseler Yves, Linecker Michael, Giglio Mariano C, Castro-Benitez Carlos, Staphanie Truant *et al.* (October 2020) Hepatobiliary scintigraphy and kinetic growth rate predict liver failure after alpps: a multi-institutional study. *HPB* 22:1420–1428.
62. Merath Katiuscha, Tiwari Ankur, Court Colin, Parikh Alexander, Dillhoff Mary, Cloyd Jordan *et al.* (November 2023) Postoperative liver failure: definitions, risk factors, prediction models and prevention strategies. *J Gastrointest Surg* 27:2640–2649.
63. Lim Byungho, Park Jong-Lyul, Kim Hee-Jin, Park Young-Kyu, Kim Jeong-Hwan, Sohn Hyun Ahm *et al.* (2014) Integrative genomics analysis reveals the multilevel dysregulation and oncogenic characteristics of tead4 in gastric cancer. *Carcinogenesis* 35:1020–1027.
64. Sommerauer Christian, Gallardo-Dodd Carlos J, Savva Christina, Hases Linnea, Birgersson Madeleine, Indukuri Rajitha *et al.* (March 2024) Estrogen receptor activation remodels tead1 gene expression to alleviate hepatic steatosis. *Mol Syst Biol* 20:374–402.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.hpb.2024.12.007>.

4 Diskussion

Das PDAC ist eine der aggressivsten onkologischen Erkrankungen mit nur sehr wenigen therapeutischen Optionen. Häufig wird die Diagnose erst gestellt, wenn das Karzinom schon metastasiert hat, was für die meisten Patient:innen mit einer deutlich schlechteren Überlebensprognose einhergeht. Die Standardtherapie ist auch heute noch die R0 Resektion. Je nach Krankheitsstand und Tumorart empfehlen die aktuellen Leitlinien, adjuvante Chemotherapien vorwegzuschalten und – bei gutem Ansprechen – anschließend die R0 Resektion anzustreben [13].

Seit Jahren schon ist das Hauptaugenmerk der Wissenschaft auf eine effiziente Therapie oder Diagnosemöglichkeit gerichtet. Eine Therapie, welche sowohl die Verbreitung der Metastasen verhindert als auch das Tumorwachstum hemmt, scheint eine unüberwindbare Herausforderung. Sie ist aber zwingend erforderlich, um das Überleben der Patient:innen zu sichern oder zumindest zu verbessern. Um dieses Ziel zu erreichen, bildet das Entschlüsseln der molekularen Prozesse und das Verständnis hinter dem Metastasierungsprozess und der Tumorprogression einen Grundpfeiler.

4.1 Der Hippo-Signalweg im Adenokarzinom des Pankreas

4.1.1 Aufgaben des Hippo-Signalwegs

In der ersten Studie dieser kumulativen Dissertation wurde Pankreasgewebe von 103 mit PDAC diagnostizierten Patient:innen immunhistologisch aufgearbeitet. Alle Patient:innen wurden nach den aktuellen Leitlinien behandelt. Die Expression der wichtigsten Hippo-Signalwegs Komponenten wurde durch immunhistologische Färbungen auf Paraffingewebeschnitten des Primärtumors und des umliegenden Pankreasgewebes nachgewiesen und anschließend mittels eines *Immunreaktiven-Scores* (IRS) bewertet. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung handelte es sich um die größte bisher analysierte Studienkohorte, in der die wichtigsten Komponenten des Hippo-Signalwegs analysiert und mit klinikopathologischen Daten inklusive des OS und des DFS korreliert wurden [131].

Die Hauptaufgaben des Hippo-Signalwegs sind die Steuerung der Zellproliferation, der Gewebekomöostase und der Organgröße. Hinzu kommen pro-onkologische Rollen in der Tumorgenese und der Tumormigration [155, 186–188].

Um herauszufinden, ob der Hippo-Signalweg auch im PDAC eine wichtige Rolle spielt, wurden die Enzymexpressionen der einzelnen Komponenten des Hippo-Signalwegs gemessen. Es gibt wissenschaftliche Nachweise dafür, dass ein inaktivierter Hippo-Signalweg zu einer höheren YAP-Expression im Zellkern führt und dies wiederum mit einer schlechteren Überlebensprognose für den/die Patient:in verbunden ist. Auch verursacht dies eine höhere Wahrscheinlichkeit des Metastasenwachstums in verschiedensten Tumorentitäten [112, 113, 186, 189].

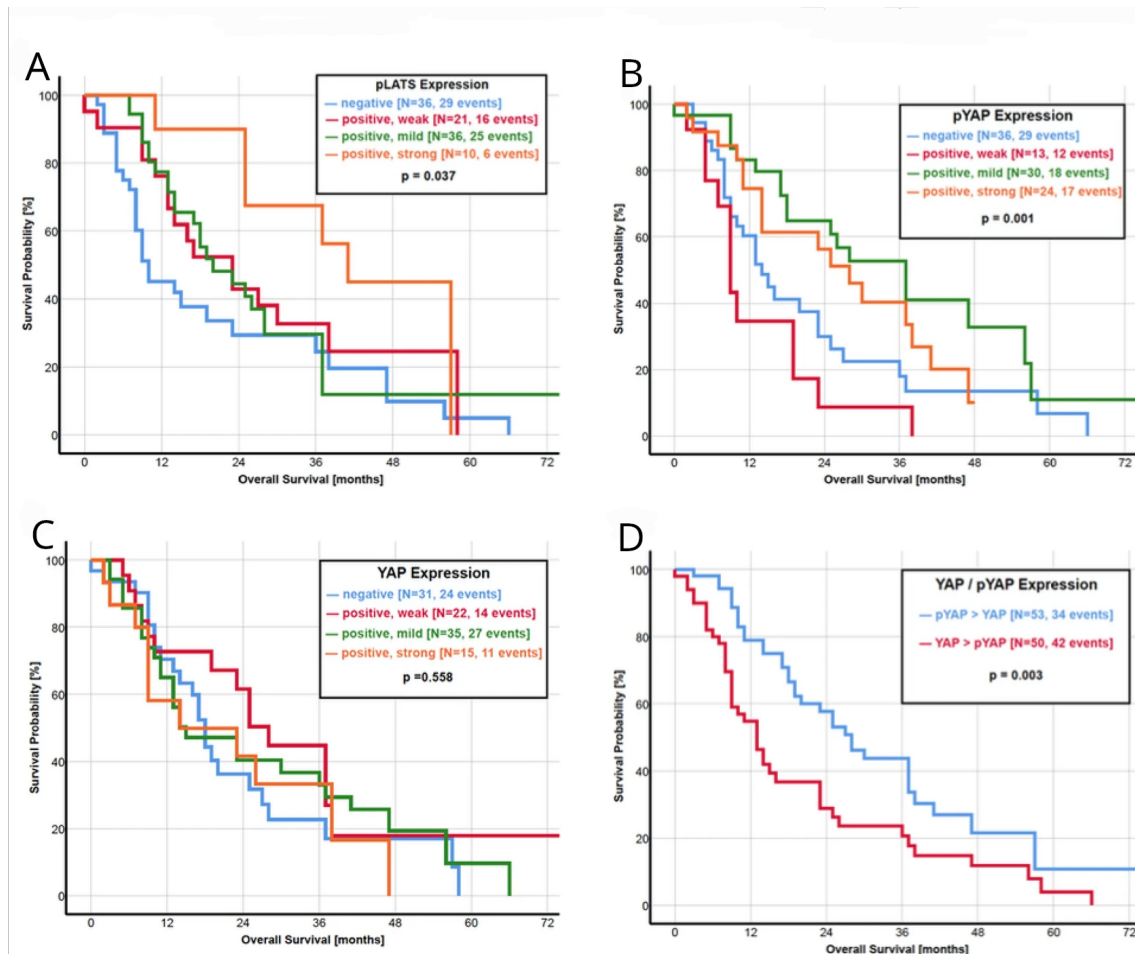


Abbildung 4.1: Kaplan-Meier Analysen für die Hippo-Signalweg-Komponenten pLATS (A), pYAP (B) und YAP (C) sowie die Ratio von pYAP und YAP (D). Sowohl pLATS und pYAP zeigen signifikante Unterschiede im Gesamtüberleben (OS) in Abhängigkeit der Expressionsstärke. YAP - Expressionsunterschiede sind nicht signifikant, aber die pYAP und YAP Ratio zeigt ein deutlich verbessertes Überleben wenn die pYAP-Expression gegenüber der YAP-Expression erhöht ist. Modifiziert aus [131].

Salcedo–Allende et al. (2017) vermuteten zudem, dass für PDAC-Patient:innen eine YAP-Überexpression inklusive Lebermetastasen mit einer schlechteren Überlebensrate verbunden ist [135]. Zudem gibt es mehrere Studien, welche YAP allein im PDAC eine pro-onkologische Funktion zuordnen und es mit Tumorprogression in Verbindung bringen [133, 190–192].

4.1.2 Immunhistologische Analyse des Hippo-Signalwegs in PDAC

In unserer Studie Drexler et al. (2020) konnten wir eine signifikante Überexpression von fast allen Komponenten des Hippo-Signalwegs im PDAC im Vergleich mit gesundem Pankreasgewebe nachweisen [131]. Interessant hierbei war, dass der Signalweg bei Patient:innen mit metastasiertem PDAC inaktiv war. Im Vergleich dazu waren MST1/2, pLATS, pYAP und 14-3-3 in Patient:innen ohne Metastasen höher exprimiert, was für einen aktiven Hippo-Signalweg spricht. Dies passt zu bisherigen Ergebnissen von Salcedo–Allende et al. (2017), wo ebenfalls eine Überexpression von YAP in metastasierten PDAC-Patient:innen nachgewiesen werden konnte [135]. Unsere Ergebnisse bestätigen die Rolle des gesamten Hippo-Signalwegs im Metastasierungsprozess von PDAC und untermauern frühere experimentelle Ergebnisse [133, 181, 193, 194] in einer realen Studienpopulation.

Zudem konnten wir in den korrespondierenden Lebermetastasen ähnliche Proteinexpressionslevel des Hippo-Signalwegs nachweisen. Das umliegende Lebergewebe zeigte keine Fehlregulation des Hippo-Signalwegs. Jedoch wird vermutet, dass es eine Prädisposition für vermehrtes Lebermetastasenwachstum gibt; diese war aber zum Zeitpunkt der Operation in unserem Kollektiv (noch) nicht nachweisbar [111, 195].

In der aktuellen Literatur beschäftigen sich nur wenige Arbeiten mit dem Zusammenhang zwischen Hippo-Signalweg und dem Überleben der Patient:innen. Salcedo–Allende et al. konnten eine signifikant geringere YAP-Expression bei Patient:innen mit einem OS von unter 30 Monaten finden; allerdings gab es keine Abweichungen bei der Kaplan-Meier-Analyse von OS und DFS [135]. Eine aktuellere Studie identifizierte YAP als unabhängigen prognostischen Marker, wobei in der Studienpopulation von 140 Patient:innen eine höhere Expression mit einem kürzeren OS und DFS assoziiert war [182]. Rozengurt und Kolleg:innen konnten 2018 mithilfe des Human Protein Atlas verschiedene YAP/TEAD-regulierte Gene identifizieren, welche ebenfalls als Prädiktoren für ein schlechteres Überleben gelten [179].

4.1.3 Prognostische Bedeutung der pLATS-, pYAP- und YAP-Expressionen

Die Ergebnisse der ersten Veröffentlichung von Drexler et al. (2020a) zeigten ein verbessertes OS bei Patient:innen mit hohen pLATS- und pYAP-Expressionen (Abbildung 4.1) [131]. Zudem konnten wir nachweisen, dass Patient:innen mit einer höheren pYAP-Expression ebenfalls signifikant längere DFS-Zeiten zeigten. Hierbei korrelierten besonders die pYAP-Expressionen sowie das Verhältnis von $pYAP > YAP$ mit einem längeren DFS (Abbildung 4.2). Diese Ergebnis-

se unterstreichen die klinische Relevanz der Hippo-Signalwegsaktivität, gemessen an der YAP- und pYAP-Expression, sowie die Korrelation dieser Expressionen mit dem OS und DFS der Patient:innen.

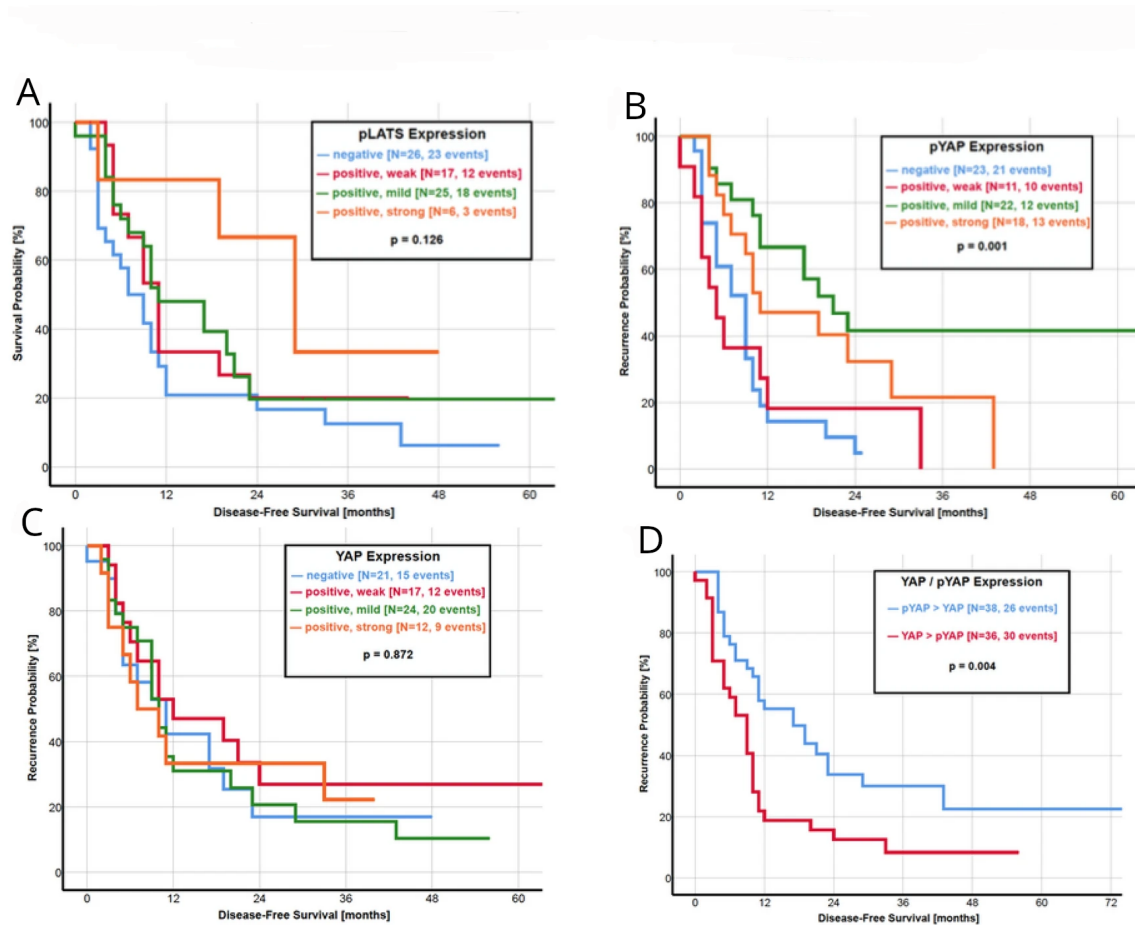


Abbildung 4.2: Kaplan-Meier Analysen für die Hippo-Signalweg-Komponenten pLATS (A), pYAP (B) und YAP (C) sowie die Ratio von pYAP und YAP (D). Sowohl pLATS und YAP zeigen keine signifikanten Unterschiede im krankheitsfreien Überleben (DFS) in Abhängigkeit der Expressionsstärke. pYAP -Expressionsunterschiede sind hingegen hoch signifikant. Auch die pYAP und YAP Ratio zeigt ein deutlich längeres DFS wenn die pYAP-Expression gegenüber der YAP-Expression erhöht ist. Modifiziert aus [131].

YAP ist der Haupteffektor des Hippo-Signalwegs, weist jedoch selbst nur eine sehr geringe Transkriptionsaktivität auf [109]. Für die Zielgentranskription benötigt YAP einen Co-Faktor, mit dem es einen Komplex bildet. Über den Phosphorylierungsstatus von YAP orchestriert der Hippo-Signalweg Zellproliferation, -wachstum und -homöostase. Ist YAP nicht phosphoryliert, kann es im Zellkern mit den dort lokalisierten TEAD1–4 Transkriptionsfaktoren einen Komplex bilden und so die Zielgentranskription regulieren. Es ist weitestgehend akzeptiert, dass TEAD einen signifikanten Beitrag zum Tumorgeschehen und zur Verbreitung von Tumorzellen leistet. Allerdings schwankt die TEAD-Aktivität und -Expression zwischen verschiedenen Tumorentitäten und muss

für jede Tumorentität gesondert betrachtet werden [107, 108, 111, 144, 164].

TEAD1–4 sind die bekanntesten Co-Faktoren von YAP im Pankreas. Um zu differenzieren, ob ein spezifisches TEAD als primärer Co-Faktor fungiert, wurde die Expression von TEAD1–4 im Zellkern von PDAC-Zellen ausgewertet. Im Vergleich zu gesundem Pankreasgewebe zeigte sich eine generelle Überexpression von TEAD im PDAC. Bei Patient:innen mit metastasiertem PDAC konnten insbesondere TEAD2 und 3 in erhöhter Expression gefunden werden. Dies gilt sowohl im PDAC als auch in den zugehörigen Metastasen, was die Vermutung nahelegt, dass YAP die Metastasierung über TEAD2 und 3 antreibt.

Alle Bestandteile des Hippo-Signalwegs sind gut erforscht und es ist bekannt, dass es bei der Aktivität zu Überschneidungen mit anderen Signalwegen kommen kann. Die aktuelle Forschung richtet deshalb die Aufmerksamkeit auf YAP und den YAP/TEAD-Komplex als medizinisch nutzbares Werkzeug zur Behandlung von PDAC-Patient:innen [108, 195, 196]. Die gezielte Manipulation des YAP-TEAD-Komplexes stellt einen vielversprechenden Ansatz dar, zum Beispiel durch Verteporfin. Zwar fehlen bislang weitere wissenschaftliche Analysen dazu, aber Verteporfin wurde als TEAD-Co-Faktor identifiziert, der mit YAP um die Bindungsstelle an TEAD konkurriert und so die YAP-TEAD-Komplexbildung hemmt [197]. Es gilt allerdings zu berücksichtigen, dass Verteporfin teilweise toxische Nebenwirkungen haben kann [114, 198, 199].

Ein weiterer Ansatz ist die direkte Interaktion mit YAP-gesteuerten Genen. Diese beeinflussen das Wachstum, die Progression und die Metastasierung von Krebs, jedoch sind bislang noch keine Wirkstoffe, die gezielt auf YAP-regulierte Gene abzielen, für den klinischen Einsatz bei PDAC zugelassen. Weitere Forschung muss aufzeigen, ob dies ein vielversprechender Ansatz in der Ära der gezielten (Krebs-)Therapie ist.

4.1.4 Bedeutung der TEAD-Transkriptionsfaktoren und ihre intrazelluläre Lokalisation

Die erste Studie dieser kumulativen Dissertation zeigt, dass der Hippo-Signalweg in metastasierten PDAC-Patient:innen inaktiv ist (Abbildung 4.3), was zu einer Ansammlung von YAP im Zellkern und der Komplexbildung mit TEAD2 und 3 führt. Dies wiederum steigert die Proliferation und die pro-metastatischen Effekte. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Hippo-Signalweg einen großen Einfluss auf das Fortschreiten der Erkrankung und die Bildung von Metastasen hat. Er ist klinisch hoch relevant, da der Wechsel vom aktiven Hippo-Signalweg zum inaktiven Hippo-Signalweg zu schlechteren Prognosen des OS und des DFS führt. Zusammengefasst

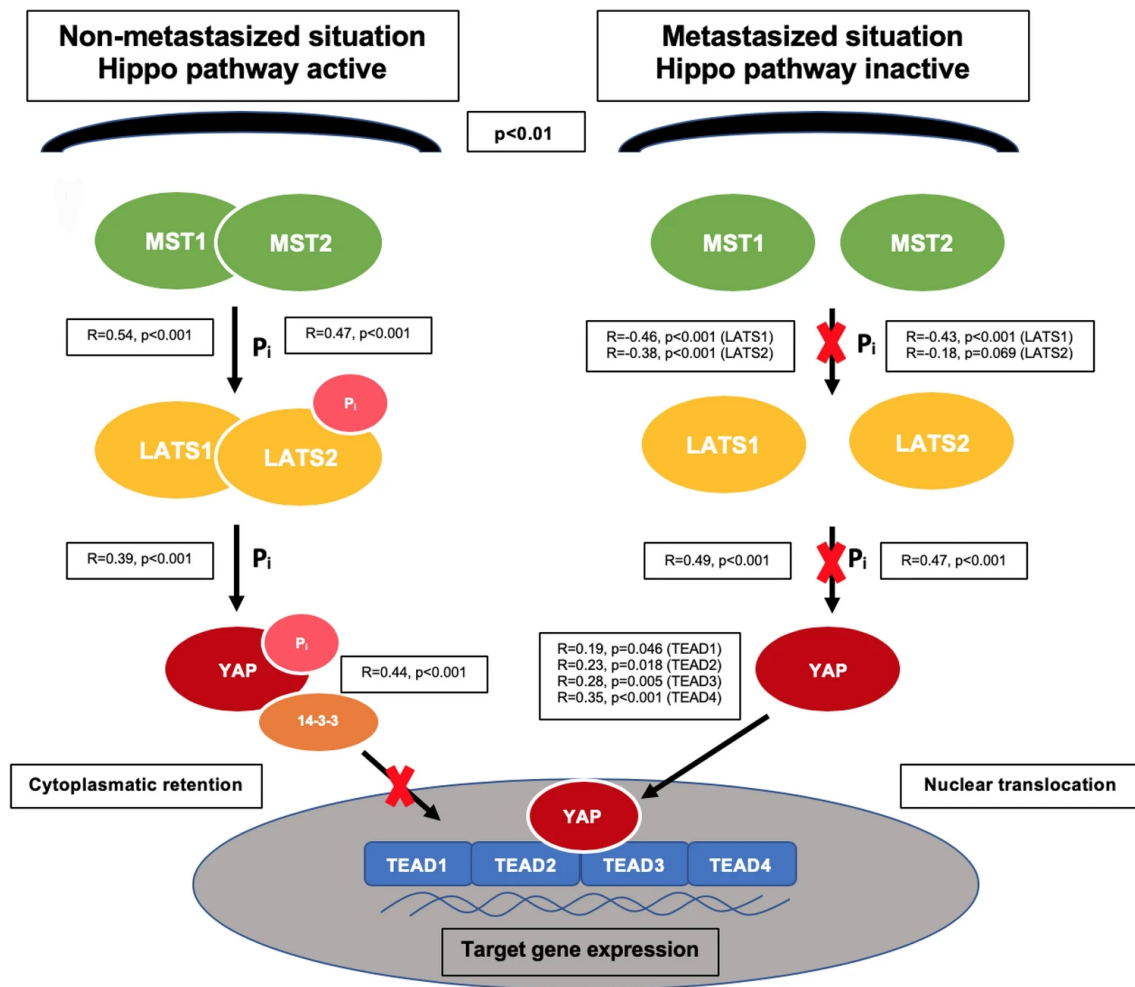


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des Hippo-Signalwegs bei PDAC Patient:innen mit Metastasen und ohne Metastasen. Unsere Ergebnisse zeigen deutlich, dass der Signalweg bei Patient:innen mit Metastasen inaktiv ist und YAP im Zellkern mit TEAD 2 und 3 einen Komplex bildet. Dieser sorgt wiederum für die Zielgentranskription. Aus [131].

zeigen diese Ergebnisse, dass der Hippo-Signalweg im PDAC ein enormes Potential als medizinisches Ziel von Präparaten haben könnte, da die Inaktivität sowohl die Prognose verbessern als auch die Metastasierungsrate verringern oder verlangsamen kann.

Der Co-Faktor TEAD ist essenziell für die Hippo-abhängige Zielgentranskription, da YAP allein nur eine sehr geringe Transkriptionsaktivität hat [109]. Bei der Auswertung der Bestandteile des Hippo-Signalwegs innerhalb der PDAC-Zellen beobachteten wir vermehrt auch TEAD1–4-Expression im Zytoplasma. Lin et al. (2017) konnten zeigen, dass TEAD1–4 nur im Zellkern als Co-Faktor interagieren kann und eine Aufgabe innerhalb des Zytoplasmas bisher noch nicht bekannt ist [164]. Es entstand die Frage, ob im speziellen Fall von PDAC die zytoplasmatische Expression von TEAD1–4 im Vergleich mit der Expression im Zellkern regulativen Einfluss auf das Fortschreiten der Erkrankung oder das Überleben der Patient:innen haben könnte.

4.2 TEAD 1–4 Expression in PDAC und Lebermetastasen

4.2.1 Intrazelluläre Lokalisation und prognostische Relevanz von TEAD in PDAC

Die zweite Arbeit dieser kumulativen Dissertation untersuchte die intrazelluläre Lokalisation von TEAD1–4 in PDAC und seinen (Leber-)Metastasen. Die Studie verwendete immunhistologische Techniken, um Proteinlevel und intrazelluläre Lokalisation von TEAD1–4 zu analysieren. Hierfür wurde ein Kollektiv von 81 Patient:innen, welche mit PDAC diagnostiziert waren, untersucht. Es handelt sich nach unserem Wissen um die erste Arbeit, welche den klinischen Einfluss von TEAD1–4 im PDAC untersucht. Verschiedene andere Arbeiten haben untersucht, welche Einflüsse TEAD1–4 in unterschiedlichen Tumorentitäten hat und konnten TEAD als wichtigen Promotor für die Tumorentstehung, die Tumorprogression und die Metastasierung nachweisen [124, 144]. Demnach ist eine höhere TEAD-Expression mit einer schlechteren Überlebensprognose in Magen-, Darm-, Prostata- und Brustkrebs assoziiert [123, 176, 178, 200–204]. Diese Ergebnisse induzieren, dass jedes einzelne TEAD in der bisher bekannten TEAD1–4 seine eigene Rolle in verschiedenen Tumorentitäten einnimmt, weshalb die Rollen für jede Tumorentität eigens definiert werden sollten.

Unsere Ergebnisse unterstreichen die zentrale Rolle von TEAD in der Tumorprogression. Wie auch die vorher genannten Studien für andere Tumorentitäten gezeigt haben, führt eine erhöhte TEAD-Expression unweigerlich zu einer schlechteren Überlebensprognose auch bei PDAC. Es zeigte sich, dass TEAD1, TEAD2 und TEAD3 in PDAC-Zellen signifikant höher im Zellkern und Zytoplasma exprimiert werden als in gesundem Pankreasgewebe. Mittels der verwendeten immunhistologischen Färbungen konnten wir zudem unterscheiden, ob TEAD1–4 im Zytoplasma oder im Zellkern exprimiert war. Eine Kaplan-Meier-Analyse konnte zeigen, dass höhere IRS-Scores im Zellkern bei TEAD2 und 3 im Vergleich zum Zytoplasma mit einem schlechteren OS assoziiert sind (Abbildung 4.4). Außerdem zeigte eine Expressionsverschiebung von TEAD1, TEAD2 und TEAD4 in den Zellkern für Patient:innen ein geringeres und kürzeres DFS (Abbildung 4.5). Mittels einer multivariaten Analyse konnten wir TEAD2 und TEAD3 als unabhängige Faktoren für das OS lokalisieren und TEAD2 zudem als unabhängigen prognostischen Faktor für das DFS. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die TEAD1–4 eine wichtige Rolle in der Progression des PDAC spielt und einen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patient:innen hat. Zudem deuten unsere Ergebnisse an, dass TEAD2 möglicherweise das wichtigste Mitglied der TEAD1–4 im PDAC ist, da es sowohl ein unabhängiger Prognosefaktor für OS als auch DFS ist.

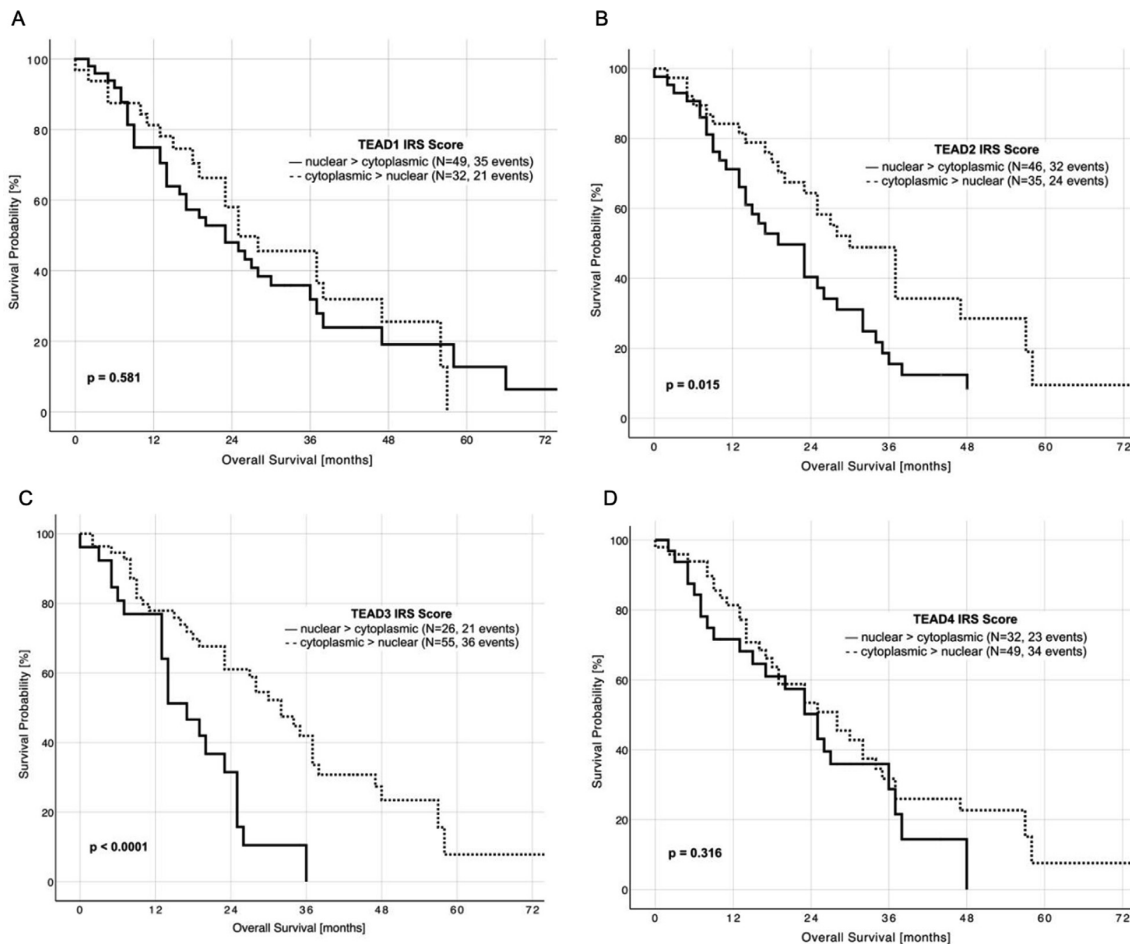


Abbildung 4.4: Kaplan-Meier Analysen der intrazellulären TEAD-Expressionsverteilung in PDAC in Bezug auf das Gesamtüberleben. Verglichen werden Patient:innengruppen, kategorisiert nach dem Verhältnis der zytoplasmatischen und nukleären Expressionshöhe der einzelnen TEAD-Familienmitglieder in Bezug auf das Gesamtüberleben (OS). TEAD1 (A) und TEAD4 (D) zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Patient:innengruppen. TEAD2 (B) zeigt signifikant verbessertes Überleben bei Patient:innen mit höherer zytoplasmatischer TEAD2 Expression. TEAD3 (C) zeigt hoch signifikante Unterschiede im Gesamtüberleben für Patient:innen, welche eine höhere TEAD3 Expression im Zytoplasma haben als im Zellkern. Modifiziert aus [170].

Ein weiterer bekannter Grund für sehr schlechte Überlebensprognosen bei PDAC sind die zum Teil sehr frühe Metastasierung bei Patient:innen, die ein eigentlich resektables PDAC hätten [23]. Aktuelle Literatur liefert immer mehr Hinweise darauf, dass PDAC mehr als systemische und weniger als lokale Krankheit gesehen werden muss [205]. Diese Erkenntnis unterstreicht die Wichtigkeit und Dringlichkeit von prognostischen Werkzeugen, um der schlechten Überlebensprognose durch frühe Metastasierung des PDAC entgegenzuwirken. Unter Berücksichtigung unserer vorangegangenen Ergebnisse stellen wir die Hypothese auf, dass TEAD1–4 an der Entstehung von PDAC-Metastasen beteiligt ist und so ebenfalls zur schlechten Überlebensprognose des PDAC beiträgt.

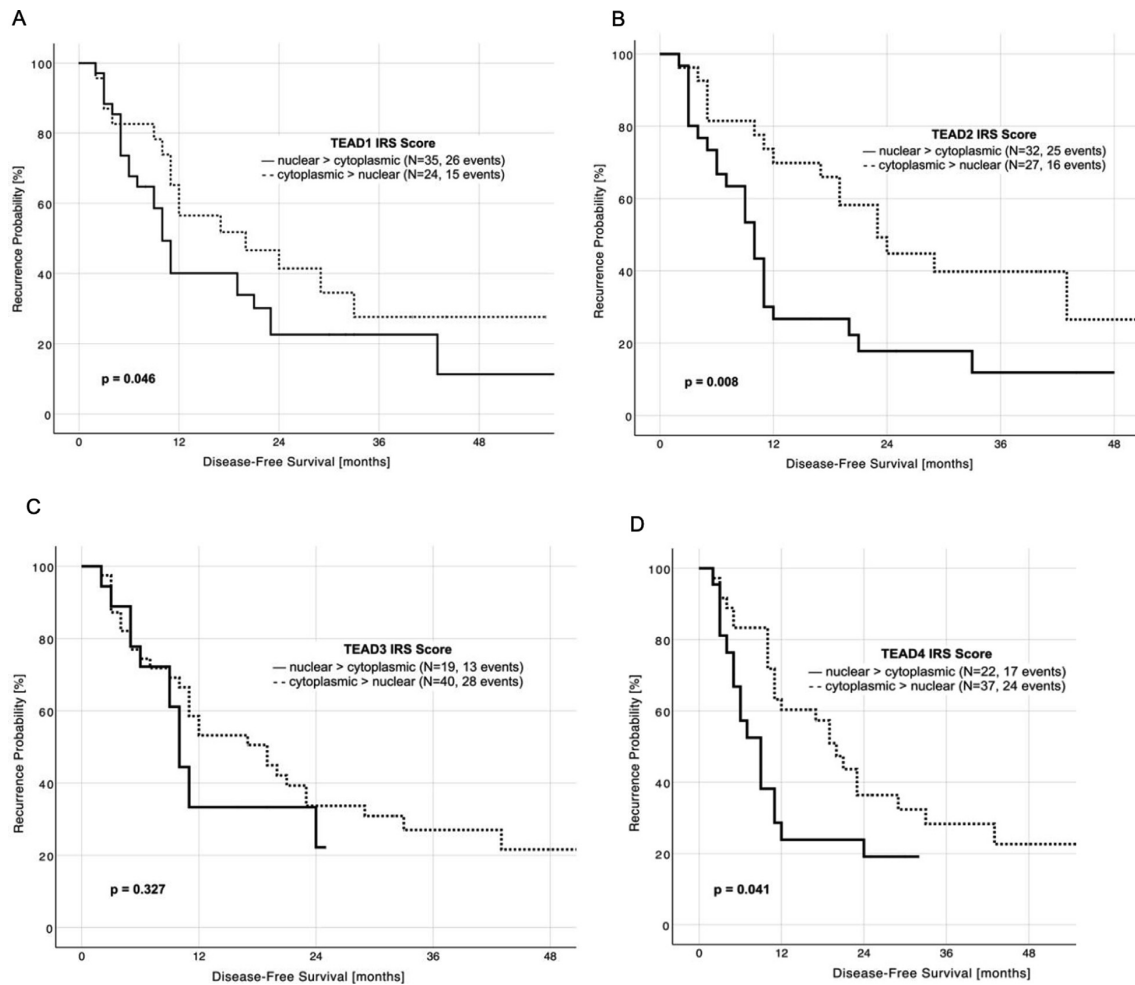


Abbildung 4.5: Kaplan-Meier Analysen der intrazellulären TEAD-Expressionsverteilung in PDAC in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben. Verglichen werden Patient:innengruppen, kategorisiert nach dem Verhältnis der zytoplasmatischen und nukleären Expressionshöhe der einzelnen TEAD-Familienmitglieder in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben (DFS). TEAD3 (C) zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Patient:innengruppen. TEAD1 (A) und TEAD4 (D) zeigen ein leicht verbessertes krankheitsfreies Überleben bei Patient:innen mit höherer zytoplasmatischer TEAD1 und TEAD4 Expression. TEAD2 (C) zeigt hoch signifikante Unterschiede im krankheitsfreien Überleben für Patient:innen welche eine höhere TEAD2 Expression im Zytoplasma als im Zellkern haben. Modifiziert aus [170].

Ein Schlüsselvorgang während der Metastasierung ist die *Epitheliale-Mesenchymale-Transition* (EMT) [27]. Verschiedene Studien haben sich mit dem Vorgang der, durch TEAD-Transkriptionsoutput induzierten, EMT beschäftigt. Sie konnten nachweisen, dass über die Transkriptionsfaktoren Slug und *zinc-finger-enhancer binding protein 1* (ZEB1) EMT stimuliert werden kann [111, 144, 145, 154, 206]. Hinzu kommen Prometastasierungseffekte durch Gene wie *connective tissue growth factor* (CTGF) und *myocardin related transcription factor* (MRTF), welche in Zellen von Brust- und Darmkrebs nachgewiesen wurden [126, 180, 207, 208].

Im Fall von PDAC haben die meisten Studien nur die YAP-TEAD-Interaktion als Promotor für

Metastasierung und Tumorprogression untersucht, aber die Rolle von TEAD1–4 allein ist noch ungeklärt. Unsere Analyse (menschliche Kohorte mit immunhistochemischen Gewebeanalysen) konnte für Patient:innen mit Lebermetastasen zum Zeitpunkt der Operation höhere IRS-Werte von TEAD2 und TEAD3 im Zellkern nachweisen. Zusätzlich zeigte sich eine Expressionsverschiebung bei Patient:innen mit metastasiertem PDAC von TEAD2 und TEAD3 vom Zytoplasma in den Zellkern. Auch in den Krebszellen der Lebermetastasen war die TEAD2- und TEAD3-Expression überwiegend vom Zytoplasma in den Zellkern verschoben. Diese Ergebnisse untermauern unsere Hypothese, dass die TEAD1–4 eine wichtige Rolle in der Metastasenbildung und Tumorprogression einnimmt. Zusätzlich zu unseren Ergebnissen sind TEAD2 und TEAD3 wichtige Faktoren in der PDAC-Progression, da die Transkriptionsfaktoren im Nukleus vermehrt auftreten, wenn die Erkrankung weiter fortgeschritten ist. Die Überexpression von TEAD2 und TEAD3 im Zellkern der Lebermetastasen unterstreicht die Rolle der TEAD1–4 in der Metastasenentstehung von zirkulierenden disseminierten Pankreaskrebszellen und sind konform zu einer Studie von Er et al. (2019), welche herausgefunden hat, dass eine L1CAM-ILK-YAP-TEAD-Signalkaskade essenziell für die Metastasenkolonisation ist [209].

Ein Hauptpunkt unserer Studie war die Evaluation der TEAD1–4-Expression in Bezug auf die intrazelluläre Verteilung. Nach unserem Verständnis kann TEAD1–4 nur im Zellkern mit den Co-Faktoren interagieren, zudem sind die Aufgaben von zytoplasmatischem TEAD bisher noch nicht verstanden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Patient:innen, die mit einer metastasierenden und fortgeschrittenen PDAC-Erkrankung zu tun haben, ein Expressionsgefälle vom Zytoplasma zum Zellkern von TEAD2 und TEAD3 zeigen. Dieses kann nur durch spezielle Vorgänge und Transporte in der Zelle erreicht werden. Der sogenannte *nukleo-zytoplasmatische Transport* (engl: nucleocytoplasmatic shuttling, NCS), welcher auch für diese Expressionsverschiebung verantwortlich sein könnte, weckt großes Interesse für zukünftige Studien.

TEAD allein weist, ähnlich wie YAP, nur eine minimale transkriptionelle Aktivität auf und benötigt verschiedene Co-Faktoren, um die Zielgenaktivität des jeweilig ansteuernden Signalwegs zu stimulieren und so die jeweils spezifischen Zielgene freizusetzen. Diese können auch pro-onkologisch und pro-metastasierend sein [143]. Der YAP-TEAD-Komplex ist einer der am besten erforschten Komplexe und das nukleäre-transkriptionelle Modul des Hippo-Signalwegs. Es ist allgemein anerkannt, dass YAP-TEAD in der Lage ist, Krebsmetastasierung und Tumorprogression in PDAC zu begünstigen [119, 126, 133, 210, 211].

Die Aktivität und intrazelluläre Verteilung von TEAD kann auf eine Hippo-abhängige und -

unabhängige Art reguliert werden [107, 123, 144]. Ein Regulator, der sowohl abhängig als auch unabhängig beeinflussen kann, ist der WNT-Signalweg [212–214]. Auch interessant ist der TGF- β -Signalweg, bei dem die Interaktion von Hippo und TGF- β zentral über ein SMAD- und TEAD-Zusammenspiel gesteuert wird [144]. Im Ergebnis induziert TGF- β eine erhöhte Expression und Aktivität von TEAD [215–217]. All dies deutet darauf hin, dass TEAD ein wichtiger Effektor des TGF- β -Signalwegs und der daraus resultierenden Tumorgenese ist. Zudem ist TEAD ein wichtiger Mediator des EGFR-RAS-RAF-MAPK-Signalwegs, welcher der am häufigsten fehlregulierte Signalweg in humanen Tumorentitäten ist [144, 218].

4.2.2 Regulatorische Netzwerke und therapeutische Angriffspunkte der TEAD—Familie

Unsere Studie Drexler et al. 2020b [170] richtet ihr Augenmerk auf die gesamte Expression von TEAD1–4, unabhängig davon, durch welchen Signalweg sie reguliert wird oder mit welchem Effektor TEAD zusammenarbeitet. Aufgrund unserer Ergebnisse scheinen TEAD2 und TEAD3 klinisch hoch relevant für PDAC-Patient:innen zu sein, und wir vermuten hohes Potential in der Regulierung der Aktivität oder des NCS als neuen möglichen therapeutischen Ansatz. Das Inhibieren von TEAD und seiner Interaktion mit verschiedensten Zielgenen hat einen massiven Einfluss auf verschiedene Signalwege, da TEAD von diversen Signalwegen beeinflusst wird. Jedes TEAD ist aus ähnlichen Domänen aufgebaut, wodurch die Entwicklung eines TEAD-Antagonisten eine enorme Herausforderung darstellt [136]. Zudem muss ein Inhibitor sowohl Zugang zum Zellkern haben als auch hochspezifisch an das jeweilige TEAD binden.

Im Gegensatz zu den bekannten Enzymen, die nur eine aktive Bindungsstelle besitzen, gibt es mehrere potenzielle Vektoren, um TEAD1–4 therapeutisch zu adressieren. Da es keinen klaren Konsens über die funktionelle Rolle der einzelnen Paraloge gibt, ist bisher ungewiss, ob ein Inhibitor spezifisch für ein Mitglied der TEAD1–4 oder spezifisch für alle menschlichen TEAD-Proteine sein muss. Unseren Ergebnissen zufolge könnte die Hemmung von TEAD2 und TEAD3 einen großen Einfluss für PDAC-Patient:innen haben. TEAD2 und 3 erwiesen sich als pro-metastatisch und prognostisch relevant. TEAD1 und 4 zeigten in unserer Studienpopulation zwar eine erhöhte Expression, aber keinen messbaren Effekt auf das Patient:innen-Outcome.

Auch auf die *DNA-Bindedomäne* (DNA-BD) von TEAD1–4 abzielen, wurde bisher nicht versucht bzw. nicht berichtet und aktuell sind dafür auch keine selektiven Inhibitoren bekannt [108, 139, 219]. Die DNA-BD-Region ist PAN-spezifisch für alle TEADs und es ist fraglich, ob ein kleines

Molekül in der DNA-BD verhindern könnte, dass der hochspezifische DNA-Bindeprozess abläuft. Hinzu kommt die potenzielle Membranwand, welche nicht jedes Molekül in den Zellkern diffundieren lässt [108, 220]. Die aktuell vielversprechendste therapeutische Option ist das Abzielen auf die TEAD-YAP-Interaktion. Diese Klasse der Medikamente (Verteporfin, K-975 und VGLL4) zielen auf das YAP selbst, die TEAD/YAP-Interaktion oder fungieren als YAP-Konkurrent [163, 221–223]. Verteporfin funktioniert als Konkurrent um die Bindungsstelle von YAP und stört so die YAP-TEAD-Interaktion [197]. Dies scheint aktuell die beste Option und der potenteste YAP-Inhibitor zu sein, jedoch muss hier erwähnt werden, dass es auch YAP-unabhängige Tumorprogressionsfaktoren gibt [198, 224]. K-975 ist ebenfalls ein potenter TEAD-Inhibitor, welcher die TEAD-YAP-Interaktion hemmt. Für diesen konnten auch antineoplastische Fähigkeiten in Mesotheliomazelllinien nachgewiesen werden [225, 226]. Jiao et al. (2014) zeigten mittels eines VGLL4-Nachahmungspeptides die direkte Konkurrenz mit YAP um die TEAD1–4-Bindungsstellen, welches ein mögliches Therapeutikum bei Magenkrebs darstellt [163]. Diese Therapeutika reichen jedoch nicht aus, um die YAP-unabhängige Transkriptionsleistung von TEAD zu stoppen und können nach derzeitigem Kenntnisstand die nukleare Aktivität von TEAD nicht vollständig hemmen.

4.2.3 Nukleäre Translokation von TEAD2, 3 und Auswirkungen auf Metastasierung und Leberfunktion

Unsere Studie hat gezeigt, dass eine nukleäre Verschiebung von TEAD2 und TEAD3 einen wesentlichen Einfluss auf die Metastasierung und das Fortschreiten der Erkrankung bei PDAC-Patient:innen haben könnte. Darüber hinaus hat sich TEAD2 als unabhängiger prognostischer Faktor für OS und DFS erwiesen und unterstreicht die klinische Relevanz der TEAD-Proteinfamilie. Unseren Ergebnissen zufolge könnte die direkte Hemmung von TEAD-Proteinen oder die Beeinflussung des NCS zu einer zytoplasmatischen Sequestrierung von TEAD ein neuer und vielversprechender therapeutischer Ansatz sein. Diese Hemmung würde sowohl auf den Hippo/YAP-abhängigen als auch auf den unabhängigen Regulationsmechanismus von TEAD abzielen.

Die Unterschiede der TEAD-Expression zwischen Zytoplasma und Zellkern haben einen Effekt auf das Outcome von PDAC-Patient:innen. Da es bei PDAC zum Teil schon sehr früh zur Metastasierung kommt und die Prognose für Patient:innen mit Metastasen deutlich schlechter ausfällt [23, 24], muss neben der angestrebten R0-Resektion auch ein Behandlungskonzept für

die Leber vorhanden sein. Zumeist bleibt nur, die Leber mittels eines Hypertrophiekonzeptes zu behandeln und sich die eigentliche Aufgabe des Hippo–Signalwegs, welche unter anderem in der Regulation der Organgröße und Zellproliferation besteht, zunutze zu machen. Hierbei wird durch Induktion der Hypertrophie das Lebergewebe zur Regeneration angeregt. Wenn die Lokalisation der Expression von TEAD1–4 im Tumor und seinen Metastasen einen Einfluss auf die Krankheitsentwicklung hat, dann könnte Ähnliches auch für gesunde Zellen und deren eigentlichen Aufgaben gelten. Wir stellten deshalb die Hypothese auf, dass die intrazelluläre Expression von TEAD in Hepatozyten einen Einfluss auf die Regenerationsfähigkeit des Lebergewebes hat.

4.3 TEAD als möglicher Prognosefaktor in der Leberregeneration

4.3.1 TEAD-Expression in tumorfreiem Lebergewebe und Verlauf in ALPPS-Schritten

Die dritte Arbeit dieser kumulativen Dissertation Küchler et al. 2024, [185] beschäftigte sich mit der TEAD–Expression in tumorfreiem Lebergewebe. Es wurde tumorfreies Lebergewebe mit immunhistologischen und Immunfluoreszenzantikörpern gefärbt und die erhobenen IRS-Werte mit klinisch relevanten Leberregenerationsmetriken verglichen. Durch die Korrelation der Expression von TEAD1–4 mit klinischen Leberregenerationsmetriken wollten wir das prognostische Potenzial von TEAD1–4 zur Verbesserung der Patient:innenauswahl und chirurgischen Planung bewerten.

Im Gegensatz zu anderen Studien, die sich meist auf TEAD1–4 und seine Co-Faktoren oder die TEAD–Expression innerhalb einer Krebserkrankung konzentrieren [144], ist unsere Studie die erste, die TEAD–Expressionen in Lebergewebe untersucht. Wir können eindeutig zeigen, dass alle TEADs in einzelnen Hepatozyten gleichzeitig exprimiert werden (Abbildung 4.6 und 4.7), was ihre evolutionäre Bedeutung für verschiedene zelluläre Prozesse unterstreicht [107, 108, 185]. Aufgrund der Funktion von TEAD als DNA-Transkriptionsfaktor wird angenommen, dass die TEAD–Lokalisierung im Zytoplasma eine regulierende Funktion hat [107]. Es bleibt jedoch zu erforschen, ob TEAD zudem auch spezifische zytoplasmatische Funktionen hat.

Die TEAD-Familie von Transkriptionsfaktoren ist stark konserviert und spezialisiert. Sie spielt eine wesentliche Rolle in diversen entwicklungsbiologischen Prozessen [154, 227]. Nach der Embryogenese fungieren TEAD1–4 als Co-Faktoren, bilden Komplexe mit Signalwegs-Effektoren, um die Transkription von Zielgenen zu regulieren und üben weitere wichtige Funktionen in ver-

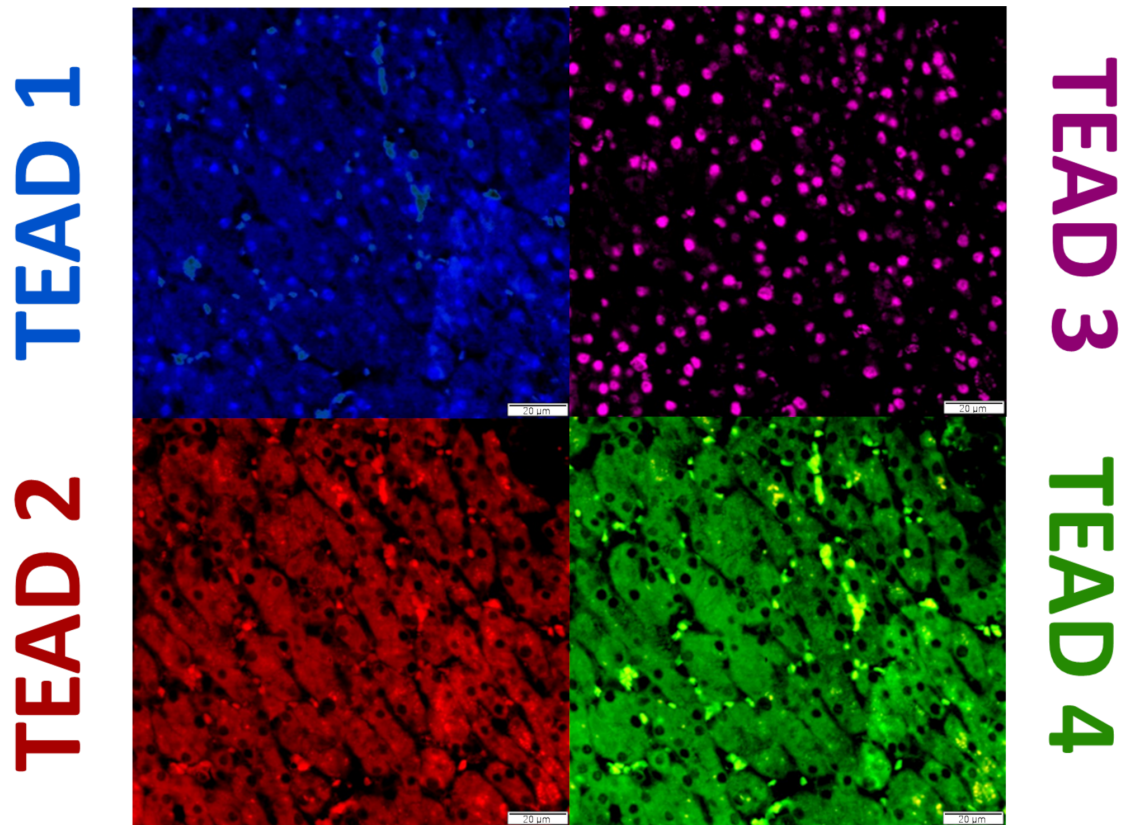


Abbildung 4.6: Vierfache Immunfluoreszenzfärbung eines tumorfreien Lebergewebeschnittes aus der ALPPS-OP 2. Repräsentatives Bild der Immunfluoreszenzfärbung mit TEAD1 bei 350 nm, TEAD2 bei 568 nm, TEAD3 bei 647 nm und TEAD4 bei 488 nm. Alle Bilder sind bei 20 × Vergrößerung aufgenommen, die Farbe von TEAD3 wurde übersichtshalber in Lila geändert. Alle Bilder wurden ohne Veränderung der Bildposition aufgenommen. Aus [185].

schiedenen Geweben aus [142]. Bemerkenswerterweise stoppt das Fehlen von TEAD im Zellkern die DNA-Transkription, unabhängig von der Aktivität nachgeschalteter Effektorproteine. So auch bei der Leberregeneration. Hier spielt der Hippo-Signalweg, insbesondere sein Effektor YAP, eine zentrale Rolle bei der Regulierung der Organgröße [228].

Hepatozyten sind hauptverantwortlich für die erste Leberregeneration nach Gewebeschädigung und werden unter anderem durch den Hippo-Signalweg und seinen Effektor YAP reguliert. Dieser Signalweg kontrolliert die Organgröße und kann bei Dysregulation zu Fehlbildungen und degenerativem Wachstum führen, einschließlich Tumorentstehung [228]. TEAD, als Transkriptionsfaktor, spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Transkription von Zielgenen des Hippo-Signalwegs. Ohne TEAD ist der Signalweg nicht in der Lage, seine transkriptionellen Funktionen auszuführen [154, 227, 228]. Zudem ist TEAD der primäre Bindungspartner für YAP im Lebergewebe von Mäusen [173]. Unsere Multicolor-Immunfluoreszenzanalyse bestätigte, dass TEAD1–4 in einzelnen Hepatozyten koexprimiert werden, was ihre evolutionäre Bedeu-

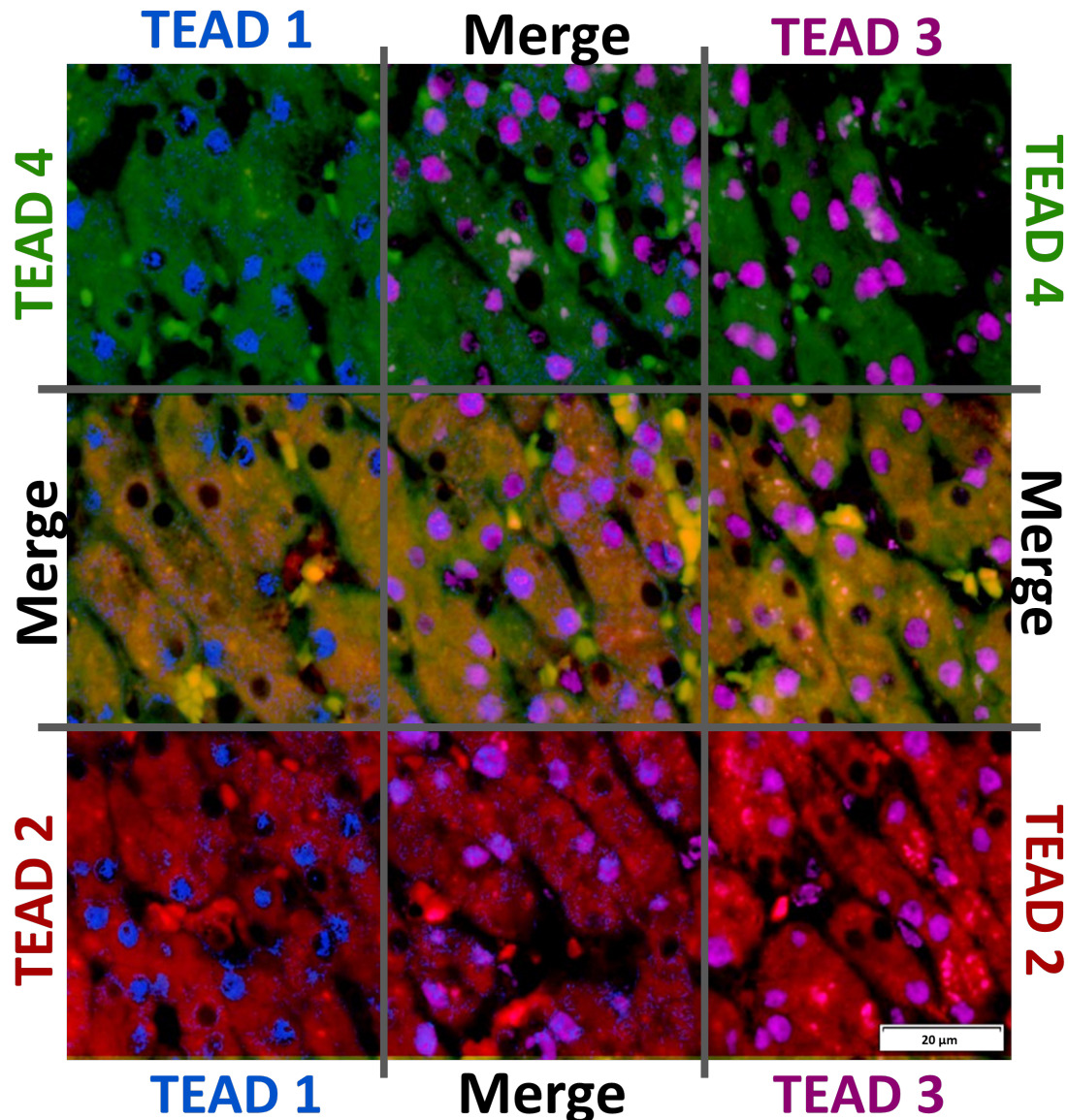


Abbildung 4.7: Überlagerungsbild der vierfachen Immunfluoreszenzfärbung. Zusammengesetztes Bild der vierfachen Färbung mit den TEADs in ihren jeweiligen Farben. Das obere „Merge“-Quadrat zeigt TEAD1+3+4. Das rechte „Merge“-Quadrat zeigt TEAD2+3+4. Das linke „Merge“-Quadrat zeigt TEAD1+2+4. Das untere „Merge“-Quadrat zeigt TEAD1+2+3. Das mittlere Quadrat zeigt alle TEADs. Die Abbildung zeigt keine signifikanten Unterschiede oder Kombinationen der TEAD-Expression. Aus [185].

tung in verschiedenen zellulären Prozessen unterstreicht [108, 164, 185]. Darüber hinaus wurde keine signifikante Assoziation zwischen der TEAD-Expression und Patient:innen-Eigenschaften wie Geschlecht, Alter oder primärer Diagnose gefunden [185]. Die unabhängige und gleichzeitige Expression aller vier TEADs in Bezug auf Patient:innen-Eigenschaften und intrazelluläre Lokalisation unterstreicht ihre vielfältigen Rollen in der Leberfunktion.

Interessant waren die gefundenen Zusammenhänge in der Verschiebung der TEAD1–4–

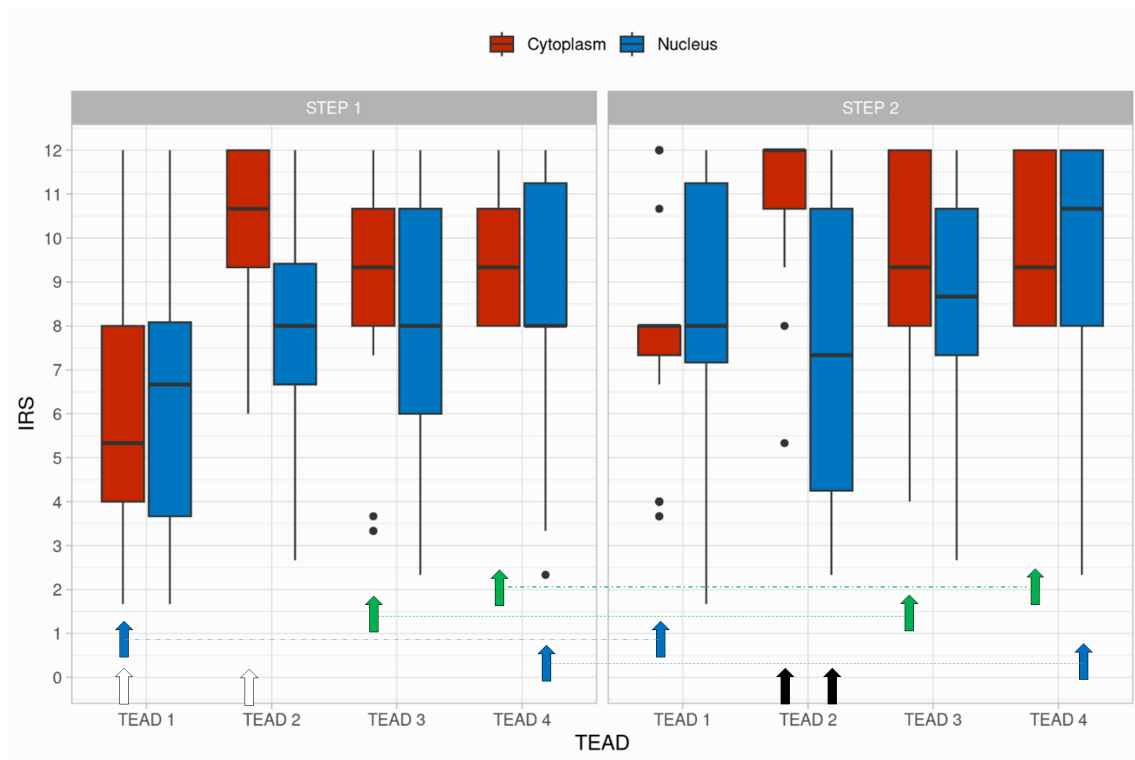


Abbildung 4.8: Boxplot für die Expression von TEAD1–4 in den ALPPS-Schritten 1 und 2, separat für die zytoplasmatische und nukleäre Lokalisation. Die Boxplots unterstreichen die immunhistologischen Befunde der Unterschiede der TEAD-Expressionen: **Schwarze Pfeile:** Unterschiedliche Expression von TEAD2 je nach intrazellulärer Lokalisation. **Blaue Pfeile:** Expressionen von TEAD1 im Zytoplasma und TEAD4 im Zellkern, die zwischen den Schritten 1 und 2 verschoben sind – entsprechende Pfeile befinden sich auf derselben Höhe und sind durch gestrichelte Linien verbunden. **Weißer Pfeile:** Unterschiedliche Expression von zytoplasmatischem TEAD1 und TEAD2 im Schritt 1. **Grüne Pfeile:** Zytoplasmatische Expressionen von TEAD3 und TEAD4, die unabhängig vom ALPPS-Schritt auf demselben Expressionsniveau blieben – entsprechende Pfeile befinden sich auf der gleichen Höhe und sind durch gestrichelte Linien verbunden. Aufgrund der kleinen Stichprobengröße wurden keine statistischen Analysen für die einfachen Expressionsergebnisse durchgeführt. Aus [185].

Expression zwischen den einzelnen ALPPS-Schritten (Abbildung 4.8). Es konnten:

- Expressionsunterschiede innerhalb eines TEAD und seiner Lokalisation innerhalb desselben ALPPS-Schritts gefunden werden (schwarze Pfeile),
- Expressionsunterschiede zwischen ALPPS-Schritt 1 und 2 innerhalb des gleichen TEADs beobachtet werden (blaue Pfeile),
- Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen TEADs im selben ALPPS-Schritt beobachtet werden (weiße Pfeile),
- stabile Expressionsniveaus über die ALPPS-Schritte hinweg beobachtet werden (grüne Pfeile) [185].

Bei Leberverletzungen oder -resektionen transloziert YAP innerhalb von vier Stunden vom Zytoplasma in den Zellkern und löst regenerative Reaktionen aus [228]. TEAD1 verbleibt jedoch

im Zytoplasma oder wird aktiv dorthin transportiert, nachdem YAP in den Zellkern eingetreten ist [229, 230]. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass die intrazelluläre Verteilung von TEAD eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Ausgabe des Hippo-Signalwegs spielt [107, 227]. Ob der YAP-TEAD-Komplex im Zellkern oder im Zytoplasma gebildet wird, ist nicht vollständig verstanden; eine Studie von Lin et al. (2017) deutet darauf hin, dass der YAP-TEAD-Komplex im Zytoplasma gebildet wird und erst später in den Zellkern migriert [107]. Unsere Ergebnisse bestätigen allerdings, dass TEAD1-4 sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert sind [185]. Weitere Studien zeigen zudem die Bindung von YAP an TEAD1 [231] und TEAD4 [232].

4.3.2 Einfluss von TEAD1 und TEAD4 auf Leberregenerationsmetriken

In unserer Analyse hatte TEAD1 einen signifikant negativen Einfluss auf die Leberregeneration (Abbildung 4.9). Dies war an klinisch relevanten Parametern wie dem *absoluten Leberwachstum* (ABS.GR), dem *Grad der Hypertrophie* (DH), *Verhältnis von zukünftigem Leberrest zum Körpergewicht* (FLRBWR) und der *kinetische Wachstumsrate* (KGR) ersichtlich. Zytoplasmatisches TEAD1 war konsequent mit einem negativen prognostischen Ergebnis verbunden: Eine Erhöhung der TEAD1-Expression um eine Einheit reduzierte die KGR um 5 % und das FLRBWR um 7 %, was auf langsames Leberwachstum und eine verringerte Lebergröße im Verhältnis zum Körpergewicht hinweist [185]. Obwohl die Lebergröße allein kein Indikator für die Funktionalität ist, erhöht reduziertes Wachstum das Risiko eines postoperativen Leberversagens [233, 234]. Darüber hinaus verringerte eine erhöhte nukleare TEAD4-Expression das ABS.GR um 4 % [185]. Zur besseren Vergleichbarkeit, wird die Festlegung von Baseline-TEAD1-4-Expressionswerten für eine zukünftige klinische Anwendung und Einordnung entscheidend sein.

Die Rolle von TEAD1 bei der Leberregeneration scheint sich von der von TEAD2-4 zu unterscheiden, was durch sein unabhängiges Expressionsmuster in unseren Gewebeproben belegt wird. Die Expression von TEAD1 war eng mit klinischen Ergebnissen verknüpft, insbesondere mit ihrem negativen Einfluss auf die Leberregeneration und dem DFS. Während eine statistische Korrelation zwischen der TEAD1-Expression sowohl von Schritt 1 als auch 2 und der TEAD3-Expression von Schritt 2 und dem DFS beobachtet wurde, bleibt der Mechanismus unklar [185]. Interessant ist allerdings, dass die Ergebnisse für erhöhte TEAD1-Expression negativ waren und für erhöhte TEAD3-Expression positiv. Es gibt viele Faktoren, die zum DFS über die Expression eines einzelnen Proteins hinaus beitragen. Dennoch ist die Beobachtung, dass einzelne

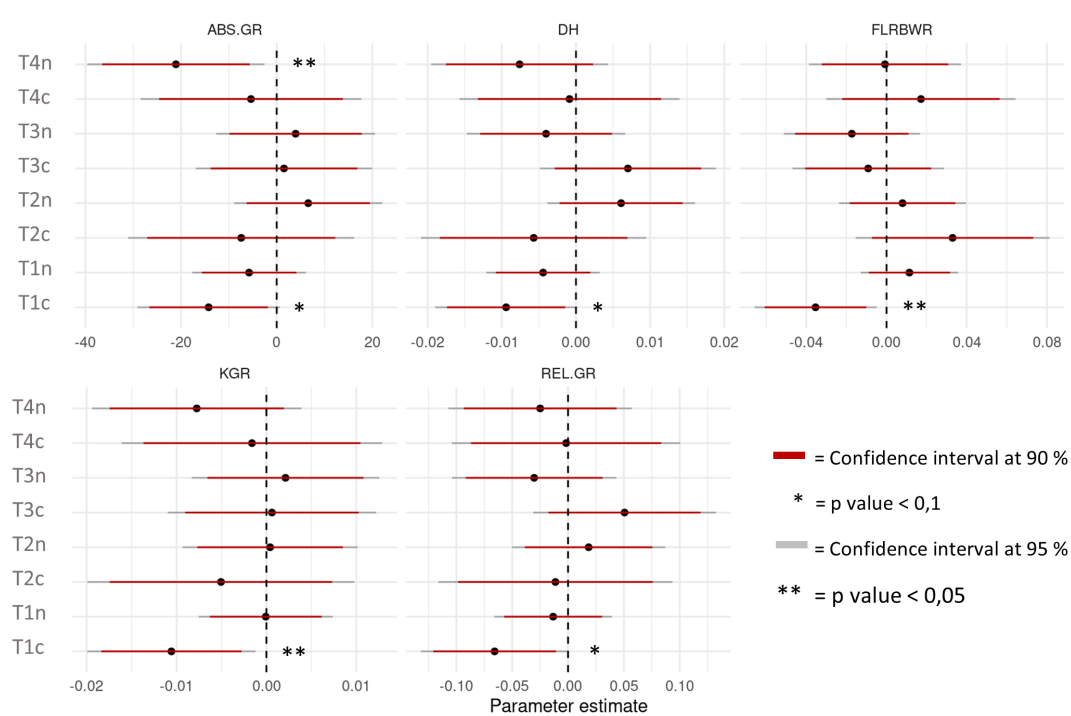


Abbildung 4.9: Forest Plot der Expressionen von TEAD1–4 in ALPPS Schritt 1 (OP1) und den Leberregenerationswerten. Nukleäres TEAD4 zeigte einen negativen Einfluss auf ABS.GR ($p = 0,027$). Die zytoplasmatische TEAD1-Expression zeigte signifikante negative Effekte auf KGR ($p = 0,028$) und FLRBWR ($p = 0,024$). Mit einem Konfidenzintervall von 90 % beeinflusste die zytoplasmatische TEAD1-Expression alle berücksichtigten Leberregenerationswerte signifikant (ABS.GR ($p = 0,06$), DH ($p = 0,054$) und REL.GR ($p = 0,051$)). Konfidenzintervall 90 % = rote Linien; Konfidenzintervall 95 % = graue Linien; mit ABS.GR = absolutes Wachstum, DH = Grad der Hypertrophie, FLRBWR = Verhältnis von verbleibendem Lebergewebe zum Körpergewicht, KGR = kinetische Wachstumsrate, REL.GR = relatives Wachstum. Aus [185].

TEAD1–4–Familienmitglieder spezifische Rollen in verschiedenen Geweben haben, konsistent mit früheren Ergebnissen [123, 170, 178, 235].

Zusätzlich zeigte die Analyse eines gemischten Modells, dass die TEAD1–Expression signifikant höher war als die von TEAD2, TEAD3 und TEAD4 ($p < 0,001$). Zwischen den ALPPS–Schritten 1 und 2 gab es erhebliche Schwankungen, welche durch die intrazelluläre Lokalisation (zytoplasmatisch vs. nukleär) beeinflusst wurden [185]. Dies wirft die Frage auf, warum TEAD1 im Vergleich zu anderen TEADs in Lebergewebe erhöhte Expressionswerte zeigt. Eine plausible Hypothese ist, dass TEAD1 eine spezialisierte Funktion in der regenerativen Antwort nach ALPPS hat und möglicherweise als entscheidender Mediator des Hippo–Signalwegs während der Hepatozytenproliferation und Gewebeumstrukturierung dient. Zukünftige Studien sind notwendig, um die spezifischen regulatorischen Mechanismen und die funktionelle Bedeutung der vorherrschenden Rolle von TEAD1 in diesem Zusammenhang zu klären. Dies könnte Auswirkungen auf

die Verbesserung der klinischen Ergebnisse bei Leberoperationen und in der regenerativen Medizin haben [236].

4.3.3 Prognostische Relevanz der TEAD Expression in gesundem Lebergewebe

Sowohl die Kombination der TEAD1–4–Expression mit Leberregenerationsmetriken als auch die Analyse des gemischten Modells deuten darauf hin, dass TEAD1, 3 und 4 an der Leberregeneration beteiligt sind und als Prädiktoren für klinische Ergebnisse dienen können. Das Ziel unserer Studie war jedoch nicht, ein klinisches Vorhersagemodell zu entwickeln, sondern vielmehr Beziehungen zwischen der TEAD1–4–Expression und der Leberregeneration zu identifizieren. Eine erhöhte *cytoplasmatische TEAD1* (T1c)–Expression war mit einer schlechteren *kinetische Wachstumsrate* (KGR) und FLRBWR korreliert, während eine erhöhte *nukleäre TEAD 4* (T4n)–Expression mit reduziertem ABS.GR assoziiert war [185]. Soweit wir wissen, ist dies die erste Studie, die diese Verbindungen in menschlichem Lebergewebe zeigt.

Die Untersuchung der *nukleären TEAD1–* (T1n), T1c– und T4n–Expression könnte zudem prognostische Einblicke in die KGR, FLRBWR und ABS.GR des FLR erlauben, wodurch diese TEADs potenzielle Laborparameter für die Vorhersage von Leberregenerationsergebnissen darstellen. In Kombination mit dem 2022 eingeführten *präoperativen ALPPS-Risiko–* (CAPRA)–Score, der das Risiko eines postoperativen Leberversagens basierend auf verschiedenen Patient:innenfaktoren schätzt [237], könnte die TEAD1–4–Expression in die klinische Praxis integriert werden, um die Patient:innenauswahl für ALPPS zu verbessern. Durch die Verbesserung der präoperativen Planung mit TEAD1–4–Expressionsdaten könnten Kliniker:innen besser in der Lage sein, die Fähigkeit eines/einer Patient:in zur Regeneration von Lebergewebe auf zellulärer Ebene vorherzusagen, was zu verbesserten Ergebnissen führt.

Weitere Studien mit größeren Kohorten und umfassenden experimentellen Setups sind erforderlich, um zu klären, warum eine erhöhte T1c– und T4n–Expression die Leberregeneration bei ALPPS-Patient:innen negativ beeinflusst. Ein detaillierteres Verständnis der regulatorischen Rolle von TEAD im Lebergewebe könnte dessen Nutzung als prognostisches Werkzeug in klinischen Settings verfeinern.

5 Conclusion

Unsere Ergebnisse verdeutlichen die zentrale Bedeutung der TEAD-Familie für Progression und Prognose des Pankreaskarzinoms, insbesondere durch ihre subzelluläre Lokalisation und funktionelle Interaktion mit Signalwegen wie Hippo, WNT und TGF- β . In metastasiertem PDAC-Gewebe zeigte sich eine nukleäre Verschiebung von TEAD2 und TEAD3 – korreliert mit ungünstigen Überlebensdaten (kurzer OS und DFS), was noch verstärkt in Lebermetastasen zu beobachten war. Für die Leberregeneration nach ALPPS haben cytoplasmatisches sowie nukleäres TEAD1 und nukleäres TEAD4 einen negativen Einfluss auf wichtige klinische Regenerationsmetriken (KGR, FLRBWR, ABS.GR).

Zusammengefasst kann die Analyse der TEAD1–4-Expression und -Lokalisation unmittelbar zur klinischen Entscheidungsfindung beitragen: Sie liefert nicht nur prognostische Marker für das Überleben von PDAC-Patient:innen, sondern erlaubt auch eine individuellere Planung komplexer leberchirurgischer Interventionen. Insbesondere eine Kombination etablierter Scores wie CAPRA mit TEAD-Expressionsprofilen könnte die Patient:innenauswahl und die prognostische Risikoabschätzung für ALPPS verbessern. Die simultane Expression aller vier TEADs in Hepatozyten unterstreicht zudem ihre evolutive Bedeutung für Wachstum, Homöostase und Regeneration, unabhängig von Patient:innencharakteristika wie Alter oder Grunderkrankung.

Zukünftig eröffnen diese Ergebnisse neue therapeutische Ansätze: Die gezielte Hemmung der TEAD-Funktion (durch Inhibitoren oder Interventionen auf das nucleocytoplasmatic shuttling) könnte sowohl die Tumorprogression als auch die Metastasierung beeinflussen und die regenerative Kapazität der Leber modulieren. Um die Nutzung als prognostisches Werkzeug und als Zielstruktur für innovative Therapien weiter zu verbessern, sind jedoch umfangreichere Studien mit größeren Patient:innenkohorten und experimentellen Ansätzen nötig.

Insgesamt leistet diese Arbeit einen Beitrag zum Verständnis der molekularen Mechanismen im PDAC und der Leberregeneration und zeigt, wie multidimensionale Analysen translationale Brücken von der Grundlagenforschung zur klinischen Chirurgie schlagen können.

Literaturverzeichnis

- [1] A. L. Blackford, M. I. Canto, M. Dbouk, R. H. Hruban, B. W. Katona, A. Chak, R. E. Brand, S. Syngal, J. Farrell, F. Kastrinos, E. M. Stoffel, A. Rustgi, A. P. Klein, I. Kamel, E. K. Fishman, J. He, R. Burkhart, E. J. Shin, A. M. Lennon und M. Goggins: **Pancreatic Cancer Surveillance and Survival of High-Risk Individuals**. In: *JAMA Oncology* 10.8 (2024), S. 1087. ISSN: 2374–2437. DOI: 10.1001/jamaoncol.2024.1930.
- [2] D. S. Bundesamt: *Sterbefälle durch Krebs insgesamt 2023*. 2024. URL: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-krebs-insgesamt.html>.
- [3] V. Heinemann und H. Schmidberger: **Duktales Adenokarzinom des Pankreas**. In: *Der Onkologe* 25.8 (2019), S. 642–644. ISSN: 0947–8965. DOI: 10.1007/s00761-019-0603-4.
- [4] M. Ilic und I. Ilic: **Epidemiology of pancreatic cancer**. In: *World Journal of Gastroenterology* 22.44 (2016), S. 9694. ISSN: 1007–9327. DOI: 10.3748/wjg.v22.i44.9694.
- [5] J. Ferlay, E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J. W. W. Coebergh, H. Comber, D. Forman und F. Bray: **Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012**. In: *European Journal of Cancer* 49.6 (2013), S. 1374–1403. ISSN: 0959–8049. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.12.027.
- [6] M. Erkan, C. Reiser-Erkan, C. W. Michalski, S. Deucker, D. Sauliunaite, S. Streit, I. Esposito, H. Friess und J. Kleeff: **Cancer-Stellate Cell Interactions Perpetuate the Hypoxia-Fibrosis Cycle in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma**. In: *Neoplasia* 11.5 (2009), S. 497–508. ISSN: 1476–5586. DOI: 10.1593/neo.81618.
- [7] B. Ren, X. Liu und A. A. Suriawinata: **Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Precursor Lesions**. In: *The American Journal of Pathology* 189.1 (2019), S. 9–21. ISSN: 0002-9440. DOI: 10.1016/j.ajpath.2018.10.004.
- [8] P. Mayer und M. M. Gaida: **Die Mikroarchitektur des Pankreaskarzinoms aus Sicht des Pathologen und des Radiologen**. In: *Der Pathologe* 42.5 (2021), S. 524–529. ISSN: 0172–8113. DOI: 10.1007/s00292-021-00949-2.
- [9] T. Große-Steffen, T. Giese, N. Giese, T. Longerich, P. Schirmacher, G. M. Hänsch und M. M. Gaida: **Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Pancreatic Tumor Cell Lines: The Role of Neutrophils and Neutrophil-Derived Elastase**. In: *Clinical and Developmental Immunology* 2012 (2012), S. 1–12. ISSN: 1740-2522. DOI: 10.1155/2012/720768.
- [10] J. Toft, W. J. Hadden, J. M. Laurence, V. Lam, L. Yuen, A. Janssen und H. Pleass: **Imaging modalities in the diagnosis of pancreatic adenocarcinoma: A systematic review and meta-analysis of sensitivity, specificity and diagnostic accuracy**. In: *European Journal of Radiology* 92 (2017), S. 17–23. ISSN: 0720–048X. DOI: 10.1016/j.ejrad.2017.04.009.
- [11] R. L. Siegel, K. D. Miller und A. Jemal: **Cancer statistics, 2018**. In: *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68.1 (2018), S. 7–30. ISSN: 1542–4863. DOI: 10.3322/caac.21442.
- [12] A. Vincent, J. Herman, R. Schulick, R. H. Hruban und M. Goggins: **Pancreatic cancer**. In: *The Lancet* 378.9791 (2011), S. 607–620. ISSN: 0140–6736. DOI: 10.1016/s0140-6736(10)62307-0.

- [13] C. Springfield, S. Krug, J. Neoptolemos und D. Jäger: **Current systemic treatment for pancreatic cancer**. In: *Die Onkologie* 29.9 (2023), S. 769–777. ISSN: 2731–7226. DOI: 10.1007/s00761-023-01382-1.
- [14] P. Hogendorf, A. Durczyński und J. Strzelczyk: **Metastatic Pancreatic Cancer**. In: *Journal of Investigative Surgery* 31.2 (2017), S. 151–152. ISSN: 1521–0553. DOI: 10.1080/08941939.2017.1291774.
- [15] D. P. Ryan, T. S. Hong und N. Bardeesy: **Pancreatic Adenocarcinoma**. In: *New England Journal of Medicine* 371.11 (2014), S. 1039–1049. ISSN: 1533–4406. DOI: 10.1056/nejmra1404198.
- [16] D. P. Ryan, T. S. Hong und N. Bardeesy: **Pancreatic Adenocarcinoma**. In: *New England Journal of Medicine* 371.22 (2014), S. 2139–2141. ISSN: 1533–4406. DOI: 10.1056/nejmc1412266.
- [17] B. Zheng, K. Ohuchida, Z. Yan, T. Okumura, T. Ohtsuka und M. Nakamura: **Primary Recurrence in the Lung is Related to Favorable Prognosis in Patients with Pancreatic Cancer and Postoperative Recurrence**. In: *World Journal of Surgery* 41.11 (2017), S. 2858–2866. ISSN: 0364–2313. DOI: 10.1007/s00268-017-4068-6.
- [18] C. A. Iacobuzio-Donahue, B. Fu, S. Yachida, M. Luo, H. Abe, C. M. Henderson, F. Vilardell, Z. Wang, J. W. Keller, P. Banerjee, J. M. Herman, J. L. Cameron, C. J. Yeo, M. K. Halushka, J. R. Eshleman, M. Raben, A. P. Klein, R. H. Hruban, M. Hidalgo und D. Laheru: **DPC4 Gene Status of the Primary Carcinoma Correlates With Patterns of Failure in Patients With Pancreatic Cancer**. In: *Journal of Clinical Oncology* 27.11 (2009), S. 1806–1813. ISSN: 0732–183X. DOI: 10.1200/jco.2008.17.7188.
- [19] N. Bardeesy, K.-h. Cheng, J. H. Berger, G. C. Chu, J. Pahler, P. Olson, A. F. Hezel, J. Horner, G. Y. Lauwers, D. Hanahan und R. A. DePinho: **Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer**. In: *Genes & Development* 20.22 (2006), S. 3130–3146. ISSN: 0890–9369. DOI: 10.1101/gad.1478706.
- [20] S. R. Hingorani, L. Wang, A. S. Multani, C. Combs, T. B. Deramaudt, R. H. Hruban, A. K. Rustgi, S. Chang und D. A. Tuveson: **Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice**. In: *Cancer Cell* 7.5 (2005), S. 469–483. ISSN: 1535–6108. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.04.023.
- [21] S. Das und S. Batra: **Pancreatic Cancer Metastasis: Are we being Pre-EMT?** In: *Current Pharmaceutical Design* 21.10 (2015), S. 1249–1255. ISSN: 1381–6128. DOI: 10.2174/138161282166614121115234.
- [22] L. Miarka: „Metastasierung des duktaalen Pankreasadenokarzinoms: Wechselwirkung der hepatischen Mikroumgebung und TRAIL-Rezeptoren sowie ihr Einfluss auf malignitäts-assoziierte Prozesse von Pankreasadenokarzinomzellen“. Diss. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 2020.
- [23] A. D. Rhim, E. T. Mirek, N. M. Aiello, A. Maitra, J. M. Bailey, F. McAllister, M. Reichert, G. L. Beatty, A. K. Rustgi, R. H. Vonderheide, S. D. Leach und B. Z. Stanger: **EMT and Dissemination Precede Pancreatic Tumor Formation**. In: *Cell* 148.1–2 (2012), S. 349–361. ISSN: 0092–8674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.11.025.
- [24] F. I. Rhim Andrew D. and Thege, S. M. Santana, T. B. Lannin, T. N. Saha, S. Tsai, L. R. Maggs, M. L. Kochman, G. G. Ginsberg, J. G. Lieb, V. Chandrasekhara, J. A. Drebin, N. Ahmad, Y.-X. Yang, B. J. Kirby und B. Z. Stanger: **Detection of Circulating Pancreas Epithelial Cells in Patients With Pancreatic Cystic Lesions**. In: *Gastroenterology* 146.3 (2014), S. 647–651. ISSN: 0016–5085. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.12.007.

- [25] G. P. Gupta und J. Massagué: **Cancer Metastasis: Building a Framework**. In: *Cell* 127.4 (2006), S. 679–695. ISSN: 0092–8674. DOI: 10.1016/j.cell.2006.11.001.
- [26] S. Gerstberger, Q. Jiang und K. Ganesh: **Metastasis**. In: *Cell* 186.8 (2023), S. 1564–1579. ISSN: 0092–8674. DOI: 10.1016/j.cell.2023.03.003.
- [27] J. Majidpoor und K. Mortezaee: **Steps in metastasis: an updated review**. In: *Medical Oncology* 38.1 (2021). ISSN: 1357–0560. DOI: 10.1007/s12032-020-01447-w.
- [28] M. P. Manns: *Praxis der Hepatologie*. Hrsg. von S. Schneidewind. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin / Heidelberg, 2016. 1257 S. ISBN: 9783642416200.
- [29] A. Schroeder, D. A. Heller, M. M. Winslow, J. E. Dahlman, G. W. Pratt, R. Langer, T. Jacks und D. G. Anderson: **Treating metastatic cancer with nanotechnology**. In: *Nature Reviews Cancer* 12.1 (2012), S. 39–50. ISSN: 1474–175X. DOI: 10.1038/nrc3180.
- [30] S. Valastyan und R. A. Weinberg: **Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms**. In: *Cell* 147.2 (2011), S. 275–292. ISSN: 0092–8674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.09.024.
- [31] K. J. Luzzi, I. C. MacDonald, E. E. Schmidt, N. Kerkvliet, V. L. Morris, A. F. Chambers und A. C. Groom: **Multistep Nature of Metastatic Inefficiency**. In: *The American Journal of Pathology* 153.3 (1998), S. 865–873. ISSN: 0002–9440. DOI: 10.1016/s0002-9440(10)65628-3.
- [32] M. Schünke, E. Schulte, U. Schumacher, M. Voll und K. Wesker: **2.4 -Pfortadersystem IN: PROMETHEUS Innere Organe: LernAtlas der Anatomie**. Georg Thieme Verlag KG, 2022. ISBN: 9783132444201. DOI: 10.1055/b0000000614.
- [33] J. A. Rhim, E. P. Sandgren, J. L. Degen, R. D. Palmiter und R. L. Brinster: **Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation**. In: *Science (New York, N.Y.)* 263 (5150 1994), S. 1149–1152. ISSN: 0036–8075. DOI: 10.1126/science.8108734.
- [34] K. Overturf, M. al-Dhalimy, C. N. Ou, M. Finegold und M. Grompe: **Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes**. In: *The American journal of pathology* 151 (5 1997), S. 1273–1280. ISSN: 0002–9440.
- [35] I. V. Kholodenko und K. N. Yarygin: **Cellular Mechanisms of Liver Regeneration and Cell-Based Therapies of Liver Diseases**. In: *BioMed research international* 2017 (2017). ISSN: 2314–6141. DOI: 10.1155/2017/8910821.
- [36] V. C. Sladky, K. Knapp, C. Soratroi, J. Heppke, F. Eichin, L. Rocamora-Reverte, T. G. Szabo, L. Bongiovanni, B. Westendorp, E. Moreno, E. A. van Lier, B. Bakker, D. C. J. Spierings, R. Wardenaar, D. Pereyra, P. Starlinger, S. Schultze, M. Trauner, T. Stojakovic, H. Scharnagl, L. L. Fava, F. Foijer, A. de Bruin und A. Villunger: **E2F-Family Members Engage the PIDDosome to Limit Hepatocyte Ploidy in Liver Development and Regeneration**. In: *Developmental Cell* 52 (2020), S. 335–349. ISSN: 1534–5807. DOI: 10.1016/j.devcel.2019.12.016.
- [37] L. N. Kent, J. B. Rakijas, S. K. Pandit, B. Westendorp, H.-Z. Chen, J. T. Huntington, X. Tang, S. Bae, A. Srivastava, S. Senapati, C. Koivisto, C. K. Martin, M. C. Cuitino, M. Perez, J. M. Clouse, V. Chokshi, N. Shinde, R. Kladney, D. Sun, A. Perez-Castro, R. B. Matondo, S. Nantasanti, M. Mokry, K. Huang, R. Machiraju, S. Fernandez, T. J. Rosol, V. Coppola, K. S. Pohar, J. M. Pipas, C. R. Schmidt, A. de Bruin und G. Leone: **E2f8 mediates tumor suppression in postnatal liver development**. In: *The Journal of clinical investigation* 126 (8 2016), S. 2955–2969. ISSN: 1558–8238. DOI: 10.1172/JCI85506.
- [38] S. Zhang, K. Zhou, X. Luo, L. Li, H.-C. Tu, A. Sehgal, L. H. Nguyen, Y. Zhang, P. Gopal, B. D. Tarlow, D. J. Siegwart und H. Zhu: **The Polyploid State Plays a Tumor-Suppressive Role in the Liver**. In: 44 (2018), S. 447–459. ISSN: 1534–5807. DOI: 10.1016/j.devcel.2018.01.010.

- [39] S. Zhang, L. H. Nguyen, K. Zhou, H.-C. Tu, A. Sehgal, I. Nassour, L. Li, P. Gopal, J. Goodman, A. G. Singal, A. Yopp, Y. Zhang, D. J. Siegwart und H. Zhu: **Knockdown of Anillin Actin Binding Protein Blocks Cytokinesis in Hepatocytes and Reduces Liver Tumor Development in Mice Without Affecting Regeneration**. In: 154 (2018), S. 1421–1434. ISSN: 0016–5085. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.12.013.
- [40] S. Celton-Morizur und C. Desdouets: **Polypliodization of liver cells**. In: *Advances in experimental medicine and biology* 676 (2010), S. 123–135. ISSN: 0065–2598. DOI: 10.1007/978-1-4419-6199-0_8.
- [41] G. Gentric, S. Celton-Morizur und C. Desdouets: **Polypliody and liver proliferation**. In: *Clinics and research in hepatology and gastroenterology* 36 (1 2012), S. 29–34. ISSN: 2210–741X. DOI: 10.1016/j.clinre.2011.05.011.
- [42] F. Chen, R. J. Jimenez, K. Sharma, H. Y. Luu, B. Y. Hsu, A. Ravindranathan, B. A. Stohr und H. Willenbring: **Broad Distribution of Hepatocyte Proliferation in Liver Homeostasis and Regeneration**. In: *Cell stem cell* 26 (1 2020), S. 27–33. ISSN: 1875–9777. DOI: 10.1016/j.stem.2019.11.001.
- [43] M. K. Diril, C. K. Ratnacaram, V. C. Padmakumar, T. Du, M. Wasser, V. Coppola, L. Tessarollo und P. Kaldis: **Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) is essential for cell division and suppression of DNA re-replication but not for liver regeneration**. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (10 2012), S. 3826–3831. ISSN: 1091–6490. DOI: 10.1073/pnas.1115201109.
- [44] M. Oertel und D. A. Shafritz: **Stem cells, cell transplantation and liver repopulation**. In: *Biochimica et biophysica acta* 1782 (2 2008), S. 61–74. ISSN: 0006–3002. DOI: 10.1016/j.bbadis.2007.12.004.
- [45] G. K. Michalopoulos, L. Barua und W. C. Bowen: **Transdifferentiation of rat hepatocytes into biliary cells after bile duct ligation and toxic biliary injury**. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 41 (3 2005), S. 535–544. ISSN: 0270–9139. DOI: 10.1002/hep.20600.
- [46] D. Yimlamai, C. Christodoulou, G. G. Galli, K. Yanger, B. Pepe-Mooney, B. Gurung, K. Shrestha, P. Cahan, B. Z. Stanger und F. D. Camargo: **Hippo Pathway Activity Influences Liver Cell Fate**. In: *Cell* 157 (2014), S. 1324–1338. ISSN: 0092–8674. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.060.
- [47] L. Hansen: **Liver transplantation in older adults**. In: *Journal of gerontological nursing* 40 (9 2014), S. 8–13. ISSN: 0098–9134. DOI: 10.3928/00989134-20140805-01.
- [48] R. Gramignoli, K. Kannisto, R. C. Srinivasan, T. Miki und S. C. Strom: **Analysis of gene expressions and metabolic activities in fetal and postnatal human hepatocytes for clinical therapy**. In: *Cytotherapy* 17 (2015), S74. ISSN: 1465–3249. DOI: 10.1016/j.jcyt.2015.03.563.
- [49] R. P. Evarts, Z. Hu, K. Fujio, E. R. Marsden und S. S. Thorgeirsson: **Activation of hepatic stem cell compartment in the rat: role of transforming growth factor α , hepatocyte growth factor, and acidic fibroblast growth factor in early proliferation**. In: *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 4 (7 1993), S. 555–561. ISSN: 1044–9523.
- [50] R. Turner, O. Lozoya, Y. Wang, V. Cardinale, E. Gaudio, G. Alpini, G. Mendel, E. Wauthier, C. Barbier, D. Alvaro und L. M. Reid: **Human hepatic stem cell and maturational liver lineage biology**. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 53 (3 2011), S. 1035–1045. ISSN: 1527-3350. DOI: 10.1002/hep.24157.

- [51] R. Español-Suñer, R. Carpentier, N. Van Hul, V. Legry, Y. Achouri, S. Cordi, P. Jacquemin, F. Lemaigre und I. A. Leclercq: **Liver progenitor cells yield functional hepatocytes in response to chronic liver injury in mice.** In: *Gastroenterology* 143 (6 2012), S. 1564–1575. ISSN: 1528–0012. DOI: 10.1053/j.gastro.2012.08.024.
- [52] M. Huch, C. Dorrell, S. F. Boj, J. H. van Es, V. S. W. Li, M. van de Wetering, T. Sato, K. Hamer, N. Sasaki, M. J. Finegold, A. Haft, R. G. Vries, M. Grompe und H. Clevers: **In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration.** In: *Nature* 494 (7436 2013), S. 247–250. ISSN: 1476–4687. DOI: 10.1038/nature11826.
- [53] S. Gordon und F. O. Martinez: **Alternative activation of macrophages: mechanism and functions.** In: *Immunity* 32 (5 2010), S. 593–604. ISSN: 1097–4180. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.05.007.
- [54] C. Schulz, E. Gomez Perdiguero, L. Chorro, H. Szabo-Rogers, N. Cagnard, K. Kierdorf, M. Prinz, B. Wu, S. E. W. Jacobsen, J. W. Pollard, J. Frampton, K. J. Liu und F. Geissmann: **A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells.** In: *Science (New York, N.Y.)* 336 (6077 2012), S. 86–90. ISSN: 1095–9203. DOI: 10.1126/science.1219179.
- [55] E. G. Perdiguero und F. Geissmann: **The development and maintenance of resident macrophages.** In: *Nature immunology* 17 (1 2016), S. 2–8. ISSN: 1529–2916. DOI: 10.1038/ni.3341.
- [56] G. K. Michalopoulos: **Liver regeneration.** In: *Journal of cellular physiology* 213 (2 2007), S. 286–300. ISSN: 0021–9541. DOI: 10.1002/jcp.21172.
- [57] A. Guillot und F. Tacke: **Liver Macrophages: Old Dogmas and New Insights.** In: *Hepatology Communications* 3 (2019), S. 730–743. ISSN: 2471–254X. DOI: 10.1002/hep4.1356.
- [58] B. Gao, W.-I. Jeong und Z. Tian: **Liver: An organ with predominant innate immunity.** In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 47 (2 2008), S. 729–736. ISSN: 1527–3350. DOI: 10.1002/hep.22034.
- [59] Z. Abdullah und P. A. Knolle: **Liver macrophages in healthy and diseased liver.** In: *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 469 (3–4 2017), S. 553–560. ISSN: 1432–2013. DOI: 10.1007/s00424-017-1954-6.
- [60] D. Meng, Y. Qin, N. Lu, K. Fang, Y. Hu, Z. Tian und C. Zhang: **Kupffer Cells Promote the Differentiation of Adult Liver Hematopoietic Stem and Progenitor Cells into Lymphocytes via ICAM-1 and LFA-1 Interaction.** In: *Tissue-Derived Stem Cell Research* 2019 (2019), S. 1–15. ISSN: 1687–966X. DOI: 10.1155/2019/4848279.
- [61] M. J. FitzGerald, E. M. Webber, J. R. Donovan und N. Fausto: **Rapid DNA binding by nuclear factor κ B in hepatocytes at the start of liver regeneration.** In: *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 6 (4 1995), S. 417–427. ISSN: 1044–9523.
- [62] N. Fausto: **Liver regeneration.** In: *Journal of hepatology* 32 (1 Suppl 2000), S. 19–31. ISSN: 0168–8278. DOI: 10.1016/s0168-8278(00)80412-2.
- [63] S. A. Mao, J. M. Glorioso und S. L. Nyberg: **Liver regeneration.** In: *Translational Research* 163 (2014), S. 352–362. ISSN: 1931–5244. DOI: 10.1016/j.trsl.2014.01.005.
- [64] C. Meijer, M. J. Wiezer, A. M. Diehl, H. J. Schouten, H. J. Schouten, S. Meijer, N. van Rooijen, A. A. van Lambalgen, C. D. Dijkstra und P. A. van Leeuwen: **Kupffer cell depletion by CI2MDP-liposomes alters hepatic cytokine expression and delays liver regeneration after partial hepatectomy.** In: *Liver* 20 (1 2000), S. 66–77. ISSN: 0106–9543. DOI: 10.1034/j.1600-0676.2000.020001066.x.

- [65] M. Kinoshita, T. Uchida, H. Nakashima, S. Ono, S. Seki und H. Hiraide: ***Opposite Effects of Enhanced Tumor Necrosis Factor- α Production from Kupffer Cells by Gadolinium Chloride on Liver Injury/Mortality in Endotoxemia of Normal and Partially Hepatectomized Mice***. In: *Shock* 23 (2005), S. 65–72. ISSN: 1073–2322. DOI: 10.1097/01.shk.0000144423.40270.96.
- [66] F. Böhm, U. A. Köhler, T. Speicher und S. Werner: ***Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines***. In: *EMBO Molecular Medicine* 2 (2010), S. 294–305. ISSN: 1757–4676. DOI: 10.1002/emmm.201000085.
- [67] Y. Sato, S. Koyama, K. Tsukada und K. Hatakeyama: ***Acute portal hypertension reflecting shear stress as a trigger of liver regeneration following partial hepatectomy***. In: *Surgery Today* 27 (1997), S. 518–526. ISSN: 0941–1291. DOI: 10.1007/bf02385805.
- [68] Y. Sato, K. Tsukada und K. Hatakeyama: ***Role of Shear Stress and Immune Responses in Liver Regeneration After a Partial Hepatectomy***. In: *Surgery Today* 29 (1999), S. 1–9. ISSN: 0941–1291. DOI: 10.1007/s005950050348.
- [69] J. M. Gentile, L. Avila und J. T. Grace: ***Liver regeneration. Old and new concepts***. In: *American journal of surgery* 120 (1 1970), S. 2–6. ISSN: 0002–9610. DOI: 10.1016/s0002-9610(70)80132-5.
- [70] K. J. Riehle, Y. Y. Dan, J. S. Campbell und N. Fausto: ***New concepts in liver regeneration***. In: *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 26 (2011), S. 203–212. ISSN: 0815–9319. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2010.06539.x.
- [71] Y. J. Kwon, K. G. Lee und D. Choi: ***Clinical implications of advances in liver regeneration***. In: *Clinical and Molecular Hepatology* 21 (2015), S. 7. ISSN: 2287–2728. DOI: 10.3350/cmh.2015.21.1.7.
- [72] J. Font-Burgada, S. Shalapour, S. Ramaswamy, B. Hsueh, D. Rossell, A. Umemura, K. Taniguchi, H. Nakagawa, M. A. Valasek, L. Ye, J. L. Kopp, M. Sander, H. Carter, K. Deisseroth, I. M. Verma und M. Karin: ***Hybrid Periportal Hepatocytes Regenerate the Injured Liver without Giving Rise to Cancer***. In: *Cell* 162 (4 2015), S. 766–779. ISSN: 1097–4172. DOI: 10.1016/j.cell.2015.07.026.
- [73] P. Heinke, F. Rost, J. Rode, P. Trus, I. Simonova, E. Lázár, J. Feddema, T. Welsch, K. Alkass, M. Salehpour, A. Zimmermann, D. Seehofer, G. Possnert, G. Damm, H. Druid, L. Brusch und O. Bergmann: ***Diploid hepatocytes drive physiological liver renewal in adult humans***. In: *Cell Systems* 13.6 (2022), S. 499–507. ISSN: 2405–4712. DOI: 10.1016/j.cels.2022.05.001.
- [74] J. I. Øvrebø und B. A. Edgar: ***Polyploidy in tissue homeostasis and regeneration***. In: *Development (Cambridge, England)* 145 (14 2018). ISSN: 1477–9129. DOI: 10.1242/dev.156034.
- [75] H. Tilg: ***Cytokines and liver diseases***. In: *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie* 15 (10 2001), S. 661–668. ISSN: 0835–7900. DOI: 10.1155/2001/746736.
- [76] N. Fausto, J. S. Campbell und K. J. Riehle: ***Liver regeneration***. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 43 (2 Suppl 1 2006), S45–S53. ISSN: 0270–9139. DOI: 10.1002/hep.20969.
- [77] J. Kountouras, P. Boura und N. J. Lygidakis: ***Liver regeneration after hepatectomy***. In: *Hepato-gastroenterology* 48 (38 2001), S. 556–562. ISSN: 0172–6390.
- [78] Y. Miyaoka, K. Ebato, H. Kato, S. Arakawa, S. Shimizu und A. Miyajima: ***Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration***. In: *Current biology : CB* 22 (13 2012), S. 1166–1175. ISSN: 1879–0445. DOI: 10.1016/j.cub.2012.05.016.

- [79] N. Fausto: **Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells.** In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 39 (6 2004), S. 1477–1487. ISSN: 0270–9139. DOI: 10.1002/hep.20214.
- [80] P. Herrmann: „Schilddrüsenhormone in der Aktivierung von hepatischen Progenitorzellen im Rahmen der Leberfibrogenese“. Diss. Universität Duisburg-Essen, 2020.
- [81] Q. Tan, J. Hu, X. Yu, W. Guan, H. Lu, Y. Yu, Y. Yu, G. Zang und Z. Tang: **The Role of IL-1 Family Members and Kupffer Cells in Liver Regeneration.** In: *BioMed research international* 2016 (2016), S. 6495793. ISSN: 2314–6141. DOI: 10.1155/2016/6495793.
- [82] P.-A. Clavien, H. Petrowsky, M. L. DeOliveira und R. Graf: **Strategies for Safer Liver Surgery and Partial Liver Transplantation.** In: *New England Journal of Medicine* 356.15 (2007), S. 1545–1559. ISSN: 1533–4406. DOI: 10.1056/nejmra065156.
- [83] A. A. Schnitzbauer, S. A. Lang, H. Goessmann, S. Nadalin, J. Baumgart, S. A. Farkas, S. Fichtner-Feigl, T. Lorf, A. Goralcyk, R. Hörbelt, A. Kroemer, M. Loss, P. Rümmele, M. N. Scherer, W. Padberg, A. Königsrainer, H. Lang, A. Obed und H. J. Schlitt: **Right Portal Vein Ligation Combined with in situ Splitting Induces Rapid Left Lateral Liver Lobe Hypertrophy Enabling 2-Staged Extended Right Hepatic Resection in Small-for-Size Settings.** In: *Annals of surgery* 255 (3 2012), S. 405–414. ISSN: 1528–1140. DOI: 10.1097/SLA.0b013e31824856f5.
- [84] E. de Santibañes und P.-A. Clavien: **Playing Play-Doh to Prevent Postoperative Liver Failure: the “ALPPS” Approach.** In: *Annals of surgery* 255 (3 2012), S. 415–417. ISSN: 1528–1140. DOI: 10.1097/SLA.0b013e318248577d.
- [85] E. Sparrelid, H. Johansson, S. Gilg, G. Nowak, E. Ellis und B. Isaksson: **Serial Assessment of Growth Factors Associated with Liver Regeneration in Patients Operated with Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy.** In: *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes* 59 (1–2 2018), S. 72–82. ISSN: 1421–9921. DOI: 10.1159/000488078.
- [86] K. Hasselgren, B. I. Røsok, P. N. Larsen, E. Sparrelid, G. Lindell, N. A. Schultz, B. A. Bjørneth, B. Isaksson, A. L. Larsson, M. Rizell, B. Björnsson und P. Sandström: **ALPPS Improves Survival Compared With TSH in Patients Affected of CRLM: Survival Analysis From the Randomized Controlled Trial LIGRO.** In: *Annals of surgery* 273 (3 2021), S. 442–448. ISSN: 1528–1140. DOI: 10.1097/SLA.0000000000003701.
- [87] X.-D. Wen und L. Xiao: **Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy in the treatment of colorectal cancer liver metastases.** In: *World Journal of Gastrointestinal Surgery* 13.8 (2021), S. 814–821. ISSN: 1948–9366. DOI: 10.4240/wjgs.v13.i8.814.
- [88] T. Budny, D. Palmes, U. Stratmann, E. Minin, H. Herbst und H.-U. Spiegel: **Morphologic features in the regenerating liver—a comparative intravital, lightmicroscopical and ultrastructural analysis with focus on hepatic stellate cells.** In: *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 451 (4 2007), S. 781–791. ISSN: 0945–6317. DOI: 10.1007/s00428-007-0472-x.
- [89] E. A. Pomfret, J. J. Pomposelli, F. D. Gordon, N. Erbay, L. L. Price, W. D. Lewis und R. L. Jenkins: **Liver Regeneration and Surgical Outcome in Donors of Right-lobe Liver Grafts.** In: *Transplantation* 76.(5) (2003), S. 5–10. ISSN: 0041–1337. DOI: 10.1097/01.tp.0000079064.08263.8e.
- [90] P. G. Kele, M. de Boer, E. J. van der Jagt, T. Lisman und R. J. Porte: **Early hepatic regeneration index and completeness of regeneration at 6 months after partial hepatectomy.** In: *British Journal of Surgery* 99 (2012), S. 1113–1119. ISSN: 0007–1323. DOI: 10.1002/bjs.8807.

- [91] S. Truant, O. Scatton, S. Dokmak, J.-M. Regimbeau, V. Lucidi, A. Laurent, R. Gauzolino, C. C. Benitez, A. Pequignot, V. Donckier et al. **Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy (ALPPS): impact of the inter-stages course on morbi-mortality and implications for management.** In: *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* 41.5 (2015), S. 674–682.
- [92] E. Schadde, M. Malagó, R. Hernandez-Alejandro, J. Li, E. Abdalla, V. Ardiles, G. Lurje, S. Vyas, M. A. Machado und E. de Santibañes: **Monosegment ALPPS Hepatectomy: extending resectability by rapid hypertrophy.** In: *Surgery* 157.4 (2015), S. 676–689.
- [93] M. de Santibañes, A. Dietrich, F. A. Alvarez, V. Ardiles, M. Loresi, M. D'adamo und E. de Santibañes: **Biological Substrate of the Rapid Volumetric Changes Observed in the Human Liver During the Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy Approach.** In: *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 20 (3 2016), S. 546–553. ISSN: 1873-4626. DOI: 10.1007/s11605-015-2982-1.
- [94] Z. Shi, F. He, M. Chen, L. Hua, W. Wang, S. Jiao und Z. Zhou: **DNA-binding mechanism of the Hippo pathway transcription factor TEAD4.** In: *Oncogene* 36 (30 2017), S. 4362–4369. ISSN: 1476–5594. DOI: 10.1038/onc.2017.24.
- [95] J. L. Grijalva, M. Huizenga, K. Mueller, S. Rodriguez, J. Brazzo, F. Camargo, G. Sadri-Vakili und K. Vakili: **Dynamic alterations in Hippo signaling pathway and YAP activation during liver regeneration.** In: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 307 (2014), G196–G204. ISSN: 0193–1857. DOI: 10.1152/ajpgi.00077.2014.
- [96] D. C. Madoff, B. C. Odisio, E. Schadde, R. C. Gaba, R. J. Bennink, T. M. van Gulik und B. Guiu: **Improving the Safety of Major Resection for Hepatobiliary Malignancy: Portal Vein Embolization and Recent Innovations in Liver Regeneration Strategies.** In: *Current oncology reports* 22 (6 2020), S. 59. ISSN: 1534–6269. DOI: 10.1007/s11912-020-00922-x.
- [97] X.-H. Feng und R. Derynck: **Specificity and Versatility in TGF- β Signaling Through Smads.** In: *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21.1 (2005), S. 659–693. ISSN: 1081–0706. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.21.022404.142018.
- [98] X. Dong, H. Yang, C. Li, Q. Liu, Q. Bai und Z. Zhang: **Triiodothyronine alleviates alcoholic liver disease injury through the negative regulation of the NLRP3 signaling pathway.** In: *Experimental and Therapeutic Medicine* (2018). ISSN: 1792–0981. DOI: 10.3892/etm.2018.6409.
- [99] L. Dollé, J. Best, J. Mei, F. A. Battah, H. Reynaert, L. A. van Grunsven und A. Geerts: **The quest for liver progenitor cells: A practical point of view.** In: *Journal of Hepatology* 52.1 (2010), S. 117–129. ISSN: 0168–8278. DOI: 10.1016/j.jhep.2009.10.009.
- [100] D. R. Dufour: **Assessment of Liver Fibrosis: Can Serum Become the Sample of Choice?** In: *Clinical Chemistry* 51.10 (2005), S. 1763–1764. ISSN: 0009–9147. DOI: 10.1373/clinchem.2005.056929.
- [101] H. Glantschnig, G. A. Rodan und A. A. Reszka: **Mapping of MST1 Kinase Sites of Phosphorylation. ACTIVATION AND AUTOPHOSPHORYLATION.** In: 277 (2002), S. 42987–42996. ISSN: 0021–9258. DOI: 10.1074/jbc.m208538200.
- [102] E. H. Y. Chan, M. Nousiainen, R. B. Chalamalasetty, A. Schäfer, E. A. Nigg und H. H. W. Silljé: **The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1.** In: 24 (2005), S. 2076–2086. ISSN: 0950–9232. DOI: 10.1038/sj.onc.1208445.
- [103] A. Hergovich, D. Schmitz und B. A. Hemmings: **The human tumour suppressor LATS1 is activated by human MOB1 at the membrane.** In: 345 (2006), S. 50–58. ISSN: 0006-291X. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.03.244.

- [104] J. C. Boggiano, P. J. Vanderzalm und R. G. Fehon: ***Tao-1 Phosphorylates Hippo/MST Kinases to Regulate the Hippo-Salvador-Warts Tumor Suppressor Pathway.*** In: 21 (2011), S. 888–895. ISSN: 1534–5807. DOI: 10.1016/j.devcel.2011.08.028.
- [105] C. L. C. Poon, J. I. Lin, X. Zhang und K. F. Harvey: ***The Sterile 20-like Kinase Tao-1 Controls Tissue Growth by Regulating the Salvador-Warts-Hippo Pathway.*** In: 21 (2011), S. 896–906. ISSN: 1534–5807. DOI: 10.1016/j.devcel.2011.09.012.
- [106] Z. Meng, T. Moroishi, V. Mottier-Pavie, S. W. Plouffe, C. G. Hansen, A. W. Hong, H. W. Park, J.-S. Mo, W. Lu, S. Lu, F. Flores, F.-X. Yu, G. Halder und K.-L. Guan: ***MAP4K family kinases act in parallel to MST1/2 to activate LATS1/2 in the Hippo pathway.*** In: 6 (2015). ISSN: 2041–1723. DOI: 10.1038/ncomms9357.
- [107] K. C. Lin, T. Moroishi, Z. Meng, H.-S. Jeong, S. W. Plouffe, Y. Sekido, J. Han, H. W. Park und K.-L. Guan: ***Regulation of Hippo pathway transcription factor TEAD by p38 MAPK-induced cytoplasmic translocation.*** In: *Nature cell biology* 19.8 (2017), S. 996–1002. DOI: 10.1038/ncb3581.
- [108] J. K. Holden und C. N. Cunningham: ***Targeting the Hippo Pathway and Cancer through the TEAD Family of Transcription Factors.*** In: *Cancers* 10 (2018), S. 81. ISSN: 2072–6694. DOI: 10.3390/cancers10030081.
- [109] L. Hong, Y. Cai, M. Jiang, D. Zhou und L. Chen: ***The Hippo signaling pathway in liver regeneration and tumorigenesis.*** In: 47 (2015), S. 46–52. ISSN: 1672–9145. DOI: 10.1093/abbs/gmu106.
- [110] S. Pelengaris, M. Khan und G. I. Evan: ***Suppression of Myc-induced apoptosis in β cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression.*** In: *Cell* 109 (3 2002), S. 321–334. ISSN: 0092–8674. DOI: 10.1016/s0092-8674(02)00738–9.
- [111] J. M. Lamar, P. Stern, H. Liu, J. W. Schindler, Z.-G. Jiang und R. O. Hynes: ***The Hippo pathway target, YAP, promotes metastasis through its TEAD-interaction domain.*** In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (37 2012), E2441–E2450. ISSN: 1091–6490. DOI: 10.1073/pnas.1212021109.
- [112] F.-X. Yu, B. Zhao und K.-L. Guan: ***Hippo pathway in organ size control, tissue homeostasis, and cancer.*** In: *Cell* 163.4 (2015), S. 811–828.
- [113] K. F. Harvey, X. Zhang und D. M. Thomas: ***The Hippo pathway and human cancer.*** In: *Nature Reviews Cancer* 13 (2013), S. 246–257. ISSN: 1474–175X. DOI: 10.1038/nrc3458.
- [114] K. Zhang, H.-X. Qi, Z.-M. Hu, Y.-N. Chang, Z.-M. Shi, X.-H. Han, Y.-W. Han, R.-X. Zhang, Z. Zhang, T. Chen und W. Hong: ***YAP and TAZ Take Center Stage in Cancer.*** In: *Biochemistry* 54 (43 2015), S. 6555–6566. ISSN: 1520–4995. DOI: 10.1021/acs.biochem.5b01014.
- [115] F. Zanconato, M. Cordenonsi und S. Piccolo: ***YAP/TAZ at the Roots of Cancer.*** In: *Cancer cell* 29 (6 2016), S. 783–803. ISSN: 1878–3686. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.05.005.
- [116] J. Wu, T. Liu, Z. Rios, Q. Mei, X. Lin und S. Cao: ***Heat Shock Proteins and Cancer.*** In: *Trends in pharmacological sciences* 38 (3 2017), S. 226–256. ISSN: 1873–3735. DOI: 10.1016/j.tips.2016.11.009.
- [117] H. Liu, S. Du, T. Lei, H. Wang, X. He, R. Tong und Y. Wang: ***Multifaceted regulation and functions of YAP/TAZ in tumors (Review).*** In: *Oncology reports* 40 (1 2018), S. 16–28. ISSN: 1791–2431. DOI: 10.3892/or.2018.6423.
- [118] A. M. Poma, L. Torregrossa, R. Bruno, F. Basolo und G. Fontanini: ***Hippo pathway affects survival of cancer patients: extensive analysis of TCGA data and review of literature.*** In: *Scientific reports* 8 (1 2018), S. 10623. ISSN: 2045–2322. DOI: 10.1038/s41598-018-28928-3.

- [119] M. Diepenbruck, L. Waldmeier, R. Ivanek, P. Berninger, P. Arnold, E. van Nimwegen und G. Christofori: ***Tead2 expression levels control the subcellular distribution of Yap and Taz, zyxin expression and epithelial-mesenchymal transition***. In: 127 (2014), S. 1523–1536. ISSN: 0021–9533. DOI: 10.1242/jcs.139865.
- [120] A. N. Lau, S. J. Curtis, C. M. Fillmore, S. P. Rowbotham, M. Mohseni, D. E. Wagner, A. M. Beede, D. T. Montoro, K. W. Sinkevicius, Z. E. Walton, J. Barrios, D. J. Weiss, F. D. Camargo, K.-K. Wong und C. F. Kim: ***Tumor-propagating cells and Yap/Taz activity contribute to lung tumor progression and metastasis***. In: 33 (2014), S. 468–481. ISSN: 0261–4189. DOI: 10.1002/embj.201386082.
- [121] F. Nallet-Staub, V. Marsaud, L. Li, C. Gilbert, S. Dodier, V. Bataille, M. Sudol, M. Herlyn und A. Mauviel: ***Pro-invasive activity of the Hippo pathway effectors YAP and TAZ in cutaneous melanoma***. In: *The Journal of investigative dermatology* 134 (12014), S. 123–132. ISSN: 1523–1747. DOI: 10.1038/jid.2013.319.
- [122] J. J. Gu, C. Rouse, X. Xu, J. Wang, M. W. Onaitis und A. M. Pendergast: ***Inactivation of ABL kinases suppresses non-small cell lung cancer metastasis***. In: 1 (2016). ISSN: 2379–3708. DOI: 10.1172/jci.insight.89647.
- [123] Y. Liu, G. Wang, Y. Yang, Z. Mei, Z. Liang, A. Cui, T. Wu, C.-Y. Liu und L. Cui: ***Increased TEAD4 expression and nuclear localization in colorectal cancer promote epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a YAP-independent manner***. In: *Oncogene* 35.21 (2016), S. 2789–2800. ISSN: 0950–9232. DOI: 10.1038/onc.2015.342.
- [124] Z. Zhou, J.-S. Zhu, C.-P. Gao, L.-P. Li, C. Zhou, H. Wang und X.-G. Liu: ***siRNA targeting YAP gene inhibits gastric carcinoma growth and tumor metastasis in SCID mice***. In: 11 (2016), S. 2806–2814. ISSN: 1792–1074. DOI: 10.3892/o1.2016.4319.
- [125] S. Han, D. Wang, G. Tang, X. Yang, C. Jiao, R. Yang, Y. Zhang, L. Huo, Z. Shao, Z. Lu, J. Zhang und X. Li: ***Suppression of miR-16 promotes tumor growth and metastasis through reversely regulating YAP1 in human cholangiocarcinoma***. In: *Oncotarget* 8 (34 2017), S. 56635–56650. ISSN: 1949–2553. DOI: 10.18632/oncotarget.17832.
- [126] T. Kim, D. Hwang, D. Lee, J.-H. Kim, S.-Y. Kim und D.-S. Lim: ***MRTF potentiates TEAD-YAP transcriptional activity causing metastasis***. In: 36 (2017), S. 520–535. ISSN: 0261–4189. DOI: 10.15252/embj.201695137.
- [127] C. Li, S. Wang, Z. Xing, A. Lin, K. Liang, J. Song, Q. Hu, J. Yao, Z. Chen, P. K. Park, D. H. Hawke, J. Zhou, Y. Zhou, S. Zhang, H. Liang, M.-C. Hung, G. E. Gallick, L. Han, C. Lin und L. Yang: ***A ROR1-HER3-lncRNA signalling axis modulates the Hippo-YAP pathway to regulate bone metastasis***. In: 19 (2017), S. 106–119. ISSN: 1465–7392. DOI: 10.1038/ncb3464.
- [128] Y. Qiao, J. Chen, Y. B. Lim, M. L. Finch-Edmondson, V. P. Seshachalam, L. Qin, T. Jiang, B. C. Low, H. Singh, C. T. Lim und M. Sudol: ***YAP Regulates Actin Dynamics through ARHGAP29 and Promotes Metastasis***. In: 19 (2017), S. 1495–1502. ISSN: 2211–1247. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.04.075.
- [129] J. Liu, L. Ye, Q. Li, X. Wu, B. Wang, Y. Ouyang, Z. Yuan, J. Li und C. Lin: ***Synaptopodin-2 suppresses metastasis of triple-negative breast cancer via inhibition of YAP/TAZ activity. SYNPO2 suppresses TNBC metastasis***. In: 244 (2018), S. 71–83. ISSN: 0022–3417. DOI: 10.1002/path.4995.
- [130] T. Wang, B. Mao, C. Cheng, Z. Zou, J. Gao, Y. Yang, T. Lei, X. Qi, Z. Yuan, W. Xu und Z. Lu: ***YAP promotes breast cancer metastasis by repressing growth differentiation factor-15***. In: 1864 (2018), S. 1744–1753. ISSN: 0925–4439. DOI: 10.1016/j.bbadis.2018.02.020.

- [131] R. Drexler, M. Küchler, K. C. Wagner, T. Reese, B. Feyerabend, M. Kleine und K. J. Oldhafer: ***The Clinical Relevance of the Hippo Pathway in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.*** In: *Journal of cancer research and clinical oncology* (2020). ISSN: 1432–1335. DOI: 10.1007/s00432-020-03427-z.
- [132] W. Zhang, N. Nandakumar, Y. Shi, M. Manzano, A. Smith, G. Graham, S. Gupta, E. E. Vietsch, S. Z. Laughlin, M. Wadhwa, M. Chetram, M. Joshi, F. Wang, B. Kallakury, J. Toretsky, A. Wellstein und C. Yi: ***Downstream of Mutant KRAS, the Transcription Regulator YAP Is Essential for Neoplastic Progression to Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.*** In: 7 (2014), ra42–ra42. ISSN: 1945–0877. DOI: 10.1126/scisignal.2005049.
- [133] D. Xie, J. Cui, T. Xia, Z. Jia, L. Wang, W. Wei, A. Zhu, Y. Gao, K. Xie und M. Quan: ***Hippo transducer TAZ promotes epithelial mesenchymal transition and supports pancreatic cancer progression.*** In: 6 (2015), S. 35949–35963. ISSN: 1949–2553. DOI: 10.18632/oncotarget.5772.
- [134] M. Chen, M. Wang, S. Xu, X. Guo und J. Jiang: ***Upregulation of miR-181c contributes to chemoresistance in pancreatic cancer by inactivating the Hippo signaling pathway.*** In: 6 (2015), S. 44466–44479. ISSN: 1949–2553. DOI: 10.18632/oncotarget.6298.
- [135] M. T. Salcedo-Allende, J. Zeron-Medina, J. Hernandez, T. Macarulla, J. Balsells, X. Merino, H. Allende, J. Tabernero und S. R. y Cajal Agüeras: ***Overexpression of Yes Associated Protein 1, an Independent Prognostic Marker in Patients With Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, Correlated With Liver Metastasis and Poor Prognosis.*** In: 46 (2017), S. 913–920. ISSN: 0885–3177. DOI: 10.1097/mpa.0000000000000867.
- [136] P. Jacquemin, J. J. Hwang, J. A. Martial, P. Dollé und I. Davidson: ***A novel family of developmentally regulated mammalian transcription factors containing the TEA/ATTS DNA binding domain.*** In: *The Journal of biological chemistry* 271 (36 1996), S. 21775–21785. ISSN: 0021–9258. DOI: 10.1074/jbc.271.36.21775.
- [137] A. Azakie, S. B. Larkin, I. K. Farrance, G. Grenningloh und C. P. Ordahl: ***DTEF-1, a novel member of the transcription enhancer factor-1 (TEF-1) multigene family.*** In: *The Journal of biological chemistry* 271 (14 1996), S. 8260–8265. ISSN: 0021–9258. DOI: 10.1074/jbc.271.14.8260.
- [138] P. Jacquemin, J. A. Martial und I. Davidson: ***Human TEF-5 is preferentially expressed in placenta and binds to multiple functional elements of the human chorionic somatomammotropin-B gene enhancer.*** In: *The Journal of biological chemistry* 272 (20 1997), S. 12928–12937. ISSN: 0021–9258. DOI: 10.1074/jbc.272.20.12928.
- [139] A. Anbanandam, D. C. Albarado, C. T. Nguyen, G. Halder, X. Gao und S. Veeraraghavan: ***Insights into transcription enhancer factor 1 (TEF-1) activity from the solution structure of the TEA domain.*** In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (46 2006), S. 17225–17230. ISSN: 0027–8424. DOI: 10.1073/pnas.0607171103.
- [140] K. J. Kaneko, M. J. Kohn, C. Liu und M. L. DePamphilis: ***Transcription factor TEAD2 is involved in neural tube closure.*** In: *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 45 (9 2007), S. 577–587. ISSN: 1526–954X. DOI: 10.1002/dvg.20330.
- [141] F. Gibault, M. Sturbaut, F. Bailly, P. Melnyk und P. Cotellet: ***Targeting Transcriptional Enhanced Associate Domains (TEADs): Miniperspective.*** In: *Journal of Medicinal Chemistry* 61.12 (2017), S. 5057–5072. ISSN: 1520–4804. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00879.
- [142] A. Vassilev, K. J. Kaneko, H. Shu, Y. Zhao und M. L. DePamphilis: ***TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm.*** In: *Genes & Development* 15.10 (2001), S. 1229–1241. ISSN: 1549–5477. DOI: 10.1101/gad.888601.

- [143] J. H. Xiao, I. Davidson, H. Matthes, J.-M. Garnier und P. Chambon: ***Cloning, expression, and transcriptional properties of the human enhancer factor TEF-1***. In: *Cell* 65 (1991), S. 551–568. ISSN: 0092–8674. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90088-g.
- [144] H. Huh, D. Kim, H.-S. Jeong und H. Park: ***Regulation of TEAD Transcription Factors in Cancer Biology***. In: *Cells* 8 (2019), S. 600. ISSN: 2073–4409. DOI: 10.3390/cells8060600.
- [145] H. Zhang, C.-Y. Liu, Z.-Y. Zha, B. Zhao, J. Yao, S. Zhao, Y. Xiong, Q.-Y. Lei und K.-L. Guan: ***TEAD transcription factors mediate the function of TAZ in cell growth and epithelial-mesenchymal transition***. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (20 2009), S. 13355–13362. ISSN: 0021–9258. DOI: 10.1074/jbc.M900843200.
- [146] A. Benhaddou, C. Keime, T. Ye, A. Morlon, I. Michel, B. Jost, G. Mengus und I. Davidson: ***Transcription factor TEAD4 regulates expression of myogenin and the unfolded protein response genes during C2C12 cell differentiation***. In: *Cell death and differentiation* 19 (2 2012), S. 220–231. ISSN: 1476–5403. DOI: 10.1038/cdd.2011.87.
- [147] X. Liu, D. Zhao, L. James, J. Li und H. Zeng: ***Requirement of the nuclear localization of transcription enhancer factor 3 for proliferation, migration, tube formation, and angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor***. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25 (4 2011), S. 1188–1197. ISSN: 1530–6860. DOI: 10.1096/fj.10-167619.
- [148] P. Home, B. Saha, S. Ray, D. Dutta, S. Gunewardena, B. Yoo, A. Pal, J. L. Vivian, M. Larson, M. Petroff, P. G. Gallagher, V. P. Schulz, K. L. White, T. G. Golos, B. Behr und S. Paul: ***Altered subcellular localization of transcription factor TEAD4 regulates first mammalian cell lineage commitment***. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.19 (2012), S. 7362–7367. ISSN: 1091–6490. DOI: 10.1073/pnas.1201595109.
- [149] Z. Chen, G. A. Friedrich und P. Soriano: ***Transcriptional enhancer factor 1 disruption by a retroviral gene trap leads to heart defects and embryonic lethality in mice***. In: *Genes & development* 8 (19 1994), S. 2293–2301. ISSN: 0890–9369. DOI: 10.1101/gad.8.19.2293.
- [150] R. Yagi, M. J. Kohn, I. Karavanova, K. J. Kaneko, D. Vullhorst, M. L. DePamphilis und A. Buonanno: ***Transcription factor TEAD4 specifies the trophoctoderm lineage at the beginning of mammalian development***. In: *Development (Cambridge, England)* 134 (21 2007), S. 3827–3836. ISSN: 0950–1991. DOI: 10.1242/dev.010223.
- [151] A. Sawada, H. Kiyonari, K. Ukita, N. Nishioka, Y. Imuta und H. Sasaki: ***Redundant roles of Tead1 and Tead2 in notochord development and the regulation of cell proliferation and survival***. In: *Molecular and cellular biology* 28 (10 2008), S. 3177–3189. ISSN: 1098-5549. DOI: 10.1128/MCB.01759-07.
- [152] R. Johnson und G. Halder: ***The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment***. In: *Nature reviews. Drug discovery* 13 (1 2014), S. 63–79. ISSN: 1474–1784. DOI: 10.1038/nrd4161.
- [153] J.-S. Mo, H. W. Park und K.-L. Guan: ***The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer***. In: 15 (2014), S. 642–656. ISSN: 1469–221X. DOI: 10.15252/embr.201438638.
- [154] B. Zhao, X. Ye, J. Yu, L. Li, W. Li, S. Li, J. Yu, J. D. Lin, C.-Y. Wang, A. M. Chinnaiyan, Z.-C. Lai und K.-L. Guan: ***TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control***. In: *Genes & evelopment* 22 (14 2008), S. 1962–1971. ISSN: 0890–9369. DOI: 10.1101/gad.1664408.

- [155] Q.-Y. Lei, H. Zhang, B. Zhao, Z.-Y. Zha, F. Bai, X.-H. Pei, S. Zhao, Y. Xiong und K.-L. Guan: **TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway.** In: *Molecular and cellular biology* 28 (7 2008), S. 2426–2436. ISSN: 1098–5549. DOI: 10.1128/MCB.01874–07.
- [156] D. Lai, K. C. Ho, Y. Hao und X. Yang: **Taxol resistance in breast cancer cells is mediated by the hippo pathway component TAZ and its downstream transcriptional targets Cyr61 and CTGF.** In: *Cancer research* 71 (7 2011), S. 2728–2738. ISSN: 1538–7445. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2711.
- [157] O. Guillermin, N. Angelis, C. M. Sidor, R. Ridgway, A. Baulies, A. Kucharska, P. Antas, M. R. Rose, J. Cordero, O. Sansom, V. S. W. Li und B. J. Thompson: **Wnt and Src signals converge on YAP-TEAD to drive intestinal regeneration.** In: *The EMBO journal* 40.13 (13 2021), e105770. ISSN: 1460–2075. DOI: 10.15252/embj.2020105770.
- [158] H.-H. Chen, T. Maeda, S. J. Mullett und A. F. R. Stewart: **Transcription cofactor Vgl-2 is required for skeletal muscle differentiation.** In: *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 39 (4 2004), S. 273–279. ISSN: 1526–954X. DOI: 10.1002/gene.20055.
- [159] H.-H. Chen, S. J. Mullett und A. F. R. Stewart: **Vgl-4, a novel member of the vestigial-like family of transcription cofactors, regulates α 1-adrenergic activation of gene expression in cardiac myocytes.** In: *The Journal of biological chemistry* 279 (29 2004), S. 30800–30806. ISSN: 0021–9258. DOI: 10.1074/jbc.M400154200.
- [160] S. Günther, M. Mielcarek, M. Krüger und T. Braun: **VITO-1 is an essential cofactor of TEF1-dependent muscle-specific gene regulation.** In: *Nucleic acids research* 32 (2 2004), S. 791–802. ISSN: 1362–4962. DOI: 10.1093/nar/gkh248.
- [161] L. M. Koontz, Y. Liu-Chittenden, F. Yin, Y. Zheng, J. Yu, B. Huang, Q. Chen, S. Wu und D. Pan: **The Hippo effector Yorkie controls normal tissue growth by antagonizing scalloped-mediated default repression.** In: *Developmental cell* 25 (4 2013), S. 388–401. ISSN: 1878–1551. DOI: 10.1016/j.devcel.2013.04.021.
- [162] A. V. Pobbati, S. W. Chan, I. Lee, H. Song und W. Hong: **Structural and functional similarity between the Vgll1-TEAD and the YAP-TEAD complexes.** In: *Structure (London, England : 1993)* 20 (7 2012), S. 1135–1140. ISSN: 1878–4186. DOI: 10.1016/j.str.2012.04.004.
- [163] S. Jiao, H. Wang, Z. Shi, A. Dong, W. Zhang, X. Song, F. He, Y. Wang, Z. Zhang, W. Wang, X. Wang, T. Guo, P. Li, Y. Zhao, H. Ji, L. Zhang und Z. Zhou: **A peptide mimicking VGLL4 function acts as a YAP antagonist therapy against gastric cancer.** In: *Cancer cell* 25 (2 2014), S. 166–180. ISSN: 1878–3686. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.01.010.
- [164] K. C. Lin, H. W. Park und K.-L. Guan: **Regulation of the Hippo Pathway Transcription Factor TEAD.** In: *Trends Biochem Sci.* 42.11 (2017), S. 862–872. ISSN: 0968–0004. DOI: 10.1016/j.tibs.2017.09.003.
- [165] S. Jiao, C. Li, Q. Hao, H. Miao, L. Zhang, L. Li und Z. Zhou: **VGLL4 targets a TCF4-TEAD4 complex to coregulate Wnt and Hippo signalling in colorectal cancer.** In: *Nature communications* 8 (2017), S. 14058. ISSN: 2041–1723. DOI: 10.1038/ncomms14058.
- [166] B. Belandia und M. G. Parker: **Functional interaction between the p160 coactivator proteins and the transcriptional enhancer factor family of transcription factors.** In: *The Journal of biological chemistry* 275 (40 2000), S. 30801–30805. ISSN: 0021–9258. DOI: 10.1074/jbc.C000484200.
- [167] F. Zanconato, M. Forcato, G. Battilana, L. Azzolin, E. Quaranta, B. Bodega, A. Rosato, S. Bicciato, M. Cordenonsi und S. Piccolo: **Genome-Wide Association Between YAP/TAZ/TEAD and AP-1 at Enhancers Drives Oncogenic Growth.** In: *Nature cell biology* 17 (9 2015), S. 1218–1227. ISSN: 1476–4679. DOI: 10.1038/ncb3216.

- [168] M. Cargnello und P. P. Roux: **Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases.** In: *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 75 (1 2011), S. 50–83. ISSN: 1098–5557. DOI: 10.1128/MMBR.00031–10.
- [169] R. Ben-Levy, S. Hooper, R. Wilson, H. F. Paterson und C. J. Marshall: **Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2.** In: *Current biology* : CB 8 (19 1998), S. 1049–1057. ISSN: 0960–9822. DOI: 10.1016/s0960-9822(98)70442-7.
- [170] R. Drexler, R. Fahy, M. Küchler, K. C. Wagner, T. Reese, M. Ehmke, B. Feyerabend, M. Kleine und K. J. Oldhafer: **Association of Subcellular Localization of TEAD Transcription Factors with Outcome and Progression in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.** In: *Pancreatology* : Off J Int Ass Pancreatol (IAP) 1 (2021), S. 170–179. ISSN: 1424–3911. DOI: 10.1016/j.pan.2020.12.003.
- [171] M. P. Gupta, P. Kogut und M. Gupta: **Protein kinase-A dependent phosphorylation of transcription enhancer factor-1 represses its DNA-binding activity but enhances its gene activation ability.** In: *Nucleic Acids Research* 28.16 (2000), S. 3168–3177. ISSN: 1362–4962. DOI: 10.1093/nar/28.16.3168.
- [172] S.-W. Jiang, M. Dong, M. A. Trujillo, L. J. Miller und N. L. Eberhardt: **DNA Binding of TEA/ATTS Domain Factors Is Regulated by Protein Kinase C Phosphorylation in Human Choriocarcinoma Cells.** In: *Journal of Biological Chemistry* 276.26 (2001), S. 23464–23470. ISSN: 0021–9258. DOI: 10.1074/jbc.m010934200.
- [173] H. Kwon, J. Kim und E.-H. Jho: **Role of the Hippo pathway and mechanisms for controlling cellular localization of YAP/TAZ.** In: *The FEBS journal* 19 (2022), S. 5798–5818. ISSN: 1742–4658. DOI: 10.1111/febs.16091.
- [174] A. Fernandez-L, P. A. Northcott, J. Dalton, C. Fraga, D. Ellison, S. Angers, M. D. Taylor und A. M. Kenney: **YAP1 is amplified and up-regulated in hedgehog-associated medulloblastomas and mediates Sonic hedgehog-driven neural precursor proliferation.** In: *Genes & Development* 23.23 (2009), S. 2729–2741. ISSN: 1549–5477. DOI: 10.1101/gad.1824509.
- [175] W. Zhang, Y. Gao, P. Li, Z. Shi, T. Guo, F. Li, X. Han, Y. Feng, C. Zheng, Z. Wang, F. Li, H. Chen, Z. Zhou, L. Zhang und H. Ji: **VGLL4 functions as a new tumor suppressor in lung cancer by negatively regulating the YAP-TEAD transcriptional complex.** In: *Cell Research* 24.3 (2014), S. 331–343. ISSN: 1001–0602. DOI: 10.1038/cr.2014.10.
- [176] C. Wang, Z. Nie, Z. Zhou, H. Zhang, R. Liu, J. Wu, J. Qin, Y. Ma, L. Chen, S. Li, W. Chen, F. Li, P. Shi, Y. Wu, J. Shen und C. Chen: **The interplay between TEAD4 and KLF5 promotes breast cancer partially through inhibiting the transcription of *p27^{Kip1}*.** In: *Oncotarget* 6.19 (2015), S. 17685–17697. ISSN: 1949–2553. DOI: 10.18632/oncotarget.3779.
- [177] Q. Xie, J. Chen, H. Feng, S. Peng, U. Adams, Y. Bai, L. Huang, J. Li, J. Huang, S. Meng und Z. Yuan: **YAP/TEAD-mediated transcription controls cellular senescence.** In: *Cancer research* 73 (12 2013), S. 3615–3624. ISSN: 1538–7445. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3793.
- [178] W. Han, E.-M. Jung, J. Cho, J. W. Lee, K.-T. Hwang, S.-J. Yang, J. J. Kang, J.-Y. Bae, Y. K. Jeon, I.-A. Park, M. Nicolau, S. S. Jeffrey und D.-Y. Noh: **DNA copy number alterations and expression of relevant genes in triple-negative breast cancer.** In: *Genes, Chromosomes and Cancer* 47.6 (2008), S. 490–499. ISSN: 1045–2257. DOI: 10.1002/gcc.20550.
- [179] E. Rozengurt, J. Sinnett-Smith und G. Eibl: **Yes-associated protein (YAP) in pancreatic cancer: at the epicenter of a targetable signaling network associated with patient survival.** In: *Signal Transduction and Targeted Therapy* 3.1 (2018). ISSN: 2059–3635. DOI: 10.1038/s41392-017-0005-2.

- [180] P.-D. Guo, X.-X. Lu, W.-J. Gan, X.-M. Li, X.-S. He, S. Zhang, Q.-H. Ji, F. Zhou, Y. Cao, J.-R. Wang, J.-M. Li und H. Wu: ***RAR γ Downregulation Contributes to Colorectal Tumorigenesis and Metastasis by Derepressing the Hippo-Yap Pathway***. In: *Cancer Research* 76.13 (2016), S. 3813–3825. ISSN: 0008–5472. DOI: 10.1158/0008-5472.can-15-2882.
- [181] H. Wei, F. Wang, Y. Wang, T. Li, P. Xiu, J. Zhong, X. Sun und J. Li: ***Verteporfin Suppresses Cell Survival, Angiogenesis and Vasculogenic Mimicry of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma via Disrupting the YAP-TEAD Complex***. In: *Cancer Science* 108.3 (2017), S. 478–487. ISSN: 1349–7006. DOI: 10.1111/cas.13138.
- [182] Q. Zhou, M. Bauden, R. Andersson, D. Hu, G. Marko-Varga, J. Xu, A. Sasor, H. Dai, K. Pawłowski, K. Said Hilmerisson, X. Chen und D. Ansari: ***YAP1 is an independent prognostic marker in pancreatic cancer and associated with extracellular matrix remodeling***. In: *Journal of Translational Medicine* 18.1 (2020). ISSN: 1479–5876. DOI: 10.1186/s12967-020-02254-7.
- [183] W. Yoo, J. Lee, E. Jun, H. N. Kyung, S. Lee, D. Jung, H. J. Kwang, J. Kim, Y. Park, S. C. Kim und S. Kim: ***The YAP1-NMU Axis Is Associated with Pancreatic Cancer Progression and Poor Outcome: Identification of a Novel Diagnostic Biomarker and Therapeutic Target***. In: *Cancers* 11.10 (2019), S. 1477. ISSN: 2072–6694. DOI: 10.3390/cancers11101477.
- [184] I. Cebola, S. A. Rodríguez-Seguí, C. H.-H. Cho, J. Bessa, M. Rovira, M. Luengo, M. Chhatrivala, A. Berry, J. Ponsa-Cobas, M. A. Maestro, R. E. Jennings, L. Pasquali, I. Morán, N. Castro, N. A. Hanley, J. L. Gomez-Skarmeta, L. Vallier und J. Ferrer: ***TEAD and YAP regulate the enhancer network of human embryonic pancreatic progenitors***. In: *Nature Cell Biology* 17.5 (2015), S. 615–626. ISSN: 1465–7392. DOI: 10.1038/ncb3160.
- [185] M. Küchler, M. Ehmke, K. Jaquet, P. Wohlmuth, J. M. Feldhege, T. Reese, T. Hartmann, R. Drexler, T. Huber, T. Burmester und K. J. Oldhafer: ***Transcription enhanced associate domain factor 1 (TEAD1) predicts liver regeneration outcome of ALPPS-treated patients***. In: *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 27 (4 2025), S. 470–479. ISSN: 1477–2574. DOI: 10.1016/j.hpb.2024.12.007.
- [186] H. J. J. van Rensburg und X. Yang: ***The roles of the Hippo pathway in cancer metastasis***. In: *Cellular Signalling* 28.11 (2016), S. 1761–1772. ISSN: 0898–6568. DOI: 10.1016/j.cellsig.2016.08.004.
- [187] Y. Han: ***Analysis of the role of the Hippo pathway in cancer***. In: *Journal of Translational Medicine* 17 (2019). ISSN: 1479–5876. DOI: 10.1186/s12967-019-1869-4.
- [188] T. Moroishi, C. G. Hansen und K.-L. Guan: ***The emerging roles of YAP and TAZ in cancer***. In: *Nature Reviews Cancer* 15.2 (2015), S. 73–79. ISSN: 1474–175X. DOI: 10.1038/nrc3876.
- [189] A. L. Zygulska, K. Krzemieniecki und P. Pierzchalski: ***Hippo pathway - brief overview of its relevance in cancer***. In: *JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY* 68.3 (2017), S. 311–335. eprint: 28820389.
- [190] S. Yang, L. Zhang, V. Purohit, S. K. Shukla, X. Chen, F. Yu, K. Fu, Y. Chen, J. Solheim, P. K. Singh, W. Song und J. Dong: ***Active YAP promotes pancreatic cancer cell motility, invasion and tumorigenesis in a mitotic phosphorylation-dependent manner through LPAR3***. In: *Oncotarget* 6.34 (2015), S. 36019–36031. ISSN: 1949–2553. DOI: 10.18632/oncotarget.5935.
- [191] C. H. Diep, K. M. Zucker, G. Hostetter, A. Watanabe, C. Hu, R. M. Munoz, D. D. V. Hoff und H. Han: ***Down-Regulation of Yes Associated Protein 1 Expression Reduces Cell Proliferation and Clonogenicity of Pancreatic Cancer Cells***. In: *PLoS ONE* 7.3 (2012), e32783. ISSN: 1932–6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0032783.

- [192] A. Kapoor, W. Yao, H. Ying, S. Hua, A. Liewen, Q. Wang, Y. Zhong, C.-J. Wu, A. Sadanandam, B. Hu, Q. Chang, G. C. Chu, R. Al-Khalil, S. Jiang, H. Xia, E. Fletcher-Sananikone, C. Lim, G. I. Horwitz, A. Viale, P. Pettazzoni, N. Sanchez, H. Wang, A. Protopopov, J. Zhang, T. Heffernan, R. L. Johnson, L. Chin, Y. A. Wang, G. Draetta und R. A. DePinho: ***Yap1 Activation Enables Bypass of Oncogenic Kras Addiction in Pancreatic Cancer***. In: *Cell* 158.1 (2014), S. 185–197. ISSN: 0092–8674. DOI: 10.1016/j.cell.2014.06.003.
- [193] D. Yang, S. Möbus, A. Balakrishnan und A. D. Sharma: „MicroRNAs in Liver Regeneration“. In: Hrsg. von C. K. Sen. Academic Press imprint of Elsevier 32 Jamestown Road, London NW1 7BY, UK 525 B Street, Suite 1800, San Diego, CA 92101–4495, USA 225 Wyman Street, Waltham, MA 02451, USA The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GB, UK: Academic Press, 2015. Kap. 36, S. 943–965. ISBN: 978–0–12–405544–5. DOI: 10.1016/b978-0-12-405544-5.00036-8.
- [194] Y. Yuan, D. Li, H. Li, L. Wang, G. Tian und Y. Dong: ***YAP overexpression promotes the epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in pancreatic cancer cells***. In: *Molecular Medicine Reports* 13.1 (2016), S. 237–242. ISSN: 1791–2997. DOI: 10.3892/mmr.2015.4550.
- [195] J. S. A. Warren, Y. Xiao und J. M. Lamar: ***YAP/TAZ Activation as a Target for Treating Metastatic Cancer***. In: *Cancers* 10.4 (2018), S. 115. ISSN: 2072–6694. DOI: 10.3390/cancers10040115. URL: <http://www.mdpi.com/2072-6694/10/4/115>.
- [196] L. Wu und X. Yang: ***Targeting the Hippo Pathway for Breast Cancer Therapy***. In: *Cancers* 10.11 (2018), S. 422. ISSN: 2072–6694. DOI: 10.3390/cancers10110422. URL: <https://www.mdpi.com/2072-6694/10/11/422>.
- [197] Y. Liu-Chittenden, B. Huang, J. S. Shim, Q. Chen, S.-J. Lee, R. A. Anders, J. O. Liu und D. Pan: ***Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP***. In: *Genes & Development* 26.12 (2012), S. 1300–1305. ISSN: 0890–9369. DOI: 10.1101/gad.192856.112.
- [198] H. Zhang, S. K. Ramakrishnan, D. Triner, B. Centofanti, D. Maitra, B. Györfy, J. S. Sebolt-Leopold, M. K. Dame, J. Varani, D. E. Brenner, E. R. Fearon, M. B. Omary und Y. M. Shah: ***Tumor-selective proteotoxicity of verteporfin inhibits colon cancer progression independently of YAP1***. In: *Science Signaling* 8.397 (2015). ISSN: 1945–0877. DOI: 10.1126/scisignal.aac5418.
- [199] E. K. Konstantinou, S. Notomi, C. Kosmidou, K. Brodowska, A. Al-Moujahed, F. Nicolaou, P. Tsoka, E. Gragoudas, J. W. Miller, L. H. Young und D. G. Vavvas: ***Verteporfin-induced formation of protein cross-linked oligomers and high molecular weight complexes is mediated by light and leads to cell toxicity***. In: *Scientific Reports* 7.1 (2017). ISSN: 2045–2322. DOI: 10.1038/srep46581.
- [200] J. F. Knight, C. J. Shepherd, S. Rizzo, D. Brewer, S. Jhavar, A. R. Dodson, C. S. Cooper, R. Eeles, A. Falconer, G. Kovacs, M. D. Garrett, A. R. Norman, J. Shipley und D. L. Hudson: ***TEAD1 and c-Cbl are novel prostate basal cell markers that correlate with poor clinical outcome in prostate cancer***. In: *British Journal of Cancer* 99.11 (2008), S. 1849–1858. ISSN: 0007–0920. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604774.
- [201] K. Liang, G. Zhou, Q. Zhang, J. Li und C. Zhang: ***Expression of hippo pathway in colorectal cancer***. In: *The Saudi Journal of Gastroenterology* 20.3 (2014), S. 188–194. ISSN: 1998–4049. DOI: 10.4103/1319–3767.133025. URL: <http://www.saudijgastro.com/article.asp?issn=1319-3767;year=2014;volume=20;issue=3;spage=188;epage=194;aualast=Liang>.

- [202] Y. Zhou, T. Huang, J. Zhang, C. C. Wong, B. Zhang, Y. Dong, F. Wu, J. H. M. Tong, W. K. K. Wu, A. S. L. Cheng, J. Yu, W. Kang und K. F. To: ***TEAD1/4 exerts oncogenic role and is negatively regulated by miR-4269 in gastric tumorigenesis***. In: *Oncogene* 36.47 (2017), S. 6518–6530. ISSN: 0950–9232. DOI: 10.1038/onc.2017.257.
- [203] G.-X. Zhou, X.-Y. Li, Q. Zhang, K. Zhao, C.-P. Zhang, C.-H. Xue, K. Yang und Z.-B. Tian: ***Effects of the Hippo Signaling Pathway in Human Gastric Cancer***. In: *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 14.9 (2013), S. 5199–5205. ISSN: 1513–7368. DOI: 10.7314/apjcp.2013.14.9.5199.
- [204] Z. Cao, L. An, Y. Han, S. Jiao und Z. Zhou: ***The Hippo signaling pathway in gastric cancer***. In: *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* (2023). ISSN: 1672–9145. DOI: 10.3724/abbs.2023038.
- [205] S. Hishinuma, Y. Ogata, M. Tomikawa, I. Ozawa, K. Hirabayashi und S. Igarashi: ***Patterns of Recurrence After Curative Resection of Pancreatic Cancer, Based on Autopsy Findings***. In: *Journal of Gastrointestinal Surgery* 10.4 (2006), S. 511–518. ISSN: 1091–255X. DOI: 10.1016/j.gassur.2005.09.016.
- [206] M. Overholtzer, J. Zhang, G. A. Smolen, B. Muir, W. Li, D. C. Sgroi, C.-X. Deng, J. S. Brugge und D. A. Haber: ***Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon***. In: *Proceedings of the National Academy of Science* 103.33 (2006), S. 12405–12410. DOI: 10.1073/pnas.0605579103. URL: <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/2006PNAS..103124050>.
- [207] D. Chen, Y. Sun, Y. Wei, P. Zhang, A. H. Rezaeian, J. Teruya-Feldstein, S. Gupta, H. Liang, H.-K. Lin, M.-C. Hung und L. Ma: ***LIFR is a breast cancer metastasis suppressor upstream of the Hippo-YAP pathway and a prognostic marker***. In: *Nature Medicine* 18.10 (2012), S. 1511–1517. ISSN: 1078–8956. DOI: 10.1038/nm.2940.
- [208] N. Li und J. Hua: ***Immune cells in liver regeneration***. In: *Oncotarget* 8 (2 2017), S. 3628–3639. ISSN: 1949–2553. DOI: 10.18632/oncotarget.12275.
- [209] E. E. Er, M. Valiente, K. Ganesh, Y. Zou, S. Agrawal, J. Hu, B. Griscom, M. Rosenblum, A. Boire, E. Brogi, F. G. Giancotti, M. Schachner, S. Malladi und J. Massagué: ***Author Correction: Pericyte-like spreading by disseminated cancer cells activates YAP and MRTF for metastatic colonization***. In: *Nature Cell Biology* 21.3 (2019), S. 408–408. ISSN: 1465–7392. DOI: 10.1038/s41556-018-0257-2.
- [210] D. Ansari, H. Ohlsson, C. Althini, M. Bauden, Q. Zhou, D. Hu und R. Andersson: ***The Hippo Signaling Pathway in Pancreatic Cancer***. In: *Anticancer Research* 39.7 (2019), S. 3317–3321. ISSN: 0250–7005. DOI: 10.21873/anticancer.13474.
- [211] J.-Y. Tang, C.-Y. Yu, Y.-J. Bao, L. Chen, J. Chen, S.-L. Yang, H.-Y. Chen, J. Hong und J.-Y. Fang: ***TEAD4 promotes colorectal tumorigenesis via transcriptionally targeting YAP1***. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 17 (1 2018), S. 102–109. ISSN: 1551–4005. DOI: 10.1080/15384101.2017.1403687.
- [212] L. Azzolin, F. Zanconato, S. Bresolin, M. Forcato, G. Basso, S. Bicciato, M. Cordenonsi und S. Piccolo: ***Role of TAZ as mediator of Wnt signaling***. In: *Cell* 151 (7 2012), S. 1443–1456. ISSN: 1097–4172. DOI: 10.1016/j.cell.2012.11.027.
- [213] L. Azzolin, T. Panciera, S. Soligo, E. Enzo, S. Bicciato, S. Dupont, S. Bresolin, C. Frasson, G. Basso, V. Guzzardo, A. Fassina, M. Cordenonsi und S. Piccolo: ***YAP/TAZ Incorporation in the β -Catenin Destruction Complex Orchestrates the Wnt Response***. In: *Cell* 158 (1 2014), S. 157–170. ISSN: 1097–4172. DOI: 10.1016/j.cell.2014.06.013.

- [214] J. Cai, A. Maitra, R. A. Anders, M. M. Taketo und D. Pan: ***β -Catenin Destruction Complex-Independent Regulation of Hippo-YAP Signaling by APC in Intestinal Tumorigenesis.*** In: *Genes & development* 29 (14 2015), S. 1493–1506. ISSN: 1549–5477. DOI: 10.1101/gad.264515.115.
- [215] X. Varelas, R. Sakuma, P. Samavarchi-Tehrani, R. Peerani, B. M. Rao, J. Dembowy, M. B. Yaffe, P. W. Zandstra und J. L. Wrana: ***TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal.*** In: *Nature Cell Biology* 10.7 (2008), S. 837–848. ISSN: 1465–7392. DOI: 10.1038/ncb1748.
- [216] D.-E. Pefani, D. Pankova, A. G. Abraham, A. M. Grawenda, N. Vlahov, S. Scrace und E. O’Neill: ***TGF- β Targets the Hippo Pathway Scaffold RASSF1A to Facilitate YAP/SMAD2 Nuclear Translocation.*** In: *Molecular cell* 63 (1 2016), S. 156–166. ISSN: 1097–4164. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.05.012.
- [217] S. E. Hiemer, A. D. Szymaniak und X. Varelas: ***The Transcriptional Regulators TAZ and YAP Direct Transforming Growth Factor β -Induced Tumorigenic Phenotypes in Breast Cancer Cells.*** In: *Journal of Biological Chemistry* 289.19 (2014), S. 13461–13474. ISSN: 0021–9258. DOI: 10.1074/jbc.m113.529115.
- [218] T.-F. Lee, Y.-C. Tseng, W.-C. Chang, Y.-C. Chen, Y.-R. Kao, T.-Y. Chou, C.-C. Ho und C.-W. Wu: ***YAP1 is essential for tumor growth and is a potential therapeutic target for EGFR-dependent lung adenocarcinomas.*** In: *Oncotarget* 8.52 (2017), S. 89539–89551. ISSN: 1949–2553. DOI: 10.18632/oncotarget.19647.
- [219] Z. Li, B. Zhao, P. Wang, F. Chen, Z. Dong, H. Yang, K.-L. Guan und Y. Xu: ***Structural insights into the YAP and TEAD complex.*** In: *Genes & Development* 24.3 (2010), S. 235–240. ISSN: 0890–9369. DOI: 10.1101/gad.1865810.
- [220] L. Guo und L. Teng: ***YAP/TAZ for cancer therapy: Opportunities and challenges (Review).*** In: *International Journal of Oncology* 46.4 (2015), S. 1444–1452. ISSN: 1019–6439. DOI: 10.3892/ijo.2015.2877.
- [221] P. C. Calses, J. J. Crawford, J. R. Lill und A. Dey: ***Hippo Pathway in Cancer: Aberrant Regulation and Therapeutic Opportunities.*** In: *Trends in Cancer* 5.5 (2019), S. 297–307. ISSN: 2405–8033. DOI: 10.1016/j.trecan.2019.04.001.
- [222] F. Zanconato, G. Battilana, M. Cordenonsi und S. Piccolo: ***YAP/TAZ as therapeutic targets in cancer.*** In: *Current opinion in pharmacology* 29 (2016), S. 26–33. ISSN: 1471-4973. DOI: 10.1016/j.coph.2016.05.002.
- [223] G. M. Elisi, M. Santucci, D. D’Arca, A. Lauriola, G. Marverti, L. Losi, L. Scalvini, M. L. Bolognesi, M. Mor und M. P. Costi: ***Repurposing of Drugs Targeting YAP-TEAD Functions.*** In: *Cancers* 10.9 (2018), S. 329. ISSN: 2072–6694. DOI: 10.3390/cancers10090329. URL: <http://www.mdpi.com/2072-6694/10/9/329>.
- [224] V. R. Dasari, V. Mazack, W. Feng, J. Nash, D. J. Carey und R. Gogoi: ***Verteporfin exhibits YAP-independent anti-proliferative and cytotoxic effects in endometrial cancer cells.*** In: *Oncotarget* 8.17 (2017), S. 28628–28640. ISSN: 1949–2553. DOI: 10.18632/oncotarget.15614.
- [225] A. V. Pobbati und W. Hong: ***A combat with the YAP/TAZ-TEAD oncoproteins for cancer therapy.*** In: *Theranostics* 10.8 (2020), S. 3622–3635. ISSN: 1838–7640. DOI: 10.7150/thno.40889.

- [226] A. Kaneda, T. Seike, T. Uemori, K. Myojo, K. Aida, T. Danjo, T. Nakajima, D. Yamaguchi, T. Hamada, Y. Tsuji, K. Hamaguchi, M. Yasunaga, N. Otsubo, H. Onodera, Y. Nishiya, M. Suzuki, J. Saito, T. Ishii und R. Nakai: **Abstract 3086: Discovery of a <i>first-in-class</i> TEAD inhibitor which directly inhibits YAP/TAZ-TEAD protein-protein interaction and shows a potent anti-tumor effect in malignant pleural mesothelioma.** In: *Cancer Research* 79.13-Supplement (2019), S. 3086–3086. ISSN: 0008–5472. DOI: 10.1158/1538-7445.am2019-3086.
- [227] M. Ota und H. Sasaki: **Mammalian Tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling.** In: *Development* 135.24 (2008), S. 4059–4069. ISSN: 0950–1991. DOI: 10.1242/dev.027151.
- [228] A. T. Nguyen-Lefebvre, N. Selzner, J. L. Wrana und M. Bhat: **The hippo pathway: A master regulator of liver metabolism, regeneration, and disease.** In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 35 (5 2021), e21570. ISSN: 1530–6860. DOI: 10.1096/fj.202002284RR.
- [229] J. M. Franklin, R. P. Ghosh, Q. Shi, M. P. Reddick und J. T. Liphardt: **Concerted localization-resets precede YAP-dependent transcription.** In: *Nature Communications* 11.1 (2020). ISSN: 2041–1723. DOI: 10.1038/s41467-020-18368-x.
- [230] J. Cagliero, A. Forget, E. Daldello, J. Silber und A. Zider: **The Hippo Kinase Promotes Scalloped Cytoplasmic Localization Independently of Warts in a CRM1/Exportin1-Dependent Manner in Drosophila.** In: *The FASEB Journal* 27.4 (2012), S. 1330–1341. ISSN: 1530–6860. DOI: 10.1096/fj.12-216424.
- [231] S. Zhang, M. Guo, X. Jiang, L. Tang, T. Wu, G. Bi, X. Yang, S. Fan und H. Bi: **PXR triggers YAP-TEAD binding and Sirt2-driven YAP deacetylation and polyubiquitination to promote liver enlargement and regeneration in mice.** In: *Pharmacological Research* 188 (2023), S. 106666. ISSN: 1043–6618. DOI: 10.1016/j.phrs.2023.106666.
- [232] L. Chen, S. W. Chan, X. Zhang, M. Walsh, C. J. Lim, W. Hong und H. Song: **Structural basis of YAP recognition by TEAD4 in the Hippo pathway.** In: *Genes & Development* 24.3 (2010), S. 290–300. ISSN: 1549–5477. DOI: 10.1101/gad.1865310.
- [233] F. Tomassini, Y. D’Asseler, M. Linecker, M. C. Giglio, C. Castro-Benitez, S. Truant, R. Axelson, P. B. Olthof, R. Montalti, M. Serenari, T. Chapelle, V. Lucidi, E. Sparrelid, R. Adam, T. Van Gulik, F.-R. Pruvot, P.-A. Clavien, D. Bruzzese, K. Geboes und R. I. Troisi: **Hepatobiliary scintigraphy and kinetic growth rate predict liver failure after ALPPS: a multi-institutional study.** In: *HPB* 22.10 (2020), S. 1420–1428. ISSN: 1365–182X. DOI: 10.1016/j.hpb.2020.01.010.
- [234] K. Merath, A. Tiwari, C. Court, A. Parikh, M. Dillhoff, J. Cloyd, A. Ejaz und T. M. Pawlik: **Postoperative Liver Failure: Definitions, Risk factors, Prediction Models and Prevention Strategies.** In: *Journal of Gastrointestinal Surgery* 27.11 (2023), S. 2640–2649. ISSN: 1091–255X. DOI: 10.1007/s11605-023-05834-2.
- [235] B. Lim, J.-L. Park, H.-J. Kim, Y.-K. Park, J.-H. Kim, H. A. Sohn, S.-M. Noh, K.-S. Song, W.-H. Kim, Y. S. Kim und S.-Y. Kim: **Integrative genomics analysis reveals the multilevel dysregulation and oncogenic characteristics of TEAD4 in gastric cancer.** In: *Carcinogenesis* 35.5 (2014), S. 1020–1027. ISSN: 1460–2180. DOI: 10.1093/carcin/bgt409.
- [236] C. Sommerauer, C. J. Gallardo-Dodd, C. Savva, L. Hases, M. Birgersson, R. Indukuri, J. X. Shen, P. Carravilla, K. Geng, J. Nørskov Søndergaard, C. Ferrer-Aumatell, G. Mercier, E. Sezgin, M. Korach-André, C. Petersson, H. Hagström, V. M. Lauschke, A. Archer, C. Williams und C. Kutter: **Estrogen receptor activation remodels TEAD1 gene expression to alleviate hepatic steatosis.** In: *Molecular Systems Biology* 20.4 (2024), S. 374–402. ISSN: 1744–4292. DOI: 10.1038/s44320-024-00024-x.

- [237] I. Capobianco, K. J. Oldhafer, M.-H. Fard-Aghaie, R. Robles-Campos, R. Brusadin, H. Petrowsky, M. Linecker, A. Mehrabi, K. Hoffmann, J. Li, A. Heumann, R. Hernandez-Alejandro, M. E. Tun-Abraham, E. Jovine, M. Serenari, B. Bjornsson, P. Sandström, R. Alikhanov, M. Efanov, P. Muiesan, A. Schlegel, T. M. van Gulik, P. B. Olthof, G. A. Stavrou, L. M. Serna-Higueta, A. Königsrainer und S. Nadalin: ***Development and internal validation of the Comprehensive ALPPS Preoperative Risk Assessment (CAPRA) score: is the patient suitable for Associating Liver Partition and Portal vein ligation for Staged hepatectomy (ALPPS)?*** In: *Hepatobiliary Surgery and Nutrition* 11.1 (2022), S. 52–66. ISSN: 2304–389X. DOI: 10.21037/hbsn-21-396.

Abbildungsverzeichnis

1.1	<i>Schematische Darstellung der Invasions-Metastasierungskaskade von Karzi-</i> <i>nomen.</i>	5
1.2	<i>Schematische Darstellung der ALPPS Operationstechnik.</i>	13
1.3	<i>Aufbau und Domänenarchitektur der humanen Transkriptionsfaktoren der</i> <i>TEAD-Familie 1–4</i>	16
4.1	<i>Kaplan-Meyer Analysen für die Hippo-Signalweg-Komponenten pLATS (A),</i> <i>pYAP (B) und YAP (C) sowie die Ratio von pYAP und YAP (D)</i>	66
4.2	<i>Kaplan-Meyer Analysen für die Hippo-Signalweg-Komponenten pLATS (A),</i> <i>pYAP (B) und YAP (C) sowie die Ratio von pYAP und YAP (D)</i>	68
4.3	<i>Schematische Darstellung des Hippo-Signalwegs bei PDAC Patient:innen mit</i> <i>Metastasen und ohne Metastasen</i>	70
4.4	<i>Kaplan-Meier Analysen der intrazellulären TEAD-Expressionsverteilung in</i> <i>PDAC in Bezug auf das Gesamtüberleben</i>	72
4.5	<i>Kaplan-Meier Analysen der intrazellulären TEAD-Expressionsverteilung in</i> <i>PDAC in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben</i>	73
4.6	<i>Vierfache Immunfluoreszenzfärbung eines tumorfreien Lebergewebeschnit-</i> <i>tes aus der ALPPS-OP 2</i>	78
4.7	<i>Überlagerungsbild der vierfachen Immunfluoreszenzfärbung</i>	79
4.8	<i>Boxplot für die Expression von TEAD1–4 in den ALPPS-Schritten 1 und 2, se-</i> <i>parat für die zytoplasmatische und nukleäre Lokalisation</i>	80
4.9	<i>Forest Plot der Expressionen von TEAD1–4 in ALPPS Schritt 1 (OP1) und den</i> <i>Leberregenerationswerten</i>	82