

**Fakultät für Medizin der Technischen Universität München**

**KLK4-Expression in humanen Prostatakarzinomzellen  
verändert das  
Expressionsmuster des Zytokins CXCL1**

**Tom-Raphael Schulze**

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

**Doktors der Medizin**

**genehmigten Dissertation.**

**Vorsitz: Prof. Dr. Ernst Rummeny**

**Prüfende der Dissertation:**

**1. apl. Prof. Dr. Viktor Magdolen**

**2. Prof. Dr. Jürgen E. Gschwend**

**Die Dissertation wurde am 30.09.2021 bei der  
Technischen Universität München eingereicht und durch die  
Fakultät für Medizin am 16.03.2022 angenommen.**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>5</b>
Einleitung	5
Methoden	5
Ergebnisse	5
Diskussion	6
<b>Danksagung</b>	<b>6</b>
<b>A - Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>1. Krebserkrankungen im Wandel</b>	<b>7</b>
1.1 Der Kampf gegen den Krebs – Fortschritte und bleibende Bürde	7
1.2 Molekularbiologische Charakteristika von Krebserkrankungen	7
1.3 <i>Tumor Microenvironment</i>	9
<b>2. Das humane Prostatakarzinom</b>	<b>10</b>
2.1 Die physiologische Funktion der Prostata im Reproduktionsvorgang	10
2.2 Epidemiologie des Prostatakarzinoms	11
2.3 Ätiologie und Prävalenz des Prostatakarzinoms	12
2.4 Klinische Symptome des Prostatakarzinoms	14
2.5 Diagnostik des Prostatakarzinoms	15
2.6 Prognose und Therapie des Prostatakarzinoms	16
<b>3. Kallikrein-ähnliche Peptidasen</b>	<b>22</b>
3.1 Bedeutung der Enzyme als Biokatalysatoren	22
3.2 Die Familie der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen	25
3.3 Regulation der KLKs und ihr Platz im Netzwerk der Proteasen	29
3.4 Artificielle Hemmung der Aktivität verschiedener KLKs	31
3.5 KLKs und ihre Rolle im humanen Prostatakarzinom	32
3.6 KLKs als potentielle diagnostische und therapeutische Zielstrukturen beim Prostatakarzinom	32
<b>4. Zielsetzung</b>	<b>33</b>
<b>B - Material und Methoden</b>	<b>35</b>
<b>1. Verwendete Materialien</b>	<b>35</b>
1.1 Verwendete Enzyme	35
1.2 Plasmide zur Herstellung stabiler Transfektanten der Zelllinie PC3	35
1.3 PCR-Primer	35
1.4 TaqMan Probes – Roche Probes	36
1.5 Lösungen und Puffer	36
1.6 Kits	37
1.7 Chemikalien	37
1.8 Verbrauchsmaterialien	38
1.9 Geräte	39
<b>2. Spezifische Inhibitoren der KLK4</b>	<b>39</b>
2.1 UAMC 1399 – ein synthetischer Diphenyl-Phosphonat-Inhibitor der KLK4	39

2.2 SFTI-FCQR Asn <sub>14</sub> – ein modifizierter Peptid-Inhibitor aus dem Samen der Sonnenblume (Helianthus annuus)	40
<b>3. Zellkultur</b>	<b>42</b>
3.1 Zelllinien	42
3.2 Medien, Zusätze, Lösungen	43
3.4 Kontamination durch Mykoplasmen	44
3.5 Stabile Transfektion von PC3-Zellen mit KLK4-Expressionsplasmiden	45
3.6 Zelluläre Assays	45
<b>4. Bestimmung der KLK4-Aktivität</b>	<b>47</b>
4.1 Bestimmung des inhibitorischen Potenzials von KLK4-Inhibitoren	47
4.2 Nachweis von sezernierter KLK4 in Zellkulturüberständen	47
<b>5. PAR-Micro-Array</b>	<b>47</b>
<b>6. Quantifizierung von Genprodukten auf RNA-Ebene</b>	<b>48</b>
6.1 RNA-Präparation	48
6.2 cDNA-Synthese	48
6.3 qPCR-Assays	49
<b>7. Quantifizierung von CXCL1 auf Proteinebene</b>	<b>51</b>
7.1 ELISA	51
7.2 Western Blot	53
<b>8. Statistische Methoden</b>	<b>54</b>
8.1 F-Test	54
8.2 t-Test	54
<b>C - Ergebnisse</b>	<b>55</b>
<b>1. Expression von KLK4 in humanen PC3-Zellen und Auswirkungen auf die Zellproliferation sowie Expression verschiedener Gene des PAR-Signalweges</b>	<b>55</b>
1.1 Transfektion von PC3-Zellen mit KLK4-Expressionsplasmiden	55
1.2 Untersuchung der Effekte von KLK4 auf das Wachstumsverhalten von PC3-Zellen	55
1.3 KLK4 nimmt Einfluss auf die Expression einer Vielzahl von Genen	56
<b>2. Hemmung der proteolytischen Aktivität von KLK4 und Auswirkungen auf die KLK4-assoziierten Effekte</b>	<b>64</b>
2.1 Einsatz des spezifischen KLK4-Inhibitors UAMC 1399 und Auswirkungen einer KLK4-Inhibition auf die Zellproliferation von KLK4-überexprimierenden vs. Vektorkontroll-PC3-Zellen	65
2.2 Auswirkungen der Anwendung des KLK4-spezifischen Inhibitors UAMC 1399 auf die CXCL1-Konzentrationen in Zellkulturüberständen	68
2.3 Hemmung der KLK4-Aktivität mit SFTI-FCQR Asn <sub>14</sub>	69
<b>3. Vergleichbarkeit der Effekte der Expression von Wildtyp-KLK4 mit der Expression von Mutationskonstrukten der KLK4</b>	<b>71</b>
3.1 <i>In-vitro</i> -Mutagenese der KLK4-Mutante delSP	72
3.2 Validierung von PC3-Transfektanten	77
3.3 Effekte der Expression von KLK4-Mutanten	78
<b>D – Diskussion</b>	<b>81</b>
<b>1. KLK4 fördert die Proliferation humaner Prostatakarzinomzelllinien <i>in vitro</i></b>	<b>81</b>
1.1 KLK4 erhöht die Malignität von Tumorzellen durch Rezeptorinteraktionen	81
1.2 KLK4-Expression in humanen Prostatakarzinomzellen supprimiert bzw. induziert die Expression von Genen des PAR-Signalweges	82

1.3 KLK4 reguliert die Expression des proinflammatorischen Zytokins CXCL1 auf Proteinebene	89
<b>2. Spezifische Hemmung von KLK4 bewirkt eine Abschwächung der KLK4-Effekte auf das Wachstumsverhalten und den Metabolismus von PC3-Zellen</b>	<b>95</b>
2.1 Halbwertszeit von UAMC 1399 und praktische Konsequenzen für Zellkulturversuche	95
2.2 UAMC 1399 inhibiert die KLK4-Aktivität und zeigt keine zytotoxischen Effekte	96
2.3 Stabilität und Zytotoxizität von SFTI-FCQR Asn <sub>14</sub> in der Zellkultur	96
2.4 Die proliferationsfördernden Effekte von KLK4 auf Tumorzellen sind von der enzymatischen Aktivität der KLK4 abhängig und lassen sich durch spezifische Inhibition der KLK4 unterdrücken	96
2.5 Die CXCL1-Suppression bei Expression von KLK4 ist abhängig von der enzymatischen Aktivität von KLK4	97
<b>3. Die Expression von KLK4-Mutanten ohne enzymatische Aktivität liefert einen weiteren Hinweis für die Abhängigkeit der CXCL1-Suppression von der enzymatischen Aktivität von KLK4</b>	<b>98</b>
<b>4. Schlussfolgerungen</b>	<b>99</b>
4.1 Mögliche Einflüsse von KLK4 im genetisch heterogenen Prostatakarzinom	99
4.2 Erklärungsansätze für die beschriebenen, unterschiedlichen Ergebnisse einer KLK4-Expression in Prostatakarzinomzellen bei <i>in-vivo</i> - und <i>in-vitro</i> -Experimenten	100
4.3 Grenzen des in der vorliegenden Arbeit durchgeführten experimentellen Ansatzes und mögliche weitere Untersuchungen	101
4.4 Zusammenfassende Darstellung der denkbaren pro- bzw. antitumorigenen Effekte von KLK4 im Prostatakarzinom	102
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>105</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>119</b>
<b>Internetquellen</b>	<b>121</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AML</b>	akute myeloische Leukämie
<b>aPKC</b>	<i>atypical protein kinase C</i>
<b>BPH</b>	benigne Prostatahyperplasie
<b>BSA</b>	<i>bovine serum albumin</i> = bovines Serumalbumin
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>CAF</b>	cancer associated fibroblast
<b>COL1A2</b>	alpha-2-Typ-I-Kollagen
<b>CSF2</b>	<i>colony-stimulating factor 2</i>
<b>CXC</b>	Aminosäuresequenz Cytosin – variable Aminosäure – Cytosin
<b>CXCL</b>	Zytokin der CXC-Familie
<b>CXCR</b>	Rezeptoren der Zytokine der CXC-Familie
<b>DARC</b>	<i>Duffy antigen receptor for chemokines</i>
<b>deISP</b>	KLK4-Mutante mit deletiertem Signalpeptid
<b>DU145</b>	humane Prostatakarzinomzelllinie aus zerebraler Metastase
<b>ECM</b>	<i>extracellular matrix</i> = Extrazellulärmatrix
<b>ELK1</b>	Transkriptionsfaktor der ETS-Familie
<b>ELR</b>	Aminosäuresequenz Glutaminsäure-Leucin-Arginin
<b>ETS</b>	<i>erythroblast transformation specific transcription factor</i>
<b>F2RL2/PAR3</b>	Thrombin-Rezeptor-ähnliches Protein 2/Protease-aktivierter Rezeptor 3
<b>F10</b>	Faktor X – ein Blutgerinnungsfaktor
<b>FCS</b>	<i>fetal calve serum</i> = fetales Kälberserum
<b>FCS I</b>	<i>furin cleavage site I</i> (Aminosäuresequenz KVRRAR)
<b>FCS II</b>	<i>furin cleavage site II</i> (Aminosäuresequenz HRRRRR)
<b>FOXA1</b>	<i>Forkhead Box A1</i> = HNF-3A = <i>hepatocyte nuclear factor 3A</i>
<b>FRMD6</b>	FERM (Band 4.1 ( <b>F</b> ), <b>Ezrin</b> , <b>Radixin</b> , <b>Moesin</b> )-domain-containing protein <b>6</b>

<b>GATA2</b>	<i>GATA binding protein 2</i> – ein Mitglied der Familie der Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren
<b>GIST</b>	gastrointestinaler Stromatumor
<b>Gl./Gll.</b>	Glandula/Glandulae (lat. Bläschen)
<b>GnRH</b>	Gonadotropin-Releasing-Hormon
<b>HER2/neu</b>	<i>human epidermal growth factor 2</i>
<b>HindIII</b>	Restriktionsenzym aus <i>Haemophilus influenzae</i>
<b>HPRT1</b>	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1
<b>HR5</b>	KLK4-Mutante mit <i>furin cleavage site 1</i> („FCS I“)
<b>HuR</b>	<i>human antigen R</i>
<b>IC<sub>50</sub></b>	mittlere inhibitorische Konzentration
<b>IGFBP</b>	<i>insulin-like growth factor binding protein</i>
<b>IKBKB</b>	<i>inhibitor of NFκB kinase subunit beta</i>
<b>IL1β</b>	Interleukin 1β
<b>IL8</b>	Interleukin 8
<b>i.d.R.</b>	in der Regel
<b>i.R.</b>	im Rahmen
<b>KDR</b>	<i>kinase insert domain receptor</i> – ein VEGF-Rezeptor
<b>KIBRA</b>	<i>kidney and brain expressed protein</i>
<b>KLK</b>	Kallikrein-ähnliche Peptidase
<b>KLK4</b>	Kallikrein-ähnliche Peptidase 4/KLK4-exprimierende PC3-Zellen
<b>KLK4wt</b>	Wildtyp der KLK 4
<b>KpnI</b>	Restriktionsenzym aus <i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>LINE</b>	<i>long interspersed nuclear element</i>
<b>LNCap</b>	humane Prostatakarzinomzelllinie aus lymphogener Metastase
<b>LCN2</b>	Lipocalin-2, ein Zytokin
<b>Lu-177</b>	Lutetium-177
<b>MAPK</b>	<i>mitogen-activated protein kinase</i>

<b>Merlin</b>	<i>moesin-ezrin-radixin-like protein</i>
<b>MSR</b>	<i>mammalian wide interspersed repeat</i>
<b>NFκB</b>	<i>nuclear factor kappa B</i>
<b>n. s.</b>	nicht signifikant
<b>PAR</b>	<i>protease activated receptor</i>
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i>
<b>PC3</b>	humane Prostatakarzinomzelllinie aus einer ossären Metastase
<b>PLG</b>	Plasminogen
<b>PLZF</b>	<i>promyelocytic leukemia zinc finger protein</i>
<b>PROC</b>	Protein C
<b>PSA</b>	prostataspezifisches Antigen = KLK3
<b>Ra-223</b>	Radium-223
<b>RLT</b>	RNA-Zell-Lyse-Puffer (Qiagen, Hilden, D)
<b>RSV</b>	Vektorkontrollzelllinie
<b>RUPL</b>	Roche Universal Probe Library
<b>S195A</b>	KLK4-(active-site)-Mutante mit Serin-zu-Alanin-Mutation in Position 195
<b>SINE</b>	<i>short interspersed nuclear element</i>
<b>syn.</b>	Synonym
<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA
<b>Taq-Polymerase</b>	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
<b>TBS</b>	<i>Tris-buffered saline</i>
<b>TME</b>	<i>tumor microenvironment</i>
<b>TNM-Status</b>	UICC-Klassifikation maligner Tumoren: <i>tumor status, nodal status, metastasis</i>
<b>TUR-P</b>	transurethrale Prostataresektion
<b>UICC</b>	<i>union internationale contre le cancer</i>
<b>uPAR</b>	<i>urokinase-type plasminogen activator receptor</i>
<b>u.U.</b>	unter Umständen
<b>3'/5'-UTR</b>	<i>3'/5' untranslated region</i>

<b>VEGF</b>	<i>vascular endothelial growth factor</i>
<b>vs.</b>	<i>versus</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>
<b>WPMY1</b>	Stromazelllinie aus gesundem Prostatagewebe
<b>XbaI</b>	Restriktionsenzym aus <i>Xanthomonas badrii</i>
<b>YAP</b>	<i>yes-associated protein</i> , eine nicht-Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinase
<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>z.T.</b>	zum Teil



## Zusammenfassung

### Einleitung

Das humane Prostatakarzinom ist in Deutschland die häufigste Tumorentität beim Mann. Trotz verbesserter Behandlungsmöglichkeiten in den letzten Jahren ist es hierzulande zudem nach wie vor die dritthäufigste Krebstodesursache. Seit einigen Jahren wird die Bedeutung der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen für die Entwicklung und die Malignität von Tumorerkrankungen erforscht. Der Kallikrein-ähnlichen Peptidase 4 (KLK4) wurde dabei eine bedeutende Rolle in der Pathogenese und dem Tumorprogress des humanen Prostatakarzinoms zugeschrieben.

### Methoden

In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurden mittels Microarray-Analysen zunächst Gene identifiziert, die in Zusammenhang mit Protease-aktivierten Rezeptoren (PARs) stehen und deren Expression durch die Expressionshöhe von KLK4 beeinflusst werden. Hierzu wurden Zellen einer humanen Prostatakrebszelllinie (PC3) entweder mit einem KLK4-Expressionsvektor oder dem Vektor allein transfiziert. Anschließend wurden die Auswirkungen einer KLK4-Expression auf die Zellproliferation sowie die Expression von Genen des PAR-Signalweges - insbesondere des proinflammatorischen Zytokins CXCL1 - mittels Zellkulturexperimenten, qPCR und ELISA und Western Blot untersucht. In einem weiteren Schritt wurden Versuche mit spezifischen Inhibitoren von KLK4 (UAMC 1399 und SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub>) durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich die KLK4-assoziierten Effekte hierdurch aufheben lassen. Schließlich wurden PC3-Zellen auch mit Mutationskonstrukten der KLK4 transfiziert und auf ihre Eigenschaften bzgl. Proliferationsverhalten, Expression von CXCL1 und die Auswirkungen einer KLK4-Inhibition auf diese Befunde untersucht.

### Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass PC3-Zellen durch eine Expression von KLK4 verstärkt proliferieren. Dieser Effekt lässt sich durch die Anwendung von spezifischen KLK4-Inhibitoren signifikant verringern. KLK4 beeinflusst zudem die Expression einer Reihe von Genen des PAR-Signalweges. Eines dieser Gene kodiert für das Cytokin CXCL1, dessen Expression durch KLK4-Expression signifikant supprimiert wird. Dieser Effekt wird insbesondere durch Anwendung des KLK4-Inhibitors SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> unterdrückt. Sowohl die Versuche mit spezifischen Inhibitoren der KLK4 als auch Experimente mit KLK4-Mutationskonstrukten sprechen zwar für wichtige Rolle der enzymatischen KLK4-Aktivität für die beobachteten Effekte, liefern jedoch auch Hinweise für nicht-enzymatische bzw. intrazelluläre Effekte von KLK4.

## Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass KLK4 die Expression von CXCL1 supprimiert, wohl einerseits durch ihre enzymatische Aktivität, andererseits auch durch andere, bislang unbekannte Mechanismen. CXCL1 ist bei einer Reihe an Tumorerkrankungen mit einer schlechten Prognose assoziiert. Im Lichte der jüngeren Untersuchungen am Mausmodell durch Tse et al. (2020) muss die bisher vorherrschende Einordnung von KLK4 als konsequent malignitätsfördernd in Frage gestellt werden. Möglicherweise könnte KLK4 über eine Suppression der Expression von Zytokinen und damit einer Unterdrückung tumorassoziierter, fehlregulierter inflammatorischer Aktivität auch antitumorigene Effekte vermitteln.

## Danksagung

Der Beginn der vorliegenden Arbeit mit den ersten Tagen im Labor der klinischen Forschergruppe der Frauenklinik am Klinikum Rechts der Isar liegt nun einige Jahre zurück und ist doch noch in sehr guter Erinnerung. Als Medizinstudent begibt man sich in eine weitgehend unbekannte Welt und ist dabei auf die Hilfe zahlreicher Menschen angewiesen. Ich möchte mich ganz herzlich bei all jenen bedanken, die mir mit viel Geduld und Einsatz dabei geholfen haben, diese Arbeit zu verwirklichen. Allen voran möchte ich Susanne Sölch, Dominik Alterauge, Sabine Creutzburg und Anke Bengel nennen, die mir im Laboralltag alle so unkompliziert und mit viel Geduld geholfen haben. Susanne Sölch, Dominik Alterauge, Tobias Dreyer, sowie Julia Hingerl und Julia Miller möchte ich auch für zahlreiche gesellige Mittagspausen und Gespräche danken, die den Laboralltag besonders kurzweilig gemacht haben.

Neben der Bekanntschaft mit all diesen wichtigen Helfern im Labor habe ich großes Glück meinem Doktorvater, Prof. Viktor Magdolen, begegnet zu sein. Er passt in so vieler Hinsicht nicht in die vorurteilsbehaftete Schublade vom unnahbaren Betreuer. Auch wenn du ein vielbeschäftigter Mann bist, Viktor, hast du dir immer Zeit genommen, um all die Dinge zu besprechen, die für den erfolgreichen Weg durch ein solches Projekt nötig sind. Zudem hast du mich von Anfang an und immer wieder mit deiner Faszination für das Thema begeistert. Vielen Dank für die spannende Winter School in Tiers, eine großartige Kongressreise nach Brisbane, all die geselligen Abende, deinen Humor und deine unglaubliche Lebensfreude, die du immer wieder mit uns teilst!

Zu guter Letzt möchte ich noch von ganzem Herzen meiner Frau danken, die mich all die Jahre trotz manchmal schwieriger Zeiten immer großartig unterstützt hat. Du bist die Größte!

## **A - Einleitung**

### **1. Krebserkrankungen im Wandel**

#### **1.1 Der Kampf gegen den Krebs – Fortschritte und bleibende Bürde**

Trotz großer Anstrengungen der Krebsforschung in den letzten Jahrzehnten gehören maligne Erkrankungen heutzutage immer noch zu den großen Bürden der Menschheit. In Deutschland sterben jedes Jahr etwa eine halbe Million Menschen an Krebs. Daher nehmen Krebserkrankungen in weiten Teilen der westlichen Welt hinter den Herz-Kreislauf-Erkrankungen nach wie vor den zweiten Platz in der Todesursachenstatistik ein (Kaatsch et al., 2015).

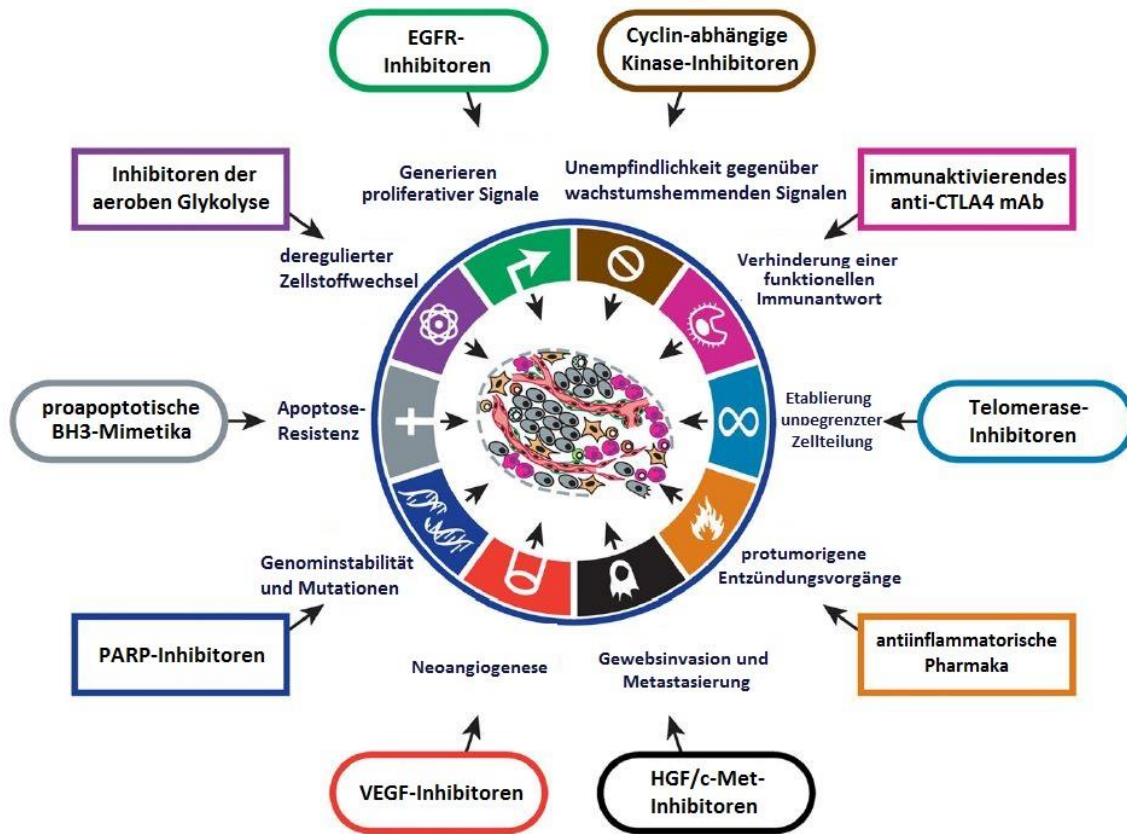
In 21 Staaten der USA hat Krebs sogar die Herz-Kreislauf-Erkrankungen als klassische führende Todesursache der Industrienationen verdrängt. Dies ist in erster Linie darauf zurückzuführen, dass die Morbidität und Letalität kardiovaskulärer Erkrankungen über die letzten Jahre deutlich verringert werden konnten. Landesweit sind Krebserkrankungen in den USA nach wie vor die zweithäufigste Todesursache. Als positive Entwicklung konnte dort die Inzidenz der Krebs-Neuerkrankungen unter Männern zwischen 2009 und 2012 um 3,1 %/Jahr gesenkt werden, was vor allem auf eine verbesserte und frühere Diagnostik von Prostatakrebs zurückzuführen ist (Siegel et al., 2016).

#### **1.2 Molekularbiologische Charakteristika von Krebserkrankungen**

Eine zentrale Eigenschaft von maligne entarteten Tumorzellen im Vergleich zu den Zellen eines gesunden Gewebes liegt darin, dass erstere eine unkontrollierte Proliferation aufweisen. Damit steuern sie ihre eigene Vermehrung, welche bei normalen (gesunden) Zellen durch verschiedenste intra- wie extrazelluläre Mechanismen effektiv kontrolliert wird. Durch den Verlust der Proliferationskontrolle werden letztlich die Architektur des gesunden Gewebes, in dem der Tumor sich ausbreitet, zerstört, und zahlreiche für Krebserkrankungen typische Eigenschaften begründet (Fedi, 1997; Hanahan & Weinberg, 2000; Weinberg, 2014).

Mit der Formulierung der Kennzeichen von Krebserkrankungen, wie etwa der Genominstabilität, der Deregulierung des Zellstoffwechsels oder der Resistenz gegenüber apoptotischen Mechanismen u. A. durch Hanahan und Weinberg im Jahr 2000 wurde ein konzeptuelles Verständnis von Krebserkrankungen begründet, beruhend auf den Erkenntnissen jahrzehntelanger, intensiver Krebsforschung. Dieser Zugang zu den zunächst sehr heterogen erscheinenden Krebserkrankungen des Menschen vereint gemeinsame molekularbiologische Charakteristika in sechs fundamentalen Säulen (Hanahan & Weinberg, 2000). Die Kennzeichen von Krebserkrankungen wurden 2011 in einer überarbeiteten

Fassung veröffentlicht, mit nunmehr zehn Eigenschaften, die einen Großteil der Krebserkrankungen charakterisieren (Hanahan & Weinberg, 2011). Abbildung 1 veranschaulicht diese Eigenschaften.



**Abbildung 1: Kennzeichen von Krebserkrankungen und pharmakologische Angriffspunkte.**

Die meisten Krebserkrankungen weisen Charakteristika auf, die den Krebszellen Vorteile im Wachstum gegenüber den Zellen des umliegenden, gesunden Gewebes verschaffen, sie vor programmiertem Zelltod wie auch dem Immunsystem schützen und zudem ihre Ausbreitung im Organismus ermöglichen. Diese verschiedenen Charakteristika stellen eine Vielzahl an denkbaren pharmakologischen Angriffspunkten dar (bearbeitet nach: Hanahan und Weinberg, 2011).

Aus einem teleologischen Blickwinkel entsprechen die von Hanahan & Weinberg (2000) aufgestellten Kennzeichen von Krebserkrankungen (*hallmarks*) Strategien von maligne entarteten Zellen, welche diese in einem mehrstufigen Prozess auf der Grundlage struktureller Veränderungen im Genom entwickeln. Die Mehrstufigkeit einer malignen Entartung benötigt bei einem Großteil der Krebserkrankungen des Menschen zwischen vier und sieben Mutationsereignisse, um eine Umwandlung von normalen zu maligne transformierten Zellen zu vollziehen (Renan, 1993). Dabei folgt die Mehrstufig-

keit dem Konzept der biologischen Evolution: Jede Mutation in einer Zelle, die dieser einen Wachstums- und Überlebensvorteil verschafft, führt zu einer positiven Selektion dieser genetischen Veränderung (Hanahan & Weinberg, 2000).

Die Veränderungen betreffen Regulationsmechanismen der Zellteilung und –homöostase und können einerseits den Verlust einer Funktion bewirken (*loss of function*), z.B. den Verlust einer adäquaten Zellzyklus-Regulierung. Dabei handelt es sich um rezessive Mutationen, d.h. beide Allele eines Gens müssen betroffen sein, um die Funktion vollständig auszuschalten. Andererseits ist auch der Hinzugewinn einer Funktion möglich (*gain of function*), wie z.B. das selbstständige Generieren von Wachstumsstimuli, oder ein autarkes Migrationsverhalten im Gewebekontext. Dabei verhalten sich die entsprechenden Mutationen dominant, d.h. für den Hinzugewinn einer Funktion reicht eine Mutation eines Allels eines Gens aus (Hanahan & Weinberg, 2000).

Die Kennzeichen von Krebserkrankungen in ihrer ursprünglichen Fassung beinhalten die Unabhängigkeit von externen Wachstumsstimuli (*self-sufficiency in growth-signals*), die Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen (*insensitivity to anti-growth signals*), die Vermeidung von Apoptose (*evading apoptosis*), eine das Tumorwachstum unterstützende Angiogenese (*sustained angiogenesis*), ein unbegrenztes proliferatives Potenzial (*unlimited replicative potential*) sowie die Gewebsinvasion und Metastasierung (*tissue invasion and metastasis*). Die erweiterte Fassung beinhaltet als Charakteristika zudem eine Deregulierung des zellulären Energiestoffwechsels (*deregulating cellular energetics*) und den Schutz vor der körpereigenen Immunabwehr (*avoiding immune destruction*). Als Faktoren, welche die maligne Entartung von Zellen forcieren (*enabling characteristics*), wurden einerseits genomische Instabilität (*genomic instability*) und andererseits ein protumorigenes Entzündungsgeschehen (*tumor promoting inflammation*) definiert (Hanahan & Weinberg, 2011).

### 1.3 Tumor Microenvironment

Von besonderer Bedeutung bei der Entwicklung von Tumoren ist ferner, dass sie keine homogenen Gebilde aus maligne entarteten Zellen darstellen. Vielmehr sind Tumore als komplexe Gewebe zu verstehen, in denen sowohl genotypisch heterogene entartete, als auch eine Vielzahl von nicht entarteten Zellen zu finden sind. Letztere werden durch die Tumorzellen zur Ausbildung des Tumorstromas rekrutiert, und sind damit aktiv an der Entwicklung der Kennzeichen von Krebserkrankungen und damit des Tumors beteiligt. Gemeinsam mit den eigentlichen Tumorzellen bilden die Zellen des Tumorstromas das *tumor microenvironment* (TME). So können zum Beispiel Zellen des Tumorstromas

von Tumorzellen zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren angeregt werden, welche die Proliferation der Tumorzellen steigern (Hanahan & Weinberg, 2011).

Eine zentrale Rolle bei Tumorerkrankungen spielen sogenannte CAF (*cancer associated fibroblasts*). Dies sind ursprünglich physiologische Bindegewebszellen, die unter dem Einfluss der maligne entarteten Tumorzellen „umprogrammiert“ werden. Der Vorgang wird unter anderem durch die Sezernierung von Aktivin A durch die Tumorzellen eingeleitet; in der Folge wird die CD36-Expression der Fibroblasten reprimiert und eine ganze Reihe von Funktionen, die essenziell für die Etablierung des TME sind, werden ermöglicht. Dazu gehören etwa die vermehrte Sezernierung bestimmter ECM-Komponenten wie Fibronectin und Kollagen, eine gesteigerte Angiogenese und die Ausrichtung auf einen anaeroben und Glykolyse-basierten Stoffwechsel. CAFs können im Zuge der Umprogrammierung selbst Charakteristika ausbilden, die mit jenen von maligne entarteten Zellen vergleichbar sind, wie etwa eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit und eine Entkoppelung von antiproliferativen Signalen (Gascard & Tlsty, 2016).

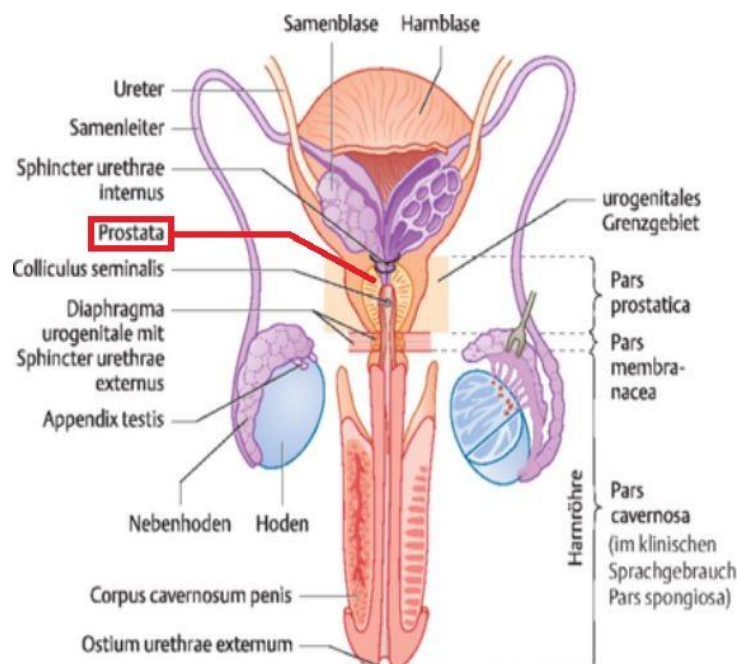
## 2. Das humane Prostatakarzinom

### 2.1 Die physiologische Funktion der Prostata im Reproduktionsvorgang

Die Weitergabe der Erbinformation geschieht beim Menschen durch die Vereinigung einer weiblichen mit einer männlichen Geschlechtszelle. Dieser Vorgang findet im weiblichen Geschlechtstrakt statt, wobei die männlichen Spermien im Rahmen des Geschlechtsaktes den Weg zur weiblichen Eizelle zurücklegen müssen. Das Transportmedium für die Spermien während des Geschlechtsaktes ist das Ejakulat. Hierbei handelt es sich um eine Vermischung von Spermien mit den Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen (Nieschlag, 2008).

Im Rahmen der Ejakulation wird der Samenflüssigkeit aus dem Samengang das Sekret der akzessorischen Geschlechtsdrüsen – beim Menschen Prostata, Samenbläschen, bulbourethrale Drüsen, urethrale Drüsen (Abb. 2 und 4) – beigemischt. Das Sekret enthält eine Vielzahl an gelösten Stoffen, deren Funktion nicht in jedem Fall geklärt ist. Das prostataspezifische Antigen/die Kallikrein-ähnliche Peptidase 3 (= PSA/KLK3), das der Samenbläschen unter anderem das Matrixprotein Semenogelin. Semenogelin aktiviert die Proteaseaktivität von KLK3 durch Bindung von Zink-Ionen, die als physiologischer Inhibitor von KLK3 wirken. Die Proteaseaktivität von KLK3 spaltet nachfolgend die Gelmatrix des Semenogelins. Die Spaltung bewirkt die Verflüssigung des zunächst viskosen Ejakulats und somit die

freie Motilität der Spermatozoen. Die reifen Spermatozoen aus dem Samengang sind jedoch auch ohne die Beimengung des Sekrets der akzessorischen Geschlechtsdrüsen fertil (Nieschlag, 2008).

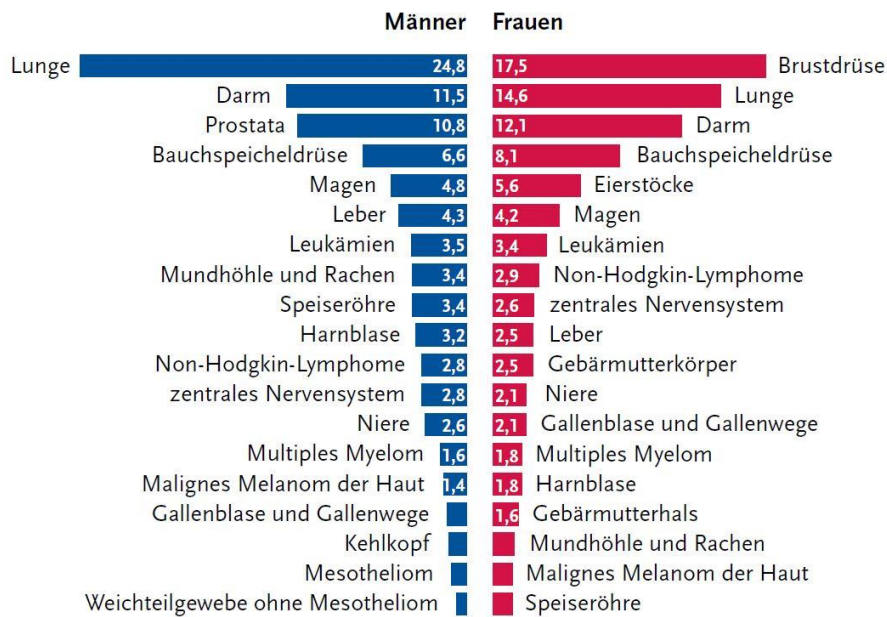


**Abbildung 2: Lage der Prostata im männlichen Urogenitaltrakt.**

Die Prostata umgibt als größte der akzessorischen Geschlechtsdrüsen des Mannes die Harnröhre direkt ab ihrem Abgang aus der Harnblase (Pars prostatica der Harnröhre). Das Prostatakarzinom stellt in Deutschland die häufigste Tumorentität des Mannes dar (modifiziert nach: Keil, 2014).

## 2.2 Epidemiologie des Prostatakarzinoms

Unter den Krebserkrankungen des Menschen nimmt das Prostatakarzinom eine bedeutende Stellung ein. Beim Mann sind die bösartigen Prostataneoplasien die häufigste maligne Tumorentität in Deutschland, mit einer geschätzten Neuerkrankungsrate von ca. 63.700 für das Jahr 2016. Daneben ist Prostatakrebs beim Mann die dritthäufigste Krebstodesursache (Kaatsch et al., 2015). In den USA erkrankten 2016 ca. 180.900 Männer am Prostatakarzinom (Siegel et al., 2016). Abbildung 3 zeigt die Häufigkeiten der durch Tumorerkrankungen verursachten Todesfälle bei Männern und Frauen in Deutschland für das Jahr 2012.



**Abbildung 3: Häufigkeiten (%) der durch Tumorerkrankungen verursachten Todesfälle bei Männern und Frauen in Deutschland für das Jahr 2012.**

Während Prostatakrebs bei Männern in Deutschland zwar die häufigste Tumorerkrankung darstellt, nimmt er auf der Rangliste der Todesursachen durch Krebserkrankungen nur Platz 3 ein. Die selteneren Tumorerkrankungen der Lunge zeichnen sich dagegen durch eine schlechtere Prognose aus und verursachen die meisten tumorassoziierten Todesfälle bei Männern. Lebensstilbedingt treten bei Frauen die Tumorerkrankungen der Lunge seltener auf, hier nimmt der Brustkrebs die führende Stellung der Todesursachen ein (Quelle: Kaatsch, 2015).

### 2.3 Ätiologie und Prävalenz des Prostatakarzinoms

Bisher ist noch wenig über die Risikofaktoren des Prostatakarzinoms bekannt. Als gesichert gilt ein erhöhtes Risiko für eine Erkrankung mit zunehmendem Alter. Während die Wahrscheinlichkeit, in jüngeren Lebensjahren am Prostatakarzinom zu erkranken, sehr gering ist, steigt die Inzidenz ab dem 50. Lebensjahr an. Das 10-Jahres-Risiko einer Neuerkrankung beträgt dabei für einen 35-Jährigen 0,6 %, für einen 75-Jährigen dagegen bereits 6 % (Kaatsch et al., 2015). Durch die häufig lange asymptomatisch bleibenden Verläufe bei älteren Patienten findet sich z.T. eine hohe Prävalenz in späteren Lebensaltern (z.B. bei Obduktionen von aus anderem Grund verstorbenen Patienten). Diese beträgt jenseits des 70. Lebensjahres ca. 70 % und für über 80-Jährige ca. 80 % (Keil, 2014). Bis zu 40 % der Fälle von Prostatakarzinom könnten einen genetischen Hintergrund haben (Gronberg, 2003).

Zudem beeinflussen Lebensgewohnheiten und -umstände das Auftreten und die Letalität der Erkrankung. Während das Prostatakarzinom unter Schwarzafrikanern zwar seltener als bei Weißen auftritt, ist die diesbezügliche Letalität in Afrika höher, bedingt durch eine schlechtere medizinische Versor-



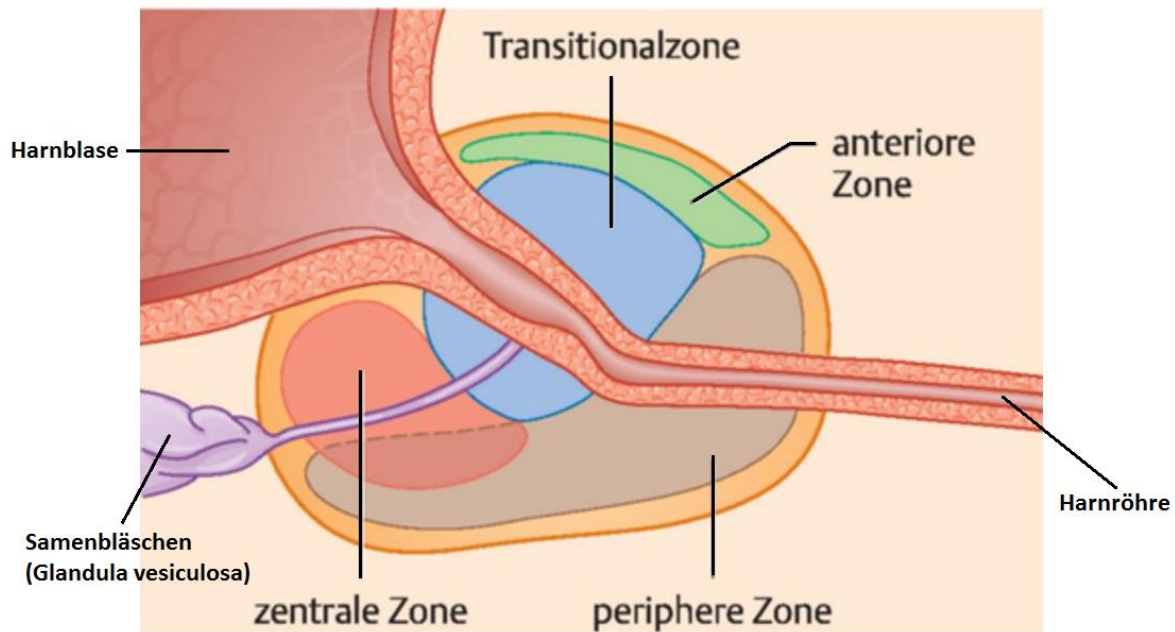
gungssituation (Barnes et al., 2016). Asiaten erkranken ebenfalls seltener als Weiße, jedoch sind diese Unterschiede auch den unterschiedlichen Lebensgewohnheiten geschuldet. Je länger etwa südostasiatisch-stämmige Immigranten ihren Lebensmittelpunkt auf dem nordamerikanischen Kontinent haben, desto stärker gleicht sich die Wahrscheinlichkeit, am Prostatakarzinom zu erkranken, innerhalb dieser Bevölkerungsgruppe zunehmend jener der nordamerikanischen Bevölkerung an (*odds ratio* für Südasiaten bei Ankunft in Nordamerika 0,67 [weiße Nordamerikaner = 1], bei Ankunft 1960-69 0,82, bei Ankunft 1930-39 0,93; McDonald et al., 2017).

Bei der Pathogenese des Prostatakarzinoms ist die Unterteilung der Prostata in verschiedene Zonen von Bedeutung. Abbildung 4 veranschaulicht die zonale Gliederung der Prostata in ihrer Lage um die männliche Harnröhre. Während das Prostatakarzinom v.a. in der Transitionalzone entsteht, wird die gutartige Prostatavergrößerung in erster Linie durch eine Organvergrößerung in der peripheren Zone bedingt. Bei diesem Krankheitsbild, das ausgeprägte Miktionsstörungen zur Folge haben kann, wird die Prostata i.d.R. nur minimal-invasiv i.R. einer TUR-P (transurethrale Resektion der Prostata) verkleinert, wobei ein gewisser Rest des Prostatagewebes, inkl. der Transitionalzone und der Organkapsel, erhalten bleiben. Dies hat zur Folge, dass sich auch nach der weitgehenden Resektion der Prostata noch ein Prostatakarzinom entwickeln kann (Keil, 2014).

Während es Hinweise gibt, die der Serinprotease KLK4 eine protumorigene Wirkung bei der Pathogenese des Prostatakarzinoms zusprechen, ist noch nicht geklärt, auf welche Weise das Enzym *in vivo* tatsächlich zur malignen Entartung und Ausprägung der Malignität beitragen könnte (Obiezu et al., 2006; Gao et al., 2007; Mize et al., 2008; Ramsay et al., 2008; Prassas et al., 2015).

Möglicherweise wird die Pathogenese des Prostatakarzinoms durch Variationen des Gens, das für KLK4 kodiert, beeinflusst. In den vergangenen Jahren wurden mehrere *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) identifiziert, die möglicherweise einen Effekt auf die Aktivität des Enzyms haben, und so das Risiko modifizieren könnten, am Prostatakarzinom zu erkranken. SNPs sind Mutationen eines einzelnen Nukleotids im Genom, die über mehrere Generationen hinweg stabil bleiben und für einen Großteil der genetischen Vielfalt verantwortlich gemacht werden. Im menschlichen Genom finden sich schätzungsweise 3-4 Millionen solcher SNPs (*Lexikon der Biologie*, 1999; Heinrich et al., 2014; Y. Liu et al., 2018). Für das humane Prostatakarzinom existieren sowohl SNPs, die das Erkrankungsrisiko erhöhen, als auch solche, denen protektive Eigenschaften zugeschrieben werden (MacArthur et al., 2017).

Protektiv auf das Erkrankungsrisiko wirken sich Bewegung und gesunde Ernährung aus, dagegen bewirkt die Einnahme von Vitamin-E-haltigen Nahrungsergänzungsmitteln eine Erhöhung des Erkrankungsrisikos (Kaatsch et al., 2015).



**Abbildung 4: Zonale Gliederung der Prostata.**

Das Prostatakarzinom entwickelt sich bevorzugt in der Transitionalszone, welche die Harnröhre unterhalb des Blasenhalses umgibt. Dagegen entsteht die benigne Prostatahyperplasie (BPH) in erster Linie in der kaudal gelegenen peripheren Zone. Daher ist nach einer TUR-P (transurethrale Prostataresektion, bei welcher die Prostata minimal-invasiv, d.h. endoskopisch und ohne Hautschnitt über die Harnröhre verkleinert wird), wie sie zur Behandlung von gravierenden Miktionsstörungen bei der BPH zur Anwendung kommt, durchaus noch die Entwicklung eines Karzinoms möglich, auch wenn bereits ein Großteil des Organs entfernt wurde (modifiziert nach: Keil, 2014).

## 2.4 Klinische Symptome des Prostatakarzinoms

In frühen Stadien der Erkrankung sind selten Symptome beobachtbar. Typische Symptome, die auf ein Prostatakarzinom hindeuten können, wie obstruktive Miktionsstörungen (Abminderung des Harnstrahls), irritative Miktionsstörungen (häufiger Harndrang bei geringem Harnvolumen [Pollakisurie], schmerzhafte Blasenentleerung [Dysurie], vermehrt nächtlicher Harndrang [Nykturie] wie auch Blut im Urin [Hämaturie], Harnverhalt und Nierenstauung bis hin zur Niereninsuffizienz, treten ähnlich auch bei der benignen Prostatahyperplasie auf. Darüber hinaus kann eine bereits fortgeschrittene, nicht mehr lokal begrenzte Erkrankung durch Schmerzen im Bereich der Lendenwirbelsäule (Lumbago) als primäres Symptom bei symptomatischen Knochenmetastasen in Erscheinung treten. Die besondere Situation, bei der bei einem Patienten bereits symptomatische Knochenmetastasen vorliegen, die Untersuchung der Prostata jedoch einen unauffälligen Tastbefund ergibt, wird als okkultes Prostatakarzinom bezeichnet (Keil, 2014).

## 2.5 Diagnostik des Prostatakarzinoms

Im deutschen Gesundheitswesen wird von den gesetzlichen Krankenkassen ab dem 45. Lebensjahr eine jährliche Untersuchung erstattet, welche die digital-rektale Tastuntersuchung der Prostata und entsprechende Fragen nach Miktionsstörungen oder sonstigen Auffälligkeiten beinhaltet (siehe 2.4). In den meisten Fällen wird das Prostatakarzinom heutzutage früh in den Tumorstadien T1 und T2, z.B. durch eine Tastuntersuchung oder einen auffälligen PSA-Wert diagnostiziert (Kaatsch, 2015). Bei unklaren oder suspekten Befunden wird die Tastuntersuchung durch transrektale oder transabdominelle Ultraschall-Untersuchungen ergänzt. Liefern auch diese Methoden keine eindeutigen Befunde, kann auch eine CT- oder MRT-Untersuchung durchgeführt werden. Differentialdiagnostisch bedeutsam ist vor allem eine Abgrenzung zur gutartigen Prostatahyperplasie, welche beim Mann in späteren Lebensjahrzehnten ebenfalls sehr häufig auftritt, jedoch keine obligate Präkanzerose darstellt. Die Therapie der gutartigen Prostatahyperplasie besteht je nach Organvolumen in einer Medikation zur Verbesserung der Miktion, oder aber einer endoskopischen oder offenen Organresektion (Keil, 2014).

Die Diagnostik des Prostatakarzinoms hat sich durch die Bestimmung des Serum-PSA-Wertes (prostataspezifisches Antigen/Kallikrein-ähnliche Peptidase 3) deutlich verbessert. Hierbei gelten einerseits erhöhte Werte, z.B. Serum-PSA > 3,5 ng/mL bei Patienten > 60. Lebensjahr, aber auch eine erhöhte *PSA-velocity*, d.h. ein dynamisch steigender PSA-Wert als suspekt (Keil, 2014). In einer retrospektiven Studie analysierten Berger et al. (2007) den Verlauf der PSA-Werte von 4800 Patienten, von denen im Beobachtungszeitraum von 10 Jahren bei 528 ein Prostatakarzinom diagnostiziert wurde. Bei jenen Patienten, bei denen kein Prostatakarzinom diagnostiziert wurde, stieg der PSA-Wert in 10 Jahren um durchschnittlich 0,03 ng/mL/Jahr. Bei den Patienten, die an Prostatakrebs erkrankten, stieg der Wert in den ersten 8 von 10 Jahren vor der Diagnose dagegen um durchschnittlich 0,225 ng/mL/Jahr, in den letzten zwei Jahren vor der Diagnose um 0,98 ng/mL/Jahr.

Nach wie vor ist nicht abschließend geklärt, ob eine flächendeckende Anwendung des PSA-Werts als Screening-Instrument sinnvoll ist, da das Verfahren stets auch falsch positive Ergebnisse liefert. Der PSA-Wert korreliert in erster Linie mit der Prostatagröße sowie mit der entzündlichen Aktivität des Organs. Erhöhte PSA-Werte finden sich auch bei der benignen Prostatahyperplasie, der Prostatitis und nach Manipulationen an der Prostata, z.B. i.R. von Vorsorgeuntersuchungen (Keil, 2014).

Diese eingeschränkte Spezifität des PSA-Werts kann zu ungerechtfertigter invasiver Diagnostik oder zu operativen Eingriffen bis hin zur Prostatektomie führen, verbunden mit dem Risiko von Komplikationen wie etwa Infektionen, Harn- oder Stuhlinkontinenz, Infertilität oder Impotenz. Daher wird

intensiv an der Entwicklung neuer, zuverlässigerer diagnostischer Marker gearbeitet. Aktueller Gegenstand der Forschung sind zum Beispiel verschiedene SNPs (s. auch 2.3.) in bestimmten Genen, wie etwa der Serinprotease KLK4. Diese Mutationen im KLK4-Gen stehen im Verdacht, das Risiko der Entwicklung eines Prostatakarzinoms zu beeinflussen, indem sie Einfluss auf die Expression auch anderer Gene als jenem der KLK4 selbst nehmen (Grin et al., 2015; Cancer\_Discovery, 2016; MacArthur et al., 2017). In der aktuellen interdisziplinären S3-Leitlinie für das Prostatakarzinom, die evidenzbasierte Informationen für die klinische Praxis von Diagnostik und Therapie der Erkrankung bereitstellt, werden diese neuen Erkenntnisse jedoch noch nicht berücksichtigt (Roigas & Krege, 2016).

Sowohl die Prognose als auch die Therapie eines neu diagnostizierten Prostatakarzinoms hängen wesentlich vom vorliegenden Krankheitsstadium ab. Beim Prostatakarzinom wird neben der Einteilung der Erkrankung in TNM-Stadien (Tabelle 1) und dem klassischen WHO-Grading der zellulären Differenzierung noch ein spezielles Klassifikationssystem verwendet, der sog. Gleason-Score. Dieser ist prognostisch wesentlich aussagekräftiger und daher für klinische Entscheidungen die bessere Grundlage (Keil, 2014). Im Gegensatz zur TNM-Klassifikation kann der Gleason-Score erst nach Resektion der Prostata histopathologisch ermittelt werden. Der Gleason-Score eines OP-Präparates orientiert sich dabei an den beiden im Tumorpräparat am häufigsten vorliegenden Drüsentypen. Diesen beiden Formen wird dann jeweils ein Zahlenwert (je höher der Grad der Entdifferenzierung, desto höher die Zahl) zugeordnet, und die beiden Werte addiert. Der Gleason-Score liegt dementsprechend zwischen den Werten „2“ = beide hauptsächlich vorliegenden Drüsentypen gut differenziert und „10“ = beide hauptsächlich vorliegenden Drüsentypen schlecht differenziert (Keil, 2014).

## **2.6 Prognose und Therapie des Prostatakarzinoms**

### *2.6.2 Prognose*

Die 5-Jahres-Überlebensrate des Prostatakarzinoms ist im Vergleich zu zahlreichen anderen Tumorentitäten mit 93 % günstig. Abbildung 5 zeigt die 5- und 10-Jahres-Überlebensraten der häufigsten Tumorentitäten für Deutschland in den Jahren 2011 und 2012 (Kaatsch et al., 2015).

### *2.6.1 Therapie*

Die Therapie des Prostatakarzinoms erfolgt in Deutschland in Abstimmung mit den Vorgaben der aktuellen S3-Leitlinie von 2018. Sie erfolgt stadienadaptiert, wobei in die Auswahl der Maßnahmen auch die allgemeine Lebenserwartung des Patienten mit einfließen sollte. Bei einer allgemeinen Le-

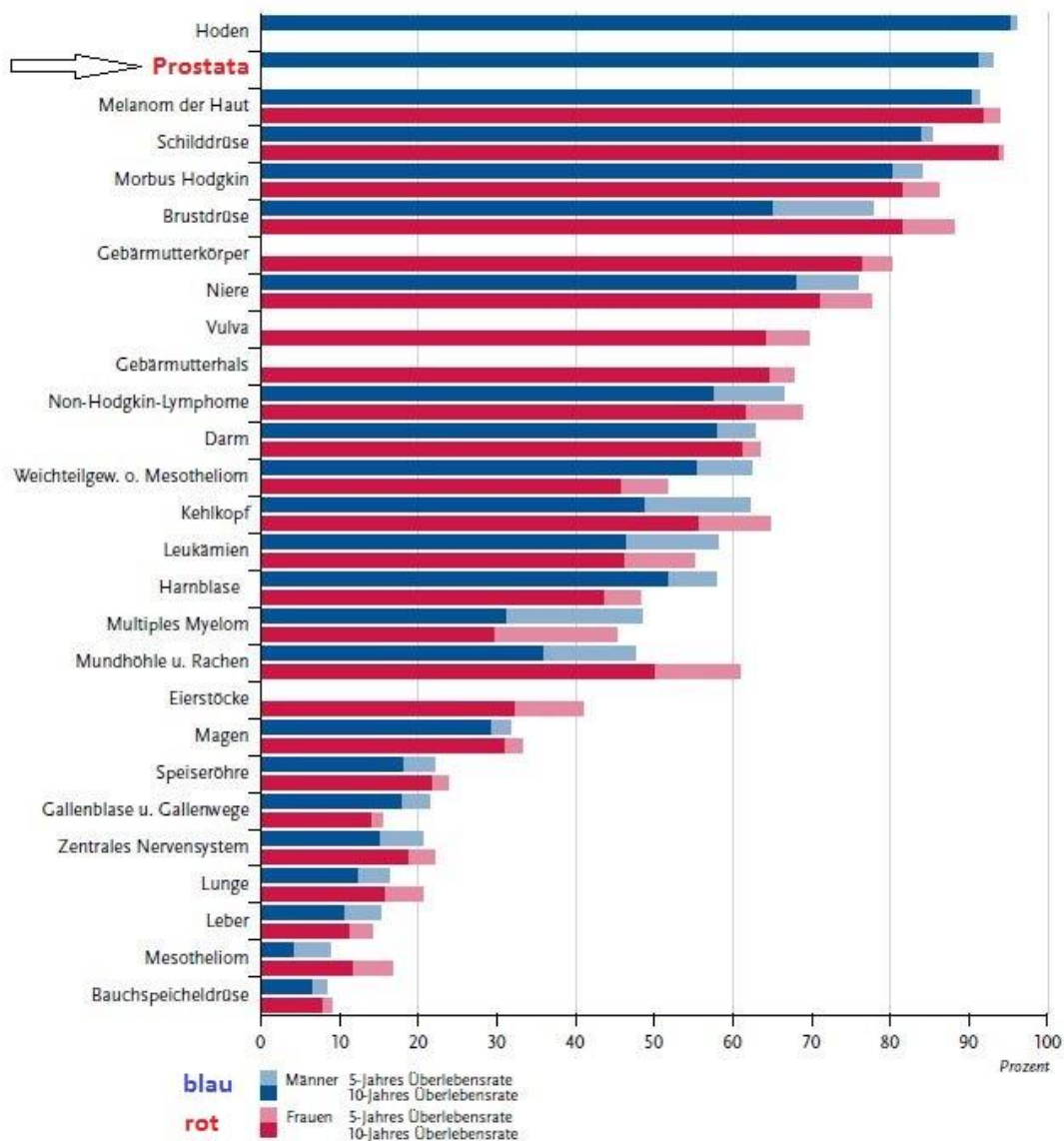


Abbildung 5: 5- und 10-Jahres-Überlebensraten für die häufigsten Tumorentitäten bei Frauen und Männern in Deutschland 2011 und 2012.

Die besten Überlebensraten zeigen sich für die Karzinome des Hodens und der Prostata, die schlechtesten für das Mesotheliom und das Karzinom der Bauchspeicheldrüse (modifiziert nach: Kaatsch, 2015).

benserwartung von über zehn Jahren im Tumorstadium 1-3 (s. Tab. 1) steht einerseits das operative Verfahren der radikalen Prostatektomie zur Verfügung. Die Entscheidung für dieses kurative Verfahren ist jedoch v.a. bei älteren Patienten und einem geringen Progressionsrisiko nicht immer unkritisch zu sehen, da es in den Jahren nach der Operation durch eine Beeinträchtigung des Harnkontinenzapparates zu deutlichen Auswirkungen auf die Lebensqualität kommen kann (Wilt et al., 2012). Als Alternative bietet sich z.B. die strahlentherapeutische Brachytherapie (brachy = kurz, über kurze Distanz) an (Talcott et al., 2003). Hierbei handelt es sich um eine interne Strahlentherapie, die z.B. als

sog. *Seed*-Therapie durchgeführt wird. Hierbei werden ultraschallgesteuert ca. 4 mm große Strahlungsträger mit radioaktivem Jod in der Prostata platziert und so das Tumorgewebe aus unmittelbarer Nähe durch radioaktive Strahlung zerstört. Je nach lokaler Ausdehnung des Tumors sollte bei Entscheidung für ein nichtoperatives Vorgehen auch eine Kombination aus Brachytherapie und einer äußeren Bestrahlung der Haut zusammen mit einer Hormonentzugstherapie (s.u.) durchgeführt werden. Bei einem lokal begrenzten Befund und Entscheidung gegen ein primär kuratives Verfahren gibt es zudem die Möglichkeit der sog. „aktiven Überwachung“ (*active surveillance*), die eine besonders enge ärztliche Anbindung und engmaschige Befundkontrolle erfordert (Bul et al., 2012; Deutsche Krebsgesellschaft, 2018).

**Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms.**

Parameter/Staging	Erläuterung
T1	Tumor nicht tastbar und nicht durch Bildgebung darstellbar
T2	Tumor lokal begrenzt auf die Prostatakapsel
T3	Tumor wächst lokal über die Organkapsel hinaus
T4	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen oder ist in der Umgebung fixiert
N0	Keine Lymphknotenmetastasen nachweisbar
N1	Lymphknotenmetastasen in regionären Lymphknoten nachweisbar
M0	Keine Fernmetastasen nachweisbar
M1	Fernmetastasen in nicht regionären Lymphknoten, Knochen oder anderen Organen nachweisbar

T (Tumorstatus), N (Nodalstatus), M (Metastasierungsstatus). Die TNM-Klassifikation dient bei einer großen Zahl an Tumorerkrankungen zur Definition des Krankheitsstadiums. Aus der Kombination der drei Parameter ergibt sich eine Einteilung in Krankheitsstadien gemäß UICC-Klassifikation, die zusammen mit der histologischen Beurteilung entsprechend dem Gleason-Score von prognostischer und therapeutischer Relevanz ist (modifiziert nach: Christmann, 2014).

Letztlich bietet sich bei geringerer Lebenserwartung und/oder Entscheidung gegen eine operative oder Radiotherapie, neben der Strategie des sog. „beobachtenden Wartens“ (*watchful waiting*) auch die Hormonentzugstherapie (s.u.) an. Beim lokal fortgeschrittenen und dem metastasierten Prostatakarzinom kommen, unter Einbeziehung von Alter, Lebenserwartung und Allgemeinzustand sowie den Präferenzen des Patienten die Hormonentzugstherapie, Strahlentherapie, Chemotherapie sowie Kombinationen dieser drei Therapiesäulen in Betracht. Hormonentzugstherapie bedeutet in diesem Zusammenhang eine Hemmung der Bildung, Ausschüttung oder Wirkung des männlichen Ge-

schlechtshormons Testosteron und seiner Abkömmlinge. Dies verfolgt den Zweck, die hormonabhängige Wachstumsstimulation des v.a. in frühen Krankheitsstadien häufig Androgen-sensitiven Prostatakarzinoms zu unterbinden (Keil, 2014; Kaatsch et al., 2015; Deutsche Krebsgesellschaft, 2018).

Das Konzept der Hormonentzugstherapie (=Androgendeprivation) basiert auf der Tatsache, dass die Tumorzellen des Prostatakarzinoms durch männliche Geschlechtshormone, die Androgene, in ihrem Wachstum stimuliert werden. Die männlichen Geschlechtshormone spielen auch in der physiologischen Entwicklung der Prostata und in der Aufrechterhaltung ihrer Gewebshomöostase eine bedeutende Rolle. Sie sorgen über die Stimulation der Androgenrezeptoren dafür, dass sich die basalen Epithelzellen der Prostata, aus denen sich deren Drüsengewebe ständig erneuert, zu den funktionellen luminalen Epithelzellen differenzieren. Diese sezernieren schließlich das Sekret der Prostata (Hayward et al., 1997; Cordeiro et al., 2008; Ishii et al., 2018). Bei maligne entarteten Prostatakarzinomzellen führt die Stimulation der Androgenrezeptoren dagegen zu einer unkontrollierten Zellteilung. Eine Hormonentzugstherapie hat daher zum Ziel, diesen Einfluss der im Körper zirkulierenden, männlichen Geschlechtshormone zu begrenzen (Huggins & Hodges, 2002; Fizazi, 2013; Ishii et al., 2018).

Zur Umsetzung der Androgendeprivation gibt es verschiedene Möglichkeiten: Einerseits lässt sich durch eine operative Entfernung beider Hoden die Menge an zirkulierendem Testosteron drastisch reduzieren. Pharmakologisch lässt sich eine hormonelle Kastration durch eine Medikamentenkombination aus einem Androgenrezeptorantagonisten (z.B. Cyproteronacetat, Bicalutamid oder Flutamid) und einem Gonadotropin-Releasing-Hormon-(=GnRH)-Analogon erzielen (Nair et al., 2002; Iversen et al., 2006; Studer et al., 2006). Der Androgenrezeptorantagonist hemmt kompetitiv die Androgenwirkungen am Rezeptor. Jedoch wird hierdurch eine negative Rückkopplung in der Hypothalamus-Hypophysenvorderlappen-Genitaltrakt-Achse unterbrochen, wodurch die Synthese von Testosteron steigt. Um diesem Mechanismus entgegen zu wirken, ist zusätzlich die Gabe eines GnRH-Analogons nötig, was die Testosteronsynthese erneut drosselt (Deutsche Krebsgesellschaft, 2018). In einer großen randomisierten Studie an 875 Patienten mit lokal fortgeschrittenem Prostatakarzinom reduzierte die Kombination aus Radio- und Hormonentzugstherapie die Prostatakrebs-bezogene 10-Jahres-Mortalität gegenüber der alleinigen Hormonentzugstherapie von 23,9 auf 11,9 % (Widmark et al., 2009).

Beim metastasierten, noch androgensensitiven Prostatakarzinom bleibt bei entsprechend erhaltenem Allgemeinzustand und Präferenzen des Patienten noch die Möglichkeit zu einer Androgendeprivation mit additiver Gabe des 17-alpha-Hydroxylase-Antagonisten Abirateron oder einer Chemotherapie mit Docetaxel (Gravis et al., 2013; Sweeney et al., 2015; James et al., 2016; Fizazi et al., 2017;

James et al., 2017). Liegt bei einem Patienten bereits ein androgenunabhängiges Prostatakarzinom vor, empfiehlt sich eine Kombination von Docetaxel mit Abirateron oder dem Androgenrezeptorantagonisten Enzalutamid (Kantoff et al., 2010; Ryan et al., 2013; Beer et al., 2014). Die beiden gängigen Chemotherapeutika sind Mitglieder der großen Gruppe der Taxane, welche sich chemisch aus dem Gift der Eibe (lat. *Taxus*) ableiten. Sie sind Mikrotubulugifte, welche die Polymerisation von Tubulin beschleunigen und andererseits seine Depolymerisation hemmen. Die Mikrotubuli als Transportsystem der Zelle wiederum sorgen physiologisch für eine geordnete Distribution von Organellen und anderen intrazellulären Strukturen. Durch die Wirkung der Taxane kommt es zu einer großräumigen Störung dieser physiologischen Funktionen, was schließlich zum Absterben insbesondere sich schnell teilender Zellpopulationen führt, aber durch die unspezifische Wirkung auf alle Zellen des Körpers auch zahlreiche Nebenwirkungen mit sich bringt (Deutsche Krebsgesellschaft, 2018; Sanofi Genzyme, 2019).

Die Kombination aus Chemotherapie und medikamentöser Kastration erweist sich beim metastasierten Prostatakarzinom als besonders wirksam und konnte in zwei großen, randomisierten Studien das Gesamtüberleben um im Mittel 14 Monate gegenüber der alleinigen hormonellen Kastration verlängern (Sweeney et al., 2015; James et al., 2016). Im Durchschnitt entwickelt sich 18-24 Monate nach Therapiebeginn eines hormonsensitiven Prostatakarzinoms ein hormonrefraktäres Karzinom, das eine differenzierte Therapie mit Chemotherapeutika und, nach neueren Erkenntnissen, eine zusätzliche, eskalierte Hormonentzugstherapie nötig macht (Kantoff et al., 2010; Ryan et al., 2013; Beer et al., 2014; Keil, 2014).

Beim Vorliegen von Knochen- und in Abwesenheit von viszeralen Metastasen bei Patienten mit androgenunabhängigem Prostatakarzinom steht die Gabe des Radium-Isotops Ra-223 als Behandlungsoption zur Verfügung. Ra-223 ist ein Alpha-Emitter mit einem kurzen Wirkungsradius von ca. 100 µm und reichert sich anstatt von Ca<sup>2+</sup> vor allem im schnell wachsenden Knochengewebe der Knochenmetastasen an, wo es durch seine Strahlungsaktivität die Tumorzellen zerstört (Henriksen et al., 2002; Henriksen et al., 2003). Es bewirkt einerseits eine Verbesserung der Beschwerden bzgl. der Knochenmetastasen und wirkt sich darüber hinaus positiv auf das Gesamtüberleben der betroffenen Patienten aus (Parker et al., 2013; Deutsche Krebsgesellschaft, 2018).

Bis vor wenigen Jahrzehnten standen bei nahezu allen Krebserkrankungen nur die operative Therapie und/oder das systemische, unspezifische Medikamentenregime (zytostatische Therapie/Chemotherapie) sowie die Strahlentherapie i.R. der adjuvanten und neoadjuvanten Therapie zur Verfügung. Diese spielen auch heute noch eine zentrale Rolle in der Behandlung von Patienten mit Tumorleiden (Gökkurt & Johann, 2014).



Die Chemotherapie geht jedoch einher mit gravierenden Nebenwirkungen. Dazu zählen vor allem unerwünschte gastrointestinale (Übelkeit, Erbrechen, Schleimhautveränderungen, Malabsorption, Gewichtsverlust bis zur Kachexie), immunologische (Myelotoxizität mit verminderter Funktionsfähigkeit des Immunsystems), nephrologische (Nephrotoxizität bis hin zum Nierenversagen), neurologische (Polyneuropathie, Ototoxizität) und auch psychologische (Depression) oder allgemeine (z.B. Fatigue) Arzneimittelwirkungen. Die unerwünschten Nebenwirkungen sind in vielen Fällen für einen vorzeitigen Abbruch der Therapie verantwortlich und führen schließlich zu einem erneuten Krankheitsprogress (Gökkurt & Johann, 2014).

Wissenschaftliche Veröffentlichungen im Sinne der „personalisierten Medizin“ finden sich nach einer großangelegten Analyse durch Emmert-Streib (2012) vermehrt ab dem Zeitraum 2000-2005, während bioinformatische Arbeiten sowie computergestützte Genomanalysen bereits Ende der 1990er-Jahre gehäuft zu finden sind. Ein frühes Beispiel für personalisierte, d.h. auf den individuellen Patienten und die Entität seiner Tumorerkrankung abgestimmte Therapie stellt die Androgendeprivation zur Behandlung des Prostatakarzinoms dar. Die Geschichte der Androgendeprivation geht zurück bis in das Jahr 1941, als Huggins & Hodges (2002) herausfanden, dass betroffene Patienten von einer bilateralen Orchiektomie und Behandlung mit Östrogenen zur Androgendeprivation profitieren. Die Hormonentzugstherapie beim Prostatakarzinom zeigte damit, wie ein individualisiertes Therapiekonzept die operative und unspezifische Chemotherapie unterstützen kann (Huggins & Hodges, 2002; Crawford, 2004).

Seit kurzem wird für das Prostatakarzinom eine weitere Therapieoption untersucht, die das in der Radiotherapie bereits etablierte Lutetium-177 mit einem Liganden kombiniert, der an ein prostata-spezifisches Transmembran-Protein (PSMA = *prostate specific membrane antigen*) bindet (= PSMA-*targeting*). Dieses wird auch durch die Prostatakrebszellen exprimiert. Durch die Verknüpfung mit dem PSMA-Liganden wird die Spezifität für die Tumorzellen deutlich erhöht und die Intensität von Nebenwirkungen verringert. Bisher liegen allerdings nur sehr heterogene und noch nicht ausreichend aussagekräftige Studien zur Therapie mit PSMA-*targeting*-Lu-177 vor, weswegen eine entsprechende Therapie nur nach Ausschöpfen aller besser erprobten Alternativen und im Rahmen von Studien empfohlen wird. (Calopedos et al., 2017; Kabasakal et al., 2017; Ahmadzadehfar et al., 2018).

In den letzten Jahrzehnten wurde an immer mehr denkbaren Angriffspunkten für eine individualisierte Therapie der Tumorerkrankungen geforscht. Grundsätzlich kommen für solche spezifischeren Therapieverfahren z.B. Rezeptorproteine oder Enzyme in Frage. Unter den Enzymen als denkbare therapeutische Ziele haben sich in den vergangenen Jahren wiederum die Kallikrein-ähnlichen Peptidasen

als weites Forschungsfeld etabliert. Diese stehen bei einer Reihe von Tumorerkrankungen im Verdacht, Einfluss auf die Malignität und Prognose der Erkrankung zu nehmen (Schmitt et al., 2013).

### 3. Kallikrein-ähnliche Peptidasen

#### 3.1 Bedeutung der Enzyme als Biokatalysatoren

Da biochemische Reaktionen in physiologischen Temperaturbereichen sehr langsam ablaufen, benötigen nahezu sämtliche Vorgänge zur Erhaltung des Lebens Reaktions-Katalysatoren, die Enzyme. Hierbei handelt es sich um hochspezialisierte Proteine, welche die Einstellung des Reaktionsgleichgewichts einer biochemischen Reaktion erheblich beschleunigen, ohne das Gleichgewicht selbst zu beeinflussen oder bei einer Reaktion verbraucht zu werden. Als Beispiel sei die bei einem Großteil aller Lebewesen vorkommende Carboanhydrase genannt, welche die Umwandlung von Kohlendioxid und Wasser zu Kohlensäure oder Bikarbonat katalysiert. Sie beschleunigt die Einstellung des pH-abhängigen Reaktionsgleichgewichts bis um den Faktor  $10^7$ . Um die Größenordnung des Effekts in einem greifbareren Maßstab zu verdeutlichen: stellt man sich vor, eine beliebige einzelne katalysierte Reaktion würde eine Dauer von einer Sekunde benötigen, bräuchte derselbe Vorgang ohne die beschleunigende Wirkung des Enzyms fast vier Monate (Löffler et al., 2007b).

Enzyme übernehmen wichtige Aufgaben in allen Bereichen des Zellstoffwechsels. Hierzu zählen neben anabolen wie katabolen Funktionen im Energiestoffwechsel auch vielfältige Rollen in der Signaltransduktion. Dabei werden von Enzymen unterschiedlichste Reaktionen katalysiert, wie zum Beispiel die Aktivierung von Verbindungen mittels Hinzufügen von Phosphatgruppen durch die Kinasen, die Abspaltung der Phosphatgruppen durch die Phosphorylasen, das Übertragen von funktionellen Gruppen durch die Transferasen oder die Spaltung von Bindungen durch die große Gruppe der Hydrolasen (Löffler et al., 2007b). Ein Beispiel für die Bedeutung von Enzymen für die zelluläre Signaltransduktion bieten die weit verbreiteten Janus-Kinasen. Sie erfüllen verschiedene Aufgaben im Zellwachstum und in der zellulären Differenzierung (O'Sullivan et al., 2007; Pesu et al., 2008; Liao et al., 2019). Nach Bindung eines Zytokins an die extrazelluläre Domäne seines Rezeptors kommt es durch die an der Innenseite der Zellmembran mit dem Zytokinrezeptor assoziierte Januskinase zur Phosphorylierung von Tyrosinresten einer intrazellulären Rezeptordomäne (Shuai & Liu, 2003; Liao et al., 2019). Diese fungieren sodann als Bindungsstellen für STAT-Proteine (= *signal transduction and activation of transcription*), die in den Zellkern einwandern und dort als Transkriptionsfaktoren den Weg der Signaltransduktion fortsetzen (Shuai & Liu, 2003; O'Shea & Murray, 2008; Liao et al., 2019).

### *3.1.1 Die Enzymfamilie der Proteasen*

Eine wichtige Rolle im Stoffwechsel nimmt die Spaltung von Peptidbindungen ein, die von Peptidasen/Proteasen vollzogen wird. Diese Enzymklasse im Genom des Menschen umfasst aktuell nahezu 600 bekannte humane Peptidasen/Proteasen und damit ca. 2 % des gesamten menschlichen Genoms (Puente et al., 2003; Quesada et al., 2009; Kappelhoff et al., 2017). Die Proteasen sind durch unterschiedliche Reaktionsmechanismen charakterisiert – entsprechend spielen im aktiven Zentrum der Enzyme jeweils bestimmte Aminosäuren/Metallionen eine Schlüsselrolle in der Katalyse. Man unterscheidet demnach die Aspartat-, Cystein-, Serin-, Threonin- und Metalloproteasen (Rawlings, 2013; Kappelhoff et al., 2017).

Proteasen spielen eine wichtige Rolle beim Abbau von Proteinen und Peptiden. Bei der Proteaseaktivität ist von Bedeutung, dass die Enzyme nur in bestimmten Kompartimenten aktiv sind, wie z.B. im Lumen des Verdauungstrakts, in Lysosomen und bakteriellen Entzündungsherden, sowie an ihrem Funktionsort durch verschiedene Mechanismen reguliert werden, da sonst eine ungewollte Zerstörung von Gewebstrukturen resultieren kann (Löffler et al., 2007d). Beispielsweise bewirkt ein Mangel an  $\alpha$ 1-Antitrypsin irreversible Organschädigungen: dabei kommt es durch einen erblich bedingten Mangel an Proteaseinhibitor  $\alpha$ 1-Antitrypsin zu einer Zerstörung elastischer Fasern in der Lunge, die dort von großer Bedeutung für ein funktionelles Gewebegerüst sind. Im Verlauf der Erkrankung führt der Niedergang des Lungenparenchyms so schließlich zur Entwicklung eines Lungenemphysems mit erheblichen funktionellen Einschränkungen für den Gesamtorganismus (Stoller & Aboussouan, 2005; Abboud et al., 2011).

### *3.1.2 Proteasen und ihre Funktionen jenseits des Proteinabbaus*

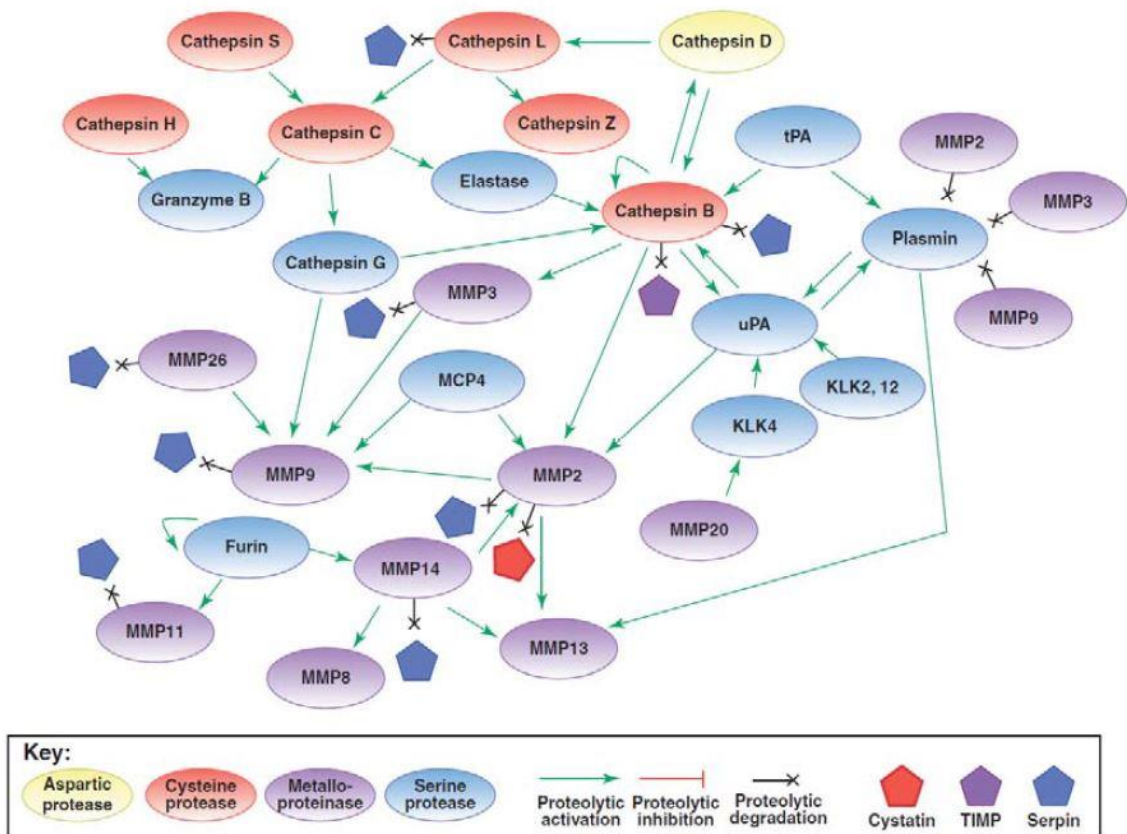
Neben dem Abbau von Proteinen spielen Proteasen auch eine Rolle in komplexen Signalwegen. Eine der ersten diesbezüglichen Entdeckungen machten Davie et al. (1964). Die Autoren konnten bereits in den 1960er-Jahren im Rahmen der Erforschung der Blutgerinnung zeigen, dass bei Ausbildung eines Fibringerinnsels mehrere in Serie geschaltete Blutgerinnungsfaktoren (zumeist Proteasen) aktiviert werden (Davie & Ratnoff, 1964).

Proteasen sind auch an der Steuerung der Zellzahlhomöostase (Proliferation und Apoptose) sowie der Motilität und Adhäsion von Zellen beteiligt (Nunez-Hernandez et al., 2018; Pranjol et al., 2018). Diese Funktionen sind eng verbunden mit der Entstehung und dem Krankheitsfortschritt von Krebserkrankungen (Mason & Joyce, 2011), da eine fehlregulierte Zellproliferation, -motilität und -adhäsion zentrale Voraussetzungen für die Transformation gesunder hin zu maligne entarteten Zellen darstellen, s. A 1.2 (Hanahan & Weinberg, 2011).

Die oben genannten Beispiele zeigen, dass Proteasen auch hochspezialisierte Aufgaben im Rahmen der Signaltransduktion erfüllen können. Hierbei katalysieren sie spezifische Reaktionen, die sich im Gegensatz zum unspezifischen Proteinverdau durch eine limitierte Proteolyse auszeichnen, d.h. es werden nur bestimmte Peptidbindungen an Zielproteinen gespalten, wodurch z.B. weitere Faktoren, bzw. Enzyme aktiviert oder inaktiviert werden können. Mehrere solcher Schritte bilden schließlich eine Signalkaskade, wie das Beispiel der Blutgerinnung verdeutlicht (Davie & Ratnoff, 1964; Mason & Joyce, 2011). Zusätzlich kann eine solche Kaskade nicht nur unidirektional ablaufen, sondern durch Feedback-Reaktionen und Quervernetzungen noch zusätzlich an Komplexität gewinnen, wie z.B. das Netzwerk der Proteasen in Abbildung 6 verdeutlicht (Mason & Joyce, 2011).

### *3.1.3 Das Netzwerk der Proteasen*

Die Vorstellung eines weit verzweigten, komplex interagierenden Systems an Proteasen begründete das Modell des Proteasenetzwerks. Wie aus Abbildung 6 deutlich wird, lässt sich dieses keineswegs nur als Einbahnstraße (wie vereinfacht die Blutgerinnungskaskade) begreifen, in welcher der Signalfluss lediglich von einem Enzym zum nächsten fortschreitet. Es verkörpert vielmehr ein hoch komplexes und interaktives Netzwerk mit wechselseitiger Aktivierung und Inaktivierung der einzelnen Proteasen. Ein Beispiel anhand von Abbildung 6: Plasmin und Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator vermögen sich gegenseitig zu aktivieren, Plasmin aktiviert die Metalloprotease 13, wird jedoch selbst von den Metalloproteasen 2, 3 und 9 abgebaut und damit inaktiviert (Mason & Joyce, 2011).



TRENDS in Cell Biology

Abbildung 6: Die Einbindung der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen innerhalb des Proteasenetzes.

Im Netzwerk der Proteasen interagieren Mitglieder verschiedener Proteasenfamilien im Rahmen komplexer Aktivierungs- und Inaktivierungsmuster. Inhibitoren vergrößern die Möglichkeiten der Interaktionen. Die Inhibitoren wiederum können von bestimmten Proteasen zudem durch proteolytischen Abbau inaktiviert werden. KLK4 ist dabei Teil einer Signalkette, die einen wichtigen Knotenpunkt des Protease-Netzwerks, den Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator (uPA) aktiviert. uPA selbst wird unter anderem von der zentralen Protease Cathepsin B aktiviert und vermag diese und über die Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP2) weitere MMPs zu aktivieren (Mason & Joyce, 2011).

### 3.2 Die Familie der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen

Die Kallikrein-ähnlichen Peptidasen (kurz KLKs) bilden eine Gruppe von evolutionär hochkonservierten trypsin- bzw. chymotrypsinähnlichen Serinproteasen, deren Genlocus den größten ununterbrochenen Cluster im Säugetiergenom darstellt, der für Proteasen kodiert (Borgono & Diamandis, 2004; Pavlopoulou et al., 2010). Im Genom des Menschen wurden 15 KLKs identifiziert, die Nummerierung entspricht dabei der Reihenfolge ihrer Entdeckung. Der gesamte Gencluster ist ohne Unterbrechung durch andere Gene auf dem langen Arm von Chromosom 19 lokalisiert. Von den Gewebs-Kallikreinen

(*tissue kallikreins*) ist das Plasma-Kallikrein (*plasma kallikrein*) zu unterscheiden, das auf Genebene kaum Sequenzhomologien zu ersteren aufweist (Cretu et al., 2012; Magdolen et al., 2012).

### 3.2.1 Vorkommen und Genstruktur der KLKs

Die KLKs sind in unterschiedlichsten Geweben des Säugetierorganismus zu finden und werden vor allem von sekretorischen Epithelien in das umgebende Interstitium oder sezernierte Körperflüssigkeiten abgegeben, darunter in die Muttermilch, den Liquor cerebrospinalis, Speichel, Schweiß und das männliche Ejakulat (Harvey et al., 2000; Shaw & Diamandis, 2007). Dabei sind sie an so unterschiedlichen Aufgaben wie KLK1 an der Blutdruckregulation (Magdolen et al., 2012), KLK3 an der Verflüssigung des männlichen Ejakulats (Sotiropoulou et al., 2009) oder KLK4 an der Ausbildung des Zahnschmelzes (Lu et al., 2008) beteiligt.

Ihr Expressionsmuster ist bei einer ganzen Reihe von Tumorerkrankungen der unterschiedlichsten Gewebe und Organe verändert, so z.B. beim Ovarialkarzinom, dem Mammakarzinom oder dem Prostatakarzinom (Abb. 7). Hierbei findet man für die unterschiedlichen Enzyme der Familie zum Teil eine erhöhte, zum Teil eine erniedrigte Expression (Schmitt et al., 2013).

Die einzelnen KLKs zeichnen sich durch eine unterschiedliche Aminosäuresequenz, Substratspezifität und Regulationsmechanismen aus. Die KLKs 1-3 zeigen mit ca. 65 % identischen Aminosäuren eine höhere Sequenzhomologie zueinander als die KLKs 4-15 mit ca. 35 % (Clements et al., 2004; Koumandou & Scorilas, 2013). Die Übergangssequenzen von Exons zu Introns sowie insbesondere jene Sequenzen, die für die katalytische Triade kodieren, sind dagegen hoch konserviert (Magdolen et al., 2012). Phylogenetische Analysen weisen darauf hin, dass die Mitglieder der Enzymfamilie durch Duplikationen eines ursprünglichen Enzyms und anschließende Mutationen entstanden sind (Hallstrom et al., 2007; Nikolaev et al., 2007; Pavlopoulou et al., 2010). KLK4 beispielsweise hat sich nach Aufspaltung der Klassen der Beutel- und Säugetiere (syn. Plazentatiere) möglicherweise aus KLK5 entwickelt (Arnason et al., 2008).

Einerseits lassen sich die 15 KLKs anhand der Ausprägung des sog. *99-loops* in die „klassischen“ (KLK1-3) und die „neuen“ (KLK4-15) unterteilen. Beim *99-loop* handelt es sich um einen Bereich der Tertiärstruktur um die Aminosäureposition 99 entsprechend der Nomenklatur des bovinen Chymotrypsinogens (Bode et al., 1983). Dieser liegt bei den KLKs 1-3 sowie KLKs 4-15 in unterschiedlicher Länge vor. Der *99-loop* kann dabei in einer offenen oder geschlossenen Formation vorliegen, was Einfluss auf die Substrataffinität und damit die Aktivität der entsprechenden KLK hat (Skala et al.,

2014). Mit Bezug auf die Substratspezifität der KLKs lassen sich zudem trypsinogene (KLKs 1,2, 4-6, 8, 10-15) und chymotrypsinogene Proteasen (KLKs 3, 7 und 9) voneinander abgrenzen.

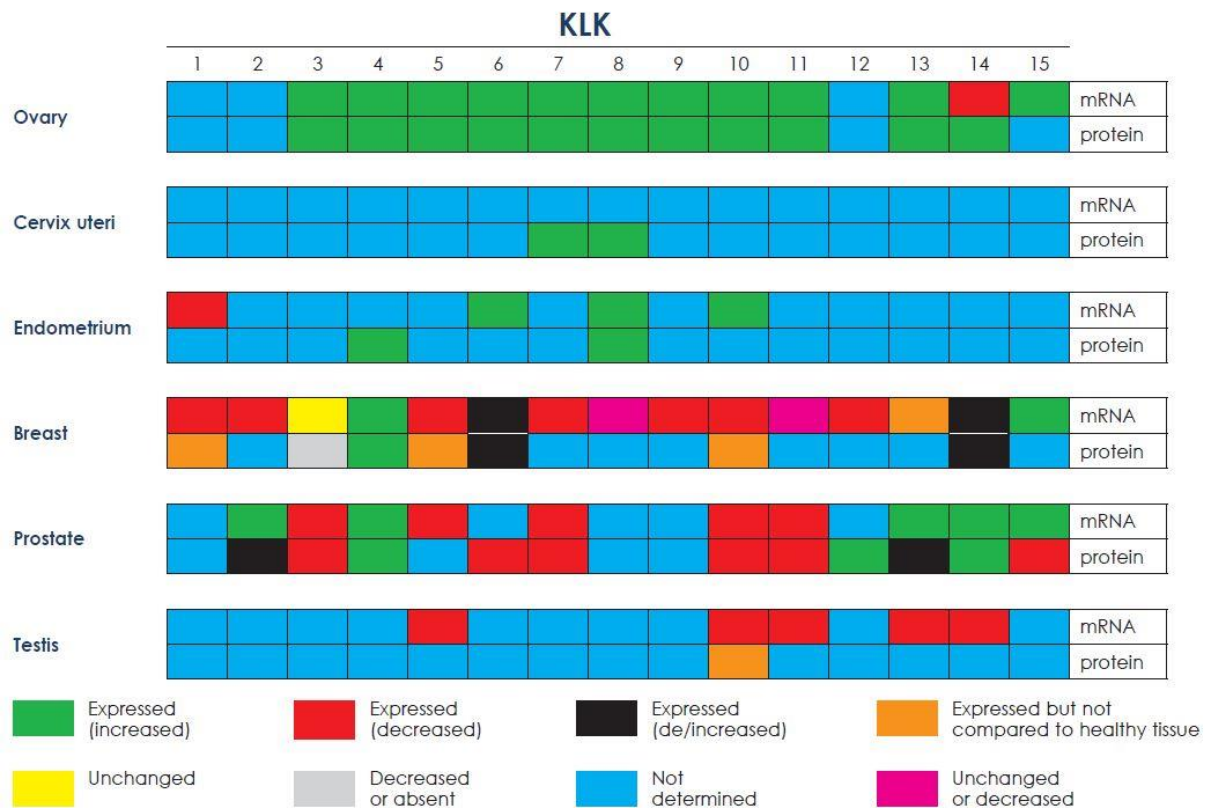


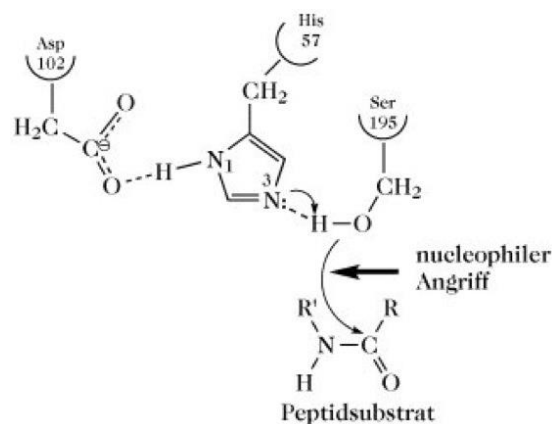
Abbildung 7: Expression der KLKs 1-15 bei verschiedenen Tumorerkrankungen.

Die KLKs werden bei verschiedenen Tumoren der Geschlechtsorgane unterschiedlich exprimiert. Übersicht über die Expressionslevel der KLKs 1-15 bei Tumoren weiblicher und männlicher Geschlechtsorgane im Vergleich zum gesunden Normalgewebe. Beim Prostatakarzinom ist die Expression von KLK3/PSA sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene erniedrigt, aufgrund der größeren Organmasse durch das Tumorwachstum sowie eines erhöhten Zellumsatzes ist die KLK3-Konzentration im Serum dagegen erhöht (s. A 3.4.). Auf Protein-Ebene geringer exprimiert werden außerdem die KLKs 6, 7, 10, 11 und 15. Die Expression von KLK4 auf Protein-Ebene hingegen ist, wie auch jene der KLKs 12 und 14, in Prostatakarzinomzellen erhöht (Schmitt et al., 2013).

### 3.2.2 Sezernierung, Aktivierung und Reaktionsmechanismus der KLKs

Allen KLKs ist gemeinsam, dass sie als inaktive Enzymvorstufen (Proenzyme/Zymogene) in das Interstitium, wie z.B. im Rahmen der Entstehung des Zahnschmelzes, oder in Körperflüssigkeiten, wie z.B. im Falle des prostatistischen Sekrets, abgegeben werden. Dort werden sie unter Abspaltung ihres Propeptids durch andere Enzyme aktiviert (Sotiropoulou et al., 2009). Wie alle Serinproteasen spal-

ten auch die Kallikrein-ähnlichen Peptidasen Peptidbindungen in ihrem aktiven Zentrum mithilfe der sog. katalytischen Triade. Hieran sind drei Aminosäuren beteiligt, die in der Primärstruktur nicht hintereinander angeordnet sind, sondern erst durch die Faltung des Proteins im Rahmen der Ausbildung der dreidimensionalen Tertiärstruktur in räumlicher Nachbarschaft zu liegen kommen (die Nummerierung der Aminosäurereste erfolgt entlang der Primärstruktur vom N- zum C-terminalen Ende von 1-x): das Histidin-57, das Aspartat-102, sowie das Serin-195, s. Abb. 8 (Bode et al., 1983; Bausch et al., 1999).



**Abbildung 8: Die katalytische Triade der Serinproteasen.**

Im Rahmen der Proteolysereaktion der Serinproteasen wirkt der Stickstoff in Position 3 des Histidin-57 als Protonenakzeptor für das Serin-195. Dadurch kommt es zum nukleophilen Angriff der Hydroxylgruppe des Serin-195 auf die Peptidbindung. Unter Ausbildung eines Acyl-Intermediats wird zunächst das N-terminale Ende des Peptids freigesetzt, in einem weiteren Schritt kommt es zur Dissoziation des C-terminalen Anteils (Blow et al., 1969; Stroud, 1974; Neitzel, 2010).

Die Serinproteasen gehören zur Enzymklasse der Hydrolasen, die kovalente Bindungen durch Anlagerung eines  $\text{H}_2\text{O}$  spalten. Dabei wirkt der Histidin-Rest als Protonenakzeptor an der Hydroxylgruppe des Serinrests. Dieser wird durch eine negative Partialladung reaktiv und greift die zu spaltende Peptidbindung am Kohlenstoff nukleophil an (Abb. 8). Dadurch kommt es einerseits zu einer Abspaltung des N-terminalen Peptidanteils, andererseits zur Ausbildung eines Acyl-Intermediats, das aus dem C-terminalen Anteil des Peptids und dem Serin-195 besteht. Der C-terminale Peptidanteil bleibt dabei also kovalent am aktiven Zentrum gebunden. Im nächsten Schritt reagiert das Acyl-Intermediat mit  $\text{H}_2\text{O}$  unter Abspaltung des C-terminalen Peptidanteils. Das Aspartat-102 stabilisiert während der Reaktion die positive Seitengruppe des Histidin-57 (Blow et al., 1969; Stroud, 1974; Neitzel, 2010).



### 3.3 Regulation der KLKs und ihr Platz im Netzwerk der Proteasen

#### 3.3.1 Regulationsmechanismen der KLKs

Die Kallikrein-ähnlichen Peptidasen (KLKs) unterliegen im komplexen Säugetierorganismus einem ausgefeilten Regulationssystem. Dagegen führt eine unkontrollierte Enzymfunktion zu pathologischen Ungleichgewichten und spielt auch in der Pathogenese von Tumorerkrankungen eine bedeutende Rolle.

Während die verschiedenen Enzyme des Protease-Netzwerks je nach Gewebe ein variables Expressionsmuster aufweisen, sind auch im Rahmen unterschiedlicher Tumorerkrankungen bestimmte Muster der Deregulation möglich. Eine zentrale Rolle spielen dabei Proteasen an sogenannten regulatorischen Knotenpunkten. Da bestimmte Aktivierungswege jedoch zahlreiche Eingangsmöglichkeiten aufweisen, kann eine Dysregulation verschiedener Elemente des Protease-Netzwerks unter Umständen ähnliche Effekte bewirken (Mason & Joyce, 2011).

Die Regulation der KLKs erfolgt zum einen bereits auf der Ebene der Transkription. Hierbei spielt auch die hormonelle Steuerung eine bedeutende Rolle. So üben Geschlechtshormone, wie z.B. Testosteron, über *androgen response elements* einen Einfluss auf die Transkription aus (Scheidereit et al., 1983; Cleutjens et al., 1996; Cleutjens et al., 1997; Brookes et al., 1998). Neben einer Steuerung der Expression der individuellen KLKs können auch Gruppen von KLKs gleichzeitig über sog. *locus control regions* angesteuert werden (Boutanaev et al., 2002). Zum anderen spielen auch epigenetische Mechanismen bei der Regulierung der KLKs eine bedeutende Rolle. Hierbei wurden sowohl suppressive als auch induktive Einflüsse beschrieben, etwa eine Inaktivierung durch Hypermethylierung für KLK10 beim Prostata-, Ovarial-, Mamma- oder dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (Li et al., 2001; Sidiropoulos et al., 2005; Y. Zhang et al., 2010b) bzw. eine Aktivierung von KLK13 durch Demethylierung beim Adenokarzinom der Lunge (A. Chang et al., 2001; Chou et al., 2011).

Für zahlreiche KLKs sind Genpolymorphismen bekannt, die Einfluss auf die Transkription der jeweiligen Gene, aber auch auf die Funktionsfähigkeit der kodierten Proteine haben können. Schließlich können auch im Falle der KLKs durch alternatives Splicing verschiedene Proteine aus ein und demselben Gen gebildet werden (Borgono et al., 2004; Michael et al., 2005). Dies ist etwa für KLK5 beim Prostata-, Mamma- und Ovarialkarzinom bekannt (Kurlender et al., 2004). Hierbei können auch inaktive Splice-Varianten entstehen (Sotiropoulou et al., 2009). Dies kommt dadurch zustande, dass im Rahmen der Splice-Vorgänge das Leseraster für die Translation verschoben, und so die ordnungsgemäße Formation der katalytischen Triade verhindert wird (Michael et al., 2005). Für KLK4 ist eine Splice-Variante beschrieben, die zwar über eine katalytische Triade verfügt, jedoch nicht mit dem

üblichen Signalpeptid ausgestattet ist. Man nimmt daher an, dass diese Splice-Variante intrazellulär arbeitet (Xi et al., 2004).

Diese unterschiedlichen Splice-Varianten zeigen je nach Organ ein unterschiedliches Expressionsmuster für gesundes oder maligne entartetes Gewebe. Die Splice-Variante KLK5-SV1 z.B. findet sich vermehrt in gesundem Prostatagewebe, im Vergleich zum Prostatakarzinom (Kurlender et al., 2004). Außerdem zeigen verschiedene Splice-Varianten bzgl. ihrer Expression eine variable Sensitivität gegenüber Steroidhormonen. Dies konnte z.B. für die Splice-Variante KLK4-IRIII gezeigt werden, deren Expression zwar durch die Hormone Dihydrotestosteron und Norgestrel ähnlich gesteuert wird wie die klassische Form des Enzyms, jedoch unter dem Einfluss von Dexamethason supprimiert wird (Michael et al., 2005).

Wie für zahlreiche andere Proteasen ist auch für die KLKs der Schritt der Zymogenaktivierung von großer Bedeutung für eine feinjustierte Regulierung der Enzyme. Hierfür sind für die Familie der KLKs unterschiedliche Mechanismen beschrieben. Einige Vertreter der Familie aktivieren sich selbst, andere können nur durch andere Proteasen in ein aktives Enzym überführt werden. Hierbei können sowohl andere KLKs als auch Mitglieder anderer Proteasefamilien beteiligt sein. Für KLK4 ist eine *in-vitro*-Aktivierung durch die Matrix-Metalloproteasen MMP-3 und MMP-20 bekannt (Beaufort et al., 2010), wobei der genaue Mechanismus ihrer *in-vivo*-Aktivierung weiterhin unklar bleibt. Bezüglich der Aktivierung von KLKs *in vivo* nimmt man an, dass die pro-Enzyme durch posttranskriptionelle Glykosylierungen zusätzlich modifiziert werden können, was Einfluss auf ihre Aktivierbarkeit hat (Guo et al., 2014).

Daneben regulieren reversible bzw. irreversible Inhibitoren die Aktivität von KLKs. Für letztere sind verschiedene endogene Inhibitoren beschrieben, wie etwa die Serpine (**Ser**in-**P**rotease-**I**nhibitor) mit breiter Substratspezifität. Bei der Interaktion von Serpin und KLK werden die Tertiärstrukturen beider Substanzen irreversibel zerstört. Unter den sog. Kazal-Typ-Inhibitoren, bei denen es sich um reversible Peptid-Inhibitoren hat, finden sich hingegen solche mit hoher oder geringerer Substratspezifität (Goettig et al., 2010).

Schließlich hemmen auch bestimmte Ionen die Aktivität von KLKs. Beispielsweise hemmt Zink die Aktivität von KLK3 im Prostatasekret. Dabei sind Milieueinflüsse, Proteasesubstrat und Inhibitor auf enge Weise miteinander verknüpft: Im Rahmen der Ejakulation gelangt das prostatasche Sekret in Kontakt mit der viskösen Samenflüssigkeit aus dem Samenstrang. In letzterer findet sich das Protein Semenogelin aus den Samenbläschen, das unmittelbar nach der Ejakulation das Zink aus dem Prostatasekret bindet. Hierdurch wird die Inhibition der KLK3 aufgehoben, und letztere bewirkt schließlich durch die Proteolyse des Semenogelins eine Verflüssigung des Ejakulats s. auch A 2.1 (Nieschlag

(2008). Die Hemmung der Enzymaktivität ist weiterhin von großer Bedeutung für experimentelle und pharmakologische Fragestellungen (s. A 3.6).

### 3.3.2 Vielfältige Verknüpfungen im Protease-Netzwerk: KLKs inmitten des Protein-Crosstalks

Einen Eindruck der vielfältigen Verflechtungen im Netzwerk der Proteasen und der Bedeutung der KLKs innerhalb des Netzwerks vermittelt Abbildung 6. Die Abbildung verdeutlicht, wie die Mitglieder der verschiedenen Proteaseklassen sich gegenseitig aktivieren und inaktivieren, und diese Mechanismen durch Signalamplifizierung auch verstärken können. Außerdem vermögen einige Proteasen sich selbst zu aktivieren. Die Vielfalt der Interaktionen wird durch eine Reihe von Inhibitoren noch erweitert. Einige Proteasen wiederum können diese Inhibitoren inaktivieren. Dieser komplexe Zusammenhang wird als „Interkonnektivität“ oder auch *crosstalk* im Netzwerk der Proteasen bezeichnet (Mason & Joyce, 2011).

### 3.4 Artificielle Hemmung der Aktivität verschiedener KLKs

Neben den physiologisch relevanten Mechanismen einer KLK-Inhibition (s. 3.3) existieren weitere Möglichkeiten einer Hemmung der KLKs durch synthetische Inhibitoren. Aus den physiologischen Inhibitoren lassen sich abgewandelte Moleküle designen. Außerdem lassen sich in anderen Spezies Konzepte für eine Proteaseinhibition finden. Durch Abwandlung des Trypsin-Inhibitors aus der Sonnenblume (*Helianthus annuus*) wurde ein spezifischer Inhibitor für KLK4 hergestellt, s. auch B 2.2 (Swedberg et al., 2011). Dieser Inhibitor stellt bzgl. seines molekularen Aufbaus ein Peptid mit zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstrukturen dar.

In einem weiteren Ansatz wurde eine Klasse vollständig synthetischer Inhibitoren entwickelt. Diese zeichnen sich gegenüber SFTI durch ein geringeres Molekulargewicht, eine hohe strukturelle Kompatibilität zur Substratbindungsstelle im aktiven Zentrum und einen Diphenyl-Phosphonat-Gefechtskopf (*warhead*) als Grundstruktur aus. Über zusätzliche Variationen von Seitenresten des Diphenyl-Phosphonat-*warheads* wurde ein KLK4-Inhibitor mit höherer Spezifität und größerer Bindungsaffinität erzeugt (Swedberg et al., 2011; van Soom et al., 2015).

Spezifische Inhibitoren können Informationen darüber liefern, ob z.B. für Effekte auf Proliferation und weitere physiologische Aspekte von Tumorzellen die Aktivität eines Enzyms nötig ist. Hierbei ist jedoch die Stabilität des Inhibitors unter Zellkulturbedingungen zu beachten (s. C 2.1).

### 3.5 KLKs und ihre Rolle im humanen Prostatakarzinom

Wie bei zahlreichen anderen Tumorerkrankungen variiert auch beim Prostatakarzinom das Expressionsmuster der KLKs (Abb. 7). KLK3/PSA wird im Prostatakarzinom geringer als im gesunden Prostatagewebe exprimiert. Die mit dem Tumorwachstum einhergehende Vergrößerung der Gewebemasse, sowie der Zerfall von Gewebe bedingen jedoch einen höheren Serum-PSA-Wert bei Patienten mit Prostatakarzinom (Koistinen & Stenman, 2012). Jedoch wurden auch bei der benignen Prostatahyperplasie erhöhte PSA-Werte im Serum der Patienten nachgewiesen (Babaian et al., 1990; Benson et al., 1992; Semjonow et al., 1994; Partin et al., 1996; Roigas & Krege, 2016). Trotz relativ geringer Expression von KLK3 im Prostatakarzinom scheint KLK3 die Proliferation von Tumorzellen zu fördern, wie für die humanen Prostatakarzinomzelllinien DU145 und LNCap gezeigt wurde (Williams et al., 2011).

KLK4 dagegen zeigt eine erhöhte Expression in frühen Krankheitsstadien des Prostatakarzinoms. Zudem fördert KLK4 möglicherweise die Malignität von Prostatakarzinomzellen. KLK4-exprimierende Prostatakarzinomzellen zeigten eine erhöhte Proliferationsrate sowie ein ausgeprägteres Migrationsverhalten (Obiezu et al., 2006; Mize et al., 2008).

### 3.6 KLKs als potentielle diagnostische und therapeutische Zielstrukturen beim Prostatakarzinom

Die Rolle von PSA/KLK3 für die Diagnostik des Prostatakarzinoms wurde bereits erörtert (s. A 2.5). Auch wenn KLK3 im maligne entarteten Prostatagewebe geringer exprimiert wird als in gesundem, sind die Konzentrationen von KLK3 im Serum von Patienten mit Prostatakarzinom erhöht. Dies wird auf die im Rahmen des Tumorwachstums steigende Organgröße und einen erhöhten Zellumsatz zurückgeführt (Partin et al., 1996). Es gibt Hinweise darauf, dass KLK3 das Wachstum von Prostatakrebszellen fördern könnte (Williams et al., 2011). Im Gegensatz zu KLK3 wird KLK2 im Prostataorgewebe verstärkt exprimiert. Verglichen mit KLK3 liefern die Serumwerte von KLK2 jedoch keine eindeutigen Informationen bzgl. des Vorliegens einer Prostatakrebserkrankung (Shariat et al., 2011). Darson et al. (1997) konnten allerdings zeigen, dass ein hohes Expressionslevel von KLK2 im Tumorgewebe mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. In Kombination mit KLK3 kann das Expressionslevel von KLK2 zusätzliche Informationen von prognostischer Relevanz liefern (Koistinen & Stenman, 2012).

KLK4 zählt, neben den KLKs 12 und 14, zu jenen Beispielen der KLKs, die im maligne entarteten Prostataorgewebe auf Protein-Ebene verstärkt exprimiert werden (Schmitt et al., 2013). KLK4 spaltet *in vitro* Komponenten der ECM (Obiezu et al., 2006) und wirkt auf den Signalweg der Protease-

aktivierten Rezeptoren ein. So aktiviert KLK4 die Rezeptoren PAR 1 und 2 (Ramsay et al., 2008) und spaltet den uPA-Rezeptor durch limitierte Proteolyse (Beaufort et al., 2006). Daher könnte KLK4 eine bedeutende Rolle bei der Entstehung und dem Krankheitsprogress des Prostatakarzinoms spielen. Aus *in-vitro*-Versuchen ist bekannt, dass KLK4 eine verstärkte Proliferation von DU145-Prostatakarzinomzellen begünstigt (Mize et al., 2008). KLK4 ist daher ein attraktives Ziel in der Diagnostik des Prostatakarzinoms. Daneben könnte eine gezielte Inhibition von KLK4 eine sinnvolle therapeutische Strategie in der Behandlung von Malignomen der Prostata darstellen.

#### 4. Zielsetzung

Wie in den vorangegangenen Kapiteln besprochen, spielen Proteasen und ihr dereguliertes Expressionsmuster bei der Entwicklung von Tumorerkrankungen sowie der Aufrechterhaltung ihrer Malignitätskriterien eine zentrale Rolle. KLK4 wird diesbezüglich beim Prostatakarzinom eine entscheidende Bedeutung zugesprochen (Beaufort, Debela et al., 2006; Obiezu, Michael et al., 2006; Mize, Wang et al., 2008; Schmitt, Magdolen et al., 2013; Prassas, Eissa et al., 2015).

In einem ersten Schritt sollten in der vorliegenden Arbeit humane PC3-(Prostatakarzinom)-Zellen, die keine endogene KLK4-Expression aufweisen, mit einem KLK4-Wildtyp-Gen transfiziert werden (s. C 1.1). Anschließend sollte untersucht werden, wie sich die Expression von KLK4 auf das Wachstumsverhalten auswirkt (s. C 1.2). Zur Qualitätssicherung sollte außerdem aus diesen Zellen RNA isoliert und mittels qPCR untersucht werden, ob die Zellen tatsächlich KLK4 exprimieren (s. C 3.2).

Da über die natürlichen Substrate von KLK4 und den pathophysiologischen Zusammenhang der KLK4-Aktivität bisher nur wenig bekannt ist, KLK4 jedoch aufgrund der Überexpression beim Prostatakarzinom als diagnostisches und therapeutisches Target von Bedeutung sein könnte, war im Rahmen der vorliegenden Arbeit geplant, Gene zu identifizieren, deren Expression durch KLK4 reguliert werden. In einer Arbeit von Alterauge (2014) wurde bereits der Einfluss der KLK4-Expression auf die Expression des Kollagen-Gens COL1A2 untersucht.

Da bekannt ist, dass KLK4 den bei verschiedenen Tumorerkrankungen involvierten PAR-Signalweg mit beeinflusst, sollte in der vorliegenden Arbeit mithilfe eines PAR-*Microarrays* der Einfluss von KLK4 auf verschiedene Gene dieses Signalweges evaluiert werden (s. C 1.3). Aus den Genen, deren Expression durch KLK4 besonders stark beeinflusst wird, sollten ausgewählte Zielgene für weitere Analysen ausgewählt und letztlich der Einfluss der KLK4-Expression auf diese Faktoren eingehender untersucht werden, z.B. durch qPCR-Analysen auf mRNA- oder durch ELISA auf Proteinebene (s. C 3.).

Da über die molekularen Mechanismen, durch die KLK4 den Zellstoffwechsel beeinflusst, noch wenig bekannt ist, sollte zudem in zwei Ansätzen untersucht werden, ob für die Effekte auf Proliferation und Genexpression die KLK4-Aktivität nötig ist: einerseits mithilfe von spezifischen Inhibitoren der KLK4, welche die KLK4-Aktivität im Zellkulturüberstand hemmen (s. C 2.), andererseits mit der Erstellung von PC3-Transfektanten, die entweder eine konstitutiv aktive KLK4-Mutante oder eine inaktive *active-Site*-Mutante der KLK4 exprimieren (C 3.).

## B - Material und Methoden

### 1. Verwendete Materialien

#### 1.1 Verwendete Enzyme

In Tabelle 2 sind die im Rahmen der Arbeit verwendeten Enzyme aufgeführt.

**Tabelle 2: Verwendete Enzyme**

Bezeichnung	Enzymfunktion	Hersteller
Taq DNA-Polymerase	DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, D
Humane, rekombinante KLK4	Protease	Klinische Forschergruppe der Frauenklinik am MRI, München, D

#### 1.2 Plasmide zur Herstellung stabiler Transfektanten der Zelllinie PC3

Im Rahmen der Zellkulturversuche wurden stabile Transfektanten der Zelllinie PC3 hergestellt. Hierzu wurden verschiedene Expressionsplasmide einerseits für das Wildtyp-Protein, andererseits für konstitutiv aktive oder *active-site*-Mutanten der KLK4 mittels *in-vitro*-Mutagenese hergestellt, die Wildtyp-PC3-Zellen anschließend entweder mit dem bloßen Expressionsvektor als Kontrolle oder den entsprechenden DNA-Konstrukten mithilfe des Lipofectin-Kits transfiziert (siehe Anhang, Lipofectin® Reagent invitrogen). Die verwendeten Plasmide sind in Tabelle 3 aufgeführt.

**Tabelle 3: Verwendete Plasmide**

Bezeichnung	Funktion	Hersteller
pRcRSV_RSV	Kontrollvektor („leerer Vektor“)	Invitrogen, Karlsruhe, D
pRcRSV_KLK4	Expression des KLK4-Wildtyps	Klinische Forschergruppe der Frauenklinik am MRI, München, D
pRcRSV_KLK4_S195A	Expression einer Mutante mit Serin-zu-Alanin-Mutation im aktiven Zentrum (konstitutiv inaktiv)	Klinische Forschergruppe der Frauenklinik am MRI, München, D
pRcRSV_KLK4_ΔSP	Expression einer Mutante mit deletiertem Signalpeptid	Herstellung i.R. der vorliegenden Arbeit

#### 1.3 PCR-Primer

In Tabelle 4 sind die im Rahmen der Arbeit verwendeten PCR-Primer aufgeführt: Mutagenese-Primer zur Herstellung der Expressionsplasmide, Primer zur Detektion von Mykoplasmenkontaminationen.

**Tabelle 4: Verwendete Primer**

Bezeichnung	Funktion	Sequenz 5'-3'
K4-delSP-do	Mutageneseprimer: Deletion Signalpeptid	GCACCTCCAAGCTTATGATCATAAAACGGCGAGG
K4-delSP-up		CCTCGCCGTTTATGATCATAAAGCTTGGAGGTGC
Myko_for	Detektion Mykoplasmenkontamination	CGCCTGAGTAGTACGTTCCGC
Myko_rev		GCGGTGTGTACAAGACCCGA

### 1.4 TaqMan Probes – Roche Probes

Um die Expression unterschiedlicher Zielgene in Wildtyp- und transfizierten Zellen zu untersuchen, wurden die in Tabelle 5 (TaqMan-Assays) und Tabelle 6 (Assays auf Basis der Roche Universal Probe Library) angegebenen Assays verwendet.

**Tabelle 5: Verwendete TaqMan Assays**

Zielgen	Assay
Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)	Hs02800695_m1
Kallikrein-ähnliche Peptidase 4 (KLK4)	Hs00191772_m1

**Tabelle 6: Verwendete Assays auf Basis der Roche Universal Probe Library**

Zielgen	Assay/Roche Probe
CXCL1	NM_001511.2 – Probe 52
Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT-1)	NM_000194.2 – Probe 73
Kallikrein-ähnliche Peptidase 4 (KLK4)	NM_004917.3 – Probe 45

### 1.5 Lösungen und Puffer

In Tabelle 7 sind die im Rahmen der Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer aufgeführt. Alle Lösungen und Puffer wurden mit doppelt destilliertem Wasser angefertigt.

**Tabelle 7: Verwendete Lösungen und Puffer**

Bezeichnung	Funktion	Zusammensetzung
0,5 M Tris-Cl pH 6,8	Sammelgel für SDS-PAGE	0,5 M Tris Base + HCl, pH 6,8
1,5 M Tris-Cl pH 8,8	Trenngel für SDS-PAGE	1,5 M Tris Base + HCl, pH 8,8
RLT-Buffer	RNA-Zelllysepuffer	RLT-Puffer (Qiagen, Hilden, D), 1 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol
50x TAE-Puffer	Agarose-Gelelektrophorese	2 M Tris-Acetat, 0,05 M EDTA, pH 8,3
TBS-T (Tween) + Triton-X-100	Protein-Zelllysepuffer	0,05 M Tris, 0,15 M NaCl, 1 % (v/v) Tween, 0,1 % Triton X- 100 + HCl, pH 7,2-7,6
TBS-T (Tween)	Zubereitung von Waschpuffer für ELISA	0,05 M Tris, 0,15 M NaCl, 0,1 % (v/v) Tween + HCl, pH 7,2-7,6
Elektrophorese-Puffer nach Towbin et al. (1979)	SDS-Gelelektrophorese	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS



Wetblot-Transfer-Puffer nach Towbin et al. (1979)	Westernblot Proteintransfer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol
Tris-buffered Saline-(TBS)-Puffer	physiologischer Puffer/Reaktionslösungen für ELISA	0,05 M Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,6

## 1.6 Kits

In Tabelle 8 sind die im Rahmen der Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen Kits aufgeführt.

**Tabelle 8: Verwendete Kits**

Bezeichnung	Hersteller
Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit	Invitrogen, Karlsruhe, D
ELISA-Kit für CXCL1 und CXCL8 (human)	Thermo Fisher Scientific, Ulm, D
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche Diagnostics, Penzberg, D
PAR Signaling Pathway RT2 Profiler PCR Array	Qiagen, Hilden, D
Pierce BCA Proteine Assay	Thermo Fisher Scientific, Ulm, D
Macherey-Nagel Plasmid Midi Kit	Macherey-Nagel, Düren, D
Macherey-Nagel Plasmid Mini Kit	Macherey-Nagel, Düren, D
QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Böblingen, D
RNeasy Mini	Qiagen, Hilden, D
RT2 First Strand cDNA Synthesis Kit	Qiagen, Hilden, D
RT <sup>2</sup> SYBR Green FAST Mastermix	Qiagen, Hilden, D

## 1.7 Chemikalien

In Tabelle 9 sind die im Rahmen der Arbeit verwendeten Chemikalien aufgeführt.

**Tabelle 9: Verwendete Chemikalien**

Bezeichnung	Hersteller
Agar (Bacto™)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Agarose	peqlab Biotechnologie, Erlangen, D
alamarBlue® (Resorcin)	Thermo Fisher Scientific Inc., Ulm, D
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Boc-Val-Pro-Arg-7-amino-4-Methylcoumarin (20 mM, "I-1120")	Bachem, Bubendorf, CH
Bovines Serum Albumin Fraction V, protease-free (lyophilisiert)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
comp Mini EDTA-free Proteaseinhibitor (gebrauchsfertige Tabletten)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Desoxyadenosintri-phosphat (dATP)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Desoxycytidintri-phosphat (dCTP)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Desoxyguanosintri-phosphat (dGTP)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Desoxythymidintri-phosphat (dTTP)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Dimethylsulfoxid	Merck KGaA, Darmstadt, D
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethanol 70%	Apotheke des Klinikums Rechts der Isar, München, D
Ethanol 98 %	Merck KGaA, Darmstadt, D

Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Gelatinemethacrylamid	Queensland University of Technology, Brisbane, AU
Glucose	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, D
Hefeextrakt (Bacto™)	Roth, Karlsruhe, D
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate	Merck KGaA, Darmstadt, D
Irgacure® / IC2959	BASF, Schwarzheide, D
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, D
Nukleasefreies Wasser	Roth, Karlsruhe, D
R1881 / Metribolon	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Schwefelsäure	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	Roche Diagnostics, Penzberg, D
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, D
Tween20	AppliChem, Darmstadt, D
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D

## 1.8 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 10 sind die im Rahmen der Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

**Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien**

Bezeichnung	Hersteller
0,2 ml PCR-Tubes	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
2 ml Cryotubes	TPP, Trasadingen, Schweiz
2 ml Injektionsspritzen	B. Braun AG, Melsungen, D
2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
6- (9,6 cm <sup>2</sup> ), 12-, 24-, 48-, 96-well-Platten für Zellkulturversuche	Falcon, Corning, USA
6 cm, 10 cm, 15 cm	Petrischalen TPP, Trasadingen, Schweiz
Immobilon-P Transfer Membrane	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, D
Kanülen Sterican (20x0,4mm)	B. Braun AG, Melsungen, D
Microplate „Black Opaque“ 96-well-Platte für Aktivitätstests	PerkinElmer, Waltham, USA
Microplate „see-through“ 96-well-Platte für <i>alamarBlue</i> ®-Assays	PerkinElmer, Waltham, USA
Minisart Filter 0,1 und 0,2 µm	Sartorius, Göttingen, D
„see-through“ 96-well-Platten für ELISA	Merck KGaA, Darmstadt, D
Pasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe, D
serologische Pipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, D
Skalpell	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
T25, T75 (75 cm <sup>2</sup> ), T160 Filter Top Zellkulturflaschen	Greiner Bio One, Frickenhausen, D
Zentrifugen-Filtereinheiten 10 kD	Thermo Fisher Scientific Inc., Ulm, D

## 1.9 Geräte

In Tabelle 11 sind die im Rahmen der Arbeit verwendeten Geräte aufgeführt.

**Tabelle 11: Verwendete Geräte**

Bezeichnung	Hersteller
Axio Observer.A1	Carl Zeiss, Hallbergmoos, D
ChemiDoc™ XRS+ System	Bio-Rad Laboratories, München, D
Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories, München, D
Gelgießvorrichtung mit Zubehör	Bio-Rad Laboratories, München, D
Heraeus™ Labofuge™ 400	Thermo Fisher Scientific Inc., Ulm, D
Herasafe Sterilbank	Thermo Fisher Scientific Inc., Ulm, D
Microcentrifuge 5417C	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
NanoDrop ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Neubauer Zählkammer	Assistent, Sondheim, D
PCR Cycler	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
QIAcube	Qiagen, Hilden, D
Sigma 4K15 Laborzentrifuge	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, D
SpectraMax Gemini EM Spektralfluorimeter	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Stratagene MX3005P	Agilent Technologies, Böblingen, D
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, München, D
Wallac Victor2 1420 Multilabel Counter	PerkinElmer LAS, Rodgau-Jügesheim, D
Zellkulturmikroskop Zeiss Axiovert 25	Carl Zeiss, Hallbergmoos, D

## 2. Spezifische Inhibitoren der KLK4

Zur Untersuchung der Frage, ob für KLK4-vermittelte Effekte die proteolytische Aktivität des Enzyms nötig ist, wurden verschiedene spezifische Inhibitoren der KLK4 in Zellkulturversuchen angewendet.

### 2.1 UAMC 1399 – ein synthetischer Diphenyl-Phosphonat-Inhibitor der KLK4

UAMC 1399, ein Diphenyl-Phosphonat-Derivat, ist ein Vertreter der ersten Generation an niedermolekularen, synthetischen Inhibitoren der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen und wurde von Kooperationspartnern der Universität Antwerpen, Belgien, zur Verfügung gestellt. Abbildung 9 zeigt den sog. Diphenyl-Phosphonat-Warhead, der den unterschiedlichen Verbindungen der Gruppe gemeinsam ist, und auch bei UAMC 1399 das strukturelle Gegenstück für das aktive Zentrum der KLK4 darstellt.

Die variablen Reste  $R_1$  und  $R_2$  bringen den Warhead am jeweiligen Zielenzym, im Falle von UAMC 1399 der KLK4, in eine möglichst günstige Position zum S195 der katalytischen Triade (van Soom et al., 2015). Der Reaktionsmechanismus der Diphenyl-Phosphonat-Inhibitoren ist in Abbildung 10 dargestellt.

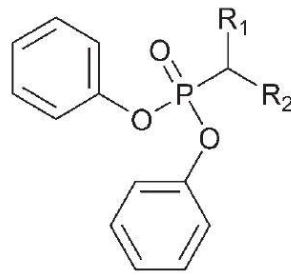


Abbildung 9: Diphenyl-Phosphonat-warhead (Quelle: van Soom et al., 2015)

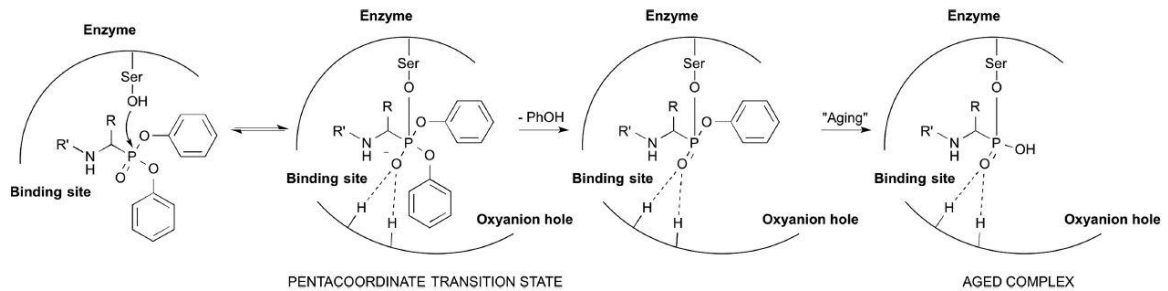


Abbildung 10: Reaktionsmechanismus der Diphenyl-Phosphonat-Inhibitoren.

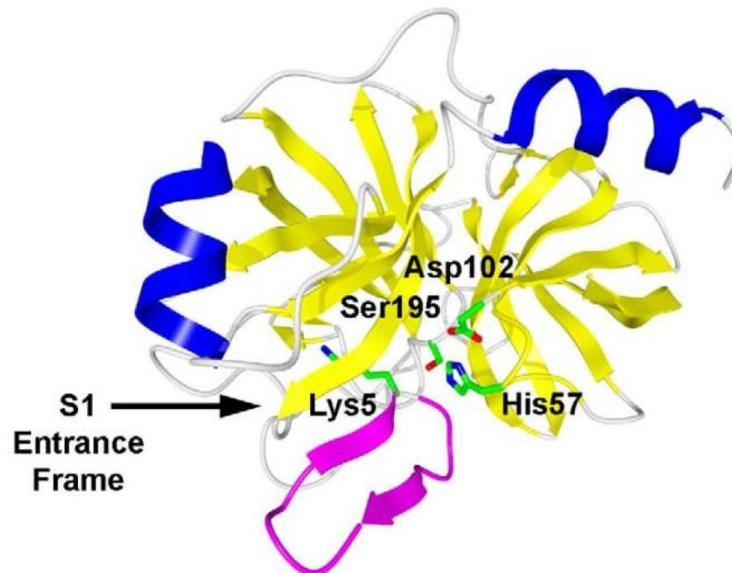
Zur besseren Übersichtlichkeit ist lediglich das Serin der katalytischen Triade einer Serinprotease mit seiner Hydroxylgruppe dargestellt. Bei Annäherung des Inhibitors an das aktive Zentrum kommt es zu einem nukleophilen Angriff des Sauerstoffs der Serin-Hydroxylgruppe auf die Diphenyl-Phosphonat-Gruppe des Inhibitors. Hierdurch bildet sich ein fünfwertiger Zwischenzustand des Phosphors aus. Dessen Instabilität führt nacheinander zur Abspaltung der beiden Phenylreste (Quelle: van Soom et al., 2015).

Bei der Annäherung des Inhibitors an die katalytische Triade gelangt das Phosphoratom der Diphenyl-Phosphonatgruppe in die Nähe der Hydroxyl-Gruppe des Serins-195, und wird von deren Sauerstoffatom nukleophil angegriffen. Das Phosphat geht einen instabilen, fünfwertigen Übergangszustand ein, woraufhin es zunächst zur Abspaltung einer der beiden Phenylgruppen kommt. Im Rahmen eines als „Reifungsprozess“ oder „Aging“ bezeichneten Vorgangs wird auch der zweite Phenylrest abgespalten, am Phosphat verbleibt lediglich eine Hydroxylgruppe. Der Inhibitor verbleibt in kovalenter Bindung an der katalytischen Triade und wird durch zwei Wasserstoffbrücken an der Oxyaniontasche stabilisiert (van Soom et al., 2015).

## 2.2 SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> – ein modifizierter Peptid-Inhibitor aus dem Samen der Sonnenblume (*Helianthus annuus*)

Neben dem niedermolekularen UAMC 1399 wurde außerdem ein Inhibitor aus einer anderen Strukturfamilie verwendet, um in den Zellkulturversuchen spezifisch die Aktivität der KLK4 zu hemmen:

SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub>. Dieser wurde von Kooperationspartnern der Queensland University of Technology, Brisbane, Australien, entwickelt. Es handelt sich dabei um ein Derivat des unspezifischen Sunflower-Trypsin-Inhibitors (kurz: SFTI-1), der ursprünglich aus Sonnenblumenkernen isoliert wurde. Abbildung 11 zeigt SFTI-1 im Komplex mit Trypsin.



**Abbildung 11: Faltungstopologie von SFTI-1 (in magenta) im Komplex mit Trypsin.**

$\alpha$ -Helices in blau,  $\beta$ -Faltblattstrukturen von Trypsin in gelb, von SFT-1 in magenta. Die katalytische Triade bzw. das aktive Zentrum des Trypsins wird durch eine 3-D-Balkenstruktur sowie Beschriftung der Aminosäurereste wiedergegeben (Quelle: Swedberg et al., 2011).

Der „Mutter-Inhibitor“ SFTI-1 weist zwar eine geringe Spezifität bezüglich der Inhibition unterschiedlicher Proteasen, jedoch eine hohe Bindungsaffinität zu diesen auf. Durch eine Modifikation von SFTI-1 konnte zunächst eine hohe Spezifität für KLK4 erreicht werden, wobei der resultierende Inhibitor SFTI-FCQR Asp<sub>14</sub> eine geringere Affinität zum Zielenzym aufwies (Swedberg et al., 2009).

Auf Basis von computerbasierten Analysen konnte durch Swedberg et al. eine umfassende Modellierung von Aminosäureresten des SFTI vorgenommen werden. Hierbei ergab sich durch Austausch des Aspartats an Position 14 zu einem Asparagin erneut eine deutlich höhere Affinität des Inhibitors. Die in-silico (d.h. lediglich computergestützt und nicht durch Erstellung einer realen Inhibitor-Bibliothek) modellierten Daten bezüglich Spezifität und Affinität entsprachen in hohem Maße den Ergebnissen, die der anschließend synthetisierte Inhibitor bei *in-vitro*-Versuchen lieferte (Swedberg et al., 2009).

Der Inhibitor der zweiten Generation SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> erfüllt dementsprechend sowohl das Kriterium einer hohen Spezifität für KLK4 als auch einer effektiven Hemmung im niedrig nanomolaren Bereich

(Swedberg et al., 2011). Beides ist für den Einsatz in Zellkulturversuchen vonnöten, weil nur so resultierende Effekte tatsächlich auf eine Inhibition von KLK4 zurückgeführt werden können. Für SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> wurde in der Zellkultur mit verschiedenen Zelllinien (inkl. PC3-Zellen) eine Halbwertszeit von ca. 55-70 h ermittelt. Bei Zugabe von 1 µm SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> ist demnach, aufgrund des für KLK4 ermittelten IC<sub>50</sub> im Bereich von ca. 0,06 nM, eine ausreichende Stabilität für die Dauer der Zellkulturversuche in jedem Fall gegeben (Swedberg et al., 2011).

### 3. Zellkultur

#### 3.1 Zelllinien

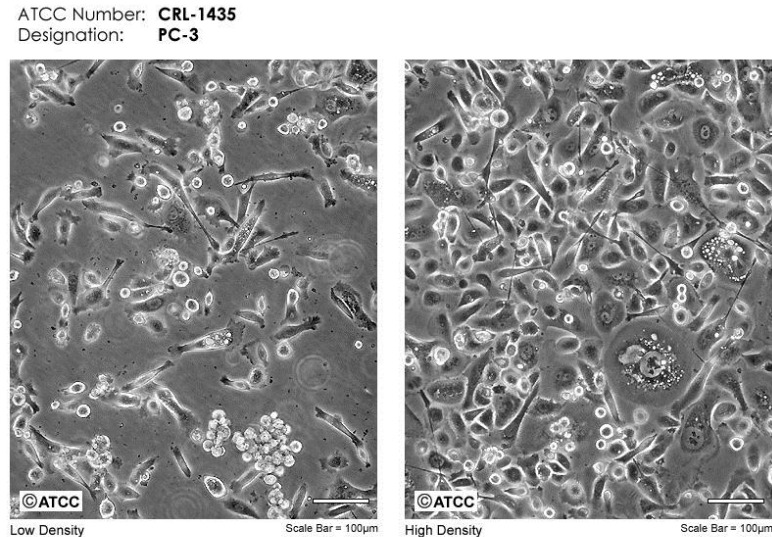
Im Rahmen dieser Arbeit wurden für zellkulturbasierte Experimente PC3- und LNCaP-Zelllinien verwendet. Beides sind humane Prostatakarzinom-Zelllinien, die ursprünglich aus metastatischen Absiedlungen eines humanen Prostatakarzinoms stammen. Tabelle 12 zeigt die Kulturbedingungen für beide Zelllinien.

**Tabelle 12: Kulturbedingungen für Zellkulturversuche**

CO <sub>2</sub> -Gehalt der Luft	5 %
Luftfeuchtigkeit	95 %
Temperatur	37°C
Zellkulturmedien	RPMI 1640 (Biochrom), P4-8F (AthenaES)
Zusätze	10 % FCS, 10 mM HEPES, 0,55 mM Asp, 0,27 mM Arg

Bei PC3 handelt es sich um eine immortalisierte Zelllinie mit einem annähernd triploiden Chromosomensatz (62, X0), die ursprünglich aus der ossären Metastase des Prostatakarzinoms eines 62-jährigen kaukasischer Abstammung isoliert wurde (ATCC & LGC\_Standards, 2016). Der etwas überraschende Umstand, dass bei PC3 kein für das männliche Geschlecht des Menschen typischer Chromosomensatz vorliegt, lässt sich durch die genomische Instabilität von genetisch entarteten Zellen erklären. So verändern Krebszellen im Laufe von Zellteilungen ihre chromosomale Ausstattung, es kommt vermehrt zu numerischen und strukturellen Chromosomenaberrationen. Beide Mechanismen können durch Veränderung der Ausstattung des Genoms mit Tumorsuppressor- und Protoonkogenen zu einer erhöhten Malignität beitragen (Cope et al., 2013; Heinrich et al., 2014b). In den von Hanahan und Weinberg 2011 überarbeiteten Hallmarks of Cancer ist die genomische Instabilität als eigene Säule vertreten (Hanahan & Weinberg, 2011).

Abbildung 12 zeigt das typische Wachstumsmuster der PC3-Zellen bei lichtmikroskopischer Vergrößerung in der Intravitalmikroskopie: eine Mischung aus spindelförmigen, fibroblastenähnlichen, und eher gedrunenen, epitheloiden Zellkörpern mit in der Regel großen, gut sichtbaren Zellkernen und Nukleoli.



**Abbildung 12: PC3-Zellen in lichtmikroskopischer Vergrößerung (Quelle: <http://www.lgc-standards-atcc.org>).**

In der nativen Lichtmikroskopie (Polarisationsmikroskop) werden einige phänotypische Eigenschaften der PC3-Zellen und ihr Wachstumsmuster erkennbar: prominente Zellkerne mit gut erkennbaren Nukleoli, variable Ausprägung vesikulärer Einschlüsse sowie ein heterogenes Wachstumsmuster mit rundlich ovalen (epitheloiden) bis spindelförmigen (fibroblastenähnlichen) Zellkörpern.

### 3.2 Medien, Zusätze, Lösungen

In Tabelle 13 sind die in der Zellkultur verwendeten Medien, Zusätze und Lösungen aufgeführt.

**Tabelle 13: Verwendete Medien und Zusätze**

Bezeichnung	Funktion	Hersteller
EDTA: 0,1 g/mL PBS	Stammlösung (Verdünnung vor Anwendung 1:100) zum Ablösen von adhärenierten Zellen	Gibco, Karlsruhe, D
Fetales Kälberserum	Wachstumsstimulator	Gibco, Karlsruhe, D
FNC Coating Mix	Vorbehandlung zur besseren Adhäsion von Zellen in Kulturflaschen	Athena Enzyme Systems, Baltimore, USA
G418 Geneticin	Selektion von transfizierten Zellen	Gibco, Karlsruhe, D
Hepes	pH-Puffer	Gibco, Karlsruhe, D
PBS Dulbecco	Spülen von adhärenierten Zellkulturen und Zellsuspensionen	Gibco, Karlsruhe, D
RPMI 1640 Medium	Standardmedium	Gibco, Karlsruhe, D
SFTI-FCQR Asn <sub>14</sub>	spezifischer (SFTI)-KLK4-Inhibitor	0,5 mM Stammlösung

UAMC 1399	spezifischer KLK4-Inhibitor	10 mM Stammlösung
BRFF-P4-8F Medium	definiertes Medium, das einen Einsatz ohne FCS ermöglicht	Athena Enzyme Systems, Baltimore, USA
0,4% (w/v) Trypanblau-Lösung	Anfärben von Zellen zur Zellzählung	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Trypsin/EDTA Lösung: 0,02% (w/v) EDTA, 0,05% (w/v) Trypsin, pH 7,4	Ablösen von adhärenierten Zellen	Biochrom GmbH, Berlin, D

Das verwendete fetale Kälberserum wurde vor der Verwendung in der Zellkultur gemäß eines Standardprotokolls bei 56°C für 30 min inaktiviert. Dieser Schritt dient der Ausschaltung der nicht definierten Mischung an zahlreichen Proteasen im Serum. Diese können zu erheblichen Verzerrungen in experimentellen Ergebnissen führen, da ein wesentlicher Teil der Untersuchungen dieser Arbeit sich der funktionellen und quantitativen Untersuchung von Proteinen widmet.

### 3.4 Kontamination durch Mykoplasmen

Im Rahmen der Zellkultur kommt es trotz Anwendung großer Sorgfalt und möglichst kontaminations-sicherer Arbeitsweise immer wieder zur Einschleppung von Keimen, u.a. Mykoplasmen. Diesen intrazellulären Mikroorganismen fällt insofern eine wichtige Bedeutung zu, als dass sie einerseits in der Lichtmikroskopie, die zur laufenden Beurteilung der Zellen zur Anwendung kommt, nicht ohne weiteres erkennbar sind (lediglich bei starker Belastung, jedoch nicht zuverlässig, als intrazelluläre vesikuläre Strukturen) und andererseits aber die Resultate von Experimenten deutlich beeinflussen können. Zu den belegten Einflüssen von Mykoplasmen zählen z.B. Störungen des Aminosäurestoffwechsels (Schmitz, 2009).

Um diese negativen Einflüsse abzuwenden, wurden in regelmäßigen Abständen, v.a. aber nach Inkulturnahme der Zellen, diese mittels PCR auf eine mögliche Mykoplasmenbelastung hin untersucht. Hierzu wurden aus der laufenden Zellkultur (z.B. im Rahmen eines Zelltransfers von einer Kulturflasche in die nächste) 200 µL Zellsuspension entnommen, die Zellen mit einem Lysepuffer lysiert und die freigesetzte DNA mithilfe des High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) isoliert. Anschließend wurden mykoplasmenspezifische DNA-Fragmente mittels PCR amplifiziert (siehe Tabelle 4), mittels einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und das Gel nach Belichtung auf das Auftreten einer entsprechenden Bande hin bewertet. Im Falle einer nachweisbaren Kontamination wurden die entsprechenden Zellen entweder verworfen oder mit einer Kombination der mykoplasmenwirksamen Antibiotika Tiamulin und Minocyclin behandelt (siehe Anhang, Protokoll zur Behandlung mykoplasmenkontaminierter Zellkulturen).



### 3.5 Stabile Transfektion von PC3-Zellen mit KLK4-Expressionsplasmiden

Zur Untersuchung der Frage, ob das Enzym KLK4 Einflüsse auf den Metabolismus von humanen Prostatakarzinomzellen ausübt, und ob seine proteolytische Aktivität hierfür vonnöten ist, wurde eine unabhängige Transfektion durchgeführt. Hierzu wurden Wildtyp PC3-Zellen verwendet, die endogen keine Expression von KLK4 zeigen. Diese Zellen wurden entweder mit einem leeren Vektor als Kontrolle oder mit Expressionsplasmiden transfiziert, die entweder das Gen für den Wildtyp der KLK4 oder für Mutanten der KLK4 tragen. Alle Plasmide tragen außerdem ein Resistenzgen für das Selektionsantibiotikum G418 (Geneticin).

Für die Transfektion wurden je  $2,4 \times 10^5$  Zellen mit Complete-Medium in 6-well-Platten ausgesät. Am Folgetag wurde das Complete-Medium für eine Stunde durch FCS-freies Medium ersetzt. In der Zwischenzeit wurden für jede Transfektante zwei Lösungen aus serumfreiem Medium und dem entsprechenden Plasmid (in sterilem Wasser gelöst, 2 und 4  $\mu\text{L}$ , Plasmid-DNA-Konzentration ca. 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) sowie einer entsprechenden Menge Lipofectin<sup>®</sup>-Reagenz vorbereitet. Im Anschluss wurde diese Lösung gegen das serumfreie Medium ausgetauscht und für 6 h auf den Wildtyp-Zellen belassen. Danach erfolgte ein Mediumswechsel, erneut auf ein serumhaltiges Medium.

Nach drei Tagen wurde mit der Antibiotikaselektion begonnen. Hierzu wurde auf ein Complete-Medium mit einem Zusatz von 1 g/L G418 (Geneticin) gewechselt. Der Selektionsdruck wurde für drei Wochen aufrechterhalten und anschließend wieder auf ein gewöhnliches Complete-Medium gewechselt.

### 3.6 Zelluläre Assays

#### 3.6.1 Konventioneller Proliferationsassay

Um zu klären, ob die Expression von KLK4 in humanen PC3-Zellen Einfluss auf die Proliferationsrate nimmt, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein konventioneller Proliferationsassay durchgeführt.

Hierzu wurden die Zellen nach Ablösung mit einer 1:10-EDTA-Lsg. abpipettiert, abzentrifugiert, in Medium resuspendiert, von dieser Suspension 10  $\mu\text{L}$  in 90  $\mu\text{L}$  Trypan-Blau-Lösung überführt und die Zellen anschließend drei Mal in der Neubauerzählkammer gezählt.

Anschließend wurde für jede Zelllinie das Volumen der Zellsuspension berechnet, das ca. 10.000 Zellen entsprach. Dieses Volumen wurde in dreifachem Ansatz in 6-well-Platten pipettiert, die im Vorhinein jeweils mit 2 mL Complete-Medium befüllt wurden. Nach 24, 48, 72 und 96 h wurden die Zellen erneut aus den Lochplatten abgelöst und gezählt.

### 3.6.2 *AlamarBlue*®-Zytotoxizitäts-Assay

Im Rahmen der Arbeit wurde außerdem untersucht, ob spezifische Inhibitoren der KLK4 unspezifische, zytotoxische Effekte auf Vektorkontrollzellen ausüben. Hierzu wurden Vektorkontrollzellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des spezifischen KLK4-Inhibitors UAMC 1399 über 96 h inkubiert. Entsprechend den Erkenntnissen aus den Versuchen zur Abnahme der inhibitorischen Kapazität (s. C 2.1) wurde nach 48 h die Hälfte der ursprünglichen Inhibitormenge in einer kleinen Menge Medium von 10 µL jedem Well zugegeben, um das inhibitorische Potenzial aufrechtzuerhalten. Nach 48, 72 und 96 h wurde zunächst ein Volumen von 10 µL *AlamarBlue*®-Farbstoff zu jedem Well gegeben. Nach zwei Stunden wurde die Absorption bei 540 nm im Wallac Victor2 1420 Multilabel Counter gemessen.

Für die Bestimmung des Zellwachstums der unterschiedlichen Varianten wurde der chromogene *AlamarBlue*®-Assay verwendet. Hierzu wurde jeweils ein einer Zellzahl von 10.000 entsprechendes Volumen der Zellsuspension abgemessen und anschließend auf zehn Löcher einer 96-well-„see-through“-Mikrotiterplatte pipettiert. Nach 48, 72 und 96 h wurden mit dem Multipipettor in jedes Well der Platte 10 µL *AlamarBlue*®-Farbstoff gegeben. Nach zwei Stunden wurde die Absorption bei 540 nm im Wallac Victor2 1420 Multilabel Counter gemessen.

Der *AlamarBlue*®-Farbstoff wird in Relation zu der Menge des im Medium enthaltenen Reduktionsäquivalents NADH<sup>+</sup> reduziert. Da die reduzierte Form ein von der oxidierten Form abweichendes Absorptionsspektrum aufweist, kann nach entsprechender Reaktionszeit so indirekt auf den Zellmetabolismus und die Zellzahl in den einzelnen Wells geschlossen werden. Studien des Herstellers zeigen über eine große Spannbreite von 50-50.000 Zellen pro Well einer 96-well-Platte eine weitgehend lineare Beziehung zwischen Zellzahl und Zählwert der *AlamarBlue*®-Messung.

## 4. Bestimmung der KLK4-Aktivität

### 4.1 Bestimmung des inhibitorischen Potenzials von KLK4-Inhibitoren

Zur Klärung der Frage, ob der KLK4-spezifische Diphenyl-Phosphonat-Inhibitor UAMC 1399 unter Zellkulturbedingungen (s. Tab. 12) stabil ist und sein inhibitorisches Potenzial entfalten kann, wurden verschiedene Fraktionen an Zellkulturmedium mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen (0, 50, 250 und 1000 nM) für 96 h im Inkubator belassen. Anschließend wurde das Medium asserviert und nach Abschluss des Versuchs ein Aktivitätstest durchgeführt.

Hierzu wurde Medium aus jeder Variante auf einer 96-Lochplatte mit einer Lösung von rekombinanter KLK4 (Sabine Creutzburg, Klinische Forschergruppe der Frauenklinik am Klinikum Rechts der Isar, München) sowie einem Puffer versetzt (50 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 0,005 % Tween 20, pH 8,0). Als letzter Schritt wurde ein fluorogenes Substrat („I-1120“, 0,1 mM 1:5 verdünnt, 20 µM finale Konzentration; I-1120 = Boc-Val-Pro-Arg-7-amino-4-methylcoumarin) zugefügt, sodass sich ein Gesamtvolumen des individuellen Ansatzes von 250 µL ergab. Als Positivkontrolle diente eine Probe Medium mit KLK4-Lösung ohne Inhibitor, als Negativkontrolle ein Ansatz mit Puffer und Substrat ohne Enzym. Daraufhin wurden die Fluoreszenzwerte für jede Probe (hervorgehoben durch aus dem Substrat freigesetztes 7-Amino-4-Methylcoumarin) in einem Spektralfluorimeter automatisch alle fünf min über einen Zeitraum von fünf Stunden gemessen.

### 4.2 Nachweis von sezernierter KLK4 in Zellkulturüberständen

Um das aktive Enzym KLK4 in Zellkulturüberständen von mit KLK4-Wildtyp-Plasmiden transfizierten PC3-Zellen nachzuweisen, wurden Überstände mithilfe von Zentrifugen-Filtereinheiten 10x konzentriert. Hierbei kamen Filtereinheiten zur Anwendung, die eine molekulare Poren-Richtgröße von 10 kDa aufweisen. Anschließend wurde wie bei der Untersuchung der Inhibitorkapazität vorgegangen, lediglich auf die Zugabe von rekombinanter KLK4 wurde verzichtet.

## 5. PAR-Micro-Array

Zur Identifizierung von Genen, die im Kontext einer KLK4-Expression variant reguliert werden, wurde ein PCR-Micro-Array mit 84 Genen des PAR-Signalweges durchgeführt. Hierzu wurde mRNA von Vektorkontrollzellen und von Wildtyp-KLK4-Zellen isoliert (siehe 6.1 RNA-Präparation) und mithilfe eines cDNA-Synthese-Kits in cDNA umgeschrieben (s. B 6.2).

Die cDNA der beiden Zelllinien wurde daraufhin hinsichtlich ihrer Expression von Genen bewertet, die alle mit dem Signalweg der Protease-aktivierten Rezeptoren in Verbindung stehen. Dabei bietet der *Micro-Array* die zeit- und materialsparende Möglichkeit, auf einer PCR-Platte für 84 Gene bereits vorgefertigte Mastermix-Lösungen (mit Farbreagenz-Mastermix, forward- und reverse-Primern) zu nutzen. Dabei wird zunächst auf die Verwendung von Triplikaten verzichtet; es handelt sich eher um eine orientierende Ersteinschätzung, um Kandidatengene zu finden, die im Anschluss exakter evaluiert werden können, wie etwa im Rahmen einer semiquantitativen Messung der Genexpression mittels RT-qPCR. Abbildung 13 zeigt den grafischen Output des PAR-*Micro-Arrays* von RSV versus KLK4-exprimierenden Zellen. Während ein Großteil der Gene innerhalb eines definierten Toleranzrahmens nur leicht differenziell exprimiert wird (Bereich innerhalb der Geraden), finden sich zu beiden Seiten des Toleranzbereichs einige Gene, die im Kontext der Expression eines Zielgens (hier KLK4) deutlich herauf- oder herunterreguliert werden.

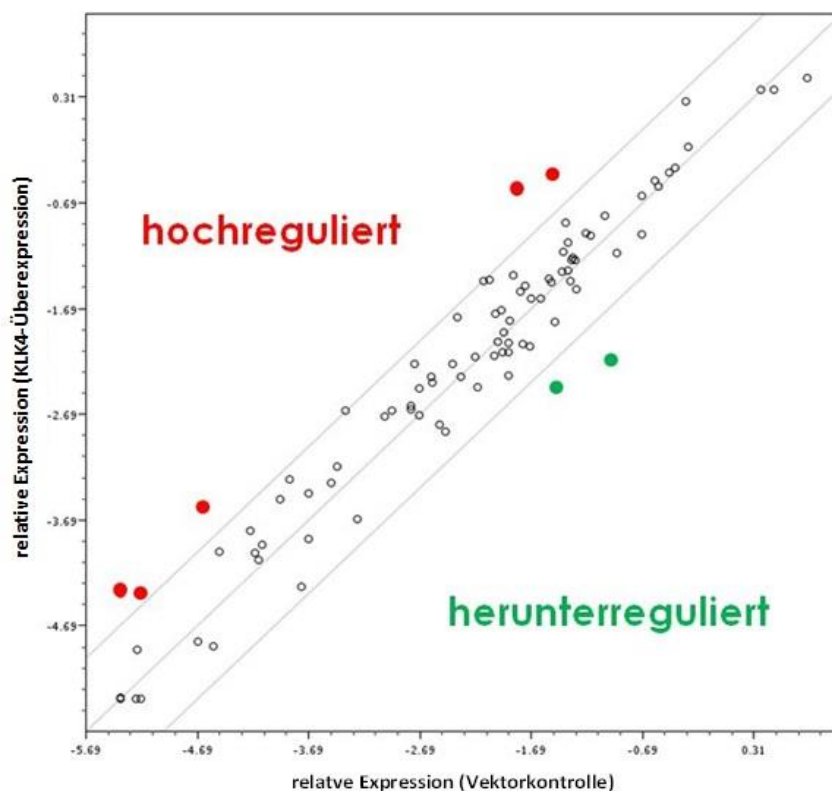
## 6. Quantifizierung von Genprodukten auf RNA-Ebene

### 6.1 RNA-Präparation

Zur Quantifizierung der Expression von transfizierten Genen in PC3-Zellen wurde aus diesen RNA isoliert. Hierzu wurde die jeweilige Zelllinie in T75-Kulturflaschen unter unterschiedlichen Bedingungen (-/+ KLK4-Inhibitoren) bis zu einer Konfluenz von ca. 70-80 % kultiviert. Nach Ablösung mit 0,01%-EDTA-Lösung wurden die Zellen abzentrifugiert und anschließend mit RLT-Puffer lysiert. Bei dieser Probenvorbereitung wurden bereits in der Probe enthaltene RNAsen denaturiert, um das Resultat der Analyse möglichst wenig zu verfälschen. Nach DNA-Verdau mittels DNase wurde die RNA mithilfe des RNAeasy-Mini-Kits im QiaCube isoliert. Das Kit basiert auf der Verwendung eluierender Zentrifugen-Säulchen, welche aus dem Reaktionsgemisch spezifisch RNA binden (Löffler et al., 2007c).

### 6.2 cDNA-Synthese

Um die resultierenden RNA-Isolate mittels qPCR semiquantitativ bewerten zu können, wurde die in den Proben enthaltene RNA in einem nächsten Schritt mithilfe des Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit durch die Aktivität der enthaltenen reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Hierzu kamen sog. Random Hexamer Primer zum Einsatz, die eine breite Abdeckung des Genoms ermöglichen.



**Abbildung 13:** Die grafische Darstellung des Outputs eines PAR-Micro-Arrays verdeutlicht die Veränderung der relativen Expression verschiedener Gene bei Überexpression von KLK4 im Vergleich zur Vektorkontrollzelllinie.

Jeder Punkt in der Abbildung symbolisiert die Expression eines Gens. Dabei entspricht die Lage der Punkte um die zentrale Gerade der relativen Expression im Vergleich zur Vektorkontrollzelllinie. Punkte, die auf der mittleren Geraden liegen, weisen bei Expression von KLK4 exakt die gleiche Expression auf wie in der Vektorkontrollzelllinie. Die beiden Geraden über und unter der zentralen Linie repräsentieren einen Streubereich, innerhalb dessen die Expression nur gering von derjenigen der Vektorkontrollzelllinie abweicht, sodass diese Gene als solche mit mehr oder weniger identischem Expressionslevel eingestuft und in der Regel keiner weiteren Evaluierung zugeführt werden. In rot und grün jeweils Gene, die durch KLK4-Expression induziert oder supprimiert werden.

## 6.3 qPCR-Assays

### 6.3.1 Verwendete Assay-Formate

Die cDNA wurde mithilfe von TaqMan- und Assays auf Basis der Roche Universal Probe Library amplifiziert und das Expressionslevel des jeweiligen Zielgens (CXCL1, KLK4, HPRT) bestimmt. Der qPCR-Cycler liefert dabei als Output sog. ct-Werte, die demjenigen Zyklus entsprechen, bei dem das Fluoreszenzsignal einer cDNA-konzentrationsabhängigen Farbstofffreisetzung eine definierte Schwelle überschreitet. Dabei verhalten sich ursprüngliche cDNA-Konzentration und ct-Wert reziprok.

Während die TaqMan-Assays bereits eine nicht näher definierte Sonde und Primer in Kombination enthalten, werden bei den auf der Roche Universal Probe Library basierenden Assays die Primer für ein gewünschtes Zielgen designet und eine passende von 99 DNA-Sonden ausgewählt, um die entsprechenden PCR-Amplifikationsprodukte nachzuweisen. Die 99 verfügbaren Sonden decken laut Hersteller alle erstellbaren Assays bzw. Zielgene genomweit ab.

Neben der Bestimmung des Expressionslevels der Zielgene wurde für das Zytokin CXCL1 außerdem ein Assay auf Basis der Roche Universal Probe Library eingeführt und auf seine Validität hin überprüft. Hierzu wurden steigende Verdünnungen der cDNA verwendet. Idealerweise sollten sich die beiden Kurven für den bereits etablierten Assay für das *Housekeeping*-Gen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) und den neuen Assay linear verhalten. Dies entspräche einer vergleichbaren Dynamik des Assays, da steigende Verdünnungen mit entsprechend höheren ct-Werten ein niedrigeres Expressionslevel im identischen cDNA-Ansatz ergeben.

### *6.3.2 Etablierung des qPCR-CXCL1-Assays auf Basis der Roche Universal Probe Library*

Im vorliegenden Fall konnte für den CXCL1-Assay auf Basis der Roche Universal Probe Library eine solche lineare Beziehung nachgewiesen werden, wie Abbildung 14 zeigt.

Jede Verdünnungsstufe wurde im Rahmen der qPCR in Duplikaten ausgewertet. Im Rahmen der qPCR wird je nach Expressionslevel eines Gens ein Farbstoff freigesetzt. Das heißt, je mehr cDNA des entsprechenden Gens in der ursprünglichen Probe zu Beginn des qPCR-Laufs vorhanden war, desto schneller steigt die Konzentration des Farbstoffs an. Da die ct-Werte demjenigen Zyklus der qPCR entsprechen, bei dem der freigesetzte Farbstoff einen Schwellenwert überschreitet, verhalten sie sich also umgekehrt proportional zum Expressionslevel des jeweiligen Gens, oder kurz gesagt: Hohe Expression, hohe cDNA-Konzentration, schnellere Freisetzung von Farbstoff und damit schnelleres Erreichen des Schwellenwerts mit einem resultierenden niedrigeren ct-Wert. Mit steigender Verdünnung der Proben steigt also auch der ct-Wert an, bei dem der Schwellenwert überschritten wird. Um nun einen Assay (hier CXCL1) auf seine Reliabilität hin zu testen, die quantitativen Verhältnisse auch tatsächlich abzubilden, wurden im abgebildeten Experiment eine Verdünnungsreihe für HPRT1 und eine für CXCL1 angefertigt. Für das Housekeeping-Gen HPRT1 ergeben sich grundsätzlich höhere Expressionslevel als für das Zytokin CXCL1. Die Steigungen der Geraden weisen große Ähnlichkeit auf, was bedeutet, dass mit identischer Verdünnung auch die Quantifizierung im qPCR-Assay die sinkenden Konzentrationen gut abbildet. Die berechneten Korrelationskoeffizienten liegen nahe 1 und zeigen damit eine gute Korrelation der Geraden als Modell für die Verdünnungsreihe an.

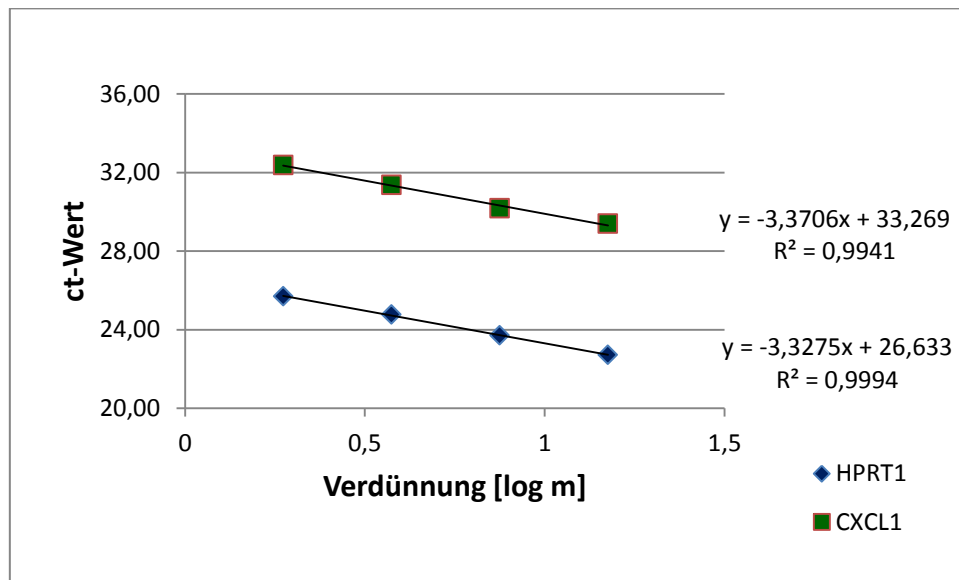


Abbildung 14: Verdünnungsreihe cDNA von PC3 KLK4 zur Validierung des CXCL1-Assays.

Die Punkte entsprechen den ct-Werten (Ordinate), die für die jeweilige Verdünnungsstufe (logarithmische Skala auf der Abszisse) erhoben wurden. Jeweils eine Verdünnungsreihe für CXCL1 und HPRT1 (*Housekeeping-Gen*). Rechts die Formeln für die Regressionsgeraden und die entsprechenden Korrelationskoeffizienten  $R^2$ .

## 7. Quantifizierung von CXCL1 auf Proteinebene

### 7.1 ELISA

Um Unterschiede in der Expression von Zytokinen auf Proteinebene bei verschiedenen Zelllinien detektieren zu können, wurden KLK4-exprimierende und RSV-Zellen parallel inkubiert und anschließend die Zytokinkonzentrationen in den Zellkulturüberständen mittels ELISA analysiert.

#### 7.1.1 Konditionierung von Zellkulturmedium

Die Zellen wurden nach Ablösung von einer Kulturplatte mit submaximalem Bewuchs und Zellzählung in einer Dichte von 200.000 Zellen/Well in einer 6-Lochplatte ausgesät und mit 10%-FCS-haltigem Medium überschichtet. Nach 24 h und entsprechender Adhäsion der Zellen wurde das Medium erneut gewechselt. Um die Konzentration an Zytokin für eine verbesserte Messbarkeit zu erhöhen, wurden die Zellen nach dieser Adhäsionsphase statt wie üblich mit 2 mL Medium mit nur 1 mL pro Well in der 6-Lochplatte überschichtet. Für jeden Messzeitpunkt und jede Zelllinie wurde ein eigenes Well verwendet, und der Zellkulturüberstand nach der jeweiligen Zeitspanne abgeerntet. Die Zellen wurden mit EDTA-Lösung abgelöst, mit Methylenblau gefärbt und so (unter Ausschluss angefärbter,

avitaler Zellkörper) nur die vitalen Zellen gezählt, um später die Zytokinkonzentrationen auf die vitale Zelldichte beziehen zu können.

Der Gehalt des konditionierten Überstands einer Zellkultur an Zytokinen hängt stark von den Medienkonditionen ab. Einerseits wurden zur Gewinnung von konditionierten Zellkulturüberständen Zellen über den gesamten Versuchszeitraum mit einem konventionellen Kulturmedium (mit Zugabe von 10 % FCS) kultiviert, andererseits wurden Zellen in 10%-FCS-haltigem Medium ausplattiert und erst nach 24 h auf ein FCS-freies Medium gewechselt. Dieses Vorgehen hat den Hintergrund, dass PC3-Zellen nur in FCS-haltigem Medium ausreichend auf der Oberfläche der Lochplatten adhären und die Versuche so reproduzierbare Ergebnisse liefern. Um den Einfluss von Spuren in den Kulturschalen verbleibenden FCS zu minimieren, wurden hierfür die Lochplatten nach Abzug des FCS-haltigen Mediums zunächst 3x mit PBS gespült, sodann für 1 h mit einem FCS-freien Medium überschichtet, erneut 3x mit PBS gewaschen und schließlich das finale FCS-freie Medium hinzugefügt.

### 7.1.2 Bestimmung der Zytokinkonzentrationen mittels ELISA

Zur Detektion von in konditioniertem Medium (Zellkulturüberständen) enthaltenem Zytokin CXCL1 (= GRO $\alpha$ ) und CXCL8 wurde das Medium nach Abschluss der Zellkultur durch Zentrifugation (Ultrazentrifugation bei 21000 RCF für 2 min) von Zelldetritus befreit. Anschließend wurden die Proben mit EDTA-freiem, unspezifischem Protease-Inhibitor (comp Mini EDTA-free<sup>®</sup>) versetzt und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C eingefroren.

Die enthaltenen Mengen an CXCL1 und CXCL8 wurden für die Proben jeweils in Duplikaten in einem sog. Sandwich-ELISA untersucht. Hierzu wird auf einer geeigneten 96-well-nunc-„see-through“-Platte zunächst ein *Capture*-Antikörper in PBS aufgebracht und über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen werden mittels eines *blocking buffers*, der u.a. BSA enthält, unspezifische Bindungsstellen auf der Platte besetzt. Nach Entfernung des *blocking buffers* werden die mit einer Reaktionslösung verdünnten Proben aufgebracht. Es folgt eine Inkubation mit einem biotinylierten Detektions-Antikörper. An diesen wird in einem nächsten Schritt ein Konjugat aus Streptavidin und Peroxidase („*horseradish peroxidase*“ aus *Armoracia rusticana* – Meerrettich) gebunden, was im letzten Schritt eine hochsensitive Detektion des gebundenen CXCL1 über eine Farbreaktion ermöglicht (Löffler et al., 2007a). Hierbei wird durch die Peroxidase ein chromogenes Substrat umgesetzt, dessen Absorption bei 450 nm gemessen und über eine Standardreihe in die Menge des in der ursprünglichen Probe enthaltenen CXCL1/CXCL8 umgerechnet werden kann. Um eine quantitative Aussage zur Zytokinkonzentration machen zu können und den tagesindividuellen Testeigenschaften gerecht zu werden, wurde für jeden durchgeführten ELISA eine Standardreihe anhand eines Zytokinstandards erstellt. Nach Messung



der absoluten Absorptionswerte am Ende des Experiments wurden schließlich die Probenwerte mit dieser Standardreihe verglichen und so die relativen Konzentrationen im Verhältnis zur Verdünnungsreihe bestimmt.

Im Verlauf von Versuchswiederholungen wurde schließlich der Frage nachgegangen, ob die KLK4-assoziierte Beeinflussung der Zytokinkonzentrationen auch unter veränderten Bedingungen reproduzierbar ist. Hierzu wurden die PC3-Zellen mit einem auf die Anforderungen der Kultur dieser Zellen ausgerichteten FCS-freien Medium ausplattiert und inkubiert, dem Zellkulturmedium P4-8F. Dieses hat den Vorteil, dass es, anders als Medium mit zugesetztem FCS, eine genau definierte Zusammensetzung aufweist. Insbesondere die beim fetalen Kälberserum chargenweise variierende, unbekannte Mischung aus Proteasen und Wachstumsfaktoren macht, trotz einer standardmäßigen Hitzeinaktivierung vor der Verwendung in der Zellkultur, die Analytik von Proteinen wie den Zytokinen schwierig (Schmitz, 2009).

Für eine ausreichende Adhärenz der Zellen bei Verwendung des definierten, FCS-freien P4-8F-Mediums war eine Vorbehandlung der Lochplatten mit dem FNC *Coating Mix* (AthenaES©) nötig. Dieser enthält verschiedene ECM- und Plasmaproteine, darunter Albumin, Fibronectin und Kollagen.

## 7.2 Western Blot

Zum Nachweis und zur Quantifizierung von humaner KLK4 aus Zelllysaten und Zellkulturüberständen wurden im Rahmen dieser Arbeit Western Blots angefertigt.

Um nachweisbare Mengen von KLK4 in den Überständen zu erhalten, wurden die Zellen der jeweiligen Transfektanten in T75-Kulturflaschen mit serumfreiem P4-8F-Medium ausgesät und für 72 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgelöst und mit einem Lysepuffer lysiert. Nach Abzentrifugieren von Zelldetritus (bei 1500 RPM, Sigma 4K15 Laborzentrifuge) wurde das so konditionierte Medium anschließend mithilfe von Zentrifugen-Filtereinheiten (mittlere Porengröße 10 kDa) bei 5000 RPM (Sigma 4K15 Laborzentrifuge) zehnfach konzentriert. Durch das deutlich höhere Molekulargewicht der KLK4 von 30 kDa wurde so die Konzentration des Enzyms im Überstand erhöht.

Anschließend wurden die jeweiligen Proben in einem SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Durch eine Behandlung mit einem primären und anschließend sekundären Antikörper, der ähnlich dem Prinzip beim ELISA an eine Peroxidase (ursprünglich aus *Armoracia rusticana* – Meerrettich) gekoppelt ist, lässt sich in einem abschließenden Entwicklungsschritt das Zielprotein auf der Nitrocelluloseplatte nachweisen und quantifizieren.

ren (Löffler et al., 2007a). Für die Umsetzung der Western Blots kam der KLK4-Antikörper Anti-KLK4 *rabbit #743C* zum Einsatz.

## 8. Statistische Methoden

Eine statistische Auswertung der Messergebnisse wurde mit Microsoft Excel<sup>®</sup> 2010 vorgenommen.

### 8.1 F-Test

Zur Bestimmung der Varianzhomogenität verschiedener zu vergleichender Versuchsgruppen kam der F-Test zum Einsatz. Diese Information ist nötig, um zum Vergleich der Mittelwerte zweier Versuchsgruppen den richtigen statistischen Test auszuwählen – im Falle vorliegender Varianzhomogenität der t-Test nach Student.

### 8.2 t-Test

Zur Beurteilung der Frage, ob sich die Mittelwerte der Messwerte zweier Versuchsgruppen signifikant voneinander unterscheiden ( $p\text{-Wert} < 0,05$ ), wurde der t-Test angewendet.

## C - Ergebnisse

### 1. Expression von KLK4 in humanen PC3-Zellen und Auswirkungen auf die Zellproliferation sowie Expression verschiedener Gene des PAR-Signalweges

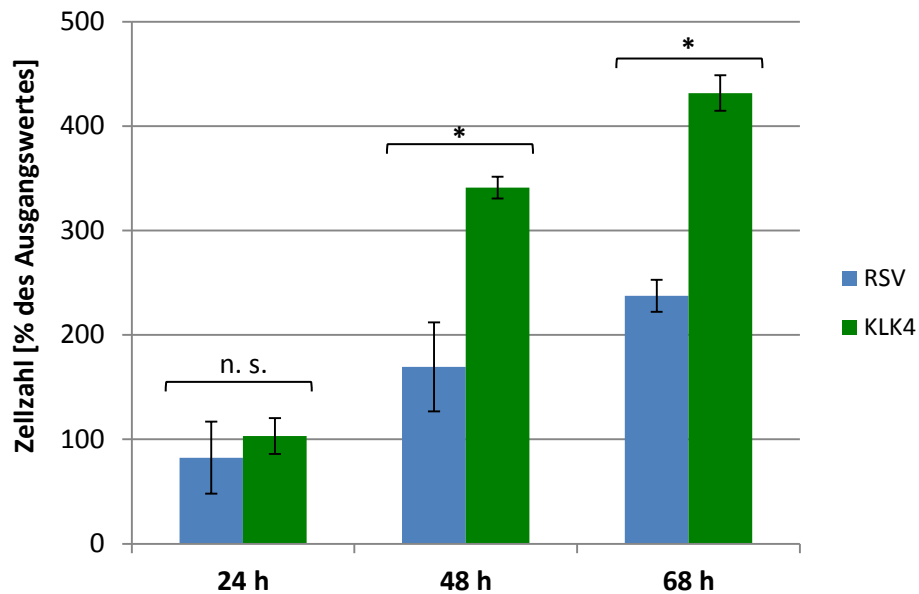
#### 1.1 Transfektion von PC3-Zellen mit KLK4-Expressionsplasmiden

Um den Effekt von KLK4 auf das Wachstumsverhalten und die Expression verschiedener Gene des PAR-Signalweges in humanen Prostatakarzinomzellen zu untersuchen, wurden für die vorliegende Arbeit Wildtyp-PC3-Zellen, die keine endogene Expression von KLK4 zeigen, stabil mit einem KLK4-Vektor transfiziert (B 3.5). Im Anschluss wurden diese durch Inkubation mit G418 (Geneticin) auf eine stabile Integration des Vektors hin selektiert. Aus der resultierenden Zellpopulation wurden in einem weiteren Schritt Klone isoliert. Die tatsächliche Expression von Wildtyp-KLK4 durch die transfizierten Zellen wurde schließlich auf mRNA-Ebene nach Zellyse, RNA-Extraktion und cDNA-Synthese mittels qPCR, sowie auf Proteinebene aus konzentrierten Zellkulturüberständen mittels Western Blot überprüft (C 3.2). Der Vergleich der KLK4-exprimierenden Transfektanten wurde stets mit Zellen durchgeführt, die mit einem leeren Expressionsvektor (Vektorkontrollzellen = „RSV“) transfiziert wurden, um einen Einfluss der Transfektion an sich auf die Ergebnisse auszuschließen. Aus diesem Grund wurde für alle Versuche eine Zelllinie dieser Vektorkontrollzellen aus derselben Transfektion parallel in Kultur gehalten.

#### 1.2 Untersuchung der Effekte von KLK4 auf das Wachstumsverhalten von PC3-Zellen

Mittels Zellzählung wurde die Geschwindigkeit der Vermehrung von PC3-Vektorkontrollzellen mit derjenigen der KLK4-exprimierenden PC3-Zellen in einem konventionellen Proliferationsassay verglichen. Hierfür wurden die Zellen der beiden Zelllinien zum gleichen Zeitpunkt in Triplikaten in 6-Lochplatten ausplattiert. Abbildung 15 zeigt die Entwicklung der Zellzahlen von PC3 RSV und PC3 KLK4 über den gesamten Versuchszeitraum.

Die konventionellen Proliferationsassays wurden in dreifacher Wiederholung ausgeführt. Abbildung 15 zeigt die Auswertung eines beispielhaften Proliferationsassays. Da die Verdopplungszeit von PC3-Zellen in der Zellkultur bei ca. 48 h liegt, ist die ermittelte Zellzahl nach 24 h entsprechend weitgehend identisch mit der Menge an ausplattierten Zellen. Nach 48 h steigen schließlich für beide Zelllinien die ermittelten Zellzahlen. Für die Inkubationszeiten 48 h und 68 h ergab sich eine signifikant erhöhte Proliferationsrate von PC3 KLK4 gegenüber PC3 RSV.



**Abbildung 15: Vergleich der Proliferation von PC3 KLK4- versus PC3 RSV-Zellen.**

In einem konventionellen Proliferationsassay wurde das Wachstum von KLK4-exprimierenden mit dem von Vektorkontrollzellen verglichen („RSV“). Die Zelllinien wurden zum gleichen Zeitpunkt in Triplikaten in einer Dichte von 10.000 Zellen pro Well in einer 6-Lochplatte ausgesät und nach 24, 48 und 68 h gezählt. Nach 48 und 68 h zeigen die KLK4-Wildtyp-Zellen eine deutlich höhere Proliferationsrate. \* =  $p < 0,01$ .

### 1.3 KLK4 nimmt Einfluss auf die Expression einer Vielzahl von Genen

#### 1.3.1 Identifizierung von Zielgenen der KLK4 mithilfe des PAR-Micro-Arrays

Der Einfluss von KLK4 auf Signalwege, die mit Charakteristika bösartigen Wachstums von Tumorzellen verschiedener Tumoren assoziiert sind, ist schon längere Zeit bekannt, s. A 4. Hierzu zählt etwa die Interaktion mit dem PAR-Signalweg (PAR = *protease activated receptors*). PARs sind membranständige, durch Proteolyse aktivierte Rezeptoren, die in die Expression verschiedener Gene involviert sind. Es ist bekannt, dass KLK4 einen Einfluss auf den PAR-Signalweg ausübt (Greenberg et al., 2003; Matsumura et al., 2005; Beaufort et al., 2006; Obiezu et al., 2006; Mize et al., 2008; Ramsay et al., 2008).

Um zum weiteren Verständnis der Funktionen von KLK4 im PAR-Signalweg beizutragen, wurde mittels eines PAR-Microarrays (s. B 5.) der Einfluss einer KLK4-Expression auf eine Vielzahl an Genen untersucht, die mit dem PAR-Signalweg assoziiert werden. Die untersuchten Gene, die eine differenzielle Expression in KLK4-überexprimierenden versus Vektorkontrollzellen zeigten, lassen sich in drei Gruppen einteilen. Es ließen sich Gene identifizieren, die im Kontext einer Expression von KLK4 supprimiert (Tabelle 14) oder induziert (Tabelle 15), oder aber durch KLK4-Expression nicht in ihrer Ex-

pression beeinflusst werden. Hier aufgeführt sind lediglich jene Gene, deren Expression sich unter KLK4-Expression besonders deutlich verändert (d.h. mindestens 2-fach erhöht oder erniedrigt).

**Tabelle 14: Gene, deren Expression unter KLK4-Expression um mind. 50 % reduziert wird.**

	Versuchslauf 1		Versuchslauf 2	
<b>CXCL8</b>	2%	A	3%	A
<b>CXCL1</b>	4%	A	2%	A
<b>CSF2</b>	4%	C	38%	C
<b>IL1B</b>	6%	B	16%	B
<b>F2RL2</b>	29%	B	46%	C
<b>CCL2</b>	38%	A	49%	A

Prozentangaben stehen für die Expression des jeweiligen Gens durch KLK4-exprimierende Zellen im Vergleich zu Vektorkontrollzellen. A = ct-Werte für RSV und KLK4 < 30, B = ct-Werte für eine Zelllinie < 30, für die andere Zelllinie > 30, C = ct-Werte für beide Zelllinien > 30.

Die Prozentangaben geben die Expression des jeweiligen Gens durch KLK4-exprimierende PC3-Zellen (bezogen auf PC3 RSV) an. Aufgeführt sind lediglich jene Gene, die aufgrund ihrer besonders deutlichen (d.h. einer mindestens 2-fach erniedrigten) Suppression unter KLK4-Expression für eine weitere Evaluation geeignet erschienen. Neben den Prozentangaben findet sich jeweils eine Angabe zum Expressionslevel des jeweiligen Gens. Dabei steht „A“ für solche Gene, bei denen der *Micro-Array* für RSV und KLK4 ct-Werte < 30 ergab, die also unter beiden Bedingungen (PC3 RSV und PC3 KLK4) eine robuste Expression aufweisen. „B“ steht für solche Gene, bei denen die Expressionslevel für eine Zelllinie (PC3 RSV oder PC3 KLK4) ct-Werte < 30, für die andere > 30, und schließlich „C“ für solche Gene, bei denen die Expressionslevel für beide Zelllinien ct-Werte > 30 ergaben. Bei sehr hohen ct-Werten für PC3 RSV und PC3 KLK4 ist die Beurteilbarkeit der Ergebnisse kritisch zu hinterfragen, da die detektierten Mengen an cDNA sehr gering sind und Messfehler verstärkt zum Tragen kommen. Weist lediglich eine Variante einen ct-Wert > 30 (und damit eine sehr geringe Expression), die andere jedoch einen niedrigen ct-Wert < 30 auf (sehr hohe Expression), stellt dies hingegen eine brauchbare Information dar, weil die Expressionslevel für das entsprechende Gen sich in Abhängigkeit der KLK4-Expression stark verändern.

In zwei unabhängig durchgeführten PAR-*Microarrays* zeigten insgesamt sechs Gene eine Expression, die für KLK4-exprimierende PC3-Zellen um mindestens den Faktor 2 gegenüber PC3 RSV erniedrigt war. Ein Gen dieser Gruppe gehörte der Kategorie „C“ an (ct-Werte für PC3 RSV und PC3 KLK4 in beiden Versuchsläufen jeweils > 30) und erschien damit nicht für eine weitere Evaluation geeignet

(CSF2). Ein Gen gehörte der Kategorie „B“ an (ct-Werte für PC3 RSV in beiden Versuchsläufen < 30 und für PC3 KLK4 > 30): IL1B. Die Ergebnisse für das Gen F2RL2 fielen für die beiden Versuchsläufe unterschiedlich aus (erster Versuchslauf Kategorie B, zweiter Versuchslauf Kategorie C). Drei Gene gehörten der Kategorie „A“ an (ct-Werte für PC3 RSV und PC3 KLK4 in beiden Versuchsläufen < 30): CXCL1, CXCL8 und CCL2. Für eine weitere Evaluation eigneten sich aus den weiter oben genannten Gründen in erster Linie die Gene der Gruppen A und B.

**Tabelle 15: Gene, deren Expression unter KLK4-Expression um mind. 200 % gesteigert wird.**

	Versuchslauf 1		Versuchslauf 2	
<b>IKBKB</b>	203%	A	282%	A
<b>KDR</b>	1385%	A	2213%	A
<b>GATA2</b>	818%	B	2339%	B
<b>PLG</b>	616%	C	705%	C
<b>PROC</b>	406%	C	844%	C
<b>F10</b>	361%	C	286%	C
<b>ELK1</b>	230%	A	581%	A

Die Prozentangaben geben die Expression des jeweiligen Gens durch KLK4-exprimierende Zellen im Vergleich zu Vektorkontrollzellen an. Legende siehe Erläuterungen zu Tabelle 14.

In der Reihe der Gene, deren Expression durch eine KLK4-Expression induziert wird, fanden sich drei Gene in der Gruppe „C“ (ct-Werte für PC3 RSV und PC3 KLK4 > 30): PLG, PROC und F10. Ein Gen fand sich in Gruppe „B“ (ct-Werte für RSV < 30, für KLK4 > 30): GATA2, sowie drei Gene in der Gruppe „A“ (ct-Werte für PC3 RSV und PC3 KLK4 < 30): IKBKB, KDR und EKL1.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden für eine weitere Validierung auf RNA- und Proteinebene zwei Gene aus der Gruppe „A“ ausgewählt, deren Expression sich durch KLK4-Expression mindestens um den Faktor 5 erniedrigt (< 20 % der Expression von PC3 RSV): die beiden Zytokine CXCL1 und CXCL8.

### *1.3.2 Quantifizierung von CXCL1 und CXCL8 auf Proteinebene mittels ELISA – Versuche mit FCS-haltigem Medium*

Zur Beurteilung eines Einflusses der KLK4-Expression auf die Genexpression von CXCL1 und CXCL8 auf Proteinebene wurden mithilfe von Zytokin-spezifischen ELISAs die Konzentrationen an CXCL1 und CXCL8 in Zellkulturüberständen von PC3-Zellen ermittelt. Die Zellen wurden zunächst mit unter-

schiedlichen Medien ausplattiert und nach 24 h das Medium gewechselt. Die angegebenen Versuchszeiten beziehen sich jeweils auf die Inkubationszeit nach dem Mediumswechsel.

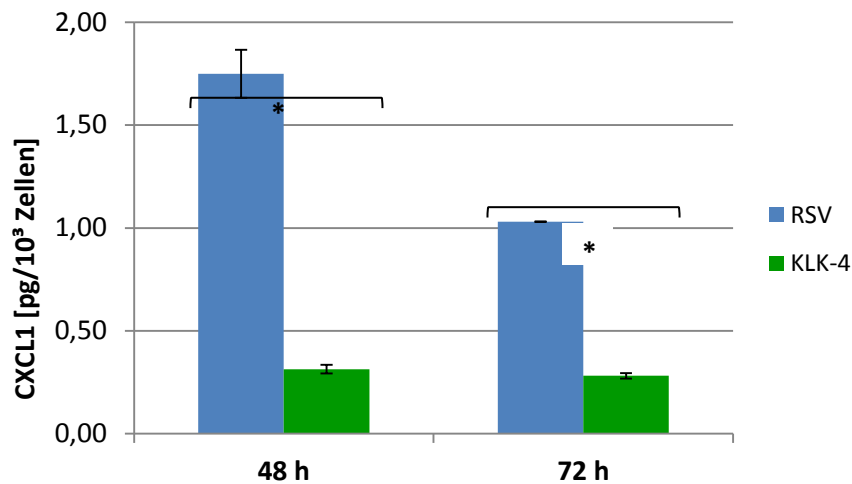
Die folgenden Abbildungen beschreiben jeweils die Ergebnisse von CXCL1- und CXCL8-ELISAs aus Zellkulturüberstand. Die Abbildungen 16 und 18 zeigen hierbei jene Versuche, bei denen die gesamte Inkubation mit 10%-FCS-haltigem Medium durchgeführt wurde. Die Abbildungen 17 und 19 hingegen zeigen solche Versuche, bei denen die Zellen zunächst in FCS-haltigem Medium ausplattiert wurden und nach der Adhäsionsphase ein Umstieg auf FCS-freies Medium erfolgte.

Die CXCL1-Konzentration in der Vektorkontrollgruppe (RSV) beträgt für beide Messzeitpunkte ein Vielfaches derjenigen Konzentration, die für die KLK4-exprimierenden Zellen bestimmt wurde. Für den zweiten Messzeitpunkt nach 72 h fällt der Unterschied geringer aus, ist aber nach wie vor signifikant.

Im Vergleich zur Inkubation der PC3-Zellen in FCS-haltigem Medium fielen die gemessenen CXCL1-Konzentrationen im FCS-freien Medium deutlich geringer aus. Außerdem zeigte sich eine dem vorhergehenden Versuch konträre Entwicklung der Konzentrationen über den Versuchszeitraum. So steigt die CXCL1-Konzentration von 48 auf 72 h deutlich an. Für beide Zeiträume ergibt sich ein signifikanter Unterschied in den CXCL1-Konzentrationen zwischen PC3 RSV und PC3 KLK4.

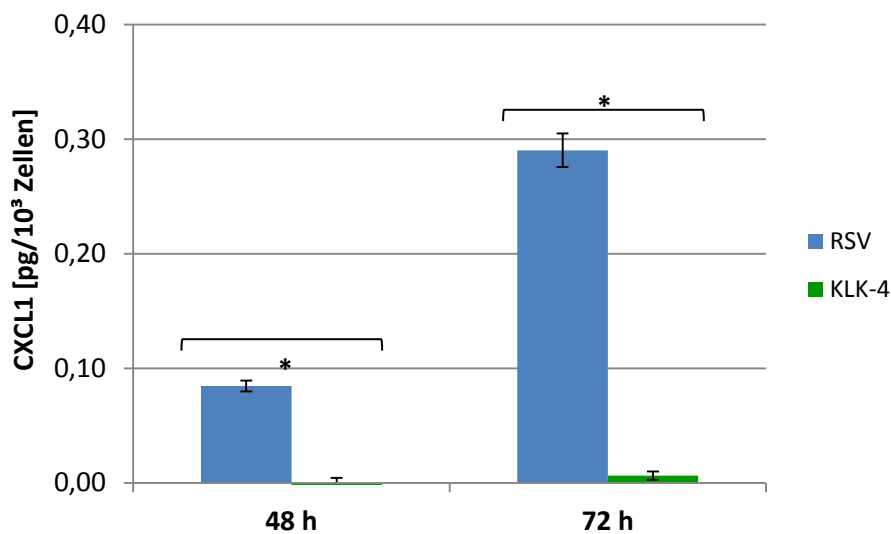
Sowohl die absoluten Konzentrationen von CXCL8 als auch die relative Änderung der Konzentration unter KLK4-Expression sind weitgehend mit denen von CXCL1 (Abb. 17) vergleichbar. So zeigt sich für beide Inkubationszeiten (48 und 72 h) eine um ein Vielfaches höhere Konzentration an CXCL8 im Überstand von PC3 RSV gegenüber PC3 KLK4 (Abb. 18 und 19). Auch der Trend der Entwicklung der CXCL8-Konzentrationen ist mit demjenigen von CXCL1 identisch (sinkende Werte von 48 auf 72 h). Für beide Inkubationszeiten ergibt sich ein signifikanter Unterschied der Konzentrationen an CXCL8.

Die absoluten Konzentrationen von CXCL8 sind nach Inkubation in FCS-freiem Medium (Abb. 19) deutlich niedriger als nach Inkubation in FCS-haltigem Medium (Abb. 18). Die CXCL8-Konzentrationen für PC3 KLK4 sind über einen Zeitraum von 72 h stets niedriger als für PC3 RSV. Außerdem lässt sich ein Anstieg der CXCL8-Konzentration für beide Varianten über den beobachteten Zeitraum hinweg feststellen. Die Unterschiede der CXCL8-Konzentrationen zwischen PC3 RSV und PC3 KLK4 sind für beide Inkubationszeiten signifikant.



**Abbildung 16: KLK4-überexprimierende vs. Vektorkontrollzellen (RSV): CXCL1-Bestimmung im Zellkulturüberstand (FCS-haltiges Medium) mittels ELISA. Zeitangaben beziehen sich auf die Inkubationszeit nach dem Mediumswechsel.**

Analyse der Zellkulturüberstände von PC3 RSV versus PC3 KLK4 –Zellen in FCS-haltigem Medium. Die CXCL1-Konzentration ist unter KLK4-Expression zu beiden Zeitpunkten niedriger als im Überstand von RSV. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines beispielhaften Experiments. Zur Validierung der Ergebnisse wurden sowohl die Zellkultur als auch die folgenden ELISAs mindestens dreimal durchgeführt, die Ergebnisse waren jeweils vergleichbar. \* =  $p < 0,01$ .

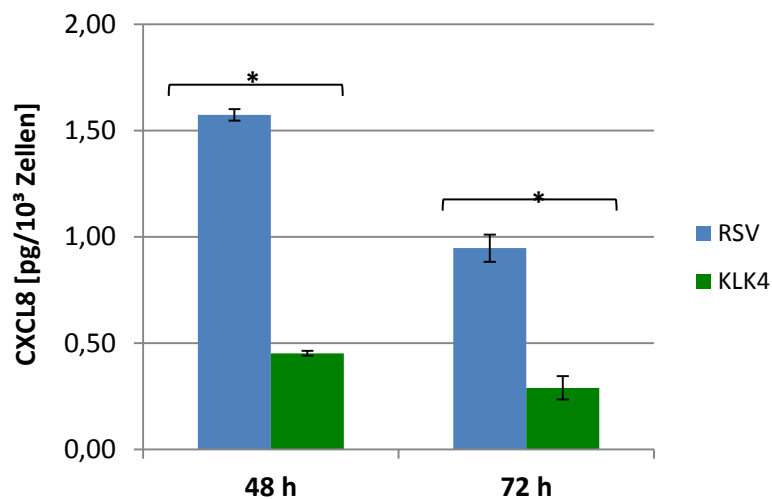


**Abbildung 17: KLK4-überexprimierende vs. Vektorkontrollzellen (RSV): CXCL1-Bestimmung im Zellkulturüberstand (FCS-freies Medium) mittels ELISA. Zeitangaben beziehen sich auf die Inkubationszeit nach dem Mediumswechsel.**

Analyse der Zellkulturüberstände von PC3 RSV versus PC3 KLK4 –Zellen in FCS-freiem Medium. Hierbei zeigt sich eine deutlich geringere CXCL1-Gesamtkonzentration und ein konträrer Verlauf im Vergleich zur Kultivierung in FCS-haltigem Medium (bei FCS-haltigem Medium absinkend, bei FCS-freiem ansteigend über die Zeit). Für beide Zeiträume wurde ein signifikanter Unterschied in den CXCL1-Konzentrationen zwischen PC3 RSV und PC3 KLK4 beobachtet. Zu Versuchswiederholungen s. Abb. 16. \* =  $p < 0,01$ .

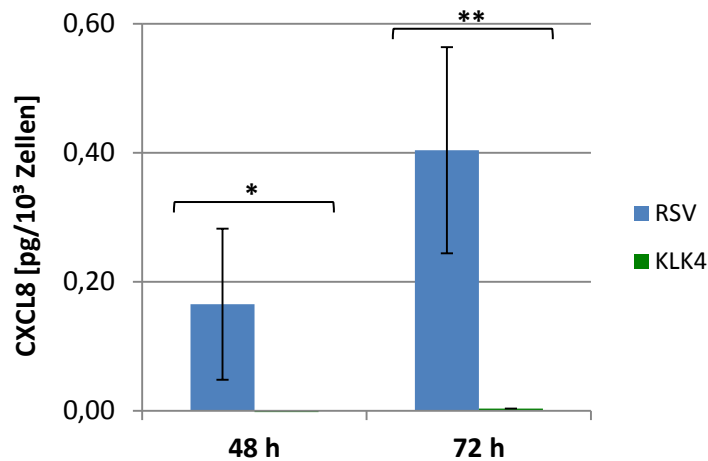


Die Expressionlevel von CXCL1 und CXCL8 zeigen auf Proteinebene eine Abhängigkeit von den Kulturbedingungen. So fallen die Unterschiede im Gehalt an CXCL1 und CXCL8 des Zellkulturüberstands von Vektorkontrollzellen vs. KLK4-exprimierenden Zellen bei Wechsel auf FCS-freies Medium (nach einer Adhäsionsphase in FCS-haltigem Medium) deutlicher aus als bei durchgehender Kultur in FCS-haltigem Medium. Insgesamt ist der Effekt einer Reduktion der Zytokinkonzentrationen im Zellkulturüberstand von KLK4-exprimierenden Zellen über die unterschiedlichen Mediumsmodalitäten stabil und lässt sich auch mit biologischen Replikaten sowie in unabhängigen Transfektionen nachweisen. Im weiteren Verlauf der Experimente wurde der Fokus auf die detailliertere Untersuchung der KLK4-Effekte auf die Expression von CXCL1 gelegt.



**Abbildung 18: KLK4-überexprimierende vs. Vektorkontrollzellen (RSV): CXCL8-Bestimmung im Zellkulturüberstand (FCS-haltiges Medium) mittels ELISA. Zeitangaben beziehen sich auf die Inkubationszeit nach dem Mediumswechsel.**

Analyse der Zellkulturüberstände von PC3 RSV versus PC3 KLK4 –Zellen in FCS-haltigem Medium. Die absoluten Konzentrationen, Konzentrationsänderungen und der Einfluss von KLK4 auf CXCL8-Konzentrationen sind vergleichbar mit den Ergebnissen für CXCL1. Für beide Inkubationszeiten zeigte sich ein auf dem Niveau  $p < 0,01$  signifikanter Unterschied der Konzentrationen an CXCL8. Zu Versuchswiederholungen s. Abb. 17. \* =  $p < 0,01$ .



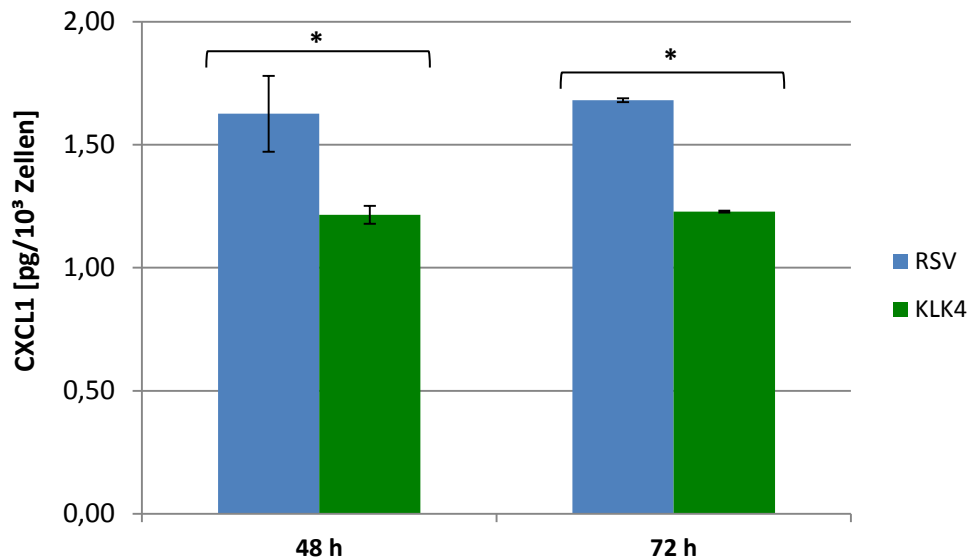
**Abbildung 19: KLK4-überexprimierende vs. Vektorkontrollzellen (RSV): CXCL8-Bestimmung im Zellkulturüberstand (FCS-freies Medium) mittels ELISA. Zeitangaben beziehen sich auf die Inkubationszeit nach dem Mediumswechsel.**

Analyse der Zellkulturüberstände von PC3 RSV versus PC3 KLK4 –Zellen in FCS-freiem Medium. Die absoluten Konzentrationen von CXCL8 sind nach Kultivierung in FCS-freiem Medium deutlich niedriger als in FCS-haltigem Medium. Eine KLK4-Expression bewirkt signifikant verminderte CXCL8-Konzentrationen über den gesamten Versuchszeitraum. Ähnlich wie bei CXCL1 wird ein Anstieg der CXCL8-Konzentration über 72 h beobachtet. Zu Versuchswiederholungen s. Abb. 17. \* =  $p < 0,01$ , \*\* =  $p < 0,05$ .

### 1.3.3 Quantifizierung von CXCL1 auf Proteinebene mittels ELISA – Versuche mit FCS-freiem, synthetischem P4-8F Medium

Um die Einflüsse von FCS als nicht klar definiertem Bestandteil des üblicherweise verwendeten Zellkulturmediums auszuschließen, wurden weitere Versuche mit einem kommerziell erhältlichen, synthetischen Zellkultur-Medium (P4-8F) durchgeführt, das eigens für die Kultur von PC3-Zellen entwickelt wurde und eine Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten PC3-Transfektanten ohne Zusatz von FCS ermöglicht.

Während die absoluten Konzentrationen von CXCL1 mit denjenigen aus den Versuchen mit FCS-haltigem Medium vergleichbar sind, zeigt sich bezüglich der relativen Änderung der CXCL1-Konzentrationen bei Expression von Wildtyp-KLK4 ein Unterschied: Die CXCL1-Konzentrationen im Überstand von KLK4-exprimierenden Zellen sind gegenüber PC3 RSV weniger stark abgeschwächt. Dennoch ergeben sich für beide Beobachtungszeiträume signifikant unterschiedliche Konzentrationen (Abb. 20).

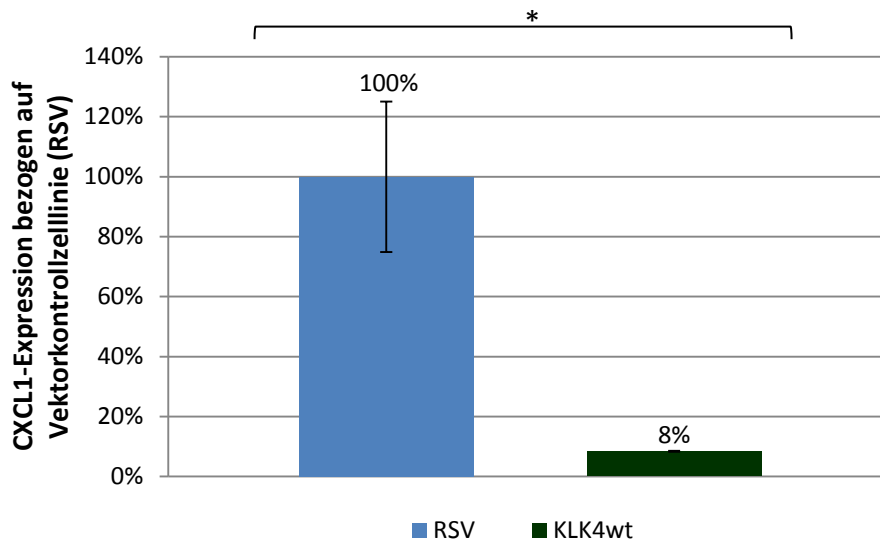


**Abbildung 20: KLK4-überexprimierende vs. Vektorkontrollzellen (RSV): CXCL1-Bestimmung im Zellkulturüberstand (serumfreies P4-8F-Medium) mittels ELISA. Zeitangaben beziehen sich auf die Inkubationszeit nach dem Mediumswechsel.**

Zellkultur PC3 RSV versus PC3 KLK4 in strikt FCS-freiem P4-8F-Medium. Bei Ausplattierung und strikt FCS-freier Zellkultur in P4-8F-Medium zeigt sich ein weniger stark ausgeprägter Einfluss einer KLK4-Überexpression auf die CXCL1-Konzentrationen im Zellkulturüberstand als bei Ausplattierung in FCS-haltigem und erst anschließendem Umstieg auf FCS-freies Medium. Dennoch wurden für beide Beobachtungszeiträume auf dem Niveau  $p < 0,01$  signifikant unterschiedliche CXCL1-Konzentrationen beobachtet. Zu Versuchswiederholungen s. Abb. 17. \* =  $p < 0,01$ .

#### *1.3.4 Validierung der Ergebnisse des PAR-Microarrays für die unter KLK4-Expression verminderte Expression von CXCL1 auf RNA-Ebene mittels qPCR*

Zum Zweck einer weiteren Validierung der Ergebnisse aus dem PAR-Microarray wurde mittels quantitativer PCR untersucht, ob die CXCL1-Expression durch PC3-Zellen bei Überexpression von KLK4 supprimiert wird. Hierzu wurden die Zellen in Kultur genommen, nach 48 h lysiert und mithilfe mehrerer Verfahrensschritte (B 6.1 und 6.2) RNA isoliert, in cDNA überführt und schließlich mithilfe eines Assays auf Basis der Roche Universal Probe Library die relative Menge an CXCL1-RNA bezogen auf das House-keeping-Gen HPRT1 quantitativ bestimmt. Die folgende Abbildung 21 zeigt das Ergebnis einer qPCR für RNA, die aus einer Zellkultur von PC3 RSV versus PC3 KLK4 isoliert wurde.



**Abbildung 21: qPCR für CXCL1 nach RNA-Isolierung aus PC3 KLK4 versus PC3 RSV.**

Die quantitative Bestimmung der relativen CXCL1-Expression für KLK4-exprimierende PC3-Zellen (KLK4wt) zeigt eine deutliche Suppression von CXCL1 gegenüber der Vektorkontrollzelllinie (PC3 RSV). Die Suppression fällt etwas geringer aus als im PAR-Microarray, ist jedoch ebenfalls signifikant und gut mit diesen Ergebnissen vergleichbar. Der Versuch wurde in einem dreifachen Ansatz durchgeführt. \* =  $p < 0,01$ .

Während die beiden Versuchsläufe des PAR-Microarrays für KLK4-exprimierende PC3-Zellen im Mittel eine CXCL1-Expression von 3 % gegenüber der Vektorkontrollzelllinie PC3 RSV zeigten, lag in der verifizierenden qPCR die CXCL1-Expression für die KLK4-Variante bei 8 % bezogen auf PC3 RSV. Dieser eher geringe Unterschied lässt sich dadurch erklären, dass für die qPCR sowohl andere Primer, unterschiedliche Referenzgene (= *Housekeeping*-Gene) als auch ein anderes Assay-Design für die Detektion von CXCL1 verwendet wurde.

## 2. Hemmung der proteolytischen Aktivität von KLK4 und Auswirkungen auf die KLK4-assoziierten Effekte

Der Vergleich von PC3-Zellen mit und ohne Expression von KLK4 legt nahe, dass die Protease Einfluss auf das Proliferationsverhalten von Tumorzellen sowie die Expression verschiedener Gene nimmt. Jedoch ergibt sich aus der bloßen Expression von Wildtyp-KLK4 in PC3-Zellen kein Anhalt dafür, ob für die veränderten Eigenschaften der Zellen und den Einfluss auf die Genexpression auch die Aktivität des Enzyms nötig ist. Auch ist unklar, ob die Expression von KLK4 in der Zellkultur tatsächlich bedeutet, dass aktive KLK4 im Zellkulturmedium vorhanden ist. Um Antwort auf die Frage nach der Not-

wendigkeit der KLK4-Aktivität zu erhalten, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Versuche mit spezifischen Inhibitoren der KLK4 durchgeführt.

## **2.1 Einsatz des spezifischen KLK4-Inhibitors UAMC 1399 und Auswirkungen einer KLK4-Inhibition auf die Zellproliferation von KLK4-überexprimierenden vs. Vektorkontroll-PC3-Zellen**

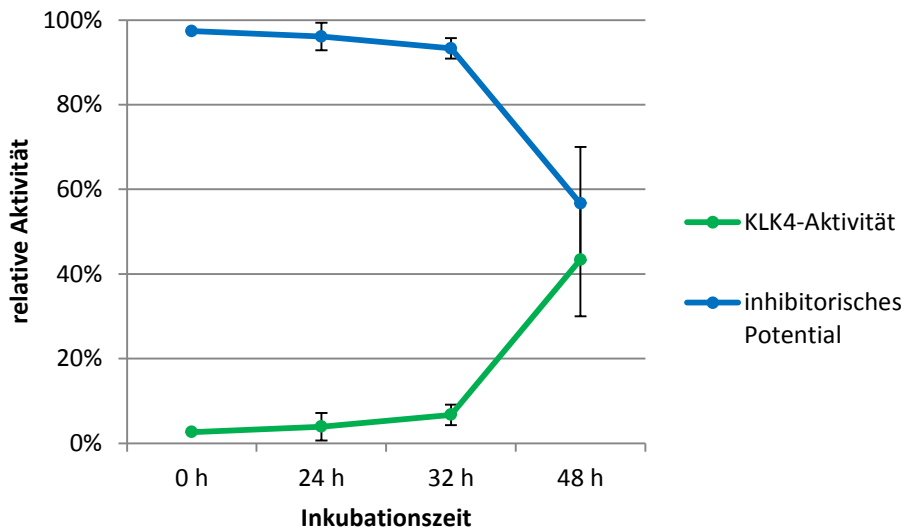
### *2.1.1 Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von UAMC 1399*

UAMC 1399 ist ein von der Arbeitsgruppe Joossens an der Universität Antwerpen (UAMC = **U**niversity of **A**ntwerp **M**edicinal **C**hemistry) entwickelter, spezifischer Diphenyl-Phosphonat-Inhibitor der KLK4 (van Soom et al., 2015). Zur Einschätzung der Stabilität dieses Inhibitors unter Zellkulturbedingungen wurden verschiedene Konzentrationen des Inhibitors mit einem Besatz an Zellen der Vektorkontrollzelllinie (PC3 RSV) inkubiert. Nach 0, 24, 32 und 48 h wurde der Zellkulturüberstand jeweils abzentrifugiert und schließlich in einem Aktivitätstest unter Zugabe rekombinanter KLK4 das inhibitorische Potenzial von UAMC 1399 anhand der gemessenen Enzymaktivität bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die inhibitorische Kapazität von UAMC 1399 nach 48 h um etwa 50 % abnimmt. Abbildung 22 zeigt das Ergebnis des Aktivitätstests.

### *2.1.2 Überprüfung der Zytotoxizität von UAMC 1399*

Neben der Frage, ob UAMC 1399 unter Zellkulturbedingungen die KLK4-Aktivität ausreichend zu hemmen vermag, ist auch die Frage nach einer möglicherweise vorhandenen unspezifischen Zytotoxizität des Inhibitors von Bedeutung, da solche Effekte die Ergebnisse von Zellkulturexperimenten verzerren würden. Zu diesem Zweck wurden Zellen der KLK4-defizienten Vektorkontrollzelllinie (PC3 RSV) über einen Zeitraum von 96 h mit verschiedenen Konzentrationen von UAMC 1399 inkubiert und anschließend ihre Proliferationsrate mittels eines chromogenen Assays (alamarBlue®) bestimmt. Abbildung 23 zeigt das Ergebnis des entsprechenden alamar-Blue-Assays.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass bei Anwendung von UAMC 1399 ( $IC_{50}$  für KLK4 ~ 5 nM) in Konzentrationen bis zu 1  $\mu$ M, bei denen von einer nahezu vollständigen Hemmung der KLK4-Aktivität ausgegangen werden kann, keine unspezifischen, zytotoxischen Effekte auf das Wachstum von PC3-Vektorkontrollzellen auftreten.

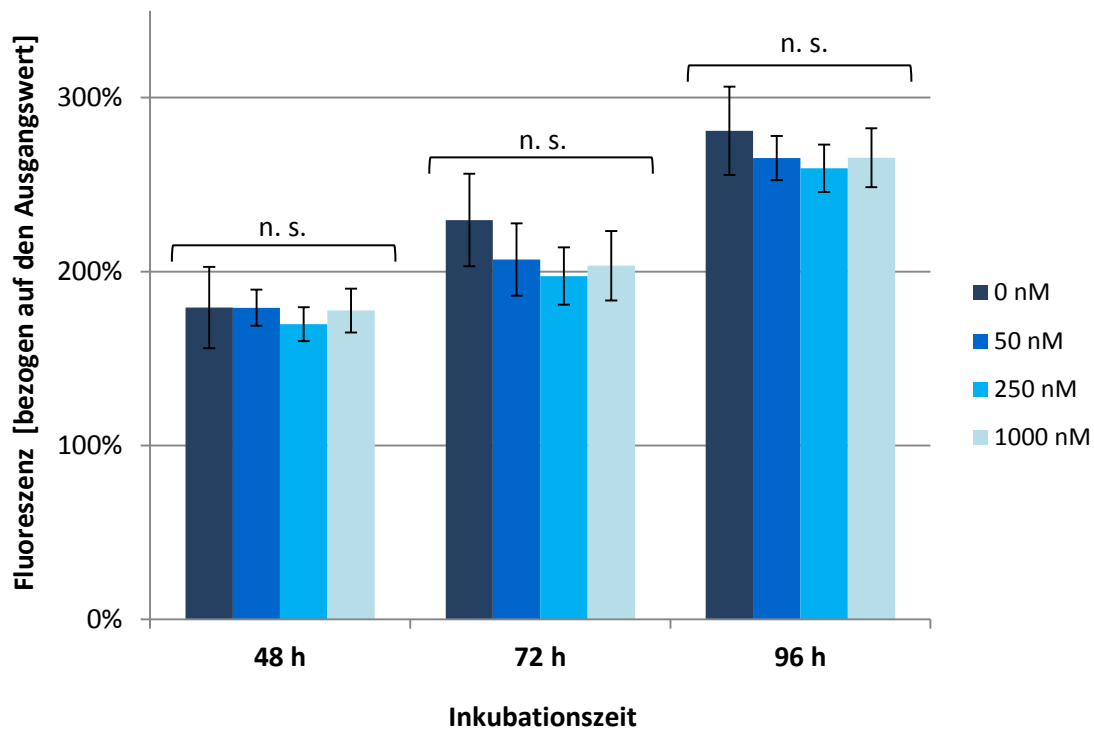


**Abbildung 22: Untersuchung der Stabilität des inhibitorischen Potentials von UAMC 1399 nach Inkubation in Zellkultur bis zu 48 h und anschließender Aktivitätstest mit dem fluorogenen Substrat I-1120 (Boc-Val-Pro-Arg-7-amino-4-methylcoumarin).**

Zur Validierung des inhibitorischen Potentials des KLK4-spezifischen Diphenyl-Phosphonat-Inhibitors UAMC 1399 wurde der Inhibitor unter Zellkulturbedingungen und mit Besatz durch Zellen der KLK4-negativen Vektorkontrollzelllinie PC3 RSV über 48 h inkubiert. Die Aktivitätsmessung von zugegebener, rekombinanter Wildtyp-KLK4 ergab, dass das inhibitorische Potenzial von UAMC 1399 nach 48 h um ca. 50 % abnimmt. Die Grafik zeigt die reziproke Beziehung von KLK4-Aktivität und inhibitorischem Potenzial.

### 2.1.3 Auswirkungen des KLK4-spezifischen Inhibitors UAMC 1399 auf die proliferativen Effekte von KLK4

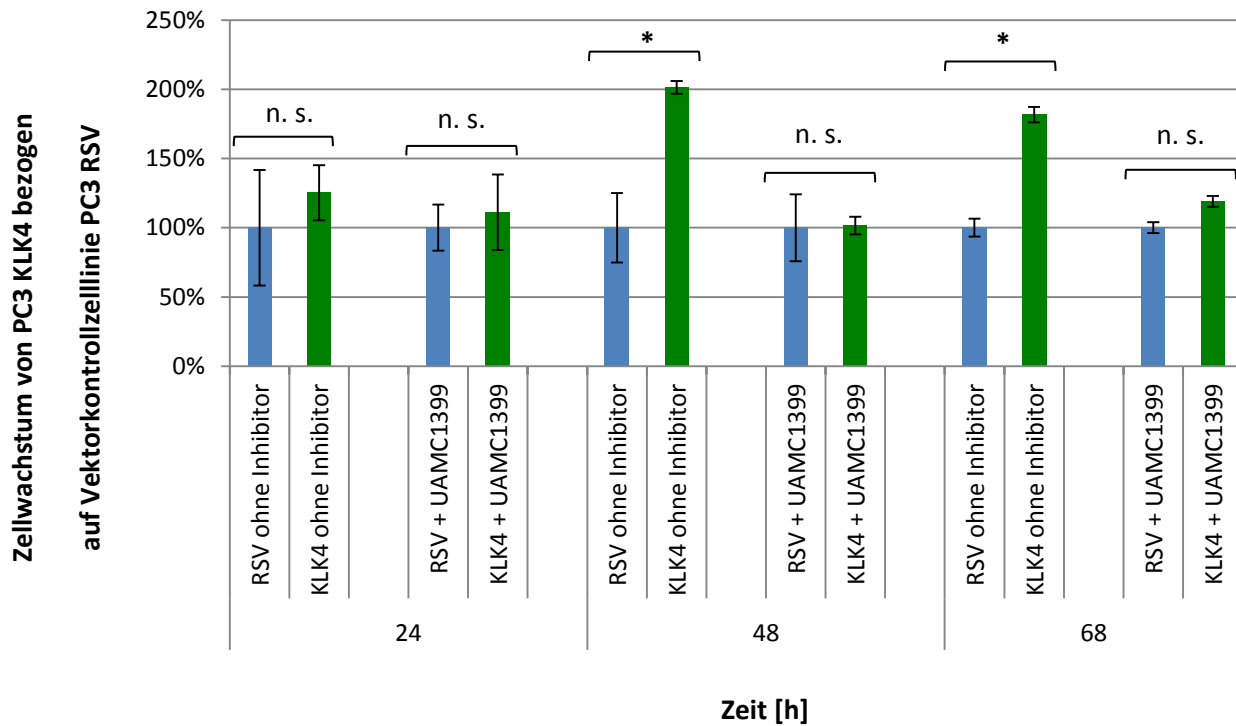
Mit dem Wissen um eine adäquate Hemmung der KLK4-Aktivität sowie einer nicht nachweisbaren Zytotoxizität des Inhibitors konnte in einem nächsten Schritt der Inhibitor dazu verwendet werden, der Frage nach der Rolle der KLK4-Aktivität in Bezug auf die proliferativen Effekte nachzugehen. Hierzu wurden erneut Zellen der PC3-Vektorkontrollzelllinie (PC3 RSV) mit Wildtyp-KLK4-transfizierten PC3-Zellen (PC3 KLK4) in einem konventionellen Proliferationsassay hinsichtlich ihrer Proliferation verglichen (Abb. 24). Jedoch wurden nun die beiden Zelllinien zusätzlich mit dem KLK4-Inhibitor UAMC 1399 in einer Konzentration von 1  $\mu$ M versetzt, und schließlich jeweils eine Variante mit und ohne Inhibitor in ihrem Wachstumsverhalten gegenübergestellt. Abbildung 24 zeigt das Ergebnis des Proliferationsassays.



**Abbildung 23: Vektorkontrollzelllinie PC3 RSV: alamarBlue-Proliferations-Assay mit verschiedenen Konzentrationen von UAMC 1399.**

Für den Versuch wurden PC3-Zellen (Vektorkontrollzelllinie PC3 RSV) mit Zellkulturmedium und verschiedenen Konzentrationen von UAMC 1399 über 96 h inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten in unabhängigen Wells die Zelldichte mittels alamarBlue-Assay gemessen. Über den gesamten Versuchszeitraum zeigte sich für keine der Konzentrationen eine signifikante Differenz in der Zellproliferation gegenüber der Kontrollgruppe. n.s. = nicht signifikant.

Durch die Adhäsions- und Ruhephasen vor Initiation einer erneuten proliferativen Phase sowie die für native und Zellen der PC3-Vektorkontrollzelllinie PC3 RSV typische Teilungsrate von ca. 48 h, ergibt sich nach 24 h noch kein signifikanter Unterschied in der Proliferation. Nach 48 und 68 h zeigt sich für KLK4-exprimierende PC3-Zellen gegenüber den PC3-Vektorkontrollzellen ohne endogene KLK4-Expression demnach eine erhöhte Proliferation, welche durch Kultivierung der Zellen mit einem spezifischen Inhibitor der KLK4 nahezu vollständig (nach 48 h) oder zumindest teilweise (nach 68 h) aufgehoben werden kann.



**Abbildung 24: Untersuchung des KLK4-Einflusses auf die Proliferation und Reversibilität der KLK4-Effekte bei Anwendung des KLK4-Inhibitors UAMC 1399.**

Vergleich von PC3 RSV vs. PC3 KLK4 in einem konventionellen Proliferationsassay. Die Zellen wurden nach Ausplattieren in Triplikaten für 24, 48 und 68 h mit und ohne KLK4-Inhibitor UAMC 1399 (1  $\mu$ M) inkubiert. Nach 48 h zeigt sich in der Gruppe ohne Inhibitor die für KLK4-Zellen bekannte erhöhte Proliferationsrate ( $p < 0,01$ ). Wird dagegen die KLK4-Aktivität durch UAMC 1399 inhibiert, zeigen sich für PC3 RSV und PC3 KLK4 nach 48 und 68 h keine signifikanten Unterschiede in der Proliferationsrate. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines beispielhaften Experiments. Zur Validierung der Ergebnisse wurde der Assay mindestens dreimal durchgeführt, die Ergebnisse waren jeweils vergleichbar. \* =  $p < 0,01$ , n.s. = nicht signifikant.

## 2.2 Auswirkungen der Anwendung des KLK4-spezifischen Inhibitors UAMC 1399 auf die CXCL1-Konzentrationen in Zellkulturüberständen

Um der Frage nachzugehen, ob für die Effekte einer KLK4-Expression auf das Zytokin CXCL1 die Aktivität der KLK4 nötig ist, wurden PC RSV- und PC KLK4-Zellen mit dem serumfreien Medium P4-8F für 72 h inkubiert. Dabei wurde das Medium entweder ohne weitere Zusätze oder unter Zugabe von UAMC 1399 (Endkonzentration 1  $\mu$ M) konditioniert. Im Anschluss wurde die CXCL1-Konzentration im Medium mittels ELISA bestimmt (Abb. 25).



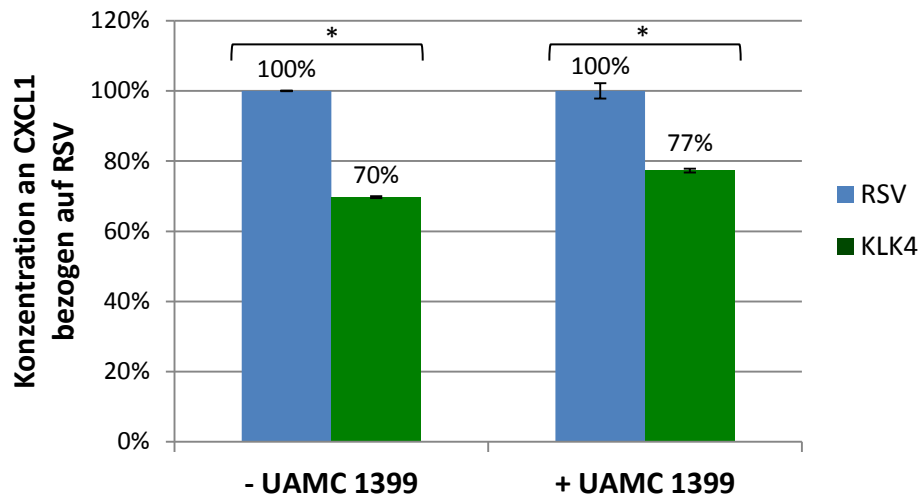


Abbildung 25: KLK4-überexprimierende vs. Vektorkontrollzellen (RSV) sowie Zellkultur mit und ohne Inhibitor UAMC 1399: CXCL1-Bestimmung im Zellkulturüberstand.

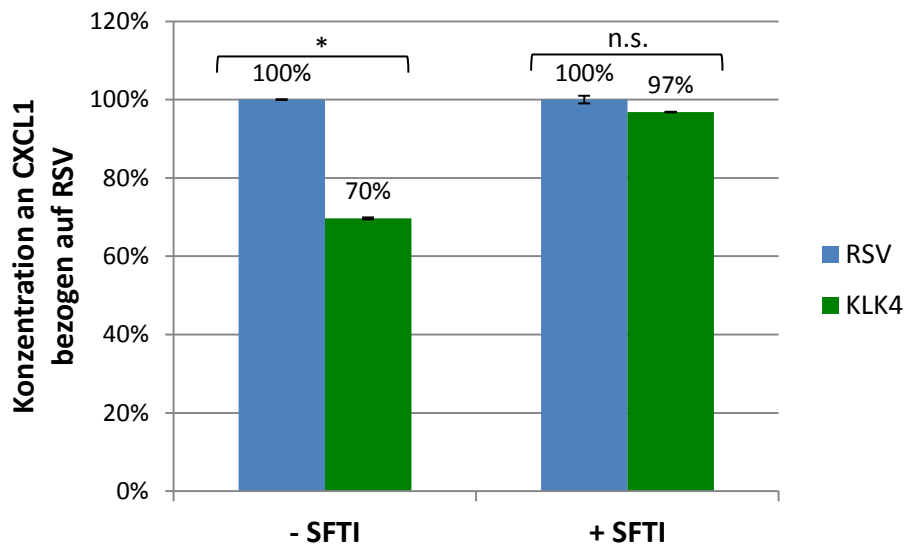
Zellkultur PC3 RSV versus PC3 KLK4 in serumfreiem P4-8F-Medium +/- KLK4-Inhibitor UAMC 1399. Für KLK4-überexprimierende Zellen zeigte sich eine mäßige, jedoch signifikante Abschwächung der KLK4-Effekte durch UAMC 1399. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines beispielhaften Experiments. Zur Validierung der Ergebnisse wurden sowohl die Zellkultur als auch der folgende ELISA mindestens dreimal durchgeführt, die Ergebnisse waren jeweils vergleichbar. \* =  $p < 0,01$

Bei Anwendung von UAMC 1399 zeigt sich eine Differenz der CXCL1-Konzentrationen für PC3 RSV und PC3 KLK4: Während die CXCL1-Konzentration im Überstand von PC3 KLK4 nach 72 h nur 70 % jener von PC3 RSV beträgt, beträgt sie bei PC3 KLK4 mit UAMC 1399 77 % bezogen auf die Vektorkontrollzelllinie PC3 RSV. Dieser Einfluss einer spezifischen KLK4-Inhibition durch den niedermolekularen Inhibitor UAMC 1399 ist signifikant, aber gering. Um die Rolle der KLK4-Aktivität und eine mögliche Aufhebung der Effekte einer KLK4-Expression auf die Expression von CXCL1 auf Proteinebene weiter zu evaluieren, wurden im Folgenden Versuche mit SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> durchgeführt, einem spezifischen KLK4-Inhibitor aus der Molekülklasse der peptidischen Inhibitoren (B 2.2).

### 2.3 Hemmung der KLK4-Aktivität mit SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub>

Bei SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> handelt es sich um eine modifizierte Variante des in *Helianthus annuus* (Sonnenblume) natürlicherweise vorkommenden Proteaseinhibitors SFTI-1 (*sunflower trypsin inhibitor*). Wildtyp-SFTI-1 zeigt eine geringe Spezifität gegenüber Trypsin-ähnlichen Serinproteasen. Durch computerassistierte Modifikationen der Aminosäuresequenz konnte jedoch auf Basis des SFTI-1 ein spezifischer KLK4-Inhibitor, SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub>, entwickelt werden (Swedberg et al., 2011).

PC3-RSV und PC3-KLK4-Zellen wurden erneut in serumfreiem Medium mit und ohne SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> inkubiert und nach 72 h die CXCL1-Konzentrationen im Zellkulturüberstand miteinander verglichen (Abb. 26).



**Abbildung 26: KLK4-überexprimierende vs. Vektorkontrollzellen (RSV): CXCL1-Bestimmung im Zellkulturüberstand und Vergleich von Zellkultur mit und ohne KLK4-Inhibitor SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub>.**

Zellkultur PC3 RSV versus PC3 KLK4 in FCS-freiem P4-8F-Medium. Im Vergleich zu UAMC 1399 zeigte sich bei Anwendung von SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> eine deutlichere Abschwächung der KLK4-Effekte. Die CXCL1-Konzentration für PC3 KLK4 ohne Inhibitor betrug 70 % jener von PC3 RSV (signifikant für  $p < 0,01$ ), mit SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> dagegen 97 % (nicht signifikant). Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines beispielhaften Experiments. Zur Validierung der Ergebnisse wurden sowohl die Zellkultur als der folgende ELISA mindestens dreimal durchgeführt, die Ergebnisse waren jeweils vergleichbar. \* =  $p < 0,01$ , n.s. = nicht signifikant.

Im Vergleich zur Anwendung des KLK4-Inhibitors UAMC 1399 (Abb. 26) verringert SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> die KLK4-Wirkung in Bezug auf die Änderung der CXCL1-Konzentration deutlicher: Ohne Inhibitor beträgt die CXCL1-Konzentration im Zellkulturüberstand von PC3 KLK4 70 % jener von PC3 RSV (signifikant), mit Inhibitor dagegen 97 % (nicht signifikant).

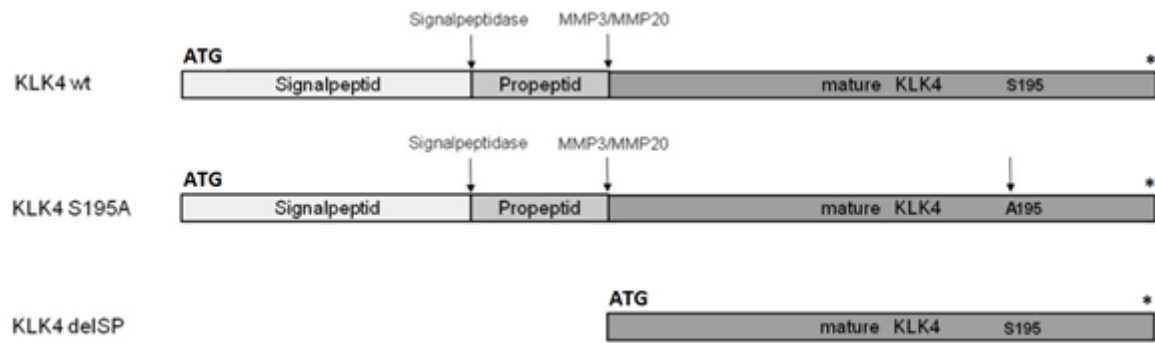
Der vergleichbare Effekt aus Versuchen mit Inhibitoren zweier unterschiedlicher Molekülklassen, für die jeweils keine unspezifischen zytotoxischen Effekte bekannt sind, ist ein starkes Indiz dafür, dass für die Effekte einer KLK4-Expression auf die Expression von CXCL1 die Aktivität der KLK4 nötig ist.

### 3. Vergleichbarkeit der Effekte der Expression von Wildtyp-KLK4 mit der Expression von Mutationskonstrukten der KLK4

Die bereits beschriebenen Experimente unter Einsatz spezifischer Inhibitoren der KLK4 lassen erste Schlüsse darauf zu, dass für den Einfluss der KLK4-Expression auf Proliferation und CXCL1-Expression von PC3-Zellen die proteolytische Aktivität der KLK4 nötig sein könnte. Zur Untersuchung der Frage, ob für die beobachteten Effekte tatsächlich die enzymatische Aktivität oder auch die Sekretion von KLK4 aus der Zelle in den Extrazellularraum nötig sind, bieten sich außerdem experimentelle Ansätze mit artifiziellen Enzym-Konstrukten (Mutanten) an. Für eine Expression dieser Mutanten durch Zellen in der Zellkultur ist zunächst die Herstellung von Expressionsplasmiden nötig, mit denen die Zielzellen anschließend transfiziert werden (B 3.5).

Jin et al. (2013) konnten zeigen, dass für die KLK4-vermittelten Effekte auf den Androgen-Rezeptor-Signalweg die Sekretion des Enzyms und seine Aktivität wahrscheinlich nicht essenziell sind. Vielmehr scheint KLK4 bereits intrazellulär eine Wirkung zu entfalten: Das Enzym inhibiert einen Repressor des Androgen-Rezeptors (PLZF = *promyelocytic leukemia zinc finger protein*) und hält damit möglicherweise dessen protumorigene Wirkung aufrecht (Jin et al., 2013).

Aus anderen Projekten der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik am Klinikum Rechts der Isar, München, lagen bereits Expressionsplasmide für eine *active-site*-Mutante der KLK4 („S195A“ = Serin 195 zu Alanin) vor. Diese wurden freundlicherweise von Dominik Alterauge zur Verfügung gestellt. In einer entsprechenden Arbeit wurden Ergebnisse zur Fragestellung veröffentlicht, wie sich die Veränderung des aktiven Zentrums hin zu einer inaktiven Variante der KLK4 auf die Expression bestimmter Zielgene, v.a. COL1A2, auswirkt (Alterauge, 2014). In der vorliegenden Arbeit wurden mit der *active-site*-Mutante KLK4-S195A weitere Experimente zur Expression von CXCL1 durchgeführt (C 3.3). Schließlich war es auch Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, wie sich eine Deletion des Signalpeptids der KLK4, mit der Folge einer Verhinderung der Sekretion des Enzyms, auf die von KLK4 vermittelten Effekte auswirkt. Die zugehörige KLK4-Mutante wird mit „delSP“ (= deletiertes Signalpeptid) bezeichnet. Abbildung 27 veranschaulicht die Struktur der verschiedenen Mutationskonstrukte der KLK4 im Vergleich zum Wildtypenzym.



**Abbildung 27: Struktur der Wildtyp-KLK4 und die beiden Mutationskonstrukte S195A und delSP.**

Die Wildtyp-KLK4 (= KLK4 wt) verfügt über ein Signal- sowie ein Propeptid. Bei der matten KLK4 findet sich in Position 195 die Aminosäure Serin, welche für die Konstitution des aktiven Zentrums von zentraler Bedeutung ist. In der S195A-KLK4-Mutante wurde dieses Serin durch ein Alanin ersetzt, was die Funktionalität des katalysierten Reaktionsmechanismus von KLK4 fast vollständig inhibiert. In der delSP-KLK4-Mutante fehlen das Signal- und das Propeptid, was den Export von KLK4 in den Extrazellulärraum verhindert. Für Wildtyp-KLK4 und S195A-KLK4 wurden die Schnittstellen der Signalpeptidase sowie der beiden Metalloproteinasen MMP3 und MMP20 veranschaulicht (modifiziert nach Alterauge (2014)). ATG = Startcodon; \* = Stoppcodon

Für die Herstellung einer delSP-KLK4-exprimierenden Zelllinie wurde in einem ersten Schritt mittels *In-vitro*-Mutagenese ein delSP-Expressionsplasmid hergestellt, um im Anschluss PC3-Zellen damit zu transfizieren. Weitere Ergebnisse zu Experimenten mit dieser und anderen KLK4-Mutanten, wie der oben beschriebenen *active-site*-Mutante und konstitutiv aktiven Mutanten, finden sich in der Arbeit von Alterauge (2014) und Felber (Klinische Forschergruppe der Frauenklinik, Klinikum Rechts der Isar, München, Doktorarbeit, eingereicht).

### 3.1 *In-vitro*-Mutagenese der KLK-Mutante delSP

Da KLK4 ihre Wirkungen als extrazelluläres Enzym entfaltet, benötigt das Enzym für den Export ein Signalpeptid. Für die KLK4-Mutante „delSP“ wurden das Signal- und das Propeptid aus der KLK4-Sequenz deletiert. Bei diesem Konstrukt sollte demnach eine Ausschleusung des Enzyms aus der Zelle nicht mehr möglich sein. Zudem dürfte durch das reduktive Milieu im Zytoplasma eine reguläre enzymatische Funktion der KLK4 nicht vorhanden sein (Alterauge, 2014).

Um PC3-Zellen mit dem KLK4-Mutationskonstrukt delSP-KLK4 transfizieren zu können, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine ortsspezifische *in-vitro*-Mutagenese der Wildtyp-KLK4 mithilfe des *Quik Change Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* durchgeführt. Die Sequenz für das Signal- und Propeptid liegt zwischen den Schnittstellen der Restriktionsenzyme Hind III und Xba I. Durch ihre

Deletion kommt es zum Verlust einer Kpn I-Spaltstelle. Nach erfolgter *In-vitro*-Mutagenese und Restriktionsverdau wurden Klone ausgewählt, als Kontrolle der erfolgreichen Deletion auf den Verlust der Kpn I-Schnittstelle hin getestet und schließlich ein potenzieller Kandidat („Klon 1“) sequenziert.

Abbildung 28 zeigt die Sequenz der Wildtyp-KLK4 im Expressionsvektor pRcRSV, den für delSP deletierten Bereich sowie die Spaltstellen der Restriktionsenzyme.

```

GAT ACA ATA AAC GCC ATT TGA CCA TTC ACC ACA TTG GTG TGC ACC TCC AAG CTT ATG GCC ACA GCA GGA AAT CCC TGG GGC TGG TTC CTG
G Y L I L G V A G S L V S G S C S Q M A T A G N P W G W F L
GGG TAC CTC ATC CTT GGT GTC GCA GGA TCG CTC GTC TCT GGT AGC TGC AGC CAA ATC ATA AAC GGC GAG GAC TGC AGC CCG CAC TCG CAG
G Y L I L G V A G S L V S G S C S Q I I N G E D C S P H S Q
CCC TGG CAG GCG GCA CTG GTC ATG GAA AAC GAA TTG TTC TGC TCG GGC GTC CTG GTG CAT CCG CAG TGG GTG CTG TCA GCC GCA CAC TGT
P W Q A A L V M E N E L F C S G V L V H P Q W V L S A A H C
TTC CAG AAC TCC TAC ACC ATC GGG CTG GGC CTG CAC AGT CTT GAG GGC GAC CAA GAG CCA GGG AGC CAG ATG GTG GAG GCC AGC CTC TCC
F Q N S Y T I G L G L H S L E A D Q E P G S Q M V E A S L S
GTA CGG CAC CCA GAG TAC AAC AGA CCC TTG CTC GCT AAC GAC CTC ATG CTC ATC AAG TTG GAC GAA TCC GTG TCC GAG TCT GAC ACC ATC
V R H P E Y N R P L L A N D L M L I K L D E S V S E S D T I
CGG AGC ATC AGC ATT GCT TCG CAG TGC CCT ACC GCG GGG AAC TCT TGC CTC GTT TCT GGC TGG GGT CTG CTG GCG AAC GGC AGA ATG CCT
R S I S I A S Q C P T A G N S C L V S G W G L L A N G R M P
ACC GTG CTG CAG TGC GTG AAC GTG TCG GTG GTG TCT GAG GAG GTC TGC AGT AAG CTC TAT GAC CCG CTG TAC CAC CCC AGC ATG TTC TGC
T V L Q C V N V S V V S E E V C S K L Y D P L Y H P S M F C
GCC GGC GGA GGG CAA GAC CAG AAG GAC TCC TGC AAC GGT GAC TCT GGG GGG CCC CTG ATC TGC AAC GGG TAC TTG CAG GGC CTT GTG TCT
A G G G Q D Q K D S C N G D S G G P L I C N G Y L Q G L V S
TTC GGA AAA GCC CCG TGT GGC CAA GTT GGC GTG CCA GGT GTC TAC ACC AAC CTC TGC AAA TTC ACT GAG TGG ATA GAG AAA ACC GTC CAG
F G K A P C G Q V G V P G V Y T N L C K F T E W I E K T V Q
GCC AGT TAA TCT AGA
A S *

```

**Abbildung 28: DNA-Sequenz von Wildtyp-KLK4 im Expressionsvektor pRcRSV.**

Wildtyp-Sequenz der humanen KLK4-cDNA zwischen Hind III- (AAGCTT, blau unterstrichen) und Xba I-Schnittstelle (TCTAGA, blau unterstrichen). Lage der komplementären Oligonukleotide (schwarz gestrichelte Linie). Der für delSP deletierte Bereich mit der Kpn I-Spaltstelle (rot überstrichen) ist mit grauem Hintergrund umfasst.

Die kodierende Wildtyp-Sequenz der humanen KLK4-cDNA ist zwischen den Spaltstellen der Restriktionsenzyme Hind III (AAGCTT, blau unterstrichen) und Xba I (TCTAGA, blau unterstrichen) in den Vektor kloniert. Die Lage der beiden komplementären Oligonukleotide, die für die *In-vitro*-Mutagenese verwendet wurden, ist mit der schwarz gestrichelten Linie gekennzeichnet. Der deletierte Bereich mit der Kpn I-Spaltstelle (rot überstrichen) wurde in der Abbildung 28 mit einem grauen Hintergrund umfasst. Abbildung 29 zeigt die Sequenz des Mutationskonstrukts KLK4-delSP.

```

AAG CTT ATG ATC ATA AAC GGC GAG GAC TGC AGC CCG CAC TCG
M I I N G E D C S P H S

CAG CCC TGG CAG GCG GCA CTG GTC ATG GAA AAC GAA TTG TTC TGC TCG GGC GTC CTG GTG CAT CCG CAG TGG GTG CTG TCA GCC GCA CAC
Q P W Q A A L V M E N E L F C S G V L V H P Q W V L S A A H

TGT TTC CAG AAC TCC TAC ACC ATC GGG CTG GGC CTG CAC AGT CTT GAG GCC GAC CAA GAG CCA GGG AGC CAG ATG GTG GAG GCC AGC CTC
C F Q N S Y T I G L G L H S L E A D Q E P G S Q M V E A S L

TCC GTA CGG CAC CCA GAG TAC AAC AGA CCC TTG CTC GCT AAC GAC CTC ATG CTC ATC AAG TTG GAC GAA TCC GTG TCC GAG TCT GAC ACC
S V R H P E Y N R P L L A N D L M L I K L D E S V S E S D T

ATC CGG AGC ATC AGC ATT GCT TCG CAG TGC CCT ACC GCG GGG AAC TCT TGC CTC GTT TCT GGC TGG GGT CTG CTG GCG AAC GGC AGA ATG
I R S I S I A S Q C P T A G N S C L V S G W G L L A N G R M

CCT ACC GTG CTG CAG TGC GTG AAC GTG TCG GTG GTG TCT GAG GAG GTC AGT AAG CTC TAT GAC CCG CTG TAC CAC CCC AGC ATG TTC
P T V L Q C V N V S V V S E E V C S K L Y D P L Y H P S M F

TGC GCC GGC GGA GGG CAA GAC CAG AAG GAC TCC TGC AAC GGT GAC TCT GGG GGG CCC CTG ATC TGC AAC GGG TAC TTG CAG GGC CIT GTG
C A G G G Q D Q K D S C N G D S G G P L I C N G Y L Q G L V

TCT TTC GGA AAA GCC CCG TGT GGC CAA GTT GGC GTG CCA GGT GTC TAC ACC AAC CTC TGC AAA TTC ACT GAG TGG ATA GAG AAA ACC GTC
S F G K A P C G Q V G V P G V Y T N L C K F T E W I E K T V

CAG GCC AGT TAA TCT AGA
Q A S *

```

Abbildung 29: DNA-Sequenz von KLK4-delSP im Expressionsvektor pRcRSV.

Im Mutationskonstrukt KLK4-delSP fehlen sowohl die Sequenz für das Signal- als auch das Propeptid. Die beiden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Hind III und Xba I sind blau unterstrichen.

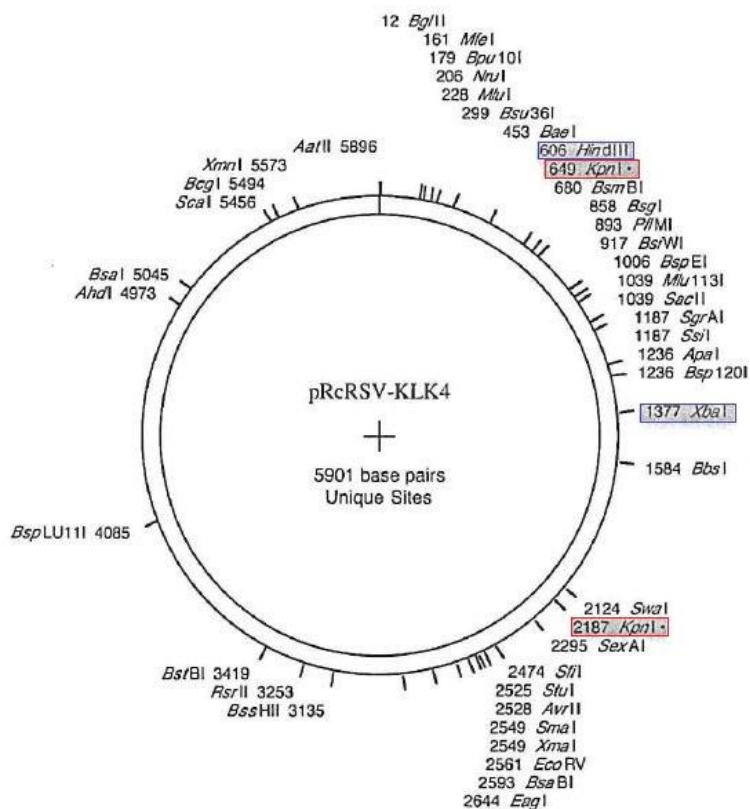
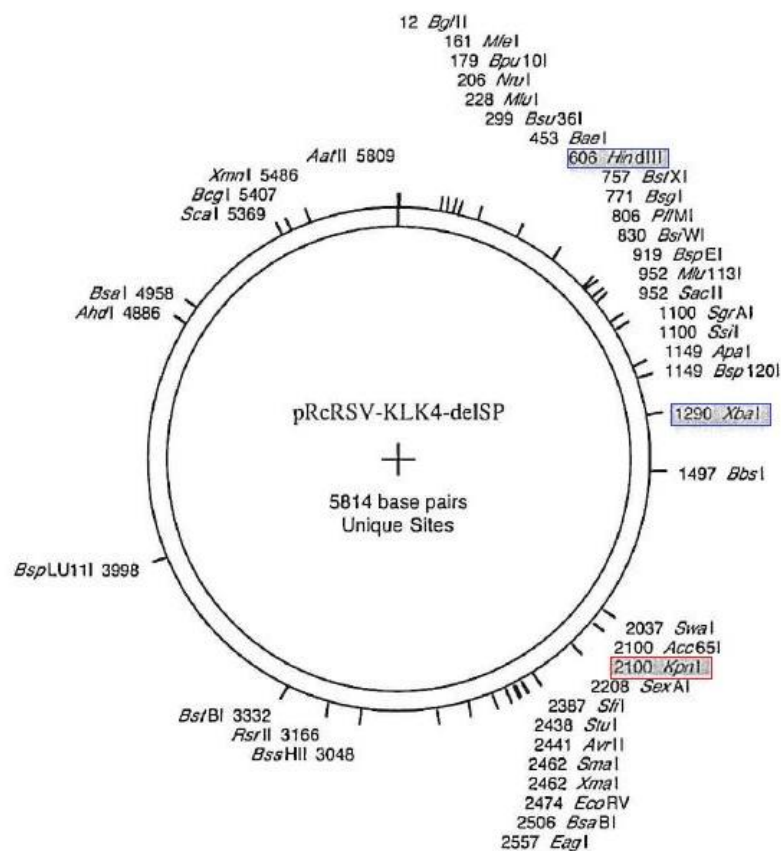


Abbildung 30: Restriktionskarte von pRc-KLK4.

Die kodierende Sequenz der KLK4-cDNA ist zwischen den Hind III- und Xba I-Spaltstellen als Fragment in den Vektor pRcRSV kloniert. Je eine Kpn I-Spaltstelle befindet sich im cDNA-Insert und im Vektor. Die Spaltung des Plasmids mit Kpn I ergibt zwei Fragmente (4363 bp + 1538 bp). Die Kpn I-Spaltstellen sind rot, die Hind III- und Xba I-Spaltstellen blau umrahmt.

Die Abbildungen 30 und 31 zeigen die entsprechenden Restriktionskarten der Expressionsvektoren für pRc-KLK4 (Abb. 30) sowie für pRc-KLK4-delSP (Abb. 31). Abbildung 32 zeigt schließlich die Kpn I-Restriktionsanalyse vier potentieller pRcRSV-KLK4-delSP-Klone nach der *In-vitro*-Mutagenese.

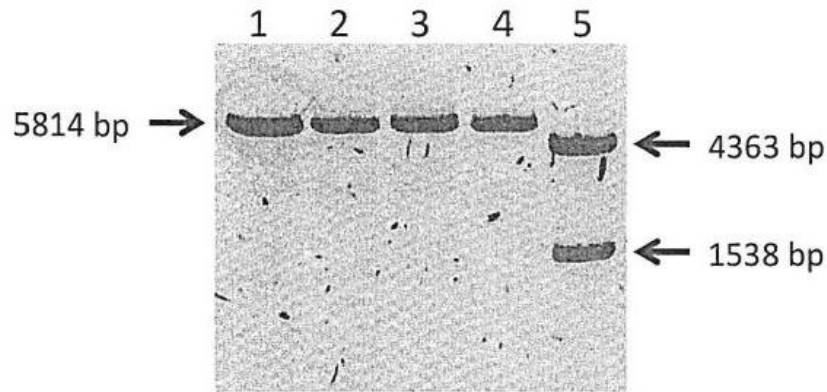
Die kodierende Sequenz der KLK4 cDNA ist als Fragment zwischen den Restriktionsstellen von Hind III und Xba I in den Vektor pRcRSV kloniert. Das cDNA-Insert besitzt eine Kpn I-Spaltstelle, der Vektor ebenfalls. Die Spaltung des Plasmids mit Kpn I resultiert daher in zwei Fragmente (4363 bp + 1538 bp). Die Kpn I-Spaltstellen sind in der Abbildung 30 rot, die Hind III- bzw. Xba I-Spaltstellen blau umrahmt.



**Abbildung 31: Restriktionskarte von pRc-KLK4-delSP.**

Die Deletion von Signal- und Propeptid führt zum Verlust der Kpn I-Spaltstelle. In der Abbildung sind die Kpn I-Spaltstelle rot, die Hind III- und Xba I-Spaltstelle blau umrahmt.

Durch die Deletion der Region, die für die Signalsequenz und das Propeptid kodiert, wird die Kpn I-Spaltstelle in der kodierenden Region entfernt. Die Kpn I-Spaltstelle ist in der Abbildung 31 rot, die Hind III- und Xba I-Spaltstellen blau umrahmt.



**Abbildung 32: Kpn I-Restriktionsanalyse von vier potenziellen pRcRSV-KLK4-delSP-Klonen nach der *In-vitro*-Mutagenese (Spur 1-4) mittels SDS-Polyacrylamid-Agarose-Gel-Elektrophorese.**

Spur 1-4: Potenzielle pRcRSV-KLK4-delSP-Klone. Spur 5: Wildtyp-Ausgangsplasmid pRc-RSV-KLK4 als Kontrolle. Das Wildtypplasmid zeigt eine Spaltung in zwei kleinere Fragmente, die pRcRSV-KLK4-delSP-Klone sind aufgrund des Verlusts einer Kpn I-Spaltstelle lediglich linearisiert und daher nicht fragmentiert.

Wie oben beschrieben, wurden nach der *In-vitro*-Mutagenese vier potenzielle pRcRSV-KLK4-delSP-Klone ausgewählt und im Rahmen einer Kpn I-Restriktionsanalyse auf den erwarteten Verlust einer Kpn I-Spaltstelle hin untersucht (Spur 1-4 in Abb. 32). Zur Kontrolle wurde in einer Spur das Wildtyp-Plasmid aufgetragen. Während das Wildtypplasmid in zwei Fragmente gespalten wird, werden die pRcRSV-KLK4-delSP-Klone lediglich linearisiert, was den erwarteten Verlust einer Kpn I-Spaltstelle anzeigt. Klon 1 wurde anschließend sequenziert (Eurofins) und die erwartete Sequenz der Deletionsmutante bestätigt (Abb. 29).

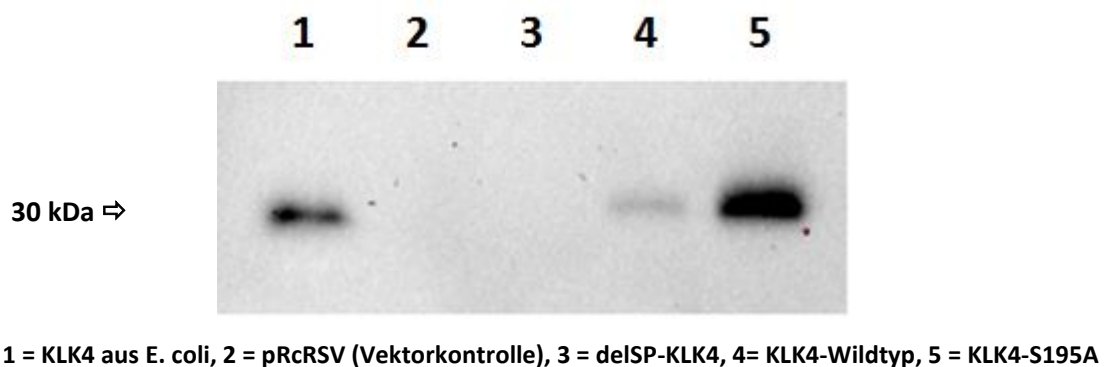
Für die konstitutiv inaktive Mutante „S195A“ wurde die Sequenz des Enzyms in der katalytischen Triade dahingehend verändert, dass die unmittelbar am Katalyse-Mechanismus beteiligte Aminosäure in Position 195, ein Serin, durch ein Alanin ersetzt wurde. Da die Funktionalität der katalytischen Triade als zentraler Bestandteil des aktiven Zentrums jedoch unabdingbar für einen normalen Reaktionsablauf ist (A 3.2), sollte die Aktivität des Enzyms hierdurch nahezu vollständig zum Erliegen kommen. Ein entsprechendes Expressionsplasmid KLK4-S195A zur Transfektion von PC3-Zellen wurde freundlicherweise von Dominik Alterauge zur Verfügung gestellt (Klinische Forschergruppe Frauenklinik, Klinikum Rechts der Isar, München).



### 3.2 Validierung von PC3-Transfektanten

Nach Transfektion der PC3-Zellen mit den Expressionsplasmiden und Antibiotika-gestützter Selektion der Transfektanten erfolgte eine Validierung der KLK4-Expression, zunächst auf mRNA-Ebene. Hierzu wurden die Zellen in Kultur gebracht und anschließend nach Zellyse, RNA-Extraktion und Überführung der RNA in cDNA mittels quantitativer RT-qPCR untersucht: Hierbei zeigte sich für die Vektor-kontrollzellen keine nachweisbare KLK4-Expression, für Wildtyp-KLK4 eine KLK4-Expression von 0,1 %, für delSP 1,1 % sowie für S195A 1,3 % jeweils bezogen auf die HPRT1-Expression (HPRT1 = Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1, *housekeeping*-Gen). HPRT-1 ist ein moderat hoch exprimiertes *housekeeping*-Gen in menschlichen Zellen. Die ebenfalls moderate KLK4-Expression ist gut vergleichbar mit jener, die man *in vivo* bei Tumorzellen aus humanen Prostatatumoren findet (Day et al., 2002). Das Expressionslevel von KLK4 wurde auch auf Proteinebene durch Detektion mittels Western Blot aus konzentrierten Zellkulturüberständen bestimmt. Die Kombination beider Ergebnisse liefert eine größere Sicherheit, da durch die verschiedenen Ebenen der Genregulation nicht unbedingt sichergestellt ist, dass ein Gen, dessen mRNA aus Zellen isoliert wird, tatsächlich auch erfolgreich translatiert und ins Zellkulturmedium sezerniert wird.

Um nachweisbare Mengen von KLK4 in den Überständen zu erhalten, wurden die Zellen der jeweiligen Transfektanten für 72 h in P4-8F-Medium inkubiert. Das so konditionierte Medium wurde anschließend mithilfe von Zentrifugen-Filtereinheiten konzentriert und damit die Konzentration von KLK4 erhöht. Abbildung 33 zeigt das Ergebnis des entsprechenden Western Blots.



**Abbildung 33: Nachweis von KLK4 im konzentrierten Zellkulturüberstand, Ausschnitt eines Western Blots von Zellkulturüberständen der PC3-Transfektanten auf Höhe der 30-kDa-Bande (KLK4).**

KLK4-Antikörper rabbit #743C. Die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese mit anschließendem Blotting zeigt eine deutliche Positivkontrolle für KLK4 aus E. coli und gut sichtbare Banden für den Überstand von Wildtyp-KLK4-exprimierenden Zellen sowie der *active-site*-Mutante KLK4-S195A.

Neben einer deutlich sichtbaren Positivkontrolle durch KLK4 aus *E. coli* zeigten sich im Western Blot des Zellkulturüberstands gut sichtbare Banden für die Wildtyp-KLK4-exprimierenden Zellen sowie die *active-site*-Mutante S195A. KLK4 aus PC3-Zellen ist ferner durch eine langsamere Laufgeschwindigkeit im Gel gekennzeichnet, da es bei der Synthese durch eukaryote Zellen zu posttranskriptionellen Glykosylierungen kommt, welche das Molekulargewicht im Vergleich zu KLK4 aus *E. coli* erhöhen (Guo et al., 2014). Wie erwartet, zeigt sich im Überstand von KLK4-delSP-exprimierenden Zellen keine Reaktion, da hier keine KLK4 in das Medium sezerniert wird. Weitergehende Untersuchungen durch Alterauge (2014) zeigten, dass KLK4-delSP jedoch in Zellextrakten von KLK4-delSP-transfizierten Zellen nachweisbar ist.

### 3.3 Effekte der Expression von KLK4-Mutanten

#### 3.3.1 Veränderung der CXCL1-Expression auf mRNA-Ebene

In einem weiteren Schritt wurde die Expression des Zytokins CXCL1 in Abhängigkeit der Expression von KLK4 und den konstruierten KLK4-Mutanten auf mRNA-Ebene evaluiert. Für dieses Experiment wurde erneut aus lysierten Zellen der verschiedenen Zelllinien mRNA extrahiert und nach cDNA-Synthese die jeweiligen CXCL1-Expressionlevel mittels qPCR bestimmt. Das Ergebnis der qPCR zeigt Abbildung 34.

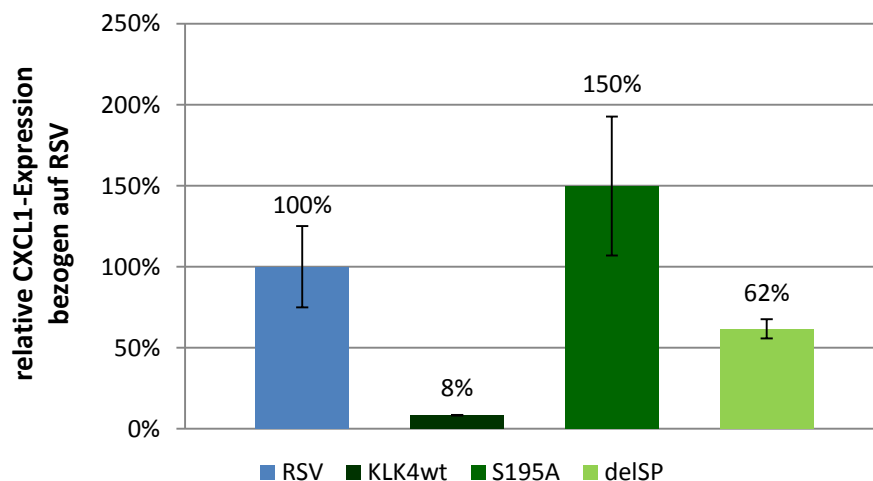
Erwartungsgemäß zeigt sich für Wildtyp-KLK4-exprimierende PC3-Zellen eine deutlich reduzierte Expression von CXCL1 (< 10 % bezogen auf PC3 RSV). Die beiden Zelllinien mit KLK4-Mutanten zeigen CXCL1-Expressionslevel, die sich um weniger als den Faktor 2 von der CXCL1-Expression in PC3 RSV unterscheiden.

#### 3.3.2 Veränderung der Konzentrationen von CXCL1 in Zellkulturüberständen

Um die CXCL1-Expression durch PC3-Zellen, die KLK4-Mutanten exprimieren, mit jener von Wildtyp-KLK4-transfizierten Zellen zu vergleichen, wurden in einem abschließenden Experiment die Konzentrationen von CXCL1 im Zellkulturüberstand dieser Zellen verglichen. Um der Frage nachzugehen, ob Effekte auf die CXCL1-Konzentrationen mit der Aktivität der KLK4 korrelieren und ob die Effekte der KLK4-Aktivität durch KLK4-Inhibition reversibel sind, wurden die verschiedenen Zelllinien jeweils in zwei Varianten (+/- Inhibitor SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub>) inkubiert. Hierbei wurde lediglich ein Vergleich der Vektorkontrollzelllinie PC3 RSV mit der Wildtyp-KLK4-exprimierenden Zelllinie PC3 KLK4 und der Zelllinie KLK4-delSP durchgeführt. Letztere könnte, wie weiter oben beschrieben, über katalytische Aktivität verfügen, auch ohne das Zellinnere zu verlassen. Die von der Zelllinie KLK4-S195A sezernierte KLK4 hingegen verfügt aufgrund der Punktmutation im aktiven Zentrum des Enzyms über keine en-

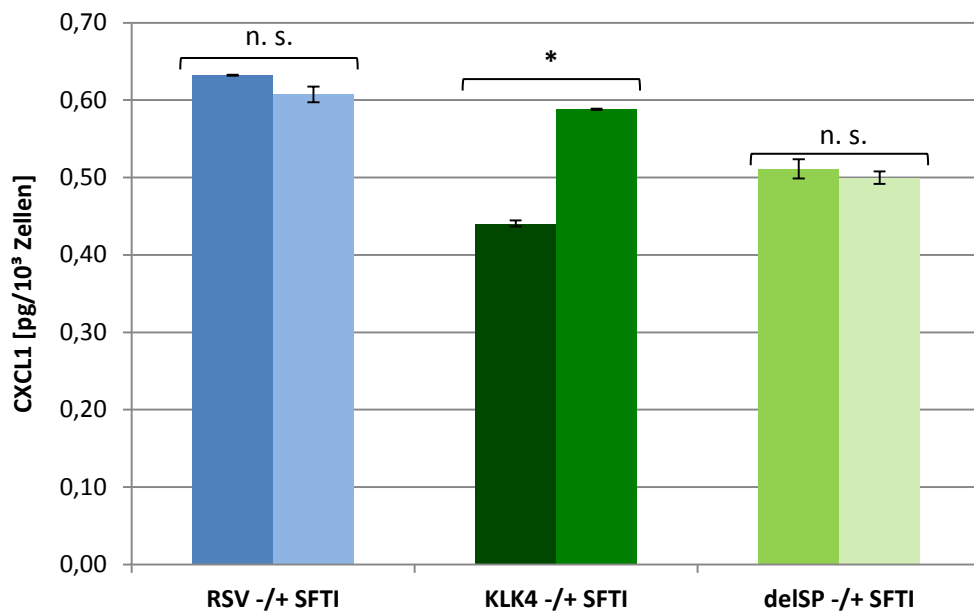
zymatische Aktivität, weswegen in diesem Zusammenhang auf eine Untersuchung des Einflusses von Inhibitoren auf diese Zellen verzichtet wurde. Das Ergebnis des entsprechenden ELISAS zeigt Abbildung 35. Zur Gewinnung der Zellkulturüberstände wurden Wildtyp-KLK4- und KLK4-delSP-exprimierende Zellen für 72 h mit und ohne SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> inkubiert und anschließend die CXCL1-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA gemessen. Die CXCL1-Konzentrationen für die Wildtyp-KLK4-exprimierenden PC3-Zellen sind signifikant niedriger als jene von PC3 RSV. Die CXCL1-Konzentration für PC3 RSV wird durch die Anwendung des KLK4-Inhibitors SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> kaum beeinflusst. Bei Inkubation von Wildtyp-KLK4-exprimierenden PC3-Zellen mit SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> zeigt sich dagegen eine fast vollständige Aufhebung des KLK4-Effekts. Für KLK4-delSP fällt die CXCL1-Konzentration insgesamt etwas niedriger aus als für PC3 RSV und Wildtyp-KLK4-exprimierende PC3-Zellen. Eine Inkubation mit SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> zeigt hier wie in der Zelllinie PC3 RSV keine Auswirkung auf die CXCL1-Konzentration.

Im Vergleich zur CXCL1-Expression auf mRNA-Ebene fallen die Unterschiede auf Proteinebene geringer aus. Dennoch zeigt sich bei Expression von Wildtyp-KLK4 eine deutlich geringere CXCL1-Konzentration. Dieser Effekt lässt sich durch Anwendung des Inhibitors SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> weitgehend aufheben. Bei Expression der KLK4-Mutante delSP zeigt die Anwendung des Inhibitors hingegen keine Wirkung.



**Abbildung 34: Wildtyp-KLK4-überexprimierende- (KLK4wt) vs. Vektorkontrollzellen (RSV) vs. S195A-KLK4 bzw. delSP-KLK4 exprimierende Zellen: Vergleich der CXCL1-Expression auf RNA-Ebene mittels qPCR.**

CXCL1-Expression jeweils bezogen auf PC3 RSV. Wildtyp-KLK4-exprimierende Zellen zeigen eine deutlich reduzierte Expression von CXCL1. Beide Zelllinien hingegen, die entweder inaktive oder nicht exportierbare KLK4 (S195A- und delSP-KLK4) exprimieren, zeigen CXCL1-Expressionslevel, die sich um weniger als den Faktor 2 von der CXCL1-Expression in der Vektorkontrollzelllinie unterscheiden.



**Abbildung 35: Einfluss der delSP-Mutation auf die CXCL1-Expression und Reversibilität des KLK4-Einflusses auf die CXCL1-Konzentration im Zellkulturüberstand bei Anwendung von SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub>, Bestimmung der CXCL1-Konzentrationen mittels ELISA.**

Inkubation der Zellen für 72 h +/- SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub>, anschließend CXCL1-Bestimmung mittels ELISA. Die ermittelten CXCL1-Konzentrationen für PC3 KLK4 zeigten sich signifikant niedriger als jene von PC3 RSV. Die CXCL1-Konzentration im Zellkulturüberstand von PC3 RSV wird durch Anwendung des KLK4-Inhibitors SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> kaum beeinflusst. Bei Inkubation von Wildtyp-KLK4-exprimierenden PC3-Zellen lässt sich dagegen eine Aufhebung des KLK4-Effekts gegenüber PC3 RSV nachweisen. Für KLK4-delSP wurden insgesamt niedrigere CXCL1-Konzentration als für PC3 RSV und Wildtyp-KLK4-exprimierende PC3-Zellen gemessen. Eine Inkubation von delSP +/- SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> zeigte ebenfalls keine signifikante Auswirkung auf die CXCL1-Konzentration. \* =  $p < 0,05$ , n.s. = nicht signifikant.

## D – Diskussion

### 1. KLK4 fördert die Proliferation humaner Prostatakarzinomzelllinien *in vitro*

#### 1.1 KLK4 erhöht die Malignität von Tumorzellen durch Rezeptorinteraktionen

Wie unter A 3.5 ausgeführt, weisen *in-vitro*-Versuche mit den humanen Prostatakrebszelllinien DU145 und LNCap darauf hin, dass KLK4 durch eine erhöhte Proliferationsrate der Tumorzellen oder ein verstärktes Migrationsverhalten zur Malignität des Prostatakarzinoms beiträgt (Obiezu et al., 2006; Mize et al., 2008). Die Fähigkeit von entarteten Zellen sich autark, d.h. ohne äußere Wachstumsstimuli und trotz wachstumshemmender Signale zu vermehren, ist eine Voraussetzung für die Entstehung und das Wachstum bösartiger Tumoren (Fedi, 1997; Hanahan & Weinberg, 2000). Die malignitätssteigernden Effekte einer KLK4-Expression werden durch die unter C 1.2 besprochenen Ergebnisse bestätigt: eine Expression von KLK4 in humanen PC3-Zellen führt zu einer erhöhten Proliferationsrate.

KLK4 kann die Zellproliferation durch Spaltung und Aktivierung der proteaseaktivierten Rezeptoren (PAR) 1 und 2 erhöhen (Mize et al., 2008; Ramsay et al., 2008). Eine erhöhte PAR-1-Expression ist bei verschiedenen Tumorentitäten assoziiert mit verstärktem Wachstum und Metastasierung (Darmoul et al., 2001), u.a. beim Mamma- (Boire et al., 2005), Bronchial- (Lin et al., 2017) und Pankreaskarzinom (Queiroz et al., 2014), sowie beim malignen Melanom (Zigler et al., 2011) und beim Sarkom (Chen et al., 2010). Auch für das Prostatakarzinom ist eine erhöhte PAR1-Expression in fortgeschrittenen Krankheitsstadien beschrieben worden (Yuan & Lin, 2004; Kaushal et al., 2006; Black et al., 2007). Neuere Ergebnisse für das Pankreaskarzinom legen nahe, dass eine erhöhte PAR-1-Expression über einen negativen Einfluss auf zelluläre Abwehrmechanismen protumorigene Wirkungen entfaltet, wahrscheinlich indem die Aktivität zytotoxischer, CD8-positiver T-Zellen und damit die Elimination der Tumorzellen supprimiert wird (Yang et al., 2019). Für das Mammakarzinom und das Osteosarkom konnte durch McAuley et al. (2019) gezeigt werden, dass eine PAR-1-Expression über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB die Metastasierung begünstigt. Dem Transkriptionsfaktor NFκB wird bei verschiedenen Tumorerkrankungen eine Schlüsselrolle bei Entzündungsreaktionen (Bachmeier et al., 2008; Foteinou et al., 2009), einer gesteigerten Proliferation sowie der Metastasierung zugesprochen (Dhawan & Richmond, 2002; Cao & Karin, 2003; Khan et al., 2013).

Eine erhöhte PAR-2-Expression wurde für das Prostatakarzinom, aber auch für zahlreiche andere maligne Tumoren beschrieben, darunter solche von Mamma, Ovar, Magen, Lunge, Schilddrüse (D'Andrea et al., 2001) und Ösophagus (Quanjun et al., 2016; Chen et al., 2017). Die proliferationsfördernden Effekte einer KLK4-Expression konnten auch in Zellkultur mit den Prostatakarzinom-

Zelllinien DU145 und LNCaP gezeigt werden (Mize et al., 2008; Ramsay et al., 2008). Auch im dreidimensionalen Sphäroid-Model konnte ein proliferationsfördernder Effekt auf Prostatakarzinomzellen nachgewiesen werden (Alterauge, 2014). Diese Befunde unterstützen die Einschätzung, dass eine Expression von KLK4 die Malignität von Tumorzellen fördert.

## **1.2 KLK4-Expression in humanen Prostatakarzinomzellen supprimiert bzw. induziert die Expression von Genen des PAR-Signalweges**

Wie im Rahmen dieser Arbeit mittels des PAR-*Microarrays* gezeigt wurde (C 1.3.1), beeinflusst eine KLK4-Expression in humanen PC3-Zellen die Expression einer Vielzahl von Genen des PAR-Signalweges. Dabei werden manche der assoziierten Gene supprimiert, andere induziert. Im Folgenden wird die Funktion der Gene beschrieben, die aufgrund der ausgeprägten Beeinflussung ihres Expressionslevels (Suppression bzw. Induktion) durch KLK4 Kandidatengene für eine weitere Evaluation darstellen.

### *1.2.1. Durch KLK4 supprimierte Gene*

#### **1.2.1.1 CXCL1**

Das vom *CXCL1*-Gen kodierte Protein ist ein Zytokin der sog. CXC-Familie. Zytokine sind kleine Polypeptide (10-14 kDa) mit wichtigen Funktionen im Rahmen der Immunabwehr, bei Entzündungsvorgängen und bei Tumorerkrankungen. Zytokine können auto-, para-, oder endokrine Wirkungen aufweisen (Tisoncik et al., 2012; Adekoya & Richardson, 2020). Die Proteine der CXC-Familie weisen als Gemeinsamkeit das Motiv „Cystein (C) – variable Aminosäure (X) – Cystein (C)“ nahe dem N-Terminus auf. *CXCL1* ist ein proinflammatorisches Zytokin, das im Zuge der Immunantwort neutrophile Granulozyten chemotaktisch anlockt. Seine zellulären Effekte vermittelt es über den Rezeptor *CXCR2*, einem Mitglied der großen Familie G-Protein gekoppelter Sieben-Transmembran-Domänen-Rezeptoren (Zhang et al., 2019). Eine bedeutende Eigenschaft der Zytokine ist, dass ihr Rezeptoraktivierungsmuster Redundanzen aufweist, d.h. dass verschiedene Zytokine gleiche Rezeptoren aktivieren und damit sich überschneidende Effekte bewirken können. Als Beispiel sei der Rezeptor von *CXCL1*, der *CXCR2* genannt, der ebenfalls durch das Chemokin *CXCL8* aktiviert werden kann (Zhang & An, 2007; Adekoya & Richardson, 2020).

Eine verstärkte Expression von *CXCL1* ist bei einer Reihe verschiedener Tumorerkrankungen mit einer schlechten Prognose assoziiert, darunter beim hepatozellulären Karzinom (Liu et al., 2015), beim Magenkarzinom (Cheng et al., 2011), beim Mammakarzinom (Bachmeier et al., 2008) sowie beim malignen Melanom (Dhawan & Richmond, 2002; Botton et al., 2011). Im Rahmen der Pathogenese

des malignen Melanoms bildet sich aufgrund einer konstitutiven Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB eine autokrine Feedbackschleife aus, die zu einer verstärkten Expression von CXCL1 führt. Die erhöhte Expression von CXCL1 wurde daher anfangs nur in Zusammenhang mit einem forcierten Tumorwachstum und einer erhöhten Metastasierungsneigung gebracht (Dhawan & Richmond, 2002; Botton et al., 2011). Neuere Untersuchungen am malignen Melanom liefern jedoch Hinweise darauf, dass CXCL1, das vom Primärtumor sezerniert wird, die Invasivität von metastatischen Absiedlungen zu verringern vermag. Dies ist ein Erklärungsansatz für die Beobachtung, dass es bei Patienten nach Resektion des Primärtumors schnell zu einer Metastasierung kommt, weil die CXCL1-vermittelte Inhibition der Metastasierung unterbunden wird (Hatano et al., 2018). Murine Prostatakarzinomzellen der Zelllinie TRAMP-C2 zeigten im Mausmodell bei einer Überexpression von CXCL1 dagegen ein vermindertes Wachstum (Benelli et al., 2013). Lu et al. (2019) konnten eine Assoziation von CXCL1 mit der zytosolischen Tyrosinkinase Src nachweisen, diese spielt eine bedeutende Rolle für Metastasierung und Zellmigration. Bei Ko-Expression von CXCL1 mit LCN2 (= Lipocalin-2, ein inflammatorisches Zytokin) kommt es verstärkt zur Aktivierung von Src. Außerdem verstärken die beiden Zytokine das Migrationsverhalten und die *epithelial-to-mesenchymal-transition* (= EMT) verschiedener Prostatakarzinomzellen (PC3 und DU145) *in vitro*. Die EMT ist eine typische Eigenschaft maligne entarteter Zellen und von großer Bedeutung für Invasivität und Metastasierung von Tumorzellen (Todorovic-Rakovic, 2021). Eine Expression der beiden Zytokine CXCL1 und LCN2 zeigte bei der Untersuchung humaner Tumor-Resektionspräparate eine starke Korrelation zu einem früheren Tumorrezidiv, im Tierversuch wurde bei Expression beider Zytokine die höchste Metastasierungsrate beobachtet (Lu et al., 2019). Die Rolle von CXCL1 wird demnach in der Literatur bisher überwiegend als protumorigen verstanden, je nach Tumorerkrankung und Krankheitsstadium wurden jedoch vereinzelt auch anti-tumorigene Effekte nachgewiesen.

Wie die Ergebnisse des unter C 1.3.1 beschriebenen PAR-*Microarrays* zeigen, wird die Expression von CXCL1 durch eine Überexpression von KLK4 in humanen Prostatakarzinomzellen der Zelllinie PC3 supprimiert, was die proliferativen Effekte von KLK4 erklären könnte. Dieses Erklärungsmodell steht im Einklang mit den Ergebnissen von Benelli et al. (2013), die einen Zusammenhang von CXCL1-Überexpression mit verringerter Tumorzellproliferation beim murinen Prostatakarzinom zeigen. Ein möglicher Erklärungsansatz für die Wirkung der CXCL-Suppression *in vivo* wäre, dass KLK4 über eine Suppression von CXCL1, welches proinflammatorische Wirkungen entfalten kann, die Immunantwort des Wirtsorganismus unterdrückt. Bei einer Vielzahl anderer Krebserkrankungen ließen sich jedoch protumorigene Effekte einer CXCL1-Überexpression nachweisen, so beim hepatozellulären Karzinom, beim Magenkarzinom, beim Mammakarzinom sowie beim malignen Melanom (Dhawan & Richmond, 2002; Bachmeier et al., 2008; Botton et al., 2011; Cheng et al., 2011, Liu et al., 2015,

Zhang et al., 2019). Eine eindeutige pro- oder antitumorigene Rolle von CXCL1 lässt sich in der Zusammenschau der Ergebnisse der Literatur und der vorliegenden Arbeit demnach vorerst nicht feststellen.

#### 1.2.1.2 CXCL8

CXCL8 (Interleukin 8) ist wie CXCL1 ein proinflammatorisches Zytokin der CXC-Familie. Es spielt eine zentrale Rolle bei der Vermittlung der zellulären Immunreaktion und weist wie CXCL1 proangiogene Effekte auf (Doszhan et al., 2019). Auch CXCL8 aktiviert, wie CXCL1 und alle anderen Zytokine der CXC-Familie, den G-Protein-gekoppelten Rezeptor CXCR2. Wie bereits erwähnt, weist das Rezeptor-Aktivierungsmuster der Zytokine jedoch Redundanzen auf. So kann CXCL8 seine Effekte noch über die Aktivierung weiterer Zytokin-Rezeptoren vermitteln. Zusammen mit CXCL6 vermag CXCL8 auch den Rezeptor CXCR1 zu aktivieren (Waugh & Wilson, 2008; Kotyza, 2012).

CXCL8 wird wie CXCL1 eine Bedeutung bei der Entstehung und Progression verschiedener Tumorerkrankungen zugeschrieben, wie etwa dem Prostatakarzinom, Mammakarzinom, Bronchialkarzinom, Kolorektalkarzinom oder dem malignen Melanom (Liu et al., 2016). Im Zellkulturüberstand der humanen Prostatakarzinomzelllinie DU145 übersteigen die gemessenen Protein-Konzentrationen von CXCL8 jene von CXCL1 um ca. den Faktor 4, weswegen CXCL8 in diesem Zusammenhang eine bedeutendere Rolle bei der Vermittlung der CXC-Zytokin-charakteristischen Effekte zugesprochen wird (Benelli et al., 2013).

Die Tatsache, dass mit CXCL1 und CXCL8 gleich zwei Liganden des Zytokinrezeptors CXCR2 durch KLK4 reguliert und bei KLK4-Überexpression in ihrer Expression supprimiert werden, ist ein starkes Indiz für die Validität der Aussage, dass KLK4 diese beiden Zytokine tatsächlich und möglicherweise auch *in vivo* beeinflusst.

#### 1.2.1.3 IL1 $\beta$

Bei dem durch das Gen *IL1 $\beta$*  (Interleukin 1 $\beta$ ) kodierten Protein handelt es sich wie bei CXCL1 und CXCL8 ebenfalls um ein proinflammatorisches Zytokin. Im Zusammenhang mit Entzündungsvorgängen setzen Makrophagen das IL1 $\beta$ -Protein nach ihrer Aktivierung als Proprotein frei, welches dann durch die Caspase 1 aktiviert wird. In malignen Tumoren wird IL-1 $\beta$  von Abwehrzellen, Fibroblasten und Tumorzellen sezerniert. Im physiologischen Zusammenhang erfüllt es vielfältige Funktionen wie etwa eine Beeinflussung der Produktion anderer Zytokine und die Regulierung von zellulärer Adhäsion und Zellmigration. Schließlich kann IL-1 $\beta$  auch Einfluss auf Angiogenese und Immunantwort nehmen (Rebe & Ghiringhelli, 2020).



Für hohe Serumkonzentrationen sowie für einige Genpolymorphismen von IL1 $\beta$  ist bekannt, dass sie das Risiko erhöhen, bestimmte Tumoren zu entwickeln. Z.B. erhöhten hohe Serumkonzentrationen das Risiko eines nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms (McLoed et al., 2016), das Allel „IL-1 -31 C > T (rs1143627) T“ erhöht unter anderem das Risiko eines Bronchial-, Mamma- und Cervix-Karzinoms (Qian et al., 2010; Bhat et al., 2014; Eras et al., 2019). Interessanterweise korreliert eine starke Färbung im immunhistochemischen Nachweis von IL-1 $\beta$  an Präparaten nasopharyngealer Plattenepithelkarzinome wie auch hohe Konzentrationen von *IL-1 $\beta$* -mRNA im Mammakarzinom mit einer besseren Prognose (Chen et al., 2012; Martinez-Reza et al., 2019).

Die Auswirkungen von IL-1 $\beta$  auf die Tumorentstehung und den Krankheitsfortschritt beim Prostatakarzinom sind vielfältig. Einerseits inhibiert IL-1 $\beta$  das Wachstum von humanen Prostatakarzinomzellen der Zelllinie LNCap (Kawada et al., 2006). Andererseits ist IL-1 $\beta$  im Stande, über eine Aktivierung von NF $\kappa$ B oder die Induktion der Endothelin-Expression die Tumorzellproliferation zu fördern und den Krankheitsfortschritt negativ zu beeinflussen (Le Brun et al., 1999; Longoni et al., 2013). Dieser Umstand verdeutlicht, dass die Rolle eines einzelnen Zytokins über verschiedene Tumorentitäten hinweg keineswegs nur entweder als pro- oder antitumorigen verstanden werden muss, sondern je nach Tumorerkrankung unterschiedliche Wirkungen denkbar sind. Bezüglich der Therapie des Androgen-sensitiven Prostatakarzinoms ist von Bedeutung, dass IL-1 $\beta$  die Androgenrezeptor-Expression vermindert, was unter Umständen negative Effekte auf die Effizienz einer Hormontherapie haben könnte (Chang et al., 2014).

#### 1.2.1.4 F2RL2

Bei dem vom *F2RL2*-Gen kodierten Protein (= *coagulation factor II [thrombin] receptor-like 2* = *PAR-3* = *thrombin receptor-like 2*) handelt es sich, wie bei den anderen Protease-aktivierten Rezeptoren (PARs), um einen G-Protein-gekoppelten Sieben-Transmembran-Domänen-Rezeptor. Das *F2RL2*-Protein (= *PAR3*) wird, wie *PAR1* und *PAR4*, durch Thrombin aktiviert und übernimmt u.a. die Funktion eines Kofaktors bei der Aktivierung des Protease-aktivierten Rezeptors 4 (= *PAR4*; Elste & Petersen, 2010). Beim Menschen finden sich hohe Konzentrationen an *F2RL2*-mRNA im Gewebe von Trachea, Magen, Dünndarm und Knochenmark (Ishihara et al., 1997). Für das Prostatakarzinom wurde eine positive Korrelation von erhöhter Expression des *F2RL2*-Proteins und Metastasierung beschrieben. Zhou et al. (2017) entschlüsselten hierbei einen zugrundeliegenden Mechanismus, bei dem das *F2RL2*-Protein den Komplex aus den Proteinen *KIBRA* (*kidney and brain expressed protein*), *Merlin* (*Moesin-Ezrin-Radixin-like protein*) und *FRMD6* (*FERM-[Band 4.1 (F), Ezrin, Radixin, Moesin]-domain-containing protein 6*) dissoziiert und sich in der Folge ein *PAR3*-aPKC-(*atypical protein kinase*

C)-KIBRA-(*kidney and brain expressed protein*)-Komplex ausbildet. Dies ermöglicht die Translokation des YAP-(*Yes-associated-protein*)-Proteins in den Zellkern, was dort die Aktivierung unterschiedlicher prometastatischer Gene zur Folge hat (Zhou et al., 2017). In Zellkulturexperimenten mit den Zelllinien PC3 und DU145, die keine endogene KLK4-Expression aufweisen, wurden durch Zhou et al. (2017) erhöhte Expressionslevel für das F2RL2-Protein beschrieben. Da die isolierte Betrachtung einer verstärkten Expression sowohl von KLK4 als auch des F2RL2-Proteins jeweils im Sinne einer erhöhten Malignität zu interpretieren sind, bleibt die Frage, warum KLK4 die Expression des F2RL2-Proteins wie beobachtet unterdrückt, und was dies für Folgen auf die Pathogenese und den Krankheitsfortschritt des Prostatakarzinoms *in vivo* bedeutet. Hierzu wären in auf diese Arbeit folgenden Projekten weitergehende Untersuchungen zur Validierung der F2RL2/PAR3-Expression, z.B. mittels qPCR, nötig.

#### 1.2.1.5 CCL2

Das vom Gen *CCL2* (*chemokine [C-C-motif] ligand 2 = monocyte chemoattractant protein 1* [MCP1] = *small inducible cytokine A2*) kodierte Protein ist ein Zytokin der CC-Familie. Diese unterscheidet sich von den Zytokinen der CXC-Familie durch das Fehlen der zwischen zwei Cystein-Resten vorhandenen, variablen Aminosäure. CCL2 wirkt chemotaktisch auf Monozyten und basophile Granulozyten, nicht jedoch auf neutrophile oder eosinophile Granulozyten (Hao et al., 2020). Mitglieder der CC-Familie sind Liganden der CC-Rezeptoren (Raman et al., 2007). CCL2 wird sowohl beim Prostatakarzinom im Frühstadium, als auch bei der metastasierten, fortgeschrittenen Erkrankung verstärkt exprimiert (Zhang et al., 2010). Bei Patienten mit ossär metastasiertem Prostatakarzinom finden sich höhere Serumkonzentrationen von CCL2 (Lu et al., 2009). Zudem konnte für CCL2 und das Prostatakarzinom ein Einfluss auf die Zellmigration gezeigt werden. CCL2 wird dabei im *tumor microenvironment* von tumorassoziierten Fibroblasten (CAF = *cancer associated fibroblasts*) sezerniert (Cioni et al., 2018). Frühe Stadien des Prostatakarzinoms zeichnen sich durch eine ausgeprägte Androgensensitivität der Tumoren aus (Kaatsch et al., 2015). Mit fortschreitender Erkrankung und nach langjähriger antihormoneller Therapie geht diese jedoch häufig verloren. Neuere Untersuchungen von Cioni et al. (2018) zeigen, dass mit dem Verlust der Androgensensitivität der CAFs eine erhöhte Expression von CCL2 und CXCL8 einhergeht. Letztere fördert die Malignität hinsichtlich einer verstärkten Migration der Tumorzellen.

## 1.2.2 Durch *KLK4* induzierte Gene

### 1.2.2.1 IKBKB

Das Gen *IKBKB* (*inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit  $\beta$*  = IKK- $\beta$  = IKK2) kodiert für ein Protein, das im Komplex mit IKK- $\alpha$  (*subunit  $\alpha$* ) und IKK- $\gamma$  (*subunit  $\gamma$* ) den Inhibitor eines NF $\kappa$ B-Inhibitor-Komplexes phosphoryliert (Shin & Choi, 2019). Hierdurch kommt es zur Dissoziation des NF $\kappa$ B-Inhibitor-Komplexes und zu einer Aktivierung von NF $\kappa$ B. Bei NF $\kappa$ B handelt es sich um eine Familie induzierbarer Transkriptionsfaktoren, welche die zelluläre Entzündungsreaktion regulieren (Bachmeier et al., 2008). Die Aktivierung von NF $\kappa$ B spielt bei einer Vielzahl von Tumorerkrankungen eine bedeutende Rolle in der Krankheitsentstehung, indem NF $\kappa$ B durch Aktivierung verschiedener Schlüsselgene physiologische Entzündungsvorgänge mit der malignen Entartung von Zellen verknüpft (Shin & Choi, 2019). Für das Prostatakarzinom ist bekannt, dass die verstärkte Expression des strukturverwandten IKK- $\epsilon$  mit verstärkter Zellproliferation und Tumorwachstum einhergeht (Michalaki et al., 2004).

### 1.2.2.2 KDR

Das vom Gen *KDR* (*kinase insert domain containing receptor* = VEGFR-2 = *vascular endothelial growth factor receptor 2* = CD309) kodierte Protein repräsentiert den membranständigen VEGFR-2. Der Ligand von VEGFR-2 ist der *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Nach Aktivierung durch VEGF dimerisieren zwei VEGFR-2-Rezeptoren und es kommt zur sog. Autophosphorylierung. VEGFR-2 entfaltet über eine intrazelluläre Signalkaskade eine proangiogenetische Wirkung im Rahmen der physiologischen Angiogenese, wird aber auch bei einer Vielzahl von Tumorerkrankungen, wie dem Mamma-, Cervix-, Bronchial-, hepatozellulären und Nierenzellkarzinom überexprimiert. Im Tumor ist VEGFR-2 mit für die Proliferation der Endothelzellen, die pathologische Neoangiogenese sowie letztlich auch Tumorwachstum und Metastasierung verantwortlich (Siddharth & Vithal, 2019). Für das Prostatakarzinom fanden Zhan et al. 2013 im Rahmen einer Metaanalyse eine Assoziation von VEGF mit einer schlechten Prognose (Zhan et al., 2013).

VEGFR-2 hat sich als Ziel neuartiger Therapiestrategien in der Tumorthherapie bewährt. So existieren inzwischen verschiedene sog. *small-molecule*-Inhibitoren für VEGF-2 (z.B. Regorafenib im Rahmen der Therapie des Kolon- und des hepatozellulären Karzinoms sowie Sorafenib, ein Multi-Kinase-Inhibitor in der Therapie des Schilddrüsenkarzinoms; Siddharth & Vithal, 2019), die durch eine Unterdrückung der VEGFR-2-vermittelten Effekte eine gezieltere Therapie als im Rahmen der alleinigen systemischen Chemotherapie ermöglichen. Diese Inhibitoren wurden anhand von Röntgenstruktur-

analysen des VEGFR-2 entwickelt und sind in der Produktion wesentlich weniger aufwändig als z.B. Antikörper-Präparate zur Hemmung von VEGFR-2 (Siddharth & Vithal, 2019).

### 1.2.2.3 GATA2

Das vom Gen *GATA2* (= *GATA-binding factor 2*) kodierte Protein gehört zur Familie der Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren. Die Bezeichnung geht auf die Basensequenz „Guanin-Adenin-Thymin-Adenin“ zurück, an die die GATA-Transkriptionsfaktoren im Bereich der Promotoren von Genen binden. GATA2 spielt eine Rolle bei der Regulation von Genen, die im Zusammenhang mit der Proliferation von Zellen der Blutbildung sowie des Hormonhaushalts stehen (Hankey et al., 2020). Neben anderen Transkriptionsfaktoren wie dem FOXA1 (= *Forkhead Box A1* = HNF-3A = *hepatocyte nuclear factor 3A*) und HOXB13 (= *Homeobox B13*) gehört GATA2 zu den sogenannten Pionier-Faktoren, die an kondensierten Chromatinabschnitten die Koordinierung verschiedener Faktoren, darunter der Histon-Acetyltransferase, bewirken, und so die entsprechenden Abschnitte der DNA für weitere Komponenten des Transkriptionsinitiationskomplexes überhaupt erst verfügbar machen (Brownell et al., 1996; Hankey et al., 2020). Im Prostatakarzinom finden sich in unterschiedlichen Krankheitsstadien erhöhte RNA-Expressionslevel von GATA2 (Rhodes et al., 2004). Zudem ist bekannt, dass GATA2 Promotor-Regionen für den Androgen-Rezeptor erreichbar macht (Wang et al., 2007). Das Zusammenspiel aus GATA2 und Androgenrezeptor ist sowohl beim hormonsensitiven als auch beim sog. kastrationsresistenten (einem der Androgendeprivations-/Hormonentzugstherapie nicht mehr zugänglichen) Prostatakarzinom für die Aufrechterhaltung der tumortypischen Eigenschaften der Erkrankung verantwortlich (Cisse et al., 2013). Diese Tatsache macht GATA2 zu einem potenziellen Ziel therapeutischer Interventionen. Der GATA2-Inhibitor K7174 schränkt die Bindung von GATA2 an die DNA ein und unterdrückt so die androgenvermittelte Transkription (Imagawa et al., 2003). Allerdings muss bei einer systemischen Unterdrückung der GATA2-Funktion bedacht werden, dass die Wirkung von Transkriptionsfaktoren je nach Zelltyp sehr unterschiedlich ausfallen kann. Im Kontext der Blutbildung und des lymphatischen Systems hat ein Verlust der GATA2-Funktion eine protumorigene Wirkung (Minegishi et al., 1997). Aus diesem Grund ist für eine prognoseverbessernde Therapie eine gezielte Unterdrückung von GATA2 nur in Tumor- oder tumor-assoziierten Zellen erwünscht, was jedoch weitere pharmakologische Entwicklungen erfordert (Hankey et al., 2020).

#### 1.2.2.4 ELK1

*ELK1 (ETS-like protein = ETS transcription factor ELK1)* kodiert für einen Transkriptionsfaktor der ETS-Familie (ETS = *erythroblast transformation specific*). Diese Transkriptionsfaktoren formen sog. ternäre Komplexe und sind intranukleäre Zielstrukturen der Ras-Raf-MAP-Kinase-Kaskade. Alle Mitglieder dieser Familie erfüllen Schlüsselfunktionen in der Regulierung der embryonalen Entwicklung, der Zellproliferation, der zellulären Differenzierung, der Angiogenese, der Entzündung und der Apoptose (Tymms & Kola, 1994; Span et al., 2002; Furlan et al., 2019). Im Prostatakarzinom wird ELK1 durch den Androgenrezeptor aktiviert und bewirkt eine verstärkte Proliferation der Tumorzellen (Patki et al., 2013).

#### 1.2.3 Zusammenfassung der ermittelten Zielgene von KLK4 im PAR-Microarray

Bezüglich der mittels *Microarray* analysierten Gene des PAR-Signalweges, die durch KLK4 supprimiert bzw. induziert werden, lässt sich zusammenfassend feststellen:

KLK4 supprimiert die Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine (CCL2, CXCL1, CXCL8, IL-1 $\beta$ ) in PC3-Zellen, was einen suppressiven Effekt der Tumorzellen auf die chemotaktische Anlockung und Aktivierung von Zellen des Immunsystems bewirken könnte (Griffith et al., 2014; Eckardt et al., 2020). Daneben bewirkt KLK4 auch eine verstärkte Expression von Wachstumsfaktoren bzw. deren Rezeptoren sowie assoziierten Kofaktoren, wie etwa von KDR (= VEGFR-2). Für KDR sind proangiogenetische Effekte, eine proliferationsfördernde Wirkung auf Endothelzellen sowie ein negativer prognostischer Effekt beim Prostatakarzinom nachgewiesen (Zhan et al., 2013; Siddharth & Vithal, 2019).

Weitere Transkriptionsfaktoren, die durch KLK4 induziert werden, sind GATA2 und ELK1 (Tymms & Kola, 1994; Span et al., 2002; Furlan et al., 2019). Daneben wird der Kofaktor I $\kappa$ B $\kappa$  des für die Regulierung der Entzündungsreaktion und in der Tumorentstehung verschiedener Tumorerkrankungen bedeutenden Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B durch die Expression von KLK4 verstärkt exprimiert (Dhawan & Richmond, 2002; Bachmeier et al., 2008; Shin & Choi, 2019).

### 1.3 KLK4 reguliert die Expression des proinflammatorischen Zytokins CXCL1 auf Proteinebene

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von KLK4 auf das Expressionsmuster des proinflammatorischen Zytokins CXCL1 näher untersucht. Die Expression von CXCL1 wird unter KLK4-Expression in PC3-Zellen auf Proteinebene supprimiert, wie die Ergebnisse unter C.1.3.2 verdeutlichen. Im Ver-

gleich zur verminderten Expression auf mRNA-Ebene, wie sie die Ergebnisse des PAR-Microarrays zeigen (CXCL1-Expression bei Expression von KLK4 lediglich 3 % bezogen auf die Vektorkontrollzelllinie), sind die Veränderungen der CXCL1-Expression auf Proteinebene, welche mit ELISA gemessen wurden, von der Tendenz her gleich (stets geringere CXCL1-Expression bei Expression von KLK4 im Vergleich zur Vektorkontrollzelllinie). Jedoch zeigte sich in Abhängigkeit vom verwendeten Medium eine unterschiedlich deutliche Ausprägung der CXCL1-Suppression.

Die Zellkultur zur Gewinnung von konditioniertem Zellkulturmedium für die vorliegenden Experimente wurde alternativ 1. unter durchgehender Verwendung von Medium mit FCS-Zusatz (C 1.3.2), 2. unter Verwendung von FCS-haltigem Medium zum Ausplattieren und anschließendem Wechsel auf FCS-freies Medium nach 24 h (C 1.3.2) sowie 3. unter Verwendung von strikt FCS-freiem Medium über den gesamten Versuchszeitraum (C 1.3.3) durchgeführt. FCS hat für die Praxis der Zellkultur eine große Bedeutung, da sich bestimmte Zelllinien nur mit FCS-Zusatz erfolgreich kultivieren lassen. Jedoch ist die genaue Zusammensetzung in der Regel nicht bekannt und letztere variiert je nach Charge. Grundsätzlich sind in FCS neben bovinem Serumalbumin auch eine Vielzahl an gelösten Wachstumsfaktoren enthalten, welche ihrerseits das Wachstumsverhalten der Zellen in Kultur maßgeblich beeinflussen. FCS beeinflusst die Expression einer Vielzahl von Genen, wie z.B. ein direkter Vergleich der Anzucht von Maus-Blastozysten mit anschließender Transkriptomanalyse durch Fernández-González (2009) zeigt. Aus diesem Grund stellt die Verwendung von FCS-freiem Medium, eine gute Alternative dar, um unabhängige Experimente besser miteinander vergleichen zu können und unbeeinflussbare und schwer quantifizierbare Einflussfaktoren durch die verschiedenen FCS-Chargen zu vermeiden. Voraussetzung hierfür ist, dass die jeweilige Zelllinie bei Verwendung spezieller, definierter Medien und –zusätze eine ausreichende Proliferation zeigt. Im Fall der vorliegenden Arbeit wurde hierfür das speziell für die Kultur von PC3-Zellen entwickelte P4-8F und der zugehörige, Fibronectin-haltige Coating Mix für eine bessere Adhäsion der Zellen verwendet (B 3.2). Die chargenabhängige, veränderliche Zusammensetzung von FCS im Gegensatz zum definierten, an Wachstumsfaktoren freien Medium P4-8F erklärt die unterschiedliche Expression von CXCL1 auf Proteinebene je nach verwendetem Medium.

### *1.3.1 Die Ergebnisse des PAR-Microarrays zur verminderten Expression von CXCL1 unter Expression von KLK4 können durch quantitative qPCR bestätigt werden. KLK4 reguliert die Expression des proinflammatorischen Zytokins CXCL1 auf mRNA-Ebene*

Zur Validierung der Ergebnisse des PAR-Microarrays, der eine verminderte Expression von CXCL1 auf mRNA-Ebene bei Expression von KLK4 in PC3-Zellen zeigt, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine quantitative qPCR durchgeführt (C 1.3.4). Die Ergebnisse dieser qPCR bestätigen die orientie-

rende Einschätzung der *Microarray*-Ergebnisse. Während die beiden Testläufe des *Microarrays* eine durchschnittliche relative CXCL1-Expression von 3 % in den Wildtyp-KLK4-exprimierenden Zellen zeigen, lieferte die genauere qPCR einen Wert von 8 % CXCL1-Expression im Vergleich zur Vektorkontrollzelllinie. Der Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte in einer relativen Ungenauigkeit des experimentellen Ansatzes des *Microarrays* im Vergleich zur qPCR liegen. Im *Microarray* wird eine Vielzahl von Genen parallel analysiert, die eingesetzten Mengen an cDNA aus den lysierten Zellen fallen deutlich geringer aus, wobei sich Messungenauigkeiten verstärken. Außerdem wurde die qPCR im Vergleich zum *Microarray* mit anderen Assay inkl. unterschiedlicher Primer durchgeführt. Die Ergebnisse verschiedener Assays unterliegen einer gewissen Streuung.

Ein Vergleich der Effekte von KLK4 auf die CXCL1-Expression auf mRNA- und Proteinebene zeigt, dass die Suppression der CXCL1-Expression auf Proteinebene je nach verwendetem Medium unterschiedlich und zum Teil geringer ausfällt. Eine Ursache für die unterschiedlich stark ausgeprägten Einflüsse auf mRNA- bzw. Proteinebene könnte in der posttranskriptionellen Regulierung liegen, der alle Gene unterliegen (Kovarik et al., 2017). Seit längerem sind unterschiedliche Mechanismen bekannt, welche die Effizienz der Translation, also der Überführung der genetischen Information von der mRNA zum fertigen Protein, modifizieren können. Von den Chemokinen (zu denen CXCL1 gehört) weiß man, dass die sog. AU-reichen Elemente (= *Adenylat-Uridylat-rich-elements* = ARE) eine bedeutende Rolle in der posttranskriptionellen Regulierung spielen. Die Chemokin-mRNA-Transkripte, welche aus der genomischen DNA durch Transkription entstehen, enthalten in den Regionen außerhalb der eigentlichen kodierenden Sequenz (*untranslated regions* = UTR) Bereiche, die reich an Adenylat und Uridylat sind. An diese Sequenzen binden wiederum Kofaktoren (im Falle der Chemokine z.B. Tristetrapolin), was einen beschleunigten Abbau dieser Transkripte bewirkt und so ihre Translation verhindert (Blackshear, 2002; Barreau et al., 2005; Kovarik et al., 2017). Andere Kofaktoren, die an die ARE-Regionen binden, vermögen wiederum die Stabilität der mRNA-Transkripte zu erhöhen, wie etwa das *Human Antigen R/HuR* (Brennan & Steitz, 2001; Kovarik et al., 2017).

### *1.3.2 KLK4 beeinflusst das Gleichgewicht der Zytokine*

Chronische und fehlregulierte Entzündungsvorgänge spielen eine Rolle in der Entstehung und für den Krankheitsfortschritt verschiedener Tumorerkrankungen (A 1.2). Auch für das Prostatakarzinom ist eine solche Assoziation von chronischer Entzündung und Tumorigenese postuliert worden. Die Mechanismen sind beim Prostatakarzinom zwar im Detail noch unklar, jedoch gibt es einige Konzepte, die versuchen die Phänomene Entzündung und maligne Entartung in Verbindung zu bringen: im Rahmen von Entzündungsvorgängen kommt es vermehrt zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und damit zu stark erhöhtem oxidativem Stress im Gewebe. Der oxidative Stress verur-

sacht unmittelbar Mutationen in der DNA und fördert in der Folge die maligne Entartung der Zellen (Bardia et al., 2009; Puhr et al., 2016).

Die Entzündungsvorgänge können einerseits mikrobiell verursacht und durch das individuelle Mikrobiom des Harntrakts beeinflusst werden. Andererseits ist auch ein Einfluss von physischen und chemischen Noxen auf die Krankheitsentstehung nachgewiesen, zum Beispiel scheinen nutritive Aspekte einen Einfluss auf die Tumorigenese des Prostatakarzinoms zu nehmen. Nutritive Aspekte könnten auch, neben unterschiedlichen genetischen und epigenetischen Voraussetzungen, für einen Teil der unterschiedlichen Prävalenz des Prostatakarzinoms in verschiedenen Ethnien mit verantwortlich sein (Puhr et al., 2016). Ein Risikofaktor wird z.B. im vermehrten Verzehr von hoherhitzen Fleischwaren gesehen. Bei zu starkem Erhitzen von Fleischwaren werden vermehrt heterozyklische Amine gebildet, welche einerseits das prostatistische Gewebe reizen und damit chronische Entzündungsvorgänge fördern, andererseits aber auch direkt karzinogen wirken. Beispiele für physische Noxen, die chronische Entzündungsvorgänge in der Prostata fördern, sind die *Corpora amylacea* (kleine, transparente Einschlüsse unklarer Funktion aus Zelldebris oder eingedicktem Sekret) sowie Prostatasteine. Beide reizen direkt durch mechanischen Stress das Prostatagewebe und tragen auf diese Weise zu Entzündungsvorgängen bei (Puhr et al., 2016).

Bezüglich des CXCL1-Expressionsmusters von Tumorzellen liegen unterschiedliche Arbeiten vor, die je nach experimentellem Ansatz, verwendeten Zelllinien oder auch der untersuchten Tumorentität sowohl eine verstärkte Expression als auch eine verminderte Expression von CXCL1 im Vergleich zum Normalgewebe zeigen (Dhawan & Richmond, 2002; Bachmeier et al., 2008; Cheng et al., 2011; Xu et al., 2012; Benelli et al., 2013; Miyake et al., 2014; Z. Zhang et al., 2019).

So wurde für das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom zunächst ein negativer (Baird et al., 2011), für das maligne Melanom hingegen ein positiver Zusammenhang von erhöhter CXCL1-Expression und Krankheitsentstehung beschrieben (Dhawan & Richmond, 2002). Neuere Arbeiten zum nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom legen jedoch einen Zusammenhang von erhöhter CXCL1-Expression in Tumorzellen und Tumorprogression nahe (Cao et al., 2017). Zudem zeigte sich eine Assoziation von erhöhter CXCL1-Expression mit tumortypischen Malignitätskriterien bei unterschiedlichen Tumorerkrankungen, etwa in Bezug auf eine erhöhte Metastasierungsneigung beim Mammakarzinom (Bachmeier et al., 2008) bzw. mit invasivem Wachstum beim Magenkarzinom (Cheng et al., 2011; Xu et al., 2012; Z. Zhang et al., 2019). Auch Untersuchungen des Tumorgewebes von Patienten mit high-grade-Prostatakarzinom zeigten erhöhte CXCL1-Level auf Proteinebene (Miyake et al., 2014).

Eine Erhöhung der CXCL1-Expression kann jedoch auch zur Reduzierung der Proliferation führen. Wie bereits unter D 1.3.1.2.1 beschrieben, fanden Benelli et al. (2013) heraus, dass murine TRAMP-C2-



Prostatakarzinomzellen nach Transfektion mit einem CXCL1-Vektor (TRAMP-C2-Zellen exprimieren physiologischerweise weder CXCL1 noch CXCL8), eine geringere Proliferationsrate zeigen als die entsprechenden Vektorkontrollzellen (Benelli et al., 2013).

Chemokine wie CXCL1 spielen bei der Rekrutierung von Bindegewebszellen zu tumorassoziierten Fibroblasten (*cancer associated fibroblasts* = CAF) und damit der Etablierung des *tumor microenvironment* (TME) eine bedeutende Rolle (Gascard & Tlsty, 2016). Kryza et al. (2017) untersuchten den Einfluss von KLK4 auf das Zytokin-Expressionsmuster von Zellen der aus gesundem Prostatagewebe isolierten Stromazelllinie WPMY1. Hierbei stellte sich heraus, dass KLK4, das von prämaligen wie maligne entarteten Prostataepithelzellen exprimiert wird, das Sekretom von WPMY1 verändert. Dabei nehmen die intakten Stromazellen CAF-ähnliche Funktionen an. Unter anderem verändert sich das Expressionsmuster der Zytokine dieser nicht maligne entarteten Zellen, wobei einzelne proinflammatorische Zytokine supprimiert, andere hingegen induziert werden. Für CXCL1 fanden Kryza et al. (2017) unter dem Einfluss von KLK4 im konditionierten Zellkulturmedium von WPMY1 ebenfalls eine Suppression um den Faktor 0,5. Die Fähigkeit von CAF, über parakrine Signalgebung ihre Umgebung zu beeinflussen, ist der Schlüssel zu der bedeutenden Rolle von tumorassoziierten Fibroblasten im *tumor microenvironment* (Mbeunkui & Johann, 2009; Augsten, 2014).

### *1.3.3 Übertragbarkeit der KLK4-Effekte auf die CXCL1-Expression von in vitro nach in vivo, Einflussfaktoren auf die Effektivität der Chemokin-Signaltransduktion*

Nachdem die Rolle sowohl von KLK4 als auch von CXCL1 bisher eher in einem protumorigenen Zusammenhang gesehen wurde, stellt sich die Frage, warum in dieser Arbeit unter KLK4-Expression in Prostatakarzinom-Zellen die CXCL1-Expression supprimiert wurde. Die beobachtete, durch KLK4 induzierte Suppression von CXCL1 *in vitro* muss jedoch nicht für andere Tumorzellen bzw. *in vivo* gelten. Während, wie unter D 1.3.4 beschrieben, CXCL1-Expression im Mausmodell zu einem geringeren Wachstum von murinen Prostatatumorzellen führt (Benelli et al., 2013), fanden Miyake et al. (2014) in Tumoren fortgeschrittener Prostatakarzinome eine erhöhte CXCL1-Expression. Daher ist die Rolle von CXCL1 nicht ohne weiteres als entweder pro- oder antitumorigen zu interpretieren. Im Folgenden werden verschiedene Aspekte der Komplexität der Regulation der Chemokin-Expression und der Effektivität der Signaltransduktion kurz erläutert. Hierin mag ein Grund dafür liegen, dass die zahlreichen nicht beeinfluss- oder messbaren Faktoren, die auf ein Zellkulturmodell einwirken, eine unmittelbare Übertragung der Erkenntnisse auf den Tumor im lebenden Organismus erschweren.

Ausgehend von der Transkription des *CXCL1*-Gens bis hin zur Bindung von CXCL1 an seinen Rezeptor CXCR2 mit der Folge einer Signaltransduktion ins Zellinnere wird die Expression von CXCL1 zunächst

auf Ebene der Transkriptionsinitiation und der posttranskriptionellen Regulierung (z.B. Stabilität der mRNA und Geschwindigkeit des CXCL1-mRNA-Abbaus) beeinflusst (Brennan & Steitz, 2001; Blackshear, 2002; Barreau et al., 2005; Kovarik et al., 2017). Die Effektivität der Signaltransduktion des schließlich extrazellulär vorliegenden CXCL1 wird dann zusätzlich durch das Expressionslevel bzw. die Dichte membranständiger Zytokinrezeptoren moduliert. Zudem existieren lösliche Rezeptoren, welche die Zytokine dem Reaktionsgleichgewicht entziehen können, sodass diese nicht mehr für eine Aktivierung membranständiger Rezeptoren zur Verfügung stehen (Van Dyke et al., 2009; Christoph et al., 2018; Z. Zhang et al., 2019; Zou et al., 2020).

Die Vielfalt der Interaktionen wird noch weiter durch Rezeptorproteine wie DARC (= *duffy antigen receptor for chemokines*) gesteigert, die „promiskuitiv“ mit Chemokinen verschiedener Klassen (z.B. CXC- und CC-Chemokine) interagieren können, aber keine G-Protein-gekoppelte-Aktivität zeigen. Solche Rezeptorproteine verringern demnach die Effektivität der Chemokin-Signaltransduktion, da die Bindung der Liganden intrazellulär keinen Effekt bewirkt (Tang et al., 1998). DARC findet sich als Blutgruppenantigen auf Erythrozyten, aber auch auf Endothelzellen und Nervenzellen, seine physiologische Funktion ist jedoch unklar. Möglicherweise besteht diese lediglich in der Bindung von Zytokinen ohne eine Signaltransduktion in den Intrazellulärraum (Horne & Woolley, 2009). Da es für die Infektion mit dem Malaria-Erreger *Plasmodium vivax* als Eintrittsrezeptor fungiert (Grimberg et al., 2007), nimmt man an, dass es bei Menschen mit afrikanischer Herkunft durch evolutionären Druck größtenteils verdrängt wurde. Jedoch tritt bei diesen das Prostatakarzinom deutlich häufiger auf als bei Patienten mit kaukasischer Herkunft. So lag die jährliche Inzidenz des Prostatakarzinoms bei US-Amerikanern zwischen 2003 und 2017 über alle Altersklassen hinweg bei Patienten mit kaukasischer Abstammung bei 122/100.000/Jahr, bei Patienten mit schwarz-afrikanischer Abstammung hingegen bei 202/100.000/Jahr (Siegel et al., 2020). Daher wurde für das Prostatakarzinom postuliert, dass DARC bei Kaukasiern die Aktivität proangiogenetischer Chemokine vermindert und somit tumorprotektiv wirken könnte (Nemesure et al., 2015). Dieser Zusammenhang spricht für eine protumorigene Rolle von CXCL1 im Prostatakarzinom und wirft die Frage auf, warum das Enzym KLK4, das bisher ebenfalls in einem protumorigenen Kontext interpretiert wurde, in PC3-Zellen die Expression von CXCL1, das möglicherweise ebenfalls protumorigen wirkt, vermindert.

In jüngster Zeit konnten Tse et al. (2020) neue Erkenntnisse hinsichtlich der Effekte einer KLK4-Expression durch Prostatakarzinomzellen im Mausmodell gewinnen. Im Gegensatz zu den Erkenntnissen der bisherigen Kallikrein-Forschung bewirkte hier die Expression von KLK4 *in vivo* eine Verringerung der Tumormasse. Dies sind die ersten Ergebnisse, die für KLK4 eine antitumorigene Wirkung postulieren. Im Hinblick auf den Einfluss von KLK4 auf die Expression von CXCL1 ergibt sich damit ein neuer Zusammenhang: Wie unter D 1.3.4 beschrieben, zeigt ein Großteil der Forschungsergebnisse

zu CXCL1 bei verschiedenen Tumorentitäten dieses Chemokin in einem protumorigenen Kontext sowie eine Korrelation von CXCL1 mit einer schlechten Prognose, etwa beim malignen Melanom (Dhawan & Richmond, 2002), dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (Cao et al., 2017), dem Magenkarzinom (Cheng et al., 2011; Xu et al., 2012; Z. Zhang et al., 2019), dem Mamma-Karzinom (Bachmeier et al., 2008) und auch dem high-grade-Prostatakarzinom (Miyake et al., 2014). Dieses deutliche Überwiegen an Befunden, die für CXCL1 einen protumorigenen Kontext postulieren, wirft die im letzten Absatz beschriebene Frage auf, warum das bisher ebenfalls als protumorigen verstandene Enzym KLK4 die Expression von CXCL1 supprimiert. Sieht man die Rolle von KLK4 anhand der neueren Ergebnisse von Tse et al. (2020) nun jedoch in einem antitumorigenen Kontext, ergäbe eine verringerte Expression des (protumorigenen) CXCL1 bei Expression von KLK4 einen schlüssigeren Zusammenhang. KLK4 könnte so durch eine Suppression der CXCL1-Expression eine antitumorigene Wirkung entfalten.

## **2. Spezifische Hemmung von KLK4 bewirkt eine Abschwächung der KLK4-Effekte auf das Wachstumsverhalten und den Metabolismus von PC3-Zellen**

Um die Effekte von KLK4 und die Bedeutung der KLK4-Enzymaktivität für das Wachstum und den Metabolismus von PC3-Zellen im Rahmen dieser Arbeit untersuchen zu können, mussten zunächst zwei Vorbedingungen erfüllt werden:

1. Es musste sichergestellt werden, dass die verwendeten KLK4-Inhibitoren UAMC 1399 und SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> unter den experimentellen Bedingungen stabil genug sind, um für die Dauer der Versuche eine ausreichende Inhibition von KLK4 zu gewährleisten.
2. Um Effekte einer KLK4-Expression untersuchen zu können, mussten unspezifische Einflüsse der KLK4-Inhibition auf das Wachstum von PC3-Zellen ausgeschlossen werden. D.h. es musste insbesondere sichergestellt sein, dass keine allgemeine Zytotoxizität der Inhibitoren in angewandten Konzentrationen vorlag.

### **2.1 Halbwertszeit von UAMC 1399 und praktische Konsequenzen für Zellkulturversuche**

Die in Abbildung 21 (C 2.1.1) gezeigten Ergebnisse verdeutlichen, dass die inhibitorische Wirkung des Inhibitors UAMC 1399 gegenüber KLK4 über einen Zeitraum von 48 h um etwa 50 % abnimmt. Aus diesem Grund wurde bei den hier durchgeführten Zellkulturversuchen nach 24 h die Hälfte der ursprünglich eingesetzten Inhibitormenge erneut zugegeben, um eine vollständige Inhibition bis zum Ende des Versuchszeitraumes zu gewährleisten.

## 2.2 UAMC 1399 inhibiert die KLK4-Aktivität und zeigt keine zytotoxischen Effekte

Wie die Ergebnisse unter C 2.1.2 zeigen, konnten für Konzentrationen von maximal 1  $\mu\text{M}$  UAMC 1399 über einen Zeitraum von 96 h keine unspezifischen zytotoxischen Effekte auf PC3-Vektorkontrollzellen nachgewiesen werden. D.h., die untersuchten Konzentrationen von UAMC 1399 (bis 1  $\mu\text{M}$ ) hatten keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation der PC3-Vektorkontrollzellen verglichen mit der Kontrollgruppe, die ohne UAMC 1399 kultiviert wurde.

Wie bereits erwähnt, wurden im Rahmen der Versuche der vorliegenden Arbeit maximal 1  $\mu\text{M}$  UAMC 1399 eingesetzt. Der  $\text{IC}_{50}$  (= Inhibitor-Konzentration, bei der die Enzymaktivität um 50 % gehemmt wird = halbmaximale Hemmkonzentration) von UAMC 1399 für KLK4 liegt bei ca. 5 nM (van Soom et al., 2015). Bei einem Verhältnis aus  $\text{IC}_{50}$  und eingesetzter Konzentration von UAMC 1399 von 1:200 im Versuchsansatz kann, trotz der unter D 2.1 beschriebenen Abnahme der inhibitorischen Wirkung und Notwendigkeit einer zwischenzeitlichen Zugabe von UAMC 1399 während der Inkubation der Zellen, von einer nahezu vollständigen Inhibition der KLK4-Aktivität ausgegangen werden. Zudem konnte, aufgrund des Fehlens unspezifischer zytotoxischer Effekte, eine isolierte Untersuchung der Auswirkungen einer KLK4-Inhibition in KLK4-überexprimierenden PC3-Zellen erfolgen.

## 2.3 Stabilität und Zytotoxizität von SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> in der Zellkultur

Für den spezifischen KLK4-Inhibitor SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> ergaben Untersuchungen von Swedberg et al. (2011) einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert für KLK4 von ca. 0,06 nM sowie eine Halbwertszeit von ca. 55-70 h unter Zellkulturbedingungen mit PC3-Zellen. Hinweise auf eine unspezifische Zytotoxizität bei den eingesetzten Konzentrationen von max. 1  $\mu\text{M}$  (d.h. einer effektiven Inhibition von KLK4) wurden nicht beobachtet (Swedberg et al., 2011). Eine Untersuchung der Hemmung von KLK4 durch SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> war demnach auch ohne eine Beeinflussung i.S. einer unspezifischen Zytotoxizität von PC3-Zellen durchführbar.

## 2.4 Die proliferationsfördernden Effekte von KLK4 auf Tumorzellen sind von der enzymatischen Aktivität der KLK4 abhängig und lassen sich durch spezifische Inhibition der KLK4 unterdrücken

Wie die Ergebnisse unter C 2.1.3 zeigen, lassen sich durch die Anwendung des KLK4-spezifischen Inhibitors UAMC 1399 die proliferationsfördernden Effekte von KLK4 auf PC3-Zellen über einen Versuchszeitraum von 68 h unterdrücken. Die Unterschiede in den Proliferationsraten sind signifikant, daher sollten die proliferativen Effekte in der enzymatischen Aktivität von KLK4 begründet sein. Mit

dem Inhibitor SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> wurden in dieser Arbeit lediglich Versuche zu Auswirkungen einer Inhibition von KLK4 auf die Expression von CXCL1, jedoch keine Versuche zur Aufhebung der proliferativen Effekte in KLK4-überexprimierenden PC3-Zellen durchgeführt.

DU-145-Zellen, wie auch die hier verwendeten PC3-Zellen, exprimieren KLK4 nicht. Eine Stimulation von DU-145-Zellen mit KLK4 zeigt jedoch ebenfalls proliferationsfördernde Effekte. Als zugrundeliegenden Mechanismus der erhöhten Proliferation bei Stimulation durch KLK4-Expression wird eine Aktivierung der Protease-aktivierten Rezeptoren 1 und 2 (= PAR 1 und 2) und in der Folge eine Aktivierung des ERK1-Signalweges vermutet (Ossovskaya & Bunnett, 2004; Obiezu et al., 2006; Mize et al., 2008; Kalinska et al., 2016). Mize et al. (2008) blockierten die enzymatische Aktivität von KLK4 mit dem unspezifischen Serinprotease-Inhibitor Aprotinin und untersuchten so den Einfluss der KLK4-Aktivität auf die Proliferation der DU-145-Zellen. Auf die (unspezifische) Wirkung des Aprotinins hin blieb der proliferationsfördernde Effekt von KLK4 aus, was mit einer verhinderten Aktivierung von PAR 1 und 2 erklärt wurde. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Aufhebung der proliferativen Effekte bei Inhibition von KLK4 durch den KLK4-spezifischen Inhibitor UAMC 1399 in KLK4-überexprimierenden PC3-Zellen bestätigen die Untersuchungen von Mize et al. (2008).

## **2.5 Die CXCL1-Suppression bei Expression von KLK4 ist abhängig von der enzymatischen Aktivität von KLK4**

Wie unter C 2.2 und C 2.3 gezeigt, lässt sich durch Hemmung der KLK4-Aktivität durch Inhibitoren verschiedener Substanzklassen die Suppression der CXCL1-Expression verringern. Die Effekte der beiden eingesetzten spezifischen KLK4-Inhibitoren UAMC 1399 und SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> fallen hierbei jedoch unterschiedlich aus. SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub>, z.B., vermag die KLK4-Effekte deutlicher aufzuheben. Sehr wahrscheinlich liegt dies an der höheren Stabilität von SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> im Zellkulturmedium und seinem niedrigeren IC<sub>50</sub>-Wert von 0,06 nM (Swedberg et al., 2011) vs. 5 nM bei UAMC 1399 (van Soom et al., 2015). Ein weiterer Grund könnte in einer schlechteren Hemmung von KLK4 durch UAMC 1399 aufgrund einer unzureichenden molekularen Passform dieses Inhibitors liegen. Der vermutete Wirkmechanismus der Diphenyl-Phosphonat-Inhibitoren, zu denen auch UAMC 1399 gehört, deutet zunächst auf eine irreversible Hemmung von KLK4 durch UAMC 1399 hin. Jedoch zeigen Untersuchungen der Inhibitionskinetik verschiedener Diphenyl-Phosphonat-Inhibitoren, dass die reaktiven Molekülbereiche von Inhibitor (hier UAMC 1399) und Enzym (KLK4) nicht immer ausreichend genau aufeinander ausgerichtet werden und daher keine irreversible Hemmung stattfindet (van Soom et al., 2015). Diese Befunde sprechen dafür, dass die Effektivität der KLK4-Hemmung durch UAMC 1399 beeinträchtigt sein könnte und somit eine nur teilweise Aufhebung der KLK4-Effekte auf die CXCL1-Expression bewirkt. Der Vollständigkeit halber sei angemerkt, dass auch SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub>

KLK4 lediglich reversibel hemmt. Sowohl UAMC 1399 als auch SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> sollen durch eine Hemmung der enzymatischen Aktivität von KLK4 eine Abschwächung der KLK4-Effekte auf die Expression von CXCL1 in PC3-Zellen bewirken.

Bisher finden die hier verwendeten spezifischen KLK4-Inhibitoren UAMC 1399 und SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> keine weitverbreitete Anwendung. Auf der Basis von SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> wurde der neuartige, spezifische KLK4-Inhibitor MCoTI-II entwickelt, der im Gegensatz zu SFTI-FCQR Asn<sub>14</sub> in der Lage ist, Zellmembranen zu passieren, und so intrazellulär lokalisierte KLK4-Aktivität inhibiert (Swedberg et al., 2018). Dies ist von besonderem Interesse, da KLK4 auch intrazelluläre Signalwege reguliert, etwa den mTOR-Signalweg. Bei mTOR handelt es sich um eine Serin-/Threonin-Kinase, die Teil eines für die Zellproliferation wichtigen Signalweges ist (Dancey, 2010; Jin et al., 2013).

### **3. Die Expression von KLK4-Mutanten ohne enzymatische Aktivität liefert einen weiteren Hinweis für die Abhängigkeit der CXCL1-Suppression von der enzymatischen Aktivität von KLK4**

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unter C 3.3 (Abb. 29) zeigen, hat die Expression von Mutanten von KLK4 ohne Enzymaktivität einen nur geringen Einfluss auf die CXCL1-Expression. Somit wird bestätigt, dass die enzymatische Aktivität von Wildtyp-KLK4 die Expression von CXCL1 reguliert. Jedoch haben die verschiedenen KLK4-Mutanten eine unterschiedliche Expressionen von CXCL1 zur Folge. Bei Expression von delSP-KLK4 sollte es nicht zur Exozytose eines aktiven Enzyms kommen, da delSP-KLK4 das Signalpeptid fehlt, um aus der Zelle ausgeschleust zu werden. PC3-Zellen zeigen bei Expression von delSP-KLK4 eine verringerte Expression von CXCL1 im Vergleich zur Vektorkontrolle, allerdings fällt die CXCL1-Expression immer noch deutlich höher aus als bei PC3-Zellen, die Wildtyp-KLK4 exprimieren. Ein Grund hierfür könnte darin liegen, dass KLK4 auch bei ausschließlich intrazellulärer Expression Signalwege beeinflussen kann, wie durch Jin et al. (2013) in Bezug auf den mTOR-Signalweg nachgewiesen wurde (D 2.5). In einem weiterführenden Versuch zeigten Jin et al. (2013), dass KLK4 auch bei Expression einer *active-site*-Mutante (analog der in dieser Arbeit verwendeten, durch Alterauge (2014) bereitgestellten S195A-KLK4-Mutante) intrazellulär nachgewiesen werden und Einfluss auf Signalwege nehmen kann.

Während bei Überexpression von Wildtyp-KLK4 in PC3-Zellen die CXCL1-Expression supprimiert wird, liegt die Expression von CXCL1 bei Expression der *active-site*-Mutante S195A-KLK4 etwas über demjenigen der Vektorkontrollzelllinie, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Bezüglich der Überlegung, ob es bei Expression der *active-site*-Mutante S195A-KLK4 zu einem vollständigen Funktionsverlust des Enzyms kommt, geben Arbeiten zu anderen Serinproteasen Hinweise: Versuche am bakteri-

ellen Subtilisin (weitverbreitete bakterielle Enzymgruppe, Namensgebung von *Bacillus subtilis*), welches mit KLK4 den Reaktionsmechanismus der Serinproteasen und die Architektur des aktiven Zentrums teilt, zeigen, dass auch Serinproteasen mit *active-site*-Mutationen im Vergleich zu nicht katalysierten Reaktionen immer noch eine deutlich erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit bewirken. Bei Versuchen durch Carter & Wells (1988) wurde durch ortsspezifische Mutagenese eine Mutante des Subtilisins erzeugt, die den weitgehenden Funktionsverlust des Enzyms zur Folge hatte (Neitzel, 2010). Die Mutation, die zum Funktionsverlust führte, ist identisch mit der in dieser Arbeit verwendeten Serin-zu-Alanin-Mutation von KLK4. Die Versuche ergaben, dass der Reaktionsmechanismus des S221A-Subtilisins zwar um den Faktor  $10^6$  gegenüber dem intakten Enzym verlangsamt, jedoch immer noch um den Faktor  $10^3$  gegenüber der unkatalysierten Reaktion beschleunigt wurde (Carter & Wells, 1988; Neitzel, 2010). Dies bedeutet, dass im Prinzip auch die verwendete *active-site*-Mutante S195A-KLK4 nach wie vor eine relevante Restaktivität aufweisen kann. Indes gestaltet sich der Nachweis tatsächlicher enzymatischer Aktivität von KLK4 im Zellkulturüberstand von Wildtyp-KLK4-überexprimierenden PC3-Zellen schwierig und konnte bisher nicht erbracht werden, wie z.B. Untersuchungen von Alterauge (2014) zeigen. Aus diesem Grund war bisher ein direkter Vergleich der KLK4-Aktivität im Zellkulturüberstand bei Expression von Wildtyp-KLK4 verglichen mit der Expression von KLK4-Mutanten mittels Aktivitätstests nicht möglich. Jedoch zeigen jüngere Untersuchungen durch Silva et al. (2017), dass eine S195A-Mutante der KLK7, welche eine hohe Sequenz- und Strukturhomologie mit KLK4 aufweist, noch über eine Restaktivität von ca. 1 % des muren Wildtypenzym aufweist. Eine noch weitgehendere Einschränkung der Enzymaktivität könnte z.B. durch eine Doppelmutation im aktiven Zentrum erreicht werden (Carter & Wells, 1988; Neitzel, 2010).

## 4. Schlussfolgerungen

### 4.1 Mögliche Einflüsse von KLK4 im genetisch heterogenen Prostatakarzinom

KLK4 wird in frühen Krankheitsstadien des Prostatakarzinoms verstärkt exprimiert, bei der fortgeschrittenen Erkrankung nimmt ihre Expression erneut ab (Schmitt et al., 2013). Bisherige Forschungsergebnisse interpretierten die Funktion dieser Serinprotease beim Prostatakarzinom als promotorigen. Eine Theorie geht davon aus, dass KLK4 über eine Aktivierung der proteaseaktivierten Rezeptoren 1 und 2 proliferationssteigernde Effekte auf die Tumorzellen ausübt (Ramsay et al., 2008). In den jüngsten Untersuchungen von Tse et al. (2020) wurde durch KLK4, im Gegensatz zur bisherigen Einschätzung, eine Verkleinerung der orthotopen (nicht in der Prostata lokalisierten) Tumoren aus PC3-Zellen in Mäusen beobachtet. In früheren Versuchen dagegen zeigte KLK4, z.B. bei Expression durch humane Prostatakarzinomzellen der Zelllinie DU-145, Effekte einer verstärkten Proliferation (Mize et al., 2008). Auch die vorliegende Arbeit lieferte Ergebnisse, die bei Expression

von KLK4 in den Tumorzellen eine erhöhte Proliferation von PC3-Zellen und damit im Hinblick auf die üblichen Eigenschaften maligne entarteter Zellen in Tumoren (z.B. erhöhte Zellteilungsrate) eine protumorigene Wirkung von KLK4 zeigten. Tatsächlich liegen bisher, mit Ausnahme der jüngsten Untersuchungen durch Tse et al. (2020), vor allem Daten aus *in-vitro*-Untersuchungen vor.

Das Prostatakarzinom ist eine Tumorerkrankung mit einer hohen genetischen und epigenetischen Heterogenität, sowohl von Patient zu Patient als auch innerhalb eines Tumors. Dabei existieren parallel Tumorzellklone verschiedener Generationen, die aufgrund ihrer genomischen Instabilität über längere Zeit eine Vielzahl an Mutationen anhäufen können. Hierbei unterscheidet man sog. „*passenger*“- und „*driver*“-Mutationen. Erstere haben keinen bedeutenden Effekt auf das Tumorstadium, während letztere den Tumorzellen einen zusätzlichen Überlebensvorteil gegenüber ihrer Elterngeneration verschaffen, welche diese Mutation noch nicht aufwiesen, z.B. indem sie das Gleichgewicht aus Proliferation und Apoptose weiter zu Gunsten der Proliferation verschieben und damit das Tumorstadium fördern (Lindberg et al., 2013; Brocks et al., 2014; Tolkach & Kristiansen, 2018). Aufgrund der genetischen Vielfalt innerhalb eines einzelnen Tumors, bei der in enger räumlicher Nähe (im Abstand von wenigen Zelldurchmessern) Klone mit sehr unterschiedlicher genetischer Ausstattung und damit auch unterschiedlichem Einfluss einzelner Signalwege auf die tumortypischen Eigenschaften vorliegen (Lindberg et al., 2013; Brocks et al., 2014; Lindberg et al., 2015), ist die kategorische Einschätzung eines Enzyms wie KLK4 oder eines Chemokins wie CXCL1 als pro- oder antitumorigen stets eine vereinfachende Darstellung.

#### **4.2 Erklärungsansätze für die beschriebenen, unterschiedlichen Ergebnisse einer KLK4-Expression in Prostatakarzinomzellen bei *in-vivo*- und *in-vitro*-Experimenten**

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse (pro- vs. antitumorigene Wirkung von KLK4) könnte einerseits in unterschiedlichen epigenetischen Voraussetzungen der verwendeten Tumorzellen (Di Meo et al., 2018) und andererseits im Auftreten unterschiedlicher Splice-Varianten von KLK4 liegen. Splice-Varianten erhöhen die Vielfalt der Genprodukte, auch in jüngster Zeit wurden für verschiedene Kallikreine neue Splice-Varianten entdeckt, die sich z.T. in der Androgensensitivität ihrer Genregulation unterscheiden, oder deren Translation zu einem unvollständigen Peptid führt, da durch ein verschobenes Leseraster ein Stopp-Codon entsteht, was die Translation frühzeitig beendet (Adamopoulos et al., 2019). Für KLK4 sind Splice-Varianten bekannt, denen das Signalpeptid fehlt und die daher nur intrazellulär aktiv sein könnten (Xi et al., 2004). Außerdem wurden für KLK4 Splice-Varianten beschrieben, die unterschiedlich stark durch androgene Hormone reguliert werden (Xi et al., 2004). Für KLK5 wurde eine Splice-Variante entdeckt, bei der das Leseraster der Translation so verschoben ist, dass es nicht zur Ausbildung der katalytischen Triade und damit zu keiner relevanten



enzymatischen Funktion des fertigen Peptids kommen kann (Kurlender et al., 2004; Sotiropoulou et al., 2009). Letztlich gilt es zu bedenken, dass Versuche an Mäusen, wie sie der Arbeit von Tse et al. (2020) zugrundeliegen, i.d.R. Xenograft-Modelle darstellen. Hierbei werden immundefiziente Versuchstiere verwendet. Dies ermöglicht zwar einerseits die Beobachtung des Tumorwachstums im Säugetierorganismus, jedoch ist die Untersuchung unter Ausschluss der Immunreaktionen des Körpers auch nur ein experimentelles Konstrukt, welches nicht unmittelbar mit der Situation im menschlichen Körper verglichen werden kann.

#### **4.3 Grenzen des in der vorliegenden Arbeit durchgeführten experimentellen Ansatzes und mögliche weitere Untersuchungen**

Die experimentelle Expression von KLK4 in PC3-Zellen stellt ein Konstrukt zur isolierten Untersuchung der Effekte von KLK4 dar, da PC3-Zellen KLK4 nicht exprimieren. Aufgrund der neuen Erkenntnisse zum Einfluss von KLK4 auf das Tumorwachstum im Tierversuch (Tse et al., 2020) wäre es von großem Wert, in künftigen Experimenten die Expression von KLK4 auf mRNA- und Proteinebene (z.B. mittels qPCR und ELISA/Western Blot) sowie die Lokalisation von KLK4 im Gewebeschnitt und das Vorkommen unterschiedlicher Splice-Varianten von KLK4 an humanen Tumorpräparaten verschiedener Krankheitsstadien und Malignitätsgrade zu untersuchen. Auf diese Weise könnten wertvolle Informationen gewonnen werden, ob die ursprünglich berichtete verstärkte Expression von KLK4 beim Prostatakarzinom (Schmitt et al., 2013) möglicherweise auf inaktive Splice-Varianten zurückzuführen ist, bzw. ob das Enzym KLK4 im Tumor lediglich intra- oder tatsächlich auch extrazellulär zu finden ist. Außerdem könnte geklärt werden, ob eine Expression von CXCL1 durch tumorassoziierte Fibroblasten möglicherweise auf Prostatakarzinomzellen lokalisierte CXCR2-Rezeptoren stimulieren und damit deren Proliferation steigern könnte. Eine derartige Konstellation würde für den Zusammenhang „KLK4 supprimiert CXCL1 und verringert damit die Tumorzellproliferation“ im Sinne der Publikation von Tse et al. (2020) sprechen, wonach die Expression von KLK4 die Tumorgröße von PC3-Zell-Tumoren im Mausmodell verringert.

Die quantitative Bestimmung des Chemokins CXCL1, wie in der vorliegenden Untersuchung durchgeführt, stellt nur einen kleinen Ausschnitt des gesamten Zytokinnetzwerks dar. Im Zytokinnetzwerk existieren Kreuzaktivierungen verschiedener Zytokine und ihrer Rezeptoren, die den komplexen Interaktionen im Netzwerk der Proteasen ähneln. Für die Effektivität der Zytokin-Signaltransduktion spielt auch die Expression der zugehörigen Rezeptoren (im Falle von CXCL1 der Rezeptor CXCR2) eine wichtige Rolle. Für eine umfassendere Betrachtung der CXCL1-Wirkung würde es naheliegen, die CXCL1-Expression auch in frischen Prostata-Tumorpräparaten und zusätzlich das Expressionslevel des

CXCL1-Rezeptors CXCR2 auf mRNA- und Proteinebene zu bestimmen, z.B. mittels qPCR und ELISA. Anhand von immunhistochemischen Untersuchungen von Tumorfeinschnitten (*tissue micro arrays*) ließe sich die exakte Lokalisation und Verteilung des Chemokinrezeptors CXCR2 im *tumor microenvironment* ermitteln. Dies könnte Informationen dazu liefern, ob CXCL1 nur auf Zellen des Immunsystems, des Bindegewebes und der Endothelien (Blutgefäßzellen) wirkt, oder womöglich auch eine gesteigerte Proliferation der Tumorzellen selbst bewirkt.

Ein wie in der vorliegenden Arbeit verwendetes zweidimensionales Zellkulturmodell kann auch Anhaltspunkte für die Situation *in vivo* bieten. Um der dreidimensionalen Situation des *tumor microenvironment in vivo* experimentell möglichst nahe zu kommen, wurden in vorhergehenden Arbeiten zum Thema, etwa durch Alterauge (2014), sog. Sphäroid-Gel-Techniken verwendet. Im Falle des Gelatine-Methacrylamid-basierten GelMA-Systems wird dabei eine definierte Zellzahl in einem flüssigen Polymer resuspendiert, das schließlich unter UV-Licht polymerisiert und in Lochplatten mit Medium bedeckt inkubiert werden kann. Nach einem definierten Versuchszeitraum kann die Größe der aus den gleichmäßig verteilten Einzelzellen entstandenen Sphäroide (= kugelförmige Zellhaufen im Gel) unter dem Mikroskop bestimmt werden (Kaemmerer et al., 2014). Mit diesem Ansatz konnte Alterauge (2014) unter dem Einfluss der Expression von KLK4 in PC3-Zellen die Ausbildung signifikant vergrößerter Sphäroide gegenüber den Vektorkontrollzellen nachweisen. Im Hinblick auf die vorliegende Arbeit wäre es denkbar, den Einfluss der Expression von KLK4 auf die CXCL1-Expression im dreidimensionalen Modell zu untersuchen. Hierzu könnte mRNA aus Sphäroidzellen extrahiert und anschließend die CXCL1-Expression mittels qPCR im dreidimensionalen Modell auf mRNA-Ebene evaluiert werden. Zudem wäre es möglich, die Konzentration von CXCL1 im Zellkulturüberstand der Sphäroid-Gele mittels ELISA zu bestimmen. Der Vergleich der verschiedenen *in-vitro*-Verfahren mit den Ergebnissen aus der Analyse von Tumorpräparaten und dem Tierversuch könnte zum weiteren Verständnis des KLK4-Einflusses auf die CXCL1-Expression beitragen.

#### **4.4 Zusammenfassende Darstellung der denkbaren pro- bzw. antitumorigenen Effekte von KLK4 im Prostatakarzinom**

Grundsätzlich sind zwei unterschiedliche Verknüpfungen von Tumorerkrankung und Immunantwort denkbar: Einerseits sind Entzündungsreaktion und Aktivierung von Abwehrzellen für die Bekämpfung maligne entarteter Zellen als physiologische Reaktion des Organismus für dessen Überleben unabdingbare Voraussetzungen. Andererseits ist seit längerem bekannt, dass Tumorzellen die Bindegewebs- und Immunzellen des Körpers zu ihrem eigenen Vorteil nutzen (Sahai et al., 2020). So veranlassen Tumorzellen nicht maligne Zellen des Tumorstromas dazu, Wachstumssignale auszusenden, welche die Tumorzellen dazu veranlassen, sich noch schneller zu teilen. Ein Beispiel ist die Sekretion von

VEGF (*vascular endothelial growth factor*) durch tumorassoziierte Fibroblasten (Fukumura et al., 1998; Sahai et al., 2020). Auch bewirken die Tumorzellen im Rahmen der Immunantwort ein Ungleichgewicht der beteiligten Abwehrzellen, sodass im *tumor microenvironment* regulatorische T-Zellen überwiegen, welche die Abwehrreaktion des Körpers bremsen (Butt & Mills, 2014). Eine chronische Entzündung spielt für die Entwicklung zahlreicher Tumorerkrankungen wie auch für den Krankheitsfortschritt eine bedeutende Rolle (Hanahan & Weinberg, 2011; Todorovic-Rakovic, 2021).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern wichtige Hinweise darauf, dass KLK4 sowohl die Immunantwort als auch Entzündungsvorgänge beeinflusst, was für die Tumorigenese und den Krankheitsprogress des Prostatakarzinoms von Bedeutung ist. Durch den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten PAR-Microarray konnten sowohl Argumente für eine pro- (1) als auch für eine antitumorigene Wirkung (2) von KLK4 gesammelt werden.

zu 1.: Bei Expression von KLK4 in PC3-Zellen ließ sich eine Induktion der Genexpression verschiedener Gene nachweisen, die beim Prostatakarzinom mit einer verstärkten Zellproliferation sowie schlechter Prognose in Verbindung gebracht werden:

- IKBKB, die  $\beta$ -Untereinheit einer Kinase des NF $\kappa$ B-Inhibitors, führt gemeinsam mit den anderen Untereinheiten der Kinase zur Aktivierung von NF $\kappa$ B (Shin & Choi, 2019)
- KDR/VEGFR-2 (*vascular endothelial growth factor receptor 2*), ein Wachstumsfaktorrezeptor; dessen Ligand VEGF ist assoziiert mit schlechter Prognose beim Prostatakarzinom (Zhan et al., 2013)
- GATA und ELK1 (Transkriptionsfaktoren), welche Gene regulieren, die für die Ausbildung und Aufrechterhaltung tumortypischer Eigenschaften wie verstärkter Zellproliferation verantwortlich sind (Cisse et al., 2013; Patki et al., 2013).

zu 2.: KLK4 supprimiert die Expression der folgenden Zytokine:

- CXCL1 ist beim Prostatakarzinom assoziiert mit der Aktivierung der Tyrosinkinase Src, Metastasierungsneigung, frühem Tumorrezidiv und schlechter Prognose (Lu et al., 2019)
- CXCL8 ist assoziiert mit schlechter Prognose beim Bronchial-, Kolorektal-, Mamma- und dem Prostatakarzinom sowie dem malignen Melanom (Liu et al., 2016)
- CCL2 wird verstärkt exprimiert sowohl beim frühen als auch beim fortgeschrittenen *high-grade*-Prostatakarzinom (Zhang et al., 2010; Cioni et al., 2018)

- IL1 $\beta$  aktiviert NF $\kappa$ B beim Prostatakarzinom und trägt damit durch die Induktion tumorspezifischer Eigenschaften zur Krankheitsentstehung bei (Longoni et al., 2013)

Alle unter 2. aufgeführten Zytokine gehören zu den proinflammatorischen Zytokinen, was zunächst die Überlegung rechtfertigt, dass KLK4 durch die Suppression ihrer Expression die Immunantwort auf den Tumor negativ beeinflusst und damit eine protumorigene Wirkung entfaltet. Jedoch wird die Rolle zahlreicher proinflammatorischer Zytokine bei Tumorerkrankungen heutzutage vor allem darin gesehen, dass sie außer einer Beeinflussung der Entzündungsvorgänge im Rahmen der Tumorentstehung auch proliferationsfördernde und proangiogenetische Funktionen erfüllen. Schließlich können proinflammatorische Zytokine im *tumor microenvironment* protumorigene Wirkungen entfalten (Argiles et al., 2009; Todorovic-Rakovic, 2021), denn das *tumor microenvironment* ist durch eine Fehlregulation der physiologischen Abwehrfunktionen des Organismus zur Instrumentalisierung für das Tumorwachstum gekennzeichnet (Sahai et al., 2020). Darüber hinaus ist für diese Zytokine eine positive Korrelation mit schlechter Prognose bei verschiedenen Tumorentitäten beschrieben worden (Cheng et al., 2011; Xu et al., 2012; Liu et al., 2015; Liu et al., 2016; Zhang et al., 2019), u.a. beim Prostatakarzinom (Zhang et al., 2010; Longoni et al., 2013; Cioni et al., 2018).

CXCL1 vermag sowohl pro- als auch antitumorigene Einflüsse auszuüben und ist bei einer Reihe von Tumorerkrankungen mit einer negativen Prognose assoziiert, darunter dem hepatozellulären Karzinom, dem Magen-, dem Mamma- und dem Prostatakarzinom sowie dem malignen Melanom (Dhawan et al., 2002; Bachmeier et al., 2008; Cheng et al., 2011; Xu et al., 2012; Han et al., 2016; Hatano et al., 2018; Zhang et al., 2019). Die mittels PAR-*Microarray* nachgewiesene supprimierte Expression von CXCL1 unter KLK4-Expression konnte im Rahmen dieser Arbeit mittels qPCR und ELISA weiter evaluiert werden. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Resultate zeigten eine Suppression der CXCL1-Expression auf mRNA- und auf Proteinebene. Die supprimierte Expression von CXCL1 bei Expression von KLK4 in der PC3-Monolayer-Zellkultur als Ergebnis der vorliegenden Arbeit sowie die Gemeinsamkeiten bzgl. assoziierter Signalwege von KLK4 und CXCL1 wie der MAP-Kinase (Bolitho et al., 2010) deuten darauf hin, dass KLK4 über eine Suppression der Expression von CXCL1 antitumorigene Effekte bewirkt. Die Zusammenschau der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den neuen Erkenntnissen aus den *in-vivo*-Versuchen von Tse et al. (2020) zur Rolle von KLK4 und die in der Literatur überwiegende Einordnung von CXCL1 als protumorigenes Zytokin liefert zahlreiche Argumente für eine antitumorigene Funktion von KLK4. KLK4 könnte demnach über eine verminderte Expression des protumorigenen Chemokins CXCL1 antitumorigene Effekte auf Prostatakarzinomzellen ausüben.

## Literaturverzeichnis

- Abboud, R. T., Nelson, T. N., Jung, B., & Mattman, A. (2011). Alpha1-antitrypsin deficiency: A clinical-genetic overview. *Appl Clin Genet* 4: 55-65
- Adamopoulos, P. G., Kontos, C. K., & Scorilas, A. (2019). Discovery of novel transcripts of the human tissue kallikrein (KLK1) and kallikrein-related peptidase 2 (KLK2) in human cancer cells, exploiting next-generation sequencing technology. *Genomics* 111: 642-652
- Adekoya, T. O., & Richardson, R. M. (2020). Cytokines and chemokines as mediators of prostate cancer metastasis. *Int J Mol Sci* 21: 1-29
- Ahmadzadehfar, H., Albers, P., Bockisch, A., Boegemann, M., Bohme, C., Burchert, W., Dietlein, M., Drzezga, A., Fabry, U., Feldmann, G., Heidenreich, A., Heinzel, A., Herrmann, K., Heyll, A., Hohling, C., Kreuzer, C., Laufer, D., Mengel, R., Mottaghy, F. M., Muller, H. W., Muller, S. C., Ost, E., Rahbar, K., Reifenhauer, W., Schafers, M., Schlenkhoff, C., Schmidt, M., Schmidt-Wolf, I., Wildenhain, C., Zimmer, B., & Essler, M. (2018). [lutetium-177-psma radioligand therapy : Consensus within the framework of gkv-funded care between the university hospitals in Aachen, Bonn, Dusseldorf, Essen, and Cologne and the MDK Nordrhein]. *Urologe A* 57: 709-713
- Alterauge, M. D. (2014). Molekulare und zelluläre Effekte der Kallikrein-related Peptidase 4 auf humane Prostatakarzinomzellen. (Master Thesis), Technische Universität München.
- Argiles, J. M., Busquets, S., Toledo, M., & Lopez-Soriano, F. J. (2009). The role of cytokines in cancer cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care* 3: 263-268
- Arnason, U., Adegoke, J. A., Gullberg, A., Harley, E. H., Janke, A., & Kullberg, M. (2008). Mitogenomic relationships of placental mammals and molecular estimates of their divergences. *Gene* 421: 37-51
- ATCC, & LGC\_Standards. (2016). PC-3 (ATCC® CRL-1435™). Retrieved from <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1435.aspx>
- Augsten, M. (2014). Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. *Front Oncol* 4: 62
- Babaian, R. J., Fritsche, H. A., & Evans, R. B. (1990). Prostate-specific antigen and prostate gland volume: Correlation and clinical application. *J Clin Lab Anal* 4: 135-137
- Bachmeier, B. E., Mohrenz, I. V., Mirisola, V., Schleicher, E., Romeo, F., Hohneke, C., Jochum, M., Nerlich, A. G., & Pfeffer, U. (2008). Curcumin downregulates the inflammatory cytokines CXCL1 and -2 in breast cancer cells via NFkappaB. *Carcinogenesis* 29: 779-789
- Baird, A. M., Gray, S. G., & O'Byrne, K. J. (2011). Epigenetics underpinning the regulation of the CXC (ELR+) chemokines in non-small cell lung cancer. *PLoS One* 6: e14593
- Bardia, A., Platz, E. A., Yegnasubramanian, S., De Marzo, A. M., & Nelson, W. G. (2009). Anti-inflammatory drugs, antioxidants, and prostate cancer prevention. *Curr Opin Pharmacol* 9: 419-426
- Barnes, B., Bertz, J., Buttman-Schweiger, N., Fiebig, J., Jordan, S., & Kraywinkel, K. (2016). Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Berlin: Robert-Koch-Institut.
- Barreau, C., Paillard, L., & Osborne, H. B. (2005). AU-rich elements and associated factors: Are there unifying principles? *Nucleic Acids Res* 33: 7138-7150
- Bausch, H., Bonk, D. M. E., Hanns, W., Hartmann, L. C. E., Hartmann, P. D. R. E., Hemmann, K., Himmler, M., (EDV), R. K., (EDV), M. L., (EDV), R. S., Schmid, D. R., Strub, H., & (EDV), M. W.-B. (1999). Lexikon der Biologie - trypsin. Retrieved from <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/trypsin/67943>
- Beaufort, N., Debela, M., Creutzburg, S., Kellermann, J., Bode, W., Schmitt, M., Pidard, D., & Magdolen, V. (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: 217-222
- Beaufort, N., Plaza, K., Utzschneider, D., Schwarz, A., Burkhart, J. M., Creutzburg, S., Debela, M., Schmitt, M., Ries, C., & Magdolen, V. (2010). Interdependence of kallikrein-related peptidases in proteolytic networks. *Biol Chem* 391: 581-587
- Beer, T. M., Armstrong, A. J., Rathkopf, D. E., Lorient, Y., Sternberg, C. N., Higano, C. S., Iversen, P., Bhattacharya, S., Carles, J., Chowdhury, S., Davis, I. D., de Bono, J. S., Evans, C. P., Fizazi, K., Joshua, A. M., Kim, C. S., Kimura, G., Mainwaring, P., Mansbach, H., Miller, K., Noonberg, S. B., Perabo, F., Phung, D., Saad, F., Scher, H. I., Taplin, M. E., Venner, P. M., Tombal, B., & Investigators, P. (2014). Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *N Engl J Med* 371: 424-433
- Benelli, R., Stigliani, S., Minghelli, S., Carlone, S., & Ferrari, N. (2013). Impact of CXCL1 overexpression on growth and invasion of prostate cancer cell. *Prostate* 73: 941-951
- Benson, M. C., Whang, I. S., Olsson, C. A., McMahon, D. J., & Cooner, W. H. (1992). The use of prostate specific antigen density to enhance the predictive value of intermediate levels of serum prostate specific antigen. *J Urol* 147: 817-821
- Berger, A. P., Deibl, M., Strasak, A., Bektic, J., Pelzer, A. E., Klocker, H., Steiner, H., Fritsche, G., Bartsch, G., & Horninger, W. (2007). Large-scale study of clinical impact of PSA velocity: Long-term PSA kinetics as method of differentiating men with from those without prostate cancer. *Urology* 69: 134-138
- Bhat, I. A., Naykoo, N. A., Qasim, I., Ganie, F. A., Yousuf, Q., Bhat, B. A., Rasool, R., Aziz, S. A., & Shah, Z. A. (2014). Association of interleukin 1 beta (il-1beta) polymorphism with mRNA expression and risk of non small cell lung cancer. *Meta Gene* 2: 123-133
- Black, P. C., Mize, G. J., Karlin, P., Greenberg, D. L., Hawley, S. J., True, L. D., Vessella, R. L., & Takayama, T. K. (2007). Overexpression of protease-activated receptors-1,-2, and-4 (PAR-1, -2, and -4) in prostate cancer. *Prostate* 67: 743-756
- Blackshear, P. J. (2002). Tristetraprolin and other cch tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover. *Biochem Soc Trans* 30: 945-952
- Blow, D. M., Birktoft, J. J., & Hartley, B. S. (1969). Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature* 221: 337-340
- Bode, W., Chen, Z., Bartels, K., Kutzbach, C., Schmidt-Kastner, G., & Bartunik, H. (1983). Refined 2 a x-ray crystal structure of porcine pancreatic kallikrein a, a specific trypsin-like serine proteinase. Crystallization, structure determination, crystallographic refinement, structure and its comparison with bovine trypsin. *J Mol Biol* 164: 237-282
- Boire, A., Covic, L., Agarwal, A., Jacques, S., Sherifi, S., & Kuliopulos, A. (2005). PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell* 120: 303-313
- Bolitho, C., Hahn, M. A., Baxter, R. C., & Marsh, D. J. (2010). The chemokine CXCL1 induces proliferation in epithelial ovarian cancer cells by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Endocr Relat Cancer* 17: 929-940
- Borgono, C. A., & Diamandis, E. P. (2004). The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nat Rev Cancer* 4: 876-890
- Borgono, C. A., Michael, I. P., & Diamandis, E. P. (2004). Human tissue kallikreins: Physiologic roles and applications in cancer. *Mol Cancer Res* 2: 257-280
- Botton, T., Puissant, A., Cheli, Y., Tomic, T., Giuliano, S., Fajas, L., Deckert, M., Ortonne, J. P., Bertolotto, C., Tartare-Deckert, S., Ballotti, R., & Rocchi, S. (2011). Ciglitazone negatively regulates CXCL1 signaling through MITF to suppress melanoma growth. *Cell Death Differ* 18: 109-121
- Boutanaev, A. M., Kalmykova, A. I., Shevelyov, Y. Y., & Nurminsky, D. I. (2002). Large clusters of co-expressed genes in the drosophila genome. *Nature* 420: 666-669
- Brennan, C. M., & Steitz, J. A. (2001). HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci* 58: 266-277

- Brocks, D., Assenov, Y., Minner, S., Bogatyrova, O., Simon, R., Koop, C., Oakes, C., Zucknick, M., Lipka, D. B., Weischenfeldt, J., Feuerbach, L., Cowper-Sal Lari, R., Lupien, M., Brors, B., Korbel, J., Schlomm, T., Tanay, A., Sauter, G., Gerhauser, C., Plass, C., & Project, I. E. O. P. C. (2014). Intratumor DNA methylation heterogeneity reflects clonal evolution in aggressive prostate cancer. *Cell Rep* 8: 798-806
- Brookes, D. E., Zandvliet, D., Watt, F., Russell, P. J., & Molloy, P. L. (1998). Relative activity and specificity of promoters from prostate-expressed genes. *Prostate* 35: 18-26
- Brownell, J. E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G., Roth, S. Y., & Allis, C. D. (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase a: A homolog to yeast GCN5P linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84: 843-851
- Bul, M., Zhu, X., Rannikko, A., Staerman, F., Valdagni, R., Pickles, T., Bangma, C. H., & Roobol, M. J. (2012). Radical prostatectomy for low-risk prostate cancer following initial active surveillance: Results from a prospective observational study. *Eur Urol* 62: 195-200
- Butt, A. Q., & Mills, K. H. (2014). Immunosuppressive networks and checkpoints controlling antitumor immunity and their blockade in the development of cancer immunotherapeutics and vaccines. *Oncogene* 33: 4623-4631
- Calopedos, R. J. S., Chalasani, V., Asher, R., Emmett, L., & Woo, H. H. (2017). Lutetium-177-labelled anti-prostate-specific membrane antigen antibody and ligands for the treatment of metastatic castrate-resistant prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 20: 352-360
- Cancer\_Discovery. (2016). A prostate cancer risk SNP upregulates the tumorigenic lncRNA PCAT1. *Cancer Discov* 6: 1079
- Cao, Y., Huang, H., Wang, Z., & Zhang, G. (2017). The inflammatory CXC chemokines, GROalpha(high), IP-10(low), and MIG(low), in tumor microenvironment can be used as new indicators for non-small cell lung cancer progression. *Immunol Invest* 46: 361-374
- Cao, Y., & Karin, M. (2003). NF-kappaB in mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8: 215-223
- Carter, P., & Wells, J. A. (1988). Dissecting the catalytic triad of a serine protease. *Nature* 332: 564-568
- Chang, A., Yousef, G. M., Jung, K., Rajpert-De Meyts, E., & Diamandis, E. P. (2001). Identification and molecular characterization of five novel kallikrein gene 13 (KLK13; KLK-14) splice variants: Differential expression in the human testis and testicular cancer. *Anticancer Res* 21: 3147-3152
- Chang, M. A., Patel, V., Gwede, M., Morgado, M., Tomasevich, K., Fong, E. L., Farach-Carson, M. C., & Delk, N. A. (2014). IL-1beta induces P62/SQSTM1 and represses androgen receptor expression in prostate cancer cells. *J Cell Biochem* 115: 2188-2197
- Chen, H. T., Tsou, H. K., Tsai, C. H., Kuo, C. C., Chiang, Y. K., Chang, C. H., Fong, Y. C., & Tang, C. H. (2010). Thrombin enhanced migration and mmps expression of human chondrosarcoma cells involves PAR receptor signaling pathway. *J Cell Physiol* 223: 737-745
- Chen, J., Xie, L., Zheng, Y., & Liu, C. (2017). Effects of silenced par-2 on cell proliferation, invasion and metastasis of esophageal cancer. *Oncol Lett* 14: 4115-4121
- Chen, L. C., Wang, L. J., Tsang, N. M., Ojcius, D. M., Chen, C. C., Ouyang, C. N., Hsueh, C., Liang, Y., Chang, K. P., Chen, C. C., & Chang, Y. S. (2012). Tumour inflammasome-derived IL-1beta recruits neutrophils and improves local recurrence-free survival in ebv-induced nasopharyngeal carcinoma. *EMBO Mol Med* 4: 1276-1293
- Cheng, W. L., Wang, C. S., Huang, Y. H., Tsai, M. M., Liang, Y., & Lin, K. H. (2011). Overexpression of CXCL1 and its receptor CXCR2 promote tumor invasion in gastric cancer. *Ann Oncol* 22: 2267-2276
- Chou, R. H., Lin, S. C., Wen, H. C., Wu, C. W., & Chang, W. S. (2011). Epigenetic activation of human kallikrein 13 enhances malignancy of lung adenocarcinoma by promoting n-cadherin expression and laminin degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 409: 442-447

- Christoph, F., Konig, F., Lebentrau, S., Jandrig, B., Krause, H., Strenziok, R., & Schostak, M. (2018). RANKL/RANK/OPG cytokine receptor system: mRNA expression pattern in bph, primary and metastatic prostate cancer disease. *World J Urol* 36: 187-192
- Cioni, B., Nevedomskaya, E., Melis, M. H. M., van Burgsteden, J., Stelloo, S., Hodel, E., Spinozzi, D., de Jong, J., van der Poel, H., de Boer, J. P., Wessels, L. F. A., Zwart, W., & Bergman, A. M. (2018). Loss of androgen receptor signaling in prostate cancer-associated fibroblasts (CAFs) promotes CCL2- and CXCL8-mediated cancer cell migration. *Mol Oncol* 12: 1308-1323
- Cisse, II, Izeddin, I., Causse, S. Z., Boudarene, L., Senecal, A., Muresan, L., Dugast-Darzacq, C., Hajj, B., Dahan, M., & Darzacq, X. (2013). Real-time dynamics of rna polymerase ii clustering in live human cells. *Science* 341: 664-667
- Clements, J. A., Willemsen, N. M., Myers, S. A., & Dong, Y. (2004). The tissue kallikrein family of serine proteases: Functional roles in human disease and potential as clinical biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci* 41: 265-312
- Cleutjens, K. B., van der Korput, H. A., van Eekelen, C. C., van Rooij, H. C., Faber, P. W., & Trapman, J. (1997). An androgen response element in a far upstream enhancer region is essential for high, androgen-regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *Mol Endocrinol* 11: 148-161
- Cleutjens, K. B., van Eekelen, C. C., van der Korput, H. A., Brinkmann, A. O., & Trapman, J. (1996). Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *J Biol Chem* 271: 6379-6388
- Cope, L., Wu, R. C., Shih Ie, M., & Wang, T. L. (2013). High level of chromosomal aberration in ovarian cancer genome correlates with poor clinical outcome. *Gynecol Oncol* 128: 500-505
- Cordeiro, R. S., Scarano, W. R., Campos, S. G., Santos, F. C., Vilamaior, P. S., Goes, R. M., & Taboga, S. R. (2008). Androgen receptor in the mongolian gerbil ventral prostate: Evaluation during different phases of postnatal development and following androgen blockage. *Micron* 39: 1312-1324
- Crawford, E. D. (2004). Hormonal therapy in prostate cancer: Historical approaches. *Rev Urol* 6 Suppl 7: S3-S11
- Cretu, D., Yousef, G. M., Scorilas, A., & Diamanis, E. P. (2012). Genomic structure of the KLK locus Kallikrein-related peptidases, volume 1 - characterization, regulation, and interactions within the protease web. Berlin: De Gruyter.
- D'Andrea, M. R., Derian, C. K., Santulli, R. J., & Andrade-Gordon, P. (2001). Differential expression of protease-activated receptors-1 and -2 in stromal fibroblasts of normal, benign, and malignant human tissues. *Am J Pathol* 158: 2031-2041
- Dancey, J. (2010). mTOR signaling and drug development in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 7: 209-219
- Darmoul, D., Marie, J. C., Devaud, H., Gratio, V., & Laburthe, M. (2001). Initiation of human colon cancer cell proliferation by trypsin acting at protease-activated receptor-2. *Br J Cancer* 85: 772-779
- Darson, M. F., Pacelli, A., Roche, P., Rittenhouse, H. G., Wolfert, R. L., Young, C. Y., Klee, G. G., Tindall, D. J., & Bostwick, D. G. (1997). Human glandular kallikrein 2 (hK2) expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: A novel prostate cancer marker. *Urology* 49: 857-862
- Davie, E. W., & Ratnoff, O. D. (1964). Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 145: 1310-1312
- Day, C. H., Fanger, G. R., Retter, M. W., Hylander, B. L., Penetrante, R. B., Houghton, R. L., Zhang, X., McNeill, P. D., Filho, A. M., Nolasco, M., Badaro, R., Cheever, M. A., Reed, S. G., Dillon, D. C., & Watanabe, Y. (2002). Characterization of KLK4 expression and detection of KLK4-specific antibody in prostate cancer patient sera. *Oncogene* 21: 7114-7120
- Deutsche Krebsgesellschaft. (2018). Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms.



- Dhawan, P., & Richmond, A. (2002). Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma. *J Leukoc Biol* 72: 9-18
- Di Meo, A., Wang, C., Cheng, Y., Diamandis, E. P., & Yousef, G. M. (2018). The miRNA-kallikrein interaction: A mosaic of epigenetic regulation in cancer. *Biol Chem* 399: 973-982
- Doszhan, A., Bektayeva, R., Imanbayeva, N., Galiyeva, A., & Kurmankina, A. (2019). [the role of interleukin 8 / CXCL8 in the immunopathogenesis and carcinogenesis of inflammatory bowel diseases (review)]. *Georgian Med News*: 150-153
- Eckardt, V., Miller, M. C., Blanchet, X., Duan, R., Leberzammer, J., Duchene, J., Soehnlein, O., Megens, R. T., Ludwig, A. K., Dregni, A., Fausner, A., Wichapong, K., Ippel, H., Dijkgraaf, I., Kaltner, H., Doring, Y., Bidzhekov, K., Hackeng, T. M., Weber, C., Gabius, H. J., von Hundelshausen, P., & Mayo, K. H. (2020). Chemokines and galectins form heterodimers to modulate inflammation. *EMBO Rep* 21: e47852
- Elste, A. P., & Petersen, I. (2010). Expression of proteinase-activated receptor 1-4 (PAR 1-4) in human cancer. *J Mol Histol* 41: 89-99
- Emmert-Streib, F. (2012). Personalized medicine: Has it started yet? A reconstruction of the early history. *Front Genet* 3: 313
- Eras, N., Daloglu, F. T., Colak, T., Guler, M., & Akbas, E. (2019). The correlation between IL-1beta-C31T gene polymorphism and susceptibility to breast cancer. *J Breast Cancer* 22: 210-218
- Fedi, P., Tronick, S.R., Aaronson, S.A. (1997). Growth factors. *Cancer Medicine*
- Fernández-González, R., de Dios Hourcade, J., López-Vidriero, I., Benguría, A., Rodríguez De Fonseca, F., Gutiérrez-Adán, A. (2009). Analysis of gene transcription alterations at the blastocyst stage related to the long-term consequences of in vitro culture in mice. *Reproduction* 137
- Fizazi, K. (2013). Nonhormone therapy for metastatic castration-resistant prostate cancer: Chemotherapy, bone-targeted treatments, and others. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*
- Fizazi, K., Tran, N., Fein, L., Matsubara, N., Rodriguez-Antolin, A., Alekseev, B. Y., Ozguroglu, M., Ye, D., Feyerabend, S., Protheroe, A., De Porre, P., Kheoh, T., Park, Y. C., Todd, M. B., Chi, K. N., & Investigators, L. (2017). Abiraterone plus prednisone in metastatic, castration-sensitive prostate cancer. *N Engl J Med* 377: 352-360
- Foteinou, P. T., Calvano, S. E., Lowry, S. F., & Androulakis, I. P. (2009). In silico simulation of corticosteroids effect on an NFKB- dependent physicochemical model of systemic inflammation. *PLoS One* 4: e4706
- Fukumura, D., Xavier, R., Sugiura, T., Chen, Y., Park, E. C., Lu, N., Selig, M., Nielsen, G., Taksir, T., Jain, R. K., & Seed, B. (1998). Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 94: 715-725
- Furlan, A., Vercamer, C., Heliot, L., Wernert, N., Desbiens, X., & Pourtier, A. (2019). ETS-1 drives breast cancer cell angiogenic potential and interactions between breast cancer and endothelial cells. *Int J Oncol* 54: 29-40
- Gao, J., Collard, R. L., Bui, L., Herington, A. C., Nicol, D. L., & Clements, J. A. (2007). Kallikrein 4 is a potential mediator of cellular interactions between cancer cells and osteoblasts in metastatic prostate cancer. *Prostate* 67: 348-360
- Gascard, P., & Tlsty, T. D. (2016). Carcinoma-associated fibroblasts: Orchestrating the composition of malignancy. *Genes Dev* 30: 1002-1019
- Goettig, P., Magdolen, V., & Brandstetter, H. (2010). Natural and synthetic inhibitors of kallikrein-related peptidases (KLKs). *Biochimie* 92: 1546-1567
- Gökkurt, E., & Johann, P.-D. (2014). *Allex - das Kompendium für die zweite ärztliche Prüfung* (2. Auflage). Stuttgart: Thieme Verlag.
- Gravis, G., Fizazi, K., Joly, F., Oudard, S., Priou, F., Esterni, B., Latorzeff, I., Delva, R., Krakowski, I., Laguerre, B., Rolland, F., Theodore, C., Deplanque, G., Ferrero, J. M., Pouessel, D., Mourey, L., Beuzeboc, P., Zanetta, S., Habibian, M., Berdahl, J. F., Dauba, J., Baciuchka, M., Platini, C., Linassier, C., Labourey, J. L., Machiels, J. P., El Kouri, C., Ravaud, A., Suc, E., Eymard, J. C., Hasbini, A., Bousquet, G., & Soulie, M. (2013). Androgen-deprivation therapy alone or with

- docetaxel in non-castrate metastatic prostate cancer (GETUG-AFU 15): A randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 14: 149-158
- Greenberg, D. L., Mize, G. J., & Takayama, T. K. (2003). Protease-activated receptor mediated Rhoalpha signaling and cytoskeletal reorganization in Incap cells. *Biochemistry* 42: 702-709
- Griffith, J. W., Sokol, C. L., & Luster, A. D. (2014). Chemokines and chemokine receptors: Positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol* 32: 659-702
- Grimberg, B. T., Udomsangpetch, R., Xainli, J., McHenry, A., Panichakul, T., Sattabongkot, J., Cui, L., Bockarie, M., Chitnis, C., Adams, J., Zimmerman, P. A., & King, C. L. (2007). Plasmodium vivax invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the duffy binding protein. *PLoS Med* 4: e337
- Grin, B., Loeb, S., Roehl, K., Cooper, P. R., Catalona, W. J., & Helfand, B. T. (2015). A rare 8q24 single nucleotide polymorphism (SNP) predisposes north american men to prostate cancer and possibly more aggressive disease. *BJU Int* 115: 101-105
- Gronberg, H. (2003). Prostate cancer epidemiology. *Lancet* 361: 859-864
- Guo, S., Skala, W., Magdolen, V., Brandstetter, H., & Goettig, P. (2014). Sweetened kallikrein-related peptidases (KLKs): Glycan trees as potential regulators of activation and activity. *Biol Chem* 395: 959-976
- Hallstrom, B. M., Kullberg, M., Nilsson, M. A., & Janke, A. (2007). Phylogenomic data analyses provide evidence that xenarthra and afrotheria are sister groups. *Mol Biol Evol* 24: 2059-2068
- Han, K. Q., Han, H., He, X. Q., Wang, L., Guo, X. D., Zhang, X. M., Chen, J., Zhu, Q. G., Nian, H., Zhai, X. F., & Jiang, M. W. (2016). Chemokine CXCL1 may serve as a potential molecular target for hepatocellular carcinoma. *Cancer Med* 5: 2861-2871
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144: 646-674
- Hankey, W., Chen, Z., & Wang, Q. (2020). Shaping chromatin states in prostate cancer by pioneer transcription factors. *Cancer Res* 80: 2427-2436
- Hao, Q., Vadgama, J. V., & Wang, P. (2020). Ccl2/ccr2 signaling in cancer pathogenesis. *Cell Commun Signal* 18: 82
- Harvey, T. J., Hooper, J. D., Myers, S. A., Stephenson, S. A., Ashworth, L. K., & Clements, J. A. (2000). Tissue-specific expression patterns and fine mapping of the human kallikrein (KLK) locus on proximal 19q13.4. *J Biol Chem* 275: 37397-37406
- Hatano, T., Yashiro, M., Fujikawa, H., & Motomura, H. (2018). C-X-C motif ligand 1 (CXCL1) from melanoma cells down-regulates the invasion of their metastatic melanoma cells. *Oncotarget* 9: 31090-31097
- Hayward, S. W., Rosen, M. A., & Cunha, G. R. (1997). Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *Br J Urol* 79 Suppl 2: 18-26
- Heinrich, P., Müller, M., & Graeve, L. (2014). *Löffler Petrides - Biochemie und Pathobiochemie* (9. Auflage). Berlin - Heidelberg: Springer Verlag.
- Henriksen, G., Bristol, K., Bruland, O. S., Fodstad, O., & Larsen, R. H. (2002). Significant antitumor effect from bone-seeking, alpha-particle-emitting (223)Ra demonstrated in an experimental skeletal metastases model. *Cancer Res* 62: 3120-3125
- Henriksen, G., Fisher, D. R., Roeske, J. C., Bruland, O. S., & Larsen, R. H. (2003). Targeting of osseous sites with alpha-emitting 223Ra: Comparison with the beta-emitter 89Sr in mice. *J Nucl Med* 44: 252-259
- Horne, K., & Woolley, I. J. (2009). Shedding light on DARC: The role of the duffy antigen/receptor for chemokines in inflammation, infection and malignancy. *Inflamm Res* 58: 431-435
- Huggins, C., & Hodges, C. V. (2002). Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. *J Urol* 168: 9-12
- Imagawa, S., Nakano, Y., Obara, N., Suzuki, N., Doi, T., Kodama, T., Nagasawa, T., & Yamamoto, M. (2003). A gata-specific inhibitor (k-7174) rescues anemia induced by IL-1beta, TNF-alpha, or L-NMMA. *FASEB J* 17: 1742-1744

- Ishihara, H., Connolly, A. J., Zeng, D., Kahn, M. L., Zheng, Y. W., Timmons, C., Tram, T., & Coughlin, S. R. (1997). Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* 386: 502-506
- Ishii, K., Takahashi, S., Sugimura, Y., & Watanabe, M. (2018). Role of stromal paracrine signals in proliferative diseases of the aging human prostate. *J Clin Med* 7
- Iversen, P., Johansson, J. E., Lodding, P., Kylmala, T., Lundmo, P., Klarskov, P., Tammela, T. L., Tasdemir, I., Morris, T., Armstrong, J., & Scandinavian Prostate Cancer, G. (2006). Bicalutamide 150 mg in addition to standard care for patients with early non-metastatic prostate cancer: Updated results from the scandinavian prostate cancer period group-6 study after a median follow-up period of 7.1 years. *Scand J Urol Nephrol* 40: 441-452
- James, N. D., de Bono, J. S., Spears, M. R., Clarke, N. W., Mason, M. D., Dearnaley, D. P., Ritchie, A. W. S., Amos, C. L., Gilson, C., Jones, R. J., Matheson, D., Millman, R., Attard, G., Chowdhury, S., Cross, W. R., Gillissen, S., Parker, C. C., Russell, J. M., Berthold, D. R., Brawley, C., Adab, F., Aung, S., Birtle, A. J., Bowen, J., Brock, S., Chakraborti, P., Ferguson, C., Gale, J., Gray, E., Hingorani, M., Hoskin, P. J., Lester, J. F., Malik, Z. I., McKinna, F., McPhail, N., Money-Kyrle, J., O'Sullivan, J., Parikh, O., Protheroe, A., Robinson, A., Srihari, N. N., Thomas, C., Wagstaff, J., Wylie, J., Zarkar, A., Parmar, M. K. B., Sydes, M. R., & Investigators, S. (2017). Abiraterone for prostate cancer not previously treated with hormone therapy. *N Engl J Med* 377: 338-351
- James, N. D., Sydes, M. R., Clarke, N. W., Mason, M. D., Dearnaley, D. P., Spears, M. R., Ritchie, A. W., Parker, C. C., Russell, J. M., Attard, G., de Bono, J., Cross, W., Jones, R. J., Thalmann, G., Amos, C., Matheson, D., Millman, R., Alzouebi, M., Beesley, S., Birtle, A. J., Brock, S., Cathomas, R., Chakraborti, P., Chowdhury, S., Cook, A., Elliott, T., Gale, J., Gibbs, S., Graham, J. D., Hetherington, J., Hughes, R., Laing, R., McKinna, F., McLaren, D. B., O'Sullivan, J. M., Parikh, O., Peedell, C., Protheroe, A., Robinson, A. J., Srihari, N., Srinivasan, R., Staffurth, J., Sundar, S., Tolan, S., Tsang, D., Wagstaff, J., Parmar, M. K., & investigators, S. (2016). Addition of docetaxel, zoledronic acid, or both to first-line long-term hormone therapy in prostate cancer (stampede): Survival results from an adaptive, multiarm, multistage, platform randomised controlled trial. *Lancet* 387: 1163-1177
- Jin, Y., Qu, S., Tesikova, M., Wang, L., Kristian, A., Maelandsmo, G. M., Kong, H., Zhang, T., Jeronimo, C., Teixeira, M. R., Yuca, E., Tekedereli, I., Gorgulu, K., Alpay, N., Sood, A. K., Lopez-Berestein, G., Danielsen, H. E., Ozpolat, B., & Saatcioglu, F. (2013). Molecular circuit involving KLK4 integrates androgen and mtor signaling in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E2572-2581
- Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A., Hentschel, S., Luttmann, S., & Stegmaier, C. (2015). *Krebs in Deutschland*. Berlin: Robert-Koch-Institut <http://www.krebsdaten.de>.
- Kabasakal, L., Toklu, T., Yeyin, N., Demirci, E., Abuqbeitah, M., Ocak, M., Aygun, A., Karayel, E., Pehlivanoglu, H., & Alan Selcuk, N. (2017). Lu-177-PSMA-617 prostate-specific membrane antigen inhibitor therapy in patients with castration-resistant prostate cancer: Stability, bio-distribution and dosimetry. *Mol Imaging Radionucl Ther* 26: 62-68
- Kaemmerer, E., Melchels, F. P., Holzapfel, B. M., Meckel, T., Hutmacher, D. W., & Loessner, D. (2014). Gelatine methacrylamide-based hydrogels: An alternative three-dimensional cancer cell culture system. *Acta Biomater* 10: 2551-2562
- Kalinska, M., Meyer-Hoffert, U., Kantyka, T., & Potempa, J. (2016). Kallikreins - the melting pot of activity and function. *Biochimie* 122: 270-282
- Kantoff, P. W., Higano, C. S., Shore, N. D., Berger, E. R., Small, E. J., Penson, D. F., Redfern, C. H., Ferrari, A. C., Dreicer, R., Sims, R. B., Xu, Y., Frohlich, M. W., Schellhammer, P. F., & Investigators, I. S. (2010). Sipuleucel-t immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 363: 411-422
- Kappelhoff, R., Puente, X. S., Wilson, C. H., Seth, A., Lopez-Otin, C., & Overall, C. M. (2017). Overview of transcriptomic analysis of all human proteases, non-proteolytic homologs and inhibitors: Organ, tissue and ovarian cancer cell line expression profiling of the human protease

- degradome by the clip-chip DNA microarray. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864: 2210-2219
- Kaushal, V., Kohli, M., Dennis, R. A., Siegel, E. R., Chiles, W. W., & Mukunyadzi, P. (2006). Thrombin receptor expression is upregulated in prostate cancer. *Prostate* 66: 273-282
- Kawada, M., Inoue, H., Usami, I., Takamoto, K., Masuda, T., Yamazaki, Y., & Ikeda, D. (2006). Establishment of a highly tumorigenic LN-CaP cell line having inflammatory cytokine resistance. *Cancer Lett* 242: 46-52
- Keil, J. (2014). *Allex - das Kompendium für die zweite ärztliche Prüfung (2. Auflage)*. Stuttgart: Thieme Verlag.
- Khan, S., Lopez-Dee, Z., Kumar, R., & Ling, J. (2013). Activation of NF $\kappa$ B is a novel mechanism of pro-survival activity of glucocorticoids in breast cancer cells. *Cancer Lett* 337: 90-95
- Koistinen, H., & Stenman, U.-H. (2012). PSA (prostate-specific antigen) and other kallikrein-related peptidases in prostate cancer. *Kallikrein-related peptidases, volume 2 - novel cancer-related biomarkers*. Berlin: DeGruyter
- Kotyza, J. (2012). Interleukin-8 (cxcl8) in tumor associated non-vascular extracellular fluids: Its diagnostic and prognostic values. A review. *Int J Biol Markers* 27: 169-178
- Koumandou, V. L., & Scorilas, A. (2013). Evolution of the plasma and tissue kallikreins, and their alternative splicing isoforms. *PLoS One* 8: e68074
- Kovarik, P., Ebner, F., & Sedlyarov, V. (2017). Posttranscriptional regulation of cytokine expression. *Cytokine* 89: 21-26
- Kryza, T., Silva, L. M., Bock, N., Fuhrman-Luck, R. A., Stephens, C. R., Gao, J., Samaratunga, H., Australian Prostate Cancer, B., Lawrence, M. G., Hooper, J. D., Dong, Y., Risbridger, G. P., & Clements, J. A. (2017). Kallikrein-related peptidase 4 induces cancer-associated fibroblast features in prostate-derived stromal cells. *Mol Oncol* 11: 1307-1329
- Kurlender, L., Yousef, G. M., Memari, N., Robb, J. D., Michael, I. P., Borgono, C., Katsaros, D., Stephan, C., Jung, K., & Diamandis, E. P. (2004). Differential expression of a human kallikrein 5 (KLK5) splice variant in ovarian and prostate cancer. *Tumour Biol* 25: 149-156
- Le Brun, G., Aubin, P., Soliman, H., Ropiquet, F., Villette, J. M., Berthon, P., Creminon, C., Cussenot, O., & Fiet, J. (1999). Upregulation of endothelin 1 and its precursor by IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and TGF- $\beta$  in the PC3 human prostate cancer cell line. *Cytokine* 11: 157-162
- Lexikon der Biologie. (1999). Heidelberg: Spektrum AkademischerVerlag.
- Li, Goyal, J., Dhar, S., Dimri, G., Evron, E., Sukumar, S., Wazer, D. E., & Band, V. (2001). CpG methylation as a basis for breast tumor-specific loss of NES1/kallikrein 10 expression. *Cancer Res* 61: 8014-8021
- Liao, H. T., Li, T. H., Chen, C. H., Chen, H. A., Chen, W. S., Lai, C. C., Chou, C. T., & Tsai, C. Y. (2019). Janus kinase-1 and 3 in ankylosing spondylitis. *J Formos Med Assoc* 118: 134-141
- Lin, C., Majoor, C. J., Roelofs, J. J., de Kruif, M. D., Horlings, H. M., Borensztajn, K., & Spek, C. A. (2017). Potential importance of protease activated receptor (PAR)-1 expression in the tumor stroma of non-small-cell lung cancer. *BMC Cancer* 17: 113
- Lindberg, J., Klevebring, D., Liu, W., Neiman, M., Xu, J., Wiklund, P., Wiklund, F., Mills, I. G., Egevad, L., & Gronberg, H. (2013). Exome sequencing of prostate cancer supports the hypothesis of independent tumour origins. *Eur Urol* 63: 347-353
- Lindberg, J., Kristiansen, A., Wiklund, P., Gronberg, H., & Egevad, L. (2015). Tracking the origin of metastatic prostate cancer. *Eur Urol* 67: 819-822
- Liu, L., Li, L., Xu, L., Yan, J., Zhen, Z. J., Ji, Y., Liu, C. Q., Lau, W. Y., Zheng, L., & Xu, J. (2015). CXCR2-CXCL1 axis is correlated with neutrophil infiltration and predicts a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 34: 129
- Liu, Q., Li, A., Tian, Y., Wu, J. D., Liu, Y., Li, T., Chen, Y., Han, X., & Wu, K. (2016). The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 31: 61-71
- Liu, Y., Hu, Y., Zhang, M., Jiang, R., & Liang, C. (2018). Polymorphisms in ERCC2 and ERCC5 and risk of prostate cancer: A meta-analysis and systematic review. *J Cancer* 9: 2786-2794

- Löffler, G., Petrides, P., & Heinrich, P. (2007a). *Biochemie und Pathobiochemie; Kapitel 3: Proteine* (8. Auflage). Hamburg: Springer Verlag
- Löffler, G., Petrides, P., & Heinrich, P. (2007b). *Biochemie und Pathobiochemie; Kapitel 4: Bioenergetik und Enzymologie* (8. Auflage). Hamburg: Springer Verlag
- Löffler, G., Petrides, P., & Heinrich, P. (2007c). *Biochemie und Pathobiochemie; Kapitel 5: Nukleotide und Nucleinsäuren* (8. Auflage). Hamburg: Springer Verlag
- Löffler, G., Petrides, P., & Heinrich, P. (2007d). *Biochemie und Pathobiochemie; Kapitel 29: Blut* (8. Auflage). Hamburg: Springer Verlag
- Longoni, N., Sarti, M., Albino, D., Civenni, G., Malek, A., Ortelli, E., Pinton, S., Mello-Grand, M., Ostano, P., D'Ambrosio, G., Sessa, F., Garcia-Escudero, R., Thalmann, G. N., Chiorino, G., Catapano, C. V., & Carbone, G. M. (2013). ETS transcription factor ESE1/ELF3 orchestrates a positive feedback loop that constitutively activates NF-kappaB and drives prostate cancer progression. *Cancer Res* 73: 4533-4547
- Lu, Y., Chen, Q., Corey, E., Xie, W., Fan, J., Mizokami, A., & Zhang, J. (2009). Activation of MCP-1/CCR2 axis promotes prostate cancer growth in bone. *Clin Exp Metastasis* 26: 161-169
- Lu, Y., Dong, B., Xu, F., Xu, Y., Pan, J., Song, J., Zhang, J., Huang, Y., & Xue, W. (2019). CXCL1-LCN2 paracrine axis promotes progression of prostate cancer via the Src activation and epithelial-mesenchymal transition. *Cell Commun Signal* 17: 118
- Lu, Y., Papagerakis, P., Yamakoshi, Y., Hu, J. C., Bartlett, J. D., & Simmer, J. P. (2008). Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. *Biol Chem* 389: 695-700
- MacArthur, J., Bowler, E., Cerezo, M., Gil, L., Hall, P., Hastings, E., Junkins, H., McMahon, A., Milano, A., Morales, J., Pendlington, Z. M., Welter, D., Burdett, T., Hindorff, L., Flicek, P., Cunningham, F., & Parkinson, H. (2017). The new NHGRI-EBI catalog of published genome-wide association studies (GWAS catalog). *Nucleic Acids Res* 45: D896-D901
- Magdolen, V., Sommerhoff, C. P., Fritz, H., & Schmitt, M. (2012). Introduction to volume 1 Kallikrein-related peptidases, volume 1 - characterization, regulation, and interactions within the protease web. Berlin: DeGruyter.
- Martinez-Reza, I., Diaz, L., Barrera, D., Segovia-Mendoza, M., Pedraza-Sanchez, S., Soca-Chafre, G., Larrea, F., & Garcia-Becerra, R. (2019). Calcitriol inhibits the proliferation of triple-negative breast cancer cells through a mechanism involving the proinflammatory cytokines IL-1beta and TNF-alpha. *J Immunol Res* 2019: 6384278
- Mason, S. D., & Joyce, J. A. (2011). Proteolytic networks in cancer. *Trends Cell Biol* 21: 228-237
- Matsumura, M., Bhatt, A. S., Andress, D., Clegg, N., Takayama, T. K., Craik, C. S., & Nelson, P. S. (2005). Substrates of the prostate-specific serine protease prostase/KLK4 defined by positional-scanning peptide libraries. *Prostate* 62: 1-13
- Mbeunkui, F., & Johann, D. J., Jr. (2009). Cancer and the tumor microenvironment: A review of an essential relationship. *Cancer Chemother Pharmacol* 63: 571-582
- McAuley, J. R., Bailey, K. M., Ekambaram, P., Klei, L. R., Kang, H., Hu, D., Freeman, T. J., Concel, V. J., Hubel, N. E., Lee, J. L., Klei, H. B., Cheng, J., Sekar, P., Bridwell, R. E., Covic, L., Lucas, P. C., & McAllister-Lucas, L. M. (2019). MALT1 is a critical mediator of PAR1-driven NF-kappaB activation and metastasis in multiple tumor types. *Oncogene* 38: 7384-7398
- McDonald, J. T., Farnworth, M., & Liu, Z. (2017). Cancer and the healthy immigrant effect: A statistical analysis of cancer diagnosis using a linked census-cancer registry administrative database. *BMC Public Health* 17: 296
- McLoed, A. G., Sherrill, T. P., Cheng, D. S., Han, W., Saxon, J. A., Gleaves, L. A., Wu, P., Polosukhin, V. V., Karin, M., Yull, F. E., Stathopoulos, G. T., Georgoulas, V., Zaynagetdinov, R., & Blackwell, T. S. (2016). Neutrophil-derived IL-1beta impairs the efficacy of NF-kappaB inhibitors against lung cancer. *Cell Rep* 16: 120-132
- Michael, I. P., Kurlender, L., Memari, N., Yousef, G. M., Du, D., Grass, L., Stephan, C., Jung, K., & Diamandis, E. P. (2005). Intron retention: A common splicing event within the human kallikrein gene family. *Clin Chem* 51: 506-515

- Michalaki, V., Syrigos, K., Charles, P., & Waxman, J. (2004). Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. *Br J Cancer* 90: 2312-2316
- Minegishi, N., Morita, S., Minegishi, M., Tsuchiya, S., Konno, T., Hayashi, N., & Yamamoto, M. (1997). Expression of gata transcription factors in myelogenous and lymphoblastic leukemia cells. *Int J Hematol* 65: 239-249
- Miyake, M., Lawton, A., Goodison, S., Urquidi, V., & Rosser, C. J. (2014). Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1) protein expression is increased in high-grade prostate cancer. *Pathol Res Pract* 210: 74-78
- Mize, G. J., Wang, W., & Takayama, T. K. (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: 1043-1051
- Nair, B., Wilt, T., MacDonald, R., & Rutks, I. (2002). Early versus deferred androgen suppression in the treatment of advanced prostatic cancer. *Cochrane Database Syst Rev*: CD003506
- Neitzel, J. J. (2010). Enzyme catalysis: The serine proteases. *Nature Education*
- Nemesure, B., Wu, S. Y., Hennis, A., & Leske, M. C. (2015). Distribution of duffy antigen receptor for chemokines (DARC) and risk of prostate cancer in barbados, west indies. *J Immigr Minor Health* 17: 679-683
- Nieschlag, E. (2008). *Physiologie; Kapitel 17: Reproduktion (5. Auflage)*. München: Verlag Urban & Fischer
- Nikolaev, S., Montoya-Burgos, J. I., Margulies, E. H., Program, N. C. S., Rougemont, J., Nyffeler, B., & Antonarakis, S. E. (2007). Early history of mammals is elucidated with the encode multiple species sequencing data. *PLoS Genet* 3: e2
- Nunez-Hernandez, D. M., Felix-Portillo, M., Peregrino-Uriarte, A. B., & Yepiz-Plascencia, G. (2018). Cell cycle regulation and apoptosis mediated by p53 in response to hypoxia in hepatopancreas of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Chemosphere* 190: 253-259
- O'Shea, J. J., & Murray, P. J. (2008). Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* 28: 477-487
- O'Sullivan, L. A., Liongue, C., Lewis, R. S., Stephenson, S. E., & Ward, A. C. (2007). Cytokine receptor signaling through the JAK-STAT-SOCS pathway in disease. *Mol Immunol* 44: 2497-2506
- Obiezu, C. V., Michael, I. P., Levesque, M. A., & Diamandis, E. P. (2006). Human kallikrein 4: Enzymatic activity, inhibition, and degradation of extracellular matrix proteins. *Biol Chem* 387: 749-759
- Ossovskaya, V. S., & Bunnett, N. W. (2004). Protease-activated receptors: Contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 84: 579-621
- Parker, C., Nilsson, S., Heinrich, D., Helle, S. I., O'Sullivan, J. M., Fossa, S. D., Chodacki, A., Wiechno, P., Logue, J., Seke, M., Widmark, A., Johannessen, D. C., Hoskin, P., Bottomley, D., James, N. D., Solberg, A., Syndikus, I., Kliment, J., Wedel, S., Boehmer, S., Dall'Oglio, M., Franzen, L., Coleman, R., Vogelzang, N. J., O'Bryan-Tear, C. G., Staudacher, K., Garcia-Vargas, J., Shan, M., Bruland, O. S., Sartor, O., & Investigators, A. (2013). Alpha emitter Radium-223 and survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* 369: 213-223
- Partin, A. W., Catalona, W. J., Southwick, P. C., Subong, E. N., Gasiot, G. H., & Chan, D. W. (1996). Analysis of percent free prostate-specific antigen (PSA) for prostate cancer detection: Influence of total PSA, prostate volume, and age. *Urology* 48: 55-61
- Patki, M., Chari, V., Sivakumaran, S., Gonit, M., Trumbly, R., & Ratnam, M. (2013). The ETS domain transcription factor ELK1 directs a critical component of growth signaling by the androgen receptor in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 288: 11047-11065
- Pavlopoulou, A., Pampalakis, G., Michalopoulos, I., & Sotiropoulou, G. (2010). Evolutionary history of tissue kallikreins. *PLoS One* 5: e13781
- Pesu, M., Laurence, A., Kishore, N., Zwillich, S. H., Chan, G., & O'Shea, J. J. (2008). Therapeutic targeting of janus kinases. *Immunol Rev* 223: 132-142
- Pranjol, M. Z. I., Gutowski, N. J., Hannemann, M., & Whatmore, J. L. (2018). Cathepsin d non-proteolytically induces proliferation and migration in human omental microvascular

- endothelial cells via activation of the ERK1/2 and PI3K/Akt pathways. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1865: 25-33
- Prassas, I., Eissa, A., Poda, G., & Diamandis, E. P. (2015). Unleashing the therapeutic potential of human kallikrein-related serine proteases. *Nat Rev Drug Discov* 14: 183-202
- Puente, X. S., Sanchez, L. M., Overall, C. M., & Lopez-Otin, C. (2003). Human and mouse proteases: A comparative genomic approach. *Nat Rev Genet* 4: 544-558
- Puhr, M., De Marzo, A., Isaacs, W., Lucia, M. S., Sfanos, K., Yegnasubramanian, S., & Culig, Z. (2016). Inflammation, microbiota, and prostate cancer. *Eur Urol Focus* 2: 374-382
- Qian, N., Chen, X., Han, S., Qiang, F., Jin, G., Zhou, X., Dong, J., Wang, X., Shen, H., & Hu, Z. (2010). Circulating IL-1beta levels, polymorphisms of IL-1b, and risk of cervical cancer in chinese women. *J Cancer Res Clin Oncol* 136: 709-716
- Quanjun, D., Qingyu, Z., Qiliang, Z., Liqun, X., Jinmei, C., Ziquan, L., & Shike, H. (2016). Effect and mechanism of PAR-2 on the proliferation of esophageal cancer cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 20: 4688-4696
- Queiroz, K. C., Shi, K., Duitman, J., Aberson, H. L., Wilink, J. W., van Noesel, C. J., Richel, D. J., & Spek, C. A. (2014). Protease-activated receptor-1 drives pancreatic cancer progression and chemoresistance. *Int J Cancer* 135: 2294-2304
- Quesada, V., Ordonez, G. R., Sanchez, L. M., Puente, X. S., & Lopez-Otin, C. (2009). The degradome database: Mammalian proteases and diseases of proteolysis. *Nucleic Acids Res* 37: D239-243
- Raman, D., Baugher, P. J., Thu, Y. M., & Richmond, A. (2007). Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Lett* 256: 137-165
- Ramsay, A. J., Dong, Y., Hunt, M. L., Linn, M., Samaratunga, H., Clements, J. A., & Hooper, J. D. (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: 12293-12304
- Rawlings, N. D., Salvesen, G. (2013). *Handbook of proteolytic enzymes*. Cambridge: Academic Press.
- Rebe, C., & Ghiringhelli, F. (2020). Interleukin-1beta and cancer. *Cancers* 12: 1791
- Renan, M. J. (1993). How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog* 7: 139-146
- Rhodes, D. R., Yu, J., Shanker, K., Deshpande, N., Varambally, R., Ghosh, D., Barrette, T., Pandey, A., & Chinnaiyan, A. M. (2004). Oncomine: A cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia* 6: 1-6
- Roigas, J., & Krege, S. (2016). Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Dagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakzinoms. Essen.
- Ryan, C. J., Smith, M. R., de Bono, J. S., Molina, A., Logothetis, C. J., de Souza, P., Fizazi, K., Mainwaring, P., Piulats, J. M., Ng, S., Carles, J., Mulders, P. F., Basch, E., Small, E. J., Saad, F., Schrijvers, D., Van Poppel, H., Mukherjee, S. D., Suttman, H., Gerritsen, W. R., Flaig, T. W., George, D. J., Yu, E. Y., Efstathiou, E., Pantuck, A., Winkquist, E., Higano, C. S., Taplin, M. E., Park, Y., Kheoh, T., Griffin, T., Scher, H. I., Rathkopf, D. E., & Investigators, C.-A.-. (2013). Abiraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy. *N Engl J Med* 368: 138-148
- Sahai, E., Astsaturov, I., Cukierman, E., DeNardo, D. G., Egeblad, M., Evans, R. M., Fearon, D., Greten, F. R., Hingorani, S. R., Hunter, T., Hynes, R. O., Jain, R. K., Janowitz, T., Jorgensen, C., Kimmelman, A. C., Kolonin, M. G., Maki, R. G., Powers, R. S., Pure, E., Ramirez, D. C., Scherz-Shouval, R., Sherman, M. H., Stewart, S., Tlsty, T. D., Tuveson, D. A., Watt, F. M., Weaver, V., Weeraratna, A. T., & Werb, Z. (2020). A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer* 20: 174-186
- Sanofi Genzyme. (2019). *Fachinformation Taxotere*
- Scheidereit, C., Geisse, S., Westphal, H. M., & Beato, M. (1983). The glucocorticoid receptor binds to defined nucleotide sequences near the promoter of mouse mammary tumour virus. *Nature* 304: 749-752

- Schmitt, M., Magdolen, V., Yang, F., Kiechle, M., Bayani, J., Yousef, G. M., Scorilas, A., Diamandis, E. P., & Dorn, J. (2013). Emerging clinical importance of the cancer biomarkers kallikrein-related peptidases (KLK) in female and male reproductive organ malignancies. *Radiol Oncol* 47: 319-329
- Schmitz, S. (2009). *Zellkultur*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Semjonow, A., Hamm, M., Rathert, P., & Hertle, L. (1994). Prostate-specific antigen corrected for prostate volume improves differentiation of benign prostatic hyperplasia and organ-confined prostatic cancer. *Br J Urol* 73: 538-543
- Shariat, S. F., Semjonow, A., Lilja, H., Savage, C., Vickers, A. J., & Bjartell, A. (2011). Tumor markers in prostate cancer i: Blood-based markers. *Acta Oncol* 50 Suppl 1: 61-75
- Shaw, J. L., & Diamandis, E. P. (2007). Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. *Clin Chem* 53: 1423-1432
- Shin, C. H., & Choi, D. S. (2019). Essential roles for the non-canonical IkappaB kinases in linking inflammation to cancer, obesity, and diabetes. *Cells* 8: 178
- Shuai, K., & Liu, B. (2003). Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol* 3: 900-911
- Siddharth, J. M., & Vithal, M. K. (2019). Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR-2)/KDR inhibitors: Medicinal chemistry perspective. *Medicine in Drug Discovery*
- Sidiropoulos, M., Pampalakis, G., Sotiropoulou, G., Katsaros, D., & Diamandis, E. P. (2005). Downregulation of human kallikrein 10 (KLK10/NES1) by CpG island hypermethylation in breast, ovarian and prostate cancers. *Tumour Biol* 26: 324-336
- Siegel, D. A., O'Neil, M. E., Richards, T. B., Dowling, N. F., & Weir, H. K. (2020). Prostate cancer incidence and survival, by stage and race/ethnicity - united states, 2001-2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 69: 1473-1480
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*
- Silva, L. M., Stoll, T., Kryza, T., Stephens, C. R., Hastie, M. L., Irving-Rodgers, H. F., Dong, Y., Gorman, J. J., & Clements, J. A. (2017). Mass spectrometry-based determination of kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) cleavage preferences and subsite dependency. *Sci Rep* 7: 6789
- Skala, W., Utschneider, D. T., Magdolen, V., Debela, M., Guo, S., Craik, C. S., Brandstetter, H., & Goettig, P. (2014). Structure-function analyses of human kallikrein-related peptidase 2 establish the 99-loop as master regulator of activity. *J Biol Chem* 289: 34267-34283
- Sotiropoulou, G., Pampalakis, G., & Diamandis, E. P. (2009). Functional roles of human kallikrein-related peptidases. *J Biol Chem* 284: 32989-32994
- Span, P. N., Manders, P., Heuvel, J. J., Thomas, C. M., Bosch, R. R., Beex, L. V., & Sweep, C. G. (2002). Expression of the transcription factor ETS-1 is an independent prognostic marker for relapse-free survival in breast cancer. *Oncogene* 21: 8506-8509
- Stoller, J. K., & Aboussouan, L. S. (2005). Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet* 365: 2225-2236
- Stroud, R. M. (1974). A family of protein-cutting proteins. *Sci Am* 231: 74-88
- Studer, U. E., Whelan, P., Albrecht, W., Casselman, J., de Reijke, T., Hauri, D., Loidl, W., Isorna, S., Sundaram, S. K., Debois, M., & Collette, L. (2006). Immediate or deferred androgen deprivation for patients with prostate cancer not suitable for local treatment with curative intent: European organisation for research and treatment of cancer (EORTC) trial 30891. *J Clin Oncol* 24: 1868-1876
- Swedberg, J. E., de Veer, S. J., Sit, K. C., Reboul, C. F., Buckle, A. M., & Harris, J. M. (2011). Mastering the canonical loop of serine protease inhibitors: Enhancing potency by optimising the internal hydrogen bond network. *PLoS One* 6: e19302
- Swedberg, J. E., Ghani, H. A., Harris, J. M., de Veer, S. J., & Craik, D. J. (2018). Potent, selective, and cell-penetrating inhibitors of kallikrein-related peptidase 4 based on the cyclic peptide MCoTI-II. *ACS Med Chem Lett* 9: 1258-1262
- Swedberg, J. E., Nigon, L. V., Reid, J. C., de Veer, S. J., Walpole, C. M., Stephens, C. R., Walsh, T. P., Takayama, T. K., Hooper, J. D., Clements, J. A., Buckle, A. M., & Harris, J. M. (2009). Substrate-



- guided design of a potent and selective kallikrein-related peptidase inhibitor for kallikrein 4. *Chem Biol* 16: 633-643
- Sweeney, C. J., Chen, Y. H., Carducci, M., Liu, G., Jarrard, D. F., Eisenberger, M., Wong, Y. N., Hahn, N., Kohli, M., Cooney, M. M., Dreicer, R., Vogelzang, N. J., Picus, J., Shevrin, D., Hussain, M., Garcia, J. A., & DiPaola, R. S. (2015). Chemohormonal therapy in metastatic hormone-sensitive prostate cancer. *N Engl J Med* 373: 737-746
- Talcott, J. A., Manola, J., Clark, J. A., Kaplan, I., Beard, C. J., Mitchell, S. P., Chen, R. C., O'Leary, M. P., Kantoff, P. W., & D'Amico, A. V. (2003). Time course and predictors of symptoms after primary prostate cancer therapy. *J Clin Oncol* 21: 3979-3986
- Tang, T., Owen, J. D., Du, J., Walker, C. L., & Richmond, A. (1998). Molecular cloning and characterization of a mouse gene with homology to the duffy-antigen receptor for chemokines. *DNA Seq* 9: 129-143
- Tisoncik, J. R., Korth, M. J., Simmons, C. P., Farrar, J., Martin, T. R., & Katze, M. G. (2012). Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol Mol Biol Rev* 76: 16-32
- Todorovic-Rakovic, N. (2021). The role of cytokines in the evolution of cancer: LFN-gamma paradigm. *Cytokine*: 155442
- Tolkach, Y., & Kristiansen, G. (2018). The heterogeneity of prostate cancer: A practical approach. *Pathobiology* 85: 108-116
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4354
- Tse, B. W., Kryza, T., Yeh, M. C., Dong, Y., Sokolowski, K. A., Walpole, C., Dreyer, T., Felber, J., Harris, J., Magdolen, V., Russell, P. J., & Clements, J. A. (2020). KLK4 induces anti-tumor effects in human xenograft mouse models of orthotopic and metastatic prostate cancer. *Cancers* 12: 3501
- Tymms, M. J., & Kola, I. (1994). Regulation of gene expression by transcription factors ETS-1 and ETS-2. *Mol Reprod Dev* 39: 208-214
- Van Dyke, A. L., Cote, M. L., Wenzlaff, A. S., Chen, W., Abrams, J., Land, S., Giroux, C. N., & Schwartz, A. G. (2009). Cytokine and cytokine receptor single-nucleotide polymorphisms predict risk for non-small cell lung cancer among women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18: 1829-1840
- van Soom, J., Cuzzucoli Crucitti, G., Gladysz, R., van der Veken, P., Di Santo, R., Stuyver, I., Buck, V., Lambeir, A.-M., Magdolen, V., Joossens, J., & Augustyns, K. (2015). The first potent diphenyl phosphonate KLK4 inhibitors with unexpected binding kinetics. *MedChemComm* 6: 1954-1958
- Wang, Q., Li, W., Liu, X. S., Carroll, J. S., Janne, O. A., Keeton, E. K., Chinnaiyan, A. M., Pienta, K. J., & Brown, M. (2007). A hierarchical network of transcription factors governs androgen receptor-dependent prostate cancer growth. *Mol Cell* 27: 380-392
- Wang, Z., Wang, Z., Li, G., Wu, H., Sun, K., Chen, J., Feng, Y., Chen, C., Cai, S., Xu, J., & He, Y. (2017). CXCL1 from tumor-associated lymphatic endothelial cells drives gastric cancer cell into lymphatic system via activating integrin beta1/Fak/Akt signaling. *Cancer Lett* 385: 28-38
- Waugh, D. J., & Wilson, C. (2008). The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 14: 6735-6741
- Weinberg, R. (2014). *The biology of cancer - second edition; chapter 2: The nature of cancer*. New York: Garland Science.
- Widmark, A., Klepp, O., Solberg, A., Damber, J. E., Angelsen, A., Fransson, P., Lund, J. A., Tisdemir, I., Hoyer, M., Wiklund, F., Fossa, S. D., Scandinavian Prostate Cancer Group, S., & Swedish Association for Urological, O. (2009). Endocrine treatment, with or without radiotherapy, in locally advanced prostate cancer (SPCG-7/SFUO-3): An open randomised phase iii trial. *Lancet* 373: 301-308
- Williams, S. A., Jelinek, C. A., Litvinov, I., Cotter, R. J., Isaacs, J. T., & Denmeade, S. R. (2011). Enzymatically active prostate-specific antigen promotes growth of human prostate cancers. *Prostate* 71: 1595-1607

- Wilt, T. J., Brawer, M. K., Jones, K. M., Barry, M. J., Aronson, W. J., Fox, S., Gingrich, J. R., Wei, J. T., Gilhooly, P., Grob, B. M., Nsouli, I., Iyer, P., Cartagena, R., Snider, G., Roehrborn, C., Sharifi, R., Blank, W., Pandya, P., Andriole, G. L., Culkin, D., Wheeler, T., & Prostate Cancer Intervention versus Observation Trial Study, G. (2012). Radical prostatectomy versus observation for localized prostate cancer. *N Engl J Med* 367: 203-213
- Xi, Z., Klok, T. I., Korkmaz, K., Kurys, P., Elbi, C., Risberg, B., Danielsen, H., Loda, M., & Saatcioglu, F. (2004). Kallikrein 4 is a predominantly nuclear protein and is overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res* 64: 2365-2370
- Xu, J., Zhang, C., He, Y., Wu, H., Wang, Z., Song, W., Li, W., He, W., Cai, S., & Zhan, W. (2012). Lymphatic endothelial cell-secreted CXCL1 stimulates lymphangiogenesis and metastasis of gastric cancer. *Int J Cancer* 130: 787-797
- Yang, Y., Stang, A., Schweickert, P. G., Lanman, N. A., Paul, E. N., Monia, B. P., Revenko, A. S., Palumbo, J. S., Mullins, E. S., Elzey, B. D., Janssen, E. M., Konieczny, S. F., & Flick, M. J. (2019). Thrombin signaling promotes pancreatic adenocarcinoma through PAR-1-dependent immune evasion. *Cancer Res* 79: 3417-3430
- Yuan, T. C., & Lin, M. F. (2004). Protease-activated receptor 1: A role in prostate cancer metastasis. *Clin Prostate Cancer* 3: 189-191
- Zhan, P., Ji, Y. N., & Yu, L. K. (2013). VEGF is associated with the poor survival of patients with prostate cancer: A meta-analysis. *Transl Androl Urol* 2: 99-105
- Zhang, J., Patel, L., & Pienta, K. J. (2010a). CC chemokine ligand 2 (CCL2) promotes prostate cancer tumorigenesis and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev* 21: 41-48
- Zhang, J. M., & An, J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin* 45: 27-37
- Zhang, Y., Song, H., Miao, Y., Wang, R., & Chen, L. (2010b). Frequent transcriptional inactivation of kallikrein 10 gene by CpG island hypermethylation in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 101: 934-940
- Zhang, Y., Zhou, L., Gu, X., Feng, X., Ding, P., Xia, Q., & Lu, M. (2020). CXCL8(high) inflammatory b cells in the peripheral blood of patients with biliary atresia are involved in disease progression. *Immunol Cell Biol*
- Zhang, Z., Chen, Y., Jiang, Y., Luo, Y., Zhang, H., & Zhan, Y. (2019). Prognostic and clinicopathological significance of CXCL1 in cancers: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Biol Ther* 20: 1380-1388
- Zhou, P. J., Xue, W., Peng, J., Wang, Y., Wei, L., Yang, Z., Zhu, H. H., Fang, Y. X., & Gao, W. Q. (2017). Elevated expression of PAR3 promotes prostate cancer metastasis by forming a PAR3/aPKC/KIBRA complex and inactivating the hippo pathway. *J Exp Clin Cancer Res* 36: 139
- Zigler, M., Kamiya, T., Brantley, E. C., Villares, G. J., & Bar-Eli, M. (2011). PAR-1 and thrombin: The ties that bind the microenvironment to melanoma metastasis. *Cancer Res* 71: 6561-6566
- Zou, Y., Liang, J., Li, D., Fang, J., Wang, L., Wang, J., Zhang, J., Guo, Q., Yan, X., & Tang, H. (2020). Application of the chemokine-chemokine receptor axis increases the tumor-targeted migration ability of cytokine-induced killer cells in patients with colorectal cancer. *Oncol Lett* 20: 123-134

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kennzeichen von Krebserkrankungen und pharmakologische Angriffspunkte

Abbildung 2: Lage der Prostata im männlichen Urogenitaltrakt

Abbildung 3: Häufigkeiten (%) der durch Tumorerkrankungen verursachten Todesfälle bei Männern und Frauen in Deutschland für das Jahr 2012

Abbildung 4: Zonale Gliederung der Prostata

Abbildung 5: 5- und 10-Jahres-Überlebensraten für die häufigsten Tumorentitäten bei Frauen und Männern in Deutschland 2011 und 2012

Abbildung 6: Die Einbindung der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen innerhalb des Proteasennetzwerks

Abbildung 7: Expression der KLKs 1-15 bei verschiedenen Tumorerkrankungen

Abbildung 8: Die katalytische Triade der Serinproteasen

Abbildung 9: Diphenyl-Phosphonat-*warhead*

Abbildung 10: Reaktionsmechanismus der Diphenyl-Phosphonat-Inhibitoren

Abbildung 11: Faltungstopologie von SFTI-1 (in magenta) im Komplex mit Trypsin

Abbildung 12: PC3-Zellen in lichtmikroskopischer Vergrößerung

Abbildung 13: Grafische Darstellung des Outputs eines PAR-Micro-Arrays

Abbildung 14: Verdünnungsreihe cDNA von PC3 KLK4 zur Validierung des CXCL1-Assays

Abbildung 15: Vergleich der Proliferation von PC3 KLK4- versus PC3 RSV-Zellen

Abbildung 16: KLK4-überexprimierende vs. Vektorkontrollzellen (RSV): CXCL1-Bestimmung im Zellkulturüberstand (FCS-haltiges Medium) mittels ELISA. Zeitangaben beziehen sich auf die Inkubationszeit nach dem Mediumswechsel

Abbildung 17: KLK4-überexprimierende vs. Vektorkontrollzellen (RSV): CXCL1-Bestimmung im Zellkulturüberstand (FCS-freies Medium) mittels ELISA. Zeitangaben beziehen sich auf die Inkubationszeit nach dem Mediumswechsel

Abbildung 18: KLK4-überexprimierende vs. Vektorkontrollzellen (RSV): CXCL8-Bestimmung im Zellkulturüberstand (FCS-haltiges Medium) mittels ELISA. Zeitangaben beziehen sich auf die Inkubationszeit nach dem Mediumswechsel

Abbildung 19: KLK4-überexprimierende vs. Vektorkontrollzellen (RSV): CXCL8-Bestimmung im Zellkulturüberstand (FCS-freies Medium) mittels ELISA. Zeitangaben beziehen sich auf die Inkubationszeit nach dem Mediumswechsel

Abbildung 20: KLK4-überexprimierende vs. Vektorkontrollzellen (RSV): CXCL1-Bestimmung im Zellkulturüberstand (serumfreies P4-(F-Medium) mittels ELISA. Zeitangaben beziehen sich auf die Inkubationszeit nach dem Mediumswechsel

Abbildung 21: qPCR für CXCL1 nach RNA-Isolierung aus PC3 KLK4 versus RSV

Abbildung 22: Untersuchung der Stabilität des inhibitorischen Potentials von UAMC 1399 nach Inkubation in Zellkultur bis zu 48 h und anschließender Aktivitätstest mit dem fluorogenen Substrat I-1120 (Boc-Val-Pro-Arg-7-amino-4-methylcoumarin)

Abbildung 23: *Alamar-Blue-Assay* mit Zellen der Vektorkontrollzelllinie PC3 RSV sowie aufsteigenden Konzentrationen von UAMC 1399

Abbildung 24: Untersuchung des KLK4-Einflusses auf die Proliferation und Reversibilität der KLK4-Effekte durch Anwendung des KLK4-Inhibitors UAMC 1399

Abbildung 25: KLK4-überexprimierende vs. Vektorkontrollzellen (RSV) sowie Zellkultur mit und ohne Inhibitor UAMC 1399: CXCL1-Bestimmung im Zellkulturüberstand

Abbildung 26: KLK4-überexprimierende vs. Vektorkontrollzellen (RSV): CXCL1-Bestimmung im Zellkulturüberstand und Vergleich von Zellkultur mit und ohne KLK4-Inhibitor SFTI-FCQR Asn14

Abbildung 27: Struktur der Wildtyp-KLK4 und die beiden Mutationskonstrukte S195A und delSP

Abbildung 28: DNA-Sequenz von KLK4 im Expressionsvektor pRcRSV

Abbildung 29: DNA-Sequenz von KLK4-delSP im Expressionsvektor pRcRSV

Abbildung 30: Restriktionskarte von pRc-KLK4

Abbildung 31: Restriktionskarte von pRc-KLK4-delSP

Abbildung 32: Kpn-I-Restriktionsanalyse von vier potentiellen pRcRSV-KLK4-delSP-Klonen nach der *in-vitro*-Mutagenese (Spur 1-4) mittels Agarose-Gel-Elektrophorese

Abbildung 33: Nachweis von KLK4 im konzentrierten Zellkulturüberstand, Ausschnitt eines Western Blots von Zellkulturüberständen der PC3-Transfektanten auf Höhe der 30-kDa-Bande (KLK4)

Abbildung 34: Wildtyp-KLK4-überexprimierende- (KLK4wt) vs. Vektorkontrollzellen (RSV) vs. S195A-KLK4 bzw. delSP-KLK4 exprimierende Zellen: Vergleich der CXCL1-Expression auf RNA-Ebene mittels qPCR

Abbildung 35: Einfluss der delSP-Mutation auf die CXCL1-Expression und Reversibilität des KLK4-Einflusses auf die CXCL1-Konzentration im Zellkulturüberstand bei Anwendung von SFTI-FCQR Asn14, Bestimmung der CXCL1-Konzentrationen mittels ELISA

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms

Tabelle 2: Verwendete Enzyme

Tabelle 3: Verwendete Plasmide

Tabelle 4: Verwendete Primer

Tabelle 5: Verwendete TaqMan Assays

Tabelle 6: Verwendete Assays auf Basis der Roche Universal Probe Library

Tabelle 7: Verwendete Lösungen und Puffer

Tabelle 8: Verwendete Kits

Tabelle 9: Verwendete Chemikalien

Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11: Verwendete Geräte

Tabelle 12: Kulturbedingungen für Zellkulturversuche

Tabelle 13: Verwendete Medien und Zusätze

Tabelle 14: Gene, deren Expression unter KLK4-Expression um mind. 50 % reduziert wird.

Tabelle 15: Gene, deren Expression unter KLK4-Expression um mind. 200 % gesteigert wird.

## Internetquellen

<http://www.krebsdaten.de>

<http://www.lgc-standards-atcc.org>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3579>

<http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/trypsin/67943>

<http://de.wikipedia.de/CXCL1>

<http://www.wwpdb.org>