

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Zentrum für Experimentelle Medizin  
Institut für Biochemie und Signaltransduktion (IBS)

Direktor der Einrichtung: Prof. Dr. A. Itzen

## **Die Rolle des Enzyms Tubulin Tyrosin Ligase Like 4 (TTLL4) bei der Gehirnmastasierung des Mammakarzinoms**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Julia Arnold  
aus Gunzenhausen

Hamburg 2023

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 13.02.2024**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Volkmar Müller**

**Prüfungsausschuss, zweite Gutachterin: Prof. Dr. Sabine Windhorst  
Prüfungsausschuss, dritte Gutachterin: Prof. Dr. Marina Mikhaylova**

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Publikation: Tubulin Tyrosine Ligase Like 4 (TTLL4) overexpression in breast cancer calls is associated with brain metastasis and alters exosome biogenesis</b>	<b>4</b>
<b>2. Publikationsanhang</b>	<b>19</b>
<b>3. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>25</b>
<b>4. Darstellung der Publikation</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Einleitung</b>	<b>27</b>
<b>4.2 Ergebnisse</b>	<b>30</b>
4.2.1 TTLL4-mRNA Level korrelieren mit kürzerem krankheitsfreiem Überleben und Gehirnetastasen bei Mammakarzinom	30
4.2.2 TTLL4-Überexpression steigert die Mikrotubuli-Polyglutamylierung in Mammakarzinomzellen	31
4.2.3 TTLL4-Überexpression hat keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben und die Migration von Mammakarzinomzellen	32
4.2.4 TTLL4-Überexpression beschleunigt sekretorische Vesikel und Multivesikuläre Körper	32
4.2.5 TTLL4-Überexpression verändert die EV-Signatur	33
4.2.6 Extrazelluläre Vesikel aus TTLL4-überexprimierenden Zellen verändern die Eigenschaften von Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke	34
<b>4.3 Diskussion</b>	<b>36</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>40</b>
<b>6. Summary</b>	<b>40</b>
<b>7. Offene Fragen und Perspektiven</b>	<b>41</b>
7.1 TTLL4-Substrate	41
7.2 Mikrotubuli-Stabilität	42
7.3 Exosomen-Cargo	45
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>47</b>
<b>9. Erklärung des Eigenanteils</b>	<b>53</b>
<b>10. Danksagung</b>	<b>54</b>
<b>11. Lebenslauf</b>	<b>55</b>
<b>12. Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>56</b>

# 1. Publikation: Tubulin Tyrosine Ligase Like 4 (TTLL4) overexpression in breast cancer cells is associated with brain metastasis and alters exosome biogenesis

Arnold et al. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* (2020) 39:205  
<https://doi.org/10.1186/s13046-020-01712-w>

Journal of Experimental &  
Clinical Cancer Research

## RESEARCH

## Open Access

# Tubulin Tyrosine Ligase Like 4 (TTLL4) overexpression in breast cancer cells is associated with brain metastasis and alters exosome biogenesis



Julia Arnold<sup>1</sup>, Juliana Schattschneider<sup>1</sup>, Christine Blechner<sup>1</sup>, Christoph Krisp<sup>2</sup>, Hartmut Schlüter<sup>2</sup>, Michaela Schweizer<sup>3</sup>, Marcus Nalaskowski<sup>1</sup>, Leticia Oliveira-Ferreira<sup>4</sup> and Sabine Windhorst<sup>1\*</sup>

### Abstract

**Background:** The survival rate is poor in breast cancer patients with brain metastases. Thus, new concepts for therapeutic approaches are required. During metastasis, the cytoskeleton of cancer cells is highly dynamic and therefore cytoskeleton-associated proteins are interesting targets for tumour therapy.

**Methods:** Screening for genes showing a significant correlation with brain metastasis formation was performed based on microarray data from breast cancer patients with long-term follow up information. Validation of the most interesting target was performed by MTT-, Scratch- and Transwell-assay. In addition, intracellular trafficking was analyzed by live-cell imaging for secretory vesicles, early endosomes and multiple vesicular bodies (MVB) generating extracellular vesicles (EVs). EVs were characterized by transmission electron microscopy (TEM), nanoparticle tracking analysis (NTA), Western blotting, mass spectrometry, and ingenuity pathway analysis (IPA). Effect of EVs on the blood-brain-barrier (BBB) was examined by incubating endothelial cells of the BBB (hCMEC/D3) with EVs, and permeability as well as adhesion of breast cancer cells were analyzed. Clinical data of a breast cancer cohort was evaluated by  $\chi^2$ -tests, Kaplan-Meier-Analysis, and log-rank tests while for experimental data Student's T-test was performed.

**Results:** Among those genes exhibiting a significant association with cerebral metastasis development, the only gene coding for a cytoskeleton-associated protein was Tubulin Tyrosine Ligase Like 4 (TTLL4). Overexpression of TTLL4 (TTLL4<sup>plus</sup>) in MDA-MB231 and MDA-MB468 breast cancer cells (TTLL4<sup>plus</sup> cells) significantly increased polyglutamylation of  $\beta$ -tubulin. Moreover, trafficking of secretory vesicles and MVBs was increased in TTLL4<sup>plus</sup> cells. EVs derived from TTLL4<sup>plus</sup> cells promote adhesion of MDA-MB231 and MDA-MB468 cells to hCMEC/D3 cells and increase permeability of hCMEC/D3 cell layer.

**Conclusions:** These data suggest that TTLL4-mediated microtubule polyglutamylation alters exosome homeostasis by regulating trafficking of MVBs. The TTLL4<sup>plus</sup>-derived EVs may provide a pre-metastatic niche for breast cancer cells by manipulating endothelial cells of the BBB.

**Keywords:** Breast cancer, Metastasis, Exosome, Microtubule, Polyglutamylation

\* Correspondence: [s.windhorst@uke.de](mailto:s.windhorst@uke.de)

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Signal Transduction, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, Germany  
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **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/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

## Background

Breast cancer brain metastasis is associated with poor prognosis and 10 to 30% of breast cancer patients develop brain metastases. Breast cancer cells that preferentially metastasize to the brain mostly belong to the subgroup of Her2 overexpressing cells or triple-negative breast cancer cells (TNBC). These cancer cells are highly aggressive and since most therapeutic compounds do not pass the blood-brain-barrier (BBB), they do not respond to hormone or chemotherapy. Clinical trials for new targeted therapies are in progress and the preliminary results are promising [1–3].

During adhesion on and transmigration through the endothelial cell layer of the BBB, the cytoskeleton of cancer cells must be tightly controlled [4]. Therefore, proteins regulating cytoskeletal functions are interesting targets for prevention of cancer cell penetration into the brain. The cytoskeleton mainly consists of actin filaments (F-actin), microtubules (MTs) and intermediate filaments, which can interact with each other. F-actin is essential for the formation of cellular protrusions involved in adhesion, chemotaxis (filopodia), migration (lamellipodia) and invasion (invadopodia). These actin-rich structures are dynamically formed and degraded, requiring precise recruitment and activation of actin-binding proteins (reviewed in [5]).

Yet, the largest compartment of the cytoskeleton is established by the dynamic network of MTs, composed by  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin dimers forming cylindrical polymers. MTs fulfil various functions like motility in cilia or flagella, the formation of the mitotic spindle as well as intracellular transport. These functions can be directed by differential expression of tubulin isoforms and a plethora of posttranslational modifications (PTMs), acting as a rheostat.

These PTMs are mediated by enzymes inducing and reversing acetylation, tyrosination, polyglycylation as well as polyglutamylation. Hence, PTMs coexists and might interact on the same MT. Decoration of the MT-surface with PTMs results in a wide and fine-tuned range of effects on interacting proteins. The composed “tubulin code” is yet beginning to unravel (reviewed in [6, 7]). The PTM polyglutamylation enhances the number of negative charges and changes the conformation on the MT-surface, which affects the interaction with MAPs and motor proteins [7–9]. Glutamylation of MTs is executed by Tubulin Tyrosine Ligase Like (TTL) enzymes. The addition of the initial glutamate (Glu) residue to the  $\gamma$ -carboxyl group near the C-terminus of polymerized tubulin can be catalyzed by TTL4 [10–13]. TTL4 prefers  $\beta$ -tubulin and acts as an “initiator” or “monoglutamylase”, creating short Glu chains [14], which can be further elongated by “polyglutamylases” e.g. TTL1 [15–22].

Affinity of vesicle transporting kinesins to MTs depends on the length of Glu chains [19]. Cellular vesicles include endosomes, which can generate intraluminal vesicles (ILV) by invagination and result as MVB, presenting Rab7. Then, late endosomes/MVBs can be transported along MTs to the plasma membrane, where they fuse with the plasma membrane to release the ILV as exosomes [20]. By different loading and sorting mechanism exosomes include proteins, micro ribonucleic acids (miRNA), non-coding ribonucleic acids (ncRNA) and DNA. Their size typically ranges within 50 nm to 150 nm [21]. Since they can be internalized by neighboring or distant cells, secretion of exosomes by tumour cells primes their invasion and/or the tumour microenvironment to survive at distant sites [22, 23].

Here, we analyzed the expression of significantly deregulated genes in primary breast cancer cells from patients with brain metastasis. Among these, TTL4 was the only cytoskeleton-associated protein whose increased expression correlated with brain metastasis formation. Based on this finding, in this study we analyzed the functional role of TTL4 overexpression for TNBC.

## Methods

### Microarray data

Microarray analyses of TTL4 messenger RNA (mRNA) levels were analysed in a cohort of 197 primary breast cancer tissue samples [24, 25]. All patients were treated between 1991 and 2002 and were selected based on tissue availability. No radiotherapy, neoadjuvant chemotherapy or endocrine therapy had been administered before surgery. All patients gave written approval for the utilisation of their tissue samples and the reviewing of their medical records according to our investigational review board and ethics committee guidelines (Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg, #OB/V/03). We analyzed the TTL4 mRNA level (probeset 203702\_s\_at) using microarray data (Affymetrix HG-U133A) from the cohort mentioned before. The cohort was firstly divided into quartiles of similar size, representing low, moderate-low, moderate-high, and high TTL4 levels. Since cases with low, moderate-low and moderate-high TTL4 mRNA levels behaved similar in survival analysis, we combined these groups (TTL4 level < 75%) for further analysis (Figure S1A, B). Correlations between TTL4 mRNA levels (cut-off 75% percentile) and clinicopathological factors such as histological grading, stage, lymph node involvement, estrogen and progesterone receptor status (ER, PR), molecular subtype and metastasis formation were statistically examined by  $\chi^2$ -tests. Overall and recurrence-free survival was analysed by Kaplan-Meier analysis and Log-Rank-Tests. All statistical analyses were conducted using SPSS software Version 26 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

### Overexpression of TLL4 in MDA-MB231 and MDA-MB468 cells

The complementary DNA (cDNA) for TLL4 was purchased from Source BioScience (ORFeomeV8.1 #CCSBo5058H0981131D) and was cloned into the LegonC2/Puro+ vector which was a friendly gift from Dr. Kristoffer Riecken (Department of Stem Cell Transplantation, University Medical Center Hamburg-Eppendorf (UKE)). Virus production, infection of MDA-MB231 and MDA-MB468 cells, and selection with puromycin were performed as described [26]. Overexpression was verified by real-time polymerase chain reaction (rt-PCR).

### Cell culture

All cells were cultured in T75 tissue culture (TC) flasks (Sarstedt #83.3911.002) and 15 cm TC dishes (Sarstedt #83.3903) at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% humidity. MDA-MB231 (ATCC #HTB-26) and MDA-MB468 (ATCC #HTB-132) cells required DMEM culture media (Gibco, #41965-035) containing constantly 10% fetal calf serum (FCS) (Gibco), penicillin-streptomycin (100 U/ml) (Gibco) and puromycin (2 µg/ml) (Gibco).

hCMEC/D3 cells (Merck, #SCC066) were grown in EBM-2 medium (Lonza #CC-3156) containing, 5% FCS (Gibco), 1x chemically defined lipid concentrate (Gibco #11905-031), 5 µg/ml ascorbic acid (Sigma #A4544) and 1.4 µM hydrocortisone (Sigma # H0888).

### Immunocytochemistry and Western blotting

For immunocytochemistry, cells grown on chamber slides (µ-Slides 8-well, Ibidi, Munich, Germany, #80826) were fixed with 4% paraformaldehyde/4% sucrose/PBS for 15 min, permeabilized with 0.5% TritonX-100/PBS for 5 min, both at room temperature (RT) and blocked with 1 x PBS/0.05% TritonX-100, containing 5% bovine serum albumin (BSA) for 20 min at RT. The primary antibodies were diluted 1:200 in blocking solution and incubated over-night at 4 °C. Primary antibodies used were anti-β-tubulin (Santa Cruz #SC-9104), anti-NAP-1 (abcam #ab21630), anti-polyglutamylation modification GT335 (AdipoGen, #AG-20B-0020-C100), anti-Rab7 (Sigma-Aldrich #R8779) and anti-VASP (Santa Cruz #SC-46668). After washing with PBS/0.03% TritonX-100, the secondary Alexa-Fluor (AF) coupled antibodies against rabbit AF-568 (abcam #ab175695) or mouse AF-488 (Life technologies Eugene #A21202) or mouse AF-568 (Life technologies Eugene #A11031) were applied for 1 h at RT in a dilution of 1:2000 in blocking solution. Thereafter, the cells were stained with 0.2 µg/ml of 4',6-diamidino-2-phenylindole solution (DAPI; Roth #6335) in PBS for 5 min at RT and/or with AF-488 coupled phalloidin (Thermo Fisher #A12379) in a dilution of 1:1000 at RT for 45 min. Finally, the cells were washed 3-times with PBS.

Images were acquired using Leica TCS SP8 X with a 63x NA = 1.4 oil objective lens controlled by Leica LAS X. Samples stained with AF-488 coupled phalloidin or with an AF-488 coupled antibody against VASP were imaged using Keyence BZ1000.

Western blotting was performed according to standard protocol using the mentioned primary antibodies and secondary anti-rabbit (Santa Cruz #SC-2054) or anti-mouse (Santa Cruz #SC-2055) antibodies in dilution of 1:5000. Bands were detected by bioluminescence using ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Amersham #RPN2232) in an ImageQuant LAS4000 System (GE Healthcare).

### Immunoprecipitation

Cells were seeded to 15 cm TC-dishes and after grown to 90% confluence, they were washed twice with ice-cold PBS. Thereafter, 1 ml M-PER™ buffer (ThermoFisher #78501) including protease inhibitor cocktail (cOmplete™, EDTA-free protease inhibitor cocktail, Roche #04693132001) were added, cells were scraped and stored at -80 °C. To couple the beads with antibody, 50 µl Protein A sepharose (abcam #ab193256) was incubated with 5 µl GT335 antibody (1 mg/ml, see above) for 3.5 h at 17 °C under rotation. In between the cell lysates were thawed, vortexed vigorously and centrifuged at 13.000 g at 4 °C. The supernatant was transferred to GT335-coupled Protein A sepharose beads, which had been equilibrated twice with M-PER™ buffer. After incubating the beads for 4 h at 4 °C under rotation, the supernatant was removed, and the beads were washed thrice with M-PER™ buffer. Finally, 2 x SDS sample buffer was added, the beads were incubated for 7 min at 95 °C, centrifuged for 1 min at 13.000 g to remove bound proteins and protein concentrations were analysed by Western blotting.

### Adhesion assay

To analyze adhesion of breast cancer cells to hCMEC/D3-cells, 2 × 10<sup>4</sup> hCMEC/D3-cells were seeded to chamber slides (see above) and grown for 5 days. Confluency of the cells was controlled by staining parallel cells with AF-488 labeled phalloidin (see above). Then, 5000 Cell-Tracker™ Green CMFDA (Invitrogen #C2925)-loaded breast cancer cells were seeded onto confluent hCMEC/D3-cells. After incubation for 4 h, the fluorescence of breast cancer cells was analyzed with the Keyence BZ1000 microscope and cell number determined by its cell count function.

### Migration

1 × 10<sup>5</sup> MDA-MB231 cells were seeded to 96-well plates and grown for 2–3 days until confluence. Migration was examined by inserting a scratch into a confluent MDA-

MB231 cell layer and migration into the wound was measured by IncuCyte® Live-Cell Analysis system (Sartorius) and quantified by using the software IncuCyte Zoom® (Version 2016B).

#### Transmigration

Fifty thousand cells were seeded into Boyden chambers (Costar #3422), containing medium with 10% in the upper and 10% in the lower chamber. An FCS gradient created by adding different FCS concentration in the upper and the lower chamber disappears after about 5 h (own preliminary studies). Since adhesion to and migrations through the Boyden chamber of tumour cells is not fast enough to profit from this gradient, here the FCS concentrations were equal between the upper and the lower chamber. After seeding, the cells were incubated for 48 h, cells of the upper site of the membranes were washed away with a cotton swab, the membranes were sliced, cells were stained with DAPI and counted, using the cell count function from Keyence BZ1000 microscope.

#### Viability

Viability was measured by a standard MTT-assay using Methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich #M2128) and Dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich #D4540). Subsequent detection was performed after 24 h, 48 h and 72 h by a plate reader at 350 nm absorption.

#### EV isolation

Conditioned media of breast cancer cells grown in DMEM/10% FCS were collected after 4 days of incubation under standard conditions, and then vesicles were purified by differential centrifugation at 4 °C. First the sample was centrifuged at 500 g for 10 min to eliminate detached cells, followed by centrifugation at 10,000 g for 30 min to pellet cell debris. Finally centrifugation at 100,000 g for 90 min was performed to harvest EVs. The exosome pellet was washed for cellular assays with 1 x PBS pH 7.4 or with 1 mM HEPES pH 7.4, containing EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail tablets (see above) for validation and characterization. To assess the biological effects of EVs, the protein content of EVs was analyzed by the Bradford assay and the number of EVs was adjusted to 50 µg protein in total. These values were further normalized to the number of cells where the EVs were harvested from.

#### EV validation by transmission electron microscopy (TEM)

Fixation and negative stain for transmission electron microscopy (TEM) were conducted as previously described [27]. In brief, Formvar (EMS, Hatfield USA, #15800) coated copper electron microscopy (EM) grids (Plano,

Wetzlar Germany, #G2410C-X) were incubated for 10 min on drops of 0.01% poly-L-lysine hydrobromide (Sigma, St Louis USA, #P2636-100MG) for hydrophilicity and stickiness. Grids were then washed over four droplets on doubled-distilled water and the excess water was removed from the grids using filter paper. Freshly isolated EVs were resuspended in 2% paraformaldehyde (PFA) in PBS (Carl Roth, Karlsruhe #0964.4) before the grids were placed with the hydrophilic surface down onto the droplet. After incubation for 20 min, the grids were washed again on five droplets of PBS for 2 min each. Next, a 5 min incubation with 1% glutaraldehyde (GA) in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 was performed (EMS, Hatfield USA, #16320). Fixation was finished after washing over seven droplets of double-distilled water for 2 min each. For negative staining, grids were transferred to the uranyl-oxalate solution (pH 7), (EMS, Hatfield USA, #22400) for 5 min before further incubation with methylcellulose-uranyl-acetate (Sigma, St Louis USA, #M-6385) for 10 min on ice. Finally, the grids were dried using a filter paper. Images were acquired with the electron microscope (EM 900; Zeiss) at 80 kV equipped with a 4 K digital camera (Tröndle, Moorenweis, Germany).

#### EV characterization by nanoparticle tracking analysis (NTA) and mass spectrometry

For NTA, samples were measured by using the NanoSight LM14 (NanoSight NTA 2.3 Build 0033, Malvern Instruments) employing a 638 nm laser and a Marlin F-033B IRF camera (Allied Vision Technology). Quantification and characterization were performed by five videos of 60 s length each at a camera intensity of 13 in the batch processing function.

Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS), sample preparation, measurements and data processing are described in detail in [Supplementary methods](#). The label-free quantification (LFQ) intensity values for protein groups were used as main columns. The quantitative values for all protein groups were transformed into log<sub>2</sub> values and normalized by the median. This dataset of EV proteome is included within the additional files. Hierarchical clustering, Student's T-Test, principal component analysis and ingenuity pathway analysis (IPA) were performed.

#### Live-cell imaging of vesicle trafficking

For analysis of green fluorescent protein (GFP)-BDNF vesicle trafficking,  $2.5 \times 10^4$  cells were seeded to chamber slides (see above). Next day the cells were transfected with a vector encoding for GFP-BDNF (a friendly gift from Prof. Dr. Matthias Kneussel, Center for Molecular Neurobiology, UKE) using K2® Transfection System (Biontex #T060) according to the manufacturer's

instructions. After 48 h of incubation, the movement of vesicles was monitored every 5 s by live fluorescence-microscopy (Keyence BZ1000) and tracked manually. Finally, the vesicle speed ( $\mu\text{m/s}$ ) was calculated.

To analyze trafficking of Rab5 and Rab7 vesicles,  $1 \times 10^6$  cells were seeded on 18 mm coverslips and transfected the next day as described above. Vectors coding for monomeric red fluorescent protein linked to Ras-related protein (mRFP-Rab5, mRFP-Rab7) were a gift from Ari Helenius (Addgene plasmid # 14437; <http://n2t.net/addgene:14437>; RRID: Addgene\_14,437 and Addgene plasmid # 14436; <http://n2t.net/addgene:14436>; RRID: Addgene\_14,436) [28].

Spinning-disk confocal microscopy was performed with a Nikon Eclipse Ti-E equipped with a 100 x objective (Nikon, ApoTIRF 100 $\times$ /1.49oil). Analysis of mean speed was done using TrackMate Plugin for FIJI [29].

#### Measurement of cell permeability after EV-incubation

$2 \times 10^5$  hCMEC/D3-cells were seeded to Transwell cell culture chambers with a mean pore size of  $0.4 \mu\text{m}$  (Corning #3470) and incubated for 5 days to reach confluency. Thereafter, EVs (see EV isolation) were applied to hCMEC/D3-cells and incubation was continued for 16 h. Permeability of hCMEC/D3-cells was measured by exchanging the cell culture medium to  $150 \mu\text{l}$  medium without phenol red (Gibco #21063029), including  $25 \mu\text{l}$  fluorescein isothiocyanate-dextran (40,000 MW, 6 mg/ml, Sigma FD40). After incubation for 4 h, fluorescence of the medium in the lower reservoir of the 24-well plate was measured in a plate reader at 485 nm excitation and 535 nm emission.

#### Statistical analysis

Statistical analysis of clinical data was conducted using SPSS software Version 24 (IBM SPSS Statistics, Armonk, NY, USA).  $\chi^2$ -tests were used to examine the correlations between TTLL4 mRNA levels and clinicopathological factors. For prognostic parameters, the following groups were compared: histological grading (G1/2 vs. G3); nodal status (positive vs negative); ER and PR status (positive vs. negative); the presence of bone, lung, visceral or brain metastasis (positive vs. negative); and molecular subtype (luminal vs. human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive vs. triple-negative (TNBC)). Survival curves were plotted by Kaplan–Meier analysis. Differences between survival curves were evaluated by log-rank tests. Probability values ( $p$ ) less than 0.05 were regarded as statistically significant. All other experiments were performed at least three times, normalized to the mean of the control group and visualized by mean  $\pm$  standard deviation (SD). Using Student's T-

Tests in GraphPad PRISM 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) results were considered significant when  $p < 0.05$ .

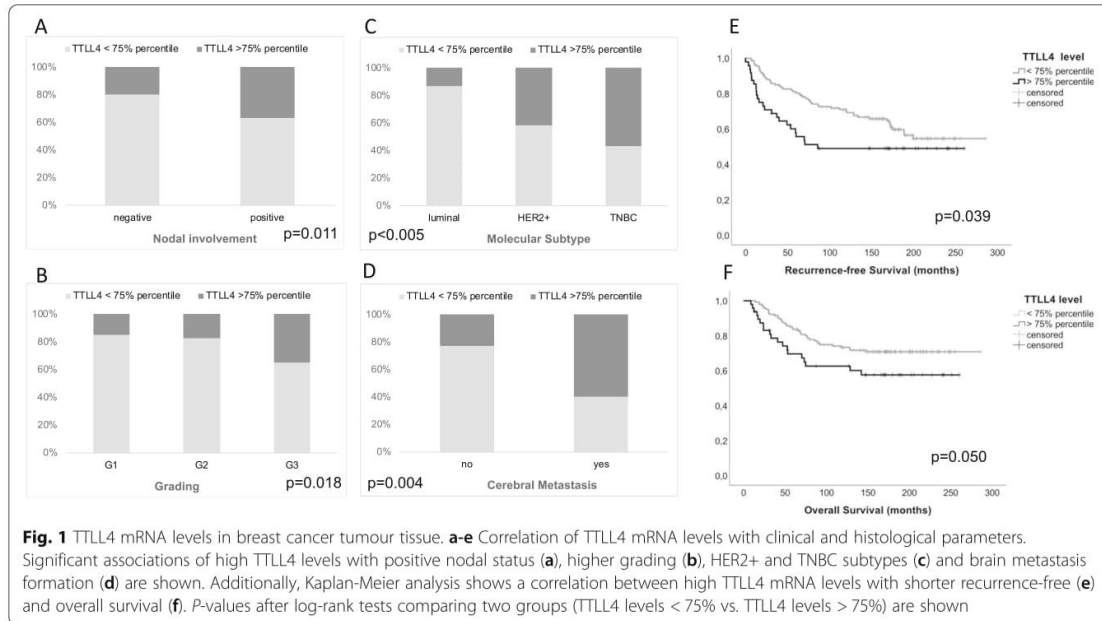
## Results

### TTLL4 mRNA levels significantly correlate with shorter recurrence-free survival and brain metastasis in breast cancer patients

To assess a potential relevance of cytoskeletal dynamics in breast cancer progression, we analyzed mRNA expression of genes significantly deregulated in breast cancer samples from patients ( $n = 197$ ) that developed brain metastasis. Characteristics of the patient cohort have been described in the methods section. Among these, TTLL4 was the only cytoskeleton-associated protein whose up-regulated expression significantly correlated with cerebral metastasis formation.

The mRNA levels of TTLL4 (probeset 203702\_s\_at) ranged from 8.9 to 1645.5 (mean:119.4 and median: 199.1). According to these values, the cohort was first divided into four groups (quartiles) of the same size displaying low, moderate-low, moderate-high and high TTLL4 expression. In survival analysis, we observed that quartiles 1 to 3 behaved similarly and were grouped for further analysis. This new group was defined as “TTLL4 < 75% percentile” and was compared with the remaining group with TTLL4 levels > 75% percentile (Figure S1A, B). Using this cut-off, statistical correlations of TTLL4 levels and clinical and pathological data were performed. Here, high TTLL4 levels (> 75% percentile) were significantly associated with a positive nodal status (Fig. 1a,  $p = 0.011$ ) and higher grading (Fig. 1b,  $p = 0.018$ ). In comparison with luminal breast cancer patients, tumours from HER2+ and triple-negative BC patients showed significantly higher TTLL4 mRNA levels (Fig. 1c,  $p < 0.005$ ). Correspondingly, a strong correlation of high TTLL4 levels and the lack of estrogen and progesterone receptor in tumour tissue was found (Figure S1C, D,  $p < 0.001$  and  $p = 0.001$ , respectively). In the majority of cases showing tumour recurrence, the site of metastasis is documented in our cohort. Interestingly, primary tumours that later developed brain (Fig. 1d) and lung metastasis (Figure S1E) were characterized by higher TTLL4 levels compared with tumours without and these differences were statistically significant ( $p = 0.004$  and  $p = 0.02$ , respectively) (Figs. 1d, S1E). Further, predictive value for TTLL4 was found, namely high TTLL4 levels were significantly associated with shorter recurrence-free survival in Kaplan-Meier analysis (Fig. 1e,  $p = 0.039$ ). The correlation between TTLL4 expression and the overall survival of breast cancer patients showed the same trend and was nearly significant (Fig. 1f,  $p = 0.05$ ).





**TLL4-overexpression increases MT-polyglutamylation in breast cancer cells**

To analyze the functional role of TLL4 in breast cancer cells, stable overexpression of TLL4 (TLL4<sup>plus</sup>) was conducted in a TNBC cell line with comparably low endogenous expression (MDA-MB231, see Figure S2) by a lentiviral approach. Real-time PCR analysis of control and TLL4<sup>plus</sup> cells revealed a 16-fold increase of TLL4 mRNA levels in TLL4 overexpressing cells (Fig. 2a). Since TLL4 catalysis the first step in polyglutamylation of proteins, this PTM should be increased in TLL4<sup>plus</sup> cells. To analyze this assumption, polyglutamylated proteins were immunoprecipitated using the GT335 antibody. Known substrates of TLL4 are β-tubulin and NAP-1 [30, 31]. Therefore, the GT335 beads were probed against β-tubulin and NAP-1 (Fig. 2b). Evaluation of band intensity normalized to the IgG signals revealed a 2.5-fold or a 1.5-fold increased polyglutamylation of β-tubulin or NAP-1, respectively. Thus, increased expression of TLL4 in MDA-MB231 cells mainly elevated the level of polyglutamylated β-tubulin.

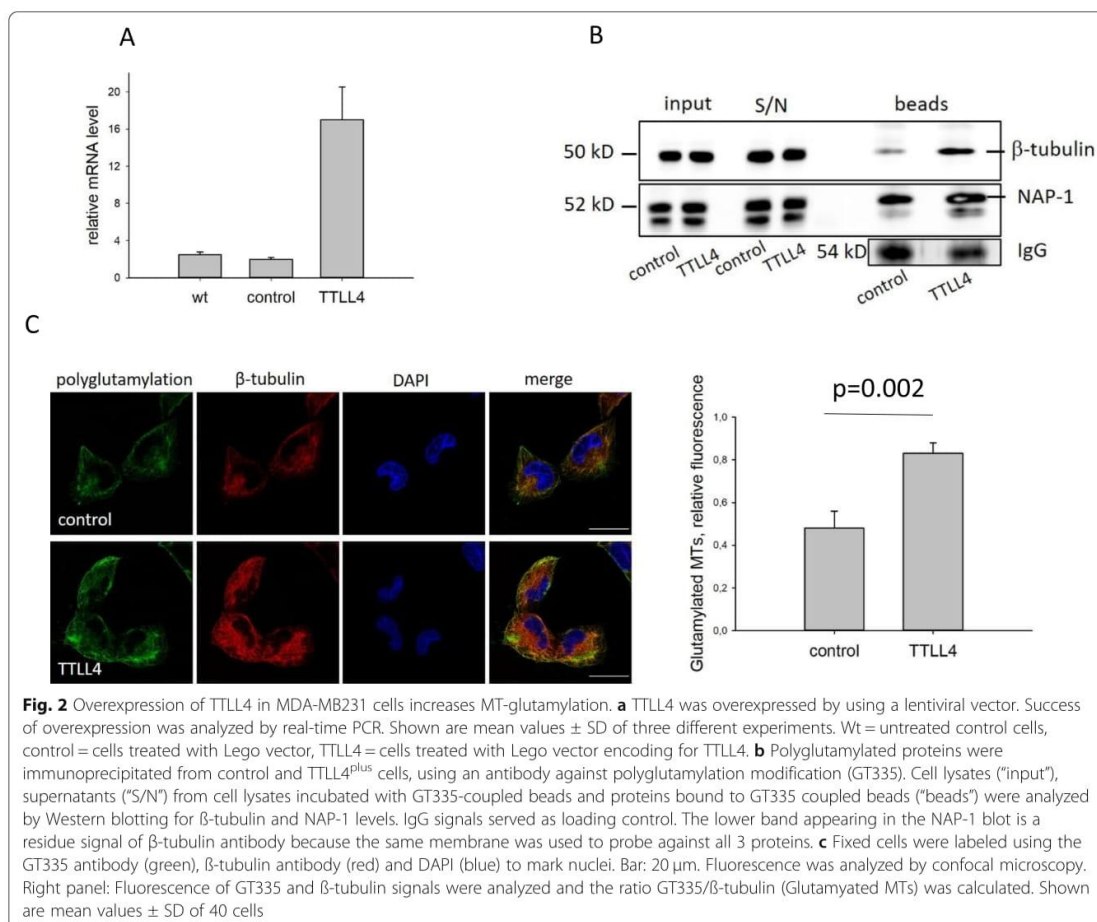
To confirm increased polyglutamylation of β-tubulin in TLL4<sup>plus</sup> cells, fixed cells were stained for polyglutamylation (green), β-tubulin (red) and DNA (DAPI, blue). Fluorescence signals derived from polyglutamylated MTs and β-tubulin were analyzed by confocal fluorescence microscopy, evaluated by ImageJ and normalized to β-tubulin signals (Fig. 2c, right panel). Again, this result shows a clear increase in polyglutamylated MTs in TLL4<sup>plus</sup> compared to control cells.

Because of known MT-actin crosstalk in cells [4], we next examined whether increased polyglutamylation of β-tubulin may affect actin dynamics. For this, the F-actin concentration of phalloidin-stained cells (Figure S3A) and the number of actin-based cellular protrusion were counted (Figure S3B, C). However, neither the F-actin concentration nor the length of cellular protrusions was different between control and TLL4<sup>plus</sup> cells. Thus, it seems that TLL4 overexpression does not alter the crosstalk between MTs and actin.

In summary, our data show that in control MDA-MB231 cells NAP-1 is highly polyglutamylated and TLL4 overexpression only slightly increased this level. On the other hand, the level of β-tubulin polyglutamylation is comparably low in control cells and strongly increased after TLL4 overexpression.

**TLL4 overexpression accelerates velocity of secretory vesicles and MVBs but has no significant effect on cell viability and migration**

Polyglutamylation of β-tubulin can alter the affinity of kinesins to MTs and thereby trafficking of cellular vesicles [15–18, 32]. Therefore, it was likely that increased β-tubulin polyglutamylation alters vesicle trafficking. To analyze this assumption, we assessed the speed of secretory vesicles, early endosomes and late endosomes/MVBs. For this purpose, the cells were transfected with vectors coding for GFP-BDNF (brain-derived neurotrophic factor as a marker for secretory vesicles), mRFP-Rab5 (early endosomes) or mRFP-Rab7 (late endosome/



**Fig. 2** Overexpression of TLL4 in MDA-MB231 cells increases MT-glutamylation. **a** TLL4 was overexpressed by using a lentiviral vector. Success of overexpression was analyzed by real-time PCR. Shown are mean values  $\pm$  SD of three different experiments. Wt = untreated control cells, control = cells treated with Lego vector, TLL4 = cells treated with Lego vector encoding for TLL4. **b** Polyglutamylated proteins were immunoprecipitated from control and TLL4<sup>plus</sup> cells, using an antibody against polyglutamylation modification (GT335). Cell lysates ("input"), supernatants ("S/N") from cell lysates incubated with GT335-coupled beads and proteins bound to GT335 coupled beads ("beads") were analyzed by Western blotting for  $\beta$ -tubulin and NAP-1 levels. IgG signals served as loading control. The lower band appearing in the NAP-1 blot is a residue signal of  $\beta$ -tubulin antibody because the same membrane was used to probe against all 3 proteins. **c** Fixed cells were labeled using the GT335 antibody (green),  $\beta$ -tubulin antibody (red) and DAPI (blue) to mark nuclei. Bar: 20  $\mu$ m. Fluorescence was analyzed by confocal microscopy. Right panel: Fluorescence of GT335 and  $\beta$ -tubulin signals were analyzed and the ratio GT335/ $\beta$ -tubulin (Glutamylated MTs) was calculated. Shown are mean values  $\pm$  SD of 40 cells

MVBs). Vesicle trafficking was analyzed by live-cell imaging. In TLL4<sup>plus</sup> cells, the speed of secretory vesicles increased by 38% and the speed of late endosomes/MVBs by 23% (Fig. 3a, c). However, the velocity of early endosomes was unaffected (Fig. 3b). To examine if Rab7-labeled vesicles are transported via polyglutamylated MTs, mRFP-Rab7-transfected MDA-MB231 cells were stained for polyglutamylation (green). Merged channels show that Rab7-labeled vesicles accumulated on polyglutamylated MTs (Fig. 4d, white arrow). However, intracellular vesicles that did not colocalize with polyglutamylated MTs were also detected (Fig. 4d, blue arrow) and Rab7 labeled EVs were found (Fig. 4d, yellow arrow).

These results suggest that high TLL4 levels promote the transport of particular late endosomes/MVBs by increasing MT-polyglutamylation.

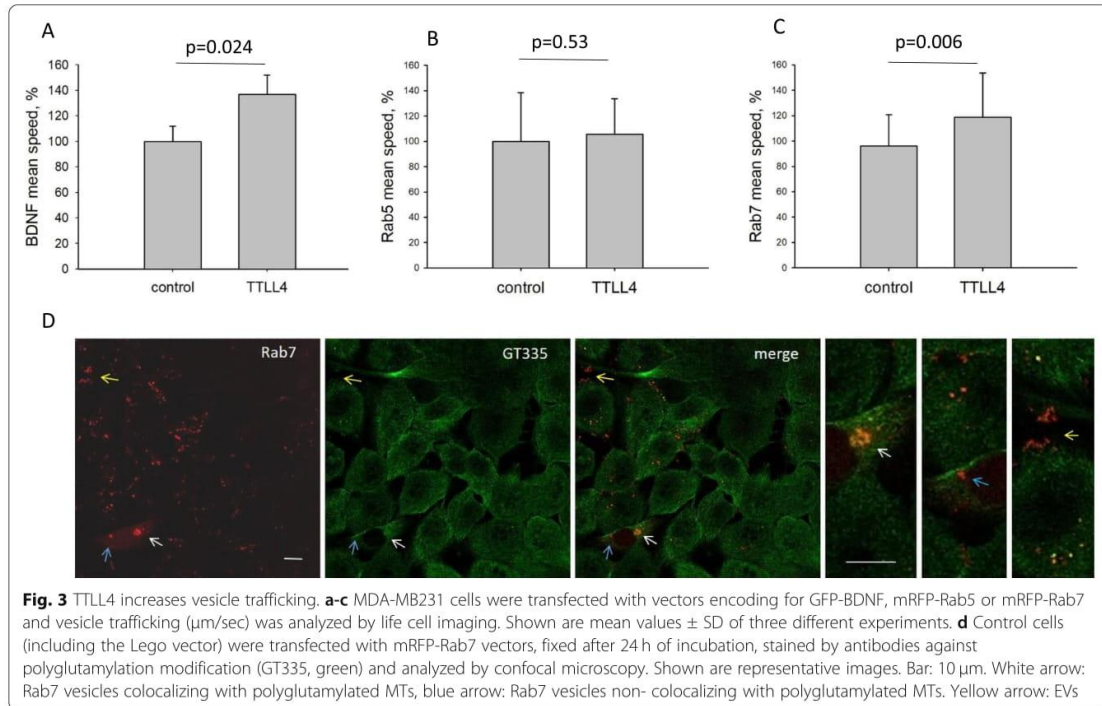
In order to show whether, in addition to altering vesicle trafficking, TLL4 may affect viability and migration, these cellular processes were analyzed. As shown in Fig.

4a, there was no effect on cell viability ( $p = 0.23$ ) but a tendency that planar migration, measured by the Scratch assay, was reduced. Also, transmigration was increased in TLL4<sup>plus</sup> compared to control cells ( $p = 0.1$ , Fig. 3b, c). However, due to high variability of the cellular migratory capacity, these results were not significant.

In summary, our results show that TLL4 overexpression increases trafficking of specific vesicles but has no significant effect on viability and migration of MDA-MB231 cells.

#### TLL4 alters EV homeostasis

Our data show that TLL4 overexpression increases velocity of secretory vesicles as well as of Rab7 containing late endosomes/MVBs. Since MVBs mediate secretion of exosomes/EVs, who are known to condition metastatic niches [33], we next analyzed a potential involvement of TLL4 on exosomes/EV signature. Possible alteration of exosomes/EV signature could provide a link between the

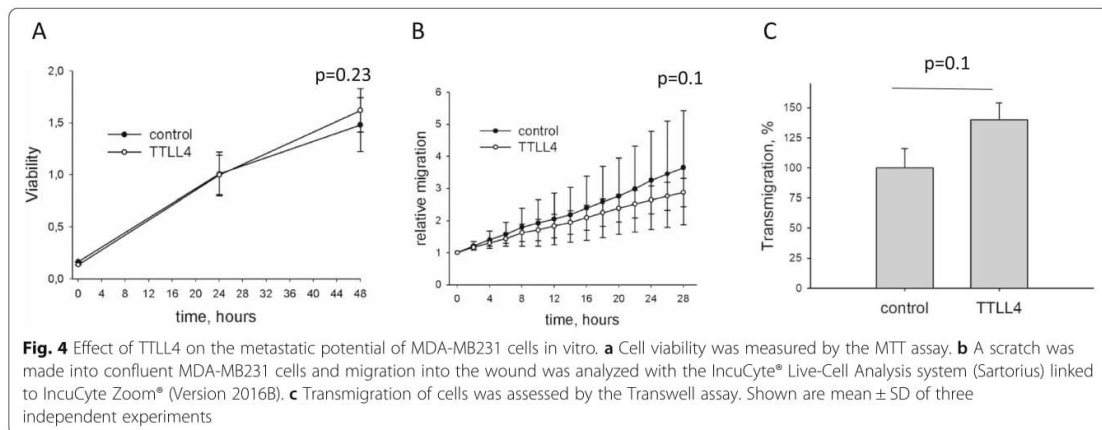


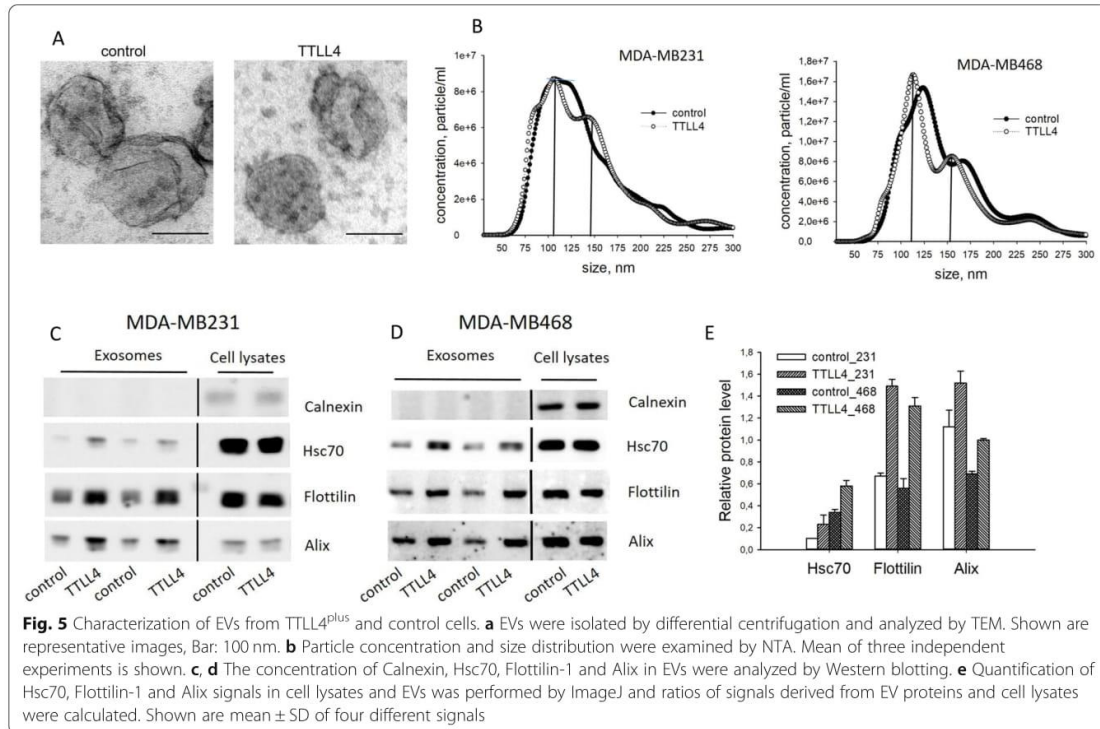
clinical relevance of TLL4 (Fig. 1) and its effect on MT-polyglutamylation (Fig. 2).

To address this, EVs (containing exosomes, microvesicles and apoptotic bodies [33]) isolated from media of MDA-MB231 control and TLL4<sup>plus</sup> cells were validated by transmission electron microscopy (TEM) visualizing the typical cup shape of exosomes [27] (Fig. 5a). Also, nanoparticle trafficking analysis (NTA) was performed to analyze the concentration

and size distribution of EVs. This analysis revealed differences in size-distribution between EVs from control and TLL4<sup>plus</sup> cells, while the EV concentration was similar. In control EVs, one non-sharp peak between 80 nm and 125 nm and in TLL4<sup>plus</sup> derived EVs two sharp peaks at 110 and 145 nm were observed.

This result indicates that TLL4 overexpression alters secretion of EV populations.





To validate this finding, TLL4 was overexpressed in a second TNBC cell line (MDA-MB468), exhibiting slightly higher endogenous TLL4 mRNA levels compared to MDA-MB231 (Figure S4A). Overexpression of TLL4 was verified by real-time PCR (Figure S4B) and polyglutamylation level by Western blotting (Figure S4C).

Thereafter, EVs from the medium of MDA-MB468 cells were analyzed by NTA. Size distribution of EVs derived from control cells were different from those of control MDA-MB231 cells, they had two sharp peaks at 125 nm and 170 nm. However, sizes of EVs from both TLL4<sup>plus</sup> cell lines were similar. Thus, it seems that TLL4 overexpression indeed alters biogenesis of EVs.

To validate this conclusion, proteins were extracted from EVs and the concentration of the EV marker proteins Alix, Flottilin-1 and Hsc70 were analyzed by Western blotting. Protein concentration was normalized to cell number and Calnexin served as a negative control. Indeed, we found an increased level of EV markers in both TLL4 overexpressing TNBC cell lines, ranging from 1.4-fold to 2.3-fold (Fig. 5c-e). Since the protein concentration was not significantly different between EVs from control or TLL4<sup>plus</sup> cells (Figure S5A), increased concentrations of Alix, Flottilin-1 and Hsc70 in EVs from TLL4<sup>plus</sup> cells further support our conclusion

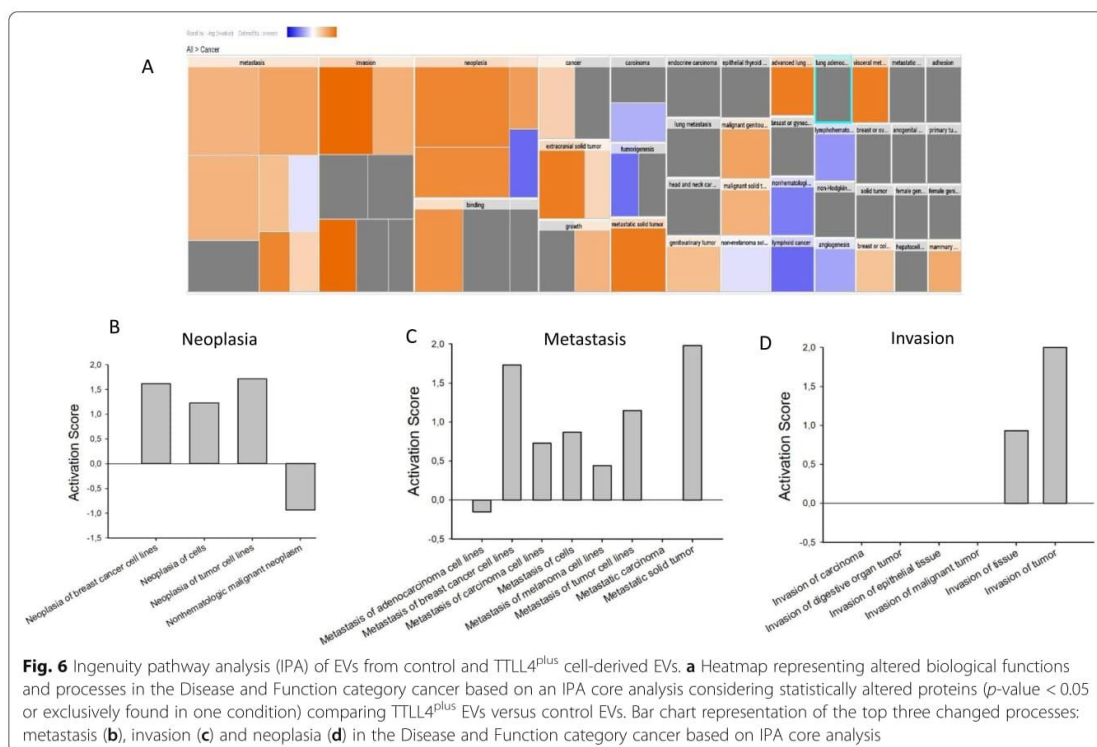
that the EV population secreted by TLL4<sup>plus</sup> cells is different from those of control cells.

To analyze whether further EV proteins may differ between control and TLL4 overexpressing cells, proteins derived from MDA-MB231 control and TLL4<sup>plus</sup> EVs were analyzed via mass spectrometric proteomics. The protein content strongly differed between control and TLL4<sup>plus</sup> cells. Of the 1270 proteins quantified in at least 3 of the 4 biological replicates per condition, 165 proteins changed significantly ( $p < 0.05$ ) between control and TLL4<sup>plus</sup> cells (see <http://www.ebi.ac.uk/pride>, PXD020743). Ingenuity pathway analysis of cancer-related processes revealed that the proteins up-regulated in TLL4<sup>plus</sup> EVs mainly are involved in the control of neoplasia, metastasis and invasion (Figs. 6 and S5).

In summary, our data show that high TLL4 expression alters the EV populations and ingenuity pathway analysis indicates that EVs derived from TLL4<sup>plus</sup> cells contain proteins involved in the regulation of malignant progression of tumour cells.

#### TLL4<sup>plus</sup> cell-derived EVs alter human brain endothelial cells

Our data showing that high expression of TLL4 significantly correlates with brain metastasis (Fig. 1d) together with the finding that EVs derived from TLL4



overexpressing cells contain proteins involved in the control of neoplasia, metastasis and invasion (Fig. 6) led us to analyze the effect of TLL4<sup>plus</sup> derived EVs on malignancy of TNBC cells. For this, permeability of endothelial cells of the BBB (hCMEC/D3) as well as adhesion of MDA-MB231 and MDA-M468 control and TLL4<sup>plus</sup> cells to hCMEC/D3-cells were assessed.

Confluent hCMEC/D3-cells were treated with EVs from control or TLL4<sup>plus</sup> cells and diffusion of dextran through cell layers was measured. This analysis revealed that dextran diffusion was significantly increased by 20% in hCMEC/D3-cells pre-incubated with EVs from TLL4<sup>plus</sup> cells (Fig. 7a).

To show if also adhesion of MDA-MB231 or MDA-MB468 cells may be altered after incubating hCMEC/D3-cells with EVs derived from control or TLL4<sup>plus</sup> cells, control cells, labeled with CellTracker™ Green CMFDA, were seeded on hCMEC/D3-cells for 4 h. Quantification of labeled cells revealed that pre-incubation with TLL4<sup>plus</sup>-derived EVs significantly increased adhesion of MDA-MB231 or MDA-MB468 to hCMEC/D3-cells by 31% or 47%, respectively, compared to cells incubated with EVs from control cells (Fig. 7b).

We next analyzed whether TLL4 overexpression may also alter adhesion of breast cancer cells independent of

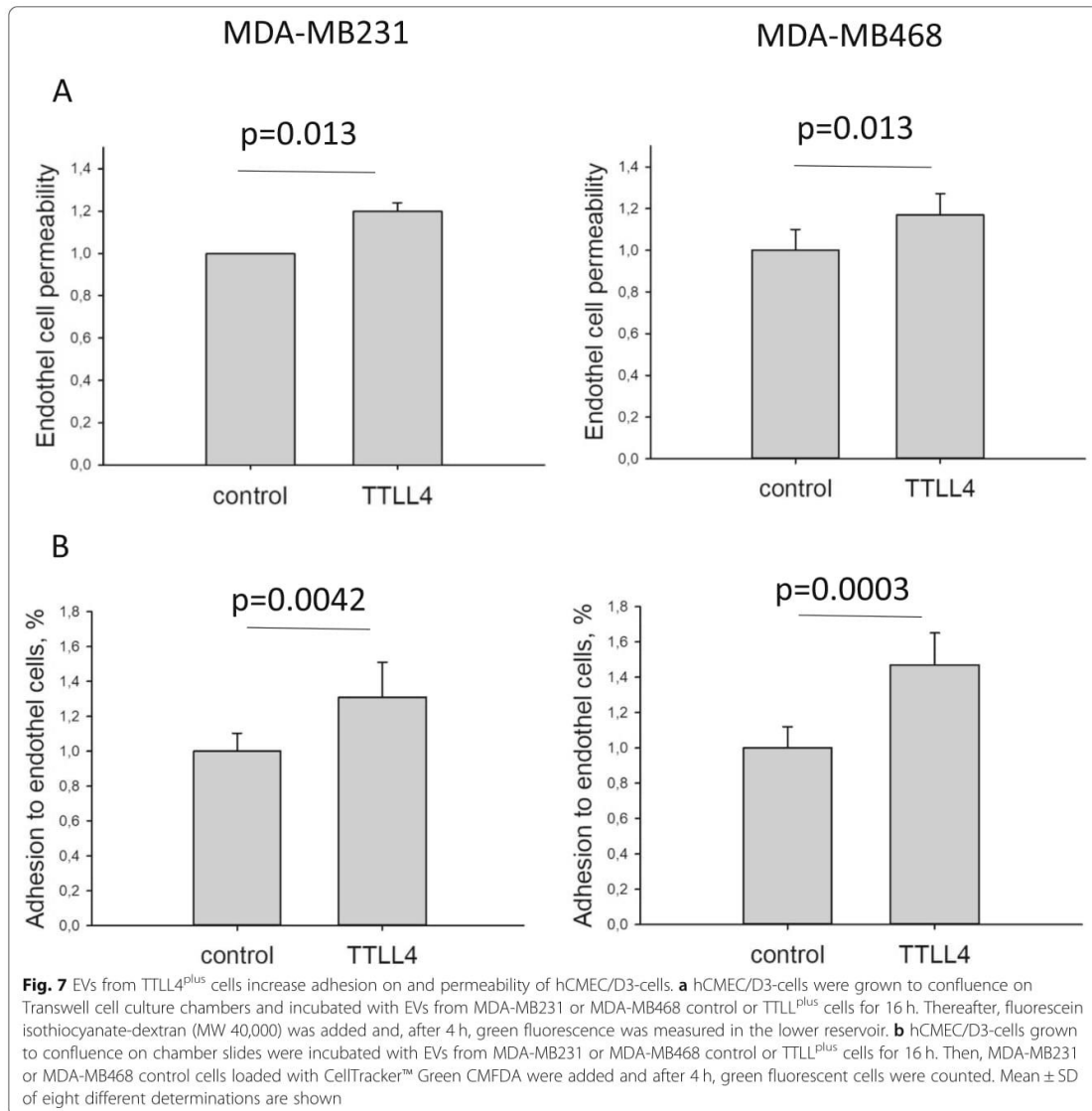
EVs. Therefore, control or TLL4<sup>plus</sup> MDA-MB231 or MDA-MB468 cells were seeded to hCMEC/D3 cells and analyzed in the same way as above. Interestingly, we found that independent of EVs, adhesion of MDA-MB231 or MDA-MB468 TLL4<sup>plus</sup> cells was increased by 52% or 34% compared to control cells (Fig. 8).

In conclusion, these results show that up-regulation of TLL4 in breast cancer cells promotes secretion of EV populations that increase permeability of endothelial cells of the BBB as well as tumour cell adhesion to these cells. In addition, independent of EVs, TLL4 overexpression increases adhesion of breast cancer cells.

## Discussion

Analysis of proteins correlating with the abundance of breast cancer brain metastasis revealed that among these the only cytoskeletal-associated protein was TLL4 (Fig. 1), a ligase that catalyzes the first addition of glutamate residue to proteins [14].

To better understand the role of TLL4 in breast cancer cells, the protein was overexpressed in TNBC cells. Analysis of polyglutamylation of the known TLL4 substrates NAP-1 and  $\beta$ -tubulin [30, 31] revealed that TLL4 overexpression only slightly increased polyglutamylation of NAP-1, but strongly increased

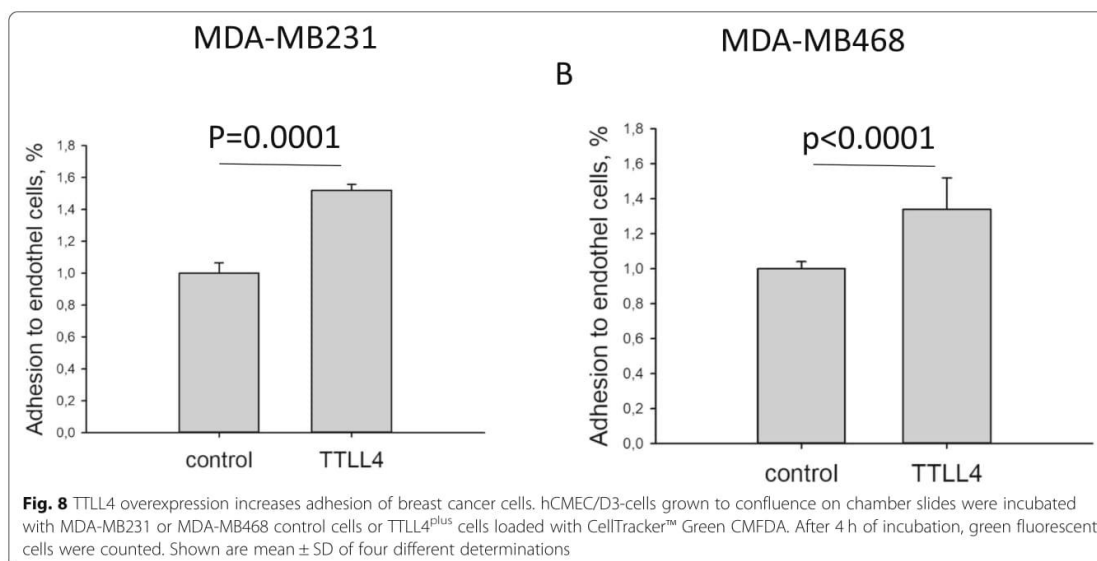


polyglutamylation of  $\beta$ -tubulin (Fig. 2b). Since also in control MDA-MB231 cells NAP-1 was strongly polyglutamylated, we assume that TLL4 is not the main NAP-1 polyglutamylating enzyme. Alternatively, high NAP-1 polyglutamylation level could be endogenously almost saturated and therefore only slightly increasable by TLL4 overexpression.

Our result, showing that TLL4 overexpression mainly increases tubulin polyglutamylation has been also shown by Van Dijk et al. in HeLa cells [31] and led us to analyze potential effects of this PTM on MT functions. Since MT-PTMs can function as “traffic lights” for

intracellular transport (reviewed in 34,35), we analyzed a potential effect of TLL4 overexpression on vesicle trafficking. The results of these analyses showed enhanced mobility of secretory vesicles and late Rab7-specific endosomes/MVBs (Fig. 3a, c). In contrast, no effect on velocity of early Rab5-specific endosomes was observed in TLL4<sup>plus</sup> cells (Fig. 3b).

Furthermore, populations of Rab7-vesicles, co- and non-colocalizing with polyglutamylated MTs were detected, suggesting that polyglutamylated MTs might transport particular Rab7-vesicles (Fig. 3d). This distinction is supported by studies reporting increased affinity



[23, 24] and motility [32] of specific motor proteins interacting with mono- or short glutamylated MTs. Particularly, Kinesin-2 showed higher motility when MTs were modified with short Glu chains [32]. Furthermore, diminishing long Glu chains by knockout of TLL1 did not affect Kinesin-2 [23]. Even the inhibitory effects of tyrosinated tubulin for Kinesin-2 binding can be overwritten by short Glu chains [24]. Recent findings have revealed that late endosomes are also transported by Kinesin-2 besides Kinesin-1 [34] to the MT-plus-ends [35–37]. However, future studies are necessary to show if TLL4-mediated glutamylation of MTs indeed increases affinity and motility of specific kinesins and thereby trafficking of particular Rab7-vesicle populations.

The finding that TNBC cells overexpressing TLL4 secrete EV populations different from those of control cells again supports our assumption that EV biogenesis might be affected by altered intracellular transport. According to our proteome data, these EVs from TLL4<sup>plus</sup> cells contain protein cargos increasing malignancy of cancer cells (Figs. 6 and S5B). Indeed, analysis of the biological effects of EVs revealed that the EVs derived from TLL4<sup>plus</sup> cells increased adhesion of TNBC cells to endothelial cells of the BBB (hCMEC/D3) (Fig. 7b). In addition, increased permeability of dextran through hCMEC/D3-cells was observed in presence of EVs from TLL4<sup>plus</sup> compared to control cells (Fig. 7a). These results indicate that EVs from TLL4<sup>plus</sup> cells facilitate a pre-metastatic niche to increase adhesion of breast cancer cells to the BBB. Also, elevated permeability of endothelial cells treated with EVs from TLL4<sup>plus</sup> cells may facilitate invasion of breast cancer cells through the BBB. This hypothesis is supported by our proteome data, showing increased levels of

proteins involved in invasion in EVs from TLL4<sup>plus</sup> cells (Figs. 6 and S5B). However, since we did not provide direct evidence that TLL4<sup>plus</sup> cell-derived EVs increase invasion of breast cancer cells through the endothelial cell layer, this potential activity must be analyzed in detail in future studies. In addition, the specific molecular changes induced by TLL4<sup>plus</sup> cell-derived EVs on endothelial cells are still unknown. Tominaga et al. 2015 [23] found that cancer-derived EVs increased permeability of endothelial tight junctions by transfer of miR-181c to endothelial cells. Furthermore, an exosome-mediated enhanced expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in human endothelial cells have been described in a model for chronic myelogenous leukemia [38]. Interestingly, our data also showed an increased ICAM-1 concentration in EVs derived from TLL4<sup>plus</sup> cells (Figure S5B). Future studies will show if this ICAM-1 up-regulation is involved in the EV-facilitated adhesion of TNBC cells to hCMEC/D3 cells.

MT-PTMs affect malignancy of tumour cells not only by modulating EV signatures but also by directly changing cellular MT functions. Whipple et al. [39] revealed that increased MT-stability in breast cancer cells, mediated by detyrosination of the C-terminal glutamate, facilitates formation of microtentacles, enhancing attachment to endothelial cells. This finding is in accordance with our result, showing that independent of EVs, TLL4 overexpression increases adhesion of MDA-MB231 and MDA-MB468 to hCMEC/D3 cells (Fig. 8). Thus, it seems that MT-PTMs directly control cellular behaviour and provide a metastatic niche by altering EV signature.

In summary, here we demonstrate that TLL4 was the only cytoskeleton-associated protein whose up-regulation in breast cancer cells correlated with the formation of brain metastasis. Functional studies suggest that TLL4-mediated glutamylation of  $\beta$ -tubulin increases trafficking of MVBs and results in altered EV signature. This EV signature increases adhesion of breast cancer cells to endothelial cells of the BBB as well as permeability of these endothelial cells.

## Conclusions

Here we show for the first time that TLL4-overexpression enhances MVB motility, thus altering EV homeostasis. Moreover, we reveal that EVs secreted by TLL4<sup>plus</sup> cells increase the potential of breast cancer cells to adhere to endothelial cells of the BBB. These findings support our clinical data, showing that high TLL4 expression correlates with brain metastasis of breast cancers. Hence, TLL4 may be an interesting target for therapy. Our work provides a basis for future research, including pre- and clinical investigations examining the effectors and biogenesis of TLL4-altered exosomes.

## Supplementary information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01712-w>.

**Additional file 1: Figure S1.** Clinical relevance of TLL4 levels for breast cancer patients. Kaplan-Meier analysis show TLL4 mRNA levels of all four quartiles for overall survival and shorter recurrence-free survival. A high correlation is shown by *p*-values after log-rank tests comparing two groups (TLL4 levels < 75% vs. TLL4 levels > 75%). (C-E). Significant associations of high TLL4 levels with negative estrogen (ER) levels (C), negative progesterone (PR) levels (D), and lung metastasis formation (E) are shown. *P*-values after  $\chi^2$ -Test are given. **Figure S2.** TLL4 mRNA expression of different breast cancer cells lines. mRNA expression of TLL4 was analyzed by real-time PCR and normalized to the value of MDA-MB231 cells. MDA-MB231-BR = cells that preferentially metastasize to the brain. MDA-MB231-SA = cells that preferentially metastasize to the bone. **Figure S3.** Effect of TLL4 on actin dynamics. (A) F-actin concentration of phalloidin-stained cells. (B, D). Cellular protrusions were stained by AF-488 coupled phalloidin (B) or by an AF-488 coupled antibody against VASP (C). Mean values  $\pm$  SD of three different experiments are shown. **Figure S4.** Overexpression of TLL4 in MDA-MB468 cells. (A) TLL4 mRNA levels of MDA-MB231 and MDA-MB468 control cells, normalized to TLL4 mRNA from MDA-MB231 cells. (B) TLL4 mRNA levels of MDA-MB468 control cells and cells treated with a lentiviral vector coding for TLL4, normalized to TLL4 mRNA from control MDA-MB468 cells. (C) Protein lysates from control and TLL4 overexpressing MDA468 cells were analyzed for polyglutamylation by Western blotting using the GT335 antibody. Detection of  $\beta$ -tubulin and Hsc70 served as loading control. **Figure S5.** Concentration and volcano plot of proteins regulated in EVs derived from TLL4 overexpressing cells. (A) Protein concentration of EVs was determined by the Bradford assay and particles/ml by NTA. From the resulting values,  $\mu\text{g}/1 \times 10^{10}$  particles were calculated. Shown are mean values  $\pm$  SD of four different determinations. (B) EVs proteins from control or TLL4 overexpressing cells were analyzed by mass spectrometry and the log ratios of TLL4 vs. control proteins were calculated.

**Additional file 2.** Supplementary methods.

## Abbreviations

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol; CMFDA: 5-chloromethylfluorescein diacetate; AF: Alexa-Fluor; BBB: Blood-brain-barrier; BDNF: Brain-derived neurotrophic factor; BC: Breast cancer; cDNA: Complementary DNA; DNA: Deoxyribonucleic acid; DMSO: Dimethylsulfoxide; ER: Estrogen receptor; EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid; FCS: Fetal calf serum; F-actin: Filamentous actin; Glu: Glutamate; GA: Glutaraldehyde; GFP: Green fluorescent protein; HER2: Human epidermal growth factor receptor 2; ICAM-1: Intercellular adhesion molecule 1; ILV: Intraluminal vesicles; LFQ: Label-free quantification; LoG detector: Laplacian of Gaussian particle detector; Lap Tracker: Linear assignment problem tracker; LC-MS/MS: Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry; mRNA: Messenger RNA; MTT: Methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium bromide; miRNA: Micro ribonucleic acid; MT: Microtubule; MAP: Microtubule-associated proteins; MDA-MB: Monroe Dunaway Anderson Metastatic Breast cancer cells; MVB: Multivesicular bodies; mRFP: Monomeric red fluorescent protein; NTA: Nanoparticle tracking analysis; ncRNA: Non-coding ribonucleic acid; NAP: Nucleosome assembly protein; PFA: Paraformaldehyde; PBS: Phosphate-buffered saline; PTM: Posttranslational modifications; PR: Progesterone receptor; Rab5: Ras-related protein 5; Rab7: Ras-related protein 7; rt-PCR: Real-time polymerase chain reaction; RT: Room temperature; SD: Standard deviation; TC: Tissue culture; TEM: Transmission electron microscopy; TNBC: Triple-negative breast cancer cells; TLL4<sup>plus</sup>: Tubulin Tyrosine Ligase Like 4 overexpression; TLL: Tubulin Tyrosine Ligase Like; UKE: University Medical Center Hamburg-Eppendorf; VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule 1; VE-Cadherin: Vascular endothelial cadherin; VASP: Vasodilator-stimulated phosphoprotein

## Acknowledgements

We thank the UKE Microscopy Imaging Facility (UMIF) for introduction, Stephanie Muhs and Dr. Saskia Grüb for technical assistance, AG Kneussel for supplying BDNF, mRFP-Rab5, mRFP-Rab7 and access to NTA. Furthermore, we thank Prof. Johanna Brander for help with dextran diffusion assay and are grateful for access to Visitrion system at AG Mikhaylova and technical assistance in live-cell imaging by Dr. Bas van Bommel and Yannes Popp. We also want to express special thanks to the Mildred-Scheel-Doktorandenprogramm (70113396) for funding this project.

## Authors' contributions

JA, JS, CB, CK, MS LOF, SW contributed by acquisition, analysis, and data interpretation. HS and MN participated in the design of this work. SW drafted and finalized the manuscript. SW created the concept and coordinated this work. All authors have read, revised, and approved the final manuscript.

## Authors' information

Julia Arnold and Juliana Schattschneider share the first authorship. Department of Biochemistry and Signal Transduction, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, Germany. Julia Arnold, Juliana Schattschneider, Christine Blechner, Marcus Nalaskowski, Sabine Windhorst. Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Mass Spectrometric Proteomics, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany. Christoph Krisp, Hartmut Schlüter. Core Facility Morphology und Electron Microscopy, Center for Molecular Neurobiology Hamburg, ZMNH, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Falkenried 94, 20251 Hamburg, Germany. Michaela Schweizer. Department of Gynecology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, Germany. Leticia Oliveira Ferrer

## Funding

Julia Arnold received a grant from the Mildred-Scheel-Foundation of the German Cancer Aid. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

## Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article and its Supplementary files.



**Ethics approval and consent to participate**

All patients gave written approval for the utilisation of their tissue samples and the reviewing of their medical records according to our investigational review board and ethics committee guidelines (Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg, #OB/V/03).

**Consent for publication**

Not applicable.

**Competing interests**

The authors declare that they have neither financial nor non-financial competing interests.

**Author details**

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Signal Transduction, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, Germany. <sup>2</sup>Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Mass Spectrometric Proteomics, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany. <sup>3</sup>Core Facility Morphology und Electron Microscopy, Center for Molecular Neurobiology Hamburg, ZMNH, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Falkenried 94, 20251 Hamburg, Germany. <sup>4</sup>Department of Gynecology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, Germany.

Received: 23 April 2020 Accepted: 14 September 2020

Published online: 30 September 2020

**References**

- Hosonaga M, Saya H, Arima Y. Molecular and cellular mechanisms underlying brain metastasis of breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2020;39:711–20.
- Hempel D, Ebner F, Garg A, Trepotec Z, Both A, Stein W, et al. Real world data analysis of next generation sequencing and protein expression in metastatic breast cancer patients. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–7 [cited 2020 Aug 23]. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67393-9>.
- Ren D, Cheng H, Wang X, Vishnoi M, Teh BS, Rostomily R, et al. Emerging treatment strategies for breast cancer brain metastasis: from translational therapeutics to real-world experience. *Ther Adv Med Oncol.* 2020;12(6):1–10 Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1758835920936151>.
- Schoumacker M, Goldman RD, Louvard D, Vignjevic DM. Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia. *J Cell Biol.* 2010;189(3):541–56.
- Yamaguchi H, Condeelis J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2007; 1773(5):642–52.
- Gadadhar S, Bodakuntla S, Natarajan K, Janke C. The tubulin code at a glance. *J Cell Sci.* 2017;130:1347–53.
- Yu J, Garnham CP, Roll-Mecak A. Writing and reading the tubulin code. *J Biol Chem.* 2015;290(28):17163–72.
- Janke C, Bulinski JC. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12: 773–86.
- Ludueña RF. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int Rev Cytol.* 1997;178:207–75.
- Eddé B, Rossier J, Le Caer JP, Desbruyères E, Gros F, Denoulet P. Posttranslational glutamylation of  $\alpha$ -tubulin. *Science.* 1990;247(4938):83–5.
- Alexander JE, Hunt DF, Leao MK, Shabanowitz J, Michel H, Berlin SC, et al. Characterization of posttranslational modifications in neuron-specific class III beta-tubulin by mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(June): 4685–9.
- Rüdiger M, Plessman U, Klöppel K, Wehland J, Weber K. Class II tubulin, the major brain beta-tubulin isoform is polyglutamylated on glutamic acid residue 435. *FEBS Lett.* 1992;308(1):101–5.
- Redeker V, Melki R, Promé D, Le Caer J-P, Rossier J. Structure of tubulin C-terminal domain obtained by subtilisin treatment - the major alpha- and beta-tubulin isoforms from pig brain are glutamylated. *FEBS Lett.* 1992; 313(2):185–92.
- van Dijk J, Rogowski K, Miro J, Lacroix B, Eddé B, Janke C. A targeted multienzyme mechanism for selective microtubule Polyglutamylation. *Mol Cell.* 2007;26(3):437–48.
- Bonnet C, Boucher D, Lazereg S, Pedrotti B, Islam K, Denoulet P, et al. Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP 1A, MAP 1B, and MAP 2 by tubulin Polyglutamylation. *J Biol Chem.* 2001; 276(16):12839–48.
- Boucher D, Larcher JC, Gros F, Denoulet P. Polyglutamylation of tubulin as a progressive regulator of in vitro interactions between the microtubule-associated protein tau and tubulin. *Biochemistry.* 1994;33(41):12471–7.
- Ikegami K, Heier RL, Taruishi M, Takagi H, Mukai M, Shimma S, et al. Loss of  $\alpha$ -tubulin polyglutamylation in ROSA22 mice is associated with abnormal targeting of KIF1A and modulated synaptic function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(9):3213–8.
- Larcher JC, Boucher D, Lazereg S, Gros F, Denoulet P. Interaction of kinesin motor domains with  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin subunits at a tau-independent binding site: regulation by polyglutamylation. *J Biol Chem.* 1996;271(36): 22117–24.
- Balabanian L, Chaudhary AR, Hendricks AG. Traffic control inside the cell: microtubule-based regulation of cargo transport. *Biochem Soc.* 2018;40(2):14–7.
- Palmulli K, Van Niel G. To be or not to be... secreted as exosomes, a balance finely tuned by the mechanisms of biogenesis. *Essays Biochem.* 2018;62(2): 177–91.
- Hessvik NP, Lorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(2):193–208.
- Bebelmann MP, Smit MJ, Pegtel DM, Baglio SR. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacol Ther.* 2018;188:1–11.
- Tominaga N, Kosaka N, Ono M, Katsuda T, Yoshioka Y, Tamura K, et al. Brain metastatic cancer cells release microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood-brain barrier. *Nat Commun.* 2015;6: 6716.
- Stamm H, Oliveira-Ferrer L, Grossjohann EM, Muschhammer J, Thaden V, Brauneck F, et al. Targeting the TIGIT-PVR immune checkpoint axis as novel therapeutic option in breast cancer. *Oncoimmunology.* 2019;8(12):e1674605 [cited 2020 Aug 23]. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2162402X.2019.1674605>.
- Oliveira-Ferrer L, Kürschner M, Labitzky V, Wicklein D, Müller V, Lüers G, et al. Prognostic impact of transcription factor Fra-1 in ER-positive breast cancer: contribution to a metastatic phenotype through modulation of tumor cell adhesive properties. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2015;141(10):1715–26 [cited 2020 Aug 23]. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00432-015-1925-2>.
- Heinz LS, Muhs S, Schiewek J, Grüb S, Nalaskowski M, Lin YN, et al. Strong fascin expression promotes metastasis independent of its F-actin bundling activity. *Oncotarget.* 2017;8(66):110077–91.
- Théry C, Clayton A, Amigorena S, Raposo G. Isolation and characterization of Exosomes from cell culture supernatants. *Curr Protoc Cell Biol.* 2006;30(11):3. 22.1–3.22.29.
- Vonderheit A, Helenius A. Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. *PLoS Biol.* 2005;3(7):1225–38.
- Tinevez JY, Perry N, Schindelin J, Hoopes GM, Reynolds GD, Laplantine E, et al. TrackMate: an open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods.* 2017;115:80–90.
- Regnard C, Desbruyères E, Huet JC, Beauvallet C, Pernollet JC, Eddé B. Polyglutamylation of nucleosome assembly proteins. *J Biol Chem.* 2000; 275(21):15969–76.
- Van Dijk J, Miro J, Strub JM, Lacroix B, Van Dorsselaer A, Edde B, et al. Polyglutamylation is a post-translational modification with a broad range of substrates. *J Biol Chem.* 2008;283(7):3915–22.
- Sirajuddin M, Rice LM, Vale RD. Regulation of microtubule motors by tubulin isoforms and post-translational modifications. *Nat Cell Biol.* 2014;16(4):335–44.
- Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013;200(4):373–83.
- Janke C, Magiera MM. The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020; Available from: <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0214-3>.
- Roll-Mecak A. The tubulin code in microtubule dynamics and information encoding. *Dev Cell.* 2020;54(1):7–20 Available from: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.06.008>.
- Raiborg C, Wenzel EM, Pedersen NM, Olsvik H, Schink KO, Schultz SW, et al. Repeated ER-endosome contacts promote endosome translocation and neurite outgrowth. *Nature.* 2015;520(7546):234–8.
- Loubéry S, Wilhelm C, Hurbain I, Neveu S, Louvard D, Coudrier E. Different microtubule motors move early and late endocytic compartments. *Traffic.* 2008;9(4):492–509.

38. Taverna S, Flugy A, Saieva L, Kohn EC, Santoro A, Meraviglia S, et al. Role of exosomes released by chronic myelogenous leukemia cells in angiogenesis. *Int J Cancer*. 2012;130(9):2033–43.
39. Whipple RA, Matrone MA, Cho EH, Balzer EM, Vitolo MI, Yoon JR, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition promotes tubulin detyrosination and microtentacles that enhance endothelial engagement. *Cancer Res*. 2010;70(20):8127–37.

#### **Publisher's Note**

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

**Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:**

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

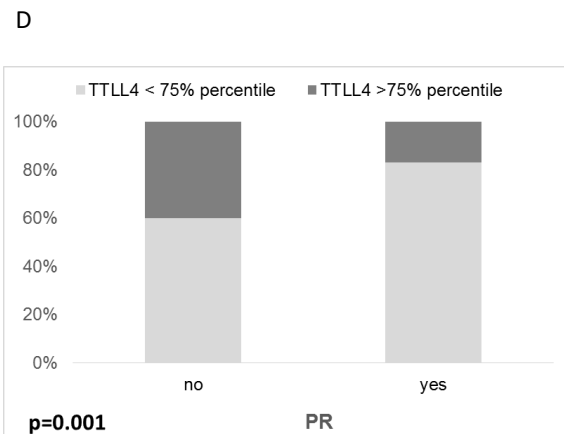
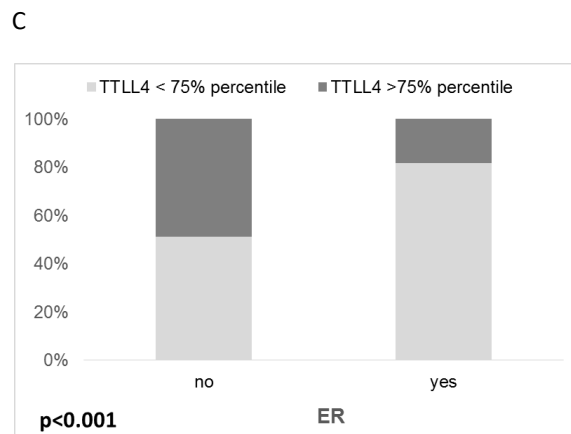
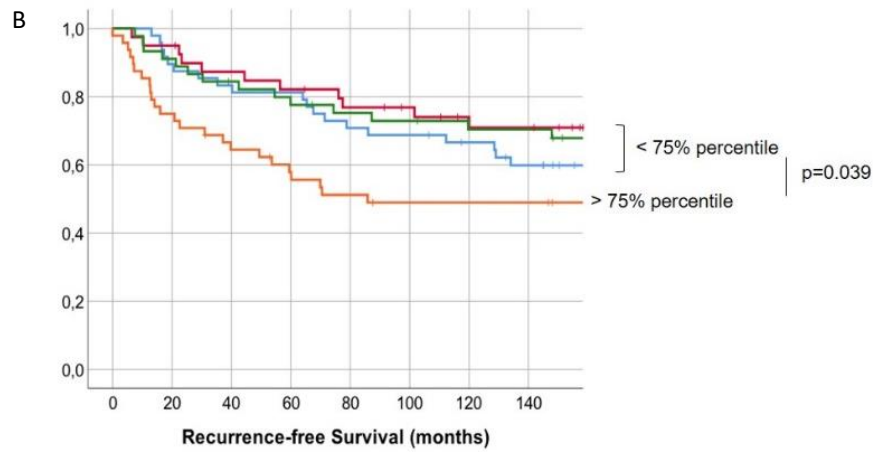
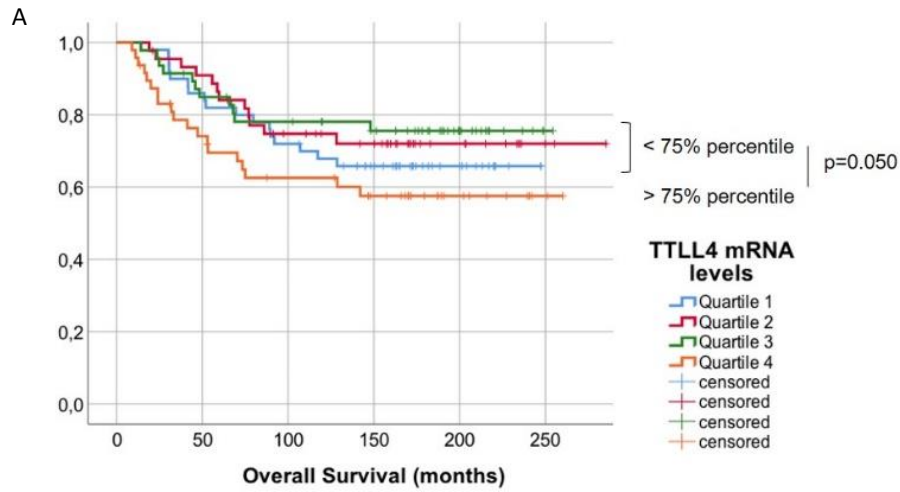
**At BMC, research is always in progress.**

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)

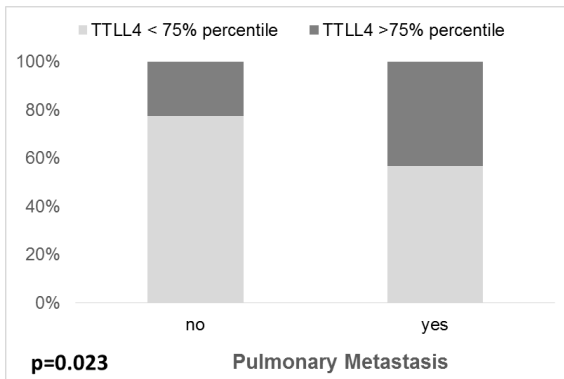


## 2. Publikationsanhang

### Supplementary Figure S1

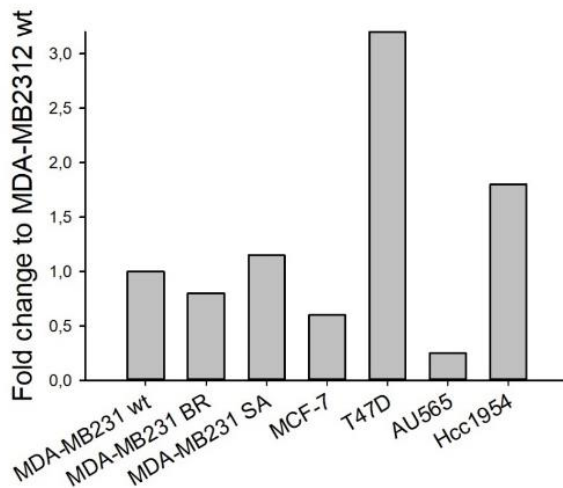


E



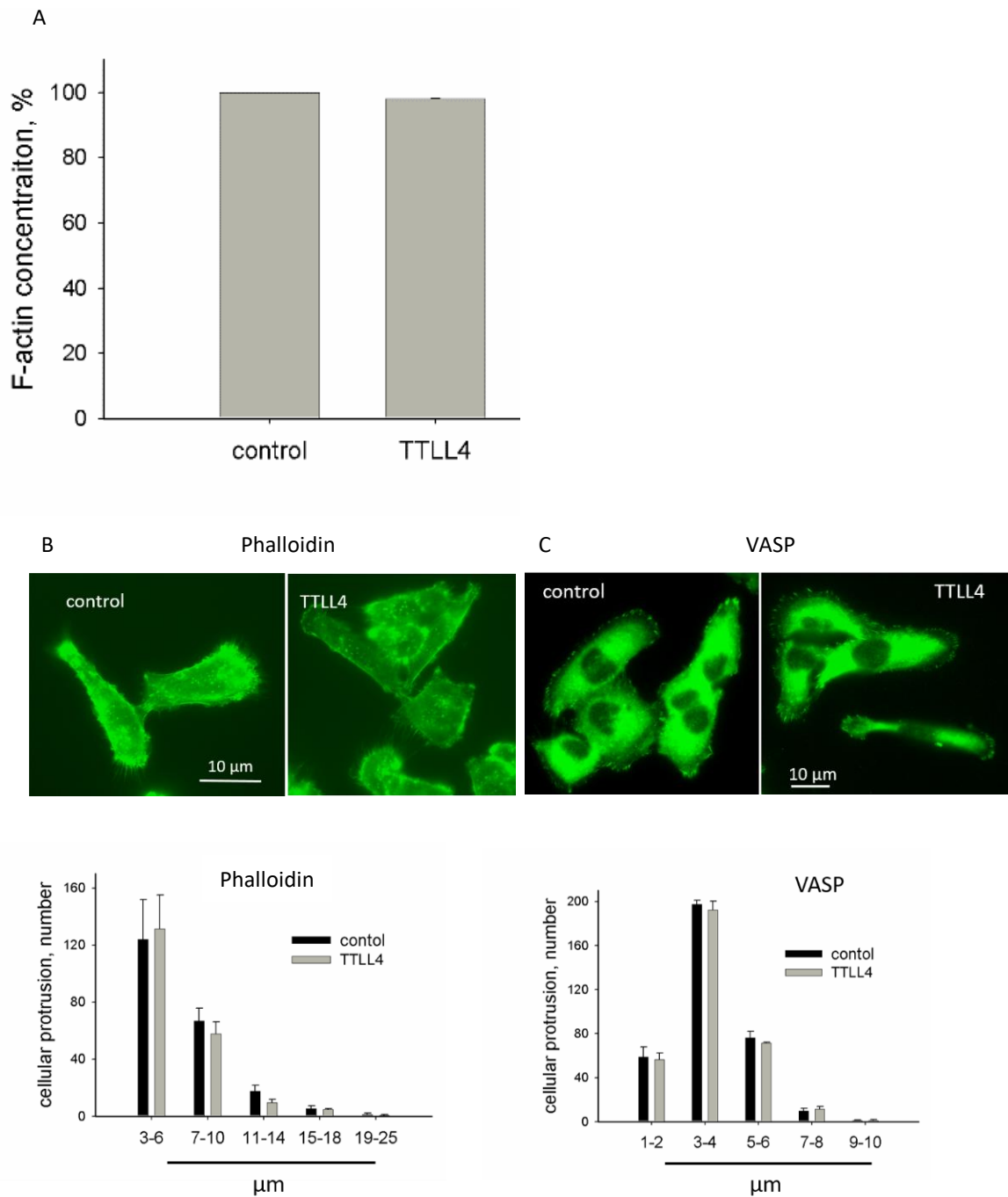
Clinical relevance of TLL4 levels for breast cancer patients. Kaplan-Meier analysis show TLL4 mRNA levels of all four quartiles for overall survival and shorter recurrence-free survival. A high correlation is shown by p-values after log-rank tests comparing two groups (TLL4 levels < 75% vs. TLL4 levels > 75%). (C-E). Significant associations of high TLL4 levels with negative estrogen (ER) levels (C), negative progesterone (PR) levels (D), and lung metastasis formation (E) are shown. P-values after  $\chi^2$ -Test are given.

### Supplementary Figure S2



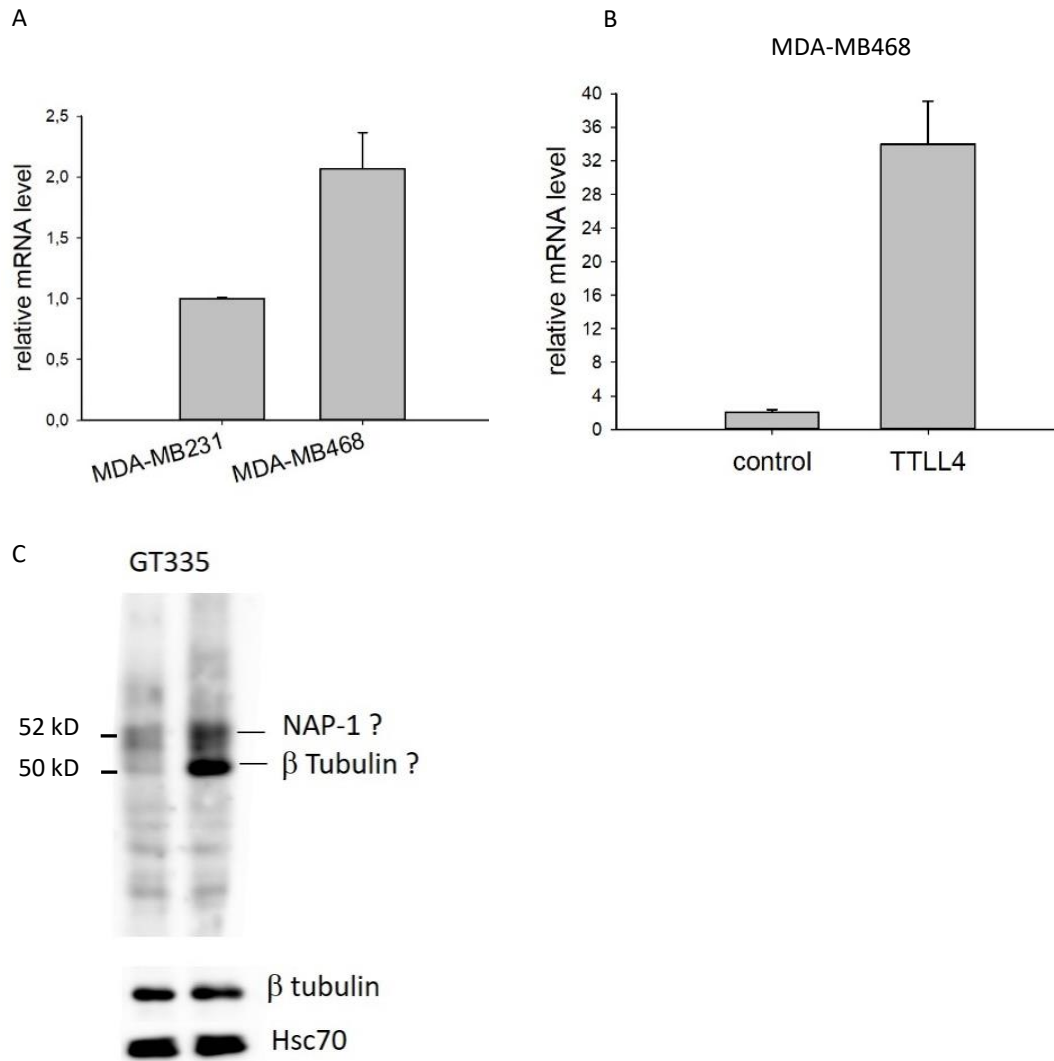
TLL4 mRNA expression of different breast cancer cells lines. mRNA expression of TLL4 was analyzed by real-time PCR and normalized to the value of MDA-MB231 cells. MDA-MB231-BR = cells that preferentially metastasize to the brain. MDA-MB231-SA = cells that preferentially metastasize to the bone.

### Supplementary Figure S3



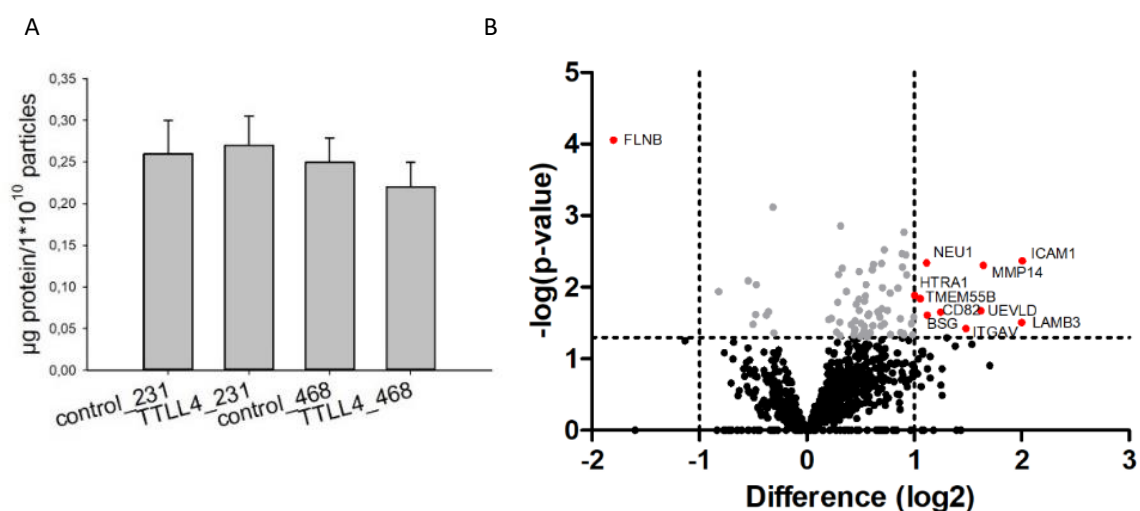
Effect of TTLL4 on actin dynamics. (A) F-actin concentration of phalloidin-stained cells. (B, D). Cellular protrusions were stained by AF-488 coupled phalloidin (B) or by an AF-488 coupled antibody against VASP (C). Mean values  $\pm$  SD of three different experiments are shown.

## Supplementary Figure S4



Overexpression of TLL4 in MDA-MB468 cells. (A) TLL4 mRNA levels of MDA-MB231 and MDA-MB468 control cells, normalized to TLL4 mRNA from MDA-MB231 cells. (B) TLL4 mRNA levels of MDA-MB468 control cells and cells treated with a lentiviral vector coding for TLL4, normalized to TLL4 mRNA from control MDA-MB468 cells. (C) Protein lysates from control and TLL4 overexpressing MDA468 cells were analyzed for polyglutamylation by western blotting using the GT335 antibody. Detection of  $\beta$ -tubulin and Hsc70 served as loading control.

## Supplementary Figure S5



Concentration and volcano plot of proteins regulated in EV derived from TTLL4 overexpressing cells. (A) Protein concentration of EV was determined by the Bradford assay and particles/ml by NTA. From the resulting values,  $\mu\text{g}/1 \times 10^{10}$  particles were calculated. Shown are mean values  $\pm$  SD of four different determinations. (B) EV proteins from control or TTLL4 overexpressing cells were analyzed by mass spectrometry and the log ratios of TTLL4 vs. control proteins were calculated.

### Additional File: mass spectrometry of exosomes

Exosome samples were lysed in 100 mM ammonium bicarbonate (Thermo Fisher) and 1% w/v sodium deoxycholate (SDC, Sigma Aldrich) buffer boiled at 95 °C for 5 min and sonicated with a probe sonicator to destroy DNA/RNA. 10  $\mu\text{g}$  of protein was used and reduced in presence of 10 mM dithiothreitol (DTT, Sigma Aldrich) at 60 °C for 30 min and alkylated with 20 mM iodoacetamide (IAA, Sigma Aldrich) for 30 min in the dark at 37 °C. Trypsin (sequencing grade, Promega) was added at a 1:100 ratio (enzyme to protein) and digestion was performed overnight at 37 °C. To stop the reaction and precipitate the SDC, formic acid (FA, Fluka) was added to 1% final concentration. The samples were centrifuged for 5 min at 16.000 g, the supernatant was transferred into a new tube and was dried in a vacuum centrifuge. For LC-MS/MS analyses, samples were resuspended in 0.1% FA at a concentration of 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

LC-MS/MS measurements were done on a Quadrupole Orbitrap hybrid mass spectrometer (Q Exactive, Thermo Fisher) coupled to a UPLC system (nanoAcquity, Waters). For analysis, 1  $\mu\text{g}$  of peptides were loaded by autosampler injection onto a C18 reversed-phase (RP) trap column (Symmetry C18 trap column, 100 Å pore size, 5  $\mu\text{m}$  particle diameters, 180  $\mu\text{m}$  x 20 mm) and separated on a 25 cm C18 RP (Peptide BEH C18 column, 130 Å pore size, 1.7  $\mu\text{m}$  particle diameters, 75  $\mu\text{m}$  x 250 mm). Trapping was done for 5 min at a flow rate of 15  $\mu\text{l}/\text{min}$  with 99% solvent A (0.1% FA) and 1% solvent B (0.1% FA in ACN). Separation and elution of peptides

were achieved by a linear gradient from 1 to 30% solvent B in 60 min. The eluting peptides were transferred in an Orbitrap Q Exactive mass spectrometer. MS1 scans were performed in positive mode over a scan range of 400-1300 m/z. The Orbitrap resolution was set to 70.000 with an AGC target of  $1 \times 10^6$  and a maximum injection time of 240 ms. Peptides with charge states between 2+ - 5+ above an intensity threshold of 100.000 were isolated with a 2 m/z isolation window in Top12 mode and fragmented with a normalized collision energy of 28%. The fragments were measured with an Orbitrap resolution of 17.500, AGC target of  $1 \times 10^5$  and 50 ms maximum injection time. Already fragmented peptides were excluded for 20 seconds. The collected raw files were searched against the reviewed human protein sequence database (Uniprot, EMBL, release April 2018 with 20260 entries) and the reviewed bovine protein sequence database (Uniprot, EMBL, release June 2020, 6012 entries). They were processed with the Andromeda Algorithm included in the MaxQuant Software (Max Plank Institute for Biochemistry, Version 1.6.2.10). All samples were handled as individual experiments and the label-free quantification option with a match between runs was used. Trypsin was selected as enzyme used to generate peptides, allowing a maximum of two missed cleavages. A minimal peptide length of 6 amino acids and maximal peptide mass of 6000 Da was defined. Oxidation of methionine, acetylation of protein N-termini and the conversion of glutamine to pyro-glutamic acid were set as variable modification. The carbamidomethylation of cysteines was selected as fixed modification. The error tolerance for the first precursor search was 20 ppm, for the following main search 4.5 ppm. Fragment spectra were matched with 20 ppm error tolerance. The false discovery rate for peptide spectrum matches and proteins were set to 1%. For quantification, all identified razor and unique peptides were considered. The ProteinGroups.txt result file from MaxQuant was filtered for proteins derived from human origin or proteins showing more or equal numbers of unique peptides from human and bovine origin. Proteins only derived from bovine origin or with a higher number of unique peptides from bovine origin were removed. The reduced ProteinGroup.txt file was loaded into Perseus software (Max Plank Institute for Biochemistry, Version 1.5.8.5). To perform data normalization and statistical testing, Student's T-Test was used. Proteins present in at least three of four biological replicates in at least one condition were considered for the quantitative analysis. Considered proteins were uploaded together with p-value and fold change information (proteins exclusively found in one condition were included with either positive or negative infinite values) into ingenuity pathway analysis software (QIAGEN) and a core analysis was performed.



### 3. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALIX	<i>apoptosis-linked gene 2 interacting protein X</i>
ANP32	<i>acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32</i>
Bax	<i>bcl-2-associated X protein</i>
BBB	<i>blood-brain-barrier</i> , Blut-Hirn-Schranke
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
CDKN1A/p21CIP1	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i>
CMFDA	5-Chloromethylfluoresceindiacetat
cMTBD	<i>cationic microtubule-binding domain</i> , kationische Mikrotubuli-Bindedomäne
CTT	<i>C-terminal tail</i> , C-terminale Kette
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	<i>desoxyribonuclein acid</i>
EB1	<i>microtubule-associated protein RP/ EB family member 1</i>
ER	<i>estrogen receptor</i> , Östrogenrezeptor
EV	<i>extracellular vesicles</i> , extrazelluläre Vesikel
EZM	Extrazellulärmatrix
F-Aktin	filamentöses Aktin
FLOT1	<i>flotillin-1</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Glu / E	Glutaminsäure
HeLa	Henrietta Lacks
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i> , humaner Epidermaler Wachstumsrezeptor 2
HNRNPK	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K</i>
Hsc70	<i>heat shock cognate 71 kDa protein</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
ILF2/NF45	<i>interleukin enhancer-binding factor 2</i>
ILV	<i>intraluminal vesicle</i> , intraluminale Vesikel
IPA	<i>Integrated Pathway Analysis</i>
KLF4	<i>Kruppel-like factor 4</i>
lncRNA	<i>long non-coding ribonuclein acid</i>
MAP	<i>microtubule-associated protein</i>
MAP2	<i>microtubule-associated protein 2</i>
miRNA	<i>micro ribonuclein acid</i>
mRFP	<i>monomeric red fluorescent protein</i>
mRNA	<i>messenger ribonuclein acid</i>
MT	Mikrotubuli
rnaMVB	<i>multivesicular body</i> , multivesikuläre Körper
NAP1	<i>nucleosome assembly protein</i> , Gensymbol NAP1L1
NAP2	<i>nucleosome assembly protein 2</i> , Gensymbol NAP1L4
NCL	<i>nucleolin</i>
ncRNA	<i>non-coding ribonuclein acid</i>

NEK5	<i>never in mitosis gene A (NIMA)-related kinase 5</i>
RNAseq	RNA-Sequenzierung
NPM/B23	<i>nucleophosmin</i>
NTA	<i>Nanoparticle Trafficking Analysis</i>
PELP1	<i>proline, glutamate, and leucine-rich protein 1</i>
PR	<i>progesteron receptor, Progesteronrezeptor</i>
PTM	posttranslationale Modifikation
qRT-PCR	quantitative reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
Rab	<i>Ras-related protein</i>
RAD54	<i>DNA repair and recombination protein RAD54</i>
RANGAP	<i>Ran-specific GTPase-activating protein</i>
SET/PHAPII	<i>protein SET</i>
shRNA	<i>small hairpin ribonuclein acid</i>
siRNA	<i>short interfering ribonuclein acid</i>
TAU/MAPT	<i>microtubule-associated protein tau</i>
TEM	Transmissionselektronen-Mikroskopie
TNBC	<i>triple-negative breast cancer</i>
TP53/p53	<i>cellular tumor antigen p53</i>
TTLL	<i>Tubulin Tyrosine Ligase Like</i>
Tuba4a $\Delta$ polyGlu	$\alpha$ -Tubulin mit Substitution C-terminaler Glutamylierungsstellen
Tub $\Delta$ Cter	Tubulin mit Deletion der C-terminalen Kette
UCCH	Universitäres Cancer Center Hamburg
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UMIF	UKE Microscopy Imaging Facility
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
z.B.	zum Beispiel
ZO-1	<i>zonula occludens-1</i>

## 4. Darstellung der Publikation

### 4.1 Einleitung

Gehirnmetastasen treten bei 10 bis 30 % aller Patient:innen mit Mammakarzinom auf (Brosnan and Anders 2018). Gehäuft kommt dies bei den Subgruppen des *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2)-positiven und Hormonrezeptor-negativen Mammakarzinoms (*triple-negative breast cancer* (TNBC)) vor. Gehirnmetastasen sind therapeutisch herausfordernd und die Patient:innen überleben selten zwei Jahre (Darlix et al. 2019; Martin et al. 2017; Kim, Kim, und Kim 2018).

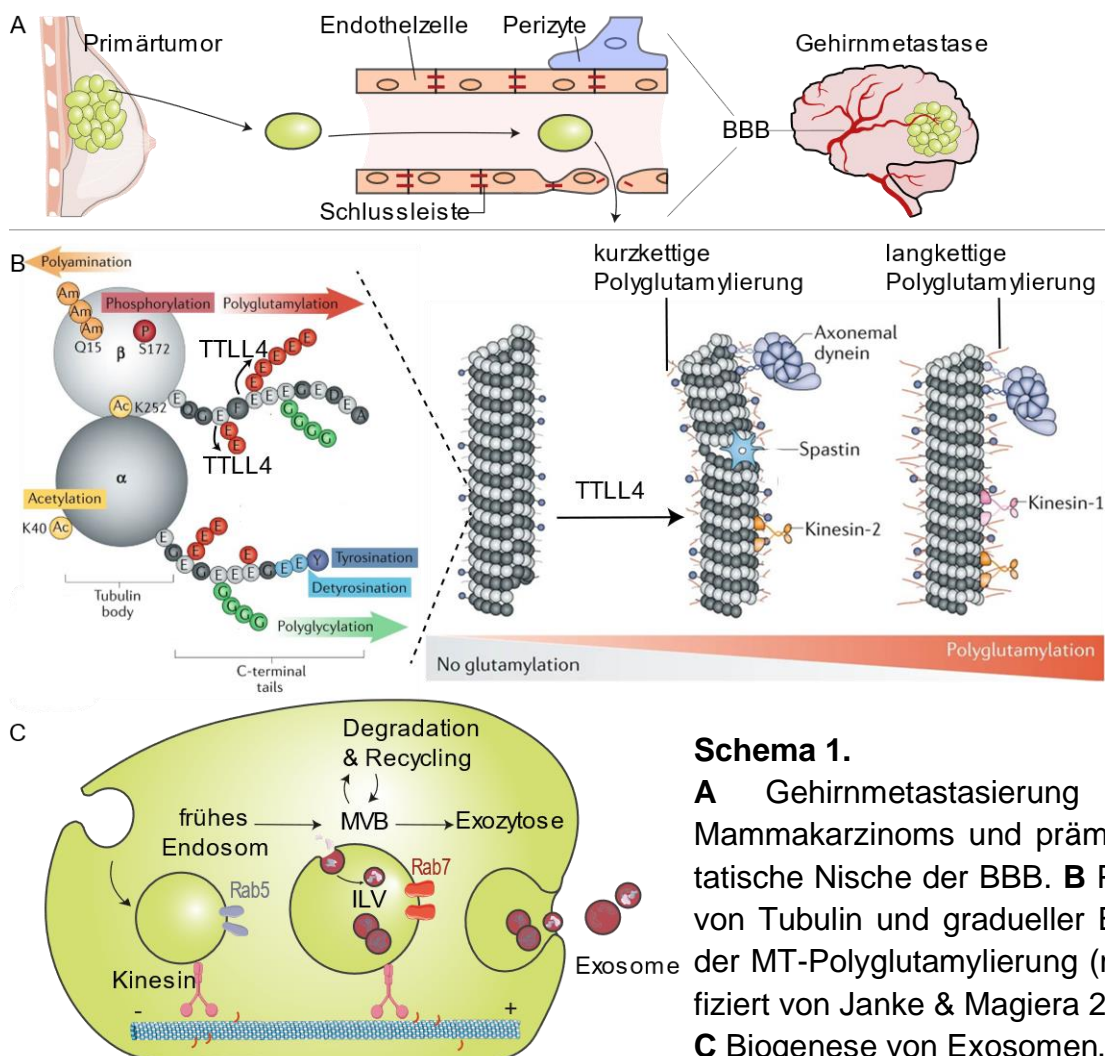
Die Gehirnmetastasierung des Mammakarzinoms erfordert wie jede Metastasierung einen komplexen, mehrschrittigen Prozess. Dieser beginnt mit (1) der Ablösung der Tumorzellen vom Primarius und (2) der Migration durch das Extrazellulärgewebe zur (3) Intravasation in das Lymph- oder Blutgefäßsystem. Sofern (4) die zirkulierenden Tumorzellen intravasal überleben, folgt (5) die Primarius-ferne Extravasation und darauf (6) die Invasion in das Extrazellulärgewebe. Dort kommt es zum (7) Wachstum einer metastatischen Absiedelung mit Adaptation und Einflussnahme auf das neue Tumor-*microenvironment* (Majidpoor and Mortezaee 2021).

Bei der Gehirnmetastasierung wirkt die Blut-Hirn-Schranke (*blood-brain-barrier*, BBB) der Extravasation und Invasion entgegen. Deren Gefäßintegrität sowie Permeabilität wird durch Adhäsionsverbindungen (engl.: *adherens junctions*) und die Schlussleiste (engl. *tight junctions*) zwischen den Endothelzellen aufrechterhalten. Die Permeabilität der BBB ist streng reguliert, um das Gehirn als immunprivilegiertes Organ für dessen optimale Funktionsfähigkeit zu schützen. Die induzierte Destruktion oder Dislokalisierung von essenziellen Komponenten der Gefäßbarriere (*vascular endothelial cadherin*, *zonula occludens-1* (ZO-1), *occludin* oder *claudin-5*) steigert die Permeabilität (Cen et al. 2019; Tominaga et al. 2015; Zhou et al. 2014; Chen et al. 2021). Dies erleichtert die transendotheliale Migration der zirkulierenden Tumorzellen während der Extravasation. Die gezielte Manipulation der zu überwindenden Barriere schafft somit eine prä-metastatische Nische und fördert die Metastasierung (Schema 1A). Ebenso wird für die prä-metastatische Nische das Primarius-ferne Tumor-*microenvironment* beeinflusst (Langley and Fidler 2011; Majidpoor and Mortezaee 2021).

Für die Adhäsion und Transmigration der Tumorzellen durch die BBB ist die präzise Regulation des Zytoskeletts entscheidend (Schoumacher et al. 2010). Die Zytoskelett-modifizierenden Proteine sind daher als potenzielle Zielstruktur zur Verhinderung und Therapie der Gehirnmetastasierung von Interesse. Das Zytoskelett besteht hauptsächlich aus drei Filament-Typen, welche miteinander interagieren: (1) Aktinfilamente, (2) Mikrotubuli (MT) und (3) Intermediärfilamente. Filamentöses Aktin (F-Aktin) ist an der Zellstabilität, -kontraktion, intrazellulären Transport sowie an der Bildung von zellulären Fortsätzen beteiligt. Diese sind notwendig für (1) die Adhäsion, (2) Chemotaxis über Filopodien, (3) Migration über Lamellipodien und (4) Invasion über Invadopodien von metastasierenden Tumorzellen. Die Aktin-reichen

Strukturen interagieren mit MT und werden dynamisch auf- und abgebaut (Yamaguchi and Condeelis 2007).

Einen bedeutenden Anteil des Zytoskeletts stellt jedoch das hochdynamische MT-Netzwerk dar. Es besteht aus röhrenförmigen Polymeren, die von Proteindimeren je eines  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulins geformt werden. Sie agieren als Mitosespindeln und sind an der Motilität von Zellfortsätzen sowie an einem großen Anteil des intrazellulären Transports beteiligt. Durch die differenzierte Expression verschiedener Tubulin-Isoformen und vielfältigen posttranslationalen Modifikationen (PTMs) können die MT-Funktionen zeitlich, situativ und lokalisiert koordiniert werden. PTMs werden durch unterschiedliche Enzyme ermöglicht, welche Acetylierung, Aminierung, Phosphorylierung, Tyrosinierung, (Poly-) Glycylierung und (Poly-) Glutamylierung an Tubulindimeren oder Tubulinpolymeren hinzufügen oder entfernen können. Da unterschiedliche PTMs in räumlicher Nähe zeitgleich auftreten, ist eine Interaktion zu vermuten. Daraus resultiert eine enorme, präzise adjustierbare Modifikationsvielfalt der Interaktionsfläche von MT mit Enzymen, Binde- und Transportproteinen. Das dynamische MT-Netzwerk mit seinen PTMs wird als sogenannter „*tubulin code*“ stetig weiter entziffert (Gadadhar et al. 2017; I. Yu, Garnham, und Roll-Mecak 2015).



**Schema 1.**

**A** Gehirnmastasierung des Mammakarzinoms und prämetastatische Nische der BBB. **B** PTMs von Tubulin und gradueller Effekt der MT-Polyglutamylierung (modifiziert von Janke & Magiera 2020). **C** Biogenese von Exosomen.

Der Fokus dieser Arbeit liegt bei der *Tubulin Tyrosine Ligase Like* (TTLL) 4, welche wie TTLL5 und TTLL7 eine Monoglutamylasen bzw. Initiasen ist. Sie leiten an Erkennungssequenzen in der C-terminalen Kette (*C-terminal tail*, CTT) von polymerisierten Tubulin die PTM ein. Dazu werden einzelne Glutamylreste der Glutaminsäure (Glu / E) angehängt. Die Initiasen bilden kurze Glu-Ketten am CTT, welche mit weiteren Glutamylresten durch Elongasen (TTLL1, TTLL6, TTLL11 und TTLL13) graduell verlängert werden können (Eddé et al. 1990; Alexander et al. 1991; Rüdiger et al. 1992; Redeker et al. 1992). TTLL4 glutamyliert als Initiase bevorzugt  $\beta$ -Tubuline (Schema 1B) und einzelne Nicht-Tubulin-Proteine wie *nucleosome assembly protein 1* (NAP1) (Van Dijk et al. 2008; Mahalingan et al. 2020). Die Polyglutamylie rung verändert graduell und lokal die negative Ladung der CTT an der MT-Außen seite. Dadurch wird die Interaktion mit MT-assoziierten Proteinen (*microtubule-associated proteins*, MAPs) und Motorproteinen koordiniert (Schema 1B; Larcher et al. 1996; Ludueña 1997; Janke und Magiera 2020; Roll-Mecak 2020).

Motorproteine transportieren intrazellulär verschiedene Vesikel, wie Endosome. Endosome können durch Invagination der Endosomenwand intraluminale Vesikel (*intraluminal vesicle*, ILV) bilden und zu multivesikulären Körpern (*multivesicular body*, MVB) reifen. Anschließend können diese MVBs entlang der MT, mit Lysosomen fusionieren oder in Richtung Zellmembran transportiert werden. Durch Fusion mit der Zellmembran können die ILVs als Exosomen außerhalb der Zelle sezerniert werden (Schema 1C; Palmulli und Van Niel 2018). Aufgrund spezifischer Beladungs- und Sortierungsmechanismen der reifenden MVB, transportieren Exosome verschiedene Proteine, *micro ribonuclein acid* (miRNA) und *desoxyribonuclein acid* (DNA). Sie erreichen einen Durchmesser von 50 nm bis 150 nm und können von benachbarten sowie fernen Zellen aufgenommen werden (Hessvik and Llorente 2018). Das Exosomen-Cargo beeinflusst die Funktion der aufnehmenden Zellen und kann somit eine prä-metastatische Nische schaffen. Exosome sind eine Subgruppe der extrazellulären Vesikel (EV), welche aus Zellkultur-Medium sowie Körperflüssigkeiten isoliert und charakterisiert werden können. Die pathologische EV-Biogenese sowie deren Effekt auf EV-aufnehmende Zellen sind komplex und aktueller Gegenstand der Forschung (Bebelman et al. 2018; Tominaga et al. 2015).

Um den Zusammenhang zwischen TTLL4-Überexpression und der gesteigerten Gehirnmetastasierung zu entschlüsseln, wird hiermit die „*transport-shapes-signature*“-Hypothese aufgestellt. Es ist zu vermuten, dass eine TTLL4-vermittelte Transportmodulation die Exosomen-Biogenese zugunsten einer pro-metastatischen EV-Signatur beeinflusst und diese EV eine prä-metastatische Nische schaffen.

Diese Arbeit basiert auf der von Prof. Oliveira-Ferrer durchgeführten Expressionsanalyse von primären Mammakarzinom-Patient:innen und deren Klink. Als einzig dysreguliertes Gen mit Assoziation zum Zytoskelett wurde TTLL4 ermittelt. Da erhöhte TTLL4-Expression mit der Entstehung von Gehirnmetastasen bei Mammakarzinom-Patient:innen korreliert, wurde dessen direkter Einfluss auf zellulärer Ebene untersucht. Der indirekte Einfluss einer TTLL4-Überexpression wurde im Sinne der „*transport-shapes-signature*“-Hypothese hinsichtlich der EV-Signatur und des Effekts der EV auf das BBB-Modell geprüft.

## 4.2 Ergebnisse

### 4.2.1 TTLL4-mRNA Level korrelieren mit kürzerem krankheitsfreiem Überleben und Gehirnetastasen bei Mammakarzinom

Für das maligne Krankheitsfortschreiten des Mammakarzinoms wurde die Rolle des Zytoskeletts untersucht. Die Patient:innen-Charakteristika sind im Methodenteil der Publikation und in Oliveira-Ferrer et al. 2015 beschrieben. Mittels *microarrays* von primären Mammakarzinomen (n = 197) wurden dysregulierte Gene anhand signifikant veränderten *messenger RNA* (mRNA) Leveln identifiziert.

In Bezug auf das Zytoskelett korrelierten einzig die mRNA-Level des Proteins TTLL4 signifikant mit dem Auftreten von Gehirnetastasen. Die mRNA-Level von TTLL4 lagen signifikant erhöht bei 8,9 bis 1645,5 [relative Signalintensität] (Mittel:119,4 und Median:199,1; probeset 203702\_s\_at). Die Patient:innen wurden anhand der TTLL4 mRNA-Level in vier gleich große Gruppen aufgeteilt. Gemäß der Kaplan-Meier-Analyse in Abbildung (Abb.) S1B und Abb. S1A zeichnete das rezidivfreie Überleben sowie das Gesamtüberleben der drei Gruppen mit TTLL4 mRNA-Leveln bis < 75 % im Vergleich zur verbleibenden Gruppe gleichartig ab. Für die nachfolgenden Analysen wurden die drei Gruppen mit TTLL4 mRNA-Leveln bis < 75 % daher zusammengefasst und mit der verbleibenden Gruppe „TTLL4 > 75 %“ verglichen.

Die Gruppe „TTLL4 > 75 %“ wies ein signifikant kürzeres rezidivfreies Überleben (Abb. 1E, p = 0,039) und mit annähernder Signifikanz ein verkürztes Gesamtüberleben (Abb. S1A und 1F, p = 0,05) auf. Hinsichtlich des Tumorschweregrads konnte bei dieser Gruppe eine signifikante Assoziation zu positivem Lymphknotenstatus (Abb. 1A, p = 0,011) sowie stärkerer Entdifferenzierung (Abb. 1B, p = 0,018) erfasst werden. TTLL4 mRNA-Level > 75 % korrelierten mit fehlenden Östrogen- (*estrogen receptor*, ER) und Progesteronrezeptoren (*progesteron receptor*, PR) im Tumorgewebe (ER: Abb. S1C, p < 0,001; PR: Abb. S1D, p = 0,001). Infolgedessen waren bei den aggressiven Mammakarzinom-Subtypen HER2+ und TBNC signifikant höhere TTLL4 mRNA-Level nachweisbar als bei dem ER- und PR-positiven, luminalen Subtyp (Abb. 1C, p < 0,001).

Bezüglich des malignen Krankheitsfortschreitens kam es Subgruppen-übergreifend zu Tumorrezidiven. Die Betroffenen, deren Primärtumor höhere TTLL4 mRNA-Level aufwiesen, entwickelten im Vergleich zur Gruppe „TTLL4 < 75 %“ signifikant häufiger pulmonale Metastasen (Abb. S1E, p = 0,02) und stark signifikant Gehirnetastasen (Abb. 1D, p = 0,004).

Folglich sind erhöhte TTLL4 mRNA-Level im Mammakarzinom signifikant mit einem hohen Schweregrad und Gehirnetastasen assoziiert. Dies macht TTLL4 zu einem interessanten Zielprotein der Tumorthherapie. Dazu ist der direkte und indirekte prometastatische Einfluss von hohen TTLL4 mRNA-Leveln für die Malignität des Mammakarzinoms zu charakterisieren.

#### 4.2.2 TTLL4-Überexpression steigert die Mikrotubuli-Polyglutamylierung in Mammakarzinomzellen

Um den Einfluss einer TTLL4-Überexpression in Mammakarzinomzellen zu untersuchen, wurde TTLL4 in der TNBC-Zelllinie MDA-MB231 mit endogen niedriger TTLL4-Expression durch ein lentivirales Verfahren stabil überexprimiert (Abb. S2). Die resultierende TTLL4<sub>plus</sub>-Zelllinie wies in der quantitativen reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) ein 16-fach erhöhtes Level an TTLL4-mRNA auf (Abb. 2A).

Um die TTLL4-Aktivität im TTLL4<sub>plus</sub>-Modell und den Kontrollzellen zu quantifizieren, wurde eine Immunopräzipitation mit dem IgG-gekoppelten Antikörper GT335 gegen (poly-)glutamylierte Proteine durchgeführt. Anschließend wurden die isolierten polyglutamylierten Proteine auf den Anteil von  $\beta$ -Tubulin sowie NAP1 untersucht (Abb. 2B). NAP1 ist ein Nicht-Tubulin-Substrat von TTLL4 (Van Dijk et al. 2008) und beteiligt an der Histonanordnung sowie an der Zellzyklusregulation (Kellogg et al. 1995). Normalisiert auf die IgG-Signalstärke zeigte die 55 kDa-Bande, welche der Masse von  $\beta$ -Tubulin entspricht, eine 2,5-fache Steigerung der Polyglutamylierung. Für NAP1 ist über die zugehörige 52 kDa-Bande eine 1,5-fache Erhöhung an Polyglutamylierung im TTLL4<sub>plus</sub>-Modell zu erkennen. Somit führt eine gesteigerte TTLL4-Expression in MDA-MB231 Zellen primär zu intensivierter Polyglutamylierung von MT. Zur Bestätigung wurden die beiden Zelllinien fixiert und mit Antikörpern gegen Polyglutamylierung (GT335, grün),  $\beta$ -Tubulin (rot) und DNA (4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), blau) markiert (Abb. 2C). Die Fluoreszenzintensität wurde mittels Konfokal-Mikroskop visualisiert und mit ImageJ quantifiziert. Der polyglutamylierte Anteil an  $\beta$ -Tubulin erwies sich als signifikant höher in TTLL4<sub>plus</sub>-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 2C).

Die ab Kapitel 4.2.5 beschriebenen Experimente wurden um eine zweite TNBC-Zelllinie mit gleichartiger TTLL4-Überexpression erweitert. Die verwendete Zelllinie MDA-MB468 hat eine geringgradig höhere endogene TTLL4-Expression im Vergleich zu MDA-MB231 (Abb. S4A). Es konnte mittels qRT-PCR (Abb. S4B) die gesteigerten TTLL4 mRNA Level und mittels Western Blot (Abb. S4C) die gesteigerte Polyglutamylierung dieser TTLL4<sub>plus</sub>-Linie validiert werden.

Da das MT- und F-Aktin-Netzwerk des Zytoskeletts miteinander interagieren (Schoumacher et al. 2010), wurde der Einfluss von gesteigerter  $\beta$ -Tubulin-Polyglutamylierung auf die Aktindynamik untersucht. Dazu wurde die F-Aktin-Konzentration von Phalloidin-markierten Zellen (Abb. S3A) und die F-Aktin-abhängigen Zellausläufer (Filopodien, Lamellipodien, Invadopodien) quantifiziert (Abb. S3B, C). Zwischen den Kontroll- und TTLL4<sub>plus</sub>-Zellen ließen sich keine Unterschiede feststellen. Folglich beeinflusst die TTLL4-Überexpression die Interaktion zwischen MT- und F-Aktin-Netzwerk nicht.

Zusammenfassend führt die TTLL4-Überexpression zu einer signifikanten Polyglutamylierung von  $\beta$ -Tubulin und beeinflusst das F-Aktin-Netzwerk nicht. Dadurch lassen sich die metastasierungsfördernden Mechanismen ebenso wie potenziell therapeutische Angriffspunkte auf das MT-Netzwerk eingrenzen.

#### 4.2.3 TTLL4-Überexpression hat keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben und die Migration von Mammakarzinomzellen

Die selektive Überexpression eines Proteins sowie ein dysfunktionales MT-Netzwerk können Tumorzellen in ihrer Überlebensfähigkeit beeinträchtigen. Gleichmaßen kann eine Zytoskelettdysregulation durch eine entsprechende Überexpression die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen beeinflussen. Mittels eines Zell-Überlebensstests (*cell viability assay*) wurde nachgewiesen, dass TTLL4-Überexpression keinen signifikanten Effekt auf die Überlebensfähigkeit von Mammakarzinomzellen hat (Abb. 4A).

Die planare Migration stellte sich im *scratch assay* im TTLL4<sub>plus</sub>-Modell tendenziell reduziert dar (Abb. 4B). Im *transwell assay* zeigte sich bei TTLL4-Überexpression ein Trend zur gesteigerten Transmigration (Abb. 4C). Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass TTLL4-Überexpression weder das Tumorzellüberleben, die Migrations- noch die Transmigrationsfähigkeit signifikant beeinflusst. Das in 4.2.1 dargestellte maligne Krankheitsfortschreiten wird daher potenziell indirekt vermittelt.

#### 4.2.4 TTLL4-Überexpression beschleunigt sekretorische Vesikel und Multi-vesikuläre Körper

Die MT-Polyglutamylierung modifiziert die Interaktionsfläche zu Motorproteinen und reguliert dadurch den intrazellulären Vesikeltransport (Larcher et al. 1996; Ikegami et al. 2007; Sirajuddin, Rice, und Vale 2014). Im Rahmen der „*transport-shapesignature*“-Hypothese wurde daher der Transport von sekretorischen Vesikeln, frühen Endosomen und MVBs analysiert.

TTLL4<sub>plus</sub>- und Kontrollzellen wurden dazu separat mit folgenden Konstrukten transfiziert: *green fluorescent protein* gekoppelt an *brain-derived neurotrophic factor* (GFP-BDNF) als Marker für sekretorische Vesikel, *monomeric red fluorescent protein* (mRFP) gekoppelt an *Ras-related protein 5* (mRFP-Rab5) für frühe Endosomen sowie mRFP gekoppelt an *Ras-related protein 7* (mRFP-Rab7) für MVBs. Der Vesikeltransport konnte dadurch in der Lebendzellmikroskopie (*live-cell imaging*) visualisiert werden. Mittels des Plug-In TrackMate in ImageJ (Tinevez et al. 2017) wurden die erhobenen Bilddaten anschließend ausgewertet. In TTLL4<sub>plus</sub>-Zellen konnte im Vergleich zu den Kontrollzellen eine Geschwindigkeitszunahme von 38 % bei den sekretorischen Vesikeln und von 23 % bei den MVBs nachgewiesen werden (Abb. 3A, 3C). Die Geschwindigkeit von frühen Endosomen veränderte sich durch TTLL4-Überexpression nicht signifikant (Abb. 3B). Die TTLL4-vermittelte MT-Modifikation beschleunigt demnach spezifisch den Transport von reifen Vesikel-Subgruppen.



Anschließend wurde der lokale Zusammenhang zwischen polyglutamylierten MT und MVBs geprüft. Dazu wurden die Zelllinien mit mRFP-Rab7 zur Detektion der MVBs transfiziert, die Zellen fixiert und die Polyglutamylierung mittels GT335-Antikörper visualisiert. Die Rab7-markierten Vesikel sind vermehrt an polyglutamylierten MT-ähnlichen Signalclustern detektierbar (Abb. 3D, weißer Pfeil). In dieser Momentaufnahme sind auch einige Rab7-markierte Vesikel unabhängig von einem Polyglutamylierungssignal zu erkennen (Abb. 3D, blauer Pfeil). Weiterhin konnten extrazelluläre Rab7-Signale detektiert werden, welches EV-Aggregaten entsprechen könnte (Abb. 3D, gelber Pfeil).

Zusammenfassend führt die TTLL4-Überexpression durch gesteigerte Polyglutamylierung von MT zu einem beschleunigten Transport von sekretorischen Vesikeln und MVBs. Entsprechend der „*transport-shapes-signature*“-Hypothese deutet der veränderte Vesikeltransport daraufhin, dass MVBs in ihrer Reifung und Sekretion von Exosomen beeinflusst werden. Aufgrund der Signalfunktion dieser EV-Subgruppe sind die TTLL4<sub>plus</sub>-EV hinsichtlich des malignen Krankheitsfortschreitens zu untersuchen.

#### 4.2.5 TTLL4-Überexpression verändert die EV-Signatur

Änderungen in der Sortierung, Beladung und Sekretionsrate der Vesikel prägen die sogenannte Signatur der EV und deren Subgruppe Exosome (Raposo and Stoorvogel 2013; Palmulli and Van Niel 2018). Im Kontext der „*transport-shapes-signature*“-Hypothese könnte eine pro-metastatische Signatur der TTLL4<sub>plus</sub>-entstammenden Exosome die Korrelation zur gehäuften Gehirnmetastasierung (Abb. 1) erklären. Um die Hypothese zu testen, wurde die EV-Signatur des TTLL4<sub>plus</sub>-Modells hinsichtlich Größe, Konzentration, Markerproteine und Proteinzusammensetzung charakterisiert.

Dazu wurde aus konditioniertem Medium der Kontroll- und TTLL4<sub>plus</sub>-Zellen EV isoliert, welche die Subgruppen Exosome, Mikrovesikel und apoptotische Strukturen beinhalten (Raposo and Stoorvogel 2013). Die isolierten Vesikel konnten mittels Transmissionselektronen-Mikroskopie (TEM) anhand ihrer Größe und der typischen becherartigen Form (Théry et al. 2006) als Exosome validiert werden (Abb. 5A). Zur Konzentrations- und Größenbestimmung wurde *Nanoparticle Trafficking Analysis* (NTA) mit den isolierten EV durchgeführt. Dabei ermöglicht das mit dem Mikroskop erfasste Streulicht der suspendierten Partikel deren Größenbestimmung anhand der Lichtstreuung sowie der Brownschen Molekularbewegung bei konstanter Temperatur (Filipe et al. 2010). Diese für EV etablierte Methode ist dadurch limitiert, dass sie Aggregat- oder Clusterformation als Einzelpartikel misst. Optimale Pufferbedingungen sind daher zur Suspension essenziell. Die Konzentration an isolierten EV verhielt sich in Kontroll- und TTLL4<sub>plus</sub>-Gruppe beider Zelllinien zueinander ähnlich. Die Größenverteilung lag in beiden Gruppen zwischen 75 nm und 200 nm. In der Kontrollgruppe von MDA-MB231 stellte sich eine Anreicherung der EV mit Durchmesser zwischen 80 nm und 125 nm dar (Abb. 5B links). Dahingegen ist im

TTLL4<sub>plus</sub>-Modell eine zweigipflige Größenverteilung mit Maxima bei 110 nm und 145 nm zu beobachten (Abb. 5B links). Die EV im TTLL4<sub>plus</sub>-Modell der Zelllinie MDA-MB468 unterschieden sich dazu lediglich in der stärker abgrenzbaren zweigipfligen Größenverteilung mit Maxima bei 125 nm und 150 nm. Ferner lag bei den EV der MDA-MB468 Kontrollzellen ein weiterer Konzentrationsanstieg bei 175 nm außerhalb der Exosomen-typischen Vesikelgröße vor (Abb. 5B rechts).

Zur Validierung und Charakterisierung der EV-Isolation wurde die EV-Proteinzusammensetzung untersucht. Mittels Western Blot von isolierten EV wurden die Exosomen-Markerproteine *apoptosis-linked gene 2 interacting protein X* (ALIX), *flotillin-1* (FLOT1) und *heat shock cognate 71 kDa protein* (Hsc70) und als Negativkontrolle *calnexin* quantifiziert. Die erfassten Proteinkonzentrationen im Western Blot konnten auf die (mit NTA quantifizierte) Anzahl an Vesikeln normalisiert werden. In beiden TTLL4<sub>plus</sub> Mammakarzinom-Zellreihen fanden sich eine 1,4- bis 2,3-fach erhöhte Konzentrationen der Exosomen-Marker (Abb. 5C-E). Die Proteinkonzentration pro Vesikel wies keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und TTLL4<sub>plus</sub>-isolierten EV auf (Abb. S5A). Um die Unterschiede des Vesikelproteoms quantitativ und qualitativ herauszustellen, wurden die isolierten Vesikel mittels Massenspektrometrie ohne Normalisierung auf Vesikelkonzentration analysiert. Aus den 1270 Proteinen, welche in mindestens 3 der 4 biologischen Replikate messbar waren, wiesen 165 Proteine einen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und TTLL4<sub>plus</sub>-isolierten EV auf ( $p < 0,05$ ; siehe <http://www.ebi.ac.uk/pride>, PXD020743). Demnach unterschied sich das EV-Proteom von Kontroll- und TTLL4<sub>plus</sub>-Gruppe deutlich. Die signifikanten Einzelproteine der TTLL4<sub>plus</sub>-EV im Vergleich zu Kontroll-EV konnten mittels Volcano-Plots visualisiert werden (Abb. S5). In TTLL4<sub>plus</sub>-isolierten EV sind ICAM-1, LAMB3, MMP14, UEVLD, NEU1, HTRA1, TMEM55B, CD82, ITGAV, BSG signifikant verstärkt und FLNB vermindert zu finden. Die dysregulierten Proteine der TTLL4<sub>plus</sub>-EV konnten anhand *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) mit verschiedenen malignitätsbezogenen Prozessen konnotiert und sortiert werden. Die drei stärksten veränderten, signifikanten Prozesse der TTLL4<sub>plus</sub>-Gruppe waren: Metastasierung, Invasion und Neoplasie (Abb. 6A). Die konnotierten Proteine zeigten eine überwiegende Aktivierung der Prozesse zugunsten eines malignen Krankheitsfortschreitens (Abb. 6B-C).

Zusammenfassend konnten die isolierten EV-Proben über die charakteristische Vesikelform im TEM, die Vesikelgröße und Markerproteine validiert werden. TTLL4-Überexpression führt indirekt zu (1) einer akzentuierten EV-Größenverteilung, (2) signifikant angereicherten Einzelproteinen mit (3) gehäufte Konnotation von malignitätsfördernden Prozessen.

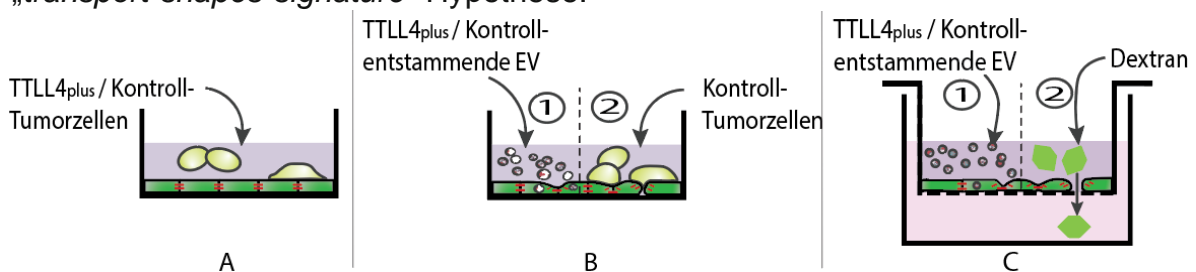
#### 4.2.6 Extrazelluläre Vesikel aus TTLL4-überexprimierenden Zellen verändern die Eigenschaften von Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke

Es ist dennoch unklar, inwiefern die TTLL4<sub>plus</sub>-EV (Abb. 6) über eine prä-metastatische Nische für die gesteigerte Gehirnmetastasierung (Abb. 1D) relevant sind. Zur

Metastasierung müssen zirkulierende Tumorzellen an Endothelzellen adhären und für die Extravasation durch Endothelzellschichten transmigrieren. Eine erhöhte BBB-Permeabilität begünstigt die Transmigration durch die Endothelschicht und Invasion in Primäris-fernes Gewebe. Der Effekt der TLL4<sub>plus</sub>-entstammenden EV auf BBB-spezifische Endothelzellen (hCMEC/D3) wurde daher in einem Adhäsionstest und in einem Permeabilitätstest analysiert.

Zunächst wurde die Adhäsionsrate der TLL4<sub>plus</sub>- und Kontrollzellen an konfluenten hCMEC/D3 im *chamber slide* untersucht (Schema 2A). In beiden Mammakarzinom-Zelllinien ließen sich eine signifikant gesteigerte Adhäsion im TLL4<sub>plus</sub>-Modell nachweisen. Bei MDA-MB468 war diese um 34 % und bei MDA-MB231 um 52 % im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen erhöht (Abb. 8). Anschließend wurde untersucht, ob die Adhäsionsrate von Kontrollzellen durch eine vorangehende Inkubation der hCMEC/D3 mit EV der Kontroll- oder TLL4<sub>plus</sub>-Gruppe beeinflusst wird (Schema 2B). Es ließ sich eine signifikant gesteigerte Adhäsionsrate der Kontrollzellen um 31 % bei MDA-MB231 und um 47 % bei MDA-MB468 bei Inkubation mit TLL4<sub>plus</sub>-entstammenden EV der jeweiligen Zelllinie nachweisen (Abb. 7b). Der EV-Einfluss auf die endotheliale Permeabilität wurde im *transwell assay* durch Inkubation konfluenter hCMEC/D3 mit Kontroll- oder TLL4<sub>plus</sub>-entstammenden EV sowie Dextran untersucht (Schema 2C). EV der TLL4<sub>plus</sub>-Gruppe beider Mammakarzinom-Zelllinien bewirkten im Vergleich zur EV-Kontroll-Gruppe eine um 20 % signifikant gesteigerte Durchlässigkeit der Endothelzellschicht (Abb. 7A).

Zusammenfassend zeigen die dargestellten Ergebnisse, dass eine TLL4-Überexpression in Mammakarzinomzellen zu Sekretion von veränderten EV führt, welche die Adhäsionsrate von Tumorzellen an Endothelzellen der BBB als auch die BBB-Permeabilität erhöht. Dies bestätigt den pro-metastatischen Effekt im Sinne der „*transport-shapes-signature*“-Hypothese.



**Schema 2.** **A** Adhäsionstest an konfluenten Endothelzellen mit TLL4<sub>plus</sub>- oder Kontrollzellen. Die Tumorzellen wurden zuvor mit CellTracker™ 5-Chloromethylfluoresceindiacetate (CMFDA) fluoreszenzmarkiert und die adhärenierten Zellen nach vierstündiger Inkubation mikroskopisch quantifiziert. **B** Adhäsionstest an konfluenten Endothelzellen mit 16-stündiger EV-Inkubation von TLL4<sub>plus</sub>- oder Kontrollzellen, anschließend vierstündiger Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Kontrollzellen und Quantifikation der adhärenierten Zellen. **C** Permeabilitätstest der konfluenten Endothelzellen nach 16-stündiger Inkubation mit EV von TLL4<sub>plus</sub>- oder Kontrollzellen. Nach EV-Inkubation wurde fluoreszenzmarkiertes Dextran (40kDa) für vier Stunden in die obere Kammer appliziert und die diffundierte Menge in der unteren Kammer photometrisch gemessen.

### 4.3 Diskussion

Gehirnmetastasierung beim Mammakarzinom korreliert in Bezug auf das Zytoskelett signifikant mit erhöhten TTLL4 mRNA-Leveln in Primärtumoren (Abb. 1). Diese TTLL4-Überexpression trat gehäuft bei TNBC-Primärtumoren auf (Abb. S1). Das Protein TTLL4 katalysiert den ersten Schritt der posttranslationalen Modifikation Polyglutamylierung durch das Hinzufügen eines Glutamylrests an spezifische Zielproteine (van Dijk et al. 2007). Um die zellulären Effekte von TTLL4 im Mammakarzinom zu untersuchen, wurde das Protein in zwei TNBC-Zelllinien überexprimiert.

Durch die TTLL4-Überexpression steigt das Level an Polyglutamylierung der bekannten Zielproteine (Regnard et al. 2000; Van Dijk et al. 2008) NAP1 1,5-fach und  $\beta$ -Tubulin 2,5-fach an (Abb. 2B). Das hohe Polyglutamylierungssignal von NAP1 in den Kontrollzellen deutet auf ein endogen gesättigtes Glutamylierungslevel von NAP1 hin. Diese Beobachtung zu Nicht-Tubulin-Substraten von TTLL4 ist in Henrietta Lacks (HeLa)-Zellen bekannt (Regnard et al. 2000; Van Dijk et al. 2008; Miller und Heald 2015). Unklar ist, ob eine gesteigerte NAP1-Polyglutamylierung einen signifikanten Einfluss auf dessen Histon-Chaperon-Funktion hat. In TNBC-Zellen führt eine TTLL4-Überexpression vorrangig zu einer gesteigerten  $\beta$ -Tubulin-Polyglutamylierung.

MT sind essenziell am intrazellulären Transport beteiligt und einige MT-PTMs agieren vergleichbar zu „Verkehrsschilder“. MT-PTMs, wie Polyglutamylierung, modulieren die Interaktionsfläche der MT zu MT-assoziierten Proteinen und Motorproteinen (Janke und Bulinski 2011; Ludueña 1997; I. Yu et al. 2015). Der intrazelluläre Transport ist für die endosomale Sortierung und Sekretion von Vesikeln relevant (Janke und Magiera 2020; Roll-Mecak 2020).

Beim Vesikeltransport in nicht-neuronalen Zellen werden frühe Endosomen mit Rab5 und Rab4 markiert. Diese Endosome können mittels Kinesin-1 (KIF5 Protein), Kinesin-2 (KIF3 Protein) und Kinesin-3 (KIF16B Protein) entlang der MT in Richtung MT-Plus-Ende (anterograd) bewegt werden. Der Austausch von Rab5 zu Rab7 kennzeichnet die Reifung zu späten Endosomen, wie Exosomen-bildende MVB. Diese werden von Kinesin-1 (KIF5 Protein) sowie Kinesin-2 (KIF3 Protein) anterograd transportiert. Ebenfalls Exosomen-assoziiert sind Recycling-Endosome, welche mit Rab11 markiert und via Kinesin-2 (KIF3 Protein) mobil sind (Brown et al. 2005; Bananis et al. 2004; Loubéry et al. 2008; Hirokawa et al. 2009; Raiborg et al. 2015).

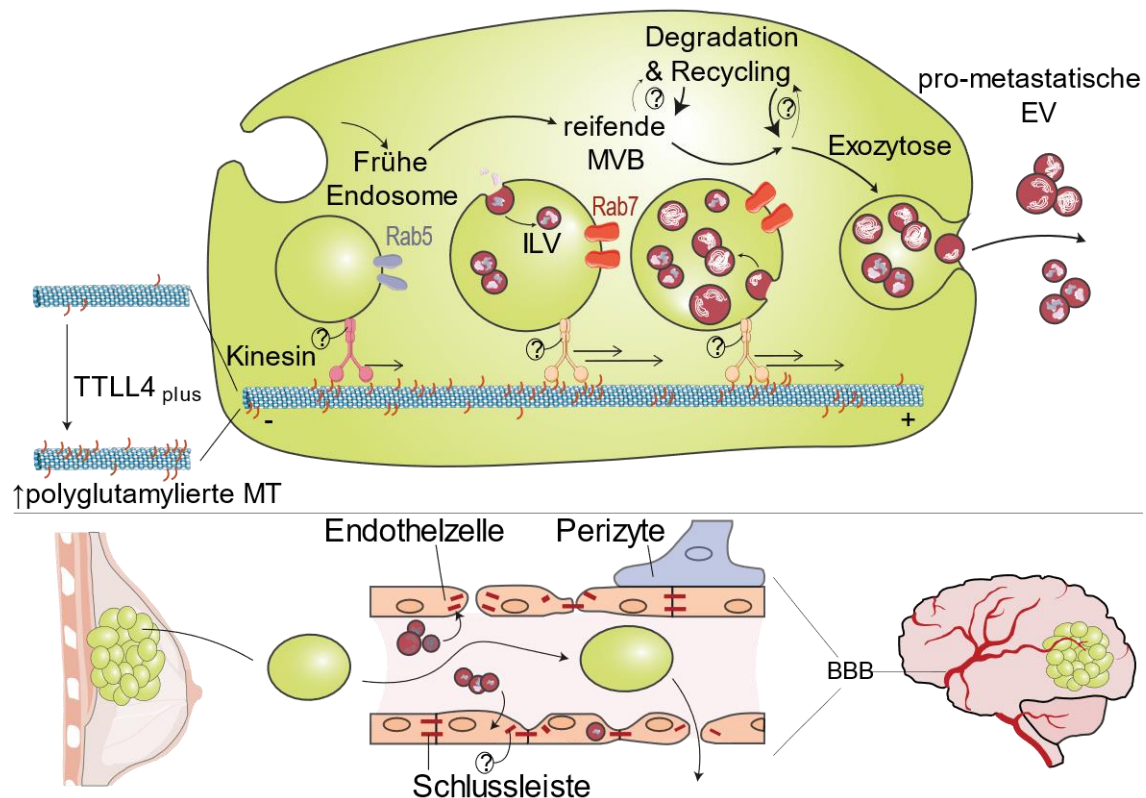
Die TTLL4-Überexpression zeigt keine signifikanten Auswirkungen auf die Geschwindigkeit von frühen Endosomen (Rab5; Abb. 3B). Dahingegen ließ sich in TTLL4<sub>plus</sub>-Zellen eine gesteigerte Transportgeschwindigkeit von sekretorischen Vesikeln (BDNF-markiert) und späten Endosomen (Rab7) feststellen (Abb. 3A, C). In fixierten Zellen kolokalisierten späte Endosome (Rab7) mit polyglutamylierten MT (Abb. 3D). Es wurde damit gezeigt, dass die TTLL4-vermittelte MT-Modifikation den Transport von bestimmten, reifen Vesikelpopulationen beschleunigt.

Um die Transportbeschleunigung entlang der glutamylierten MT-Abschnitte im Vergleich zu nicht-glutamylierten MT-Abschnitten darzustellen, wäre ein höher auflösendes *live-cell imaging* mit einer MT-, Polyglutamylierungs- und Rab-Floureszenzmarkierung erforderlich. Um die Motilität der Rab-markierten Vesikel auf glutamylierten MT zu visualisieren, wäre ein *live-cell sensor*, ähnlich des Tyrosinierungssensor A1aY1, nötig (Kesarwani et al. 2020). Ein für MT-(Poly-)Glutamylierung spezifischer *live-cell sensor* ist bislang nicht verfügbar.

Die dargestellten Transportunterschiede basieren wahrscheinlich auf der modulierten MT-Außenfläche und der dadurch veränderten Interaktion mit spezifischen Motorproteinen (Schema 1B rechts). Die einzelnen Motorproteine unterliegen (1) einer veränderten Affinität zu den mono- oder kurzkettig glutamylierten MT (Larcher et al. 1996; Ikegami et al. 2007) und (2) zeigen daran eine gesteigerte Bewegung (Sirajuddin et al. 2014). Über die Varianz an Adapterproteinen besitzen die unterschiedlichen Vesikelpopulationen wiederum Spezifität für einzelnen Motorproteine (Janke and Magiera 2020).

Für das Motorprotein Kinesin-2 beobachteten Sirajuddin, Rice und Vale 2014 eine erhöhte Motilität durch gesteigerte Prozessivität und Geschwindigkeit entlang MT mit kurzen sowie langen Glutamylnketten. Die Prozessivität beschreibt dabei die Strecke, die pro Lauf zurückgelegt wird und ist beeinflusst durch die lokale MT-Affinität. Die Autoren zeigten zusätzlich, dass kurzkettige MT-Glutamylierung die inhibitorischen Effekte der MT-PTM Tyrosinierung für Kinesin-2 überschreibt. Weiterhin zeigte auch ein TLL1-Knockout, wodurch signifikant weniger Glutamylnketten verlängert werden, keinen Effekt auf die MT-Affinität von Kinesin-2 (Ikegami et al. 2006). Es liegt daher nahe, dass die Mobilität von Kinesin-2 verstärkt durch die TLL4-generierten kurzen Glutamylnketten an MT reguliert wird (Schema 1B und 3). Bei Kinesin-1 hingegen steigern lange Glutamylnketten an den MT die Prozessivität, aber nicht die Geschwindigkeit (Schema 1B; Sirajuddin, Rice, und Vale 2014). In Mausneuronen mit einer Knock-in Mutation (Tuba4a $\Delta$ polyGlu) beeinflusste die Abwesenheit von MT-Glutamylierung die Mobilität von Kinesin-1 nicht (Hausrat et al. 2022). Eine Generalisierung von Erkenntnissen aus Neuronen ist jedoch aufgrund physiologisch abweichender Tubulin-Isoformen und hoher, endogener Level an langkettigen MT-Glutamylierung (Valenstein and Roll-Mecak 2016) kritisch zu betrachten. Ob kurzkettige MT-Glutamylierung dennoch in nicht-neuronalen Zellen einen Einfluss auf das Verhalten von Kinesin-1 haben, ist daher nicht ausgeschlossen.

Es wäre folglich zu prüfen, ob eine Transportmodulation für Kinesin-2 durch kurzkettige MT-Glutamylierung ein relevanter Mechanismus im TLL4<sub>plus</sub>-Modell ist (Schema 3). Anschließend ließe sich analysieren, wie sich dies auf die Sortierung und Reifung der Endosome auswirkt. Dafür könnte mittels *live-cell imaging* der Transport der frühen Endosome (Rab5) sowie der sezernierenden MVB (Rab7-, Rab11- und Rab27A/B-markiert) und die Motilität der Kinesin-Subtypen (KIF3 und KIF5 Protein) im TLL4<sub>plus</sub>-Modell untersucht werden. Eine Kollisionsanalyse dieser *live-cell imaging* Versuche würde die Spezifität zwischen Endosomsubtypen



**Schema 3.** TLL4<sub>plus</sub>-Mammakarzinomzellen sezernieren pro-metastatische EV, welche durch eine prämetastatischen Nische zur Gehirnmastasierung beitragen.

und Kinesin-Gruppe aufklären. Zudem wäre eine Differenzierung zwischen kurz- und langkettigen MT-Glutamylierung für die im *live-cell imaging* verwendeten Kombinationen mit fixierten Zellen möglich. Über die Kolokalisation der Antikörper GT335 für MT-abzweigende (Poly-)Glutamylierung und mit PolyE für langkettige Glutamylierung ließen sich die Vesikel- und Kinesin-Präferenzen den MT-PTM-Ausprägungen zuordnen.

Ferner ist der endo-lysosomale Transport zu untersuchen, da MVB auch mit Lysosomen in Interaktion stehen und zur Degradation und Recycling fusionieren können (Schema 3). Lysosome und Amphisome können daher ebenfalls Rab7-markiert sein (Raudenska et al. 2021). Begünstigt die TLL4<sub>plus</sub>-vermittelte Transportmodulation über veränderte Kontakte des Endoplasmatischen Retikulums mit den MVB zu deren vermehrten Sekretion und weniger lysosomale Fusion (Verweij et al. 2022)? Führt TLL4-Überexpression indirekt zu einer pro-metastatischen Beladung der ILV durch verstärkte Interaktion zwischen MVB und Amphisomen (Salimi et al. 2020)? Mit pH-abhängigen Lysosomenmarkern im *live-cell imaging* wäre der lysosomale vom sezernierenden Pfad der MVB-Biogenese im TLL4<sub>plus</sub>-Modell abgrenzbar.

Für die „*transport-shapes-signature*“-Hypothese wurde geprüft, ob die TLL4-vermittelten Beschleunigung der MVB und sekretorischen Vesikeln zu einer pro-metastatischen EV-Signatur führt. Dazu wurden die EV charakterisiert und deren Effekt im BBB-Modell untersucht. Die Charakterisierung ergab eine EV-Signatur der TLL4<sub>plus</sub>-Zellen, die sich in Größe und Proteinzusammensetzung von den Kontroll-EV unterscheidet. Die Größenverteilung der EV der TLL4<sub>plus</sub>-Zelllinien zeigt eine

verstärkt zweigipflige Verteilung (Abb.5B ). Dies legt nahe, dass durch die veränderten Reifungsbedingungen einzelne ILV-Subgruppen vermehrt produziert werden.

Das Proteom der TTLL4<sub>plus</sub>-entstammenden EV im Vergleich zu den Kontroll-EV weist signifikant angereichertes ICAM-1 auf (Abb. S5B). Physiologisch beeinflusst ICAM-1 von Immunzellen-entstammenden Exosomen sowohl die Exosomen-Aufnahme als auch indirekt die T-Zell-Stimulation (Morelli et al., 2004, Segura et al., 2005). Bei Melanom-, Kolon- und Lungenkarzinom-entstammenden Exosomen zeigte sich ICAM-1 essenziell für die Interaktion mit T-Zellen mit inhibitorischer Effekt (Zhang et al. 2022). Zu ICAM-1 von Prostatakarzinom-entstammenden Exosomen ist bekannt, dass ICAM-1 die Leukozyten-Adhäsionskapazität an Endothelzellen blockiert (Lee et al. 2010). Währenddessen fördert ICAM-1 von Pankreaskarzinom-entstammenden Exosomen einen pro-tumorigenen Makrophagen-Phänotyp (Linton et al. 2018). Da Lee et al 2010 beim Mammakarzinom keine exosomale ICAM-1-Anreicherung beobachtete, wäre dies als TTLL4-spezifische, pro-tumorigene Immunmodulation des Tumormikroenviroment zu prüfen. Mit immunologischem Schwerpunkt wäre dies mit komplexen Zellversuchen, mit *imaging mass cytometry* der Primär- und Sekundärtumorproben oder mit Blut-Liquor-Analysen von Patient:innen zu untersuchen.

Die Funktion der EV-enthaltenden Proteine konnte durch eine *Integrated Pathway Analysis* im TTLL4<sub>plus</sub>-Modell gehäuft der Metastasierung, Invasion und Neoplasie zuordnet werden (Abb. 6 und S5B). Diese datenbank-basierten Effekte wurden im *transwell assay* mit konfluenten Endothelzellen (hCMEC/D3) als BBB-Modell untersucht. Dabei vermitteln die TTLL4<sub>plus</sub>-entstammenden EV eine Adhäsionssteigerung der Kontroll-Tumorzellen (Abb. 7B). Zusätzlich bewirken die TTLL4<sub>plus</sub>-entstammenden EV im Vergleich zu den Kontroll-EV eine Permeabilitätszunahme des BBB-Modells (Abb. 7A). Da TTLL4<sub>plus</sub>-Zellen ohne vorherige EV-Inkubation lediglich einen Trend zu gesteigerter Transmigrationsrate aufweisen (Abb. 4C), wäre weiterführend zu prüfen, ob die Transmigration durch vorherige Inkubation mit TTLL4<sub>plus</sub>-entstammenden EV beeinflusst wird. Diese Auswirkungen auf die BBB zeigen, dass EV von TTLL4<sub>plus</sub>-Zellen eine prämetastatische Nische schaffen, welche die Metastasierung in das Gehirn erleichtert (Schema 3).

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass TTLL4 das einzige Zytoskelett-assoziierte Protein ist, dessen Überexpression bei Mammakarzinom mit vermehrter Gehirnmetastasierung korreliert. Die experimentellen Versuche zeigten einen beschleunigten, intrazellulären Transport von MVBs durch die TTLL4-vermittelte Polyglutamylierung von  $\beta$ -Tubulin. Die Präinkubation im BBB-Modell mit den EV der TTLL4-überexprimierenden Zellen bewirkte (1) eine erhöhte Adhäsionskapazität der Mammakarzinomzellen zu Endothelzellen sowie (2) eine Permeabilitätssteigerung des Endothels. Perspektivisch sind daher die Pathophysiologie der EV-Biogenese sowie die Exosomen-Cargos bei TTLL4-Überexpression vielversprechende Ansätze für die translationale Forschung der Gehirnmetastasen beim Mammakarzinom.

## **5. Zusammenfassung**

In dieser Publikation wurde erstmalig gezeigt, dass eine TTLL4-Überexpression in Mammakarzinomzellen die Beweglichkeit von sekretorischen Vesikeln und MVB steigert, wodurch die EV-Homöostase beeinflusst wird. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass EV aus TTLL4-überexprimierenden Zellen die Adhäsionsrate der Tumorzellen an Endothelzellen der BBB sowie der endothelialen Permeabilität erhöhen. Dieses Ergebnis untermauert die aus den klinischen Daten gewonnene Korrelation zwischen hoher TTLL4-Expression beim Mammakarzinom und dem gehäuften Auftreten von Gehirnmetastasen. Demzufolge ist TTLL4 eine interessante Zielstruktur für die individualisierte Behandlung von Mammakarzinom-Patient:innen. Diese Arbeit bildet die Grundlage für zukünftige Forschung in präklinischen und klinischen Studien zur Untersuchung der Biogenese, der Wirkweise und klinischer Perspektiven Exosomen bei TTLL4-Überexpression.

## **6. Summary**

In this publication, we show for the first time, that TTLL4-overexpression in breast cancer cells enhances secretory and MVB motility, thus altering EV homeostasis. Moreover, we reveal that EV secreted by TTLL4 overexpressing cells increase the potential of breast cancer cells to transmigrate through the BBB through increased tumour cell adhesion and endothelial permeability. These findings support our clinical data, showing that high TTLL4 expression correlates with brain metastasis of breast cancers. Hence, TTLL4 may be an interesting target for therapy. Our work provides a foundation for future research, including preclinical and clinical studies investigating the biogenesis, effects, and clinical perspectives of exosomes from TTLL4-overexpressing cancer cells.



## 7. Offene Fragen und Perspektiven

Neben der hier dargestellten Publikation zeigen weitere Studien zu (1) TTLL4-Substraten, (2) MT-Stabilität und (3) Exosomen-Cargo die Komplexität von Polyglutamylierung als PTM und dessen Effekte. Dies eröffnet auch alternative Ansatzpunkte im Rahmen einer Tumorthherapie.

### 7.1 TTLL4-Substrate

Neben  $\beta$ -Tubulin und NAP1 sind weitere TTLL4 Substrate bekannt. Diese eröffnen neue Fragen sowie alternative Ansatzpunkte für therapeutische Intervention. Die initiale Publikation zu TTLL4-Substraten von Van Dijk et al. 2008 identifizierte *in vitro* neben  $\beta$ -Tubulin und NAP1:

- (1) die Histon-Chaperone *nucleosome assembly protein 2* (NAP2, Gensymbol NAP1L4), *nucleophosmin* (NPM/B23), *protein SET* (SET/PHAPII) und *nucleolin* (NCL),
- (2) die Transkriptionsregulatoren *acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32* (ANP32) Proteine, SET (Doppelfunktion), *interleukin enhancer-binding factor 2* (ILF2/NF45), *proline, glutamate, and leucine-rich protein 1* (PELP1) und *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K* (HNRNPK) sowie
- (3) die MT-Interaktoren *microtubule-associated protein RP/EB family member 1* (EB1) und *Ran-specific GTPase-activating protein* (RANGAP).

Die Histon-Chaperone NAP1, NAP2 und PELP1 regulieren über die Interaktion mit Histonen das Chromatinremodelling und somit sowohl die Transkription von Tumorsuppressorgenen als auch Onkogenen. Für NAP1 wurde in HeLa Zellen und *Xenopus laevis* Ei-Extrakten bereits gezeigt, dass die NAP1-Polyglutamylierung dessen Bindung zu Histone verstärkt (Regnard et al. 2000; Miller und Heald 2015). Aus HeLa-Zellen ist bekannt, dass das Level an Polyglutamylierung der Tubulin- und Nicht-Tubulin-Substrate während der Mitose am höchsten und für die Chromosomenkondensation sowie Spindeldynamik essenziell ist (Regnard et al. 2000; Miller und Heald 2015).

Wie in der hier dargestellten Publikation wurde auch im Patient:innen-Kollektiv mit duktalem Pankreasadenokarzinom eine TTLL4-Überexpression in Korrelation zur Malignität nachgewiesen (Kashiwaya et al. 2010). In diesem Zelltyp bewirkte TTLL4 über Polyglutamylierung von PELP1 ein gesteigertes Zellwachstum und höhere Überlebensrate.

Die ubiquitär exprimierten TTLL4-Substrate NAP1 und NAP2 wirken ferner auf das Zellschicksal über Regulation des Tumorsuppressorgens *cellular tumor antigen p53* (TP53/p53) ein. p53 kann einen Mitosearrest im Sinne des Zellüberlebens sowie je nach Genomschädigung eine Apoptose induzieren (Vousden and Prives 2009). In Stress-induzierten HeLa-Zellen rief ein NAP1-*knockdown* eine verringerte Acetylierung des p53-Proteins hervor, welche über vermehrte bcl-2-associated X protein (Bax)- und verringerte p21-Expression die Apoptose fördern. Der NAP2-*knockdown* wirkte gegensätzlich und hemmt dadurch die Apoptose (Tanaka et al. 2019).

Darüberhinaus kann NAP1 an *DNA repair and recombination protein RAD54* (RAD54) binden und ist dann bei der Reparatur von DNA-Doppelstrang-Brüchen beteiligt. Ebenso ist NAP1 als *linker-histone-chaperone* involviert (Machida 2014). Inwiefern das durch Glutamylierung modellierte Histon-Bindevverhalten der Histon-Chaperone (Regnard et al. 2000) auf die DNA-Reparatur Einfluss nimmt, ist jedoch unklar.

Obgleich in dieser Arbeit die TTLL4-Überexpression keinen signifikanten Einfluss auf das Zellüberleben gezeigt hat (Abb. 4A), ist die Übertragbarkeit der oben genannten Studie auf TNBC-Zellen zu prüfen. Dazu wären die Glutamylierungslevel der TTLL4-Substrate während der Mitose bei TTLL4-Überexpression zu bestimmen. In therapeutischer Absicht ist weiterführend die Mitosedauer, Reparatureffizienz und deren Kapazität im Rahmen einer Radiotherapie bei TTLL4-Überexpression abzuklären. Diesen Mechanismus zu entschlüsseln, könnte zur Effizienzsteigerung der Radiotherapie beim Mammakarzinom beitragen.

Das neu identifizierte TTLL4-Substrat *Kruppel-like factor 4* (KLF4) ist als direkter Transkriptionsfaktor für koordiniertes Zellwachstum und die Zelldifferenzierung relevant. Die Glutamylierung von KLF4 verhindert dessen Degradation und fördert die Expression von Pluripotenz-erhaltender Faktoren im Mausmodell (Ye et al. 2018). In Mammakarzinomzellen wirkt KLF4 zeitgleich supprimierend auf die p53-Expression und induzierend auf *cyclin dependent kinase inhibitor 1A* (CDKN1A/p21CIP1) (Rowland et al. 2005). Die Autoren diskutierten, dass die Tumorsuppressor-Funktion von KLF4 im Mammakarzinom einen Selektionsvorteil zur Resistenz gegenüber Apoptose-induzierenden Medikamenten schaffen könnte. Dennoch zeigte diese Studie auch eine dosisabhängige Apoptosesteigerung durch KLF4-Reduktion. Der Glutamylierungsstatus bzw. -level von KLF4 wurde in dieser Studie jedoch nicht untersucht. Im Falle einer TTLL4-Inhibition oder eines *-knockdowns* wäre daher eine KLF4-Reduktion in der Metastasenprävention beim Mammakarzinom vorteilhaft und zu prüfen.

Um die Effekte von TTLL4 unabhängig von dessen MT-Modifikation zu untersuchen, wäre eine Überexpression von TTLL4 ohne die MT-Bindedomäne (*cationic microtubule-binding domain* (cMTBD) 918-1029, (Garnham et al. 2015)) denkbar. Da die enzymatische Bindungsdomäne von TTLL4 für Tubulin und den Nicht-Tubulin-Substraten potenziell identisch ist, sollte vorab das reduzierte Glutamylierungslevel der MT bei einer TTLL4-Transfektion mit cMTBD-Deletion mittels Immunopräzipitation validiert werden. Alternativ ist die Überexpression von  $\beta$ -Tubulin ohne Glutamylierungsstellen im CTT ähnlich Tuba4a $\Delta$ polyGlu (Hausrat et al. 2022) oder ohne CTT (Tub $\Delta$ Cter; Torrino et al. 2021) zu diskutieren.

## **7.2 Mikrotubuli-Stabilität**

MT-PTMs können die Malignität von Tumorzellen nicht nur durch veränderte EV-Signaturen, sondern auch durch direkte Veränderung zellulärer MT-Funktionen beeinflussen. Die Stabilität von MT ist durch ihre strukturgebende Funktion auch für

die Adaptation an die Umgebungsfestigkeit während der Metastasierung von Bedeutung.

Eine kürzlich publizierte Studie von Torrino et al. 2021 deckte einen weiteren Mechanismus auf, wonach ein höheres Level an MT-Glutamylierung, die Festigkeit der Extrazellulärmatrix (EZM) und Zellmalignität miteinander korrelieren. Bei mehreren murinen *TLL4-knockouts*, murinen Deglutamase-*knockouts* sowie zwei Tubulin-Mutationen (verhindern MT-Glutamylierung: Tub\_E445D, Tub $\Delta$ Cter) in HeLa Zellen konnten die Autoren zeigen, dass feste EZM die MT-Glutamylierung induziert und diese die Zellproliferation steigert. Die MT-Glutamylierung in HeLa Zellen ist dabei abhängig von der Aufnahme und der intrazellulären Verstoffwechslung von Glu, wodurch sich Ansatzpunkte zur pharmakologischen Intervention ergeben. Diese Ergebnisse wurden mit den Zelllinien MDA-MB-231 und 4T1 für das Mammakarzinom validiert. Weiterhin zeigte sich, dass die MT-Glutamylierung trotz Behandlung mit dem MT-interferierenden Nocodazol für die Stabilität des MT-Netzwerkes essenziell ist und zur aggressiveren Tumorzellinvasion führt. Im Mausmodell mit implantierten, humanen Mammakarzinom und CB839-Gabe (Steigerung der EZM-Festigkeit) wurde abschließend die geförderte Tumorprogression und -metastasierung durch MT-Glutamylierung im Wechselspiel mit fester EZM demonstriert. Dies ließ sich auch in primären Mammakarzinom-Proben bestätigen.

Unter klinischen Gesichtspunkten gewinnt dies für die lokale, teilweise chronische Entzündungsreaktion im Rahmen einer Tumorerkrankung und der darauffolgenden Fibrosierung, an Bedeutung. Die Relevanz des Mechanismus ist im Kontext der Fibrose-induzierenden Radiotherapie zu diskutieren und subtyp-spezifisch zu untersuchen. Für das invasive Mammakarzinom korreliert die lokale Fibrosierung signifikant mit Metastasierung und einer schlechten Prognose (Mujtaba et al. 2013). Es besteht daher zunehmendes Forschungsinteresse an dem breiten Spektrum an Anti-Fibrose-Medikamenten als Therapie-Add-On oder Augmentation für das Mammakarzinom sowie für andere Tumorentitäten (Xing et al. 2022; Marwitz et al. 2020; Diazi et al. 2022). Da eine Zunahme der EZM-Festigkeit die MT-Glutamylierung verstärkt, ist theoretisch eine veränderte Exosomen-Homoöstase durch hyperglutamylierte MT ähnlich den *TLL4<sub>plus</sub>*-Zellen die Folge. Es stellt sich dadurch die Frage, ob die erhöhte EZM-Festigkeit (1) die Exosomen-Homoöstase auch ohne *TLL4*-Überexpression dysreguliert oder (2) die *TLL4<sub>plus</sub>*-entstammenden Exosomen die Fibrosierung (2a) direkt initiieren, (2b) via Immunaktivierung indirekt initiieren oder (2c) verstärken.

Perspektivisch würde dies die Therapie von Mammakarzinom-Patient:innen mit *TLL4*-Überexpression des Primärtumors, des invasiven Typs als auch mit lokaler Radiotherapie-induzierter Fibrose beeinflussen können.

Die Dynamik des MT-Netzwerkes wird zusätzlich durch MT-Schneideproteine, wie Spastin und Katanin moduliert (Roll-Mecak and McNally 2010). In einer Studie mit murinen Neuronen führte ein Spastin-*knockout* zur verstärkten Ausbildung von längeren MT mit gesteigerter Polyglutamylierung (Lopes et al. 2020). Die MT-Dynamik

in Neuronen ist jedoch auf intrazellulären Transport und im Gegensatz zu Tumorzellen, nicht auf Zellteilung, Adhäsion oder Migration fokussiert. Valenstein und Roll-Mecak 2016 untersuchten die Spastinaktivität im zellfreien System mit TTLL7-vermittelten Glutamylnketten am CTT von  $\beta$ -Tubulin. Die MT-destabilisierende Aktivität von Spastin stieg bei bis zu acht Glutamylnresten an und verhielt sich ab diesem Grenzwert rückläufig. In HeLa Zellen konnten Lacroix et al. 2010 darstellen, dass TTLL4-vermittelte MT-Glutamylierung keine Aktivitätssteigerung von Spastin und eine geringere Aktivität von Katanin hervorruft. Dies verdeutlicht, wie spezifisch die Länge der MT-Glutamylierung auf die Aktivität von Schneideproteinen wirkt.

Zur Klärung ist der Preprint des Labors von Prof. C. Aumeier in Ausblick zu stellen, welche semi-synthetische Tubuline mit entsprechender *PTM-pattern* für *in vitro* Versuche ermöglicht (Ebberink et al. 2022).

In einem Therapie-orientierten Ansatz wäre potenziell der Einfluss des Spastin-Inhibitors Spastazoline (Cupido et al. 2019) an Tumorproben mit TTLL4-Überexpression oder im Xenograft-Tiermodell auf das Zellüberleben und die Migrationsfähigkeit zu prüfen.

MAPs beeinflussen neben den Motorproteinen auch die MT-Dynamik auf vielfältige Weise. Die Affinität von MAPs zu MT zeigte sich *in vitro* abhängig von der Länge der Glutamylnketten am CTT des Tubulin. Demnach binden TAU, MAP1B und MAP2 verstärkt an MT mit kurzkettigen (1-3 Glu) und MAP1A bevorzugt an MT mit langkettigen Glutamylnmodifizierung (~7 Glu) (Boucher et al. 1994; Bonnet et al. 2001). *In vitro* wurde demonstriert, dass MAP2C die Häufigkeit und Dauer von MT-Abbau reduziert (Gamblin et al. 1996). Qiang et al. 2006 zeigten in Fibroblasten den signifikant geminderten Effekt von überexprimierten Katanin durch MAP2C und in geringerem Ausmaß von MAP4. Keine protektive Wirkung gegenüber Katanin-induzierten MT-Abbau zeigten MAP1B und MAP2 in Neuronen (Qiang et al. 2006).

Weiterhin bindet MAP2A/C schlechter und MAP1a unverändert an MT mit CTT-Mutation im  $\alpha$ -Tubulin (Tuba4a $\Delta$ polyGlu, unterbindet  $\alpha$ -Tubulin-Glutamylierung) in Neuronen (Hausrat et al. 2022). Ferner kolokalisieren in Neuronen TTLL7 (Monoglutamylase für  $\beta$ -Tubulin) und glutamylierte MT mit MAP2. Die TTLL7-vermittelte MT-Glutamylierung erwies sich essenziell für das Wachstum von Neuriten, welches wiederum stabile MT erfordert (Ikegami et al. 2006).

Aufgrund der Neuronen-basierten Versuche sowie der TTLL4-Substratpräferenz von  $\beta$ -Tubulin, ist die Affinität von MAPs in TTLL4<sub>plus</sub>-Mammakarzinomzellen zu prüfen und eine Validierung mit  $\beta$ -Tubulin-Konstrukten notwendig. Denkbar wäre eine Kolokalisationsanalyse mit den Antikörpern PolyE (langkettig glutamylierte MT), GT335 (kurz- und langkettig glutamylierte MT) und MAP4 (nicht Neuronen-spezifisch).

Interessanterweise wurde in der zuvor geschilderten Studie von Torino et al. 2021 mit small interfering RNA (siRNA) für TTLL4 und Deglutamylasen kein signifikanter Einfluss von MT-Glutamylierung auf die Zelladhärenz beobachtet. Bedauerlicherweise ist die Zelllinie nicht dokumentiert sowie die Aussaat auf anorganischer Oberfläche statt auf Endothelzellen untersucht. Whipple et al. 2010 wiesen bei

Mammakarzinomzellen eine durch MT-Detyrosinierung gesteigerte MT-Stabilität nach, welche über die Bildung von Mikrotentakeln die Tumorzellanhaftung an Endothelzellen förderte. In der Studie wurde das Level der MT-Glutamylierung nicht erfasst. Zu klären bleibt, ob die gesteigerte Adhärenz der TLL4<sub>plus</sub> Zellen auf intrazelluläre Prozesse oder durch Interaktion während des Adhäsionsprozesses von TLL4<sub>plus</sub>-Exosomen mit den Endothelzellen vermittelt wird.

Demnach scheint die dysregulierte MT-Glutamylierung sowohl das zelluläre Verhalten zu verändern als auch eine prämetastatische Nische durch veränderte EV-Signatur generieren zu können. Für eine therapeutische Anwendung ist (1) eine TLL4-Reduktion mittels *siRNA*- oder *short hairpin RNA* (shRNA), (2) TLL4-Inaktivierung oder alternativ durch (3) gezielte Einflussnahme auf den dysregulierten Glutamatstoffwechsel für das TLL4<sub>plus</sub>-Modell zu evaluieren.

Der TLL4-knockdown mit shRNA erzielte im 3D-Zellkulturmodell von aggressiven Mammakarzinomzellen bereits eine signifikant reduzierte Invasivität (Torrino et al. 2021). Ebenso ist die Relevanz der Effektor-Kinase *never in mitosis gene A (NIMA)-related kinase 5* (NEK5) zu prüfen, da die TLL4-Phosphorylierung via NEK5 dessen Glutamylierungsaktivität reduziert (Melo-Hanchuk and Kobarg 2021). Abschließend zeigte sich der selektive Glutaminase-Inhibitor CB839 als Add-On zu Paclitaxel bereits in zwei *xenograft*-Modellen effektiv zur Reduktion des Tumorstwachstums (Gross et al. 2014).

### 7.3 Exosomen-Cargo

Weitreichende diagnostische und therapeutische Perspektiven ergeben sich für die personalisierte Therapie von Krebserkrankungen aber auch anderer Pathologien durch EV. Da die Untergruppe der Exosomen über gerichtete Sortier- und Beladungsprozesse zusammengesetzt und sezerniert werden (Palmulli and Van Niel 2018), gilt ihnen als *drug* oder *marker carrier* besondere Beachtung. Vergleichende Analysen sind mit der Exosomen-Datenbank ExoCarta (<http://exocarta.org>; Keerthikumar et al. 2016) möglich, welche die in Exosomen enthaltenen Proteine, ncRNA und Lipide für verschiedene Zelltypen und Organismen sammelt.

Mit der sogenannten „*Liquid Biopsy*“ können Tumor- und Biomarker erfasst werden aus Blut, Urin, Liquor, Speichel, Peritoneal- oder Pleuraflüssigkeit. Zur Karzinom-Früherkennung sowie Therapieanpassung können diese mittels Massenspektrometrie, RNA-Sequenzierung (RNAseq) oder qRT-PCR analysiert werden (D. Yu et al. 2022). Für das Mammakarzinom werden die exosomalen Biomarker bereits in verschiedenen Kombinationen aus nicht-kodierenden RNA (*non-coding RNA*, ncRNA) sowie Proteinen experimentell und klinisch untersucht (Halvaei et al. 2018). Aus der Übergruppe der ncRNA sind vor allem *micro RNAs* (miRNA) und *long non-coding RNAs* (lncRNA) relevant. Sie können durch Interferenz mit mRNA der Zielzelle ein „Gensilencing“ bewirken und durch das veränderte Proteom die Zellfunktion signifikant manipulieren. Zusammengefasst in: (Liu et al. 2022; Sideris et al. 2022; Abolghasemi et al. 2020).

Die spezifischen molekularen Veränderungen, welche die TTLL4<sub>plus</sub>-entstammende EV in Endothelzellen bewirkten, sind bislang unklar. Jedoch sind in mehreren Tumorentitäten bereits unterschiedliche Mechanismen für die hier dargestellte und diskutierte Manipulation der Gefäßpermeabilität durch Exosomen bekannt.

Beim Mammakarzinom ist in verschiedenen Versuchsaufbauten beispielsweise eine hohe exosomale Thrombospondin-1-Konzentrationen (Cen et al. 2019), miR-181c (Tominaga et al. 2015) oder miR-105 (Zhou et al. 2014) nachgewiesen, welche die Destruktion endothelialer Zell-Zell-Verbindungen induzieren. Auch anderen Tumorentitäten, wie Magenkarzinom via lnc-RNA X26nt (Chen et al. 2021) oder Glioblastoma durch VEGF-A (Zhao et al. 2018) generieren so eine geschwächte Gefäßbarriere (*vascular leakiness*) zur Metastasierung. Dabei eliminieren ncRNA einzelne Zell-Zell-Verbindungskomponenten, wodurch diese destabilisiert und durchlässiger werden. Ein solcher zugrunde liegende Mechanismus ließe sich mittels Massenspektrometrie und RNAseq von Endothelzellen mit und ohne EV-Präinkubation entschlüsseln.

Zur Therapie ließe sich der Mechanismus der TTLL4<sub>plus</sub>-entstammenden Exosomen theoretisch sowohl über die Exosomen-Beladung und Sekretion als auch die einzelnen Cargos inhibieren. Es wurde in Mammakarzinomzellen bereits gezeigt, dass eine Rab7-Markierung der Endosomen für die Exosomen-Homöostase essenziell ist und ein Rab7-knockdown die Exosomensekretion reduziert (Baietti et al. 2012). Ebenso ist ein Therapieansatz, die Bildung der prämetastatischen Nische zu bremsen. In der personalisierten Medizin wächst diesbezüglich das Forschungsgebiet des *EV bioengineering*. Als Transportmittel verfügen Exosomen über hohe Stabilität als auch die Fähigkeit hydrophobe und hydrophile Stoffe zu transportieren (Luan et al. 2017). Der Einbau von diagnostisch und therapeutisch wirksamen Proteinen, RNA oder anderer Wirkstoffe ist via (1) *preloading* mittels genetischer Modulation sowie via (2) *postloading* von isolierten Exosomen mittels biotechnologischer Prozesse *in vitro* etabliert (Walker et al. 2019). Weiterhin erwies sich die individuelle Oberflächenzusammensetzung der von den Patient:innen-entstammenden Exosomen vorteilhaft für die spezifische Aufnahme in Zielzellen, was für den Metastasierungsprozess relevant sind (Li et al. 2020). Zu spekulieren ist, ob eine frühere Metastasendetektion aufgrund der Exosomen-vermittelten Veränderungen des *micro-environments* möglich ist.

Im Kontext der TTLL4-Überexpression beim Mammakarzinom ist jedoch vorab die Exosomen-Signatur im Patient:innenkollektiv mit den experimentellen Daten abzugleichen. Diese translationale Forschung und mehrere klinische Studien (NCT04394572, NCT04939324, NCT02393703, NCT01294072, NCT01159288, NCT01668849, NCT03608631, NCT04529915, NCT05286684, Siehe <https://clinicaltrials.gov/>) deuten auf das Potential der Exosomen-basierten Diagnostik und Therapie in der Onkologie hin.

## 8. Literaturverzeichnis

- Abolghasemi M, Tehrani SS, Yousefi T, Karimian A, Mahmoodpoor A, Ghamari A, Jadidi-Niaragh F, Yousefi M, Kafil HS, Bastami M, Edalati M, Eyvazi S, Naghizadeh M, Targhazeh N, Yousefi B, Safa A, Majidinia M, and Rameshknia V (2020) MicroRNAs in Breast Cancer: Roles, Functions, and Mechanism of Actions. *J. Cell. Physiol.* 235 (6): 5008–29
- Alexander JE, Hunt DF, Leo MK, Shabanowitz J, Michel H, Berlin SC, Macdonald TL, Sundberg RJ, Rebhun LI, and Frankfurter A (1991) Characterization of Posttranslational Modifications in Neuron-Specific Class III Beta-Tubulin by Mass Spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (6): 4685–89
- Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G, Geeraerts A, Ivarsson Y, Depoortere F, Coomans C, Vermeiren E, Zimmermann P, and David G (2012) Syndecan-Syntenin-ALIX Regulates the Biogenesis of Exosomes. *Nat. Cell Biol.* 14 (7): 677–85
- Banani S, Nath S, Gordon K, Satir P, Stockert RJ, Murray JW, and Wolkoff AW (2004) Microtubule-Dependent Movement of Late Endocytic Vesicles In Vitro: Requirements for Dynein and Kinesin. *Mol Biol Cell* 15 (8): 5318–28
- Bebelman MP, Smit MJ, Pegtel DM, and Baglio SR (2018) Biogenesis and Function of Extracellular Vesicles in Cancer. *Pharmacol. Ther.* 188 (2): 1–11
- Bonnet C, Boucher D, Lazereg S, Pedrotti B, Islam K, Denoulet P, and Christophe J (2001) Differential Binding Regulation of Microtubule-Associated Proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by Tubulin Polyglutamylation. *J. Biol. Chem.* 276 (16): 12839–48
- Boucher D, Larcher JC, Gros F, and Denoulet P (1994) Polyglutamylation of Tubulin as a Progressive Regulator of in Vitro Interactions between the Microtubule-Associated Protein Tau and Tubulin. *Biochemistry* 33 (41): 12471–77
- Brosnan EM, and Anders CK (2018) Understanding Patterns of Brain Metastasis in Breast Cancer and Designing Rational Therapeutic Strategies. *Ann. Transl. Med.* 6 (9): 163–76
- Brown CL, Maier KC, Stauber T, Ginkel LM, Wordeman L, Vernos I, and Schroer TA (2005) Kinesin-2 Is a Motor for Late Endosomes and Lysosomes. *Traffic* 6 (12): 1114–24
- Cen J, Feng L, Ke H, Bao L, Li LZ, Tanaka Y, Weng J, and Su L (2019) Exosomal Thrombospondin-1 Disrupts the Integrity of Endothelial Intercellular Junctions to Facilitate Breast Cancer Cell Metastasis. *Cancers (Basel)*. 11 (12): 1946
- Chen X, Zhang S, Du K, Zheng N, Liu Y, Chen H, Xie G, Ma Y, Zhou Y, Zheng Y, Zeng L, Yang J, and Shen L (2021) Gastric Cancer–Secreted Exosomal X26nt Increases Angiogenesis and Vascular Permeability by Targeting VE-cadherin. *Cancer Sci.* 112 (5): 1839–52
- Cupido T, Pisa R, Kelley ME, and Kapoor TM (2019) Designing a Chemical Inhibitor for the AAA Protein Spastin Using Active Site Mutations. *Nat. Chem. Biol.* 15 (5): 444–52
- Darlix A, Louvel G, Fraise J, Jacot W, Brain E, Debled M, Mouret-Reynier MA, Goncalves A, Dalenc F, Delalogue S, Campone M, Augereau P, Ferrero JM, Levy C, Fumet J-D, Lecouillard I, Cottu P, Petit T, Uwer L, Jouannaud C, Leheurteur M, Dieras V, Robain M, Chevrot M, Pasquier D, and Bachelot T (2019) Impact of Breast Cancer Molecular Subtypes on the Incidence, Kinetics and Prognosis of Central Nervous System Metastases in a Large Multicentre Real-Life Cohort. *Br. J. Cancer* 121 (12): 991–1000

- Diazzi S, Baeri A, Fassy J, Lecacheur M, Marin-Bejar O, Girard CA, Lefevre L, Lacoux C, Irondelle M, Mounier C, Truchi M, Couralet M, Ohanna M, Carminati A, Berestjuk I, Larbret F, Gilot D, Vassaux G, Marine J, Deckert M, Mari B, and Tartare-Deckert S (2022) Blockade of the Pro-fibrotic Reaction Mediated by the MiR-143/-145 Cluster Enhances the Responses to Targeted Therapy in Melanoma. *EMBO Mol. Med.* 14 (3): e15295
- Dijk J Van, Miro J, Strub JM, Lacroix B, Dorsselaer A Van, Edde B, and Janke C (2008) Polyglutamylation Is a Post-Translational Modification with a Broad Range of Substrates. *J. Biol. Chem.* 283 (7): 3915–22
- Dijk J van, Rogowski K, Miro J, Lacroix B, Eddé B, and Janke C (2007) A Targeted Multienzyme Mechanism for Selective Microtubule Polyglutamylation. *Mol. Cell* 26 (3): 437–48
- Ebberink E, Fernandes S, Hatzopoulos G, Agashe N, Guidotti N, Reichart TM, Reymond L, Velluz M-C, Schneider F, Pourroy C, Janke C, Gönczy P, Fierz B, and Aumeier C (2022) Tubulin Engineering by Semisynthesis Reveals That Polyglutamylation Directs Detyrosination. *BioRxiv*, 2022.09.20.508649
- Eddé B, Rossier J, Caer JP Le, Desbruyères E, Gros F, and Denoulet P (1990) Posttranslational Glutamylation of  $\alpha$ -Tubulin. *Science* (80-. ). 247 (4938): 83–85
- Filipe V, Hawe A, and Jiskoot W (2010) Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. *Pharm. Res.* 27 (5): 796–810
- Gadadhar S, Bodakuntla S, Natarajan K, and Janke C (2017) The Tubulin Code at a Glance. *J. Cell Sci.* 130 (8): 1347–53
- Gamblin TC, Nachmanoff K, Halpain S, and Williams RC (1996) Recombinant Microtubule-Associated Protein 2c Reduces the Dynamic Instability of Individual Microtubules. *Biochemistry* 35 (38): 12576–86
- Garnham CP, Vemu A, Wilson-Kubalek EM, Yu I, Szyk A, Lander GC, Milligan RA, and Roll-Mecak A (2015) Multivalent Microtubule Recognition by Tubulin Tyrosine Ligase-like Family Glutamylases. *Cell* 161 (5): 1112–23
- Gross MI, Demo SD, Dennison JB, Chen L, Chernov-Rogan T, Goyal B, Janes JR, Laidig GJ, Lewis ER, Li J, MacKinnon AL, Parlati F, Rodriguez MLM, Shwonek PJ, Sjogren EB, Stanton TF, Wang T, Yang J, Zhao F, and Bennett MK (2014) Antitumor Activity of the Glutaminase Inhibitor CB-839 in Triple-Negative Breast Cancer. *Mol. Cancer Ther.* 13 (4): 890–901
- Halvaei S, Daryani S, Eslami-S Z, Samadi T, Jafarbeik-Iravani N, Bakhshayesh TO, Majidzadeh-A K, and Esmaili R (2018) Exosomes in Cancer Liquid Biopsy: A Focus on Breast Cancer. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* 10 (3): 131–41
- Hausrat TJ, Janiesch PC, Breiden P, Lutz D, Hoffmeister-Ullerich S, Hermans-Borgmeyer I, Failla AV, and Kneussel M (2022) Disruption of Tubulin-Alpha4a Polyglutamylation Prevents Aggregation of Hyper-Phosphorylated Tau and Microglia Activation in Mice. *Nat. Commun.* 13 (1): 4192
- Hessvik NP, and Llorente A (2018) Current Knowledge on Exosome Biogenesis and Release. *Cell. Mol. Life Sci.* 75 (2): 193–208
- Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, and Niwa S (2009) Kinesin Superfamily Motor Proteins and Intracellular Transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (10): 682–96
- Ikegami K, Heier RL, Taruishi M, Takagi H, Mukai M, Shimma S, Taira S, Hatanaka K, Morone N, Yao I, Campbell PK, Yuasa S, Janke C, MacGregor GR, and Setou M (2007) Loss of  $\alpha$ -Tubulin Polyglutamylation in ROSA22 Mice Is Associated with Abnormal Targeting of KIF1A and Modulated Synaptic Function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (9): 3213–18



- Ikegami K, Mukai M, Tsuchida J, Heier RL, MacGregor GR, and Setou M (2006) TLL7 Is a Mammalian  $\beta$ -Tubulin Polyglutamylase Required for Growth of MAP2-Positive Neurites. *J. Biol. Chem.* 281 (41): 30707–16
- Janke C, and Chloë Bulinski J (2011) Post-Translational Regulation of the Microtubule Cytoskeleton: Mechanisms and Functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12 (12): 773–86
- Janke C, and Magiera MM (2020) The Tubulin Code and Its Role in Controlling Microtubule Properties and Functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21 (6): 307–26
- Kashiwaya K, Nakagawa H, Hosokawa M, Mochizuki Y, Ueda K, Piao L, Chung S, Hamamoto R, Eguchi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Janke C, Shinomura Y, and Nakamura Y (2010) Involvement of the Tubulin Tyrosine Ligase-like Family Member 4 Polyglutamylase in PELP1 Polyglutamylation and Chromatin Remodeling in Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Res.* 70 (10): 4024–33
- Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Saffar H Al, Anand S, Zhao K, Samuel M, Pathan M, Jois M, Chilamkurti N, Gangoda L, and Mathivanan S (2016) ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J. Mol. Biol.* 428 (4): 688–92
- Kellogg DR, Kikuchi A, Fujii-Nakata T, Turck CW, and Murray AW (1995) Members of the NAP/SET Family of Proteins Interact Specifically with B- Type Cyclins. *J. Cell Biol.* 130 (3): 661–73
- Kesarwani S, Lama P, Chandra A, Reddy PP, Jijumon AS, Bodakuntla S, Rao BM, Janke C, Das R, and Sirajuddin M (2020) Genetically Encoded Live-Cell Sensor for Tyrosinated Microtubules. *J. Cell Biol.* 219 (10): e201912107
- Kim YJ, Kim JS, and Kim IA (2018) Molecular Subtype Predicts Incidence and Prognosis of Brain Metastasis from Breast Cancer in SEER Database. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 144 (9): 1803–16
- Langley RR, and Fidler IJ (2011) The Seed and Soil Hypothesis Revisited-The Role of Tumor-Stroma Interactions in Metastasis to Different Organs. *Int. J. Cancer* 128 (11): 2527–35
- Larcher JC, Boucher D, Lazereg S, Gros F, and Denoulet P (1996) Interaction of Kinesin Motor Domains with  $\alpha$ - and  $\beta$ -Tubulin Subunits at a Tau-Independent Binding Site: Regulation by Polyglutamylation. *J. Biol. Chem.* 271 (36): 22117–24
- Lee HM, Choi EJ, Kim JH, Kim TD, Kim YK, Kang C, and Gho YS (2010) A Membranous Form of ICAM-1 on Exosomes Efficiently Blocks Leukocyte Adhesion to Activated Endothelial Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397 (2): 251–56
- Li S, Wu Y, Ding F, Yang J, Li J, Gao X, Zhang C, and Feng J (2020) Engineering Macrophage-Derived Exosomes for Targeted Chemotherapy of Triple-Negative Breast Cancer. *Nanoscale* 12 (19): 10854–62
- Linton SS, Abraham T, Liao J, Clawson GA, Butler PJ, Fox T, Kester M, and Matters GL (2018) Tumor-Promoting Effects of Pancreatic Cancer Cell Exosomes on THP-1-Derived Macrophages. *PLoS One* 13 (11): e0206759
- Liu X, Papukashvili D, Wang Z, Liu Y, Chen X, Li J, Li Z, Hu L, Li Z, Rcheulishvili N, Lu X, and Ma J (2022) Potential Utility of MiRNAs for Liquid Biopsy in Breast Cancer. *Front. Oncol.* 12 (8): 1–27
- Lopes AT, Hausrat TJ, Heisler FF, Gromova K V., Lombino FL, Fischer T, Ruschkies L, Breiden P, Thies E, Hermans-Borgmeyer I, Schweizer M, Schwarz JR, Lohr C, and Kneussel M (2020) Spastin Depletion Increases Tubulin Polyglutamylation and Impairs Kinesin-Mediated Neuronal Transport, Leading to Working and Associative Memory Deficits. *PLOS Biol.* 18 (8):

e3000820

- Loubéry S, Wilhelm C, Hurbain I, Neveu S, Louvard D, and Coudrier E (2008) Different Microtubule Motors Move Early and Late Endocytic Compartments. *Traffic* 9 (4): 492–509
- Luan X, Sansanaphongpricha K, Myers I, Chen H, Yuan H, and Sun D (2017) Engineering Exosomes as Refined Biological Nanoplatfoms for Drug Delivery. *Acta Pharmacol. Sin.* 38 (6): 754–63
- Ludueña RF (1997) Multiple Forms of Tubulin: Different Gene Products and Covalent Modifications. In *Int. Rev. Cytol.*, 178:207–75
- Mahalingan KK, Keith Keenan E, Strickland M, Li Y, Liu Y, Ball HL, Tanner ME, Tjandra N, and Roll-Mecak A (2020) Structural Basis for Polyglutamate Chain Initiation and Elongation by TTL Family Enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 27 (9): 802–13
- Majidpoor J, and Mortezaee K (2021) Steps in Metastasis: An Updated Review. *Med. Oncol.* 38 (1): 3
- Martin AM, Cagney DN, Catalano PJ, Warren LE, Bellon JR, Punglia RS, Claus EB, Lee EQ, Wen PY, Haas-Kogan DA, Alexander BM, Lin NU, Aizer AA, and Aizer A (2017) Brain Metastases in Newly Diagnosed Breast Cancer A Population-Based Study. *JAMA Oncol* 3 (8): 1069–77
- Marwitz S, Turkowski K, Nitschkowski D, Weigert A, Brandenburg J, Reiling N, Thomas M, Reck M, Drömann D, Seeger W, Rabe KF, Savai R, and Goldmann T (2020) The Multi-Modal Effect of the Anti-Fibrotic Drug Pirfenidone on NSCLC. *Front. Oncol.* 9 (1): 1550
- Melo-Hanchuk TD, and Kobarg J (2021) Polyglutamylase Activity of Tubulin Tyrosine Ligase-like 4 Is Negatively Regulated by the Never in Mitosis Gene A Family Kinase Never in Mitosis Gene A -Related Kinase 5. *World J. Biol. Chem.* 12 (3): 38–51
- Miller KE, and Heald R (2015) Glutamylatation of Nap1 Modulates Histone H1 Dynamics and Chromosome Condensation in *Xenopus*. *J. Cell Biol.* 209 (2): 211–20
- Mujtaba SS, Ni YB, Tsang JYS, Chan SK, Yamaguchi R, Tanaka M, Tan PH, and Tse GM (2013) Fibrotic Focus in Breast Carcinomas: Relationship with Prognostic Parameters and Biomarkers. *Ann. Surg. Oncol.* 20 (9): 2842–49
- Oliveira-Ferrer L, Kürschner M, Labitzky V, Wicklein D, Müller V, Lüers G, Schumacher U, Milde-Langosch K, and Schröder C (2015) Prognostic Impact of Transcription Factor Fra-1 in ER-Positive Breast Cancer: Contribution to a Metastatic Phenotype through Modulation of Tumor Cell Adhesive Properties. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 141 (10): 1715–26
- Palmulli R, and Niel G Van (2018) To Be or Not to Be... Secreted as Exosomes, a Balance Finely Tuned by the Mechanisms of Biogenesis. *Essays Biochem.* 62 (2): 177–91
- Qiang L, Yu W, Andreadis A, Luo M, and Baas PW (2006) Tau Protects Microtubules in the Axon from Severing by Katanin. *J. Neurosci.* 26 (12): 3120–29
- Raiborg C, Wenzel EM, Pedersen NM, Olsvik H, Schink KO, Schultz SW, Vietri M, Nisi V, Bucci C, Brech A, Johansen T, and Stenmark H (2015) Repeated ER-Endosome Contacts Promote Endosome Translocation and Neurite Outgrowth. *Nature* 520 (7546): 234–38
- Raposo G, and Stoorvogel W (2013) Extracellular Vesicles: Exosomes, Microvesicles, and Friends. *J. Cell Biol.* 200 (4): 373–83
- Raudenska M, Balvan J, and Masarik M (2021) Crosstalk between Autophagy

- Inhibitors and Endosome-Related Secretory Pathways: A Challenge for Autophagy-Based Treatment of Solid Cancers. *Mol. Cancer* 20 (1): 140
- Redeker V, Melki R, Promé D, Caer J-P Le, and Rossier J (1992) Structure of Tubulin C-Terminal Domain Obtained by Subtilisin Treatment - The Major Alpha- and Beta-Tubulin Isoforms from Pig Brain Are Glutamylated. *FEBS Lett.* 313 (2): 185–92
- Regnard C, Desbruyères E, Huet JC, Beauvallet C, Pernollet JC, and Eddé B (2000) Polyglutamylation of Nucleosome Assembly Proteins. *J. Biol. Chem.* 275 (21): 15969–76
- Roll-Mecak A (2020) The Tubulin Code in Microtubule Dynamics and Information Encoding. *Dev. Cell* 54 (1): 7–20
- Roll-Mecak A, and McNally FJ (2010) Microtubule-Severing Enzymes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22 (1): 96–103
- Rowland BD, Bernards R, and Peeper DS (2005) The KLF4 Tumour Suppressor Is a Transcriptional Repressor of P53 That Acts as a Context-Dependent Oncogene. *Nat. Cell Biol.* 7 (11): 1074–82
- Rüdiger M, Plessman U, Klöppel K, Wehland J, and Weber K (1992) Class II Tubulin, the Major Brain Beta-Tubulin Isoform Is Polyglutamylated on Glutamic Acid Residue 435. *FEBS Lett.* 308 (1): 101–5
- Salimi L, Akbari A, Jabbari N, Mojarad B, Vahhabi A, Szafert S, Kalashani SA, Soraya H, Nawaz M, and Rezaie J (2020) Synergies in Exosomes and Autophagy Pathways for Cellular Homeostasis and Metastasis of Tumor Cells. *Cell Biosci.* 10 (1): 1–18
- Schoumacher M, Goldman RD, Louvard D, and Vignjevic DM (2010) Actin, Microtubules, and Vimentin Intermediate Filaments Cooperate for Elongation of Invadopodia. *J. Cell Biol.* 189 (3): 541–56
- Sideris N, Dama P, Bayraktar S, Stiff T, and Castellano L (2022) LncRNAs in Breast Cancer: A Link to Future Approaches. *Cancer Gene Ther.* 29 (12): 1866–77
- Sirajuddin M, Rice LM, and Vale RD (2014) Regulation of Microtubule Motors by Tubulin Isoforms and Post-Translational Modifications. *Nat. Cell Biol.* 16 (4): 335–44
- Tanaka T, Hozumi Y, Martelli AM, Iino M, and Goto K (2019) Nucleosome Assembly Proteins NAP1L1 and NAP1L4 Modulate P53 Acetylation to Regulate Cell Fate. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1866 (12): 118560
- Théry C, Clayton A, Amigorena S, and Raposo G (2006) Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 30 (1): 3.22.1-3.22.29
- Tinevez J-Y, Perry N, Schindelin J, Hoopes GM, Reynolds GD, Laplantine E, Bednarek SY, Shorte SL, and Eliceiri KW (2017) TrackMate: An Open and Extensible Platform for Single-Particle Tracking. *Methods* 115 (10): 80–90
- Tominaga N, Kosaka N, Ono M, Katsuda T, Yoshioka Y, Tamura K, Lötval J, Nakagama H, and Ochiya T (2015) Brain Metastatic Cancer Cells Release MicroRNA-181c-Containing Extracellular Vesicles Capable of Destructing Blood-Brain Barrier. *Nat. Commun.* 6 (6716)
- Torrino S, Grasset EM, Audebert S, Belhadj I, Lacoux C, Haynes M, Pisano S, Abélanet S, Brau F, Chan SY, Mari B, Oldham WM, Ewald AJ, and Bertero T (2021) Mechano-Induced Cell Metabolism Promotes Microtubule Glutamylated to Force Metastasis. *Cell Metab.* 33 (7): 1342-1357.e10
- Valenstein ML, and Roll-Mecak A (2016) Graded Control of Microtubule Severing

- by Tubulin Glutamylation. *Cell* 164 (5): 911–21
- Verweij FJ, Bebelman MP, George AE, Couty M, Bécot A, Palmulli R, Heiligenstein X, Sirés-Campos J, Raposo G, Pegtel DM, and Niel G van (2022) ER Membrane Contact Sites Support Endosomal Small GTPase Conversion for Exosome Secretion. *J. Cell Biol.* 221 (12): e202112032
- Vousden KH, and Prives C (2009) Blinded by the Light: The Growing Complexity of P53. *Cell* 137 (3): 413–31
- Walker S, Busatto S, Pham A, Tian M, Suh A, Carson K, Quintero A, Lafrence M, Malik H, Santana MX, and Wolfram J (2019) Extracellular Vesicle-Based Drug Delivery Systems for Cancer Treatment. *Theranostics* 9 (26): 8001–17
- Whipple RA, Matrone MA, Cho EH, Balzer EM, Vitolo MI, Yoon JR, Ioffe OB, Tuttle KC, Yang J, and Martin SS (2010) Epithelial-to-Mesenchymal Transition Promotes Tubulin Detyrosination and Microtentacles That Enhance Endothelial Engagement. *Cancer Res.* 70 (20): 8127–37
- Xing Y, Ren Z, Jin R, Liu L, Pei J, and Yu K (2022) Therapeutic Efficacy and Mechanism of CD73-TGFβ Dual-Blockade in a Mouse Model of Triple-Negative Breast Cancer. *Acta Pharmacol. Sin.* 43 (9): 2410–18
- Yamaguchi H, and Condeelis J (2007) Regulation of the Actin Cytoskeleton in Cancer Cell Migration and Invasion. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1773 (5): 642–52
- Ye B, Liu B, Hao L, Zhu X, Yang L, Wang S, Xia P, Du Y, Meng S, Huang G, Qin X, Wang Y, Yan X, Li C, Hao J, Zhu P, He L, Tian Y, and Fan Z (2018) Klf4 Glutamylation Is Required for Cell Reprogramming and Early Embryonic Development in Mice. *Nat. Commun.* 9 (1): 1–16
- Yu D, Li Y, Wang M, Gu J, Xu W, Cai H, Fang X, and Zhang X (2022) Exosomes as a New Frontier of Cancer Liquid Biopsy. *Mol. Cancer* 21 (1): 56
- Yu I, Garnham CP, and Roll-Mecak A (2015) Writing and Reading the Tubulin Code. *J. Biol. Chem.* 290 (28): 17163–17172
- Zhang W, Zhong W, Wang B, Yang J, Yang J, Yu Z, Qin Z, Shi A, Xu W, Zheng C, Schuchter LM, Karakousis GC, Mitchell TC, Amaravadi R, Herlyn M, Dong H, Gimotty PA, Daaboul G, Xu X, and Guo W (2022) ICAM-1-Mediated Adhesion Is a Prerequisite for Exosome-Induced T Cell Suppression. *Dev. Cell* 57 (3): 329-343.e7
- Zhao C, Wang H, Xiong C, and Liu Y (2018) Hypoxic Glioblastoma Release Exosomal VEGF-A Induce the Permeability of Blood-Brain Barrier. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 502 (3): 324–31
- Zhou W, Fong MY, Min Y, Somlo G, Liu L, Palomares MR, Yu Y, Chow A, Timothy S, Connor FO, Chin AR, Yen Y, Wang Y, Marcusson EG, Chu P, Wu J, Wu X, Li AX, Li Z, Gao H, Ren X, and Boldin MP (2014) Cancer-Secreted MiR-105 Destroys Vascular Endothelial Barriers to Promote Metastasis. *Cancer Cell* 25 (4): 501–15

## 9. Erklärung des Eigenanteils

Die Projektidee sowie das Konzept wurde von Prof. Dr. Sabine Windhorst verfasst und koordiniert. Die ausführliche Literaturrecherche zu Beginn und der fortlaufende Austausch im Journal Club des Universitären Cancer Center Hamburgs (UCCH) erlaubten mir, neue Aspekte einfließen zu lassen. In Zusammenarbeit und gemäß den Vorversuchen wurde die weitere Projektplanung stetig reevaluiert und entsprechend angepasst. Regelmäßig stellte ich meine Ergebnisse in den Arbeitsgruppen- und Institutsseminaren vor.

Für den experimentellen Teil der Arbeit wurde ich von Christine Blechner, Dr. Saskia Grüb, Dr. Stefanie Muhs, Dr. Bas van Bommel, Michaela Mischak und Dr. Michaela Schweizer eingearbeitet.

Ich etablierte eigenständig die Exosomenisolation und die NTA. Vollständig von mir durchgeführt wurden die qRT-PCRs, Western Blots, Immunopräzipitationen, Erhaltung der Zelllinien sowie Lebendzellmikroskopie, Konfokalmikroskopie und Immunocytochemie. Die erfassten Daten wurden von mir ausgewertet, visualisiert und in den aktuellen Forschungsstand eingeordnet. Die „*transport-shapes-signature*“-Hypothese wurde von mir entwickelt und mit Prof. Windhorst sowie Yannes Popp fachlich diskutiert.

Die Massenspektrometrie sowie deren Auswertung wurde durch die AG Schlüter und die Elektronenmikroskopie von Dr. Michaela Schweizer durchgeführt. Durch Prof. Dr. Leticia Oliveira-Ferrer und ihre Arbeitsgruppe erfolgte die *microarray* Analyse. Die Arbeit von Juliana Schattschneider ist in Abb. 2A, Abb. 3A und Abb. 4 sowie von Christine Blechner in Abb. 5C-E, Abb. 7 und Abb.8 gebündelt.

Des Weiteren führte ich im Rahmen der Konzeptoptimierung Versuche durch, welche nicht in der Publikation Erwähnung finden. Dies umfasst die rekombinante Proteinexpression von TTLL4, die sequenzielle Fraktionierung der Tumorzellen sowie deren Charakterisierung mittels Western Blot, qRT-PCR und Probensammlung für die Massenspektrometrie. In Kooperation mit Dr. Fabienne Hamester erfolgte die Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes von BBB-Modellen mit Endothelzellen und Astrozyten. Zusätzlich zu EV auf Grids wurden eingebettete EVs in Zusammenarbeit mit Dr. Michaela Schweizer mittels Elektronenmikroskopie analysiert.

Abschließend zur experimentellen Arbeit verfasste ich unter Supervision von Prof. Dr. Sabine Windhorst ein Publikationsentwurf und der aktuelle Forschungsstand wurde gemeinsam diskutiert. Prof. Dr. Sabine Windhorst schrieb und finalisierte das Manuskript für die Veröffentlichung.

## 10. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Sabine Windhorst für die Ermöglichung meiner Promotionsarbeit und darüber hinaus für ihre ansteckende Begeisterung an der Welt des Zytoskeletts bedanken. Von ihrer verlässlichen Betreuung und ihrer wissenschaftlichen Expertise durfte ich stets profitieren.

Danken möchte ich ebenso dem Institutsdirektor Prof. Dr. Aymelt Itzen für die bereichernden Seminare und die Möglichkeit meine Doktorarbeit am Institut für Biochemie und Signaltransduktion durchführen zu können.

Ein großes Dankeschön gilt den Kooperationspartner:innen für die exzellente Zusammenarbeit: Dr. Michaela Schweizer, Prof. Dr. Marina Mikhaylova, Prof. Dr. Kneussel, Prof. Dr. Johanna Brander, Prof. Hartmut Schlüter, Dr. Christoph Krisp und der UKE Microscopy Imaging Facility (UMIF). Sie inspirierten stets durch ihre fachliche Kompetenz und ihre wertvolle Unterstützung hat diese Arbeit in wesentlichen Stellen erst ermöglicht.

Insbesondere möchte ich hiermit Prof. Dr. Leticia Oliveira-Ferrer und ihrer Arbeitsgruppe für ihren essenziellen Beitrag zur Publikation und den fachlichen Austausch wertschätzen. Für die erfolgreiche Zusammenarbeit und gründlichen Vorversuche ist meine Co-Autorin Juliane Schattschneider zu honorieren.

Einen lieben Dank möchte ich dem gesamten Laborteam für die freundliche Einarbeitung, Ermutigungen und hilfreiche Unterstützung bei aufwendigen Versuchen aussprechen. Besonders zu würdigen ist Christine Blechner für ihre zahlreichen Hilfestellungen, ihren Optimismus und ihre unerschöpfliche Geduld auch in kritischen Phasen. Ihre Arbeit trug wesentlich zur Publikation bei.

Ein großer Dank gebührt Yannes Popp für die technische Unterstützung bei der Lebendzellmikroskopie, die klugen Verbesserungsvorschläge und Ideen. Vor allem aber danke ich ihm für den immensen Zuspruch und stetigen Rückhalt.

Bei dieser Gelegenheit möchte ich meinen Dank auch dem Mildred-Scheel-Doktorandenprogramm der Deutschen Krebshilfe für die finanzielle Unterstützung aussprechen.

Abschließend möchte ich mich noch für die standhafte Unterstützung, kritische Lektüre und umsichtigen Ratschläge bei meiner Familie, Familie Feuerle-Popp sowie meinen Freund:innen bedanken.

## **11. Lebenslauf**


entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

## 12. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.



Unterschrift: .....