



Technische Universität München

Fakultät für Medizin

**Validierung der klinischen Relevanz der Kallikrein-ähnlichen Peptidase 8
(KLK8) als Biomarker beim Mammakarzinom**

Sarah Preis

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin (Dr.med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Julia Dorn

2. apl. Prof. Dr. Viktor Magdolen

Die Dissertation wurde am 02.06.2020 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 06.10.2020 angenommen.

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Das Mammakarzinom	1
1.1.1. Epidemiologie von TNBC und HR+-Mammakarzinomen	1
1.1.2. Therapie von TNBC und HR+-Mammakarzinomen	3
1.1.3. Prognose von TNBC und HR+-Mammakarzinomen	4
1.2. Die Familie der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen (KLK)	5
1.2.1. Proteasen	6
1.2.2. Kallikrein-ähnliche Peptidasen und Brustkrebs	6
1.2.3. Die Rolle von KLK8 in verschiedenen Krebserkrankungen	8
1.2.4. Rolle von KLK8 in Brustkrebs	12

2. Ziel der Arbeit

3. Material und Methoden

3.1. Patientinnen	16
3.1.1. TNBC-Kollektiv	16
3.1.2. HR+-Mammakarzinom-Kollektiv	16
3.2. Materialien	17
3.3. RNA-Extraktion aus Tumorgewebe	17
3.3.1. Vorbereiten der Gewebeprouben	22
3.3.2. Extraktion der RNA mit dem RNeasy Mini Kit	23
3.3.3. Messung der RNA-Konzentration mit dem Nanodrop	23
3.4. Reverse Transkription von RNA	24
3.5. Real-time Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR)	24
3.5.1. Primer Design	26
3.5.2. qPCR der Patientenproben	28
3.5.3. Auswertung der qPCR	29
3.6. Western Blot	31
3.6.1. Sammelgel und Trenngel	35
3.6.2. Vorbereiten der Proteine	36
3.6.3. Elektrophorese	37
3.6.4. Semi-Dry-Blot	38

3.6.5. Antikörper	39
3.6.6. Chemilumineszenz	39
3.7. Immunhistochemie	41
3.7.1. Färbung der Schnitte mit der Polymer-One-Step-Methode	42
3.7.2. Auswertung	43
3.8. Statistische Analysen	45
4. Ergebnisse	46
4.1. Patientenkohorten	48
4.2. KLK8 mRNA Expression in Tumorgewebe von TNBC und HR+- Mammakarzinom-Patientinnen	48 51
4.3. Vergleich der KLK8 mRNA Expression in verschiedenen Brustkrebsentitäten	52
4.4. Assoziationen zwischen klinischen und histomorphologischen Eigenschaften von Patienten mit TNBC und HR+- Mammakarzinomen	53
4.5. Assoziation von KLK8 mRNA Expression mit krankheitsfreiem Überleben (DFS) und Gesamtüberleben (OS) in TNBC-Patientinnen: Univariate Cox-Regressionsanalyse	55
4.6. Assoziationen von KLK8 mRNA Expression mit krankheitsfreiem Überleben (DFS) und Gesamtüberleben (OS) in TNBC-Patientinnen: Multivariate Cox-Regressionsanalyse	58
4.7. KLK8 mRNA Expression im hormonrezeptorpositiven Brustkrebskollektiv	60
4.8. Expression von KLK8-Immunhistochemie	
4.9. Korrelation der KLK8 Expression auf mRNA und Proteinebene	60
5. Diskussion	63
5.1. Expression in Subtypen	64
5.2. Korrelation mit klinischen Parametern	65
5.3. Evaluation von KLK8 als prognostischer Marker beim TNBC	66
5.4. Unterschiede zwischen der Expression auf Protein und mRNA- Ebene	66 68
5.5. Verringerte Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe	68
5.6. Vergleich der eigenen Ergebnisse mit vorangegangenen Studien	

5.7. Onkologische Bedeutung der KLKs	69
5.8. Möglichkeiten der KLK-Inhibition	70
5.9. Möglichkeiten des klinischen Einsatzes der KLKs	75
5.10. Schlussfolgerung	80
6. Zusammenfassung	82
7. Literaturverzeichnis	83
Anhang	85
Antikörpereigenschaften	
Menge/ Verdünnung Pro-KLKs	
Standardprotokoll IHC	
Liste der Publikationen	
Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

Acr	Acrylamid
APS	Ammoniumpersulfat
AUC	Area Under The Curve
Bis	Methylenbisacrylamid
BSA	Bovines Serumalbumin
BMI	Body Mass Index
BRCA1/ 2	Breast Cancer Gene 1/2
°C	Grad Celsius
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
CI	Konfidenzintervall
Ct	Threshold Cycle
DAB	Diaminobenzidin
DCIS	Duktales Carcinoma in Situ
DEPC	Dietyhylpyrocarbonate
DFS	Disease-Free Survival
DTT	1,4-Dithioreitol
E	Effizienz
ER	Östrogenrezeptor
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	Fetal Calf Serum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
g	Gramm
G	Grading
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
Her2/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HR	Hazard Ratio
HR+	Hormonrezeptorpositiv
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IRS	Immunreaktiver Score
KLK	Kallikrein-ähnliche Peptidase
KLK1-15	Kallikrein-ähnliche Peptidasen 1-15
LIN	Lobuläre intraepitheliale Neoplasie
M	Metastase
mA	Milliampere
min	Minuten
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
n	Anzahl
N	Nodus
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄ -2H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄ -2H ₂ O	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
noRT	No Reverse Transcription
NTC	Nuklease-freies Wasser
NTP	Nukleosidtriphosphat
OS	Overall Survival
pH	Potentia hydrogenii
PSA	Prostate-specific antigen
PR	Progesteronrezeptor
PVDF	Polyvinylidene
qPCR	Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion

R ²	Korrelationskoeffizient
RNAsen	Ribonukleasen
ROC	Receiver Operating Characteristic
rRNA	Ribosomale Ribonucleic Acid
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumlaurylsulfat
SLNB	Sentinel-Node-Biopsy
T	Tumor
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNBC	Triple-negative Breast Cancer
UICC	Union Internationale Contre Le Cancer
UPL	Universal ProbeLibrary
W	Watt
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Intrinsische Typen des Mammakarzinoms	2
Tabelle 2:	TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms	3
Tabelle 3:	Expression der KLK-Level auf mRNA- und Proteinebene von Brustkrebspatientinnen im Vergleich zu gesundem Brustgewebe	9
Tabelle 4:	Geräteliste	17
Tabelle 5:	Verbrauchsmaterialien	19
Tabelle 6:	Chemikalien	20
Tabelle 7:	Kits	22
Tabelle 8:	Komponenten Mastermix Reverse Transkription	25
Tabelle 9:	UPL Proben	28
Tabelle 10:	Primer	29
Tabelle 11:	Komponenten Mastermix qPCR	29
Tabelle 12:	qPCR-Programm	31
Tabelle 13:	Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel	36
Tabelle 14:	Zusammensetzung Laufpuffer	38
Tabelle 15:	Zusammensetzung TBS	40
Tabelle 16:	Zusammensetzung Tris-Puffer	43
Tabelle 17:	Zusammensetzung Citrat-Puffer	44
Tabelle 18:	Immunreaktiver Score (IRS)	46
Tabelle 19:	Zusammenfassung klinischer und histomorphologischer Parameter des TNBC-Kollektivs	49
Tabelle 20:	Zusammenfassung klinischer und histomorphologischer Parameter des HR+-Mammakarzinom-Kollektivs	50
Tabelle 21:	KLK8 mRNA Expression in TNBC- und HR+-Mammakarzinom-Tumorgewebe	51
Tabelle 22:	Assoziationen zwischen der KLK8 Expression und klinischen und histomorphologischen Eigenschaften von Patientinnen mit TNBC und HR+-Mammakarzinomen	54
Tabelle 23:	Prognostischer Einfluss von KLK8 auf das Überleben von TNBC-Patientinnen-univariate Cox-Regressionsanalyse	56
Tabelle 24:	Prognostischer Einfluss von KLK8 auf das Überleben von	59

TNBC-Patientinnen - multivariate Cox-Regressionsanalyse

Tabelle 25:	Immunreaktiver Score der Brustkrebsgewebe	63
Tabelle 26:	Antikörpereigenschaften	Anhang
Tabelle 27:	Menge / Verdünnung der Pro-KLKs	Anhang
Tabelle 28:	Standardprotokoll für die Immunhistochemie	Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Der Genlocus der Familie der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen	7
Abbildung 2:	Prinzip des 5'-3'-Nuklease-Assays	27
Abbildung 3:	Amplifikationskurven einer qPCR	32
Abbildung 4:	Standardverdünnungsreihe für KLK8 und HPRT	34
Abbildung 5:	KLK1-15 mit dem Penta-His-Antikörper	41
Abbildung 6:	Westernblot mit MAB1719	42
Abbildung 7:	Prinzip der Polymer-One-Step-Methode	44
Abbildung 8:	KLK8 mRNA Expression im Tumorgewebe der TNBC-Patientinnen	52
Abbildung 9:	KLK8 mRNA Expression im Tumorgewebe der HR+-Mammakarzinom-Patientinnen	52
Abbildung 10:	Darstellung der KLK8 mRNA Expression im TNBC und HR+-Mammakarzinom-Kollektiv	53
Abbildung 11:	Kaplan-Meier-Analyse für das OS von TNBC-Patientinnen in Abhängigkeit von der KLK8 Expression	57
Abbildung 12:	Kaplan-Meier-Analyse für das DFS von TNBC-Patientinnen in Abhängigkeit von der KLK8 Expression	58
Abbildung 13:	IHC der KLK8 Expression im TNBC-Mammakarzinomgewebe	61
Abbildung 14:	IHC der KLK8 Expression in HR+-Mammakarzinomgewebe	62

1. Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist aktuell die häufigste maligne Erkrankung der Frau. In Deutschland beträgt das Lebenszeitrisiko 10-12%, weltweit erkranken jährlich 1,5 Millionen Frauen, wobei fast eine halbe Millionen daran versterben.

Zu den bedeutendsten Risikofaktoren zählen familiäre Belastung und genetische Prädisposition (v.a. BRCA1/BRCA2-Genmutation), höheres Lebensalter, ein langer hormonell aktiver Zeitraum (frühe Menarche und späte Menopause, Hormonersatztherapie in der Postmenopause), konstitutionelle Faktoren (Ernährungszustand, BMI, körperliche Aktivität, Nikotin-/Alkoholkonsum) und proliferative sowie präkanzeröse Gewebeveränderungen. Histologisch lassen sich anhand des Gewebetyps Mammakarzinome in duktale (vom Milchgang ausgehend) und lobuläre (vom Milchdrüsenläppchen ausgehend) Neoplasien sowie seltenere muzinöse, papilläre, tubuläre und medulläre Subtypen einteilen.

Invasive Mammakarzinome zeigen meist erst in fortgeschrittenen Stadien (ab T2) Symptome, welche sich durch unscharf begrenzte, ggf. druckempfindliche asymmetrische Verhärtungen und Knoten, Größenveränderungen der Brust, Hautödeme, -einziehungen, -entzündungen und Erytheme, Peau d'orange oder eine Mamillenretraktion darstellen können. Die Metastasierung erfolgt lymphogen (v.a. in regionäre Lymphknoten in die ipsilaterale Axilla, parasternal und seltener supra-/infraklavikulär, sowie retrosternal und intramammär) und hämatogen (v.a. in Leber, Skelett und Lunge). Um eine frühe Diagnose zu ermöglichen und somit die Prognose der Patientinnen zu verbessern, gibt es seit einigen Jahren das Mammographiescreening, an welchem Frauen zwischen 50 und 69 Jahren in einem zweijährigen Turnus teilnehmen können.

Therapeutisch ist bei einem günstigen Verhältnis zwischen Tumor- und Brustgröße eine brusterhaltende Therapie erstrebenswert. Zusätzlich zu dem operativen Verfahren stellen Chemo-, Hormon- und Antikörpertherapie sowie die Bestrahlung wichtige Bestandteile der Behandlung dar. Die Therapie richtet sich dabei nach dem Subtyp des Mammakarzinoms.

Bei allen invasiven Mammakarzinomen wird im Rahmen der Diagnostik eine immunhistochemische Untersuchung mit Bestimmung der Hormonrezeptorstatus für Progesteron (PR) und Östrogen (ER) durchgeführt. Es wird zwischen dem hormonsensitiven und dem nicht hormonsensitiven Mammakarzinom unterschieden, wobei Tumore ab einer Anfärbung von mindestens 1% der Zellkerne als positiv gewertet werden (Gilcrease, 2010). Routinemäßig wird bei allen neu diagnostizierten Mammakarzinomen außerdem der humane epitheliale Wachstumsfaktorrezeptor 2 (Her2/neu) immunhistochemisch oder mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) bestimmt. Bis zu 20% der Mammakarzinome zeigen eine Überexpression. Mit Hilfe der Kenntnis der Tumorbiologie inklusive histopathologisches Gradings werden verschiedene Tumorsubtypen definiert (**Tabelle 1**).

Tabelle 1: Intrinsische Typen des Mammakarzinoms

Subtyp	Definition
Luminal-A-Karzinome	Positiver ER- und PR-Status, negativer Her2/neu-Status
Luminal-B-Karzinome	Positiver ER- und PR-Status (geringere Hormonrezeptorstatusexpression), negativer Her2/neu-Status, häufig ungünstiges Grading
Basal-like-Karzinome	Negativer ER- und PR-Status, negativer Her2/neu-Status (triple-negativ)
Her2/neu-positive Karzinome	Positiver Her2/neu-Status
Triple-positive Karzinome	Positiver ER- und PR-Status, positiver Her2/neu-Status

Die intrinsischen Typen des Mammakarzinoms werden durch die verschiedenen RNA-Expressionsprofile (Östrogen-/ Progesteronstatus, Her2/neu-Status) definiert (Perou et al., 2000). Dabei lassen sich verschiedene Subtypen unterscheiden.

Mammakarzinome werden wie die meisten malignen Erkrankungen nach der TNM-Klassifikation eingeteilt. Diese Facetten-Klassifikation stellt ein Akronym aus Tumor (T), Nodus (N) und Metastase (M) dar und hilft, Tumore anhand ihres Schweregrades einzuteilen. (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms

TNM	Ausdehnung
T1	Tumorgröße < 2cm <ul style="list-style-type: none"> • T1a: ≤ 0,5cm • T1b: > 0,5cm und ≤ 1cm • T1c: > 1cm und ≤ 2cm
T2	Tumorgröße > 2cm und ≤ 5cm
T3	Tumorgröße > 5cm
T4	Tumor jeder Größe mit Infiltration der Haut oder Brustwand; inflammatorisches Mammakarzinom
N1	axilläre Lymphknoten beweglich
N2	N2a: axilläre Lymphknoten fixiert N2b: Lymphknoten entlang der Arteria mammaria interna in Abwesenheit axillärer Lymphknoten
N3	N3a: infraklavikuläre Lymphknoten N3b: axilläre Lymphknoten und Lymphknoten entlang der Arteria mammaria interna N3c: supraklavikuläre Lymphknoten
M1	Fernmetastasen

Die hier dargestellte TNM-Klassifikation ist an die S3-Leitlinie „Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms“ angelehnt. Dabei steht das Akronym TNM für Tumor (T), Nodus (N) und Metastase (M).

1.1.1 Epidemiologie von TNBC und HR+-Mammakarzinomen

Epidemiologisch tritt der Luminal-B-Typ mit 41,4% am häufigsten auf. An zweiter Stelle finden sich Tumore vom Luminal-A-Typ (33,2%). In 10,7% der Fälle finden sich triple-negative Tumore. Brustkrebs von Luminal-A- oder-B-Typ betrifft eher ältere Patienten, wobei TNBC eher bei jüngeren, häufig prämenopausalen, Patientinnen auftritt (Carey et al., 2006). Bis zu 20% der Mammakarzinome zeigen eine Überexpression des Wachstumsfaktors Her2/neu.

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Faktoren definiert, die das Auftreten von hormonrezeptorpositivem oder triple-negativem Brustkrebs begünstigen (Carey

et al., 2006). Frauen, die ihre Kinder stillen, haben ein reduziertes Risiko für TNBC, wohingegen Medikamente, welche die Laktation unterdrücken, das Risiko erhöhen. Die Stillzeit beeinflusst nicht das Auftreten von hormonrezeptorpositivem Brustkrebs. Während ein jüngeres Alter bei der ersten Schwangerschaft als protektiv in hormonrezeptorpositivem Brustkrebs gilt, erhöht es das Risiko für TNBC. Auch eine ethnische Herkunft aus Afrika und Lateinamerika begünstigt einen TNBC (Millikan et al., 2008).

1.1.2 Therapie von TNBC und HR+-Mammakarzinomen

Die Therapieoptionen des Mammakarzinoms beinhalten die Operation, die Bestrahlung sowie die medikamentöse Tumorthherapie. Gemäß S3-Leitlinie „Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms“ von August 2017 wird eine brusterhaltende Operation mit anschließender Radiotherapie angestrebt. Mögliche Kontraindikationen gegen eine brusterhaltende Therapie können sein: ein ungünstiges Brust-Tumor-Verhältnis, eine Multizentrität, eine inkomplette Tumorentfernung, ein inflammatorisches Mammakarzinom, Kontraindikationen gegen die anschließende Bestrahlung oder der Patientinnenwunsch. Alternativ steht die Mastektomie mit der Möglichkeit der anschließenden Rekonstruktion (durch z.B. Implantate oder Eigengewebe) zur Verfügung. Eine Entfernung des Sentinellymphknotens (*Sentinel-Node-Biopsy*, *SLNB*) nach Technetium- und/oder Farbstoffmarkierung ist bei klinisch unauffälligem Lymphknotenstatus Bestandteil der operativen Therapie und Staginguntersuchung. Bei Patientinnen mit klinisch oder histologisch befallenen Lymphknoten ist meist eine Dissektion der Axilla notwendig. Sind die Tumore bereits lokal fortgeschritten oder primär inoperabel, so besteht die Möglichkeit einer primär systemischen Therapie. Diese erhöht die Operabilität von primär nicht operablen Tumoren als auch die Rate an Operationen, welche brusterhaltend durchgeführt werden können (Eiermann, 1999). Die primär systemische Therapie kann in Form einer neoadjuvanten Chemotherapie oder einer neoadjuvanten Behandlung mit Antikörpern durchgeführt werden. Die neoadjuvante Chemotherapie wird mit Anthrazyklinen und Taxanen durchgeführt. Bei hormonrezeptorpositiven Patientinnen erfolgt die Therapie mit Aromatasehemmern. Vor allem bei älteren oder multimorbiden Patientinnen, bei welchen eine Operation nicht mehr möglich ist, stellt die neoadjuvante

Antikörpertherapie einen wichtigen therapeutischen Baustein dar. Bei einem guten Ansprechen mit entsprechenden Remissionsraten ist der Verzicht von weiteren Therapieoptionen möglich.

Je nach Tumorbilologie und Anzahl der befallenen Lymphknoten schließen sich unterschiedliche Therapieregimes an. Patientinnen mit einem östrogen- oder progesteronpositiven Hormonstatus sollten in jedem Fall eine endokrine Therapie erhalten. Bei einer Überexpression von Her2/neu sollte initial Trastuzumab (Herceptin), ein monoklonaler Antikörper welcher an diesen bindet, zusätzlich zur Chemotherapie gegeben werden. Auch besteht bei Her2/neu-positiven Tumoren die Möglichkeit einer dualen Blockade mit Trastuzumab und Pertuzumab. Bei Pertuzumab handelt es sich ebenfalls um einen monoklonalen Antikörper gegen Her2/neu. Im Gegensatz zu Trastuzumab, welcher ligandenunabhängig wirkt, blockiert Pertuzumab die ligandenabhängige Dimerisierung des Her2/neu-Rezeptors. Beide inhibieren so das Tumorwachstum. Bei TNBC erfolgt meist eine neoadjuvante Therapie mit Anthrazyklinen und Taxanen. Gegebenenfalls wird ein Platinderivat hinzugegeben, welches die Rate an pathohistologischen Komplettremissionen erhöht.

Bei V.a. ein hohes Rezidivrisiko (entdifferenzierter Tumor, high risk multigen assay, junge Patientin, befallene Lymphknoten) ist auch bei hormonrezeptorpositiven Tumoren eine Chemotherapie angezeigt.

1.1.3 Prognose von TNBC und HR+-Mammakarzinomen

Nachdem noch vor einigen Jahren die Tumorgöße und der Nodalstatus als wichtigste prognostische Parameter galten, steht heute die Beurteilung der Tumorbilologie mit im Vordergrund.

Das seit 1978 bestehende Tumorregister München (TRM) analysiert Daten der Brustkrebspatientinnen hinsichtlich verschiedener klinischer Parameter. Die beste Prognose weisen Patientinnen mit Luminal-A-Tumoren auf. 71,9% der Tumoren befanden sich bei Diagnosestellung im pT1-Stadium, 24% der Patientinnen hatten befallene Lymphknoten und 1,6% waren fernmetastasiert. Bei triple-negativen Tumoren war die Prognose weniger günstig. Bei Diagnose waren nur 49,2% im pT1-

Stadium, 32,2% hatten Lymphknotenmetastasen und doppelt so viele Patientinnen wie in der Luminal-A-Subtyp-Gruppe wiesen Fernmetastasen auf (3,6%). Auf das Gesamtleben bezogen weisen Patientinnen mit einem positiven Hormonrezeptorstatus die höchsten Überlebenschancen auf. 91,6% überleben die ersten 5 Jahre nach Diagnosestellung. Die geringste 5-Jahres-Überlebensrate mit 73,3% wurde für die triple-negativen Patientinnen beobachtet (Tumorzentrum München, 2015).

Patientinnen mit einem positiven Hormonrezeptorstatus erhalten seit den frühen Neunziger Jahren eine antihormonelle Therapie. Diese adjuvante antihormonelle Behandlung, prämenopausal mit Tamoxifen, postmenopausal mit einem Aromatasehemmer, konnte die Sterblichkeitsrate um 31% senken (Fisher et al., 1988). Eine Metastasierung von hormonrezeptorpositiven Tumoren erfolgt meist össar, wogegen Tumore mit negativen Rezeptorstatus in ungünstigere Körperregionen wie Gehirn und Leber metastasieren.

Zu den wichtigen ungünstigen Prognosefaktoren des Brustkrebses zählt der positive axilläre Lymphknotenstatus, die Größe des Primärtumors (TNM-Status), die Überexpression des Her2/neu-Rezeptors, ein negativer Hormonrezeptorstatus, hohes Grading und eine erhöhte S-Zellphase-Fraktion. TNBC zeigen häufig ungünstige, aggressive Wachstumsmuster und eine hohe Rezidivrate in den ersten 2-3 Jahren (Carey et al., 2006)

Patientinnen mit triple-negativem Brustkrebs weisen häufig BRCA-Mutationen auf (Lakhani et al., 2002). 80% der Tumore mit BRCA1-Mutation exprimieren einen triple-negativen Subtyp, wobei in einem unselektierten Kollektiv aus TNBC-Patientinnen 20% der Tumore eine BRCA-Mutation zeigten. Diese erkrankten im Schnitt 10-15 Jahre früher.

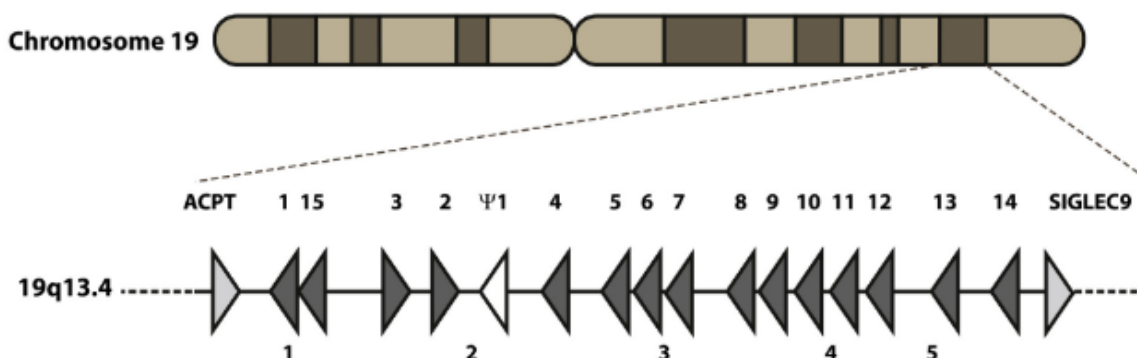
1.2 Die Familie der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen (KLK)

1.2.1 Proteasen

Proteasen bilden eine Gruppe von Enzymen, welche Proteine durch Hydrolyse spalten. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Strukturen in ihren aktiven Zentren und der daraus folgenden unterschiedlichen katalytischen Aktivitäten lassen sie sich in fünf

Untergruppen einteilen: Cysteinproteasen, Aspartatproteasen, Threoninproteasen, Metalloproteasen und Serinproteasen (Yousef et al., 2003a). Mit einem Anteil von 30% stellen die Serinproteasen, nach den Metalloproteasen, die zweitgrößte Gruppe dar. Die Kodierung der Serinproteasen verteilt sich auf verschiedene Chromosomen: 8, 9, 10, 12, 17, 20, 22, 23 und X. Während auf vielen Chromosomen nur 1-3 Gene für Serinproteasen kodieren, befindet sich auf dem Chromosom 19 ein 300kb betragendes Cluster aus 15 Serinprotease-Genen: die Familie der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen (KLKs) (19q13.3-q13.4) (**Abbildung 1**) (Yousef et al., 2003a). Die Serinproteasen haben entweder trypsin-artige (KLK1, KLK2, KLK4, KLK5, KLK6, KLK8, KLK10, KLK11, KLK12, KLK13, KLK14, KLK15) oder chymotrypsin-artige (KLK3, KLK7, KLK9) Aktivität (Borgoño and Diamandis, 2004). Der Aufbau der KLKs ist ähnlich, sie bestehen aus einem untranslatierten Exon, fünf kodierenden Exonen mit identischen Exon-Intron-Phasen und einer untranslatierten 3'-Region. Diese variable Region sorgt für die Entstehung verschiedener mRNA, die alle für dasselbe Protein kodieren (Kurlender et al., 2005). Die Funktionen der Serinproteasen beinhalten die Beeinflussung von Zellwachstum, Invasion und Metastasierung, Proliferation und Angiogenese, und die Aktivierung weiterer Proteasen. Durch ihre Sekretion in den Extrazellulärraum stellen sie exzellente Tumormarker dar (Underwood et al., 1999).

Abbildung 1: Der Genlocus der Familie der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen



Die Genfamilie der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen (KLK1-15) ist auf Chromosom 19q13.3-q13.4 lokalisiert. Die Spitzen der abgebildeten Pfeile zeigen in die Richtung der Transkription, von Telomer zu Zentromer, wobei KLK2 und KLK3 in die andere Richtung transkribiert werden. ACPT steht für den Genlocus der testicular acid phosphatase, einer sauren Phosphatase des Hodens, SIGLEC9 für sialic acid-like-binding Ig-like lectin 9, ein Transmembranprotein, welches Sialinsäure bindet (Kalinska et al., 2016).

Die katalytische Triade im aktiven Zentrum besteht aus den Aminosäuren Histidin, Asparagin und Serin (Kalinska et al., 2016). Die Synthese der KLKs erfolgt als Prä-Pro-Proteine mit einem N-terminalen Signalpeptid, gefolgt von Propeptid und Mature, sowie der Serinproteasendomäne. Das Signalpeptid wird während der Sekretion in das extrazelluläre Milieu, das Propeptid durch Autokatalyse oder die Aktivität einer anderen Protease, entfernt.

Die Nomenklatur der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen unterlag im Laufe der Zeit verschiedenen Entwicklungen. Neben dem bekanntesten Synonym für KLK3, PSA, existierten auch für KLK8 verschiedene Bezeichnungen wie Neuropsin, Ovasin und tumor-associated differentially expressed gene 14 (TADG-14). Aufgrund der aktuellsten Nomenklatur und zur Einheitlichkeit wird KLKs als Bezeichnung der Kallikrein-ähnlichen Peptidase in dieser Arbeit verwendet.

1.2.2 Kallikrein-ähnliche Peptidasen und Brustkrebs

Kallikrein-ähnliche Peptidasen werden in den meisten Geweben unseres Körpers exprimiert und sind nachweislich an verschiedenen regulatorischen Prozessen beteiligt. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Hauterneuerung, der Samenproduktion, der Nierenfunktion, der Zahnschmelzbildung, der Ausbildung von neuronalen Synapsen sowie der Hirnfunktion. KLKs sind Teil von proteolytischen Kaskaden. Eine aktivierte Protease schneidet und aktiviert somit weitere Proteasen in der Kaskade, was zu einer Amplifikation des ursprünglichen Signals führen kann.

Im Vergleich zum gesunden Brustgewebe ist die Expression einiger KLKs in tumorösem Gewebe verändert (**Tabelle 3**) (Avgeris et al., 2012).

Tabelle 3: Expression der KLK-Level auf mRNA- und Proteinebene im Gewebe von Brustkrebspatientinnen im Vergleich zu gesundem Brustgewebe

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
mRNA			Dark Gray	Dark Gray	Light Gray	Dark Gray	Light Gray	Dark Gray	Dark Gray	Light Gray	Light Gray	Light Gray	Light Gray	Dark Gray	Light Gray
Protein			Dark Gray	Dark Gray	Light Gray	Dark Gray	Light Gray	Dark Gray	Dark Gray	Light Gray	Light Gray	Light Gray	Light Gray	Dark Gray	Light Gray

Die unterschiedlichen Farben bezeichnen unterschiedliche Expressionslevel. Dunkelgrau steht für eine erhöhte Expression der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen in Tumorgewebe gegenüber gesundem Brustgewebe, hellgrau zeigt eine erniedrigte Expression in Tumorgewebe gegenüber gesundem Gewebe. Cremefarben zeigt keine Unterschiede in der Expression der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen in Tumorgewebe und gesundem Brustgewebe an. Bei den weißen Feldern handelt es sich um eine fehlende Studienlage.

Im Folgenden wurde der bisherige Kenntnisstand zu den KLKs beim Mammakarzinom aufgelistet:

KLK1

Die Inhibierung von KLK1 in Brustkrebszelllinien zeigt eine verminderte Invasion der Zellen (Wolf et al., 2001).

KLK2

Experimente mit verschiedenen Tumorzelllinien zeigten unterschiedlich starke Expressionen von KLK2, was auf einen Einfluss von KLK2 auf die Beeinflussung verschiedener Signalwege von Brustkrebs schließen lassen könnte (Magklara et al., 2002).

KLK3

Beim hormonabhängigen Brustkrebs (ER/PR+) wird für KLK3 eine Eigenschaft als Tumorsuppressor beschrieben. Experimente mit der hormonabhängigen Brustkrebszelllinie MCF-7 zeigten, dass eine geringe KLK3-Expression das Wachstum der Zellen hemmt. Dies basiert auf der Umwandlung des potenten Östradiols (E2) in das weniger potente Östron (E1) (Lai et al., 1996). Eine erhöhte KLK3-Expression ist mit prognostisch günstigen Tumoreigenschaften wie einer kleineren Tumorgöße und einer geringeren Anzahl von Zellen in der Synthesephase assoziiert. Überlebensanalysen zeigen einen Vorteil für Patientinnen mit erhöhter KLK3-Expression. Diese Patientinnen hatten sowohl ein verlängertes krankheitsfreies

als auch Gesamtüberleben (Yu et al., 1998). In Tumoren mit fortgeschrittenen Stadien (größere Tumormasse, involvierte Lymphknoten) wurde eine geringere Expression von KLK3 festgestellt (Sauter et al., 2004). Patientinnen mit einem Brustkrebsrezidiv und einer KLK3-Überexpression zeigten ein schlechteres Ansprechen auf eine Therapie mit Tamoxifen und ein kürzeres Gesamtüberleben (Foekens et al., 1999).

KLK4

Untersuchungen der KLK4 mRNA Expression zeigten eine Erhöhung bei Patientinnen mit höhergradigen Tumoren (Papachristopoulou et al., 2009). Eine höhere KLK4 Proteinexpression war in einem TNBC-Patientenkollektiv mit einem signifikant kürzeren progressionsfreien Überleben assoziiert (Yang et al., 2017).

KLK5

Im Nippelaspirat konnten bei Brustkrebspatientinnen erhöhte KLK5 Werte nachgewiesen werden (Yousef et al., 2003b). Für KLK5 wurden verschiedene Expressionsniveaus abhängig von der hormonellen Situation der Patientinnen beschrieben. Postmenopausale, an Brustkrebs erkrankte Frauen exprimieren niedrigere *KLK5*-mRNA-Level im Tumorgewebe als Frauen mit einem prä-/perimenopausalen Status (Avgeris et al., 2011). Ein positiver Rezeptorstatus für Östrogen und Progesteron geht mit einer erniedrigten KLK5 mRNA Expression einher (Talieri et al., 2011). Patientinnen, deren KLK5 Expression auf mRNA-Ebene erhöht war, zeigten ein signifikant kürzeres krankheitsfreies Überleben und Gesamtüberleben (Yousef et al., 2002b).

KLK6

KLK6 agiert als Tumorsuppressor. Erhöhte Expressionslevel verringern die Zellinvasion und wirken antiangiogenetisch (Pampalakis et al., 2009). Außerdem wurde eine inverse Beziehung zwischen der KLK6 Expression auf mRNA und Proteinebene und dem Östrogenrezeptorstatus sowie der Metastasierung beschrieben (Wang et al., 2008).

KLK7

Östrogenrezeptornegative Tumore exprimieren erhöhte KLK7 Level auf mRNA-Ebene. Patientinnen, die erhöhte KLK7 mRNA Level zeigten, hatten ein prolongiertes krankheitsfreies Überleben (Holscheiter et al., 2006). Analysen der Brustkrebsmetastasen zeigen eine erniedrigte Expression von KLK7 in den Metastasen verglichen mit dem Primärtumor (Li et al., 2009).

KLK9

Auch die KLK9 Expression ist für Patientinnen prognostisch günstig. Patientinnen mit einem negativen Rezeptorstatus für Östrogen und Progesteron lebten länger und entwickelten weniger Rezidive und Metastasen (Yousef et al., 2003c).

KLK10

KLK10 wird eine Rolle als Tumorsuppressor zugeschrieben. In Experimenten zeigte sich ein vermindertes Tumorwachstum (Goyal et al., 1998). Jüngere, prämenopausale Patientinnen mit einem negativen Rezeptorstatus exprimieren höhere KLK10 Level. Erhöhte KLK10 Werte verschlechtern die Antwort auf eine Therapie mit Tamoxifen und verringern aufgrund dessen das Gesamt- und krankheitsfreie Überleben in der mit Tamoxifen behandelten Patientenkohorte (Luo et al., 2002). KLK10 kann als Target für Patientinnen mit Trastuzumab-Resistenz verwendet werden (Wang et al., 2016). Für Patientinnen mit methyliertem KLK10 werden Rezidive nach einer geringeren Zeitspanne und ein kürzeres Gesamtüberleben beschrieben (Kioulafa et al., 2009).

KLK11

Eine erhöhte Expression von KLK11 wird für prämenopausale Patientinnen sowie Patientinnen mit positivem Hormonrezeptorstatus beschrieben (Sano et al., 2007).

KLK12

Eine vermehrte Expression von KLK12 auf mRNA-Ebene ist mit einem verlängerten krankheitsfreien Überleben assoziiert (Talieri et al., 2012).

KLK13

Die erhöhte Expression von KLK13 mRNA vermindert das Risiko eines Rezidives und verlängert das Überleben von Brustkrebspatientinnen (Chang et al., 2002).

KLK14

Für KLK14 konnte in Studien bislang kein eindeutiger Effekt das auf Gesamt- oder krankheitsfreie Überleben gezeigt werden (Fritzsche et al., 2006). Jedoch führt eine erhöhte KLK14 Expression in den Subgruppen der Patientinnen mit einer Tumorgroße < 2 cm, einem positivem Hormonrezeptorstatus und befallenen Lymphknoten zu einem verkürzten progressionsfreien und Gesamtüberleben (Yousef et al., 2002a).

KLK15

KLK15 zeigt eine prognostisch günstige Signifikanz in Bezug auf das Überleben für Patientinnen mit niedriggradigen, hormonrezeptornegativen Tumoren (Yousef et al., 2002c).

1.2.3 Die Rolle von KLK8 in verschiedenen Krebserkrankungen

Das Gen der humanen Kallikrein-ähnlichen Peptidase 8 (KLK8, Neuropsin, Ovasin, tumor-associated differentially expressed gene 14 (TADG-14), kodiert das Protein KLK8) wurde als humanes Homolog zu murinem Neuropsin aus einer Haut-cDNA kloniert (Chen et al., 1995).

Es sind acht Spleißvarianten beschrieben, welche sich in der Anzahl und Länge ihrer Exons unterscheiden. KLK8 ist an der Modellierung der extrazellulären Matrix beteiligt, indem es degradierend auf Kasein, Fibrinogen, Gelatin, Kollagen Typ IV, Fibronectin und Plasminogen wirkt. Über seine Eigenschaft als Protease wandelt es den einkettigen Plasminogen-Aktivator in seine zweikettige Form um, was dessen Aktivität verstärkt. KLK8 kann durch Serinproteaseinhibitoren inhibiert werden (Rajapakse et al., 2005). Zelleexperimente mit Darmkrebspatienten vermuten eine Beteiligung von KLK8 in Bezug auf Proliferation, Invasion und Migration *in vitro* (Liu et al., 2017).

Die höchsten Expressionen von KLK8 werden im Ösophagus, Haut sowie fetalen Gewebe von Ureter und Tonsillen, gefolgt von Speicheldrüsen, Brustgewebe, Tonsillen, Hoden, Lymphknoten, Eileiter und Nieren gemessen. Auch in der Muttermilch, im Fruchtwasser, im Liquor und in der Samenflüssigkeit kann KLK8

nachgewiesen werden (Kishi et al., 2003). Neben anderen KLKs kann KLK8 durch 17 β -Estradiol in den hormonrezeptorpositiven Brustkrebszelllinien MCF-7 und T-47D hochreguliert werden. Dies lässt auf ein komplexes regulatorisches Netzwerk der KLKs schließen, welches die Expression der KLKs und ihre physiologischen Funktionen beeinflusst (Paliouras et al., 2007). Auch für weitere Steroide wie Androgene und Glukokortikoide konnte in Experimenten mit Brustkrebs- und Prostatazelllinien eine regulatorische Einwirkung auf KLK8 beschrieben werden (Kishi et al., 2003).

In nichtkleinzelligen Lungenkarzinom-Zelllinien supprimiert die Überexpression von KLK8 die Invasion der Zellen, sowie in Mausexperimenten zusätzlich das Tumorstadium *in vivo*. Eine Überexpression stellt einen prognostisch günstigen Parameter für ein verlängertes krankheitsfreies Überleben dar ($P = 0,049$) (Sher et al., 2006).

Das Genprodukt von KLK8 reguliert synaptische Interaktionen und ist an der physiologischen Funktion des Hippocampus beteiligt (Hirata et al., 2001). Bei Patienten mit Alzheimer konnte verglichen mit der Kontrollgruppe, eine 11,5-fach erhöhte Konzentration an KLK8 gemessen werden. Dies impliziert eine wahrscheinliche Beteiligung von KLK8 an der Entstehung von Alzheimer (Shimizu-Okabe et al., 2001). Bei Darmkrebspatienten ist eine erhöhte KLK8 Expression signifikant mit einer weiter fortgeschrittenen, aggressiveren Erkrankung assoziiert. Die KLK8 Expression wird als signifikanter, unabhängiger prognostischer Marker, sowohl für das DFS als auch für das OS für Patienten mit Darmkrebs beschrieben (Liu et al., 2017). KLK8 mRNA und Protein ist im Ovarialkarzinomgewebe, verglichen mit Normalgewebe, höher exprimiert (Underwood et al., 1999), was auf eine Rolle von KLK8 als Tumormarker schließen lässt (Kishi et al., 2003). Patientinnen mit erhöhter KLK8 mRNA Expression haben eher niedriggradige Tumore und wenig Resttumor nach Operation, und zeigen ein längeres krankheitsfreies Überleben und Gesamtüberleben (Magklara et al., 2001). Für Cervixkarzinome wurde eine Überexpression von KLK8 beschrieben und KLK8 als Marker für Diagnose und Therapieansprechen diskutiert (Cané et al., 2004).

1.2.4 Rolle von KLK8 in Brustkrebs

Beim Mammakarzinom ist die Expression von KLK8 mRNA in Zelllinien und im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe reduziert (Yousef et al., 2004).

Gleichzeitig ist eine höhere KLK8 Expression mit ungünstigen klinischen Parametern, wie fortgeschrittenes TNM-Stadium (UICC III oder IV) und einem positiven Nodalstatus assoziiert.

Auch in Bezug auf die unterschiedlichen Brustkrebssubtypen unterscheidet sich die Expression von KLK8. In TNBC und HER2/neu-positivem Brustkrebs ist KLK8 verglichen mit anderen Brustkrebsentitäten signifikant erhöht und es wird eine negative Korrelation zwischen KLK8 mRNA Expression und einem positiven Rezeptorstatus für Östrogen und Progesteron beschrieben. Es konnten höhere Expressionslevel in nicht-luminalen Brustkrebssubtypen, wie TNBC und Her2/neu-positivem Krebs, nachgewiesen werden (Michaelidou et al., 2015). Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der KLK8 Expression und anderen klinischen Parametern wie Grading, Her2/neu-Status, Patientenalter oder ki67-Index. Eine durchgeführte Studie aus dem Jahr 2015 von Micheaelidou et al. zeigt eine Assoziation einer erhöhten KLK8 mRNA Expression mit einem verkürzten DFS. In Bezug auf die prognostische Relevanz zeigt sich, dass sowohl Patientinnen mit adjuvanter Chemotherapie als auch Patientinnen mit einer sich an die OP anschließenden Hormontherapie ein verkürztes rezidivfreies Überleben hatten. Bei Patientinnen, die keine adjuvante Hormontherapie erhielten, zeigte die KLK8 Expression keinen Einfluss auf das DFS (Michaelidou et al., 2015).

Zusammengefasst spielen die Kallikrein-ähnlichen Peptidasen bei verschiedenen Krebserkrankungen eine wichtige Rolle. Für das Mammakarzinom liegen zum Teil nur wenige Daten vor, dort scheint aber die Proteasenfamilie und insbesondere KLK8 ein vielversprechender, prognostisch ungünstiger Biomarker zu sein.

2. Ziel der Arbeit

In letzter Zeit hat sich gezeigt, dass Brustkrebs nicht als eine einzige, homogene Erkrankung gesehen werden kann. Die unterschiedliche Tumorbiologie, das Ansprechen auf Therapie und das Outcome der Patienten in den unterschiedlichen Subtypen zeigen, dass Brustkrebs vielmehr als eine heterogene Entität gesehen werden muss (Brunello et al., 2013). Aktuelle systemische Therapien, oftmals bestehend aus einer Chemotherapie, sind häufig wenig effizient und führen bei vielen Patienten zu unzureichender Wirkung bei zahlreichen, unerwünschten und schwerwiegenden Nebenwirkungen. Folglich gibt es einen großen Bedarf an speziellen Biomarkern, um den Krankheitsverlauf und das Therapieansprechen besser einschätzen und vorhersagen können. Ziel ist es, adjuvante systemische Therapien durch eine individuelle, personalisierte Behandlung zu ergänzen und soweit möglich zu ersetzen.

Ziel der durchgeführten Studie war, die Assoziation von klinischen Parametern und die prognostische Relevanz der Kallikrein-ähnlichen Peptidase 8 in einem homogenen Kollektiv von Patientinnen zu untersuchen. Bislang durchgeführte Studien zur KLK8 mRNA Expression in Brustkrebs unterschieden in der Zusammenstellung des Kollektivs nicht die unterschiedlichen Brustkrebssubtypen, welche aber alleine aufgrund ihrer Tumorbiologie wesentliche, zu beachtende Auswirkungen auf die Prognose der Tumorerkrankung haben.

Diese Studie soll die Bedeutung von KLK8 in Bezug auf das krankheitsfreie und das Gesamtüberleben in einem großen, homogenen Kollektiv validieren.

Um dieses Ziel zu erfüllen, wurden folgende Schritte durchgeführt:

1. Bestimmung der Genexpression von KLK8 auf mRNA- Ebene in triple-negativen und hormonrezeptorpositiven Brustkrebsproben mittels qPCR
2. Vergleich der Genexpression in beiden Kollektiven
3. Analyse der Auswirkung der Expression auf das krankheitsfreie Überleben und das Gesamtüberleben
4. KLK8 Expressionsbestimmung auf Proteinebene mittels Immunhistochemie in ausgewählten Proben aus beiden Kollektiven
5. Korrelation der KLK8 Expression zwischen der mRNA und der Protein-Ebene

3. Material und Methoden

3.1 Patientinnen

Für die vorliegende Doktorarbeit wurde Gewebe von 127 triple-negativen (TNBC) und 144 hormonezeptorpositivem (HR+) Brustkrebspatientinnen untersucht. Die Patientinnen wurden in den Jahren 1988 bis 2013 im Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, operiert und die Daten retrospektiv erhoben. Die Genehmigung zur Studiendurchführung fand durch die Ethikkommission der Technischen Universität München statt (Zeichen: 491/17 S).

3.1.1 TNBC-Kollektiv

Das intraoperativ gewonnene Mammagewebe wurde im Anschluss an die Operation im Institut für Pathologie der Technischen Universität München, München, Deutschland untersucht und der Rezeptor- und Her2/neu-Status überprüft. Alle in das triple-negative (TNBC)- Kollektiv eingeschlossenen Patientinnen (n=127) wiesen keine Expression des Östrogen- und Progesteronrezeptors, sowie keine Überexpression des HER2/neu-Status auf. Keine der Patientinnen war primär metastasiert oder erhielt eine neoadjuvante Chemotherapie. Das mediane Alter der Patientinnen betrug 55 Jahre (Range: 30-96 Jahre). Zum Zeitpunkt der Diagnose waren 42 (33%) Patientinnen prä-, drei (2%) Patientinnen peri- und 82 (65%) Patientinnen postmenopausal. Bei 61% der Patientinnen erfolgte eine brusterhaltende Therapie, die restlichen Patientinnen wurden mastektomiert. Im Anschluss erhielten 94 (74%) Patientinnen eine adjuvante Chemotherapie, entsprechend der aktuellen Empfehlungen. 20 (16%) Patientinnen wurden antihormonell behandelt und 95 (75%) Patientinnen wurden bestrahlt. Das mediane krankheitsfreie Überleben betrug 71 Monate (Range: 3-269 Monate). In unserem gewählten Beobachtungszeitraum von 15 Jahren erlitten 39 (35%) der nachverfolgten Patientinnen ein Rezidiv. Das mediane Gesamtüberleben lag bei 79 Monaten (Range: 4-286 Monate), wobei im Beobachtungszeitraum 42 (37%) Patientinnen verstarben.

3.1.2 HR+-Mammakarzinom-Kollektiv

Alle in das hormonrezeptorpositive (HR+) Kollektiv eingeschlossenen Patientenproben (n=144) wurden bezüglich ihres Rezeptorstatus im Institut für Pathologie, München, untersucht. Sie wiesen einen positiven Status für Östrogen und Progesteron auf. Der HER2/neu-Status war bei allen Patientinnen negativ. Auch in diesem Kollektiv war keine Patientin primär metastasiert und es wurde keine neoadjuvante Behandlung durchgeführt. Das mediane Patientenalter betrug 64 Jahre (Range: 28-83 Jahre). 107 (74%) Patientinnen befanden sich bereits in der Menopause. 120 (83%) erhielten eine brusterhaltende Therapie. Eine adjuvante Chemotherapie erfolgte bei 68 (47%) Patientinnen, 122 (85%) wurden hormonell behandelt und 120 (83%) bestrahlt. Das mediane progressionsfreie Überleben betrug 52,5 Monate (Range: 3-128 Monate), währenddessen 28 (19%) Patientinnen ein Rezidiv entwickelten. Das mediane Gesamtüberleben betrug 57 Monate (Range: 2-128 Monate). Sechs (4%) Patientinnen starben in dieser Zeit.

3.2 Materialien

Tabelle 4: Geräteliste

Geräteliste	
Centrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Chemilumineszenzgerät	BioRad ChemiDoc XRS with Image Lab Software, BioRad Hercules, Kalifornien, USA
Druckkochtopf (Ankoch-Automatik)	WMF, Geislingen an der Steige, Deutschland
Elektrophoreseapparatur	Biometra, Göttingen, Deutschland
Feuchtkammer	BioRad Mini Protean II™, BioRad Hercules, Kalifornien, USA
Glasplatten 10,1x7,3cm	Biostep GmbH, Burkardtshausen, Deutschland
Hamamatsu Photonics NPD scanner	Hamamatsu Photonics, Hamamatsu,

Heraeus Multifuge 3 L-R	Japan Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Kamm	BioRad Hercules, Kalifornien, USA
Kühlplatte	Medite COP 30, Medite, Burgdorf, Deutschland
Lichtmikroskop	Axioskop, Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Microcentrifuge 5417R	Eppendorf, Hauppauge, NY, USA
Mikrotom	Microm HM 335E, Microm GmbH, Walldorf, Deutschland
Mini Centrifuge C-1200	National Labnet, Edison, New Jersey, USA
Mx3005P quantitative PCR	Agilent Technologies Böblingen, Deutschland
Nanodrop	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NanoZoomer Virtual Microscope and software NDP 2.0	Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan
Pinzette	Bayha, Tuttlingen, Deutschland
pH-Meter	SCHOTT Instruments Analytics, Mainz, Deutschland
REAX top	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Rührplatte	MS1 Minishaker, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sartorius TE313S Milligramm Lab Scale	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Skalpell, rostfrei	Bayha, Tuttlingen, Deutschland
Stickstoffeimer	Isotherm, Karlsruhe, Deutschland
Thermal Cycler SensoQuest Labcycler	SensoQuest GmbH, Göttingen, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Toploader Balance	#Z267074, Model BP310S. Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	Medite TFB 35, Medite, Burgdorf,

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	
Blotting Paper	#MN827 B, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Cell Star Tubes	#227261 Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläschen	#1130287, R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland
Eppendorf Safe Lock Tubes 1,5ml	#0030120086, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kryotubes	#5150C12, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Objektträger	#03-0600, SuperFrost Plus, R.Langenbrinck, Teningen, Deutschland
Optical Strip Caps	#401427, Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland
PCR-Gefäß mit flacher Kappe, 0,2 ml	#732-3215, PEQLAB, Erlangen, Deutschland
Petrischale 92 x 16 mm, PS, ohne Nocken	#82.1472, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
QPCR 96-Well Plated, Non-Skirted	#401333, Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland
Roti-PVDF-Membran Porengröße 0,45 µm	#T830.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SafeSeal SurPhob Spitzen, 10 µl, kurz, steril	#VT0210, Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
SafeSeal SurPhob Spitzen, 200µl	#VT0240, Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Skalpellklingen Nr. 19	#319, Bayha, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 6: Chemikalien

Chemikalien	
Acrylamid/Methylenbisacrylamid	#A515.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Antibody diluent 500 ml ready to use	#ZUC25-500, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	#A3678, Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
β- Mercaptoethanol	#M6250, Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
Brilliant III Ultra-Fast RT-PCR Master Mix with Low Rox	#600890, Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland
BSA (Bovines Serumalbumin)	#A2153, Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
Citric acid monohydrate	#C1909-500G, Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
DAB (Diaminobenzidin)	#247-DA, DAB 5000 plus, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
Ethanol	Institut für Pathologie, Technische Universität München, München, Deutschland
Glycin	#H51507, Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
H ₂ O	Forschergruppe der Frauenklinik der Technischen Universität München, München, Deutschland
H ₂ O ₂ 30% (Wasserstoffperoxid)	#1.07210.05250, Merck, Darmstadt, Deutschland
Harnstoff	#A120.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin	#S2020, Dako REAL, Glostrup, Deutschland
HCl 37% (Chlorwasserstoff)	#3957.2, Carl Roth, Karlsruhe,

HRPO Polymer Conjugated Goat anti-Mouse IgG	Deutschland #DAB-88220, Dianova, Hamburg, Deutschland
Isopropanol	Institut für Pathologie, Technische Universität München, München, Deutschland
MAB1719	#189004, R&D Systems, Wiesbach-Nordenstadt, Deutschland
Milchpulver	#T145, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl (Natriumchlorid)	#1.06404, Merck, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ -2H ₂ O (Dinatriumhydrogenphosphat)	#S-0876, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NaH ₂ PO ₄ -2H ₂ O (Natriumhydrogenphosphat)	#2370, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaOH (Natriumhydroxid)	#S-0899, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder 10 to 250 kDa	#26619, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Paraffin	Institut für Pathologie, Technische Universität München, München, Deutschland
Penta-His-Antbody, BSA-free	#34660, Qiagen, Hilden, Deutschland
Pierce ECL Western Blotting Substrate	#32106, Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
Pertex (mounting medium)	#41-4010-00, PER3000, Medite, Burgdorf, Deutschland
RNase-free DNase Set (50)	#79254, Qiagen, Hilden, Deutschland
Roti Load 1	#K929.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schweineserum	X0901, Dako, Glostrup, Dänemark
SDS (Natriumlaurylsulfat)	#0183.2, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

TEMED	#2367.3, Carl Roth, Karlsruhe
Trizma Base	#T1503, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Tween-20	#P1379, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Xylol	Institut für Pathologie, Technische Universität München. München,. Deutschland
Zytochrom plus HRP One-Step-Polymer anti-mouse/rabbit/rat	#ZUC053-100, Zytomed Systems, Berlin, Deutschland

Tabelle 7: Kits

Kits				
Cloned	AMV	first-strand	cDNA	#12328-040, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
synthesis kit				
QIASHredder (250)				
#79656, Qiagen, Hilden, Deutschland				
RNeasy Mini Kit (250)				
#74106, Qiagen, Hilden, Deutschland				

3.3 RNA-Extraktion aus Tumorgewebe

Um Tumorgewebe der Patienten viele Jahre archivieren zu können, werden die Proben direkt nach der operativen Entnahme in der Pathologie in *Cryotubes* überführt und in Stickstofftanks der Tumorbank der Frauenklinik der TU München gelagert. Nach dem Auftauen des Gewebes verhält dieses sich wie Frischgewebe, sodass sich auch nach langer Zeit noch ein hoher Gehalt an DNA und RNA isolieren lässt. Für die RNA-Extraktion des Gewebes wurde das *QIASHredder* und das *RNAeasy Mini* Kit verwendet.

Das Prinzip der RNA-Extraktion basiert auf wenigen Grundoperationen. Das Gewebe wird mit einem Gemisch aus β -Mercaptoethanol und einem Guanidin-Thiocyanat-haltigen Puffer lysiert und homogenisiert. RNAsen werden dabei inaktiviert, sodass

die RNA vor weiterem Abbau geschützt wird. Durch die Zugabe von Ethanol wird die Bindung der RNA an eine Silica-Membran verbessert, wodurch bei den darauffolgenden Waschschrritten die RNA fest an der Membran haftet und Kontaminationen spezifisch entfernt werden können. Die isolierte RNA wird im letzten Schritt durch Zugabe von RNase-freiem Wasser eluiert.

Ein Vorteil dieses Kits ist, dass mRNA optimal isoliert werden kann, da hauptsächlich Nukleotidketten, welche länger als 200 Nukleotide sind, extrahiert werden. Der Gehalt an tRNA und rRNA, welche eine Größe von <200 Nukleotiden haben, lässt sich daher auf ein Minimum reduzieren.

3.3.1. Vorbereitung der Gewebeproben

Von dem gefrorenen Gewebe wurden mit Hilfe eines Skalpell sehr dünne Gewebsraspel abgetragen, deren Gewicht zwischen 10 – 30 mg betrug. Diese Gewebemengen gewährleiten eine optimale Ausbeute und Qualität der RNA entsprechend der Bindungskapazität der verwendeten Säulen. Da RNA sehr instabil ist, muss schnell gearbeitet werden. Damit der Gehalt an RNA möglichst hoch bleibt, wurden Petrischalen, auf welchen das Tumorgewebe geschnitten wurde, auf flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Das geschnittene Gewebe wurde in Kryoröhrchen überführt und in Stickstoff schockgefroren. Es konnte dann entweder direkt im Anschluss weiterverarbeitet oder aber in Stickstofftanks gelagert werden.

Die gefrorenen Gewebeproben wurden jeweils in 600 µl RLT plus Puffer und 6 µl β-Mercaptoethanol durch Auf- und Abpipettieren mit einer 1000 µl Pipette lysiert.

3.3.2 Extraktion der RNA mit dem RNeasy Mini Kit

Das Lysat wurde auf eine *QIAshredder* Säule in einem 2 ml Sammelröhrchen überführt. Während einer zweiminütigen Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit durchfließt das Lysat die Säule, wodurch es homogenisiert wurde. Es wurde mit 600 µl 70% Ethanol versetzt und gut gemischt. Im Anschluss wurden jeweils Aliquotes von 700 µl auf eine *RNeasy Mini* Säule in einem 2 ml Sammelröhrchen überführt. Bei 10000 g wurde die Probe für 15 s zentrifugiert und

der Durchfluss verworfen. Dann wurden 350 µl RW1 Puffer hinzugefügt und bei Raumtemperatur für 15 s bei 10000g zentrifugiert. Um restliche DNA-Kontaminationen zu entfernen, wurde im nächsten Schritt ein DNase-Verdau durchgeführt. Jede Probe wurde mit einem Gemisch, bestehend aus 10 µl DNase Stock-Lösung und 70 µl RW1 Puffer versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden erneut 350 µl RW1-Puffer hinzupipettiert, die Proben zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. RW1 ist ein Waschpuffer bestehend aus Guanidinsalz und Ethanol. Dieser entfernt Proteine, Fette und Zuckerketten, welche unspezifisch an die Membran binden. Danach erfolgten zwei Waschschrte mit jeweils 500 µl RPE Puffer. Die Säule wurde im Anschluss in ein neues Sammelrohr gegeben und 1 min bei Raumtemperatur und Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert. Nach dem Überführen in ein frisches 1,8 ml Sammelröhrchen, der Zugabe von 50 µl RNase-freien Wasser wurde die Proben für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch anschließende einminütige Zentrifugation wurde die RNA eluiert.

3.3.3 Messung der RNA-Konzentration mit dem Nanodrop

Die Konzentration und Reinheit der extrahierten RNA wurden mit dem Nanodrop 2000c Spektrophotometer und der Nanodrop 2000/2000c Software gemessen. Das Spektrophotometer basiert auf der Eigenschaft der Stoffe, Licht bei einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren und misst deren Extinktionen. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm. Vor der Messung wurden 1,5 µl RNase-freies Wasser auf den Sensor gegeben und ein Leerwert wurde bestimmt. Die Absorption des Puffers wurde durch die Messung dieses Elutions-Puffers berücksichtigt. Für die Messung wurden jeweils 1,5 µl Probe verwendet und die Absorptionslevel bei 260/230 nm, welches einen Hinweis auf organische Verunreinigungen der Probe, und 260/280 nm, welches Rückschlüsse auf Proteinkonzentrationen der RNA gibt, gemessen. Beträgt der Quotient >1,8 ist davon auszugehen, dass die Probe nicht wesentlich durch andere Substanzen verunreinigt ist. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80° C gelagert.

3.4 Reverse Transkription von RNA

Um die Expression des Gens zu messen, benötigt man komplementäre DNA (cDNA). Hierfür wird aus RNA mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase cDNA synthetisiert. Als reverse Transkriptase diente ein bakterieller Retrovirus, welcher eine RNA-abhängige DNA-Polymerase ist. Für den Versuch wurde das *Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit* verwendet.

In einem 0,5 ml Reaktionsgefäß wurde ein Gemisch aus jeweils pro Probe 1 µl Random Hexamer Primern, 2 µl dNTPs und 500 ng RNA angesetzt. Dieses wurde dann mit DEPC- Wasser zu einem Endvolumen von 12 µl aufgefüllt. Die Random Hexamere binden effizient an viele kleine RNA-Sequenzen und dienen als Primer für die DNA-Polymerase. Im Anschluss wurden RNA und Primer bei 65°C für 5 min erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen und die Bindung der Primer an die RNA zu erhöhen. Im Anschluss wurden die Reaktionsgefäße auf Eis gekühlt und der Master Mix für die Reverse Transkription vorbereitet. Der Master Mix besteht für jede Probe aus den folgenden Komponenten (**Tabelle 8**):

Tabelle 8: Komponenten Master Mix Reverse Transkription

Komponenten	1 Reaktion
5x cDNA Synthesis Buffer	4 µl
0,1 M DTT ^a	1 µl
RNaseOUT™ (40U/µl)	1 µl
DEPC- treated H ₂ O ^b	1 µl
Cloned AMV RT (15 units/µl)	1 µl
Gesamtvolumen	8 µl

^aDithiothreitol

^bDiethylpyrocarbonate

Der Master Mix, welcher für die reverse Transkription verwendet wird, besteht aus den oben genannten Komponenten. Dabei bestand dieser aus einer Puffersubstanz, welcher diverse Ionen beinhaltet und einen optimalen pH-Wert gewährleistet. DTT schützt die Komponenten vor der Oxidation. Bei RNaseOUT handelt es sich um einen rekombinanten Ribonuklelease Inhibitor, welcher dazu dient, die RNA vor dem Abbau zu schützen. DEPC-treated Wasser wird verwendet, um die RNA vor einem Abbau durch RNAsen zu schützen. Bei Cloned AMV RT handelt es sich um eine aus dem avian myeloblastosis Virus klonierte reverse Transkriptase.

Der 5x cDNA Synthesis Buffer und DTT gewährleisten optimale Reaktionsbedingungen für die Reverse Transkriptase. Während DTT diese vor Oxidation schützt, beinhaltet der Puffer benötigte Ionen und gewährleistet einen optimalen pH-Wert. Die RNA wird durch den rekombinanten Ribonuklease Inhibitor RNaseOUT vor Abbau geschützt. Pro Probe wurden 8 µl des Master Mixes zu dem RNA-Primer-Mix auf Eis hinzugegeben. Die reverse Transkription wurde mit dem Thermal Cycler durchgeführt. Die Reaktion durchlief vier Temperaturzyklen und Inkubationszeiten. Der Anlagerungsprozess der Primer an die RNA-Sequenzen erfolgte bei 25°C für 10 min, im Anschluss die reverse Transkription bei 50°C für 50 min und die Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 85°C für 5 min. Danach folgte eine unlimitierte Kühlung bei 4°C. Zuletzt wurde die cDNA mit 80 µl RNase freiem Wasser auf ein finales Volumen von 100 µl verdünnt, um eine Endkonzentration von 5 ng/µl zu erhalten und bei -20°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

3.5. Real-time Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR)

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR*) kombiniert zwei Methoden. Einerseits die exponentielle Amplifikation der cDNA, andererseits die Quantifikation der Expression des untersuchten Produktes nach jedem Zyklus. Im Gegensatz zur reinen PCR können bei der qPCR die gebildeten DNA-Moleküle schon während der Reaktion gemessen werden. Dafür setzt man für das Gen spezifische, fluoreszierende Sonden ein. Der qPCR-Zyklus besteht aus drei Hauptschritten: der Denaturierung der cDNA bei 95°C für 3 min, der Anlagerungsphase–Phase (*Annealing*) bei 95°C für 15 sec, in welcher sich komplementäre Primer an den Einzelstrang anlagern, und der Verlängerungsphase (*Elongation*) bei 60°C und einer Dauer von 1 min. Die Temperatur der Elongationsphase liegt hierbei nicht bei der klassischen Temperatur von 72°C, dem Temperaturoptimum der DNA-Polymerase. Dies hat den Grund, dass die Sonde an das Target gebunden sein muss, um die Amplifikation detektieren zu können. Bei einer Temperatur über 60°C würde sich die Sonde aufgrund ihrer Schmelztemperatur vom Target lösen und die Detektion wäre nicht möglich. Als Detektiersystem wurde die *TaqMan*TM-Technologie verwendet. Die Sonde sollte so gewählt werden, dass sie zwischen den Primern hybridisiert werden kann. Sie ist an

ihrem 3'-Ende mit einer Phosphatgruppe blockiert, wodurch sie nicht durch die Polymerase verlängert wird. Am 5'-Ende der Probe befindet sich ein Fluorochrom, das Reporter-molekül (engl. *to report*; berichten) 6-Carboxyfluorescein (FAM) (Abbildung 2).

Abbildung 2: Prinzip des 5'-3'-Nuklease-Assays

TAQMAN® PROBE-BASED ASSAY CHEMISTRY

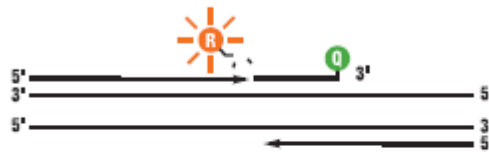
1. **Polymerization:** A fluorescent reporter (R) dye and a quencher (Q) are attached to the 5' and 3' ends of a TaqMan® probe, respectively.



2. **Strand displacement:** When the probe is intact, the reporter dye emission is quenched.



3. **Cleavage:** During each extension cycle, the DNA polymerase cleaves the reporter dye from the probe.



4. **Polymerization completed:** Once separated from the quencher, the reporter dye emits its characteristic fluorescence.



Das Prinzip des 5'-3'-Nuklease-Assays, basierend auf den Schritten der Polymerisation, der Anlagerung an den Strang und der Spaltung. In der Phase der Polymerisation lagern sich der fluoreszierende Reporter und der Quencher (to quench=dämpfen) an das 5' und das 3' Ende der TaqMan Probe an. Im zweiten Schritt, der Strangverschiebung kommt es zu einer Elongation des Stranges, wobei der Reporterfarbstoff der Probe abgeschnitten wird. Dabei wird in jedem Elongationszyklus durch die DNA Polymerase der Reporter von der Probe gelöst. Sobald der Reporter vom Quencher gelöst wurde, kann er seine charakteristische Fluoreszenz emittieren.

Die Emission des Reporterfarbstoffes wird durch das Phänomen des FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) beeinflusst. In Nähe zu dem Farbstoff befindet sich am 3'-Ende der Sonde ein Quencher (engl *to quench*; löschen). Wird der Fluoreszenzfarbstoff 1 angeregt, so emittiert er Energie in Form von Licht. Solange sich dieser aber nahe des Fluorochroms 2, dem Quencher (hier: *dark quencher dye*) befindet, wird die Energie direkt an diesen weitergegeben, der dann Licht in seiner eigenen Wellenlänge abstrahlt. Wird die Probe nun an ihr Target gebunden, so wird sie während der Elongation von der Taq-Polymerase geschnitten. Die Taq-Polymerase verfügt neben ihrer 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität über eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität, mit welcher sie den durch die Sonde gebildeten Doppelstrang erkennt und schneidet (Livak et al., 1995). Ungebundene Sonden,

welche einzelsträngig vorliegen, werden daher nicht geschnitten. Das Farbsignal des Sondenmoleküls wird nicht mehr gequenched und somit wird ein Lichtsignal freigesetzt, welches detektiert werden kann. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals verhält sich proportional zur Menge des Amplifikationsproduktes (Smith and Osborn, 2009).

Es wurden folgende Sonden von der Universal Probe Library (Roche, Penzberg, Deutschland) verwendet (**Tabelle 9**).

Tabelle 9: UPL Proben

UPL Probe	Sequenz
<i>HPRT1</i>	
#73	5'-FAM-GCTGAGGA
<i>KLK8</i>	
#37	5'-FAM-TGCCCTGG

Für die qPCR wurden folgende Proben für das Housekeeping Gen und die Kallikrein-ähnliche Peptidase 8 verwendet.

3.5.1 Primer Design

Um die Expression des Gens bestimmen zu können, müssen spezifische Primer hergestellt werden. Diese wurden mit der Universal Probe Library Assay Design Center Software (<http://lifescience.roche.com/shop/products/universal-probelibrary-system-assay-design>) designed. Wichtig ist dabei, dass die Primer ein großes Intron überspannen können (hier 700 Basenpaare), um die Amplifikation auf mRNA-Ebene zu gewährleisten. Weitere wichtige Eigenschaften, die der designte Primer aufweisen sollte, sind geringes Selbst- und Kreuzannealing, sowie eine optimale Schmelztemperatur. Eine Anzahl zwischen 18 und 24 Nukleotiden eignet sich hierfür ideal. (Thermo Fisher Scientific, 2016)

Es wurden folgende Primer von Metabion (Martinsried, Deutschland) verwendet (**Tabelle 10**).

Tabelle 10: Primer

Probe/Gen	Sequenz
<i>HPRT1</i>	
Forward	TGACCTTGATTTATTTTGCATACC
Reverse	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT
<i>KLK8</i>	
Forward	CAGCAAAGGGGCTGACAC
Reverse	GACCTCCCACAGGGGTCT

Die oben genannten Primer für das Housekeeping Gen und die Kellikrein-ähnliche Peptidase 8 wurden mit der Universal Probe Library Assay Design Center Software hergestellt. Besonders wichtig für die Funktion der Primer ist hierbei, dass die Primer ein großes Intron überspannen können. In diesem Fall überspannen die Primer 700 Basenpaare. Weiterhin wichtig ist ein geringes Selbst- und Kreuzannealing und eine optimale Schmelztemperatur.

3.5.2 qPCR der Patientenproben

Die Patientenproben wurden in Triplets untersucht. Pro *Well* wurden 3 µl cDNA mit einer Konzentration von 5 ng/µl eingesetzt, was einen Gehalt von 15 ng cDNA pro *Well* ergibt. Im Anschluss wurde der MasterMix nach dem folgendem Schema auf Eis hergestellt (**Tabelle 11**):

Tabelle 11: Komponenten des Mastermixes qPCR

	Konz. ^a	Input	Endkonzentration
Brilliant III Master-Mix (low ROX)	2x	10 µl	1x
Primer (forward)	20 µM	0,4 µl	400 Nm
Primer (reverse)	20 µM	0,4 µl	400 nM
UPL Probe	10 µM	0,4 µl	200 nM
Nuklease-freies Wasser		5,8 µl	
cDNA	5 ng/µl	3 µl	15 ng
Gesamtvolumen		20 µl	
^a Konzentration			

Die oben genannten Komponenten bilden die Bestandteile des Mastermixes, welcher für die Durchführung der qPCR verwendet wird. Der Brilliant III Master-Mix enthält eine mutierte Taq DNA Polymerase, Nukleotide, Magnesiumionen und einen Puffer. Zusätzlich werden die beiden Primer benötigt und die spezifische UPL Probe. Zudem Nuklease-freies Wasser, damit keine Nukleinsäuren während der Reaktion gespalten werden.

Im ersten Versuchsdurchlauf wurden zur Validierung des Systems genomische DNA (gNDA), zwei untranskribierte RNA-Proben (noRT) und RNase-freies Wasser (NTC) jeweils als Duplikate mitgeführt. Bei den noRT Proben handelte es sich ebenfalls um Patienten-Proben mit triple-negativem Brustkrebs, welche allerdings nicht in cDNA umgeschrieben wurden. Die Messung dieser Proben ergab keine messbaren CT-Werte, sodass diese als Negativ-Kontrollen mitgeführt wurden. Pro Versuchsreihe wurden 25 Patientenproben in einer 96-Well-Plate gemessen. Diese wurden mit Strip verschlossen. Auf jeder Platte wurde als Kalibrator die cDNA der Ovarialkarzinomzelllinie OVMZ6 als Triplikate, sowie zwei verschiedene noRT Proben (30 ng) und nuklease-freies Wasser (NTC) mitgeführt, um mögliche Verunreinigungen des Versuchs frühzeitig zu erkennen. Als interne Kontrolle und um die Robustheit des Systems aufzuzeigen, wurden auf jeder neuen Platte einige zuvor gemessene Proben der Vorplatte als wiederholte Triplikate mitgeführt. Die wiederholten Messungen zeigten einen Fehler <30%. Nach dem Pipettieren der Platte wurde diese für 3 min bei 1000g zentrifugiert, um Luftbläschen zu eliminieren, den Inhalt der Wells auf die gleiche Füllhöhe zu bringen und Substanztröpfchen am Innenrand des Wells zu vermeiden.

Folgendes Programm der MxPro Software Version 4.10 wurde verwendet (**Tabelle 12**):

Tabelle 12: qPCR-Programm

Segment	Zyklus- nummer	Schritt	Temperatur	Dauer
1	1	Aktivierung der Polymerase	95°	3 min
2	40	Denaturierung Elongation	95° 60°	15 s 1 min

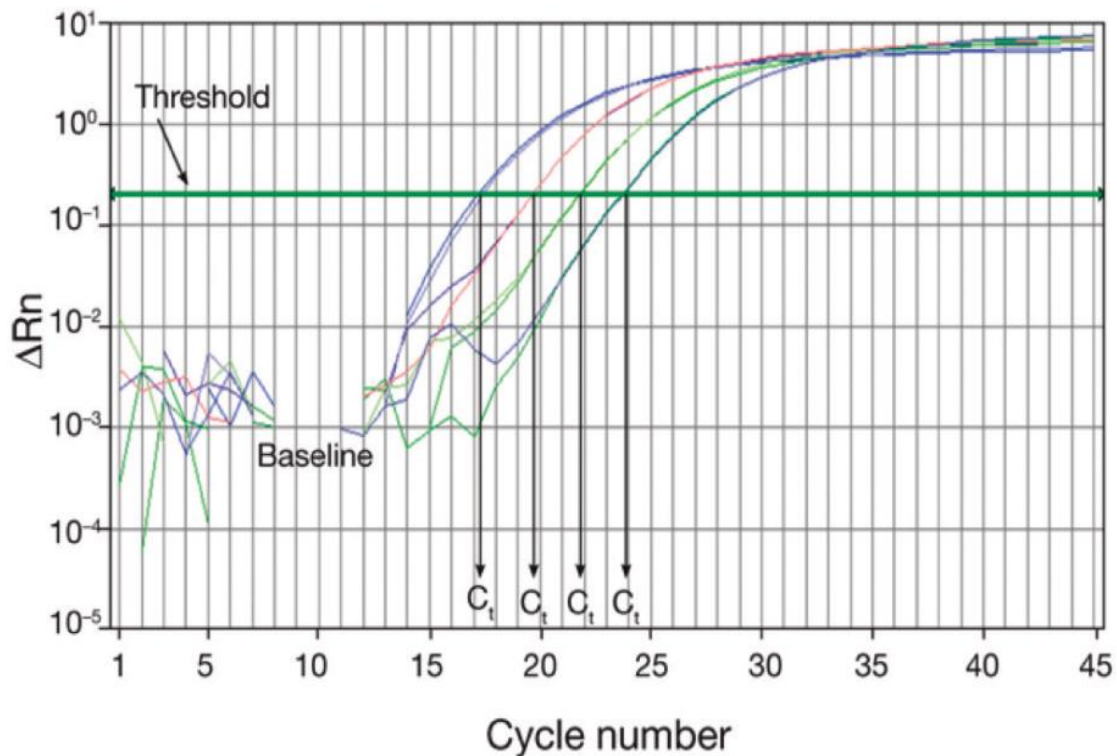
Die qPCR wurde mit der MxPro Software Version 4.10 durchgeführt. Die qPCR besteht dabei aus mehreren Phasen. Dabei wird bei 95°C die Polymerase über 3 min aktiviert. Danach kommt es zu einer Denaturierung bei 95°C über 15 s und zur Elongation bei einer Temperatur von 60°C über 1 min.

Nach jedem Zyklus wurde die Fluoreszenz der Proben detektiert und gemessen. Anhand festgelegter Kriterien wurden Proben aus der Studie exkludiert. Dies war der Fall, (1) wenn Triplikate intern eine Abweichung >30% (auch nach Wiederholung) zeigten, (2) wenn der C_t -Wert für *HPRT* >35 betrug, da in solchen Proben keine qualitative RNA bzw umgeschriebene cDNA vorhanden ist, (3) wenn die prozentuale Standardabweichung der ermittelten $\exp(-\Delta\Delta C_t)$ -Werte zweier valider Durchläufe 47,1% betrug. Dies gewährleistet, dass ausschließlich valide, replizierbare Patientenproben verwendet werden.

3.5.3 Auswertung der qPCR

Jede Amplifikationskurve erreicht eine Sättigungsphase im Laufe der Reaktion. Aus ihren unterschiedlichen Wachstumskurven kann man auf den Ursprungs-RNA-Gehalt des zu untersuchenden Zielgens in der Probe rückschließen. Je höher die Expression des zu untersuchenden Gens ist, desto steiler verläuft die Wachstumskurve und desto schneller überschreitet die Probe einen bestimmten Wert, den Threshold, und wird detektiert (**Abbildung 3**). Alle Analysen wurden mit der MxPro.Software version 4.10 durchgeführt.

Abbildung 3: Amplifikationskuvern einer qPCR



Die Abbildung zeigt die Amplifikationskurven einer qPCR. Diese besteht aus einer exponentiellen Phase durch die Verdopplung der Zielstruktur und einer anschließenden Sättigungsphase durch die Limitation der bestehenden Reaktionskomponenten, (Thermo Fisher Scientific, 2016)

Baseline

Unter der Baseline fasst man die frühen PCR-Zyklen, normalerweise Zyklus 3 - 15, zusammen, in welchen ein Fluoreszenzsignal eliminiert, aber die Nachweisgrenze nicht überschritten wird. In den ersten Zyklen ändern sich das Medium und die Reaktionsbedingungen, sodass es zu Hintergrundfluoreszenzen kommt. Die Baseline soll hoch genug gesetzt werden, um nicht in die späteren Berechnungen miteinzufließen, aber sollte keine Zyklen beinhalten, in welchen bereits Amplifikation stattfindet. Die Baseline wird durch eine automatische Analyse des Amplifikations-Plots von dem Programm festgelegt (Applied Biosystems).

Threshold

Der Threshold wird automatisch gesetzt und ist direkt abhängig von der zuvor gesetzten Baseline. Er beträgt ein zehnfaches der Standardabweichung des Baselinewertes und hilft dadurch, statistisch signifikante Fluoreszenzen von

Hintergrundsignalen zu unterscheiden (Smith and Osborn, 2009). Da sich der Threshold bei jedem neuen Ansatz, abhängig von der laufspezifischen Hintergrundsequenz ändern kann, muss man den Threshold manuell festlegen, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Der Wert lag für HPRT bei 0,75 und für KLK8 bei 0,17. Wiederholte Messungen von den gleichen Proben-Triplets ergaben reproduzierbare Ergebnisse und verifizierten den Einsatz dieses spezifischen Threshold-Wertes. (Thermo Fisher Scientific, 2016)

Threshold Cycle (C_t)

Der C_t gibt einen Wert an, bei welchem das Fluoreszenzsignal den Threshold „überschneidet“. Dieser Wert ist relativ abhängig von der Menge des eingesetzten Targets. Eine Probe mit einer doppelt so hohen Expression des untersuchten Gens wird den C_t-Wert bereits eine Runde früher erreichen. Er ist folglich proportional zur Menge der zu Beginn enthaltenen Moleküle und durch ihn kann auf die Expression des Gens auf mRNA- Ebene zurückgeschlossen werden (Thermo Fisher Scientific, 2016).

Referenzfarbstoff ROX

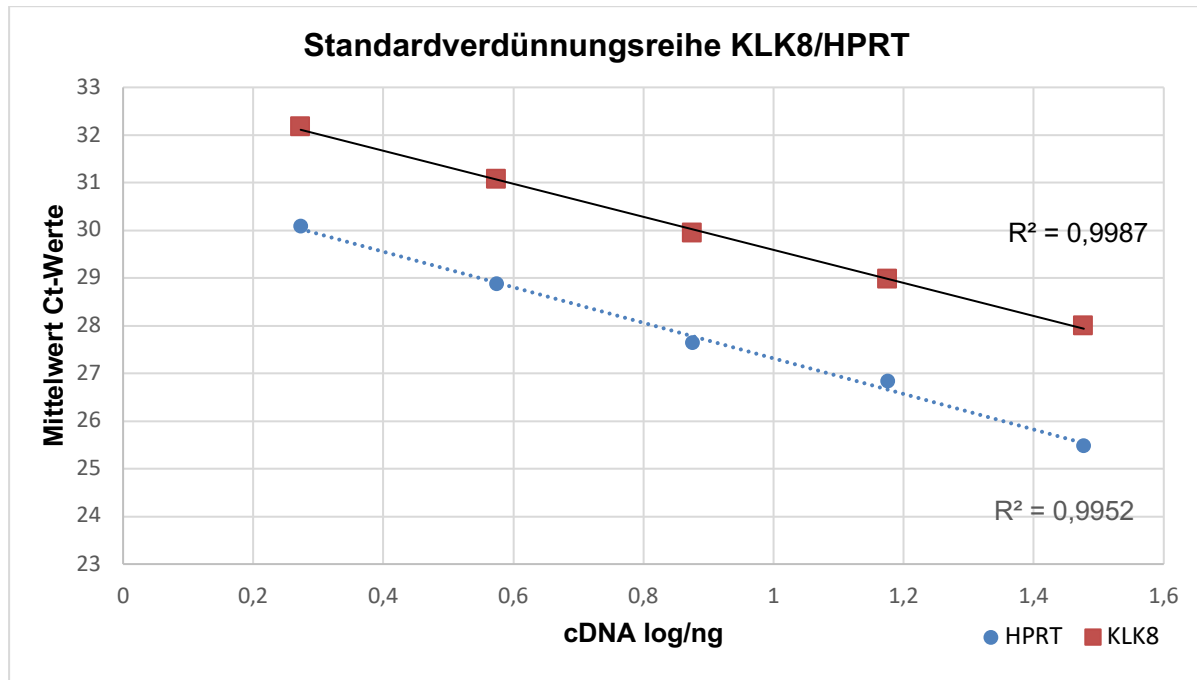
Um Schwankungen der Fluoreszenz, welche durch Änderungen des Volumens, der Konzentration oder der Messeigenschaften des Instrumentes bedingt sind, normalisieren zu können, wird ein Referenzfarbstoff, ROX (6-Carboxy-X-Rhodamin) mitgeführt. ROX selbst beeinflusst die qPCR-Reaktion nicht und sein Fluoreszenzsignal kann einfach von dem eingesetzten Reporter-Farbstoff unterschieden werden und normalisiert diesen. Zusammen mit der Baseline können so nicht nur allgemeine Hintergrundfluoreszenzen, sondern gemeinsam mit dem ROX-Wert, auch interne Schwankungen von Well-zu-Well normalisiert werden. (Thermo Fisher Scientific, 2016)

Effizienzanalysen

Mit Hilfe einer Standardkurve, welche aus einer Verdünnungsreihe der jeweiligen Zielstruktur besteht, lässt sich die Effizienz der qPCR bestimmen. Für KLK8 und das Housekeeping Gen *Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase* (HPRT) wurde der Versuch je zweimal mit fünf Verdünnungsstufen (DNA0-DNA4; 30-1,875 ng) durchgeführt. Trägt man die gemessenen C_t-Werte gegen die bekannten

Konzentrationen der Verdünnungen logarithmisch auf, ergibt sich eine lineare Gerade, mit dem Korrelationskoeffizienten R^2 . Idealerweise sollte dieser einen Wert zwischen 0,99 und 1 annehmen (Thermo Fisher Scientific, 2016) (**Abbildung 4**).

Abbildung 4: Standardverdünnungsreihe für KLK8 und HPRT



Die Abbildung zeigt die Standardverdünnungsreihe für KLK8 und HPRT. Als cDNA wurde DNA der OVMZ6-KLK8-Zellreihe verwendet. Der Versuch wurde je zweimal mit fünf Verdünnungsstufen (DNA0-DNA4) zwischen 30 und 1,875 ng durchgeführt. Im Anschluss wurden die gemessenen Ct-Werte gegen die bekannten Verdünnungskonzentrationen logarithmisch aufgetragen. Dadurch ergab sich eine lineare Gerade mit dem Korrelationskoeffizienten R^2 .

Der Korrelationskoeffizient war mit einem Wert von 0,9952 für HPRT und 0,9987 für KLK8 zufriedenstellend. Im Anschluss wurden zwei qPCR-Durchläufe mit den oben ausgewählten UPL-Proben für HPRT und KLK8 und einer Verdünnungsreihe von OVMZ6/KLK8- Zellen durchgeführt. Bei den OV-MZ-6- Zellen (V.Moebus, Frankfurt, Deutschland) handelt es sich humane Ovarialkrebszellen welche mit pRcRSV-Plasmiden transfiziert wurden. Die Plasmide kodierten die komplette Pre-Pro-Proteinformen von *KLK8*. Die Effizienz wurde mit folgender Formel berechnet (Thermo Fisher Scientific, 2016)

$$E = 10^{\left(\frac{-1}{slope}\right)} - 1$$

Der *Slope* betrug für *KLK8* -3,47, was im Effizienzbereich zwischen 90 und 100% liegt. Für *HPRT* war der *Slope*-Wert mit -3,73 nicht im optimalen Bereich. In unserer Arbeitsgruppe lagen bereits Voranalysen und ein effizienter OVMZ6/*KLK8* und OVMZ6/*HPRT* Essay vor, bei welchem die interne Variation < 30% und die Variation zwischen den Proben < 20% betragen. Folglich ist das System für eine qPCR mit klinischen Proben, kalibriert zu OVMZ6/*KLK8*, geeignet (Nancy Ahmed, 2017).

Berechnung der $\Delta\Delta C_t$ -Werte

Expressionslevel des zu analysierenden Gens über die $\Delta\Delta C_t$ -Methode zu berechnen bedeutet, dass gleichzeitig ein Kalibrator (hier: *OV-KLK8*) sowie ein Housekeeping-Gen (hier: *HPRT*) mitgeführt werden. Der C_t -Wert des untersuchten Gens (GOI) einerseits, sowie der C_t -Wert des Kalibrators werden mit dem internen Kontrollgen *HPRT* in Relation gesetzt (Thermo Fisher Scientific, 2016).

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ Probe}} - \Delta C_{t \text{ Kalibrator}}$$

wobei

$$\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ target}} - \Delta C_{t \text{ HPRT}}$$

$\Delta\Delta C_t$ wird dann in die Formel *fold difference* = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ eingesetzt. Erhöhte Konzentrationen der Proben haben durch gleichzeitig erhöhte Referenzgenkonzentrationen keinen Einfluss auf den erhaltenen Wert. Dieser ist demzufolge unabhängig von der Ausgangskonzentration der Probe.

3.6 Western Blot

Um die Spezifität der Antikörper, welche in der Immunhistochemie verwendet werden sollen, zu überprüfen wurden mit jedem Antikörper Western-Blots in verschiedenen Verdünnungen durchgeführt. Ziel dabei war, einen Antikörper zu finden, welcher nur eine Reaktion mit *KLK8* in Form einer Bandenbildung zeigt. Während eines Western Blots werden Proteine über eine SDS-Page anhand ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Ein Primäantikörper bindet an spezifische Bindungsstellen der Proteine. Ein enzymmarkierter Sekundäantikörper bindet den primären Antikörper und generiert mit einem Substrat ein Signal. Proteine, welche vom Antikörper erkannt werden, können dadurch sichtbar gemacht werden.

3.6.1 Sammelgel und Trenngel

Um die Proteine nach ihrer molekularen Größe aufteilen zu können, werden zwei verschiedene Gele benötigt: das Trenngel (pro Gel 5 ml) und das Sammelgel (pro Gel 2 ml). Diese wurden folgenderweise hergestellt (**Tabelle 13**):

Tabelle 13: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

Gel	Komponente	Menge ³
12%Trenngel	H ₂ O	4,27 ml
	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml
	40% Acr Bis ¹	3,13 ml
	10% SDS ⁵	0,1 ml
	10% APS ²	80 µl
	TEMED ⁴	8 µl
5%Sammelgel	H ₂ O	5,98 ml
	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	2,5 ml
	40% Acr Bis ¹	1,25 ml
	10% SDS ⁵	100 µl
	10% APS ²	60 µl
	TEMED	6 µl

¹ Acrylamid/Methylenbisacrylamid (29:1)

² Ammoniumpersulfat

³ Material für 2 Gele

⁴ N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

⁵ Natriumlaurylsulfat

Trenn- und Sammelgel für den Western Blot setzen sich aus den oben genannten Komponenten zusammen. Unterschied dabei ist die Konzentration und der pH-Wert des Trishydrochloridpuffers.

Die Bestandteile wurden in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen gemischt. 1000 µl wurden mit Hilfe einer Pipette abgenommen und mit 11 µl 10% APS und 1 µl TEMED vermischt und als Basis zwischen die beiden Glasplatten (Abstand 1 mm) gegossen. Durch den höheren Anteil des Radikalstarters APS und des Katalysators TEMED polymerisiert diese Schicht schneller aus und dichtet die Kammer sicher nach unten ab. Das Festwerden des Gels erfolgt nach dem Prinzip der radikalischen Polymerisation. Dabei entsteht durch Anlagerung von Monomeren ein großes Polymer. Die Startreaktion basiert dabei auf dem Zerfall eines Anions des Salzes

APS zu einem Radikal (Startreaktion). Dieses ist durch sein ungepaartes Elektron hoch reaktiv und bricht eine Doppelbindung des Acrylamids auf, welches nun seinerseits zum Radikal wird, an welche sich nun Monomere anlagern können (Wachstumsreaktion). Der Kettenabbruch ergibt sich dann durch das Zusammentreffen zweier Radikale und deren Verbindung zu einem Molekül. Die lineare Kette wird durch das Bisacrylamid zu einem Netz verknüpft. Das übrige Trenngel wird dann auf die auspolymerisierte Schicht gegossen. Das basische Trenngel (pH 8,8) besitzt durch den höheren Anteil an Polyacrylamiden (12%) kleinere Poren, was ein Aufteilen der Proteine anhand der Größe ermöglicht. Kleinere Proteine können das Gel weiter durchwandern als große. (Mahmood and Yang, 2012). Die Schicht aus Trenngel wird bis zum Auftragen des Sammelgels mit 5%-igen SDS abgedichtet, welches die Bildung einer gleichmäßigen, geraden Oberfläche ermöglicht. Das saure Sammelgel (pH 6,8) wird im Anschluss in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen gemischt und auf das Trenngel gegossen. Durch seinen geringeren Anteil an Polyacrylamiden (5%) besitzt es größere Poren. Diese dienen dazu, dass sich die eingesetzten Proteine zu einer Bande am Ende des Sammelgels formatieren und somit an gleicher Stelle in die Elektrophorese starten können. (Mahmood and Yang, 2012). Ein zehnzackiger Kamm wird in das noch flüssige Sammelgel eingebracht, um Taschen für die Proteine zu bilden. Nun polymerisiert das Gel innerhalb von 15 min aus.

3.6.2 Vorbereiten der Proteine

Es wurden 0,2 µg pro-KLKs (kloniert im Labor der Forschergruppe der Technischen Universität München, München, Deutschland) verwendet und nach kurzem Vortexen mit 8M Harnstoff auf 24 µl aufgefüllt

Zu jeder Protein-Probe wurden 8 µl Roti®-Load 1 gegeben. Dieser hält den pH der Probe in einem konstanten Bereich, schützt dabei empfindliche Proteinbindungen und vermeidet einen Abbau der Probe. Das enthaltene Glycerol (40%) erhöht die Dichte der Probe, sodass sie leichter an den Boden des *Wells* absinken kann und sich nicht mit dem Laufpuffer vermischt. Der Farbstoff Bromphenolblau (0,015%) ermöglicht es, die Probe beim Durchlaufen des Gels leichter verfolgen zu können (Carl Roth GmbH + Co. KG). Im Anschluss werden alle Proben in einem Heizblock

bei 95°C für 3 min erhitzt. Die Wärme, der Harnstoff und reduzierende sowie denaturierende Substanzen des Proteinauftragungspuffers (2-Mercaptoethanol (20%)) lösen die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen der Proteine (Mahmood and Yang, 2012). Im Anschluss wurden die Proben auf Eis gelagert und 10 sec lang bei 5000/min zentrifugiert. Zusätzlich wurde für beide Gele 4 µl Marker in 18 µl Harnstoff vorbereitet.

3.6.3 Elektrophorese

Um die Elektrophorese durchzuführen, wurden die Gelkammer in die mit Laufpuffer (**Tabelle 14**) befüllte Elektrophoreseapparatur eingebaut.

Tabelle 14: Zusammensetzung Laufpuffer

Komponente	Menge ^a
Glycin	144g
TRIZMA (Trisbase)	30g
SDS	10g
	ad 1l

^a10-fache Konzentration

Der Laufpuffer besteht aus den folgenden oben genannten Komponenten. Bei TRIZMA handelt es sich um einen Puffer. SDS sorgt für eine Entfaltung der zugegebenen Proteine und lagert sich mit seinem lipophilen Anteil in das Proteinmolekül ein. Zudem sorgt der Sulfatrest von SDS für eine negative Ladung des SDS-Protein-Komplexes und ermöglicht seine Wanderung durch das Gel hindurch zur positiv geladenen Anode.

Die Elektrophorese wurde bei 95 V gestartet und ca. 20 min laufen gelassen, bis die Bromphenolblau-Front zum Ende des Sammelgels gewandert ist. Bis zum Durchwandern des Markers zum Ende des Gels wurde auf 130 V hochgedreht. Am unteren Pol der Kammer befindet sich die positiv geladene Anode. Die negative Ladung der Proteine und dadurch die Eigenschaft, zur Anode zu wandern, ergibt sich durch den Zusatz von SDS bei der Probenvorbereitung. Dieses Detergenz (*detergere lat. reinigen*) entfaltet die Proteine und lagert sich mit seinem lipophilen Anteil in das Proteinmolekül ein. Der am hydrophilen Pol befindliche Sulfatrest sorgt für eine negative Ladung des SDS-Protein-Komplexes und ermöglicht seine Wanderung durch das Gel hindurch zur positiv geladenen Anode. Diese ist schlussfolgernd

unabhängig von der Ladung der Proben. Das Laufverhalten der Proben hängt von der Größe der Proteine ab. Kleinere Proteine durchwandern das Gel schneller als größere und kommen somit näher an der Anode zu liegen. Anhand des mitgeführten Markers lassen sich die Molekülmassen der Proben ablesen. Nach Ende der Elektrophorese werden die Glasplatten mit Hilfe von destilliertem Wasser getrennt und das Gel entnommen.

3.6.4 Semidry-Blot

Die Proteine werden durch Anlegen eines senkrecht zur ersten Laufrichtung orientierten elektrischen Feldes auf eine PVDF-Membran übertragen. Dafür werden drei *Blotting Paper*, getränkt in 20%-igen Alkohol, auf die unteren Kohlenstoffplatten der Blotkammer und drei weitere *Blotting Paper* getränkt in 5%-igen Ethanol auf die obere Fläche der Kammer angebracht. Dazwischen befinden sich Trenngel und Membran, welche davor in 100%-igen und 20%-igen Ethanol eingebracht wurde. Die hydrophobe Membran wird dadurch aktiviert und ist nun zugänglich für wässrige Lösungen. Durch Anlage eines elektrischen Feldes (80 mA, 8 W) werden die Proteine von dem Gel auf die Membran geblottet.

3.6.5 Antikörper

Im Anschluss an den Transfer wird ein primärer Antikörper verwendet, welcher an spezifische Proteinstrukturen bindet. Um den von diesem gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex sichtbar zu machen, wird im Anschluss ein zweiter Antikörper, gegen den ersten Antikörper gerichtet, verwendet.

Um Bindungen des Antikörpers an unspezifische, vom Protein unbesetzte Bindestellen zu minimieren und so die Spezifität des Blots zu erhöhen, wird die Membran blockiert. Dazu wurden je 30ml TBS (Trisgepufferte Salzlösung) (**Tabelle 15**) und 3% BSA verwendet.

Tabelle 15: Zusammensetzung TBS

Komponenten	Menge ^a
10mM Tris-Cl	6,06
NaCl	43,8
	ad 500ml (pH 7,5)

^a 10-fach-Stock-Lösung

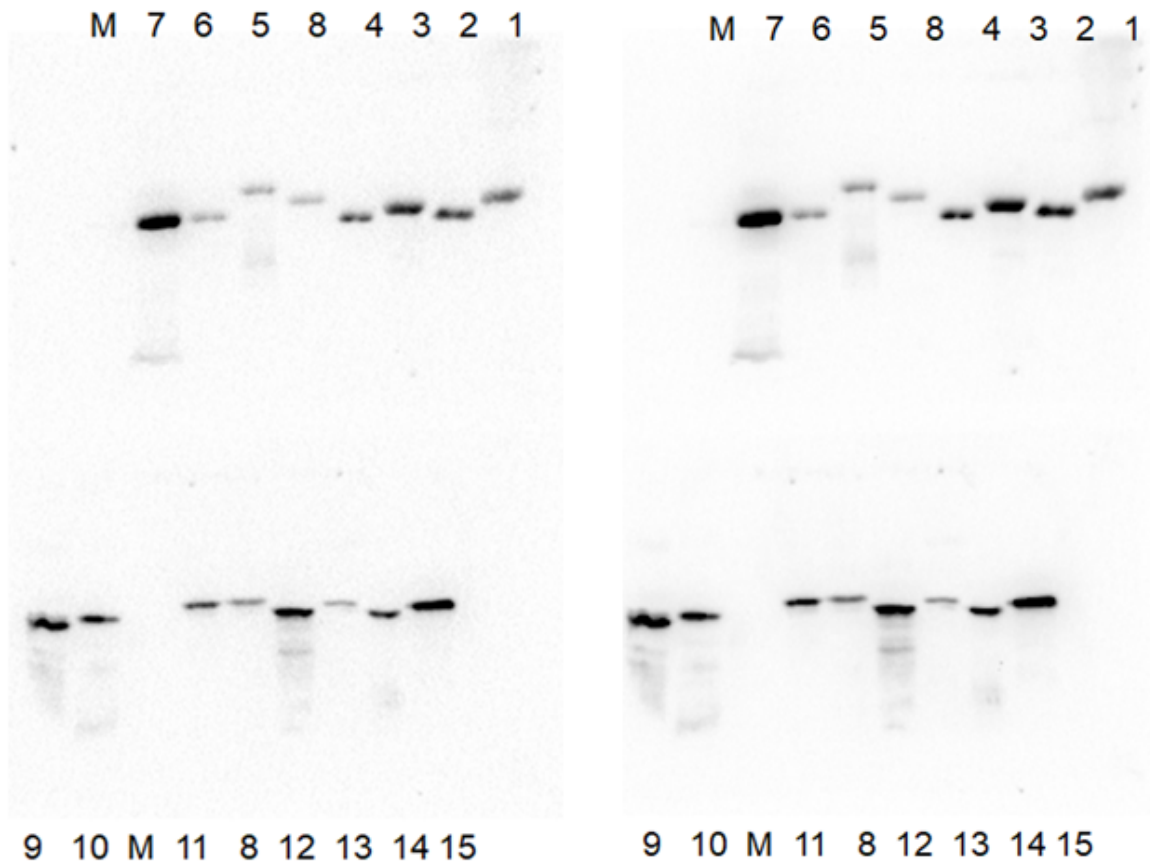
Die Zusammensetzung der trisgepufferten Salzlösung besteht aus Trishydrochlorid und Kochsalz. Diese wird genutzt, um die Membran zu blocken und dadurch die Bindung des Antikörpers an unspezifische, vom Protein unbesetzte Bindestellen zu minimieren und so die Spezifität des Blots zu erhöhen.

Die Membranen wurden 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler blockiert.

Als primärer Antikörper wurde der monoklonale Mausantikörper ausgewählt. Der Vorteil eines monoklonalen im Vergleich zu einem polyklonalen Antikörper besteht darin, dass dieser durch seine Eigenschaft, nur gegen ein einziges Epitop gerichtet zu sein, eine höhere Spezifität aufweist. Der Primärantikörper wurde 1:500 in TBS und 3% BSA verdünnt und über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran drei Mal mit je 20 ml TBS für jeweils 10 min gewaschen. Dies entfernt die ungebundenen Antikörper und vermindert dadurch Hintergrundeffloreszenzen (GE Healthcare Life Sciences). Zu dem Wasch-TBS wurden 0,05% Tween zugegeben. Dieses verbessert die Entfernung von ungebundenen Antikörpern und Molekülen von der Membran (Corning Life Sciences). Der sekundäre Antikörper wurde 1:10000 in TBS und 3% BSA verdünnt und für eine Dauer von 40 sec inkubiert. Im Anschluss wurde vier Mal für jeweils 5 min die Membran mit TBS und 1% Milchpulver gewaschen.

Um zu gewährleisten, dass alle Proben auf der Membran aufgetragen wurden, wurde als Kontrolle ein Primärantikörper, Verdünnung 1:2000 gegen den His-Tag der Proteine eingesetzt (**Abbildung 5**).

Abbildung 5: KLK 1-15- Proteine mit dem Penta-His-Antibody (1:2000)

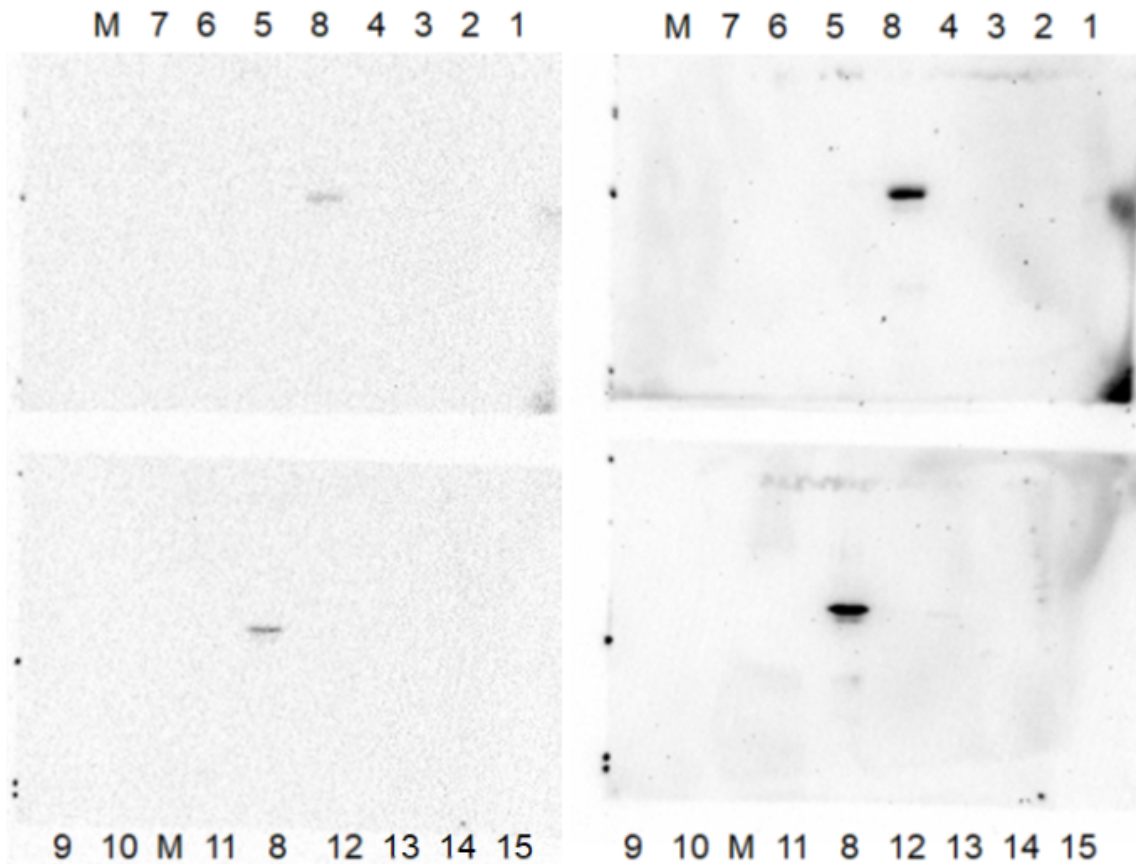


Die dargestellten Westernblots zeigen die Proteine, welche mit dem Penta-His-Antibody in einer Verdünnung von 1:2000 aufgetragen wurden. Der Antikörper detektiert alle auf den Westernblot aufgetragenen Proteine und dient damit dem Nachweis, dass die Proteine an die Membran gebunden haben. Die Markierung M steht hierbei für den Marker. Die beiden linken Aufnahmen wurden dabei nach 10 sec, die rechten Aufnahmen nach 80 sec angefertigt.

3.6.6 Chemilumineszenz

Der Sekundärantikörper ist mit der Meerrettich-Peroxidase (HRP) markiert. Bei der Zugabe von ECL, welches Luminol enthält, wird dieses durch HRP oxidiert und führt zur Lichtemission. (Hering and Schönfelder, 2012) (**Abbildung 6**). Diese wird durch eine CCD-Kamera gemessen.

Abbildung 6: Westernblot mit MAB1719



Es wurde ein Westernblot mit dem Antikörper MAB1719, welcher gegen humanes KLK8 gerichtet ist, durchgeführt. Die linke Aufnahme wurde nach 10 s durchgeführt, die rechte Aufnahme nach 295,3 s. Der Antikörper bindet an das KLK8 Protein. Die Bandenbildung bei einem Molekulargewicht von 33 kDA spricht für eine spezifische Bindung des Antikörpers. Der Antikörper bindet an keine andere der weiteren Kallikrein-ähnlichen Peptidasen, sichtbar durch keine weitere Bandenbildung und erzeugt somit keine Kreuzreaktionen.

3.7 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine bewährte Methode, um das Vorhandensein von Proteinen in Gewebe festzustellen und deren Lokalisation in der Zelle zu bestimmen. Der Nachweis gelingt durch die Bindung von Antikörpern an spezifische Regionen der Proteine. Diese Antigen-Antikörper-Reaktion ist an ein Detektionssystem gekoppelt, welches das Vorhandensein des Proteins in der Probe sichtbar macht.

3.7.1 Färbung der Schnitte mit der Polymer-One-Step-Methode

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse der qPCR wurden jeweils 10 Patientenproben mit hoher KLK8 mRNA Expression sowie 10 Patientenproben mit niedriger KLK8 mRNA Expression aus beiden Patientenkollektiven ausgewählt. Die Präparate wurden nach der Tumorexzision im OP im Institut für Pathologie der Technischen Universität München in Paraffin eingebettet. Mithilfe eines Mikrotoms wurden 3 µm dicke Scheiben von den Paraffinblöcken geschnitten und auf einen Objektträger überführt. Um das Paraffin von den Schnitten zu entfernen, wurden sie bei 60°C für 30 min in den Brutschrank und anschließend für 2x 10 min in ein Xylolbad gestellt. Die Rehydrierung erfolgte über eine absteigende Alkoholreihe (2x 100% Isopropanol, 1x 96% Ethanol, 1x 70% Ethanol). Im Anschluss wurden diese zweimal für je 5 min mit intermittierenden Pufferwechsel nach 2,5 min mit Trispuffer gewaschen (**Tabelle 16**).

Tabelle 16: Zusammensetzung Trispuffer

Komponenten	Menge ^a
TRIZMA Base	60,5 g
NaCl	90 g
Aqua dest.	700 ml
	ad 1000ml (pH 7,6) ^b

^aergibt 1000 ml Stocklösung, Gebrauchslösung auf 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnen

^b pH mit 2N HCl (Salzsäure) einstellen

Der Trisspuffer besteht aus der TRIZMA Base, Natriumchlorid und destilliertem Wasser. Das zweimalige Waschen mit Trispuffer für jeweils fünf Minuten stellt einen wichtigen Teil der immunhistochemischen Färbung dar.

Um endogene Enzymaktivitäten der im Gewebe enthaltenen Peroxidasen zu unterbinden und somit eine unspezifische Färbereaktion zu vermeiden, wurden die Schnitte mit 3% H₂O₂ bei Raumtemperatur für 20 min blockiert. Um eine unspezifische Hintergrundfärbung, welche durch eine Anlagerung des Primärantikörpers an stark geladene Kollagenelemente des Präparates entsteht, zu vermindern, wurden die Schnitte mit 120 µl 5% Schweineserum, verdünnt mit TBS, blockiert. Das Serum lagert sich an die elektrisch geladenen Stellen an. Danach erfolgte ein zweiminütiger Waschschrift mit Leitungswasser, gefolgt von 5 min

Waschen mit Trispuffer. Um die Proteine zu demaskieren und ihre Epitope freizulegen, um die Bindung des primären Antikörpers zu erleichtern, wurden die Schnitte für 4 min in Citratpuffer gekocht (**Tabelle 17**).

Tabelle 17: Zusammensetzung Citratpuffer

Komponenten	Menge ^a
Citric acid monohydrate	2,1 g
Aqua dest.	800 ml
	ad 1000ml (pH 6,0) ^b

^aergibt gebrauchsfertige Lösung

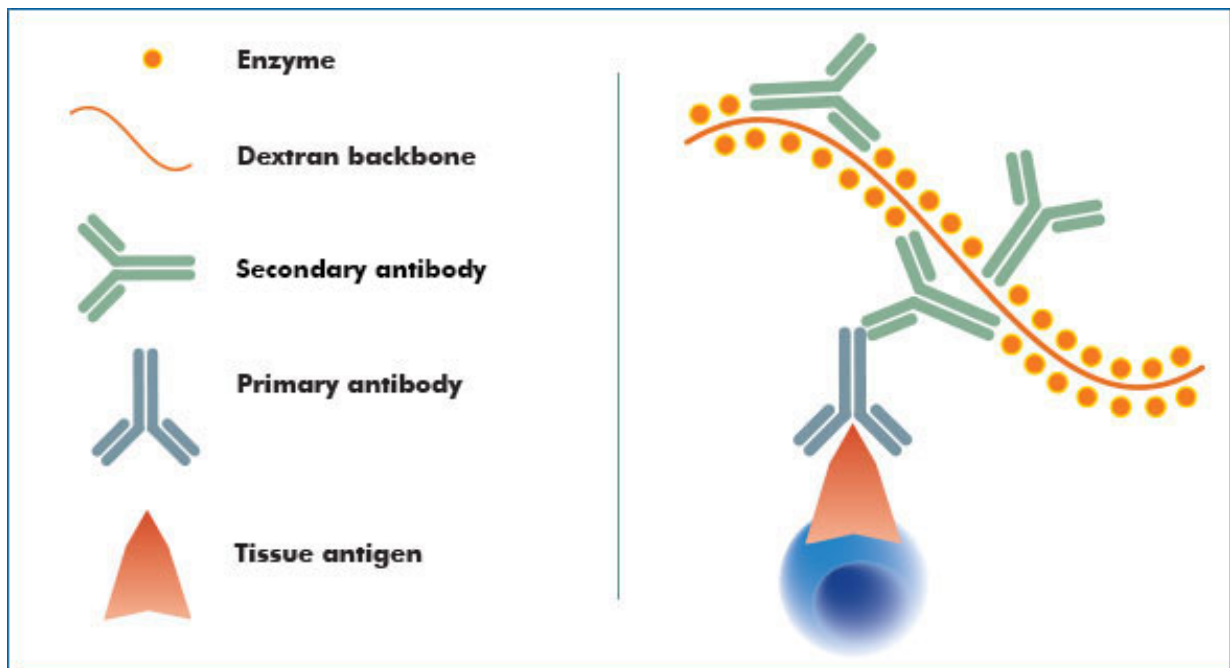
^b pH mit NaOH (Natronlauge) einstellen

Der Citratpuffer setzt sich aus Zitronensäure und destilliertem Wasser zusammen. Dieser dient dazu, Proteine zu demaskieren und die Bindung des primären Antikörpers zu erleichtern. Die Schnitte wurden für 4 min in Citratpuffer gekocht.

Der Topf wurde 5 min unter laufendem Leitungswasser gekühlt und die Proben anschließend unter intermittierenden Pufferwechsel für 5 min in Trispuffer gewaschen. Pro Schnitt wurden 120 µl der verdünnten Primärantikörperlösung (Verdünnung 1:250 mit Antibody diluent) verwendet. Die Inkubation erfolgte in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur für 2h.

Vor der Inkubation mit 120 µl ZytoChem Plus HRP One-Step Polymer anti-Mouse/Rabbit/Rat erfolgte erneut ein fünfminütiger Waschschritt mit Trispuffer unter Pufferwechsel. Das Polymersystem besteht aus einer Kette von Aminosäuren, an welche sowohl Sekundärantikörper als auch mehrere Enzymmoleküle Meerrettich-Peroxidase (HRP) kovalent gebunden sind. Die im aktiven Zentrum enthaltene Hämgruppe (Hämatin) bildet mit Wasserstoffperoxid einen Komplex. Dieser zerfällt unter Abspaltung von Sauerstoff und Wasser (**Abbildung 7**).

Abbildung 7: Prinzip der Polymer-One-Step-Methode



Das Prinzip der Polymer-One-Step-Methode basiert auf mehreren Teilschritten. Zunächst bindet der Primärantikörper an das Antigen. Im Anschluss wird dann der Primärantikörper durch den Sekundärantikörper gebunden und detektiert. (Quelle: Novus Biologicals)

Diese chemische Reaktion führt dazu, dass das nach einem erneuten Tris-Waschschritt zugegebene DAB (3,3'-Diaminobenzidine) eine dunkelbraune Färbereaktion hervorruft. Die Inkubationszeit betrug hierbei 8 min bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden anschließend mit Trispuffer gewaschen, mit Hämatoxylin für 5 min gegengefärbt, unter fließendem Leitungswasser gebläut und in destilliertes Wasser überführt. Durch eine abschließende aufsteigende Alkoholreihe (1x 70% Ethanol, 1x 96% Ethanol, 2x 100% Isopropanol, 2x Xylol) für je 3 min wurden die Schnitte wieder rehydriert. Die Präparate wurden mit Pertex und Deckgläschen eingedeckt (das detaillierte Protokoll befindet sich im Anhang)

3.7.2 Auswertung

Die Schnitte wurden mit dem Hamamatsu Photonics NPD scanner (Hamamatsu, Japan) eingescannt und von einer Pathologin des Instituts für Pathologie der Technischen Universität München mit folgendem semiquantitativen Bewertungssystem bewertet (**Tabelle 18**)

Tabelle 18: Immunreaktiver Score (IRS)

Färbeintensität		Positive Zellen		IRS	
0	Keine Reaktion	0	Keine	0-2	Negativ
1	Schwache Reaktion	1	Weniger als 10%	3-4	Schwach positiv
2	Mäßige Reaktion	2	Zwischen 10 und 50%	6-8	Mäßig positiv
3	Starke Reaktion	3	Zwischen 51 und 80%	9-12	Stark positiv
		4	Mehr als 80%		

Zur Bewertung der immunhistochemischen Färbungen wurde der immunreaktive Score verwendet. Dabei wurde die Farbintensität im Sinne der Stärke der Reaktion von 0-3 und die Anzahl der positiven Zellen von 0-4 bewertet und darauf der immunreaktive Score gebildet.

Der Scoring-Wert ergibt sich durch Multiplikation der Anzahl der positiv gefärbten Zellen (*engl. PP = percentage points*) und deren Färbeintensität (*engl. IS = staining intensity*). Die Schnitte wurden mit dem Hamamatsu Nanozoomer XT *virtual microscope* bei 40-facher Vergrößerung gescannt und mit der NDP scan software (Version 2.2.60) bearbeitet.

3.8 Statistische Analysen

Für alle durchgeführten Analysen wurde die SPSS Software (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA, Version 22.0) verwendet. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

Um Assoziationen zwischen etablierten klinischen Parametern für Brustkrebs, wie Alter, Lymphknotenstatus, Grading und Tumorgröße mit der gemessenen KLK8 mRNA Expression beurteilen zu können, wurde der Chi-Square-Test verwendet. Für die Analysen von Überleben (OS) und krankheitsfreier Zeit (DFS) wurde ein Zeitintervall von 180 Monaten festgelegt. Als DFS wurde dabei der Zeitraum zwischen Datum der Operation und Auftreten eines Rezidivs oder Entwicklung einer Metastase definiert. Zeitintervalle für DFS unter drei Monate wurden ausgeschlossen. Das Zeitintervall zwischen Operationsdatum und Versterben des Patienten wird als OS bezeichnet. Patienten mit einem OS unter einem Monat wurden nicht in die Überlebensanalysen aufgenommen. Kaplan-Meier-Analysen (Kaplan und Meier, 1958) wurden verwendet, um die Überlebensanalysen darzustellen. Die Assoziation

zwischen klinischen Parametern, biologischen Tumoreigenschaften und dem Überleben der Patienten wurde über die uni- und multivariate Cox-Regression berechnet und mit Hilfe des 95% Konfidenzintervalles (CI) und der Hazard Ratio (HR) bestimmt. Die eingesetzten klinischen Variablen wurden als binäre Variablen kodiert (Alter < / > 60 Jahre, Lymphnotenstatus positiv/ negativ, Tumorgröße < / > 20 mm).

Vergleiche der KLK8 mRNA Expression zwischen den beiden unterschiedlichen Brustkrebsarten (HR+-Mammakarzinom vs. TNBC) wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Die Korrelation zwischen der KLK8 mRNA Expression und der Expression von humaner Kallikrein-ähnlicher Peptidase 8 auf Proteinebene wurde mit dem Spearman-Test berechnet.

4. Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die klinische Bedeutung der humanen Kallikrein-ähnlichen Peptidase 8 (*KLK8*) auf krankheitsfreies Überleben (DFS) und Gesamtüberleben (OS) von Mammakarzinompatientinnen untersucht. Dafür wurde der *KLK8*-Gehalt auf mRNA-Ebene (mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion, qPCR) und auf Proteinebene (mittels Immunhistochemie, IHC) im Tumorgewebe analysiert. In die Studie wurden ein Kollektiv von Patientinnen mit triple-negativem Mammakarzinom (TNBC) sowie ein Kollektiv mit hormonrezeptorpositiven, Her2/neu negativem Mammakarzinom (HR+) eingeschlossen.

4.1 Patientenkohorten

In Tabelle 19 und 20 sind die klinischen und histomorphologischen Parameter des TNBC-Kollektivs sowie des HR+-Mammakarzinom-Kollektivs zusammengefasst (**Tabelle 19, Tabelle 20**).

Tabelle 19: Zusammenfassung klinischer und histomorphologischer Parameter des TNBC – Kollektives (n = 127)

Patientenkohorte für TNBC					
Anzahl		127			
Medianes Alter		55 (30 – 96)			
Mediane Beobachtungszeit für das Überleben der Patienten		79 (4 – 286)			
	n	%		n	%
Tumorgröße			Tumorstadium		
< 20 mm	33	26	1	35	27,6
> 20 mm	93	73,2	2	76	59,8
Keine Daten	1	0,8	3	7	5,5
			4	9	7,1
Lymphknotenstatus			Grading		
Negativ	72	56,7	G1 + G2	21	16,5
Positiv	55	43,3	G3	106	83,5
Menopause			Rezidiv/Metastase		
Prämenopausal	42	33,1	Nein	83	65,4
Perimenopausal	3	2,4	Ja	43	33,9
Postmenopausal	82	64,6	Fehlend	1	0,8
Verstorben					
Nein	75	59,1			
Ja	51	40,2			

Insgesamt bestand das TNBC-Kollektiv aus 127 Patientinnen. Das mediane Alter beträgt 55 Jahre, die mediane Beobachtungszeit beträgt 79 Monate. Die Patientinnen wurden mit verschiedenen klinischen und histomorphologischen Parametern korreliert. Die Fokusse wurden dabei auf die Tumorgröße, das Tumorstadium, der Lymphknotenstatus, das Grading, das Klimakterium, dem Auftreten eines Rezidives oder einer Metastase und das Versterben gelegt.

Tabelle 20: Zusammenfassung klinischer und histomorphologischer Parameter des HR+-Mammakarzinom- Kollektives (n = 144)

Patientenkohorte für HR+					
Anzahl	144				
Medianes Alter	64 (25 – 89)				
Mediane Beobachtungszeit für das Überleben der Patienten	57 (2 - 128)				
	n	%		n	%
Tumorgröße			Tumorstadium		
< 20 mm	79	54,9	1	81	56,3
> 20 mm	64	44,4	2	57	39,6
Keine Daten	1	0,7	3	2	1,4
			4	4	2,8
Lymphnotenstatus			Grading		
Negativ	83	57,6	G1 + G2	99	68,8
Positiv	60	41,7	G3	45	31,1
Keine Daten	1	0,7			
Menopause			Rezidiv/Metastase		
Prämenopausal	35	24,3	Nein	115	65,4
Perimenopausal	1	0,7	Ja	28	19,4
Postmenopausal	107	73,6	Keine Daten	1	0,7
Keine Daten	1	0,7			
Verstorben					
Nein	137	95,1			
Ja	6	4,2			
Keine Daten	1	0,7			

Insgesamt bestand das HR+-Kollektiv aus 144 Patientinnen. Das mediane Alter beträgt 64 Jahre, die mediane Beobachtungszeit beträgt 57 Monate. Die Patientinnen wurden mit verschiedenen klinischen und histomorphologischen Parametern korreliert. Die Fokusse wurden dabei auf die Tumorgröße, das Tumorstadium, den Lymphknotenstatus, das Grading, das Klimakterium, das Auftreten eines Rezidives oder einer Metastase und das Versterben gelegt.

4.2 KLK8 mRNA Expression in Tumorgewebe von TNBC und HR+-Mammakarzinom-Patientinnen

Die KLK8 mRNA Expression wurde in den beiden vorliegenden Patientenkohorten mit Hilfe der qPCR über den $2 \exp^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert bestimmt. Die Expressionslevel werden in der Tabelle 21 und den Abbildungen 8 und 9 dargestellt.

Im TNBC-Kollektiv variiert die KLK8 mRNA Expression von 0 bis 19,34 (Median: 0,2, Mittelwert: 1,35, Standardabweichung: 3,24) (**Tabelle 28, Abbildung 8, Abbildung 9**).

In der Kohorte der hormonrezeptorpositiven Patienten beträgt die Spannweite der KLK8 mRNA Expression zwischen 0 und 66,92 (Median: 0,03, Mittelwert: 0,65, Standardabweichung: 6,0). Bei der Patientin mit der zweithöchsten KLK8 mRNA Expression wurde ein Wert von 2,35 gemessen. Damit zeigten die meisten hormonrezeptorpositiven Gewebe eine niedrige KLK8 mRNA Expression. Um die Ursache der ungewöhnlich hohen KLK8 mRNA Expression des einen Tumors zu untersuchen, wurden erneut die Expression der Rezeptoren für Östrogen und Progesteron sowie Her2/neu bestimmt. Der positive Rezeptorstatus für Östrogen und Progesteron als auch die negative Expression von Her2/neu haben sich bestätigt. Folglich konnte keine Ursache für den singulären Ausreißer gefunden werden.

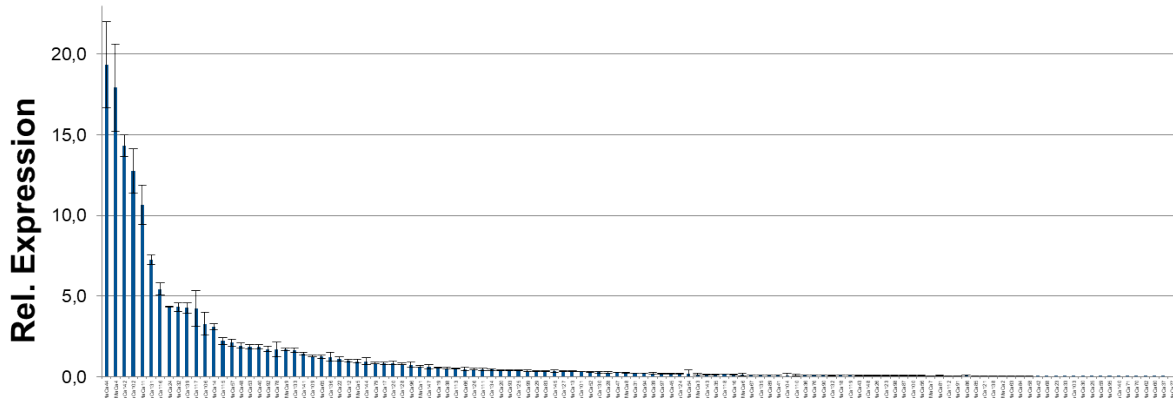
Tabelle 21: KLK8 mRNA Expression in TNBC und HR+-Mammakarzinom Tumorgewebe

	TNBC	HR+
Anzahl	115	124
Mittelwert	1,35	0,65
Standardabweichung	3,24	6,00
Minimum	0	0
Maximum	19,34	66,92
25. Perzentile	0,07	0,01
Median	0,21	0,03
75. Perzentile	0,99	0,087

Die KLK8 mRNA Expression im triple-negativen Brustkrebsgewebe betrug 1,35, mit einer Spannweite von 0 bis 19,34. Das Minimum bestand in einer fehlenden Expression von KLK8-mRNA, im Gewebe mit der maximalen Expression ergab sich ein Wert von 19,34. Im hormonrezeptorpositiven Brustkrebs

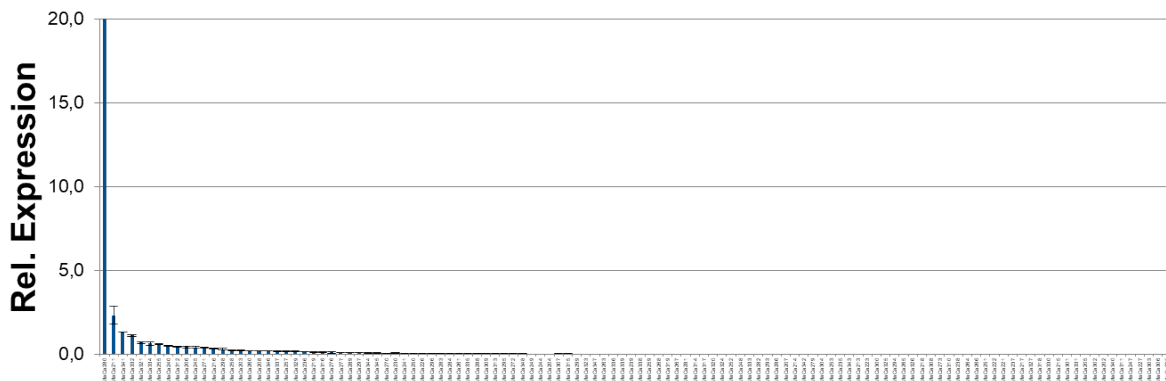
betrug der Mittelwert der KLK8 mRNA Expression 0,65, deutlich unter dem Mittelwert des triple-negativen Brustkrebses. Die Spannweite lag zwischen 0 und 66,92.

Abbildung 8: KLK8 mRNA Expression im Tumorgewebe der TNBC-Patientinnen



Dargestellt ist die KLK8 mRNA Expression im Tumorgewebe der TNBC-Patientinnen. KLK8 und HPRT wurden dabei mit dem Kalibrator OV-MZ-6 normalisiert.

Abbildung 9: KLK8 mRNA Expression im Tumorgewebe der HR+-Mammakarzinom-Patientinnen



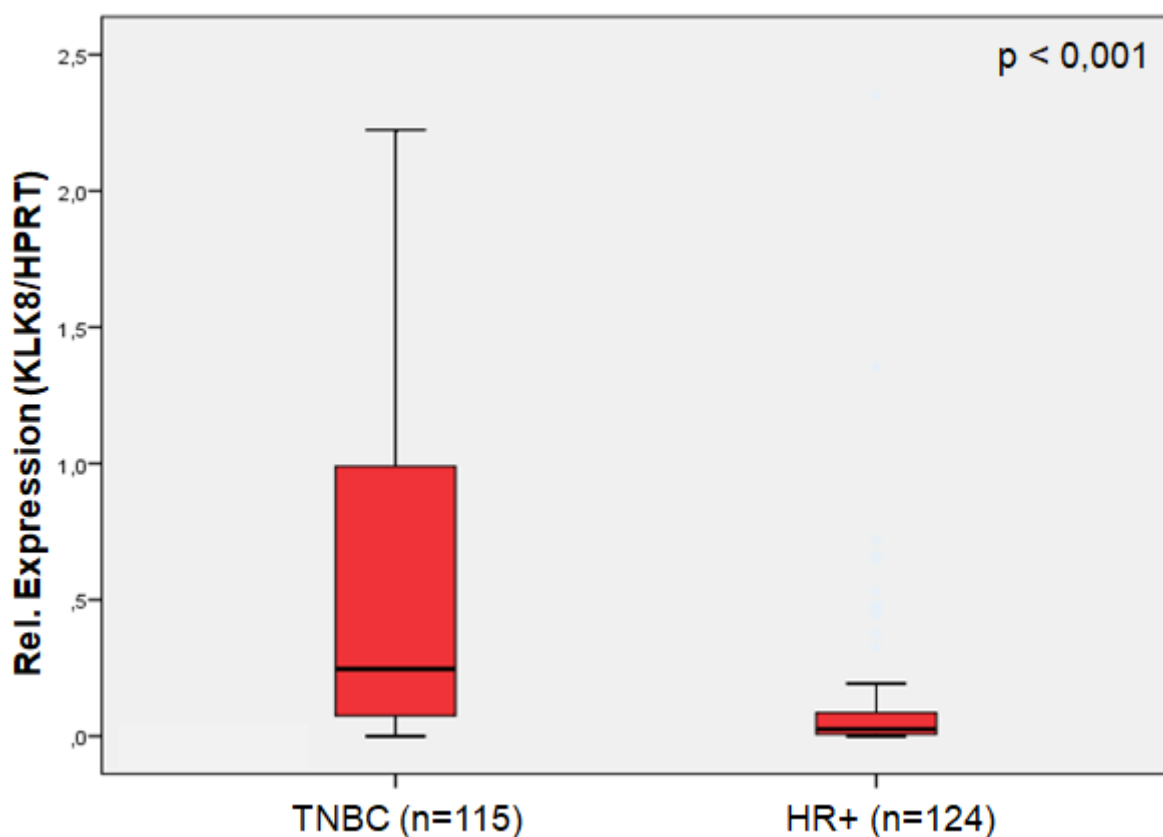
Dargestellt ist die KLK8 mRNA Expression im Tumorgewebe der HR+-Patientinnen. KLK8 und HPRT wurden dabei mit dem Kalibrator OV-MZ-6 normalisiert.

4.3 Vergleich der KLK8 mRNA Expression in verschiedenen Brustkrebsentitäten

Um die KLK8 mRNA Expression der beiden voneinander unabhängigen Patientenkohorten zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Das

Verhältnis der Expression wurde durch einen Boxplot visualisiert (**Abbildung 10**). Wie schon im Histogramm erkenntlich, ist die KLK8 mRNA Expression im Kollektiv der TNBC-Patienten höher. Patientinnen mit triple-negativem Brustkrebs zeigen eine signifikant höhere KLK8 mRNA Expression als Patientinnen mit hormonrezeptorpositivem Brustkrebs ($p < 0,001$).

Abbildung 10: Darstellung der KLK8 mRNA Expression im TNBC und HR+-Mammakarzinom Kollektiv



Im Histogramm werden die KLK8 mRNA Expressionen der beiden Kollektive aufgetragen. In der Gruppe der triple-negativen Brustkrebspatientinnen ist die relative Expression deutlich höher als in der Gruppe der hormonrezeptorpositiven Brustkrebspatientinnen.

4.4 Assoziationen zwischen klinischen und histomorphologischen Eigenschaften von Patienten mit TNBC und HR+-Mammakarzinom

Über einen Chi-Square-Test kann auf Assoziationen zwischen der KLK8 mRNA Expression und etablierten klinischen Parametern für Brustkrebs geschlossen

werden. Als Cutoff für KLK8 wurde der Median festgelegt. Untersuchte Parameter waren das Alter der Patientinnen, ihr Lymphknotenstatus, die Tumorgöße und das Grading (**Tabelle 22**).

Die KLK8 mRNA Level unterscheiden sich in beiden Gruppen nicht signifikant in Bezug auf die untersuchten klinischen Parameter. Schlussfolgernd besteht keine Assoziation zwischen der KLK8 mRNA Expression und klinischen Parametern.

Tabelle 22: Assoziationen zwischen der KLK8 Expression und klinischen und histomorphologischen Eigenschaften von Patientinnen mit TNBC und HR+-Mammakarzinomen

Klinische Parameter	No.	TNBC	No.	HR+ BC
		<i>KLK8</i> ^a niedrig/ hoch		<i>KLK8</i> ^a niedrig/ hoch
Alter		<i>P</i> = 0,920		<i>P</i> = 0,154
≤ 60 Jahre	62	31/31	53	23/30
≥ 60 Jahre	53	27/26	71	40/31
Lymphknotenstatus		<i>P</i> = 0,772		<i>P</i> = 0,875
Negativ	63	31/32	70	36/34
Positiv	52	27/25	54	27/27
Tumorgöße		<i>P</i> = 0,923		<i>P</i> = 0,467
≤ 20 mm	31	16/15	65	31/34
≥ 20 mm	83	42/41	59	32/27
Grading		<i>P</i> = 0,347		<i>P</i> = 0,165
G1+G2	20	12/8	82	38/44
G3	95	46/49	42	25/17

^a Chi-Square-Test (Cutoff = Median)

Dargestellt sind die Assoziationen der KLK8 Expression mit den klinischen und histomorphologischen Eigenschaften der triple-negativen sowie der hormonrezeptorpositiven Kohorte. Bei den klinischen Parametern wurden die Fokusse auf das Alter (</> 60 Jahre), den Lymphknotenstatus (negativ/positiv), die Tumorgöße (≤/≥ 20mm) und das Grading (G1+G2/G3) gelegt. Sowohl in der triple-negativen als auch in der hormonrezeptorpositiven Gruppe wurden keine Assoziationen zwischen der KLK8 Expression und den klinischen Parametern beobachtet.

4.5 Assoziation von KLK8 mRNA Expression mit krankheitsfreiem Überleben (DFS) und Gesamtüberleben (OS) in TNBC-Patientinnen: Univariate Cox-Regressionsanalyse

Um die Auswirkungen verschiedener etablierter klinischer Parameter auf das krankheitsfreie und Gesamtüberleben bewerten zu können, wurde die univariate Cox-Regressionsanalyse über einen maximalen Beobachtungszeitraum von 180 Monaten (15 Jahre) durchgeführt. Untersuchte klinische Parameter waren das Patientenalter (\leq/\geq 60 Jahre), der Lymphknotenstatus (negativ/positiv), die Größe des Tumors (\leq/\geq 20 mm) und das Grading (G1 + G2 vs. G3). Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 zusammengefasst. Als Cutoff wurde der Median der KLK8 mRNA Expression festgelegt.

Für das OS stellt nur das Patientenalter einen signifikanten Parameter dar. Ältere Patientinnen haben ein signifikant verringertes Gesamtüberleben als jüngere Patientinnen ($P < 0,001$, HR = 2,96, 95% CI = 1,63-5,36). Der Lymphknotenstatus zeigt einen Trend in Richtung Signifikanz ($P = 0,055$, HR = 1,74, 95% CI = 0,99-3,07). Die restlichen klinischen Parameter, wie die Tumorgöße und das Grading sowie die KLK8 mRNA Expression haben keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben.

Für das krankheitsfreie Überleben zeigt das Patientenalter eine Tendenz in Richtung Signifikanz an ($P = 0,052$, HR = 1,85, 95% CI = 0,99-3,45). Die weiteren klinischen Parameter, wie Lymphknotenstatus, Tumorgöße und Grading haben keinen Einfluss auf Rezidiv- oder Metastasenbildung. Die gemessene KLK8 mRNA Expression zeigt jedoch eine starke Assoziation mit dem krankheitsfreien Überleben. Patientinnen, die erhöhte KLK8 Werte aufweisen, haben ein signifikant verkürztes DFS ($P = 0,014$, HR = 2,32, 95% CI = 1,19-4,52). Eine erhöhte KLK8 mRNA Expression führt folglich zu einem kürzeren krankheitsfreien Überleben (**Tabelle 23**).

Tabelle 23: Prognostischer Einfluss von KLK8 auf das Überleben von TNBC-Patientinnen - univariate Cox-Regressionsanalyse

Klinische Parameter	OS 180 m			DFS 180 m		
	No ^a	HR (95%CI) ^b	P	No ^a	HR (95% CI) ^b	P
Alter			<0,001			<u>0,052</u>
≤ 60 Jahre	67	1		67	1	
≥ 60 Jahre	58	2,96 (1,63-5,36)		56	1,85 (0,99-3,45)	
Lymphknotenstatus			<u>0,055</u>			0,136
Negativ	70	1		69	1	
Positiv	55	1,74 (0,99-3,07)		54	1,57 (0,84-2,95)	
Tumorgröße			0,117			0,610
≤ 20 mm	33	1		33	1	
≥ 20 mm	91	1,83 (0,86-3,92)		89	1,21 (0,59-2,46)	
Grading			0,915			0,394
G1 + G2	23	1		21	1	
G3	106	1,04 (0,49-2,22)		102	1,59 (0,59-3,93)	
KLK8 mRNA ^c			0,384			0,014
Niedrig	57	1		55	1	
Hoch	46	1.31 (0,71-2.41)		56	2,32 (1.19-4.52)	

^a Anzahl der Patientinnen

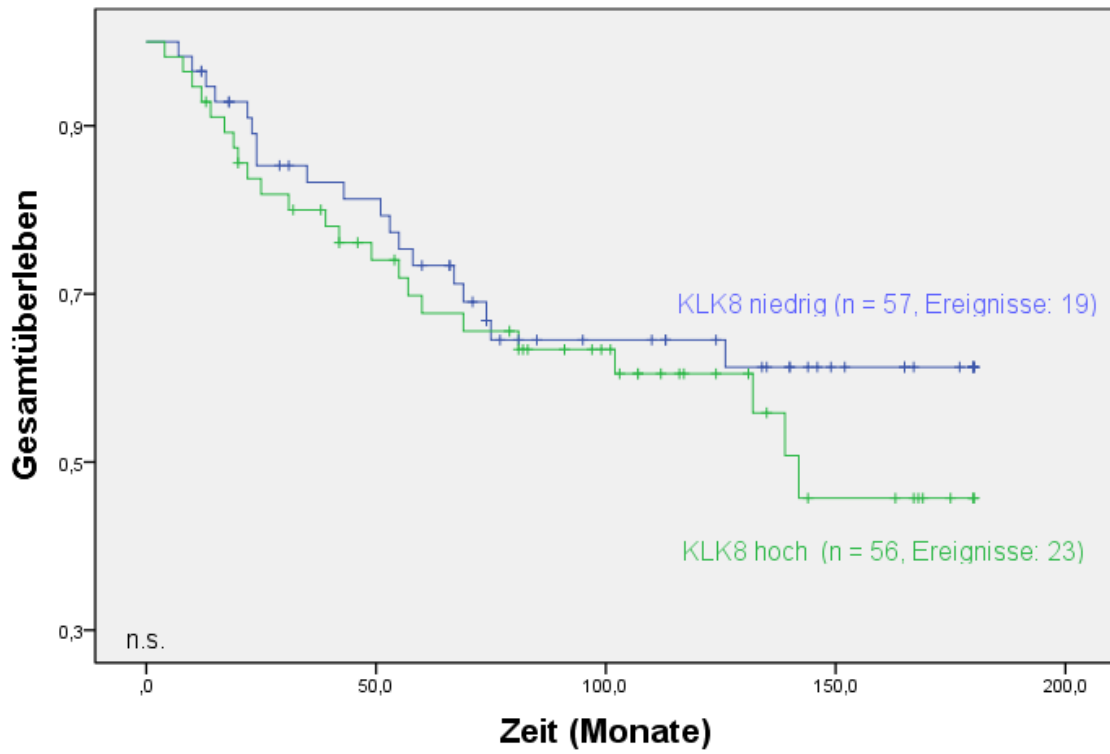
^b HR: Hazard Ratio (95% Konfidenzintervall) der univariaten Cox-Regression

^c Dichotomisiert in niedrige und hohe Expression anhand des Medians

Es wurde eine univariate Cox-Regressionsanalyse durchgeführt. In Bezug auf das krankheitsfreie Überleben zeigt das Patientenalter eine Tendenz in Richtung Signifikanz an. Einen signifikanten Einfluss auf das krankheitsfreie Überleben hat die KLK8 mRNA. Den wichtigsten, signifikantesten Parameter für das Gesamtüberleben stellt das Patientenalter dar, gefolgt vom Lymphknotenstatus.

Die Kaplan-Meier-Analysen, als Visualisierung der univariaten Cox-Regression, bestätigen das Ergebnis dieser in Bezug auf das OS. Es konnte kein Unterschied in Bezug auf das Gesamtüberleben in den Gruppen mit niedriger und hoher KLK8 mRNA Expression gefunden werden (**Abbildung 11**). Die KLK8 mRNA Expression hat folglich keinen Einfluss auf das OS.

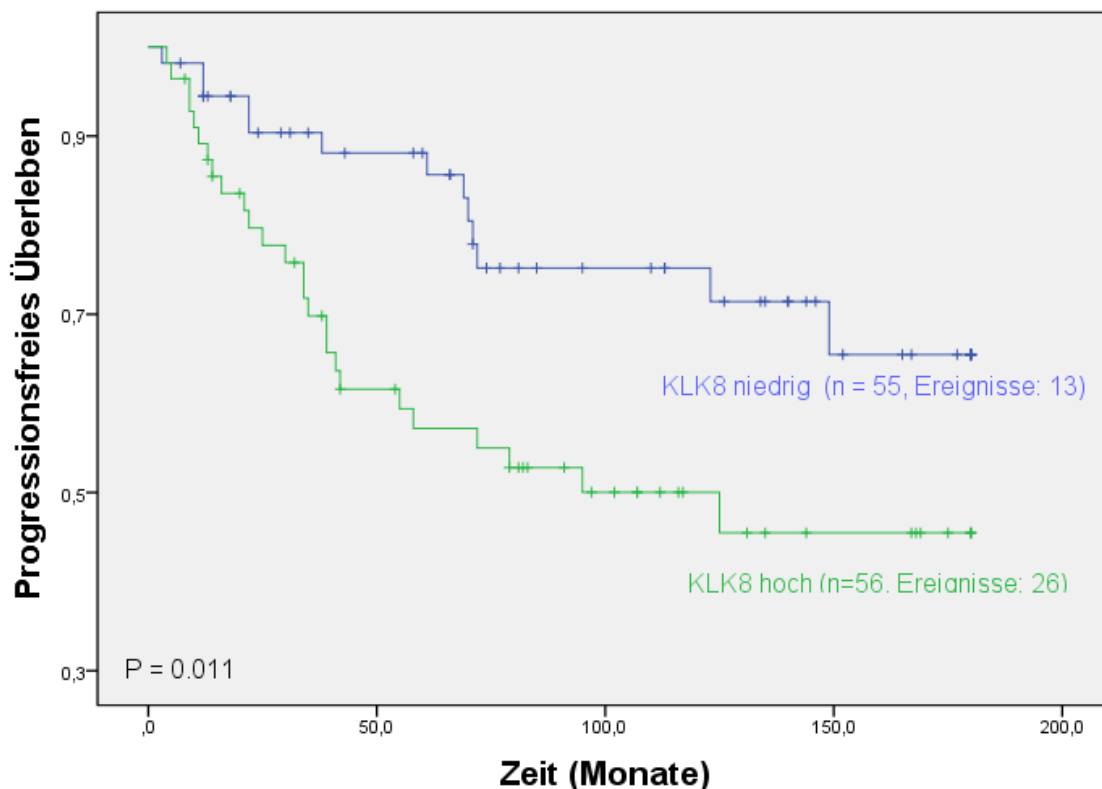
Abbildung 11: Kaplan-Meier-Analyse für das OS von TNBC-Patientinnen in Abhängigkeit von der KLK8 Expression



Die Abbildung zeigt die durchgeführten Kaplan-Meier-Analysen in Bezug auf das Gesamtüberleben der triple-negativen Brustkrebspatientinnen, unterteilt in eine Gruppe mit einer erhöhten KLK8 mRNA Expression und eine Gruppe mit einer erhöhten KLK8 mRNA Expression. Dabei zeigt sich keine Signifikanz der KLK8 mRNA Expression auf das Gesamtüberleben.

Auch für das DFS werden die Ergebnisse der univariaten Cox-Regression bestätigt (**Abbildung 12**). Eine erhöhte KLK8 mRNA Expression führt zu einem signifikant verkürzten krankheitsfreien Überleben in der Kohorte der TNBC-Patientinnen ($P = 0,011$).

Abbildung 12: Kaplan-Meier-Analyse für das DFS von TNBC-Patientinnen in Abhängigkeit von der KLK8 Expression



Die Abbildung zeigt die durchgeführten Kaplan-Meier-Analysen in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben der triple-negativen Brustkrebspatientinnen, unterteilt in eine Gruppe mit einer erhöhten KLK8 mRNA Expression und eine Gruppe mit einer erhöhten KLK8 mRNA Expression. Es zeigt sich, dass Patientinnen mit einer erhöhten KLK8 mRNA Expression ein signifikant verringertes krankheitsfreies Überleben haben.

4.6 Assoziation der KLK8 mRNA Expression mit krankheitsfreiem Überleben (DFS) und Gesamtüberleben (OS) bei TNBC-Patientinnen: Multivariate Cox-Regressionsanalyse

Die multivariate Cox-Regressionsanalyse zeigt einen unabhängigen Einfluss der KLK8 mRNA Expression auf das krankheitsfreie und Gesamtüberleben (Tabelle 24). In der Cox-Regressionsanalyse wurden die klinischen Parameter Alter, Lymphknotenstatus und Tumorgröße als Basismodell eingeschlossen. Die KLK8 mRNA Expression wurde dann separat hinzugefügt. Für das OS weist das Patientenalter einen signifikanten Einfluss auf ($P = 0,001$, HR = 3,19, 95% CI = 1,64 - 6,20). Die übrigen klinischen Parameter sowie die KLK8 mRNA Expression haben keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben.

Der einzige Parameter, der sich signifikant auf das krankheitsfreie Überleben auswirkt, ist die KLK8 mRNA Expression. Diese behält in der multivariaten Analyse ihre Signifikanz ($P = 0,014$, HR = 2,31, 95% CI = 1,18 – 4,50). Patientinnen, die eine erhöhte KLK8 mRNA Expression aufweisen, haben ein signifikant vermindertes progressionsfreies Intervall.

Tabelle 24: Prognostischer Einfluss von KLK8 auf das Überleben von TNBC-Patientinnen - multivariate Cox-Regressionsanalyse

Klinische Parameter	OS 180 m			DFS 180 m		
	No ^a	HR (95%CI) ^b	<i>P</i>	No ^a	HR (95% CI) ^b	<i>P</i>
Alter			0,001			0,066
≤ 60 Jahre	59	1		59	1	
≥ 60 Jahre	53	3,19 (1,64-6,20)		51	1,82 (0,96-3,43)	
Lymphknotenstatus			0,069			0,425
Negativ	61	1		60	1	
Positiv	51	1,80 (0,96-3,40)		50	1,31 (0,62-2,77)	
Tumorgröße			0,252			0,480
≤ 20 mm	33	1		31	1	
≥ 20 mm	81	1,62 (0,71-3,69))		79	1,31 (0,62-2,77)	
KLK8 mRNA ^c			0,617			0,014
Niedrig	57	1		55	1	
Hoch	55	1,17 (0,63-2,17)		55	2,31 (1,18-4,50)	

^aAnzahl der Patientinnen

^b HR: Hazard Ratio (95% Konfidenzintervall) der univariaten Coxregression. *KLK8 mRNA Expression* wurde separat zum Basismodell (bestehend aus den klinischen Parametern: Alter, Lymphknotenstatus, Tumorgröße) hinzugefügt

^c Aufgeteilt in niedrige und hohe Expression anhand des Medians

In der multivariaten Analyse zeigte sich die deutliche Signifikanz der KLK8 mRNA Expression in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben der Patientinnen. Patientinnen, welche KLK8-mRNA vermehrt exprimierten, hatten ein deutlich kürzeres krankheitsfreies Überleben.

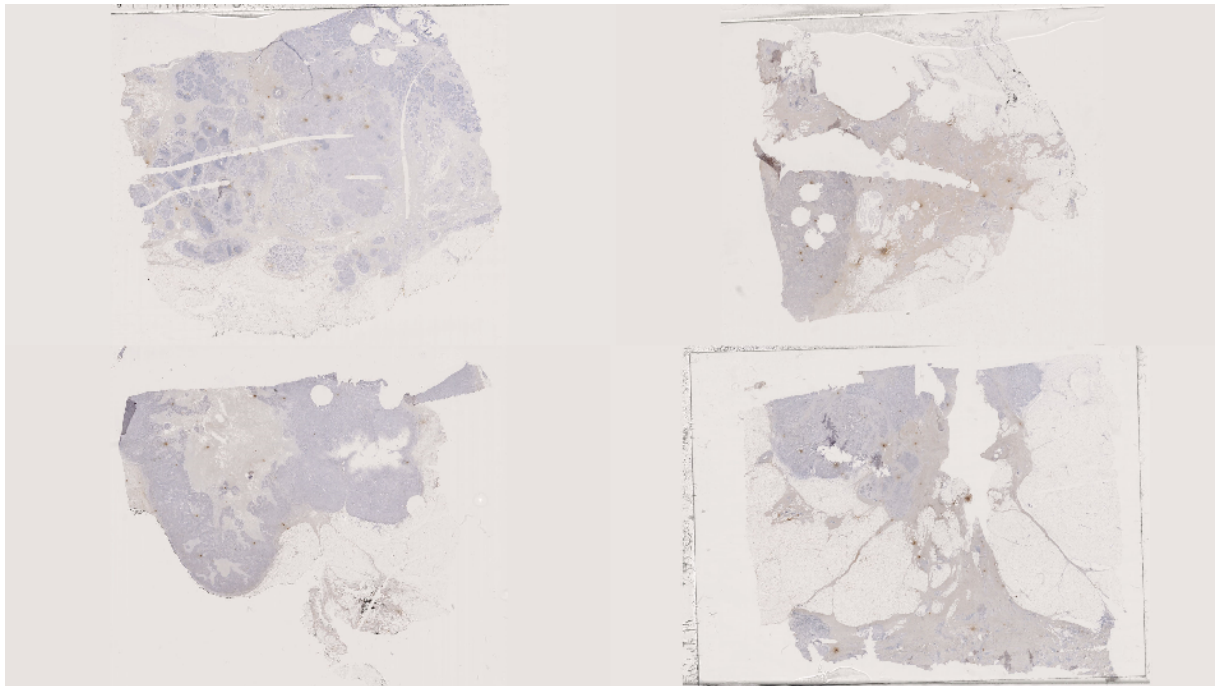
4.7 KLK8 mRNA Expression im hormonrezeptorpositiven Brustkrebskollektiv

Insgesamt wurden 144 Patientinnen mit hormonrezeptorpositivem Brustkrebs in Hinblick auf die Expressionslevel der KLK8 mRNA untersucht (**Tabelle 20**). Insgesamt waren die Expressionslevel von KLK8 mit einem Mittelwert von 0,65 deutlich unter den gemessenen Expressionen des triple-negativen Kollektivs. Es wurden Chi-Square-Tests durchgeführt, um eine Assoziation von KLK8 mit etablierten klinischen Parametern festzustellen. Daraus ließ sich schließen, dass es keinen Zusammenhang der KLK8 mRNA Expression mit etablierten klinischen Parametern wie dem Alter, dem Lymphknotenstatus, der Tumorgöße oder dem Grading gab (**Tabelle 22**). KLK8 stellt also ebenfalls im hormonezeptorpositivem Kollektiv einen unabhängigen Parameter dar. Von den 144 eingeschlossenen Patientinnen erlitten 28 Patientinnen ein Rezidiv der Brustkrebserkrankung oder eine Metastase. Für die Coxregressionsanalysen standen daher nur wenige Patientinnen mit Rezidiv-/Metastasenbildung zur Verfügung, welche mit der KLK8 mRNA Expression korreliert werden konnten. Die Aussagekraft der Analysen ist damit zu gering und das Kollektiv nicht repräsentativ genug. Individuelle Unterschiede der Patientinnen könnten hierbei stärker ins Gewicht fallen und einen möglichen Einfluss von KLK8 verschleiern. Daher werden in dieser Arbeit keine Ergebnisse in Bezug auf das Gesamt- und rezidivfreie Überleben der hormonrezeptorpositiven Brustkrebspatientinnen gezeigt. Ein guter Lösungsansatz wäre, die Fallzahl der Studie stark zu erhöhen, um so mehr Patientinnen mit Metastasen oder Rezidivbildung einzuschließen.

4.8 Expression von KLK8 - Immunhistochemie

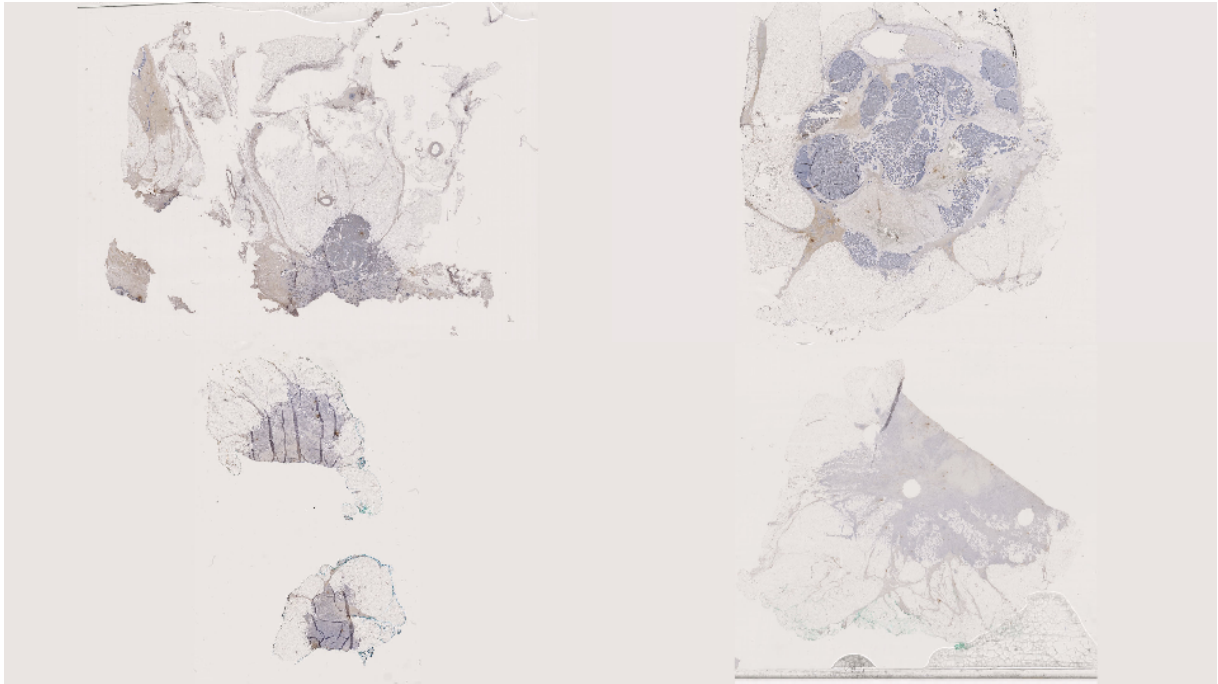
Die Expression der Kallikrein-ähnlichen Peptidase 8 in der Immunhistochemie stellte sich insgesamt gering dar. Sowohl in den analysierten TNBC- als auch in den HR+-Mammakarzinom-Gewebe fanden sich Tumorgewebe mit geringer als auch mit leicht erhöhter Expression (**Abbildung 13**). Der IRS-Score lag für beide Kollektive bei negativen bis schwach positiven Werten. Die Expression war innerhalb der beiden Kollektive ähnlich, weshalb keine Aussage darüber gemacht werden kann, ob die KLK8 Expression in einem der beiden Kollektive höher ist.

Abbildung 13: IHC der KLK8 Expression in TNBC–Mammakarzinomgewebe



Die immunhistochemische Färbung wurde mit dem Antikörper MAB 1719 durchgeführt, welcher sich im Westernblot als spezifisch für KLK8 zeigte. Die Verdünnung beträgt 1:250. Der immunreaktive Score der gezeigten Gewebeschnitte des triple-negativen Brustkrebses zeigt sich gering positiv.

Abbildung 14: IHC der KLK8 Expression in HR+-Mammakarzinomgewebe



Die immunhistochemische Färbung wurde mit dem Antikörper MAB 1719 durchgeführt, welcher sich im Westernblot als spezifisch für KLK8 zeigte. Die Verdünnung beträgt 1:250. Der immunreaktive Score der gezeigten Gewebeschnitte des hormonrezeptorpositiven Brustkrebses zeigt sich gering positiv.

Insgesamt wurden zehn hormonrezeptorpositive und zehn triple-negative Gewebeproben untersucht. Dabei wurden pro Gruppe fünf Proben mit einer in der qPCR bestimmten erhöhten KLK8 mRNA Expression und fünf mit einer erniedrigten KLK8 mRNA Expression immunhistochemisch untersucht (**Tabelle 25**).

Tabelle 25: Immunreaktiver Score der Brustkrebsgewebe

HR+		TNBC	
KLK8 mRNA Expression	IRS	KLK8 mRNA Expression	IRS
0,53	0	14,32	2
0,479	2	10,651	1
0,326	2	4,317	1
0,269	3	1,705	1
0,217	0	3,272	3
0,002	0	0,02	3
0,002	0	0,012	0
0,001	0	0,004	0
0,001	0	0,003	1
0	3	0,002	2

Aus dem triple-negativen und dem hormonrezeptorpositiven Kollektiv wurden jeweils zehn Patientenproben ausgewählt. Jeweils fünf zeigten in der qPCR niedrige Werte für KLK8, fünf zeigten hohe Werte für KLK8. Nach Anfärbung mit dem Antikörper MAB 1719 wurde der immunreaktive Score (IRS) bestimmt. Dieser zeigte für die Gewebeproben Werte im Bereich von negativ bis zu schwach-positiv.

Die meisten Färbungen bewegten sich im Bereich von negativ bis schwach positiv. Aufgrund der vorliegenden Homogenität der Ergebnisse wurde auf eine klinische Korrelation verzichtet.

4.9 Korrelation der KLK8 Expression auf mRNA und Proteinebene

Die Korrelation zwischen der Expression von KLK8 auf mRNA-, gemessen mit der qPCR, und Proteinebene, bewertet über die IHC, wurde mit Hilfe des Spearman-Tests für die vorliegenden Fälle untersucht.

Für das das TNBC sowie für das HR+-Mammakarzinom-Kollektiv ergab sich kein Zusammenhang zwischen der mRNA- und Proteinexpression (TNBC: $r = 0,271$, $P = 0,449$; HR+: $r = 0,050$, $P = 0,883$).

5. Diskussion

Kallikrein-ähnliche Peptidasen spielen bei verschiedenen Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle und sind zum Teil mit einer günstigen, zum Teil mit einer ungünstigen Prognose für die Patienten assoziiert. Für jede der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen (KLKs) wurde mindestens eine Erkrankung beschrieben, bei welcher diese als Gewebeproteinmarker oder auf mRNA Ebene von Bedeutung ist (Mavridis and Scorilas, 2010). Beim Mammakarzinom sind die meisten KLKs sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene über- oder unterexprimiert und teilweise mit der Prognose der Patientinnen verknüpft. Folglich verdichten sich die Hinweise auf eine tumorbiologische Bedeutung der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen für Tumorwachstum, -migration, -invasion, Chemotherapieresistenz und als potentielle therapeutische Angriffspunkte (Kryza et al., 2016)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung von KLK8 beim Mammakarzinom untersucht. Insbesondere wurde ein triple-negatives (TNBC) Kollektiv auf mRNA Ebene analysiert und mit einem hormonrezeptorpositiven (HR+) Mammakarzinom-Kollektiv verglichen.

Dabei konnte gezeigt werden, dass KLK8 auf mRNA Ebene im TNBC deutlich höher exprimiert ist als beim HR+-Mammakarzinomen. In beiden Kollektiven lässt sich keine Assoziation zwischen der KLK8-Expression und den etablierten klinischen Parametern Alter, Lymphknotenstatus, Tumorgroße und Grading finden. Kaplan-Meier-Analysen und die univariate Cox-Regressionsanalyse identifizierten ein signifikant verkürztes DFS für Patientinnen, deren Tumore erhöhte KLK8 mRNA Level exprimieren. In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse stellte sich KLK8 als unabhängiger, prognostisch ungünstiger, signifikanter Parameter für das DFS dar. In Hinblick auf eine Korrelation zwischen der Expression auf mRNA und Proteinebene ergab sich bislang kein Zusammenhang.

5.1 Expression in Subtypen

Die durchgeführte Arbeit zeigt eine erhöhte Expression der KLK8 mRNA in TNBC im Vergleich zu HR+-Mammakarzinomen auf. Dies bestätigt frühere Studien, welche eine erhöhte KLK8 Expression in TNBC und Her2/neu-überexprimierenden Brustkrebsentitäten, verglichen mit den Subtypen Luminal A und Luminal B, zeigen konnten (Michaelidou et al., 2015). Bereits für andere Biomarker und Tumoreigenschaften wurde eine unterschiedliche prognostische und prädiktive Relevanz von KLKs in den verschiedenen Tumorsubtypen beschrieben. Für erhöhte KLK6- sowie KLK10-Level konnten Assoziationen mit hormonrezeptornegativen Subtypen gezeigt werden (Luo et al., 2002). Ebenso konnten frühere Studien zeigen, dass Kallikrein-ähnliche Peptidasen durch Androgene und Östrogene stimuliert werden können (Lawrence et al., 2010). Die Expression von KLK 10, 11 und 14 wird in BT-474 Brustkrebszellen nach Stimulation von Androgenen und Östrogenen erhöht (Paliouras et al., 2008). KLK8 kann durch 17 β -Estradiol in den hormonrezeptorpositiven Brustkrebszelllinien MCF-7 und T-47D hochreguliert werden (Paliouras et al., 2007). Im Vergleich dazu zeigte sich keine Hochregulierung von KLK8 in BT-474 Zellen nach Stimulation mit Östrogenen (Paliouras et al., 2008). Schlussfolgernd zeigen sich deutliche Unterschiede in der Östrogenreaktivität für jede der einzelnen Kallikrein-ähnlichen Peptidasen in Hinblick auf die verschiedenen Brustkrebszelllinien (Paliouras et al., 2007, Tong et al. 2002). Eine allgemeingültiges Reaktionsmuster, wie eine Überexpression nach Stimulation mit Östrogenen lässt sich für die Kallikrein-ähnlichen Peptidasen aufgrund der aktuellen Studienlage nicht ableiten. Vielmehr besteht ein individuelles Verhalten innerhalb der Zelllinien. In unserer durchgeführten Studie wurden keine Vergleichswerte mit gesunden Gewebeproben analysiert. Aufgrund der Expressionsunterschiede von KLK8 in TNBC und HR+ Brustkrebsgewebe ist jedoch von einem komplexen, auch hormonregulierten, Netzwerk auszugehen, in welches die Kallikrein-ähnlichen Peptidasen eng eingebunden sind. Ebenfalls konnte in vorangegangenen Studien für weitere Steroide wie Androgene und Glukokortikoide eine regulatorische Einwirkung auf KLK8 in Brustkrebs- und Prostatazelllinien beschrieben werden (Kishi et al., 2003). Dieser Mechanismus kann auch als Grundlage für die Ergebnisse unserer Studie betrachtet werden.

Für den Proliferationsindex Ki67 ist bekannt, dass eine erhöhte Expression in östrogenpositivem Brustkrebs ein prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf eine Chemotherapie darstellt. In TNBC dagegen scheint Ki67 in Bezug auf das Therapieansprechen nicht relevant zu sein (Harris et al., 2007). In diesen Tumoren müssen folglich andere Faktoren unabhängig vom Proliferationsindex für das Therapieansprechen von Relevanz sein. KLK15 wurde in einer hormonrezeptornegativen Subgruppe von Patientinnen als günstiger prognostischer Marker beschrieben. Im Gegensatz dazu hatte die Expression von KLK15 keinen Einfluss auf die Prognose für Patientinnen mit einer anderen Tumorbilogie (Yousef et al., 2002c). Diese Arbeiten zeigen, dass optimalerweise jeder Biomarker in einem möglichst homogenen Kollektiv untersucht werden sollte, um eine bestmögliche Aussagekraft zu erreichen. Dies stellte auch ein wesentliches Ziel unserer durchgeführten Studie dar, die KLK8-Expression in den vorbeschriebenen zwei homogenen Kollektiven zu untersuchen.

Die unterschiedliche Tumorbilogie der Subtypen stellt einen entscheidenden Faktor für die differierende Expression der verschiedenen Marker dar. Viele Tumore des basal-like-Subtyps sind triple-negativ. Tumore vom basal-like-Subtyp exprimieren geringe Level von luminalen und Her2/neu-positiven Genclustern, jedoch eine hohe Anzahl verschiedener Proliferationsgene und zudem auch KLK8 (Perou und Børresen-Dale 2011). Für östrogenrezeptornegative Tumore konnte ebenfalls eine Expression von KLK8 nachgewiesen werden (Glynn et al. 2010). Die Ergebnisse unsere Studie, erhöhte KLK8-Level beim TNBC, stehen folglich mit früheren Erkenntnissen, der erhöhten Expression von KLK8 in basal-like-Tumoren, in Einklang. Mit unseren gewonnenen Ergebnissen lässt sich vermuten, dass verschiedene in basal-like-Subtypen vorhandene Proliferationsfaktoren in Zusammenhang mit KLK8 führen und so zu einer verstärkten Tumorprogression führen könnten.

5.2 Korrelation der KLK8 mRNA Expression mit klinischen Parametern

In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen der KLK8 Expression und etablierten klinischen Parametern für Brustkrebs (Alter, Tumorgroße, Lymphknotenstatus, Grading) untersucht. Für keinen Parameter konnte dabei eine

Korrelation mit der KLK8 Expression gezeigt werden. Folglich handelt es sich bei KLK8 um einen unabhängigen Faktor. In einer früheren KLK8-Arbeit vgl. *Michaelidou et al 2015* wurde ein Zusammenhang der KLK8 Expression mit einem fortgeschrittenen TNM-Status beschrieben, allerdings wurde dort ein heterogenes Patientenkollektiv, bestehend aus verschiedenen Brustkrebssubtypen, verwendet. Für das TNBC sind, verglichen mit anderen Brustkrebssubtypen, eine erhöhte Mitoserate, ein höheres Grading und häufigere p53-Mutationen sowie ein erhöhter Ki-67-Index beschrieben. Auch infiltrieren triple-negative Tumore häufiger vaskuläre und nervale Strukturen (Abdollahi et al., 2015) und zeigen einen Lymphknotenbefall (Carey et al., 2006). Tumore mit einem negativen Östrogenrezeptor zeigen häufig eine vermehrte Proliferationsrate mit schnellerem Wachstum und fortgeschrittenem Stadium (Györfy et al., 2015). Der in den Vorarbeiten gefundene Zusammenhang zwischen TNM Status und KLK8 Status könnte in diesem Fall folglich als Korrelation von TNBC und KLK8 Expression interpretiert werden. Denn TNBC, welche vermehrt KLK8 exprimieren, haben aufgrund zahlreicher weiterer Proliferationsfaktoren und der daraus sich ergebenden Tumorbilologie oftmals einen höheren TNM-Status und häufiger positive Lymphknoten als andere Subtypen.

5.3 Evaluation von KLK8 als prognostischer Marker beim TNBC

Im Rahmen unserer Studie wurde die Höhe der KLK8 mRNA Expression in TNBC analysiert. Diese zeigt einen Einfluss von KLK8 auf das krankheitsfreie Überleben aber nicht auf das Gesamtüberleben. TNBC Patientinnen mit einer hohen KLK8 mRNA Expression haben ein zweifach höheres Risiko, ein Rezidiv oder eine Metastase zu entwickeln, als Patientinnen mit einer niedrigen Expression von KLK8. In der multivariaten Analyse für das progressionsfreie Überleben behält KLK8 als einziger Parameter seine prognostische Relevanz. Hiermit konnten frühere Ergebnisse bestätigt werden. Eine erhöhte KLK8 Expression auf mRNA Ebene stellt einen ungünstigen prognostischen Parameter dar und verkürzt das progressionsfreie Überleben der Patientinnen (Michaelidou et al., 2015). Für das HR+-Mammakarzinom Kollektiv konnte keine prognostische Relevanz beschrieben werden. Überlebensanalysen, welche KLK8 mit DFS und OS korrelierten, zeigten keinen Einfluss von KLK8 auf das hormonrezeptorpositive Kollektiv. Dies könnte an der ohnehin guten Prognose von HR+-Mammakarzinomen und der in Relation dazu

kurzen Nachbeobachtungszeit liegen, denn die Patientinnen haben eine 5-Jahres-Überlebensrate von 91,6%. Auch tritt der hormonabhängige Brustkrebs eher bei postmenopausalen Patientinnen und somit in einem höheren Lebensalter auf (Carey et al., 2006). Diese beiden Faktoren könnten dazu führen, dass eine erhöhte KLK8 Expression keinen Einfluss auf das Überleben der Patientinnen hat. Die Heilungschancen sind gut und Patientinnen versterben im höheren Alter eher an Multimorbidität als an direkter Folge des Brustkrebses.

5.4 Unterschiede zwischen der Expression auf Protein und mRNA Ebene

Im Rahmen der Studie wurde die Korrelation zwischen der mRNA Expression von KLK8 mittels qPCR und der Expression auf Proteinebene mittels Immunhistochemie verglichen. Es konnte keine Korrelation zwischen den beiden Ebenen festgestellt werden. Dass die Expression auf mRNA und Proteinebene nicht miteinander korrelieren muss, wurde bereits beschrieben (Yousef et al., 2004; Michaelidou et al., 2015). Für KLK3 ist eine Erhöhung im Patientenserum im Vergleich zur verminderten bis undetektierbaren Expression auf Genebene bekannt. Dies könnte durch Veränderungen der Angiogenese und einer erhöhten Gefäßpermeabilität der malignen Zellen bedingt sein (Yousef et al., 2004). Eine verminderte Expression auf Proteinebene lässt sich darauf zurückführen, dass es durch das veränderte Mikromilieu, welches der Tumor erzeugt, Veränderungen auf translationaler Ebene geben könnte. Eine verminderte Transkription und Translation können trotz hoher KLK8 Werte auf mRNA Ebene zu einer verminderten Expression auf Proteinebene führen. (Michaelidou et al., 2015). Zudem ist bekannt, dass KLKs nachweislich das Mikromilieu des Tumors verändern (Kyrza et al., 2016). Teil dieser Veränderung könnte sich ebenfalls auf die Translation von mRNA zu Protein auswirken.

5.5 Verringerte Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe

Es ist bekannt, dass die Expression von KLK8 auf mRNA Ebene verglichen mit Normalgewebe vermindert ist. In einer Arbeit wurde eine Herunterregulation von KLK8 in 72% der untersuchten Gewebe beschrieben. Nur 28% der Tumore exprimierten höhere KLK8 Werte als die zugehörigen Normalgewebeproben

(Michaelidou et al., 2015). Da die frühere Studie jedoch ein heterogenes Kollektiv betrachtet, lässt sich nicht eindeutig sagen, inwiefern die Expression zwischen TNBC und dem Normalgewebe speziell variiert. Vergleichende Expressionsanalysen zwischen Normalgewebe und TNBC werden dringend benötigt. Für andere Gene wurde allerdings ebenfalls eine verminderte Expression in tumorösem Gewebe in Hinblick auf Normalgewebe beschrieben. In einer Mikroarray-Studie konnte gezeigt werden, dass sich im normalen Epithel von Brustkrebszellen auch Genabnormalitäten zeigen können (Zubor et al., 2015). Weitere Analysen zeigten, dass in histologisch gesundem Gewebe aus der Nähe des Tumors einige Proben (7 von 38) ein malignomähnliches Expressionsprofil zeigten. Dies lässt darauf schließen, dass einige gesunde Gewebsregionen prädisponiert für Brustkrebs sein könnten (Schummer et al., 2010). Falls diese anatomisch nahe liegenden Gewebeproben als Vergleich herangezogen wurden, lässt sich in der früheren Studie kein Vergleich zwischen den Proben aus Normalgewebe und Tumorgewebe ausarbeiten. Besser wäre es, diese Analyse mit eindeutig gesundem, im ausreichenden Abstand zum Tumor vorhandenem Gewebe, zu wiederholen. Für eine Reihe von Genen und Signalwegen, welche mit der Tumorentstehung assoziiert sind, wurde zudem eine verminderte Expression in Tumoren mit schlechter Prognose im Vergleich zum Normalgewebe beschrieben (Schummer et al., 2010). Eine Vermutung in dieser Hinsicht wäre, dass Tumorgewebe in höheren Tumorstadien meist schon stark entdifferenziert sind und daher auch Transkription und Translation nicht mehr im physiologischen Umfang stattfinden können.

5.6. Vergleich der eigenen Ergebnisse mit vorangegangenen Studien

KLK8 als potentieller Biomarker wurde von Micheaelidou et al. (2015) beschrieben. Die Studie umfasste ein heterogenes Kollektiv von 150 Brustkrebsproben. Es wurde von einer vermehrten Expression von KLK8 auf mRNA Ebene in TNBC und Her2/neu positiven Tumoren verglichen mit den Luminal A und B Subtypen berichtet, was wir bestätigen konnten: auch in unserer Studie zeigen sich erhöhte Werte für die KLK8 mRNA in TNBC im Vergleich mit HR+-Mammakarzinomen. Michaelidou et al. (2015) beschrieben in der univariaten und der multivariaten Cox-Regressionsanalyse ein verringertes DFS für Patientinnen, deren Tumore vermehrt KLK8 exprimierten. Auch dies wurde in unserer Studie bestätigt. Patientinnen mit einer KLK8-Erhöhung

auf mRNA Ebene weisen eine verringerte krankheitsfreie Zeit auf. Auf das Gesamtüberleben hatte die KLK8 mRNA Expression sowohl in unserer als auch in der vorangegangenen Studie keinen Einfluss. In Hinblick auf klinische Parameter ergab sich eine Assoziation der KLK8 mRNA Expression mit einem erhöhten TNM-Status. Dies konnte in unserer Arbeit nicht bestätigt werden. Die KLK8 mRNA Expression zeigte sich im Chi-Square-Test unabhängig von klinischen Parametern. Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür wäre, dass unser Kollektiv homogener war. Für TNBC und Her2/neu-positive Tumore wurden erhöhte KLK8 mRNA Werte gemessen. Da diese auch eher in Lymphknoten metastasieren sowie bei Diagnosestellung meist höhere TNM Stadien aufweisen, könnte der Zusammenhang mit den klinischen Parametern auch darauf zurückgeführt werden. Auch Zellexperimente mit Darmkrebspatienten lassen eine Beteiligung von KLK8 in Bezug auf Proliferation, Invasion und Migration *in vitro* vermuten (Liu et al., 2017). Diese Ergebnisse stehen mit unseren Erkenntnissen von verstärkter Tumoraggressivität in Einklang. KLK8 hat mutmaßlich bei diversen Tumorarten einen Einfluss auf die Tumorgenese.

5.7 Onkologische Bedeutung der KLKs

Für die Subtypisierung des Brustkrebses wird hauptsächlich molekulargenetisch die Expression der Hormonrezeptoren für Progesteron, Östrogen sowie der Wachstumsrezeptor Her2/neu herangezogen. Der triple-negative Brustkrebs wird daher über sein charakteristisches Färbemuster in der Immunhistochemie, die Abwesenheit des Östrogenrezeptors (ER), des Progesteronrezeptors (PR) und Her2/neu definiert. Abgesehen davon liegt eine erhöhte Expression von Proliferationsgenen vor sowie eines einzigartigen Clusters von Genen, dem basalen Cluster. Dieses Cluster beinhaltet neben dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR) diverse andere, teils gut bekannte Gene (c-Kit, Vimetin, P-Cadherin, Fascin, Caveolins 1 und 2, alphaB-Crystallin). Aufgrund des Vorhandenseins von Zytokeratinen der basalen Epithelzellschicht der Atemwege und der Haut (CK 5, 6, 14 und 17), wurde der Name „*basal-like*“ etabliert. Nachdem die Gene der Basalzellschicht analysiert wurden, konnten zahlreiche Verbindungen zu weiteren charakteristischen Genmarkern für Brustkrebs gefunden werden. Es besteht eine starke Assoziation zwischen der BRCA1-Mutation und der Entwicklung eines Tumors des basalzellähnlichen Subtyps (Perou et al., 2010). Neben all den oben genannten

Genen konnte zudem eine erhöhte Expression von KLK8 im basal-like Brustkrebssubtyp identifiziert werden (Glynn et al., 2010).

Die Ausbildung von Metastasen gehört zu den folgenschwersten Manifestationen einer Tumorerkrankung. Wesentlich für die Metastasierung ist die Fähigkeit eines malignen Tumors zur Invasion, das Lösen von Zellen aus dem Zellverband des Primärtumors und folglich das Überschreiten der strukturellen Grenzen. Der Prozess, bestehend aus einem Zusammenspiel zwischen Tumorzellen, dem umgebenden Gewebe sowie dem körpereigenen Immunsystem konnte noch nicht vollständig pathophysiologisch verstanden werden. Die primäre Gefäßversorgung einer Neoplasie wird zunächst über normale, im Gewebe bereits vorkommende, naheliegende Blutgefäße gewährleistet. Dabei kommt es zu einem bidirektionalen Prozess: körpereigene Immunzellen treten aus den Gefäßen aus, dringen in den Tumor ein und induzieren eine Immunabwehr, gleichzeitig infiltrieren Tumorzellen die kapillären Systeme (Intravasation) und gelangen in den systemischen Kreislauf. Verlassen sie das Gefäßsystem an entfernter liegenden Stellen wieder (Extravasation), so kann es dort zu einer Bildung von Sekundärtumoren, den so genannten Metastasen kommen. Alle malignen Tumore haben die gemeinsame Fähigkeit, die extrazelluläre Matrix, die Basalmembran und das interstitielle Stroma über verschiedene Prozesse abzubauen, um eine Wanderung der invasiven Zellen in das umliegende Gewebe zu ermöglichen (Mignatti et al., 1993).

Die Basalmembran bildet im gesunden Gewebe eine natürliche Barriere zwischen den Epithelzellen und dem Stroma. Kommt es zu einer Proliferation von transformierten Epithelzellen, so ist diese zunächst auf das Epithelkompartiment beschränkt. Diese Proliferation führt zu einem, die Basalmembran nicht durchbrechenden, *Carcinoma in situ*, welches mit einer guten klinischen Prognose einhergeht (Hanahan et al., 2000). Membrangebundene Matrixmetalloproteasen leiten einen Durchbruch der Basalmembran und eine Invasion der Tumorzellen in das tieferliegende Gewebe ein, wobei die Tumorzellen erstmalig in Kontakt mit Fibroblasten, Leukozyten, Stromazellen und dendritischen Zellen, einem Teil der extrazellulären Matrix, treten (Hotary et al., 2006). Sobald die Basalmembran von den Tumorzellen überschritten wurde und diese in das tieferliegende Gewebe eingedrungen sind, verschlechtert sich die Prognose für den Patienten erheblich (Hanahan et al., 2000).

Die Tumorprogression sowie die Metastasierung von Tumoren sind folglich eng mit einem, auf der Interaktion von Tumor und Wirtsgewebe basierenden, Gewebeumbau verbunden. Zytokine, Chemokine und proteolytische Enzyme, welche von den Tumorzellen sezerniert werden, interagieren, stimulieren oder inhibieren Makrophagen, Fibroblasten, aktivieren Endothelzellen und sorgen für die Migration zahlreicher Leukozytensubtypen (Bhowmick et al., 2004). Primäres Tumorwachstum induziert folglich Reaktionen des Wirtsgewebes, von welchen angenommen wird, dass sie förderlich auf das Tumorwachstum wirken. Einige der freigesetzten Wachstumsfaktoren führen zur Neoangiogenese, andere regen Myofibroblasten und Fibroblasten zur Synthese und Proliferation von Bestandteilen der extrazellulären Matrix an (Bacac et al., 2008). Die angeregte Reaktion erinnert praktisch an eine Gewebsreparatur, mit dem Unterschied, dass der Tumor sich wie eine chronische, nicht heilende Wunde verhält (Dvorak, 1986). Planche et al. (2011) untersuchten gesundes Gewebe sowie Tumorgewebe von Brustkrebspatientinnen und verglichen die Expression von verschiedenen Genen. Dabei zeigte sich in den immunhistochemischen Färbungen der Tumorgewebe eine erhöhte Expression von Genen (*COL11A1*, *COL10A1*, *COMP*, *MMP11*, *FN1*, *MFAP2*, *TNXB* und *MATN2*), welche für Bestandteile der extrazellulären Matrix codieren und bei erhöhter Expression mit einem vermehrten Umbau der extrazellulären Matrix einhergehen. Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass es sich bei KLK8 um eine Serinprotease handelt, welche eine variable Bandbreite von Substraten hydrolysieren kann. Rajapakse et al. (2005) zeigten, dass KLK8 die Aktivität von Casein, Fibronectin, Gelatin, Kollagen Typ IV, Fibrinogen und Kininogen beeinflusst. Besonders interessant ist hierbei der Einfluss der Proteasenfunktion von KLK8 auf Fibronectin und Kollagen IV, Bestandteile der extrazellulären Matrix. Bei Fibronectin handelt es sich um ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix. Dieses dient einerseits als eines der wichtigsten Adhäsionsmoleküle für verschiedene Zellen während derer Wanderung, andererseits bildet es eine Verbindung zwischen diversen Molekülen der extrazellulären Matrix untereinander und zu Kollagenfibrillen sowie Proteoglykanen. Für Brustkrebszelllinien konnte gezeigt werden, dass das Gesamtfibronectin, ED-A-Fibronectin sowie $\alpha 5\beta 1$ -Integrin deutlich hochreguliert waren (Nam et al., 2010). Ferner führt eine Erhöhung von Fibronectin zu einer erhöhten Invasivität von auf Kollagenhydrogelen kultivierten Brustkrebslinien (Mierke et al., 2011). Fibronectin wird folglich in Tumoren nicht nur fehlerhaft exprimiert,

sondern unterstützt durch die Beeinflussung und Aktivierung diverser nachgeschalteter Signalwege das Fortschreiten in Form von Wachstum sowie Metastasierung des Tumors (Wang et al., 2017).

Kollagen IV ist ein Protein aus der Familie der Kollagene. Während der posttranslationalen Modifikation wird die C4-Domäne am C-Terminus nicht entfernt, was zu einer Kopf-an-Kopf-Verbindung der Fasern führt. Zudem fehlt Kollagen IV die Aminosäure Glycin, wodurch sich keine Helix ausbilden kann und sich eine flache Struktur, die Basallamina, bildet. Das Goodpasture-Syndrom, wo das Immunsystem die Basallamina mittels Antikörperbildung schädigt und das Alport Syndrom mit Hämaturie und Hörverlust, zeigen, dass Kollagen IV einen wichtigen Bestandteil der Basallamina darstellt. Für Darmkrebs konnte gezeigt werden, dass Kollagen IV Ketten verloren gehen. Dies führt zu einer veränderten Mikroumgebung des Tumors und damit möglicherweise zu einer erhöhten Tumorinvasivität (Tanjore et al., 2006). Aufgrund dieser Voruntersuchungen lässt sich vermuten, dass die proteolytische Aktivität von KLK8 eine entscheidende Rolle in der Invasivität von Tumorzellen spielt. KLK8 beeinflusst Fibronectin, einen wichtigen Bestandteil der extrazellulären Matrix und Kollagen IV, einen der Hauptbestandteile der Basallamina, einem Teil der Basalmembran. Wenn die Basalmembran durch Veränderungen der Expression und der Aktivität von Kollagen IV, beeinflusst über eine Erhöhung der Expression von KLK8, verändert wird, so haben es Tumorzellen leichter, in tiefere Zellschichten einzudringen. Dadurch wird ein Tumorprogress gefördert. Eine veränderte Expression oder Aktivität von Fibronectin, ebenfalls beeinflusst durch die proteolytische Aktivität von KLK8, führt zu einer vermutlich verminderten Verbindung der interzellulären Moleküle untereinander, einer vermutlich verminderten Verbindung zu Kollagenen und Proteoglykanen. Hypothetisch können Tumorzellen somit leichter die extrazelluläre Matrix durchwandern und zu einer erhöhten Metastasierungsneigung führen.

Plasmin ist ein Enzym, welches zur Gruppe der Peptidasen gehört. Durch seine katalytische und fibrolytische Funktion kann es zahlreiche Proteine spalten. Seine bekannteste Funktion übt Plasmin in der Blutgerinnung aus. Im Gefäßsystem laufen Fibrinogenese, die Blutgerinnung, und Fibrinolyse, der Fibrinabbau, ständig parallel ab. Der Thrombus wird dabei durch Fibrin gespalten, welches zuvor durch die Serinprotease Plasmin aktiviert wird. Plasminogen wird dabei von zwei

verschiedenen Substanzen in seine aktive Form Plasmin überführt. Bei der einen handelt es sich um den im Endothel vorkommenden Gewebsplasminaktivator (t-PA = *tissue type Plasminogen Activator*), welcher therapeutisch in einer rekombinanten Form auch medikamentös eingesetzt werden kann. Bei dem anderen handelt es sich um Urokinase (u-PA = *Urokinase-type Plasminogen Activator*), welcher in den Epithelien der Nierentubuli vorkommt und hauptsächlich für einen Fibrin-Abbau im Harn sorgt. Plasmin hat in der Regulation der Fibrinolyse folglich eine zentrale Schlüsselrolle inne. Neben seiner fibrinolytischen Aktivität kann Plasmin diverse andere Proteine spalten. Es aktiviert Kollagenasen, Mediatoren des Komplementsystems, aktiviert Monozyten und agiert zu Beginn der Ovulation mit dem Graafschen Follikel. Bereits seit Jahren besteht die Annahme, dass Plasmin eine wichtige Rolle in der Tumorerkrankung und Metastasierung einnimmt. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass Plasmin daneben eine herausragende Bedeutung in vielen weiteren Tumorprozessen, wie im Gewebeumbau, der Neoangiogenese, der Stimulation von Fibroblasten sowie der Synthese der Proteine der extrazellulären Matrix besitzt (Andreasen et al., 2000). Der Plasminogenaktivator t-PA kann sowohl einzelsträngig als auch nach Spaltung in einer doppelsträngigen Form vorliegen. Vorgegangene Arbeiten zeigten, dass die doppelsträngige Form eine erhöhte Affinität zu Plasminogen hat und Plasminogen direkt zu Plasmin aktiviert. Liegt t-PA in seiner einzelsträngigen Form vor, so bedarf es den Kofaktor Fibrin, damit Plasminogen gespalten werden kann. In Abwesenheit des Cofaktors wird nur wenig Plasminogen zu Plasmin umgesetzt (Stubbs et al., 1998). Einzelsträngiges t-PA stellt ein Substrat von KLK8 dar, wie Rajapakse et al. zeigen konnten. In einem Gemisch von Einzelstrang t-PA mit KLK8 ließen sich nach Inkubation eine vermehrte t-PA-Aktivität feststellen. In Abwesenheit von Fibrin kann folglich KLK8 die Rolle des Cofaktors übernehmen. KLK8 könnte also in Abwesenheit von Fibrin die t-PA/Plasmin-Kaskade einleiten. Plasminogen ist vermehrt in Gewebeflüssigkeit vorhanden. Wenn Tumorzellen nun vermehrt KLK8 synthetisieren, wird vermehrt Plasminogen gespalten und der proteolytische Abbau der extrazellulären Matrix, der Basalmembran und zahlreichen weiteren Strukturen beschleunigt eingeleitet (Rajapakse et al., 2005). Zudem kann KLK8, neben weiteren Kallikrein-ähnlichen Peptidasen über seine proteolytische Aktivität pro-uPA zu uPA aktivieren (Beaufort et al., 2010).

In der Haut vermitteln interzelluläre Haftstrukturen, die Desmosomen, den Zusammenhalt der Keratinozyten in der Epidermis. Für KLK5, KLK7 und KLK15 konnte ein Einfluss in Form eines vermehrten Abbaus von Desmoglein festgestellt werden (Eissa et al., 2008). Die Beteiligung an solchen Prozessen und die Zerstörung der physiologischen Architektur führt zur Vermutung, dass KLKs die Regulation und Zelladhäsion von Tumorzellen entscheidend beeinflussen können. Auch KLK8 könnte in Brustkrebszellen an diesem Prozess beteiligt sein.

Zudem konnte gezeigt werden, dass Kallikrein-ähnliche Peptidasen einen Einfluss auf verschiedenen Signalproteine haben, welche an der Sequestrierung verschiedener Wachstumsfaktoren beteiligt sind. KLK1, KLK5, KLK12 und KLK15 beeinflussen CCNs, welche zu den interzellulären Signalproteinen gehören und auf Wachstumsfaktoren wie FGF-2, TGF- β 1 und VEGF wirken (Guillon-Munes et al., 2011). Zudem können auch indirekte wachstumsstimulierende Signale wie eine Wirkung auf den *Hepatocyte Growth Factor-Scatter Factor* (HGF-SF), einem Signalweg der Krebsprogression, nachgewiesen werden (Mukai et al., 2015). Die Stimulation von Wachstumsfaktoren durch Kallikrein-ähnliche Peptidasen trägt einen essenziellen Anteil zur vermehrten Tumorprogression bei.

In Zusammenschau mit den von uns durchgeführten Untersuchungen lässt sich die Hypothese aufstellen, dass aufgrund der erhöhten KLK8 Expression in triple-negativen Zellen, KLK8 über seine proteolytische Aktivität auf diverse Moleküle der extrazellulären Matrix und vor allem der Basalmembran zu einer erhöhten Progredienz und einer zunehmenden Metastasierung führt.

5.8 Möglichkeiten der KLK-Inhibition

Auch in therapeutischer Hinsicht ist KLK8 ein interessanter Angriffspunkt. Denkbar wäre es, Inhibitoren zu entwickeln und in der Brustkrebstherapie einzusetzen.

Eine Hemmung der Serinproteasen im Körper läuft im Körper physiologischerweise durchgehend ab, beispielsweise um Serinproteasen abzuschalten. Fehlen die natürlichen Inhibitoren, so kann dies von klinischer Bedeutung sein. Bei der für die Koagulation wichtigen Gerinnungsfaktoren Thrombin (= Faktor IIa), VIIa, IXa, Xa, XIa und XIIa handelt es sich um Serinproteasen. Um das Gleichgewicht zwischen

Gerinnung und Gerinnungshemmung zu schaffen, ist ein gegenregulierendes System notwendig. Einer der wichtigsten Gegenspieler und damit Gerinnungshemmer stellt der Serinproteaseninhibitor Antithrombin III dar. Ein Fehlen des Inhibitors führt zum Auftreten von Thrombosen (Roemisch et al., 2002). Auch die Entstehung eines Lungenemphysems kann aus einem Ungleichgewicht zwischen Proteasen und Proteaseinhibitoren resultieren. α 1-Antitrypsin ist ein hepatisch synthetisierter Protease-Inhibitor, welcher Elastase, Tryptase und verschiedene weitere Serinproteasen hemmt. Kommt es zu einem Mangel an α 1-Antitrypsin, bei Malfunktionen der Leber oder aufgrund anderer seltenerer hereditärer Stoffwechselerkrankungen (α 1-Antitrypsin-Mangel) so resultiert daraus eine gesteigerte Proteaseaktivität in der Lunge, eine Zerstörung der Lungenarchitektur mit Entstehung eines Lungenemphysems. Als Gegenmaßnahmen können in diesen Fällen künstlich hergestellte Serinproteaseinhibitoren gegeben werden. Die Möglichkeiten einer Inhibition sind vielseitig und reichen von aus Mikroorganismen isolierten Peptiden und Proteinen über heterozyklische und synthetische Peptid-Derivate bis hin zu nonpeptidischen synthetischen Derivaten (Masurier et al., 2018).

Generell lassen sich die Inhibitoren in eine Gruppe aus natürlichen, endogenen Inhibitoren und in eine Gruppe aus synthetisch hergestellten Inhibitoren unterteilen.

Die im Körper vorkommenden Metallionen stellen wichtige natürliche Inhibitoren dar. Die Spurenelemente Eisen, Kupfer, Zink, Jod und Selen erfüllen im Körper sehr spezifische Funktionen. Zumeist sind sie Bestandteile von Proteinen oder Cofaktoren von Enzymen.

Zink ist einer der wichtigsten Bestandteile der Cofaktoren von Enzymen. Im menschlichen Organismus existieren >300 verschiedene Zink-Metalloproteasen. Die Carboanhydrase, diverse Dehydrogenasen und Matrix-Metalloproteasen arbeiten zinkabhängig. Zudem ist Zink ein Bestandteil von regulatorischen DNA-Bindeproteinen, den sogenannten Zinkfingern. Zudem ist Zink, genauer das Zink-Kation (Zn^{2+}), ein signifikanter endogener Inhibitor diverser Kallikrein-ähnlicher Peptidasen. Auch für die Aktivität von KLK8 ist eine Inhibition durch den Einsatz von $3 \mu\text{m } Zn^{2+}$ beschrieben worden (Kishi et al., 2006). Zinkionen wirken stark hemmend auf die hydrolytische Aktivität von KLK8 (Debela et al., 2018)

Serpine, Makroglobuline, Kazal-type und Kunitz-type Inhibitoren stellen die wichtigsten proteinhaltigen endogenen KLK-Inhibitoren dar (Barrett et al., 2003).

Der einfachste, relativ unspezifische Inhibitor ist das Alpha-2-Makroglobulin. Alpha-2-Makroglobulin ist ein Akute-Phase-Protein, welches vornehmlich von Makrophagen synthetisiert wird und diverse, zahlreiche Proteasen, unter anderem KLKs, inhibieren kann. Die Proteasen spalten eine bestimmte Region des alpha-2-Makroglobulins und werden nach Spaltung in Form eines Käfigs eingeschlossen und inaktiviert.

Zu den wichtigsten endogenen, spezifischen Inhibitoren der Serinproteasen zählen die Serpine. Serpine sind Proteine, welche in zahlreichen Lebewesen vorkommen. Serpine sind in der Lage die Enzymaktivität von Serinproteasen irreversibel zu inhibieren. Die Serpine binden in der Nachbarschaft der katalytischen Dömane der Serinproteasen und hemmen diese zunächst über die sterische Hinderung. Dies bedeutet, dass die Serinproteasen ihre räumliche Ausdehnung nach Kontakt mit den Serinproteaseinhibitoren nicht beibehalten können und damit ihre enzymatische Funktion verlieren. Diese weitreichenden Konformationsänderungen führen im Endeffekt zur Zerstörung der Protease (Epstein et al., 2003). Zu den wichtigsten Serpinen gehören Antithrombin, Antitrypsin, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor und Neuroserpin. Alpha2-Antiplasmin, ein Sofortinhibitor des Plasmins über Komplexbildung mit freiem Plasmin, inhibiert ebenfalls die Aktivität von KLK8 (Kishi et al., 2006). Auch Protein C Inhibitor, ein wichtiger Inhibitor der Blutgerinnung, übt einen hemmenden Einfluss auf KLK8 aus (Kishi et al., 2006, Luo et al., 2006).

Beim Kazal-type Inhibitor handelt es sich um ein aus 58 Aminosäuren bestehendes Peptid des Pankreassekrets. Der Inhibitor besitzt einen positiv geladenen Rest, welcher mit Trypsin-ähnlichen Proteasen interagieren kann und deren enzymatische Funktion hemmt (Masurier et al., 2018).

Einer der heutzutage am besten untersuchte und verstandene spezifischere Inhibitor ist der Lymphe-Epitheliale Kazal-Typ Inhibitor (LEKTI)-1, kodiert durch das Gen SPINK5 (Serine Protease Inhibitor of Kazal-Type). Physiologisch ist LEKTI an zahlreichen Prozessen der Haar- und Hautmorphogenese beteiligt. Mutationen in diesem Gen führen zu einem Funktionsverlust und schlussendlich zum Krankheitsbild einer Ichthyose, dem Netherton-Syndrom (Kantyka et al., 2011). Die verschiedenen Domänen von LEKTI-1 inhibieren KLK5, KLK6, KLK7 und KLK13. Auf

der Suche nach neuen Inhibitoren konnte LEKTI-2/SPINK9 identifiziert werden, welcher inhibitorische Eigenschaften für KLK5, KLK6, KLK7, KLK12, KLK13 und KLK14 aufweist. Für die Inhibition von KLK8 konnte bislang kein Kazal-Typ-Inhibitor beschrieben werden (Kantyka et al., 2011).

Zudem bestehen drei wichtige KLK-Inhibitoren vom Kunitz-like Typ. Therapeutisch wird der Kunitz- Inhibitor, auch bekannt als Apoprotinin als antifibrinolytische Medikation verwendet. Der Soybean trypsin inhibitor (SBTI), der Lima bean trypsin inhibitor (LBTI) und der Bowenman-Birk-Inhibitor (BBI) stellen ihm ähnliche Abkömmlinge dar, welche als kompetitive Inhibitoren der KLKs agieren (Masurier et al., 2018).

Für KLK6 wurde ein potenter Inhibitor, eine Variante des humanen Amiloidvorläuferproteins Kunitz Protease Inhibitor (APPI), entwickelt. Für die Brustkrebszelllinie BT20, welche eine hohe Metastasentendenz zeigt und KLK6 im Vergleich zu den anderen Kallikrein-ähnlichen Peptidasen vermehrt exprimiert, konnten einige interessante Ergebnisse gezeigt werden. Werden die Brustkrebszellen mit diversen Konzentrationen, 10, 50 oder 100 nM, des neu entwickelten Inhibitors APPI-4M behandelt, so zeigte sich ein signifikanter Rückgang der invasiven Zellen, welche das Matrixgel im Sinne einer Metastasierung durchwanderten. Je nach eingesetzter Konzentration konnte ein Rückgang um 20%, 24% und sogar 37% verzeichnet werden. Zudem wurde ein *scratch-assay* durchgeführt, in welchem nach 24 Stunden nach Verletzung der Oberfläche der Prozentsatz der Rekolonisation evaluiert wurde. Die mittels des Inhibitors APPI-4M behandelten Zellen zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine signifikant verminderte Kolonisation der Oberfläche, welche auf die durch den Inhibitor herbeigeführt verminderte Migration zurückzuführen ist. Blockade von KLK6 mittels des APPI stellt somit einen attraktiven Angriffspunkt für Mammakarzinome dar, welche eine erhöhte Expression von KLK6 aufweisen (Sananes et al., 2018).

Die Entwicklung von Cyclopeptiden, ringförmigen Peptiden mit erhöhter Stabilität, zählt zu den wichtigen synthetisch entwickelten Inhibitoren der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen. 2016 konnte ein KLK7-Inhibitor durch den Austausch einzelner Aminosäuren auf der Basis von *sunflower trypsin inhibitor-1* (SFTI-1) designed werden, welcher zur Hemmung einer Schuppenbildung in der Epidermis führte (de

Veer et al., 2016). Auch für KLK5 und KLK14 konnten potente Inhibitoren entwickelt werden (Jendry et al., 2016, de Veer et al., 2016)

Neben den natürlichen, physiologischen KLK-Inhibitoren und den oben erwähnten synthetischen Varianten des Kunitz-type Inhibitors bestehen einige nonphysiologische Inhibitoren. Dazu zählen natürliche Proteine und Peptide, welche potente KLK-Inhibitoren darstellen. Peptidaldehyde üben durch eine Bildung eines Hemiacteal-Intermediats durch Reaktion mit dem katalytischen Serinrest von Kallikrein-ähnlichen Peptidasen eine hemmende Funktion aus. Die Aktivität von KLK8 wird durch die Peptidaldehyde Leupeptin und Antipain merklich gehemmt (Rajakapse et al., 2005). Einen unspezifischen Proteaseninhibitor stellen zudem Depsipeptides dar, Bestandteile, welche aus dem Bakterium *Chondromyces crocatus* gewonnen werden konnten (Krastel et al., 2011). Des Weiteren können natürliche heterozyklische Derivate wie Isocumarine und Fukugetin die KLK-Aktivität beeinflussen.

Zwei potente und bekannte synthetische Inhibitoren der Serinproteasen sind 4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid (AEBSF) und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF). AEBSF ist ein wasserlöslicher Serinproteaseinhibitor, welcher Proteasen wie Chymotrypsin, Plasmin, Thrombin, Kallikrein und Trypsin inhibiert. PMSF inhibiert durch eine irreversible Bindung an das aktive Serin ebenfalls Serinproteasen, allen voran Chymotrypsin, Trypsin und Thrombin. Dabei beruht die Inhibition auf einer kovalenten Bindung zwischen PMSF und der Serinprotease. Zudem inhibiert es KLK8 und kann als pharmakologisches Werkzeug genutzt werden (Eissa et al., 2011). Chlormethylketone stellen eine unspezifische Gruppe an Inhibitoren der Serinproteasen dar. Eine Inhibierung von KLK8 durch Chlormethylketone, insbesondere durch Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-Chlormethylketon, ist beschrieben worden. (Shaw, 1990). Sulfonylfluoride sind als kovalente Inhibitoren von Serinproteasen beschrieben.

Weitere Inhibitoren, natürliche Peptide und Proteine, von Serinproteasen, welche zudem auch die Aktivität von KLK8 hemmen, sind beschrieben. Dazu zählen Diisopropylfluorophosphat (DFP) Antipain, Aprotinin, Leupeptid, und Benzamidin (Rajakapse et al., 2005).

Zielgerichtete Therapien mit spezifischen Antikörpern sind aus der modernen Tumorthherapie nicht mehr wegzudenken. Um Immunreaktionen des Körpers bei Antikörpergabe zu vermeiden, sollten Therapeutika möglichst humanisierte Antikörpersequenzen beinhalten. Für Atemwegserkrankungen konnte ein KLK1-Antikörper entwickelt werden. Im Metacholinprovokationstest konnte durch den Antikörper im Asthma-Schafmodell eine allergenvermittelte Bronchokonstriktion und Bronchialhyperreagibilität inhibiert werden (Sexton et al., 2009). Im Mausmodell für Multiple Sklerose konnte durch den Einsatz von neutralisierenden KLK6-Antikörpern ein Rückgang der Erkrankung in Rückenmark und Gehirn beobachtet werden (Scarbrick et al., 2012). Eine weitere therapeutische Möglichkeit stellt die Entwicklung von spezifischen Aptameren dar. Bei Aptameren handelt es sich um kurze einzelsträngige Oligonukleotide oder Peptide, welche durch ihre molekulare Struktur verschiedene Substanzen binden können. Pegaptanib wurde in den USA für die feuchte altersbedingte Makuladegeneration zugelassen. Dabei handelt es sich um ein RNA-Aptamer, welches hochspezifisch an VEGF binden kann. Auch wurden bereits Aptamere, wie der CG3-Aptamer, welcher sich gegen aktives KLK3 richtet, zur Frühdetektion von Prostatakrebs entwickelt (Marangoni et al., 2015). Ein auf Aptamere basierender Wirkstoff existiert in der Tumorthherapie bislang noch nicht. Aktuell laufen jedoch mehrere vielversprechende Studien.

Die zukünftige Entwicklung von spezifischeren KLK-Inhibitoren stellt einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz dar.

Jedoch erschweren die Homologie und die strukturelle Ähnlichkeit der verschiedenen Serinproteasen untereinander die Entwicklung proteasenspezifischer Antikörper (Sananes et al., 2018).

5.9 Möglichkeiten des klinischen Einsatzes der KLKs

Die Expressionsanalysen von KLK8 auf mRNA-Ebene mittels qPCR ergaben ein verkürztes krankheitsfreies Überleben bei Patientinnen mit überexprimierten KLK8 Werten. Brustkrebs ist eine sehr heterogene Erkrankung, weswegen ein einziger Marker nicht ausreicht, um die Gesamtheit von Diagnose, Therapie und Therapieansprechen sowie Prognose zu erfassen. Molekulare Tests, welche verschiedene Gene neben etablierten Tumormarkern einbeziehen, haben das

Potential, die Diagnostik und Therapie von Brustkrebs zu revolutionieren (Schnitt, 2010). Ein erfolgreiches Beispiel ist das „*four-kallikrein-serum-panel*“, welches für den Einsatz beim Prostatakarzinom eingesetzt werden kann. Dieses analysiert freies, gesamtes und intaktes PSA sowie KLK2 und kann das Ergebnis einer Prostata-Biopsie vorhersagen. Die Rate an durchgeführten, nicht notwendigen Biopsien, und dadurch vermiedenen Folgekomplikationen führt zur Verminderung von Überdiagnostizierung und Überbehandlung (Scorilas and Mavridis, 2014). Auch für das Ovarial- und Bronchialkarzinom wurden solche Panels beschrieben. Dieses Modell könnte sich auch auf den Brustkrebs übertragen lassen. Identifiziert man beispielsweise Serummarker, welche zwischen Fibroadenomen und Brustkrebs unterscheiden, könnten überflüssige Biopsien vermieden werden.

Gencluster zu identifizieren und zu analysieren erlaubt, die Biologie und molekulare Mechanismen des Tumors besser zu verstehen und Rückschlüsse auf das Therapieansprechen zu ziehen. Die KLK8 mRNA Expression könnte Teil eines multigenetischen Assays werden. Einzelne Parameter reichen nämlich meist nicht mehr aus, um die Gesamtheit des Tumors zu erfassen. Während einige Tumoreigenschaften wie der Lymphknotenstatus, die Tumorgöße und vaskuläre Infiltration direkt mit der Prognose verknüpft sind, stellen andere Parameter wie der histologische Subtyp, die Hormonrezeptoren und Wachstumsfaktoren Parameter für Prognose und Therapieansprechen dar. Ein hohe Mitoserate und somit ein hoher Proliferationsindex sind einerseits Indizien für ein aggressiveres Tumorwachstum, andererseits stellen sie durch die hohe Zellteilung einen Indikator für eine effektive Chemotherapie dar (Györfly et al., 2015). Kallikrein-ähnliche Peptidasen helfen, die biologische Gesamtheit des Tumors zu erfassen und können der Indikationsstellung für Chemotherapien dienen. Die Expression von KLK4 und KLK7 hat einen Einfluss auf das Ansprechen einer Paclitaxel-haltigen Chemotherapie in Ovarialkrebspatientinnen. Eine Überexpression von KLK4 in SKOV-3 Zellen zeigte ein schlechteres Ansprechen auf die Chemotherapie (Dong et al., 2013). Der gleiche Effekt konnte auch für KLK7 beobachtet werden (Loessner et al., 2012). Für den Einfluss von KLK8 auf das Ansprechen von Chemotherapien in Brustkrebs liegen aktuell noch keine Daten vor. Durch unsere Erkenntnisse von erhöhten KLK8 Werten in verstärkt proliferierenden Tumoren ist jedoch ein Einfluss auf das Ansprechen denkbar.

5.10 Schlussfolgerung

Diese Studie ist die erste, die die KLK8 mRNA Expression in zwei homogenen Patientenkohorten mit TNBC sowie HR+-Mammakarzinomen untersucht. Die Expression von KLK8 ist im TNBC signifikant höher als in HR+-Mammakarzinomen. Die mRNA Level sind für beide Brustkrebssubtypen unabhängig von etablierten klinischen Parametern. Beim TNBC ist die KLK8 mRNA Expression ein statistisch signifikanter, unabhängiger, ungünstiger prognostischer Faktor für das krankheitsfreie Überleben der Patientinnen.

Aus den Erkenntnissen dieser und früherer Studien lässt sich ableiten, dass KLK8 als valider prädiktiver Biomarker in TNBC verwendet werden kann. Da KLK8 mit einem ungünstigen Outcome für die Patientinnen vergesellschaftet ist, stellt dieses Enzym einen attraktiven Angriffspunkt für eine individualisierte und risikoadaptierte Tumorthherapie dar.

6. Zusammenfassung

KLK8 gehört zur Familie der 15 Kallikrein-ähnlichen Peptidasen (KLKs), die als vielversprechender Pool von Biomarkern für verschiedene Krebsarten dienen. In menschlichen Geweben sind KLKs oft koexprimiert und funktionell miteinander verbunden. Anhand einer Kohorte von Brustkrebspatientinnen, die verschiedene molekulare Subtypen (Luminal A, Luminal B, TNBC, unterschiedlicher HER2/neu-Status) sowie neoadjuvante und adjuvante chemotherapeutische Behandlungsschemata umfasste, zeigten Michaelidou et al., dass eine erhöhte KLK8 mRNA Expression mit einer ungünstigen Prognose für die Patientinnen assoziiert ist. In der vorliegenden Studie haben wir die KLK8 mRNA Expression in einer homogenen Brustkrebsentität untersucht, die triple-negative invasiv-duktales (TNBC) Patienten umfasst.

127 Patienten mit TNBC und zum Vergleich eine Kohorte mit 144 hormonrezeptorpositiven (HR+) Brustkrebspatientinnen wurden in diese retrospektive Studie eingeschlossen. Alle Patienten wurden nicht mit einer neoadjuvanten Chemotherapie behandelt und wiesen keine primäre Metastasierung auf. Die TNBC-Patienten wurden gemäß ihrer KLK8 mRNA Expression in zwei Untergruppen (hoch gegen niedrig, Cut-off: Median) eingeteilt und Assoziationen mit etablierten klinischen Parametern und der Prognose wurden untersucht.

In unserer Studie zeigten TNBC-Patienten eine signifikant höhere KLK8 mRNA Expression als HR+-Brustkrebspatienten. Chi-Quadrat-Tests zeigten keine Assoziation zwischen dichotomisierten KLK8 mRNA Expressionspiegeln (hoch / niedrig) mit etablierten klinischen Parametern bei Brustkrebs wie Alter, Lymphknotenstatus, Tumorgröße und Grading.

Sowohl in der uni- als auch multivariaten Cox-Regressionsanalyse waren erhöhte KLK8 mRNA Spiegel in Tumorgewebe von TNBC-Patienten signifikant mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben assoziiert.

Zusammenfassend zeigen wir, dass die KLK8 mRNA Expression als unabhängiger prognostischer Biomarker in triple-negativen Brustkrebspatientinnen (TNBC) dienen kann.

KLK8 belongs to the family of 15 kallikrein-related peptidases (KLKs), which serve as a promising pool of biomarkers for different types of cancer. In human tissues, KLKs are often co-expressed and functionally linked to each other. Using a breast cancer cohort encompassing different molecular subtypes (luminal A, luminal B, TNBC, different HER2 status) as well as both neoadjuvant and adjuvant chemotherapeutic treatment schemes, Michaelidou and co-workers showed that elevated KLK8 mRNA expression is associated with an unfavorable prognosis of the patients. In the present study, we aimed at analyzing KLK8 mRNA expression in a homogenous breast cancer subgroup encompassing triple-negative invasive-ductal (TNBC) patients.

127 patients with TNBC, and for comparison a cohort of 144 hormone receptor positive (HR+) breast cancer patients, were included in this retrospective study. None of the patients were treated with neoadjuvant chemotherapy, nor did they have primary metastasis. The TNBC patients were divided into two subgroups according to their KLK8 mRNA expression (high vs low, cut-off: median) and associations with established clinical parameters and prognosis were explored.

In our study, TNBC patients show a significantly higher KLK8 mRNA expression than HR+ breast cancer patients. Chi-Square tests show no association between dichotomized KLK8 mRNA expression levels (high/low) and established clinical parameters in breast cancer such as age, lymph node status, tumor size and grading.

In both uni- and multivariate Cox regression analyses, elevated KLK8 mRNA levels in tumor tissues of TNBC patients were significantly linked with shorter disease-free survival.

In conclusion, we demonstrate that higher KLK8 levels serve as an unfavorable independent prognostic marker in the subgroup of triple-negative breast cancer (TNBC) patients.

7. Literaturverzeichnis

- Abdollahi, A., Eternadi, M., 2015. Pathological characteristics of triple-negative breast cancer at main referral teaching hospital, April 2014 to April 2015, Tehran, Iran. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research* 10 (4), 200–205.
- Andreasen, P.A., Egelund, R., Petersen, H., 2000: The plasminogen activation system in tumor growth, invasion and metastasis. *Cellular and Molecular Life Science* 57(1), 25-40
- Ahmed N., Dorn, J., Napieralski, R., Drecoll, ., Kotsch, M., Goettig, P., Zein, E., Avril, S., Kiechle, M., Diamandis, E.P., Schmitt, M., Magdolen, V., 2016. Clinical relevance of kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) and 8 (KLK8) mRNA Expression in advanced serous ovarian cancer. *Biological Chemistry* 1;397 (12), 1265-1676
- Applied Biosystems. Data Analysis on the ABI PRISM 7700: Setting Baselines and Thresholds, 1–12.
- Avgeris, M., Mavridis, K., Scorilas, A., 2012. Kallikrein-related peptidases in prostate, breast, and ovarian cancers: from pathology to clinical relevance. *Biological Chemistry* 393 (5), 301–317.
- Avgeris, M., Papachristopoulou, G., Polychronis, A., Scorilas, A., 2011. Down-regulation of kallikrein-related peptidase 5 (KLK5) Expression in breast cancer patients: a biomarker for the differential diagnosis of breast lesions. *Clinical Proteomics* 8 (1), 1–11.
- Bacac, M., Stamenkovic, I., 2008: Metastatic cancer cell. *Annual Review of Pathology*. 3, 221-247.
- Barrett, A.J., Tolle, T.D., Rawlings, N.D., 2003. Managing peptidases in the genomic era. *Biological Chemistry* 384, 873e882.
- Beaufort, N., Plaza, K., Utzschneider, D., Schwarz, A., Burkhart, J.M., Creutzburg, S., Debela, M., Schmitt, M., Ries, C., Magdolen, V., 2010. Interdependence of kallikrein-related peptidases in proteolytic networks. *Biological Chemistry* 391 (5), 581-587
- Beck, J.C., Sickinger, A.G., 2016. Inhibition of kallikrein-related peptidases 5 and 7 by grafting serpin reactive-centerloop sequences onto sunflower trypsin inhibitor-1 (SFTI-1). *ChemBioChem* 17 (8), 719-726.

- Bhowmick, N.A., Chytil, A., Plieth, D., Gorska A.E., Dumont, N., Shappell, S., Washington M.K., Neilson, E.G, Moses H.L., 2004. TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science* 6;303(5659), 848-851.
- Borgoño, C.A., Diamandis, E.P., 2004. The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nature* 4 (11), 876–890.
- Brunello, A., Borgato, L., Basso, U., Lumachi, F., Zagonel, V., 2013. Targeted approaches to triple-negative breast cancer: current practice and future. *Current Medicinal Chemistry* (20), 605–612.
- Cané, S., Bignotti, E., Bellone, S., Palmieri, M., las Casas, L. de, Roman, J.J., Pecorelli, S., Cannon, M.J., O'brien, T., Santin, A.D., 2004. The novel serine protease tumor-associated differentially expressed gene-14 (KLK8/Neuropilin/Ovasin) is highly overexpressed in cervical cancer. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 190 (1), 60–66.
- Carey, L.A., Perou, C.M., Livasy, C.A., Dressler, L.G., Cowan, D., Conway, K., Karaca, G., Troester, M.A., Tse, C.K., Edmiston, S., Deming, S.L., Geradts, J., Cheang, M.C.U., Nielsen, T.O., Moorman, P.G., Earp, H.S., Millikan, R.C., 2006. Race, breast cancer subtypes and survival in the caroline breast cancer study. *Journal of the American Medical Association* 295 (29521), 2492–2502.
- Carl Roth GmbH + Co. KG. Gebrauchsanweisung Roti Load, 1–2.
- Chang, A., Yousef, G.M., Scorilas, A., Sismondi, P., Ponzzone, R., Diamandis, E.P., 2002. Human kallikrein gene 13 (KLK13) Expression by quantitative RT-PCR: an independent indicator of favorable prognosis in breast cancer. *British Journal of Cancer* (86), 1457–1464.
- Chen, Z.-L., Yoshida, S., Kato, K., Momota, Y., 1995. Expression and acitivity-dependent changes of a novel limbic-serine protease gene in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience* (15), 5088–5097.
- Corning Life Sciences. Effective Blocking Procedures - ELISA Technical Bulletin - No. 3.
- De Veer, S.J., Swedberg, J.E., Brattsand, M., Clements, J.A., Harris, J.M. 2016. Exploring the active site bindingspecificity of kallikrein-related peptidase 5 (KLK5) guides the design of new pepitde subtrates and inhibitors. *Biological Chemistry* 397 (12), 1237-1249.

- De Veer, S.J., Furio, L., Swedberg, J.E., Munro, C.A., Brattsand, M., Clements, J.A., Hovnanian, A., Harris, J.M., 2017. Selective substrates and inhibitors for kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) shed light on KLK proteolytic activity in the stratum corneum. *Journal of Investigative Dermatology* 137 (2), 430-439.
- Debela, M., Magdolen, V., Grimminger, V., Sommerhoff, C., Messerschmidt, A., Huber, R., Friedrich, R., Bode, W., Goettig, P., 2006. Crystal structures of human tissue kallikrein 4: activity modulation by a specific zinc binding site. *Journal of Molecular Biology* 362, 1094e1107.
- Debela, M., Magdolen, V., Skala, W., Elsässer, B., Schneider, E.L., Craik, C.S., Biniossek, M.L., Schilling, O., Bode, W., Brandstetter, H., Goettig, P., 2018. Structural determinants of specificity and regulation of activity in the allosteric loop network of human KLK8/neuropsin. *Scientific Reports* 8 (1), 19705
- Dong, Y., Stephens, C., Walpole, C., Swedberg, J.E., Boyle, G.M., Parson, P.G., McGuckin, M.A., Harris, J.M., Clements, J.A. 2013. Paclitaxel resistance and multicellular spheroid formation are induced by kallikrein-related peptidase 4 in serous ovarian cancer cells in an ascites mimicking microenvironment. *PLoS One* 8 (2) e57056
- Dvorak, H.F. 1986: Tumors: Wounds that do not heal. *New England Journal of Medicine* 215 (26), 1650-1659
- Epstein, R.J. 2003. *Human molecular biology*. an introduction to the molecular basis of health and disease. University Press, Cambridge [ISBN 0-521-64481-X](#), 26.
- Eiermann, W., 1999. Primär systematische Therapie beim Mammakarzinom. *Oncology Research and Treatment* 22 (2), 14–15.
- Eissa, A., Amodeo, V., Smith, C.R., Diamandis, E.P., 2011. Kallikrein-related peptidase-8 (KLK8) is an active serine protease in human epidermis and sweat and is involved in a skin barrier proteolytic cascade. *The Journal of Biological Chemistry* 286 (1), 687–706.
- Eissa, A., Diamandis, E.P., 2008. Human tissue kallikreins as promiscuous modulators of homeostatic skin barrier functions. *Biological chemistry* 389 (6), 669-680
- Fisher B., Redmond C., Fisher, E.R., Caplan, R., 1988. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from

- national surgical adjuvant breast and bowel project protocol B-06. *Journal of Clinical Oncology* (6), 1076–1087.
- Foekens, J.A., Diamandis, E.P., Yu, H., Look, M.P., Meijer-van Gelder, M.E., van Putten, W.L., Klijn, J.G., 1999. Expression of prostate-specific antigen (PSA) correlates with poor response to tamoxifen therapy in recurrent breast cancer. *British Journal of Cancer* 79 (5-6), 888–894.
- Fritzsche, F., Gansukh, T., Borgeño, C.A., Burkhardt, M., Pahl, S., Mayordomo, E., Winzer, K.-J., Weichert, W., Denkert, C., Jung, K., Stephan, C., Dietel, M., Diamandis, E.P., Dahl, E., Kristiansen, G., 2006. Expression of human Kallikrein 14 (KLK14) in breast cancer is associated with higher tumour grades and positive nodal status. *British Journal of Cancer* 94 (4), 540–547.
- GE Healthcare Life Sciences. Western blotting principles and methods.
- Gerlach, R.F., Souza, A.P., Cury, J.A., Line, S.R.P., 2000. Effect of lead, cadmium and zinc on the activity of enamel matrix proteinases in vitro, *European Journal of J. Oral Science* 108, 327e334.
- Gilcrease, M.Z., 2010. American society of clinical oncology/college of american pathologist's guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Breast Diseases: A Year Book Quarterly* 21 (4), 336–337.
- Glynn, S.A., Boersma B.J, Dorsey T.H., Yi, M., Yfantis, H.G., Ridnour, L.A., Martin, D.N., Switzer, C.H., Hudson, R.S., Wink, D.A., Lee, D.H., Stephens, R.M., Ambis, S., 2010: Increased NOS2 predicts poor survival in estrogen receptor-negative breast cancer patients. *The Journal of clinical investigation* 120 (11), 3843-54
- Goettig, P., Magdolen, V., Brandstetter, H. 2010. Natural and synthetic inhibitors of kallikrein-related peptidases (KLKs). *Biochimie* 93, 1546-1567
- Goyal, J., Smith, K.M., Cowan, J.M., Wazer, D.E., Lee, S.W., Band, V., 1998. The role for NES1 serine protease as a novel tumor suppressor. *Cancer Research* (58), 4782–4786.
- Guillon-Munos, A., Oikonomopoulou, K., Michel, N., Smith, C.R., Petit-Courty, A., Canepa, S., Reverdiau, O., Heuze-Vourc'h, N., Diamandis, E.P., Courty, Y., 2011. Kallikrein-related peptidase 12 hydrolyzes matricellular proteins of the CCN family and modifies interactions of CCN1 and CCN5 with growth factors. *Journal of biological chemistry* 286 (29), 25505-25518

- Györfy, B., Hatzis, C., Sanft, T., Hofstatter, E., Aktas, B., Pusztai, L., 2015. Multigene prognostic tests in breast cancer: Past, present, future. *Breast cancer research : BCR* 17, 11.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell Issue* 100 (1), 57-70
- Harris, L., Fritsche, H., Mennel, R., Norton, L., Ravdin, P., Taube, S., Somerfield, M.R., Hayes, D.F., Bast, R.C., 2007. American society of clinical oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25 (33), 5287–5312.
- Hering, E., Schönfelder, G., 2012. *Sensoren in Wissenschaft und Technik: Funktionsweise und Einsatzgebiete*, 1. Aufl. ed. Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden.
- Hirata, A., Yoshida, S., Inoue, N., Matsumoto-Miyai, K., Ninomiya, A., Taniguchi, M., Matsuyama, T., Kato, K., Iizasa, H., Kataoka, Y., Yoshida, N., Shiosaka, S., 2001. Abnormalities of synapses and neurons in the hippocampus of neuropsin-deficient mice. *Molecular and Cellular Neurosciences* 17 (3), 600–610.
- Holzschneider, L., Biermann, J.C., Kotzsch, M., Prezas, P., Farthmann, J., Baretton, G., Luther, T., Tjan-Heijnen, V.C.G., Talieri, M., Schmitt, M., Sweep, F.C.G.J., Span, P.N., Magdolen, V., 2006. Quantitative reverse transcription-PCR assay for detection of mRNA encoding full-length human tissue kallikrein 7: Prognostic relevance of KLK7 mRNA Expression in breast cancer. *Clinical Chemistry* 52 (6), 1070–1079.
- Hotary, K., Li X.Y., Allen, E., Stevens, S.L., Weiss, S.J., 2006. A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program. *Genes & Development* 20 (19), 2673-2686
- Jeong, S., Han, S.R., Lee, Y.J., Lee, S.W. 2010. Selection of RNA aptamers specific to activate prostate-specific antigen. *Biotechnology Letters* 32
- Kalinska, M., Meyer-Hoffert, U., Kantyka, T., Potempa, J., 2016. Kallikreins - The melting pot of activity and function. *Biochimie* 122, 270–282.
- Kantyka, T., Fischer, J., Wu, Z., Declercq, W., Reiss, K., Schröder, J.-M., Meyer-Hoffert, U., 2011. Inhibition of kallikrein-related peptidases by the serine protease inhibitor of Kazal-type 6. *Peptides* 32 (6), 1187–1192.

- Kavanagh, J.P., 1985. Sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc, citrate and chloride content of human prostatic and seminal fluid. *Journal of Reproduction and Fertility* 75, 35e41.
- Krastel, P., Liechty, B.M., Schmitt, E., Schreiner, E.P., 2013. Use of cyclic decapeptides to inhibit kallikrein 7. US Patent 20130172267.
- Kishi, T., Cloutier, S.M., Kündig, C., Deperthes, D., Diamandis, E.P., 2006. Activation and enzymatic characterization of recombinant human kallikrein 8. *Biological Chemistry* 387, 723e731.
- Kioulafa, M., Kaklamanis, L., Stathopoulos, E., Mavroudis, D., Georgoulas, V., Lianidou, E.S., 2009. Kallikrein 10 (KLK10) methylation as a novel prognostic biomarker in early breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 20 (6), 1020–1025.
- Kishi, T., Grass, L., Soosaipillai, A., Shimizu-Okabe, C., Diamandis, E.P., 2003. Human Kallikrein 8: Immunoassay Development and Identification in Tissue Extracts and Biological Fluids. *Clinical Chemistry* (49), 87–96.
- Kryza, T., Silva, M.L., Loessner, D., Heuzé-Vourc'h, N., Clements, J.A., 2016. The kallikrein-related peptidase family: Dysregulation and functions during cancer progression. *Biochimie* 122, 283–299.
- Kurlender, L., Borgono, C., Michael, I.P., Obiezu, C., Elliott, M.B., Yousef, G.M., Diamandis, E.P., 2005. A survey of alternative transcripts of human tissue kallikrein genes. *Biochimica et biophysica acta* 1755 (1), 1–14.
- Lai, L.C., Erbas, H., Lennard, T.W., Peaston, R.T., 1996. Prostate-specific antigen in breast cyst fluid: Possible role of prostate-specific antigen in hormone-dependent breast cancer. *International Journal of Cancer* (66), 743–746.
- Lakhani, S.R., van de Vijver, M.J., Jacquemier, J., Anderson, T.J., Osin, P.P., McGuffog, L., Easton, D.F., 2002. The pathology of familial breast cancer: Predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 20 (9), 2310–2318.
- Lawrence, M.G., Lai J., Clements, J.A., 2010. Kallikreins on steroids: structure, function, and hormonal regulation of prostate-specific antigen and the extended kallikrein locus. *Endocrine Reviews* 31,407-446.

- Li, X., Liu, J., Wang, Y., Zhang, L., Ning, L., Feng, Y., 2009. Parallel underExpression of kallikrein 5 and kallikrein 7 mRNA in breast malignancies. *Cancer Science* 100 (4), 601–607.
- Liu, X., Quan, B., Tian, Z., Xi, H., Jia, G., Wang, H., Zhang, L., Liu, R., Ma, C., Han, F., Li, H., Yuan, F., 2017. Elevated Expression of KLK8 predicts poor prognosis in colorectal cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 88, 595–602.
- Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K., 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications* 4 (6), 357–362.
- Loessner, D., Quent, M.C., Kraemer, J., Weber, E.C., Hutmacher, D.W., Magdolen, V., Clements, J.A. 2012. Combined Expression of KLK4, KLK5, KLK6, and KLK7 by ovarian cancer cells leads to decreased adhesion and paclitaxel-induced chemoresistance. *Gynecologic Oncology* 127 (3), 569-578.
- Lovgren, J., Airas, K., Lilja, H., 1999. Enzymatic action of human glandular kallikrein 2 (hK2). Substrate specificity and regulation by Zn²⁺ and extracellular protease inhibitors. *European Journal of Biochemistry* 262, 781-789.
- Luo, L.-Y., Diamandis, E.P., Look, M.P., Soosaipillai, A.P., Foekens, J.A., 2002. Higher Expression of human kallikrein 10 in breast cancer tissue predicts tamoxifen resistance. *British Journal of Cancer* 86 (11), 1790–1796.
- Luo, L.-Y., Jiang, W., 2006. Inhibition profiles of human tissue kallikreins by serine protease inhibitors, *Biological Chemistry* 387, 813e816.
- Magklara, A., Brown, T.J., Diamandis, E.P., 2002. Characterization of androgen receptor and nuclear receptor co-regulator Expression in human breast cancer cell lines exhibiting differential regulation of kallikreins 2 and 3. *International Journal of Cancer* 100 (5), 507–514.
- Magklara, A., Scorilas, A., Katsaros, D., Massobrio, M., Yousef, G.M., Fracchioli, S., Danese, S., Diamandis, E.P., 2001. The human KLK8 (Neuropsin/Ovasin) gene: Identification of two novel splice variants and its prognostic value in ovarian cancer. *Clinical Cancer Research* (7), 806–811.
- Mahmood, T., Yang, P.-C., 2012. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences* 4 (9), 429–434.

- Malm, J., Hellman, J., Hogg, P., Lilja, H., 2000. Enzymatic action of prostate-specific antigen (PSA or hK3): substrate specificity and regulation by Zn(2p), a tight-binding inhibitor. *The Prostate* 45, 132e139.
- Marangoni, K., Neves, A.F., Roucha, R.M., Faria, P.R., Alves, P.T., Souza, A.G., Fujimura, P.T., Santos, F.A.A., Araujo, T.G., Ward, L.S., Goulart, L.R. 2015. Prostate-specific RNA aptamer: promising nucleic acid antibody-like cancer detection. *Scientific Reports* 5, 12090
- Masurier, N., Arama, D.P., El Amri, C., Lisowski, V., 2018. Inhibitors of kallikrein-related peptidases: an overview. *Medicinal Research Reviews* 38 (2), 655–683.
- Mavridis, K., Scorilas, A., 2010. Prognostic value and biological role of the kallikrein-related peptidases in human malignancies. *Future Oncology (London, England)* 6 (2), 269–285.
- Michaelidou, K., Ardavanis, A., Scorilas, A., 2015. Clinical relevance of the deregulated kallikrein-related peptidase 8 mRNA Expression in breast cancer: A novel independent indicator of disease-free survival. *Breast Cancer Research and Treatment* 152 (2), 323–336.
- Mierke, C.T., Frey, B., Fellner, M., Herrmann, M., Fabry, B. 2011. Integrin $\alpha 5 \beta 1$ facilitates cancer cell invasion through enhanced contractile forces. *Journal of Cellular Science* 124(3), 369-83.
- Mignatti, P., Rifkin, D.B., 1993: *Biology and Biochemistry of Proteinases in Tumor Invasion*. *Physiological Reviews*, 73(1), 161-185.
- Millikan, R.C., Newman, B., Tse, C.-K., Moorman, P.G., Conway, K., Dressler, L.G., Smith, L.V., Labbok, M.H., Geradts, J., Bensen, J.T., Jackson, S., Nyante, S., Livasy, C., Carey, L., Earp, H.S., Perou, C.M., 2008. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 109 (1), 123–139.
- Mukai, S., Yorita, K., Yamasaki, K., Nagai, T., Kamibeppu, T., Sugie, S., Kida, K., Onizuka, C., Tsukino, H., Kamimura, T., Kamato, T., Kataoka, H., 2015. Expression of human kallikrein 1-related peptidase 4 (KLK4) and MET phosphorylation in prostate cancer tissue: immunohistochemical analysis. *Human Cell* 28(3), 133-142
- Nam, J.M., Onodera, Y., Bissell, M.J., Park, C.C., 2010: Breast cancer cells in three-dimensional culture display an enhanced radioresponse after coordinate targeting of integrin $\alpha 5 \beta 1$ and fibronectin. *Cancer Research* 70(13), 5238-48.

- Paliouras, M., Diamandis, E.P., 2007. Coordinated steroid hormone-dependent and independent Expression of multiple kallikreins in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment* 102 (1), 7–18.
- Pampalakis, G., Prosnikli, E., Agalioti, T., Vlahou, A., Zoumpourlis, V., Sotiropoulou, G., 2009. A tumor-protective role for human kallikrein-related peptidase 6 in breast cancer mediated by inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Research* 69 (9), 3779–3787.
- Paliouras M., Diamandis, E.P., 2008 Androgens act synergistically to enhance estrogen-induced upregulation of human tissue kallikreins 10, 11, and 14 in breast cancer cells via a membrane bound androgen receptor. *Molecular Oncology* 1 ,413–424
- Papachristopoulou, G., Avgeris, M., Scorilas, A., 2009. Expression analysis and study of KLK4 in benign and malignant breast tumours. *Thrombosis and Haemostasis: Internal medicine* 101 (2), 381-387
- Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnson, H., Aksel, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lonning, P.E., Borresen-Dalle, A.L., Brown, P.O., Botstein, D., 2000. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* (406), 747–752.
- Perou, C.M., Børresen-Dale, A., 2010. Systems biology and genomics of breast cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (2), a003292.
- Planche, A., Bacac, M., Provero, P., Fusco, C., Delorenzi, M., Stehle, J.C., Stamenkovic, I., 2011. Identification of prognostic molecular features in the reactive stroma of human breast and prostate cancer. *PLoS One* 6(5):e18640.
- Rajapakse, S., Ogiwara, K., Takano, N., Moriyama, A., Takahashi, T., 2005. Biochemical characterization of human kallikrein 8 and its possible involvement in the degradation of extracellular matrix proteins. *FEBS letters* 579 (30), 6879–6884.
- Roemisch, J., Gray, E., Hoffmann, J.N., Wiedermann, C.J., 2002. Antithrombin: a new look at the actions of a serine protease inhibitor. *Blood Coagulation Fibrinolysis*. 13 (8), 657-670.
- Sano, A., Sangai, T., Maeda, H., Nakamura, M., Hasebe, T., Ochiai, A., 2007. Kallikrein 11 expressed in human breast cancer cells releases insulin-like growth

- factor through degradation of IGFBP-3. *International Journal of Oncology*. 30 (6), 1493-1498
- Sananes, A., Cohen, I., Shahar, A., Hockla A., De Vita, E., Miller, A.K., Radisky, S., Papo, N. 2018. A potent, proteolysis-resistant inhibitor of kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) for cancer therapy, developed by combinatorial engineering. *Journal of Biological Chemistry*. 209, 12663-12680
- Sauter, E.R., Klein, G., Wagner-Mann, C., Diamandis, E.P., 2004. Prostate-specific antigen Expression in nipple aspirate fluid is associated with advanced breast cancer. *Cancer Detection and Prevention* 28 (1), 27–31.
- Scarisbrick, I.A., Yoon, H., Panos, M., Larson, N., Blaber, S.I., Blaber, M., Rodriguez, M. 2012. Kallikrein 6 regulates early CNS demyelination in a viral model of multiple sclerosis. *Brain Pathology* 22 (5), 709-722
- Schnitt, S.J., 2010. Classification and prognosis of invasive breast cancer: From morphology to molecular taxonomy. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology* 23 (2), 60-64.
- Schummer, M., Green, A., Beatty, J.D., Karlan, B.Y., Karlan, S., Gross, J., Thornton, S., McIntosh, M., Urban, N., 2010. Comparison of breast cancer to healthy control tissue discovers novel markers with potential for prognosis and early detection. *PLOS one* 5 (2), 9122.
- Scorilas, A., Mavridis, K., 2014. Predictions for the future of kallikrein-related peptidases in molecular diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 14 (6), 713–722.
- Sexton, D.J., Chen, T., Martik, D., Kuzmic, P., Kuang, G., CHen, J., Nixon, A.E., Zuraw, B.L., Forteza, R.M., Abraham, W.M., Wood, C.R., 2009. Specific inhibition of tissue kallikrein 1 with a human monoclonal antibody reveals a potential role in airway diseases. *Biochemical Journal* 422(2), 383-392
- Shaw, E., 1990. Cysteiny proteinases and their selective inactivation. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 63, 271–347.
- Sher, Y.-P., Chou, C.-C., Chou, R.-H., Wu, H.-M., Wayne Chang, W.-S., Chen, C.-H., Yang, P.-C., Wu, C.-W., Yu, C.-L., Peck, K., 2006. Human kallikrein 8 protease confers a favorable clinical outcome in non-small cell lung cancer by suppressing tumor cell invasiveness. *Cancer Research* 66 (24), 11763–11770.

- Shimizu-Okabe, C., Yousef, G.M., Diamandis, E.P., Yoshida, S., Shiosaka, S., Fahnestock, M., 2001. Expression of the kallikrein gene family in normal and Alzheimer's disease brain. *Neuroreport* 12 (12), 2747–2751.
- Smith, C.J., Osborn, A.M., 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 67 (1), 6–20.
- Stubbs, M.T., Renatus, M., Bode, W., 1998. An active zymogen: unravelling the mystery of tissue-type plasminogen activator. *Biological Chemistry* 379(2), 95-103.
- Talieri, M., Devetzi, M., Scorilas, A., Pappa, E., Tsapralis, N., Missitzis, I., Ardavanis, A., 2012. Human kallikrein-related peptidase 12 (KLK12) splice variants Expression in breast cancer and their clinical impact. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 33 (4), 1075–1084.
- Talieri, M., Devetzi, M., Scorilas, A., Prezas, P., Ardavanis, A., Apostolaki, A., Karameris, A., 2011. Evaluation of kallikrein-related peptidase 5 Expression and its significance for breast cancer patients: association with kallikrein-related peptidase 7 Expression. *Anticancer Research* (31), 3093–3100.
- Tanjore, H., Kalluri, R., 2006. The role of type IV collagen and basement membranes in cancer progression and metastasis. *American Journal of Pathology* 168(3), 715-717
- Thermo Fisher Scientific, 2016. Real-time PCR handbook.
- Tong D., Schuster, E., Seifert, M., Czerwenka, K., Leodolte, S., Zeillinger, R., 2002. Expression of estrogen receptor beta iso- forms in human breast cancer tissues and cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment*, (71), 249 –255
- Tumorzentrum München (Ed.), 2015. Mammakarzinome: Manual: Empfehlung zu Diagnostik, Therapie und Nachsorge, 15th ed. W. Zuckschwerdt Verlag, München.
- Underwood, L.J., Tanimoto, H., Wang, Y., Parmley, T.H., O'Brien, T.J., 1999. Cloning of tumor-associated differentially expressed gene-14, a novel serine protease overexpressed by ovarian carcinoma. *Cancer Research* (59), 4435–4439.
- Wang, S.M., Mao, J., Li, B., Wu, W., Tang, L.L., 2008. Expression of KLK6 protein and mRNA in primary breast cancer and its clinical significance. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*.

- Wang, J.P., Hielscher, A., 2017. Fibronectin: How its aberrant Expression in tumors may improve therapeutic targeting. *Journal of cancer* 8(4), 674-682
- Wang, Z., Ruan, B., Jin, Y., Zhang, Y., Li, J., Zhu, L., Xu, W., Feng, L., Jin, H., Wang, X., 2016. Identification of KLK10 as a therapeutic target to reverse trastuzumab resistance in breast cancer. *Oncotarget* 7 (48), 79494–79502.
- Wolf, W.C., Evans, D.M., Chao, L., Chao, J., 2001. A synthetic tissue kallikrein inhibitor suppresses cancer cell invasiveness. *The American Journal of Pathology* 159 (5), 1797–1805.
- Yang, F., Aubele, M., Walch, A., Gross, E., Napieralski, R., Zhao, S., Ahmed, N., Kiechle, M., Reuning, U., Dorn, J., Sweep, F., Magdolen, V., Schmitt, M., 2017. Tissue kallikrein-related peptidase 4 (KLK4), a novel biomarker in triple-negative breast cancer. *Biological Chemistry* 398 (10), 1151–1164.
- Yousef, G.M., Borgoño, C.A., Scorilas, A., Ponzzone, R., Biglia, N., Iskander, L., Polymeris, M.-E., Roagna, R., Sismondi, P., Diamandis, E.P., 2002. Quantitative analysis of human kallikrein gene 14 Expression in breast tumours indicates association with poor prognosis. *British Journal of Cancer* 87 (11), 1287–1293.
- Yousef, G.M., Kopolovic, A.D., Elliott, M.B., Diamandis, E.P., 2003a. Genomic overview of serine proteases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305 (1), 28–36.
- Yousef, G.M., Polymeris, M.-E., Grass, L., Soosaipillai, A., Chan, P.-C., Scorilas, A., Borgono, C., Harbeck, N., Schmalfeldt, B., Dorn, J., Schmitt, M., Diamandis, E.P., 2003. Human kallikrein 5: A potential novel serum biomarker for breast and ovarian cancer. *Cancer Research* 15;63 (14), 3958–3965.
- Yousef, G.M., Scorilas, A., Kyriakopoulou, L.G., Rendl, L., Diamandis, M., Ponzzone, R., Biglia, N., Gai, M., Roagna, R., Sismondi, P., Diamandis, E.P., 2002. Human kallikrein gene 5 (KLK5) Expression by quantitative PCR: An independent indicator of poor prognosis in breast cancer. *Clinical Chemistry* 48 (8), 1241–1250.
- Yousef, G.M., Scorilas, A., Magklara, A., Memari, N., Ponzzone, R., Sismondi, P., Biglia, N., Abd Ellatif, M., Diamandis, E.P., 2002. The androgen-regulated gene human kallikrein 15 (KLK15) is an independent and favourable prognostic marker for breast cancer. *British Journal of Cancer* 87 (11), 1294–1300.
- Yousef, G.M., Scorilas, A., Nakamura, T., Abd Ellatif, M., Ponzzone, R., Biglia, N., Maggiorotto, F., Roagna, R., Sismondi, P., Diamandis, E.P., 2003. The prognostic

value of the human kallikrein gene 9 (KLK9) in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 78 (2), 149–158.

Yousef, G.M., Yacoub, G.M., Polymeris, M.-E., Popalis, C., Soosaipillai, A., Diamandis, E.P., 2004. Kallikrein gene downregulation in breast cancer. *British Journal of Cancer* 90 (1), 167–172.

Yu, H., Levesque, M., Clark, G.M., Diamandis, E.P., 1998. Prognostic value of prostate-specific antigen for women with breast cancer: A large united states cohort study. *Clinical Cancer Research* (4), 1489–1497.

Zubor, P., Hatok, J., Moricova, P., Kajo, K., Kapustova, I., Mendelova, A., Racay, P., Danko, J., 2015. Gene Expression abnormalities in histologically normal breast epithelium from patients with luminal type of breast cancer. *Molecular Biology Reports* 42 (5), 977–988.

Anhang

Antikörpereigenschaften

Tabelle 26: Antikörpereigenschaften

Antigen	Spezie	Stock solution (mg/ml)	Verdünnung
hK8	Monoclonal mouse IgG _{2b}	0,5	1:250

Menge/Verdünnungen der Pro-KLKs

Tabelle 27: Menge/Verdünnungen der Pro-KLKs

Pro-KLK	Verdünnung	Menge in µl
1	1:10	3
2	1:10	5
3	unverdünnt	5
4	1:10	3
5	unverdünnt	5
6	1:10	2,5
7	unverdünnt	6
8	1:10	20
9	1:10	10
10	1:10	16
11	1:10	20
12	1:10	8
13	1:10	15
14	unverdünnt	33
15	unverdünnt	4

Standardprotokoll für die IHC

Tabelle 27: Standardprotokoll für die immunhistochemische Färbung der Humanen KLK8- Protein-Expression

1	Deparaffinieren und Rehydrierung der Schnitte in Xylol und der absteigenden Alkoholreihe: 2 x 10 min Xylol, 2 x 100% Isopropanol, 1 x 96% Ethanol, 1 x 70% Ethanol, jeweils für 5 min bei RT
2	Waschschritt: 5 min waschen mit TBST (Trispuffer mit 0,005% Tween-20), intermittierende Pufferwechsel, RT
3	Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität: Inkubation der Schnitte mit 3% H ₂ O ₂ (Wasserstoffperoxid), (45 ml destilliertes Wasser + 5 ml 30% H ₂ O ₂), 20 min, RT
4	Blockierung von elektrisch geladenen unspezifischen Bindungsstellen: Inkubation der Schnitte mit 120 µl, 30 min, RT
5	Waschschritt: 3 min waschen mit Leitungswasser, RT
6	Waschschritt: 5 min waschen mit TBST, intermittierender Pufferwechsel, RT
7	Demaskierung der Proteine: Kochen im Druckkochtopf für 4 min mit 1l Citratpuffer bei pH 6,0 für 4 min
8	Waschschritt: 5 min waschen in Leitungswasser, RT
9	Waschschritt: 5 min waschen mit TBST, intermittierender Pufferwechsel, RT
10	Auftragen des Primärantikörpers gegen Humanes Kallikrein 8: Verdünnung des Antikörpers mit ready-to-use Antibody diluent auf 1:250 (Stock concentration 0,5 mg/ml), Auftragen von 120 µl/ Schnitt . 120 µl Antibody diluent anstelle von Primärantikörper als Negativkontrolle. Inkubation in einer Feuchtkammer, 2h, RT
11	Waschschritt: 5 min waschen mit TBST, intermittierender Pufferwechsel, RT
12	Auftragen der Polymer-One-Step-Mischung von Zytomed: 120 µl/ Schnitt, Inkubation für 30 min bei RT
13	Waschschritt: 5 min waschen mit TBST, intermittierender Pufferwechsel, RT
14	Auftragen des DAB plus Substrat Kits von Zytomed: 120 µl/ Schnitt (Mischverhältnis: 1000 µl Puffer + 50 µl Substrat), Inkubation in Feuchtkammer bei RT für 8 min
15	Waschschritt: 5 min waschen mit TBST, intermittierender Pufferwechsel, RT

16	Gegenfärbung: mit Hämatoxylin, 1 min, RT
17	Bläuen: 10 min unter fließendem Leitungswasser, dann Überführen in destilliertes Wasser für 5 min
18	Dehydrierung der Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol: 1 x 70% Ethanol, 1 x 96% Ethanol, 2 x 100% Isopropanol, 2 x Xylol für je 3 min
19	Eindecken mit Pertex

Bei dem Protokoll handelt es sich um eine manuelle Färbung mit der Polymer-One-Step-Färbemethode

Liste der Publikationen

Preis, S., Diersch, S., Dorn, J., Magdolen, V. Clinical relevance of kallikrein-related peptidase 8 (KLK8) in triple-negative breast cancer. ISK 2017, 26.-29. September 2017, Tours, Frankreich. Vortrag.

Preis, S., Diersch, S., Dorn, J., Magdolen, V. Elevated mRNA of kallikrein-related peptidase 8 (KLK8) is associated with shorter disease-free survival in triple-negative breast cancer. DAAD-Workshop, 8-11. Oktober 2016, Brisbane, Australien. Vortrag.

Danksagung

„No one can whistle a symphony. It takes a whole orchestra to play it.” H.E. Luccock

Hinter all den Versuchen und Ergebnissen, entstandenen Ideen und der tatsächlichen Umsetzung stehen viele wundervolle Menschen, welchen ich meinen aufrichtigen Dank entgegenbringen möchte. Zuallererst meiner Doktormutter PD. Dr. med. Julia Dorn für die Möglichkeit, diese Arbeit unter ihrer Betreuung durchzuführen. Danke für die unermüdlichen Antworten auf all meine Fragen, die uneingeschränkte Unterstützung und Anleitung und die stetige Inspiration, als Mensch, als Forscherin und als Ärztin. Für all das Besprechen der Ergebnisse, dem Planen von Versuchen und stetigen neuen Ideen danke ich Prof. Dr. rer. nat. Viktor Magdolen. Er hat mir gezeigt, was Forschung bedeutet und insbesondere wie wichtig und wertvoll der internationale Austausch ist. Ich bin stolz, ein Teil dieses Laborteams zu sein. Auch an PD Dr. med. Holger Bronger als meinen Mentor möchte ich meinen Dank für die hilfreichen Anmerkungen aussprechen.

Sandra Diersch stellte meine wichtigste Ansprechpartnerin während meiner Tätigkeit im Labor dar. Von dem Erlernen der Methoden bis hin zum gemeinsamen Pipettieren habe ich von ihr sehr viel gelernt. Ich danke ihr zudem für die mir entgegengebrachte Freundschaft. Auch Sarah Konrad und Tobias Dreyer, erfahrene, promovierende Naturwissenschaftler auf die ich als Medizinerin hinaufblicken darf, haben mit ihrer unermüdlichen Unterstützung im Labor viel zu dem Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Durch die wundervolle, genaue Arbeit von Sabine Creutzburg und Elisabeth Schüren konnte ich viel lernen und meine praktischen Anwendungen weitergeben. Zudem gilt mein Dank Dr. med. Enken Drecoll, für die Hilfe der Auswertung der Immunhistochemie und Rosalinde Bräuer, für all die Unterstützung bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen und der langwierigen Geduld bei den zahlreichen Experimenten.

Meine Kollegin Nancy Ahmed hat eine wertvolle Vorarbeit an der Kallikrein-ähnlichen Peptidase 8 durchgeführt und mir all ihre Expertise zur Verfügung gestellt, dafür danke ich ihr von Herzen. Zudem nicht zu vergessen alle meine großartigen Laborkollegen Larissa Dettmar, Johanna Felber, Yueyang Liu und Xiacong Geng, welche die Zeit im Labor zu einer wirklich schönen Erfahrung gemacht haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen endlosen Unterstützern, meinen Eltern.
Danke, dass ihr immer an mich glaubt.