

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Biochemie und Signaltransduktion
Martinistraße 52
D-20246 Hamburg

Institutsdirektor
Prof. Dr. Aymelt Itzen

Strong fascin expression promotes metastasis independent of its F-actin bundling activity

Dissertation

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

vorgelegt von:

Lisa Stephanie Heinz
aus Hamburg

Hamburg 2019

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 24.09.2019**

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Sabine Windhorst

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Linda Diehl

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. Jürgen Dittmer

Inhalt

| | |
|---|----|
| 1. Artikel | 4 |
| 2. Abkürzungen | 18 |
| 3. Darstellung der Publikation | 19 |
| 3.1. Einleitung..... | 19 |
| 3.2. Ergebnisse | 20 |
| 3.2.1. Expression von Aktin assoziierten Proteinen in hoch malignen MDA-MB-231 Subtypen | 20 |
| 3.2.2. Klinische Relevanz einer Fascin-Hyperexpression | 21 |
| 3.2.3. Effekt einer Fascin-Hyperexpression auf die Aktindynamik <i>in vitro</i> und in Zellen | 22 |
| 3.2.4. Die Fascin-Hyperexpression in MDA-MB-231 Zellen erhöht deren Metastasierung unabhängig von Fascins Aktinbündelungsaktivität..... | 24 |
| 3.2.5. Effekt der Fascin-Hyperexpression auf Zell-Viabilität, Adhäsion, Transmigration und Koloniebildung | 25 |
| 3.2.6. Die Fascin-Hyperexpression erhöht die Mikrotubulidynamik..... | 25 |
| 3.2.7. Hohe Fascin Konzentrationen beeinflussen die Mikrotubulidynamik in zellfreien Systemen | 26 |
| 3.3. Diskussion | 27 |
| 4. Zusammenfassung..... | 30 |
| 5. Summary..... | 31 |
| 6. Literaturverzeichnis | 32 |
| 7. Erklärung des Eigenanteils an der Publikation | 34 |
| 8. Danksagungen | 36 |
| 9. Lebenslauf..... | 37 |
| 10. Eidesstattliche Versicherung | 38 |

Strong fascin expression promotes metastasis independent of its F-actin bundling activity

Lisa S. Heinz^{1,*}, Stefanie Muhs^{1,*}, Johanna Schiewek¹, Saskia Grüb¹, Marcus Nalaskowski¹, Yuan-Na Lin^{1,6}, Harriet Wikman², Leticia Oliveira-Ferrer³, Tobias Lange⁴, Jasmin Wellbrock⁵, Anja Konietzny⁷, Marina Mikhaylova⁷ and Sabine Windhorst¹

¹Department of Biochemistry and Signal Transduction, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

²Institute of Tumor Biology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

³Department of Gynecology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

⁴Institute of Anatomy and Experimental Morphology, University Cancer Center Hamburg, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

⁵Department of Oncology, Hematology and Bone Marrow Transplantation with Section Pneumology, Hubertus Wald University Cancer Center, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

⁶Department of General, Visceral and Thoracic Surgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

⁷DFG Emmy Noether Group 'Neuronal Protein Transport', Center for Molecular Neurobiology, ZMNH, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

*These authors have contributed equally to this work

Correspondence to: Sabine Windhorst, email: s.windhorst@uke.uni-hamburg.de

Keywords: fascin; metastasis; actin; microtubule; cytoskeletal dynamics

Received: April 21, 2017

Accepted: September 27, 2017

Published: November 01, 2017

Copyright: Heinz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

High expression of the actin bundling protein Fascin increases the malignancy of tumor cells. Here we show that fascin expression is up-regulated in more malignant sub-cell lines of MDA-MB-231 cells as compared to parental cells. Since also parental MDA-MB-231 cells exhibit high fascin levels, increased fascin expression was termed as "hyperexpression". To examine the effect of fascin hyperexpression, fascin was hyperexpressed in parental MDA-MB-231 cells and metastasis was analyzed in NOD scid gamma (NSG) mice. In addition, the effect of fascin mutants with inactive or constitutively active actin bundling activity was examined. Unexpectedly, we found that hyperexpression of both, wildtype (wt) and mutant fascin strongly increased metastasis *in vivo*, showing that the effect of fascin hyperexpression did not depend on its actin bundling activity. Cellular assays revealed that hyperexpression of wt and mutant fascin increased adhesion of MDA-MB-231 cells while transmigration and proliferation were not affected. Since it has been shown that fascin controls adhesion by directly interacting with *microtubules* (MTs), we analyzed if fascin hyperexpression affects MT dynamics. We found that at high concentrations fascin significantly increased MT dynamics in cells and in cell-free approaches. In summary our data show that strong expression of fascin in breast cancer cells increases metastasis independent of its actin bundling activity. Thus, it seems that the mechanism of fascin-stimulated metastasis depends on its concentration.

INTRODUCTION

Proteins regulating the cytoskeleton are very promising targets for therapy because they are essential to regulate morphological changes associated with tumor cell metastasis. Expression of the actin bundling protein fascin is up-regulated in many tumor types (reviewed in [1]) and it has been shown that this up-regulated fascin expression is associated with increased risk of mortality in breast, colorectal and gastric cancer [2]. Therefore, fascin is discussed as biomarker and cellular target for therapy of malignant cancers. Different groups [3, 4] revealed that direct inhibition of the actin bundling activity of fascin in malignant breast cancer cells had the same metastasis-suppressing effect as its down-regulation. Thus, it seems that the actin bundling activity of fascin accounts for its metastasis-promoting activity. The actin bundling activity of fascin is essential for the formation of filopodia [5] and is also needed for actin stabilization in invadopodia [6], indicating that fascin promotes metastasis by stabilizing cellular protrusions essential for adhesion and invasion.

The fascin molecule is composed of four β -trefoils of which trefoils one and three have actin-binding capacity [7]. The actin binding site in β -trefoil one is inhibited by protein kinase C (PKC)-mediated phosphorylation at Ser-39 [8] resulting in inhibition of actin bundling activity. Obviously, transient activation and inactivation of fascin's actin bundling activity is required for its metastasis-promoting function since overexpression of a phosphomimic and a dephosphomimic mutant did not, while overexpression of wt fascin did increase metastasis of colon cancer cells [9]. In addition to its actin bundling activity, fascin also has actin bundling-independent effects. Villari et al. (2015) [10] showed that fascin can alter microtubule (MT) dynamics by directly binding to MTs via amino acids 234-250. Furthermore, they demonstrated that fascin-mediated regulation of MT dynamics is essential for focal adhesion assembly of breast cancer cells.

In this study we demonstrate that fascin expression is up-regulated in more malignant subtypes of breast cancer MDA-MB-231 cells and reveal that this "fascin hyperexpression" increases metastasis by an actin bundling-independent mechanism.

RESULTS

Expression of actin-associated proteins in highly malignant MDA-MB-231 subtypes

By serial passaging of the MDA-MB-231 cells in mice by intracardiac injection and subsequent harvest of disseminated cell deposits, different subtypes of cell lines were generated that preferentially disseminate to either the brain (MDA-MB-231-BR) or the bone (MDA-MB-231-SA) [11, 12]. Since cytoskeletal arrangements

are required for metastatic spread, we analyzed whether mRNA levels of actin-associated proteins are altered in MDA-MB-231-BR and MDA-MB-231-SA cells as compared to the parental cell line. cDNA microarray data showed that the level of most actin-associated proteins were similar between parental and MDA-MB-231-BR and MDA-MB-231-SA cells. However, mRNA levels of the actin severing proteins gelsolin and cofilin, as well as that of the actin-cross-linking protein Filamin A, were drastically reduced in MDA-MB-231-BR and MDA-MB-231-SA cells as compared to parental MDA-MB-231 cells. Only expression of the actin bundling protein fascin was substantially increased (3-fold, Figure 1A). To confirm these results, protein levels were analyzed by Western blotting (Figure 1B, 1C). The result of this analysis confirmed reduced expression of gelsolin and Filamin A as well as increased expression of fascin in MDA-MB-231-BR and MDA-MB-231-SA as compared to parental cells, while at the protein level cofilin was not altered (Figure 1B, 1C). It has been already shown that gelsolin expression is down-regulated in malignant breast cancer by epigenetic regulation [13]. Whether up-regulated fascin expression and downregulated expression of gelsolin and Filamin-A are related is not known.

Here, we focused on the effect of fascin-upregulation on malignancy of MDA-MB-231 cells. Since at least two different authors revealed that the high basal fascin level is essential for metastasis of parental MDA-MB-231 cells [3, 4], it was interesting to know if a further increase of fascin expression (which we state as "hyperexpression") further increases malignancy of MDA-MB-231 cells.

Clinical relevance of fascin hyperexpression

It is well documented that a high fascin expression in breast cancer correlates with bad clinical outcome (reviewed in [1]). However it was not clear if a further increase of fascin expression is associated with higher malignancy in breast cancer. Therefore, we analysed fascin mRNA levels in primary breast cancer tissues and grouped the cohort (n=194) into quartiles of which the last one (Q4) represents samples with fascin hyperexpression. To perform correlation analysis with clinical parameter Q1-Q3 (low, moderate-low, moderate-high fascin expression) was compared with Q4 (fascin high expression). This analysis revealed that high fascin mRNA levels significantly correlated with increased lymph node metastasis ($p < 0.001$; Figure 2A) and higher grading ($p = 0.002$; Figure 2B). In addition a significant correlation of fascin hyperexpression with the molecular subtype was found ($p < 0.001$; Figure 2C). Here, HER2+ and triple negative breast cancer (TNBC) tumors were characterized by significantly higher fascin levels. Further, high tumour fascin levels were significantly associated with shorter overall survival ($p = 0.04$; Figure 2D) and showed a trend regarding disease-free survival ($p = 0.1$;

Supplementary Figure 1A) in our collective. Interestingly, stratified analyses within the different molecular subtypes showed a significant correlation of high fascin levels with

disease free survival in HER2+ and TNBC ($p=0.035$; Supplementary Figure 1B), whereas no correlation could be found in luminal tumors ($p=0.078$; Supplementary

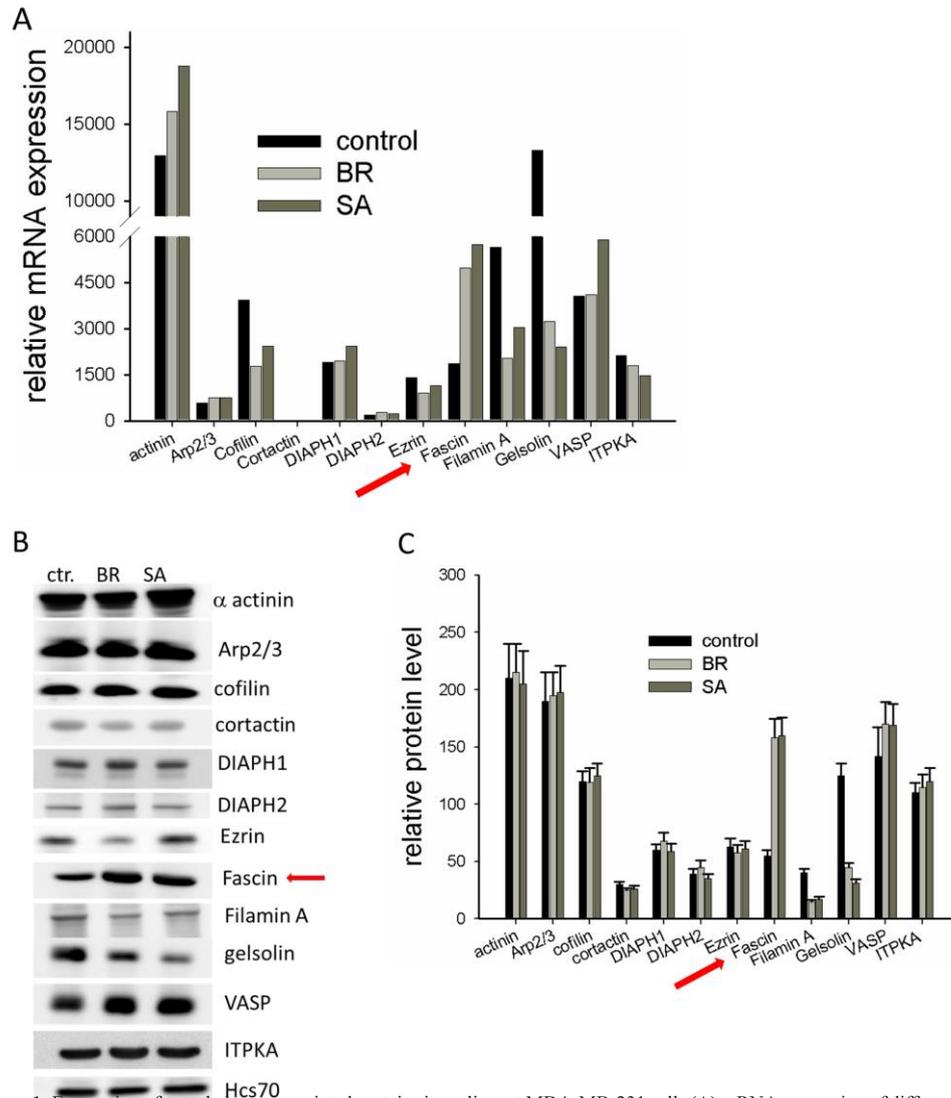


Figure 1: Expression of cytoskeleton-associated proteins in malignant MDA-MB-231 cells (A) mRNA expression of different cytoskeleton associated proteins of parental MDA-MB-231, MDA-MB-231-SA and MDA-MB-231-BR was examined by a cDNA expression array (*Affymetrix®* GeneChip) (B) Protein lysates of MDA-MB-231, MDA-MB-231-SA and MDA-MB-231-BR were examined for expression of cytoskeleton-associated proteins by western blotting. Shown is one out of three representative western blots. (C) Band intensities ($n=3$) were determined, normalized to Hsc70 loading control and mean \pm SD was calculated. Shown are protein levels of actin binding proteins relative to the level of Hsc70.

Figure 1C). These data clearly show that fascin hyperexpression correlates with bad clinical outcome, especially in the more aggressive molecular subtypes of HER2+ and triple negative breast cancer.

Effect of fascin hyperexpression on actin dynamics *in vitro* and in cells

Our data above show fascin hyperexpression in both, malignant tumor samples from breast cancer patients and in MDA-MB-231 sublines with increased malignancy. It is described that the actin bundling activity of fascin accounts for its malignancy-promoting effect [3, 4]. Therefore, we next analyzed whether fascin's actin bundling activity increases upon fascin hyperexpression. Since the effect of actin-binding-proteins depends on the

actin to actin-binding-protein ratio, the actin-to-fascin ratios in parental and in MDA-MB-231-SA cells were determined by western blotting. This analysis revealed an actin-to-fascin ratio of 3:1 in MDA-MB-231 cells and 1:1 in MDA-MB-231-SA cells (Supplementary Figure 2). This result is in line with our data showing a 3-fold higher fascin level in MDA-MB-231-SA cells as compared to the parental cell line (Figure 1B, 1C).

To analyze if in principle fascin can increase actin bundling at an actin-to-fascin ratio of 1:1 as compared to 3:1, cell-free *in vitro* analysis were performed. In addition, mutants with constitutive active actin bundling activity (S39A) or with impaired actin bundling activity (S39D) were included as controls at actin-to-fascin ratios of 1:1. Determination of actin bundling activity by pulling down actin bundles did not reveal differences between

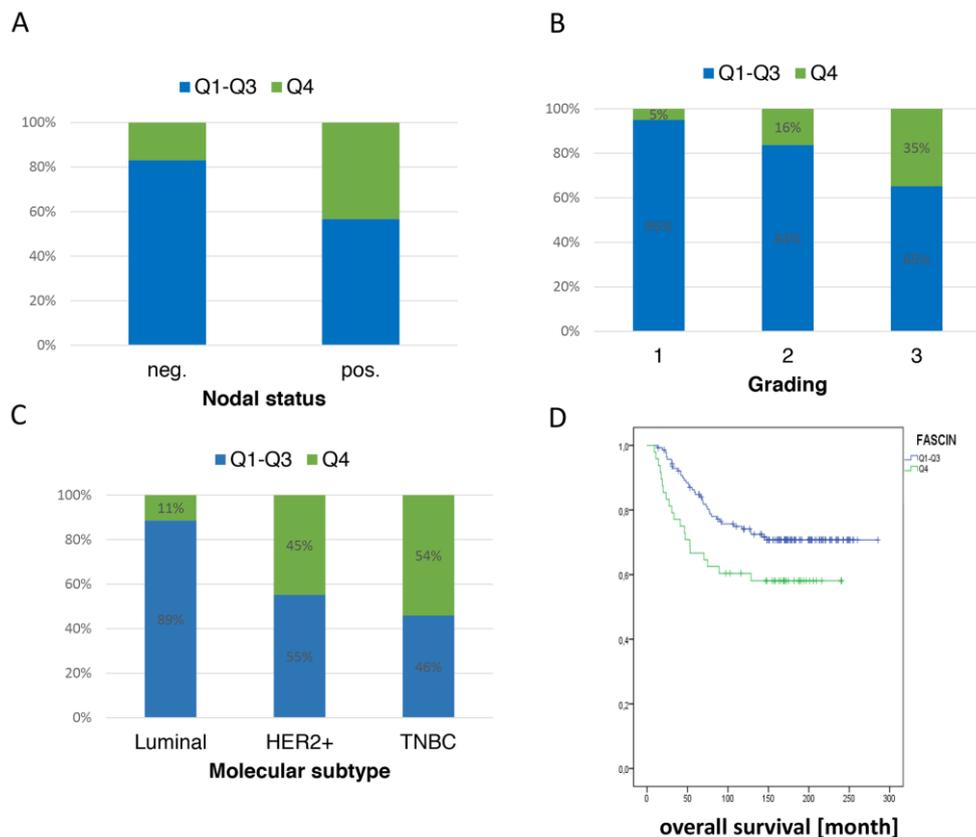


Figure 2: Hyperexpression of fascin is associated with poor clinical outcome. Fascin mRNA was analyzed from 194 breast cancer patient samples and correlation analysis with fascin expression, (A) nodal status, (B) tumor grade, (C) molecular subtype and (D) overall survival were performed.

actin-to-fascin ratios of 3:1 and 1:1, but confirmed that the fascin mutant S39D did not exhibit actin bundling activity (Figure 3A, 3B; actin band). In addition, Figure 3A (GST-Fascin band) shows that at an actin to fascin ratio of 2:1 binding of fascin to actin is saturated. However, visualization of actin bundles by fluorescence microscopy clearly showed that at an actin-to-fascin ratio of 1:1 actin bundles were more compact than at a ratio of 3:1 (Figure 3C) and resembled those actin bundles produced by fascin S39A. As expected, the fascin mutant S39D did not induce formation of actin bundles. Quantification of fluorescence signals derived from actin bundles confirmed that the density of actin bundles was significantly increased at an actin-to-fascin ratio of 1:1 as compared to 3:1 (Figure 3D). No differences were found between fascin and the fascin mutant S39A, because in a cell-free system no phosphorylation of fascin occurs. Thus, we conclude that in a cell-free system actin bundling activity of fascin increases at very high concentrations.

Next, we analyzed if this is also true in cells. Therefore, fascin or fascin mutants with inactive or constitutive active actin bundling activity (phosphomimic S39D or dephosphomimic S36A) were stably hyperexpressed in MDA-MB-231 cells using a lentiviral approach. After selection of positive cells with puromycin, hyperexpression of fascin was controlled by western-blot analysis (Figure 3E). Since bundling of actin filaments stabilizes F-actin and is involved in elongation of filopodia, the G-actin to F-actin ratio and filopodia length were analyzed in control cells and in cells hyperexpressing fascin or fascin mutants. To control that hyperexpressed fascin still locates in filopodia, MDA-MB-231 fascin hyperexpressing and control cells were stained with an anti-fascin antibody. This analysis revealed that hyperexpressed wt fascin accumulated at the tip and throughout the filopodia while fascin S39D was located diffusely in lamellipodia-like structures and Fascin S39A at the tip of filopodia (Supplementary Figure 3A).

Analysis of the G- to F-actin ratio and filopodia length revealed that only hyperexpression of the constitutive active fascin mutant (S39A) increased the F-actin concentration (Figure 3F) as well the length of filopodia (Figure 3G and Supplementary Figure 3B). The number of filopodia was not altered after hyperexpression of fascin or fascin mutants (Figure 3H). We assume that accumulation of high concentrations of constitutive active fascin at the leading edge of MDA-MB-231 cells increases actin bundling and thus stimulates elongation of filopodia. However, overexpression of wt or constitutive inactive fascin (S39D) had no effect on F-actin concentration and on filopodia elongation. This result shows that fascin S39D does not act as dominant negative mutant, most likely because it is not able to replace endogenous fascin from the tips of filopodia, because of its diffuse localization in lamellipodia (see Supplementary Figure 3A). In addition the result reveals that overexpression of

wt fascin does not increase the F-actin concentration and elongation of filopodia, indicating that hyperexpression of wt fascin does not further stimulate actin bundling in cells.

In conclusion, our results indicate that only hyperexpression of a constitutive active fascin mutant increases actin bundling while hyperexpression of wt fascin has no effect.

Hyperexpression of fascin in MDA-MB-231 cells increases metastasis independent of its actin-bundling activity

Our data above show that fascin hyperexpression does not further increase the formation of actin bundles in cells, indicating that the effect of fascin on actin bundling is saturated at a certain fascin level. These data assume that the effect of fascin hyperexpression on malignancy of breast cancer (see Figure 2) does not result from its actin bundling activity.

In order to validate this assumption, metastasis of MDA-MB-231 cells hyperexpressing fascin, fascin-S39D or fascin-S39A, as well as parental vector-transfected MDA-MB-231 cells (control), were analyzed in immunodeficient mice. The cells were injected subcutaneously into the flank of the mice and the animals were sacrificed when the primary tumor had reached a size of about 1.5 cm² (24 days after injection). To control that fascin expression did not decrease during growth of MDA-MB-231 cells in mice, the primary tumors were embedded in paraffin and stained for fascin. Analysis of the samples revealed that fascin expression remained stable after tumor growth in mice (Supplementary Figure 4). Spontaneous metastasis of the cells was analyzed by *Alu*-qRT-PCR and by histology (for details, see methods). We found that fascin-hyperexpression caused a 4-fold increase in the metastatic cell burden in the lungs as determined by *Alu* qRT-PCR ($p=0.022$, Mann Whitney test) as compared to control cells. Analysis of lung metastasis by histology revealed that both, the number and size of lung metastases were increased in fascin-hyperexpressing relative to control MDA-MB-231 cells (Figure 4B). Importantly, fascin hyperexpression did not alter primary tumor growth in our xenograft model (Figure 4C). Thus, fascin hyperexpression increases metastasis, but not tumor growth.

The metastatic cell loaded in the lungs of mice injected with MDA-MB-231 cells expressing the fascin mutant with inactive actin bundling activity (S39D) was even 9-fold higher as compared to control cells ($p=0.0007$, Mann Whitney test, Figure 4A), while the number of cells expressing the constitutive active form (S39A) of fascin was 6.5-fold higher ($p=0.004$, Mann Whitney test, Figure 4A). However, the higher effect of fascin mutants on metastasis relative to wt fascin could be explained by the fact, that the level of fascin mutants in MDA-MB-231 cells is higher than that of wt fascin (see Figure 3E).

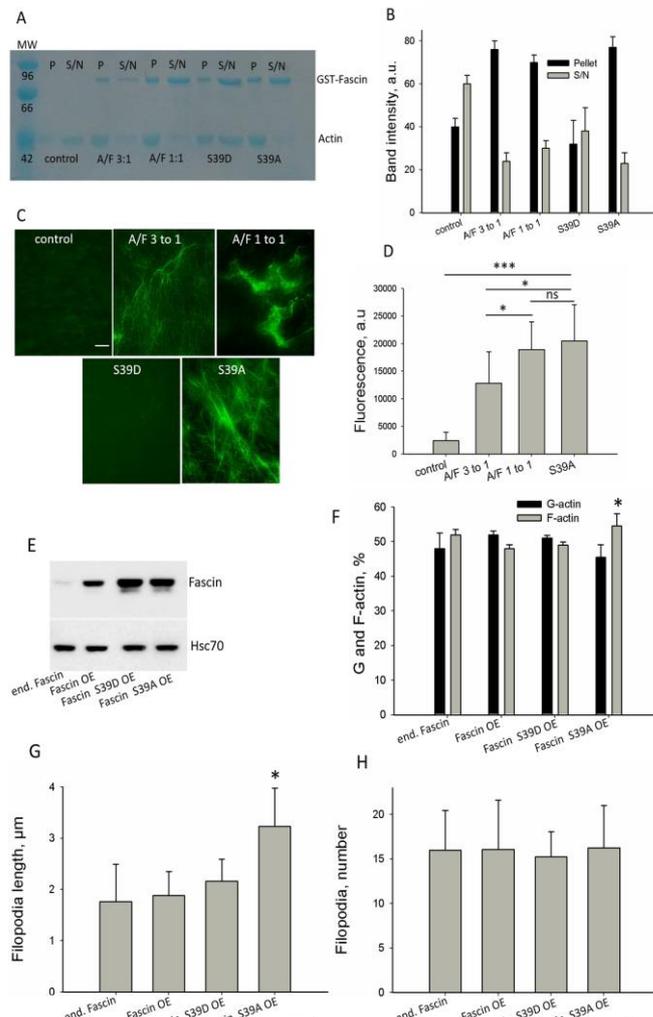


Figure 3: Effect of fascin on actin dynamics in a cell-free system and in cells. To analyze the effect of fascin hyperexpression on actin dynamics in cell-free systems, fascin was employed at actin to fascin ratios as occurring in parental MDA-MB-231 (A/F 3:1) or in the more malignant sub-cell line MDA-MB-231-SA (A/F 1:1). (A) Fascin or fascin mutants were incubated with F-actin and F-actin bundles were pulled down (P), while F-actin remained in the supernatant (S/N). GST-Fascin bound to F-actin is in the pellet fraction and non-bound GST-Fascin remained in the supernatant. (B) Band intensities of actin (42kDa) (n=3) were determined and mean \pm SD was calculated. (C) Actin alone (control) or in presence of fascin or fascin mutants was stained with Alexa-fluor[®]488-conjugated phalloidin and actin filaments or actin bundles were analyzed by fluorescence microscopy. Bar: 5 μ m. (D) Fluorescence intensity of actin bundles were analyzed by ImageJ. Shown are mean values of ten different micrographs from two independent experiments. *p<0.05; ***p<0.0001. (E) MDA-MB-231 cells were lentiviral-transduced with vectors encoding for fascin or fascin mutants. Two weeks after puromycin selection, expression of fascin was analyzed by western-blotting, Hsc70 signals served as loading control. (F) Protein lysates of MDA-MB-231 control, fascin or fascin-mutant overexpressing cells were fractionated by centrifugation. F-actin content of pellet and supernatant was analyzed using ITPKA, which is constitutively bound to F-actin, as marker. Then, band intensity was quantified and plotted in graph. Shown are mean values \pm SD of three independent experiments. *p<0.05. (G, H) MDA-MB-231 control, fascin or fascin-mutant hyperexpressing cells were stained for the filopodia marker vasodilator stimulated phosphoprotein (VASP) (see Supplementary Figure 3B) and filopodia length (G) and number of filopodia per cell (H) were measured using the Keyence software. Shown are mean values \pm SD of 40 cells from two different experiments.

In summary these *in vivo* data confirm our assumption that fascin hyperexpression increases metastasis independent of its actin bundling activity.

Cellular processes accounting for fascin-hyperexpression-stimulated metastasis

In order to analyze which cellular processes drives fascin-hyperexpression-stimulated metastasis, viability (Figure 5A), colony formation (Figure 5B), adhesion (Figure 5C) and trans-migration (Figure 5D) were compared between control and fascin or fascin-mutant hyperexpressing MDA-MB-231 cells. This analysis revealed that hyperexpression of fascin significantly increased colony formation and adhesion of MDA-MB-231 cells but had no significant effect on viability and on transmigration. In the case of adhesion, MDA-MB-231 cells hyperexpressing fascin, fascin S39D and fascin S39A significantly increased adhesion as compared to control cells ($p=0.002$, 0.0046 , 0.018).

However, colony formation was only significantly increased by hyperexpressing wt fascin ($p=0.03$). From this result we conclude that fascin hyperexpression only increases colony formation when its actin bundling activity can be transiently regulated by phosphorylation. Thus, the effect of fascin on colony formation seems to be dependent on its actin bundling activity. The stimulating effect of fascin hyperexpression on adhesion, however, seems to be independent of its actin bundling activity because hyperexpression of fascin as well as hyperexpression of fascin mutants with constitute active (S39A) or inactive (S39D) actin bundling activity had similar stimulated effects on adhesion of MDA-MB-231 cells.

Fascin hyperexpression increases microtubules dynamics

Our data above show that fascin-hyperexpression in MDA-MB-231 cells increases metastasis *in vivo* and adhesion *in vitro* independent of its actin bundling

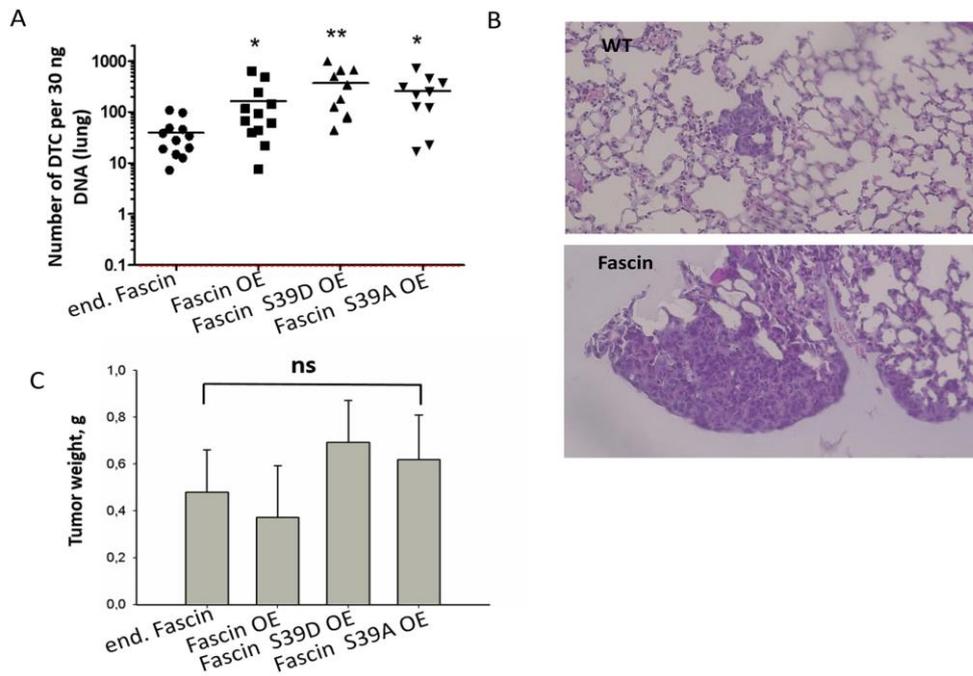


Figure 4: Fascin hyperexpression increases metastasis independently of its actin bundling activity. MDA-MB-231 control, fascin or fascin-mutant overexpressing cells were injected into the flank of NSG mice; 10 mice per cell line were used. About 6 weeks later the number of cells in the lung was analyzed by (A) *Alu* qRT-PCR and by (B) histological examination of HE-stained lungs. Please note the logarithmic scale of the y-axis in (A). * $p<0.05$, ** $p<0.001$ (Mann Whitney test). DTC: Disseminated tumor cells. Bar: 20 μ m. (B) Mean values of tumor weight in gram (g) \pm SD. (C) Primary tumors were dissected and weighed. Shown are mean values \pm SD from ten to twelve tumor per group.

activity. A recent study revealed that depletion of fascin in MDA-MB-231 cells resulted in less dynamic MTs. In addition the authors showed that fascin directly binds to MTs thereby regulating cellular adhesion [10]. It was thus interesting to analyze if hyperexpression of fascin in MDA-MB-231 cells also alter MT dynamics. For this purpose, control and fascin hyperexpressing MDA-MB-231 cells as well as cells hyperexpressing the inactive or constitutively active actin bundling fascin mutant were analyzed for expression of detyrosinated (thus stabilized [14]) MTs by western blotting. As shown in Figure 6, hyperexpression of wt and mutant fascin reduced the level of detyrosinated MTs by about 40%. Thus, hyperexpression of fascin seems to increase MT dynamics.

High fascin concentration alters MT-dynamics in a cell-free system

In order to analyze the mechanism by which fascin hyperexpression regulates MT dynamics, cell-free *in vitro* experiments were performed employing MT-to-fascin ratios as occurring in fascin overexpressing cells (1:1, see Supplementary Figure 2).

In principle, it is possible that actin binding of fascin influences its effect on MT dynamics. In this case fascin should connect the actin cytoskeleton with MTs. To analyze this, Alexa-fluor[®]488 labeled actin and taxol-stabilized, rhodamine labeled MTs with or without fascin were incubated and actin filaments and MTs were visualized by and fluorescence microscopy. As

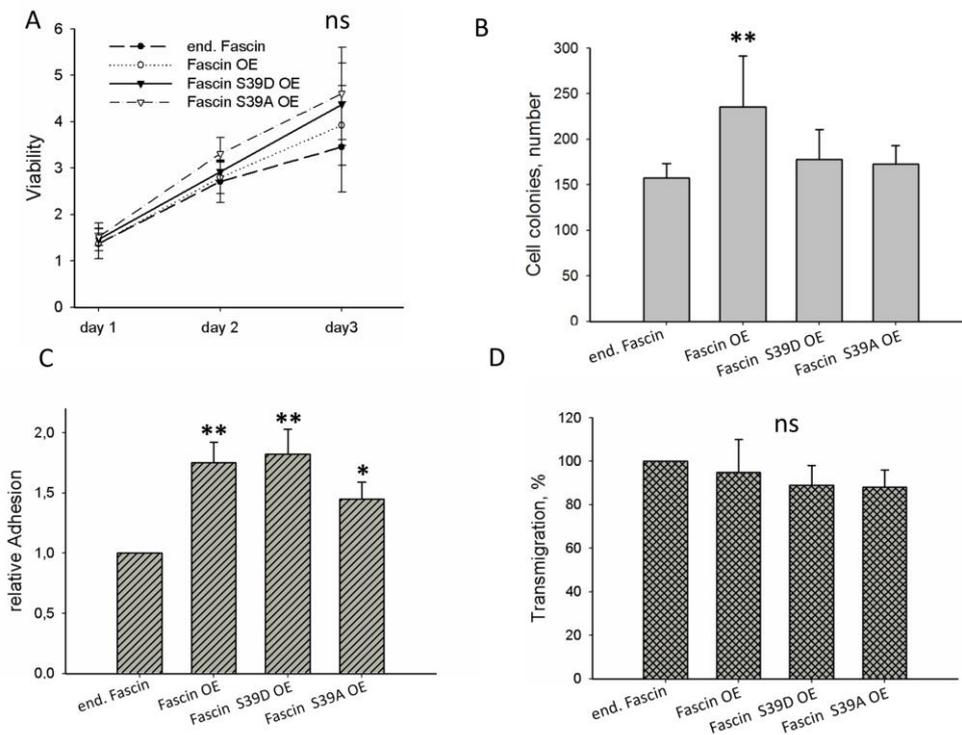


Figure 5: Cellular effects of fascin hyperexpression. (A) Viability was measured by the MTT-assay. Values were normalized to adhesion controls of cells incubated for 16 h (B) For colony assay 500 cells were seeded into 6-well plates and after incubation for 10 days colonies were stained with Giemsa and counted. (C) Adhesion was measured by determining the number of cells adhering to the Petri dish. (D) Transmigration was analyzed by the Transwell assay. In parallel cellular adhesion was measured and transmigrated cells were normalized to adherent cells. Control cells were set to 100%. Shown are mean values \pm SD of at least three independent experiments. ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$.

positive control Alexa-fluor[®]488 labeled actin and taxol-stabilized MTs were incubated with DIAPH2 which binds actin with its FH1/FH2 domains as well as MTs with its FH2 domain [15]. DIAPH2 induced the formation of polarized actin filaments and recruited MTs to F-actin (Supplementary Figure 5). However, in presence of fascin no co-localization between F-actin and MTs were detected (Figure 7A). Thus, it is unlikely that actin binding of fascin influences its effect on MT-dynamics.

Since our data above revealed that in MDA-MB-231 cells fascin hyperexpression increases MT dynamics we next analyzed if this is mediated directly or indirectly via cellular fascin-interaction partners. For this purpose growth of HiLyte Fluor[™]-647 labeled, non-taxol-stabilized MTs were analyzed by TIRF microscopy. Indeed, this analysis revealed that in the presence of fascin the percentage of both growth and shrinking of MTs ("dynamic MTs") was increased as compared to control (Figure 7B, 7C). In addition quantitative evaluation of kymographs showed that fascin significantly ($P=0.007$) accelerated MT-polymerization (Figure 7D, 7E). This result was confirmed by measuring polymerization of non-labeled and non-taxol-stabilized MTs in a Tecan reader at 340 nm, showing that fascin significantly ($P=0.0019$) increased the velocity (by 25%) of MT polymerization (Figure 7F). In conclusion, our data show that at high concentrations fascin increases MT-dynamics.

DISCUSSION

Proteins regulating the cytoskeleton are promising targets for therapy of malignant cancers (reviewed in [16]). In this study, we screened for actin-associated proteins which are differentially expressed in more

malignant sub-cell lines of MDA-MB-231 (MDA-MB-231-SA and MDA-MB-231-BR). Thereby, we found that fascin was the only actin-associated protein examined whose expression was up-regulated in both MDA-MB-231-SA and MDA-MB-231-BR cells. It has been described by different groups that high fascin expression increases malignancy of different tumor types (reviewed in [2]). However, parental MDA-MB-231 cells already expressed high fascin levels and it has been shown that in these cells fascin is essential for metastasis in SCID mice [3]. Thus, it was not clear if a further increase of fascin expression, as observed in MDA-MB-231-SA and MDA-MB-231-BR cells, further increases malignancy. To analyze this question, samples from breast cancer patients were analyzed for fascin expression. Groups containing patients with low, moderate-low and moderate-high fascin expression levels showed similar overall and progression-free survival times while the group with very high fascin expression (fascin hyperexpression) showed significant decreased survival. Thus it seemed that fascin hyperexpression increases malignancy of breast cancer cells.

To analyze the mechanism behind this, we compared fascin's actin bundling activity at actin-to-fascin ratios as occurring in parental MDA-MB-231 (3:1) and in MDA-MB-231-SA (1:1) cells. In addition, mutants with constitutively active or inactive actin bundling activity were analyzed. In cell-free assays actin bundling activity of fascin was increasable at an actin to fascin ratio of 1:1 as compared to 1:3. However, in cells fascin hyperexpression did not further enhance the effect of fascin on F-actin, indicating that the effect of fascin on actin dynamics is saturated at a certain fascin level. This result implied that the effect of fascin hyperexpression

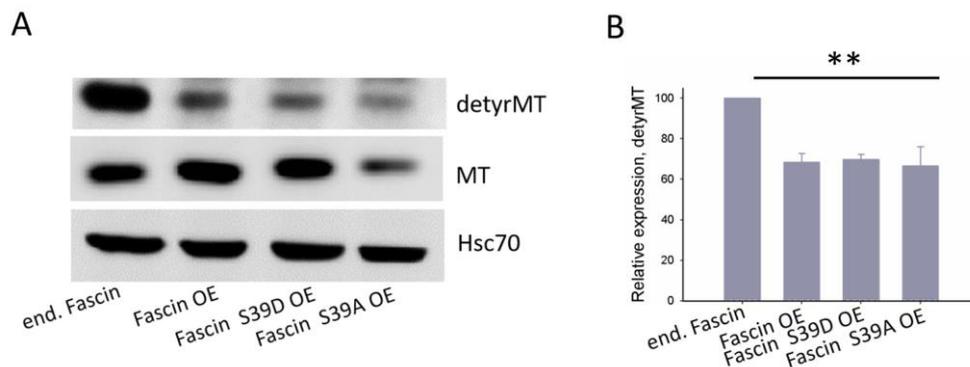


Figure 6: Fascin hyperexpression destabilizes MTs. (A) Protein lysates of MDA-MB-231 control, fascin or fascin-mutant hyperexpressing cells were blotted against detyrosinated (detyrMT), thus stabilized MTs. (B) Band intensities of detyrMT ($n=3$) were determined, normalized to MT-signals (which had been normalized to Hsc70 signals before) and mean \pm SD was calculated. ** $p<0.001$. Values of control cells were set to 100%.

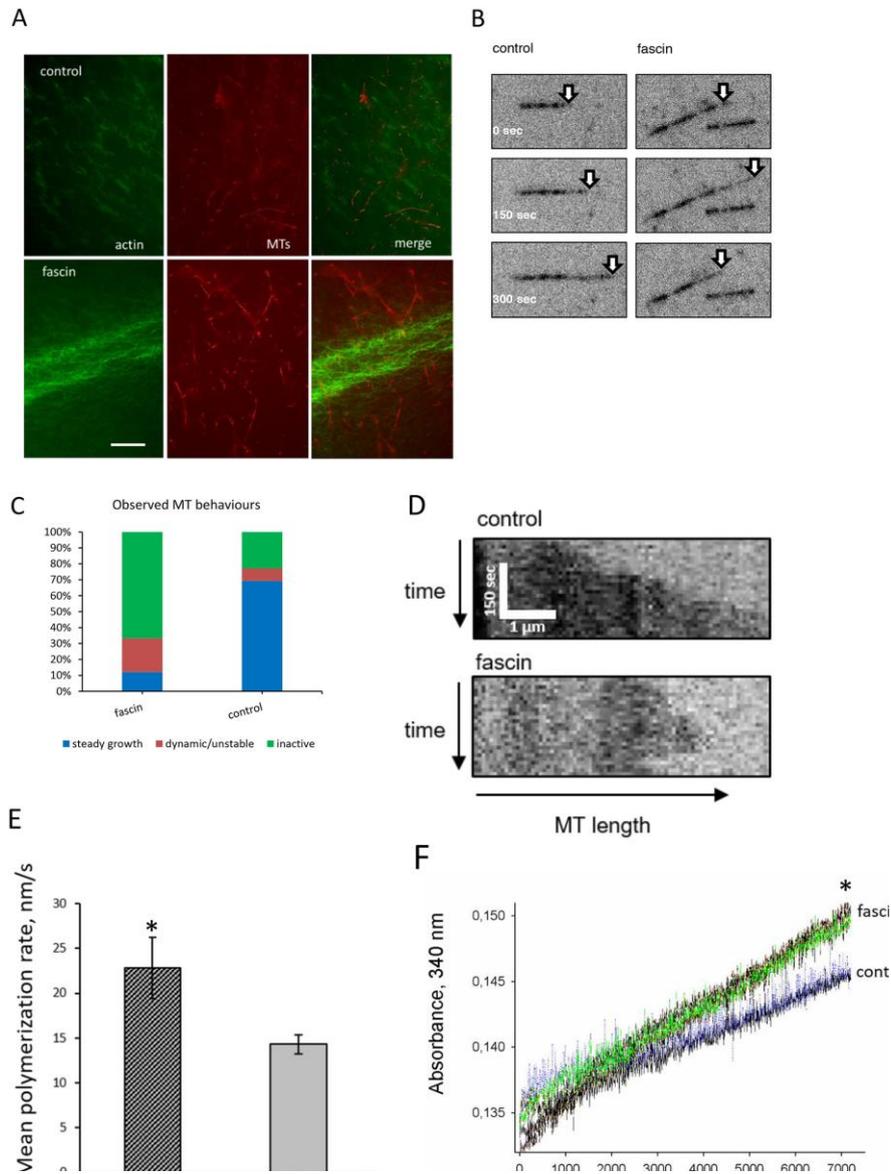


Figure 7: Fascin regulates MT-dynamics *in vitro* (A) First Alexa-fluor[®]488-coupled phalloidin-stained actin was applied to chamber slides. After 20 min of incubation, rhodamine labeled taxol-stabilized MTs were added and incubation was continued for another 15 min. Images were taken by fluorescence microscopy. The last image show merges of F-actin (green) and MTs (red). Bar: 5 μ m. (B-C) Show TIRF-analysis of fascin-controlled MT dynamics; (B) representative micrographs, (C) quantitative analysis of MT-dynamics, (D) kymographs of MT dynamics in presence or absence of fascin, (E) polymerization rates of MTs. Shown are mean values of three measurements \pm SEM (F) For confirmation, polymerization of non-labeled, non-taxol stabilized MTs was again measured at 340 nm in the presence or absence of fascin for 2 hours. Shown are three measurement of each sample.

expression further enhances metastasis independent of its actin bundling activity (see Graph in Figure 8). This conclusion should be taken into account for development of drugs inhibiting fascin activity.

MATERIALS AND METHODS

Analysis of mRNA expression data in cell lines and breast cancer tumor tissue samples

Microarray data was analyzed from pooled triplicate experiments of the three different subclones of the MDA-MB-231 cell line (parental, SA and BR) as described [20]. Array data is available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/GSE44354>. Authentications of all cell lines were conducted by short tandem repeat (STR) profiling to exclude cross-contamination between the cell lines.

Fascin mRNA levels was furthermore analysed using microarray data (Affymetrix HG-U133A) from a cohort of 194 mammary carcinoma enrolled in the Department of Gynecology, Hamburg University Medical Center. Cohort characteristics as well as technical details have been previously described [21]. Informed consent for the scientific use of tissue materials, which was approved by the local ethics committee (Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg, #OB/V/03), was obtained from all patients. The study was performed in accordance to the principles of the declaration of Helsinki and REMARK criteria (Mcshane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies (REMARK) 2005;2:416-422).

According to the fascin values (probe set 210933s_at) the cohort was divided into quartiles of similar size, representing low, moderate-low, moderate-high and high expression of the analyzed factor. Correlations between fascin levels and clinicopathological factors such as histological grading (for details, see <http://pathology.jhu.edu/breast/grade.php>), stage, lymph node involvement, estrogen and progesterone receptor status (ER, PR) and molecular subtypes, were statistically examined by χ^2 -tests. Overall survival was analysed by Kaplan-Meier analysis and Log-Rank-Tests. Probability values less than 0.05 were regarded as statistically significant. All statistical analyses were conducted using SPSS software Version 23 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Recombinant expression of fascin in bacteria or in MDA-MB-231 cells

The cDNA of fascin was first cloned into the pGEM®-T Easy vector (Promega, Mannheim, Germany) and the cDNA was mutated by Quick change mutagenesis to S39D or S39A. Then, wt and mutated cDNAs were sub cloned into the vector pGEX-6P-2A and expression

in *E-coli* and protein purification were performed as described [22].

For hyperexpression of fascin and fascin mutants in MDA-MB-231 cells, the cDNAs of wt and mutated fascin were cloned into the lentiviral vector LeGo-iC2-Puro+ which was a friendly gift from Kristoffer Riecken. For virus production HEK293-3T cells were used. 10 μ g LeGo-iC2-Puro+, 10 μ g gagpol packaging plasmid, 5 μ g pRSVrev packaging plasmid and 2 μ g VSV-G vector (coding for the envelop protein) were added to 750 μ l Optimem and incubated for 5 min at RT. In parallel 40 μ l Lipofectamine 2000 was mixed with 750 μ l Optimem and incubated for 5 min at RT. Both samples were mixed, incubated for 20 min at RT and applied to HEK-293-T cells which had been seeded to 10 cm dishes. HEK-293-T medium containing the virus was transferred to MDA-MB-231 cells grown in 6-well plates after 24 h, 48 h and 72 h. After further incubation for 24 h, the virus-containing medium was changed against puromycin (2 μ g/ml) containing DMEM/10% FCS. Overexpression of fascin was analyzed by western blotting after one week. Primary antibodies against fascin (Santa Cruz SC-251) and Hsc70 (Santa Cruz SC-7289) were used in a dilution of 1:1000 or 1:5000, respectively. Secondary antibodies against rabbit (Santa Cruz SC-2054) or mouse (Santa Cruz SC-2055) were used in dilutions of 1:5000.

Determination of actin-to-fascin or MT-to-fascin ratios in cells

To examine the effect of fascin hyperexpression on actin and MT dynamics in a cell-free system it is important to know the actin- (or MT-) to-fascin ratio. For this purpose, we blotted fascin, actin or tubulin standards as well as protein extracts from MDA-MB-231 and MDA-MB-231-SA cells against fascin (antibody from Santa Cruz SC-251, dilution 1:1000), actin (antibody from Sigma A2066, dilution 1:10,000) or tubulin (antibody from Sigma T1026, dilution 1:1000). Band intensities were analyzed by ImageJ. Based on the band intensities of protein standards, concentrations of fascin, actin and tubulin per mg cellular protein were calculated. Experiments were performed at least three times and mean \pm SD values were calculated.

Analysis of the actin structure in a cell-free system

All reagents used for cell-free analysis of actin or MTs dynamics were from tebu-bio Cytoskeleton (Offenbach, Germany).

The effect of fascin on F-actin structure was analyzed by florescence microscopy: Actin (1 mg/ml) was incubated on ice for one hour and was then centrifuged for 15 min at 13.000 g, 4 °C. The supernatant was used. 18 μ l G-buffer (see

[22]) including 200 μ M ATP and 1 mM DTT, 2 μ l actin, 2.5 μ l Alexa-fluor[®] conjugated phalloidin (1:25 dilution) as well as 2.5 μ l 10 \times assay buffer (see [22]) were mixed and applied to a poly-L-lysine-covered chamber slide (Ibidi, Martinsried, Germany). After about 20 min, actin bundles or cross links were monitored by fluorescence microscopy. Fluorescence intensity of actin bundles were analyzed by ImageJ. Five areas where actin bundles had been formed were analyzed per micrograph. In addition, five areas without actin bundles were analyzed (background). Then, mean values of fluorescence intensity of actin bundles and background were calculated and fluorescence intensity of actin bundles were subtracted from background. Five micrographs from two independent experiments were analyzed.

Actin bundling was measured by pull down experiments as described [22].

Determination of F-to-G-actin ratio

MDA-MB-231 cells, grown in 15 cm Petri dishes were washed twice with cold PBS. 3 ml PBS was added to the Petri dish, the cells were scraped with a cell scraper and centrifuged for 5 min at 500 g 4°C. Cell lysis was performed by adding 500 μ l lysis buffer (100 mM HEPES, pH7.9; 15 mM MgCl₂; 100 mM KCl, 1 mM DTT and proteinase inhibitor (Roche)), resuspending the cells and incubating them on ice for 15 min. Thereafter, 10% IGEPAL CA-6630 was added and the sample was vortexed for 10 sec and centrifuged for 30 s at 11.000 g 4°C. In the supernatant G-actin is enriched. The pellet was resuspended again in 70 μ l extraction buffer (20 mM HEPES pH 7.9; 1.5 mM MgCl₂, 0.42 M NaCl, 0.2 mM EDTA, 25% glycerol, 1 mM DTT and proteinase inhibitor (Roche)), incubated on a shaker for 30 min at 4°C und centrifuged for 5 min at 21,000 g 4°C. In this supernatant F-actin is enriched.

Actin standards and the supernatants (25 μ g protein each) were applied to SDS-PAGE and after blotting the gel, antibodies against actin (Sigma A2066 dilution, 1:10,000) and ITPKA (Santa Cruz SC-11206, dilution 1:2000) were applied.

Thereafter, band intensities were determined by ImageJ. Since ITPKA is constitutively bound to F-actin [23] the distribution of F-actin in the supernatants was analyzed by determining the band intensities obtained by the ITPKA antibody. The concentration of actin was analyzed by determining the band intensity obtained by the actin antibody relative to the band intensity of the actin standard. Using these parameters, the actin concentration per 25 μ g whole protein extract was analyzed. Finally the percentage of G-actin and F-actin in pellet and supernatant was calculated.

Immunofluorescence

Cells seeded on chamber slides (Ibid, Munich, Germany) were washed with warm PBS and fixed with

warm 4% paraformaldehyde (diluted in DMEM, 10% FCS) at 37°C for 15 min. For permeabilization, the cells were incubated 3-times with warm 0.1% Triton X-100/PBS for 5 min at 37°C and washed then 3-times with PBS for 10 min. The first antibodies (anti-fascin, Santa Cruz sc21746; anti VASP, Santa Cruz sc-46668) were diluted 1:200 in PBS/4% FCS and incubated over night at 4°C. After washing 3-times with PBS for 10 min, the secondary Alexa-fluor[®]488 conjugated antibody (diluted 1:2000 in PBS/4% FCS) was added and the cells were incubated for 1 hour RT in the dark. Finally, the cells were washed 3-times with PBS and analyzed by fluorescence microscopy.

Measurement of MT-actin interaction and MT dynamics a cell-free system

To analyze interaction of MTs with F-actin. We first produced taxol-stabilized MTs: Labeled MTs and unlabeled MTs were mixed: 37 μ l MTs (10 mg/ml), 1 μ l rhodamine labeled MTs (10 mg/ml), 0.65 μ l DTT (100 mM) 6.5 μ l GMPC (non-hydrolysable GTP, 10 mM) 19.85 μ l GT-buffer (80 mM PIPES, pH 6.9; 2 mM MgCl₂; 0.5 mM EGTA) were mixed, frozen to 5 μ l aliquots in liquid nitrogen and stored at -80°C. For visualization of MT-formation 1 mM GTP and 20 mM taxol were added to GT-buffer. This buffer was pre-warmed in a water bath at 37°C. The MT-stock (6 mg/ml; see above) were thawed and incubated for 30 min in a water bath at 37°C. 1 μ l of this solution was diluted in 360 μ l pre-warmed GT-buffer (0.01 mg/ml MTs) containing 200 μ M taxol and 1 mM GTP and was incubated over night at room temperature. Afterwards, MTs were for incubated for 30 min in a water bath at 37°C, these MTs were used for analysis of interaction of MTs with F-actin. Therefore, 10 μ l of Alexa-fluor[®]488 labeled actin solution (see above) was applied to chamber slides. After about 20 min of incubation, when F-actin had stucked to the bottom of the chamber slide (Ibidi, Martinsried, Germany) 10 μ l of the MT solution was added and incubation was continued for about 20 min. F-actin and MTs were monitored by fluorescence microscopy.

For analysis of MT-polymerization unlabeled MTs were used: 10 μ l (10 mg/ml) ice cold MTs were thawed and added to 90 μ l prewarmed (37 °C) GT-buffer/1 mM GTP/10% glycerol. Polymerization was measured in prewarmed (37 °C) 96-well plates in a Tecan reader (Infinite 200) at 340 nM/37 °C for 2 h.

Analysis of MT dynamics using TIRF microscopy was performed as described previously [24]. Briefly, double cycled MT seeds were produced from unlabeled porcine brain tubulin, tubulin-biotin and tubulin-Hylite647 (all from Cytoskeleton) as described [25]. Flow chambers, assembled from glass coverslips and microscopic slides were functionalized by sequential incubation with 0.2 mg/ml PLL-PEG-biotin (Susos AG, Switzerland), 1 mg/ml

NeutrAvidin (*Invitrogen*) and 5 mg/ml κ -casein (Sigma) in MRB80 buffer (80 mM PIPES, 4 mM MgCl₂, 1 mM EGTA). MT seeds were immobilized in the imaging flow chamber through biotin-neutravidin interaction. Polymerization was induced by addition of imaging buffer (MRB80 buffer supplemented with 15 μ M porcine brain tubulin, 0.5 μ M rhodamine-tubulin, 50 mM KCl, 1 mM guanosine triphosphate, 0.2 mg/ml κ -casein, 0.1% methylcellulose, and oxygen scavenger mix [50 mM glucose, 400 μ g/ml glucose oxidase, 200 μ g/ml catalase, and 4 mM DTT]) either in the presence or absence of 2 μ M fascin. Imaging was done on a VisiScope TIRF/FRAP/PA imaging system. TIRF microscopy based on Nikon Ti-E equipped with a perfect focus system (Nikon), Nikon CFI Apo TIRF 100x, 1.49 N.A. oil objective, a back focal TIRF scanner for suppression of interference fringes (Ilas-2, Roper Scientific France/ PICT-IBiSA, Institut Curie) and controlled with VisiView software. 405, 561, 488 and 647 nm laser lines were used for illumination and activation of respective fluorophores. Tubulin-Hylite647 fluorescence was collected through an ET 405/488/561/640 Laser Quad Band filter with a The ORCA-Flash4.0 LT sCMOS camera.

Adhesion assay

Cells were trypsinized, suspended in medium containing 10% FCS and 30,000 cells were seeded to a polylysine-covered 8-chamber slides (Ibidi, Munich). After further incubation for 2 h, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde/PBS and stained with 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Thereafter, the cell number was determined using the Keyence software function Hybrid Cell Count.

Transwell invasion assay

50,000 cells were seeded into Boyden chambers as well as in parallel wells to measure adhesion. After incubation for 16 h, the cells seeded to the parallel wells were *trypsinized* and counted by the CASY-cell counter to calculate the number of adhered cells. The cells which had transmigrated through the pores of the membrane were fixed and its number determined as described [23]. For normalization, the ratio of transmigrated/adhered cells were calculated.

Measurement of cell viability and colony formation

Cell viability was measured by the MTT-Assay as described [26]. For determination of colony formation, 500 cells diluted in 2 ml cell culture medium (DMEM/10% FCS) were applied to a 6-well plate and the cells were incubated for 2 weeks. Thereafter, the cells were washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde/4%

sucrose. After washing with ddH₂O, cells were stained with 500 μ l Giemsa Azur-Eosine-Methylblue solution (1:10) for 10 min. The cells were washed again with ddH₂O, dried at room temperature and number of colonies were counted.

Analysis of spontaneous metastasis in a subcutaneous xenograft SCID mouse model

1 x 10⁶ cells were suspended in cell culture medium without supplements and were subcutaneously injected between the scapulae of narcotised (O₂/CO₂) mice. Fifteen mice per group were analysed. The mice were sacrificed by cervical dislocation when the first primary tumors had a size of 1.5 cm². Primary tumors were excised, weighted, and processed for histological examinations. The lungs were dissected, embedded in paraffin and stained with hematoxylin/eosin or stored at -20°C for later DNA-extraction. Lung DNA was extracted using the DNeasy blood and tissue kit from Qiagen. Human tumor cells which had metastasized to the lungs were quantified by real-time PCR using established primers specific for human Alu sequences [27]. Numerical data were determined by generating a standard curve from log-fold dilutions of DNA from 1 x 10⁶ cell culture grown MDA-MB-231 cells. Negative controls included lung tissue from non-treated mice. For each sample, analyzes were done in duplicates and as independent at least twice.

ACKNOWLEDGMENT AND FUNDING

We thank Krisoffer Riecken for providing the LeGo-iC2-Puro+ and Christine Blechner and Christine Knees for excellent technician assistance. AK and MM are supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG Emmy-Noether Programm (MI 1923/1-1) and FOR2419 (MI 1923/2-1)). TL is supported by DFG LA 3373/2-3 and DFG LA 3373/6-1.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Machesky LM, Li A. Fascin: invasive filopodia promoting metastasis. *Commun Integr Biol.* 2010; 3: 263-70.
2. Tan VY, Lewis SJ, Adams JC, Martin RM. Association of fascin-1 with mortality, disease progression and metastasis in carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med.* 2013; 11: 52.
3. Chen L, Yang S, Jakoncic J, Zhang JJ, Huang XY. Migrastatin analogues target fascin to block tumour metastasis. *Nature.* 2010; 464: 1062-6.

4. Huang FK, Han S, Xing B, Huang J, Liu B, Bordeleau F, Reinhart-King CA, Zhang JJ, Huang XY. Targeted inhibition of fascin function blocks tumour invasion and metastatic colonization. *Nat Commun.* 2015; 6: 7465-68.
5. Vignjevic D, Kojima S, Aratyn Y, Danciu O, Svitkina T, Borisy GG. Role of fascin in filopodial protrusion. *J Cell Biol.* 2006; 174: 863-75.
6. Li A, Dawson JC, Forero-Vargas M, Spence HJ, Yu X, König I, Anderson K, Machesky LM. The actin-bundling protein fascin stabilizes actin in invadopodia and potentiates protrusive invasion. *Curr Biol.* 2010; 20: 339-45.
7. Jansen S, Collins A, Yang C, Rebowski G, Svitkina T, Dominguez R. Mechanism of actin filament bundling by fascin. *J Biol Chem.* 2011; 286: 30087-96.
8. Yamakita Y, Ono S, Matsumura F, Yamashiro S. Phosphorylation of human fascin inhibits its actin binding and bundling activities. *J Biol Chem.* 1996; 271: 12632-8.
9. Hashimoto Y, Parsons M, Adams JC. Dual actin-bundling and protein kinase C-binding activities of fascin regulate carcinoma cell migration downstream of Rac and contribute to metastasis. *Mol Biol Cell.* 2007; 18: 4591-602.
10. Villari G, Jayo A, Zanet J, Fitch B, Serrels B, Frame M, Stramer BM, Goult BT, Parsons M. A direct interaction between fascin and microtubules contributes to adhesion dynamics and cell migration. *J Cell Sci.* 2015; 128: 4601-14.
11. Bos PD, Zhang XH, Nadal C, Shu W, Gomis RR, Nguyen DX, Minn AJ, van de Vijver MJ, Gerald WL, Foekens JA, Massagué J. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature.* 2009; 459: 1005-9.
12. Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C, Guise TA, Massagué J. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell.* 2003; 3: 537-49.
13. Mielnicki LM, Ying AM, Head KL, Asch HL, Asch BB. Epigenetic regulation of gelsolin expression in human breast cancer cells. *Exp Cell Res.* 1999; 249: 161-76.
14. Kreis TE. Microtubules containing deetyrosinated tubulin are less dynamic. *EMBO J.* 1987; 6: 2597-606.
15. Gaillard J, Ramabhadran V, Neumann E, Gurel P, Blanchoin L, Vantard M, Higgs HN. Differential interactions of the formins INF2, mDia1, and mDia2 with microtubules. *Mol Biol Cell.* 2011; 22: 4575-87.
16. Nürnberg A, Kitzing T, Grosse R. Nucleating actin for invasion. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11: 177-87.
17. Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10: 194-204.
18. Fife CM, McCarroll JA, Kavallaris M. Movers and shakers: cell cytoskeleton in cancer metastasis. *Br J Pharmacol.* 2014; 171: 5507-23.
19. Ghebeh H, Al-Khaldi S, Olabi S, Al-Dhfyhan A, Al-Mohanna F, Barnawi R, Tulba A, Al-Tweigeri T, Ajarim D, Al-Alwan M. Fascin is involved in the chemotherapeutic resistance of breast cancer cells predominantly via the PI3K/Akt pathway. *Br J Cancer.* 2014; 111: 1552-61.
20. Wikman H, Westphal L, Schmid F, Pollari S, Kropidlowski J, Sielaff-Frimpon B, Glatzel M, Matschke J, Westphal M, Iljin K, Huhtala H, Terracciano L, Kallioniemi A, et al. Loss of CADM1 expression is associated with poor prognosis and brain metastasis in breast cancer patients. *Oncotarget.* 2014; 5: 3076-87. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1832>.
21. Milde-Langosch K, Karn T, Schmidt M, zu Eulenburg C, Oliveira-Ferrer L, Wirtz RM, Schumacher U, Witzel I, Schütze D, Müller V. Prognostic relevance of glycosylation-associated genes in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2014; 145: 295-305.
22. Köster JD, Leggewie B, Blechner C, Brandt N, Fester L, Rune G, Schweizer M, Kindler S, Windhorst S. Inositol-1,4,5-trisphosphate-3-kinase-A controls morphology of hippocampal dendritic spines. *Cell Signal.* 2016; 28: 83-90.
23. Windhorst S, Blechner C, Lin HY, Elling C, Nalaskowski M, Kirchberger T, Guse AH, Mayr GW. Ins(1,4,5)P3 3-kinase-A overexpression induces cytoskeletal reorganization via a kinase-independent mechanism. *Biochem J.* 2008; 414: 407-17.
24. Sharma A, Aher A, Dynes NJ, Frey D, Katrukha EA, Jaussi R, Grigoriev I, Croisier M, Kammerer RA, Akhmanova A, Gönczy P, Steinmetz M. Centriolar CPAP/SAS-4 imparts slow processive microtubule growth. *Dev Cell.* 2016; 37: 362-76.
25. Gell C, Bormuth V, Brouhard GJ, Cohen DN, Diez S, Friel CT, Helenius J, Nitzsche B, Petzold H, Ribbe J, Schäffer E, Stear JH, Trushko A, et al. Microtubule dynamics reconstituted *in vitro* and imaged by single-molecule fluorescence microscopy. *Methods Cell Biol.* 2010; 95: 221-45.
26. Lin YN, Izbicki JR, König A, Habermann JK, Blechner C, Lange T, Schumacher U, Windhorst S. Expression of DIAPH1 is up-regulated in colorectal cancer and its down-regulation strongly reduces the metastatic capacity of colon carcinoma cells. *Int J Cancer.* 2014; 134: 1571-82.
27. Nehmann N, Wicklein D, Schumacher U, Müller R. Comparison of two techniques for the screening of human tumor cells in mouse blood: quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) versus laser scanning cytometry (LSC). *Acta Histochem.* 2010; 112:489-96.

2 Abkürzungen

| | |
|---------------|---|
| ABA | <i>Aktinbündelungsaktivität</i> |
| ABS | <i>Aktinbindungsstelle</i> |
| F-Aktin | <i>filamentöses Aktin</i> |
| G-Aktin..... | <i>globuläres Aktin</i> |
| GFP | <i>Grün fluoreszierendes Protein</i> |
| GST | <i>Glutathion-S-Transferase</i> |
| HER2 | <i>human epidermal growth factor receptor 2</i> |
| HER2+ | <i>HER2-Rezeptor-Positive-Zellen</i> |
| MT | <i>Mikrotubuli</i> |
| MTT | <i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid</i> |
| SCID | <i>severe combined immunodeficient mice</i> |
| TNBC..... | <i>triple-negativer Brustkrebs</i> |
| WT | <i>Wildtyp</i> |

3 Darstellung der Publikation

3.1 Einleitung

Ein dynamisches Zytoskelett ist ausschlaggebend für die Metastasierungsfähigkeit von Krebszellen. Proteine, die diese Dynamik regulieren sind somit vielversprechende Angriffspunkte der Krebstherapie. Die Expression eines solchen Proteins, des Aktinbündelproteins Fascin, ist in vielen Tumortypen erhöht (Machesky et al. 2010). Zudem ist bekannt, dass diese erhöhte Fascin-Expression in Brust-, Kolorektal- und Magenkrebs mit einer erhöhten Sterblichkeit assoziiert ist. Deshalb wird Fascin als Biomarker und zelluläres Target in der Krebstherapie in Betracht gezogen. Zurzeit wird angenommen, dass die Aktinbündelungsaktivität (ABA) von Fascin für dessen metastasenfördernden Effekt verantwortlich ist. Die Aktinbündelungsaktivität von Fascin ist in Zellen essenziell für die Bildung von Filopodien (Vignjevic et al. 2006) und die Aktin vermittelte Stabilisierung von Invadopodien (Li et al. 2010). Beide Arten von Zellausläufern sind für die Metastasierung von Tumorzellen entscheidend.

Das Fascin-Molekül besteht aus vier β -Faltblattstrukturen, von denen das erste und das dritte β -Faltblatt eine Aktinbindungsstelle (ABS) besitzt (Jansen et al. 2011). Die Aktinbindungsstelle der ersten β -Faltblattstruktur wird durch die Proteinkinase C reguliert, die Phosphorylierung des Ser-39 führt zu einer Blockade der Aktinbindung und somit zu einer Inhibierung der Aktinbündelungsaktivität (Yamakita et al. 1996). Die transiente Aktivierung und Inaktivierung der Aktinbündelungsaktivität ist offenbar für den metastasenfördernden Effekt von Fascin nötig, da eine Überexpression von phosphomimetischen und dephosphomimetischen Mutanten keinen, die Überexpression von Wildtyp-(WT)-Fascin allerdings, einen metastasenfördernden Effekt bei Kolonkarzinomzellen aufwies (Hashimoto et al. 2007). Fascin besitzt außerdem von der Aktinbündelungsaktivität unabhängige Effekte. Das Protein kann direkt die Mikrotubuli (MT)-Dynamik über eine Bindung an MTs durch die Aminosäuren 234-250 beeinflussen (Villari et al. 2015). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Regulation der MT-Dynamik durch Fascin essenziell für die Bildung von fokalen Adhäsion von Brustkrebszellen ist (Villari et al. 2015).

In unserer Studie zeigen wir, dass die Fascin Expression in hoch malignen Subtypen der MDA-MB-231 Zelllinie erhöht ist, sowie das sehr hohe Fascin-Expressions-Level (im Folgenden als Fascin-Hyperexpression bezeichnet) einen metastasenfördernden Effekt besitzen, der unabhängig von der Aktinbündelungsaktivität von Fascin ist.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Expression von Aktin assoziierten Proteinen in hoch malignen MDA-MB-231 Subtypen

Durch wiederholte intrakardiale Injektion von MDA-MB-231 Zellen in Mäuse und anschließendes Ernten von disseminierten Zellaggregaten wurden verschiedene Subtypen dieser Zelllinie generiert. Diese Zelllinien disseminieren dann vorzugsweise entweder in das Gehirn (MDA-MB-231-BR) oder den Knochen (MDA-MB-231-SA) [Bos et al. 2009, Kang et al. 2003]. Da die Dynamik des Zytoskeletts ausschlaggebend für das Metastasierungspotential von Zellen ist, analysierten wir mRNA-Konzentrationen von Aktin-assoziierten Proteinen in MDA-MB-231-BR und MDA-MB-231-SA Zellen im Vergleich zur parentalen Zelllinie. cDNA-Microarray-Daten ergaben, dass das Niveau der meisten Aktin-assoziierten Proteine zwischen parentaler Zelllinie, MDA-MB-231-BR und MDA-MB-231-SA Zellen gleich war. Die mRNA-Konzentrationen von den Aktin-Schneide-Proteinen Gelsolin und Cofilin, sowie des aktinvernetzenden Proteins Filamin A, waren in MDA-MB-231-BR und MDA-MB-231-SA Zellen im Vergleich zur parentalen Zelllinie drastisch reduziert. Die einzige deutliche Erhöhung einer Expression zeigte das Aktinbündelprotein Fascin (3-fach, Abbildung 1A). Um diese Ergebnisse zu bestätigen, analysierten wir die Proteinspiegel per Western Blot (Abbildung 1B, 1C). Dieser bestätigte eine reduzierte Expression von Gelsolin und Filamin A, sowie eine erhöhte Expression von Fascin in MDA-MB-231-BR und MDA-MB-231-SA im Vergleich zu parentalen Zellen. Die Expression von Cofilin erwies sich auf Proteinebene als unverändert (Abbildung 1B, 1C). Es ist bereits bekannt, dass Gelsolin bei bösartigem Brustkrebs durch epigenetische Regulierung reduziert ist (Mielnicki et al. 1999). Unbekannt jedoch ist, ob eine erhöhte Expression von Fascin und eine reduzierte Expression von Gelsolin und Filamin-A zusammenhängen.

Im Folgenden fokussieren wir uns auf den Effekt einer Fascin-Hochregulation auf die Malignität von MDA-MB-231 Zellen. Dass eine hohe basale Fascin-Expression essenziell für die Metastasierung von MDA-MB-231 Zellen ist, konnte bereits gezeigt werden (Chen et al. 2010, Huang et al. 2015). Für uns war es daher interessant herauszufinden, ob eine weitere Steigerung der Fascin-Expression zu einer Erhöhung der Malignität von MDA-MB-231 Zellen führt.

3.2.2 Klinische Relevanz einer Fascin-Hyperexpression

Um die klinische Relevanz einer Fascin-Hyperexpression zu untersuchen, gruppieren wir primäres Brustkrebsgewebe (n=194) basierend auf Fascin mRNA-Konzentrationen in Quartile, wobei das letzte Quartil (Q4) Proben mit einer Fascin-Hyperexpression beinhaltet. Durch Korrelationsanalyse von klinischen Parametern verglichen wir die Quartile Q1-Q3 (niedrige, moderat-niedrige, moderat–hohe Fascin Expression) mit Q4 (Fascin-Hyperexpression). Diese Analyse zeigte, dass hohe Fascin mRNA-Konzentrationen signifikant mit einer erhöhten Anzahl an Lymphknotenmetastasen ($p < 0,001$; Abbildung 2A) und einem höheren Grading ($p = 0,002$; Abbildung 2B) einher gingen. Es gab außerdem eine Korrelation der Fascin-Hyperexpression mit den molekularen Subtypen *human epidermal growth factor receptor 2 positiv* (HER2+) und trippl negativem Brustkrebs (TNBC) ($p < 0,001$; Abbildung 2C). Des Weiteren war eine hohe Fascin Expression signifikant mit einem kürzerem Gesamtüberleben ($p = 0,04$; Abbildung 2D) und einem Trend betreffend des krankheitsfreien Überleben ($p = 0,1$; Ergänzende Abbildung 1A) in unserem Kollektiv assoziiert. Eine stratifizierte Analyse innerhalb der molekularen Subtypen ergab eine signifikante Korrelation einer Fascin Hyperexpression mit einem krankheitsfreien Überleben bei HER2+ und TNBC ($p = 0,035$; Ergänzende Abbildung 1B), aber keine solche Korrelation bei luminalen Tumoren ($p = 0,078$; Ergänzende Abbildung 1C). Diese Daten zeigen, dass eine schlechte klinische Prognose, insbesondere in den aggressiveren molekularen Subtypen HER2+ und TNBC, mit einer Fascin-Hyperexpression einhergeht.

3.2.3 Effekt einer Fascin-Hyperexpression auf die Aktindynamik *in vitro* und in Zellen

Aus unseren zuvor gezeigten Daten wird deutlich, dass sowohl in hoch malignen Brustkrebstumoren als auch in hoch malignen MDA-MB-231 Subtypen eine Fascin-Hyperexpression vorliegt. Es ist bereits beschrieben, dass die Aktinbündelungsaktivität von Fascin für dessen malignitätsfördernden Effekt verantwortlich ist (Chen et al. 2010, Huang et.al. 2015). Deshalb analysierten wir, ob eine Fascin-Hyperexpression zu einer Erhöhung der Aktinbündelungsaktivität führt. Da der Effekt von Aktinbündelproteinen von dem Verhältnis zwischen Bündelprotein und Aktin abhängt, bestimmten wir das Aktin/Fascin-Verhältnis in parentalen und in MDA-MB-231-SA Zellen per Western Blot. Diese Analyse ergab ein Aktin/Fascin-Verhältnis von 3:1 in parentalen MDA-MB-231-Zellen und ein Verhältnis von 1:1 in MDA-MB-231-SA Zellen (ergänzende Abbildung 2). Dies deckt sich mit unseren Daten, die ein 3-fach höheres Fascin-Level in MDA-MB-231-SA Zell in Vergleich zu parentalen Zellen zeigen (Abbildung 1B,1C).

Als nächstes führten wir zellfreie *in vitro* Versuche durch, um festzustellen, ob die Aktinbündelungsaktivität von Fascin durch eine Verhältnisänderung von 3:1 auf 1:1 gesteigert werden kann. Zusätzlich untersuchten wir als Kontrolle Fascin-Mutanten mit dauerhaft aktiver (S39A) und mit dauerhaft inaktiver (S39D) Bündelungsaktivität (im Folgenden als Fascin-S39A, Fascin-S39D bezeichnet) in einem Aktin/Fascin Verhältnis von 1:1. Wir konnten durch die Verhältnisänderung keine Erhöhung der Aktinbündelungsaktivität zeigen. Allerdings konnten wir beweisen, dass die Fascin-Mutante S39D keine Aktinbündelungsaktivität besitzt (Abbildung 3A, 3B; Aktin-Bande).

Durch fluoreszenz-mikroskopische Visualisierung konnten wir feststellen, dass sich die Aktinbündel bei einem Aktin/Fascin-Verhältnis von 1:1 deutlich kompakter darstellten als bei einem Verhältnis von 3:1 (Abbildung 3C) und dem durch Fascin-S39A gebündelten Aktin ähnelten. Wie erwartet wurde durch Fascin-S39D keine Bündelung induziert. Durch Quantifikation der Fluoreszenz der Aktinbündel konnten wir bestätigen, dass die Dichte der Bündel sich durch die Aktin/Fascin Verhältnisänderung von 3:1 auf 1:1 signifikant erhöht hat (Abbildung 3D). Wir fanden keinen Unterschied zwischen Fascin-WT und Fascin-S39A, da es in zellfreien Systemen zu keiner Phosphorylierung von Fascin kommt.

Schlussfolgernd kommt es in zellfreien Systemen zu einer Steigerung der Aktinbündelungsaktivität von Fascin bei sehr hohen Fascin Konzentrationen. Der nächste Schritt war festzustellen, ob sich dies auch in Zellen bewahrheitet. Hierzu hyperexprimierten

wir Fascin-WT und die Fascin-Mutanten S39A und S39D durch einen lentiviralen Vektor stabil in MDA-MB-231 Zellen. Diese wurden anschließend mit Puromycin selektiert und die Fascin-Expression per Western Blot kontrolliert (Abbildung 3E). Da die Bündelung von Aktinfilamenten filamentöses Aktin (F-Aktin) stabilisiert und an der Elongation von Filopodien beteiligt ist, analysierten wir als nächstes das F-Aktin zu globuläres Aktin (G-Aktin) Verhältnis und die Länge der Filopodien bei einer Fascin- und Fascin-Mutanten-Hyperexpression in MDA-MB-231 im Vergleich zu Kontroll-MDA-MB-231. Um zu überprüfen, ob bei einer Hyperexpression Fascin weiterhin in der Spitze der Filopodien lokalisiert ist, färbten wir die MDA-MB-231 Zellen mit einem Anti-Fascin-Antikörper. Hierbei stellten wir fest, dass Fascin sich bei der Fascin-WT-Hyperexpression in der Spitze und im gesamten Filopodium ansammelte. Bei einer Fascin-S39D-Hyperexpression sammelte Fascin sich diffus in Lamellopodienartigen Strukturen und bei einer Fascin-S39A-Hyperexpression akkumulierte Fascin in der Spitze der Filopodien (ergänzende Abbildung 3B).

Die Analyse des G-zu F-Aktin Verhältnisses ergab, dass nur die Fascin-S39A-Hyperexpression zu einer erhöhten F-Aktin Konzentration (Abbildung 3F) sowie einer Verlängerung der Filopodien führte (Abbildung 3G, ergänzende Abbildung 3B). Keine der Hyperexpressionen führte zu einer Veränderung der Anzahl an Filopodien (Abbildung 3H). Wir vermuten, dass die Verlängerung der Filopodien bei einer Fascin-S39A-Hyperexpression durch die Anreicherung des Fascins im *leading edge* der MDA-MB-231 Zellen bedingt ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Fascin-S39D, wahrscheinlich durch seine diffuse Lokalisation, nicht das endogene Fascin an den Spitzen der Filopodien ersetzen konnte und so keinen dominant negativen Effekt auf die Filopodien hatte (ergänzende Abbildung 3A). Ebenfalls führte die Fascin-WT-Hyperexpression nicht zu einer Erhöhung der F-Aktin Konzentration und zu keiner Verlängerung der Filopodien, was darauf hinweist, dass eine Fascin-WT-Hyperexpression nicht zu einer erhöhten Aktinbündelung in den Zellen führt. Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass nur eine Fascin-S39A-Hyperexpression zu einer erhöhten Aktinbündelung führt, wohingegen die Fascin-WT-Hyperexpression keinen Effekt zeigt.

3.2.4 Die Fascin-Hyperexpression in MDA-MB-231 Zellen erhöht deren Metastasierung unabhängig von Fascins Aktinbündelungsaktivität

Wie unsere Daten zeigen, führt eine Fascin-Hyperexpression nicht zu einer zusätzlich erhöhten Bildung von Aktinbündeln in der Zelle, was darauf hindeutet, dass die Wirkung von Fascin auf die Aktinbündelung ab einer bestimmten Konzentration gesättigt ist. Hieraus könnte man schließen, dass der Effekt von einer Fascin-Hyperexpression auf die Malignität von Brustkrebs (Abbildung 2) unabhängig von dessen Aktinbündelungsaktivität ist.

Um diese Annahme zu bestätigen, analysiert wird die Metastasierung von MDA-MB-231 Zellen mit einer Fascin-WT-Hyperexpression, einer Fascin-Mutante-Hyperexpression (Fascin-S39D oder Fascin-S39A), sowie parentale Vektor transduzierte MDA-MB-231 Zellen (Kontrolle), in immundefizienten Mäusen. Wir injizierten die Zellen subkutan in den Nacken der Mäuse. Als der Primärtumor eine Größe von ca. 1,5 cm² (24 Tage nach der Injektion) erreicht hatte, wurden die Mäuse sezirt. Um zu kontrollieren, dass die Fascin-Expression sich während des Tumorwachstums nicht verringert hatte, fixierten wir die Primärtumoren in Paraffin und wiesen die Fascin-Expression durch Antikörperfärbung nach. Die Fascin-Expression blieb nachweislich stabil (ergänzende Abbildung 4).

Um die spontane Metastasierung der Zellen zu analysieren, nutzten wir Alu-qRT-PCR. Hierzu wurde die DNA der Lunge mit Hilfe eines DNeasy Kit extrahiert und mit etablierten Primern (Nehmann et al. 2010), welche an die Alu-Sequenz binden, in einer real time PCR quantifiziert. Des Weiteren werteten wir die Proben histologisch aus. Die Alu-qRT-PCR-Analyse ergab bei einer Fascin Hyperexpression eine 4-fache Vergrößerung der metastatischen Zellmasse innerhalb der Lunge ($p=0,022$), im Vergleich zu Kontroll MDA-MB-231 Zellen (Abbildung 4B). Das Primärtumorwachstum wurde durch eine Fascin-Hyperexpression jedoch nicht beeinflusst (Abbildung 4C). Folglich führt eine Fascin-Hyperexpression zu einer höheren Metastasierungsrate, aber nicht zu einer Vergrößerung der Primärtumormasse.

Bei mit Fascin-S39D-Hyperexpressions MDA-MB-231 injizierten Mäusen konnten wir, im Vergleich zu Kontrollzellen, eine 9-fach erhöhte metastatische Zellmasse innerhalb der Lungen feststellen ($p=0,0007$, Abbildung 4A). Dies könnte allerdings auch dadurch

bedingt sein, dass das Expressions-Level der Fascin-S39D-Hyperexpression, im Vergleich zu den Fascin-Expressions-Leveln der anderen Fascin-Hyperexpressionen, etwas höher liegt (siehe Abbildung 3E).

Zusammenfassend lässt sich aus den *in vivo* Daten unsere Vermutung bestätigen, dass eine Fascin-Hyperexpression unabhängig von dessen Aktinbündelungsaktivität eine erhöhte Metastasierung bedingt.

3.2.5 Effekt der Fascin-Hyperexpression auf Zell-Viabilität, Adhäsion, Transmigration und Koloniebildung

Um zu analysieren, welche zellulären Prozesse bei einer Fascin-Hyperexpression eine erhöhte Metastasierung stimulieren, verglichen wir Viabilität (Abbildung 5A), Koloniebildung (Abbildung 5B), Adhäsion (Abbildung 5C) und Transmigration (Abbildung 5D) zwischen Kontroll und allen Fascin-Hyperexpressions MDA-MB-231 Zellen. Diese Analyse ergab, dass die Fascin-Hyperexpression eine deutlich erhöhte Koloniebildung und Adhäsion von MDA-MB-231 zur Folge hat, aber keine signifikanten Auswirkungen auf die Viabilität und die Transmigration besitzt. Im Falle der Adhäsion zeigten MDA-MB-231 Zellen, mit einer Fascin-Hyperexpression, Fascin-S39D-Hyperexpression oder Fascin-S39A-Hyperexpression, eine deutlich erhöhte Adhäsion im Vergleich zu Kontrollzellen ($p=0,002$, $p=0,0046$, $p=0,018$). Die Koloniebildung war jedoch nur bei einer Fascin-WT-Hyperexpression signifikant erhöht ($p=0,03$).

Diesen Ergebnissen zeigen, dass eine Fascin-Hyperexpression nur die Koloniebildung erhöht, wenn die Aktinbündelungsaktivität durch Phosphorylierung reguliert werden kann. Somit scheint die stimulierende Wirkung von Fascin auf die Koloniebildung von dessen Aktinbündelungsaktivität abhängig zu sein, die stimulierende Wirkung einer Fascin-Hyperexpression auf die Adhäsion scheint jedoch unabhängig von dessen Aktinbündelungsaktivität zu sein.

3.2.6 Die Fascin-Hyperexpression erhöht die Mikrotubulidynamik

Unsere Daten zeigen, dass eine Fascin-Hyperexpression in MDA-MB-231 Zellen die Metastasierung *in vivo* und Adhäsion *in vitro* unabhängig von dessen Aktin-Bündelungsaktivität erhöht. Eine aktuelle Studie ergab, dass die Depletion von Fascin in MDA-MB-231 Zellen zu weniger dynamischen Mikrotubuli führte. Zusätzlich zeigten die Autoren, dass Fascin direkt an Mikrotubuli bindet und hierdurch die Zelladhäsion

mit reguliert (Villari et al. 2015). Es war daher interessant zu untersuchen, ob eine Fascin-Hyperexpression ebenfalls die Mikrotubulidynamik in MDA-MB-231 verändert. Zu diesem Zweck analysierten wir bei Kontroll-, Fascin-WT, Fascin-S39A und Fascin-S39D-Hyperexpression MDA-MB-231 Zellen die Expression von detyrosinierten (stabilisierten, Kreis et al. 1987) Mikrotubuli per Western Blot. Es zeigte sich, dass alle Fascin-Hyperexpressionen zu einem um ca. 40% reduzierten Gehalt an detyrosinierten Mikrotubuli führte (Abbildung 6). Eine Fascin-Hyperexpression scheint somit die Mikrotubulidynamik zu erhöhen.

3.2.7 Hohe Fascin Konzentrationen beeinflussen die Mikrotubulidynamik in zellfreien Systemen

Um den Mechanismus zu analysieren, durch den eine Fascin-Hyperexpression die MT-Dynamik reguliert, führten wir zellfreie *in vitro* Experimente durch. Hierzu setzten wir ein Verhältnis an Fascin zu Mikrotubuli entsprechend der Fascin-Hyperexpression MDA-MB-231 ein (1:1, siehe Ergänzende Abbildung 2). Grundsätzlich ist es möglich, dass die Aktinbindung von Fascin dessen Wirkung auf die MT-Dynamik beeinflusst. Wäre dies der Fall, so sollte Fascin das Aktin-Zytoskelett mit MTs verbinden. Um dies zu analysieren, inkubierten wir Alexa-fluor®488 markiertes Aktin und Taxol-stabilisierte, Rhodamin markierte MTs mit und ohne Fascin. Die Aktinfilamente und MTs wurden durch Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Als Positivkontrolle inkubierten wir Alexa-fluor®488 markiertes Aktin und Taxol-stabilisierte MTs mit DIAPH2, welches Aktin mit dessen FH1/FH2-Domäne sowie MTs mit dessen FH2-Domäne bindet (Gaillard et al. 2011). DIAPH2 induzierte die Bildung von polarisierten Aktinfilamenten und rekrutierte MTs zu F-Aktin (Ergänzende Abbildung 5). In Gegenwart von Fascin kam es jedoch zu keiner Co-Lokalisierung zwischen F-Aktin und MTs (Abbildung 7A). Folglich ist es unwahrscheinlich, dass die Aktinbindung von Fascin dessen Wirkung auf die MT-Dynamik beeinflusst. Da unsere Daten zeigten, dass eine Fascin-Hyperexpression die MT-Dynamik in MDA-MB-231 erhöht, untersuchten wir ob dies direkt oder indirekt über zelluläre Fascin-Interaktionspartner vermittelt wird. Hierzu wurde das Wachstum von HiLyte Fluor™-647 markierten, nicht Taxol-stabilisierte MTs mittels TIRF-Mikroskopie analysiert. Tatsächlich ergab diese Analyse, dass in Gegenwart von Fascin die Dynamik der MTs (Auf- und Abbau) gegenüber der Kontrolle erhöht waren (Abbildung 7B, 7C). Zusätzlich zeigte eine quantitative Bewertung von Kymographen, dass Fascin

($p=0,007$) die MT-Polymerisation signifikant beschleunigte (Abbildung 7D, 7E). Dieses Ergebnis wurde durch die Messung der Polymerisation von nicht markierten und nicht Taxol-stabilisierten MTs durch Absorbionsmessung bei 340 nm bestätigt. Hier führte Fascin zu einer signifikanten ($p=0,0019$) Erhöhung der Geschwindigkeit der MT-Polymerisation um 25% (Abbildung 7F). Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass hohe Konzentrationen von Fascin die MT-Dynamik steigern.

3.3 Diskussion

Im Rahmen dieser Studie suchten wir nach Aktin assoziierten Proteinen in hoch malignen MDA-MB-231 Subtypen (SA, BR).

Hierbei fanden wir, dass Fascin als einziges Aktin assoziiertes Protein eine gesteigerte Expression sowohl in MDA-MB-231-SA als auch in MDA-MB-231-BR aufwies. Es wurde bereits durch verschiedene Forschungsgruppen beschrieben, dass eine hohe Fascin-Expression zu einer erhöhten Malignität in unterschiedlichen Tumortypen führt (Übersichtsartikel Tan et al. 2013). Parentale MDA-MB-231 Zelle besitzen bereits ein hohes Fascin-Expressions-Level und es konnte gezeigt werden, dass Fascin in diesen Zellen essenziell für die Metastasierung von MDA-MB-231 Zellen in *severe combined immunodeficient mice* (SCID)-Mäusen ist (Chen et al. 2010). Es war allerdings nicht klar, ob die nochmals erhöhte Fascin Expression der hoch malignen Subtypen auch deren Malignität weiter steigert. Um diese Frage zu beantworten, analysierten wir zunächst die Fascin-Expressions-Level von Brustkrebsproben verschiedener Patienten. Patientengruppen mit einer niedrigen, moderat-niedrigen und moderat-hohen Fascin-Expression zeigten eine ähnliche gesamt- und progressionsfreie Überlebenszeit, wohingegen die Patientengruppe mit einer sehr hohen Fascin-Expression (Fascin-Hyperexpression) eine signifikant geringere Überlebensrate zeigte. Diese Daten deuten darauf hin, dass eine Fascin-Hyperexpression eine besondere Bedeutung für die Malignität von Brustkrebszellen haben könnte. Um diese Hypothese näher zu untersuchen, verglichen wir die Aktinbündelungsaktivität von Fascin bei einem Aktin zu Fascin Verhältnis entsprechend der parentalen MDA-MB-231 (3:1) und der MDA-MB-231-SA (1:1) Zellen. Zusätzlich analysierten wir Fascin-Mutanten mit dauerhaft aktiver (S39A) und dauerhaft inaktiver (S39D) Aktinbündelungsaktivität. In zellfreien Versuchen konnten wir eine Erhöhung der Aktinbündelungsaktivität von Fascin bei einem Aktin/Fascin Verhältnis von 1:1 gegenüber einem Verhältnis von 3:1 feststellen. In MDA-MB-231

Zellen führte eine Fascin-Hyperexpression allerdings zu keiner Verstärkung des Effekts von Fascin auf F-Aktin. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass der Effekt von Fascin auf die Aktindynamik ab einem bestimmten Expressions-Level gesättigt ist.

Hieraus könnte geschlossen werden, dass der Effekt einer Fascin-Hyperexpression auf die Malignität von Brustkrebszellen unabhängig von dessen Aktinbündelungsaktivität ist. Um diese Annahme zu bestätigen, analysierten wir die Metastasierung von MDA-MB-231 Zellen mit einer Fascin-Hyperexpression, einer Fascin-Mutanten-Hyperexpression mit dauerhaft aktiver Aktinbündelungsaktivität (S39A), Fascin-Mutanten-Hyperexpression mit dauerhaft inaktiver Aktinbündelungsaktivität (S39D) und parentalen Leer-Vektor transduzierten MDA-MB-231 Zellen in immundefizienten Mäusen. Hierzu hyperexprimierten wir Fascin-WT und die Fascin-S39A und Fascin-S39D durch einen lentiviralen Vektor stabil in MDA-MB-231 Zellen. Diese selektierten wir anschließend mit Puromycin, kontrollierten die jeweiligen Fascin-Expression-Level und injizierten die transduzierten Zellen in immundefiziente Mäusen. Tatsächlich fanden wir, dass alle Fascin-Hyperexpressions Varianten die Metastasierung stark erhöhten. Dies zeigt uns, dass eine Fascin-Hyperexpression unabhängig von seiner Aktinbündelungsaktivität zu einer erhöhten Malignität führt.

Von uns durchgeführte Analysen ergaben, dass eine Fascin-Hyperexpression und Fascin-Mutanten-Hyperexpression nur die Adhäsion der Zellen verstärkte. Dies weist darauf hin, dass eine erhöhte Metastasierung durch Fascin-Hyperexpression auf dessen Wirkung auf die zelluläre Adhäsion beruht.

Villary et al. (2015) konnte zeigen, dass Fascin essenziell für die Bildung fokaler Adhäsionen ist und dass hierzu die Bindung von Fascin an MTs nötig ist. Des Weiteren fand die Arbeitsgruppe, dass die Depletion von Fascin in MDA-MB-231 Zellen zu einer geringeren MT-Dynamik und einer geringeren Wachstumsrate führt.

Dies lässt vermuten, dass der Aktinbündelungsaktivität unabhängige Effekt einer Fascin-Hyperexpression auf die zelluläre Adhäsion durch dessen Wirkung auf die MT-Regulation bewirkt wird. Wir konnten feststellen, dass eine Fascin-Hyperexpression zu einer erhöhten MT-Dynamik in MDA-MB-23 Zellen führt. In zusätzlichen zellfreien *in vitro* Experimenten, in denen wir ein Fascin zu MT-Verhältnis entsprechend der Fascin-Hyperexpressions MDA-MB-231 Zellen einsetzten, konnten wir ebenfalls zeigen, dass hohe Fascin Konzentrationen zu einer erhöhten MT-Dynamik führten. Des Weiteren fanden wir, dass Fascin keine Verbindung zwischen dem Aktin-Zytoskelett und MTs bildet. Dies unterstützt die Annahme, dass Fascin in Zellen nur an MTs binden

kann, wenn die Aktinbindung an der dritten Faltblattstruktur durch Phosphorylierung an S274 blockiert ist (Villari et al. 2015).

Schlussfolgernd lässt sich feststellen, dass der stimulierende Effekt einer Fascin-Hyperexpression auf die Metastasierung nicht abhängig von der Aktinbündelungsaktivität von Fascin ist. Aufgrund unserer Erkenntnisse, dass eine Fascin-Hyperexpression zu einer Erhöhung der MT-Dynamik führt, lässt sich vermuten, dass die Fascin bedingte Regulierung der MTs und die Erhöhung des Metastasespotentials durch Fascin zusammenhängen. Es sind allerdings noch weitere Experimente nötig, um diese These zu beweisen. Da MTs mehrere zelluläre Prozesse, wie Zellteilung, Migration, intrazellulären Transport und Invasion regulieren, wäre es außerdem interessant zu analysieren, welche zellulären Prozesse durch die Fascin bedingte MT-Regulation beeinflusst werden (Kavallaris et al. 2010, Fife et al. 2014). Zusätzlich sollte man untersuchen ob die durch Fascin bedingte Resistenz gegen das MT-angreifende Taxoteron, mit der MT-Dynamik kontrollierenden Eigenschaft von Fascin zusammenhängen (Gihebeh et al. 2014).

Zusammengefasst zeigen unsere Daten, dass eine Steigerung der Fascin-Expression mit einer Steigerung des malignen Potentials von Brustkrebszellen korreliert und dass eine erhöhte Fascin-Expression unabhängig von seiner Aktinbündelungsaktivität (Abbildung 6) das Metastasierungspotential von Brustkrebszellen erhöht. Diese Erkenntnisse sollten bei der Entwicklung neuer Medikamente, welche die Fascin-Aktivität hemmen, berücksichtigt werden.

4 Zusammenfassung

Proteine, welche die Dynamik des Zytoskeletts beeinflussen und dadurch die morphologische Wandlungsfähigkeit der Zelle regulieren, sind essenziell für die Bewegungsfähigkeit und somit auch für die Metastasierung von Tumorzellen. Das Aktinbündelprotein Fascin zeigt in vielen Tumortypen eine erhöhte Expression (Machesky et al. 2010), welche mit einer erhöhten Mortalität der Krebspatienten assoziiert ist (Tan et al. 2013). Auch wir fanden in unserer Patientengruppe mit hochmalignem Brustkrebs und in den hochmalignen Subzelllinien von MDA-MB-231 eine stark erhöhte Fascin-Expression (Hyperexpression) im Vergleich zur parentalen MDA-MB-231 Zelllinie. Um den genauen Effekt einer Fascin Hyperexpression auf die Metastasierung zu bestimmen, hyperexpressierten wir Fascin-WT sowie Fascin-Mutanten (dauerhaft aktive ABA S39A, dauerhaft inaktive ABA S39D) in parentalen MDA-MB-231 Zellen und analysierten die Metastasierung in immundefizienten Mäusen.

Sowohl eine Fascin-WT-Hyperexpression als auch eine Hyperexpression beider Fascin-Mutanten führten zu einer stark gesteigerten Metastasierung. Hieraus schlossen wir, dass der metastasenfördernde Effekt einer Fascin-Hyperexpression unabhängig von Fascins Aktinbündelungsaktivität sein muss. In Zellversuchen konnten wir feststellen, dass alle Fascin-Hyperexpressionen zu einer gesteigerten Adhäsion der Zellen führten und Villari et al. (2015) fanden, dass Fascin die Adhäsion von Zellen durch eine Regulierung der MT-Dynamik beeinflusst. In zellfreien *in vitro* Versuchen konnten wir aufzeigen, dass hohe Fascin Konzentrationen zu einer gesteigerten MT-Dynamik führt. Der Effekt der Fascin-Hyperexpression auf die Metastasierung könnte durch diese MT-regulierende Aktivität von Fascin bedingt sein. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob diese Hypothese stimmt.

Die Aufklärung des Mechanismus, welcher der Fascin stimulierten Metastasierung zugrunde liegt, ist essenziell für die Entwicklung neuer Fascin spezifischer Inhibitoren.

5 Summary

Proteins regulating cytoskeletal dynamics, are essential for the ability of a cell to move and thus also for its ability to metastasize. The actin bundling protein fascin is up-regulated in many tumor types (Machesky et al. 2010); and is associated with a poor clinical outcome (Tan et al. 2013). We also found a strongly increased fascin expression (hyperexpression) in our patient group with highly malignant breast cancer and in highly malignant subcell lines of MDA-MB-231, compared to the parental MDA-MB-231 cell line. To determine the effect of fascin hyperexpression on metastasis, we hyperexpressed fascin-WT and fascin mutants (consistently active S39A, consistently inactive actin bundeling activity S39D) in parental MDA-MB-231 and analyzed metastasis in immunodeficient mice.

Fascin-WT hyperexpression and hyperexpression of both fascin-mutants led to an increased metastatic cell burden. This result indicates, that the metastasis-promoting effect of fascin-hyperexpression is independent of its actin bundling activity.

Experiments showed that all types of fascin-hyperexpressions increased cellular adhesion. Villari et al.2015 found, that fascin altered cellular adhesion by regulating MT-dynamics, and we revealed in cell-free in vitro experiments, that high concentrations of fascine lead to increased MT-dynamics.

Thus, the effect of fascin hyperexpression on metastasis and the MT-regulating activity of fascin could be related. Future experiments will show if this assumption holds true. The clarification of the mechanism underlying fascin-stimulated metastasis is essential for the development of new fascin-specific inhibitors.

6 Literaturverzeichnis

Bos PD, Zhang XH, Nadal C, Shu W, Gomis RR, Nguyen DX, Minn AJ, van de Vijver MJ, Gerald WL, Foekens JA, Massagué J. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature*. 2009; 459:1005-9.

Chen L, Yang S, Jakoncic J, Zhang JJ, Huang XY. Migrastatin analogues target fascin to block tumour metastasis. *Nature*. 2010; 464:1062-6.

Fife CM, McCarroll JA, Kavallaris M. Movers and shakers: cell cytoskeleton in cancer metastasis. *Br J Pharmacol*. 2014; 171:5507-23.

Gaillard J, Ramabhadran V, Neumann E, Gurel P, Blanchoin L, Vantard M, Higgs HN. Differential interactions of the formins INF2, mDia1, and mDia2 with microtubules. *Mol Biol Cell*. 2011;22:4575-87.

Gell C, Bormuth V, Brouhard GJ, Cohen DN, Diez S, Friel CT, Helenius J, Nitzsche B, Petzold H, Ribbe J, Schäffer E, Stear JH, Trushko A, Varga V, Widlund PO, Zanich M, Howard J. Microtubule dynamics reconstituted in vitro and imaged by single-molecule fluorescence microscopy. *Methods Cell Biol*. 2010; 95:221-45.

Ghebeh H, Al-Khaldi S, Olabi S, Al-Dhfyhan A, Al-Mohanna F, Barnawi R, Tulba A, Al-Tweigeri T, Ajarim D, Al-Alwan M. Fascin is involved in the chemotherapeutic resistance of breast cancer cells predominantly via the PI3K/Akt pathway. *Br J Cancer*. 2014; 111:1552-61.

Hashimoto Y, Parsons M, Adams JC. Dual actin-bundling and protein kinase C-binding activities of fascin regulate carcinoma cell migration downstream of Rac and contribute to metastasis. *Mol Biol Cell*. 2007; 18:4591-602.

Huang FK, Han S, Xing B, Huang J, Liu B, Bordeleau F, Reinhart-King CA, Zhang JJ, Huang XY. Targeted inhibition of fascin function blocks tumour invasion and metastatic colonization. *Nat Commun*. 2015; 6:7465-68.

Jansen S, Collins A, Yang C, Rebowski G, Svitkina T, Dominguez R. Mechanism of actin filament bundling by fascin. *J Biol Chem*. 2011; 286:30087-96.

Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C, Guise TA, Massagué J. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*. 2003; 3:537-49.

Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10:194-204.

Köster JD, Leggewie B, Blechner C, Brandt N, Fester L, Rune G, Schweizer M, Kindler S, Windhorst S. Inositol-1,4,5-trisphosphate-3-kinase-A controls morphology of hippocampal dendritic spines. *Cell Signal* 2016 ;28: 83-90.

Kreis TE. Microtubules containing detyrosinated tubulin are less dynamic. *EMBO J*. 1987; 6:2597-606.

Li A, Dawson JC, Forero-Vargas M, Spence HJ, Yu X, König I, Anderson K, Machesky LM. The actin-bundling protein fascin stabilizes actin in invadopodia and potentiates protrusive invasion. *Curr Biol*. 2010; 20:339-45.

Lin YN, Izbicki JR, König A, Habermann JK, Blechner C, Lange T, Schumacher U, Windhorst S. Expression of DIAPH1 is up-regulated in colorectal cancer and its down-regulation strongly reduces the metastatic capacity of colon carcinoma cells. *Int J Cancer*. 2014; 134:1571-82.

Machesky LM, Li A. Fascin: Invasive filopodia promoting metastasis. *Commun Integr Biol*. 2010; 3:263-70.

Mielnicki LM, Ying AM, Head KL, Asch HL, Asch BB. Epigenetic regulation of gelsolin expression in human breast cancer cells. *Exp Cell Res*. 1999;249:161-76.

Milde-Langosch K, Karn T, Schmidt M, zu Eulenburg C, Oliveira-Ferrer L, Wirtz RM, Schumacher U, Witzel I, Schütze D, Müller V. Prognostic relevance of glycosylation-associated genes in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2014; 145: 295-305.

Nehmann N, Wicklein D, Schumacher U, Müller R. Comparison of two techniques for the screening of human tumor cells in mouse blood: quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) versus laser scanning cytometry (LSC). *Acta Histochem*. 2010;112:489-96.

Nürnberg A, Kitzing T, Grosse R. Nucleating actin for invasion. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11:177-87.

Sharma A, Aher A, Dynes NJ, Frey D, Katrukha EA, Jaussi R, Grigoriev I, Croisier M, Kammerer RA, Akhmanova A, Gönczy P, Steinmetz M. Centriolar CPAP/SAS-4 Imparts Slow Processive Microtubule Growth. *Dev Cell*. 2016; 37:362-76.

Tan VY, Lewis SJ, Adams JC, Martin RM. Association of fascin-1 with mortality, disease progression and metastasis in carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med*. 2013; 11:52.

Vignjevic D, Kojima S, Aratyn Y, Danciu O, Svitkina T, Borisy GG. Role of fascin in filopodial protrusion. *J Cell Biol*. 2006; 174:863-75.

Villari G, Jayo A, Zanet J, Fitch B, Serrels B, Frame M, Stramer BM, Goult BT, Parsons M. A direct interaction between fascin and microtubules contributes to adhesion dynamics and cell migration. *J Cell Sci*. 2015; 128: 4601-14.

Wikman H, Westphal L, Schmid F, Pollari S, Kropidlowski J, Sielaff-Frimpon B, Glatz M, Matschke J, Westphal M, Iljin K, Huhtala H, Terracciano L, Kallioniemi A, Sauter G, Müller V, Witzel I, Lamszus K, Kemming D, Pantel K. Loss of CADM1 expression is associated with poor prognosis and brain metastasis in breast cancer patients. *Oncotarget*. 2014; 5:3076-87.

Windhorst S, Blechner C, Lin HY, Elling C, Nalaskowski M, Kirchberger T, Guse AH, Mayr GW. Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase-A overexpression induces cytoskeletal reorganization via a kinase-independent mechanism. *Biochem J*. 2008; 414: 407-17.

Yamakita Y, Ono S, Matsumura F, Yamashiro S. Phosphorylation of human fascin inhibits its actin binding and bundling activities. *J Biol Chem*. 1996; 271: 12632-8.

7 Erklärung des Eigenanteils an der Publikation

Das Projekt wurde in Zusammenarbeit mit PD Dr. Sabine Windhorst konzipiert und im Verlauf wurden gemeinsam, entsprechend der entstandenen Daten, Anpassungen der Projektplanung durchgeführt. Zu Beginn des Promotionsvorhabens erfolgte eine ausführliche Literaturrecherche. Hierbei eignete ich mir entsprechend dem neusten Stand der Forschung tiefgreifendes Wissen über das Projektthema an und sammelte Informationen über nützliche Methodik.

Für den experimentellen Teil der Arbeit klonierte ich alle für die weiteren Versuche erforderlichen Fascin-WT/S39A/S39D-Vektoren und Leer-Vektoren (GFP, GST, Lego). Die Fascin Mutanten, Fascin-S39A und Fascin-S39D wurden mit Unterstützung durch PD Dr. Marcus Nalaskowski konzipiert und von mir mittels Quick Change erzeugt. Es erfolgte die Herstellung rekombinanter Proteine des Fascin-WT/S39A/S39D und Optimierung der Methodik für die Protein-Expression von Fascin.

Mittels lentiviraler Transduktion stellte ich alle für die Mausversuche benötigten Zelllinien her. Ich selektierte die Zellen mittels Puromycin, kontrollierte die Fascin-Expressionslevel per Western-Blot und bereitete die Zellen für die Übergabe an unseren Kooperationspartner Jun.-Prof. Dr. med. Tobias Lange vor. Sowohl die lentiviral transduzierten Zelllinien als auch die MDA-MB-231-WT und die MDA-MB-231-SA wurden von mir kontinuierlich kultiviert und die Fascin Expressionslevel regelmäßig überprüft.

Die Zellversuche der Adhäsion, Viabilität und Migration wurden komplett durch mich durchgeführt. Des Weiteren erfolgten Vorversuche und Optimierung des Kolonie Formation Versuches, der Ermittlung des F-zu G-Aktin Verhältnisses und der zellfreien Aktinbündelung durch Fascin unter dem Mikroskop.

Ich transfizierte MDA-MB-231 Zellen mit Fascin-GFP und fertigte Aufnahmen am Mikroskop für die Ermittlung der Fascin Lokalisation und Zellmorphologie an. Des Weiteren wurden Versuche zur Konzeptoptimierung durchgeführt, welche nicht im Paper erwähnt wurden. Zu nennen sind hier zum einen das Gewinnen eines Osteoklasten Mediums in Kooperation mit Prof. Dr. Thorsten Schinke. Dieses Medium wurde von mir für unterschiedliche Stimulationsversuche eingesetzt (Adhäsion, Viabilität, Migration, Fascin-Expression in MDA-MB-231-WT/SA). Und zum anderen die Analyse Fascin spezifischer Hemmstoffe mittels MTT-Assay, welche uns durch Kooperationspartner zur Verfügung gestellt wurden.

Die durch diese Versuche entstandenen Datensätze wurden von mir ausgewertet und entsprechende Graphiken erstellt. Meine Erkenntnisse und Ergebnisse wurden durch mich in Institutsseminaren vorgestellt. Im Anschluss an den experimentellen Teil der Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit PD Dr. Sabine Windhorst das Manuskript zur Veröffentlichung der wichtigsten Daten verfasst.

8 Danksagungen

Ich möchte mich zunächst ganz herzlich bei meiner Doktormutter Frau PD Dr. Sabine Windhorst für die Ermöglichung meiner Promotionsarbeit bedanken: Danken möchte ich ihr auch für die mir bei der Durchführung entgegengebrachte Unterstützung und Supervision, sowie für ihre hilfreichen Kommentaren, unsere produktiven Diskussionen und dass ich von ihrer wissenschaftlichen Expertise profitieren durfte. Mein Dank gilt auch dem ehemaligen Direktor des Institutes für Biochemie und Signaltransduktion Herrn Prof. Dr. med. Georg W. Mayr und dem aktuellen Direktor Herrn Prof. Dr. Aymelt Itzen für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in diesem Institut durchführen zu können. Danken möchte ich ebenso dem gesamten Laborteam, insbesondere Frau Christine Blechner für ihre freundliche Einarbeitung, ihre kompetente technische und inhaltliche Beratung bezüglich Labortechniken und für ihre Unterstützung bei aufwendigen Versuchen. Für die erfolgreiche Zusammenarbeit und den wissenschaftlichen Austausch danke ich meiner Co-Autorin Frau Stefanie Muhs. Desweiteren möchte ich mich bei allen Kooperationspartnern bedanken insbesondere bei Herrn PD Dr. Marcus Nalaskowski für die fachliche Beratung, Frau Prof. Dr. Harriet Wikman und Frau PD Dr. Leticia Oliveira-Ferrer für die zur Verfügung gestellten Patientendaten, bei Herrn Jun.-Prof. Dr. med. Tobias Lange für die Durchführung der Maus-Versuche und bei Frau Dr. Marina Mikhaylova für die Unterstützung bei den Mikrotubuli-Versuchen. Mein herzlicher Dank gilt ebenso den anonymen Reviewern für ihre hilfreichen inhaltlichen Anmerkungen und Anregungen, sowie allen Arbeitsgruppen, deren Arbeit mir als Inspiration dienten und ich in meiner Veröffentlichung zitieren durfte. Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken.

9 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

10 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: