



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin

**Kallikrein-ähnliche Peptidase 4 (KLK4) induziert die differentielle
Expression EMT-assoziiierter Proteine in humanen
Prostatakarzinomzellen**

Johanna Maria Felber

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Gabriele Multhoff

Prüfer*innen der Dissertation:

- 1. apl. Prof. Dr. Viktor Magdolen**
- 2. Prof. Dr. Jürgen E. Gschwend**

Die Dissertation wurde am 17.06.2021 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.12.2021 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	II
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Abstract.....	XII
Zusammenfassung	XIV
1 Einleitung und Literaturüberblick.....	1
1.1 Das Prostatakarzinom	1
1.1.1 Allgemeine Anatomie und Physiologie der Prostata	1
1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie des Prostatakarzinoms	2
1.1.3 Früherkennung des Prostatakarzinoms.....	2
1.1.4 Klinik, Diagnosesicherung und <i>Staging</i> des Prostatakarzinoms	3
1.1.5 Verlauf und Therapieoptionen des Prostatakarzinoms.....	3
1.2 Die Entwicklung und Progression maligner Tumoren	6
1.2.1 Karzinogenese, Invasion und Metastasierung.....	6
1.2.2 Die Rolle von Proteasen in der Tumorentwicklung und –progression	8
1.2.3 Proteasen als Zielstrukturen in der Krebstherapie.....	10
1.3 Kallikrein-ähnliche Peptidasen (KLKs)	11
1.3.1 Genlokus, Struktur und Spezifität.....	11
1.3.2 Regulation und Interaktion im proteolytischen Netzwerk	12
1.3.2.1 Sekretion als inaktive Vorstufen.....	12
1.3.2.2 Endogene Inhibitoren	13
1.3.2.3 Allosterische Inhibition durch Metallionen	14
1.3.3 Vorkommen und Funktion im gesunden Prostatagewebe und der Samenflüssigkeit .	14
1.4 Die Rolle Kallikrein-ähnlicher Peptidasen beim Prostatakarzinom	16
1.4.1 Expressionsmuster der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen im Prostatakarzinom und ihre Korrelation zu klinischen Parametern	16
1.4.2 Auswirkungen der KLKs, insbesondere von KLK4, auf die Tumorprogression.....	17
1.4.2.1 Modulation der Tumorzell-Proliferation	17
1.4.2.2 Einfluss auf die Invasion und Migration der Krebszellen.....	21
1.4.2.3 Beeinflussung der Angiogenese	23

1.5	Zusammenfassung und Zielsetzung dieser Arbeit	24
2	Material und Methoden	26
2.1	Verwendete Materialien	26
2.1.1	Technische Geräte und Hilfsmittel	26
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	27
2.1.3	Chemikalien und allgemeine Reagenzien	28
2.1.4	Enzyme	30
2.1.5	Gebrauchsfertige Reagenziensätze (Kits)	31
2.1.6	Plasmide	31
2.1.7	Primer	32
2.1.8	Antikörper	33
2.1.9	Puffer und Lösungen	33
2.1.10	Bakterienstämme und Medien	35
2.1.11	Zelllinien	36
2.1.12	Reagenzien in der Zellkultur	36
2.1.13	Medien in der Zellkultur	37
2.2	Methoden der Zellkultur	38
2.2.1	Auftauen, Passagieren und Einfrieren der Zellen	38
2.2.2	Zählen und Aussäen von Zellen	39
2.2.3	Transfektion	39
2.2.4	Gewinnung von Zelllysaten, RNA-Pellets und konditionierten Überständen	40
2.2.5	Inhibitorversuche	40
2.2.6	MTT-Test	40
2.2.7	Adhäsions-Assay	41
2.3	Molekularbiologische Methoden	41
2.3.1	<i>Site specific in vitro</i> Mutagenese	41
2.3.2	Transformation von Bakterien	42
2.3.3	Präparation von Plasmid-DNA zur Restriktionsanalyse	43
2.3.4	Restriktionsanalyse und Sequenzierung	43
2.3.5	Plasmid-DNA-Aufreinigung zur Transfektion	43
2.3.6	Mykoplasmen-PCR	44
2.3.7	Agarosegelelektrophorese	45
2.3.8	RNA-Isolierung	45
2.3.9	cDNA-Synthese	45

2.3.10	Quantitative Echtzeit-PCR	45
2.3.11	Transkriptomanalyse mittels <i>Human Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) PCR-Array</i>	48
2.3.12	Proteinbestimmung.....	48
2.3.13	Einengung der Überstände.....	49
2.3.14	Western Blot	49
2.4	Software-basierte Methoden	50
2.4.1	Bestimmung der Proteinmenge der Western Blot Analyse relativ zum <i>Housekeeping</i> -Protein mittels <i>ImageLab</i>	50
2.4.2	Statistische Auswertung	50
3	Ergebnisse	51
3.1	Analyse differentiell exprimierter Zielgene in KLK4-exprimierenden Prostatakarzinomzellen	51
3.1.1	Identifizierung differentiell exprimierter EMT-Gene mittels PCR-Array	51
3.1.2	Effizienz-Analyse der qRT-PCR durch Verdünnungsreihen.....	52
3.1.3	Validierung der differentiellen Expression von CAMK2N1, COL1A2, PDGFRB, SPARC, TFPI2, WNT5B in KLK4-transfizierten PC-3-Zellen	53
3.2	Herstellung verschiedener KLK4-Konstrukte in humanen Prostatakarzinomzellen	54
3.2.1	Ersetzen des Propeptids durch eine Furinspaltstelle und Deletion des Propetids mittels <i>in vitro</i> Mutagenese	56
3.2.2	Transfektion der Plasmide in humane Prostatakarzinomzellen	58
3.3	Charakterisierung der transfizierten Zelllinien.....	59
3.3.1	Proliferationsverhalten	59
3.3.2	Adhäsionsverhalten.....	60
3.4	Auswirkungen der proteolytischen Aktivität von KLK4 auf die differentielle Expression der Zielgene	61
3.4.1	Einfluss der KLK4-Mutationen auf die differentielle Expression der Zielgene COL1A2 und SPARC.....	61
3.4.2	Einfluss der Verwendung eines irreversiblen Inhibitors von KLK4 auf die differentielle Expression der Zielgene COL1A2 und SPARC	64
4	Diskussion.....	66
4.1	KLK4-Überexpression führt zu signifikanten Änderungen der Genexpression in Prostatakarzinomzellen.....	66
4.2	KLK4 beeinflusst die Tumorprogression des Prostatakarzinoms durch die Veränderung der Genexpression.....	67
4.2.1	Die widersprüchliche Rolle von CAMK2N1 im Prostatakarzinom.....	67

4.2.2	In Abwesenheit von COL1A2 bilden sich proteolyseresistente, invasionsfördernde Alpha-1-Homotrimere	68
4.2.3	SPARC fördert die Invasivität von Prostatakarzinomzellen und das <i>Homing</i> zirkulierender Tumorzellen in den Knochen	69
4.1.3.1	Zelluläre Effekte von SPARC	69
4.1.3.2	Die Rolle der SPARC-Expression im Prostatakarzinom	70
4.1.3.3	Tumorigene Effekte der SPARC-Überexpression durch KLK4	71
4.2.4	Die Herabregulation des Tumorsuppressors TFPI2 stimuliert die Invasion, Migration und Androgenresistenz	72
4.3	Möglichkeiten und Limitationen der KLK4-Konstrukte	73
4.3.1	Konstitutiv aktive und inaktive KLK4-Konstrukte ermöglichen eine Differenzierung aktivitätsabhängiger <i>versus</i> -unabhängiger KLK4-Effekte	73
4.3.2	Die Verwendung eines spezifischen KLK4-Inhibitors unterstützt die durch die KLK4-Konstrukte erworbenen Daten	75
4.4	Die Expression von KLK4 in PC-3-Zellen hat keinen Einfluss auf ihre Proliferationsrate	76
4.5	KLK4 vermindert die Adhäsion von PC-3-Zellen auf Kollagenen	77
4.6	Mögliche Regulationsmechanismen von COL1A2 durch KLK4	78
4.6.1	KLK4 reguliert die mRNA-Expression von <i>COL1A2</i> aktivitätsunabhängig	78
4.6.2	Aktivitätsabhängige Mechanismen führen zu einer Diskrepanz der mRNA- und Proteinexpression	80
4.7	Mögliche Regulationsmechanismen von SPARC durch KLK4	81
4.8	Zusammenfassung der möglichen Genregulationsmechanismen.....	82
4.9	Ausblick	83
	Literaturverzeichnis.....	85
	Danksagung.....	99

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Anatomie der Prostata	1
Abbildung 1-2: Mechanismen der Androgenresistenz	5
Abbildung 1-3: Zellveränderungen bei der EMT	8
Abbildung 1-4: Schematische Darstellung des KLK Lokus, Gens und Proteins	12
Abbildung 1-5: Übersicht möglicher KLK-vermittelter Mechanismen der Proliferationsregulation in Tumorzellen	19
Abbildung 3-1: Exemplarische Verdünnungsreihe für <i>COL1A2</i> und <i>HPRT1</i>	53
Abbildung 3-2: Validierung der differentiellen Expression der Zielgene in den KLK4-WT-PC-3-Zellen	54
Abbildung 3-3: Schematische Darstellung der verwendeten KLK4-Expressionsplasmide.....	56
Abbildung 3-4: Restriktionsanalyse der <i>in vitro</i> mutierten Plasmide.....	57
Abbildung 3-5: Charakterisierung der KLK4-Expression nach Transfektion der verschiedenen Plasmide in PC-3-Zellen.....	58
Abbildung 3-6: Charakterisierung des Proliferationsverhaltens der mit den unterschiedlichen KLK4-Varianten transfizierten PC-3-Zellen	60
Abbildung 3-7: Charakterisierung des Adhäsionsverhaltens der mit den unterschiedlichen KLK4-Varianten transfizierten PC-3-Zellen	61
Abbildung 3-8: Differentielle Expression von <i>COL1A2</i> und <i>SPARC</i> in den mit verschiedenen KLK4-Varianten transfizierten PC-3-Zellen auf mRNA- und Protein-Ebene.....	63
Abbildung 3-9: Die Regulation der Zielgene ist unabhängig von der KLK4-Aktivität.....	65
Abbildung 4-1: Mögliche Einflüsse von <i>SPARC</i> auf die Tumorprogression des Prostatakarzinoms	71
Abbildung 4-2: Schematische Darstellung der transkriptionellen (In-)Aktivierung von <i>COL1A2</i>	79
Abbildung 4-3: Präzipitation einer Protease mithilfe eines biotinylierten Inhibitors und streptavidingekoppelter Agarose	84

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Technische Geräte und Hilfsmittel	26
Tabelle 2-2: Verbrauchsmaterialien	27
Tabelle 2-3: Chemikalien und allgemeine Reagenzien	28
Tabelle 2-4: Enzyme	30
Tabelle 2-5: Gebrauchsfertige Reagenziensätze (Kits)	31
Tabelle 2-6: Plasmide	31
Tabelle 2-7: Primer	32
Tabelle 2-8: Antikörper	33
Tabelle 2-9: Puffer und Lösungen für DNA-Analysen	33
Tabelle 2-10: Puffer und Lösungen für die Messung der Zelladhäsion	34
Tabelle 2-11: Puffer für die Präparation zytosolischer Zellextrakte	34
Tabelle 2-12: Puffer für Western Blot Analysen	35
Tabelle 2-13: Bakterienstämme	35
Tabelle 2-14: Bakterienmedien	35
Tabelle 2-15: Zelllinien	36
Tabelle 2-16: Reagenzien in der Zellkultur	36
Tabelle 2-17: Medien in der Zellkultur	37
Tabelle 2-18: Verwendete Volumina in der Zellkultur	38
Tabelle 2-19: Transfektionsansatz	39
Tabelle 2-20: PCR-Reaktion für die <i>in vitro</i> Mutagenese	42
Tabelle 2-21: Bedingungen für die PCR der <i>in vitro</i> Mutagenese	42
Tabelle 2-22: Mastermix für die Restriktionsanalyse	43
Tabelle 2-23: PCR-Ansatz für die Mykoplasmen-PCR	44
Tabelle 2-24: PCR-Bedingungen für die Mykoplasmen-PCR	44
Tabelle 2-25: Reaktionsansatz für die quantitative Echtzeit-PCR	46
Tabelle 2-26: Bedingungen der quantitativen Echtzeit-PCR	46
Tabelle 2-27: Gelzusammensetzung für den Western Blot	49
Tabelle 3-1: Identifizierung differentiell exprimierter EMT-Gene in KLK4-exprimierenden Zellen <i>versus</i> Vektorkontrollzellen	52

Abkürzungsverzeichnis

μM	Mikromolar
%	Prozent
°C	Grad Celsius
<	Kleiner
>	Größer
2xTY	Tryptone / Yeast extract / NaCl-Medium
A	Adenin
ACTB	Actin beta
ACTH	Adrenocorticotropin
Akt	Proteinkinase B
Ala		
A	Alanin
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
AP1	Activator protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgenrezeptor
ARA70	Activation of androgen receptor-associated protein 70
ARE	Androgen response element
Arg		
R	Arginin
AS	Aminosäure(n)
Asn		
N	Asparagin
B2M	β2-Mikroglobulin
Bad	Bcl-2-antagonist of cell death
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl	B-cell-lymphoma
BM-40	Basement-membrane protein 40
BMI	Body Mass Index
BMP2	Bone morphogenic protein 2
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CAMK2N1	Calcium/calmodulin dependent protein kinase II inhibitor 1
CBP	CREB-binding protein
cDNA	Complementary DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CREB	cAMP response element binding protein
Cys		
C	Cystein
d. h.	Das heißt
ddH ₂ O	Bidestilliertes H ₂ O
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonucleosidtriphosphate
DPP1	Dipeptidylpeptidase 1
DRU	Digitale rektale Untersuchung
dsDNA	Doppelstrang-DNA

DSMO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
E	<i>Effizienz</i>
ECM	<i>Extrazelluläre Matrix</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
EMT	<i>Epitheliale-zu-mesenchymale Transition</i>
ER	<i>Endoplasmatisches Retikulum</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
ERSPC	<i>European Randomised Study for Prostate Cancer</i>
ETS.....	<i>E26 transformation-specific oder E-twenty-six</i>
FCS.....	<i>Fetal bovine serum</i>
Fli1.....	<i>Friend Leukemia Integration 1</i>
Fra2	<i>Fos-related antigen 2</i>
g	<i>Gramm</i>
G	<i>Guanin</i>
GAPDH.....	<i>Glycerinaldehyde-3-phosphate-Dehydrogenase</i>
ggf.	<i>Gegebenenfalls</i>
Gln	
Q	<i>Glutamin</i>
GRE.....	<i>Glucocorticoid response element</i>
h	<i>Stunde</i>
H ₂ O	<i>Wasser</i>
HEPES	<i>N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure</i>
HGF.....	<i>Hepatocyte growth factor</i>
His	
H	<i>Histidin</i>
HPRT1.....	<i>Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1</i>
HRE.....	<i>Hormone response element</i>
HRP.....	<i>Meerrettichperoxidase</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
IFN _γ	<i>Interferon gamma</i>
IGF.....	<i>Insulin-like growth factor</i>
IGFBP	<i>Insulin-like-growth-factor-Bindeprotein</i>
IL-6.....	<i>Interleukin 6</i>
Ile	
I	<i>Isoleucin</i>
kb	<i>Kilobase(n)</i>
kDa	<i>Kilodalton</i>
l	<i>Liter</i>
LARP6	<i>LA-related protein 6</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LEKTI.....	<i>Lympho-epithelial Kazal-type inhibitor</i>
LH	<i>Luteinisierendes Hormon</i>
LHRH.....	<i>LH-releasing Hormon</i>
LNA.....	<i>Locked nucleic acids</i>
Lys	
K	<i>Lysin</i>
M	<i>molar</i>
mA.....	<i>Milliampere</i>
MAPK.....	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
mCRPC.....	<i>Metastasiertes kastrationsresistentes Prostatakarzinom</i>
min	<i>Minute(n)</i>

ml	Milliliter
MLL.....	Mixed lineage leukemia
mm	Millimeter
mM.....	Millimolar
MOPS.....	3-(N-morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Messenger RNA
mTOR.....	Mammalian Target of Rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NF- κ B.....	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NND.....	Number needed to diagnose
OD	Optische Dichte
ON	Osteonektin
PAA.....	Polyacrylamid
pAb.....	Polyclonal antibody
PCR.....	Polymerase Kettenreaktion
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIA.....	Proliferative Inflammatorische Atrophie
PIN.....	Intraepitheliale Prostataneoplasie
PLZF	Promyelocytic leukaemia zinc finger protein
Pro	
P	Prolin
pro-HGFA.....	Pro-hepatocyte growth factor activator
PS	Polystyrol
PSA	Prostate-specific antigen oder prostataspezifisches Antigen
PSAv	PSA-Anstiegsgeschwindigkeit
PSMA.....	Prostate-specific membrane antigen
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PVDF.....	Polyvinylidenfluorid
rcf	Relative Zentrifugalbeschleunigung
RNA	Ribonukleinsäure
RPL13A	60S ribosomal protein L13a
rpm.....	Revolutions per minute
RPMI.....	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s.	Siehe
s. o.....	Siehe oben
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sec.....	Sekunde(n)
Ser	
S	Serin
Serpin	Serinproteaseinhibitor
SFTI.....	Sunflower trypsin inhibitor
SHBP	Sexualhormon-Bindeproteine
SOX5	SRY-box transcription factor 5
Sp1.....	Specificity protein 1
SPINK5.....	Serine protease inhibitor Kazal-type 5
STAT	Signal transducer and activator of transcription
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA

Taq.....	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	<i>Tris-Borsäure-EDTA</i>
TBS.....	<i>Tris buffered saline</i>
TE	<i>Tris-EDTA</i>
TEMED.....	<i>N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin</i>
TET.....	<i>Ten-eleven translocation</i>
TFPI-2	<i>Tissue factor pathway inhibitor 2</i>
TGF-β.....	<i>Transforming growth factor beta</i>
TMPRSS2	<i>Transmembrane protease, serine 2</i>
TNFα.....	<i>Tumornekrosefaktor alpha</i>
TNM.....	<i>Tumor-node-metastasis</i>
U	<i>Enzymeinheit</i>
uPA.....	<i>Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator</i>
UPL.....	<i>Universal ProbeLibrary</i>
V	<i>Volt</i>
v. a.....	<i>Vor allem</i>
v/v	<i>Volume per volume</i>
Val	
V	<i>Valin</i>
VEGF.....	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
w/v	<i>Weight per volume</i>
WT.....	<i>Wildtyp</i>
y	<i>Jahr</i>
YB-1	<i>Y-box binding factor</i>
z. B.....	<i>Zum Beispiel</i>
µg	<i>Mikrogramm</i>
µl	<i>Mikroliter</i>
µm.....	<i>Mikrometer</i>
µM.....	<i>Mikromolar</i>

Abstract

Prostate cancer is the most common cancer and the second leading cause of cancer-related deaths in males in Germany. Prostate-specific antigen (PSA) screening has improved diagnosis often leading to the detection of an earlier stage disease, but also resulting in over-diagnosis and over-treatment. Yet, men are still dying of lethal metastases and castration resistance. Despite great efforts and improvements in therapy, up to date, no approach has been developed to cure that metastatic stage of disease.

Proteases are known to be differentially expressed in cancer inducing tumor progression not only by cleaving extracellular matrix proteins and thereby enhancing invasion and migration, but also by supporting angiogenesis and interacting with the tumor microenvironment, and thereby collaborating within the so-called *protease web*.

Kallikrein-related peptidase 4 (KLK4) is one of 15 serine proteases of the tissue kallikrein-related peptidase family and is overexpressed in prostate cancer. It has been proposed to affect proliferation and increase migration, as well as induce epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), a crucial step in promoting cell motility and tumor scattering. Additionally, its physiological function in the mineralized tissue of dental enamel suggests its involvement in the development of prostate cancer bone metastasis. Due to these functional roles in carcinogenesis, its physiologically limited expression to the prostate and its overexpression in prostate cancer KLK4 represents a promising therapeutic target. To date the mechanism by which KLK4 is facilitating cancer progression and to what extent its proteolytic activity is responsible for these processes is largely unknown. Thus, a deeper understanding is required to evaluate the potential of KLK4 as an anti-cancer target.

In this study, we sought to identify target genes of KLK4 and to determine the importance of its proteolytic activity in regulating protein expression and prostate cancer progression. Comparison of gene expression in PC-3 cells transfected with pre-pro-KLK4, compared to vector control cells, was analyzed using a low-density microarray (EMT; SABiosciences). Differential expression of selected genes was validated by qRT-PCR and Western blot analysis. To determine the dependence of KLK4-regulated functions on its proteolytic activity, PC-3 cells were transfected with expression plasmids encoding either a furin-activatable KLK4, pre-pro-KLK4 or an active site mutant as negative control and characterized concerning their proliferative and adhesive capacities. Additionally, we analyzed changes in gene expression in the presence or absence of a specific KLK4 inhibitor.

KLK4 or its variants were expressed and secreted in all analyzed cell lines. Proliferation of PC-3 cells expressing pre-pro-KLK4 or furin-activatable KLK4 was unchanged after 96 h compared to vector control or inactive mutant cells with a tendency to a decreased proliferation rate as it is described in the literature. Moreover, we found compromised adhesion of pre-pro-KLK4 expressing cells to

untreated surface of culture plates compared to all other cell lines. Interestingly and in contrast to previous reports, where KLK4 was suggested to promote prostate cancer bone metastasis by increasing cell adhesion on collagen I and IV, the attachment on surfaces coated with those two collagens was also reduced. Collagen I and IV were suggested to be putative substrates of KLK4. As collagen I is common in almost every form of connective tissue and collagen IV is an essential part of the basal lamina, cleavage of the two proteins might lead to an impaired attachment of the cells increasing their motility and invasive capacity. The different results suggest that KLK4 might play a finely tuned role in regulating cell adhesion resulting in pro- and anti-adhesive effects dependent on the stage of disease.

Measuring gene expression of 84 genes related to EMT in vector control cells compared to pre-pro-KLK4 producing cells, 12 genes with a more than 2-times differential expression were identified, ten of them up-, two down-regulated in KLK4 cells. Further examinations applying specific qRT-PCR assays for six of those 12 genes revealed significant upregulation of *CAMK2N1*, significant downregulation of *COL1A2* and *TFPI2* and a trend towards upregulation of *SPARC*. Upregulation of *SPARC* expression was indeed confirmed on a protein level via Western blot analysis. *SPARC* is known as a regulator of migration and EMT, a crucial step in metastasis. Downregulation of *COL1A2* may lead to increased formation of homotrimeric alpha1-collagen I that is resistant to proteolytic degradation and is associated with increased proliferation and migration. Thus, regulation of both genes might be an important mechanism through which KLK4 promotes tumor progression.

Of interest, all of the expressed KLK4 constructs showed up-regulation of *SPARC* and down-regulation of *COL1A2* implying a non-proteolytic mechanism of this gene regulation. Moreover, modulation of the target genes seemed to be dependent on the absolute KLK4 content in the cells indicating that a non-secreted, possibly nuclear variant of KLK4 could be of importance. These results were further underlined by using a specific, irreversible KLK4 inhibitor to block proteolytic activity in the medium of the cells and subsequently evaluate gene expression.

KLK4 is a promising target for prostate cancer therapy. However, molecular mechanisms by which KLK4 is regulating cancer progression are not fully understood and further examination is needed, especially to distinguish between proteolytic and non-proteolytic effects of the protease to determine the desired consequences and the unwanted side effects of a possible therapeutic approach.

Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist die häufigste Tumorentität und die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache bei Männern in Deutschland. Die Bestimmung des PSA-Werts (prostataspezifisches Antigen) im Rahmen der Tumurvorsorge hat die Diagnosestellung vereinfacht, führt aber gleichzeitig zu Überdiagnosen und Überbehandlung. Und dennoch sterben immer noch Patienten an den Folgen der Metastasierung und der Resistenz gegen die Hormontherapie. Denn, trotz größter Bemühungen ist es bisher nicht möglich, das metastasierte Stadium dieser Tumorerkrankung zu heilen.

Proteasen sind in Tumoren häufig differentiell exprimiert, wobei sie die Tumorprogression nicht nur beeinflussen, indem sie extrazelluläre Matrix spalten und damit die Invasion und Migration ermöglichen, sondern auch, indem sie mit der Tumormikroumgebung interagieren und dabei in einem proteolytischen Netzwerk zusammenarbeiten.

Kallikrein-ähnliche Peptidase 4 (KLK4) ist eine von 15 Serinproteasen der Gewebekallikrein-ähnlichen Peptidasen Familie und im Prostatakarzinom überexprimiert. Sie soll die Migration der Tumorzellen steigern und die epitheliale-zu-mesenchymale Transition fördern, welche für die Metastasierung unerlässlich ist. Hinzu kommt, dass die physiologische Funktion von KLK4 im mineralisierten Zahnschmelzgewebe eine wichtige Rolle der Protease in der Knochenmetastasierung nahelegt. So scheint KLK4 ein vielversprechendes therapeutisches Ziel zu sein, um die letale Metastasierung zu verhindern. Allerdings sind die Mechanismen, durch welche KLK4 die Tumorprogression fördert, und, in welchem Ausmaß die Aktivität der Protease für diese Prozesse verantwortlich ist, noch nicht bekannt. Es sind also weitere Studien nötig, um KLK4 als potentielle Zielstruktur für onkologische Medikamente zu evaluieren.

In dieser Arbeit sollten Zielgene von KLK4 identifiziert werden und die Notwendigkeit der proteolytischen Aktivität von KLK4 für die Genregulation und die Prostatakarzinomprogression evaluiert werden. Hierfür wurde mithilfe eines *low-density Microarrays* (EMT; SABiosciences) die Genexpression in KLK4-überexprimierenden PC-3-Zellen mit der in Vektorkontrollzellen verglichen und anschließend die differentielle Genexpression von Zielgenen mittels qRT-PCR und Western Blot bestätigt. Um die Rolle der proteolytischen Aktivität zu klären, wurden die PC-3-Zellen mit Expressionsplasmiden transfiziert, die entweder Furin-aktivierbare KLK4, prä-pro-KLK4 oder einer inaktiven KLK4-Variante kodieren, und deren Proliferations- und Adhäsionseigenschaften charakterisiert. Die Genexpression der Zielgene wurde dann in den verschiedenen Zelllinien und in Präsenz und Absenz eines spezifischen KLK4-Inhibitors bestimmt.

KLK4 und ihre Varianten wurden in allen Zelllinien exprimiert. Die KLK4-Expression veränderte das Proliferationsverhalten von prä-pro-KLK4-Zellen und Zellen mit Furin-aktivierbarer KLK4 verglichen

zur Vektor- oder zur inaktiven Kontrolle nach 96 h nicht, wobei sich eine Tendenz zu einer verminderten Proliferationsrate zeigte, wie sie auch in der Literatur beschrieben ist.

Darüber hinaus zeigte sich eine verringerte Adhäsionsfähigkeit der prä-pro-KLK4-Zellen an unbeschichteten, mit Kollagen I und mit Kollagen IV beschichteten Zellkulturplatten im Vergleich zu allen anderen Zelllinien. Das steht im Widerspruch zur vorhandenen Literatur, in welcher KLK4 als Promotor der Knochenmetastasierung beschrieben wurde, da sie die Anhaftung auf Oberflächen mit diesen beiden, im Knochen vorkommenden Kollagenen erhöhte. Allerdings sind beide Kollagene auch potentielle Substrate von KLK4. Da Kollagen I in fast jedem Bindegewebe vorkommt und Kollagen IV wichtiger Bestandteil der Basallamina ist, könnte die Spaltung dieser Proteine mit einer verminderten Adhäsion der Zellen und damit mit einer erhöhten Motilität und Invasivität einhergehen. Die unterschiedlichen Ergebnisse legen nahe, dass KLK4 eine fein abgestimmte Rolle in der Regulation der Adhäsion spielt, die in pro- und antiadhäsiven Effekten abhängig vom Tumorstadium resultiert.

In einem Vergleich der Genexpression von 84 EMT-assoziierten Genen in KLK4-überexprimierenden PC-3-Zellen verglichen zu Vektorkontrollzellen konnten 12 Gene identifiziert werden, die mehr als 2-fach differentiell exprimiert wurden. Davon waren 10 hoch- und zwei herabreguliert. Eine Evaluation von 6 dieser Gene mittels spezifischer qRT-PCR Assays untermauerte eine signifikante Regulation von *CAMK2N1*, *COL1A2*, *TFPI2* und einen Trend zur Überexpression von *SPARC*, wobei die Hochregulation der SPARC-Expression auf Proteinebene im Western Blot bestätigt werden konnte. SPARC ist bekannt dafür, die Migration und EMT von Zellen zu regulieren. Eine Herabregulation von *COL1A2* könnte zur vermehrten Formation von Alpha1-Homotrimeren führen, welche gegen proteolytische Spaltung resistent sind und mit erhöhter Proliferation und Migration assoziiert werden. So könnte die Regulation beider Gene ein wichtiger Mechanismus sein, durch welchen KLK4 die Tumorprogression fördert.

Interessanterweise veränderten alle exprimierten KLK4-Konstrukte die Expression von SPARC und *COL1A2*, was auf einen aktivitätsunabhängigen Regulationsmechanismus hinweist. Darüber hinaus schien der Einfluss auf die Genexpression vom absoluten KLK4-Gehalt in den Zellen abhängig zu sein, was suggeriert, dass eine nichtaktive, möglicherweise nukleäre Form von KLK4 eine Rolle spielen könnte. Diese Ergebnisse wurden dadurch unterstrichen, dass ein spezifischer, irreversibler KLK4-Inhibitor die Genregulation nicht unterdrücken konnte.

KLK4 ist also ein vielversprechendes Zielprotein für die Prostatakarzinomtherapie. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen müssen aber noch genauer verstanden werden, um die gewünschten Konsequenzen und die unerwünschten Nebenwirkungen einer möglichen therapeutischen Intervention zu verstehen.

1 Einleitung und Literaturüberblick

1.1 Das Prostatakarzinom

1.1.1 Allgemeine Anatomie und Physiologie der Prostata

Die Prostata oder Vorsteherdrüse, eine walnussförmige, circa 20 g schwere Drüse, ist Bestandteil der männlichen inneren Geschlechtsorgane. Sie befindet sich kaudal der Harnblase, ventral des Rektums und umschließt ringförmig die *Pars prostatica* der Urethra. Sie gliedert sich in eine periphere Zone, die mehr als 70 % der Prostatadrüsen beinhaltet, eine zentrale Zone, welche die *Ducti ejaculatores* umschließt und 25 % der glandulären Prostata stellt, eine Transitionszone, welche die Urethra zwischen Harnblasenhals und Samenhügel umfasst und kaum Drüsen enthält, sowie die aglanduläre fibromuskuläre anteriore Zone (McNeal 1968).

Beim Auftreten einer benignen Prostatahyperplasie (BPH), welche meist aus der Transitionszone hervorgeht, entsteht durch die Adenome eine Lappenstruktur. Diese unterteilt die Prostata in einen rechten und einen linken Lappen, einen periurethralen Mittellappen und sehr selten in einen periurethralen Vorderlappen. Eine solche Lappenstruktur ist in der normalen, nicht hyperplastischen Prostata nicht zu finden (Myers 2000).

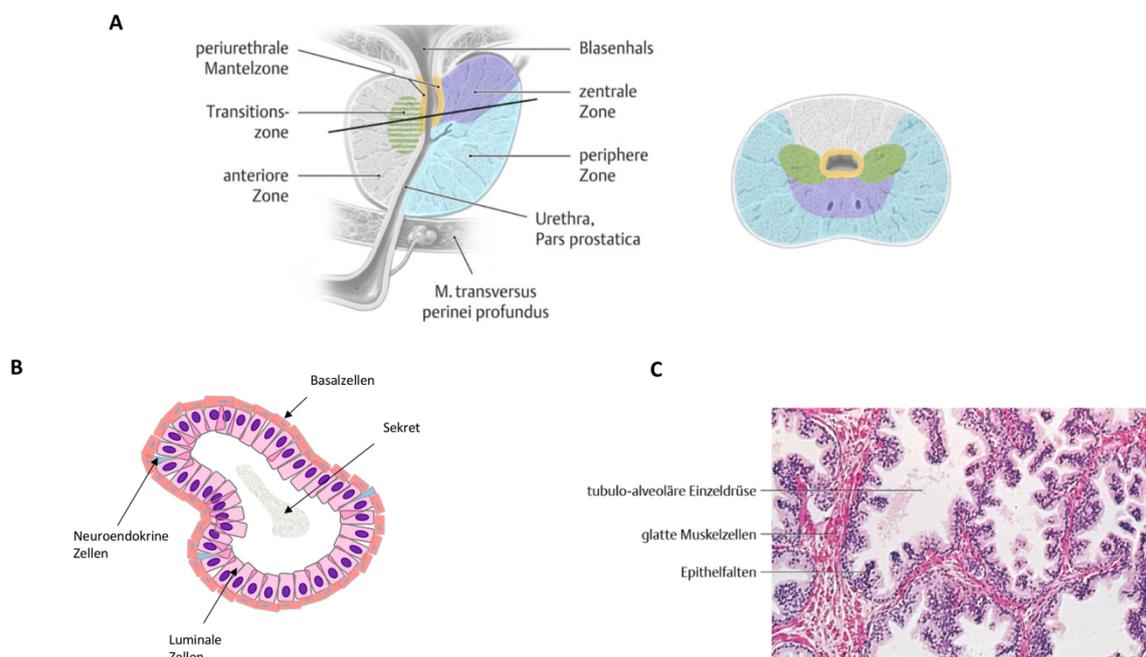


Abbildung 1-1: Anatomie der Prostata

(A) Schematische Darstellung der Prostata und ihrer Lagebeziehung zur Blase und zur Urethra sowie der Zonenaufteilung im Sagittal- und Axialschnitt (Schünke et al. 2009).

(B) Schematische Darstellung des histologischen Aufbaus einer tubulo-alveolären Einzeldrüse.

(C) Hämatoxylin-Eosin gefärbter Gewebeschnitt der Prostata (Kühnel 2014).

Die Prostata umfasst 30 bis 50 tubulo-alveoläre Einzeldrüsen, bestehend aus einem auf einer Basalmembran aufliegenden zweireihigen kubischen bis hochprismatischen sekretorischen Epithel und neuroendokrinen Zellen. Die Drüsenazini sind von fibromuskulärem Bindegewebe umgeben, dessen glatte Muskelzellen sich bei der Ejakulation durch die sympathische Aktivierung der α -Adrenorezeptoren kontrahieren, und münden einzeln in den prostatistischen Teil der Harnröhre (Manski 2017). Sie produzieren ein dünnflüssiges, leicht saures Sekret, das insgesamt etwa 20 % des Ejakulats ausmacht und neben Spermin zur Ermöglichung der Spermienmotilität unter anderem auch Phosphatasen und Proteasen enthält, um das Sperma zu verflüssigen (Mann 1974).

1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom ist mit circa 57.000 Neuerkrankungen und 13.000 Todesfällen pro Jahr die häufigste Krebserkrankung und die zweithäufigste tumorassoziierte Todesursache bei Männern in Deutschland (Krebsregisterdaten 2014b). Bei der überwiegenden Mehrzahl der Prostatakarzinome handelt es sich um multifokale Adenokarzinome, entstanden aus der peripheren Zone der Prostata (Hakenberg 2014). Schätzungen ergaben, dass 30 - 50 % der über 50-jährigen und 80 % der über 80-jährigen Männer mikroskopische Prostatakarzinome in sich tragen. Viele dieser Karzinome werden allerdings niemals klinisch relevant. Im Gegenteil, nur für circa 3 % der Männer sind sie letal (Taichman et al. 2007).

Als wichtigste Risikofaktoren für die Entstehung eines Prostatakarzinoms gelten ein hohes Lebensalter, eine positive Familienanamnese und die ethnische Herkunft, wobei Männer schwarzafrikanischer Herkunft am häufigsten und asiatische Männer am seltensten betroffen sind. Ausgewogene, gesunde Ernährung sowie körperliche Bewegung sollen eine protektive Wirkung haben und die Progression eines schon vorhandenen Karzinoms verlangsamen (Krebsregisterdaten 2014a).

1.1.3 Früherkennung des Prostatakarzinoms

Meist werden die Prostatakarzinome über eine Früherkennungsuntersuchung diagnostiziert. Diese beinhaltet bei Männern ab dem 45. Lebensjahr neben der digitalen rektalen Untersuchung (DRU) einen PSA-Test im Serum der Patienten. PSA (prostataspezifisches Antigen) oder auch KLK3 ist eine spezifisch in der Prostata produzierte Serinprotease der Familie der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen, die durch Spaltung des Proteins Semenogelin eine Liquefizierung des Ejakulats verursacht (Lilja 1985). Sie ist Hauptbestandteil des Spermas, jedoch im Serum gesunder Männer kaum nachweisbar. Beim Prostatakarzinom kommt es aufgrund einer gestörten Gewebearchitektur zu einer Erhöhung der PSA-Serumlevel, da der Kontaktverlust zwischen Drüsenzellen und Ausführungsgängen zur Sekretion des PSA direkt in die systemische Zirkulation führt (Taichman et al. 2007). Eine

transrektale, sonographisch gesteuerte, ggf. mit einer MRT-Untersuchung fusionierte Stanzbiopsie mit zweimal sechs Stanzzylindern erfolgt zur histologischen Diagnosesicherung ab einem PSA-Wert von $> 10,0$ ng/ml, bei rezidivierenden Werten von $> 4,0$ ng/ml, bei einer PSA-Anstiegsgeschwindigkeit von $> 0,75$ ng/ml/Jahr und/oder einem suspektem Tastbefund. Laut den Ergebnissen der *European Randomised Study for Prostate Cancer* (ERSPC) kommt es bei der alleinigen Betrachtung des Gesamt-PSA-Werts allerdings in bis zu 50 % der detektierten Fälle zu Überdiagnosen mit Übertherapie und Therapienebenwirkungen bei einer *Number needed to diagnose* (NND) von 27 (Schröder et al. 2014). Da der PSA-Wert auch bei benigner Prostatahyperplasie und Prostatitis erhöht ist und von Alter, Ethnizität und *Body Mass Index* (BMI) abhängt, gibt es verschiedene Modelle, um die Spezifität zu erhöhen. So kommt unter anderem der oben genannten PSA-Anstiegsgeschwindigkeit (PSAv) eine besondere Bedeutung zu. In der Regel kommt es 10 bis 15 Jahre vor der klinischen Symptomatik zu einem exponentiellen PSA-Anstieg, wodurch bei einer PSAv $< 0,35$ ng/ml/Jahr eine prostatakarzinomspezifische Überlebensrate von 94 % besteht. Vor allem bei grenzwertigen Gesamt-PSA-Befunden (zwischen 4 -10 ng/ml) kann die PSAv die Indikationsstellung zur Stanzbiopsie erleichtern (Taichman et al. 2007). Neuere Modelle umfassen das sogenannte *4-Kallikrein Marker Panel*, ein Panel aus den Werten von freiem, intaktem und totalem PSA sowie KLK2 im Serum, der sehr präzise *high-grade* Prostatakarzinome detektieren kann. So wird die Anzahl von unnötigen Biopsien gesenkt, ohne dass hochgradige Prostatakarzinome übersehen werden. Dieses Panel lässt sich durch die Hinzunahme des Microseminoprotein- β -Wertes noch zusätzlich verbessern (Kim et al. 2017).

1.1.4 Klinik, Diagnosesicherung und Staging des Prostatakarzinoms

Betroffene entwickeln aufgrund der überwiegend peripheren Lokalisation des Prostatakarzinoms selten Frühsymptome. Meist werden sie erst durch die Metastasierung symptomatisch. Zu den lokalen Symptomen zählen beispielsweise Miktions- und Erektionsbeschwerden. Knochenmetastasen verursachen häufig Knochenschmerzen oder Anämien.

Zur Diagnosesicherung erfolgt eine Stanzbiopsie der Prostata (s. Kapitel 1.1.3). Diese wird neben einer transrektalen Ultraschalluntersuchung und ggf. einer MRT zum *Staging* der lokalen Ausbreitung herangezogen. Um Knochenmetastasen zu diagnostizieren oder auszuschließen erfolgt eine Skelettzintigraphie. Bei Hinweisen auf Weichteilmetastasen kann zusätzlich ein *Staging* des Thorax, des Abdomens oder des Gehirns indiziert sein (Hakenberg 2014).

1.1.5 Verlauf und Therapieoptionen des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom ist ein sich langsam über mehrere Jahrzehnte aus den Vorläuferläsionen der proliferativen inflammatorischen Atrophie (PIA) und der intraepithelialen Prostataneoplasie (PIN)

entwickelnder Tumor (Sfanos und De Marzo 2012). Ein früher, kritischer Schritt der Karzinogenese ist ein genetischer DNA-Umlagerungsprozess, welcher zu einem androgenabhängigen Fusionsprodukt aus dem prostataspezifischen, androgenabhängigen TMPRSS2 (*transmembrane protease, serine 2*) und Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie (*E26 transformation-specific* oder *E-twenty-six* Familie) führt. Dieses ist in 50 bis 70 % der Prostatakarzinome nachzuweisen und assoziiert mit einem höheren Tumorstadium und einer höheren prostatakarzinomassoziierten Mortalität (Mosquera et al. 2007).

Prostatakarzinome zählen zu den hormonsensitiven Karzinomen. Das Überleben und die Proliferation der Tumorzellen und damit die Karzinomprogression ist abhängig von der Stimulation wachstums- und proliferationsfördernder Androgene (Miyamoto et al. 2004).

Die Klassifikation und die Therapie erfolgt nach dem TNM-Stadium und dem von dem amerikanischen Pathologen D. F. Gleason entwickelten *Gleason-Score*. Während die TNM-Klassifikation die Tumorausbreitung bezogen auf den Primärtumor (T), die Lymphknoten (N) und die Fernmetastasen (M) beschreibt (Cheng et al. 2012), gibt der *Gleason-Score* mit Werten von 2 bis 10 den Entdifferenzierungsgrad der Drüsenarchitektur und somit die Aggressivität des Karzinoms wieder (Epstein 2010).

Die Metastasierung des Prostatakarzinoms erfolgt lymphogen in die pelvinen und retroperitonealen Lymphknoten und hämatogen vor allem in die Knochen, seltener in Leber, Thorax, Gehirn und Nebennieren (Gandaglia et al. 2014).

Frühstadien mit geringem *Gleason-Score* (≤ 6) und PSA < 10 mg/ml können aktiv überwacht (Leapman et al. 2017), mit einer radikalen Prostatektomie ohne/mit Lymphadenektomie oder einer primären Radiatio in Form einer Brachytherapie behandelt werden und haben eine sehr gute Prognose. Höhergradige lokale Tumoren erfordern eine radikale Prostatektomie mit Lymphadenektomie oder eine primäre externe Strahlentherapie. Stellt sich in der histologischen Aufarbeitung eines Prostatektomieresektats ein R1-Befund heraus, wird auch nach radikaler Prostatektomie eine Bestrahlung nötig.

Adjuvant bei lokal fortgeschrittenen Tumoren (N+) und als Erstlinientherapie von metastasierten Karzinomen wird eine antihormonelle Therapie durchgeführt (AWMF 2018; Hakenberg 2014).

Androgendeprivation führt zur Apoptose des sekretorischen Prostataepithels und beeinflusst über die veränderte Wachstumshormonproduktion auch die Vaskularisierung und Angiogenese (Huggins 1967; Russell et al. 1998). Es gibt verschiedene Ansatzpunkte, eine antihormonelle Therapie durchzuführen. LHRH-Antagonisten (z. B. Abarelix) hemmen die LHRH-Wirkung in der Hypophyse. LHRH-Agonisten (z. B. Buserelin) stören die pulsatile Freisetzung von LHRH im Hypothalamus und blockieren somit indirekt dessen Wirkung. Beide führen zu einer verminderten Produktion von LH

und FSH in der Hypophyse und zu einer verminderten Produktion von Testosteron und adrenalen Androgenen. Diese können in Kombination oder jeweils als Monotherapie mit sogenannten steroidalen oder nichtsteroidalen Antiandrogenen (z. B. Bicalutamid) verabreicht werden, die den Androgenrezeptor (AR) im Gewebe antagonisieren.

Eine Androgendeprivation führt allerdings nur sehr selten zur dauerhaften Heilung. In den meisten Fällen entwickelt sich eine hormonrefraktäre, androgenunabhängige Subpopulation, die zum biochemischen und klinischen Rezidiv führt (Miyamoto et al. 2004).

Die Mechanismen, die zur Kastrationsresistenz führen, sind noch nicht gänzlich verstanden. Sie umfassen multiple zelluläre Signaltransduktionsveränderungen, die das Tumorwachstum begünstigen. Ergebnisse einer exom- und transkriptomweiten Sequenzierung von mCRPC (metastasiertes kastrationsresistentes Prostatakarzinom)-Tumorbiopsien zeigen, dass in über 60 % der Fälle Mutationen des AR zu finden sind, was nahelegt, dass die Tumorzellen zwar androgenabhängig bleiben, aber gegen die verwendeten Therapeutika Resistenzen entwickeln (Robinson et al. 2015).

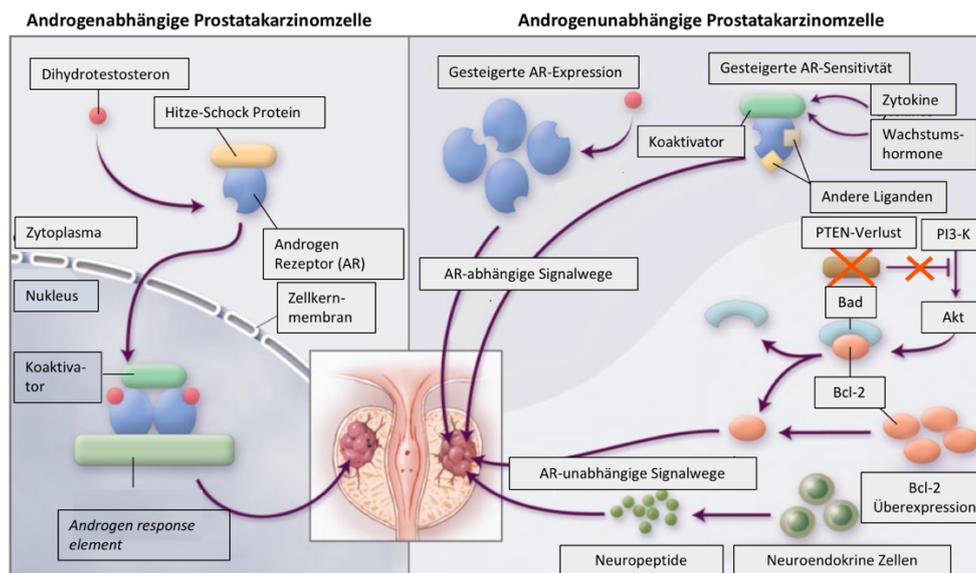


Abbildung 1-2: Mechanismen der Androgenresistenz

In androgensensiblen Tumorzellen wird der Wachstumsanreiz hauptsächlich über den Androgenrezeptor (AR) vermittelt. Dieser liegt im inaktiven Zustand gebunden an ein Hitze-Schock Protein im Zytoplasma vor. Nach Bindung des Androgens Dihydrotestosteron gelangt er in den Zellkern, wo er dimerisiert und an ein *Androgen response element* bindet, wodurch Gene so aktiviert oder deaktiviert werden, dass es zu einem vermehrten Zellwachstum kommt.

In androgenresistenten Tumorzellen führen nicht nur AR-abhängige, sondern auch AR-unabhängige Signalkaskaden zu einer Tumorprogression. Mögliche AR-abhängige Mechanismen beinhalten eine vermehrte Expression des AR in den Prostatakarzinomzellen, eine Aktivierung des AR durch eine geringere Dosis von Dihydrotestosteron oder eine (ggf. über einen Koaktivator vermittelte) Aktivierung durch deregulierte Wachstumsfaktoren, Zytokine oder andere Liganden. AR-unabhängig könnte ein häufig in Prostatakarzinomzellen auftretender Verlust der Phosphatase PTEN zu einer vermehrten Aktivität des PI3-K/Akt-Signalwegs führen. Dies führt zu einer gesteigerten Phosphorylierung von Bad (*Bcl-2-antagonist of cell death*), wodurch das antiapoptotische Bcl-2 Protein freigesetzt wird und so der programmierte Zelltod verhindert wird. Außerdem könnten Prostatakarzinomzellen ein neuroendokrines Zellverhalten entwickeln und tumorfördernde Neuropeptide sezernieren, die das Zellwachstum begünstigen.

Quelle: Modifiziert nach Debes und Tindall (2004).

Es wird diskutiert, dass die AR-Expression und die Sensitivität des Rezeptors gegenüber androgener Stimulation steigt sowie durch vermehrte Aktivität von 5 α -Reduktasen die Konzentration des wirksamen Androgens DHT zunimmt. Außerdem sollen Rezeptormutationen eine Aktivierung der Signalkaskade auch durch nichtandrogene Steroide ermöglichen und *downstream*-Signale durch Wachstumsfaktoren aus der Tumormikroumgebung stimulierbar werden. Dies wird zusätzlich verstärkt durch eine Dysbalance von Koaktivatoren und Korepressoren des Signalwegs. Außerdem wird durch die Hochregulation antiapoptotischer Signale das Absterben der Zellen verhindert, über die Formation neuroendokriner Zellen und die Sekretion von Neuropeptiden die Proliferation stimuliert und durch androgenunabhängige Stammzellen kontinuierlich die bestehende Tumorzellpopulation aufrechterhalten (Debes und Tindall 2004; Pienta und Bradley 2006; Taichman et al. 2007).

Eine kurative Therapie des mCRPC ist trotz intensiver Forschung derzeit nicht möglich. Lebensverlängernde Therapieoptionen umfassen unter anderem Chemotherapien mit Docetaxel oder Carbazitaxel, Immuntherapien mit Sipuleucel-T oder Ipilimumab und die Behandlung mit Zweitlinien-Androgendeprivation durch den Testosteron-Biosynthese-Inhibitor Abiraterone oder den neuen AR-Inhibitor Enzalutamid (Kapoor et al. 2016; Pagliuca et al. 2019). α -Radionukleotidgekoppelte PSMA-Liganden sind trotz beeindruckender Ergebnisse in der Anwendung bei einzelnen therapierefraktären Prostatakarzinompatienten noch nicht routinemäßig einsetzbar (Kratochwil et al. 2016). Im Mittelpunkt der palliativen Therapie steht eine effektive Schmerztherapie bei Knochenmetastasen. Diese kann durch externe Radiatio, mittels knochenspezifisch anreichernden Radioisotopen (z. B. Ra-223-Dichlorid), mit Bisphosphonaten oder RANKL-Inhibitoren (z. B. Denosumab) erreicht werden (Loberg et al. 2005).

Die starken Prognoseunterschiede zwischen Tumorfrüh- und -spätstadien verdeutlichen die Notwendigkeit, das Karzinomfortschreiten aufzuhalten und kurative Therapien für das mCRPC zu entwickeln, um die Entwicklung der letalen Metastasen zu verhindern oder diese zu eliminieren. Um dies zu ermöglichen, müssen Moleküle identifiziert werden, die eine kritische Rolle in der Tumorprogression und Metastasierung spielen und somit ideale Angriffspunkte für neue Therapeutika darstellen.

1.2 Die Entwicklung und Progression maligner Tumoren

1.2.1 Karzinogenese, Invasion und Metastasierung

Die Karzinogenese ist ein vielschrittiger Prozess, in welchem Zellen durch die Akkumulation von DNA-Alterationen Onkogene aktivieren und/oder Tumorsuppressorgene inaktivieren. Dies führt zu Defekten in den Regulationszyklen von Proliferation und Homöostase, wodurch die Zellen

malignitätsspezifische Fähigkeiten erwerben, die ihnen einen Überlebensvorteil gegenüber den nichttumorösen Zellen verschaffen und ihnen erlauben invasiv zu wachsen (Hanahan und Weinberg 2000).

Maligne Tumoren werden charakterisiert durch einige Schlüsselkompetenzen, sogenannte *hallmarks of cancer*: die Unabhängigkeit von externen Wachstumsfaktoren, das Umgehen von wachstumshemmenden Faktoren, die Förderung einer inflammatorischen Reaktion bei Vermeidung einer direkten Immunreaktion, die Apoptoseinhibition, die genomische Instabilität, die unendliche Fähigkeit zur Replikation, die Deregulation zellulärer Energiemechanismen und die Induktion von Angiogenese, Invasion und Metastasierung (Hanahan und Weinberg 2011). Nicht jede Tumorzelle besitzt jede dieser Fähigkeiten. Stattdessen bestehen innerhalb eines Tumors heterogene Subpopulationen, von denen nur einige den selektiven Prozess der Invasion und Metastasierung überstehen (Fidler 2003).

Lokale Invasion erfordert die Motilität und Migrationsfähigkeit der Zellen. Zellmigration kann mesenchymal oder amöboid, durch Einzelzellen oder kollektiv erfolgen. Dabei sezernieren die Tumorzellen meist Proteasen um die extrazelluläre Matrix zu degradieren (Yilmaz et al. 2007). Durch die Auflösung interzellulärer Kontakte verlieren die Zellen ihre Polarität und reorganisieren ihr Zytoskelett. Dadurch verändern sich die zellulären Genexpressionsmuster und Signalkaskaden, sodass sie einen invasiven Phänotyp entwickeln (Lamouille et al. 2014). Diese sogenannte epitheliale-zu-mesenchymale Transition (EMT) ist genetisch hauptsächlich gekennzeichnet durch eine Herabregulation des Proteins E-Cadherin, welches eine normale Zell-Zell-Interaktion gewährleistet und intrazelluläre Signalwege aktiviert (Geiger und Peepers 2009). Darüber hinaus ist die EMT mit einer veränderten Proteasenaktivität assoziiert (Lawrence et al. 2007).

Die Metastasierung scheint ein früher Prozess in der Tumorprogression zu sein, wobei ein oder mehrere Subpopulationen die Fähigkeit entwickeln, sich vom Primärtumor zu lösen und in die Blutbahn zu gelangen. Dort werden die sogenannten *circulating tumor cells* zunächst als harmlos angesehen, bis sie es schaffen in einem Kapillarbett zu stoppen, dort aus der Zirkulation auszutreten und zu proliferieren. Die Neoangiogenesestimulation der Tumorzellen dient dabei nicht nur der Aufrechterhaltung der metabolischen Versorgung des Primärtumors, sondern auch als Zugang zum systemischen Kreislauf (Nguyen 2004). Eine entscheidende Rolle im Prozess der Metastasierung spielt hierbei der Umstand, dass die disseminierten Tumorzellen eines Tumors (*seeds*) nicht beliebig in andere Organe metastasieren können. Die Extravasation und Ausbildung solider Metastasen hängt stark von der Mikroumgebung der Zielorgane (*soil*) ab (Fidler 2003).

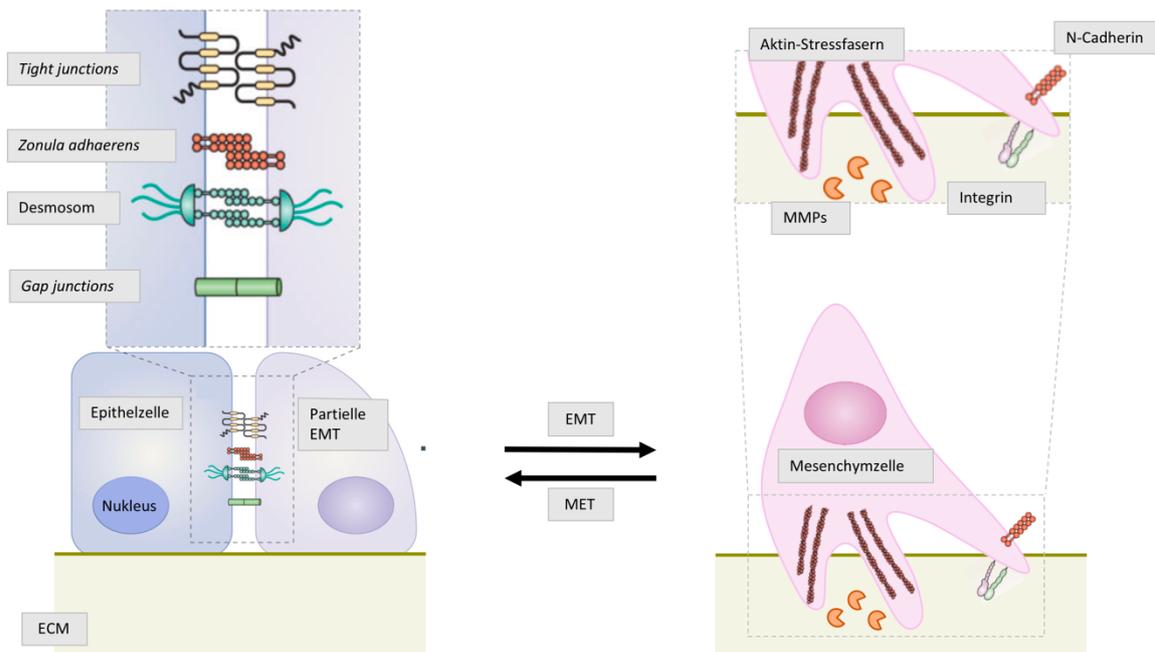


Abbildung 1-3: Zellveränderungen bei der EMT

Die Auflösung der Zell-Zell-Kontakte durch *Tight junctions*, *Zonula adherens*, Desmosomen und *Gap junctions* und der Verlust der basal-apikalen Polarität der Zellen sind wichtige Schritte in der EMT. Außerdem reduzieren die Zellen die Expression epithelialer Marker (wichtigster Vertreter: E-Cadherin) und verstärken gleichzeitig die Expression mesenchymaler Proteine wie N-Cadherin. Anschließend kommt es zu einer Reorganisation des Zytoskeletts durch Ausbildung von Aktin-Stressfasern. Die Zellen entwickeln Lamello- und Filopodien und erlangen so einen motilen, invasiven Phänotyp. Die Expression von MMPs ermöglicht die nötige Degradierung der extrazellulären Matrix (ECM).

Quelle: Modifiziert nach Lamouille et al. (2014).

1.2.2 Die Rolle von Proteasen in der Tumorentwicklung und -progression

Proteasen sind Enzyme, die die irreversible Hydrolyse von Peptidbindungen katalysieren. Sie werden gemäß ihrem katalytischen Mechanismus beim Menschen in fünf Hauptgruppen unterteilt: Aspartat-, Cystein-, Serin-, Metallo- und Threoninproteasen (Koblinski et al. 2000). Derzeit sind 588 humane Proteasen bekannt (Perez-Silva et al. 2016; Quesada et al. 2009). Etwa die Hälfte der Proteasen befinden sich extrazellulär, weniger intrazellulär oder intramembranös (Turk et al. 2012). Um massive homöostatische Dysregulationen zu vermeiden, muss die Aktivität und Spezifität von Proteasen sehr streng reguliert werden. Die meisten Proteasen werden als inaktive Vorstufen, sogenannte Zymogene, produziert, welche erst durch proteolytische Abspaltung des Propeptids in ihre mature Form überführt werden. Auch durch Kompartimentierung und pH-Abhängigkeit kann die proteolytische Aktivität kontrolliert werden. Nicht zuletzt existieren eine Vielzahl endogener Inhibitoren, wie Cystatine für Cysteinproteasen, Serinproteaseinhibitoren (Serpine) für Serinproteasen oder *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs), welche meist ein breites Hemmspektrum gegen mehrere Proteasen besitzen (Turk et al. 2001; Mason und Joyce 2011). Während des Prozesses des Proteinkatabolismus sind alle Proteine einer Proteolyse unterworfen. Meist werden Proteine aber nicht komplett degradiert, sondern lediglich prozessiert, um die

Funktionalität oder Aktivität des Proteins zu beeinflussen. Damit werden sehr präzise biologische Prozesse wie z. B. DNA-Replikation, Proliferation, Differenzierung und Migration gesteuert (Lopez-Otin und Overall 2002). Das Degradom, die Gesamtheit aller physiologischen Substrate einer Protease, wird dabei nicht nur durch die Möglichkeit einer Protease bestimmt, ein bestimmtes Protein zu spalten, sondern auch durch die Zugänglichkeit des Substrates, d. h. durch die Kollokalisierung von Substrat und Protease (Turk 2006).

Proteasen agieren meist innerhalb eines sogenannten proteolytischen Netzwerkes. Die Aktivierung einer Protease kann direkt (über proteolytische Spaltung) oder indirekt (z. B. über Spaltung eines Aktivators oder Inhibitors) die Aktivität oder die Quantität anderer Proteasen beeinflussen, wodurch letztlich ein komplexes System zellulärer Kontrollmechanismen entsteht (Mason und Joyce 2011).

Die Rolle des proteolytischen Netzwerkes in der Tumorprogression ist noch nicht gänzlich verstanden. Bekannt ist, dass Proteasen an der Degradierung extrazellulärer Matrix (ECM) und damit an der Invasion und Metastasierung beteiligt sind (Shay et al. 2015; Overall und Kleinfeld 2006). Mögliche proteolytische Kaskaden involvieren aber auch die Aktivierung des Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivators (uPA) durch Cystein- oder Serinproteasen, die wiederum über die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin zum direkten und indirekten (durch Matrixmetalloproteinaseaktivierung) Abbau der ECM führt (Koblinski et al. 2000). Entscheidend ist dabei neben der extrazellulären Proteolyse auch die intrazelluläre Degradierung endozytierter Proteinreste, welche durch lysosomale Cysteinproteasen, die Cathepsine, erfolgt (Turk et al. 2001).

Zusätzlich werden durch Spaltung von ECM-Proteinen Wachstumsfaktoren aktiviert oder freigesetzt, die wiederum die Proliferation der Tumorzellen stimulieren, was sowohl die Progression des Tumors aus prämaligen Vorstufen als auch die Invasion begünstigt (Koblinski et al. 2000; Fuhrman-Luck et al. 2014).

Außerdem spielen Proteasen eine wichtige Rolle in der Stimulation der Angiogenese, der Modulation der Apoptose und der Interaktion mit dem Tumorstroma (Koblinski et al. 2000; Overall und Kleinfeld 2006), wobei diese abhängig von Tumorart und –stadium sowohl tumorprogressive als auch tumorinhibierende Eigenschaften haben können (Mason und Joyce 2011). So können Proteasen beispielsweise eine vermehrte Resistenz gegen Chemotherapeutika induzieren (Kryza et al. 2016).

Hinzu kommen eine Vielzahl nichtkatalytischer Funktionen als Liganden, über die Bindung von DNA oder Proteindomänen (Shay et al. 2015), und bidirektionale Interaktionen mit anderen Enzymklassen, beispielsweise mit den Kinasen (Lopez-Otin und Hunter 2010).

Proteasen besitzen also eine Schlüsselfunktion in der Karzinogenese und eine genaue Kenntnis ihrer biologischen Wirkmechanismen stellt eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis der Tumorprogression und für die Evaluierung von Proteasen als therapeutische Zielstrukturen dar.

1.2.3 Proteasen als Zielstrukturen in der Krebstherapie

Da selbst Tumoren derselben Entität einer großen Heterogenität unterworfen sind, liegt das Augenmerk der Krebsforschung immer stärker auf der Entwicklung individueller und zielgerichteter Therapieformen. In der klinischen Anwendung werden v. a. Monotherapien gegen Schlüsselproteine der Signaltransduktion oder Oberflächenrezeptoren verwendet. Rationaler als eine Monotherapie wäre zur Verbesserung der Therapieeffizienz und zur Verminderung der Nebenwirkungen eine Kombination aus verschiedenen Therapeutika (Imai und Takaoka 2006).

Proteasen stellen durch ihre elementare Stellung in der Begünstigung des Tumorfortschreitens vielversprechende therapeutische Zielstrukturen dar. Zu diesem Zweck erfüllt eine ideale Zielprotease eine essentielle Funktion in der Krankheitsinitiation und/oder -progression, die spezifisch inhibiert und nicht von anderen Proteasen kompensiert werden kann, und weder die Zielprotease noch ihre Familienmitglieder besitzen protektive oder lebensnotwendige Eigenschaften, die sie zu einem *anti-target* machen (Overall und Kleifeld 2006).

Zunächst lag wegen ihrer Rolle in der Degradierung der ECM der Fokus der Proteaseinhibition auf den Metalloproteinasen. Leider zeigten die entsprechenden Therapeutika wegen ihrer geringen Selektivität und der Blockade wichtiger zellulärer MMP-Funktionen zwar schwere Nebenwirkungen aber, insbesondere bei späten Tumorstadien, kaum Benefit (Turk 2006). Es wurde eine Vielzahl neuerer Substanzen wie nichtpeptidomimetische Inhibitoren beispielsweise Prinomastat oder chemisch modifizierte Tetracycline entwickelt. Aber auch unter diesen kam es häufig zu v. a. muskuloskelettalen Nebenwirkungen (Jablonska-Trypuc et al. 2016).

Allerdings gibt es durchaus bewährte Substanzen, die zusätzlich zu ihrem eigentlichen Wirkmechanismus einen proteaseinhibitorischen Effekt aufweisen, darunter Letrozol und Bisphosphonate (Jablonska-Trypuc et al. 2016). Und Proteasominhibitoren zählen in einigen Tumorentitäten bereits zu den Standardtherapeutika (Leleu et al. 2019).

Dies zeigt zum einen, wie komplex sich die Entwicklung einer zielgerichteten Therapie gegenüber Proteasen darstellt, und zum anderen, wie effektiv die Proteaseinhibition in der Behandlung maligner Tumoren sein kann. Deshalb ist es umso wichtiger, die pro- und antitumorigenen Effekte einer Protease abzuwägen, die Interaktionen der Protease im proteolytischen Netzwerk zu beachten (Fortelny et al. 2014) und sich ein umfassendes Bild über das Degradom einer Protease zu verschaffen (Overall und Kleifeld 2006; Turk 2006).

Proteasen stellen also ideale therapeutische Angriffspunkte dar und die Analyse ihrer Funktion, ihres Degradoms und ihres Einflusses auf Signalwege, insbesondere auch in Bezug auf ihre aktivitätsabhängigen und -unabhängigen Einflussfaktoren, ist essentiell für die Validierung ihres therapeutischen Potentials.

1.3 Kallikrein-ähnliche Peptidasen (KLKs)

1.3.1 Genlokus, Struktur und Spezifität

Kallikrein-ähnliche Peptidasen stellen eine Gruppe von 15 Serinproteasen dar, deren ca. 265 kbp großer Genlokus auf dem Chromosom 19q13.3-13.4 liegt (Yousef et al. 2000; Gan et al. 2000; Cretu et al. 2012). Neben den 15 KLK Genen existiert ein bekanntes Pseudogen *KLKP1*, welches unter anderem eine Nichtserinprotease kodiert (Kaushal et al. 2008; Yousef et al. 2004). *KLK1* und *KLK4-15* werden, im Gegensatz zu *KLK2* und *KLK3*, vom komplementären Strang der DNA transkribiert (Cretu et al. 2012; Stephenson et al. 1999). Alle *KLKs* bestehen aus 5 kodierenden Exons, die in ihrer Länge und Anordnung konserviert sind (Yousef und Diamandis 2001, 2003). Die stärkste Homologie findet sich in den Kodons der katalytischen Triade, wobei Histidin im zweiten, Aspartat im dritten und Serin im fünften Exon kodiert wird. Die Gene aller Kallikrein-ähnlichen Proteasen tragen die Informationen für ein prä-pro-Enzym mit einem Signalpeptid von 17 bis 20 Aminosäuren, einem Propeptid von 4 bis 9 Aminosäuren (mit Ausnahme von *KLK5*, welche ein längeres Propeptid besitzt) und dem maturen Enzym. Abhängig von der Aminosäure der Substratbindetasche ergibt sich eine trypsin- (Aspartat: *KLK1*, 2, 4-6, 8, 10-14) oder eine chymotrypsinähnliche oder gemischte Aktivität der Proteasen (Serin: *KLK3*; Asparagin: *KLK7*; Glycin: *KLK9*; und Glutamat: *KLK15*). Alle Proteasen enthalten 5 (*KLK1-3*, 13) bis 6 (*KLK4-12*, 14, 15) Disulfidbrücken, welche ebenfalls konserviert sind (Yousef und Diamandis 2003, 2001). Die Transkription wird über mehrere *hormone response elements* (HRE), *androgen response elements* (ARE) und *glucocorticoid response elements* (GRE) unter anderem durch Steroidhormone beeinflusst (Cretu et al. 2012; Borgono und Diamandis 2004).

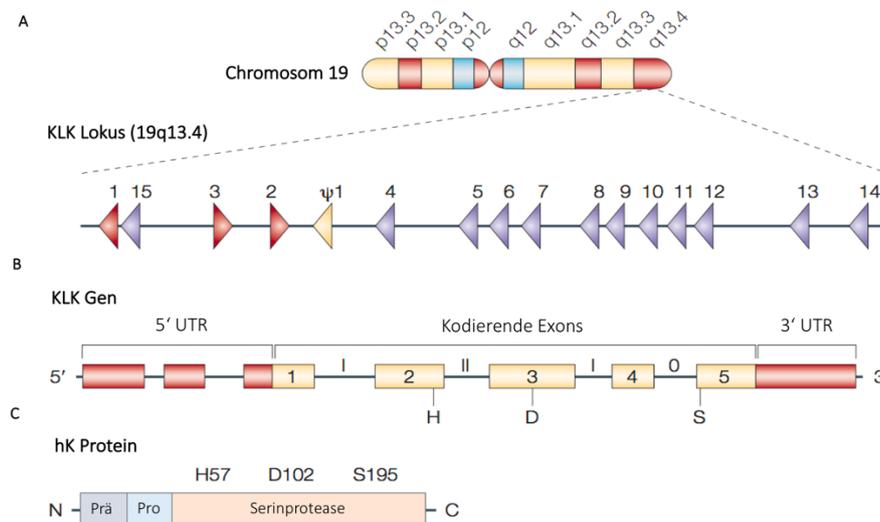


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung des KLK Lokus, Gens und Proteins

(A) Der Genlocus der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 19. Die KLKs liegen gebündelt ohne Unterbrechung durch Nicht-KLK-Gene. Alle KLKs außer KLK2 und KLK3 werden vom komplementären Strang der DNA transkribiert.

(B) Alle KLKs bestehen aus 5 kodierenden Exons und vier Introns, wobei die Länge der Exons im Gegensatz zur Länge der Introns zwischen den KLKs ähnlich ist. Die Lage der Basen, welche für die Aminosäuren der katalytischen Triade (H, D, S) kodieren, ist konserviert. Die meisten KLKs enthalten im Bereich des 5'UTRs 1-3 nichtkodierende Exons.

(C) Humane KLK Proteine (hK Proteine) sind Einzelketten. Sie enthalten ein Präprotein, welches das Protein in den sekretorischen Weg einschleust, ein Proprotein, welches die Protease inaktiv hält, bis dieses proteolytisch abgespalten wird, und die mature, katalytisch aktive Serinprotease.

Quelle: Modifiziert nach Borgono und Diamandis (2004).

1.3.2 Regulation und Interaktion im proteolytischen Netzwerk

Neben der Regulation der KLK-Expression z. B. durch Steroidhormone bedarf es auch posttranslationaler Mechanismen, um die irreversible Aktivität der Proteasen zu kontrollieren und die Gewebeintegrität zu gewährleisten. Dazu zählen (a) die Sekretion der Protease als inaktive Vorstufe (Zymogen), (b) das Vorhandensein endogener Inhibitoren, (c) die allosterische Inhibition und (d) die Inaktivierung durch Proteolyse (Borgono und Diamandis 2004).

1.3.2.1 Sekretion als inaktive Vorstufen

Die Aktivierung der Zymogene durch Abspaltung der Propeptide kann sowohl intrazellulär im Bereich des Golgi-Apparats oder der sekretorischen Vesikel als auch extrazellulär erfolgen. Die meisten KLKs enthalten ein Arginin oder Lysin als C-terminale Aminosäure des Propeptids, was nahelegt, dass sie von trypsinähnlichen Proteasen aktiviert werden. So ist es nicht verwunderlich, dass für einige KLKs, darunter KLK2, 6 und 13 eine Autoaktivierung nachgewiesen werden konnte (Yousef und Diamandis 2002).

Eine Ausnahme stellt KLK4 dar, welches ein Glutamin am C-terminalen Ende des Propeptids enthält, wodurch es kaum durch trypsin- oder chymotrypsinähnliche Proteasen aktiviert werden sollte

(Beaufort et al. 2010). Während der Zahnschmelzentwicklung erfolgt die Aktivierung vermutlich durch die Dipeptidyl Peptidase 1 (DPP1) (Tye et al. 2009) und die Matrixmetalloproteinase 20 (MMP20). Eine Aktivierung von pro-KLK4 zu KLK4 führt dabei wiederum zur proteolytischen Inaktivierung von MMP20, sodass die beiden Proteasen in der Zahnentwicklung nur kurzzeitig koaktiviert sind (Yamakoshi et al. 2013). Da sowohl DPP1 als auch MMP20 in der Prostata nur schwach exprimiert werden, müssen dort weitere Aktivatoren existieren (Rao et al. 1997; Uhlen et al. 2015). In Untersuchungen mit rekombinanten Proteinen konnte eine Aktivierung von pro-KLK4 durch MMP3 (Beaufort et al. 2010) nachgewiesen werden. Auch dieses ist laut *Humanem Protein Atlas* in der Prostata nur gering exprimiert (Uhlen et al. 2015), scheint aber im Prostatakarzinom mit KLK4 kolokalisiert zu sein (Reid et al. 2017). Außerdem konnte entgegen der allgemeinen Auffassung, KLK2 könne keine Proteine mit Glutamin in der P1-Position spalten, gezeigt werden, dass glykosyliertes pro-KLK4 sehr effizient durch glykosyliertes KLK2 und KLK4 aktiviert werden kann. Das legt nahe, dass posttranslationale Modifikationen einen großen Einfluss auf die Interaktion der Proteasen haben und in weiteren Studien berücksichtigt werden sollten (Guo et al. 2018).

1.3.2.2 Endogene Inhibitoren

Die Zymogenaktivierung ist irreversibel. Sobald die Proteasen aktiv sind, werden sie von einer Vielzahl endogener Inhibitoren kontrolliert.

LEKTI (*lympho-epithelial Kazal-type inhibitor*), ein Serinproteaseinhibitor mit mehreren Hemmdomänen vom Kazal-Typ, ist hauptsächlich im epithelialen Gewebe der Haut aktiv. Kazal-Typ Inhibitoren hemmen KLKs kompetitiv, indem sie diese reversibel binden, wobei ihre *Turnover*-Rate sehr viel langsamer als die des eigentlichen Substrats ist (Goettig et al. 2010). Eine Mutation in dem LEKTI-Gen (*SPINK5*) führt zum *Netherton* Syndrom, eine autosomal-rezessiv vererbte Hauterkrankung, die mit Barrieredefekten der Haut einhergeht (Kishibe 2019). Als eines von vielen Beispielen zeigt dies die enorme Vulnerabilität des proteolytischen Netzwerkes und die schwerwiegenden Auswirkungen einer Dysbalance.

Im Gegensatz zur Haut scheint die Inhibition der KLKs im Serum und in der Prostata vor allem durch Serpine gewährleistet zu sein. Dabei handelt es sich um eine große Gruppe von Serinproteaseinhibitoren, darunter α_1 -Antitrypsin und Antithrombin III, die in einem Suizidakt die Proteasen inhibieren, indem sie eine kovalente Bindung mit der Serinprotease eingehen und dadurch zu massiven Konformationsänderungen führen (Goettig et al. 2010).

Daneben existiert noch eine Reihe weiterer Inhibitoren. Beispielsweise werden auch KLKs, wie die meisten Proteasen, von α_2 -Makroglobulin inhibiert. Bei einer Proteolyse des 720 kDa großen Proteins durch die Protease kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch die Protease irreversibel im α_2 -Makroglobulin gefangen ist (Goettig et al. 2010).

1.3.2.3 Allosterische Inhibition durch Metallionen

Die Feinanpassung der KLK-Aktivität in der Prostata erfolgt vermutlich über die reversible allosterische Inhibition durch divalente Metallionen, v. a. Zinkionen (Zn^{2+}). Die Prostata besitzt die höchsten Zinklevel (800 – 1500 μM) des menschlichen Körpers (Costello und Franklin 1998), wohingegen die Zinklevel im Seminalplasma sehr viel niedriger sind, sodass die Proteasen vermutlich erst dort ihre Aktivität entfalten können (Borgono und Diamandis 2004; Goettig et al. 2010) und dadurch die Spermienmotilität ermöglicht wird. Für KLK4 konnte gezeigt werden, dass es bis zu einer Zinkkonzentration von 1 μM hoch aktiv ist, die Aktivität allerdings bei steigendem Zinklevel ab 100 μM auf bis zu 30 % abfällt (Debela et al. 2006). Auch in der Haut konnte die Modulation der proteolytischen Aktivität durch Zinkionen nachgewiesen werden (Goettig et al. 2010). Interessanterweise ist die Zinkkonzentration im Prostatakarzinom im Vergleich zum umgebenden gesunden Gewebe um bis zu 60 - 80 % verringert (Costello und Franklin 1998), was auf eine erhöhte KLK-Aktivität im Tumorgewebe schließen lässt (Borgono und Diamandis 2004).

Dies verdeutlicht, dass Veränderungen der im gesunden Gewebe streng kontrollierten Proteasenaktivität einen großen Einfluss auf die Entwicklung benigner oder maligner Erkrankungen haben können und ein besseres Verständnis der Kontrollmechanismen und deren Auswirkungen nötig ist, um die weitreichenden Konsequenzen einer Dysbalance und einer therapeutischen Inhibition zu verstehen und vorherzusehen.

1.3.3 Vorkommen und Funktion im gesunden Prostatagewebe und der Samenflüssigkeit

Um die Rolle der KLKs in der Karzinogenese des Prostatakarzinoms zu verstehen, ist es wichtig zunächst ihre Funktion in der gesunden Prostata genauer zu betrachten. Alle 15 KLKs werden in unterschiedlichem Ausmaß in der Prostata exprimiert (Bayani et al. 2012; Shaw und Diamandis 2007). Für KLK2-4 konnte in mehreren unabhängigen Studien eine auf mRNA- und Proteinlevel hohe Expression nachgewiesen werden (Bayani et al. 2012; Harvey et al. 2000). Bis auf KLK6 und 8 werden alle KLKs in die Samenflüssigkeit sezerniert, wobei KLK2 und 3 den größten Anteil ausmachen (Shaw und Diamandis 2007).

Die Proteolyse durch Kallikrein-ähnliche Peptidasen stellt eine Schlüsselfunktion in der Auflösung des Samengerinnsels dar und ermöglicht damit die Spermienmotilität und Befruchtung (Emami und Diamandis 2012). Der wohl bekannteste Vertreter der KLK-Familie, KLK3 (PSA), hydrolysiert die Semenogeline 1 und 2 (Lilja 1985; Christensson et al. 1990) sowie Fibronectin (Lilja et al. 1987), wodurch es zur Verflüssigung des Ejakulats kommt. Neben KLK3 konnte *in vitro* auch für KLK2 und KLK5 nachgewiesen werden, dass sie Semenogeline spalten (Lovgren et al. 1999; Michael et al. 2006). Auch an der Proteolyse von Fibronectin könnten neben KLK3 noch weitere KLKs, darunter

KLK2, 5 und 14, beteiligt sein (Emami und Diamandis 2007). Durch Aktivierung von uPA scheinen KLK2 und KLK4 noch weitere fibrinolytische Faktoren zu beeinflussen (Emami und Diamandis 2012; Beaufort et al. 2006; Takayama et al. 2001).

Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass sich die Proteasen gegenseitig oder selbst im Rahmen einer sogenannten proteolytischen Kaskade aktivieren. So stellen KLK2, 4, 5 und 14 mögliche Aktivatoren von KLK3 dar (Emami und Diamandis 2008; Michael et al. 2006; Takayama et al. 2001; Williams et al. 2010; Matsumura et al. 2005) und KLK2 kann von KLK4, 5 und sich selbst aktiviert werden (Michael et al. 2006; Yoon et al. 2007). Insgesamt scheinen KLK4, 5, 11, 12 und 14 aufgrund ihrer breiten Spezifität gegen Arginin und/oder Lysin in der P1-Position die Fähigkeit zu besitzen fast alle anderen pro-KLKs zu aktivieren (Yoon et al. 2007).

Zusätzlich wird angenommen, dass die KLKs die Spermienmotilität unabhängig von der Spaltung von Semenogelinen und Fibronectin auch über den Kinin-Signalweg beeinflussen (Emami und Diamandis 2012). Für Bradykinin konnte ein konzentrationsabhängiger positiver Effekt auf die Spermienmotilität gezeigt werden (Siems et al. 2003). Neben KLK1, dem hauptsächlich die Aktivierung der Kinine zugeschrieben wird (Tang et al. 2011), kann auch KLK2 Bradykinin freisetzen (Charlesworth et al. 1999). Darüber hinaus scheint KLK1 durch KLK2 und 14 aktiviert zu werden (Emami und Diamandis 2008; Yoon et al. 2007).

Die regulatorischen Mechanismen, insbesondere die Inhibition durch Zn^{2+} und Serpine wurden bereits in Kapitel 1.3.2 erläutert. Hier sei nur noch darauf hingewiesen, dass Semenogelin die Fähigkeit besitzt Zn^{2+} zu binden (Jonsson et al. 2005), wodurch die KLK-Aktivität erhöht werden kann. Durch die darauffolgende Liquefizierung des Spermas wird das Zn^{2+} wieder freigesetzt, was als negativer Feedbackmechanismus die KLK-Aktivität wieder sinken lässt (Emami und Diamandis 2012). Daneben konnte KLK3 *in vitro* von KLK14 degradiert werden, sodass angenommen werden kann, dass die Proteasen auch einer Regulation durch proteolytischen Abbau unterliegen (Emami und Diamandis 2008).

Neben der Verflüssigung des Seminalgerinnsels scheinen KLKs auch durch eine immunmodulatorische Reaktion im weiblichen Genitaltrakt an einer erfolgreichen Befruchtung der Oozyte beteiligt zu sein. Die entzündliche Reaktion wird dabei hauptsächlich über TGF- β -Signalwege initiiert, an deren Aktivierung im Seminalplasma KLKs, vornehmlich KLK14, beteiligt sind (Emami und Diamandis 2010).

Obwohl die meisten der genannten Interaktionen bisher lediglich *in vitro* oder *ex vivo* untersucht wurden, unterstreicht dies die Komplexität der möglichen Proteasen-Wechselwirkungen in der Prostata und damit die weitreichenden Folgen der Dysregulation einer oder mehrerer Proteasen

sowie die immense Bedeutung, die Auswirkungen der Proteasenfunktionen im Prostatakarzinom genauer zu erforschen.

1.4 Die Rolle Kallikrein-ähnlicher Peptidasen beim Prostatakarzinom

1.4.1 Expressionsmuster der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen im Prostatakarzinom und ihre Korrelation zu klinischen Parametern

Die Rolle von Proteasen in der Tumorprogression im Allgemeinen wurden bereits in Kapitel 1.2.2 erläutert. Auch im Prostatakarzinom konnte eine differentielle Expression verschiedener Proteasen nachgewiesen werden. KLK2, 4, 12, 14 und 15 werden im Prostatakarzinomgewebe im Vergleich zu benignem Prostatagewebe vermehrt (Darson et al. 1999; Darson et al. 1997; Klock et al. 2007; Avgeris et al. 2011; Memari et al. 2007; Yousef et al. 2003; Yousef et al. 2001), KLK3, 5 und 7 vermindert exprimiert (Darson et al. 1997; Jamaspishvili et al. 2011; Yousef et al. 2002). Die erhöhte Expression einiger dieser KLKs konnte auch mit geringerer Tumordifferenzierung (KLK2, 14 und 15) oder höherem Tumorstadium (KLK4, 14 und 15) assoziiert werden (Darson et al. 1999; Avgeris et al. 2011; Yousef et al. 2003; Yousef et al. 2001). Andere KLKs scheinen protektiv zu sein und korrelieren mit besserer Differenzierung und geringerem Stadium (KLK5) (Yousef et al. 2002). Für KLK4 ist die Datenlage widersprüchlich. KLK4 wird in Primärtumoren der Prostata und in geringerem Ausmaß auch in Metastasen exprimiert (Day et al. 2002; Tse et al. 2020). Eine hohe KLK4-Expression in Primärtumoren soll mit einem höheren Tumorstadium (Avgeris et al. 2011), aber einer besseren Tumordifferenzierung (nach *Gleason-Score*) korrelieren (Tse et al. 2020). Wobei letztere Korrelation in einer anderen Studie nicht nachgewiesen werden konnte (Klock et al. 2007).

Die veränderte KLK-Expression bzw. -Sekretion wird u. a. bereits zur Früherkennung von Prostataamalignomen als Biomarker genutzt, wobei verschiedenste Ansätze, darunter die Miteinbeziehung von KLK2, verfolgt werden, um die Qualität des Tests weiter zu verbessern (s. Kapitel 1.1.3). Unter diesen Umständen ist es erwähnenswert, dass auch KLK11 im Serum von Männern mit Prostatakarzinom im Vergleich zu scheinbar gesunden Männern erhöht ist (Diamandis et al. 2002). Die Daten zur Expression von KLK11 im Prostatakarzinomgewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe sowie zur Korrelation mit Tumorstadium und -differenzierung sind allerdings widersprüchlich (Jamaspishvili et al. 2011; Bi et al. 2010).

Zusammenfassend deutet die differentielle Expression fast aller KLKs darauf hin, dass Kallikrein-ähnlichen Peptidasen eine große Bedeutung in der Entwicklung des Prostatakarzinoms zukommt. Diese stellen somit optimale Parameter dar, um durch Messungen der KLK-Werte in Serum oder Biopsien die Diagnostik weiter zu verbessern und durch gezielte Therapeutika die Progression des Prostatakarzinoms zu verhindern.

1.4.2 Auswirkungen der KLKs, insbesondere von KLK4, auf die Tumorprogression

1.4.2.1 Modulation der Tumorzell-Proliferation

Der proliferative Effekt von Kallikrein-ähnlichen Proteasen auf Prostatakarzinomzellen wurde *in vivo* und *in vitro* mehrfach untersucht, wobei die Mechanismen und die Abhängigkeit von der Proteasenaktivität noch nicht abschließend geklärt werden konnten.

Ein *knockdown* von aktiver KLK3 in LNCap-Zellen führte in einem *in vivo* Mausmodell zu einer verringerten Tumorrates und niedrigeren Tumorlast. Gleichzeitig steigerte die Expression einer aktiven Variante von KLK3 in DU145-Zellen die Tumorgroße und -last im Mausmodell im Vergleich zu Wildtyp-KLK3-DU145-Zellen und Vektorkontrollzellen, was darauf hinweist, dass der proliferative Effekt aktivitätsabhängig ist. Entsprechende Ergebnisse konnten *in vitro* gezeigt werden (Williams et al. 2011). Im Gegensatz dazu führte die Injektion von aktiver rekombinanter KLK3 in den PC-3M-Zell-Tumor, einer Unterlinie von PC-3-Zellen, von Mäusen zu einer Verringerung der Tumormasse (Bindukumar et al. 2005) und die Expression von prä-pro-KLK3 verschaffte den PC-3-*Xenografts* in Nacktmäusen keinen Proliferationsvorteil im Vergleich zu Wildtypkontrollen (Denmeade et al. 2003). Das impliziert, dass KLK3 in androgensensitiven Tumoren verkörpert durch LNCap-Zellen pro- und in androgenunabhängigen Tumoren verkörpert durch PC-3-Zellen antiproliferative Wirkungen entfaltet. Auch KLK10 scheint auf PC-3-Zellen einen antiproliferativen Effekt zu haben. KLK10-Expression in diesen Zellen führte zu einer Verminderung der Proliferationsrate *in vitro* und einem kleineren Tumolvolumen im Mausmodell *in vivo* (Hu et al. 2015).

Nach KLK4-*knockdown* in LNCap- und LAPC4-Zellen kam es, ähnlich den Ergebnissen nach KLK3-*knockdown*, zu einer verminderten Wachstumsrate und einer verringerten Kolonie-Bildung verglichen mit Kontrollzellen *in vitro* sowie zu einem verlangsamten Tumorwachstum der LNCap-*Xenografts in vivo* (Jin et al. 2013; Klock et al. 2007). Diese Effekte wurden der nichtproteolytischen Interaktion von KLK4 mit dem Transkriptionsregulator PLZF (*Promyelocytic leukaemia zinc finger protein*) und der darauffolgenden Beeinträchtigung des AR- und Phosphoinositid-3-Kinasen- (PI3K-) Signalwegs zugeschrieben. Die Hypothese konnte durch die Tatsache unterstützt werden, dass inverse Auswirkungen auf diese Signalwege nicht nur durch die ektope Expression von Wildtyp-KLK4, sondern auch durch die Expression einer vermutlich inaktiven KLK4-Variante (Serin-zu-Alanin Mutation im aktiven Zentrum) nachzuweisen waren (Jin et al. 2013). Diese Ergebnisse implizieren, dass neben der sezernierten prä-pro-KLK4 eine nukleäre Variante von KLK4 existiert, was durch Ergebnisse von weiteren Forschungsgruppen unterstützt werden konnte (Dong et al. 2005; Xi et al. 2004). Zusätzlich existiert im Prostatakarzinom ein Fusionsprotein aus KLK4 und KLK1, welches in RWPE-1-Zellen *in vitro* und *in vivo* die Proliferation förderte (Chakravarthi et al. 2019). Im Gegensatz

dazu führte eine Expression von WT-KLK4 verglichen zur Vektorkontrolle in PC-3-PSMA-Zellen zu einer Reduktion der Primärtumor- und Metastasenlast in Mäusen (Tse et al. 2020).

Auch zum proliferativen Effekt von KLK4 *in vitro* wurden in der Literatur widersprüchliche Daten veröffentlicht. In PC-3-Zellen wurden nach Überexpression von KLK4 verringerte und erhöhte Proliferationsraten gemessen (Veveris-Lowe et al. 2005; Klock et al. 2007; Tse et al. 2020). Hierbei ist zu beachten, dass in den Versuchen zwei unterschiedliche KLK4-Konstrukte verwendet wurden. Bei prä-pro-KLK4 kann davon ausgegangen werden, dass die Protease sezerniert wird, was auch im Western Blot nachgewiesen werden konnte (Veveris-Lowe et al. 2005; Tse et al. 2020). Der ab Exon 2 exprimierte KLK4-Variante von Klock et al. fehlt allerdings das Signalpeptid, da dieses in Exon 1 initiiert wird (Clements et al. 2001), sodass dabei v. a. die nukleäre Variante von KLK4 exprimiert werden sollte (Klock et al. 2007). Dies suggeriert, dass prä-pro-KLK4 in PC-3-Zellen die Proliferation vermindert, wohingegen nukleäre KLK4 die Proliferation verstärkt.

In den androgenunabhängigen DU145-Zellen steigerte jedoch sowohl die Expression der nukleären KLK4-Variante als auch die Zugabe von rekombinanter KLK4 die Proliferationsrate (Klock et al. 2007; Mize et al. 2008). Dies verdeutlicht, dass weder die Auswirkungen von KLKs auf das Tumorstadium noch die genauen Abläufe der Proliferationsbeeinflussung durch KLKs abschließend geklärt sind.

Zu den diskutierten Mechanismen, über die KLKs die Proliferation beeinflussen, zählen (a) die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie IGF und HGFA, (b) die Aktivierung des PAR-Signalwegs sowie (c) des AR-Signalwegs und (d) die Aktivierung anderer Proteasen im proteolytischen Netzwerk (Kryza et al. 2016). Für einige KLKs konnte gezeigt werden, dass sie *insulin-like-growth-factor*-Bindeproteine (IGFBPs) spalten (Kryza et al. 2016; Borgono und Diamandis 2004). Beispielsweise degradiert rekombinante KLK4 *in vitro* IGFBP-3, 4, 5 und 6 (Matsumura et al. 2005). Dadurch greifen die Proteasen direkt über die Proteolyse der IGFBPs und indirekt über die Freisetzung von IGFs in die Regulation von Proliferation und Apoptose ein (Borgono und Diamandis 2004). In der Tat sind IGF-Proteinlevel im Prostatakarzinom im Vergleich zu benignem Gewebe erhöht und korrelieren mit hohen präoperativen PSA-Werten (IGF I und II) und hohem *Gleason-Grading* (IGF II) (Liao et al. 2005). Zudem konnten KLK4 und 5 als Aktivatoren des *pro-hepatocyte growth factor activator* (pro-HGFA) identifiziert werden. Dieser fördert über die Aktivierung von HGF und dessen Signalwegs die Tumorstadiumprogression verschiedener Tumoren (Mukai et al. 2008; Kryza et al. 2016). Bei Patienten mit Prostatakarzinom korrelieren erhöhte Plasma-HGF-Level mit Kastrationsresistenz (Sugie et al. 2016). Ferner können die Proteasen durch die Degradierung der ECM (s. Kapitel 1.4.2.2) viele weitere Wachstumsfaktoren freisetzen (Kryza et al. 2016).

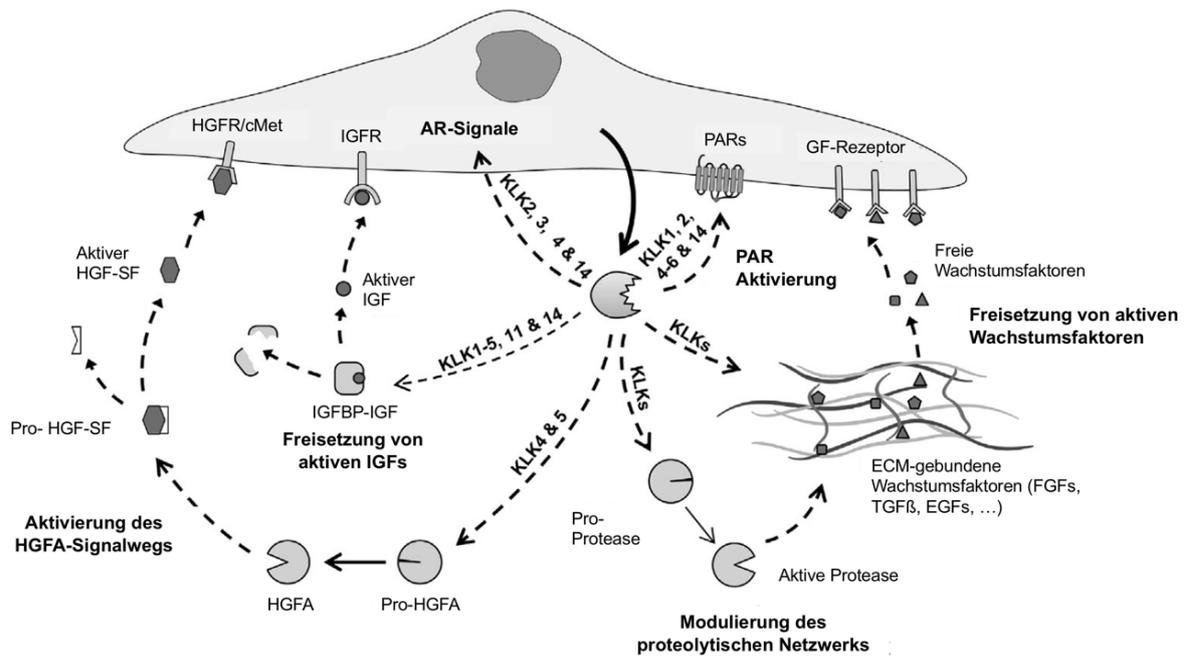


Abbildung 1-5: Übersicht möglicher KLK-vermittelter Mechanismen der Proliferationsregulation in Tumorzellen

KLKs können über verschiedene Mechanismen in die Zellproliferation eingreifen: Aktivierung des Androgenrezeptors oder Protease-aktivierter Rezeptoren (PARs) und deren Signalwege; Aktivierung von weiteren Proteasen; Freisetzung von ECM-gebundenen Wachstumsfaktoren; Spaltung von IGFBPs und konsekutiv Erhöhung der aktiven IGF-Konzentration; Aktivierung des HGFA-Signalwegs durch proteolytische Abspaltung des inhibitorischen Proproteins von Pro-HGFA.

Quelle: Modifiziert nach Kryza et al. (2016).

Darüber hinaus werden sowohl Proliferation als auch Invasion und Angiogenese durch Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs) und den von ihnen stimulierten ERK-Signalweg reguliert. Die Behandlung von Prostatakarzinomzelllinien PC-3, DU145 und LNCap mit rekombinanter KLK2 oder 4 resultierten in einer Phosphorylierung von ERK und damit in einer Aktivierung dieses Signalwegs. In DU145-Zellen führte dies wie oben beschrieben auch zu einer erhöhten Proliferation (Mize et al. 2008). Die Aktivierung des ERK-Signalwegs scheint dabei nicht nur auto-, sondern auch parakrin die Proliferation zu stimulieren. Denn die Stimulation des Signalwegs mit Thrombin führt zu einer vermehrten Sekretion von Wachstumsfaktoren wie Interleukin 6 (IL-6) ins konditionierte Medium der Prostatastromazellen WPMY-1. IL-6, aber nicht die direkte Stimulation durch Thrombin, konnte wiederum die Proliferation von LNCap-Zellen sowie die Expression von PSA und KLK4 in LNCap-Zellen induzieren. Da KLK4 in der Lage ist, PAR zu aktivieren, deutet dies auf einen protumorigenen Feedbackmechanismus zwischen Prostatakarzinom- und Stromazellen hin (Wang et al. 2010). Dieser scheint im Primärtumor v. a. PAR-1 vermittelt. Denn PAR-1 wird überwiegend in Stromazellen exprimiert, während KLK4 und PAR-2 in Prostatakarzinomzellen des Primärtumors, im Stroma aber kaum exprimiert sind. In Knochenmetastasen allerdings ist die Koexpression von KLK4 und PAR-2 nicht nur in den Karzinomzellen, sondern auch in den Osteoblasten nachweisbar (Ramsay et al. 2008; Wang et al. 2010). Zudem könnte der PAR-Signalweg nicht nur über proteolytische Aktivierung der

PARs, sondern auch über die differentielle Expression von assoziierten Genen moduliert werden. Denn KLK4 beeinflusst u. a. in Ovarialkarzinomzellen die Expression von Genen des PAR-, EMT- und TGF- β - Signalwegs (Wang et al. 2018).

Die Stimulation des Androgen-Signalwegs erfolgt bidirektional. Zum einen ist die Expression von KLKs androgenabhängig (s. Kapitel 1.3.1), zum anderen aktiviert KLK2 über einen Koaktivator des AR-Signalwegs ARA70 die Androgenachse in KLK2-überexprimierenden LNCaP-Zellen und fördert somit die Proliferation. Im Gegenzug konnte ein proliferationshemmender Effekt nach KLK2-*knockdown* gezeigt werden (Shang et al. 2014). Erwähnenswert ist dabei, dass KLK2 in LNCaP-Maus-*Xenografts* und in humanem Gewebe in kastrationsresistenten Tumoren stärker vorhanden ist als in hormonsensitiven Tumoren, was darauf hinweist, dass KLK2 über die androgenunabhängige Transaktivierung der Androgen-Signalkaskade zur Kastrationsresistenz beiträgt (Shang et al. 2014). Daneben besitzen KLK4 und 14 die Fähigkeit Sexualhormon-Bindeproteine (SHBP) zu spalten, wobei sich die Proteolyse abhängig davon, ob Androgene gebunden sind oder nicht, stark unterscheidet. So führt KLK4 bei freiem SHBP zur limitierten Proteolyse, wohingegen KLK14 das Protein vollständig degradiert. SHBPs mit gebundenen Androgenen werden hingegen von beiden KLKs so gespalten, dass die Bindestelle intakt bleibt (Sanchez et al. 2012). Die biologischen Konsequenzen davon sind bis dato nicht verstanden (Kryza et al. 2016).

Nicht zuletzt könnte die Aktivierung von TGF- β durch KLKs (Emami und Diamandis 2010; Dallas et al. 2005) eine bedeutende Rolle für die Tumorprogression spielen. Die Stimulation von TGF- β -Signalen in Stromazellen konnte androgenunabhängig AR-Signalkaskaden in LNCaP-Zellen aktivieren. Diese Reaktivierung des AR-Signalwegs ist von großer Bedeutung für die Entstehung des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms. Da dies in der Studie von Yang et al. (2014) unter anderem die Freisetzung von IL-6 involvierte, könnte ein ähnlicher Feedbackmechanismus, wie er für die PARs vorgeschlagen wurde (s. o.), zur Tumorprogression beitragen.

Die oben genannten Studien zeigen, dass Kallikrein-ähnliche Peptidasen über verschiedenste Mechanismen die Proliferation der Tumorzellen beeinflussen können. Die Datenlage legt nahe, dass KLKs vor allem in der Progression androgensensitiver Tumoren, charakterisiert durch die LNCaP-Zellen, eine wichtige Rolle spielen und dabei entscheidend an der Entwicklung eines kastrationsresistenten Prostatakarzinoms mitwirken. Dennoch konnte die Bedeutung der KLKs in der Tumorprogression noch nicht abschließend geklärt werden. Insbesondere die unterschiedliche Auswirkung der Expression verschiedener KLK4-Konstrukte auf die Proliferation von Prostatakarzinomzelllinien zeigt, dass weitere Studien dringend nötig sind, um zu eruieren, inwieweit die Sekretion und die Aktivität der Protease Einfluss auf die Entwicklung des Tumors nimmt.

1.4.2.2 Einfluss auf die Invasion und Migration der Krebszellen

Neben der Proliferation stellt auch die Fähigkeit der Krebszellen zur lokalen Invasion und Migration einen wichtigen Bestandteil der Tumorprogression dar. Die epitheliale-zu-mesenchymale Transition (EMT), erkennbar an einer länglichen, spindeligen Zellform und repräsentiert durch die Abnahme der E-Cadherin- und die Zunahme der Vimentin-Expression, stellt wie bereits in Kapitel 1.2.1 erläutert eine Schlüsselfunktion in diesem Prozess dar und ist charakteristisch für Karzinomzellen auf ihrem Weg zur Metastasierung (Lawrence et al. 2007). Die Expression von prä-pro-KLK3 sowie von prä-pro-KLK4, aber nicht von prä-pro-KLK2 induzierte in PC-3-Zellen Veränderungen hin zu einem mesenchymalen Phänotyp (Veveris-Lowe et al. 2005), konnten allerdings in anderen KLK4-überexprimierenden Zellen, auch derselben Forschungsgruppe, nicht nachgewiesen werden (Gao et al. 2007). Hierbei führte dies zwar nicht zu einer erhöhten Invasionskapazität, steigerte aber das Migrationspotential der prä-pro-KLK3- und -KLK4-Zellen (Veveris-Lowe et al. 2005). Ebenso führte die Expression von KLK7 in DU145-Zellen zur EMT und förderte die Invasion der Zellen in einem Matrigel Assay (Mo et al. 2010).

Darüber hinaus zeigten prä-pro-KLK4 exprimierende PC-3-Zellen eine vermehrte Migration in Richtung konditioniertem Medium von SaOs-2-Knochtumorzellen. Dabei konnte nicht nur KLK4 in den Überständen nachgewiesen werden, sondern die Zugabe des Serinproteaseninhibitors Aprotinin wirkte der erhöhten Migrationsfähigkeit entgegen, was nahelegt, dass prä-pro-KLK4 aktiv aus PC-3-Zellen sezerniert wird, und, dass die proteolytische Aktivität entscheidend für die Motilitätserhöhung ist (Gao et al. 2007). Allerdings konnte auch durch eine intrazelluläre KLK4-Variante (Klokk et al. 2007) und ein KLK4-KLKP1 Fusionsprotein die Migration gesteigert werden. Letzteres entsteht durch die Fusion der Exons 1 und 2 von *KLK4* mit den Exons 4 und 5 von *KLKP1*, wodurch das in Exon 5 von *KLK4* kodierte Serin der katalytischen Triade und damit die KLK4-Aktivität fehlt (Chakravarthi et al. 2019). Beides deutet darauf hin, dass neben der proteolytischen Aktivität auch nichtproteolytische Mechanismen an der Steigerung der Migrationsfähigkeit von Prostatakarzinomzellen beteiligt sind. Dementgegen führte die Expression von prä-pro-KLK4 in PC-3-PSMA-Zellen zu einer verminderten Metastasenbildung in Mäusen (Tse et al. 2020).

Ferner erhöhte prä-pro-KLK4 in PC-3-Zellen die Zelladhäsion auf den mit den Knochenmatrixproteinen Kollagen I oder Kollagen IV beschichteten Oberflächen, was impliziert, dass KLK4 an der Ausbildung von Knochenmetastasen beteiligt ist (Gao et al. 2007). Dies steht auch im Einklang mit der Tatsache, dass KLK4 eine wichtige Rolle in einem anderen mineralisierten Gewebe, der Zahnmatrix, übernimmt (Simmer et al. 1998).

Die Auswirkungen von KLK3 auf die Invasions- und Migrationsfähigkeit der Zellen erwiesen sich als weniger eindeutig. In LNCaP-Zellen verringerte sich die Invasion durch Zugabe eines monoklonalen Antikörpers gegen PSA (Webber et al. 1995). In DU145-Zellen führte die Sekretion von pro-PSA zu

einer Steigerung, die Sekretion von PSA zu einer Verminderung des Invasions- und Migrationspotentials (Cumming et al. 2011). Eine eindeutige Klassifizierung von KLK3 als pro- oder antiinvasiv ist also nicht möglich. Allerdings führte die Implantation von KLK3 sezernierenden *mixed lineage leukemia* (MLL) Zellen in Mäusen zu einer Vermehrung von Osteoblasten und Osteoid (organischer Knochengrundsubstanz) an der Tumorlokalisierung, sodass angenommen werden kann, dass KLK3 unabhängig von dessen Einfluss auf Migration oder Invasion eine Rolle in der Entwicklung von osteoblastischen Knochenmetastasen spielt (Cumming et al. 2011).

Ein Großteil der proinvasiven Auswirkungen von Proteasen wird der Degradierung der extrazellulären Matrix zugeschrieben, welche die lokale Ausbreitung und die Intravasation der Tumorzellen ermöglicht (Kryza et al. 2016). KLKs können ECM-Proteine, darunter wichtige Proteine der Basallamina wie Fibronectin, Kollagen IV und Laminin spalten (Lawrence et al. 2010). Die Durchbrechung der Basallamina markiert für die meisten Malignome den Übergang von intraepithelialer Neoplasie zum invasiven Karzinom und ist deshalb ein wichtiger Schritt in der Tumorentstehung aus prä-malignen Vorstufen.

Auch KLK4 kann die Kollagene I und IV sowie Fibrinogen spalten und weitere Proteasen wie Meprin und MMP1 aktivieren, die wiederum ECM-Moleküle degradieren und somit zu einer erhöhten Invasivität beitragen (Obiezu et al. 2006; Ohler et al. 2010; Sterchi et al. 2008; Fuhrman-Luck et al. 2016). Beachtenswerterweise wird MMP1 in Knochenmetastasen des Prostatakarzinoms produziert und scheint damit auch *in vivo* für die Aktivierung durch KLK4 zugänglich zu sein (Fuhrman-Luck et al. 2016). Ebenso besteht *in vivo* eine überlappende Expression der membrangebundenen Proteasen Hepsin und TMPRSS2 mit KLK4 und 14 und MMP3 und 9. Die Kollokalisation erweist sich dabei am stärksten in speziellen Zellausläufern, die entscheidend für die Migration und Invasion sind. Daneben konnte *in vitro* eine Vielzahl proteolytischer Interaktionen dieser sechs Proteasen nachgewiesen werden, was eine gegenseitige perizelluläre Regulation nahelegt und damit die Komplexität des Einflusses der Kallikreine auf die Tumorprogression unterstreicht (Reid et al. 2017).

Neben der Degradierung der ECM ist die Spaltung von Zell-Zell-Kontakten essentiell für eine suffiziente Zellmotilität. Auch Adhäsionsmoleküle konnten als Substrate von Kallikrein-ähnlichen Peptidasen identifiziert werden. So spalten KLKs Desmocollin, Desmogleine und E-Cadherin (Lawrence et al. 2010). Der Verlust von Zell-Zell-Kontakten zeichnet wiederum eine Verwandlung in einen mesenchymalen Phänotyp (EMT) aus, der mit einer vermehrte Invasivität assoziiert ist (Lawrence et al. 2007).

Neben all den genannten Mechanismen wird auch die Migration und Invasion durch die Kallikrein-assoziierte Anschaltung verschiedener Signalwege beeinflusst. Für KLK1 konnte ein stimulierender Effekt auf die Migration und Proliferation in DU145-Zellen über die Aktivierung von PAR1

nachgewiesen werden (Gao et al. 2010). Da noch weitere KLKs an der Aktivierung von Protease-aktivierten Rezeptoren beteiligt sind (s. Kapitel 1.4.2.1), liegt die Vermutung nahe, dass auch sie so Einfluss auf die Migrationsfähigkeit der Zellen nehmen können. Daneben aktivieren KLKs, darunter KLK4, den Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator (uPA) und modulieren dessen Rezeptor uPAR (Beaufort et al. 2006; Beaufort et al. 2010; Takayama et al. 2001). Beide sind im Prostatakarzinom überexprimiert und mit höherem Tumorstadium, *Gleason-Score* und positivem Lymphknotenstatus sowie kürzerem rezidivfreiem Überleben assoziiert (Kumano et al. 2009).

Kallikrein-ähnliche Peptidasen spielen also eine wichtige Rolle in der Tumorprogression und der Ausbildung von Metastasen. Dabei kommt insbesondere KLK4 aufgrund ihrer Überexpression im Prostatakarzinom und ihrer wichtigen Funktion in mineralisiertem Gewebe eine besondere Bedeutung zu. Sie stellt dadurch eine potentielle therapeutische Zielstruktur für onkologische Medikamente dar und ein genaueres Verständnis ihrer biologischen Rolle und Interaktionen ist essentiell, um ihre diesbezügliche Eignung zu prüfen.

1.4.2.3 Beeinflussung der Angiogenese

Angiogenese ist ein wichtiger Prozess in der Tumorprogression, da sie die Versorgung der Karzinomzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie den Zugang zum systemischen Kreislauf sicherstellt. Einige der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen konnten mit der Neovaskularisation in Verbindung gebracht werden.

Aufgrund der Interaktion mit dem Kinin-Weg lag das Augenmerk der Forschung zunächst auf KLK1 (Kryza et al. 2016). Diese scheint u. a. über Bradykinin-Rezeptor-B₂-abhängige Mechanismen an der Regulation der invasiven, migratorischen und angiogenetischen Fähigkeiten von proangiogenetischen Zellen beteiligt zu sein (Spinetti et al. 2011). Derzeit liegt der Fokus vermehrt auf KLK12. KLK12 stört durch die Spaltung von Fibronektin dessen Polymerisierung und Fibrillenbildung. Dadurch sinkt die Adhäsion von Endothelzellen, sodass deren Motilität und Migrationsfähigkeit steigt (Kryza et al. 2018). Außerdem resultiert die Spaltung von Bindeproteinen der CCN-Familie in einer vermehrten Verfügbarkeit der proangiogenetischen Wachstumsfaktoren *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *bone morphogenic protein 2* (BMP2) (Guillon-Munos et al. 2011). Da auch weitere KLKs mutmaßlich an der Spaltung von *low* oder *high molecular weight kininogen* bzw. von Fibronektin beteiligt sind (Lawrence et al. 2010), könnten auch sie einen Beitrag zur Tumorneovaskularisierung leisten.

Allerdings sind für KLKs auch antiangiogenetische Einflüsse beschrieben. Aktive KLK3 z. B. verringerte im Prostatakarzinom die Vaskularisierung über die proteolytische Freisetzung angiostatischer Peptide und die Veränderung der Expression (anti)angiogenetischer Proteine (Mattsson et al. 2009).

Im Gegensatz dazu konnte für KLK4 eine angiogenesefördernde Wirkung nachgewiesen werden. Die Zugabe von aktiver KLK4 im Vergleich zu inaktiver (Serin-zu-Alanin Mutation) KLK4 führte durch die Aktivierung des PAR1-Signalwegs zu einer gesteigerten Expression und Sekretion von VEGF in WPMY1-Stromazellen, deren konditioniertes Medium wiederum die Proliferation von *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) förderte (Kryza et al. 2017).

Die oben diskutierten Ergebnisse verdeutlichen einen weiteren wesentlichen Anteil der KLKs an der Onkogenese des Prostatakarzinoms, wobei in der Angiogenese insbesondere der Aktivität der Proteasen eine wichtige Rolle zuzukommen scheint. Dennoch sind weitere Untersuchungen nötig, um die pathophysiologischen Mechanismen genauer zu verstehen.

1.5 Zusammenfassung und Zielsetzung dieser Arbeit

Das Prostatakarzinom ist die häufigste Tumorentität und die zweithäufigste tumorassoziierte Todesursache bei Männern in Deutschland. Verbesserungen in der Früherkennung führen häufig zur Diagnose gut behandelbarer Frühstadien, sind aber auch mit Überdiagnose und Übertherapie assoziiert. Dennoch sterben in Deutschland immer noch ca. 13.000 Männer pro Jahr am metastasierten, kastrationsresistenten Tumorstadium, für das trotz eines enormen Forschungsaufwands noch keine Heilung möglich ist. Es werden also dringend Medikamente benötigt, die die Tumorprogression verhindern und/oder eine Erkrankung im Spätstadium heilen können.

Proteasen sind in Tumoren häufig differentiell exprimiert und induzieren die Tumorprogression nicht nur durch einen Abbau der extrazellulären Matrix, sondern auch durch die Interaktion mit der Tumormikroumgebung und anderen Proteasen. Als Schlüsselproteine der Karzinogenese stellen sie somit ideale therapeutische Zielstrukturen dar.

Die Kallikrein-ähnliche Peptidase 4 (KLK4) ist eine von 15 extrazellulären Serinproteasen der KLK-Familie. Sie wird im Prostatakarzinom im Vergleich zu benignem Prostatagewebe vermehrt exprimiert. In Prostatakarzinomzellen induziert die Expression von KLK4 die Transition von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp (EMT) – ein wichtiger Schritt in der Metastasierung – und beeinflusst so die Proliferations-, Invasions- und Migrationsfähigkeit der Zellen direkt, aber auch indirekt über die Aktivierung von Signalkaskaden. Zu den potentiellen Substraten zählen u. a. die Protease-aktivierten Rezeptoren PAR1 und PAR2 und der Pro-Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator. Außerdem deutet ihre physiologische Rolle im mineralisierten Gewebe des Zahnschmelzes auf die Beteiligung von KLK4 an der Ausbildung von Knochenmetastasen hin.

KLK4 wird als prä-pro-Enzym inaktiv sezerniert. Die Aktivierung erfolgt vermutlich durch MMPs, eine Aktivierung durch andere KLKs ist aufgrund des Glutamins an der P1-Position des Propeptids unwahrscheinlich, wenngleich nach posttranslationalen Veränderungen nicht unmöglich. Neben der

prä-pro-Variante scheint auch eine intrazelluläre, nukleäre KLK4-Variante und ein KLK4-KLKP1-Fusionsprotein zu existieren, deren tumorbiologische Effekte vermutlich nichtproteolytischer Natur sind. In Ovarialkarzinomzellen konnte nachgewiesen werden, dass KLKs an der differentiellen Expression von Genen des EMT-, PAR- und TGF- β -Signalweges beteiligt sind und so die Tumorprogression beeinflussen könnten. In dieser Forschungsarbeit sollten deshalb Zielgene von KLK4 in Prostatakarzinomzellen identifiziert und gleichzeitig die Notwendigkeit der proteolytischen Aktivität für die Regulation der Expressionsmuster untersucht werden. Da PC-3-Zellen endogen kein KLK4 exprimieren, sind sie sehr gut geeignet, um die Effekte der Überexpression des Gens zu untersuchen, weshalb sie für die Untersuchung herangezogen wurden. Allerdings konnte aufgrund der relativ niedrigen Expression von KLK4 in den Zellkulturüberständen bisher nicht nachgewiesen werden, ob und in welchem Ausmaß KLK4 aktiviert wird. Deshalb sollten verschiedene KLK4-Varianten hergestellt werden, darunter eine aktive, eine inaktive und die mature Form der Protease, um die Notwendigkeit der proteolytischen Aktivität für mögliche identifizierte Effekte zu evaluieren.

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Ziele festgesetzt:

1. Identifizierung von EMT-assoziierten Zielgenen durch eine Transkriptomanalyse der prä-pro-KLK4 exprimierenden Zellen verglichen zu Vektorkontrollzellen mithilfe eines PCR-*Microarrays*
2. Validierung der Zielgene auf mRNA- und Proteinebene unter Anwendung von qRT-PCR *Assays* und Western Blot Analyse
3. Expression verschiedener, aktive und inaktive, KLK4-Varianten in PC-3-Zellen
4. Charakterisierung der Zelllinien mittels Proliferations- und Adhäsionsuntersuchungen
5. Bestimmung der Rolle der proteolytischen Aktivität in der Zielgenregulation durch
 - a. Vergleich der verschiedenen KLK4-Varianten und
 - b. Analyse der Genregulation in Prä- und Absenz eines spezifischen KLK4-Inhibitors.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Technische Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 2-1: Technische Geräte und Hilfsmittel

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz, Land
Analysewaage BP 1200	Sartorius, Göttingen, D
Abzug	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze, D
BluePower500	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Brutschrank Heracell	Thermo Fisher Scientific, Ulm, D
Consort E865 Powersupply	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Consort EV231 Powersupply	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Echtzeit-PCR Cycler Stratagene MX3005P	Agilent Technologies, Böblingen, D
Elektrophoresekammer GNA 100	Pharmacia Biotech, Uppsala, S
ELGALabWater Purelab Classic	Veolia Water Technologies, Celle, D
ChemiDoc™ XRS+ System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
CoolCell® Cell Freezing Containers BioCision	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Falcon® Pipet Controller	Corning GmbH, Kaiserslautern, D
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Gelgießvorrichtung mit Zubehör	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Glasplatten	Biostep GmbH, Jahnsdorf, D
LabCycler	SensoQuest, Göttingen, D
Labofuge 400R Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Ulm, D
Magnetrührer Ikamag reo	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
Mikrowelle	Sharp, Osaka, J
Multifuge 3 L-R Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Ulm, D
Multiscan FC	Thermo Fisher Scientific, Ulm, D
Multipipette plus	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Neubauer Zählkammer	Assistent, Sondheim, D
pH-Meter Lab 850	Schott Instruments, Weilheim, D
Photometer	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D

Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Plattformschüttler Polymax 2040	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, D
Präzisionswaage BA 110S	Sartorius, Göttingen, D
QIAcube	Qiagen, Hilden, D
Sicherheitswerkbank Herasafe	Thermo Fisher Scientific, Ulm, D
Thermomixer 5436	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
Tischzentrifuge Mini Centrifuge C-1200	National Labnet Co., Woodbridge, NJ, USA
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, München, D
Varioklav® Dampfsterilisator	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, D
Vortexer Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, D
Zellkulturmikroskop Zeiss Axiovert 25	Carl Zeiss, Hallbergmoos, D
Zentrifuge 5425 R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
Zentrifuge 4K15	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, D

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-2: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz, Land
CELLSTAR® Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
CELLSTAR® Tubes (15, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
CELLSTAR® Zellkulturflaschen mit roter Standarddrehkappe (T25, T75, T175)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Combitips advanced®	Eppendorf AG, Hamburg, D
Cryotubes	TPP, Trasadingen, CH
Einmal-Injektions-Kanülen Sterican® G20	Braun, Melsungen, D
Einmalspritzen Omnifix®-F (1, 5, 10, 20 ml)	Braun, Melsungen, D
Filterpapier	Macherey-Nagel GmbH und Co KG, Düren, D
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D

MChloropHast™ pH Indicator Strips	Merck KGaA, Darmstadt, D
Microlon® Microplatte (96 well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Micro-Touch Coated Handschuhe	Ansell, München, D
Minisart® Syringe Filter (0,1, 0,2 µm)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, D
Multipurpose Beaker (50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Mx3000P® 96-well Plates	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, D
Optical Cap, 8x Strip	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, D
Pasteurpipetten, Glas	Braun, Melsungen, D
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, D
Pipettenspitzen Premium Tips (200 µl)	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, D
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Peqlab GmbH, Erlangen D
PS-Röhrchen, konisch (4,5 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
PVDF-Membran	Roth GmbH, Karlsruhe, D
SafeSeal Reagiergefäße (1,5, 2 ml)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, D
SafeSeal Tips PreCision (10, 40, 100, 200, 1000 µl)	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, D
Vasco® Nitril light Handschuhe	Braun, Melsungen, D
Vivaspin (6, 15 ml)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, D
Zellkulturplatten Falcon® (6, 12, 24, 96 well)	Corning GmbH, Kaiserslautern, D

2.1.3 Chemikalien und allgemeine Reagenzien

Tabelle 2-3: Chemikalien und allgemeine Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz, Land
Agar (Bacto™)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Ampuwa® Wasser	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, D
Bacto-Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Borsäure	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Dimethylsulfoxid (DSMO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
dNTPs	Roth GmbH, Karlsruhe, D
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Essigsäure	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Ethanol 100 %	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Glycerin	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Glycin	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Hefe-Extrakt	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Immobilon™ Western Chemiluminescent	Millipore Corporation, Billerica, USA
HRP Substrate	
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Kaliumchlorid	RdH Laborchemikalien GmbH & CO KG, Seelze, D
Laemmli Puffer 4x „Roti load 1“	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid	Roth GmbH, Karlsruhe, D
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Milchpulver	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Natriumchlorid (NaCl)	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumfluorid	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Natriummetavandat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Natrium-MOPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Natrium-Pyrophosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
PageRulerPrestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, München, D

PageRulerPrestained Plus Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, München, D
p-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Glucosaminide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
ProteaseInhibitor Cocktail cOmplete EDTA-free	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, D
ProteaseInhibitor Cocktail cOmplete + EDTA	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, D
Polyacrylamid (PAA)	Roth GmbH, Karlsruhe, D
RLT Puffer	Qiagen GmbH, Hilden, D
Tris-Hydrochlorid	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Tween 20	AppliChem, Darmstadt, D
SDS	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Urea	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Xylencyanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Zitronensäure	Merck KGaA, Darmstadt, D

2.1.4 Enzyme

Alle verwendeten Enzyme mit Ausnahme der in den Kits enthaltenen Enzyme sind in Tabelle 2-4 aufgeführt.

Tabelle 2-4: Enzyme

Bezeichnung	Funktion	Hersteller, Firmensitz, Land
Fsp I	Restriktionsenzym	New England Biolabs, Frankfurt, D
Psi I	Restriktionsenzym	New England Biolabs, Frankfurt, D
Rekombinantes KLK4	Serinprotease	Klinische Forschergruppe der Frauenklinik, München, D
Taq DNA Polymerase	DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.5 Gebrauchsfertige Reagenziensätze (Kits)

Tabelle 2-5: Gebrauchsfertige Reagenziensätze (Kits)

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz, Land
2X Brilliant III Ultra Fast QPCR Master Mix/ Low ROX	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, D
2X Brilliant III SYBR® Green QPCR Master Mix/ Low ROX	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, D
Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit	Invitrogen, Karlsruhe, D
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche Diagnostics, Penzberg, D
Human Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) PCR-Array	SABioscience, Qiagen GmbH, Hilden, D
Plasmid-DNA-purification kit NucleoBond® Xtra Midi	Macherey-Nagel GmbH und Co KG, Düren, D
Plasmid-preparation kit NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel GmbH und Co KG, Düren, D
QuickChange II Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, CA (USA)
QIAshredder	Qiagen GmbH, Hilden, D
RNAse-freies DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden, D
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
Universal Probe Library Set, Human	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, D

2.1.6 Plasmide

Alle für die Transfektion von PC-3-Zellen verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2-6 aufgeführt.

Tabelle 2-6: Plasmide

Bezeichnung	Funktion	Hersteller, Firmensitz, Land
pRc/RSV	Expressionsplasmid/ Kontrollvektor	Invitrogen, Karlsruhe, D
pRc/RSV_KLK4	KLK4 Wildtyp Expression	Klinische Forschergruppe der Frauenklinik, München, D; (Prezas et al. 2006)
pRc/RSV_S195A	KLK4 S195A Expression	Klinische Forschergruppe der Frauenklinik, München, D

pRc/RSV_KVRRAR	KLK4 KVRRAR Expression	Klinische Forschergruppe der Frauenklinik, München, D
pRc/RSV_HR5	KLK4 HR5 Expression	Klinische Forschergruppe der Frauenklinik, München, D
pRc/RSV_delPro	KLK4 delPro Expression	Klinische Forschergruppe der Frauenklinik, München, D

2.1.7 Primer

Alle verwendeten Primer sind in Tabelle 2-7 aufgeführt. Die Mutageneseprimer und die Primer für die Mykoplasmen-PCR stammen von Metabion international AG, Planegg, D, die qRT-PCR Primer von Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, D.

Tabelle 2-7: Primer

Bezeichnung	Funktion	Sequenz 5'-3'
KLK4-KVRRAR-do	Mutageneseprimer: Einführung einer <i>Furin cleavage Site</i>	CGCTCGTCTCTGGTAAGGTGCGCAGAGCGCGAATAAACGG
KLK4-KVRRAR-up		CGCCGTTTATGATTCGCGCTCTGCGCACCTTACCAGAGACGAGCG
KLK4-delPro-do	Mutageneseprimer: Deletion des Propeptids	GGATCGCTCGTCTCTGGTATTATAAACGGCGAGGAC
KLK4-delPro-up		GTCCTCGCCGTTTATAATACC AGAGACGAGCGATCC
Myko-for	Detektion Mykoplasmenkontamination	CGCCTGAGTAGTACGTTTCGC
Myko-rev		GCGGTGTGTACAAGACCCGA
COL1A2 L	qRT-PCR Primer, UPL Probe 79	CTGGAGAGGCTGGTACTGCT
COL1A2 R		AGCACCAAGAAGACCCTGAG
CAMK2N1 L	qRT-PCR Primer, UPL Probe 27	TTTATAGGGATTCTCTTAAGGCACA
CAMK2N1 R		GCATTTTTGCAAATACCATGC
HPRT1 L	qRT-PCR Primer, UPL Probe 73	TGACCTTGATTTATTTGCATACC
HPRT1 R		CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT
KLK4 L	qRT-PCR Primer, UPL Probe 23	CCGCACACTGTTCCAGA
KLK4 R		CTTGGTCGGCCTCAAGACT
PDGRFB L	qRT-PCR Primer, UPL Probe 1	TCCACCCTGAATGAAGTCAAC
PDGRFB R		TCTGGCTCTGGTTCGTCCT
SPARC	qRT-PCR Primermix	Invitrogen, Karlsruhe, D

TFPI2 L	qRT-PCR Primer, UPL	TTCTGCGCACCAAAGAAA
TFPI2 R	Probe 53	TCTTGGATTAATAATAGCGAGTCA
WNT5B L	qRT-PCR Primer, UPL	CGTGTGCAGTCAGCTTCC
WNT5B R	Probe 6	GCCATGTGCTCCTGGTACA

2.1.8 Antikörper

Tabelle 2-8: Antikörper

Bezeichnung	Wirt	Katalognummer	Hersteller
GAPDH	Maus	MAB374	Merck KGaA, Darmstadt, D
KLK4, pAb#587	Hase	Die Aufreinigung erfolgte nach beschriebenem Verfahren (Seiz et al. 2010).	Klinische Forschergruppe der Frauenklinik, München, D
SPARC	Maus	33-5500	Thermo Fisher Scientific, Ulm, D
proCOL1A2	Ziege	sc-8785	Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, D
Anti-Ziege	Hase	305-035-003	Jackson ImmunoresearchLaborotories Inc., Dianova, Hamburg, D
Anti-Maus	Ziege	G21040	Thermo Fisher Scientific, Ulm, D
Anti-Hase	Ziege	111-096-045	Jackson ImmunoresearchLaborotories Inc., Dianova, Hamburg, D

2.1.9 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

Tabelle 2-9: Puffer und Lösungen für DNA-Analysen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Auftragslösung für DNA	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol FF 30 % Glycerin
TAE-Puffer, pH 8,0, 50x	2 M Tris 0,4 M Natriumacetat 50 mM EDTA pH Einstellung mit 100 % Essigsäure
TBE-Puffer, pH 8,3	90 mM Tris 90 mM Borsäure 2,5 mM EDTA

Tabelle 2-10: Puffer und Lösungen für die Messung der Zelladhäsion

Bezeichnung	Zusammensetzung
Adhäsionspuffer	2 % (v/v) HEPES 0,5 % (w/v) BSA gelöst in RPMI Medium, steril filtriert (0,2 µm)
Glucosaminidase-Substrat	100 mM Natriumcitrat, pH 5,0 mit Zitronensäure 10 mM p-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Glucosaminide 0,5 % (v/v) Triton-X100
Stopplösung	0,2 M NaOH 5 mM EDTA

Tabelle 2-11: Puffer für die Präparation zytosolischer Zellextrakte

Bezeichnung	Zusammensetzung
RIPA Puffer	1 % (v/v) Triton-X100 1x Roche comp + EDTA Protease Inhibitor Cocktail 1 mM Vanadate 1 mM Glycerolphosphat 50 mM Natriumfluorid 10 mM Natriumpyrophosphat gelöst in TBS
Lysis Puffer	50 mM HEPES, pH 7,5 150 mM NaCl 1 mM EDTA 10 % Glycerin 1 % (v/v) Triton-X100 10 mM Natriumpyrophosphat

Tabelle 2-12: Puffer für Western Blot Analysen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blocking-Puffer: Milch	8 % (w/v) Milchpulver gelöst in TBS-T
Blocking-Puffer: BSA	5 % (w/v) BSA gelöst in TBS-T
Blotpuffer, 5x, pH 8,5	250 mM Borsäure/NaOH
Blotpuffer, 5 % Ethanol, pH 8,5	5 % (v/v) Ethanol 100 % 50 mM Borsäure/NaOH
Blotpuffer, 20 % Ethanol, pH 8,5	20 % (v/v) Ethanol 100 % 50 mM Borsäure/NaOH
Laufpuffer, 10x	1,9 M Glycin 0,25 M Tris 1 % (w/v) SDS
TBS, pH 7,4, 10x	0,5 M Tris 1,5 M NaCl
TBS-T	0,1 % (v/v) Tween-20 gelöst in TBS
Trenngelpuffer, pH 8,8	1,5 M Tris-HCl
Sammelgelpuffer, pH 6,8	0,5 M Tris-HCl
Stripping Puffer, pH 2,2	0,2 M Glycin 0,1 % (w/v) SDS 1 % (v/v) Tween-20

2.1.10 Bakterienstämme und Medien

Tabelle 2-13: Bakterienstämme

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz, Land
XL1-Blue superkompetente Zellen	Stratagene, San Diego, USA

Tabelle 2-14: Bakterienmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB Medium, pH 7,0	10 g/l Bacto™ - Trypton 5 g/l Hefe-Extrakt 10 g/l NaCl 15 g/l Agar (für Agarplatten)

TE, pH 8,0	10 mM Tris-Cl 1 mM EDTA
2xTY, pH 7,0	16 g/l Bacto™ - Trypton 10 g/l Hefe- Extrakt 5 g/l NaCl gelöst in H ₂ O/NaOH

2.1.11 Zelllinien

Tabelle 2-15: Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung
PC-3	ATCC® CRL-1435™ Keine endogene KLK4 Expression
PC-3 RSV	Vektorkontrolle
PC-3 KLK4	KLK4 Wildtyp
PC-3 S195A	Inaktive KLK4-Mutante: Ersatz des Serin im aktiven Zentrum durch Alanin
PC-3 KVRRAR	Konstitutiv aktive KLK4-Mutante: Ersatz des Propetids durch die <i>Furin cleavage site</i> KVRRAR
PC-3 HR5	Konstitutiv aktive KLK4-Mutante: Ersatz des Propetids durch die <i>Furin cleavage site</i> HR5
PC-3 delPro	Konstitutiv aktive KLK4-Mutante: deletiertes Propetid

2.1.12 Reagenzien in der Zellkultur

Tabelle 2-16: Reagenzien in der Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz, Land
Arginin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Asparagin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
BRFF-P4-8F™ Serumfreies Medium	AthenaES, Halethorpe, MD (USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Gibco, Karlsruhe, D
EDTA (Versen) 1% in PBS	Biochrom GmbH, Berlin, D

Fetales bovines Serum (FCS)	Gibco, Karlsruhe, D
Fibronektin	R&D Systems, Inc., Minneapolis, CA
Geneticin G-418 Sulphate	Gibco, Karlsruhe, D
HEPES	Gibco, Karlsruhe, D
Inhibitor UAMC 1399	Universität Antwerpen, B
Kollagen I	Gibco, Karlsruhe, D
Kollagen IV	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
MTT Reagenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
RPMI 1640	Gibco, Karlsruhe, D
Transfektionsreagenz Lipofectin® Reagent	Invitrogen, Karlsruhe, D
Trypan Blau Lösung (0,4%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D

2.1.13 Medien in der Zellkultur

Tabelle 2-17: Medien in der Zellkultur

Bezeichnung	Zusammensetzung
Einfriermedium	FCS 10 % DMSO
RPMI Komplettmedium	RPMI 10 % FCS 1 % HEPES 0,550 mM Arginin 0,272 mM Asparagin
RPMI G 0,5/1,0 Komplettmedium	RPMI 10 % FCS 1 % HEPES 0,550 mM Arginin 0,272 mM Asparagin 0,5/1,0 g/l Geneticin G-418 Sulphate
Serumfreies Medium	P4-8F Serum-Free Medium

2.2 Methoden der Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden bei sterilen Bedingungen unter Sicherheitswerkbänken durchgeführt. Die humanen Prostatakarzinomzellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.2.1 Auftauen, Passagieren und Einfrieren der Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurden beschriftete Falcons mit 8 ml frischem Medium vorbereitet. Mit 1 ml Medium wurden die Zellen in den Einfrierröhrchen langsam durch Auf- und Abpipettieren aufgetaut, in den jeweiligen Falcon gegeben, abzentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in frischem Medium resuspendiert und die Zellen in eine T25-Flasche gegeben. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt. Anschließend verlief die Kultur nach Standardprotokoll, wobei die einzelnen Zellen nie länger als 15 Passagen verwendet wurden.

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert, alle 2 Tage mit frischem Medium versorgt und regelmäßig bei einer Konfluenz von 80 % passagiert. Dafür wurde der Zellrasen mit 0,1%iger EDTA-Lösung (in PBS) bedeckt. Nach Inkubation bei 37 °C wurde mikroskopisch die vollständige Ablösung der Zellen sichergestellt. Daraufhin wurde die Suspension mit PBS weiter verdünnt, in einen neuen Falcon gegeben und bei 1300 x g 3 min bei RT abzentrifugiert. Nach Absaugen des EDTA-PBS-Gemisches wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und die gewünschte Menge der Suspension zusammen mit weiterem Medium in eine neue Kulturflasche gegeben. Eine gleichmäßige Verteilung der Zellen innerhalb der Kulturflasche wurde durch mehrfaches Kippen der Flasche erreicht und mikroskopisch kontrolliert.

Für das Einfrieren der Zellen wurden diese wie oben beschrieben abgelöst und in Einfriermedium resuspendiert. Je 1 ml der Suspension wurde in vorher beschriftete Einfrierröhrchen gegeben. Die Zellen wurden im -80 °C Gefrierschrank für 72 h in einem *CoolCell® Cell Freezing Container* um ca. 1 °C/h abkühlt und anschließend zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff transferiert.

Tabelle 2-18: Verwendete Volumina in der Zellkultur

	Medium	0,1 % EDTA in PBS	PBS zur Verdünnung/ zum Waschen
T25	5 ml	1 ml	4 ml
T75	8-10 ml	2 ml	8 ml
T175	15-20 ml	5 ml	15 ml
6-well Platten	2-3 ml	1 ml	1 ml
96-well Platten	100 µl		

2.2.2 Zählen und Aussäen von Zellen

Zum Aussäen der Zellen wurden diese bei einer Konfluenz von ca. 80 % analog zum Passagieren abgelöst und resuspendiert. Je 2 x 10⁶ µl der Zellsuspension wurden in ein Eppendorfggefäß gegeben, mit 90 µl einer 1:10 verdünnten Trypanblaulösung verdünnt und in je zwei Neubauerzählkammern gezählt. Aus den vier Einzelzählungen wurde die Zellzahl/ml bestimmt und basierend darauf das Mischungsverhältnis zwischen Zellsuspension und Medium errechnet, um die gewünschte Endkonzentration der Zellen zu erreichen. Anschließend wurden die Zellen ausgesät, wobei penibel darauf geachtet wurde, dass die Zellen immer gleichmäßig gelöst waren.

2.2.3 Transfektion

Zur stabilen Transfektion wurden die parentalen PC-3-Zellen ATCC® CRL-1435™ verwendet. Am Vortag der Transfektion wurden 250.000 Zellen/well in 6-well Platten ausgesät. Unmittelbar vor der Transfektion wurden die Zellen mit PBS und RPMI ohne Zusätze gewaschen, um Serumreste zu entfernen. Als Transfektionsreagenz diente Lipofectin® (Invitrogen, Karlsruhe, D) in einer Endkonzentration von 1 % (v/v). Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Plasmid-DNA. Die Transfektionsansätze wurden 6 h bei 37 °C mit den Zellen inkubiert, dann wurde das Medium auf RPMI Kompletmedium gewechselt.

Tabelle 2-19: Transfektionsansatz

Ansatz	Zusammensetzung	Volumen/Menge	Inkubation
1	RPMI Lipofectin®	300 µl 6 µl	45 min bei RT, dann Zugabe von Ansatz 2
2	RPMI Plasmid-DNA	300 µl 2 µg	45 min bei RT, dann Zugabe zu Ansatz 1
3	Ansatz 1 + 2		15 Min. bei RT

Bei täglichem Mediumwechsel konnten die Zellen nach 3 Tagen auf T25-Flaschen und nach weiteren 3 Tagen auf T75-Flaschen passagiert werden. Zu diesem Zeitpunkt begann die Selektion mit RPMI G 1,0 g/l Kompletmedium, um nichttransfizierte Zellen abzutöten. Es erfolgte weiterhin ein täglicher Mediumwechsel. Die Selektion wurde solange durchgeführt, bis alle Zellen der Negativkontrolle abgetötet waren. Als Erhaltungsdosis wurde RPMI G 0,5 g/l Kompletmedium für eine weitere Woche und später alle 3 Wochen für eine Woche verwendet. In den übrigen Wochen wurden die Zellen in RPMI Kompletmedium kultiviert.

2.2.4 Gewinnung von Zelllysaten, RNA-Pellets und konditionierten Überständen

Zur Gewinnung von Zelllysaten, RNA-Pellets und konditionierten Überständen wurden die Zellen unter serumfreien Konditionen kultiviert. Dazu wurden pro Zelllinie 90.000 Zellen in eine T75-Flasche ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, anschließend 1 h mit RPMI-Medium ohne Zusätze bei 37 °C inkubiert und weitere dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 50 - 72 h bis zu einer Konfluenz von circa 70 % in serumfreiem P48-F Medium weiterkultiviert. Anschließend wurden das Medium abgenommen, Zellreste bei 1300 x g 3 min abzentrifugiert und der restliche Überstand entweder sofort eingengt oder bei -80 °C eingefroren. Die Zellen wurden mit EDTA und PBS abgelöst, je 50 % zu Zelllysaten verarbeitet und die weiteren 50 % für die RNA-Extraktion verwendet.

2.2.5 Inhibitorversuche

Zur Inhibition der KLK4-Aktivität wurde in Kooperation mit Dr. Joossens (Universität Antwerpen, Belgien) ein selektiver, potenter, irreversibler *small molecule*-Inhibitor gegen KLK4 (UAMC-1399, IC₅₀: 2,5 nM) in einer Endkonzentration von 1 µM verwendet (van Soom et al. 2015). Als Kontrolle diente DMSO. Alle Inhibitorversuche wurden in serumfreiem P4-8F Medium durchgeführt, und die Inhibitor- bzw. DMSO-Konzentration wurde nach 48 h in 1/8 des Gesamtmediums so aufgefrischt, dass insgesamt die Konzentration um 50 % erhöht wurde.

2.2.6 MTT-Test

Mittels MTT-Tests kann die metabolische Aktivität lebender Zellen gemessen und somit die Viabilität der Zellen bestimmt werden. Dabei wird das gelbliche 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid (MTT) von den Zellen aufgenommen und durch mitochondriale Dehydrogenasen in wasserunlösliches, dunkelblaues Formazan umgewandelt. Der Test dient als Annäherung an die tatsächliche Proliferationsrate und wird in der Literatur häufig zur Messung dieser beschrieben, obgleich er weniger akkurat ist als DNA-Quantifizierungstests (Quent et al. 2010).

Die Messungen erfolgten jeweils in Triplikaten in 96-well Platten, die für die serumfreien Bedingungen am Vortag mit 50 µl einer 3 µg/ml Fibronectin-in-PBS-Lösung beschichtet wurden. Für die serumhaltige Proliferationsmessung wurden die wells nicht beschichtet. 2.500 Zellen/well wurden in Kompletmedium in einem Volumen von 100 µl/well ausgesät. Nach 6 h wurden die wells für die serumfreie Proliferationsmessung mit 200 µl PBS gewaschen, 45 min mit reinem RPMI inkubiert und dann auf 100 µl serumfreies P4-8F Medium gewechselt.

Nach 24, 48, 72 und 96 h wurden pro well je 20 µl des MTT-Reagenzes in einer Endkonzentration von 200 µg/ml zugegeben, ca. 5 h inkubiert und das Medium vorsichtig mit einer Pipette entfernt. Zur

Lösung der Formazankristalle wurde die Platte 10 min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur mit einem EtOH/DMSO-Gemisch (1:1) inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte der homogenen kristalloiden Lösung bei 596 nm mittels *Multiscan FC* bestimmt. Als Leerwert dienten mit entsprechendem Medium gefüllte Kontroll-*wells*.

Zur Berechnung der Wachstumsrate wurden die 24-h-Werte als Ausgangswert definiert. Alle anderen Werte wurden als x-faches dieses Wertes berechnet.

2.2.7 Adhäsions-Assay

Die Adhäsionsfähigkeit der Zellen wurde jeweils in Triplikaten in 96-*well* Platten unter drei verschiedenen Bedingungen getestet – in unbeschichteten und mit Kollagen I und Kollagen IV (je 100 µl in einer Konzentration von 5 µg/ml) beschichteten *wells*. Die Beschichtung der Platten erfolgte jeweils am Vortag. Die *wells* wurden am Versuchstag einmalig mit 200 µl PBS gewaschen.

Bei einer Konfluenz von 70 - 80 % wurden die Zellen abgelöst, mit PBS gewaschen, in Adhäsionsmedium resuspendiert, gezählt und anschließend 40.000 Zellen/*well* ausgesät. Nach 1,5 h wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 200 µl PBS gewaschen und 100 µl des Glucosaminidase-Substrats auf die Zellen gegeben. Dieses enthält ein chromogenes Substrat des Enzyms β -N-Acetylglucosaminidase, dessen Produkt 4-Nitrophenol bei 405 nm photometrisch detektiert werden kann. Nach einer Inkubation von 1,5 h bei 37 °C wurde die Reaktion mit je 100 µl Stopppuffer beendet und die Absorption innerhalb von 5 min bei 405 nm mittels *Multiscan FC* gemessen.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Site specific in vitro Mutagenese

Als Ausgangsplasmid für die Herstellung der unterschiedlichen Varianten der KLK4-Plasmid-DNA diente ein Wildtyp-KLK4-cDNA enthaltender 5,2 kb Expressionsvektor. Die *site specific in vitro* Mutagenese erfolgte mittels *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* nach Herstellerangaben. Das *Primer-Design* erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde je eine zusätzliche Spaltstelle für ein Restriktionsenzym in die veränderte Sequenz eingeführt: im Falle des KVRRAR-Plasmids für das Restriktionsenzym Fsp I, im Falle des delPro-Peptids für das Restriktionsenzym Psi I.

Die PCR-Reaktion wurde wie folgt hergestellt:

Tabelle 2-20: PCR-Reaktion für die *in vitro* Mutagenese

	KVRRAR, Volumen (µl)	delPro, Volumen (µl)
Nukleasefreies H₂O	33,2	32,74
Puffer (10x)	5	5
Primer up (10 µM)	0,9	1,13
Primer down (10 µM)	0,9	1,13
dNTP (2,5 µM)	7	7
KLK4-pRc/RSV-Plasmid (13 ng/µl)	2	2
Pfu Ultra HF-Polymerase (2,5 U/µl)	1	1
Gesamtvolumen	50	50

Die PCR erfolgte bei der Änderung bzw. Deletion von multiplen Aminosäuren in 18 Zyklen nach folgendem Schema:

Tabelle 2-21: Bedingungen für die PCR der *in vitro* Mutagenese

Segment		Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit
1	Denaturierung	1	95	30 sec
2	Denaturierung	18	95	30 sec
	Hybridisierung		55	1 min
	Elongation		68	1 min/kb Plasmid-Länge: 6 min

Nach Amplifikation der DNA wurde die Reaktion 2 min auf Eis abgekühlt, 1 µl des Restriktionsenzym Dpn I (20 U/µl) zugegeben, gemischt und 1 h bei 37 °C inkubiert, um die parentale, methylierte Plasmid-DNA abzubauen.

2.3.2 Transformation von Bakterien

Für die Transformation der Plasmide wurden chemisch kompetente *E. coli* Bakterien des Stamms XL1-Blue verwendet. Nach Auftauen der Bakterien auf Eis wurden zur Herstellung des Transformationsansatzes 4 µl der Plasmid-DNA mit 40 µl TE-Puffer gemischt und vorsichtig zu 100 µl XL1-Blue-Zellen zugegeben. Der Ansatz wurde zunächst 25 min auf Eis, dann 1,75 min bei 37 °C und anschließend wieder 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml 2xTY-Medium folgte eine Regenerationsphase der *E. coli* Bakterien für 1 h bei 37 °C, um nach erfolgreicher Plasmidaufnahme die Expression der Resistenzgene zu ermöglichen. Anschließend wurden die Bakterien bei

Raumtemperatur 1 min mit 1000 x g zentrifugiert, der Überstand wurde bis 200 µl abgenommen, die Bakterien wurden sanft resuspendiert, auf Ampicillin-Agarplatten (Konz. 100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden die Zellklone mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in ein PS-Röhrchen mit 5 ml Ampicillin-LB-Medium (100 µg/ml) überführt und daraufhin zur Plasmidamplifikation wieder über Nacht bei 37 °C im Bakterieninkubator geschüttelt (200 rpm).

2.3.3 Präparation von Plasmid-DNA zur Restriktionsanalyse

Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mittels *NucleoSpin*[®] Plasmid-Kit nach Herstellerangaben (Macherey-Nagel GmbH und Co KG, Düren, D). Die DNA-Konzentration wurde mittels *NanoDrop ND-1000* gemessen.

2.3.4 Restriktionsanalyse und Sequenzierung

Fragmentgrößen der generierten Plasmide wurden anhand einer Restriktionsanalyse auf einem Agarosegel überprüft (s. Kapitel 2.3.5). Dafür wurden ca. 6 µl der Plasmid-DNA, entsprechend ca. 600 ng, mit je 4 µl des Restriktionsmastermixes (s. Tabelle 2-22) vermischt. Anschließend erfolgte eine 60-minütige Inkubation bei 37 °C.

Tabelle 2-22: Mastermix für die Restriktionsanalyse

	Mastermix für das KRRRAR-Plasmid, Volumen (µl)	Mastermix für das delPro-Plasmid, Volumen (µl)
H ₂ O	11	12
Puffer (10x)	5	5
Restriktionsenzym	4	3
Fsp I (KRRRAR-Plasmid)		
Psi I (delPro-Plasmid)		
Gesamtvolumen	20	20

Zudem wurden je 1,5 µg der Plasmid-DNA sequenziert (Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, D), um die Aufnahme der richtigen Mutation in der richtigen Orientierung sicherzustellen.

Die Starterkultur mit der korrekten Sequenz wurde im Kühlschrank aufbewahrt.

2.3.5 Plasmid-DNA-Aufreinigung zur Transfektion

Für die Präparation einer zur Transfektion ausreichend großen Menge an Plasmid-DNA wurde die Starterkultur 1:1.000 in Ampicillin-LB-Medium (Konz. 100 µg/ml) verdünnt und 12-16 h bei 37 °C bei ca. 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurde mittels Eppendorf Photometer die OD 600 ermittelt

und ein Volumen von 400 ml/OD 600 der Zellsuspension 10 min bei 4 °C und 5500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet wurde für die Aufreinigung verwendet. Diese erfolgte nach Herstellerangaben mit dem *NucleoBond® Xtra Midi Kit* (Macherey-Nagel GmbH und Co KG, Düren, D).

2.3.6 Mykoplasmen-PCR

Für die Mykoplasmen-PCR wurden zunächst je 10 µl der zu untersuchenden Zellpellets in 200 µl PBS gelöst und bei -20 °C eingefroren. Anschließend wurde die DNA mittels des *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics, Penzberg, D) nach Standardprotokoll isoliert und gereinigt. Die DNA-Menge wurde mit dem Photometer ermittelt, um sicherzustellen, dass genügend DNA zur Beurteilung der Mykoplasmenkontamination/-freiheit vorhanden sei.

Der PCR-Ansatz wurde wie folgt gemischt. Als Negativkontrolle diente H₂O, als Positivkontrolle eine kontaminierte Probe.

Tabelle 2-23: PCR-Ansatz für die Mykoplasmen-PCR

Komponente	Volumen (µl)
PCR-Puffer (10x)	5
dNTPs (2,5 mM)	5
5' Primer (20 pmol/µl)	3
3' Primer (20 pmol/µl)	3
H ₂ O	32
DNA	1
Taq-Polymerase	1
Gesamtvolumen	50

Tabelle 2-24: PCR-Bedingungen für die Mykoplasmen-PCR

Segment		Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit
1	Denaturierung	1	94	5 min
2	Denaturierung	30	94	30 sec
	Hybridisierung		60	1 min
	Elongation		72	30 sec
3	Elongation	1	72	5 min
4	Beenden	1	4	∞

2.3.7 Agarosegelelektrophorese

Die Analyse des Plasmidrestriktionsverdaus sowie der Mykoplasmen-PCR-Produkte erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung auf 1 % Agarosegelen. Zur Gelherstellung wurden 0,4 g Agarose in 40 ml TBE-Puffer (für Restriktionsanalyseprodukte) oder TAE-Puffer (für Mykoplasmen-PCR-Produkte) in der Mikrowelle aufgeköcht, das Gel circa 20 min bei Raumtemperatur abgekühlt, mit 10 µl Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelgießform überführt. Nach vollständigem Abkühlen wurden 10 bzw. 20 µl der Proben mit 2,5 bzw. 5 µl 5x DNA-Ladepuffer versetzt und zusammen mit einem Standard definierter Bandengrößen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 25 min bei 90 V und 200-500 mA in 1xTBE- bzw. TAE-Puffer. Zur Bandendetektion wurde das *ChemiDoc™ XRS+* System verwendet.

2.3.8 RNA-Isolierung

Für die Isolierung der RNA wurden die gewonnenen Zellpellets in 350 µl RLT-Ruffer mit 1 % Mercaptoethanol lysiert und bei -80 °C eingefroren. Nach Homogenisierung der Zellysate mithilfe der *Qiashredder*-Säulen erfolgte die Extraktion der RNA manuell oder mithilfe des *QiaCubes* nach Angaben des Herstellers mittels *RNeasy Mini Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, D), wobei die RNA in 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert wurde. Die RNA-Konzentration sowie ihr Reinheitsgrad wurden mit dem *NanoDrop* bestimmt.

2.3.9 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden je 1000 ng der RNA eingesetzt. Die Umschreibung erfolgte mittels *Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit* (Invitrogen, Karlsruhe, D) nach Herstellerangaben. Eine *no-RT*-Kontrolle, bei der statt RNA Wasser verwendet wurde, diente als Negativkontrolle. Anschließend wurde die cDNA mit nukleasefreiem Wasser auf 10 ng/µl verdünnt, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.10 Quantitative Echtzeit-PCR

Für die Echtzeit-PCR wurden zwei verschiedene Systeme angewandt.

Zur Quantifizierung des mRNA-Gehalts an *HPRT1*, *KLK4*, *COL1A2*, *CAMK2N1*, *TFPI2*, *WNT5B*, *PDGFRB* und zunächst auch *SPARC* wurde die *Universal ProbeLibrary* (UPL) (Roche Life Science, Penzberg, D) verwendet. Die Proben enthalten sogenannte *Locked nucleic acids* (LNA), Nukleotidanaloga, bei denen das 2'-O Atom der Ribose mittels Methylenbindung an das 4'-C Atom gekoppelt ist, was die Bindungsfähigkeit verglichen zu normalen Nukleotiden erheblich erhöht. Eine Probe kann mehrere Transkripte detektieren, die Spezifität wird durch zielgenspezifische Amplifikationsprimer erreicht. Diese werden mithilfe der *ProbeFinder Assay Design Software* ausgewählt. Die Proben sind am 5'-Ende mit einem Reporterfarbstoff (FAM) und am 3'-Ende mit einem Quencherfarbstoff versehen,

der bei räumlicher Nähe die Energie des Fluorophors absorbiert und damit die Fluoreszenz auslöscht. Der Abbau der Probe durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase hebt die räumliche Nähe des Quencher- zum Reporterfarbstoff auf und erlaubt somit die Detektion der Fluoreszenz, die die Menge an entstandenem PCR-Produkt reflektiert.

Da SPARC mit dem oben genannten System nicht ausreichend effizient detektiert werden konnte, wurde auf einen kommerziell erhältlichen Primermix (Invitrogen) zurückgegriffen und die SYBR-Green Methode verwendet. Dabei bindet der im Mix enthaltene Reporterfarbstoff dsDNA-Produkte, resultierend in einem Fluoreszenzsignal proportional zum dsDNA-Gehalt des PCR-Produkts.

Um die *well-zu-well* Variabilität in der Exzitation des Reporterfarbstoffs aufgrund von ungleichmäßiger Illumination, unterschiedlich starker Kondensation, optischer Variabilität etc. zu normalisieren wurde die Detektion des passiven Referenzfarbstoffs ROX herangezogen, dessen Fluoreszenzlevel sich nicht als direktes Resultat der PCR-Produkt-Menge verändert.

Tabelle 2-25: Reaktionsansatz für die quantitative Echtzeit-PCR

Komponente	Volumen (µl)	Komponente	Volumen (µl)
2X Brilliant III Ultra Fast QPCR Master Mix/ Low ROX	10	2X Brilliant III SYBR® Green QPCR Master Mix/ Low ROX	10
Primer R (20 µM)	0,4	Primermix	0,8
Primer L (20 µM)	0,4		
UPL Probe	0,4		
Nukleasefreies H₂O	5,8	Nukleasefreies H₂O	6,2

Pro *well* wurden 17 µl Mastermix und 3 µl cDNA (10 ng/µl) aufgetragen. Als Negativkontrolle dienten Wasser (*no-template*-Kontrolle) und eine *no-RT*-Kontrolle (s. Kapitel 2.3.9).

Anschließend wurde die Platte versiegelt, 3 min bei 1000 x g zentrifugiert und die qRT-PCR gestartet.

Tabelle 2-26: Bedingungen der quantitativen Echtzeit-PCR

Segment		Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit
1	Polymeraseaktivierung	1	95	3 min
2	Fluoreszenzmessung	40	95	15 sec
			60	1 min

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mithilfe des Softwareprogramms *Excel*. Als Kontrollgen diente *HPRT1*, welches für die Karzinomforschung zur Standardisierung für Genexpressionsmessungen empfohlen wird (de Kok et al. 2005) und in den PC-3-Zellen unabhängig von der Transfektion stabil exprimiert wird. Für die Anwendung der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode wurde zunächst über eine cDNA-Verdünnungsreihe die Effizienz (E) der PCR für die verschiedenen Primer berechnet:

$$E = 10^{-\frac{1}{\text{slope}}}$$

Danach wurde bei einer Effizienz zwischen 1,9 und 2,1 die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode zur Berechnung der relativen Expression eines Zielgenes wie folgt angewandt:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct} (\text{Probe des Interesses}) - \text{Ct} (\text{Vektorkontrollprobe})$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} (\text{Zielgen}) - \Delta\text{Ct} (\text{Kontrollgen})$$

$$\text{relative } n - \text{fache Expression} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Die Effizienzkorrektur erfolgte mithilfe der folgenden Formel:

$$\text{effizienzkorrigierte relative } n - \text{fache Expression} = \frac{E (\text{Zielgen})^{-\Delta\text{Ct} (\text{Zielgen})}}{E (\text{Kontrollgen})^{-\Delta\text{Ct} (\text{Kontrollgen})}}$$

Zur internen Kontrolle der Triplikat-Genauigkeit wurde eine Fehlerfortsetzung über die Standardabweichung (S) der Triplikate durchgeführt:

$$\text{Fehler (Gen)} = \sqrt{\frac{S (\text{Probe des Interesses})^2 + S (\text{Vektorkontrollprobe})^2}{2}}$$

$$\text{Fehler (relative Expression)} = \sqrt{\frac{\text{Fehler (Zielgen)}^2 + \text{Fehler (Kontrollgen)}^2}{2}}$$

$$\text{Fehler (absolut)} = \ln(2) * \text{Fehler (relative Expression)} * 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

$$\text{Fehler (prozentual)} = \frac{\text{Fehler (absolut)}}{2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}}$$

Als optimal wurde ein prozentualer Fehler von < 10 % beurteilt, in Ordnung war ein Fehler < 15 %, in Einzelfällen wurden bis zu 25 % akzeptiert.

2.3.11 Transkriptomanalyse mittels *Human Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) PCR-Array*

Die Analyse der Transkriptomänderung bezogen auf die Gene der epithelialen-zu-mesenchymalen Transition (EMT) nach Induktion von Wildtyp-KLK4 in die PC-3-Zellen erfolgte mittels eines kommerziell erhältlichen PCR-Array (SABioscience, Qiagen GmbH, Hilden, D). Getestet wurden je zwei unabhängige nach oben beschriebener Methode extrahierte und in cDNA umgeschriebene RNAs aus KLK4-Wildtyp-Zellen und aus Vektorkontrollzellen (s. Kapitel 2.3.8 und 2.3.9). Die quantitative PCR und Datenauswertung erfolgte nach Herstellerangaben.

Es wurden 84 Gene mit Einfluss auf EMT, Differenzierung, Morphogenese, Proliferation, Migration, Adhäsion sowie Gene von Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren und 5 Kontrollgene (*B2M*, *HPRT1*, *RPL13A*, *GAPDH*, *ACTB*) analysiert und die relative Expressionsrate berechnet. Zur Selektion des optimalen Kontrollgens bzw. der Kombination aus Kontrollgenen wurden alle Gene der zwei getrennten PCR-Läufe von Vektorkontroll- und KLK4-Wildtyp-Zell-cDNA auf die verschiedenen Kontrollgene bzw. Kontrollgenkombinationen normalisiert und verglichen. Befand sich die relative Expression aller Gene in einem Bereich zwischen -2 und 2, eignete sich das Kontrollgen bzw. die Kontrollgenkombination, da dies als natürliche Variabilität angesehen wird. Anschließend wurde die relative Genexpression der KLK4-Wildtyp-Zellen verglichen zu den Vektorkontrollzellen berechnet. Als differentiell exprimiert wurden alle Gene angesehen, deren relatives Expressionslevel > 2 oder < -2 war.

2.3.12 Proteinbestimmung

Die Zellen wurden nach entsprechender Behandlung nach Pelletgröße in 300-450 µl RIPA-Puffer oder Lyse-Puffer gelöst, weggefroren und nach dem Auftauen 10 sec mit Ultraschall lysiert.

Anschließend wurden die Proben für die Proteinbestimmung 1:3 in TBS vorverdünnt. Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mittels *BCA-Assay* nach Herstellerangaben, wobei die Proben in Triplets aufgetragen wurden. Anschließend erfolgte die Auslesung bei 570 nm mit dem *Multiscan FC*, sowie die Auswertung mittels des Softwareprogramms *Excel*. Dafür wurde eine Eichkurve aus der Standardreihe der BSA-Proben erstellt, wobei die Proteinmenge gegen die gemessenen Werte der optischen Dichte (OD) aufgetragen wurden. Anschließend wurde deren Funktionsgleichung wie unten beschrieben bestimmt und daraus die Proteinmenge in den Proben errechnet.

$$y (\text{Proteinmenge}) = mx(OD) + b$$

2.3.13 Einengung der Überstände

Zur Konzentration der Überstände wurden *Vivaspin* Zentrifugalkonzentratoren mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa verwendet. Zur Entfernung von Glycerin und Natriumazid wurden diese zunächst mit D-PBS vorgewaschen. Das D-PBS wurde verworfen und die Konzentratoren mit den geernteten Überständen versehen und so lang nach Herstellerangaben zentrifugiert, bis die Überstände 10x eingeeengt waren. Die konzentrierten Überstände wurden abgenommen, aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

2.3.14 Western Blot

Die Proteine wurden mittels *SDS-PAGE* der Größe nach aufgetrennt. Um möglichst viel Protein laden zu können, wurden 1,5 mm dicke Gele mit 10 Geltaschen verwendet. Diese wurden wie folgt hergestellt.

Tabelle 2-27: Gelzusammensetzung für den Western Blot

Komponente	Trenngel (12 %), 4 Gele	Sammelgel (5 %), 1 Gel
ddH ₂ O	13 ml	1,82 ml
TrisCl 1,5 M, pH 8,8	7,5 ml	
TrisCl 0,5 M, pH 6,8		763 µl
Polyacrylamid	9 ml	381,9 µl
SDS 10 %	300 µl	29,7 µl
TEMED	16 µl	10 µl
APS 10 %	160 µl	50 µl

Zur Herstellung wurde zunächst das mit TEMED und APS aktivierte Trenngel in die Gelgießapparatur gegeben und mit 0,5 % SDS überdeckt. Nach Polymerisation wurde die SDS-Lösung wieder abgegossen, das Sammelgel mit APS und TEMED aktiviert, eingefüllt und die Kämme eingesteckt. Nach Polymerisation wurden die Geltaschen zweimalig mit 1x Laufpuffer gewaschen und die Proben geladen, welche zuvor mit Lämmli-Puffer reduziert und 5 min bei 95 °C erhitzt wurden. Die Gelelektrophorese wurde mit 1x Laufpuffer bei 80-120 V für ca. 2 h durchgeführt.

Dabei wurden jeweils 37,5 µl der 10x konzentrierten Überstände und 40 µg Protein aus Zelllysaten verwendet. Die Verdünnung der Lysate erfolgte mit D-PBS. Als Marker diente die *PageRulerPrestained Protein Ladder* oder die *PageRulerPrestained Plus Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific, München, D).

Der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran erfolgte mittels des *Semidry-Blot*-Verfahrens bei 75 mA pro Membran für ca. 2 h. Die Membran wurde zuvor kurz in 100 % Ethanol aktiviert und mit ddH₂O benetzt.

Anschließend wurde die Membran kurz mit TBS-T gewaschen und 2 h bei Raumtemperatur in 5 % BSA-TBS-T auf dem Wippschüttler blockiert, um unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden. Nach weiterem Waschen mit TBS-T wurde der Primärantikörper (Verdünnung 1:1000 in 5 % BSA-TBS-T oder 8 % Milchpulver-TBS-T) über Nacht bei 4 °C auf dem Wippschüttler inkubiert. Daraufhin wurde die Membran 3 x 10 min mit TBS-T gewaschen, bevor sie mit dem Sekundärantikörper (Verdünnung 1:10000 in 5 % BSA-TBS-T oder 8 % Milchpulver-TBS-T) bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert und nach weiteren 3 x 10 min Waschschritten mit dem Substrat benetzt wurde (1 ml, Millipore Cooperation, Billerica, USA). Nach 5 min Inkubationszeit wurde der gebundene Antikörper bei Raumtemperatur mit dem *ChemiDoc™ XRS+* System detektiert. Die Kontrolle von einheitlichen Proteinlademengen bei Zelllysaten erfolgte durch die Detektion von GAPDH.

2.4 Software-basierte Methoden

2.4.1 Bestimmung der Proteinmenge der Western Blot Analyse relativ zum *Housekeeping-Protein* mittels *ImageLab*

Die densitometrische Auswertung der Western Blots erfolgte mithilfe des Softwareprogramms *ImageLab* und wurde relativ zur detektierten Menge an GAPDH, das als *Housekeeping-Protein* verwendet wurde, berechnet.

2.4.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mithilfe des zweiseitigen T-Tests zweier ungepaarter Variablen gleicher Varianz im Softwareprogramm *Excel* durchgeführt. Bei einem p-Wert < 0,05 wurden die Ergebnisse als statistisch signifikant bewertet.

Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt gekennzeichnet:

< 0,05:	*
< 0,01:	**
< 0,001:	***

3 Ergebnisse

3.1 Analyse differentiell exprimierter Zielgene in KLK4-exprimierenden Prostatakarzinomzellen

PC-3-Zellen exprimieren endogen keine KLK4-mRNA (Nelson et al. 1999), weshalb sich die Zellen sehr gut eignen, um den Effekt von KLK4 auf die Genexpression zu evaluieren. Hierfür wurde schon in Voruntersuchungen ein Zellsystem aus PC-3-Zellen, transfiziert mit WT-KLK4 oder einer Vektorkontrolle, entwickelt. Zunächst sollten durch den Vergleich der beiden Zelllinien in einem *Screening*-Verfahren potentielle KLK4-Zielgene mittels PCR-Array identifiziert und anschließend mithilfe einer qRT-PCR bestätigt werden.

3.1.1 Identifizierung differentiell exprimierter EMT-Gene mittels PCR-Array

Die Erlangung eines mesenchymalen Phänotyps gilt als wichtiger Schritt in der Progression maligner Tumoren zur Gewährleistung einer suffizienten Invasion und Metastasierung (Lawrence et al. 2007). Aus diesem Grund stellen EMT-assoziierte Proteine vielversprechende Ziele für eine Deregulation in Tumorzellen dar, sodass deren differentielle Expression durch KLK4 analysiert werden sollte.

Hierfür wurde aus den KLK4- bzw. den Vektorkontrollzellen in zwei unabhängigen Versuchen RNA extrahiert und diese in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die cDNA zusammen mit dem Mastermix in eine bereits mit getrockneten *Assay-Primern* für 84 EMT-Gene versehene Mikrowellplatte pipettiert, woraufhin eine Echtzeit-PCR folgte. Die differentielle (x-fache) Genexpression wurde mittels $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode relativ zum *Housekeeping*-Gen bzw. einer Kombination aus *Housekeeping*-Genen berechnet (s. Kapitel 2.3.10 und 2.3.11).

Gene wurden als differentiiell exprimiert angesehen, wenn sich ihre Expression in den KLK4-WT-Zellen um einen Faktor von mindestens 2 von der Expression in den Vektorkontrollzellen unterschied. Tabelle 3-1 zeigt die dabei identifizierten 12 potentiellen Zielgene von KLK4 und ihre Regulationsrichtung. Sechs Gene, darunter *CAMK2N1*, *PDGFRB*, *SPARC*, *WNT5B* (hochreguliert), *COL1A2* und *TFPI2* (herabreguliert), zeigten sich mehr als 4-fach differentiiell exprimiert. Die Regulation dieser sollte mittels qRT-PCR unter Verwendung der Technik der *Universal ProbeLibrary* (UPL) validiert werden.

Tabelle 3-1: Identifizierung differentiell exprimierter EMT-Gene in KLK4-exprimierenden Zellen versus Vektorkontrollzellen.

Gen	Protein	Genexpression	Richtung	x-fache Expression
CAMK2N1	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1	hoch	↑	4,09
CDH1	E-Cadherin	hoch	↑	2,62
COL1A2	Alpha-2-Typ-I-Kollagen	hoch	↓	20,00
IL1RN	Interleukin 1 Rezeptor Antagonist	moderat	↑	3,59
MITF	Mikrophthalmie-assoziiertes Transkriptionsfaktor	hoch	↑	2,53
MMP9	Matrixmetallopeptidase 9	hoch	↑	2,16
OCLN	Occludin	hoch	↑	2,43
PDGFRB	Beta-type platelet-derived growth factor receptor	moderat	↑	5,40
SNAI1	Snail Family Transcriptional Repressor 1	hoch	↑	2,32
SPARC	Secreted protein acidic and rich in cysteine	hoch	↑	4,58
TFPI2	Tissue factor pathway inhibitor 2	hoch	↓	4,16
WNT5B	Wingless-type MMTV integration site family, member 5B	moderat	↑	5,99

↑: Expression höher in der KLK4-exprimierenden Zellen als in den Vektorkontrollzellen.

↓: Expression niedriger in der KLK4-exprimierenden Zellen als in den Vektorkontrollzellen.

3.1.2 Effizienz-Analyse der qRT-PCR durch Verdünnungsreihen

Zur Validierung der im EMT-PCR-Array identifizierten Zielgene wurden qRT-PCRs aus jeweils mindestens zwei unabhängigen RNA-Extraktionen durchgeführt. Zur Planung der Echtzeit-PCR-Assays wurde die benötigte Probe der *Universal ProbeLibrary* von Roche und die entsprechenden Primer-Sequenzen mithilfe der zugehörigen *ProbeFinder Assay Design Software* identifiziert. Die RNA-Extraktion, cDNA-Synthese und qRT-PCR erfolgte wie in den Kapiteln 2.3.8, 2.3.9 und 2.3.10 beschrieben.

Um sicherzustellen, dass die Ergebnisse der qRT-PCR nicht dadurch verfälscht wurden, dass bei unterschiedlich starker Expression, d.h. bei unterschiedlichen CT-Werten, die Gene unterschiedlich gut detektiert wurden, sollte die Effizienz der Genbestimmung berechnet werden. Hierfür wurden von der Gesamt-cDNA Verdünnungsreihen von vier bis sechs 1:2 Verdünnungen angefertigt und die entsprechende Genexpression mittels qRT-PCR gemessen. Abbildung 3-1 zeigt exemplarisch eine Verdünnungsreihe für die Analyse der *COL1A2*-Expression. Aus den vier bzw. sechs erhaltenen Werten konnte durch eine lineare Trendlinie die Effizienz der qRT-PCR für die Genbestimmung nach oben beschriebenem Modell berechnet werden (s. Kapitel 2.3.10). Die Verdünnungsreihen wurden mehrmals wiederholt.

Bei einer Effizienz zwischen 1,9 und 2,1 und einer vergleichbaren Steigung der *HPRT*- und Zielgenexpression wurde eine Effizienzkorrektur als nicht notwendig angesehen. Dies war für alle Gene der Fall. Zur Kontrolle wurden die Werte dennoch auch effizienzkorrigiert berechnet (für die Berechnungsformel s. Kapitel 2.3.10). Der Unterschied zu den nichteffizienzkorrigierten Werten war, wie erwartet, nur marginal, was die Abdingbarkeit der Effizienzkorrektur unterstrich.

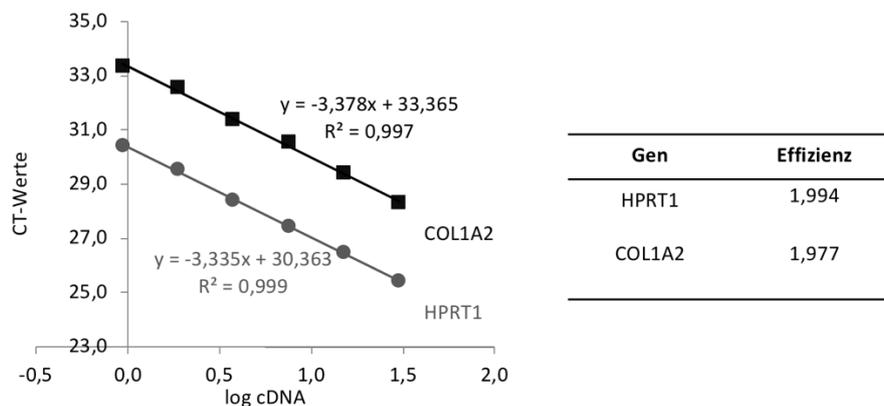


Abbildung 3-1: Exemplarische Verdünnungsreihe für *COL1A2* und *HPRT1*

Um die Effizienz zu berechnen wurde eine cDNA vier bis sechs Mal 1:2 verdünnt und dann eine qRT-PCR für die entsprechenden Gene mit allen Verdünnungen durchgeführt. Die gemessenen CT-Werte wurden gegen den Logarithmus des cDNA-Gehalts aufgetragen, eine lineare Trendlinie durch die Punkte gelegt und aus der Steigung der Geraden die Effizienz nach oben genannter Formel (s. Kapitel 2.3.10) berechnet.

3.1.3 Validierung der differentiellen Expression von *CAMK2N1*, *COL1A2*, *PDGFRB*, *SPARC*, *TFPI2*, *WNT5B* in *KLK4*-transfizierten *PC-3*-Zellen

Aus Tabelle 3-1 lässt sich entnehmen, dass *WNT5B* und *PDGFRB2* in den *PC-3*-Zellen nur moderat exprimiert werden. Wie angenommen, konnten die Gene aus diesem Grund nicht angemessen beurteilt werden, da die CT-Werte für die Zielgene, bei normalen *HPRT1*-CT-Werten von 25-26, bei über 35 lagen (Daten nicht gezeigt). Zunächst trat dieses Problem auch bei der Betrachtung von *SPARC* auf. Es ließ sich lösen, indem auf einen kommerziell erhältlichen Primermix und das *SybrGreen* Verfahren umgestellt wurde (s. Kapitel 2.3.10).

Die mRNA-Quantifizierung durch die qRT-PCR ergab für die vier anderen untersuchten Gene eine Regulationsrichtung entsprechend der EMT-PCR-Array Daten. Die Regulationsstärke wich allerdings von den *Microarray* Daten ab.

Eine starke differentielle Expression zeigten die Gene *COL1A2* und *SPARC*, die in den *KLK4*-WT-Zellen 4,17-fach herab- bzw. 5,64-fach hochreguliert wurden (Abbildung 3-2 (B) und (C)), wenngleich die Ergebnisse im Falle von *SPARC* aufgrund einer relativ großen Variabilität zwischen den biologischen Replikaten (2,34-, 9,16- und 5,41-fache Expression in *PC-3*-*KLK4*- verglichen zu den Vektorkontrollzellen) nicht signifikant waren. Weniger stark waren hingegen die Auswirkungen auf die anderen beiden Gene. *CAMK2N1* war nur 2,2-fach hochreguliert (Abbildung 3-2 (A)) und *TFPI2*

nur 1,4-fach herabreguliert (Abbildung 3-2 (D)). Deshalb beschränkten wir uns trotz der in drei unabhängig untersuchten Ansätzen nichtsignifikanten, aber deutlichen Regulation von *SPARC* für die weiteren Untersuchungen auf die Gene *COL1A2* und *SPARC*.

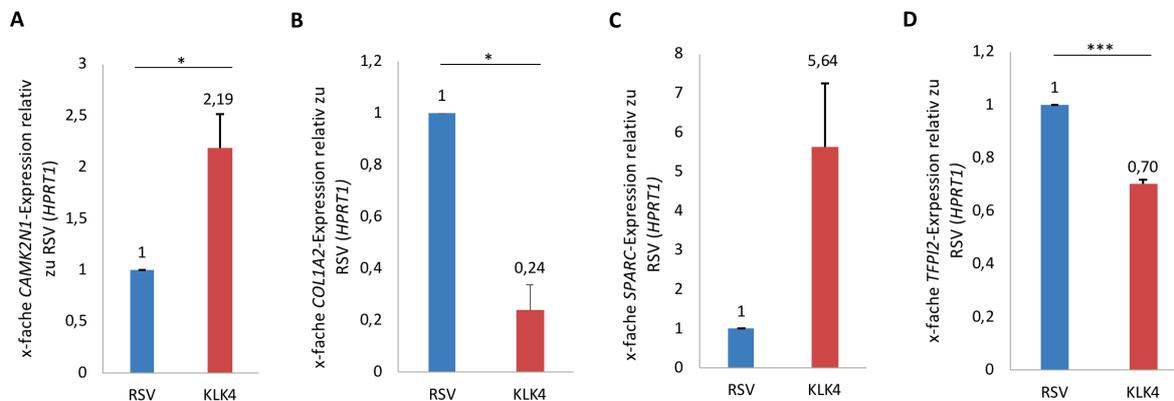


Abbildung 3-2: Validierung der differentiellen Expression der Zielgene in den KLK4-WT-PC-3-Zellen

In der qRT-PCR-Analyse der KLK4-WT-Zellen im Vergleich zur Vektorkontrolle (RSV) zeigen sich eine circa 2-fach erhöhte *CAMK2N1*- (A), eine etwa 4-fach erniedrigte *COL1A2*- (B), eine circa 5,5-fach erhöhte *SPARC*- (C) und eine circa 1,4-fach erniedrigte *TFPI2*-Expression (D). Trotz der deutlichen Heraufregulation von *SPARC* in KLK4-WT-Zellen war diese aufgrund der starken Variabilität der unabhängigen Replikate (2,34-, 9,16- und 5,41-fache Heraufregulation) nicht statistisch signifikant.

Gezeigt werden jeweils die Mittelwerte aus 3 (A, C, D) bzw. 2 (B) unabhängigen Versuchen. Die Fehlerindikatoren entsprechen den Standardfehlern.

3.2 Herstellung verschiedener KLK4-Konstrukte in humanen Prostatakarzinomzellen

Um die Mechanismen der Zielgenregulation durch KLK4 genauer zu verstehen, erschien es uns zunächst nötig herauszufinden, ob die Regulation von *COL1A2* und *SPARC* von der proteolytischen Aktivität von KLK4 abhängt.

KLK4-WT wird hergestellt als ein prä-pro-Enzym. Das Signal- oder Präpeptid vermittelt die Einschleusung in den sekretorischen Pfad der Proteinsynthese und wird im Endoplasmatischen Retikulum (ER) von der Signalpeptidase abgespalten. Das Propeptid, welches bei KLK4 aus nur 4 Aminosäuren besteht, hält die Protease in einer inaktiven Zymogenform, bis (vermutlich) Matrixmetalloproteinasen es abspalten und so das mature aktive KLK4-Protein entlassen (Debela et al. 2008). Der natürliche Aktivator von pro-KLK4 in der Prostata ist noch nicht eindeutig identifiziert (s. auch Kapitel 1.3.2.1). Darüber hinaus ist es unklar, ob die Prostatakarzinomzellen und/oder die Stromazellen pro-KLK4 aktivierende Proteinasen sezernieren, sodass ggf. in Zellkulturversuchen ohne Stromazellen keine Aktivierung erfolgt.

Nach stabiler Transfektion von PC-3-Zellen mit prä-pro-KLK4 konnte mittels molekularbiologischer Methoden mehrfach die mRNA- und Proteinexpression und die Sekretion von KLK4 in den Extrazellularraum nachgewiesen werden. In Voruntersuchungen konnte aber nicht gezeigt werden,

ob pro-KLK4 von den PC-3-Zellen zum murenen KLK4 aktiviert wird. Zum einen ist ein Nachweis der Abspaltung von den nur 4 Aminosäuren (AS) des Propeptids wegen der nur geringen Änderung des Migrationsverhaltens der glykosylierten KLK4 mittels SDS-Page nicht möglich. Zum anderen konnte in Voruntersuchungen dieser Arbeitsgruppe ein Unterschied in einer KLK4-ähnlichen Aktivität in den Zellkulturüberständen von prä-pro-KLK4- im Vergleich zu Vektorkontrollzellen weder mittels Zymographie noch mithilfe eines fluorogenen Serinprotease-substrats I-1120 (Boc-Val-Pro-Arg-AMC) nachgewiesen werden.

Deshalb sollte ein neuer Ansatz herangezogen werden, um die Rolle der proteolytischen Aktivität von KLK4 in tumorbiologischen Prozessen untersuchen zu können: KLK4 sollte in einer konstitutiv aktiven bzw. inaktiven Form in den PC-3-Zellen exprimiert werden.

Um eine konstitutiv aktive Form zu erhalten, wurden zwei unterschiedliche Herangehensweisen verfolgt. Eine davon beinhaltet die Einführung einer Furinspaltstelle anstelle des Propeptids. Furin ist eine ubiquitär im trans-Golgi-Netzwerk exprimierte Proproteinkonvertase, die Vorstufen vieler anderer Proteine im sekretorischen Pfad konstitutiv spaltet (Nakayama 1997). Zwei verschiedene Aminosäureabfolgen wurden dafür erstellt. HR5 (His-Arg-Arg-Arg-Arg) entspricht der Konsensussequenz aller bekannten Furinspaltstellen (Nakayama 1997). Allerdings könnte die Aufeinanderfolge von sechs basischen Aminosäuren und die damit verbundene außergewöhnlich hohe positive Ladung eine Interaktion mit anderen Proteinregionen bedingen, die eine enzymatische Spaltung verhindern. Deshalb wurde eine zweite Aminosäureabfolge (KVRRAR: Lys-Val-Arg-Arg-Ala-Arg) erstellt, die für die konstitutiv aktive Expression eines KLK3-Konstruktes in Prostatakarzinomzellen als effizientes Substrat von Furin bereits beschrieben wurde (Williams et al. 2011).

Die zweite Herangehensweise zur Entwicklung einer konstitutiv aktiven KLK4-Variante war die Deletion des Propeptids, in der Annahme, dass die Signalpeptidase die mature KLK4 freisetzen würde (delPro).

Für die Entwicklung einer inaktiven KLK4-Variante wurde das Serin (Ser/S) der katalytischen Triade (nach der Chymotrypsin-Zählweise für Serinproteasen das Serin 195) durch ein Alanin (Ala/A) ersetzt (S195A).

Eine schematische Darstellung der verschiedenen KLK4-Varianten zeigt Abbildung 3-3.



Abbildung 3-3: Schematische Darstellung der verwendeten KLK4-Expressionsplasmide

KLK4-WT wird synthetisiert als prä-pro-Enzym bestehend aus einem 26 AS-langen Signal-, einem 4 AS-langen Propeptid und dem maturen Enzym (AS 31-254). Das Signalpeptid ist entscheidend für die Sekretion des Enzyms und wird im Endoplasmatischen Retikulum (ER) von Signalpeptidasen abgespalten. Das Propeptid hält die Protease in einem inaktiven Zymogenzustand bis es vermutlich extrazellulär von Matrixmetalloproteinasen (wie MMP3/20) abgespalten wird. Das Serin der katalytischen Triade befindet sich an Position 195 (Chymotrypsin-Zählweise). Die Substitution des Propeptids durch eine Furinspaltstelle (HR5 und KVRRAR) sowie die Deletion des Propeptids (delPro) führt potentiell zu einer konstitutiv aktiven KLK4-Variante (rotes, offenes Symbol). Der Austausch des Serins der katalytischen Triade durch ein Alanin führt zu einer potentiell inaktiven KLK4-Variante (blaues, geschlossenes Symbol).

3.2.1 Ersetzen des Propeptids durch eine Furinspaltstelle und Deletion des Propeptids mittels *in vitro* Mutagenese

Die Mutationen wurden mithilfe einer *site-specific in vitro* Mutagenese in das KLK4-WT-Plasmid (Prezas et al. 2006) eingefügt. Hierbei wurden die Primer so entworfen, dass sie neben der gewünschten Mutation eine zusätzliche Spaltstelle für ein Restriktionsenzym einführen (Abbildung 3-4 (A)). Dadurch konnten anschließend die Restriktionsmuster der mutierten Plasmide im Vergleich zum KLK4-Ausgangsplasmid analysiert werden und so potentiell erfolgreiche Mutageneseversuche vorselektioniert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *in vitro* Mutagenese für die Varianten KVRRAR und delPro durchgeführt. Die KLK4-Konstrukte HR5 und S195A wurden freundlicherweise von Dominik Alterauge (Klinische Forschergruppe der Frauenklinik, München) zur Verfügung gestellt. Die Analyse des Restriktionsverdaus ist in Abbildung 3-4 (B) dargestellt. Fsp I spaltet das KLK4-WT-Plasmid in ein 3540 bp- und ein 2360 bp-Fragment. Die Einführung einer zusätzlichen Fsp-I-Spaltstelle im KVRRAR-Plasmid führt zu einer weiteren Aufspaltung des 3540 bp langen Restriktionsprodukt in ein 2150 bp- und ein 1400 bp-Fragment (Abbildung 3-4 (B)). Ähnliches gilt für die Detektion der Restriktionsfragmente nach Behandlung mit Psi I. Der Verdau des KLK4-WT-Plasmids durch Psi I führt zu einer Detektion eines 4320 bp- und eines 1570 bp-Fragments. Durch die Einführung einer Psi-I-Spaltstelle im delPro-Plasmid können bei Verdau mit Psi I anstelle des 4320 bp-Fragments zwei Fragmente der Größe 3000 bp und 1320 bp detektiert werden.

Plasmide mit den zu erwartenden Restriktionsmustern wurden zur Sequenzierung (Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg) eingeschickt, um die korrekte Mutation und Lokalisation zu verifizieren, und anschließend für die Transfektion in PC-3-Zellen verwendet.

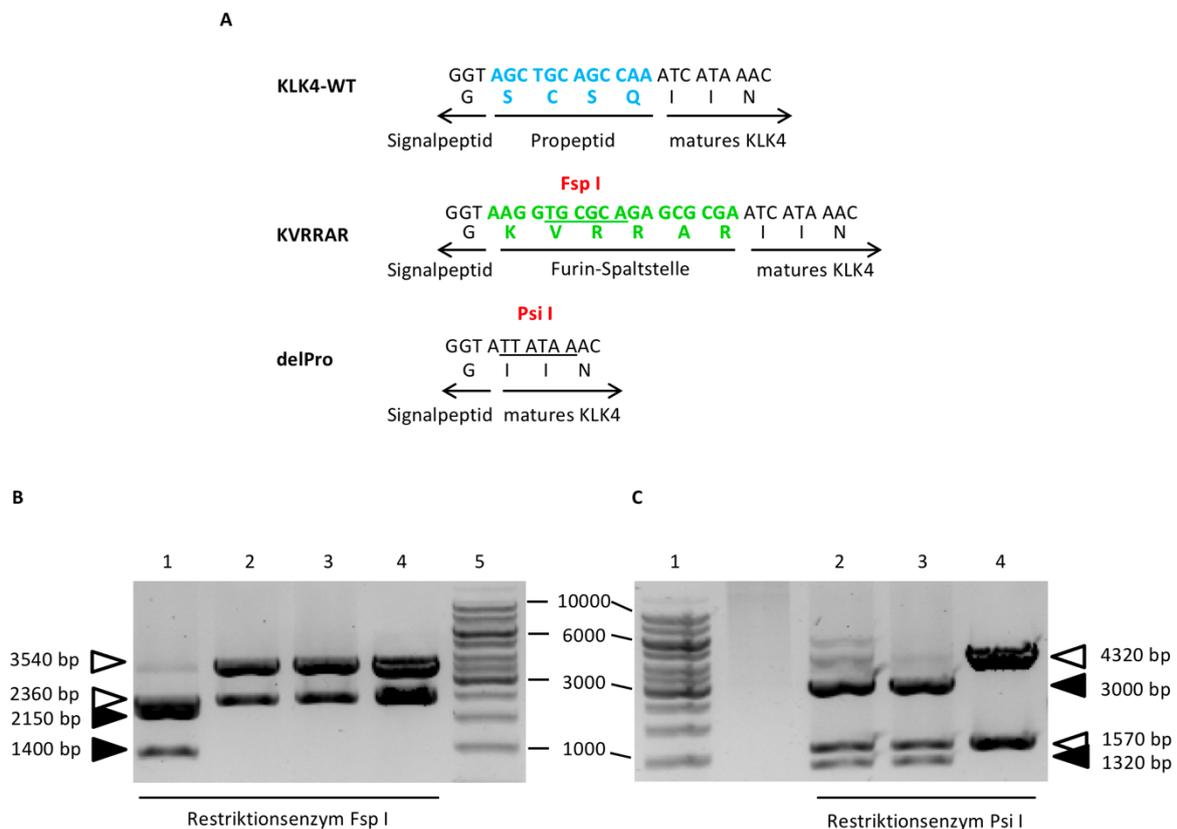


Abbildung 3-4: Restriktionsanalyse der *in vitro* mutierten Plasmide

(A) Schematische Darstellung der Mutagenese von KLK4-WT zu den Varianten KVRRAR und delPro. Dargestellt sind je das letzte Kodon/die letzte AS des Signalpeptids (GGT/G) und die ersten drei Kodons/AS der matures KLK4 (ATC ATA AAC/IIN) sowie der Bereich dazwischen. Durch den Austausch der Kodons für die Aminosäuren SCSQ des Propetids (blau) durch entsprechende Kodons für die Aminosäuren KVRRAR (grün) wird das Propeptid durch eine Furinspaltstelle ersetzt. Gleichzeitig wird eine Fsp-I-Spaltstelle eingefügt. Bei der delPro-Variante werden die Kodons für das Propeptid vollständig gelöscht. Zusätzlich führen die Primer durch eine stille Punktmutation im zweiten dargestellten Kodon (C → T) eine Psi-I-Spaltstelle ein.

(B) Fsp I spaltet das KLK4-WT-Plasmid (Spur 4) in ein 3540 bp- und ein 2360 bp- Fragment (ungefüllte Pfeilspitzen). Bei erfolgreicher Mutation des Plasmids mit Ersatz des Propeptids durch eine Furinspaltstelle (KVRRAR) (Spur 1) wird das 3540 bp lange Restriktionsprodukt von Fsp I weiter in ein 2150 bp- und ein 1400 bp-Fragment (gefüllte Pfeilspitzen) gespalten. Spur 2 und 3 zeigen erfolglose Mutageneseversuche.

(C) Psi I spaltet das KLK4-WT-Plasmid (Spur 4) in ein 4320 bp- und ein 1570 bp-Fragment (ungefüllte Pfeilspitzen). Bei erfolgreicher Mutation des Plasmids mit Deletion des Propeptids (Spur 2, 3) wird das 4320 bp lange Restriktionsprodukt von Psi I weiter in ein 3000 bp- und ein 1320 bp-Fragment (gefüllte Pfeilspitzen) gespalten.

DNA-Standards wurden in Spur 5 (B) und Spur 1 (C) geladen.

3.2.2 Transfektion der Plasmide in humane Prostatakarzinomzellen

Um die tumorbiologischen Effekte von KLK4 in Abhängigkeit der Aktivität der Protease untersuchen zu können, wurden die in Kapitel 3.2 besprochenen fünf verschiedenen KLK4-Varianten und eine unveränderte Vektorkontrolle in parentale PC-3-Zellen transfiziert.

Der Erfolg der Transfektion wurde auf mRNA- und Proteinebene mehrfach kontrolliert. Die quantitative Untersuchung der mRNA mit qRT-PCR zeigte, wie erwartet, keine Expression von *KLK4* in den Vektorkontrollzellen (RSV). Alle anderen Zellen exprimierten unterschiedliche Level der *KLK4*-Varianten von circa 0,3-0,9 der *HPRT1*-Expression. Einzig die Zelllinie mit der inaktiven Variante S195A produzierte deutlich höhere *KLK4* mRNA-Level (2,32 der *HPRT1*-Expression), s. Abbildung 3-5 (A).

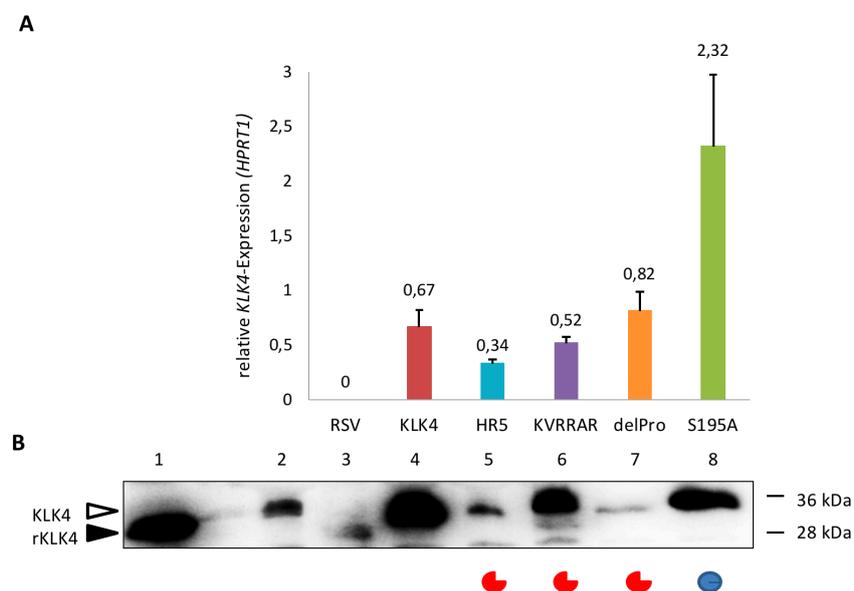


Abbildung 3-5: Charakterisierung der KLK4-Expression nach Transfektion der verschiedenen Plasmide in PC-3-Zellen

(A) Analyse der *KLK4*-Expression relativ zum Kontrollgen *HPRT1* in den verschiedenen Transfektanten mittels qRT-PCR. Die Vektorkontrolle (RSV) zeigt, wie erwartet, keine *KLK4*-Expression. Die stärkste Expression findet sich in den Zellen mit der potentiell inaktiven *KLK4*-Variante. Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte aus drei (HR5, KVRRAR, delPro) bzw. vier (KLK4, S195A) unabhängigen Versuchen. Die Fehlerindikatoren entsprechen den Standardfehlern.

(B) Western Blot der konzentrierten Zellüberstände. Die Vektorkontrolle (Spur 3) zeigt keine *KLK4*-Proteinproduktion, wohingegen in den Transfektanten *KLK4*-WT (Spur 4), HR5 (Spur 5), KVRRAR (Spur 6), delPro (Spur 7) und S195A (Spur 8) glykosyliertes *KLK4* (ungefüllte Pfeilspitze) produziert wird. Im Vergleich zur mRNA-Produktion scheint die Variante delPro entweder nicht gut sezerniert zu werden oder instabil zu sein. Als Kontrollen dienten rekombinantes, nicht-glykosyliertes *KLK4* (Spur 1) (gefüllte Pfeilspitze) und konzentrierte Überstände der Zelllinie LNCaP mit endogener *KLK4*-Produktion (Spur 2).

Auf Proteinebene konnte *KLK4* mittels Western Blot in 10-fach konzentrierten konditionierten Überständen der Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 3-5 (B)). Auch hier war kein *KLK4* in den Vektorkontrollzellen detektierbar. In allen anderen Zellen wurden die entsprechenden *KLK4*-Proteinvarianten hergestellt und sezerniert. Als Positivkontrollen dienten rekombinante *KLK4* aus *E. coli*, das aufgrund der fehlenden Glykosylierung eine geringere molekulare Größe aufweist (Guo et

al. 2014) und 10-fach konzentrierter konditionierter Überstand von LNCaP-Zellen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dominik Alterauge, Klinische Forschung der Frauenklinik, München, D), welche endogen KLK4 produzieren (Nelson et al. 1999).

Leider stellt das Fehlen von geeigneten Referenzmarkern bei der Quantifizierung des Proteingehalts aus Zellkulturüberständen ein generelles Problem dar. Zusätzlich ist die Berechnung des Gesamtproteingehalts wegen des erhöhten BSA-Gehaltes im verwendeten serumfreien P4-8F nicht möglich. Jedoch wird durch standardisierte Protokolle des Zellaussäens, der Gewinnung und der Weiterverarbeitung der Überstände eine relativ gute Vergleichbarkeit erreicht. Diese konnte auch durch mehrfache unabhängige Wiederholung der Western Blots bestätigt werden.

Auffallend ist, dass sich im Western Blot im Vergleich zur qRT-PCR nur eine sehr geringe Menge an delPro-KLK4-Protein zeigt. Möglicherweise führt die Deletion des Propeptids zu einer Transportstörung des Proteins in den Extrazellularraum oder zur Produktion einer instabilen Protease. Zusätzlich weist die Variante KVRRAR im Vergleich zu HR5 eine höhere und damit zum KLK4-WT- und S195A-Plasmid vergleichbarere KLK4-Expression auf. Deswegen wurde die Analyse der beiden Zelllinien PC-3 HR5 und PC-3 delPro nicht weiterverfolgt.

3.3 Charakterisierung der transfizierten Zelllinien

Nun sollten die verbleibenden, mit den unterschiedlichen KLK4-Varianten transfizierten PC-3-Zellen an Hand ihrer zellbiologischen Eigenschaften im Sinne ihres Wachstums- und Anheftungsverhaltens an Oberflächen charakterisiert werden. Die vorhandene Literatur zum Effekt von KLK4 auf die Proliferation und die Adhäsionsfähigkeit der Prostatakarzinomzellen wurde bereits in den Kapiteln 1.4.2.1 und 1.4.2.2 diskutiert.

3.3.1 Proliferationsverhalten

In der vorliegenden Arbeit wurde das Proliferationsverhalten der PC-3-Zellen mit einem MTT-Test über einen Zeitraum von 96 h bestimmt (s. Kapitel 2.2.6). Um Fehler beim Aussäen der Zellen zu entkräften, wurde die Proliferationsrate der einzelnen Zelllinien jeweils relativ zum 24-h-Wert berechnet.

Gemessen wurde die Proliferation sowohl unter serumhaltigen als auch unter serumfreien Bedingungen, da es nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Anwesenheit von Proteaseinhibitoren im Serum die Aktivität von KLK4 hemmt. Ein Unterschied in den Ergebnissen der beiden Versuche würde somit für eine wichtige Rolle der proteolytischen Aktivität in der Modulation des Proliferationsverhaltens sprechen.

Allerdings konnte weder unter serumhaltigen (s. Abbildung 3-6 (A)) noch unter serumfreien Bedingungen (s. Abbildung 3-6 (B)) ein signifikanter Proliferationsunterschied der Zellen festgestellt

werden. Kleinere Unterschiede zeigen einen leichten Nachteil der prä-pro- und KVRRAR-KLK4 produzierenden Zellen.

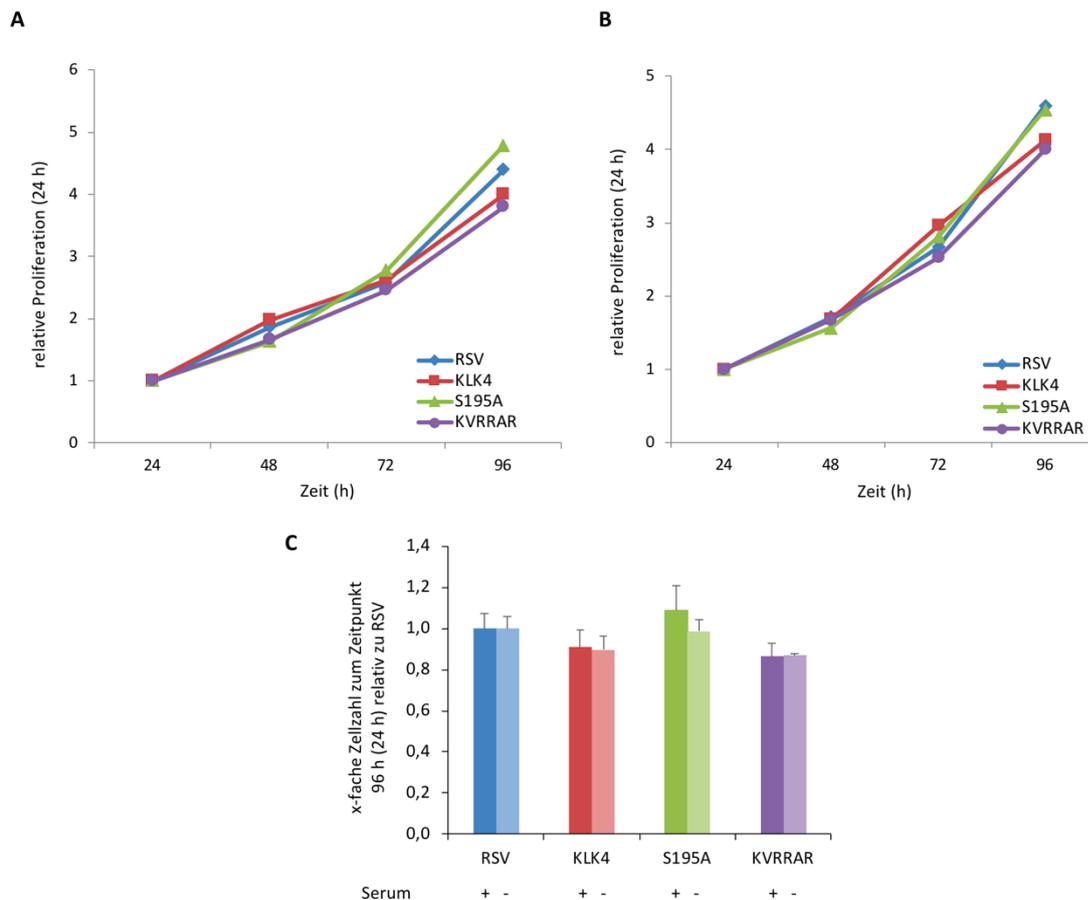


Abbildung 3-6: Charakterisierung des Proliferationsverhaltens der mit den unterschiedlichen KLK4-Varianten transfizierten PC-3-Zellen

(A, B) MTT-Assay zur Bestimmung der Zellproliferation. Die Zellproliferation der unterschiedlich transfizierten PC-3-Zellen, relativ zum 24-h-Ausgangswert, unterscheidet sich weder unter serumhaltigen (A) noch unter serumfreien (B) Bedingungen signifikant. Relativ zur Vektorkontrolle bewegen sich die Zellzahlen zum Zeitpunkt 96 h (24 h) zwischen 0,9 und 1,1 (C). Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Proliferationsversuchen (A, B, C) und deren Standardabweichung (C).

3.3.2 Adhäsionsverhalten

Neben der Evaluation des Einflusses von KLK4 auf die Proliferation sollte auf zellulärer Ebene auch der Einfluss von KLK4 auf die Adhäsionsfähigkeit der Zellen untersucht werden. Hierfür wurde das Anhaftungsverhalten der verschiedenen Zelllinien auf unterschiedlich beschichtete 96-well Platten gemessen. Die Adhäsionsfähigkeit der Vektorkontrollzellen wurden als Referenzwert angesehen, auf welchen alle anderen Werte normalisiert wurden.

Erstaunlicherweise zeigten die KLK4-WT-Zellen eine verminderte Adhäsion auf den unbeschichteten (Abbildung 3-7 (A)) und den mit Kollagen Typ I beschichteten (Abbildung 3-7 (B)) Platten bei nichtsignifikant verminderter Adhäsion auf den mit Kollagen Typ IV beschichteten Platten (Abbildung

3-7 (C)). Im Gegensatz dazu zeigte sich aber weder ein Einfluss der KLK4-Variante KVRRAR noch der KLK4-Variante S195A auf die Adhäsion.

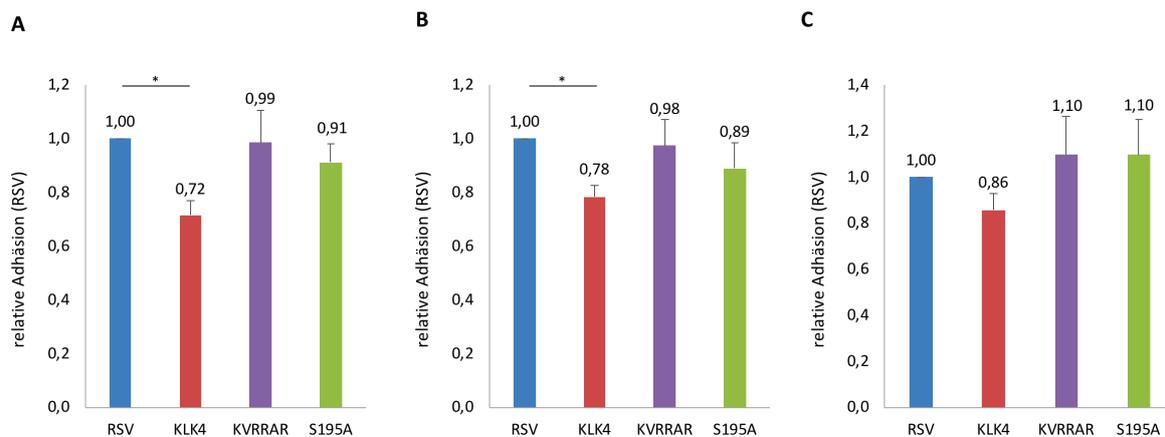


Abbildung 3-7: Charakterisierung des Adhäsionsverhaltens der mit den unterschiedlichen KLK4-Varianten transfizierten PC-3-Zellen

Die KLK4-WT exprimierenden PC-3-Zellen zeigen auf unbeschichteten (A), mit Kollagen Typ I (B) und in der Tendenz auch auf Kollagen Typ IV (C) beschichteten 96-well Platten eine verminderte Adhäsion im Vergleich zur Vektorkontrolle (RSV). Die anderen PC-3-Zellen (KVRRAR und S195A) zeigen ein ähnliches Adhäsionsverhalten wie die Vektorkontrolle. Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Adhäsionsmessungen. Die Fehlerindikatoren entsprechen den Standardfehlern.

3.4 Auswirkungen der proteolytischen Aktivität von KLK4 auf die differentielle Expression der Zielgene

3.4.1 Einfluss der KLK4-Mutationen auf die differentielle Expression der Zielgene COL1A2 und SPARC

Im Folgenden sollte die Auswirkung der verschiedenen KLK4-Mutationen auf die differentielle Expression von COL1A2 und SPARC beurteilt werden. Hierfür sollte zunächst die mRNA-Expression mittels qRT-PCR und anschließend die Protein-Expression mittels Western Blot in den mit den verschiedenen KLK4-Varianten transfizierten PC-3-Zellen analysiert werden.

COL1A2 zeigte sich in allen drei KLK4-Varianten herabreguliert, was mit den Daten zur COL1A2-Regulation in unabhängig mit KLK4-WT und S195A transfizierten PC-3-Zellen überein stimmte (Alterauge 2014). Interessanterweise war die Regulation am stärksten in der inaktiven S195A-Variante und am wenigsten stark in der KVRRAR-Variante, suggerierend, dass die Regulation nicht von der proteolytischen Aktivität abhängt (Abbildung 3-8 (A)). Die Stärke der gemessenen Herabregulation erscheint vielmehr konkordant zur Stärke der KLK4-Expression in den Zellen (s. Kapitel 3.2.2), was die Vermutung nahelegt, dass der absolute KLK4-Gehalt in den Zellen entscheidend für die Ausprägung der differentiellen Expression ist.

Voruntersuchungen zeigten, dass COL1A2 auf Proteinebene als sezerniertes Protein mit herkömmlichen Western Blot Antikörpern in konditionierten Überständen nicht reproduzierbar

detektiert werden kann. Dies liegt möglicherweise an der Ausbildung eines höhermolekularen Kollagenetzwerkes. Um dieses Problem zu umgehen und gleichzeitig eine Möglichkeit der Quantifizierung einzuführen, wurde eine Methode entwickelt, bei welcher anstelle von COL1A2 in Überständen proCOL1A2 in Zelllysaten bestimmt werden sollte. Die Bandenstärke konnte dann über ein *Housekeeping* Protein, hier GAPDH, normalisiert werden. In Vorversuchen mit unabhängig transfizierten Zellen war dies mehrfach gelungen, wobei eine ca. 2-fache Herabregulation des proCOL1A2 Proteinlevels in den KLK4-WT-Zellen verglichen zur Vektorkontrolle gezeigt werden konnte (Alterauge 2014). Abbildung 3-8 (B) zeigt einen solchen Western Blot der hier verwendeten Zelllinien. Die densitometrische Auswertung ergab eine leichte Herabregulation von proCOL1A2 in den KLK4-WT-Zellen verglichen zur Vektorkontrolle. Leider ließ die Qualität dieses Western Blots trotz mehrfacher Versuche zu wünschen übrig, sodass aufgrund der fraglichen Aussagekraft auf weitere (pro)COL1A2 Western Blots verzichtet wurde.

Abbildung 3-8 (C) zeigt die Regulation von *SPARC*, welches in KLK4-WT-, KVRRAR- und S195A-PC-3-Zellen verglichen zu den Vektorkontrollzellen hochreguliert wird. Auch hier scheint die Regulation aktivitätsunabhängig, aber abhängig vom KLK4-Gehalt der Zellen zu sein. Dass die Hochregulation in den PC-3-Zelllinien KLK4 und S195A nicht signifikant war, lag trotz deutlicher Expressionsveränderung an der hohen Variabilität zwischen den biologischen Replikaten, bei gleichzeitiger starker Schwankung der KLK4-Expression, und wurde bereits in Kapitel 3.1.3 erörtert.

Ein exemplarischer Western Blot zeigt die Detektion des extrazellulären Proteins SPARC in den konzentrierten konditionierten Zellkulturüberständen. Mit den bereits in Kapitel 3.2.2 genannten Einschränkungen lässt sich dabei semiquantitativ eine vermehrte SPARC-Produktion und -Sekretion in allen KLK4-exprimierenden Zellen feststellen. Wie schon auf dem mRNA-Level ist SPARC auch auf dem Proteinlevel am meisten in den S195A-Zellen, gefolgt von den KLK4-WT-Zellen hochreguliert. Die KVRRAR-Zellen sezernieren nur unwesentlich mehr SPARC als die Vektorkontrollzellen. Deshalb ist auch auf Proteinebene davon auszugehen, dass die SPARC-Regulation abhängig vom KLK4-Gehalt der Zellen und weniger von der KLK4-Aktivität ist.

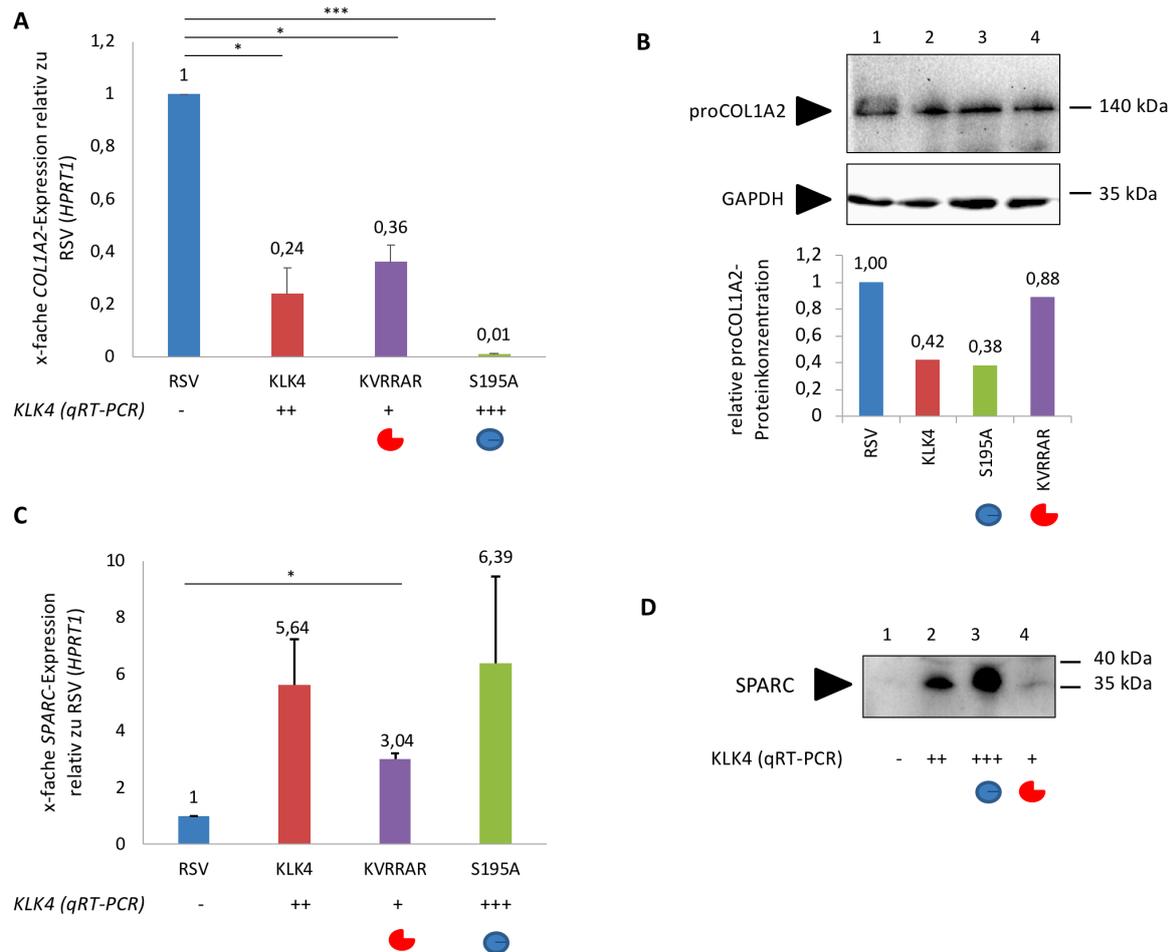


Abbildung 3-8: Differentielle Expression von COL1A2 und SPARC in den mit verschiedenen KLK4-Varianten transfizierten PC-3-Zellen auf mRNA- und Protein-Ebene

(A) Die qRT-PCR-Analyse der Expression von *COL1A2* in den KLK4-WT-, KVRRAR- und S195A-PC-3-Zellen verglichen zu der in den Vektorkontrollzellen (RSV) zeigt eine signifikante Herabregulation der mRNA-Expression in allen drei KLK4-Varianten. Die Regulation scheint unabhängig von der katalytischen Aktivität, allerdings abhängig vom KLK4-Gehalt der Zellen zu sein.

(B) Die Western Blot Analyse von COL1A2 stellte sich als sehr schwierig heraus, da kein geeigneter Antikörper gefunden wurde, um COL1A2 reproduzierbar zu detektieren. Der abgebildete Western Blot zeigt eine alternative Detektionsvariante, in der die Vorstufe proCOL1A2 in den Zelllysaten der PC-3-Zellen gemessen wurde, GAPDH diente als Ladekontrolle. Laut densitometrischer Auswertung ist im oben abgebildeten Western Blot die proCOL1A2-Proteinexpression, zwar weniger als die mRNA-Expression, aber dennoch in allen drei KLK4-positiven Zelllinien herabreguliert (Spur 1: Vektorkontrolle, Spur 2: KLK4-WT-, Spur 3: S195A-, Spur 4: KVRRAR-Variante). Allerdings zeigte diese Methode keine zufriedenstellenden, reproduzierbaren Ergebnisse, weswegen im Verlauf auf Western Blot Analysen der COL1A2-Proteinexpression verzichtet wurde.

(C) Die qRT-PCR-Analyse der Expression von *SPARC* in den KLK4-WT-, KVRRAR- und S195A-PC-3-Zellen verglichen zu der in den Vektorkontrollzellen (RSV) zeigt eine Hochregulation von *SPARC* in allen untersuchten Zelllinien. Diese ist bei hoher Variabilität der Werte in der KLK4-WT- und der S195A-Variante nur für die KVRRAR-Variante statistisch signifikant. Auch hier wirkt die Regulation unabhängig von der katalytischen Aktivität, aber abhängig vom KLK4-Gehalt der Zellen.

(D) Der exemplarische Western Blot zeigt die Proteinexpression von SPARC in 10x konzentrierten konditionierten Überständen der PC-3-Zelllinien RSV (Spur 1), KLK4-WT (Spur 2), S195A (Spur 3) und KVRRAR (Spur 4). Semiquantitativ scheint SPARC im Vergleich zur Vektorkontrolle (RSV) sowohl in der KLK4-WT- und der KVRRAR-Variante als auch in der S195A-Variante vermehrt exprimiert.

Die Abbildungen (A) und (C) zeigen jeweils den Mittelwert von n unabhängigen qRT-PCRs, (A): n=2, (C): n=3 (KLK4 und S195A), 2 (KVRRAR). Die Fehlerindikatoren entsprechen den Standardfehlern.

3.4.2 Einfluss der Verwendung eines irreversiblen Inhibitors von KLK4 auf die differentielle Expression der Zielgene COL1A2 und SPARC

Um die Aktivitätsunabhängigkeit der Regulation von COL1A2 und SPARC weiter zu bestätigen, wurden die Zellen in serumfreiem Medium in Prä- und Absenz eines irreversiblen, spezifischen KLK4-Inhibitors kultiviert und anschließend die mRNA-Expression und die Proteinexpression untersucht. Da die potentiell konstitutiv aktive Variante KVRAR keinen nachweislich stärkeren Effekt auf die Expression der Zielgene hatte als die KLK4-WT-Variante, wurden die Versuche auf die Varianten KLK4-WT, S195A und die Vektorkontrolle begrenzt. Vorversuche hatten gezeigt, dass parentale PC-3-Zellen auch in der Anwesenheit von hohen Konzentrationen des Inhibitors (1 μ M) ohne offensichtliche toxische Effekte wachsen und die Proliferationsrate nicht beeinflusst wird (Schulze und Magdolen, persönliche Mitteilung).

Um Effekte auszuschließen, die von einer unterschiedlichen KLK4-Expression in den mit bzw. ohne Inhibitor behandelten Zellen ausgingen, wurde erneut die KLK4-Konzentration in den Zellen bestimmt (Abbildung 3-9 (A)). Insgesamt zeigte sich, dass über die Zeit trotz Verwendung von Zellen, die direkt nach abgeschlossener stabiler Transfektion eingefroren, in flüssigem Stickstoff gelagert und für diese Versuche frisch aufgetaut wurden, die KLK4-Konzentration in den PC-3-Zellen abgenommen hatte (vgl. Kapitel 3.2.2).

Wie schon die Vorversuche in serumhaltigem Medium gezeigt hatten (s. Kapitel 3.4.1) wurde COL1A2 auch in serumfreiem Medium sowohl in den KLK4-WT- als auch in den S195A-Zellen herabreguliert. Die differentielle Expression war mit einer 10- bis 20-fachen Herabregulation statistisch signifikant (Abbildung 3-9 (B)). Es bestand kaum ein Unterschied zwischen der COL1A2-Expression in den unterschiedlichen Behandlungsgruppen (ohne bzw. mit Inhibitor (1 μ M)). Sowohl die Herabregulation von COL1A2 bei Expression von potentiell aktiven und inaktiven Varianten unter serumfreien Bedingungen als auch die fehlende Differenz der Genregulation nach Inhibitorbehandlung der Zellen bekräftigen die Annahme, dass es sich bei der differentiellen Expression um einen aktivitätsunabhängigen Effekt der KLK4-Expression handelt.

Ähnliches gilt für die Expression von SPARC, welches in beiden untersuchten KLK4-exprimierenden Zelllinien signifikant hochreguliert war. Die Zugabe des Inhibitors antagonisierte die Regulation der SPARC-Expression nicht (Abbildung 3-9 (C)). Dies konnte auch auf Proteinebene durch die Anfertigung eines Western Blots aus konzentrierten konditionierten Zellkulturüberständen bestätigt werden (Abbildung 3-9 (D)).

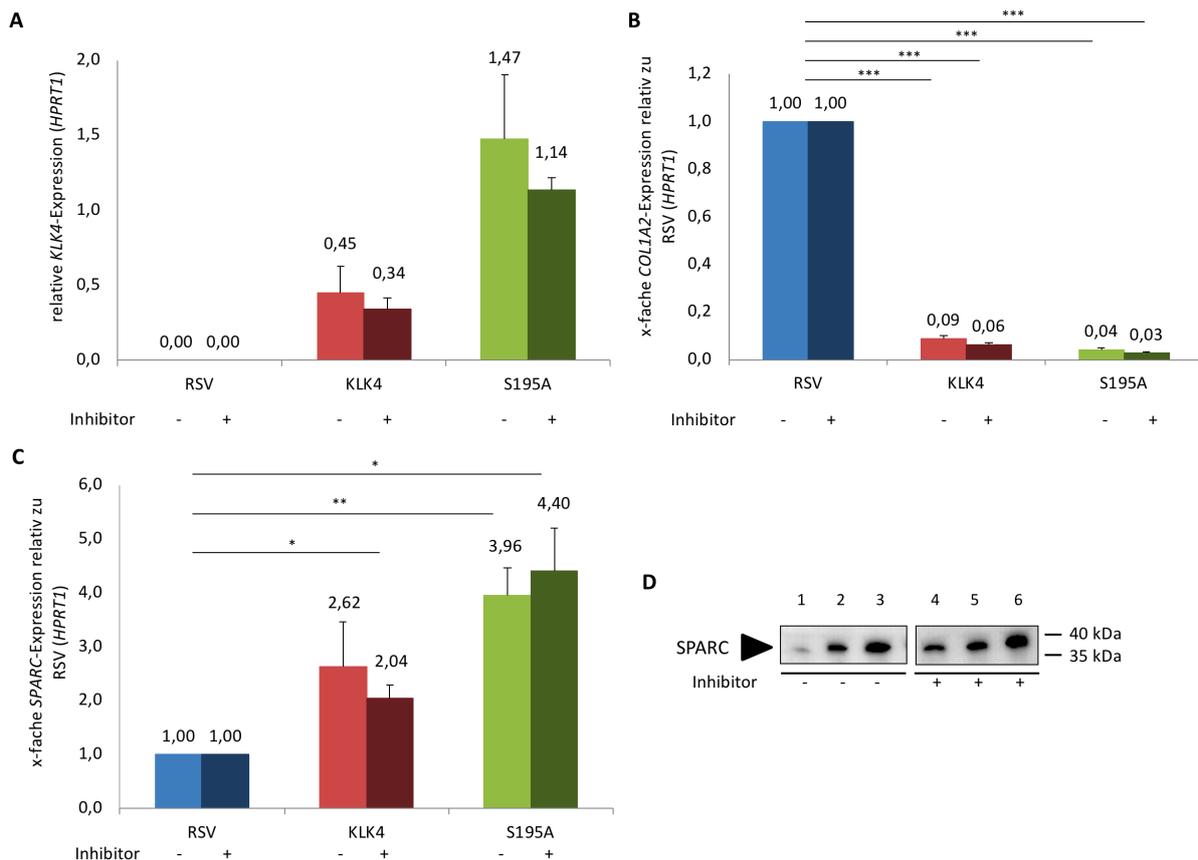


Abbildung 3-9: Die Regulation der Zielgene ist unabhängig von der KLK4-Aktivität

Zur Validierung der Aktivitätsunabhängigkeit der KLK4-Effekte in der Genexpression von PC-3-Zellen wurden die mit den KLK4-Varianten transfizierten PC-3-Zellen 72 h mit einem oder ohne einen spezifischen, irreversiblen Inhibitor (1 μ M) inkubiert und daraufhin die mRNA-Expression von *KLK4*, *COL1A2* und *SPARC* sowie Proteinmenge von *SPARC* gemessen.

(A) *KLK4*-mRNA wird in den KLK4-WT- und S195A-Zellen exprimiert, in RSV ist kein *KLK4* detektierbar. Die Behandlung mit dem Inhibitor senkt die *KLK4* Expression leicht, aber nicht signifikant ab.

(B) Wie schon in den vorherigen Versuchen gesehen, regulieren sowohl die KLK4-WT- als auch die S195A-Zellen *COL1A2* signifikant herab. Die Behandlung mit einem spezifischen KLK4-Inhibitor führt in keinem der beiden Fälle zu einer Aufhebung dieses Effekts. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die *COL1A2*-Regulation nicht von der proteolytischen Aktivität abhängig ist.

(C) *SPARC* wird in beiden Zelllinien (KLK4-WT und S195A) im Vergleich zur Vektorkontrolle (RSV) heraufreguliert, jedoch in beiden Fällen geringer als vormals (s. Abb. 3-8) gesehen. Dies könnte an der nun verringerten *KLK4*-Konzentration in den Zellen im Vergleich zu Vorversuchen (s. Abb. 3-5) liegen. Die Behandlung mit einem spezifischen KLK4-Inhibitor hat weder in den KLK4-WT- noch in den S195A-Zellen Einfluss auf die Regulation von *SPARC*.

(D) Der Western Blot für *SPARC* aus konzentrierten konditionierten Überständen bestätigt die Heraufregulation von *SPARC* in KLK4-WT- und S195A-Zellen im Vergleich zur Vektorkontrolle (RSV) auch auf Proteinebene, wobei auch hier, analog zur mRNA-Expression, kein antagonistischer Effekt durch die Inhibitorbehandlung zu erkennen ist.

Die Abbildungen (A) bis (C) zeigen jeweils die Mittelwerte aus 2 (A) oder 3 (B und C) unabhängigen Versuchen. Die Fehlerindikatoren entsprechen den Standardfehlern.

4 Diskussion

4.1 KLK4-Überexpression führt zu signifikanten Änderungen der Genexpression in Prostatakarzinomzellen

Viele der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen, darunter auch KLK4, werden im Prostatakarzinom überexprimiert und korrelieren mit schlechteren Prognoseparametern für den Verlauf dieser Erkrankung (Avgeris et al. 2011; Darson et al. 1999; Yousef et al. 2003). Für KLK4 konnte gezeigt werden, dass sie in Prostatakarzinomzellen die epitheliale-zu-mesenchymale Transition fördert (Veveris-Lowe et al. 2005) und die Migrationsfähigkeit erhöht (Klokk et al. 2007; Gao et al. 2007), wodurch KLK4 zur Tumorprogression des Prostatakarzinoms beitragen könnte.

Die Funktionen der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen sind komplex, da sie im Rahmen eines proteolytischen Netzwerkes agieren (Ohler et al. 2010) und somit eine Vielzahl von Signalkaskaden stimulieren oder inhibieren können. Hinzu kommen aktivitätsunabhängige Eigenschaften der Protease (Klokk et al. 2007), die auf die Tumorprogression Einfluss nehmen.

Untersuchungen von KLK-Überexpression in Ovarialkarzinomzellen zeigten, dass KLKs an der differentiellen Expression von Genen der TGF- β -, PAR- und EMT-Signalkaskaden beteiligt sind (Wang et al. 2018). In der Annahme, dass eine KLK-induzierte differentielle Expression von Genen dieser Signalwege auch in Prostatakarzinomzellen vorkommt, wurden PCR-Arrays zu allen drei Signalkaskaden durchgeführt (neben EMT in dieser Arbeit, auch TGF- β (Alterauge 2014) und PAR (Schulze und Magdolen, persönliche Mitteilung)), in denen KLK4-überexprimierende PC-3-Zellen mit Vektorkontrollzellen verglichen wurden. Im EMT-PCR-Array konnten 12 differentiell exprimierte Gene identifiziert werden, wovon sechs mehr als 4-fach differentielle exprimiert waren (s. Kapitel 3.1.1). Die Regulation von vier dieser sechs Gene, *CAMK2N1*, *COL1A2*, *SPARC* und *TFPI2*, konnte mittels qRT-PCR validiert werden, wobei unabhängige RNA-Extraktionen benutzt wurden (s. Kapitel 3.1.3). Beachtenswert ist dabei, dass *COL1A2* auch im unabhängig durchgeführten TGF- β -PCR-Array herabreguliert war und die Regulation mittels qRT-PCR (und Western Blot) bestätigt werden konnte (Alterauge 2014), was die Richtigkeit der Messung unterstreicht. Darüber hinaus ergaben Voruntersuchungen an Patientenproben, dass *COL1A2*-mRNA im Prostatakarzinomgewebe im Vergleich zu gesundem Prostatagewebe schwächer exprimiert ist und negativ mit der *KLK4*-mRNA-Expression korreliert (Napieralski und Magdolen, persönliche Mitteilung). Erstaunlicherweise ist E-Cadherin im EMT-Array 2,6-fach hochreguliert, was eigentlich einer EMT widerspricht, sodass diesbezüglich dringend weitere Studien nötig sind, um die Rolle von KLK4 in der EMT von Prostatakarzinomzellen zu klären.

4.2 KLK4 beeinflusst die Tumorprogression des Prostatakarzinoms durch die Veränderung der Genexpression

In Kapitel 3.1.3 und konnte gezeigt werden, dass die Expression von KLK4 in PC-3-Zellen zu einer vermehrten Expression von *CAMK2N1* und *SPARC* sowie zu einer verminderten Expression von *COL1A2* und *TFPI2* führt. Im Folgenden sollen mögliche Auswirkungen dieser differentiellen Genexpression auf die Tumorprogression des Prostatakarzinoms diskutiert werden.

4.2.1 Die widersprüchliche Rolle von CAMK2N1 im Prostatakarzinom

CAMK2N1 (*Calcium/calmodulin dependent protein kinase II inhibitor 1*) ist ein intrazelluläres Protein, welches über die Hemmung der Proteinkinase CAMK2 zu einer Deaktivierung des MEK/ERK-Signalwegs (Romanuik et al. 2009a) und damit zu einem vermehrten Zellzyklusarrest in der G₀/G₁-Phase führt (Wang et al. 2014b).

Das legt eine tumorsuppressive Rolle von CAMK2N1 nahe (Carneiro et al. 2019) und tatsächlich konnte dies auch in einigen Studien nachgewiesen werden. Nicht nur wurde im Prostatakarzinomgewebe im Vergleich zu normalem Gewebe eine verringerte CAMK2N1 mRNA- und Proteinexpression detektiert (Wang et al. 2014b), auch in chemotherapieresistentem Prostatakarzinomgewebe war die CAMK2N1-Expression im Vergleich zu chemotherapiesensiblen Tumorgewebe und in Metastasen im Vergleich zu Primärtumoren vermindert (Wu et al. 2019; Romanuik et al. 2009a). Ein CAMK2N1-*knockdown* in C4-2-Zellen führte *in vivo* zu einem größeren Tumor und einem erhöhtem Tumorgewicht (Wang et al. 2014a), eine Überexpression von CAMK2N1 in DU145- und PC-3-Zellen *in vivo* und *in vitro* zu einer verminderten Proliferation (Wang et al. 2014b). Auch die Hemmung der Kinase CAMK2 in C4-2-Zellen verminderte *in vitro* die Proliferation und Matrigel-Invasion und inhibierte Notch-Signale (Mamaeva et al. 2009), welche u. a. für die EMT verantwortlich gemacht werden (Jing et al. 2011). Darüber hinaus scheint CAMK2N1 invers mit dem Androgenrezeptor zu korrelieren und in kastrationsresistenten Tumorzellen zu einer Wiederherstellung der Sensitivität auf AR-Deprivation zu führen (Romanuik et al. 2009b; Wang et al. 2014a), wobei die Kinase CAMK2 selbst aufgrund ihrer Fähigkeit zur AR-unabhängigen AKT-Aktivierung in Verbindung mit der Entwicklung einer Kastrationsresistenz gebracht wurde (Rokhlin et al. 2007).

Trotz dieser Erkenntnisse ist die Rolle von CAMK2N1 in der Tumorprogression des Prostatakarzinoms noch nicht endgültig verstanden. Im Gegenteil, es gibt auch Hinweise auf tumorunterstützende Eigenschaften des Proteins. So scheint eine hohe CAMK2N1-Expression in Primärtumoren prädiktiv für ein anschließendes biochemisches Rezidiv zu sein (Romanuik et al. 2009a) und mit lokal fortgeschrittenen Stadien, höherem *Gleason-Score* und geringerem krankheitsspezifischen und krankheitsfreien Überleben zu korrelieren (Carneiro et al. 2019).

Die widersprüchlichen Ergebnisse zeigen, dass weitere funktionelle Studien notwendig sind, um die Rolle von CAMK2N1 in der Tumorprogression des Prostatakarzinoms besser einordnen zu können. Diskutiert wird, dass CAMK2N1 je nach Tumorphase mehr oder weniger exprimiert wird, um differenzierte Auswirkungen auf EMT und Migration oder auf die Proliferation von Primärtumoren zu vermitteln (Carneiro et al. 2019).

Betrachtet man außerdem die oben genannten Auswirkungen der CAMK2N1-Expression auf die Proliferationseigenschaften der Prostatakarzinomzellen, legt dies nahe, dass CAMK2N1 durch seine KLK4-assoziierte Hochregulation in den PC-3-Zellen (s. Kapitel 3.1.3) an der unveränderten bis leicht verminderten Proliferationsfähigkeit der KLK4-WT-Zellen im Vergleich zu den Vektorkontrollzellen (s. Kapitel 3.3.1) beteiligt sein könnte.

4.2.2 In Abwesenheit von COL1A2 bilden sich proteolyseresistente, invasionsfördernde Alpha-1-Homotrimere

Kollagen Typ I ist das am weitesten verbreitete Strukturprotein der extrazellulären Matrix und setzt sich als Heterotrimer aus zwei Alpha-1-Ketten und einer Alpha-2-Kette zusammen. In Abwesenheit von funktionalen Alpha-2-Ketten, wie z. B. bei Patienten mit *Osteogenesis imperfecta*, kommt es zur energetisch ungünstigeren Organisation der Kollagenfibrillen in Alpha-1-Homotrimere (McBride et al. 1992). Deshalb finden sich Alpha-1-Homotrimere normalerweise nicht in gesundem, erwachsenem Gewebe, sondern wurden außer ihrem Vorkommen in fetalem Gewebe lediglich in fibrotischem oder kanzerösem Gewebe beschrieben (Chang et al. 2012). Unter anderem konnten Alpha-1-Homotrimere in Adenokarzinomen der Lunge (Rupard et al. 1988), Mammakarzinomen (Luparello et al. 1991), Osteosarkomen (Yamagata und Yamagata 1984) und auch in Prostatakarzinomen (Makareeva et al. 2010) nachgewiesen werden. Interessanterweise werden diese lediglich durch die Tumorzellen und nicht durch tumorassoziierte Fibroblasten hergestellt, sodass die Mehrheit der ECM weiterhin aus Heterotrimeren besteht. Diese Tatsache legt nahe, dass die Ursache der Homotrimerbildung in den Tumorzellen selbst und nicht in der Tumormikroumgebung liegt (Makareeva et al. 2010). Eine Regulation durch eine sezernierte, aktive Variante von KLK4 würde vermutlich auch die Tumormikroumgebung beeinflussen, sodass die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese einer aktivitätsunabhängigen Regulation von *COL1A2* durch KLK4 (vgl. Kapitel 3.4.1 und 3.4.2) naheliegend scheint.

Die Organisation in Alpha-1-Homotrimeren führt zu einer Resistenz gegenüber der Proteolyse durch MMPs, wobei auch durch Homotrimere umgebene Heterotrimere vor der Proteolyse geschützt werden, wodurch Leitstrukturen für die Invasion der Tumorzellen entstehen könnten (Han et al. 2010; Mekkat et al. 2018; Makareeva et al. 2010). In der Tat scheinen Kollagen-I-Homotrimere sich positiv auf die Proliferation und Motilität von Fibrosarkom-, Melanom- und Mammakarzinomzellen

auszuwirken (Makareeva et al. 2010; Schillaci et al. 1989; Luparello et al. 1991). Für Prostatakarzinomzellen gibt es meines Wissens bis dato keine solchen Untersuchungen.

Zusammenfassend könnte die Herabregulation der COL1A2-Expression durch KLK4 zu einer vermehrten Alpha-1-Homotrimer-Bildung führen und darüber die Tumorprogression im Sinne einer vermehrten Invasion und Proliferation begünstigen.

4.2.3 SPARC fördert die Invasivität von Prostatakarzinomzellen und das *Homing* zirkulierender Tumorzellen in den Knochen

4.1.3.1 Zelluläre Effekte von SPARC

SPARC, auch bekannt unter Osteonektin (ON) oder *basement-membrane protein 40* (BM-40), ist ein matrizelluläres Glykoprotein, das die Interaktion zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix moduliert (Thomas et al. 2000). Es erfüllt eine wichtige Funktion in der Regulation der extrazellulären Matrix durch Beeinflussung der Kollagenaggregation, -prozessierung und deren Bindung an Signalrezeptoren (Bradshaw 2009). Im sekretorischen Weg fördert es die korrekte Zusammenlagerung der Kollagenfibrillen und ist an der Prozessierung von Kollagenen beteiligt, wobei sowohl posttranslationale Modifizierungen wie Glykosylierung und Spaltung durch MMPs als auch die Anwesenheit von Calcium die Bindefähigkeit von SPARC an Kollagene beeinflussen (Bradshaw 2009; Kaufmann et al. 2004; Sasaki et al. 1997; Sage et al. 1989). Außerdem verringert SPARC u. a. durch die Störung der Interaktion von Kollagenen mit Oberflächenrezeptoren und über tyrosinkinaseabhängige Signalwege die Zelladhäsion und führt zu einer Abrundung der Zelloberfläche (Sage et al. 1989; Bradshaw 2009; Motamed und Sage 1998). Passend dazu wurde SPARC auch mit der Induktion von EMT in Verbindung gebracht (Feng und Tang 2014). In mehreren Studien konnte eine enge Verknüpfung im Sinne eines positiven *Feedback*-Mechanismus zwischen SPARC und dem TGF- β -Signalweg gezeigt werden. TGF- β gilt als Schlüsselprotein in der EMT und soll sowohl invasions- als auch migrationsfördernd wirken. Darüber hinaus soll SPARC eine wichtige Rolle in der Vermeidung der körpereigenen Immunantwort auf die Tumorzellen spielen und die Angiogenese beeinflussen. Während SPARC durch die Hemmung von VEGF und PDGF antiangiogenetische Wirkung entfaltet (Kupprion et al. 1998), werden nach Spaltung durch MMPs auch proangiogenetische Peptide frei (Podhajcer et al. 2008; Sage et al. 2003). Nicht zuletzt kann SPARC durch *Re-Uptake* wieder in die Zellen gelangen und dort Signalfunktionen erfüllen (Gooden et al. 1999; Sodek et al. 2002). Dies deutet darauf hin, dass es je nach zellulärem und physiologischem Kontext unterschiedliche Funktionen erfüllt.

4.1.3.2 Die Rolle der SPARC-Expression im Prostatakarzinom

SPARC ist in Prostatakarzinomprimärtumoren nicht bis kaum exprimiert, wohingegen in Lymphknotenmetastasen und in soliden Metastasen, insbesondere in Knochenmetastasen, eine vermehrte Expression nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise wird es von fast allen Prostatakarzinomzelllinien exprimiert, darunter auch von PC-3-Zellen, wobei sich die höchste Expressionsrate in einer invasiven Sub-Linie der PC-3-Zelllinie (B-PC-3) zeigte (Thomas et al. 2000).

SPARC ist hinsichtlich seiner Rolle in der Tumorprogression des Prostatakarzinoms ausgiebig untersucht worden. Im Sinne der Interaktionen von Tumorzellen mit dem umgebenden Tumorstroma wurden dabei nicht nur die Effekte von tumorendogener SPARC-Expression, sondern auch die Auswirkungen von ECM-SPARC auf die Tumorprogression untersucht.

Extrazelluläres SPARC, ein wichtiger Bestandteil der Knochenmatrix, fördert die Migration von Prostatakarzinomzellen, wobei es diese Wirkung interessanterweise nicht auf Melanomzellen entfaltet, die im Gegensatz zu Prostatakarzinomzellen typischerweise keine Knochenmetastasen ausbilden (De et al. 2003; Said et al. 2009). Zusätzlich konnte die Invasivität von DU145- und PC-3-Zellen durch Knochenextrakte im Vergleich zu anderen Gewebeextrakten wie Gehirn deutlich stimuliert werden, ohne einen Einfluss auf die Proliferation *in vitro* oder das Tumorwachstum *in vivo* zu zeigen (Jacob et al. 1999). Diese Ergebnisse legen nahe, dass SPARC als chemischer Lockstoff das *Homing* von zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) in den Knochen ermöglicht. Darüber hinaus ist SPARC als häufigstes nichtkollagenöses extrazelluläres Protein im Knochen entscheidend an der Osteoblastendifferenzierung und der Bildung von mineralisierter Knochenmatrix beteiligt (Delany und Hankenson 2009). Da Knochenmetastasen des Prostatakarzinoms im Gegensatz zu denen anderer Karzinomarten v. a. osteoblastischer Natur sind, könnte SPARC einen wichtigen Faktor in der Ausbildung dieser letalen Metastasen darstellen (Delany und Hankenson 2009). Gleichzeitig scheint die Knochenmatrix in Anwesenheit von SPARC die Invasion und Proliferation von Prostatakarzinomzellen zu verhindern, sodass für das Ausbilden solider Metastasen noch weitere Faktoren eine Rolle spielen müssen (Kapinas et al. 2012; McCabe et al. 2011).

Die Effekte von endogener SPARC-Sekretion durch Karzinomzellen sind in der Literatur nicht eindeutig geklärt. Die Hypermethylierung des *SPARC*-Promotors in Primärtumoren konnte mit einer schlechteren Prognose und einem kürzeren progressionsfreien Überleben korreliert werden (Sharma et al. 2016; Liu et al. 2018), was auch mit *in vitro* Daten zur verminderten Proliferation und Invasion von Prostatakarzinomzellen nach transientser SPARC-Expression oder Behandlung mit exogenem SPARC vereinbar ist (Said et al. 2009; Shin et al. 2013). Im Gegensatz dazu konnte eine weitere Studie zeigen, dass eine hohe SPARC-Expression in Primärtumoren mit höheren *Gleason-Scores*, geringerer Differenzierung und einer häufigeren metachronen Metastasierung einhergeht (Derosa et al. 2012). Zusätzlich erhöhte rekombinantes SPARC sowie SPARC aus dem konditionierten Medium

einer hochinvasiven PC-3-Sublinie die Invasivität von PC-3-Zellen *in vivo* und *in vitro* (Chen et al. 2007; Mateo et al. 2014) und steigerte die MMP-Aktivität (Jacob et al. 1999), was zu dieser erhöhten Invasivität beitragen könnte.

4.1.3.3 Tumorigene Effekte der SPARC-Überexpression durch KLK4

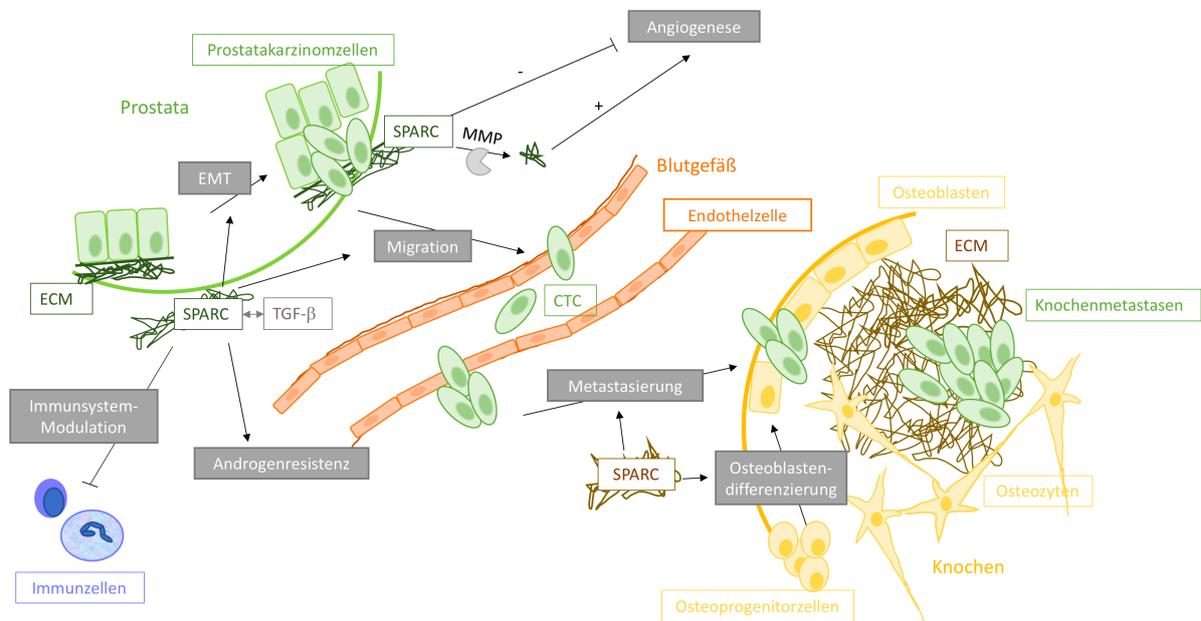


Abbildung 4-1: Mögliche Einflüsse von SPARC auf die Tumorprogression des Prostatakarzinoms

SPARC ist ein wichtiger Bestandteil der Extrazellulärmatrix (ECM). In Prostatakarzinomzellen soll es durch einen positiven Feedbackmechanismus mit dem TGF- β -Signalweg die EMT und damit die Migration der Zellen stimulieren und zur Androgenresistenz beitragen. SPARC selbst scheint eher antiangiogenetische Eigenschaften zu besitzen, wohingegen durch Matrixmetalloproteinasen (MMPs) erzeugte Spaltprodukte die Angiogenese fördern könnten. Darüber hinaus scheint SPARC die körpereigene Immunreaktion gegen Karzinomzellen verringern. Nicht zuletzt stellt SPARC als der Bestandteil der Knochenmatrix einen wichtigen chemischen Lockstoff für zirkulierende Tumorzellen (CTCs) dar und unterstützt die Differenzierung der Osteoblasten. So könnte SPARC einen wichtigen Beitrag zur Ausbildung der für das Prostatakarzinom typischen osteoblastischen Knochenmetastasen leisten.

Die Interaktionen und Implikation von SPARC in der Tumorprogression des Prostatakarzinoms sind demnach vielfältig. Endogenes SPARC scheint im Prostatakarzinom in Abhängigkeit vom physiologischen Kontext und Tumorstadium die Invasivität und Tumorprogression zu fördern oder zu hemmen, wobei weitere Studien nötig sind, um das dafür nötige komplexe Zusammenspiel aus zellulären und extrazellulären Effekten zu eruieren. Als extrazelluläres Protein bietet es eine große Angriffsfläche für proteolytische Spaltung und unterschiedliche Spaltprodukte könnten unterschiedliche pro- oder antitumorigene Wirkungen entfalten. Darüber hinaus ist SPARC bekannt als Modulator der EMT, welche auch durch KLK4 ausgelöst werden kann (Veveris-Lowe et al. 2005) und einen wichtigen Prozess in der Metastasierung darstellt. Die Beteiligung von SPARC an der Regulation von MMPs (Shankavaram et al. 1997), den wahrscheinlichsten physiologischen Aktivatoren von KLK4, legt weitere Interaktionen zwischen den beiden Proteinen nahe. Darüber hinaus werden sowohl SPARC als auch KLK4 in Zusammenhang mit der TGF- β -Signalkaskade

gebracht (Podhajcer et al. 2008; Yang et al. 2014; Kobayashi-Kinoshita et al. 2016; Cho et al. 2013). Nicht zuletzt scheint extrazelluläres SPARC das *Homing* von zirkulierenden Tumorzellen in den Knochen zu fördern und damit bedeutend an der Ausbildung letaler Metastasen beteiligt zu sein. So scheint die Regulation von SPARC ein möglicher Mechanismus zu sein, über welchen KLK4 die Tumorprogression des Prostatakarzinoms, insbesondere die Metastasierung und Androgenresistenz vermittelt.

4.2.4 Die Herabregulation des Tumorsuppressors TFPI2 stimuliert die Invasion, Migration und Androgenresistenz

TFPI2 (*tissue factor pathway inhibitor 2*) ist ein Kunitz-Typ-Serinproteaseinhibitor (Sprecher et al. 1993), welcher neben seiner Rolle in der Hämostase durch die Inhibition des *tissue-factor/factor-VIIa*-Komplexes eine Reihe von Serinproteasen inhibiert, darunter Plasmin, Plasmakallikrein, Trypsin und Chymotrypsin (Sierko et al. 2007). Eine Hemmung von KLK4 wird in der Literatur nicht beschrieben, wäre allerdings aufgrund ihrer trypsinähnlichen Proteaseaktivität durchaus denkbar. TFPI2 wird von humanen Epithelzellen synthetisiert und in die ECM sezerniert, deren Integrität er vermutlich durch die Proteaseinhibition erhält (Iino et al. 1998). TFPI2 wurde bereits in einer Vielzahl von Karzinomen, darunter hepatozelluläre und ösophageale Karzinome sowie Melanome, als Tumorsuppressor beschrieben, wobei das Gen häufig durch eine Hypermethylierung der Promotorregion herabreguliert ist (Xu et al. 2011; Jia et al. 2012; Nobeyama et al. 2007). Es induziert die Apoptose und hemmt die Angiogenese, Invasion und Metastasierung (Sierko et al. 2007). Entsprechend zeigten TFPI2 überexprimierende LNCaP-Zellen eine verminderte Matrigel-Invasion und Spheroid-Migration verglichen zu Vektorkontroll- und parental Zellen (Konduri et al. 2001). In LNCaP korreliert TFPI2 invers mit der microRNA miR-616, welche mit Androgenunabhängigkeit assoziiert ist und im Prostatakarzinom im Vergleich zu normalem Gewebe vermehrt exprimiert wird. Eine Reexpression von TFPI2 in miR-616-überexprimierenden Zellen stellt einen androgensensiblen Phänotyp wieder her (Ma et al. 2011), sodass angenommen werden kann, dass TFPI2 einer Kastrationsresistenz entgegenwirkt. Trotzdem konnte für TFPI2 weder eine differentielle Expression im Prostatakarzinomgewebe verglichen zu normalem Prostatagewebe nachgewiesen werden, noch konnte die TFPI2-Expression mit Tumorstadium, *Gleason*-Grad, Metastasierung oder Rekurrenz korreliert werden. Das wurde auf eine sehr starke Variabilität der TFPI2-Expression in den Prostatakarzinomproben zurückgeführt (Ribarska et al. 2010).

Dies lässt vermuten, dass TFPI2 im Prostatakarzinom eine tumorsuppressive Rolle einnimmt, wobei die Ausschaltung dieses Proteaseinhibitors für die Tumorprogression zwar förderlich, aber nicht obligat ist. Über eine Herabregulation von TFPI2 könnte KLK4 die Androgenresistenz, Invasions- und

Migrationsfähigkeit der Prostatakarzinomzellen fördern und gleichzeitig die eigene Inhibition im extrazellulären Gewebe unterbinden.

4.3 Möglichkeiten und Limitationen der KLK4-Konstrukte

4.3.1 Konstitutiv aktive und inaktive KLK4-Konstrukte ermöglichen eine Differenzierung aktivitätsabhängiger *versus* -unabhängiger KLK4-Effekte

Im Vergleich zur Zugabe von rekombinanten Proteinen in das Zellkulturmedium erleichtert eine endogene KLK4-Expression die Rückschlüsse auf die komplexen Abläufe *in vivo*. Denn, während es bei der Verwendung rekombinanter Proteine schwierig ist eine geeignete Proteasekonzentration einzustellen, entspricht die Proteasekonzentration nach stabiler Transfektion annähernd der in physiologischen und pathophysiologischen Zellprozessen. Dies verhindert eine Überschätzung der KLK4-abhängigen Effekte.

In einer Untersuchung von 60 Prostatakarzinomgewebeproben wurde der Mittelwert der KLK4-mRNA-Anzahl mit 0,322 Kopien *KLK4*-mRNA pro Kopie des *Housekeeping*-Gens *GAPDH* angegeben (Avgeris et al. 2011). In den hier verwendeten PC-3-Zellen lag die *KLK4*-Expression zwischen 0,3 und 2,3 verglichen zur Expression von *HPRT1*. *HPRT1* gehört zu den moderat exprimierten Genen, *GAPDH* und β -*Actin* werden in Tumorgewebe deutlich höher exprimiert (de Kok et al. 2005), sodass die Expression von KLK4 in der vorliegenden Arbeit keinesfalls im unphysiologisch hohen Bereich liegt. Dass die unterschiedlichen PC-3-Zellen trotz gleicher Transfektionsbedingungen eine unterschiedlich starke KLK4-Expression zeigen, ist ein schlecht korrigierbarer, limitierender Faktor. Allerdings ist es aufgrund folgender Hypothese von Vorteil, dass die höchste KLK4-Expression in den Zellen mit der inaktiven KLK4-Variante, S195A, besteht: Findet man einen Effekt der KLK4-Expression in KLK4-WT-/KVRRAR-, aber nicht oder deutlich weniger in S195A-Zellen, so ist dieser Effekt sehr wahrscheinlich aktivitätsabhängig. Denn ansonsten müsste er in den S195A-Zellen viel ausgeprägter vorhanden sein, da diese Zellen insgesamt mehr KLK4 enthalten. Wäre aber der KLK4-Gehalt in den KLK4-WT-/KVRRAR-Zellen höher als in den S195A-Zellen könnte ein Effekt, der nur oder deutlich stärker in den KLK4-WT-/KVRRAR-Zellen vorhanden ist, sowohl als Folge der Aktivität als auch als Folge des höheren KLK4-Gehalts interpretiert werden.

Ein zusätzlicher Vorteil der stabilen Transfektion gegenüber der Behandlung mit rekombinanter KLK4 ist, dass sowohl die Sekretion als auch die Aktivierung der Protease möglichst in einem physiologischen Ausmaß geschehen. Da die natürlichen Aktivatoren von KLK4 in der Prostata bisher nicht bekannt sind und KLK4 (und damit ggf. auch deren Aktivatoren) in PC-3-Zellen endogen nicht exprimiert wird (vgl. Kapitel 3.2), kann nicht vorausgesetzt werden, dass KLK4 aktiv aus PC-3-Zellen sezerniert wird. Bedauernswerterweise konnte in Vorversuchen unserer eigenen Gruppe mit KLK4-

transfizierten PC-3-Zellen die Aktivität der Protease in Zellkulturüberständen nie nachgewiesen werden (Alterauge 2014). Ebenso konnten andere Forschergruppen die Aktivität von stabil in PC-3 exprimierter KLK4 nicht nachweisen. Grund dafür könnte neben den geringen physiologischen KLK4-Mengen (s. o.) eine relative Instabilität der aktiven KLK4-Monomere sein, die sich im Gegensatz zu inaktiven KLK4-Oligomeren und zu intrazellulärem KLK4 bei Raumtemperatur recht schnell degradieren (Debela et al. 2006; Klock et al. 2007). Allerdings gibt es Indizien für die KLK4-Aktivität im konditionierten Medium von prä-pro-KLK4-exprimierenden PC-3-Zellen. So wurde beispielsweise in Zellkulturüberständen von KLK4-Zellen im Vergleich zu Kontrollbedingungen degradierte Proteine nachgewiesen, die wahrscheinliche Substrate von KLK4 darstellen (Fuhrman-Luck et al. 2016). Außerdem konnten KLK4-abhängige Effekte in PC-3-Zellen durch den Proteaseinhibitor Aprotinin antagonisiert werden (Gao et al. 2007). Nach Abschluss der experimentellen Arbeiten zu dieser Arbeit gelang es schließlich australischen Kollegen die Aktivität von KLK4 in PC-3-Zellen, die sowohl KLK4 als auch PSMA (*prostate-specific membrane antigen*) exprimieren, mittels eines fluorogenen Substrats nachzuweisen (Tse et al. 2020).

Aufgrund der schwierigen Nachweisbarkeit der KLK4-Aktivität in Zellkulturüberständen erschien uns die Entwicklung aktiver und inaktiver Varianten der Protease für *in-vitro*- und *in-vivo*-Modelle als gute Möglichkeit, um die Effekte der Proteasen bzgl. ihrer proteolytischen Aktivität besser einordnen zu können. Die genauen Hintergründe und Überlegungen zur Entwicklung der KLK4-Varianten wurden bereits in Kapitel 3.2 erläutert. Auf sie soll daher hier nicht mehr weiter eingegangen werden.

KVRRAR-KLK4 wurde analog zu einer KLK3-Variante entwickelt, deren Aktivität nach Überexpression in Prostatakarzinom-DU145-Zellen nachgewiesen wurde (Williams et al. 2011). Da Furin eine ubiquitär vorhandene Protease ist (Nakayama 1997) und die Struktur von KLK3 der von KLK4 sehr ähnlich ist (Clements et al. 2001), legt dies eine konstitutive Aktivierung von pro-KLK4 während des Exports und damit eine aktive Sekretion von KVRRAR-KLK4 nahe. Da aber auch in den Überständen der KVRRAR-Zellen die Aktivität nicht messbar war (Daten nicht gezeigt) und diese KLK4-Variante in der Literatur bisher nicht beschrieben wurde, bleibt dies eine noch zu beweisende Annahme. Als inaktive Kontrollkondition wurde das Serin des aktiven Zentrums der KLK4 zu einem Alanin mutiert. Dies führt zu einer ca. 99-prozentigen Auslöschung der Enzymaktivität (Silva et al. 2017). Betrachtet man die geringe KLK4-Expression in der verwendeten Zelllinie ist dort nur ein geringster Anteil der sezernierten KLK4 aktiv. Allerdings muss limitierend hinzugesagt werden, dass aufgrund der Zusammenarbeit im proteolytischen Netzwerk der Effekt von geringen Proteaseaktivitätsänderungen um ein Vielfaches potenziert werden kann und auch minimale Mengen aktiver

Proteasen die Tumorprogression enorm beeinflussen können (Obiezu et al. 2001; Loessner et al. 2018).

Deshalb stellt die Untersuchung der Auswirkungen unterschiedlicher KLK4-Zellen zwar eine gute Annäherung dar, um proteolytische Effekte zu identifizieren. Es sind aber noch weitere Untersuchungen nötig, um die (Un-)Abhängigkeit von der proteolytischen Aktivität nachzuweisen.

4.3.2 Die Verwendung eines spezifischen KLK4-Inhibitors unterstützt die durch die KLK4-Konstrukte erworbenen Daten

Eine mögliche Strategie, aktivitätsabhängige von aktivitätsunabhängigen Auswirkungen zu unterscheiden, ist die Verwendung eines spezifischen KLK4-Inhibitors. Dabei wurden folgende Hypothesen aufgestellt: (a) Zeigt KLK4-WT und die KVRRAR-Variante einen Effekt auf die PC-3-Zellen, der nicht durch die S195A-Variante ausgelöst wird, und wird dieser Effekt durch den Inhibitor (zumindest teilweise) aufgehoben, dann ist dieser Effekt (teilweise) aktivitätsabhängig; (b) gibt es einen KLK4-abhängigen Effekt in allen KLK4-Varianten und wird dieser durch den Inhibitor antagonisiert, dann ist dieser ebenfalls aktivitätsabhängig und die Restaktivität von S195A reicht für die Erzielung des Effekts aus; (c) gibt es einen KLK4-abhängigen Effekt in allen KLK4-Varianten und kann dieser nicht durch den Inhibitor antagonisiert werden, dann ist der Effekt proteolyseunabhängig.

Voraussetzungen für die Hypothese sind, dass der Inhibitor (a) in der notwendigen Konzentration für die PC-3-Zellen nicht zytotoxisch ist, (b) über die Dauer der Versuchsreihe stabil und aktiv bleibt und (c) spezifisch die zu untersuchende Protease KLK4 inhibiert. In Vorversuchen mittels eines *AlamarBlue-Assays* konnte bestätigt werden, dass der Inhibitor in Konzentrationen von 0, 50, 250 und 1000 nM über eine Versuchsdauer von 96 h keine zytotoxischen Effekte auf PC-3-Vektorkontrollzellen hat (Schulze und Magdolen, persönliche Mitteilung). Ebenso wurde in Vorversuchen die inhibitorische Kapazität in P4-8F-Medium, als reziproke Konstante der KLK4-Aktivität, über einen Zeitraum von 48 h gemessen. Dabei zeigte sich am Ende des Messzeitraums ein Abfall des inhibitorischen Potentials um 50 % (Schulze und Magdolen, persönliche Mitteilung). Aus diesem Grund wurde bei den hier gezeigten Versuchen nach 48 h so viel Inhibitor nachgegeben, dass sich die Konzentration insgesamt um 50 % erhöhte. Die Spezifität und die inhibitorische Konzentration im nanomolaren Bereich wurden durch unsere Kooperationspartner und Hersteller des Inhibitors bereits publiziert (van Soom et al. 2015).

Wie bereits im Kapitel 3.4.2 ausgeführt, hatte die Hemmung der KLK4-Aktivität im Medium der Zellen keinen Einfluss auf die Regulation der *COL1A2*- oder *SPARC*-Expression. So wurde in KLK4- und S195A-Zellen unabhängig davon, ob die Zellen mit dem KLK4-Inhibitor behandelt wurden oder nicht, *COL1A2* herabreguliert und *SPARC* auf mRNA- und Proteinebene vermehrt exprimiert. Dies

unterstützt die Hypothese einer proteolyseunabhängigen differentiellen Expression der beiden Gene durch KLK4.

4.4 Die Expression von KLK4 in PC-3-Zellen hat keinen Einfluss auf ihre Proliferationsrate

Über die Veränderung des Proliferationsverhaltens von KLK4-exprimierenden Prostatakarzinomzellen wird in der Literatur widersprüchlich diskutiert. LNCaP-Zellen verlangsamten ihr Wachstum *in vitro* und *in vivo*, wenn die KLK4-Expression unterdrückt wurde (Jin et al. 2013; Klock et al. 2007). Sie exprimieren drei verschiedene KLK4-Isoformen durch alternatives *Splicing*, welche alle von dem *Knockdown* betroffen sind: (a) die sezernierte prä-pro-KLK4 (b) die nukleäre Isoform (Dong et al. 2005) und (c) ein KLK4-KLKP1 Fusionsprotein (Chakravarthi et al. 2019).

Dem gegenüber stehen Überexpressionsstudien, in welchen jeweils eine der Isoformen in endogen KLK4-freien Zellen exprimiert wird. Dabei führte die nukleäre Form in DU145- und PC-3-Zellen zu einer Proliferationsstimulation *in vitro* (Klock et al. 2007), die sezernierte Form *in vitro* und *in vivo* zu einer Proliferationsinhibition (Veveris-Lowe et al. 2005; Tse et al. 2020).

Als drittes Versuchsmodell, neben dem *Knockdown* endogener KLK4 und der Überexpression von KLK4-cDNA, gilt die Behandlung von Tumorzellen mit aktiver, rekombinanter KLK4, die am ehesten der sezernierten prä-pro-KLK4-Variante entspricht. rKLK4 in einer Konzentration von 50 nmol/l stimulierte die Proliferation von DU145-Zellen (Mize et al. 2008). Allerdings ist hierbei limitierend zu erwähnen, dass häufig mit überphysiologischen Konzentrationen gearbeitet wird.

Zu den verschiedenen Versuchsmodellen kommt die erschwerte Vergleichbarkeit der Experimente aufgrund der unterschiedlichen Methoden zur Messung der Proliferation. Denn metabolische Assays wie MTT und *AlamarBlue* (Veveris-Lowe et al. 2005; Tse et al. 2020) stellen zwar einfache und günstige, aber dennoch indirekte Messungen dar, da nicht die Zellzahl, sondern die metabolische Aktivität gemessen wird. DNA-Quantifizierungen (Mize et al. 2008) sind genauer, aber weniger weit verbreitet. Schließlich sind direkte Messungen der Zellzahl über Neubauer Zählkammern (Jin et al. 2013) sehr untersucherabhängig (Quent et al. 2010).

Insgesamt zeichnet sich allerdings ab, dass die Auswirkung von KLK4 auf die Proliferation von Prostatakarzinomzellen von zwei Dingen abhängig ist – (a) der exprimierten Isoform und (b) der verwendeten Zelllinie bzw. deren Sensibilität auf Androgene.

In den in Kapitel 3.3.1 dargestellten Proliferationsassays, die auch mittels Messung der metabolischen Aktivität erfolgten, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen PC-3-Zellen. Zu beachten ist aber, dass PC-3-Zellen, welche aktive KLK4 exprimieren, im Vergleich zu den Vektorkontrollzellen und der inaktiven Kontrolle eine Tendenz zu einer

geringeren Proliferationsrate aufweisen. Dies ist zumindest im Ansatz passend zur Literatur, in welcher prä-pro-KLK4 als antiproliferativ beschrieben wird.

Vor dem Hintergrund, dass KLK4 EMT induziert und die Motilität und Invasion der Zellen fördert (Veveris-Lowe et al. 2005; Gao et al. 2010), ist ein Stagnieren der Proliferation nicht verwunderlich. Denn für Tumorstammzellen wurde beschrieben, dass diese entweder vorwiegend proinvasive oder proliferative Eigenschaften haben (Biddle et al. 2011). Mögliche Faktoren, über welche KLK4 die Proliferation und die Migration beeinflussen könnte, wurden bereits in Kapitel 1.4.2.1 dargestellt und werden hier nicht mehr besprochen.

Für die weiteren Versuche von Interesse ist auch die Tatsache, dass die Proliferation/Viabilität der Zellen in serumfreiem P4-8F-Medium im Vergleich zu serumhaltigem Medium (a) nicht eingeschränkt war und (b) die Versuchsergebnisse in serumfreien und -haltigem Medium nahezu identisch waren. Denn letzteres ist ein Hinweis auf die Eignung des P4-8F-Mediums für die Kultivierung der Zellen in weiteren Experimenten.

Insgesamt lässt sich also sagen, dass KLK4 in androgenabhängigen LNCaP-Zellen proliferative Eigenschaften hat, wohingegen es in androgenunabhängigen PC-3-Zellen antiproliferativ wirkt, wobei die proliferativen Eigenschaften eher auf eine nukleäre Isoform oder das KLK4-KLKP1 Fusionsprotein und die antiproliferativen auf die sezernierte Isoform zurückzuführen sind. Durch die Hemmung der Proliferation könnte KLK4 die EMT und damit die Verwandlung in einen invasiven Zelltyp vorantreiben und die Metastasierung fördern. Allerdings wurde kürzlich eine verminderte Metastasierung in PC-3-PSMA-Zellen nach stabiler Transfektion mit KLK4 nachgewiesen (Tse et al. 2020), sodass dringend weitere Studien nötig sind, um die Auswirkung von KLK4 auf die Zellproliferation und -migration von Prostatakarzinomzellen zu verstehen.

4.5 KLK4 vermindert die Adhäsion von PC-3-Zellen auf Kollagenen

Prostatakarzinomzellen metastasieren vorwiegend in Knochen, deren Extrazellulärmatrix hauptsächlich aus Kollagen I besteht. Vom Knochen abgeleitete PC-3-Zellen binden stärker an Kollagen I als es LNCaP-Zellen tun, welche von Weichteilmetastasen abgeleitet wurden. Dies lässt vermuten, dass die Fähigkeit an Kollagen I zu binden, einen entscheidenden Metastasierungsmechanismus darstellt (Docheva et al. 2010; Hall et al. 2008).

Bisher wurde, wie in Kapitel 1.4.2.2 bereits erläutert, die Expression von prä-pro-KLK4 in PC-3-Zellen mit einer erhöhten Adhärenz der Zellen auf Kollagen I und IV assoziiert (Gao et al. 2007). In den vorliegenden Untersuchungen hingegen adhärten prä-pro-KLK4 exprimierende PC-3-Zellen weniger stark an unbeschichteten, mit Kollagen I und mit Kollagen IV beschichteten Oberflächen. Die Adhäsion von KRRAR- und S195A-KLK4 exprimierenden Zellen war unbeeinträchtigt (s. Kapitel 3.3.2). Dass die Adhäsionsfähigkeit sich in KLK4-Zellen vermindert, während sie in S195A-Zellen

gleichbleibt, spricht für eine aktivitätsabhängige Regulation der Adhäsion. Dass KVRRAR-KLK4 nicht zu einer Verringerung der Adhäsion führt, kann durch folgende Möglichkeiten erklärt werden: (a) KVRRAR wird nicht aktiv sezerniert oder (b) die geringere KLK4-Expression in der KVRRAR-KLK4-Zelllinie verglichen zur KLK4-Expression in der KLK4-WT-Zelllinie reicht nicht aus, um den Effekt zu erzielen. Dass KLK4 die Kollagene I und IV proteolytisch spalten kann (Obiezu et al. 2006), stellt eine mögliche Erklärung für die verringerte Adhäsion an ebendiese Proteine dar, wobei die verminderte Adhäsion an unbeschichteten Oberflächen nicht durch eine proteolytische Spaltung erklärt werden kann. Es wäre denkbar, dass KLK4 durch die verminderte Adhärenz die Motilität der Zellen erhöhen und damit die Tumorprogression steigern könnte. Dementgegen steht allerdings oben genannte Hypothese, dass eine vermehrte Adhäsion an ebendiese ECM-Strukturen die Metastasierung in den Knochen fördern kann, wodurch der hier gesehene Effekt einer KLK4-Expression in PC-3-Zellen als tumorprotektiv gewertet werden muss. Letztere Ansicht erscheint auch deshalb plausibel, weil eine prä-pro-KLK4-Expression in PC-3-PSMA-Zellen *in vivo* zu einer verminderten Knochenmetastasierung in Mäusen führte, wobei in der Studie nicht geklärt wurde, ob bzw. inwieweit diese Tatsache von der Adhäsionsfähigkeit der Zellen auf Kollagen I und IV abhängt (Tse et al. 2020). Insgesamt sind aufgrund der widersprüchlichen Datenlage zwingend weitere Untersuchungen nötig, um eine diesbezügliche Aussage treffen zu können.

4.6 Mögliche Regulationsmechanismen von COL1A2 durch KLK4

4.6.1 KLK4 reguliert die mRNA-Expression von COL1A2 aktivitätsunabhängig

Die in Kapitel 3.4.1 und 3.4.2 dargestellten Experimente zeigen, dass die Expression von *COL1A2* in PC-3-Zellen durch alle drei untersuchten KLK4-Varianten signifikant herabreguliert wurde, wobei sowohl unter serumfreien als auch unter serumhaltigen Bedingungen die stärkste Regulation durch die inaktive S195A-Variante und die geringste Regulation durch die konstitutiv aktive KVRRAR-Variante erzielt wurde, was für die Theorie einer aktivitätsunabhängigen Regulation spricht. Diese These wird durch die Tatsache unterstützt, dass auch die Behandlung der Zellen mit einem spezifischen KLK4-Inhibitor die Regulation von *COL1A2* nicht antagonisieren konnte. Die limitierenden Faktoren dieser Annahmen wurden bereits in Kapitel 4.3 diskutiert.

Die Regulation von Kollagen I wird maßgeblich durch die Aktivität von drei Signalwegen beeinflusst. TGF- β -Signale stellen die wichtigsten Aktivatoren, TNF α -Signale und IFN γ -Signale die wichtigsten Repressoren der Kollagenexpression dar. Beide inhibitorischen Signalkaskaden wirken dabei nicht nur der TGF- β -Aktivierung entgegen, sondern vermindern auch die konstitutive *COL1A2*-Promotoraktivität (Bou-Gharios et al. 2020).

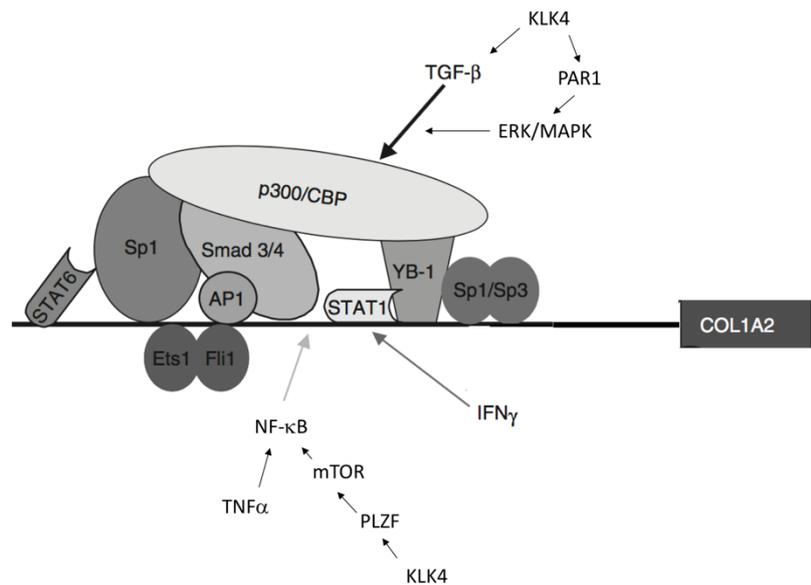


Abbildung 4-2: Schematische Darstellung der transkriptionellen (In-)Aktivierung von COL1A2

Für genauere Erläuterungen wird auf den Schrifttext verwiesen. Abkürzungen: AP1: *activator protein 1*; CBP: *CREB-binding protein*; CREB: *cAMP response element binding protein*; ERK: *extracellular-signal related kinase*; Ets1: *E twenty-six 1*; Fli1: *friend leukemia integration 1*; IFN γ : Interferon gamma; KLK4: Kallikrein-ähnliche Peptidase 4; MAPK: *mitogen-activated protein kinase*; mTOR: *mammalian target of rapamycin*; NF- κ B: *nuclear factor kappa B*; PAR1: Protease-aktivierter Rezeptor 1; PLZF: *promyelocytic leukemia zinc finger protein*; Sp1: *specificity protein 1*; STAT: *signal transducer and activator of transcription*; TGF- β : *transforming growth factor beta*; TNF α : *Tumornekrosefaktor alpha*; YB-1: *Y-box binding factor*.

Quelle: Modifiziert nach Bou-Gharios et al. (2020).

TGF- β aktiviert die Kollagensynthese vornehmlich über einen Komplex aus den Transkriptionsfaktoren Smad3/4 und Sp1 (Zhang et al. 2000). Zusätzlich kommt es in einigen Zelltypen zu einer ERK-abhängigen Aktivierung von Smad2/3 und damit zu einem additiven Effekt des ERK-MAPK-Signalwegs auf die TGF- β -induzierte Kollagensynthese (Hayashida et al. 2003). Neben Smad2/3 ist auch der Transkriptionsfaktor Ets1 ein Effektor der MAPK-Kaskade (Trojanowska 2000). Auch dieser soll auf den COL1A2-Promotor eine stimulierende Wirkung haben (Czuwara-Ladykowska et al. 2001). Allerdings soll sich dieser Effekt bei gleichzeitiger TGF- β -Stimulation sogar in eine inhibitorische Wirkung auf COL1A2 umkehren (Okano et al. 2012), sodass die Rolle von Ets1 noch nicht eindeutig geklärt ist.

Betrachtet man nun mögliche Interaktionen von KLK4 mit den oben genannten Signalwegen, fällt auf, dass KLK4 nicht nur den TGF- β -Aktivator KLK2 (Fuhrman-Luck et al. 2014), sondern durch die Spaltung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors PAR1 auch den ERK-Signalweg aktiviert. Da sowohl die Aktivierung von PAR1 als auch die von KLK2 auf einer proteolytischen Spaltung beruht, würde man bei einer aktivitätsabhängigen Regulation eine erhöhte Expression von COL1A2 erwarten. Die Herabregulation der COL1A2-Expression in PC-3-Zellen lässt also vermuten, dass hier andere Mechanismen eine maßgebliche Rolle spielen.

Als einer der wichtigsten Gegenspieler von TGF- β in der Kollagenproduktion gilt TNF α , welcher über die Aktivierung von NF- κ B die COL1A2-Expression inhibiert (Bou-Gharios et al. 2020). Neben TNF α

stimuliert aber auch mTOR die NF- κ B-Aktivität (Dan et al. 2008). Dieser Signalweg wird wiederum von KLK4 aktiviert. Denn KLK4 destabilisiert den Transkriptionsfaktor PLZF, wodurch die Bildung eines mTOR-Inhibitors gehemmt wird (Jin et al. 2013). So könnte KLK4 über die Aktivierung der mTOR-NF- κ B-Kaskade die Expression von *COL1A2* verringern.

Neben der Interaktion mit PLZF, dessen Destabilisierung durch KLK4 nachgewiesen wurde, gäbe es noch viele weitere mögliche Wechselwirkungen zwischen KLK4 und anderen die *COL1A2*-Expression beeinflussenden Transkriptionsfaktoren. KLK4 könnte sich dabei nicht nur auf die Stabilität von Proteinen, sondern auch auf ihre Bindungsfähigkeit an Promotorelemente oder auf ihre Translokationsfähigkeit in den Nukleus auswirken. Mögliche Kandidaten wären beispielsweise die ETS-Transkriptionsfaktoren Fli1 und Sp1, welche als wichtige Faktoren der *COL1A2*-Regulation identifiziert wurden, wobei Sp1 alleine zwar das Basallevel von *COL1A2* erhöht, in Kombination mit Fli1 allerdings als Korepressor der *COL1A2*-Expression fungiert (Czuwara-Ladykowska et al. 2001).

Die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren setzt allerdings eine intrazelluläre Variante von KLK4 voraus. Da das hier verwendete KLK4-Konstrukt keine Introns besitzt, ist ein alternatives Splicing von KLK4 zu einer primär intrazellulären KLK4-Variante eher unwahrscheinlich (Irimia und Roy 2014). Dementsprechend müsste KLK4 entweder über ein Leck im sekretorischen Pfad der Zelle oder über eine sekundäre Internalisierung aus dem Extrazellulärraum in das Zytoplasma gelangen, um die beschriebenen intrazellulären Effekte zu veranlassen. Beide Mechanismen wurden bereits für die Serinprotease Granzym B in natürlichen Killerzellen beschrieben (Ida et al. 2003; Wang et al. 2013) und sind deshalb durchaus denkbar. Xi et al. (2004) zeigt beispielsweise, dass KLK4 nicht nur hauptsächlich im Zellkern vorhanden ist, sondern einem > 40 kDa Protein entspricht, also in den Glykosylierungsprozess eingetreten sein müsste, welcher hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat stattfindet. Limitierend muss hinzugesagt werden, dass in dieser Arbeit keine Sekretion von KLK4 nachgewiesen wurde, was den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe widerspricht (Alterauge 2014).

4.6.2 Aktivitätsabhängige Mechanismen führen zu einer Diskrepanz der mRNA- und Proteinexpression

Auffällig ist, dass trotz deutlicher Herabregulation der *COL1A2*-mRNA-Expression die Proteinkonzentration lediglich um ca. 50 % herabreguliert ist (vgl. Kapitel 3.4.1). Die Limitationen des Western Blots zu *COL1A2* wurden bereits in ebendiesem Kapitel beschrieben und werden deshalb hier nicht erneut diskutiert. Derartige Unterschiede in der mRNA- verglichen zur Proteinexpression sind nicht ungewöhnlich (Gry et al. 2009) und können durch posttranskriptionelle Regulationen, die meist mit einer (De-)Stabilisierung der mRNA einhergehen, verursacht sein (Bou-Gharios et al. 2020). Eine mögliche Ursache für die unterschiedlich starke Regulation der *COL1A2*-Expression auf mRNA-

und Proteinebene besteht in der Spaltung von IGFBPs durch KLK4 (vgl. Kapitel 1.4.2.1). Die Freisetzung von IGF1 könnte zu einer vermehrten Expression von LARP6 (LA-related Protein 6) führen, welches die Stabilität der *COL1A1*- und *COL1A2*-mRNA und damit die Proteinproduktion erhöht (Guo et al. 2017; Blackstock et al. 2014). Darüber hinaus könnte eine mögliche KLK4-abhängige ERK-Aktivierung zu einer Induktion von IL-6 (Wang et al. 2010) führen, welches über die Aktivierung von STAT3 zu einer posttranskriptionellen Hochregulation von *COL1A2* führt (Papaioannou et al. 2018). So könnte KLK4 aktivitätsunabhängig die Synthese von *COL1A2*-mRNA reduzieren, während es aktivitätsabhängig die Proteinsynthese von *COL1A2* erhöht.

4.7 Mögliche Regulationsmechanismen von SPARC durch KLK4

Ähnlich wie für *COL1A2* zeigen die in Kapitel 3.4.1 und 3.4.2 dargestellten Experimente eine differentielle Expression von *SPARC* in PC-3-Zellen durch alle drei untersuchten KLK4-Varianten. Da das Ausmaß der Regulation unter serumhaltigen Bedingungen stark variierte, ist die Regulation lediglich in den PC-3-KVRRAR-Zellen signifikant, obwohl sie in den PC-3-KLK4- und PC-3-S195A-Zellen deutlich ausgeprägter ist. Unter serumfreien Bedingungen hingegen wird *SPARC* auch in den PC-3-KLK4- und in den PC-3-S195A-Zellen signifikant hochreguliert. Die im Western Blot bestimmten Proteinlevel von *SPARC* in den konditionierten Überständen der Zellen korrelieren mit den qRT-PCR-Ergebnissen. In allen Versuchen zeigte sich die stärkste Regulation in den Zellen mit der inaktiven S195A-Variante und die geringste Regulation in denen mit der konstitutiv aktiven KVRRAR-Variante, was impliziert, dass die Regulation wie auch die von *COL1A2* weniger von der KLK4-Aktivität als vielmehr vom KLK4-Gesamtgehalt abhängt, welcher in der S195A-Variante deutlich höher war als in den untersuchten KLK4-WT- und den KVRRAR-Zellen (s. Kapitel 3.2.2). Die erhöhte *SPARC*-Expression konnte durch Behandlung der Zellen mit einem spezifischen Inhibitor nicht antagonisiert werden, was die Theorie einer aktivitätsunabhängigen Regulation verstärkt. Die limitierenden Faktoren dieser Annahmen werden in Kapitel 4.3 diskutiert.

Aufgrund der multifunktionalen Rolle von *SPARC* und seiner differentiellen Expression in der Embryogenese wird angenommen, dass die *SPARC*-Expression sehr streng reguliert wird (Torres-Nunez et al. 2015). Sie verändert sich als Reaktion auf eine Vielzahl von Reizen, z. B. Glukokortikoide, Metallionen, oxidativen Stress, Wachstumsfaktoren und Zytokine (Gorski und Hankenson 2020). Allerdings sind die Regulationsfaktoren auf transkriptioneller Ebene in menschlichen Zellen noch unzureichend erforscht (Torres-Nunez et al. 2015).

Wie die Kollagensynthese wird auch die Produktion von *SPARC* durch TGF- β aktiviert (Wrana et al. 1991), wodurch KLK4 aktivitätsabhängig die *SPARC*-Expression erhöhen könnte. Des Weiteren produzieren Prostatakarzinomzellen eine sezernierte, lösliche Form des EGF-Rezeptors p45-sErbB3 (Lin et al. 2008), die in Osteoblasten zu einer vermehrten *SPARC*-Expression führen (Chen et al.

2007). Allerdings kann p45-sErbB3 als Ligand nur die Oberflächenrezeptoren von Osteoblasten und nicht die von PC-3-Zellen stimulieren (Liang et al. 2005; Lin et al. 2008), sodass eine derartige Aktivierung in den hier gezeigten Experimenten nicht in Frage kommt.

In Hühner- und Rattenembryonen wurden AP1- und ETS-Transkriptionsfaktoren als Regulatoren von SPARC identifiziert. V/C-Jun und Fra2 sollen dabei die SPARC-Expression vermindern, wohingegen SP1 und SP3 die Expression induzieren sollen (Chamboredon et al. 2003; Mettouchi et al. 1994; Vial et al. 2000). In Nasopharynxkarzinomzellen wurde der Transkriptionsfaktor SOX5 als Repressor der SPARC-Expression beschrieben (Huang et al. 2008).

V/C-Jun sind Effektoren des MAPK-Signalwegs (Musti et al. 1997), welchen KLK4 wie in Kapitel 4.6.1 beschrieben über die Spaltung von Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR) aktivieren könnte. Wie im Fall von *COL1A2* würde dadurch eine aktivitätsabhängige Regulation von KLK4 eher zu einer gegensätzlichen Regulation von *SPARC* führen, als wir sie in den PC-3-Zellen nachweisen konnten. So erscheinen andere, vermutlich nichtaktivitätsabhängige Mechanismen, wie z. B. die (De-) Stabilisierung der oben genannten Transkriptionsfaktoren, wahrscheinlicher.

Neben der Aktivität von Transkriptionsfaktoren spielt auch die Zugänglichkeit der DNA und damit der Chromatinorganisation für die transkriptionelle Regulation der Genexpression eine wichtige Rolle. Die Chromatinstruktur wird entscheidend durch die Modifikation von DNA und Histonen beeinflusst. DNA-Methyltransferasen und TET-Enzyme methylieren bzw. demethylieren die DNA und de- bzw. aktivieren dadurch die Genexpression (Valencia und Kadoch 2019). Außerdem können auch microRNAs, zusätzlich zu ihrer posttranskriptionellen Funktion in der Repression der Translation oder der Degradation der mRNA, die Genregulation auf transkriptioneller Ebene beeinflussen (Catalanotto et al. 2016).

Da SPARC in Prostatakarzinomzellen durch DNA-Methylierung und microRNAs reguliert wird (Liu et al. 2018; Sharma et al. 2016; Hao et al. 2018), wäre auch das Eingreifen von KLK4 in diese distinkten Genregulationsmechanismen ein denkbarer Grund für eine differentielle Expression von SPARC. Diesbezügliche mögliche nichtkatalytische Funktionen von KLK4 beinhalten intra- und extrazelluläre Protein-Protein-Interaktionen, Aktivierung von Signalkaskaden und DNA-Bindung, wie sie für Matrixmetalloproteinasen bereits nachgewiesen werden konnten (Shay et al. 2015).

4.8 Zusammenfassung der möglichen Genregulationsmechanismen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass KLK4 an der differentiellen Genexpression in PC-3-Zellen beteiligt ist und unter anderem die Expression von EMT-assoziierten Genen stark beeinflusst. Dabei konnte in mehreren unabhängigen Versuchen nachgewiesen werden, dass KLK4 die *COL1A2*-Expression zumindest auf mRNA- und in geringerem Maße auch auf Proteinebene reduziert und die SPARC-Expression auf mRNA- und Proteinebene induziert. Die Mechanismen, über

welche KLK4 die SPARC- und COL1A2-Expression reguliert, sind bisher nicht identifiziert worden. KLK4 scheint die Expression beider Gene weitestgehend aktivitätsunabhängig zu beeinflussen, wobei verschiedene Möglichkeiten der Regulation in Betracht gezogen werden sollten.

Intrazellulär könnte KLK4 Transkriptionsfaktoren (de-)stabilisieren, die entweder direkt zu einer veränderten Expression des Zielgens führen oder indirekt, z. B. über die differentielle Expression von microRNAs, die Zielgenexpression verändern. Darüber hinaus könnte KLK4 sowohl intra- als auch extrazellulär mit weiteren Enzymen wie Kinasen oder DNA-Methyltransferasen interagieren und so z. B. Einfluss auf die Signalkaskadenaktivierung oder auf die DNA-Methylierung nehmen, welche in der differentiellen Expression von Genen eine entscheidende Rolle spielen. Extrazellulär könnte KLK4 als Ligand Oberflächenrezeptoren und damit Signalwege aktivieren oder hemmen. Die oben diskutierten möglichen Mechanismen zeigen die Komplexität der transkriptionellen und auch der posttranskriptionellen Regulation von Genen und verdeutlichen, dass weitere Untersuchungen dringend benötigt werden, um die Regulationsmechanismen und auch die Auswirkungen der von KLK4-induzierten differentiellen Genexpression im Prostatakarzinom genauer zu verstehen und zu therapeutischen Zwecken nutzen zu können.

4.9 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass KLK4 die Genexpression von EMT-assoziierten Genen in Prostatakarzinomzellen reguliert. Die Mechanismen, über welche die Genregulation funktioniert, sind allerdings weiter unverstanden.

Um den hier vorgeschlagenen aktivitätsunabhängigen Regulationsweg zu bekräftigen, wäre es zwingend nötig, die Aktivität der Protease in konditionierten Überständen nachzuweisen.

Lange war dies keiner Arbeitsgruppe gelungen. Nun gelang es der Gruppe um Dr. Tse die Aktivität von KLK4 mittels eines fluorogenen Substrats zu messen (Tse et al. 2020). Eine Aktivitätsmessung mit demselben Substrat und Versuchsprotokoll wäre daher erstrebenswert, um die (In-)Aktivität der murenen und der mutierten KLK4s in den hier verwendeten Zelllinien zu bestätigen. Sollte eine Messung mit dieser Methode nicht gelingen, könnten *activity based probes* verwendet werden. Dabei soll ein dem UAMC1399 in Hemmspezifität und -wirkung sehr ähnlicher Inhibitor UAMC2156, welcher eine Modifikation mit Biotin trägt (Magdolen und Creutzburg, persönliche Mitteilung), mit den konditionierten Überständen inkubiert werden. Befindet sich in den Überständen aktive KLK4, sollte sich ein kovalenter Biotin-Inhibitor-Protease-Komplex ausbilden. Dieser könnte im Anschluss mittels streptavidingekoppelter Agarose präzipitiert werden. Daneben sollten die Inhibitorversuche mit einem anderen Inhibitor bestätigt werden. In Frage käme hierfür der zyklische Peptidinhibitor SFTI-FCQR (Swedberg et al. 2009).

Darüber hinaus könnte man PC-3-Zelllinien mit unterschiedlichen Expressionsleveln (niedrig, mittel, hoch) von KLK4-WT und S195A-KLK4 exprimieren und die Genregulation testen, um die Hypothese einer Abhängigkeit der Genregulation vom KLK4-Gehalt in den Zellen zu bestätigen.

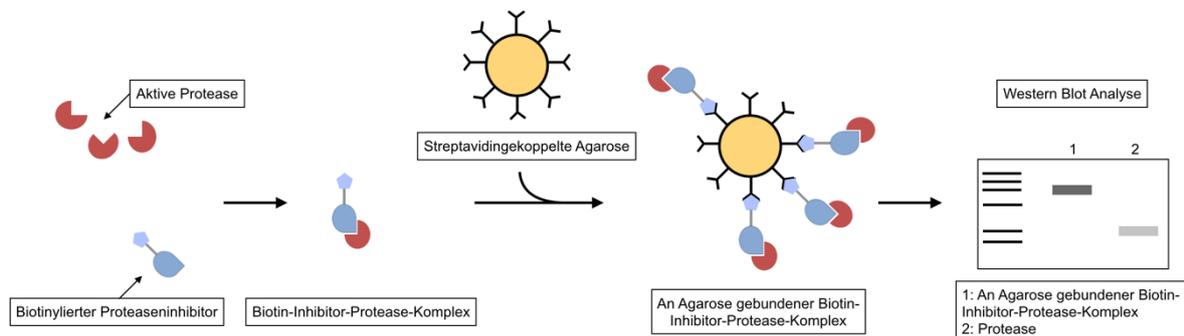


Abbildung 4-3: Präzipitation einer Protease mithilfe eines biotinylierten Inhibitors und streptavidingekoppelter Agarose

Bei Inkubation von Zellkulturüberständen, die aktive Proteasen enthalten, entsteht durch eine kovalente Bindung des biotinylierten Proteaseinhibitors ein Biotin-Inhibitor-Protease-Komplex. Aufgrund der hohen Affinität von Biotin und Streptavidin, kann dieser mithilfe von streptavidingekoppelter Agarose präzipitiert werden und mittels Gelelektrophorese im Western Blot nachgewiesen werden. Das stellt einen indirekten Aktivitätsnachweis dar, da der Inhibitor selektiv an proteolytisch aktive Proteasen bindet.

Könnte so abschließend geklärt werden, ob es sich bei der Genregulation um aktivitätsabhängige oder -unabhängige Mechanismen handelt, wäre es nötig die detaillierten Regulationskaskaden zu entschlüsseln, indem man mögliche involvierte Signalkaskaden oder potentiell beteiligte Substrate untersucht. Darüber hinaus sollten die Ergebnisse in einer zweiten, am besten androgenabhängigen Zelllinie, *in vitro* bekräftigt und im Verlauf *in vivo* reproduziert werden.

Nur dann wäre es möglich, die Rolle von KLK4 in der Progression des Prostatakarzinoms weiter zu beleuchten, mögliche tumorsuppressive und -progressive Interaktionen zu verstehen und KLK4 als potentiellen Biomarker oder also Angriffspunkt von zielgerichteten Therapeutika zu evaluieren.

Literaturverzeichnis

- Alterauge, Marc Dominik. 2014. 'Molekulare und zelluläre Effekte der Kallikrein-related Peptidase 4 auf humane Prostatakarzinomzellen', TUM.
- Avgeris, M., K. Stravodimos, and A. Scorilas. 2011. 'Kallikrein-related peptidase 4 gene (KLK4) in prostate tumors: quantitative expression analysis and evaluation of its clinical significance', *Prostate*, 71: 1780-9.
- AWMF. 2018. "Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms." In.
- Bayani, J., C.D. Petraki, A. Dimitromanolakis, V. Milou, E. P. Diamandis, and M. Schmitt. 2012. 'Expression of Kallikrein-related Peptidases under (Patho-)Physiological Conditions.' in V. Magdolen, C. Sommerhoff, H. Fritz and M. Schmitt (eds.), *Kallikrein-related Peptidases*.
- Beaufort, N., M. Debela, S. Creutzburg, J. Kellermann, W. Bode, M. Schmitt, D. Pidard, and V. Magdolen. 2006. 'Interplay of human tissue kallikrein 4 (hK4) with the plasminogen activation system: hK4 regulates the structure and functions of the urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR)', *Biol Chem*, 387: 217-22.
- Beaufort, N., K. Plaza, D. Utzschneider, A. Schwarz, J. M. Burkhart, S. Creutzburg, M. Debela, M. Schmitt, C. Ries, and V. Magdolen. 2010. 'Interdependence of kallikrein-related peptidases in proteolytic networks', *Biol Chem*, 391: 581-7.
- Bi, X., H. He, Y. Ye, Q. Dai, Z. Han, Y. Liang, and W. Zhong. 2010. 'Association of TMPRSS2 and KLK11 gene expression levels with clinical progression of human prostate cancer', *Med Oncol*, 27: 145-51.
- Biddle, A., X. Liang, L. Gammon, B. Fazil, L. J. Harper, H. Emich, D. E. Costea, and I. C. Mackenzie. 2011. 'Cancer stem cells in squamous cell carcinoma switch between two distinct phenotypes that are preferentially migratory or proliferative', *Cancer Res*, 71: 5317-26.
- Bindukumar, B., S. A. Schwartz, M. P. Nair, R. Aalinkeel, E. Kawinski, and K. C. Chadha. 2005. 'Prostate-Specific Antigen Modulates the Expression of Genes Involved in Prostate Tumor Growth', *Neoplasia*, 7: 544.
- Blackstock, C. D., Y. Higashi, S. Sukhanov, S. Y. Shai, B. Stefanovic, A. M. Tabony, T. Yoshida, and P. Delafontaine. 2014. 'Insulin-like growth factor-1 increases synthesis of collagen type I via induction of the mRNA-binding protein LARP6 expression and binding to the 5' stem-loop of COL1a1 and COL1a2 mRNA', *J Biol Chem*, 289: 7264-74.
- Borgono, C. A., and E. P. Diamandis. 2004. 'The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer', *Nat Rev Cancer*, 4: 876-90.
- Bou-Gharios, G., D. Abraham, and B. de Crombrughe. 2020. 'Type I collagen structure, synthesis, and regulation.' in J. Bilezikian, T. J. Martin, T. L. Clemens and C. J. Rosen (eds.), *Principles of Bone Biology* (Elsevier).
- Bradshaw, A. D. 2009. 'The role of SPARC in extracellular matrix assembly', *J Cell Commun Signal*, 3: 239-46.
- Carneiro, I., F. Quintela-Vieira, J. Lobo, C. Moreira-Barbosa, F. D. Menezes, A. T. Martins, J. Oliveira, R. Silva, C. Jeronimo, and R. Henrique. 2019. 'Expression of EMT-Related Genes CAMK2N1 and WNT5A is increased in Locally Invasive and Metastatic Prostate Cancer', *J Cancer*, 10: 5915-25.
- Catalanotto, C., C. Cogoni, and G. Zardo. 2016. 'MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions', *Int J Mol Sci*, 17.
- Chakravarthi, B. V., P. Dedigama-Arachchige, S. Carskadon, S. K. Sundaram, J. Li, K. H. Wu, D. S. Chandrashekar, J. O. Peabody, H. Stricker, C. Hwang, D. A. Chitale, S. R. Williamson, N. S. Gupta, N. M. Navone, C. Rogers, M. Menon, S. Varambally, and N. Palanisamy. 2019. 'Pseudogene Associated Recurrent Gene Fusion in Prostate Cancer', *Neoplasia*, 21: 989-1002.

- Chamboredon, S., J. Briggs, E. Vial, J. Hurault, F. Galvagni, S. Oliviero, T. Bos, and M. Castellazzi. 2003. 'v-Jun downregulates the SPARC target gene by binding to the proximal promoter indirectly through Sp1/3', *Oncogene*, 22: 4047-61.
- Chang, S. W., S. J. Shefelbine, and M. J. Buehler. 2012. 'Structural and mechanical differences between collagen homo- and heterotrimers: relevance for the molecular origin of brittle bone disease', *Biophys J*, 102: 640-8.
- Charlesworth, M. C., C. Y. Young, V. M. Miller, and D. J. Tindall. 1999. 'Kininogenase activity of prostate-derived human glandular kallikrein (hK2) purified from seminal fluid', *J Androl*, 20: 220-9.
- Chen, N., X. C. Ye, K. Chu, N. M. Navone, E. H. Sage, L. Y. Yu-Lee, C. J. Logothetis, and S. H. Lin. 2007. 'A secreted isoform of ErbB3 promotes osteonectin expression in bone and enhances the invasiveness of prostate cancer cells', *Cancer Res*, 67: 6544-8.
- Cheng, L., R. Montironi, D. G. Bostwick, A. Lopez-Beltran, and D. M. Berney. 2012. 'Staging of prostate cancer', *Histopathology*, 60: 87-117.
- Cho, A., N. Haruyama, B. Hall, M. J. Danton, L. Zhang, P. Arany, D. J. Mooney, Y. Harichane, M. Goldberg, C. W. Gibson, and A. B. Kulkarni. 2013. 'TGF-ss regulates enamel mineralization and maturation through KLK4 expression', *PLoS One*, 8: e82267.
- Christensson, A., C. B. Laurell, and H. Lilja. 1990. 'Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with extracellular serine proteinase inhibitors', *Eur J Biochem*, 194: 755-63.
- Clements, J., J. Hooper, Y. Dong, and T. Harvey. 2001. 'The expanded human kallikrein (KLK) gene family: genomic organisation, tissue-specific expression and potential functions', *Biol Chem*, 382: 5-14.
- Costello, L. C., and R. B. Franklin. 1998. 'Novel role of zinc in the regulation of prostate citrate metabolism and its implications in prostate cancer', *Prostate*, 35: 285-96.
- Cretu, Daniela, George M. Yousef, Andreas Scorilas, and Eleftherios P. Diamandis. 2012. 'Genomic Structure of the KLK Locus.' in V.; Sommerhoff Magdolen, C. P.; Fritz, H.; Schmitt, M. (ed.), *Kallikrein-related Peptidases*.
- Cumming, A. P., S. N. Hopmans, S. Vukmirovic-Popovic, and W. C. Duivenvoorden. 2011. 'PSA affects prostate cancer cell invasion in vitro and induces an osteoblastic phenotype in bone in vivo', *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 14: 286-94.
- Czuwara-Ladykowska, J., F. Shirasaki, P. Jackers, D. K. Watson, and M. Trojanowska. 2001. 'Fli-1 inhibits collagen type I production in dermal fibroblasts via an Sp1-dependent pathway', *J Biol Chem*, 276: 20839-48.
- Dallas, S. L., S. Zhao, S. D. Cramer, Z. Chen, D. M. Peehl, and L. F. Bonewald. 2005. 'Preferential production of latent transforming growth factor beta-2 by primary prostatic epithelial cells and its activation by prostate-specific antigen', *J Cell Physiol*, 202: 361-70.
- Dan, H. C., M. J. Cooper, P. C. Cogswell, J. A. Duncan, J. P. Ting, and A. S. Baldwin. 2008. 'Akt-dependent regulation of NF- κ B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK', *Genes Dev*, 22: 1490-500.
- Darson, M. F., A. Pacelli, P. Roche, H. G. Rittenhouse, R. L. Wolfert, M. S. Saeid, C. Y. Young, G. G. Klee, D. J. Tindall, and D. G. Bostwick. 1999. 'Human glandular kallikrein 2 expression in prostate adenocarcinoma and lymph node metastases', *Urology*, 53: 939-44.
- Darson, M. F., A. Pacelli, P. Roche, H. G. Rittenhouse, R. L. Wolfert, C. Y. Young, G. G. Klee, D. J. Tindall, and D. G. Bostwick. 1997. 'Human glandular kallikrein 2 (hK2) expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a novel prostate cancer marker', *Urology*, 49: 857-62.
- Day, C. H., G. R. Fanger, M. W. Retter, B. L. Hylander, R. B. Penetrante, R. L. Houghton, X. Zhang, P. D. McNeill, A. M. Filho, M. Nolasco, R. Badaro, M. A. Cheever, S. G. Reed, D. C. Dillon, and Y. Watanabe. 2002. 'Characterization of KLK4 expression and detection of KLK4-specific antibody in prostate cancer patient sera', *Oncogene*, 21: 7114-20.

- de Kok, J. B., R. W. Roelofs, B. A. Giesendorf, J. L. Pennings, E. T. Waas, T. Feuth, D. W. Swinkels, and P. N. Span. 2005. 'Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes', *Lab Invest*, 85: 154-9.
- De, S., J. Chen, N. V. Narizhneva, W. Heston, J. Brainard, E. H. Sage, and T. V. Byzova. 2003. 'Molecular pathway for cancer metastasis to bone', *J Biol Chem*, 278: 39044-50.
- Debela, M., N. Beaufort, V. Magdolen, N. M. Schechter, C. S. Craik, M. Schmitt, W. Bode, and P. Goettig. 2008. 'Structures and specificity of the human kallikrein-related peptidases KLK 4, 5, 6, and 7', *Biol Chem*, 389: 623-32.
- Debela, M., V. Magdolen, V. Grimminger, C. Sommerhoff, A. Messerschmidt, R. Huber, R. Friedrich, W. Bode, and P. Goettig. 2006. 'Crystal structures of human tissue kallikrein 4: activity modulation by a specific zinc binding site', *J Mol Biol*, 362: 1094-107.
- Debes, J. D., and D. J. Tindall. 2004. 'Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer', *N Engl J Med*, 351: 1488-90.
- Delany, A. M., and K. D. Hankenson. 2009. 'Thrombospondin-2 and SPARC/osteonectin are critical regulators of bone remodeling', *J Cell Commun Signal*, 3: 227-38.
- Denmeade, S. R., I. Litvinov, L. J. Sokoll, H. Lilja, and J. T. Isaacs. 2003. 'Prostate-specific antigen (PSA) protein does not affect growth of prostate cancer cells in vitro or prostate cancer xenografts in vivo', *Prostate*, 56: 45-53.
- Derosa, C. A., B. Furusato, S. Shaheduzzaman, V. Srikantan, Z. Wang, Y. Chen, M. Seifert, L. Ravindranath, D. Young, M. Nau, A. Dobi, T. Werner, D. G. McLeod, M. T. Vahey, I. A. Sesterhenn, S. Srivastava, and G. Petrovics. 2012. 'Elevated osteonectin/SPARC expression in primary prostate cancer predicts metastatic progression', *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 15: 150-6.
- Diamandis, E. P., A. Okui, S. Mitsui, L. Y. Luo, A. Soosaipillai, L. Grass, T. Nakamura, D. J. Howarth, and N. Yamaguchi. 2002. 'Human kallikrein 11: a new biomarker of prostate and ovarian carcinoma', *Cancer Res*, 62: 295-300.
- Docheva, D., D. Padula, M. Schieker, and H. Clausen-Schaumann. 2010. 'Effect of collagen I and fibronectin on the adhesion, elasticity and cytoskeletal organization of prostate cancer cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 402: 361-6.
- Dong, Y., L. T. Bui, D. M. Odorico, O. L. Tan, S. A. Myers, H. Samaratunga, R. A. Gardiner, and J. A. Clements. 2005. 'Compartmentalized expression of kallikrein 4 (KLK4/hK4) isoforms in prostate cancer: nuclear, cytoplasmic and secreted forms', *Endocr Relat Cancer*, 12: 875-89.
- Emami, N., and E. P. Diamandis. 2007. 'New insights into the functional mechanisms and clinical applications of the kallikrein-related peptidase family', *Mol Oncol*, 1: 269-87.
- . 2008. 'Human kallikrein-related peptidase 14 (KLK14) is a new activator component of the KLK proteolytic cascade. Possible function in seminal plasma and skin', *J Biol Chem*, 283: 3031-41.
- . 2010. 'Potential role of multiple members of the kallikrein-related peptidase family of serine proteases in activating latent TGF beta 1 in semen', *Biol Chem*, 391: 85-95.
- . 2012. 'Kallikrein-related Peptidases and Semen.' in V. Magdolen, C. Sommerhoff, H. Fritz and M. Schmitt (eds.), *Kallikrein-related Peptidases*.
- Epstein, J. I. 2010. 'An update of the Gleason grading system', *J Urol*, 183: 433-40.
- Feng, J., and L. Tang. 2014. 'SPARC in Tumor Pathophysiology and as a Potential Therapeutic Target', *Curr Pharm Des*, 20: 6182-90.
- Fidler, I. J. 2003. 'The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited', *NATURE REVIEWS | CANCER*.
- Fortelny, N., J. H. Cox, R. Kappelhoff, A. E. Starr, P. F. Lange, P. Pavlidis, and C. M. Overall. 2014. 'Network analyses reveal pervasive functional regulation between proteases in the human protease web', *PLoS Biol*, 12: e1001869.
- Fuhrman-Luck, R. A., D. Loessner, and J. A. Clements. 2014. 'Kallikrein-Related Peptidases in Prostate Cancer: From Molecular Function to Clinical Application', *EJIFCC*, 25: 269-81.

- Fuhrman-Luck, R. A., S. H. Stansfield, C. R. Stephens, D. Loessner, and J. A. Clements. 2016. 'Prostate Cancer-Associated Kallikrein-Related Peptidase 4 Activates Matrix Metalloproteinase-1 and Thrombospondin-1', *J Proteome Res*, 15: 2466-78.
- Gan, L., I. Lee, R. Smith, R. Argonza-Barrett, H. Lei, J. McCuaig, P. Moss, B. Paeper, and K. Wang. 2000. 'Sequencing and expression analysis of the serine protease gene cluster located in chromosome 19q13 region', *Gene*, 257: 119-30.
- Gandaglia, G., F. Abdollah, J. Schiffmann, V. Trudeau, S. F. Shariat, S. P. Kim, P. Perrotte, F. Montorsi, A. Briganti, Q. D. Trinh, P. I. Karakiewicz, and M. Sun. 2014. 'Distribution of metastatic sites in patients with prostate cancer: A population-based analysis', *Prostate*, 74: 210-6.
- Gao, J., R. L. Collard, L. Bui, A. C. Herington, D. L. Nicol, and J. A. Clements. 2007. 'Kallikrein 4 is a potential mediator of cellular interactions between cancer cells and osteoblasts in metastatic prostate cancer', *Prostate*, 67: 348-60.
- Gao, L., R. S. Smith, L. M. Chen, K. X. Chai, L. Chao, and J. Chao. 2010. 'Tissue kallikrein promotes prostate cancer cell migration and invasion via a protease-activated receptor-1-dependent signaling pathway', *Biol Chem*, 391: 803-12.
- Geiger, T. R., and D. S. Peeper. 2009. 'Metastasis mechanisms', *Biochim Biophys Acta*, 1796: 293-308.
- Goettig, P., V. Magdolen, and H. Brandstetter. 2010. 'Natural and synthetic inhibitors of kallikrein-related peptidases (KLKs)', *Biochimie*, 92: 1546-67.
- Gooden, M. D., R. B. Vernon, J. A. Bassuk, and E. H. Sage. 1999. 'Cell cycle-dependent nuclear location of the matricellular protein SPARC: association with the nuclear matrix', *J Cell Biochem*, 74: 152-67.
- Gorski, J. P., and K. D. Hankenson. 2020. 'Secreted noncollagenous proteins of bone.' in J. Bilezikian, T. G. Martin, T. L. Clemens and C. J. Rosen (eds.), *Principles of Bone Biology* (Elsevier).
- Gry, M., R. Rimini, S. Stromberg, A. Asplund, F. Ponten, M. Uhlen, and P. Nilsson. 2009. 'Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines', *BMC Genomics*, 10: 365.
- Guillon-Munos, A., K. Oikonomopoulou, N. Michel, C. R. Smith, A. Petit-Courty, S. Canepa, P. Reverdiau, N. Heuze-Vourc'h, E. P. Diamandis, and Y. Courty. 2011. 'Kallikrein-related peptidase 12 hydrolyzes matricellular proteins of the CCN family and modifies interactions of CCN1 and CCN5 with growth factors', *J Biol Chem*, 286: 25505-18.
- Guo, S., P. Briza, V. Magdolen, H. Brandstetter, and P. Goettig. 2018. 'Activation and activity of glycosylated KLKs 3, 4 and 11', *Biol Chem*, 399: 1009-22.
- Guo, S., W. Skala, V. Magdolen, H. Brandstetter, and P. Goettig. 2014. 'Sweetened kallikrein-related peptidases (KLKs): glycan trees as potential regulators of activation and activity', *Biol Chem*, 395: 959-76.
- Guo, Y., C. Y. Tang, X. F. Man, H. N. Tang, J. Tang, C. L. Zhou, S. W. Tan, M. Wang, Y. Z. Feng, and H. D. Zhou. 2017. 'Insulin-like growth factor-1 promotes osteogenic differentiation and collagen I alpha 2 synthesis via induction of mRNA-binding protein LARP6 expression', *Dev Growth Differ*, 59: 94-103.
- Hakenberg, O.W. 2014. 'Prostatakarzinom.' in H. Schmelz, C. Sparwasser and W. Weidner (eds.), *Facharztwissen Urologie*.
- Hall, C. L., C. W. Dubyk, T. A. Riesenberger, D. Shein, E. T. Keller, and K. L. van Golen. 2008. 'Type I collagen receptor (alpha2beta1) signaling promotes prostate cancer invasion through RhoC GTPase', *Neoplasia*, 10: 797-803.
- Han, S., E. Makareeva, N. V. Kuznetsova, A. M. DeRidder, M. B. Sutter, W. Losert, C. L. Phillips, R. Visse, H. Nagase, and S. Leikin. 2010. 'Molecular mechanism of type I collagen homotrimer resistance to mammalian collagenases', *J Biol Chem*, 285: 22276-81.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 2011. 'Hallmarks of cancer: the next generation', *Cell*, 144: 646-74.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2000. 'The Hallmarks of Cancer', *Cell*.
- Hao, P., B. Kang, G. Yao, W. Hao, and F. Ma. 2018. 'MicroRNA-211 suppresses prostate cancer proliferation by targeting SPARC', *Oncol Lett*, 15: 4323-29.

- Harvey, T. J., J. D. Hooper, S. A. Myers, S. A. Stephenson, L. K. Ashworth, and J. A. Clements. 2000. 'Tissue-specific expression patterns and fine mapping of the human kallikrein (KLK) locus on proximal 19q13.4', *J Biol Chem*, 275: 37397-406.
- Hayashida, T., M. Decaestecker, and H. W. Schnaper. 2003. 'Cross-talk between ERK MAP kinase and Smad signaling pathways enhances TGF-beta-dependent responses in human mesangial cells', *FASEB J*, 17: 1576-8.
- Hu, J., H. Lei, X. Fei, S. Liang, H. Xu, D. Qin, Y. Wang, Y. Wu, and B. Li. 2015. 'NES1/KLK10 gene represses proliferation, enhances apoptosis and down-regulates glucose metabolism of PC3 prostate cancer cells', *Sci Rep*, 5: 17426.
- Huang, D. Y., Y. T. Lin, P. S. Jan, Y. C. Hwang, S. T. Liang, Y. Peng, C. Y. Huang, H. C. Wu, and C. T. Lin. 2008. 'Transcription factor SOX-5 enhances nasopharyngeal carcinoma progression by down-regulating SPARC gene expression', *J Pathol*, 214: 445-55.
- Huggins, C. 1967. 'Endocrine-induced regression of cancers', *Cancer Res*, 27: 1925-30.
- Ida, H., T. Nakashima, N. L. Kedersha, S. Yamasaki, M. Huang, Y. Izumi, T. Miyashita, T. Origuchi, A. Kawakami, K. Migita, P. I. Bird, P. Anderson, and K. Eguchi. 2003. 'Granzyme B leakage-induced cell death: a new type of activation-induced natural killer cell death', *Eur J Immunol*, 33: 3284-92.
- Iino, M., D. C. Foster, and W. Kisiel. 1998. 'Quantification and characterization of human endothelial cell-derived tissue factor pathway inhibitor-2', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18: 40-6.
- Imai, K., and A. Takaoka. 2006. 'Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer', *Nat Rev Cancer*, 6: 714-27.
- Irimia, M., and S. W. Roy. 2014. 'Origin of spliceosomal introns and alternative splicing', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6.
- Jablonska-Trypuc, A., M. Matejczyk, and S. Rosochacki. 2016. 'Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs', *J Enzyme Inhib Med Chem*, 31: 177-83.
- Jacob, K., M. Webber, D. Benayahu, and H. K. Kleinman. 1999. 'Osteonectin promotes prostate cancer cell migration and invasion: a possible mechanism for metastasis to bone', *Cancer Res*, 59: 4453-7.
- Jamaspishvili, T., A. Scorilas, M. Kral, I. Khomeriki, D. Kurfurstova, Z. Kolar, and J. Bouchal. 2011. 'Immunohistochemical localization and analysis of kallikrein-related peptidase 7 and 11 expression in paired cancer and benign foci in prostate cancer patients', *Neoplasma*, 58: 298-303.
- Jia, Y., Y. Yang, M. V. Brock, B. Cao, Q. Zhan, Y. Li, Y. Yu, J. G. Herman, and M. Guo. 2012. 'Methylation of TFPI-2 is an early event of esophageal carcinogenesis', *Epigenomics*, 4: 135-46.
- Jin, Y., S. Qu, M. Tesikova, L. Wang, A. Kristian, G. M. Maelandsmo, H. Kong, T. Zhang, C. Jeronimo, M. R. Teixeira, E. Yuca, I. Tekedereli, K. Gorgulu, N. Alpay, A. K. Sood, G. Lopez-Berestein, H. E. Danielsen, B. Ozpolat, and F. Saatcioglu. 2013. 'Molecular circuit involving KLK4 integrates androgen and mTOR signaling in prostate cancer', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: E2572-81.
- Jing, Y., Z. Han, S. Zhang, Y. Liu, and L. Wei. 2011. 'Epithelial-Mesenchymal Transition in tumor microenvironment', *Cell Biosci*, 1: 29.
- Jonsson, M., S. Linse, B. Frohm, A. Lundwall, and J. Malm. 2005. 'Semenogelins I and II bind zinc and regulate the activity of prostate-specific antigen', *Biochem J*, 387: 447-53.
- Kapinas, K., K. M. Lowther, C. B. Kessler, K. Tilbury, J. R. Lieberman, J. S. Tirnauer, P. Campagnola, and A. M. Delany. 2012. 'Bone matrix osteonectin limits prostate cancer cell growth and survival', *Matrix Biol*, 31: 299-307.
- Kapoor, A., C. Wu, B. Shayegan, and A. P. Rybak. 2016. 'Contemporary agents in the management of metastatic castration-resistant prostate cancer', *Can Urol Assoc J*, 10: E414-e23.

- Kaufmann, B., S. Muller, F. G. Hanisch, U. Hartmann, M. Paulsson, P. Maurer, and F. Zaucke. 2004. 'Structural variability of BM-40/SPARC/osteonectin glycosylation: implications for collagen affinity', *Glycobiology*, 14: 609-19.
- Kaushal, A., S. A. Myers, Y. Dong, J. Lai, O. L. Tan, L. T. Bui, M. L. Hunt, M. R. Digby, H. Samaratunga, R. A. Gardiner, J. A. Clements, and J. D. Hooper. 2008. 'A novel transcript from the KLK1 gene is androgen regulated, down-regulated during prostate cancer progression and encodes the first non-serine protease identified from the human kallikrein gene locus', *Prostate*, 68: 381-99.
- Kim, E. H., G. L. Andriole, E. D. Crawford, D. D. Sjoberg, M. Assel, A. J. Vickers, and H. Lilja. 2017. 'Detection of High Grade Prostate Cancer among PLCO Participants Using a Prespecified 4-Kallikrein Marker Panel', *J Urol*, 197: 1041-47.
- Kishibe, M. 2019. 'Physiological and pathological roles of kallikrein-related peptidases in the epidermis', *J Dermatol Sci*, 95: 50-55.
- Klokk, T. I., A. Kilander, Z. Xi, H. Waehre, B. Risberg, H. E. Danielsen, and F. Saatcioglu. 2007. 'Kallikrein 4 is a proliferative factor that is overexpressed in prostate cancer', *Cancer Res*, 67: 5221-30.
- Kobayashi-Kinoshita, S., Y. Yamakoshi, K. Onuma, R. Yamamoto, and Y. Asada. 2016. 'TGF-beta1 autocrine signalling and enamel matrix components', *Sci Rep*, 6: 33644.
- Koblinski, J. E., M. Ahram, and B. F. Sloane. 2000. 'Unraveling the role of proteases in cancer', *Clin Chim Acta*, 291: 113-35.
- Konduri, S. D., A. Tasiou, N. Chandrasekar, and J. S. Rao. 2001. 'Overexpression of tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2), decreases the invasiveness of prostate cancer cells in vitro', *Int J Oncol*, 18: 127-31.
- Kratochwil, C., F. Bruchertseifer, F. L. Giesel, M. Weis, F. A. Verburg, F. Mottaghy, K. Kopka, C. Apostolidis, U. Haberkorn, and A. Morgenstern. 2016. '225Ac-PSMA-617 for PSMA-Targeted alpha-Radiation Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer', *J Nucl Med*, 57: 1941-44.
- Krebsregisterdaten, Zentrum für. 2014a. 'Krebs in Deutschland; Prostata', Robert Koch Institut, Accessed 16.02.2019.
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/kid_2017_c61_prostata.pdf?__blob=publicationFile.
- . 2014b. 'Krebs in Deutschland; Übersichten zu den Krebsneuerkrankungs- und Krebssterbefällen', Robert Koch Institut, Accessed 16.02.2019.
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/kid_2017_c00_97_krebs_gesamt.pdf?__blob=publicationFile.
- Kryza, T., C. Parent, J. Pardessus, A. Petit, J. Burlaud-Gaillard, P. Reverdiau, S. Iochmann, V. Labas, Y. Courty, and N. Heuze-Vourc'h. 2018. 'Human kallikrein-related peptidase 12 stimulates endothelial cell migration by remodeling the fibronectin matrix', *Sci Rep*, 8: 6331.
- Kryza, T., L. M. Silva, N. Bock, R. A. Fuhrman-Luck, C. R. Stephens, J. Gao, H. Samaratunga, BioResource Australian Prostate Cancer, M. G. Lawrence, J. D. Hooper, Y. Dong, G. P. Risbridger, and J. A. Clements. 2017. 'Kallikrein-related peptidase 4 induces cancer-associated fibroblast features in prostate-derived stromal cells', *Mol Oncol*, 11: 1307-29.
- Kryza, T., M. L. Silva, D. Loessner, N. Heuze-Vourc'h, and J. A. Clements. 2016. 'The kallikrein-related peptidase family: Dysregulation and functions during cancer progression', *Biochimie*, 122: 283-99.
- Kühnel, W. 2014. 'Taschenatlas Histologie', Thieme.
<https://viamedici.thieme.de/lernmodule/histologie/akzessorische+geschlechtsdruesen+histologie>.
- Kumano, M., H. Miyake, M. Muramaki, J. Furukawa, A. Takenaka, and M. Fujisawa. 2009. 'Expression of urokinase-type plasminogen activator system in prostate cancer: correlation with

- clinicopathological outcomes in patients undergoing radical prostatectomy', *Urol Oncol*, 27: 180-6.
- Kupprion, C., K. Motamed, and E. H. Sage. 1998. 'SPARC (BM-40, osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells', *J Biol Chem*, 273: 29635-40.
- Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck. 2014. 'Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15: 178-96.
- Lawrence, M. G., J. Lai, and J. A. Clements. 2010. 'Kallikreins on steroids: structure, function, and hormonal regulation of prostate-specific antigen and the extended kallikrein locus', *Endocr Rev*, 31: 407-46.
- Lawrence, M. G., T. L. Veveris-Lowe, A. K. Whitbread, D. L. Nicol, and J. A. Clements. 2007. 'Epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer and the potential role of kallikrein serine proteases', *Cells Tissues Organs*, 185: 111-5.
- Leapman, M. S., J. E. Cowan, H. G. Nguyen, K. K. Shinohara, N. Perez, M. R. Cooperberg, W. J. Catalona, and P. R. Carroll. 2017. 'Active Surveillance in Younger Men With Prostate Cancer', *J Clin Oncol*: Jco2016680058.
- Leleu, X., T. G. Martin, H. Einsele, R. M. Lyons, B. G. M. Durie, K. S. Iskander, and S. Ailawadhi. 2019. 'Role of Proteasome Inhibitors in Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma', *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 19: 9-22.
- Liang, A. K., J. Liu, S. A. Mao, V. S. Siu, Y. C. Lee, and S. H. Lin. 2005. 'Expression of recombinant MDA-BF-1 with a kinase recognition site and a 7-histidine tag for receptor binding and purification', *Protein Expr Purif*, 44: 58-64.
- Liao, Y., U. Abel, R. Grobholz, A. Hermani, L. Trojan, P. Angel, and D. Mayer. 2005. 'Up-regulation of insulin-like growth factor axis components in human primary prostate cancer correlates with tumor grade', *Hum Pathol*, 36: 1186-96.
- Lilja, H. 1985. 'A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein', *J Clin Invest*, 76: 1899-903.
- Lilja, H., J. Oldbring, G. Rannevik, and C. B. Laurell. 1987. 'Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen', *J Clin Invest*, 80: 281-5.
- Lin, S. H., C. J. Cheng, Y. C. Lee, X. Ye, W. W. Tsai, J. Kim, R. Pasqualini, W. Arap, N. M. Navone, S. M. Tu, M. Hu, L. Y. Yu-Lee, and C. J. Logothetis. 2008. 'A 45-kDa ErbB3 secreted by prostate cancer cells promotes bone formation', *Oncogene*, 27: 5195-203.
- Liu, T., X. Qiu, X. Zhao, R. Yang, H. Lian, F. Qu, X. Li, and H. Guo. 2018. 'Hypermethylation of the SPARC promoter and its prognostic value for prostate cancer', *Oncol Rep*, 39: 659-66.
- Loberg, R. D., C. J. Logothetis, E. T. Keller, and K. J. Pienta. 2005. 'Pathogenesis and treatment of prostate cancer bone metastases: targeting the lethal phenotype', *J Clin Oncol*, 23: 8232-41.
- Loessner, D., P. Goettig, S. Preis, J. Felber, H. Bronger, J. A. Clements, J. Dorn, and V. Magdolen. 2018. 'Kallikrein-related peptidases represent attractive therapeutic targets for ovarian cancer', *Expert Opin Ther Targets*, 22: 745-63.
- Lopez-Otin, C., and T. Hunter. 2010. 'The regulatory crosstalk between kinases and proteases in cancer', *Nat Rev Cancer*, 10: 278-92.
- Lopez-Otin, C., and C. M. Overall. 2002. 'Protease degradomics: a new challenge for proteomics', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3: 509-19.
- Lovgren, J., K. Airas, and H. Lilja. 1999. 'Enzymatic action of human glandular kallikrein 2 (hK2). Substrate specificity and regulation by Zn²⁺ and extracellular protease inhibitors', *Eur J Biochem*, 262: 781-9.
- Luparello, C., P. Sheterline, I. Pucci-Minafra, and S. Minafra. 1991. 'A comparison of spreading and motility behaviour of 8701-BC breast carcinoma cells on type I, I-trimer and type V collagen substrata. Evidence for a permissive effect of type I-trimer collagen on cell locomotion', *J Cell Sci*, 100 (Pt 1): 179-85.

- Ma, S., Y. P. Chan, P. S. Kwan, T. K. Lee, M. Yan, K. H. Tang, M. T. Ling, J. R. Vielkind, X. Y. Guan, and K. W. Chan. 2011. 'MicroRNA-616 induces androgen-independent growth of prostate cancer cells by suppressing expression of tissue factor pathway inhibitor TFPI-2', *Cancer Res*, 71: 583-92.
- Magdolen, V., and S. Creutzburg. , persönliche Mitteilung. Technical University of Munich.
- Makareeva, E., S. Han, J. C. Vera, D. L. Sackett, K. Holmbeck, C. L. Phillips, R. Visse, H. Nagase, and S. Leikin. 2010. 'Carcinomas contain a matrix metalloproteinase-resistant isoform of type I collagen exerting selective support to invasion', *Cancer Res*, 70: 4366-74.
- Mamaeva, O. A., J. Kim, G. Feng, and J. M. McDonald. 2009. 'Calcium/calmodulin-dependent kinase II regulates notch-1 signaling in prostate cancer cells', *J Cell Biochem*, 106: 25-32.
- Mann, T. 1974. 'Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction', *J Reprod Fertil*, 37: 179-88.
- Manski, D. 2017. 'Urologielehrbuch.de'.
- Mason, S. D., and J. A. Joyce. 2011. 'Proteolytic networks in cancer', *Trends Cell Biol*, 21: 228-37.
- Mateo, F., O. Meca-Cortes, T. Celia-Terrassa, Y. Fernandez, I. Abasolo, L. Sanchez-Cid, R. Bermudo, A. Sagasta, L. Rodriguez-Carunchio, M. Pons, V. Canovas, M. Marin-Aguilera, L. Mengual, A. Alcaraz, S. Schwartz, Jr., B. Mellado, K. Y. Aguilera, R. Brekken, P. L. Fernandez, R. Paciucci, and T. M. Thomson. 2014. 'SPARC mediates metastatic cooperation between CSC and non-CSC prostate cancer cell subpopulations', *Mol Cancer*, 13: 237.
- Matsumura, M., A. S. Bhatt, D. Andress, N. Clegg, T. K. Takayama, C. S. Craik, and P. S. Nelson. 2005. 'Substrates of the prostate-specific serine protease prostase/KLK4 defined by positional-scanning peptide libraries', *Prostate*, 62: 1-13.
- Mattsson, J. M., P. Laakkonen, U. H. Stenman, and H. Koistinen. 2009. 'Antiangiogenic properties of prostate-specific antigen (PSA)', *Scand J Clin Lab Invest*, 69: 447-51.
- McBride, D. J., Jr., K. E. Kadler, Y. Hojima, and D. J. Prockop. 1992. 'Self-assembly into fibrils of a homotrimer of type I collagen', *Matrix*, 12: 256-63.
- McCabe, N. P., B. A. Kerr, M. Madajka, A. VasANJI, and T. V. Byzova. 2011. 'Augmented osteolysis in SPARC-deficient mice with bone-residing prostate cancer', *Neoplasia*, 13: 31-9.
- McNeal, J. E. 1968. 'Regional morphology and pathology of the prostate', *Am J Clin Pathol*, 49: 347-57.
- Mekkat, A., E. Poppleton, B. An, R. Visse, H. Nagase, D. L. Kaplan, B. Brodsky, and Y. S. Lin. 2018. 'Effects of flexibility of the alpha2 chain of type I collagen on collagenase cleavage', *J Struct Biol*, 203: 247-54.
- Memari, N., E. P. Diamandis, T. Earle, A. Campbell, H. Van Dekken, and T. H. Van der Kwast. 2007. 'Human kallikrein-related peptidase 12: antibody generation and immunohistochemical localization in prostatic tissues', *Prostate*, 67: 1465-74.
- Mettouchi, A., F. Cabon, N. Montreau, P. Vernier, G. Mercier, D. Blangy, H. Tricoire, P. Vigier, and B. Binetruy. 1994. 'SPARC and thrombospondin genes are repressed by the c-jun oncogene in rat embryo fibroblasts', *Embo j*, 13: 5668-78.
- Michael, I. P., G. Pampalakis, S. D. Mikolajczyk, J. Malm, G. Sotiropoulou, and E. P. Diamandis. 2006. 'Human tissue kallikrein 5 is a member of a proteolytic cascade pathway involved in seminal clot liquefaction and potentially in prostate cancer progression', *J Biol Chem*, 281: 12743-50.
- Miyamoto, H., E. M. Messing, and C. Chang. 2004. 'Androgen deprivation therapy for prostate cancer: current status and future prospects', *Prostate*, 61: 332-53.
- Mize, G. J., W. Wang, and T. K. Takayama. 2008. 'Prostate-specific kallikreins-2 and -4 enhance the proliferation of DU-145 prostate cancer cells through protease-activated receptors-1 and -2', *Mol Cancer Res*, 6: 1043-51.
- Mo, L., J. Zhang, J. Shi, Q. Xuan, X. Yang, M. Qin, C. Lee, H. Klocker, Q. Q. Li, and Z. Mo. 2010. 'Human kallikrein 7 induces epithelial-mesenchymal transition-like changes in prostate carcinoma cells: a role in prostate cancer invasion and progression', *Anticancer Res*, 30: 3413-20.

- Mosquera, J. M., S. Perner, F. Demichelis, R. Kim, M. D. Hofer, K. D. Mertz, P. L. Paris, J. Simko, C. Collins, T. A. Bismar, A. M. Chinnaiyan, and M. A. Rubin. 2007. 'Morphological features of TMPRSS2-ERG gene fusion prostate cancer', *J Pathol*, 212: 91-101.
- Motamed, K., and E. H. Sage. 1998. 'SPARC inhibits endothelial cell adhesion but not proliferation through a tyrosine phosphorylation-dependent pathway', *J Cell Biochem*, 70: 543-52.
- Mukai, S., T. Fukushima, D. Naka, H. Tanaka, Y. Osada, and H. Kataoka. 2008. 'Activation of hepatocyte growth factor activator zymogen (pro-HGFA) by human kallikrein 1-related peptidases', *Febs j*, 275: 1003-17.
- Musti, A. M., M. Treier, and D. Bohmann. 1997. 'Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases', *Science*, 275: 400-2.
- Myers. 2000. 'Structure of the Adult Prostate From a Clinician's Standpoint', *Clinical Anatomy*, 13.
- Nakayama, K. 1997. 'Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins', *Biochem J*, 327 (Pt 3): 625-35.
- Napieralski, R., and V. Magdolen. , persönliche Mitteilung. Technical University of Munich.
- Nelson, P. S., L. Gan, C. Ferguson, P. Moss, R. Gelinas, L. Hood, and K. Wang. 1999. 'Molecular cloning and characterization of prostase, an androgen-regulated serine protease with prostate-restricted expression', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 3114-9.
- Nguyen, T. H. 2004. 'Mechanisms of metastasis', *Clin Dermatol*, 22: 209-16.
- Nobeyama, Y., E. Okochi-Takada, J. Furuta, Y. Miyagi, K. Kikuchi, A. Yamamoto, Y. Nakanishi, H. Nakagawa, and T. Ushijima. 2007. 'Silencing of tissue factor pathway inhibitor-2 gene in malignant melanomas', *Int J Cancer*, 121: 301-7.
- Obiezu, C. V., I. P. Michael, M. A. Levesque, and E. P. Diamandis. 2006. 'Human kallikrein 4: enzymatic activity, inhibition, and degradation of extracellular matrix proteins', *Biol Chem*, 387: 749-59.
- Obiezu, C. V., A. Scorilas, D. Katsaros, M. Massobrio, G. M. Yousef, S. Fracchioli, I. A. Rigault de la Longrais, R. Arisio, and E. P. Diamandis. 2001. 'Higher human kallikrein gene 4 (KLK4) expression indicates poor prognosis of ovarian cancer patients', *Clin Cancer Res*, 7: 2380-6.
- Ohler, A., M. Debela, S. Wagner, V. Magdolen, and C. Becker-Pauly. 2010. 'Analyzing the protease web in skin: meprin metalloproteases are activated specifically by KLK4, 5 and 8 vice versa leading to processing of proKLK7 thereby triggering its activation', *Biol Chem*, 391: 455-60.
- Okano, K., A. Hibi, T. Miyaoka, T. Inoue, H. Sugimoto, K. Tsuchiya, T. Akiba, and K. Nitta. 2012. 'Inhibitory effects of the transcription factor Ets-1 on the expression of type I collagen in TGF-beta1-stimulated renal epithelial cells', *Mol Cell Biochem*, 369: 247-54.
- Overall, C. M., and O. Kleinfeld. 2006. 'Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy', *Nat Rev Cancer*, 6: 227-39.
- Pagliuca, M., C. Buonerba, K. Fizazi, and G. Di Lorenzo. 2019. 'The Evolving Systemic Treatment Landscape for Patients with Advanced Prostate Cancer', *Drugs*.
- Papaoiannou, I., S. Xu, C. P. Denton, D. J. Abraham, and M. Ponticos. 2018. 'STAT3 controls COL1A2 enhancer activation cooperatively with JunB, regulates type I collagen synthesis posttranscriptionally, and is essential for lung myofibroblast differentiation', *Mol Biol Cell*, 29: 84-95.
- Perez-Silva, J. G., Y. Espanol, G. Velasco, and V. Quesada. 2016. 'The Degradome database: expanding roles of mammalian proteases in life and disease', *Nucleic Acids Res*, 44: D351-5.
- Pienta, K. J., and D. Bradley. 2006. 'Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer', *Clin Cancer Res*, 12: 1665-71.
- Podhajcer, O. L., L. G. Benedetti, M. R. Girotti, F. Prada, E. Salvatierra, and A. S. Llera. 2008. 'The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host', *Cancer Metastasis Rev*, 27: 691-705.
- Prezas, P., M. J. Arlt, P. Viktorov, A. Soosaipillai, L. Holzscheiter, M. Schmitt, M. Talieri, E. P. Diamandis, A. Kruger, and V. Magdolen. 2006. 'Overexpression of the human tissue kallikrein

- genes KLK4, 5, 6, and 7 increases the malignant phenotype of ovarian cancer cells', *Biol Chem*, 387: 807-11.
- Quent, V. M., D. Loessner, T. Friis, J. C. Reichert, and D. W. Hutmacher. 2010. 'Discrepancies between metabolic activity and DNA content as tool to assess cell proliferation in cancer research', *J Cell Mol Med*, 14: 1003-13.
- Quesada, V., G. R. Ordonez, L. M. Sanchez, X. S. Puente, and C. Lopez-Otin. 2009. 'The Degradome database: mammalian proteases and diseases of proteolysis', *Nucleic Acids Res*, 37: D239-43.
- Ramsay, A. J., Y. Dong, M. L. Hunt, M. Linn, H. Samaratinga, J. A. Clements, and J. D. Hooper. 2008. 'Kallikrein-related peptidase 4 (KLK4) initiates intracellular signaling via protease-activated receptors (PARs). KLK4 and PAR-2 are co-expressed during prostate cancer progression', *J Biol Chem*, 283: 12293-304.
- Rao, N. V., G. V. Rao, and J. R. Hoidal. 1997. 'Human dipeptidyl-peptidase I. Gene characterization, localization, and expression', *J Biol Chem*, 272: 10260-5.
- Reid, J. C., A. Matsika, C. M. Davies, Y. He, A. Broomfield, N. C. Bennett, V. Magdolen, B. Srinivasan, J. A. Clements, and J. D. Hooper. 2017. 'Pericellular regulation of prostate cancer expressed kallikrein-related peptidases and matrix metalloproteinases by cell surface serine proteases', *Am J Cancer Res*, 7: 2257-74.
- Ribarska, T., M. Ingenwerth, W. Goering, R. Engers, and W. A. Schulz. 2010. 'Epigenetic inactivation of the placentally imprinted tumor suppressor gene TFPI2 in prostate carcinoma', *Cancer Genomics Proteomics*, 7: 51-60.
- Robinson, D., E. M. Van Allen, Y. M. Wu, N. Schultz, R. J. Lonigro, J. M. Mosquera, B. Montgomery, M. E. Taplin, C. C. Pritchard, G. Attard, H. Beltran, W. Abida, R. K. Bradley, J. Vinson, X. Cao, P. Vats, L. P. Kunju, M. Hussain, F. Y. Feng, S. A. Tomlins, K. A. Cooney, D. C. Smith, C. Brennan, J. Siddiqui, R. Mehra, Y. Chen, D. E. Rathkopf, M. J. Morris, S. B. Solomon, J. C. Durack, V. E. Reuter, A. Gopalan, J. Gao, M. Loda, R. T. Lis, M. Bowden, S. P. Balk, G. Gaviola, C. Sougnez, M. Gupta, E. Y. Yu, E. A. Mostaghel, H. H. Cheng, H. Mulcahy, L. D. True, S. R. Plymate, H. Dvinge, R. Ferraldeschi, P. Flohr, S. Miranda, Z. Zafeiriou, N. Tunariu, J. Mateo, R. Perez-Lopez, F. Demichelis, B. D. Robinson, M. Schiffman, D. M. Nanus, S. T. Tagawa, A. Sigaras, K. W. Eng, O. Elemento, A. Sboner, E. I. Heath, H. I. Scher, K. J. Pienta, P. Kantoff, J. S. de Bono, M. A. Rubin, P. S. Nelson, L. A. Garraway, C. L. Sawyers, and A. M. Chinnaiyan. 2015. 'Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer', *Cell*, 161: 1215-28.
- Rokhlin, O. W., A. F. Taghiyev, K. U. Bayer, D. Bumcrot, V. E. Koteliansk, R. A. Glover, and M. B. Cohen. 2007. 'Calcium/calmodulin-dependent kinase II plays an important role in prostate cancer cell survival', *Cancer Biol Ther*, 6: 732-42.
- Romanuik, T. L., T. Ueda, N. Le, S. Haile, T. M. Yong, T. Thomson, R. L. Vessella, and M. D. Sadar. 2009a. 'Novel biomarkers for prostate cancer including noncoding transcripts', *Am J Pathol*, 175: 2264-76.
- Romanuik, T. L., G. Wang, R. A. Holt, S. J. Jones, M. A. Marra, and M. D. Sadar. 2009b. 'Identification of novel androgen-responsive genes by sequencing of LongSAGE libraries', *BMC Genomics*, 10: 476.
- Rupard, J. H., S. J. Dimari, I. Damjanov, and M. A. Haralson. 1988. 'Synthesis of type I homotrimer collagen molecules by cultured human lung adenocarcinoma cells', *Am J Pathol*, 133: 316-26.
- Russell, P. J., S. Bennett, and P. Stricker. 1998. 'Growth factor involvement in progression of prostate cancer', *Clin Chem*, 44: 705-23.
- Sage, E. H., M. Reed, S. E. Funk, T. Truong, M. Steadele, P. Puolakkainen, D. H. Maurice, and J. A. Bassuk. 2003. 'Cleavage of the matricellular protein SPARC by matrix metalloproteinase 3 produces polypeptides that influence angiogenesis', *J Biol Chem*, 278: 37849-57.
- Sage, H., R. B. Vernon, S. E. Funk, E. A. Everitt, and J. Angello. 1989. 'SPARC, a secreted protein associated with cellular proliferation, inhibits cell spreading in vitro and exhibits Ca²⁺-dependent binding to the extracellular matrix', *J Cell Biol*, 109: 341-56.

- Said, N., H. F. Frierson, Jr., D. Chernauskas, M. Conaway, K. Motamed, and D. Theodorescu. 2009. 'The role of SPARC in the TRAMP model of prostate carcinogenesis and progression', *Oncogene*, 28: 3487-98.
- Sanchez, W. Y., S. J. de Veer, J. E. Swedberg, E. J. Hong, J. C. Reid, T. P. Walsh, J. D. Hooper, G. L. Hammond, J. A. Clements, and J. M. Harris. 2012. 'Selective cleavage of human sex hormone-binding globulin by kallikrein-related peptidases and effects on androgen action in LNCaP prostate cancer cells', *Endocrinology*, 153: 3179-89.
- Sasaki, T., W. Gohring, K. Mann, P. Maurer, E. Hohenester, V. Knauper, G. Murphy, and R. Timpl. 1997. 'Limited cleavage of extracellular matrix protein BM-40 by matrix metalloproteinases increases its affinity for collagens', *J Biol Chem*, 272: 9237-43.
- Schillaci, R., C. Luparello, and S. Minafra. 1989. 'Type I and I-trimer collagens as substrates for breast carcinoma cells in culture. Effect on growth rate, morphological appearance and actin organization', *Eur J Cell Biol*, 48: 135-41.
- Schröder, Fritz H., Jonas Hugosson, Monique J. Roobol, Teuvo L. J. Tammela, Marco Zappa, Vera Nelen, Maciej Kwiatkowski, Marcos Lujan, Liisa Määttänen, Hans Lilja, Louis J. Denis, Franz Recker, Alvaro Paez, Chris H. Bangma, Sigrid Carlsson, Donella Puliti, Arnaud Villers, Xavier Rebillard, Matti Hakama, Ulf-Hakan Stenman, Paula Kujala, Kimmo Taari, Gunnar Aus, Andreas Huber, Theo H. van der Kwast, Ron H. N. van Schaik, Harry J. de Koning, Sue M. Moss, and Anssi Auvinen. 2014. 'Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up', *The Lancet*, 384: 2027-35.
- Schulze, T., and V. Magdolen. , persönliche Mitteilung. Technical University of Munich.
- Schünke, M., E. Schulte, U. Schumacher, and et al. 2009. 'Prometheus LernAtlas - Innere Organe.'. <https://eref.thieme.de/cockpits/clAna0001/0/coAna00046/4-7460>.
- Seiz, L., M. Kotsch, N. I. Grebenchtchikov, A. J. Geurts-Moespot, S. Fuessel, P. Goettig, A. Gkazepis, M. P. Wirth, M. Schmitt, A. Lossnitzer, F. C. Sweep, and V. Magdolen. 2010. 'Polyclonal antibodies against kallikrein-related peptidase 4 (KLK4): immunohistochemical assessment of KLK4 expression in healthy tissues and prostate cancer', *Biol Chem*, 391: 391-401.
- Sfanos, K. S., and A. M. De Marzo. 2012. 'Prostate cancer and inflammation: the evidence', *Histopathology*, 60: 199-215.
- Shang, Z., Y. Niu, Q. Cai, J. Chen, J. Tian, S. Yeh, K. P. Lai, and C. Chang. 2014. 'Human kallikrein 2 (KLK2) promotes prostate cancer cell growth via function as a modulator to promote the ARA70-enhanced androgen receptor transactivation', *Tumour Biol*, 35: 1881-90.
- Shankavaram, U. T., D. L. DeWitt, S. E. Funk, E. H. Sage, and L. M. Wahl. 1997. 'Regulation of human monocyte matrix metalloproteinases by SPARC', *J Cell Physiol*, 173: 327-34.
- Sharma, S., F. Xing, Y. Liu, K. Wu, N. Said, R. Pochampally, Y. Shiozawa, H. K. Lin, K. C. Balaji, and K. Watabe. 2016. 'Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) Mediates Metastatic Dormancy of Prostate Cancer in Bone', *J Biol Chem*, 291: 19351-63.
- Shaw, J. L., and E. P. Diamandis. 2007. 'Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids', *Clin Chem*, 53: 1423-32.
- Shay, G., C. C. Lynch, and B. Fingleton. 2015. 'Moving targets: Emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis', *Matrix Biol*, 44-46: 200-6.
- Shin, M., A. Mizokami, J. Kim, M. Ofude, H. Konaka, Y. Kadono, Y. Kitagawa, S. Miwa, M. Kumaki, E. T. Keller, and M. Namiki. 2013. 'Exogenous SPARC suppresses proliferation and migration of prostate cancer by interacting with integrin beta1', *Prostate*, 73: 1159-70.
- Siems, W. E., B. Maul, B. Wiesner, M. Becker, T. Walther, L. Rothe, and A. Winkler. 2003. 'Effects of kinins on mammalian spermatozoa and the impact of peptidolytic enzymes', *Andrologia*, 35: 44-54.
- Sierko, E., M. Z. Wojtukiewicz, and W. Kisiel. 2007. 'The role of tissue factor pathway inhibitor-2 in cancer biology', *Semin Thromb Hemost*, 33: 653-9.

- Silva, L. M., T. Stoll, T. Kryza, C. R. Stephens, M. L. Hastie, H. F. Irving-Rodgers, Y. Dong, J. J. Gorman, and J. A. Clements. 2017. 'Mass spectrometry-based determination of Kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) cleavage preferences and subsite dependency', *Sci Rep*, 7: 6789.
- Simmer, J. P., M. Fukae, T. Tanabe, Y. Yamakoshi, T. Uchida, J. Xue, H. C. Margolis, M. Shimizu, B. C. DeHart, C. C. Hu, and J. D. Bartlett. 1998. 'Purification, characterization, and cloning of enamel matrix serine proteinase 1', *J Dent Res*, 77: 377-86.
- Sodek, J., B. Zhu, M. H. Huynh, T. J. Brown, and M. Ringuette. 2002. 'Novel functions of the matricellular proteins osteopontin and osteonectin/SPARC', *Connect Tissue Res*, 43: 308-19.
- Spinetti, G., O. Fortunato, D. Cordella, P. Portararo, N. Krankel, R. Katare, G. B. Sala-Newby, C. Richer, M. P. Vincent, F. Alhenc-Gelas, G. Tonolo, S. Cherchi, C. Emanuelli, and P. Madeddu. 2011. 'Tissue kallikrein is essential for invasive capacity of circulating proangiogenic cells', *Circ Res*, 108: 284-93.
- Sprecher, C. A., F. J. Grant, G. Grimm, P. J. O'Hara, F. Norris, K. Norris, and D. C. Foster. 1993. 'Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family', *Biochemistry*, 32: 4481-6.
- Stephenson, S. A., K. Verity, L. K. Ashworth, and J. A. Clements. 1999. 'Localization of a new prostate-specific antigen-related serine protease gene, KLK4, is evidence for an expanded human kallikrein gene family cluster on chromosome 19q13.3-13.4', *J Biol Chem*, 274: 23210-4.
- Sterchi, E. E., W. Stocker, and J. S. Bond. 2008. 'Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases', *Mol Aspects Med*, 29: 309-28.
- Sugie, S., S. Mukai, K. Yamasaki, T. Kamibeppu, H. Tsukino, and T. Kamoto. 2016. 'Plasma macrophage-stimulating protein and hepatocyte growth factor levels are associated with prostate cancer progression', *Hum Cell*, 29: 22-9.
- Swedberg, J. E., L. V. Nigon, J. C. Reid, S. J. de Veer, C. M. Walpole, C. R. Stephens, T. P. Walsh, T. K. Takayama, J. D. Hooper, J. A. Clements, A. M. Buckle, and J. M. Harris. 2009. 'Substrate-guided design of a potent and selective kallikrein-related peptidase inhibitor for kallikrein 4', *Chem Biol*, 16: 633-43.
- Taichman, R. S., R. D. Loberg, R. Mehra, and K. J. Pienta. 2007. 'The evolving biology and treatment of prostate cancer', *J Clin Invest*, 117: 2351-61.
- Takayama, T. K., B. A. McMullen, P. S. Nelson, M. Matsumura, and K. Fujikawa. 2001. 'Characterization of hK4 (prostase), a prostate-specific serine protease: activation of the precursor of prostate specific antigen (pro-PSA) and single-chain urokinase-type plasminogen activator and degradation of prostatic acid phosphatase', *Biochemistry*, 40: 15341-8.
- Tang, S. C., J. C. Leung, and K. N. Lai. 2011. 'The kallikrein-kinin system', *Contrib Nephrol*, 170: 145-55.
- Thomas, R., L. D. True, J. A. Bassuk, P. H. Lange, and R. L. Vessella. 2000. 'Differential expression of osteonectin/SPARC during human prostate cancer progression', *Clin Cancer Res*, 6: 1140-9.
- Torres-Nunez, E., L. Cal, P. Suarez-Bregua, C. Gomez-Marin, P. Moran, J. L. Gomez-Skarmeta, and J. Rotllant. 2015. 'Matricellular protein SPARC/osteonectin expression is regulated by DNA methylation in its core promoter region', *Dev Dyn*, 244: 693-702.
- Trojanowska, M. 2000. 'Ets factors and regulation of the extracellular matrix', *Oncogene*, 19: 6464-71.
- Tse, B. W., T. Kryza, M. C. Yeh, Y. Dong, K. A. Sokolowski, C. Walpole, T. Dreyer, J. Felber, J. Harris, V. Magdolen, P. J. Russell, and J. A. Clements. 2020. 'KLK4 Induces Anti-Tumor Effects in Human Xenograft Mouse Models of Orthotopic and Metastatic Prostate Cancer', *Cancers (Basel)*, 12.
- Turk, B. 2006. 'Targeting proteases: successes, failures and future prospects', *Nat Rev Drug Discov*, 5: 785-99.
- Turk, B., D. Turk, and V. Turk. 2012. 'Protease signalling: the cutting edge', *Embo j*, 31: 1630-43.
- Turk, V., B. Turk, and D. Turk. 2001. 'Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities', *Embo j*, 20: 4629-33.

- Tye, C. E., C. T. Pham, J. P. Simmer, and J. D. Bartlett. 2009. 'DPPI may activate KLK4 during enamel formation', *J Dent Res*, 88: 323-7.
- Uhlen, M., L. Fagerberg, B. M. Hallstrom, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, A. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjostedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C. A. Szogyarto, J. Odeberg, D. Djureinovic, J. O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P. H. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J. M. Schwenk, M. Hamsten, K. von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. von Heijne, J. Nielsen, and F. Ponten. 2015. 'Proteomics. Tissue-based map of the human proteome', *Science*, 347: 1260419.
- Valencia, A. M., and C. Kadoch. 2019. 'Chromatin regulatory mechanisms and therapeutic opportunities in cancer', *Nat Cell Biol*, 21: 152-61.
- van Soom, J, G Cuzzucoli Crucitti, R Gladysz, P Van der Veken, R Di Santo, I Stuyver, V Buck, A-M Lambeir, V Magdolen, J Joossens, and K Augustyns. 2015. 'The first potent diphenyl phosphonate KLK4 inhibitors with unexpected binding kinetics.', *Medchemcomm.*, 6: 1954–58.
- Veveris-Lowe, T. L., M. G. Lawrence, R. L. Collard, L. Bui, A. C. Herington, D. L. Nicol, and J. A. Clements. 2005. 'Kallikrein 4 (hK4) and prostate-specific antigen (PSA) are associated with the loss of E-cadherin and an epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like effect in prostate cancer cells', *Endocr Relat Cancer*, 12: 631-43.
- Vial, E., S. Perez, and M. Castellazzi. 2000. 'Transcriptional control of SPARC by v-Jun and other members of the AP1 family of transcription factors', *Oncogene*, 19: 5020-9.
- Wang, P., V. Magdolen, C. Seidl, J. Dorn, E. Drecolli, M. Kotzsch, F. Yang, M. Schmitt, O. Schilling, A. Rockstroh, J. A. Clements, and D. Loessner. 2018. 'Kallikrein-related peptidases 4, 5, 6 and 7 regulate tumour-associated factors in serous ovarian cancer', *Br J Cancer*, 119: 1-9.
- Wang, S., M. F. He, Y. H. Chen, M. Y. Wang, X. M. Yu, J. Bai, H. Y. Zhu, Y. Y. Wang, H. Zhao, Q. Mei, J. Nie, J. Ma, J. F. Wang, Q. Wen, L. Ma, Y. Wang, and X. N. Wang. 2013. 'Rapid reuptake of granzyme B leads to emperitosis: an apoptotic cell-in-cell death of immune killer cells inside tumor cells', *Cell Death Dis*, 4: e856.
- Wang, T., S. Guo, Z. Liu, L. Wu, M. Li, J. Yang, R. Chen, X. Liu, H. Xu, S. Cai, H. Chen, W. Li, S. Xu, L. Wang, Z. Hu, Q. Zhuang, L. Wang, K. Wu, J. Liu, Z. Ye, J. Y. Ji, C. Wang, and K. Chen. 2014a. 'CAMK2N1 inhibits prostate cancer progression through androgen receptor-dependent signaling', *Oncotarget*, 5: 10293-306.
- Wang, T., Z. Liu, S. Guo, L. Wu, M. Li, J. Yang, R. Chen, H. Xu, S. Cai, H. Chen, W. Li, L. Wang, Z. Hu, Q. Zhuang, S. Xu, L. Wang, J. Liu, Z. Ye, J. Y. Ji, C. Wang, and K. Chen. 2014b. 'The tumor suppressive role of CAMK2N1 in castration-resistant prostate cancer', *Oncotarget*, 5: 3611-21.
- Wang, W., G. J. Mize, X. Zhang, and T. K. Takayama. 2010. 'Kallikrein-related peptidase-4 initiates tumor-stroma interactions in prostate cancer through protease-activated receptor-1', *Int J Cancer*, 126: 599-610.
- Webber, M. M., A. Waghray, and D. Bello. 1995. 'Prostate-specific antigen, a serine protease, facilitates human prostate cancer cell invasion', *Clin Cancer Res*, 1: 1089-94.
- Williams, S. A., C. A. Jelinek, I. Litvinov, R. J. Cotter, J. T. Isaacs, and S. R. Denmeade. 2011. 'Enzymatically active prostate-specific antigen promotes growth of human prostate cancers', *Prostate*, 71: 1595-607.
- Williams, S. A., Y. Xu, A. M. De Marzo, J. T. Isaacs, and S. R. Denmeade. 2010. 'Prostate-specific antigen (PSA) is activated by KLK2 in prostate cancer ex vivo models and in prostate-targeted PSA/KLK2 double transgenic mice', *Prostate*, 70: 788-96.
- Wrana, J. L., C. M. Overall, and J. Sodek. 1991. 'Regulation of the expression of a secreted acidic protein rich in cysteine (SPARC) in human fibroblasts by transforming growth factor beta. Comparison of transcriptional and post-transcriptional control with fibronectin and type I collagen', *Eur J Biochem*, 197: 519-28.

- Wu, C., C. Miao, Q. Tang, X. Zhou, P. Xi, P. Chang, L. Hua, and H. Ni. 2019. 'MiR-129-5p promotes docetaxel resistance in prostate cancer by down-regulating CAMK2N1 expression', *J Cell Mol Med*.
- Xi, Z., T. I. Klock, K. Korkmaz, P. Kurys, C. Elbi, B. Risberg, H. Danielsen, M. Loda, and F. Saatcioglu. 2004. 'Kallikrein 4 is a predominantly nuclear protein and is overexpressed in prostate cancer', *Cancer Res*, 64: 2365-70.
- Xu, Y., X. Qin, J. Zhou, Z. Tu, X. Bi, W. Li, X. Fan, and Y. Zhang. 2011. 'Tissue factor pathway inhibitor-2 inhibits the growth and invasion of hepatocellular carcinoma cells and is inactivated in human hepatocellular carcinoma', *Oncol Lett*, 2: 779-83.
- Yamagata, S., and T. Yamagata. 1984. 'FBJ virus-induced osteosarcoma contains type I, type I trimer, type III as well as type V collagens', *J Biochem*, 96: 17-26.
- Yamakoshi, Y., J. P. Simmer, J. D. Bartlett, T. Karakida, and S. Oida. 2013. 'MMP20 and KLK4 activation and inactivation interactions in vitro', *Arch Oral Biol*, 58: 1569-77.
- Yang, F., Y. Chen, T. Shen, D. Guo, O. Dakhova, M. M. Ittmann, C. J. Creighton, Y. Zhang, T. D. Dang, and D. R. Rowley. 2014. 'Stromal TGF-beta signaling induces AR activation in prostate cancer', *Oncotarget*, 5: 10854-69.
- Yilmaz, M., G. Christofori, and F. Lehembre. 2007. 'Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis', *Trends Mol Med*, 13: 535-41.
- Yoon, H., G. Laxmikanthan, J. Lee, S. I. Blaber, A. Rodriguez, J. M. Kogot, I. A. Scarisbrick, and M. Blaber. 2007. 'Activation profiles and regulatory cascades of the human kallikrein-related peptidases', *J Biol Chem*, 282: 31852-64.
- Yousef, G. M., C. A. Borgono, I. P. Michael, and E. P. Diamandis. 2004. 'Cloning of a kallikrein pseudogene', *Clin Biochem*, 37: 961-7.
- Yousef, G. M., A. Chang, A. Scorilas, and E. P. Diamandis. 2000. 'Genomic organization of the human kallikrein gene family on chromosome 19q13.3-q13.4', *Biochem Biophys Res Commun*, 276: 125-33.
- Yousef, G. M., and E. P. Diamandis. 2001. 'The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease', *Endocr Rev*, 22: 184-204.
- . 2002. 'Human tissue kallikreins: a new enzymatic cascade pathway?', *Biol Chem*, 383: 1045-57.
- . 2003. 'An overview of the kallikrein gene families in humans and other species: emerging candidate tumour markers', *Clin Biochem*, 36: 443-52.
- Yousef, G. M., A. Scorilas, A. Chang, L. Rendl, M. Diamandis, K. Jung, and E. P. Diamandis. 2002. 'Down-regulation of the human kallikrein gene 5 (KLK5) in prostate cancer tissues', *Prostate*, 51: 126-32.
- Yousef, G. M., A. Scorilas, K. Jung, L. K. Ashworth, and E. P. Diamandis. 2001. 'Molecular cloning of the human kallikrein 15 gene (KLK15). Up-regulation in prostate cancer', *J Biol Chem*, 276: 53-61.
- Yousef, G. M., C. Stephan, A. Scorilas, M. A. Ellatif, K. Jung, G. Kristiansen, M. Jung, M. E. Polymeris, and E. P. Diamandis. 2003. 'Differential expression of the human kallikrein gene 14 (KLK14) in normal and cancerous prostatic tissues', *Prostate*, 56: 287-92.
- Zhang, W., J. Ou, Y. Inagaki, P. Greenwel, and F. Ramirez. 2000. 'Synergistic cooperation between Sp1 and Smad3/Smad4 mediates transforming growth factor beta1 stimulation of alpha 2(I)-collagen (COL1A2) transcription', *J Biol Chem*, 275: 39237-45.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Dr. Viktor Magdolen für die Leitung des Projekts, deine unermüdliche Unterstützung und Geduld, die gemütlichen Grillabende, deine tollen Konzerte und dafür, dass du mir ermöglicht hast, meinen wissenschaftlichen Horizont in Australien um ein Vielfaches zu erweitern. Danke auch an meine Betreuerin Dr. Juliane Ramser für deine klugen Ratschläge, die mir häufig eine neue Perspektive auf meine Experimente gegeben haben.

I also want to thank my supervisors in Australia, D/Prof. Judith Clements and Dr Daniela Loessner for your support, guidance and patience. A special thanks goes to Ruth Fuhrman-Luck not only for teaching me how to plan, run and interpret my experiments, but also for your lovely and heartwarming character that makes it a pleasure and a great honor to work with you.

Außerdem möchte ich den früheren und aktuellen Mitgliedern der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik und der Clements Gruppe des TRI danken, insbesondere Sabine Creutzburg für deine geduldigen Anleitungen und Unterstützungen meiner Experimente, Rudi Napieralski für deine unermüdlichen Erklärungen zur qRT-PCR-Auswertung und allen anderen für die tolle Arbeitsatmosphäre, die fachliche Unterstützung, die netten Gespräche, Mittagspausen und die gemeinsamen Kongressteilnahmen.

Ein großer Dank gebührt auch dem Deutschen Akademischen Austauschdienst für die finanzielle Unterstützung des Deutsch-Australischen Netzwerks der Personalisierten Krebsmedizin, die mir einen Forschungsaufenthalt an dem beeindruckenden Translational Research Institute in Brisbane ermöglichte. Danke auch an Dr. Christof Seidl, der diesbezüglich die komplette Organisation übernommen hat. Darüber hinaus möchte ich mich bei der Studienstiftung des Deutschen Volkes und der Manfred Lautenschläger-Stiftung für die finanzielle Unterstützung während meines Studiums bedanken, die es mir ermöglicht hat, so viel Zeit in diese Arbeit zu investieren.

Danke an meine wundervolle Familie, dass ihr mir immer mit Rat und Tat zur Seite standet und die Hoffnung an den Abschluss dieser Arbeit nie aufgegeben haben. Ich liebe euch.

Danke Michi für deine aufmunternde und liebewürdige Art, deine Geduld und die vielen schönen Abende, die mich ermutigt haben, am nächsten Tag weiter zu machen.