

Klinische Bedeutung von Kallikrein-ähnlichen Peptidasen beim fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom (KLK13, KLK14) und triple- negativen Mammakarzinom (KLK14)

Larissa, Kürzinger

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen
Universität München zur Erlangung einer

Doktorin der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: apl. Prof. Dr. Bernhard Haslinger

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Viktor Magdolen
2. Priv.-Doz. Dr. Holger Bronger

Die Dissertation wurde am 27.07.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die TUM School of Medicine and Health am 03.01.2024 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	8
Abkürzungsverzeichnis.....	11
I. Einleitung.....	15
I.1 Ovarialkarzinom.....	15
I.1.1 Epidemiologie.....	15
I.1.2 Risikofaktoren.....	15
I.1.3 Histologische Klassifikation und Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms	15
I.1.4 Klinik und Diagnostik des Ovarialkarzinoms.....	16
I.1.5 Therapie und Prognose des Ovarialkarzinoms.....	18
I.2 Mammakarzinom.....	19
I.2.1 Epidemiologie.....	19
I.2.2 Risikofaktoren.....	19
I.2.3 Histologische Klassifikation, Stadieneinteilung und Immunhistochemie des invasiven Mammakarzinoms.....	19
I.2.4 Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Prognose des Mammakarzinoms.....	22
I.3 Kallikrein-ähnliche Peptidasen (KLK) und ihre Rolle im Tumorgeschehen.....	24
I.3.1 Kallikrein-ähnliche Peptidasen im Ovarialkarzinom.....	24
I.3.2 Kallikrein-ähnliche Peptidasen im Mammakarzinom.....	27
I.4 Kallikrein-ähnliche Peptidasen 13 und 14.....	30
I.4.1 KLK13 unter physiologischen Bedingungen.....	30
I.4.2 Rolle von KLK13 im Tumorgeschehen.....	31
I.4.2.1 KLK13 im Ovarialkarzinom.....	31
I.4.2.2 KLK13 in anderen Karzinomen.....	31
I.4.3 KLK14 unter physiologischen Bedingungen.....	32
I.4.4 Rolle von KLK14 im Tumorgeschehen.....	33
I.4.4.1 KLK14 im Ovarialkarzinom.....	33
I.4.4.2 KLK14 im Mammakarzinom.....	33
I.4.4.3 KLK14 in anderen Karzinomen.....	34
I.5 Zielsetzung.....	35
II. Patientenkollektiv.....	36
II.1.1 Patientenkollektiv der qPCR- Analysen beim fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom.....	36

II.1.2	Patientenkollektiv der immunhistochemischen Analysen beim fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom	37
II.1.3	Patientenkollektiv der immunhistochemischen Analysen beim triple-negativen Mammakarzinom	39
III.	Material und Methoden.....	41
III.1	Material.....	41
III.1.1	Technische Geräte und Hilfsmittel.....	41
III.1.2	Verbrauchsmaterialien	42
III.1.3	Chemikalien und allgemeine Reagenzien	42
III.1.4	Puffer und Lösungen.....	45
III.1.5	Bakterienstämme und Medien	46
III.1.6	Kommerziell erhältliche Kits	47
III.1.7	cDNA	48
III.1.8	Plasmide.....	48
III.1.9	Primer	48
III.1.10	Antikörper.....	49
III.2	Methoden	50
III.2.1	Quantitative Real-time (Echtzeit)-Polymerase Kettenreaktion (qPCR).....	50
III.2.2	Produktion und Aufreinigung von pro-KLK1	54
III.2.2.1	Polymerase-Kettenreaktion	54
III.2.2.2	Agarosegelelektrophorese	55
III.2.2.3	Aufreinigung des PCR-Produktes	56
III.2.2.4	DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme	56
III.2.2.5	Ligation der DNA-Fragmente	57
III.2.2.6	Transformation	57
III.2.2.7	Plasmid-DNA-Präparation	58
III.2.2.8	Restriktionsanalyse der rekombinanten Plasmide und Sequenzierung.....	58
III.2.2.9	Expression der rekombinanten Proteine	59
III.2.2.10	Affinitätschromatographie mit Ni ²⁺ -NTA-Agarose-Säule	60
III.2.3	Western Blot Analysen	61
III.2.4	RNA-Isolierung mit Qiagen-Kits	63
III.2.4.1	RNA-Isolierung von Zelllinien	63
III.2.4.2	RNA- und DNA-Isolierung aus ovarialem Tumorgewebe	64
III.2.5	Reverse Transkription und cDNA Synthese.....	65
III.2.6	Immunhistochemie	66
III.2.7	Statistische Analysen	67
IV.	Ergebnisse	69
IV.1	Klinische Relevanz der KLK13-mRNA-Expression beim fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom.....	69

IV.1.1	Etablierung des qPCR-Systems.....	69
IV.1.2	KLK13 mRNA Expressionslevel im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom	71
IV.1.3	Assoziation zwischen etablierten klinischen Parametern für Ovarialkarzinome und der KLK13-mRNA-Expression	73
IV.1.4	Assoziation von KLK13/KLK14-mRNA-Expression sowie den klinisch etablierten Parametern mit dem Gesamtüberleben und progressionsfreiem Überleben	74
IV.1.5	Korrelation der mRNA-Expression verschiedener Mitglieder der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen zueinander beim fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom.....	79
IV.2	Charakterisierung von Antikörpern für die Analyse der KLK13- und KLK14-mRNA-Expression beim fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom und triple-negativen Mammakarzinom	82
IV.2.1	Klonierung der Proform der Kallikrein-ähnlichen Peptidase 1.....	82
IV.2.1.1	Vervielfältigung der pro-KLK1 cDNA mittels PCR	83
IV.2.1.2	Behandlung der DNA-Fragmente mit Restriktionsenzymen Bam HI und Sal I.....	84
IV.2.1.3	Ligation des pro-KLK1-DNA-Fragments in den Vektor pQE100 und Transformation in <i>E.coli</i>	85
IV.2.1.4	Restriktionsanalysen der klonierten Plasmide	85
IV.2.1.5	Sequenzierungsergebnisse.....	86
IV.2.2	Expression und Reinigung der Proform KLK1.....	87
IV.2.2.1	Induktion der pro-KLK1 Proteinexpression mittels IPTG.....	87
IV.2.2.2	Die gereinigte Proform von KLK1	90
IV.2.3	Testung der Sensitivität und Spezifität der polyklonalen Antikörper gegen KLK13 und KLK14	91
IV.2.3.1	Konzentrationsbestimmung der Proformen der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen 1 bis 15	91
IV.2.3.2	Western Blot Ergebnisse mit KLK13- und KLK14- Antikörpern	93
IV.3	IHC-Ergebnisse	96
IV.3.1	Versuche zur Etablierung der Immunhistochemie für KLK13 und KLK14.....	96
IV.3.2	Immunhistochemische Färbung mit KLK14-Antikörper im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom	96
IV.3.2.1	Assoziation zwischen etablierten klinischen Parametern für Ovarialkarzinome und der KLK14-Proteinexpression.....	97
IV.3.2.2	Assoziation von KLK14-Proteinexpression sowie den klinisch etablierten Parametern mit dem Gesamtüberleben und progressionsfreiem Überleben bei Ovarialkarzinompatientinnen.....	98
IV.3.2.3	Korrelation der KLK14-mRNA-Expression und -Proteinexpression im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom	100
IV.3.3	Immunhistochemische Färbung mit KLK14-Antikörper beim triple-negativen Mammakarzinom	102

IV.3.3.1	Assoziation zwischen etablierten klinischen Parametern für Mammakarzinome und der KLK14-Proteinexpression	102
IV.3.3.2	Assoziation von KLK14-Proteinexpression und den klinisch etablierten Parametern mit dem Gesamtüberleben beim triple-negativen Mammakarzinom	103
V.	Diskussion	107
V.1	KLK13 und KLK14 und deren prognostische Bedeutung im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom	107
V.2	KLK14 und deren prognostische Bedeutung im triple-negativen Mammakarzinom	111
VI.	Zusammenfassung	116
VII.	Literaturverzeichnis	119
VIII.	Anhang	136
IX.	Danksagung	140

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stadieneinteilung maligner Ovarialtumore nach TNM- und FIGO-Klassifikation (Kommos F., 2009).....	16
Abbildung 2: Schematischer Ablauf der qPCR mittels TaqMan-Technologie	51
Abbildung 3: Schematische Darstellung der wichtigsten Charakteristika des verwendeten pQE100 Vektors zur Klonierung von KLK1. (Qiagen, 2003)	59
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Interaktion des His-Tags (blau) und der Ni ²⁺ -NTA-Matrix (rot) (Qiagen, 2003)	60
Abbildung 5: Beispiel einer Verdünnungsreihe für KLK13 und HPRT mit der cDNA OVMZ6/KLK13 (DNA0-DNA4, 30-1,875ng).....	70
Abbildung 6: Auswertung der 4 Ovarialkarzinomproben (OVD1-4) mittels Berechnung von 2- $\Delta\Delta C_t$ für KLK13	71
Abbildung 7: Relative KLK13-mRNA-Expression im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom	73
Abbildung 8: Korrelationen der KLK13-mRNA-Expression mit KLK10- und KLK11-mRNA-Expressionslevel im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom	81
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Klonierung der Proform der Kallikrein-ähnlichen Peptidase 1	83
Abbildung 10: PCR-Produkte von pro-KLK 1	84
Abbildung 11: Pro-KLK1 nach Restriktion mit Sal I und Bam HI.....	85
Abbildung 12: Restriktionsprodukte von Pro-KLK1 nach Restriktionsanalyse mit den Enzymen Sal I und Bam HI.....	86
Abbildung 13: Sequenzierungsergebnis der Proform der Kallikrein-ähnlichen Peptidase 1.....	87
Abbildung 14: Wachstumskurve der pro-KLK1-produzierenden <i>E.coli</i> M15-[pREP4] nach Induktion mit IPTG.....	88
Abbildung 15: Expressionsanalyse mittels SDS-PAGE und Coomassieblau-Färbung von rekombinantem humanen pro-KLK1 in <i>E.coli</i> -M15-[pREP4]-Extrakten	89
Abbildung 16: Expressionsanalyse mittels Western Blot von rekombinantem humanen pro-KLK1 in <i>E.coli</i>	90
Abbildung 17: Aufreinigung des pro-KLK1	91
Abbildung 18: Konzentrationsbestimmung der Proformen der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen 1 bis 15 nach Auftrennung mittels SDS-PAGE und Färbung mit Silbernitrat	92

Abbildung 19: Western Blot Analyse zur Identifizierung aller Proformen der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen 1 bis 15 mittels Penta-Histidin Antikörper	93
Abbildung 20: Western Blot Analyse zur Testung der Spezifität und Sensitivität der KLK13-Antikörper	94
Abbildung 21: Western Blot Analyse zur Testung der Spezifität und Sensitivität der KLK14- Antikörper	95
Abbildung 22: Immunhistochemische Analysen der KLK14-Proteinexpression beim fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom	97
Abbildung 23: Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben beim fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom (FIGOIII/IV) nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von etablierten klinischen Prognoseparametern (Aszitesvolumen und Resttumormasse)	99
Abbildung 24: Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben beim fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom (FIGOIII/IV) nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von der KLK14-Proteinexpression mittels Immunhistochemie	100
Abbildung 25: Korrelation der KLK14-mRNA-Expression und -Proteinexpression im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom	101
Abbildung 26: Immunhistochemie von KLK14 im triple-negativen Mammakarzinom	102
Abbildung 27: Gesamtüberleben beim triple-negativen Mammakarzinom nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von der KLK14 Proteinexpression	105

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms (O'Sullivan et al., 2017).....	21
Tabelle 2: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms und immunhistochemisches Expressionsmuster (Mayr D., 2011; Meindl et al., 2011)	22
Tabelle 3: Bedeutung der Expressionsmuster der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen für die Prognose des Ovarialkarzinoms.....	26
Tabelle 4: Bedeutung der Expressionsmuster der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen für die Prognose des Mammakarzinoms	29
Tabelle 5: Patientenkollektiv der KLK13 qPCR-Analysen	37
Tabelle 6: Patientenkollektiv der KLK14 immunhistochemischen Analysen beim fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom	38
Tabelle 7: Patientenkollektiv der KLK14 immunhistochemischen Analysen beim triple-negativen Mammakarzinom	40
Tabelle 8: Technische Geräte und Hilfsmittel.....	41
Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien	42
Tabelle 10: Chemikalien und allgemeine Reagenzien	42
Tabelle 11: Eingesetzte Puffer für die Agarosegelelektrophorese	45
Tabelle 12: Eingesetzte Puffer für Western Blot Analysen.....	46
Tabelle 13: Bakterienstämme.....	46
Tabelle 14: Bakterienmedien	47
Tabelle 15: Kommerziell erhältliche Kits	47
Tabelle 16: cDNA	48
Tabelle 17: Plasmide.....	48
Tabelle 18: Primer	48
Tabelle 19: Primäre Antikörper für Western Blot Analysen	49
Tabelle 20: Sekundäre Antikörper für Western Blot Analysen.....	49
Tabelle 21: Primäre Antikörper für immunhistochemische Analysen.....	49
Tabelle 22: Sekundäre Antikörper für immunhistochemische Analysen.....	50
Tabelle 23: Generierte Primer und Proben für das Housekeeping Gen HPRT1 und KLK13 (Roche Universal Probe Library, Penzberg, Deutschland)	52
Tabelle 24: Mastermixansatz für die quantitative Echtzeit-PCR	52
Tabelle 25: Protokoll der quantitativen Echtzeit-PCR	53
Tabelle 26: Mischverhältnis der 1. und 2. PCR Reaktion	55
Tabelle 27: Protokoll der Polymerasekettenreakton im Labcycler.....	55
Tabelle 28: Mischverhältnis der Ligation von KLK1 und pQE 100.....	57

Tabelle 29: Mastermix für Restriktionsanalyse	58
Tabelle 30: Wasch- und Elutionsschritte der Ni ²⁺ -NTA- Agarose- Affinitätschromatographie.....	61
Tabelle 31: Primär-Antikörper Verdünnungen der Western Blot Analysen	62
Tabelle 32: Mischverhältnisse von Trenn- und Sammelgel	62
Tabelle 33: Mischverhältnis der cDNA Synthese	65
Tabelle 34: Mischverhältnis der reversen Transkription	65
Tabelle 35: Protokoll der Reversen Transkription im Labcycler	66
Tabelle 36: Bewertung der immunhistochemischen Analysen bei fortgeschrittenem serösen Ovarialkarzinom	66
Tabelle 37: Bewertung der immunhistochemischen Analysen bei triple-negativem Mammakarzinom.....	67
Tabelle 38: Immunreaktiver Score (IRS)	67
Tabelle 39: Deskriptive Statistik der KLK13 und KLK14-mRNA-Expressionslevel	72
Tabelle 40: Assoziation zwischen etablierten klinischen Parametern für Ovarialkarzinome und KLK13- mRNA-Expression	74
Tabelle 41: Univariate Cox-Regressionsanalyse des Gesamt- bzw. progressionsfreien Überlebens bei Patientinnen mit fortgeschrittenem serösen Ovarialkarzinom (FIGO III/IV) in Bezug auf klinisch etablierte Prognosefaktoren und KLK13/14 Expression	75
Tabelle 42: Multivariate Cox-Regressionsanalyse des Gesamt- bzw. progressionsfreien Überlebens bei Patienten mit fortgeschrittenem serösen Ovarialkarzinom (FIGO III/IV) in Bezug auf klinisch etablierte Prognosefaktoren und KLK13/14 Expression.....	78
Tabelle 43: Korrelation zwischen der untersuchten mRNA-Expression der verschiedenen KLK-Mitglieder (KLK6, -8, -9, -10, -11, -13, -14, -15) im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom	80
Tabelle 44: Verteilung der KLK14-Proteinexpression im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom	97
Tabelle 45: Assoziation zwischen etablierten klinischen Parametern für Ovarialkarzinome und KLK14-Proteinexpression.....	98
Tabelle 46: Korrelation zwischen der untersuchten KLK14-mRNA-Expression (qPCR) und -Proteinexpression (IHC) beim fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom	101
Tabelle 47: Verteilung der KLK14-Proteinexpression im triple-negativen Mammakarzinom.....	102
Tabelle 48: Assoziation zwischen etablierten klinischen Parametern für Mammakarzinome und KLK14-Proteinexpression.....	103
Tabelle 49: Univariate Cox-Regressionsanalyse des Gesamt- bzw. progressionsfreien Überlebens bei Patientinnen mit triple-negativen	

Mammakarzinom in Bezug auf klinisch etablierte Prognosefaktoren und KLK14-Proteinexpression	106
--	-----

Abkürzungsverzeichnis

µg	-----	Mikrogramm
µl	-----	Mikroliter
µm	-----	Mikrometer
µmol	-----	µmol
A	-----	Absorptionslevel
AA-Bis	-----	Acrylamid-Bisacrylamid
AFP	-----	Alpha-1-Fetoprotein
AMVRT	-----	Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase
APS	-----	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	-----	Adenosintriphosphat
BMI	-----	Body Mass Index
BRCA	-----	Breast Cancer Gen
BSA	-----	Bovines Serumalbumin
CA 125	-----	Cancer-Antigen 125
CA19-9	-----	Cancer- Antigen 19-9
CA72-4	-----	Cancer-Antigen 72-4
CC1	-----	Cell Conditioning 1
cDNA	-----	komplementäre DNA
cm	-----	Zentimeter
Ct	-----	Cycle threshold
CT	-----	Computertomographie
DAB	-----	Diaminobenzidin
dATP	-----	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	-----	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	-----	Diethylpyrocarbonat
Dest	-----	Destilliert
dGTP	-----	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	-----	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	-----	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dNTPs	-----	Desoxyribonucleosidtriphosphate
DTT	-----	Dithiothreitol
dTTP	-----	Desoxythymidintriphosphat

E	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Östrogenrezeptor
exp	exponential
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAM	6-carboxy-Fluorescein
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FRET	fluorescence resonance energy transfer
g	Gramm
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HE4	Human epididymis protein 4
HER2	humaner epidermaler Wachstumsrezeptor 2
His	Histidin
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HR	Hazard-Rate
HRP	Horseradish Peroxidase
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IGFBP	Insulin-like-growth-factor-binding-protein
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasen
KLK	Kallikreine
KI	Konfidenzintervall
L	Lymphgefäßinvasion
lac	Laktose
LB	Lysogenbrühe
LiCl	Lithiumchlorid
M	molar, Molmasse, Metastase
mA	Milliamper
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
miRNA	microRNA

mm	-----	Millimeter
mM	-----	millimolar
mRNA	-----	messenger ribonucleic acid
MRT	-----	Magnetresonanztomographie
N	-----	Nodus
Na ₂ HPO ₄	-----	Dinatriumphosphat
NaCl	-----	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	-----	Natriumdihydrogenphosphat
ng	-----	Nanogramm
Ni	-----	Nickel
nm	-----	Nanometer
nM	-----	nanomolar
NSCLC	-----	Non small cell lung cancer
NST	-----	no special type
NTA	-----	Nitrilotriessigsäure
OD	-----	Optische Dichte
PAA	-----	Polyacrylamid
PAR2	-----	Protease-aktivierter Rezeptor 2
PBS	-----	Phosphatpufferlösung
PCR	-----	Polymerase-Kettenreaktion
PVDF	-----	Polyvinylidenfluorid
PET	-----	Positronenemissionstomographie
PARP	-----	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PR	-----	Progesteronrezeptor
PSA	-----	Prostata-spezifisches Antigen
qRT	-----	quantitative Real-time
R	-----	Korrelationskoeffizient / Residualtumor
rcf	-----	relative centrifugal force
ROX	-----	6-Carboxy-X-Rhodamin
rpm	-----	revolutions per Minute
RT	-----	Raumtemperatur
SD	-----	Standardabweichung
SDS	-----	Sodium dodecyl sulfate
sec	-----	Sekunde

T	Tumor
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TIL	tumorinfiltrierende Lymphozyten
TMA	Tissue micro array
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-Cl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Chlorid
Triton 100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween 20	Polysorbat 20
U	Unit
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization

I. Einleitung

I.1 Ovarialkarzinom

I.1.1 Epidemiologie

Weltweit erkranken jährlich ca. 225.000 Frauen neu an einem Ovarialkarzinom (= maligner epithelialer Tumor der Eierstöcke). Die Sterberate des Ovarialkarzinoms liegt weltweit bei etwa 140.000 Frauen pro Jahr. Es ist damit die siebthäufigste tödliche Krebserkrankung bei Frauen (Ferlay et al., 2010).

In Deutschland ist das Ovarialkarzinom nach dem Mammakarzinom (= maligner epithelialer Tumor der Brustdrüse) die zweithäufigste tödliche gynäkologische Krebserkrankung. 2014 lag die Zahl der Neuerkrankungen bei 7.250 und die Sterbefälle bei 5.354 Frauen. Vor allem durch die sehr häufig erst im späten Stadium gestellte Diagnose eines Ovarialkarzinoms sind die Überlebensaussichten der Patientinnen eher schlecht. 2014 lag die relative 5-Jahres-Überlebensrate über alle Stadien des Ovarialkarzinoms hinweg bei ca. 41 % (Robert Koch Institut, 2017a).

I.1.2 Risikofaktoren

Als Risikofaktoren für diese Erkrankung spielen zunehmendes Alter und Übergewicht eine Rolle (Olsen, Green, et al., 2007; Robert Koch Institut, 2017a). Zusätzlich begünstigen hormonelle Faktoren, wie zum Beispiel Kinderlosigkeit, Unfruchtbarkeit und eine Östrogensersatztherapie nach der Menopause, das Risiko einer Entstehung (Anderson et al., 2003; Cetin et al., 2008). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei etwa 70 Jahren, jedoch steigen die Erkrankungsraten kontinuierlich bis zum 85. Lebensjahr an. Des Weiteren konnte ein erhöhtes Erkrankungsrisiko bei Frauen gezeigt werden, deren Verwandte ersten Grades bereits an Brust- oder Eierstockkrebs erkrankt waren. In diesen Fällen liegen häufig Mutationen in den Genen BRCA1 und BRCA2 vor (Robert Koch Institut, 2017b).

I.1.3 Histologische Klassifikation und Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms

Das histomorphologische Spektrum der Ovarialkarzinome ist vielfältig, die WHO unterscheidet dabei seröse, muzinöse, endometrioid, klarzellige, transitionalzellige, seromuzinöse und undifferenzierte Karzinome (Tavassoli FA & P, 2003).

Maligne Ovarialtumore (neben den Ovarialkarzinomen auch maligne Tumore stromalen Ursprungs) werden in ihre Stadien sowohl nach der TNM-Klassifikation der UICC als auch nach FIGO (*Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*) eingeteilt (Pecorelli, 2003; *Richtlinie des Gemeinsamen Bundesausschusses über die Früherkennung von Krebserkrankungen (Krebsfrüherkennungs-Richtlinie / KFE-RL)*; Wittekind et al., 2002). Seit einigen Jahren besteht eine Deckungsgleichheit der beiden Klassifikationen (s. Abbildung 1). Während die TNM-Klassifikation nach T = Tumor, N = Nodus/Lymphknotenstatus und M = Metastase unterscheidet, wird das FIGO-System mit römischen Ziffern I-IV beschrieben.

TNM		FIGO	Befundsituation
T1		I	Tumor begrenzt auf Ovarien
	T1a	IA	Tumor auf ein Ovar begrenzt; Kapsel intakt; kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars
	T1b	IB	Tumor auf beide Ovarien begrenzt; Kapsel intakt; kein Tumor auf der Oberfläche beider Ovarien
	T1c	IC	Tumor begrenzt auf ein oder beide Ovarien mit Kapselruptur; Tumor an Ovaroberfläche oder maligne Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
T2		II	Tumor befällt ein oder beide Ovarien und breitet sich im Becken aus
	T2a	IIA	Ausbreitung auf und/oder Implantate an Uterus und/oder Tube(n)
	T2b	IIB	Ausbreitung auf andere Beckengewebe
	T2c	IIC	Ausbreitung im Becken (2a oder 2b) und maligne Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
T3 und/oder N1		III	Tumor befällt ein oder beide Ovarien, mit histologisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionären Lymphknotenmetastasen
	T3a	IIIA	Mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens
	T3b	IIIB	Makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung ≤2 cm
	T3c und/oder N1	IIIC	Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung >2 cm, und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
	NX		Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
	N0		Keine regionären Lymphknotenmetastasen
	N1		Regionäre Lymphknotenmetastasen
M1		IV	Fernmetastasen (ausschließlich Peritonealmetastasen)

Abbildung 1: Stadieneinteilung maligner Ovarialtumore nach TNM- und FIGO-Klassifikation (Kommiss F., 2009)

Allgemein werden Karzinome nach ihrem Grad der Differenzierung eingeteilt, wobei ein eindeutig definiertes Graduierungssystem für Ovarialkarzinome nicht existiert (Prat, 2009). Es kommen dreistufige Graduierungssysteme (G1-G3 bzw. gut, mäßig und schlecht differenziert) wie zum Beispiel das Graduierungssystem nach Silverberg zur Anwendung (Silverberg, 2000). Malpica (2004) empfiehlt jedoch vor allem für den serösen Subtyp eine zweistufige Graduierung nach sogenannten „*high-grade*“ (= gering differenzierte Tumorgewebe) und „*low-grade*“ (= hoch differenzierte Tumorgewebe) Karzinomen (Malpica et al., 2004).

In dieser Arbeit wurden ausschließlich seröse Ovarialkarzinome betrachtet, da es sich bei den Karzinomen vom serösen Typ mit ca. 70% um den häufigsten Subtyp der Ovarialkarzinome handelt (Prat, 2012). Darüber hinaus wurden nur Tumore in fortgeschrittenen Stadien FIGO III und IV und sogenannte „*high-grade*“ seröse Ovarialkarzinome in die Untersuchungen aufgenommen, da diese mit einer eindeutig schlechteren Prognose einhergehen.

I.1.4 Klinik und Diagnostik des Ovarialkarzinoms

Aufgrund fehlender spezifischer Frühsymptome des Ovarialkarzinoms werden etwa 70% der Patientinnen erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium (FIGO III / IV) diagnostiziert (Prat & Oncology, 2014). Symptome wie Bauchumfangszunahme, Völlegefühl,

Blähungen, unklare abdominale Schmerzen, Zunahme der Miktionsfrequenz sowie allgemeine Müdigkeit und Erschöpfung sind unspezifisch und werden daher häufig von Patientinnen und Ärzten zunächst nicht mit einem Tumorleiden in Verbindung gebracht (Bankhead et al., 2005; Olsen, Crossen, et al., 2007).

Die Verdachtsdiagnose eines Ovarialkarzinoms kann sowohl in einer Spiegel- und Tastuntersuchung als auch mit Hilfe des transvaginalen Ultraschalls erfolgen (S3-Leitlinie, 2016). Für die Beurteilung der Ausdehnung oder zum Ausschluss weiterer Differenzialdiagnosen werden weitere bildgebende Verfahren (vor allem die Computertomographie = CT) oder beispielsweise eine Koloskopie durchgeführt werden (Nam et al., 2010).

In den letzten Jahren wurden zahlreiche potenzielle Serumbiomarker beim Ovarialkarzinom identifiziert und untersucht. Serumbiomarker sind in der Regel Proteine, die in Blut, Urin oder anderen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden können. Sie können spezifisch entweder vom Tumor selbst oder als Reaktion auf das Vorhandensein eines Tumors produziert werden. Serumbiomarker dienen zur Tumorerfrüherkennung, Diagnose-sicherung, Vorhersage der Prognose und zur Überwachung des Ansprechens einer Tumorbehandlung (Hottinger & Hormigo, 2011). Der bekannteste Tumormarker für das Ovarialkarzinom ist das *Cancer Antigen 125* (CA 125) (Cramer et al., 2011; Moore et al., 2010; Moore et al., 2012; Schmalfeldt et al., 2014). Bei 80% der Patientinnen mit fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinomen ist der CA 125-Wert erhöht. Im Gegensatz dazu kann man in frühen Krankheitsstadien nur bei der Hälfte der Patientinnen eine Erhöhung von CA 125 messen. Daher spielt CA 125 in der frühen Diagnostik des Ovarialkarzinoms eher eine untergeordnete Rolle. Zudem ist die Spezifität eingeschränkt, da beispielsweise auch eine Erhöhung beim Vorliegen von benignen Erkrankungen beobachtet werden konnte. So kommen erhöhte CA 125-Werte auch bei Endometriose, Infektionen, Uterus myomatosus, Schwangerschaft oder Leber- und Autoimmunerkrankungen vor. Der isolierte Einsatz von CA 125 als Screeningmarker ist daher ungeeignet (Sarojini et al., 2012; Schmalfeldt et al., 2014; van Nagell & Pavlik, 2012). Speziell für das muzinöse Ovarialkarzinom eignen sich auch Tumormarker wie *Cancer-Antigen 19-9* (CA19-9) und *Cancer-Antigen 72-4* (CA72-4) (Gadducci et al., 2009). Neue Tumormarker wie *Human epididymis protein 4* (= HE4), *Mesothelin*, *Folat-Rezeptor alpha* und die Familie der Kalikrein-ähnlichen Peptidasen (= KLK) werden aktuell genauer untersucht. Doch auch diese sind wie das CA 125 auf Grund ihrer geringen Sensitivität und Spezifität für eine Früherkennung oder für den Einsatz als Screeningmethoden ungeeignet. Durch die Bestimmung einzelner Tumormarker konnte bislang keine Senkung der Mortalität erreicht werden. Es bestehen allerdings Hinweise, dass eine kombinierte Bestimmung mehrerer verschiedener Marker die diagnostische und prognostische Aussagekraft erhöhen könnten (Bast et al., 2005; S3-Leitlinie, 2016; Sarojini et al., 2012; Schmalfeldt et al., 2014). Daher sind geeignete Serumbiomarker eine vielversprechende Option einer früheren Diagnosesicherung und Verlaufskontrolle des Ovarialkarzinoms. Sie könnten somit zukünftig die Mortalität und Morbidität des Ovarialkarzinoms senken und sollten daher weiterhin genauer untersucht werden.

I.1.5 Therapie und Prognose des Ovarialkarzinoms

Die primäre Standardtherapie des Ovarialkarzinoms ist die Operation mit dem Ziel der endgültigen Diagnosestellung, der Evaluation der Ausdehnung und der möglichst vollständigen Entfernung allen Tumors. Die sogenannte „*Staginglaparotomie*“, besteht aus (S3-Leitlinie, 2016):

- Inspektion und Palpation der gesamten Abdominalhöhle
- Peritonealzytologie
- Biopsien aus allen auffälligen Stellen
- Peritonealbiopsien aus unauffälligen Regionen
- Adnexektomie beidseits
- Hysterektomie
- Omentektomie Mindestens infrakolisch
- Ggf. Appendektomie (bei muzinösem/unklarem Tumortyp)
- Ggf. beidseits pelvine und paraaortale Lymphonodektomie

Um das Operationsziel, die vollständige Entfernung aller makroskopisch sichtbaren Tumormanifestationen zu erreichen, bedarf es häufig einer weiteren Ausdehnung des Operationsgebietes (Peritoneum-, Darm-, Leber- oder Milzresektion). Die vollständige Resektion aller Tumoranteile ist für die Prognose von entscheidender Bedeutung (du Bois et al., 2009; Trimbos et al., 2010). Nur in Ausnahmefällen (unilateraler Tumor mit FIGO I-Stadium, nach adäquater *Staging*, inkl. Lymphonodektomie) kann eine fertilitätserhaltende Operation durchgeführt werden (Gershenson, 2005). Im Anschluss an die Operation erfolgt bei Patientinnen mit einem fortgeschrittenen Ovarialkarzinom die Chemotherapie mit Carboplatin und Paclitaxel über 6 Zyklen (du Bois et al., 1999). Eine zusätzliche Therapie über ein Jahr mit humanem monoklonalen Antikörper (Bevacizumab), welcher an den Gefäßwachstumsfaktor *vascular endothelial growth factor* (= VEGF) bindet, kann in fortgeschrittenen Stadien (FIGO IIIB und IV) das progressionsfreie Leben verlängern (Perren et al., 2011).

Als wichtige Faktoren für die Prognose gelten das Tumorstadium, die Menge an Tumorrest nach radikaler Operation, das *Tumorgrading*, histologischer Subtyp, das Alter der Patientinnen und das Auftreten von präoperativem Aszites (Mahner et al., 2009). Über 70% der Patientinnen werden in fortgeschrittenen Tumorstadien FIGO III/IV diagnostiziert. In diesen Stadien beträgt das 5-Jahres-Gesamtüberleben weniger als 30%. Im Gegensatz dazu liegt das 5-Jahres-Überleben bei früh diagnostiziertem Ovarialkarzinom bei etwa 90% (Prat & Oncology, 2014). Eine Tumorkomplettresektion führt ebenfalls zu einer deutlichen Verbesserung der Prognose, auch in bereits fortgeschrittenen Stadien. Das Gesamtüberleben kann mit einer Komplett-Resektion um etwa 30-60 Monate verlängert werden (du Bois et al., 2009). Auch bei einem Tumorrest von < 1 cm besteht noch ein signifikanter Überlebensvorteil, allerdings ist dieser nicht mit einer Komplettresektion zu vergleichen (Horowitz et al., 2015). Bei Patientinnen mit einem Alter von über 69 Jahren bei Erstdiagnose konnte eine signifikant schlechtere Prognose beobachtet werden (Mahner et al., 2009; Thigpen et al., 1993; Tingulstad et al., 2003). Auch konnte gezeigt werden, dass vorhandener Aszites bei Erstdiagnose mit einem schlechteren 5-Jahres-Überleben einhergeht (Seck et al., 2012). In dieser Arbeit werden der Resttumor, das Alter der Patientinnen und die Aszitesmenge bei Erstdiagnose als etablierte Prognoseparameter berücksichtigt.

I.2 Mammakarzinom

I.2.1 Epidemiologie

Laut aktuellen Inzidenzraten erkrankt etwa jede achte Frau im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom (= maligner Tumor der Brustdrüse). Damit ist das Mammakarzinom mit Abstand die häufigste Krebserkrankung der Frau weltweit. In Deutschland liegt die Neuerkrankungsrate bei etwa 70.000 pro Jahr. Das Erkrankungsrisiko steigt mit zunehmendem Alter der Frau. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei etwa 64 Jahren, wobei drei von zehn Frauen bei Diagnosestellung unter 55 Jahren sind. Durch die Einführung des Mammographie Screenings und die Fortschritte bei der Therapie kam es in den letzten Jahrzehnten zu einem Rückgang der Sterberate. Jedoch ist das Mammakarzinom mit einer Mortalitätsrate von 17,8 % immer noch die häufigste krebssbedingte Todesursache der Frau (Robert Koch Institut, 2017a).

I.2.2 Risikofaktoren

Zu den wesentlichen Risikofaktoren des Mammakarzinoms gehören das weibliche Geschlecht, ein steigendes Lebensalter und das Vorkommen von Mammakarzinomen in der Verwandtschaft. Zusätzlich existieren hormonelle Risikofaktoren: Frauen mit einer frühen Menarche und einer späten Menopause, Nulliparität oder einem hohen Alter bei Erstparität sowie fehlende Laktation führen zu einer erhöhten Erkrankungsrate. Auch ein hoher *Body Mass Index* (= BMI) bedingt eine signifikante Zunahme des Risikos, an einem Mammakarzinom zu erkranken. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass regelmäßige Ausübung von Sport das Mammakarzinom-Risiko senken kann. Exogen zugeführte Hormone wie Gestagene und Östrogene, welche in oralen Kontrazeptiva und in der postmenopausalen Hormontherapie eingesetzt werden, können auch zur Brustkrebsentstehung beitragen (Albert U.S., 2008; H.P. Hellemann, 2011; Robert Koch Institut, 2017a; Romieu et al., 1990). Dichtes Brustdrüsengewebe, gutartige Brustveränderungen ohne Atypien sowie atypische duktale Hyperplasie bei Frauen zeigen ein erhöhtes Risiko, am Mammakarzinom zu erkranken (Deutsche Krebsgesellschaft, 2018; Dupont et al., 1993; London et al., 1992; Robert Koch Institut, 2017a). Das Auftreten von Mammakarzinomen oder Ovarialkarzinomen bei Verwandten ersten Grades erhöht das Erkrankungsrisiko deutlich. Bei Frauen mit einer nachgewiesenen Mutation im Bereich der Risikogene BRCA1 oder BRCA2 liegt das Erkrankungsrisiko für ein Mammakarzinom sogar bei etwa 50-80% (Antonioni et al., 2003; Deutsche Krebsgesellschaft, 2018; Robert Koch Institut, 2017a).

I.2.3 Histologische Klassifikation, Stadieneinteilung und Immunhistochemie des invasiven Mammakarzinoms

Histologisch erfolgt die Unterteilung der Mammakarzinome in nicht invasive sowie invasive Karzinome. Die nicht invasiven Karzinome, sogenannte *Carcinoma in situ*, werden häufig früher entdeckt und haben auch deshalb eine gute Prognose. Die invasiven

Mammakarzinome werden nach der aktuellen WHO-Klassifikation aufgrund ihrer Histologie in verschiedene Untergruppen unterteilt. 5-15 % der Mammakarzinome sind vom lobulären Typ. Seltener handelt es sich um Subtypen wie tubuläre, medulläre, muzinöse oder papilläre Karzinome. Die mit Abstand häufigste Tumorentität mit 50-80% ist das invasive Karzinom vom nicht speziellen Typ (NST = *no special type*, früher als invasiv duktales Karzinom bezeichnet) (Deutsche Krebsgesellschaft, 2018; Lakhani, 2012; Mayr D., 2011).

Das *Grading* aller invasiven Mammakarzinome erfolgt aktuell nach Elston und Ellis:

nach Beurteilung von histo- und zytologischen Kriterien, Tubulusbildung der Tumorzellen, Kernpolymorphie und Mitoserate, und daraus folgender Bildung eines Summen-Scores erfolgt die Tumorgraduierung in 3 Stufen: G1: gut differenziert, G2: mäßig differenziert und G3: schlecht differenziert (Deutsche Krebsgesellschaft, 2018; Elston & Ellis, 1991; Mayr D., 2011).

Die TNM-Klassifikation der UICC der invasiven Mammakarzinome erfolgt anhand der Parameter Tumorgröße (T), Lymphknotenbefall (N) und Bildung von Fernmetastasen (M) (siehe Tabelle 1). Eine Erweiterung erfuhr diese Klassifikation um die Angaben von Residualtumor (R), Lymphgefäß- und Veneninvasion (L und V) und Perineuralscheideninvasion (Pn) (Deutsche Krebsgesellschaft, 2018; Harris et al., 2003; O'Sullivan et al., 2017).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms (O'Sullivan et al., 2017)

pT – Primärtumor	
pTX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	Kein Anhalt für Primärtumor
pT1	Primärtumor ≤ 2 cm
pT2	Primärtumor > 2 cm, aber < 5 cm
pT3	Primärtumor > 5 cm
pT4	Primärtumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut
pN – Regionäre Lymphknoten	
pNX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
pN0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
pN1	Metastasen in 1-3 Lymphknoten
pN2	Metastasen in 4-9 Lymphknoten
pN3	Metastasen in ≥ 10 Lymphknoten
pM – Fernmetastasen	
pMX	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
pM0	Keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen
R- Residualtumor	
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor
L –Lymphgefäßinvasion	
L0	Keine Tumorzellen in Lymphbahn
L1	Tumorzellen in Lymphbahn vorhanden

Zur Primärdiagnostik gehört bei allen histologisch diagnostizierten invasiven Mammakarzinomen die immunhistochemische Bestimmung der Expressionen des Östrogen- (= ER) und Progesteronrezeptors (= PR) sowie des human epidermalen Wachstumsrezeptors 2 (= HER2). Der Nachweis von ER/PR-Überexpression (>/ = 0%) in den Tumorzellen spricht für ein endokrin sensibles Ansprechen einer adjuvanten Hormon-

therapie mit Tamoxifen oder Aromatasehemmern. Die Expression von HER2 ist Voraussetzung für eine Therapie mit einem Antikörper gegen HER2 (Trastuzumab/Pertuzumab).

Die Expression von HER2 wird in einer Skala von 0-3 angegeben. Bei 0 und 1 liegt keine Überexpression der HER2 vor. Von einer Überexpression von HER2 wird bei 2+ und 3+ ausgegangen, wobei bei einem immunhistochemischen Wert von 2+ nochmals eine Validierung der Genamplifikation mittels *in situ*-Hybridisierung erfolgen muss. Für eine Behandlung mit Trastuzumab muss also eine immunhistochemische Überexpression 3+ oder eine in der *in situ*-Hybridisierung nachgewiesene Genamplifikation vorliegen. Zusätzlich wird die Proliferationsrate der Tumorzellen mittels immunhistochemischem Nachweis von Ki-67 bestimmt. Ki-67 spielt eine wichtige Rolle bei der Zellteilung und ist in allen proliferierenden Zellen nachweisbar. Eine hohe Ki-67 Proliferationsrate zeigt in der Regel ein gutes Ansprechen auf eine Behandlung mit Chemotherapeutika an (Deutsche Krebsgesellschaft, 2018; Hammond et al., 2010; Mayr D., 2011; Wolff et al., 2013).

Anhand der Expressionsmuster ergeben sich 4 verschiedene invasive Karzinomsubtypen (s. Tabelle2):

Tabelle 2: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms und immunhistochemisches Expressionsmuster (Mayr D., 2011; Meindl et al., 2011)

	ER	PR	HER2	Ki-67
LuminalA-Typ	+	+	-	< 14%
LuminalB-Typ	+	-	-/+	> 14%
HER2+-Typ	-	+	+	> 20%
Basal-like Typ (triple-negativer Typ)	-	-	-	50-60%

1.2.4 Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Prognose des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist in frühen Stadien häufig symptomlos. In fortgeschrittenen Stadien zeigen sich dann Veränderungen wie ein tastbarer Knoten, Hauteinziehungen, Veränderungen der Brustwarzen oder Schwellungen der Lymphknoten im Achselbereich. Zur Früherkennung wird Frauen zwischen dem 50. und 69. Lebensjahr alle zwei Jahre die Teilnahme am Mammographie-Screening-Programm empfohlen. Bei der Mammographie handelt es sich um eine Röntgenuntersuchung der Brust, welche die Gewebestruktur der Brust genauer untersucht. Als suspekta Befunde gelten hier zum Beispiel der Nachweis von Mikrokalk, Asymmetrien, Verdichtungen und nachweisbare Knoten (Deutsche Krebsgesellschaft, 2018). Bei auffälligen Befunden wird zunächst eine Basisdiagnostik empfohlen. Diese besteht aus einer Anamnese, der klinischen Untersuchung der Brust sowie der Lymphabflussgebiete und einer Ultraschalluntersuchung. Zur diagnostischen Sicherung soll dann die histologische Abklärung mittels Stanzbiopsie, Vakuumbiopsie oder in Ausnahmefällen durch offene Exzisionsbiopsie erfolgen. Damit können dann die prätherapeutisch notwendigen tumorbiologischen Faktoren (Tumortyp,

Grading, Hormonrezeptorstatus, HER2-Status, Proliferationsindex Ki-67) zur weiteren Therapieplanung erfasst werden (Dahabreh et al., 2014; Deutsche Krebsgesellschaft, 2018; Thill et al., 2018).

Die Therapie des invasiven Mammakarzinoms setzt sich aus den Therapiesäulen operative Therapie, Strahlentherapie und systemische Therapie (endokrine-, Chemo- und Antikörpertherapie) zusammen. Generell besteht die Empfehlung, bei invasiven Mammakarzinomen die vollständige operative Tumorentfernung durch brusterhaltende Operation oder Mastektomie mit gegebenenfalls primärer oder sekundärer Brustrekonstruktion durchzuführen. Ein weiterer Bestandteil der operativen Therapie ist das axilläre Staging (Sentinellymphknoten-Entfernung oder Axilladisektion). Im Anschluss an die brusterhaltende Therapie bei invasivem Mammakarzinom ist eine Bestrahlung der betroffenen Seite indiziert, um einem Lokalrezidiv vorzubeugen (Clarke et al., 2005; Deutsche Krebsgesellschaft, 2018; London et al., 1992; Lyman et al., 2017; Schnitt et al., 2015; Thill et al., 2018). Eine Empfehlung zur – wenn möglich neoadjuvant durchzuführenden - systemischen Therapie berücksichtigt verschiedene tumorbiologischen Faktoren, wie beispielsweise höheres *Grading*, Lymphknotenbefall, HER2-Positivität, triple-Negativität (also weder der Nachweis von Hormon-, noch von HER2-Überexpression), und junges Erkrankungsalter (<35 Jahre). Für ausgesuchte Patientinnen gibt es außerdem die Möglichkeit, mit Genexpressionstests (Oncotype DX®, Endopredict®) das individuelle Risiko weiter einzuschätzen (Albert U.S., 2008; Dubsy, Brase, et al., 2013; Dubsy, Filipits, et al., 2013; Filipits et al., 2011; Martin et al., 2014). Eine Chemotherapie für das primäre Mammakarzinom sollte ein Taxan und ggf. ein Anthrazyklin enthalten (Deutsche Krebsgesellschaft, 2018; Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, 2005; Goldhirsch et al., 2011).

Patientinnen mit HER2-überexprimierenden Tumoren wird in Kombination mit der Chemotherapie und anschließend für insgesamt ein Jahr eine HER2-gerichtete Antikörpertherapie (mit Trastuzumab und ggf. Pertuzumab) verabreicht (Deutsche Krebsgesellschaft, 2018; Moja et al., 2012; Petrelli & Barni, 2012).

Patientinnen mit Steroidhormonrezeptor-positiven Tumoren erhalten anschließend an eine Chemotherapie oder anstelle eine antihormonelle Therapie mit Tamoxifen, einem selektiven Östrogenrezeptormodulator (SERM) oder Aromatasehemmern, ggf. in Kombination mit einem GnRH-Analogon (je nach Menopausenstatus und individuellem Risiko) Die endokrine Therapie senkt die Wahrscheinlichkeit eines Lokalrezidivs signifikant (Deutsche Krebsgesellschaft, 2018; Thill et al., 2018).

Wie oben schon angedeutet, orientieren sich die Therapieempfehlungen beim Mammakarzinom Faktoren entscheidend nach prognostischen Faktoren der Erkrankung, wie dem Alter, Menopausenstatus, Tumorgröße, Lymphknotenstatus, histologischer Typ, *Grading*, Hormonrezeptorstatus, HER2-Status und Ki-67-Proliferationsindex (Deutsche Krebsgesellschaft, 2018; Schaller G., 2011).

Der Subtyp des triple-negativen Mammakarzinom mit fehlender Expression der Hormonrezeptoren und fehlender Überexpression von HER2 macht etwa 10–15 % aller Mammakarzinome aus und ist mit einer deutlich schlechteren Prognose verknüpft. Der hohe Proliferationsindex sowie die fehlende Erhaltungstherapie, wie die endokrine Therapie verschlechtern die Prognose. Als medikamentöse Therapieoption stehen uns zum heutigen Zeitpunkt nur die Chemotherapie sowie eine neoadjuvante Antikörpertherapie

mit Pembrolizumab zur Verfügung (Dent et al., 2007; Gluz et al., 2009; Liedtke et al., 2016).

I.3 Kallikrein-ähnliche Peptidasen (KLK) und ihre Rolle im Tumorgeschehen

Die humanen Kallikrein-ähnlichen Peptidasen (= KLKs) bilden eine Familie innerhalb der Serinproteasen, die 15 nah-verwandte Enzyme umfasst (KLK 1-15). Der Genlocus der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen erstreckt sich über eine 300 kb-Region und ist auf Chromosom 19q13.3-13.4 zu finden (Yousef, Chang, et al., 2000). KLKs sind extrazelluläre Proteasen mit unterschiedlicher Spezifität. Sie spalten verschiedene Substrate und besitzen daher unterschiedliche biologische Funktionen (Sotiropoulou et al., 2009). Sie sind an Prozessen wie z.B. der Hautabschilferung, der Verflüssigung von Sperma, der renalen Homöostase und Zahnschmelzbildung beteiligt (Borgono et al., 2004). Außerdem regulieren KLKs die Embryogenese, Schwangerschaft, Blutgerinnung, Komplementaktivierung und Wundheilung (Schmitt & Magdolen, 2009; Schmitt et al., 2013). Die Freisetzung der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen aus dem Gewebe kann sowohl in das Blut, den Aszites, die Alveolar- als auch in die Zerebrospinalflüssigkeit erfolgen. KLKs sind an der Zell-Proliferation und -Signalisierung, -Migration und -Invasion sowie Apoptose und Zelltod beteiligt. Diese spielen nicht nur unter physiologischen Bedingungen sondern auch in der Krebsentwicklung eine wichtige Rolle (Schmitt et al., 2013).

Es kommt vor allem in hormonabhängigen Tumoren zu einer deregulierten Expression der KLK-Mitglieder. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression bestimmter KLKs, je nach Tumorart, das Tumorstadium, die Angiogenese, die Invasion und die Metastasierung unterstützen. Daher gelten viele KLK-Mitglieder als potenzielle Tumormarker (Borgoño & Diamandis, 2004; Dorn et al., 2014). Das bekannteste KLK ist das Prostata-spezifische Antigen (= PSA = KLK3), welches in den Zellen des Prostatakarzinoms vermehrt exprimiert ist, und sich im Serum der Patienten nachweisen lässt. PSA ist damit wertvollster Biomarker in der Diagnostik und der Therapie-Überwachung des Prostatakarzinoms (Balk et al., 2003). Die Expression anderer KLK (KLK1-15) ist abhängig von der Art des Tumors mit einer günstigen oder ungünstigen Prognose verknüpft (Emami & Diamandis, 2008b; Schmitt et al., 2013).

I.3.1 Kallikrein-ähnliche Peptidasen im Ovarialkarzinom

Kallikrein-ähnliche Peptidasen KLK4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14 und 15 wurden sowohl im Tumorgewebe als auch im Serum von Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom nachgewiesen. Sie wurden in den Zellen des Ovarialkarzinoms auf mRNA- und Proteinebene im Vergleich zu benignen Geschehen vermehrt exprimiert (Borgoño & Diamandis, 2004; Pampalakis & Sotiropoulou, 2007; Wagner, 2009; Yousef, Stephan, et al., 2003).

KLK4- und KLK5-mRNA-Überexpressionen konnten mit äußerst aggressiven Formen des Ovarialkarzinoms in Verbindung gebracht werden (Pampalakis & Sotiropoulou, 2007; Wagner, 2009). Auch eine vermehrte KLK6-Expression konnte im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom gefunden werden. Sie war mit einem früheren Rezidiv, einem ge-

ringeren Gesamtüberleben und einem schlechteren Chemotherapieansprechen assoziiert (Ahmed et al., 2016; Diamandis et al., 2003; Kountourakis et al., 2008; Loessner et al., 2012; Seiz et al., 2012; White, Mathews, Yousef, Prizada, Popadiuk, & Dore, 2009). Ovarialtumoren mit einem höheren *Grading* (G3) weisen eine erhöhte KLK7- Expression im Vergleich zu Tumoren mit niedrigem *Grading* (G1/2) auf. Bei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom, bei denen keine KLK7- Expression nachzuweisen war, konnte ein längerer krankheitsfreier Verlauf gezeigt werden (Kyriakopoulou et al., 2003; Pampalakis & Sotiropoulou, 2007; Wagner, 2009). Es zeigte sich auch eine hohe Expression von KLK8 im Serum, Aszites und im Tumorgewebe bei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom (Ahmed et al., 2016; Kishi et al., 2003). Allerdings ist umstritten, wie sich eine hohe KLK8- Expression auf die Prognose auswirkt. Studien zeigten je nach untersuchtem Kollektiv entweder eine Assoziation einer hohen oder einer niedrigen KLK8-Expression mit einem verlängerten und rezidivfreien Krankheitsverlauf (Ahmed et al., 2016; Borgono et al., 2006; Shigemasa, Tian, et al., 2004). Für KLK9 wurde eine erhöhte Expression bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom im frühen Krankheitsstadium festgestellt. Das Expressionsniveau von KLK9 verhält sich umgekehrt zu den Werten des Tumor-Markers CA 125. KLK9-positive Patientinnen wiesen ein wesentlich längeres progressionsfreies und Gesamt-Überleben auf (Geng et al., 2017; Yousef, Kyriakopoulou, et al., 2001). Im Falle von KLK10 zeigte sich, dass hohe Serumspiegel signifikant mit einem fortgeschrittenen Stadium seröser Tumoren einhergehen. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass eine hohe KLK10-Expression mit einer unvollständigen Tumorsektion und einem schlechteren Ansprechen auf eine Chemotherapie assoziiert war (Geng et al., 2017; Luo, Yousef, & Diamandis, 2003; Paliouras & Diamandis, 2008; Wagner, 2009). Die Bedeutung einer erhöhten Expression von KLK11 ist derzeit noch umstritten. Etwa 70% der Ovarialkarzinompatientinnen weisen erhöhte KLK11- Serumwerte auf. Einige Studien berichteten, dass eine erhöhte KLK11-Expression mit einer günstigeren Prognose assoziiert ist (Borgono et al., 2003; Diamandis et al., 2004; Geng et al., 2017; McIntosh et al., 2007). Im Gegensatz dazu zeigten andere Studien, dass auch niedrige KLK11-Werte mit einer günstigeren Prognose in Verbindung gebracht werden (Shigemasa, Gu, et al., 2004). Auch KLK15 konnte in Ovarialkarzinomen nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass erhöhte KLK15-Werte mit einer reduzierten Progressionsfreiheit und verringertem Gesamtüberleben einhergehen (Yousef, Scorilas, Katsaros, et al., 2003). Jedoch konnte in neueren Studien nachgewiesen werden, dass erhöhte KLK15-mRNA-Spiegel im Rahmen von fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen mit einem längeren Gesamtüberleben assoziiert sind (Geng et al., 2017). Eine Zusammenfassung der Bedeutung der einzelnen KLK findet sich in Tabelle 3.

Tabelle 3: Bedeutung der Expressionsmuster der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen für die Prognose des Ovarialkarzinoms

KLK	Expression	Prognose	Quelle
4	↑ Expression in aggressiven Tumoren	Reduziertes Gesamtüberleben	(Pampalakis & Sotiropoulou, 2007; Wagner, 2009)
5	↑ Expression in aggressiven Tumoren	Reduziertes Gesamtüberleben	(Pampalakis & Sotiropoulou, 2007; Wagner, 2009)
6	↑ Expression in fortgeschrittenem serösen Ovarialkarzinom	Reduziertes Gesamtüberleben	(Ahmed et al., 2016; Diamandis et al., 2003; Kountourakis et al., 2008; Loessner et al., 2012; Seiz et al., 2012; White, Mathews, Yousef, Prizada, Popadiuk, & Dore, 2009)
7	↑ Expression in Tumoren mit höherem Grading ∅ Expression	Längerer rezidivfreier Verlauf	(Kyriakopoulou et al., 2003; Pampalakis & Sotiropoulou, 2007; Wagner, 2009)
8	↑ Expression	Längerer rezidivfreier Verlauf; Längeres Gesamtüberleben	(Ahmed et al., 2016; Borgono et al., 2006; Shigemasa, Tian, et al., 2004)
	↓ Expression	Längerer rezidivfreier Verlauf; Längeres Gesamtüberleben	(Ahmed et al., 2016; Kountourakis et al., 2009)

9	↑ Expression bei Ovarialkarzinompatientinnen mit frühem Krankheitsstadium; umgekehrtes Expressionsverhalten wie Ca125	Längerer rezidivfreier Verlauf; Längeres Gesamtüberleben	(Geng et al., 2017; Yousef, Kyriakopoulou, et al., 2001)
10	↑ Expression bei serösen fortgeschrittenen Tumoren, bei suboptimaler Tumoresektion und bei schlechtem bzw. keinem Ansprechen auf eine Chemotherapie	Reduziertes Gesamtüberleben; Diagnostische Relevanz	(Geng et al., 2017; Luo, Yousef, & Diamandis, 2003; Paliouras & Diamandis, 2008; Wagner, 2009)
11	↑ Expression	Längeres Gesamtüberleben	(Borgono et al., 2003; Diamandis et al., 2004; Geng et al., 2017; McIntosh et al., 2007)
	↓ Expression	Verlängertes Gesamtüberleben	(Shigemasa, Gu, et al., 2004)
15	↑ Expression	Längeres Gesamtüberleben und kürzerer rezidivfreier Verlauf	(Yousef, Scorilas, Katsaros, et al., 2003)
	↑ Expression bei fortgeschrittenem serösen Ovarialkarzinom	Längeres Gesamtüberleben	(Geng et al., 2017)

↑ = erhöhte Expression; ↓ = erniedrigte Expression; Ø = keine Expression

1.3.2 Kallikrein-ähnliche Peptidasen im Mammakarzinom

Alle Kallikrein-ähnlichen Peptidasen werden im gesunden Brustgewebe entweder auf mRNA- oder Proteinebene exprimiert. Die Freisetzung der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen erfolgt hauptsächlich im Drüsenepithel der Brust. Sie können in Brustsekreten wie der Muttermilch, Zystenflüssigkeit und im Nippelaspirat nachgewiesen werden (Petraki et al., 2006; Schmitt et al., 2013; Shaw & Diamandis, 2007). Im Hinblick auf Brustkrebserkrankungen wurde bereits die Expression vieler KLK untersucht (Schmitt et al., 2013; Shaw & Diamandis, 2007; Wagner, 2009). Dabei scheint es, dass die meisten

KLK eine reduzierte Expression in den Zellen des Mammakarzinoms aufweisen. Ausschließlich KLK4 und KLK15 werden im Brustkrebs vermehrt exprimiert (Avgeris et al., 2012; Mange et al., 2008; Schmitt et al., 2013; Yousef et al., 2004). Die Expressionslevel von KLK3, 5, 7, 9, 10 sowie 12-15 können prognostische Hinweise auf den Krankheitsverlauf liefern. Eine Zusammenfassung der Bedeutung der verschiedenen Unterformen der KLK findet sich in Tabelle 4 (Schmitt et al., 2013).

Obwohl KLK3 vor allem für das Prostatakarzinom spezifisch ist, konnte KLK3 auch bei der Frau im Mammakarzinom nachgewiesen werden. Niedrige Protein-Werte von KLK3 (= PSA) konnten häufiger im Gewebe oder im Serum bei Patientinnen mit größeren Mammatumoren, Steroidhormonrezeptor-negativen Tumoren sowie bei älteren und postmenopausalen an Brustkrebs erkrankten Patientinnen gefunden werden. Jedoch konnte bisher kein Zusammenhang zwischen den KLK3-Werten und dem *Grading* oder der Anzahl der beteiligten Lymphknoten festgestellt werden. Höhere KLK3-Werte sind aber insgesamt mit einem prognostisch günstigeren Krankheitsverlauf verbunden. Darüber hinaus sind sowohl hohe KLK3- als auch KLK10- Protein-Expressionen mit einem schlechteren Ansprechen auf Tamoxifen assoziiert (Borgono et al., 2004; Foekens et al., 1999; Luo et al., 2002; Schmitt et al., 2013).

Eine hohe KLK5-mRNA-Expression wurde häufiger bei Patientinnen in der Prä- oder Perimenopause, Östrogenrezeptor-negativen Tumoren und bei Patientinnen mit Lymphknotenbefall festgestellt. Eine Überexpression von KLK5 -mRNA geht mit einem kürzeren progressionsfreien und Gesamt-Überleben einher (Borgoño & Diamandis, 2004; Emami & Diamandis, 2008b; Obiezu & Diamandis, 2005; Yousef, Scorilas, Kyriakopoulou, et al., 2002).

Im Gegensatz dazu weist eine niedrige KLK7-Genexpression eine signifikante Assoziation mit frühen Tumorstadien auf. Zusätzlich wurde eine signifikante Assoziation zwischen niedriger KLK7- Expression und Progesteron-negativen Mammatumoren nachgewiesen. Eine verminderte KLK7-Expression wird mit einer besseren Prognose in Verbindung gebracht (Obiezu & Diamandis, 2005; Talieri et al., 2004).

Ein längeres krankheitsfreies und Gesamtüberleben wurde bei KLK9-positiven Tumoren nachgewiesen, wobei eine Überexpression von KLK9 vor allem bei Brustkrebspatientinnen im Frühstadium sowie bei Patientinnen mit kleiner Tumorgroße gefunden wurde (Geng et al., 2017; Obiezu & Diamandis, 2005; Yousef, Scorilas, Nakamura, et al., 2003).

Es konnte bisher kein Zusammenhang einer Expression von KLK10 und dem krankheitsfreien- oder Gesamtüberleben bestätigt werden. Jedoch kann eine Überexpression von KLK10 als unabhängiger prädiktiver Marker für das Ansprechen der Tamoxifentherapie genutzt werden (Luo et al., 2002; Obiezu & Diamandis, 2005). Zusätzlich wurde beschrieben, dass ein Verlust der KLK10-Expression den Tumorprogress begünstigt und eine hohe Invasivität zur Folge hat (Paliouras & Diamandis, 2007; Wagner, 2009).

Es wird vermutet, dass eine erhöhte Expression von KLK12 und KLK15 mit einer besseren Prognose bezüglich des Krankheitsverlaufes und des Gesamtüberlebens assoziiert sein kann (Geng et al., 2017; Yousef, Scorilas, Magklara, et al., 2002).

Tabelle 4: Bedeutung der Expressionsmuster der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen für die Prognose des Mammakarzinoms

KLK	Expression	Prognose	Quelle
KLK3	↓ Expression bei größeren Mammatumoren, Steroidhormonrezeptor-negativen Tumoren, älteren und postmenopausalen Patientinnen	Günstigerer Krankheitsverlauf, gutes Ansprechen auf Tamoxifentherapie	(Borgono et al., 2004; Foekens et al., 1999; Luo et al., 2002; Schmitt et al., 2013)
KLK5	↑ Expression bei Patientinnen in der Prä- oder Perimenopause, Östrogenrezeptor-negativen Tumoren und Lymphknotenbefall	Reduziertes Gesamtüberleben; kürzerer Rezidiv-freier Verlauf	(Borgoño & Diamandis, 2004; Emami & Diamandis, 2008b; Obiezu & Diamandis, 2005; Yousef, Scorilas, Kyriakopoulou, et al., 2002)
KLK7	↓ Expression bei niedrigem Tumorstadium sowie Progesteron-negativem Tumoren ↑ Expression	Reduziertes Gesamtüberleben	(Obiezu & Diamandis, 2005; Talieri et al., 2004)
KLK9	↑ Expression im Frühstadium	Längerer rezidivfreier Verlauf; Längeres Gesamtüberleben	(Geng et al., 2017; Obiezu & Diamandis, 2005; Yousef, Scorilas, Nakamura, et al., 2003)
KLK10	↑ Expression ∅ Expression	unabhängiger prädiktiver Marker für das Ansprechen der Tamoxifentherapie hohe Invasivität des Tumors	(Luo et al., 2002; Obiezu & Diamandis, 2005) (Paliouras & Diamandis, 2007; Wagner, 2009)

KLK12	↑ Expression	Längerer rezidivfreier Verlauf; Längeres Gesamtüberleben	(Talieri et al., 2012)
KLK15	↑ Expression	Längerer rezidivfreier Verlauf; Längeres Gesamtüberleben	(Geng et al., 2017; Yousef, Scorilas, Magklara, et al., 2002)

↑ = erhöhte Expression; ↓ = erniedrigte Expression; ∅ = keine Expression

I.4 Kallikrein-ähnliche Peptidasen 13 und 14

Da sich diese Arbeit vor allem auf die humanen KLK13 und -14 und deren mögliche Rolle als klinisch relevante Biomarker bei Ovarialkarzinomen und Mammakarzinomen konzentriert, werden diese im folgenden Abschnitt genauer betrachtet.

I.4.1 KLK13 unter physiologischen Bedingungen

KLK13 wird in einer Vielzahl von Geweben, z.B. in Prostata, Speicheldrüsen, Brust, Gebärmutterhals, Niere und Hoden exprimiert (Dorn et al., 2013; Yousef, Stephan, et al., 2003). Es kommt auch in großen Mengen in der Speiseröhre, in den Tonsillen, Haut, Lunge und Schilddrüse vor. Darüber hinaus ist das Protein KLK13 in einer Reihe von biologischen Flüssigkeiten (Samenflüssigkeit, Fruchtwasser, Muttermilch sowie Follikelflüssigkeit) zu finden. Man geht also davon aus, dass KLK13 vor allem in Drüsenepithel gebildet und von dort sezerniert wird (Kapadia et al., 2003; Petraki et al., 2003). Eine vermehrte Bildung von KLK13 wird durch Steroidhormone wie Progesteron, Androgene und Östrogene induziert (Yousef, Chang, & Diamandis, 2000). KLK13 ist zusammen mit KLK1, -6, und -10 an der Weiterverarbeitung von Peptidhormonen im endokrinen Pankreas verantwortlich. Immunhistochemische Studien zeigten, dass diese KLKs sowohl in den Langerhans'schen Inselzellen als auch in den spezialisierten α -, β -, δ - und pankreatische-Polypeptid-Zellen exprimiert werden. Diese synthetisieren Insulin, Glukagon, Somatostatin und pankreatisches Polypeptid (Borgono et al., 2004; ole-MoiYoi et al., 1979; Petraki et al., 2003). Weiterhin besitzt KLK13 eine intrinsische katalytische Aktivität, die zur Autoaktivierung führen kann. KLK13 ist in der Lage, spezifisch Plasminogen zu spalten und folglich Angiostatin-ähnliche Fragmente herzustellen. Demnach wird vermutet, dass KLK13 eine eher antiangiogene Wirkung aufweist. Somit könnte es KLK13 möglich sein, die Gefäßbildung bei Tumorerkrankungen einzudämmen (Borgono et al., 2004; Sotiropoulou et al., 2003).

I.4.2 Rolle von KLK13 im Tumorgeschehen

Ergänzend zu den bereits beschriebenen Eigenschaften zeigte sich, dass KLK13 die Fähigkeit besitzt, Bestandteile der extrazellulären Matrix (= EZM) wie Kollagene, Fibronektin und Laminin zu spalten. Die EZM reguliert die Zellmigration, Differenzierung, Proliferation, Metastasierung und Invasion von Tumoren. Sobald die extrazelluläre Matrix abgebaut ist, neigen Tumorzellen zur Metastasierung. Folglich könnte KLK13 durch die Spaltung der EZM-Bestandteile Tumormetastasierung, perizelluläre Proteolyse und Tumorerkrankung begünstigen (Blacque & Worrall, 2002; Fertala et al., 2001; Kapadia et al., 2004). Da sich diese Arbeit vor allem mit der Bedeutung der KLK13 und -14 im Ovarialkarzinom beschäftigt, soll im Folgenden die KLK13 Expression in verschiedenen Tumorgeweben und im Besonderen im Ovarialkarzinom betrachtet werden.

I.4.2.1 KLK13 im Ovarialkarzinom

KLK13 wurde bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom sowohl im Tumorgewebe als auch in Aszites und Serum sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen (Dorn et al., 2014; Kapadia et al., 2003; Scorilas et al., 2004; White, Mathews, Yousef, Prizada, Fontaine, et al., 2009). Gegenüber benignen Ovarialtumoren, welche keine KLK13-Expression aufwiesen, zeigten sich bei ca. 50% der Patientinnen mit malignen Ovarialtumoren erhöhte KLK13-Expressionslevel (Kapadia et al., 2003). Immunhistochemische Analysen konnten eine Expression von KLK13 vor allem im Zytoplasma der Epithelzellen nachweisen. Eine verstärkte Färbung wurde dabei sowohl in malignen Ovarialtumoren des serösen als auch muzinösen Subtyp gefunden. Es wurde auch gezeigt, dass eine hohe KLK13-mRNA-Expression im Tumorgewebe mit einem 2,2-fach erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Rezidivs verknüpft ist (White, Mathews, Yousef, Prizada, Popadiuk, & Dore, 2009). Im Gegensatz dazu deuteten andere Studien darauf hin, dass eine hohe KLK13-Proteinkonzentration im Tumorgewebe mit einem Tumorstadium (FIGO I/II), keinem Resttumor und optimaler Tumorreduktionsoperation einhergeht. Dieses Ergebnis unterstützt die These, dass eine hohe KLK13-Konzentration mit einer günstigeren Prognose assoziiert ist (Scorilas et al., 2004). Derart variierende Resultate können vor allem durch die verschiedenen Methoden begründet werden, mit denen die KLK13-Konzentration auf mRNA- und Proteinebene untersucht wurden (Dorn et al., 2014). Zusätzlich zu diesen Befunden wurde vermutet, dass die kombinierte Bestimmung von CA 125, KLK6 und KLK13 die Sensitivität der Früherkennung vom Ovarialkarzinom im Vergleich zur alleinigen Bestimmung von CA 125 deutlich erhöhen kann (White, Mathews, Yousef, Prizada, Fontaine, et al., 2009). Zum jetzigen Zeitpunkt ist jedoch die prognostische Bedeutung der KLK13-Expression im Ovarialkarzinom noch nicht eindeutig geklärt.

I.4.2.2 KLK13 in anderen Karzinomen

Neben der Expression im Ovarialkarzinom wurden erhöhte KLK13-Expressionslevel auch in anderen Tumorentitäten gefunden. Je nach Tumorentität ist die prognostische Bedeutung der KLK13-Expression unterschiedlich. In mehreren Studien konnte eine hohe KLK13-Konzentration mit einer geringeren Krankheitslast, früherem klinischem Stadium und besserem Überleben assoziiert werden (Dettmar et al., 2018). KLK13 erwies sich dabei als statistisch unabhängiger, prognostisch günstiger Marker für Brustkrebs,

Magenkrebs, Darmkrebs und Lungenkrebs (Chang et al., 2002; Gueugnon et al., 2015; Konstantoudakis et al., 2010; Planque, Blechet, et al., 2008; Talieri et al., 2009).

Eine hohe KLK13-Expression war im Brustkrebs mit Östrogen-positiven, Lymphknoten-positiven und geringgradigen Tumoren assoziiert. Somit ist eine KLK13-Expression mit einem signifikant längeren progressionsfreien- und Gesamtüberleben bei Brustkrebs verbunden (Chang et al., 2002). Bei Patienten mit Magenkrebs wurde im Vergleich zum Normalgewebe häufig eine niedrigere KLK13-Expression festgestellt. Hier schien eine Überexpression von KLK13 mit einem signifikant erhöhten krankheitsfreien Überleben mit geringerem Risiko für Rezidive sowie einem längeren Gesamtüberleben assoziiert zu sein (Konstantoudakis et al., 2010). Die KLK13-Expression und deren Bedeutung für die Prognose wurde ebenfalls bei nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (= NSCLC) untersucht. Eine höhere KLK13-Expressionsrate wurde im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe und mehr bei weiblichen als bei männlichen Patienten gefunden. Im Hinblick auf das Gesamtüberleben spielt eine hohe KLK13-Expression eine günstige prognostische Rolle (Gueugnon et al., 2015). Bei Hoden- und Nierentumoren wurde dagegen eine geringere Expression von KLK13 als im Normalgewebe festgestellt. Ob die niedrige KLK13-Expression dabei eine prognostische Bedeutung hat, ist noch unklar (Chang et al., 2001; Dettmar et al., 2018; Luo, Yousef, & Diamandis, 2003).

Die Rolle von KLK13 für die Prognose und Diagnostik im Rahmen verschiedener Krebserkrankungen scheint zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht eindeutig geklärt zu sein. Einerseits ist vorstellbar, dass KLK13 auf Grund seiner physiologischen Eigenschaften der Spaltung von EZM-Proteinen das Fortschreiten von Tumor-Erkrankungen begünstigt. Dennoch ist eine Expression von KLK13 nicht immer mit einer ungünstigen Prognose verknüpft. Daher soll die Bedeutung von KLK13 im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht werden.

1.4.3 KLK14 unter physiologischen Bedingungen

KLK14 wird ebenso in diversen Geweben exprimiert. KLK14 ist sowohl im zentralen Nervensystem, der Haut, als auch in endokrinen Geweben wie der Gebärmutter, den Eierstöcken, der Brustdrüse, der Prostata und der Schilddrüse zu finden (Borgono et al., 2007; Dettmar et al., 2018; Hooper et al., 2001). KLK14 wurde in biologischen Flüssigkeiten wie Fruchtwasser, Speichel, Follikelflüssigkeit, Muttermilch und Samenflüssigkeit nachgewiesen (Borgono et al., 2007). Eine Schlüsselrolle spielt KLK14 zusammen mit anderen KLK-Mitgliedern in der Verflüssigung des Samens durch die Proteolyse von Semenogelin I und II (Emami et al., 2008; Michael et al., 2006). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass KLK14 mit KLK5 und -7 die Abschuppung der Haut unterstützt. Dabei ist KLK14 am Abbau von interzellulären Adhäsionsmolekülen, die die benachbarten Korneozyten verbinden, beteiligt (Borgono et al., 2007; Brattsand et al., 2005; Emami & Diamandis, 2008a).

1.4.4 Rolle von KLK14 im Tumorgeschehen

Der Peptidase KLK14 schreibt man wie KLK13 die Fähigkeit zu, Bestandteile der EZM abzubauen. Bevorzugte Abbauprodukte der extrazellulären Matrix von KLK14 sind Kollagen I und IV, Fibronektin, Laminin, Plasminogen, Vitronektin sowie hochmolekulares Kininogen. KLK14 spielt ebenfalls durch den Abbau der EZM eine entscheidende Rolle in der Tumor-Progression, dem -Wachstum, der Invasion und der Angiogenese. Je nach Tumorentität kann KLK14 entweder stimulierend oder hemmend wirken. *Insulin-like-growth-factor-binding-protein* (= IGFBP), welches die Wirkung des *Insulin-like growth factor -1* (= IGF-1) reguliert, wird auch von KLK14 abgebaut. Damit kann KLK14 nicht nur die tumorunterdrückende Wirkung von IGFBP regulieren, sondern ist auch an der Freisetzung von IGF-1 beteiligt (Borgoño & Diamandis, 2004; Borgono et al., 2007; Egeblad & Werb, 2002; Firth & Baxter, 2002; Rajapakse & Takahashi, 2007). Dies kann zur Überstimulierung von sowohl gutartigen als auch bösartigen Zellen führen. In zellbiologischen Experimenten wurde gezeigt, dass die Hemmung der KLK14-Expression in Ovarialkarzinomzellen das Zellwachstum und die -invasion signifikant reduziert und die Apoptoserate deutlich erhöht (Ahmed et al., 2016; Zhang et al., 2012). Die KLK14-Expression weist wiederum auch in verschiedenen Tumorarten eine prognostische Bedeutung auf.

1.4.4.1 KLK14 im Ovarialkarzinom

Steroidhormone wie Androgene und Gestagene spielen bei der Entwicklung und Progression des Ovarialkarzinoms eine entscheidende Rolle (Risch, 1998). Durch Androgen- und Gestagenrezeptoren wird eine Hochregulierung von KLK14 in Ovarialkarzinomzellen beobachtet (Yousef, Fracchioli, et al., 2003). Eine hohe KLK14-Expression wurde bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom in einem frühen FIGO-Stadium, nach einer optimalen Debulking-Operation sowie bei positivem Ansprechen auf eine verabreichte Chemotherapie gezeigt. Patientinnen mit KLK14-positiven Ovarialtumoren wiesen ein längeres progressionsfreies und Gesamt-Überleben als Patientinnen mit KLK14-negativen Tumoren auf. KLK14 gilt daher als prognostisch günstiger Tumormarker für das Ovarialkarzinom. Zusätzlich wurde eine schwache negative Korrelation zwischen der KLK14-Expression und den Werten für CA 125 im Serum von Ovarialkarzinompatientinnen gezeigt (Dettmar et al., 2018; Yousef, Fracchioli, et al., 2003). KLK14 wurde zusammen mit KLK6, KLK7, KLK11 und B7-H4 und weiteren klinischen Faktoren in einem sogenannten Biomarker-Panel aufgenommen. Dieser zeigte eine sehr hohe Spezifität und Sensitivität für die Vorhersage des 5-Jahres progressionsfreien Überlebens bei Ovarialkarzinompatientinnen (Ahmed et al., 2016; Zheng et al., 2007). KLK14 scheint im Rahmen des Ovarialkarzinoms mit einer Verbesserung der Prognose assoziiert zu sein. Der Grund dafür ist zum jetzigen Zeitpunkt allerdings noch unklar.

1.4.4.2 KLK14 im Mammakarzinom

Auch beim Mammakarzinom wird die KLK14-Expression durch Androgenrezeptoren und deren Reaktion auf Steroidhormone, wie Androgen und Progesteron, gesteuert. Die Expression von KLK14 wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Es existieren Arbeiten, die eine geringere KLK14-mRNA-Expression in Brusttumoren im Vergleich zu normalem

Brustgewebe zeigen. Im Gegensatz dazu wurde aber auch höhere KLK14-Expression in Tumoren der Brust beobachtet (Fritzsche et al., 2006; Papachristopoulou et al., 2011; Yousef, Borgono, et al., 2002; Yousef, Magklara, et al., 2001). Einige Studien zeigten, dass eine hohe KLK14-Expression mit verschiedenen klinischen Parametern (Tumorstadium, Tumorgöße, Lymphknotenstatus) und schlechter Prognose korrelieren. Eine hohe KLK14-Proteinexpression geht mit einem höheren *Tumorgrading*, größerer Tumorgöße sowie einem positiven Lymphknotenstatus einher (Fritzsche et al., 2006; Yousef, Borgono, et al., 2002). Im Gegensatz dazu ist beim östrogen-positiven Mammakarzinom eine signifikant geringere Expression von KLK14 zu beobachten (Papachristopoulou et al., 2011). Hohe KLK14-Werte im Serum oder Tumorgewebe bei Patientinnen mit Mammakarzinom deuten auf eine ungünstige Prognose hin und wurden mit einem verminderten krankheitsfreien Überleben und Gesamtüberleben assoziiert (Yousef, Borgono, et al., 2002). Jedoch gibt es auch Studien, die beschreiben, dass keine Signifikanz bezüglich hoher KLK14-Expression und einem verkürzten krankheitsfreien Überleben und Gesamtüberleben besteht. Die prognostische Bedeutung der vermehrten KLK14-Expression ist nach derzeitigem Stand der Forschung umstritten. Dies könnte vor allem durch die verschiedenen Methoden der Expressionsmessung sowohl auf mRNA- und Proteinebene als auch durch die Verwendung von unterschiedlichen Patientenkollektiven bedingt sein (Fritzsche et al., 2006; Yousef, Borgono, et al., 2002).

I.4.4.3 KLK14 in anderen Karzinomen

Eine Reihe von weiteren Studien zeigt, dass KLK14 bei vielen Krebsarten eine prognostische Rolle spielt. KLK14 wird sowohl vermehrt als auch vermindert in verschiedenen Krebsarten vorgefunden und scheint je nach Art des Tumors und der Expression entweder einen günstigen oder auch einen ungünstigen Einfluss auf die Prognose zu haben. Auf mRNA-Ebene wurde eine niedrigere Expression von KLK14 bei Hoden- und Prostatakrebs beobachtet (Luo, Yousef, & Diamandis, 2003; Yousef, Magklara, et al., 2001). In diesen Tumoren war eine erhöhte KLK14-Expression mit einem fortgeschrittenen Stadium sowie einer ungünstigeren Prognose assoziiert (Borgono et al., 2007; Hooper et al., 2001; Lose et al., 2012; Yousef, Stephan, et al., 2003). Ein hohes KLK14-Expressionslevel stellt bei kolorektalen Karzinomen einen statistisch unabhängigen Marker für eine ungünstige Prognose dar. Darüber hinaus wurde die Expression von KLK14 im Darmkrebs und seine Beteiligung an der Protease-aktivierter Rezeptor 2 (= PAR-2) -Rezeptorsignalisierung untersucht. Es wurde gezeigt, dass sowohl KLK14 als auch sein *Target* PAR-2 möglicherweise als therapeutische Ziele in Frage kommen (Devetzi et al., 2013; Gratio et al., 2011; Talieri et al., 2009). Eine Überexpression von KLK14 wird zudem in Speicheldrüsenkrebs, klarzelligem Nierenzellkarzinom, nicht kleinzelligem Lungenkarzinom und bei chronisch lymphatischer Leukämie beobachtet. KLK14 scheint sowohl bei chronisch lymphatischer Leukämie als auch bei klarzelligem Nierenkarzinom einen prognostisch ungünstigen Faktor darzustellen (Hashem et al., 2010; Kontos et al., 2016; Planque, Blechet, et al., 2008; Planque, Li, et al., 2008; Taylor et al., 2018).

Die Bedeutung von KLK14 für die Tumorprogression und dessen Einfluss auf die Prognose verschiedener Tumorerkrankungen ist demnach bislang noch nicht aufgeklärt. Dennoch weisen die erläuterten Forschungsergebnisse daraufhin, dass KLK14 in Zukunft eine Rolle als Biomarker im Rahmen verschiedener Krebserkrankungen spielen kann.

I.5 Zielsetzung

Im Vorfeld beschäftigten sich einige Studien mit der Expression von KLK13 und KLK14 im Ovarialkarzinom und im Mammakarzinom und deren Prognose. Dabei wurden in Bezug auf Subtyp, Stadium, Histologie und Rezeptorstatus heterogen zusammengesetzte Patientenkollektive analysiert. In dieser Studie sollte die Expression beider KLK-Mitglieder, KLK13 und KLK14, in homogenen Patientenkollektiven untersucht werden. Die Ermittlung der mRNA-Expression mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (= qPCR) und Immunhistochemie (= IHC) sollte die tumorbiologische Funktion und klinische Relevanz der KLK13 und KLK14 im Ovarialkarzinom beleuchten. Zusätzlich sollte mittels immunhistochemischer Analysen die klinische Relevanz von KLK14 im triple-negativen Mammakarzinom untersucht werden.

Um die im obigen Abschnitt erläuterten Fragen aufzuschlüsseln, wurden folgende Schritte geplant:

- Zusammenstellung eines homogenen Patientenkollektivs mit ausschließlich fortgeschrittenen (FIGO III/IV), high-grade serösen Ovarialkarzinomen ohne neoadjuvante Chemotherapie
- Zusammenstellung eines homogenen Patientenkollektivs mit ausschließlich triple-negativen Mammakarzinomen
- Die Analyse von KLK13- und KLK14-mRNA-Expression im Ovarialkarzinom durch quantitative Polymerasekettenreaktion
- Die Charakterisierung von Antikörpern gegen KLK13 und KLK14 und Etablierung von Immunhistochemie-Protokollen in Ovarial- und Mammakarzinomen
- Die Durchführung von statistischen Analysen klinisch etablierter Prognosefaktoren und der KLK13/14 mRNA-Expression und KLK14-Proteinexpression

II. **Patientenkollektiv**

Die Auswahl der Studienteilnehmerinnen wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt. Zum Studienbeginn haben alle Patientinnen die Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, schriftlich bestätigt.

II.1.1 Patientenkollektiv der qPCR- Analysen beim fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom

Für die qPCR-Analysen wurde das Tumorgewebe von 91 Patientinnen untersucht (s. Tabelle 5). Dabei wurden ausschließlich *high-grade* seröse Ovarialkarzinome im fortgeschrittenen Stadium (FIGO III und IV) ausgewählt. Alle Patientinnen wurden an der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar, Technische Universität München im Zeitraum von 1990 bis 2012 behandelt. Nach der operativen Therapie erhielten alle Patientinnen eine adjuvante Chemotherapie nach klinisch standardisierten Schemata. Patientinnen mit neoadjuvanter Chemotherapie sind ausgeschlossen worden.

Tabelle 5: Patientenkollektiv der KLK13 qPCR-Analysen

Patientenkollektiv der qPCR- Analysen bei fortgeschrittenem serösen Ovarialkarzinom			
Gesamtanzahl der eingeschlossenen Patienten		91	
Medianes Alter		62 (33-88)	
Mediane Beobachtungszeit in Monaten		42 (2-60)	
	n		n
FIGO- Stadium		Alter	
III	69	<60 Jahre	43
IV	22	>60 Jahre	48
LK-Status		Aszitesmenge	
negativ	19	kein Aszites	16
positiv	55	< 500 ml	26
fehlend	17	> 500 ml	42
		fehlend	7
Rezidiv		Resttumor	
ja	55	kein Resttumor	39
nein	17	≤ 1 cm	23
fehlend	19	> 1cm	28
		fehlend	1
Verstorben			
ja	54		
nein	31		
fehlend	6		

II.1.2 Patientenkollektiv der immunhistochemischen Analysen beim fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom

Für die immunhistochemischen Analysen wurden 106 Patientinnen untersucht, die nach gleichen Kriterien (*high-grade* seröse Ovarialkarzinome, FIGO III und IV, keine neoadjuvante Chemotherapie) ausgewählt wurden (s. Tabelle 6). Die Behandlung der Patientinnen erfolgte auch hier an der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München im Zeitraum von 1990 bis 2012.

Tabelle 6: Patientenkollektiv der KLK14 immunhistochemischen Analysen beim fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom

Patientenkollektiv der IHC bei fortgeschrittenem serösen Ovarialkarzinom			
Gesamtanzahl der eingeschlossenen Patienten		106	
Medianes Alter		60 (26-88)	
Mediane Beobachtungszeit in Monaten		41 (2-60)	
	n		n
FIGO- Stadium		Alter	
III	72	<60 Jahre	56
IV	34	>60 Jahre	50
LK-Status		Aszitesmenge	
negativ	31	kein Aszites	26
positiv	68	< 500 ml	31
fehlend	7	> 500 ml	48
		fehlend	1
Rezidiv		Resttumor	
ja	54	kein Resttumor	45
nein	17	≤ 1 cm	26
fehlend	35	> 1cm	33
		fehlend	2
Verstorben			
ja	64		
nein	32		
fehlend	10		

II.1.3 Patientenkollektiv der immunhistochemischen Analysen beim triple-negativen Mammakarzinom

Das Kollektiv für die immunhistochemischen Analysen bestand aus 154 Patientinnen. Untersucht wurden ausschließlich Patientinnen mit einem triple-negativen Mammakarzinom, das heißt sowohl die Steroidhormonrezeptoren als auch der HER2-Status sind vom Pathologen als negativ bewertet worden. Die Einteilung erfolgte nach TNM-Klassifikation (T = Tumor, N = Nodus (Lymphknotenstatus) und M = (Fern-)Metastase) und nach 3 Graduierungsstufen (G1-G3 bzw. gut, mäßig und schlecht differenziert). Histologisch wurde zwischen duktalem (= NST), lobulärem medullärem und anderen Mammakarzinomen unterschieden (s. Tabelle 7).

Tabelle 7: Patientenkollektiv der KLK14 immunhistochemischen Analysen beim triple-negativen Mammakarzinom

Patientenkollektiv der IHC beim triple-negativen Mammakarzinom			
Gesamtanzahl der eingeschlossenen Patienten		154	
Medianes Alter		57 (27-96)	
Mediane Beobachtungszeit in Monaten		74 (2-324)	
		n	n
T-Stadium		Alter	
pT1	46	<60 Jahre	91
pT2	75	>60 Jahre	63
pT3	12		
pT4	17		
unbekannt	4		
N-Status		Menopause	
pN0	81	Prä-	41
pN1	47	Post-	112
pN2	17	unbekannt	1
pN3	6		
unbekannt	3		
M-Fernmetastasen		Rezidiv	
ja	99	Ja	27
nein	55	Nein	127
Grading		Verstorben	
G1	2	Ja	79
G2	15	Nein	75
G3	132		
G4	2		
unbekannt	3		
Histologie			
Invasiv duktal (NST)	124		
Invasiv lobulär	5		
Invasiv medullär	13		
Andere	12		

III. Material und Methoden

III.1 Material

III.1.1 Technische Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 8: Technische Geräte und Hilfsmittel

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz, Land
Centrifuge filter unit/Costar SpinX	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Echt-Zeit-PCR Cycler Stratagene MX3005P	Agilent Technologies, Böblingen, D
Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen, Deutschland
ChemiDoc™ XRS+ System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Gelgießvorrichtung mit Zubehör	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Glasplatten	Biostep GmbH, Jahnsdorf, D
Heizblock	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
LabCycler	SensoQuest, Göttingen, D
Magnetrührer Ikamao reo	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
Mikrowelle	Sharp, Osaka, J
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
pH-Meter Lab 850	Schott Instruments, Weilheim, D
Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
Plattformschüttler Polymax 2040	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, D
Präzisionswaage BA 110S	Sartorius, Göttingen, D
QIAcube	Qiagen, Hilden, D
Tischzentrifuge Mini Centrifuge C-1200	National Labnet Co., Woodbridge, NJ, USA
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, München, D
UV- Licht Biometra TI-1	Biometra, Göttingen, Deutschland
Varioklav® Dampfsterilisator	HP-Medizintechnik, Oberschleißheim, D

Vortexer Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, D
Zentrifuge 5425 R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D

III.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz, Land
Cryotubes	TPP, Trasadingen, CH
Filterpapier	Macherey-Nagel GmbH und Co KG, Düren, D
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
Mx3000P® 96-well Plates	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, D
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, D
Pipettenspitzen Premium Tips (200 µl)	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, D
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Peqlab GmbH, Erlangen, D
PDVF-Membran	Roth GmbH, Karlsruhe, D

III.1.3 Chemikalien und allgemeine Reagenzien

Tabelle 10: Chemikalien und allgemeine Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz, Land
Agar (Bacto™)	Becton Dick, Franklin Lakes, USA
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
APS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Ampuwa® Wasser	Fresenius Kabi Deutschland GmbH,

ATP	Bad Homburg, D New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
Bacto-Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg, D
BAM HI- HF	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
Borsäure	Roth GmbH, Karlsruhe, D
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
cut smart buffer	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
DNA Polymerase PfuUltra II Fusion HS	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, D
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Dithiothreitol	Roth GmbH, Karlsruhe, D
dNTPs	Roth GmbH, Karlsruhe, D
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Essigsäure	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Ethanol 100 %	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Glycerin	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Glycerinphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Glycin	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Hefe-Extrakt	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP-Substrate	Millipore Cooperation, Billerica, USA
IPTG	Roth GmbH, Karlsruhe, D

Kaliumhexacyanidoferrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Kanamycin	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Laemmli Puffer 4x „Roti load 1“	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Lithiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, D
Magnesiumchlorid	Roth GmbH, Karlsruhe, D
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Milchpulver	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Natriumchlorid (= NaCl)	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Natriumdihydrogenphosphat	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat (= SDS)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natrium-Pyrophosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Natriumthiosulfat	Merck KGaA, Darmstadt, D
N, N,N',N'- Tetramethylethyldiamin (= TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase	Agilent Technologies, Böblingen, D
PageRulerPrestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, München, D
PageRulerPrestained Plus Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, München, D
Phenol Chloroform Isoamyl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Polyacrylamid (= PAA)	AppliChem, Darmstadt, D
Proteinase-K	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
RLT Puffer	Qiagen GmbH, Hilden, D
T4 DNA-Ligase + 10X T4 DNA Ligasepuffer	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
Tris-Hydrochlorid	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Tween 20	AppliChem, Darmstadt, D

Sall-HF	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
SDS	Roth GmbH, Karlsruhe, D
Silbernitrat	Merck KGaA, Darmstadt, D
Urea	Roth GmbH, Karlsruhe, D

III.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 11: Eingesetzte Puffer für die Agarosegelelektrophorese

Puffer	Zusammensetzung
TBE (5-fach)	90 mM Tris 90 mM Borsäure 2,5 mM EDTA, pH 8,3
Ladepuffer für DNA	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol FF 30% Glycerin

Tabelle 12: Eingesetzte Puffer für Western Blot Analysen

Puffer	Zusammensetzung
Blocking-Puffer: BSA	3 % (w/v) BSA gelöst in PBS
Blocking-Puffer: Milch	8 % (w/v) Milchpulver gelöst in PBS
Blotpuffer (5-fach)	250 M Borsäure, pH 8,5
Blotpuffer, 20 % Ethanol	20 % (v/v) Ethanol 100 % gelöst in Blotpuffer
Blotpuffer, 5 % Ethanol	5 % (v/v) Ethanol 100 % gelöst in Blotpuffer
Cracking Puffer	8 M Harnstoff pH 8 1 % β -Mercaptoethanol 1 % SDS
Laufpuffer (10fach)	1,9 M Glycin 0,25 M Tris 1 % (w/v) SDS
PBS	0,17 M Na ₂ HPO ₄ 0,058 M NaH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl pH 7,4
PBS-T	0,05% Tween 20 0,2% Triton 100 in PBS gelöst
Sammelgelpuffer	0,5 M TRIS/HCl, pH 6,8
Stripping Puffer	0,2 M Glycin-HCl pH 2,2 0,1 % (w/v) SDS 1 % (v/v) Tween-20, pH 2,2
Trenngelpuffer	1,5 M TRIS/HCl, pH 8,8

III.1.5 Bakterienstämme und Medien

Tabelle 13: Bakterienstämme

Bakterienstämme	Hersteller, Firmensitz, Land
XL1Blue superkompetente Zellen	Stratagene, Kalifornien, USA
M15 [pREP4] Zellen	Qiagen, Hilden, Deutschland

Tabelle 14: Bakterienmedien

Medien	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g/l Bacto™ - Trypton 5 g/l Hefe- Extrakt 10 g/l NaCl 15 g/l Agar (für Agarplatten), pH 7,0
TE	10 mM Tris-Cl 1 mM EDTA
2xTY	16 g/l Bacto™ - Trypton 10 g/l Hefe- Extrakt 5 g/l NaCl gelöst in H ₂ O pH 7,0

III.1.6 Kommerziell erhältliche Kits

Tabelle 15: Kommerziell erhältliche Kits

Kits	Hersteller, Firmensitz, Land
2X Brilliant III Ultra Fast QPCR Master Mix/ Low ROX	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, D
Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit	Invitrogen, Karlsruhe, D
Plasmid-PräparationskitNucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel GmbH und Co KG, Düren, D
Protino Ni-NTA-Agarose	Macherey-Nagel GmbH und Co KG, Düren,D
QIAshredder	Qiagen GmbH, Hilden, D
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden, D
AllPrep® DNA/RNA/miRNA Universal Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
Universal Probe Library Set, Human	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, D

III.1.7 cDNA

Tabelle 16: cDNA

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz, Land
Humane KLK1 cDNA	Abgent, San Diego, USA

III.1.8 Plasmide

Tabelle 17: Plasmide

Bezeichnung	Funktion	Hersteller, Firmensitz, Land
pQE 100	Expressionsplasmid	Qiagen GmbH, Hilden, D

III.1.9 Primer

Tabelle 18: Primer

Gen	Sequenz	Funktion
HPRT1		
Forward Primer	TGACCTTGATTTATTTGCATACC	qRT PCR Primer
Reverse Primer	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT	qRT PCR Primer
KLK13		
Forward Primer	CCCACAACAACCGCCTAA	qRT PCR Primer
Reverse Primer	GAGTTTTGGGGTAATTCACCTG	qRT PCR Primer
KLK1		
Forward Primer 1	GATCCGCGCCCCGATTCAGTCC	PCR Primer
Reverse Primer 1	TTGTTGGATCCGCGCCCCGATTC	PCR Primer
Forward Primer 2	TCGACCGGAGTTCTCCGCTATGGTG	PCR Primer
Reverse Primer 2	TTGTTGTCGACCGGAGTTCTCCGC	PCR Primer

III.1.10 Antikörper

Tabelle 19: Primäre Antikörper für Western Blot Analysen

Bezeichnung	Wirt	Hersteller, Land	Firmensitz,
KLK13	Ziege	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	
KLK13	Kaninchen	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA	
KLK14	Ziege	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	
KLK14	Kaninchen	Agrisera, Vännäs, SWE	
Penta- Histidin	Maus	Qiagen, Hilden, D	

Tabelle 20: Sekundäre Antikörper für Western Blot Analysen

Bezeichnung	Wirt	Hersteller, Land	Firmensitz,
Anti-goat	Maus	Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., Dianova, Hamburg, D	
Anti-mouse	Kaninchen	Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., Dianova, Hamburg, D	

Tabelle 21: Primäre Antikörper für immunhistochemische Analysen

Bezeichnung	Wirt	Hersteller, Land	Firmensitz,
KLK13	Ziege	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	
KLK14	Ziege	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	

Tabelle 22: Sekundäre Antikörper für immunhistochemische Analysen

Bezeichnung	Wirt	Hersteller, Land	Firmensitz,
Anti-rabbit	Ziege	Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., Hamburg, D	Dianova,
Anti-goat	Rind	Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., Hamburg, D	Dianova,

III.2 Methoden

III.2.1 Quantitative Real-time (Echtzeit)-Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

Schritte der Polymerase Kettenreaktion

Bei der Vervielfältigung der spezifischen DNA-Region werden drei Einzelschritte mehrfach in Zyklen wiederholt. Es beginnt mit der thermischen Denaturierung der zu amplifizierenden, doppelsträngigen DNA bei etwa 95°C. Dies hat zur Folge, dass zwei komplementäre Einzelstränge entstehen, die zur Vorlage der darauffolgenden Amplifikation dienen. Das Annealing besteht in der Anlagerung von synthetischen Oligonukleotiden, sogenannten Primern, an den Einzelsträngen bei 65°C. Die Primer werden dabei so ausgewählt, dass diese sequenzspezifisch an den zu untersuchenden Genabschnitt binden. Die finale Elongation dient der Verlängerung durch die DNA-Polymerase, was zu einer Verdoppelung der DNA-Fragmente des gesuchten Genabschnitts führt. Je nach Anzahl der Wiederholungen der beschriebenen Schritte steigt die Anzahl der DNA-Fragmente exponentiell (Smith & Osborn, 2009).

Quantitative Echtzeit-PCR mit TaqMan-Technologie

Zur Detektion und Quantifizierung der Transkripte wurde die Echtzeit-PCR in Verbindung mit der TaqMan-Technologie verwendet. Eine Besonderheit der quantitativen Echtzeit-PCR ist die Detektion der Gene während der Amplifikation in Echtzeit. Daher eignet es sich gut zur Untersuchung des Expressionsverhaltens und um eine präzise quantitative Aussage der entstandenen Transkripte zu machen. Das Prinzip der TaqMan-Technologie basiert auf spezifisch fluoreszenzmarkierten Sonden und den dazugehörigen PCR-Primern, welche den Nachweis der Transkripte hochspezifisch machen. Die Sonden, bestehend aus Oligonukleotiden, sind dabei sequenzspezifisch zu den gesuchten Genabschnitten und hybridisieren zwischen den beiden Primern. An ihrem 5'-Ende sind sie mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FAM = Fluorescein-Derivat), dem sogenannten Reporter markiert. Im Gegensatz dazu befindet sich am 3'-Ende ein Quencher, der bei räumlicher Nähe zum Reporter durch den Mechanismus des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (= FRET) die Freisetzung der Fluoreszenz des Reporters unterdrückt. Im Verlauf der PCR binden die Primer und die Sonde sequenzspezifisch und die TaqMan-Polymerase beginnt die Primer zu verlängern. Da die TaqMan-Polymerase sowohl eine 5'-3'-DNA-

Polymeraseaktivität als auch eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität besitzt, kommt es zum Abbau der Sonde (Livak et al., 1995). Demzufolge wird der Reporter vom Quencher räumlich getrennt, und die Fluoreszenz des Reporters kann im PCR-Gerät detektiert werden. Das Fluoreszenzsignal steigt proportional zur entstandenen Menge der PCR-Produkte, welche wiederum proportional zur eingesetzten Template-Menge ist. Die Spezifität der Methode wird dadurch gesichert, dass die 5'-3'- Exonukleaseaktivität der TaqMan-Polymerase doppelstrangspezifisch ist, sodass nur sequenzspezifisch gebundene Sonden und keine ungebundenen Sonden abgebaut werden (s. Abbildung 2).

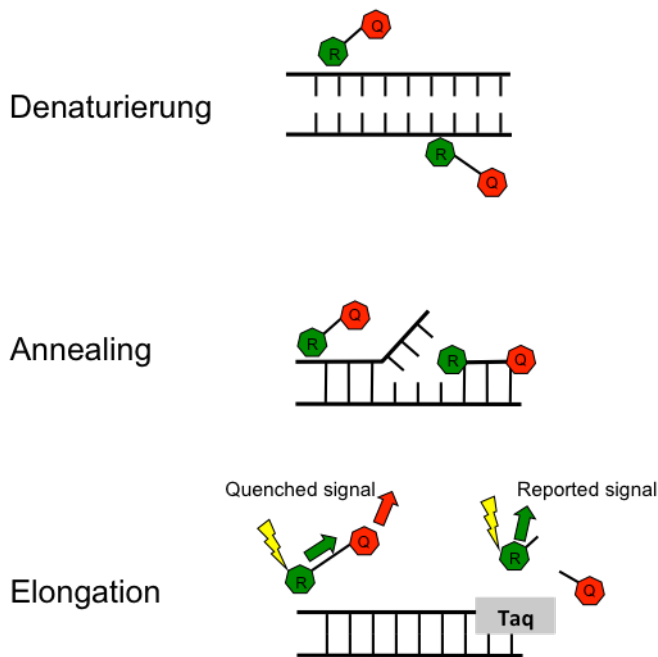


Abbildung 2: Schematischer Ablauf der qPCR mittels TaqMan-Technologie

R = Reporter, Q = Quencher, Durch die Taq-Polymerase kommt es sowohl zur Strangverlängerung als auch zum Abbau der Sonde durch die 5'-3'- Exonuklease-Aktivität. Es kommt zur Abspaltung des Reporterfarbstoffes, welcher detektiert werden kann.

Primer Design für KLK13

Zuerst wurden die Primer und Sonden mit Hilfe der Universal Probe Library Software von Roche generiert. Um eine hinreichende Amplifikation gewährleisten zu können, sollten die Primer so gewählt werden, dass sie an zwei verschiedenen Exons binden, und in der DNA-Sequenz ein möglichst großes Intron (über 700 Basenpaare) liegt. So kann sichergestellt werden, dass nicht die DNA, sondern die mRNA amplifiziert wird. Zusätzlich sollten die Primer ein geringes Selbst- und Kreuzannealing sowie eine optimale Schmelztemperatur aufweisen. Eine Länge zwischen 18 und 24 Nukleotiden eignet sich hierfür ideal. Zusätzlich zum untersuchten KLK13-Gen wurde als Referenzgen das sogenannte *Housekeeping* Gen, Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (= HPRT1), verwendet, welches konstant in den Zellen exprimiert wird (s. Tabelle 23). Dabei detektierte das KLK13-qPCR-System nur die Splicevariante 1 und keine weiteren Splicevarianten. Diese KLK13- Splicevariante codiert die Gesamtlänge des Proteins (Dettmar et al., 2018).

Tabelle 23: Generierte Primer und Proben für das Housekeeping Gen HPRT1 und KLK13 (Roche Universal Probe Library, Penzberg, Deutschland)

Gen	Sequenz	Position
HPRT1		
Forward Primer	TGACCTTGATTTATTTTGCATACC	218-241
Reverse Primer	CGAGCAAGACGTTCAATCCT	300-319
Probe 73	5'-FAM-GCTGAGGA	
KLK13		
Forward Primer	CCCACAACAACCGCCTAA	480-497
Reverse Primer	GAGTTTTGGGGTAATTCACCTG	548-569
Probe 20	5'-FAM-CTGGCTGG	

Durchführung der qPCR

Es wurde der „Brilliant III Ultra-fast qPCR Master Mix with low ROX“ (Agilent Technologies, Darmstadt, Deutschland) verwendet, welcher sich speziell für die TaqMan-Technologie eignet.

Die quantitative Echtzeit-PCR wurde mit folgendem Mastermixansatz durchgeführt:

Tabelle 24: Mastermixansatz für die quantitative Echtzeit-PCR

Komponente	Volumen (μ l)	Gesamtkonzentration
2X Brilliant III Ultra-fast QPCR Master Mix low ROX	10,0 μ l	1x
Primer R	0,4 μ l	400 nM
Primer L	0,4 μ l	400 nM
UPL Probe	0,4 μ l	200 nM
Nukleasefreies H ₂ O	5,8 μ l	1x

Die Patientenproben wurden in Triplikaten untersucht. Es wurden pro Well 3 μ l cDNA mit einer Konzentration von 5 ng/ μ l eingesetzt. Als Referenzwert wurde die cDNA der Ovarialkarzinomzelllinie OVMZ6 als Triplikat mitgeführt. Duplikate von zwei verschiedenen untranskribierten RNA-Proben und RNase-freies Wasser dienten als Negativkontrollen. Zusätzlich wurden zur internen Kontrolle, um die Robustheit des Systems zu prüfen, einige zuvor gemessene Proben als wiederholte Triplikate mitgeführt.

Nachdem die Proben in die 96-Well Platte pipettiert wurden, wurde diese für 3 min bei 1000 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurde die qPCR mit folgendem Programm der MxPro Software Version 4.10 gestartet (s. Tabelle 25):

Tabelle 25: Protokoll der quantitativen Echtzeit-PCR

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit	Schritt
1	1	95	3 min	Aktivierung der Polymerase
2	40	95	15 sec	Denaturierung
		60	1 min	Elongation

Zur Normalisierung wurde ein Referenzfarbstoff, 6-Carboxy-X-Rhodamin (= ROX) herangezogen, dessen Fluoreszenzsignal die qPCR-Reaktion nicht beeinflusst und der sich von dem eingesetzten Reporterfarbstoff unterscheidet. Somit konnten interne Schwankungen von Well zu Well, ungleichmäßige Volumina, optische Variabilität und Ähnliches normalisiert werden.

Auswertung der qPCR für die KLK13-mRNA-Expression

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels Excel.

Zunächst wurden für KLK13 und HPRT-Verdünnungsreihen mit der cDNA von OVMZ6/KLK13 in 5 Stufen (DNA0-DNA4; 30-1,875 ng) durchgeführt. Es wurden die gemessenen Ct-Werte auf der y-Achse gegen die logarithmischen bekannten Konzentrationen der Verdünnungen auf der x-Achse aufgetragen. Daraus ergab sich eine lineare Funktion mit dem Korrelationskoeffizienten R^2 . Dieser sollte idealerweise den Wert 0,99 bis 1,00 annehmen. Die Effizienz (= E) der PCR für die verschiedenen Primer wurde wie folgt berechnet:

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

100 % Effizienz war bei einem E-Wert von 2 gegeben.

Anschließend konnte durch die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode die Berechnung der relativen mRNA-Expression des Zielgens wie folgt berechnet werden:

$$\begin{aligned}\Delta\text{Ct} &= \text{Ct}(\text{Zielgen}) - \text{Ct}(\text{HPRT}) \\ \Delta\Delta\text{Ct} &= \Delta\text{Ct}(\text{Patientenprobe}) - \Delta\text{Ct}(\text{Referenzwert}) \\ \text{relative } n - \text{fache Expression} &= 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}\end{aligned}$$

Dabei ergeben sich die Ct-Werte aus dem Mittelwert der Triplikate. Zur internen Kontrolle der Triplikat-Genauigkeit wurde eine Fehlerfortsetzung über die Standardabweichung (= SD) der Triplikate durchgeführt:

$$\text{Fehler}(\Delta\text{Ct}) = \sqrt{\frac{\text{SD}(\text{Zielgen})^2 + \text{SD}(\text{HPRT})^2}{2}}$$

$$Fehler(\Delta\Delta Ct) = \sqrt{\frac{Fehler(Patientenprobe)^2 + Fehler(Referenzwert)^2}{2}}$$

$$Fehler(absolute) = \ln(2) * Fehler(\Delta\Delta Ct) * 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

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

Um valide replizierbare Patientenproben zu verwenden, wurden Proben nach folgenden Kriterien aus der Analyse ausgeschlossen:

1. wenn ein Ct-Wert für HPRT >35 ergab
2. wenn der prozentuale Fehler (auch nach Wiederholungen) > 30% betrug,
3. wenn die errechnete prozentuale Standardabweichung der ermittelten exp- $\Delta\Delta Ct$ -Werte zweier valider Durchläufe > 47,1% war.

III.2.2 Produktion und Aufreinigung von pro-KLK1

Da das Labor der klinischen Forschergruppe der Frauenklinik der Technischen Universität über alle Proformen der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen verfügt (2-15), ausschließlich pro-KLK1, sollte dieses produziert und aufgereinigt werden. Aufgrund der ähnlichen Eigenschaften der KLK-Mitglieder könnten bei späteren Antikörpertestungen z.B. Kreuzreaktionen entstehen. Deshalb ist es wichtig, alle Proformen in den Analysen zu verwenden. Für die Produktion von pro-KLK1 erfolgt zunächst die Amplifizierung und spezielle Reinigungsschritte, anschließend wird die pro-Form in ein Expressionsplasmid mittels Restriktionsenzymen ligiert und in E.coli-Bakterienstämme transformiert, um dann exprimiert zu werden. Um das gereinigte Protein KLK1 zu erhalten, wird die Affinitätschromatographie mit Ni²⁺-NTA- Agarose-Chromatographiesäule verwendet.

III.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifizierung der erhaltenen humanen KLK1-cDNA von Abgent erfolgte eine Polymerase-Kettenreaktion in zwei Schritten. Bei der Vervielfältigung der cDNA wurden zwei verschiedene Primerpaare (KLK1 FP1 & RP1, KLK1 FP2 & RP2) benutzt. Ihre Sequenzen sind komplementär zu den Anfangs- bzw. Endsequenzen der pro-KLK1-Protease. Durch die Hybridisierung der Primer an beiden Seiten wird der zu replizierende Abschnitt beidseitig begrenzt. Für die Amplifizierung wurden zusätzlich eine thermostabile DNA-Polymerase „PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase“ und 4 Desoxy-Nukleotidtriphosphate dATP, dGTP, dTTP und dCTP benötigt.

Zuerst wurden die Primer nach Synthesereport „metabion international AG“ aufgelöst und anschließend in destilliertem Wasser 1:10 verdünnt (Endkonzentration 10 μ M) Ebenso wurde die KLK1-cDNA im Verhältnis 1:40 in destilliertem Wasser verdünnt. Für den ersten Zyklus der PCR erfolgte der Reaktionsansatz wie folgt:

Tabelle 26: Mischverhältnis der 1. und 2. PCR Reaktion

Dest. H ₂ O	34,0 µl
10xPuffer	5,0 µl
KLK1 FP1/ KLK1 FP2	1,25 µl
KLK1 RP1/ KLK1 RP2	1,25 µl
dNTP's (jedes 2,5mM)	5,0 µl
cDNA KLK1	3,0 µl
PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase	0,5 µl

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde mit folgendem Programm mittels Labcycler durchgeführt:

Tabelle 27: Protokoll der Polymerasekettenreakton im Labcycler

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	2 min	1
95°C	20 sec	10
38°C	20 Sec	10
72°C	15 Sec	10
95°C	20 Sec	15
61°C	20 Sec	15
72°C	15 Sec	15
72°C	3 min	1
4°C	∞	

Mit dem entstandenen PCR-Produkt wurde eine zweite Reaktion durchgeführt, um die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen anzuhängen. Hierzu wurden 4 µl des PCR-Produkts und die 4-fache Menge der oben aufgeführten Reagenzien verwendet. Hier wird das zweite Primerpaar (FP2 und RP2) eingesetzt. Anschließend wurde das gleiche Programm des Labcyclers gestartet (s. Tabelle 27).

III.2.2.2 Agarosegelelektrophorese

Im Anschluss an die Polymerase-Kettenreaktion folgte zum Nachweis der entstandenen DNA die elektrophoretische Auftrennung auf einem 1% Agarosegel. Zur Gelherstellung wurden 0,45 g Agarose abgewogen und in 45 ml TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, bis eine klare Flüssigkeit entstand. Bevor das Gel in eine Gelgießform überführt wurde und die Taschenkämme eingesetzt wurden, musste es auf etwa 50°C abkühlen und mit 10 µl Ethidiumbromid versetzt werden. Es wurden jeweils 10 µl der PCR-Pro-

dukte aus Punkt II.2.2.1 mit 2,5 µl 5x DNA-Ladepuffer versetzt. Nach vollständigem Abkühlen des Gels konnten die Proben und ein Marker, dessen Banden einer exakten Basenpaarlänge zugeordnet werden können, aufgetragen werden. Die Elektrophorese erfolgte für 25 min bei 100 V und etwa 300 mA in 1xTBE-Puffer. Zur Bandendetektion wurde das ChemiDoc™ XRS+ System verwendet.

III.2.2.3 Aufreinigung des PCR-Produktes

Um Verunreinigungen des amplifizierten PCR-Produktes durch unerwünschte DNA, Proteine, Enzyme und Salze zu beseitigen, wurde ein Proteinase K-Verdau sowie eine PCI-Extraktion (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1) und eine Ethanolfällung durchgeführt.

Verdau mit Proteinase-K

Proteinase-K spaltet Peptidbindungen und baut damit Polypeptide zu kleineren Oligopeptiden ab, die durch PCI-Extraktionen leichter entfernt werden können (Bajorath et al., 1988). Es wurden 185 µl DNA mit 4 µl Proteinase K versetzt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Zur Inaktivierung der Proteinase-K erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei 68 °C. Nach kurzer Zentrifugation wurde bei 4°C für 5 min inkubiert. Anschließend erfolgte die PCI-Extraktion.

PCI- Extraktionen (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1)

Durch Denaturierung der Proteine durch Phenol und den Zusatz von Chloroform, welches verhindert, dass Phenol in der wässrigen Phase zurückbleibt, können die Proteine aus DNA-haltigen Lösungen entfernt werden (Wagner, 2009). Die DNA-Lösung wurde mit dem Gemisch aus Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 1:1 verdünnt, anschließend für 20 sec gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die obere Phase, welche die DNA enthielt, wurde abpipettiert und in ein neues Gefäß überführt.

Ethanolfällung

Im Anschluss an die PCI wurde eine Ethanolfällung durchgeführt, um eine konzentrierte DNA zu erhalten. Hierzu wurden 225 µl der DNA mit 4,5 µl 1 M MgCl₂ und 600 µl 100%-Ethanol gemischt und 15 min bei 4°C inkubiert. Nachdem das Gemisch bei 4°C für 15 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert wurde, wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Das DNA-Pellet wurde anschließend mit 70-80% Ethanol gewaschen und wiederholt bei 4°C für 3 min zentrifugiert. Nachdem das Ethanol entfernt wurde, wurde das DNA-Pellet in der „Speed- Vac“-Zentrifuge getrocknet.

III.2.2.4 DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme

Der pQE 100-Vektor stellt ein Expressionsplasmid dar, welches die Produktion von pro-CLK1 ermöglicht. Um entstandene CLK1-DNA in den pQE 100-Vektor richtig einsetzen zu können, muss diese mit Restriktionsenzymen behandelt werden. Bei Restriktionsenzymen handelt es sich um Endonukleasen, die die doppelsträngige DNA an genau definier-

ten Schnittstellen schneiden. Da der pQE 100-Vektor dieselben Schnittsequenzen enthält, kann das DNA-Fragment in seine vorbestimmte Richtung in diesen eingefügt werden.

Hierzu wurde das gereinigte getrocknete DNA-Pellet mit den Enzymen Bam HI-HF und Sal I-HF gespalten. Als Restriktionsansatz wurden 84 µl, mit destilliertem Wasser verdünnte DNA mit jeweils 3 µl Restriktionsendonukleasen Bam HI-HF und Sal I-HF sowie 10 µl CutSmart Puffer verwendet. Dieser wurde für 60 min im Heizblock bei 37°C inkubiert. Danach wurde die DNA mit 10 µl 4 M LiCl und 280 µl 100% Ethanol gefällt. Nach Inkubation des Gemisches über 48 h bei -20°C wurde es bei 4°C für 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließender Waschschrift mit 75% Ethanol sowie eine 3-minütige Zentrifugation. Der entstandene Überstand konnte verworfen werden und die DNA wurde getrocknet und in 20 µl destilliertem Wasser gelöst. Für den Nachweis, dass die DNA über die richtige Größe und das richtige Schnittmuster verfügt, wurde eine Agarosegelelektrophorese (s. III 2.2.2) durchgeführt. Diese diente zusätzlich zur Konzentrationsabschätzung von Vektor zu Fragment für die darauffolgende Ligation, weshalb der pQE 100-Vektor sowie ein Marker mitgelaufen waren. Hierfür wurden 2 µl pQE 100-DNA und 4 µl pro-KLK1-cDNA verwendet.

III.2.2.5 Ligation der DNA-Fragmente

Zur Einklonierung des KLK1-DNA-Fragments in den pQE 100-Vektor wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Diese katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den benachbarten 5'Phosphat- und 3'Hydroxyenden in doppelsträngiger DNA (Doherty & Suh, 2000). Als Reaktionsansatz der Ligation wurde ein Gesamtvolumen von 20 µl aus folgenden Reagenzien gemischt:

Tabelle 28: Mischverhältnis der Ligation von KLK1 und pQE 100

pQE 100 DNA	1 µl
KLK1 DNA	2 µl
10x T4-DNA-Ligase Puffer	2 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl
10 mM ATP	2 µl
H ₂ O	12 µl

Das Gemisch wurde in einem 25°C warmen Wasserbad für 45 min inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde der Ansatz bei 65°C für 10 min erhitzt.

III.2.2.6 Transformation

Für die Transformation der KLK1 enthaltenden Plasmide wurden chemisch kompetente E.coli Bakterien des Stamms XL1Blue sowie M15 [pREP4] eingesetzt.

Zunächst wurden Agarplatten aus LB-Medium mit Ampicillin (Endkonzentration 100

µg/ml) hergestellt. Nachdem die Bakterien auf Eis aufgetaut waren, wurden zur Herstellung des Transformationsansatzes 8 µl der Plasmid-DNA mit 42 µl TE-Puffer gemischt und zu 100 µl XL1Blue-Zellen bzw. 1 µl der Plasmid-DNA mit 29 µl TE-Puffer zu 80 µl M15 [pREP4] -Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte zunächst 25 min auf Eis, dann 1 min 45 sec bei 37 °C und anschließend wieder 4 min auf Eis. Nach Zugabe von 1 ml 2xTY-Medium wurden die E.coli Bakterien für 60 min bei 37 °C inkubiert, um nach erfolgreicher Plasmidaufnahme die Expression der Resistenzgene zu ermöglichen. Darauffolgend wurden die Bakterien bei Raumtemperatur 1 min mit 2000 x g zentrifugiert und der Überstand bis auf 200 µl abgenommen. Die Bakterien wurden sanft resuspendiert, auf die Ampicillin versetzten Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zellen, die das Plasmid aufgenommen und dadurch auch das Ampicillin-Resistenzgen erworben haben, konnten somit Kolonien bilden. Am darauffolgenden Tag wurden 12 Zellklone mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und jeweils in ein steriles Bakterienröhrchen mit 5 ml Ampicillin-LB-Medium (100 µg/ml) überführt. Zur Plasmidamplifikation wurden diese wieder über Nacht bei 37 °C im Horizontalschüttler bei etwa 200 rpm inkubiert.

III.2.2.7 Plasmid-DNA-Präparation

Mittels NucleoSpin® Plasmid-Kit nach Herstellerangaben (Macherey-Nagel GmbH und Co KG, Düren, D) wurde die Plasmidpräparation aus den 12 verschiedenen Zellklonen durchgeführt. Die DNA-Konzentration der einzelnen Proben wurde mittels NanoDrop ND-1000 ermittelt.

III.2.2.8 Restriktionsanalyse der rekombinanten Plasmide und Sequenzierung

Zur Analyse der generierten Plasmide wurde eine Restriktionsanalyse mit den vorher verwendeten Enzymen Bam HI-HF und Sal I-HF durchgeführt. Anhand der Elektrophorese auf einem Agarosegel kann erfasst werden, ob das gewünschte Insert von KLK1 inseriert hat. Als Input dienten jeweils 500 ng/µl der DNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl. Diese wurde jeweils mit 5 µl des Restriktionsmastermix vermischt (s. Tabelle 29). Im Anschluss folgte eine 60-minütige Inkubation bei 37°C.

Tabelle 29: Mastermix für Restriktionsanalyse

CutSmart Puffer	4,0 µl
BSA	4,0 µl
Sal I-HF	1,5 µl
Bam HI-HF	1,5 µl
H2O	4,0 µl

Jeweils 15 µl Plasmid-DNA von zwei Klonen mit der höchsten Konzentration wurden sequenziert, um die Aufnahme von KLK1 in der richtigen Orientierung sicherzustellen.

III.2.2.9 Expression der rekombinanten Proteine

Nach erfolgreicher Transformation des pQE 100-Vektors in die oben genannten Bakterienstämme soll durch Induktion gezielt die Transkription des Gens ausgelöst werden. Das gewünschte KLK1-Protein entsteht durch anschließende Translation. Um diese Replikation zu steuern, enthält der verwendete Vektor pQE 100 zusätzlich zu dem Ampicillinresistenzgen ein Promoter/Operator-Element mit starkem T5-Promoter. Daneben liegt eine zweifache lac-Operator-Sequenz, die das lac-Repressor-Protein bindet und somit den T5-Promoter unterdrückt und die Transkription des Gens verhindert. Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (= IPTG) bindet an den lac-Repressor und inaktiviert diesen. Somit kann die Expression des gewünschten Proteins erfolgen. Der pQE 100-Vektor enthält zusätzlich einen sogenannten „double-tag“. An jedem Ende des exprimierten Proteins wird eine Erkennungssequenz platziert: am N-Terminus der 6x His-Tag, welcher die anschließende Reinigung mittels Ni^{2+} -NTA-Agarosesäule ermöglicht, am C-Terminus der Tag-100, welcher durch spezielle Antikörper detektiert werden kann (s. Abbildung 3).

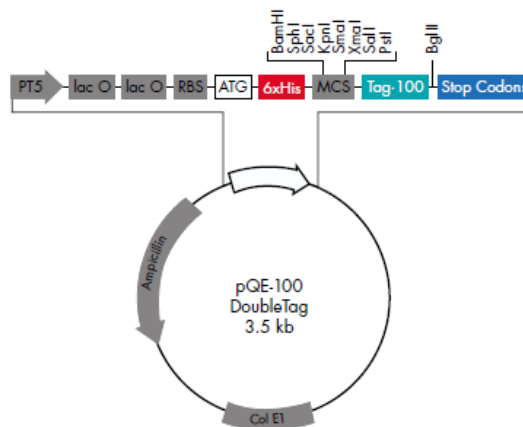


Abbildung 3: Schematische Darstellung der wichtigsten Charakteristika des verwendeten pQE100 Vektors zur Klonierung von KLK1. (Qiagen, 2003)

Es wurden sowohl Übernachtskulturen der E.coli M15-[pREP4] als auch der E.coli XL1 Blue hergestellt und für die Expressionsanalysen verwendet. Für jeden Klon wurden 2-5 ml Übernachtskultur, bestehend aus LB-Medium mit Ampicillin und Kanamycin (Verdünnung 1:1000) und Bakterienkultur (Verdünnung 1:100) hergestellt. Diese wurde anschließend bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden jeweils 3 ml 2xTY mit Ampicillin und Kanamycin mit 150 μl der Übernachtskultur beimpft und bei 37°C für 2 h und 200 rpm inkubiert. Es erfolgten zwei verschiedene Induktionstests.

Einerseits wurden die Kulturen halbiert und eine davon mit einer IPTG-Lösung beimpft, 4 h auf dem Schüttler inkubiert und 500 μl der Kulturen für 5 min bei 16000 rcf zentrifugiert. Die entstandenen Pellets wurden eingefroren und anschließend aufgetaut und in 40 μl Cracking Puffer gelöst. Nachdem zu jeder Probe 14 μl 4xRed hinzugegeben und die Proben bei 95°C für 5 min erhitzt wurden, erfolgten die Auftrennung mittels SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese und die Färbung mit Coomassieblau.

Andererseits wurde bei den 2xTY-Kulturen im Abstand von 30 min die Optische Dichte (= OD)₆₀₀ gemessen. Bei einer OD₆₀₀ 0,7 bis 0,9 wurde die Kultur mit 1 M IPTG (1:500) versetzt, sodass die Induktion der Expression stattfinden konnte. Es folgten weitere OD₆₀₀-Messungen zunächst alle 30 min danach alle Stunden. So konnte eine Wachstumskurve mittels Excel erstellt werden. Nach jeder Messung wurden 500 µl abgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt und zentrifugiert. Das Pellet wurde bei -80 °C eingefroren und für Western Blot Analysen sowie zur Aufreinigung mittels Ni²⁺-NTA-Agarosesäule verwendet.

III.2.2.10 Affinitätschromatographie mit Ni²⁺-NTA-Agarose-Säule

Für den Erhalt eines reinen KLK1-Proteins war eine Aufreinigung nötig. Hierzu wurde die Affinitätschromatographie mit Ni²⁺-NTA-Agarose-Säule verwendet. Wie bereits in III.2.2.9 erwähnt, werden bei der Expression von KLK1 den Proteinen die sechs Histidin-Einheiten angehängt, die eine große Affinität zu Nickel²⁺-NTA-Agarose aufweisen. NTA ist ein Chelatbildner, welcher vier Bindungsstellen des Nickels besetzt. Die zwei freien Stellen können mit den 6 x His-Tag des Proteins interagieren (s. Abbildung 4). Durch schrittweise Senkung des pH-Werts bis auf etwa 4,5 kommt es zur Ablösung des Proteins, da die Histidin-Reste protoniert werden und nicht mehr an Nickel binden können (Qiagen, 2003; Wagner, 2009).

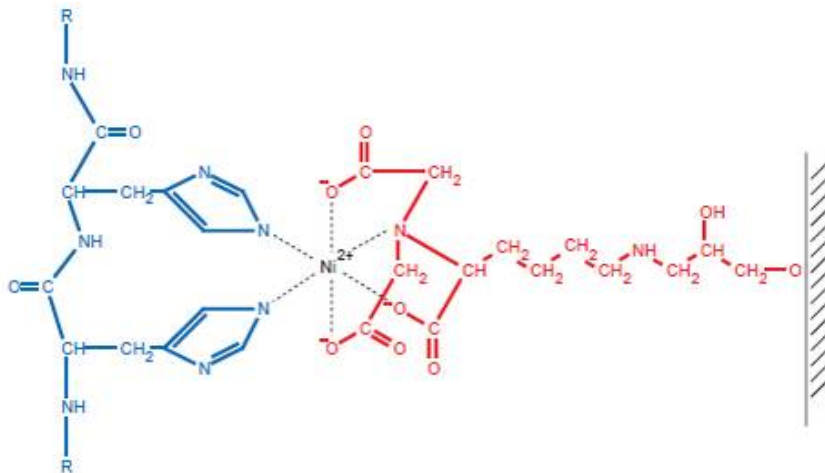


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Interaktion des His-Tags (blau) und der Ni²⁺-NTA-Matrix (rot) (Qiagen, 2003)

Vorbereitung der Ni²⁺-NTA-Agarose-Chromatographiesäule

Die Chromatographiesäule wird mit 5 ml Ni-NTA-Agarose Protino von Machery-Nagel befüllt und mit 5 ml H₂O bedeckt. Nach ungefähr 30 min war die Agarose abgesunken und der flüssige Überstand konnte durch Öffnen der unteren Kappe der Säule abfließen. Zur Äquilibration wurde die Säule mit 20 ml Puffer A befüllt.

Vorbereitung des Zelllysats

Das entstandene Zellpellet der Expression in 200 ml 2xTY in den E.coli M15 [pREP4] wurde auf Eis aufgetaut und abgewogen. Pro Gramm Pellet wurden 5 ml Puffer A (s. Tabelle 30) zugegeben und Mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rotator inkubiert. Danach wurde das Reaktionsgemisch 20 Min bei RT und 10000 x g zentrifugiert. Es entstand ein klarer Überstand, der dann auf die Säule aufgetragen werden konnte und langsam die Ni²⁺-NTA-Agarose durchlief.

Anschließend wurden Wasch- und Elutionsschritte wie folgt durchgeführt (s. Tabelle 30):

Tabelle 30: Wasch- und Elutionsschritte der Ni²⁺-NTA- Agarose- Affinitätschromatographie

Schritte	Puffer	Zusammensetzung	pH	Menge (ml)
Waschen	Puffer A	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris-Cl 6 M Guanidinhydrochlorid	8,0	25
Waschen	Puffer B	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris-Cl 8 M Urea	8,0	50
Waschen	Puffer C ₁	wie Puffer B	7,0	100
Waschen	Puffer C ₂	wie Puffer B	6,3-6,4	50
Eluieren	Puffer D ₁	wie Puffer B	5,9-5,8	25
Eluieren	Puffer D ₂	wie Puffer B	5,2	10
Eluieren	Puffer D ₃	wie Puffer B	4,6	10-15

Für das Senken des pH-Wertes wurde HCl verwendet. Die Fraktionen ab einem pH-Wert von 6,3-6,4 wurden aufgefangen. Aus diesen Fraktionen wurden je 10 µl auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, welches mit Coomassieblau gefärbt wurde.

III.2.3 Western Blot Analysen

Zur Testung der Sensitivität und Spezifität der polyklonalen Antikörper gegenüber KLK13 und KLK14 wurden Western Blot Analysen verwendet. Hierzu standen jeweils zwei verschiedene polyklonale Antikörper gegen KLK13 und KLK14 zur Verfügung (s. Tabelle 31). Zur Sicherstellung, dass alle aufgetragenen KLK-Mitglieder in ungefähr gleicher Masse anwesend sind, wurde ein monoklonaler Antikörper gegen Penta-Histidin verwendet, der den angehängten Histidin-Tag der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen erkennt.

Tabelle 31: Primär-Antikörper Verdünnungen der Western Blot Analysen

Antikörper	Hersteller	Wirt	Verdünnung
KLK13	AF2625 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)	Ziege	1:4000
KLK13	PA1-16656 (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)	Hase	1:1000
KLK14	AF2626 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)	Ziege	1:3000
KLK14	AS060101 (Agri- sera, Vännäs, SWE)	Hase	1:4000
Penta- Histidin	Qiagen, Hilden, D	Maus	1:2000

Probenvorbereitung

Um für jedes KLK1-15 die annähernd gleiche Proteinmenge pro Bande zu verwenden, erfolgte die Herstellung von Silbergelelen. Zunächst sind die Proteinproben im Verhältnis 1:10 in 8 M Harnstoff verdünnt worden. Je nach Konzentration des Proteins wurden diese weiter verdünnt. Zum endgültigen Gebrauch wurde ein Gesamtvolumen von 24 µl des Proteingemischs verwendet. Als Marker (Pageruler Plus prestained) dienten 10 µl in 10 µl 8 M Harnstoff. Alle verwendeten Proben und Marker wurden mit 8 µl Laemmli Puffer versetzt und 5 min bei 95° erhitzt.

Durchführung des Western Blot

Zuerst wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht mittels vertikaler SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Um ein möglichst großes Volumen von den Proben benutzen zu können, wurden 1,5 mm dicke Gele mit 10 Geltaschen verwendet. Diese wurden nach folgender Rezeptur hergestellt (s. Tabelle 32):

Tabelle 32: Mischverhältnisse von Trenn- und Sammelgel

Trenngel 12%		Sammelgel 5%	
H ₂ O	4,3 ml	H ₂ O	17,2 ml
Tris 1,5 M, pH 8,8	2,5 ml	TrisCl 0,5 M, pH 6,8	7,2 ml
AA-Bis 40%, 29:1	3,0 ml	AA-Bis 40 %, 29:1	3,6 ml
SDS 10%	0,1 ml	SDS 10 %	0,28 ml
APS 10%	15,0 µl	APS 10 %	30,0 µl
TEMED	1,5 µl	TEMED	3,0 µl

Um die Polymerisierungsreaktion der Gele zu starten, wurden APS und TEMED im Verhältnis 10:1 hinzugegeben. Die Gelgießapparatur wurde zügig mit Trenngel bis 1 cm unter die untere Kante des Kamms gefüllt und mit Wasser überschichtet. Nachdem das Gel vollständig auspolymerisiert war, wurde das Wasser abgegossen und mit aktiviertem Sammelgel ersetzt. Unverzüglich wurde ein Probenkamm mit 10 Kammern eingesetzt. Nach vollständiger Polymerisierung des Sammelgels konnte der Probenkamm entnommen werden und die Elektrophoresekammer mit 1x Laufpuffer befüllt werden. Die Kammern wurden mit den Proben beladen und diese wurden bei einer Spannung von 100-150 V und 30 mA aufgetrennt.

Die aufgetrennten Proteine wurden mittels einer *Semi-Dry* Blot-Apparatur auf eine 0,45 µm PVDF-Membran bei 160 mA und maximal 8 Watt für ca. 2 Stunden übertragen.

Für den Proteintransfer wurden 3 Filterpapiere in Anodenpuffer, die PVDF-Membran in Blotting-Puffer mit 20% Ethanol, das hergestellte Gel in Blotting-Puffer mit 5% Ethanol und 3 weitere Filterpapiere in Kathodenpuffer geschwenkt und zum Blotten verwendet.

Nach Abschluss des Proteintransfers wurde die Membran 2-malig in PBS-Puffer für 10 min gewaschen. Um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran 60 min in BSA-Blocking-Puffer geschwenkt. Darauf folgten zwei weitere Waschschriffe mit PBS-T-Puffer und ein weiterer Waschschriff mit PBS für jeweils 10 min. Im Anschluss wurde der Primärantikörper in 3% BSA-PBS verdünnt (Verdünnung s. Tabelle 31) und die Membran darin über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Membran wieder 3x10 min mit PBS-T und 1x5 min mit PBS gewaschen. Je nach Wirt des primären Antikörpers erfolgte anschließend mit entweder dem sekundären HRP-konjugierten Maus-anti-Ziege-IgG-Antikörper oder dem sekundären HRP-konjugierten Kaninchen-anti-Maus-IgG-Antikörper (Verdünnung 1:20.000 in 8% Milchpulver-PBS) die Inkubation für 60 min bei Raumtemperatur. Nach weiteren 4x10 min Waschen mit PBS-T wurde der HRP-konjugierte Antikörper mittels Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate nach Herstellerangaben nachgewiesen. Unter Verwendung von ChemiDoc™ MP System konnte die Lichtreaktion sichtbar gemacht werden.

III.2.4 RNA-Isolierung mit Qiagen-Kits

Die Reinigung von sowohl DNA als auch RNA und miRNA wurde mittels automatischem QIAcube durchgeführt. Die Technologie des QIAcube ist in der Lage alle erforderlichen Schritte der Isolierung (Lysieren, Binden, Waschen, Eluieren) automatisch auszuführen. Dabei wurden spezielle Kits von Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. So wurde RNA aus der ovariellen Zelllinie (RNeasy Mini Kit) und andererseits DNA und RNA aus ovariellen Tumorgewebe (ALL Prep DNA/RNA/miRNA Universal Kit) isoliert.

III.2.4.1 RNA-Isolierung von Zelllinien

Die RNA wurde aus der humanen ovariellen Zelllinie OV-MZ-6/KLK13 mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert. Die OV-MZ-6-Zelllinien waren bereits mit Expressionsplasmiden transfiziert, welche KLK13-mRNA enthielten. Nachdem die Zellen eine Zellzahl von 2×10^6 erreicht hatten, wurden diese mit 0,05% EDTA/PBS abgelöst und zentrifugiert.

Das entstandene Zellpellet wurde in 350 µl RLT Puffer und 3,5 µl β-Mercaptoethanol lysiert. Durch die Zugabe des RLT-Puffers, der eine hohe Konzentration an Guanidinisothiocyanat enthält, wurden die Zellwände, Plasmamembranen und andere Organellen der Zellen zerstört und somit die vollständige RNA freigesetzt. Um eine bestmögliche Homogenisierung des Lysats zu erhalten, wurden Qiashredder-Säulen verwendet. Die Extraktion der RNA erfolgte mit Hilfe des QiaCubes nach Angaben des Herstellers mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, D), wobei die RNA in 30-50 µl RNase freiem Wasser eluiert wurde.

III.2.4.2 RNA- und DNA-Isolierung aus ovarialem Tumorgewebe

Die Isolierung der RNA und DNA bestand aus drei Schritten:

Aufarbeitung der ovarialen Tumorproben

Das Tumorgewebe wird in Cryotubes in flüssigem Stickstoff vom Labor der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik der TU München gesammelt, sodass das Tumorgewebe auch noch nach langer Aufbewahrungszeit einen hohen Gehalt an intakter RNA und DNA aufweist. Zur Isolierung von DNA und RNA wurden die ausgewählten tiefgefrorenen Tumorproben in Stücke von maximal 10-20 µg geschnitten und in 600 µl RLT-Puffer (RLT-Puffer + β-Mercaptoethanol 1:100) gelöst.

DNA-Isolierung

Um eine optimale Homogenisierung des Lysats zu erreichen, wurde es in eine „Qiashredder“-Säule überführt und bei maximaler Geschwindigkeit 2 Min zentrifugiert. Anschließend wurde das Lysat in ein neues 2 ml- „Safe-lock Eppendorf tube“ gegeben und der QIAcube nach Anleitung (QIAcube, Protocol Sheet 2012, Part A-DNA Purification) mit Puffer AW1, AW2, EB und Proteinase K beladen. Durch die Kombination aus salzhaltigen Puffern und der sogenannten „AllPrep DNA Mini Column“ wird die DNA an die Säule gebunden. Der zusätzliche Proteinase-Verdau sorgt dafür, dass die Proteine von der DNA getrennt werden können. Schließlich enthält das Eluat die reine DNA.

RNA Isolierung

Der aus der DNA-Isolierung erhaltene Überstand, welcher die zu isolierende RNA enthält, wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß umgefüllt. Um aus Proben, die mehr Fettgewebe besitzen, die RNA optimal zu isolieren, wurde der Überstand mit 150 µl Chloroform gevortext und bei 4°C mit höchster Geschwindigkeit 3 min zentrifugiert. Durch das Zentrifugieren entstehen zwei Phasen, wobei die obere wässrige Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues 2 ml „Safe-lock Eppendorf tube“ gegeben wurde. Danach wurde der Qiacube wie im Protokoll (QIAcube, Protocol Sheet 2012, Part B-RNA Purification) mit den Proben, Puffern (FRN, RPE), RNase freiem Wasser, Ethanol, Proteinase K und DNase-Mix beladen. Die große Ausbeute an reiner RNA ist durch den Proteinase K-Verdau, das optimale Binden der RNA an die „RNeasy Mini spin column“ durch Ethanol und den DNase Verdau, der die RNA von der restlichen DNA befreit, gegeben. Die anschließenden Waschschrte mit den verschiedenen Puffern (FRN, RPE) und Ethanol reinigen die RNA nochmals, wobei man am Ende eine reine RNA in 50 µl RNase freiem Wasser erhielt.

Messung der DNA- und RNA-Konzentration mittels Nanodrop

Zur Bestimmung der Reinheit und der Konzentration der isolierten DNA und RNA wurde das Absorptionslevel (= A) 260/230 nm mittels eines Nanodrop gemessen. Als Referenz diente RNase-freies Wasser. Das A260/230 nm gibt dabei Hinweise auf organische Verunreinigungen der Probe, wobei bei einem Quotienten von 1,8 die RNA als ausreichend rein bewertet wurde. Zusätzlich erfolgte die Konzentrationsbestimmung in ng/µl mittels Nanodrop.

Die DNA wurde bei -20°C und die RNA bei -80°C aufbewahrt.

III.2.5 Reverse Transkription und cDNA Synthese

Die Reverse Transkription und cDNA-Synthese der isolierten RNA wurde mittels eines „Cloned AMV First-Strand Synthesis Kit“ (Invitrogen, Karlsruhe, D) durchgeführt. Für die cDNA-Synthese wurde eine RNA-Gesamtmenge von 500 ng (RNA aus Tumorgewebe) bzw. 1000 ng (RNA aus Zelllinie) eingesetzt. Zunächst wurde die Reaktion wie folgt angesetzt (s. Tabelle 33):

Tabelle 33: Mischverhältnis der cDNA Synthese

Random Hexamer Primer	1 µl
10 mM dNTP-Mix	2 µl
RNA	x µl je nach Konzentration
DEPC-treated Water	auf 12 µl aufgefüllt

Anschließend erfolgte die Denaturierung des RNA-Primer Gemisches mit dem Labcycler bei 65°C für 5 min. Nachdem die Proben auf Eis gestellt wurden, wurde die reverse Transkription der RNA durchgeführt. Hierzu wurden folgenden Reagenzien hinzugegeben (s. Tabelle 34):

Tabelle 34: Mischverhältnis der reversen Transkription

5x cDNA synthesis Buffer	4,0 µl
0,1 M DTT	1,0 µl
DEPC- treated water	1,1 µl
RNase OUT (40 U/µl)	1,0 µl
Cloned AMVRT (15 U/µl)	0,9 µl

Im Anschluss wurde erneut mittels Labcycler die reverse Transkription nach folgendem Protokoll durchgeführt (s. Tabelle 35):

Tabelle 35: Protokoll der Reversen Transkription im Labcycler

Temperatur	Zeit	Schritt
25 °C	10 min	Primerhybridisierung
50 °C	50 min	Reverse Transkription
85 °C	5 min	Inaktivierung der Reversen Transkriptase
4 °C	∞	Lagerung

Abschließend wurde die cDNA mit 80 µl RNase freiem Wasser verdünnt, um eine Konzentration von 10 ng/µl (cDNA aus Zelllinie) und 5 ng/µl (cDNA aus Tumorgewebe) zu erhalten. Für den weiteren Gebrauch wird die cDNA bei -20 °C gelagert.

III.2.6 Immunhistochemie

Zur immunhistochemischen Untersuchung wurden sogenannte „*Tissue micro arrays*“ (= TMA) verwendet, auf welchen sich zwischen 10-24 Tumorproben befanden. In Kooperation mit dem „Helmholtz-Zentrum München, Abteilung für analytische Pathologie“, wurden diese mittels der Ventana DISCOVERY® XT- Maschine angefärbt. Nach Entparaffinierung wurden die Schnitte mit Hitze und CC1-Puffer behandelt und anschließend für 12 h mit dem primären KLK14-Antikörper (Verdünnung 1:20) inkubiert. Als Antikörper wurde der KLK14-Antikörper von R&D System verwendet, da dieser am wenigsten Kreuzreaktionen aufwies. Danach erfolgte die Inkubation mit einem Sekundärantikörper und die Detektion mit DAB-Substrat. Abschließend folgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin (s. Protokoll im Anhang).

Die gefärbten Schnitte wurden mittels Hamamatsu Nanozoomer XT eingescannt und mit der Software NDP Scan bearbeitet und vergrößert.

Die Intensität der immunhistochemischen Färbungen von Ovarialkarzinomen wurde von zwei unabhängigen Pathologen (Prof. A. Walch und Dr. P. Dettmar) durchgeführt und wie folgt bewertet (s. Tabelle 36):

Tabelle 36: Bewertung der immunhistochemischen Analysen bei fortgeschrittenem serösen Ovarialkarzinom

Punktzahl	Färbeintensität
0	keine
1	schwach
2	moderat
3	stark

Die immunhistochemischen Färbungen von Mammakarzinomen wurden von denselben zwei unabhängigen Pathologen mit einem Zwei-Punkte-Scoring bewertet. Dabei wurde

die Intensität der Färbungen als auch die Anzahl gefärbter Tumorzellen (positiv) ermittelt (s. Tabelle 37).

Tabelle 37: Bewertung der immunhistochemischen Analysen bei triple-negativem Mammakarzinom

Punktzahl	Färbeintensität	Positive Zellen
0	keine	keine
1	schwach	weniger als 10 %
2	moderat	zwischen 10 und 50 %
3	stark	zwischen 51 und 80 %
4		mehr als 80 %

Diese beiden Punktzahlen wurden miteinander multipliziert und ergaben einen sogenannten immunreaktiven Score (IRS) (s. Tabelle 38):

Tabelle 38: Immunreaktiver Score (IRS)

Punktzahl	Interpretation der Färbung
0-2	negativ
3-4	schwach positiv
6-8	moderat positiv
9-12	stark positiv

III.2.7 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung wurde mittels SPSS Software Version 22.0 durchgeführt. Bei allen Analysen wurde eine statistische Signifikanz bei einem p-Wert von $\leq 0,05$ angenommen. Deskriptive Daten wurden mittels absoluter Häufigkeit sowie mit Mittelwert, Median, Perzentilen und Standardabweichung dargestellt. Die klinischen Parameter, wie das Alter der Patienten, der Resttumor und das Aszites-Volumen wurden jeweils in 2 Gruppen (Alter < 60 vs. > 60 , Resttumor 0 mm vs. < 0 mm, Aszitesvolumen < 500 ml vs. > 500 ml) eingeteilt.

Um einen Zusammenhang zwischen klinischen Parametern und der KLK13-mRNA-Expression zu ermitteln, wurde der Chi²-Unabhängigkeitstest angewandt und in Kreuztabellen dargestellt.

Das 5-Jahres-Gesamtüberleben und das 5-Jahres progressionsfreie Überleben wurden mittels Kaplan-Meier-Überlebenskurven dargestellt, wobei die Signifikanz mittels Log-Rank-Test erfolgte. Dabei setzten sich das Gesamtüberleben aus der Differenz vom Tag der Operation und dem Tag des Versterbens und das progressionsfreie Überleben vom Tag der Operation bis zum Tag der Rezidivdiagnose zusammen. Patientinnen mit einem progressionsfreien Überleben unter 3 Monaten wurden aus der Studie ausgeschlossen.

Um Korrelationen zwischen den verschiedenen mRNA-Expressionen der KLK-Mitglieder

nachzuweisen, wurden Mann-Whitney-Testanalysen durchgeführt und der Korrelationskoeffizient nach Spearman (R) bestimmt. Graphisch wurde die Korrelation der KLK13-mRNA mit anderen KLK-Mitgliedern in Streudiagrammen und Boxplots dargestellt. Um den Einfluss der klinischen Parameter und die KLK13-mRNA-Expression auf das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben zu prüfen, wurden sowohl univariate als auch multivariate Cox-Regressionsanalysen durchgeführt. Hierzu wurde die Hazard-Rate (= HR) und das 95%-Konfidenzintervall (= 95%-KI) angegeben.

IV. Ergebnisse

IV.1 Klinische Relevanz der KLK13-mRNA-Expression beim fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom

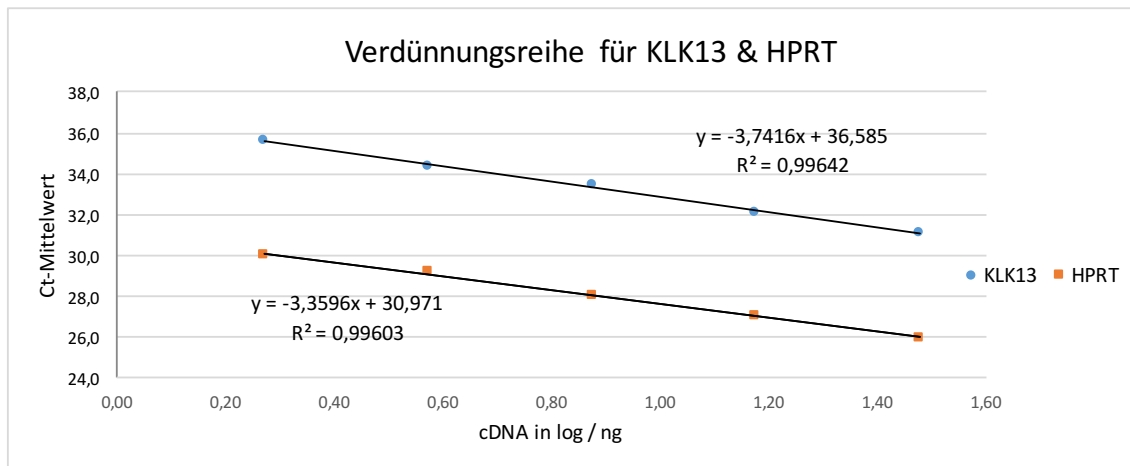
Mit Hilfe der quantitativen Polymerasekettenreaktion wurde Tumorgewebe von insgesamt 91 Patientenproben mit fortgeschrittenem, serösen Ovarialkarzinom (FIGOIII/IV) auf die Expression von KLK13 untersucht. RNA aus Patientenproben, die eine ungenügende Qualität aufweisen, Patientenproben, die aus nicht rein serösen Ovarialkarzinomen stammten oder Proben von Patientinnen, die zuvor eine neoadjuvante Therapie erhalten hatten, wurden von der Auswertung ausgeschlossen (s. II.1.1, Tabelle 5). Demnach enthalten die folgenden Analysen Proben von 88 Patientinnen.

IV.1.1 Etablierung des qPCR-Systems

Hierzu wurde in vier Durchläufen die Sensitivität des Systems mittels Standardverdünnungsreihen (DNA0-DNA4; 30-1,875 ng) von cDNA aus einer KLK13-exprimierenden Zelllinie (OVMZ-6-KLK13) bestimmt. Es wurde der Korrelationskoeffizient R^2 , die Effizienz und $2^{\text{exp}-\Delta\Delta\text{Ct}}$ für die Verdünnungsreihen ermittelt (s. Abbildung 5). Bei einem R^2 -Wert von 0,9-1,0 und einer Effizienz zwischen 1,9-2,0 wurde der Test als robust und stabil bewertet. Um die Spezifität des qPCR-Systems sicherzustellen, wurden verschiedene Negativ-Kontrollen (Referenzzelllinie ohne endogene KLK-Expression, Reverse-Transkription-Negativkontrolle, genomische DNA, nicht transkribierte RNA und PCR-Mastermix ohne cDNA) bei allen Durchläufen mitgeführt. Anschließend wurde in 4 unabhängigen qPCR-Durchläufen mit 4 gleichen Ovarialkarzinomproben (OVD1-4) die Robustheit des qPCR-Systems überprüft. Die Normalisierung des KLK13-mRNA-Niveaus erfolgte mittels relativer Quantifizierung zum Referenzgen HPRT und einer Kalibrator-cDNA (Zelllinie OVMZ-6-KLK13) mit der $2^{\text{exp}-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -Methode (s. Abbildung 6).

Zusätzlich wurde der prozentuale Fehler sowohl innerhalb verschiedener Durchläufe als auch innerhalb eines Versuches berechnet. Da dieser bei der Verdünnungsreihe als auch bei der Versuchsreihe mit Patientenproben unter 30 % lag, konnte eine hohe Sensitivität und Spezifität für ein robustes qPCR-System angenommen werden.

A



B

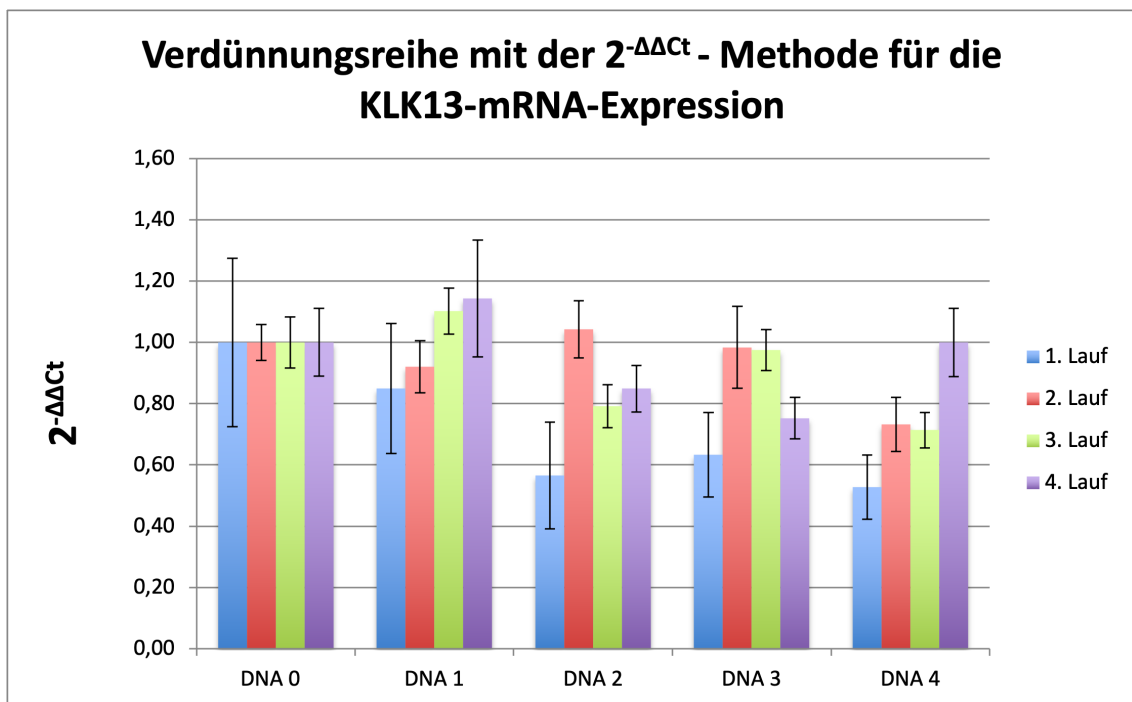


Abbildung 5: Beispiel einer Verdünnungsreihe für KLK13 und HPRT mit der cDNA OVMZ6/KLK13 (DNA0-DNA4, 30-1,875ng)

A) Die gemessenen Ct-Werte wurden auf der y-Achse gegen die bekannten Konzentrationen der Verdünnungen logarithmisch auf der x-Achse aufgetragen.

Der Korrelationskoeffizienten R^2 lag bei allen durchgeführten Läufen für KLK13 über 0,99 und für HPRT über 0,98. Für HPRT betrug die Effizienz einen Wert von 1,97 bis 2,00. Für KLK13 war diese bei Werten um die 1,74 bis 1,94. Die beiden Geraden laufen parallel, was für eine effiziente und konstante Amplifikation der beiden Gene spricht.

B) Es wurden 4 qPCR-Durchläufe mit 4 verschiedenen KLK13-DNA (1-4) durchgeführt. Für alle 4 Läufe wurde der Wert $2^{-\Delta\Delta Ct}$ für die verschiedenen KLK13-DNA ermittelt und in einem Balkendiagramm dargestellt. Innerhalb eines Durchlaufs wurde jeweils 3-mal die gleiche DNA verwendet und der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Mittelwert verwendet. Der prozentuale Fehler innerhalb eines qPCR-Durchlaufs und zwischen den verschiedenen Läufen war unter 30%.

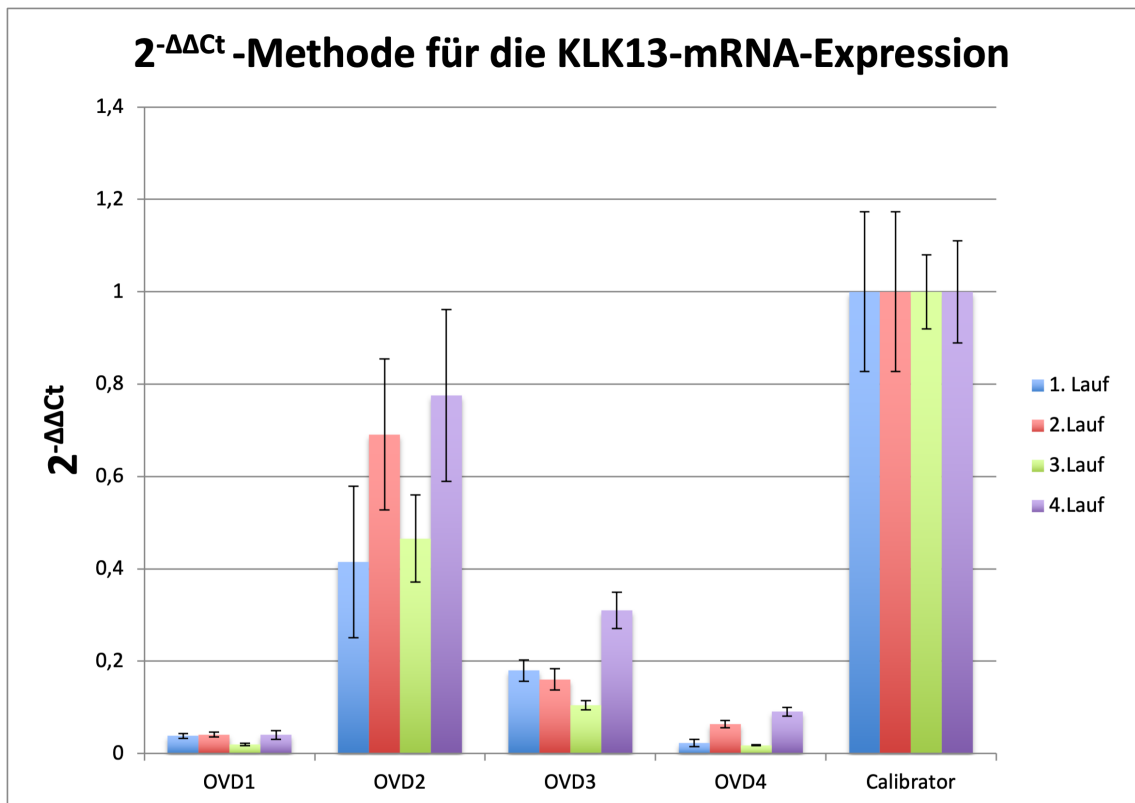


Abbildung 6: Auswertung der 4 Ovarialkarzinomproben (OVD1-4) mittels Berechnung von $2^{-\Delta\Delta Ct}$ für KLK13

Es erfolgte die Auswertung der KLK13-mRNA-Expression in vier verschiedenen Ovarialkarzinomproben in vier verschiedenen qPCR-Durchläufen. Die Auswertung erfolgte wie mittels Berechnung von $2^{-\Delta\Delta Ct}$, wobei sich $\Delta\Delta Ct$ aus der Subtraktion von ΔCt (Ovarialkarzinomproben) und ΔCt (Zelllinie OVMZ6/KLK13) ergibt. Das Balkendiagramm zeigt, dass in den verschiedenen durchgeführten Läufen eine geringe Abweichung besteht und der ermittelte prozentuale Fehler unter 30 % betrug, und somit ist die Robustheit des qPCR Systems angenommen.

IV.1.2 KLK13 mRNA Expressionslevel im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom

Die KLK13-mRNA-Expressionslevel wurden mittels der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ – Methode errechnet. Bei der Auswertung wurden PCR-Läufe für solche Ovarialkarzinomproben wiederholt, die im ersten Lauf keine oder zu hohe (>30) Ct-Werte aufwiesen. Des Weiteren wurden einzelne ausgewählte Proben wiederholt, um Standardabweichungen innerhalb zweier valider Durchläufe zu prüfen. Anschließend wurden Proben nach folgenden Kriterien ausgeschlossen:

1. wenn ein Ct-Wert für HPRT > 35 war
2. wenn der prozentuale Fehler (auch nach Wiederholungen) sowohl bei HPRT als auch KLK13 > 30% betrug
3. wenn die errechnete prozentuale Standardabweichung der ermittelten $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte sowohl bei HPRT als auch bei KLK13 zweier valider Durchläufe > 47,1 % war.

Es konnten am Ende der qPCR-Analysen 88 Proben für KLK13 mit fortgeschrittenem

serösen Ovarialkarzinom für die weitere statistische Auswertung verwendet werden. Parallel wurden von einer Kollegin der Arbeitsgruppe, Nancy Ahmed, dieselben Proben auf die KLK14-mRNA-Expressionslevel untersucht und mit der Effizienzkorrektur-Methode berechnet (Dettmar et al., 2018). Die Analysen für die KLK14-mRNA-Expression werden im Folgenden als zusätzlicher „Biomarker“ zum Teil mit aufgeführt. Die unten aufgeführte Tabelle 39 zeigt die mRNA-Expressionslevel für KLK13 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode) und die KLK14- mRNA-Expression (effizienzkorrigierte Methode) mit Bestimmung von wichtigen Einteilungskriterien (Median, Mittelwert usw.).

Tabelle 39: Deskriptive Statistik der KLK13 und KLK14-mRNA-Expressionslevel

	KLK13	KLK14
Anzahl der Proben	88	88
Mittelwert	3,06	0,03
Standardabweichung	3,97	0,08
Minimum	0,03	0
Maximum	24,59	0,55
25.Perzentile	0,78	0,00 (0,004)
Median	1,61	0,01
75.Perzentile	3,99	0,03

Es ist zu erkennen, dass die Expressionsmuster für KLK13 und KLK14 weit gestreut sind, da Mittelwert und Median stark voneinander abweichen. Im Gegensatz zu den KLK13-Expressionswerten waren die von KLK14 mit einem Maximum von 0,55 deutlich niedriger. Für die weiteren statistischen Analysen wurden die mRNA-Expressionslevel von KLK13 (und KLK14) in zwei Gruppen eingeteilt (s. Abbildung 7). Hierzu wurde das 75. Perzentil als sogenannter „Cut-Off“ verwendet. Ein niedriges Expressionslevel wird für das 1., 2. und 3. Quartil, ein hohes Expressionslevel für das 4. Quartil angenommen.

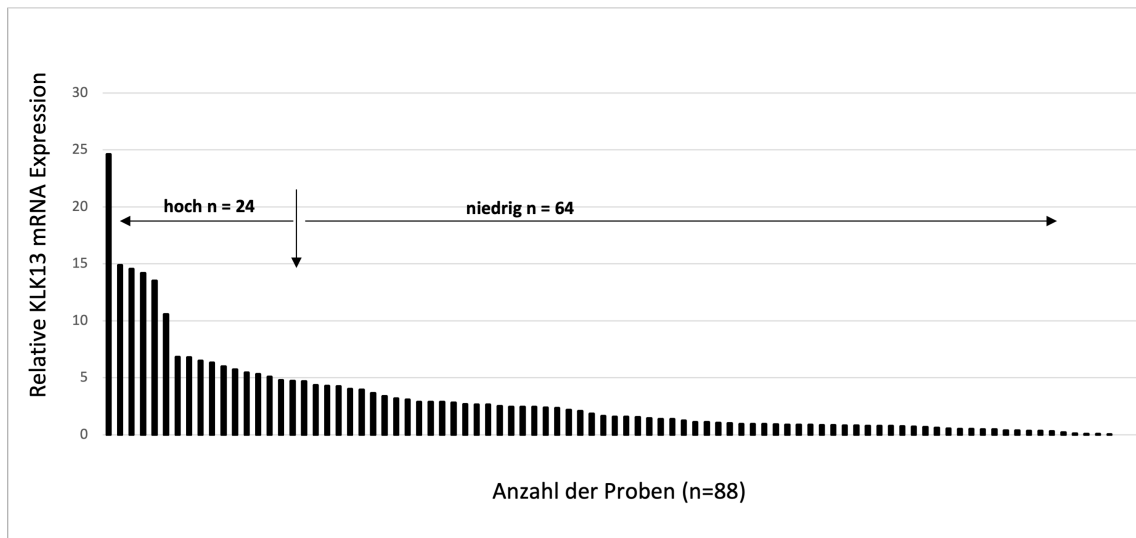


Abbildung 7: Relative KLK13-mRNA-Expression im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom

Es erfolgt, die Einteilung der mRNA-Expressionslevel von KLK13 in zwei Gruppen. Das 75. Perzentil diente als sogenannter „Cut-Off“. Die Anzahl der hohen Expressionslevel beträgt für KLK13 $n = 24$ und zu den niedrigen Expressionslevel werden $n = 64$ gezählt.

IV.1.3 Assoziation zwischen etablierten klinischen Parametern für Ovarialkarzinome und der KLK13-mRNA-Expression

Mit dem χ^2 -Unabhängigkeitstest wurde geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen etablierten klinischen Faktoren für Eierstockkrebs, wie das Alter, das präoperative Aszitesvolumen und der postoperativen Resttumormasse und dem mRNA-Expressionsniveau von KLK13 besteht. Für den χ^2 -Unabhängigkeitstest wurden die zu untersuchenden klinischen Parameter jeweils gruppiert und mit den mRNA-Expressionsniveaus (niedrig/hoch) von KLK13 korreliert. Wie in Tabelle 40 dargestellt, bestehen keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den mRNA-Werten von KLK13 in Bezug auf die etablierten prognostischen Parameter des Ovarialkarzinoms.

Tabelle 40: Assoziation zwischen etablierten klinischen Parametern für Ovarialkarzinome und KLK13-mRNA-Expression

Klinische Parameter	Anzahl der Patienten	KLK13 ^a
		niedrig/hoch
Gesamtanzahl der Patienten	88	64/24
Alter		p = 0,223
≤ 60 Jahre	42	28/14
> 60 Jahre	46	36/10
Resttumor		p = 0,920
> 0 mm	37	27/10
> 0 mm	50	36/14
Aszites		p = 0,894
≤ 500 ml	40	29/11
> 500 ml	42	31/11

^aCut-off: 75. Perzentil

IV.1.4 Assoziation von KLK13/KLK14-mRNA-Expression sowie den klinisch etablierten Parametern mit dem Gesamtüberleben und progressionsfreiem Überleben

Mit Hilfe von sowohl univariaten als auch multivariaten Cox-Regressionsanalysen konnte die Assoziation zwischen den hohen und niedrigen KLK13-mRNA-Expressionsniveaus und dem Gesamtüberleben bzw. progressionsfreiem Überleben untersucht werden. Zudem wurde die Stärke der Assoziation der etablierten klinischen Prognosefaktoren und dem 5-Jahres-Überleben und 5-Jahre-progressionsfreiem Überleben analysiert. Hierzu wurden alle zu untersuchenden Parameter in 2 Gruppen eingeteilt (0 mm Resttumor vs. > 0 mm, Alter < 60 Jahren vs. > 60 Jahren und Aszitesvolumen < 500 ml vs. > 500 ml, KLK13/14 hoch vs. niedrig). Den Erwartungen entsprechend wiesen Patienten mit Resttumor und hohem präoperativem Aszitesvolumen ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben (HR = 3,71; 95%-KI = 2,02-6,83; p < 0,001 und HR = 1,81; 95%-KI = 1,03-3,19; p = 0,041) und progressionsfreies Überleben (HR = 3,15; 95%-KI = 1,79-5,56; p < 0,001 und HR = 1,91; 95%-KI = 1,08-3,39; p = 0,026) auf. Patientinnen mit hohem KLK13-mRNA-Expressionslevel zeigten ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben (HR = 1,81; 95%-KI = 1,03-3,19; p = 0,041) und erhöhtes Risiko für Rezidive (HR = 1,97; 95%-KI = 1,12-3,47; p = 0,020). Im Gegensatz zu KLK13 waren hohe KLK14-mRNA-Expressionswerte signifikant mit längerem progressionsfreiem Überleben assoziiert (HR = 0,44; 95%-KI = 0,22-0,86; p = 0,017), während nur ein Trend zur Signifikanz für das 5-Jahres-Überleben beobachtet werden konnte (HR = 0,54; 95%-KI = 0,28-1,05; p = 0,070) (s. Tabelle 41). Das Alter der Patientin zeigte keine Korrelation mit dem Rezidivrisiko und Überleben. Mittels Kaplan-Meier-Schätzungen konnte der Zusammenhang zwischen dem klinischen Ergebnis und den Prognoseparametern, sowie der KLK13-Expression zusätzlich bestätigt werden (s. Abbildung 8 und 9).

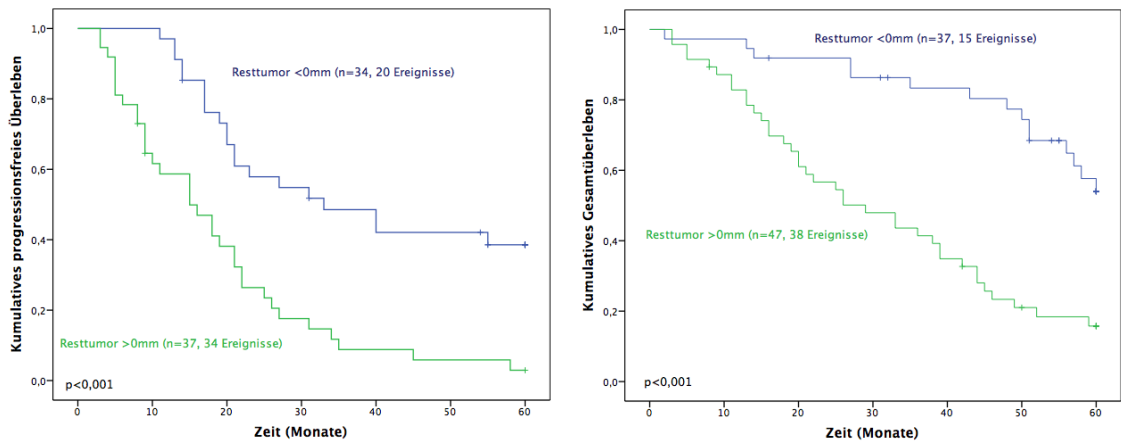
Tabelle 41: Univariate Cox-Regressionsanalyse des Gesamt- bzw. progressionsfreien Überlebens bei Patientinnen mit fortgeschrittenem serösen Ovarialkarzinom (FIGO III/IV) in Bezug auf klinisch etablierte Prognosefaktoren und KLK13/14 Expression

Klinische Parameter	Gesamtüberleben (60 Monate)			Progressionsfreies Überleben (60 Monate)		
	N ^a	HR (95% KI) ^b	p	N	HR (95% KI) ^b	p
Alter			0,370			0,422
≤ 60 Jahre	39	1		32	1	
> 60 Jahre	45	1,28 (0,75-2,20)		38	1,25 (0,73-2,15)	
Resttumor			< 0,001			< 0,001
0 mm	37	1		34	1	
> 0 mm	46	3,71 (2,02-6,83)		36	3,15 (1,79-5,56)	
Aszites			0,037			0,026
≤ 500 ml	40	1		35	1	
> 500 ml	38	1,82 (1,04-3,21)		30	1,91 (1,08-3,39)	
KLK13 mRNA			0,041			0,020
niedrig	59	1		46	1	
hoch	23	1,81 (1,03-3,19)		22	1,97 (1,12-3,47)	
KLK14 mRNA			0,070			0,017
niedrig	60	1		49	1	
hoch	22	0,54 (0,28-1,05)		19	0,44 (0,22-0,86)	

^aAnzahl der Patienten

^b Hazard-Rate und 95% Konfidenzintervall der univariaten Cox-Regressionsanalyse

A



B

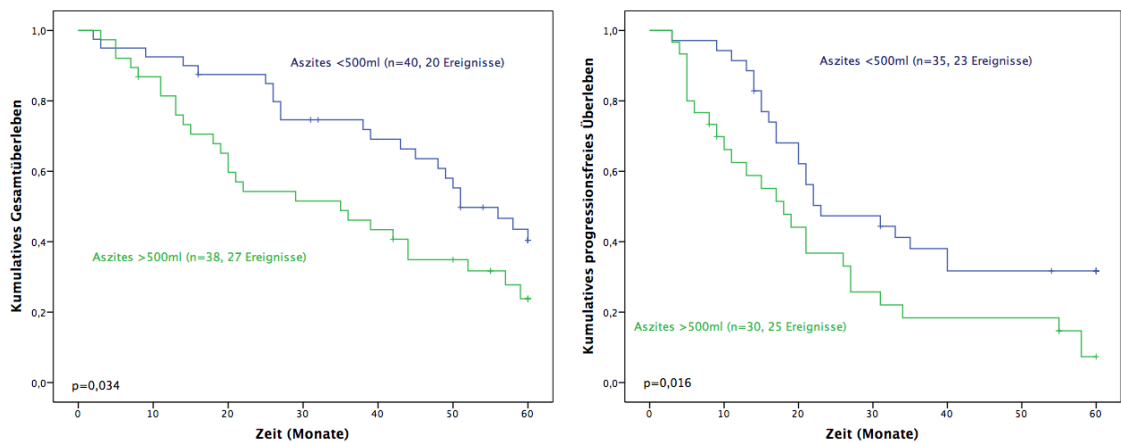


Abbildung 8: Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben bei fortgeschrittenem serösen Ovarialkarzinom (FIGOIII/IV) nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von etablierten klinischen Prognoseparametern (Aszitesvolumen und Resttumormasse)

A) Eine Resttumormasse zeigt sowohl ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben ($p < 0,001$, linke Abbildung) als auch ein progressionsfreies Überleben ($p < 0,001$, rechte Abbildung).

B) Zusätzlich spricht auch ein höheres präoperatives Aszitesvolumen (> 500 ml) für ein schlechteres 5-Jahres-Überleben ($p = 0,034$, linke Abbildung) und höheres Rezidivrisiko ($p = 0,016$, rechte Abbildung).

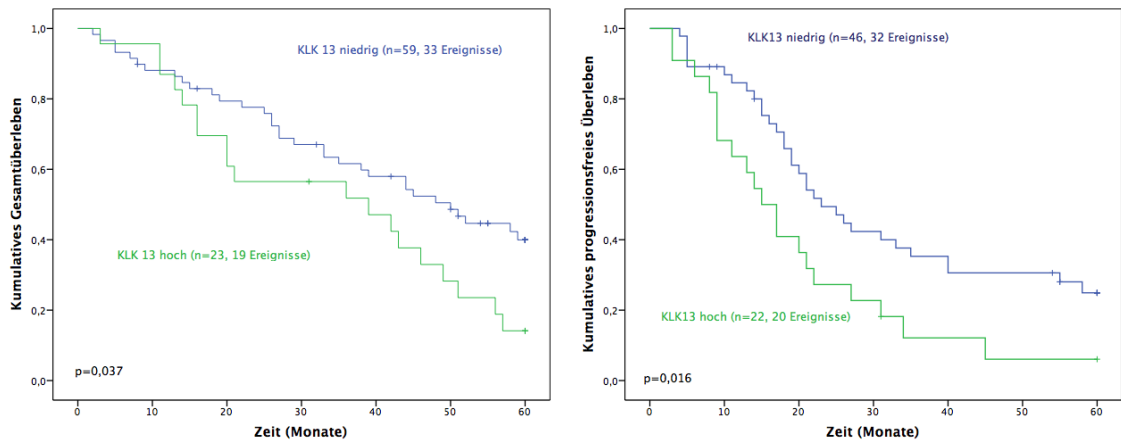


Abbildung 9: Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben bei fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom (FIGOIII/IV) nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von der KLK13-mRNA-Expression

Patientinnen mit einer niedrigen KLK13-mRNA-Expression zeigen ein signifikant besseres Gesamtüberleben ($p = 0,037$, linke Abbildung) sowie ein geringeres Risiko an einem Rezidiv zu erkranken ($p = 0,016$, rechte Abbildung). Als „Cut-off“ für die mRNA-Spiegel von KLK13 wurde das 75. Perzentil verwendet.

Schließlich wurde eine multivariate Regressionsanalyse nach Cox durchgeführt, um die unabhängige Beziehung der KLK13- und KLK14-mRNA-Expression in Bezug zu anderen etablierten klinischen Parametern auf das Gesamt- und progressionsfreie Überleben zu prüfen. Hierzu wurde ein Basismodell aus den etablierten klinischen Prognoseparametern (Alter, Aszitesvolumen, Resttumormasse) erstellt und anschließend separat die dichotomisierten KLK13- oder KLK14-mRNA-Expressionlevel hinzugefügt. Man konnte im Basismodell beobachten, dass nur die verbleibende Tumormasse ein prädiktiver Marker für ein schlechteres 5-Jahres-Überleben ($HR = 3,46$; $95\%-KI = 1,66-7,20$; $p = 0,001$) und progressionsfreies Überleben ($HR = 3,12$; $95\%-KI = 1,49-6,51$; $p = 0,002$) darstellte. Hingegen verlor der Faktor präoperatives höheres Aszitesvolumen seine prädiktive Bedeutung (Gesamtüberleben: $HR = 1,09$, $95\%-KI = 0,56-2,13$; $p = 0,809$, progressionsfreies Überleben: $HR = 1,20$, $95\%-KI = 0,60-2,41$, $p = 0,604$). Beim separaten Hinzufügen von KLK13 konnte ein Trend zur Signifikanz für das Gesamtüberleben ($HR = 1,82$; $95\%-KI = 0,99-3,35$; $p = 0,054$) gesehen werden. Bei KLK14 zeigte sich gegenüber dem Gesamtüberleben ein Trend zur Signifikanz ($HR = 0,52$; $95\%-KI = 0,25-1,06$; $p = 0,073$). Jedoch stellen sowohl die KLK13- als auch KLK14-mRNA-Expressionslevel eine unabhängige prognostische Bedeutung in Bezug auf das Risiko eines Rezidivs dar (KLK13: $HR = 1,87$; $95\%-KI = 1,02-3,44$; $p = 0,043$, KLK14: $HR = 0,40$; $95\%-KI = 0,19-0,84$; $p = 0,016$). Fügt man dagegen KLK13 und KLK14 gleichzeitig zum Basismodell hinzu, konnte in der multivariablen Analyse gezeigt werden, dass hohe KLK13-Werte für ein kürzeres Gesamtüberleben ($HR = 2,05$; $95\%-KI = 1,08-3,88$; $p = 0,020$) sowie progressionsfreies Überleben ($HR = 2,14$; $95\%-KI = 1,13-4,08$; $p = 0,037$) sprechen. Im Gegensatz dazu sind hohe KLK14-Werte mit einem längeren Gesamt- und progressionsfreiem Überleben (Gesamtüberleben: $HR = 0,46$; $95\%-KI = 0,22-0,95$; $p = 0,037$; Progressionsfreies Überleben: $HR = 0,36$; $95\%-KI = 0,17-0,76$; $p = 0,007$) assoziiert (s. Tabelle 42).

Tabelle 42: Multivariate Cox-Regressionsanalyse des Gesamt- bzw. progressionsfreien Überlebens bei Patienten mit fortgeschrittenem serösen Ovarialkarzinom (FIGO III/IV) in Bezug auf klinisch etablierte Prognosefaktoren und KLK13/14 Expression

Klinische Parameter	Gesamtüberleben (60 Monate)			Progressionsfreies Überleben (60 Monate)		
	N ^a	HR (95% KI) ^b	p	N ^a	HR (95% KI) ^b	p
Alter			0,888			0,366
≤ 60 Jahre	39	1		32	1	
> 60 Jahre	45	1,05 (0,56- 1,95)		38	0,74 (0,39- 1,42)	
Resttumor			0,001			0,002
0 mm	37	1		34	1	
> 0 mm	46	3,46 (1,66- 7,20)		36	3,12 (1,49- 6,51)	
Aszites			0,809			0,604
≤ 500 ml	40	1		35	1	
> 500 ml	38	1,09 (0,56- 2,13)		30	1,20 (0,60- 2,41)	
KLK13 mRNA			0,054			0,043
niedrig	59	1		46	1	
hoch	23	1,82 (0,99- 3,35)		22	1,87 (1,02- 3,44)	
KLK14 mRNA			0,073			0,016
niedrig	60	1		49	1	
hoch	22	0,52(0,25- 1,06)		19	0,40 (0,19- 0,84)	
KLK13 mRNA			0,028			0,020
niedrig	59	1		46	1	
hoch	23	2,05 (1,08- 3,88)		22	2,14 (1,13- 4,08)	
KLK14 mRNA			0,037			0,007
niedrig	60	1		49	1	
hoch	22	0,46 (0,22- 0,95)		19	0,36 (0,17- 0,76)	

Als Basismodell dienten die für das Ovarialkarzinom etablierten klinischen Prognoseparameter zu dem sowohl separat als auch gleichzeitig die KLK13 und KLK14 mRNA Expression hinzugefügt wurde.

^aAnzahl der Patienten

^b Hazard-Rate und 95% Konfidenzintervall der multivariaten Cox-Regressionsanalyse

IV.1.5 Korrelation der mRNA-Expression verschiedener Mitglieder der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen zueinander beim fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom

In der Arbeitsgruppe der klinischen Forschergruppe der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar wurden weitere KLK-Mitglieder auf ihre mRNA-Expression mittels qPCR beim fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom (FIGO III/IV) untersucht und für statistische Auswertungen zur Verfügung gestellt. Um einen Zusammenhang der mRNA-Expression der verschiedenen Mitglieder der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen im Ovarialkarzinom zu prüfen, wurde eine nichtparametrische Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt (s. Tabelle 43). Nachdem eine Korrelation durch den Spearman-Test festgestellt wurde, bestätigte sich dieses Ergebnis nochmals mit der Mann-Whitney-Testanalyse und mit der Boxplot-Darstellung (s. Abbildung 10).

Es konnte mittels Rangkorrelationsanalyse nach Spearman gezeigt werden, dass eine signifikant moderate Korrelation zwischen der KLK13- und KLK10- ($R = 0,544$, $p < 0,001$) sowie KLK11- ($R = 0,541$, $p < 0,001$) mRNA-Expression besteht. Der Zusammenhang der mRNA-Expression von KLK13 und KLK10 bzw. KLK11 konnte durch den Mann-Whitney-Test zusätzlich verifiziert werden ($p < 0,001$). Des Weiteren wurden moderat hohe Korrelationen der mRNA-Expressionen zwischen weiteren KLK-Mitgliedern festgestellt, vor allem zwischen KLK9/15, KLK6/10 und KLK10/11 (s. Tabelle 43).

Tabelle 43: Korrelation zwischen der untersuchten mRNA-Expression der verschiedenen KLK-Mitglieder (KLK6, -8, -9, -10, -11, -13, -14, -15) im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom

	KLK13	KLK15	KLK14	KLK11	KLK10	KLK9	KLK8
KLK6	R = 0,393 p < 0,001	R = -0,128 p < 0,001	R = 0,228 p = 0,033	R = 0,317 p = 0,003	R = 0,557 p < 0,001	R = 0,078 p = 0,484	R = 0,476 p < 0,001
KLK8	R = 0,263 p = 0,013	R = 0,184 p = 0,117	R = 0,162 p = 0,131	R = 0,438 p < 0,001	R = 0,485 p < 0,001	R = 0,110 p = 0,320	
KLK9	R = 0,104 p = 0,345	R = 0,716 p < 0,001	R = 0,267 p = 0,015	R = 0,159 p = 0,074	R = 0,074 p = 0,406		
KLK10	R = 0,544 p < 0,001	R = 0,030 p = 0,744	R = 0,400 p < 0,001	R = 0,647 p < 0,001			
KLK11	R = 0,541 p < 0,001	R = 0,134 p = 0,146	R = 0,439 p < 0,001				
KLK14	R = 0,218 p = 0,045	R = 0,197 p = 0,097					
KLK15	R = 0,027 p = 0,820						

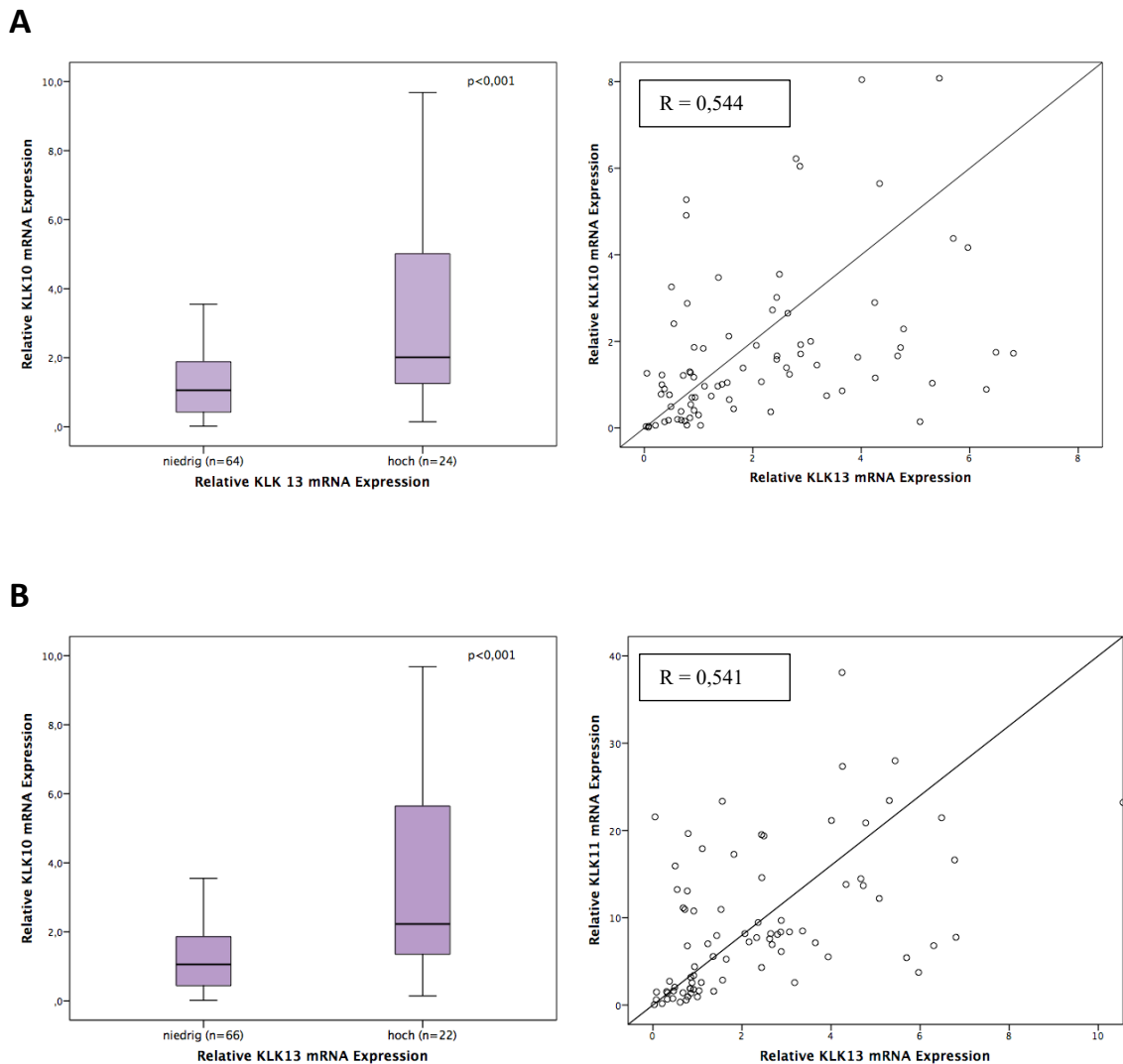


Abbildung 8: Korrelationen der KLK13-mRNA-Expression mit KLK10- und KLK11-mRNA-Expressionslevel im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom

A) Die KLK13-mRNA-Expression korreliert signifikant mit dem KLK10-mRNA-Spiegel im Ovarialkarzinom. In der linken Abbildung wurden die KLK13- und KLK10-mRNA-Expressionslevel als lineare Faktoren in einem Streudiagramm dargestellt (Spearman-Korrelationsanalyse: $R = 0,544$, $p < 0,001$). Rechts wurden die KLK13-mRNA-Spiegel durch das 75. Perzentil gruppiert und auf eine Korrelation mit den KLK10-mRNA-Werten geprüft (Mann-Whitney-Test: $p < 0,001$).

B) Zudem besteht eine signifikante Korrelation der KLK13- und KLK11-mRNA-Spiegel im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom. Links erfolgte die Abbildung der KLK13- und KLK11-mRNA-Werte als lineare Faktoren mit Darstellung in einem Streudiagramm (Spearman-Korrelationsanalyse: $R = 0,541$, $p < 0,001$). In der Abbildung rechts sind die KLK13-mRNA in niedrige (1. + 2. + 3. Quartil) und hohe (4. Quartil) Werte aufgeteilt und wurden mit den KLK11 mRNA-Spiegeln korreliert (Mann-Whitney-Test: $p < 0,001$).

Zusammenfassend lässt sich zeigen, dass eine hohe KLK13-mRNA-Expression mit einer schlechten Prognose für das Gesamtüberleben und progressionsfreie Überleben im fortgeschrittenem serösen Ovarialkarzinom einhergeht. Im Gegensatz war eine hohe KLK14-mRNA-Expression mit einer besseren Prognose für das fortgeschrittene seröse Ovarialkarzinom assoziiert (Dettmar et al., 2018). Ziel des nächsten Schritts war, zu untersuchen, ob es möglich ist, neben der mRNA-Analyse auch die Proteinexpression dieser beiden KLKs im Tumorgewebe zu untersuchen.

IV.2 Charakterisierung von Antikörpern für die Analyse der KLK13- und KLK14-mRNA-Expression beim fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom und triple-negativen Mammakarzinom

Für die Etablierung der immunhistochemischen Untersuchung der KLK13 und KLK14-Proteinexpression beim fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom und triple-negativen Mammakarzinom sollten jeweils zwei kommerziell erhältliche Antikörper getestet werden, ob diese für immunhistologische Analysen geeignet sind. Nachdem die KLK-Familie aus 15 homologen Proteasen mit hoher Sequenzhomologie (ca. 40-60% identische Aminosäuren) besteht, musste zunächst untersucht werden, ob die Antikörper spezifisch nur auf KLK13 bzw. KLK14 reagieren.

IV.2.1 Klonierung der Proform der Kallikrein-ähnlichen Peptidase 1

Da in unserem Labor alle Proformen der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen (2-15) mit Ausnahme der Proform der Kallikrein-ähnlichen Peptidase 1 zur Verfügung standen, sollte hierzu zunächst die Kallikrein-ähnliche Peptidase 1 hergestellt und aufgereinigt werden. Dies war vor allem wichtig, um bei späteren Antikörpertestungen mögliche Kreuzreaktionen aufzudecken.

Für die Klonierung der kodierenden Sequenz von pro-KLK1 wurden folgende Schritte durchgeführt (s. Abbildung 11):

- 1) Amplifizierung der pro-KLK1-Sequenz (s. IV. 2.1.1)
- 2) Behandlung mit Restriktionsenzymen Sal I und Bam HI (s. IV.2.1.2)
- 3) Ligation des pro-KLK1-Fragments in den pQE100-Vektor und Transformation in *E.coli* (s. IV.2.1.3)

Um die korrekte Klonierung von KLK1 zu verifizieren, erfolgte als letzter Schritt die Sequenzierungsanalyse (s. IV.2.1.4 und IV.2.1.5)

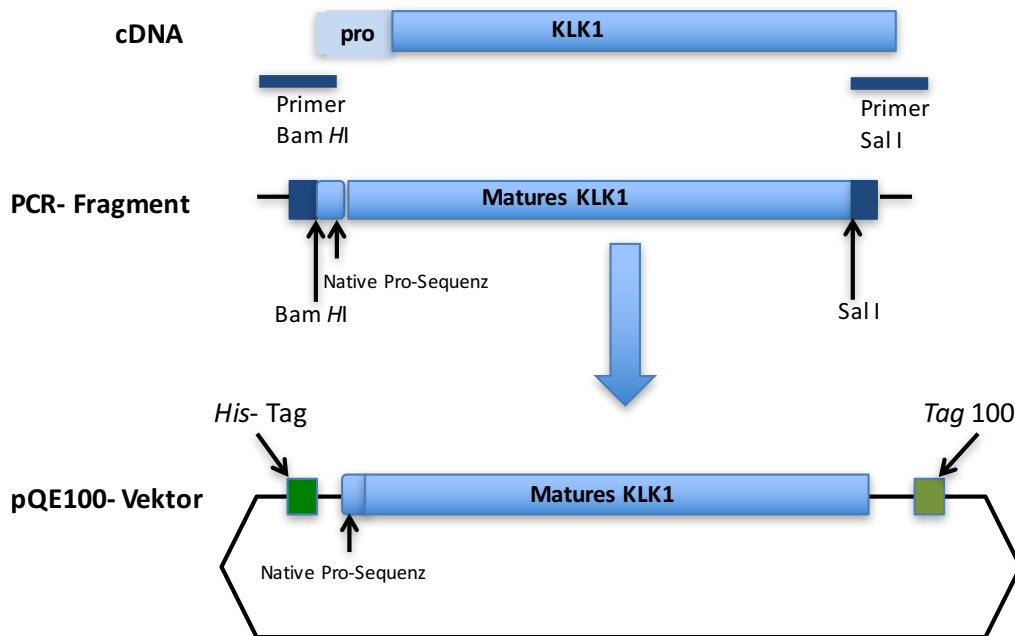


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Klonierung der Proform der Kallikrein-ähnlichen Peptidase 1

Als Ausgangsprodukt wurde die cDNA des Pro-KLK 1 von Abgent, San Diego (obere Abbildung) verwendet. Diese wurde mit zwei Primerpaaren *forward* und *reverse* (blaue Balken) versetzt und durch Polymerasekettenreaktion vervielfältigt. Danach wurde sowohl das PCR-Fragment als auch der Vektor pQE100 mit den Restriktionsenzymen Sal I und Bam HI geschnitten (mittlere Abbildung). Anschließend erfolgte die Ligation des PCR-Fragments in den Vektor. Die untere Abbildung zeigt den Vektor, welcher matures KLK1 mit dem nativen Propetid, einen 6xHis-Tag am N-Terminus sowie Tag 100 am C-Terminus umfasst. Der 6xHis-Tag dient später als Bindungsstelle für Nickelionen und kann die Identifizierung des Proteins möglich machen bzw. kann zur Reinigung des Proteins verwendet werden. Durch spezielle Antikörper kann auch der Tag 100 detektiert werden.

IV.2.1.1 Vervielfältigung der pro-KLK1 cDNA mittels PCR

Zur Amplifikation der pro-KLK1-Sequenz wurde eine PCR mit pro-KLK1-cDNA, Primern, DNA-Polymerase und Nukleotidtriphosphat-Bausteinen durchgeführt. Da die Sequenzen, die an das Template mit Hilfe der Primer angehängt werden sollen, zu lang für eine PCR-Reaktion werden, wurden zwei aufeinander aufbauende PCR-Reaktionen durchgeführt. Durch die Primer wurden kurze Sequenzen an das Amplikon angefügt, die als Restriktionschnittstellen für Sal I und Bam HI dienen. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (s. Abbildung 12). Hier wurde bei beiden Durchläufen ein PCR-Produkt auf Höhe von etwa 750-770 Basenpaaren (bp), welches der cDNA für pro-KLK1 entspricht, detektiert.

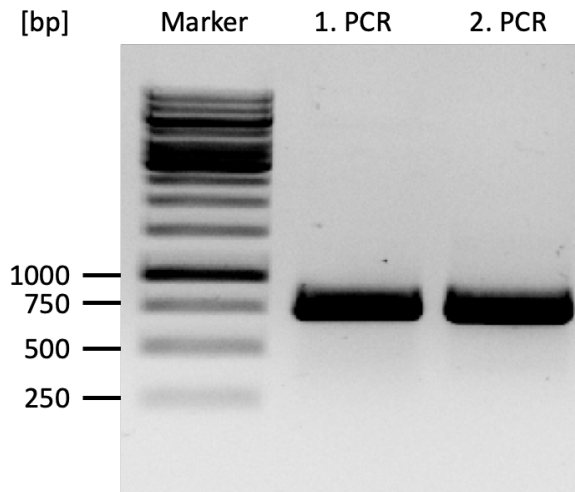


Abbildung 10: PCR-Produkte von pro-KLK 1

Das Agarosegel zeigt die vervielfältigten pro-KLK1-cDNA-Fragmente auf einer Höhe von etwa 750-770 Basenpaaren (bp). Der aufgetragene Marker gibt verschiedene Banden als Referenzwerte in bp an. Reihe 1 (1.PCR) zeigt das pro-KLK1-Fragment nach einmaligem PCR-Lauf. Reihe 2 (2.PCR) stellt pro-KLK1 nach dem zweiten PCR-Lauf dar.

Für die weiteren Klonierungsschritte wurde das cDNA-Fragment des zweiten Laufs verwendet.

IV.2.1.2 Behandlung der DNA-Fragmente mit Restriktionsenzymen Bam HI und Sal I

Es erfolgte ein Restriktionsverdau des pro-KLK1-cDNA-Fragments (aus Punkt IV.2.1.1, 2.PCR) mit den Restriktionsendonukleasen Sal I und Bam HI, um die Gensequenzen der cDNA auf die Vektor-DNA abzustimmen. Anschließend wurde nochmals eine elektrophoretische Auftrennung mittels Agarosegel durchgeführt (s. Abbildung 13). Dies diente der Konzentrationsabschätzung des Verhältnisses von Vektor zu Fragment für die anschließende Ligation. Für die Ligation wurde ein molares Fragment-Vektor-Verhältnis von 5:1 gewählt.

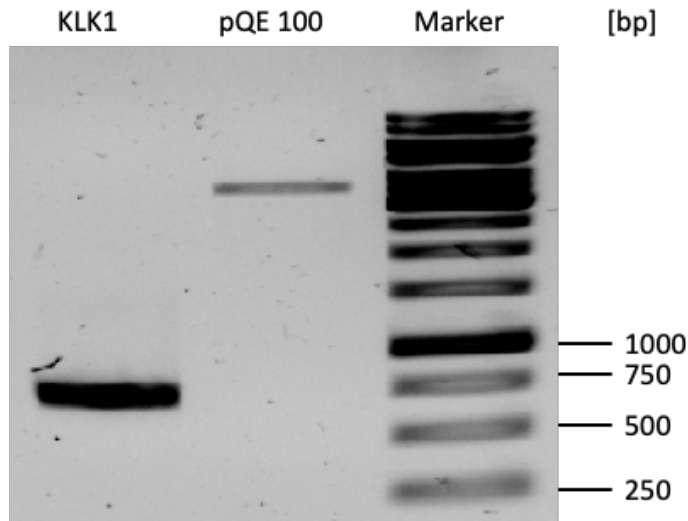


Abbildung 11: Pro-KLK1 nach Restriktion mit Sal I und Bam HI

Das Gel zeigt rechts den Marker zur Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente. Mittig läuft der pQE100-Vektor, welcher zur Konzentrationsabschätzung des Verhältnisses Vektor zu Fragment für die darauffolgende Ligation diente. Links befindet sich die mit Sal I und Bam HI behandelte cDNA von KLK1, mit einer Größe von ca. 745 bp.

IV.2.1.3 Ligation des pro-KLK1-DNA-Fragments in den Vektor pQE100 und Transformation in *E.coli*

Durch die Behandlung mit Restriktionsendonukleasen sind die freien Enden von Vektor und pro-KLK1-Fragment aufeinander abgestimmt. Es konnte somit aus dem Vektor und dem pro-KLK1-Fragment ein Expressionsplasmid hergestellt werden. Um das Plasmid zu amplifizieren, wurde dieses in zwei verschiedene *E.coli*-Stämme (XL1 blue und M15 [pREP4]) transformiert. Für die weiteren Untersuchungen wurden jedoch nur die *E.coli*-Stämme von M15 [pREP4] verwendet.

IV.2.1.4 Restriktionsanalysen der klonierten Plasmide

Nach Präparation der Plasmid-DNA wurde mittels Restriktionsanalyse mit den vorher verwendeten Enzymen Bam HI und Sal I der Erfolg der Ligation überprüft. Es konnte mittels elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel gezeigt werden, dass die verschiedenen Klone jeweils den pQE 100-Vektor und das gewünschte pro-KLK1-Fragment enthielten (s. Abbildung 14).

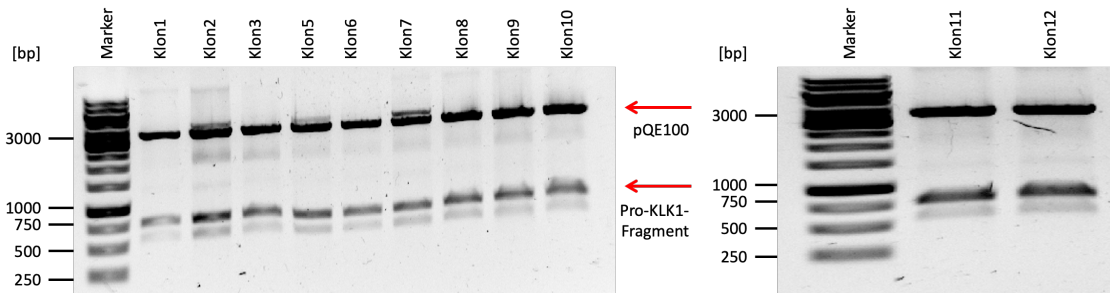


Abbildung 12: Restriktionsprodukte von Pro-KLK1 nach Restriktionsanalyse mit den Enzymen Sal I und Bam HI

Auf beiden Gelen befindet sich links der Marker zur Abschätzung der Größen der Fragmente. Es erfolgte die Restriktion von 11 verschiedenen Klonen aus M15[pREP4], die pro-KLK1 enthielten. Die obere starke Bande, markiert mit einem Pfeil, stellt den pQE100-Vektor mit ca. 3000 bp dar. Die untere heller erscheinende Bande, auch mit einem Pfeil markiert, entspricht dem pro-KLK1-Fragment mit ca. 750 bp. Die zusätzlich schwächeren Schattenbanden sind Fragmente, die dem Plasmid [pREP4] des Stammes M15 zugeordnet werden können.

IV.2.1.5 Sequenzierungsergebnisse

Zwei ausgewählte Klone (Klon 8 und 11) wurden zur Plasmidsequenzierung eingeschickt. Dies diente zur Überprüfung, ob die pro-KLK1 die korrekten Nukleotidsequenzen aufweist. Die Sequenzierung erfolgte in der Firma „Eurofins Genomics DNA sequencing service“ in Ebersberg mit Hilfe eines Abgleichs von bereits veröffentlichten Nukleotidsequenzen. Es konnten keine Abweichungen zu den bereits veröffentlichten Nukleotidsequenzen festgestellt werden (s. Abbildung 15).

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

Sal I Tag100-Epitop

Abbildung 13: Sequenzierungsergebnis der Proform der Kallikrein-ähnlichen Peptidase 1

Die Sequenz des rekombinanten pro-KLK1 (in pQE100) beinhaltet eine Histidin-Tag (blauer Kasten), ein Tag100-Epitop (grüner Kasten), sowie die Schnittstellen Bam HI und Sal I (rot markiert). Die Pro-Sequenz des KLK1 ist im grauen Kasten zu finden. Die mature KLK1-Sequenz liegt zwischen den beiden gelben Pfeilen. Die Zellklone 8 und 11 entsprachen beide der gleichen DNA-Sequenz und wurden von der Firma Eurofins analysiert.

IV.2.2 Expression und Reinigung der Proform KLK1

Für weitere Analysen war es wichtig, ausreichende Mengen des rekombinanten KLK1-Proteins zu erhalten. Die Expression des Proteins erfolgt durch eine Aktivierung der bakteriellen Genexpression von pro-KLK1 mittels IPTG. Wie bereits in III.2.2.9 beschrieben enthält der pQE 100-Vektor eine zweifache lac-Operator- Sequenz, die durch ein lac-Repressor-Protein gehemmt wird. In Abwesenheit von Galaktose ist das lac-Repressor-Protein aktiv. Bindet jedoch IPTG an den lac-Repressor, wird dieser inaktiviert und die Expression von KLK1 kann erfolgen. Die Reinigung der Proform von KLK1 kann mit Hilfe des Histidin-Tags am N-Terminus möglich gemacht werden. Aufgrund der sechs Histidin-Einheiten besteht eine große Affinität zu Nickel-NTA-Agarose bei neutralem/basischem pH.

IV.2.2.1 Induktion der pro-KLK1 Proteinexpression mittels IPTG

IPTG-Zugabe und Wachstumsanalyse:

Abbildung 16 zeigt, dass nach IPTG-Zugabe sich das Wachstum ein wenig verlangsamt (im Vergleich zu ohne IPTG). Dies deutet darauf hin, dass das rekombinante KLK1-Protein in größeren Mengen gemacht wird und die Zellteilungszeit dadurch etwas verlangsamt wird.

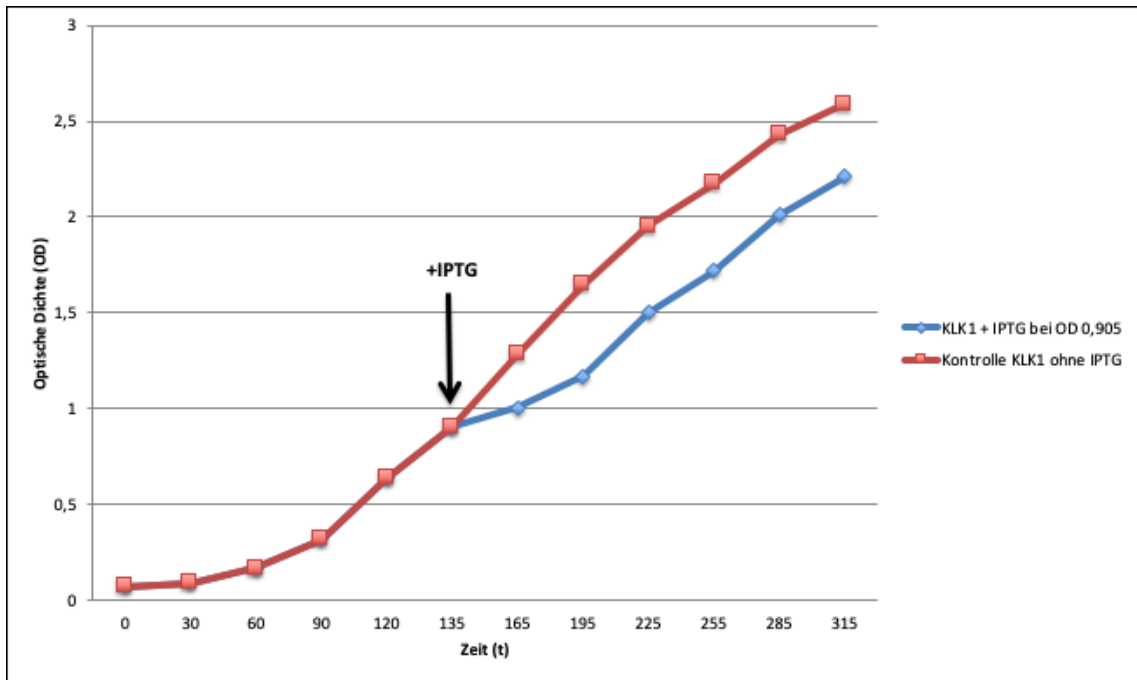


Abbildung 14: Wachstumskurve der pro-KLK1-produzierenden *E.coli* M15-[pREP4] nach Induktion mit IPTG

Nach Herstellung einer Übernachtskultur mit *E.coli* M15-[pREP4] erfolgte die Messung der OD₆₀₀ alle 30 Min. Bei einem OD-Wert von 0,905 wurde IPTG hinzugeben und weiter gemessen. Aus den ermittelten OD₆₀₀-Werten wurde eine Wachstumskurve erstellt. Die rote Linie entspricht den Zellen ohne IPTG, wobei die blaue Linie die Messung nach Zugabe von IPTG zeigt. Durch die Zugabe von IPTG wird das Wachstum zwar initial etwas verlangsamt, was aber keinen zu großen Effekt auf das Wachstum der *E.coli*-Zellen hat.

Zum Nachweis, ob die mit den Expressionsplasmiden transformierten *E.coli*-Zellen (Klon 8 und 11) das gewünschte KLK1-Protein produzieren, wurden Extrakte hergestellt und diese sowohl ohne als auch mit IPTG inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassieblau angefärbt (s. Abbildung 17).

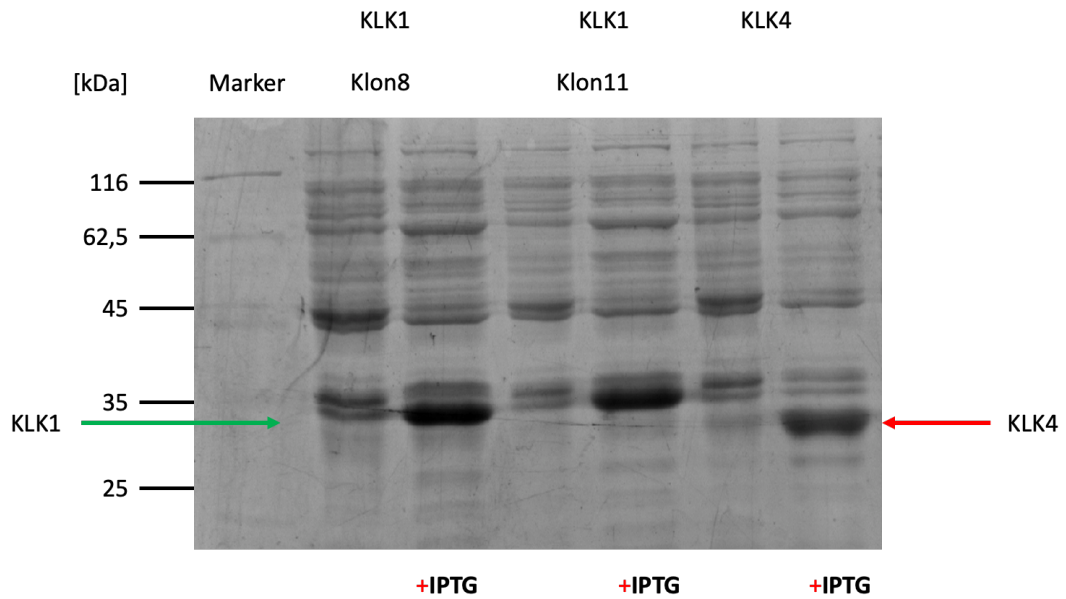


Abbildung 15: Expressionsanalyse mittels SDS-PAGE und Coomassieblau-Färbung von rekombinatem humanen pro-KLK1 in *E.coli*-M15-[pREP4]-Extrakten

Es ist zu sehen, dass die Zellen in Anwesenheit von IPTG eine deutliche sichtbare zusätzliche Probenbande produzieren. Der grüne Pfeil markiert die Anreicherung des KLK1-Proteins. Als Kontrolle dienten transformierte Zellen, die ein Expressionsplasmid mit KLK4-Protein enthielten, welches mit einem roten Pfeil gekennzeichnet wurde. Es ist zu sehen, dass sowohl pro-KLK1 als auch pro-KLK4 nach Zugabe von IPTG deutlich mehr anreichert wird.

Um sicher zu stellen, ob das rekombinante Protein exprimiert wird, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Hierzu wurden primäre Antikörper gegen den His-Tag des rekombinanten Proteins verwendet, womit bewiesen werden konnte, dass es sich um das rekombinante Protein handelt (s. Abbildung 18).

Es ist eindeutig zu erkennen, dass durch Zugabe von IPTG die transformierten *E.coli*-Zellen das gewünschte rekombinante Protein KLK1 exprimieren.

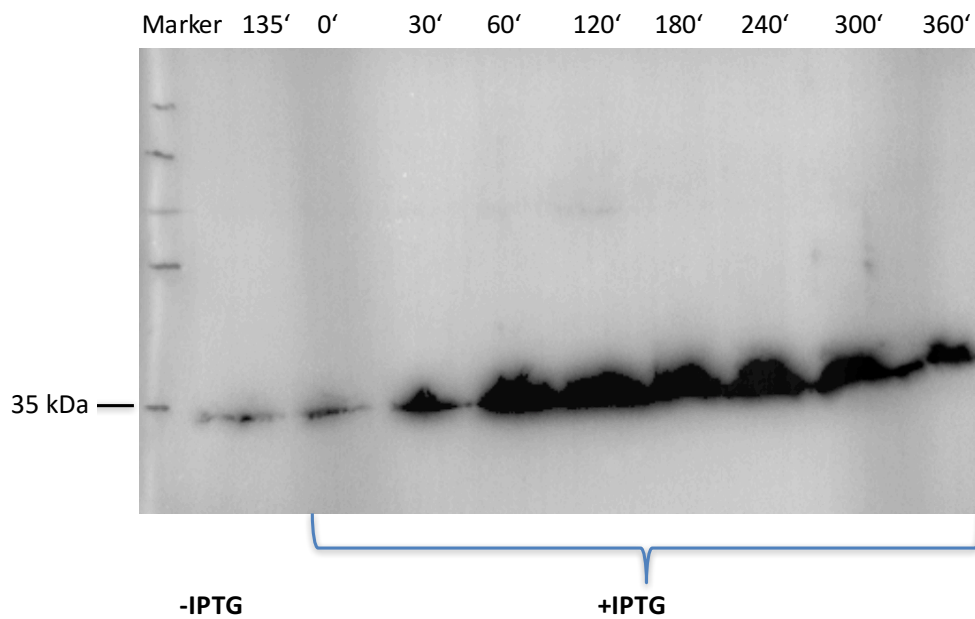


Abbildung 16: Expressionsanalyse mittels Western Blot von rekombinatem humanen pro-KLK1 in *E.coli*

Für die Expressionsanalyse mittels Western Blot wurde eine Probe ohne IPTG-Zugabe aufgetragen. Es handelte sich um eine Probe mit einem OD600-Wert von 0,9, welcher nach 135 Min gemessen wurde. Die zusätzlichen Spuren enthalten Extrakte nach IPTG-Zugabe nach 0 - 360 Min. Der verwendete primäre Antikörper ist gegen den His-Tag des rekombinanten Proteins gerichtet. Zu sehen ist, dass das Expressionsmaximum von KLK1 bei etwa 120-240 Min liegt.

IV.2.2.2 Die gereinigte Proform von KLK1

Die Reinigung des rekombinanten Proteins erfolgte mittels Affinitätschromatographie mit der Ni²⁺-NTA- Agarose-Säule. Zunächst wurde die Säule mit einem Puffer mit einem pH von 8,0 gewaschen, durch Absenken des pH-Wertes wurden unspezifische Proteine abgelöst. Durch weiteres Absenken des pH-Wertes wurde schließlich das reine rekombinante pro-KLK1 isoliert. Von den verschiedenen Elutionspuffer-Fractionen wurden Proben genommen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassieblau gefärbt (s. Abbildung 19). Bei einem pH-Wert von 7-5,8 sind geringe Mengen an KLK1-Protein zu erkennen. Die größten eluierten KLK1-Proteinmengen wurden bei einem pH-Wert von 5,2-4,6 gesehen. Das gereinigte rekombinante Protein ist zu über 95% rein.

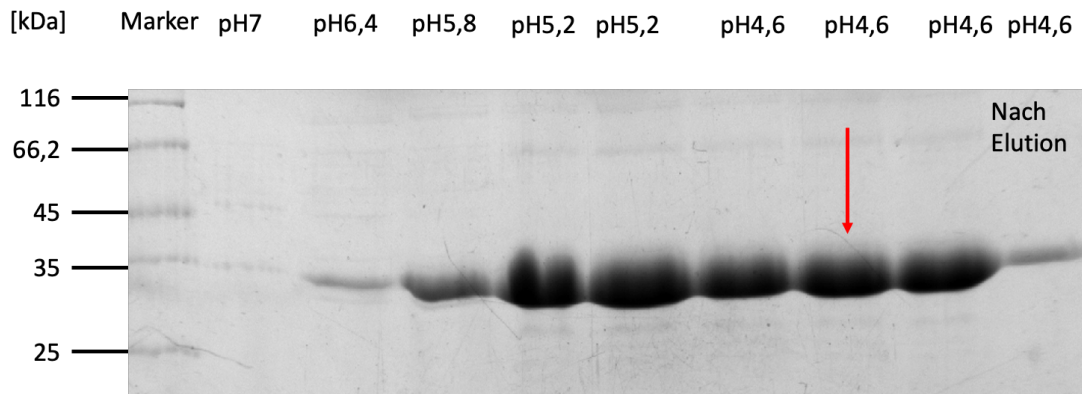


Abbildung 17: Aufreinigung des pro-KLK1

Um das aufgereinigte pro-KLK1 darzustellen, erfolgte die Auftrennung mittels SDS-PAGE und Coomassieblau-Färbung. Zu sehen sind die verschiedenen Elutionsfraktionen mit unterschiedlichen pH-Werten von pH 7 - 4,6 (siehe obere Zeile). In der 1. Spur wurde ein Protein-Marker aufgetragen. Die größten eluierten Proteinmengen sind bei einem pH zwischen 5,2 - 4,6 zu erkennen. Mit dem roten Pfeil wurde die Elutionsfraktion gekennzeichnet, die für spätere Analysen verwendet wurde. Das gereinigte rekombinante Protein ist zu über 95% rein.

IV.2.3 Testung der Sensitivität und Spezifität der polyklonalen Antikörper gegen KLK13 und KLK14

Für die Etablierung von immunhistochemischen Analysen sollten polyklonale Antikörper gegen KLK13 und KLK14 zunächst auf ihre Sensitivität und Spezifität im Western Blot getestet werden. Dabei sollte vor allem untersucht werden, ob die verwendeten Antikörper Kreuzreaktionen mit den anderen Mitgliedern der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen aufweisen.

IV.2.3.1 Konzentrationsbestimmung der Proformen der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen 1 bis 15

Um vergleichbare Proteinkonzentrationen der jeweiligen Kallikrein-Mitglieder 1-15 zu erhalten, erfolgte die Auftrennung mittels SDS-PAGE und Färbung mit Silbernitrat (s. Abbildung 20). Diese Konzentrationsbestimmung der einzelnen Kallikrein-Mitglieder sollte vermeiden, dass die Western Blot Analysen aufgrund von unterschiedlichen Konzentrationen verfälscht werden. Zunächst wurden die Konzentrationen der Kallikrein-Mitglieder 2-6, 13 und 14 bestimmt und anschließend die Konzentration von KLK1 ermittelt. Um die Anwesenheit aller Kallikrein-Mitglieder 1-15 sicherzustellen, wurden anschließend Western Blot Analysen mittels eines spezifischen Antikörpers gegen den angehängten Histidin-Tag durchgeführt (s. Abbildung 21). Hierfür wurden annähernd ähnliche Konzentrationen der verschiedenen Proformen verwendet.

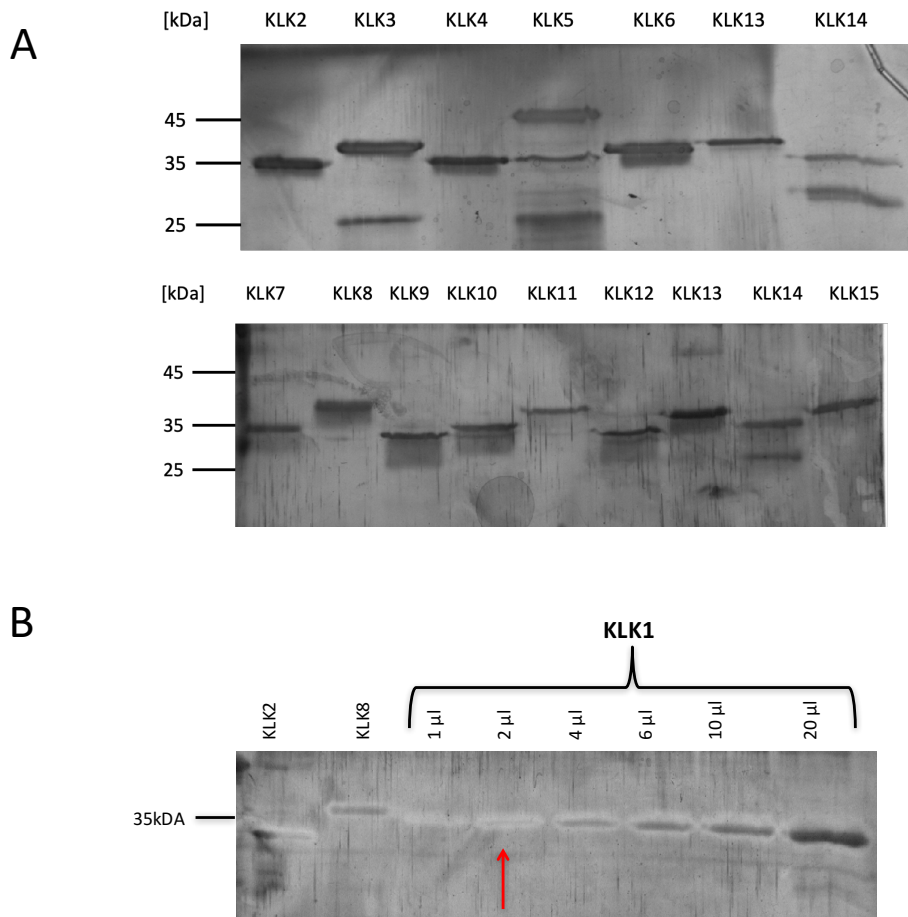


Abbildung 18: Konzentrationsbestimmung der Proformen der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen 1 bis 15 nach Auftrennung mittels SDS-PAGE und Färbung mit Silbernitrat

Bei allen Gelen wurde in Spur 1 ein Marker zur Größenbestimmung mitgeführt.

A) Es wurden alle Proformen der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen von 2 bis 15 aufgetragen und deren relative Konzentration für den weiterführenden Western Blot bestimmt.

B) Im Anschluss wurde die gewünschte Konzentration für Pro-KLK1 in Abbildung B bestimmt. Hierzu wurden als Kontrollen in Bande 2 und 3 KLK2 und KLK8 mitgeführt und unterschiedliche KLK1 Konzentrationen von 1 µl bis 20 µl verwendet. Der rote Pfeil markiert die gewählte Konzentration von KLK1.

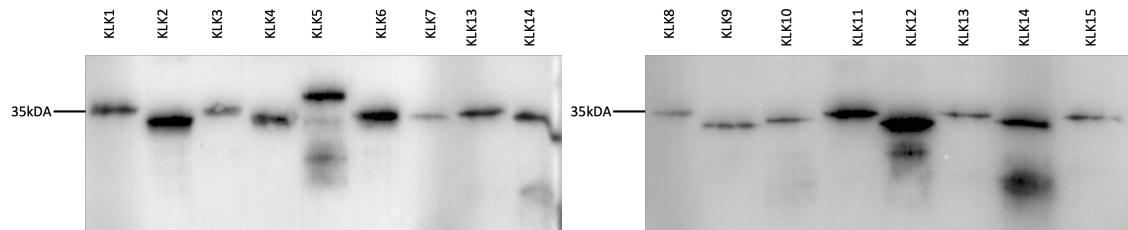


Abbildung 19: Western Blot Analyse zur Identifizierung aller Proformen der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen 1 bis 15 mittels Penta-Histidin Antikörper

Die Anwesenheit der KLK-Mitglieder 1-15 wurde mittels Western Blot Analysen mit einem monoklonalen Penta-Histidin-Antikörper überprüft. Der verwendete Antikörper detektiert spezifisch den molekularbiologisch angehängten Histidin-Tag der KLK. Es ist für alle Proformen der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen von 1 bis 15 eine Bande zu erkennen, welche als Beweis für deren Anwesenheit gilt. Die Größe der Proformen variiert zwischen 30-35 kDa.

IV.2.3.2 Western Blot Ergebnisse mit KLK13- und KLK14- Antikörpern

Um einen geeigneten Antikörper für die immunhistochemischen Analysen zu ermitteln, wurden jeweils zwei verschiedene polyklonale KLK13-Antikörper als auch KLK14-Antikörper (s. Tabelle 19) getestet. Es erfolgte zunächst die Testung der Antikörper gegen pro-KLK2 bis 15. Nach Produktion und Aufreinigung von pro-KLK1 wurde eine nochmalige Testung gegen dieses durchgeführt. Hierzu dienten KLK6 und KLK8 als interne Kontrollen. Sowohl beide benutzten KLK13-Antikörper als auch der KLK14-Antikörper von R&D zeigten keine Kreuzreaktionen mit anderen KLK-Mitgliedern. Im Gegensatz dazu kann bei dem KLK14-Antikörper von Agrisera eine Kreuzreaktion mit KLK1, -6, -8, -10 und -13 beobachtet werden (s Abbildung 22 & 23).

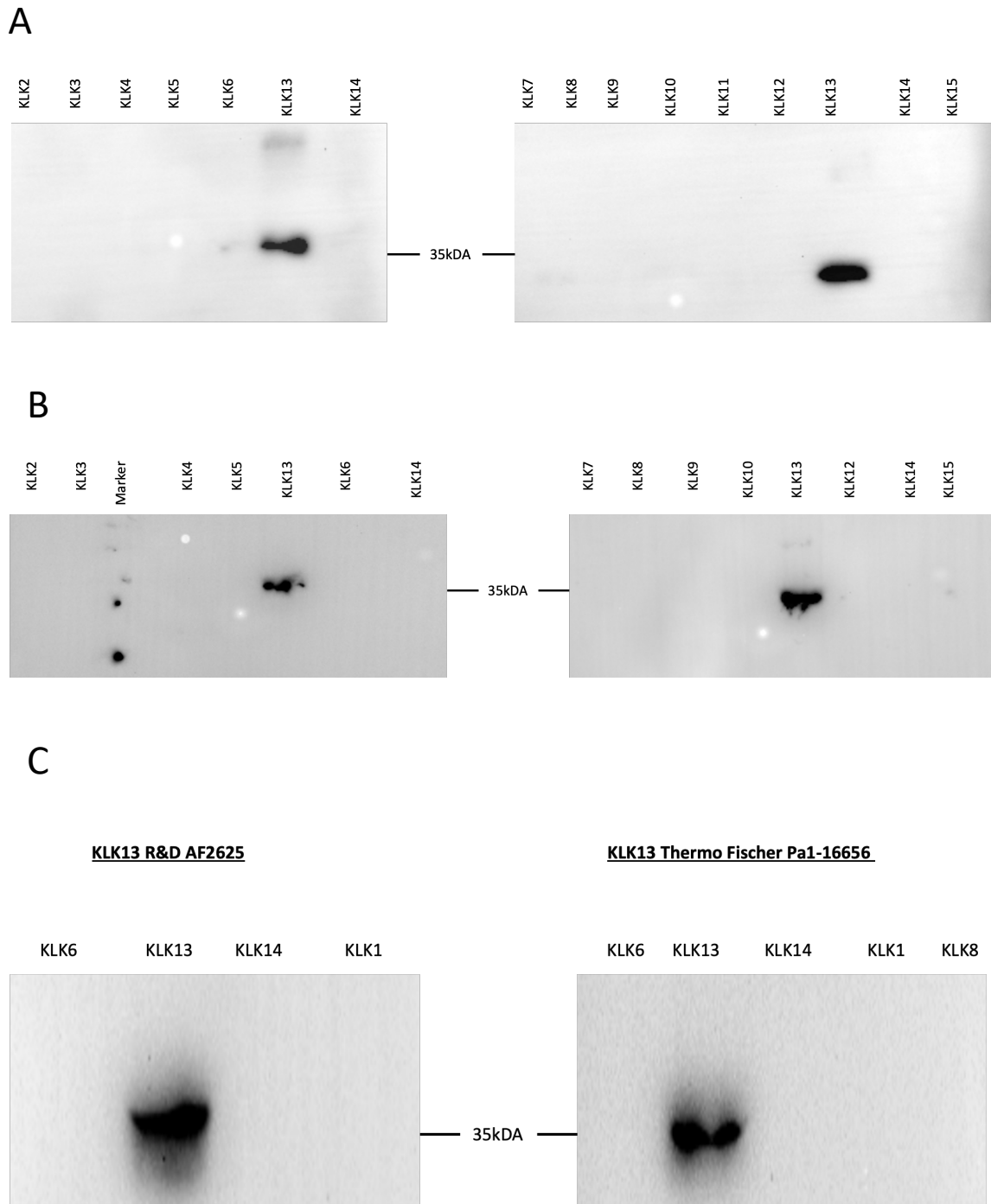


Abbildung 20: Western Blot Analyse zur Testung der Spezifität und Sensitivität der KLK13-Antikörper

In den Abbildungen A+B wurde der KLK13-Antikörper gegen die Proformen KLK2 bis 15 getestet. In C erfolgte die Testung des KLK13-Antikörpers gegen pro-KLK1. Zur Größenbestimmung wurde ein Marker mitgeführt. Das ermittelte Molekulargewicht der KLK-Mitglieder betrug etwa 35 kDa.

A) Die Inkubation des Antikörpers KLK13 von R&D mit den verschiedenen KLKs resultiert mit einer dicken Bande bei KLK13. Es sind keine Kreuzreaktionen gegen die anderen KLK-Mitglieder zu sehen.

B) Die Western Blot Analyse mit dem KLK13-Antikörper von Thermo Fischer weist keine Kreuzreaktionen auf. Es wird ausschließlich KLK13 detektiert.

C) Beide KLK13-Antikörper wurden nochmals gegen Pro-KLK1 getestet. Als zusätzliche Kontrollen dienen Pro-KLK6 und -KLK8. Es konnten keine Kreuzreaktionen der Antikörper mit Pro-KLK1 festgestellt werden.

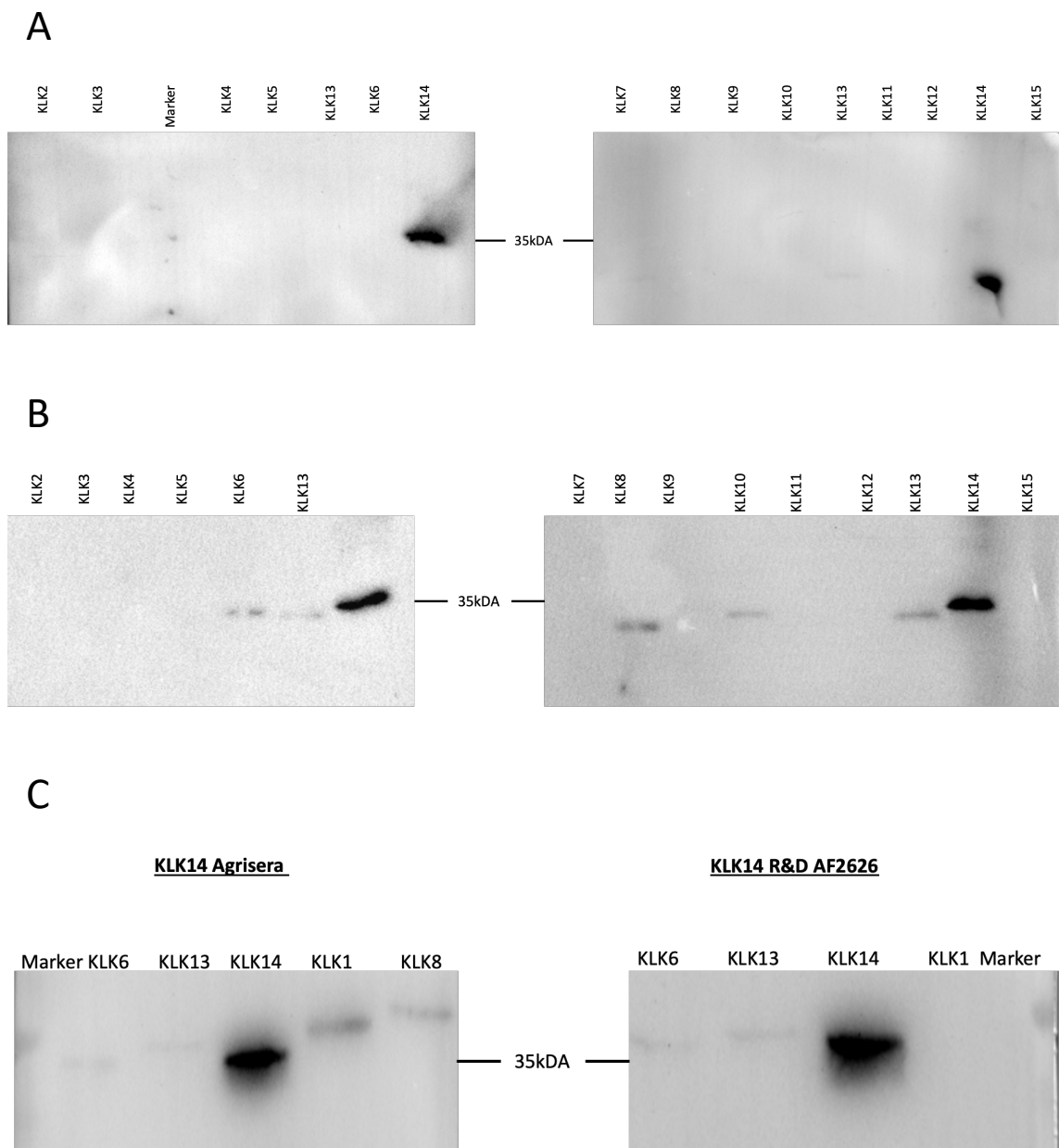


Abbildung 21: Western Blot Analyse zur Testung der Spezifität und Sensitivität der KLK14- Antikörper

In den Abbildungen A+B wurde der KLK14-Antikörper gegen die Proformen KLK2 bis 15 getestet. In C erfolgte die Testung des KLK14-Antikörpers gegen pro-KLK1. Zur Größenbestimmung wurde ein Marker mitgeführt. Das ermittelte Molekulargewicht der KLK-Mitglieder betrug etwa 35 kDa.

A) Mit dem KLK14-Antikörper von R&D ist nur auf der Position von KLK14 eine Bande zuerkennen.

B) Der KLK14-Antikörper von Agrisera zeigte leichte Kreuzreaktionen mit KLK6, -8, -10 und -13.

C) Im Gegensatz zu dem KLK14-Antikörper von R&D zeigte sich eine leichte Kreuzreaktion von KLK1 und KLK6 mit dem KLK14-Antikörper von Agrisera.

Abschließend konnte gezeigt werden, dass beide kommerziell erhältlichen KLK13-Antikörper von R&D (AF2625) und Thermo Fischer (16656) spezifisch für die KLK13-Untersuchungen sind. Im Gegensatz dazu war bei KLK14 nur der Antikörper von R&D (AF2626) spezifisch. Der KLK14-Antikörper ist aufgrund seiner multiplen Kreuzreaktionen für die weiteren Untersuchungen ungeeignet.

IV.3 IHC-Ergebnisse

IV.3.1 Versuche zur Etablierung der Immunhistochemie für KLK13 und KLK14

In Kooperation mit dem Helmholtz-Zentrum München wurden immunhistochemische Färbungen mit den 2 verschiedenen KLK13-Antikörpern durchgeführt. Es wurden sowohl verschiedene Färbeprotokolle als auch verschiedene Verdünnungen der KLK13-Antikörper verwendet (Daten nicht angezeigt). Es wurden zunächst Kontrollpräparate wie die Milz (negativ) und Niere (positiv) ausprobiert. Anschließend sollte diese Färbung auf den entsprechen Ovarialkarzinom- und Mammakarzinomfälle angewendet werden. Zwei unabhängige Pathologen (Prof. A. Walch und Dr. P. Dettmar) bewerteten die Färbung jedoch als nicht auswertbar. Bei den Proben konnten keine Unterschiede in den Expressionsstufen festgestellt werden. Außerdem zeigten einige Proben eine so starke Überfärbung, was vermutlich auf eine unspezifische Reaktion hinweist, sodass keine Quantifizierung von KLK13 möglich war.

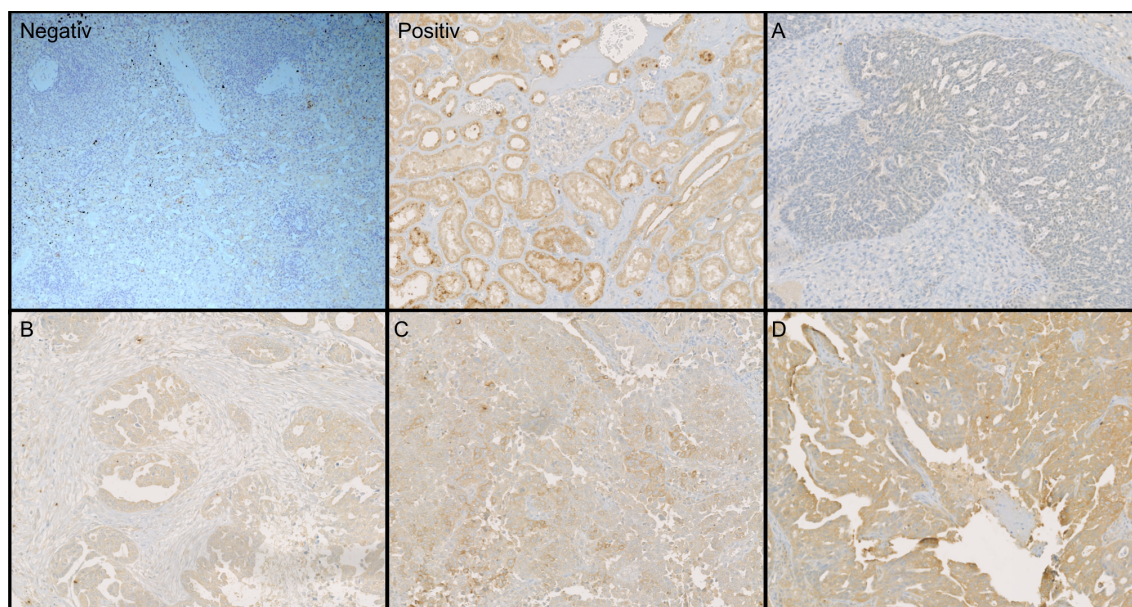
Im Gegensatz dazu konnte für den KLK14-Antikörper von R&D (2626) eine Methode entwickelt werden, um die Proteinexpression von KLK14 im Tumorgewebe des Ovars und der Mamma zu ermitteln.

IV.3.2 Immunhistochemische Färbung mit KLK14-Antikörper im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom

Die KLK14-Expression wurde bei 106 Patientinnen mit fortgeschrittenem serösen Ovarialkarzinom immunhistochemisch analysiert (s. II.1.2, Tabelle 6). Hierzu wurden bereits vorhandene TMA-Schnitte, die in Kooperation mit Prof. Dr. A. Walch (Helmholz-Zentrum München, Abteilung für analytische Pathologie) angefertigt wurden, verwendet. Die immunhistochemische Färbung erfolgte dann ebenfalls in Kooperation mit Prof. Dr. A. Walch (Helmholz-Zentrum München, Abteilung für analytische Pathologie) (s.III.2.6.). Der KLK14-Antikörper von R&D System (Lot AF2626) wurde dabei 1:20 verdünnt. Die Visualisierung der TMAs erfolgte mittels dem Hamamatsu Nanozoomer XT und der Software NDP Scan. Wie in Abbildung 24 zu sehen, erfolgte die Quantifizierung der Färbung über ein Punktesystem von 0-3 (0 = keine Färbung, 1 = schwach, 2 = moderat, 3 = stark) (s. Tabelle 44). Als negative Kontrolle diente ein Präparat der Milz, als positive Kontrolle die Niere (s. Abbildung 24).

Tabelle 44: Verteilung der KLK14-Proteinexpression im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom

KLK14-Proteinexpression	Anzahl der Patienten
0	5
1	36
2	39
3	18

**Abbildung 22: Immunhistochemische Analysen der KLK14-Proteinexpression beim fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom**

Die Färbung erfolgte mittels KLK14-Antikörper (R&D System, AF2626) in einer 1:20 Verdünnung. Als negativ und positiv Kontrolle dienten Präparate der Milz und der Niere. Die Farbintensität wurde von 0-3 bewertet. Von A-D sind verschiedene Farbintensitäten gezeigt: A = 0/keine Färbung, B = 1/schwach, C = 2/moderat und D = 3/stark dar.

IV.3.2.1 Assoziation zwischen etablierten klinischen Parametern für Ovarialkarzinome und der KLK14-Proteinexpression

Es erfolgte die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen den etablierten klinischen Parametern beim Ovarialkarzinom und der KLK14-Proteinexpression mittels des Chi²-Unabhängigkeitstests. Für diesen Test wurden die zu untersuchenden klinischen Parameter (Aszitesmenge, Alter, und Resttumormasse) jeweils gruppiert und mit den Proteinexpressionsniveaus (niedrig/hoch) von KLK14 korreliert. Die KLK14-Expressionniveaus wurden wie folgt aufgeteilt: 0+1 (niedrig) vs. 2+3 (hoch) und 0+1+2 (niedrig) vs. 3 (hoch).

Die unterstehende Tabelle 45 zeigt, dass keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der KLK14-Proteinexpression und den klinisch etablierten prognostischen Parametern des Ovarialkarzinoms bestehen.

Tabelle 45: Assoziation zwischen etablierten klinischen Parametern für Ovarialkarzinome und KLK14-Proteinexpression

Klinische Parameter	Anzahl der Patienten	KLK14 ^a	KLK14 ^b
		niedrig/hoch	niedrig/hoch
Gesamtanzahl der Patienten	98	57/39	80/18
Alter		p = 0.907	p = 0.570
≤ 60 Jahre	52	22/30	42/10
> 60 Jahre	46	20/26	39/7
Resttumor		p = 0.143	p = 0.123
> 0 mm	41	14/27	31/10
> 0 mm	55	27/28	48/7
Aszites		p = 0.483	p = 0.359
≤ 500 ml	53	21/32	42/11
> 500 ml	45	21/24	39/6

^a KLK14-Proteinexpression 0+1 vs. 2+3

^b KLK14 Proteinexpression 0+1+2 vs. 3

IV.3.2.2 Assoziation von KLK14-Proteinexpression sowie den klinisch etablierten Parametern mit dem Gesamtüberleben und progressionsfreiem Überleben bei Ovarialkarzinompatientinnen

Um eine Assoziation der KLK14-Proteinexpression mit sowohl dem 5-Jahres Überleben als auch mit dem 5-Jahre progressionsfreien Überleben bei an Ovarialkarzinom erkrankten Patientinnen festzustellen, wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt. Zusätzlich erfolgte dies auch für die klinisch etablierten Prognosefaktoren des Ovarialkarzinoms (Alter, Resttumor und Aszitesmenge). Die zu untersuchenden Parameter und die KLK14-Proteinexpression wurden jeweils in 2 Gruppen unterteilt (0 mm Resttumor vs. > 0 mm, Alter ≤ 60 Jahre vs. > 60 Jahre und Aszitesvolumen ≤ 500 ml vs. > 500 ml, KLK14 hoch/ 2+3 vs. niedrig/ 0+1, sowie KLK14 hoch/3 vs. niedrig/0+1+2). Es besteht ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben bei Patientinnen mit Resttumor (Gesamtüberleben: $p < 0,001$, progressionsfreies Überleben: $p < 0,001$) und erhöhten präoperativen Aszitesvolumina (Gesamtüberleben: $p = 0,001$, progressionsfreies Überleben: $p = 0,004$) (s. Abbildung 25). Im Falle der Proteinexpression von KLK14 konnte bei beiden unterteilten Gruppen (KLK14 2+3 vs. 0+1; KLK14 3 vs. 0+1+2) keine Signifikanz gegenüber dem progressionsfreien und Gesamtüberleben festgestellt werden (s. Abbildung 26).

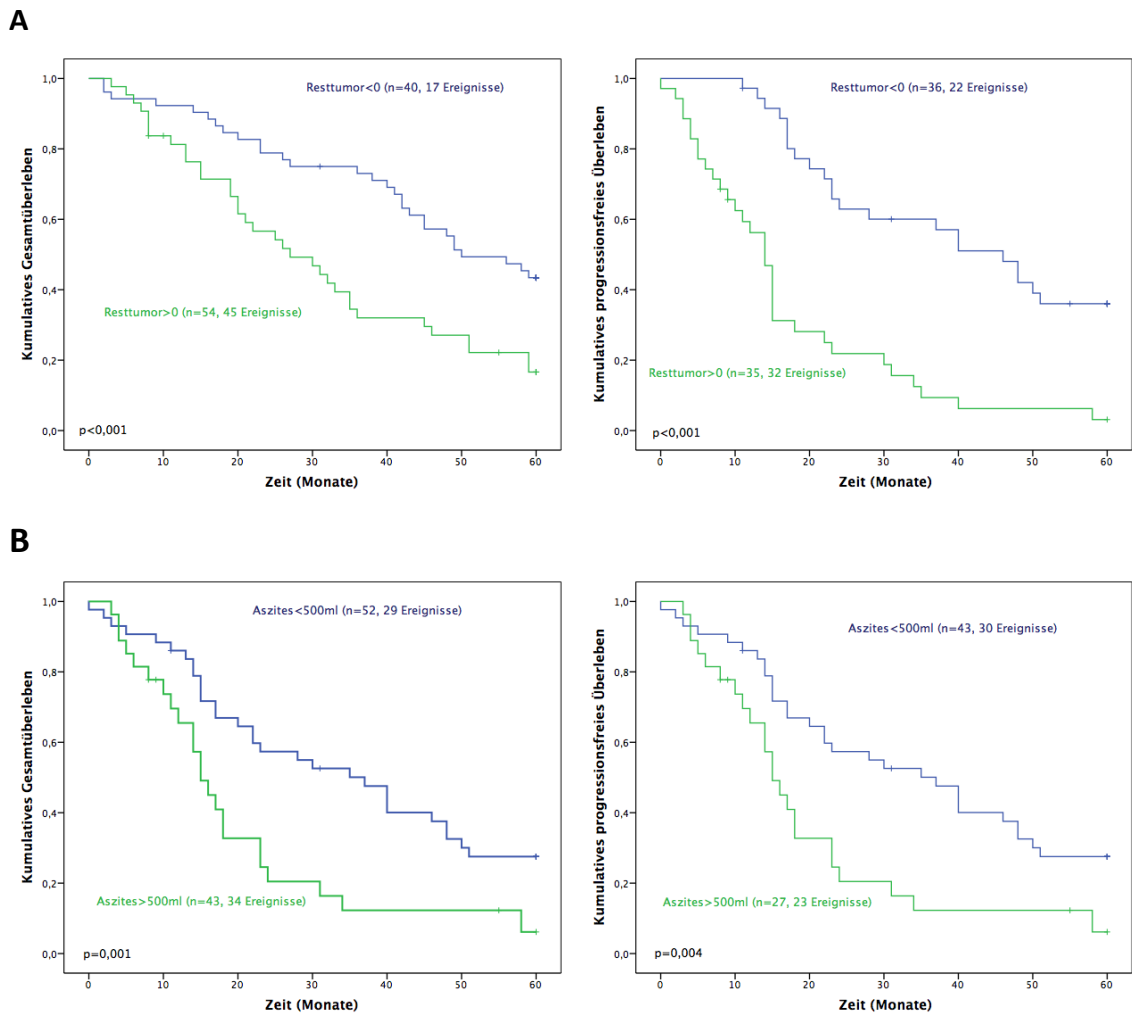


Abbildung 23: Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben beim fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom (FIGOIII/IV) nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von etablierten klinischen Prognoseparametern (Aszitesvolumen und Resttumormasse)

A) Keine Resttumormasse nach vollständiger Debulkingoperation spricht für ein signifikant längeres Gesamtüberleben ($p < 0,001$, linke Abbildung) als auch ein progressionsfreies Überleben ($p < 0,001$, rechte Abbildung).

B) Ein höheres präoperatives Aszitesvolumen ($> 500\text{ml}$) ist mit einem schlechteren 5-Jahres-Überleben ($p = 0,001$, linke Abbildung) und einem höheren Rezidivrisiko assoziiert ($p = 0,004$, rechte Abbildung).

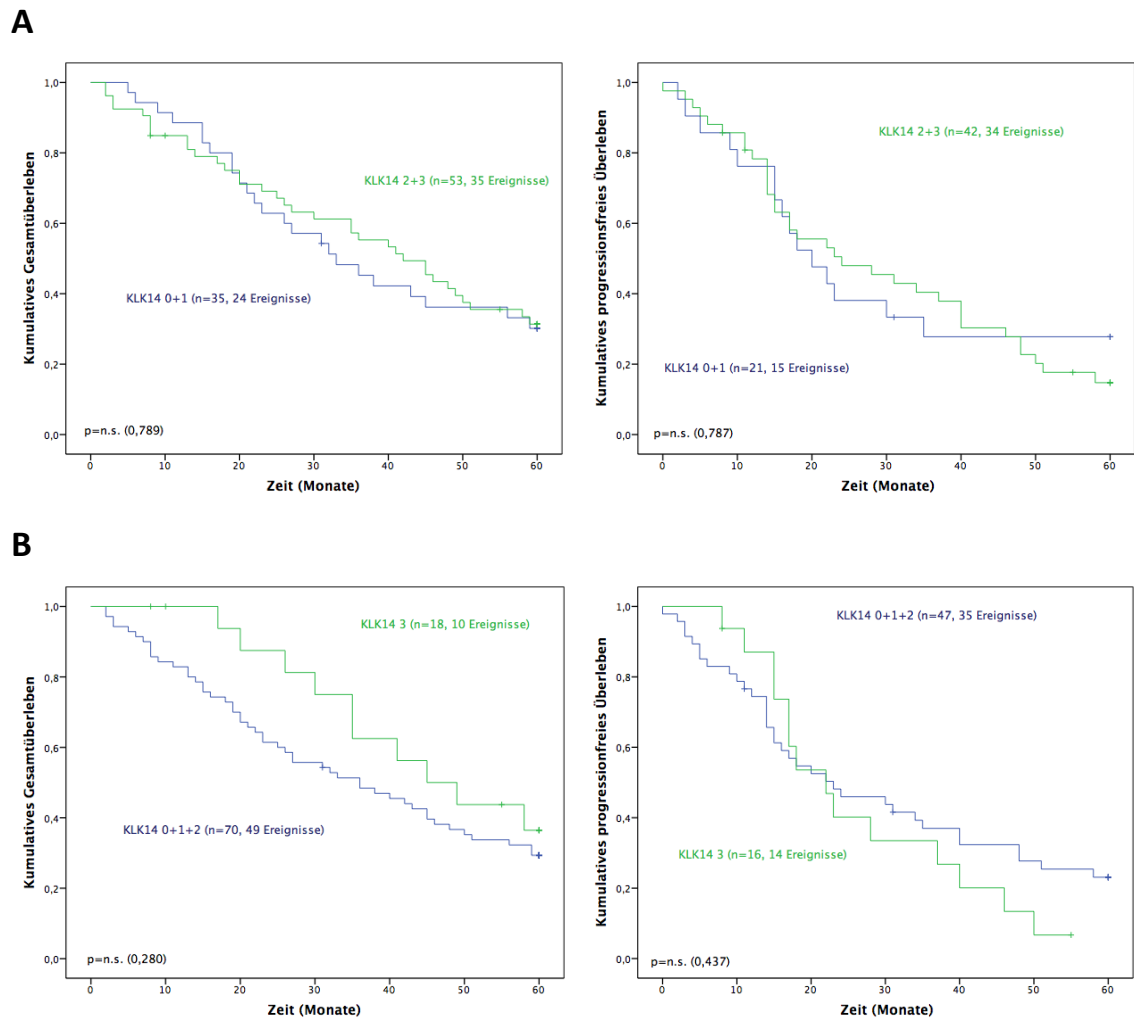


Abbildung 24: Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben beim fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom (FIGOIII/IV) nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von der KLK14-Proteinexpression mittels Immunhistochemie

A) Die Aufteilung KLK14-Proteinexpression hoch/ 2+3 vs. niedrig/ 0+1 zeigt keine Korrelation mit dem Gesamtüberleben und dem progressionsfreien Überleben beim fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom.

B) Auch bei Aufteilung von KLK14 hoch/3 vs. niedrig/0+1+2 Proteinexpression wurde keine Signifikanz gegenüber dem Gesamtüberleben und progressionsfreien Überleben beobachtet.

IV.3.2.3 Korrelation der KLK14-mRNA-Expression und -Proteinexpression im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom

Im Rahmen des vorliegenden Projekts wurde auch die klinische Relevanz der KLK14-mRNA-Expression im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom untersucht. Die Patientenkollektive der Protein- und mRNA-Expression von KLK14 überlappen hierbei zum Teil (insgesamt 50 Proben). Daher konnte eine Korrelation der mRNA-Expression und der Proteinexpression von KLK14 durchgeführt werden. Die KLK14-mRNA-Expression wurde mittels qPCR (effizienzkorrigiert) ermittelt, die Proteinexpression von KLK14 mittels IHC. Insgesamt konnten 50 Proben miteinander verglichen werden. Eine Korrelation zwischen KLK14-mRNA und -Proteinexpression im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzi-

nom konnte nicht beobachtet werden. Zusätzlich wurden Mann-Whitney-Tests zur Ermittlung der Korrelation der hohen vs. niedrigen KLK14-Proteinexpression gegenüber der mRNA-Expression durchgeführt (s. Tabelle 46). Auch diese Analyse wies keinen Zusammenhang zwischen der Expression von KLK14 auf mRNA- und Proteinebene auf. Um dieses Ergebnis graphisch zu verdeutlichen, wurde eine Boxplot erstellt. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der KLK14-mRNA-Expression und KLK14-Proteinexpression (hoch vs. niedrig) dargestellt werden (s. Abbildung 27).

Tabelle 46: Korrelation zwischen der untersuchten KLK14-mRNA-Expression (qPCR) und -Proteinexpression (IHC) beim fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom

	KLK 14 mRNA- Expression
KLK 14 Proteinexpression niedrig (0+1) vs. hoch (2+3)	p = 0,906
KLK 14 Proteinexpression niedrig (0+1+2) vs. hoch (4)	p = 0,552

Es wurden insgesamt 50 Gewebeproben von Patientinnen mit fortgeschrittenem serösen Ovarialkarzinom sowohl mittels qPCR als auch IHC untersucht.

Korrelation mittels Mann-Whitney-Test: Eine hohe vs. niedrige KLK14-Proteinexpression (IHC) gegenüber KLK14-mRNA-Expression (qPCR) zeigt keine signifikante Korrelation.

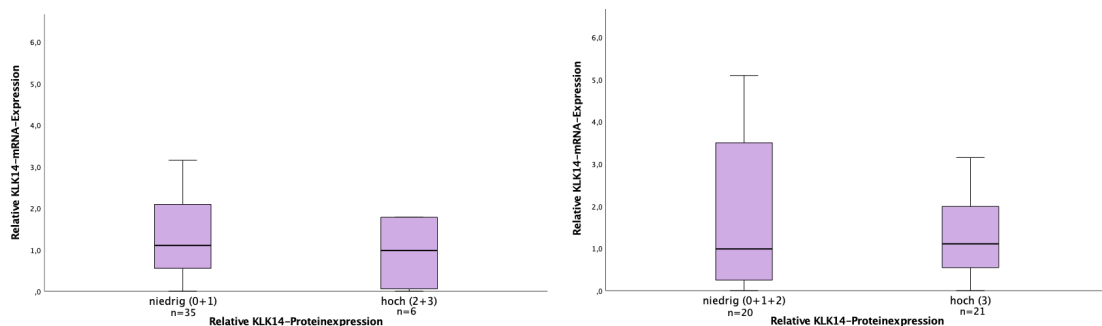


Abbildung 25: Korrelation der KLK14-mRNA-Expression und -Proteinexpression im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom

Die linke Abbildung zeigt, dass keine signifikante Korrelation der KLK14-mRNA-Expression und der KLK14-Proteinexpression (niedrig = 0+1 vs. hoch = 2+3) besteht. Auf der rechten Abbildung wurde zusätzlich die Korrelation der KLK14-mRNA-Expression gegenüber der KLK14-Proteinexpression (niedrig = 0+1+2 vs. hoch = 3) geprüft. Auch hier konnte kein signifikantes Ergebnis gezeigt werden.

IV.3.3 Immunhistochemische Färbung mit KLK14-Antikörper beim triple-negativen Mammakarzinom

Die KLK14 Expression wurde bei 154 Patientinnen mit triple-negativen Mammakarzinom immunhistochemisch analysiert. Die Färbung erfolgte in Kooperation mit Prof. A. Walch (Helmholtz-Zentrum München). Dabei wurde der KLK14 Antikörper (R&D System, AF 2626) in einer Verdünnung von 1:20 verwendet. Als Kontrollpräparate diente ebenfalls die Milz (negativ) und Niere (positiv) (s. Abbildung 28). Die Auswertung der Mammakarzinompräparate erfolgte über das Punktesystem (0 = keine Färbung, 1 = schwach, 2 = moderat, 3 = stark) (s. Tabelle 47).

Tabelle 47: Verteilung der KLK14-Proteinexpression im triple-negativen Mammakarzinom

KLK14-Proteinexpression	Anzahl der Patienten
0	25
1	35
2	34
3	4

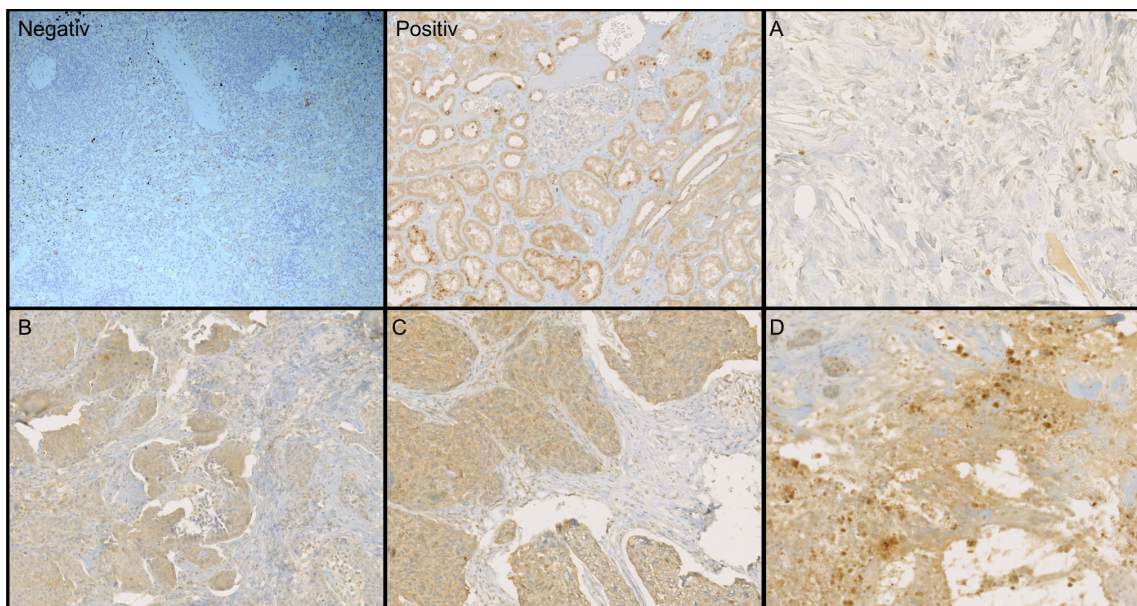


Abbildung 26: Immunhistochemie von KLK14 im triple-negativen Mammakarzinom

Der KLK14-Antikörper (R&D System, AF 2626) wird in einer Verdünnung von 1:20 verwendet. Als Kontrollen wurden Präparate der Milz (negativ) und der Niere (positiv) aufgeführt. A-D zeigen Beispiele für die verschiedenen Färbeintensitäten: A = 0/keine Färbung, B = 1/schwach, C = 2/moderat und D = 3/stark.

IV.3.3.1 Assoziation zwischen etablierten klinischen Parametern für Mammakarzinome und der KLK14-Proteinexpression

Um den Zusammenhang zwischen klinisch etablierten Parametern des Mammakarzinoms (Tumorstadium, Lymphknotenstatus, Alter) und der Proteinexpression von KLK14 zu ermitteln, wurde der Chi²-Unabhängigkeitstest durchgeführt. Die zu untersuchenden

klinischen Parameter wurden hierfür jeweils gruppiert und mit den KLK14-Proteinexpressionsniveaus (niedrig/hoch) korreliert. Die KLK14-Expressionniveaus wurden hierzu jeweils mit 0+1 (niedrig) vs. 2+3 (hoch) und 0 (niedrig) vs. 1+2+3 (hoch) aufgeteilt. Es konnten keine eindeutigen Zusammenhänge zwischen den klinisch etablierten Parametern des Mammakarzinoms und der KLK14-Proteinexpression bei der Aufteilung niedrig (0+1) und hoch (2+3) gezeigt werden. Es ist lediglich eine Tendenz zwischen dem Lymphknotenstatus und der KLK14-Proteinexpression ($p = 0,065$) zu sehen. Im Falle der Aufteilung der KLK14-Proteinexpression niedrig (0) und hoch (1+2+3) ist ein signifikanter Zusammenhang ($p = 0,030$) zwischen dem Tumorstadium und der KLK14-Proteinexpression zu beobachten. Zusätzlich zeigt sich ein Trend zur Signifikanz im Zusammenhang mit dem Alter und der KLK14-Proteinexpression ($p = 0,072$) (s. Tabelle 48).

Tabelle 48: Assoziation zwischen etablierten klinischen Parametern für Mammakarzinome und KLK14-Proteinexpression

Klinische Parameter	Anzahl der Patienten	KLK14 ^a niedrig/hoch	KLK14 ^b niedrig/hoch
Gesamtanzahl der Patienten	98	60/38	25/73
Alter		$p = 0,523$	$p = 0,072$
≤ 60 Jahre	52	32/20	17/35
> 60 Jahre	33	18/15	5/28
Tumorstadium		$p = 0,134$	$p = 0,030$
Stadium 1+2	76	43/33	16/60
Stadium 3+4	20	15/5	9/11
Lymphknotenstatus		$p = 0,065$	$p = 0,261$
Lymphknoten negativ	49	25/24	10/39
Lymphknoten positiv	46	32/14	14/32

^a KLK14-Proteinexpression 0+1 vs. 2+3

^b KLK14 Proteinexpression 0 vs. 1+2+3

IV.3.3.2 Assoziation von KLK14-Proteinexpression und den klinisch etablierten Parametern mit dem Gesamtüberleben beim triple-negativen Mammakarzinom

Für klinisch etablierte Parameter, wie der LK-Status sowie das Tumorstadium des triple-negativen Mammakarzinoms wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt. Hierbei erfolgte eine Gruppierung des LK-Status (positiv vs. negativ) und Tumorstadium (1+2 vs. 3+4). Es konnte gezeigt werden, dass beide klinisch etablierten Parameter (LK-Status: $p = 0,002$, Tumorstadium $p = 0,001$) statistisch signifikant mit dem Gesamtüberleben assoziiert sind (s. Abbildung 29).

Zusätzlich wurde mit Hilfe der Kaplan-Meier-Schätzung der Zusammenhang zwischen der KLK14-Proteinexpression und dem Gesamtüberleben bei triple-negativen Mammakarzinompatienten dargestellt. Es erfolgte eine Gruppierung der KLK14-Proteinexpression hoch vs. niedrig (hoch 1+2+3 oder 2+3 vs. niedrig 0 oder 0+1) (s. Abbildung 30). Es wurden Überlebenskurven sowohl für den gesamten Beobachtungszeitraum (maximal 324 Monate) als auch für einen Beobachtungszeitraum von 15 Jahren erstellt. Es konnte kein signifikantes Ergebnis gegenüber der KLK14-Proteinexpression und dem Gesamtüberleben festgestellt werden. Bei einer hohen KLK14-Proteinexpression konnte lediglich ein Trend zur Signifikanz ($p = 0,067$) für ein längeres 15-Jahre-Gesamtüberleben beobachtet werden.

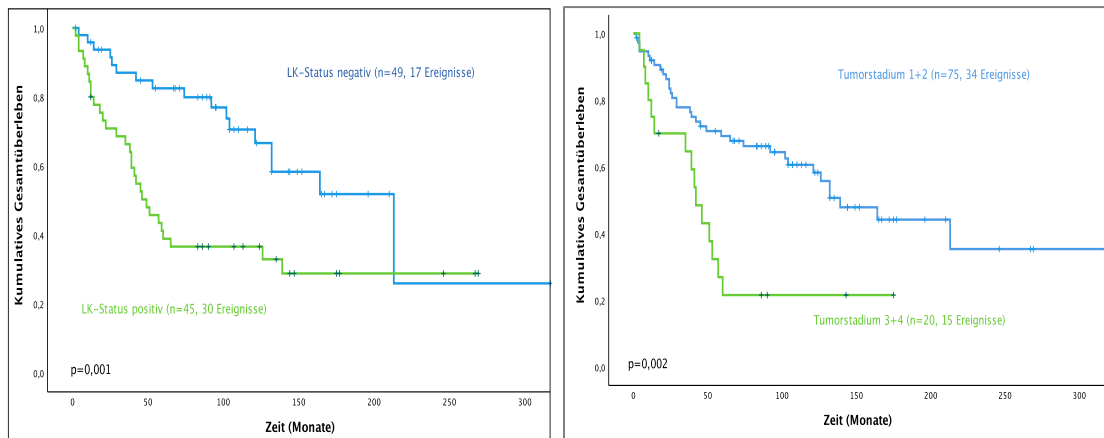


Abbildung 29: Gesamtüberleben beim triple-negativen Mammakarzinom nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der klinisch etablierten Parameter (LK-Status und Tumorstadium)

Es zeigt sich sowohl bei positivem LK-Status (linke Abbildung) als auch bei einem höheren Tumorstadium (rechte Abbildung) ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben.

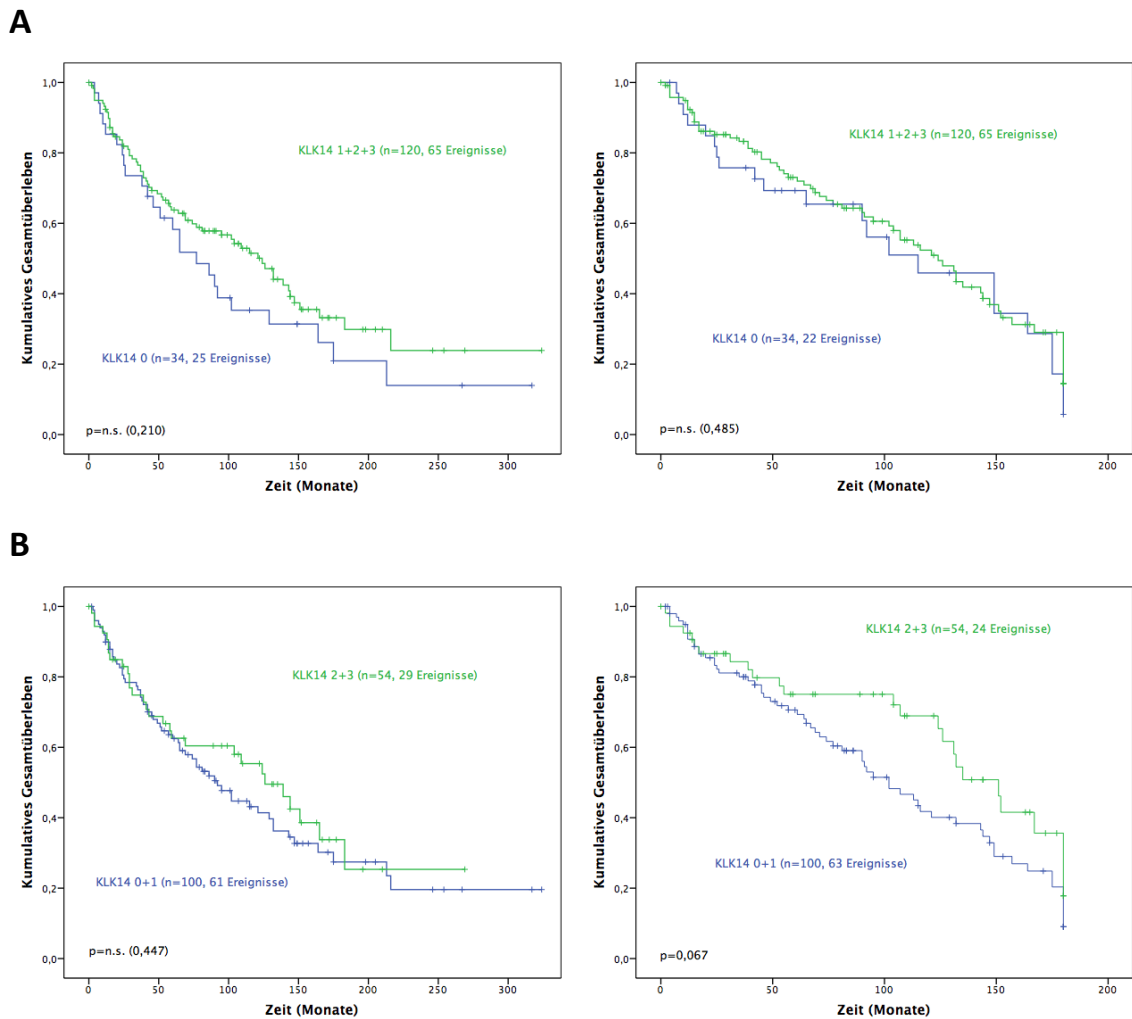


Abbildung 27: Gesamtüberleben beim triple-negativen Mammakarzinom nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit von der KLK14 Proteinexpression

A) Bei einer definierten hohen KLK14-Proteinexpression (1+2+3) kann kein Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben festgestellt werden. (Links: gesamter Beobachtungszeitraum (max. 324 Monate); rechts: maximale Beobachtungszeit 180 Monate)

B) Eine hohe KLK14-Proteinexpression (2+3) zeigt keine Signifikanz mit dem Gesamtüberleben, wenn die gesamte Beobachtungszeit betrachtet wird. Jedoch ist bei einer hohen KLK14-Proteinexpression (2+3) ein Trend zur Signifikanz ($p = 0,067$) für ein längeres 15-Jahres-Überleben zu sehen.

Mit Hilfe von univariaten Cox-Regressionsanalysen konnte die Assoziation zwischen den hohen und niedrigen KLK14-Proteinexpressionsniveaus und dem Gesamtüberleben bzw. progressionsfreien Überleben untersucht werden. Zudem wurde die Stärke der Assoziation der etablierten klinischen Prognosefaktoren (LK-Status und Tumorstadium) mit dem Gesamtüberleben und dem progressionsfreien Überleben analysiert. Hierzu wurden wieder die zu untersuchenden Parameter in 2 Gruppen eingeteilt (LK-Status positiv vs. negativ, Tumorstadium 1+2 vs. 3+4 und KLK14 hoch vs. niedrig). Den Erwartungen entsprechend wiesen Patienten mit positivem LK-Status ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben (HR = 2,55; 95%-KI = 1,40-4,63; $p = 0,002$) und progressionsfreies Überleben (HR = 4,53; 95%-KI = 1,62-12,66; $p = 0,004$) auf. Auch ein höheres Tumorstadium ist signifikant mit einem kürzeren Gesamtüberleben (HR = 2,61; 95%-KI = 1,40-4,87; $p = 0,002$) und höheren Rezidivrisiko (HR = 6,15; 95%-KI = 2,33-16,24; $p < 0,001$) assoziiert. KLK14-Proteinexpressionswerte wurden sowohl in zwei Gruppen aufgeteilt (0+1+2 vs. 3 und

0+1 vs. 2+3). Bei der Durchführung der univariaten Cox-Regressionsanalyse konnte keine Signifikanz der beiden Gruppen mit dem Gesamtüberleben ($p = 0,109$ und $p = 0,505$) oder dem progressionsfreien Überleben ($p = 0,297$ und $p = 0,527$) gezeigt werden (s. Tabelle 49).

Tabelle 49: Univariate Cox-Regressionsanalyse des Gesamt- bzw. progressionsfreien Überlebens bei Patientinnen mit triple-negativen Mammakarzinom in Bezug auf klinisch etablierte Prognosefaktoren und KLK14-Proteinexpression

Klinische Parameter	Gesamtüberleben			Progressionsfreies Überleben		
	N ^a	HR (95% KI) ^b	p	N	HR (95% KI) ^b	p
LK-Status			0,002			0,004
positiv	47	1		73	1	
negativ	47	2,55 (1,40-4,63)		19	4,53 (1,62-12,66)	
Tumorstadium			0,002			< 0,001
1+2	46	1		18	1	
3+4	49	2,61 (1,40-4,87)		75	6,15 (2,33-16,24)	
KLK14			0,109			0,297
niedrig (0+1)	50	1		19	1	
hoch (2+3)	47	0,61 (0,33-1,12)		76	0,60 (0,23-1,57)	
KLK14			0,505			0,527
niedrig (0+1+2)	50	1		19	1	
Hoch (3)	47	0,51 (0,07-3,70)		76	0,05 (0-635,98)	

V. Diskussion

V.1 KLK13 und KLK14 und deren prognostische Bedeutung im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom stellt die zweithäufigste tödliche, gynäkologische Krebserkrankung in Deutschland dar. Das liegt insbesondere darin begründet, dass aufgrund von fehlenden Frühsymptomen die Diagnose meist erst in fortgeschrittenem Stadium gestellt wird. In diesen späten Stadien (FIGO III und IV) liegt das Fünf-Jahres-Überleben lediglich bei etwa 30%. Das Ovarialkarzinom vom serösen Typ gilt histomorphologisch als der häufigste Subtyp (ca. 70%), weshalb in dieser Studie nur Patientinnen mit diesem Typ in dieser Studie betrachtet wurden (Prat, 2012; Prat & Oncology, 2014). Bisher kann die Prognose nur durch Debulkingoperation ohne Resttumormasse beeinflusst werden, daher sind neue, valide Tumormarker sowohl zur Vorhersage der Prognose als auch für das Ansprechen auf Chemotherapeutika erforderlich (Dorn et al., 2011). Derzeit ist CA-125 der beste verfügbare Serummarker für epitheliale Ovarialkarzinome. Weitere Serummarker wie AFP und hCG treten nicht bei epithelialen Ovarialkarzinomen auf, spielen jedoch bei Keimzelltumoren des Ovars eine entscheidende Rolle. Eine Erhöhung von Serummarkern wie CEA und CA 19-9 werden bei Subtypen wie muzinösen und endometrioiden Tumoren beobachtet (Kerbrat et al., 2001; Sturgeon, 2002). CA-125 ist jedoch nicht empfindlich bzw. spezifisch genug, um in der Früherkennung oder Diagnosesicherung eine Rolle zu spielen. Auch der routinemäßige Einsatz einer CA-125 Bestimmung führt zu keiner Senkung der Mortalität. Dennoch kann CA-125 nützlich sein, um bei familiärer Vorbelastung Ovarialkarzinome frühzeitig zu erkennen. Zusätzlich kann CA-125 als differentialdiagnostischer Parameter bei Tumoren im Beckenbereich hinzugezogen werden (Forstner et al., 2010; Menon & Jacobs, 2000; S3-Leitlinie, 2016; Sturgeon, 2002). Zur Beurteilung des Therapieansprechens eignet sich die Abnahme von CA-125, sofern dieser vor Beginn der Therapie erhöht war (Deutsche Krebsgesellschaft, 2018; S3-Leitlinie, 2016; Sturgeon, 2002). Die Häufigkeit und der Zeitraum der Abnahme von CA-125 ist dabei bisher nicht definiert. Wenn ein Anstieg vernommen wird, sollte eine zusätzliche bildgebende Diagnostik (z.B. Computertomographie) durchgeführt werden. Jedoch ist auch ohne CA-125-Anstieg ein Fortschreiten der Erkrankung möglich (Kerbrat et al., 2001; Sturgeon, 2002).

Die Familie Kallikrein-ähnlichen Peptidasen, bestehend aus 15 Mitgliedern, stellt eine Untergruppe der Serinproteasen dar (Yousef, Chang, et al., 2000). Die Expression von Kallikrein-ähnlichen Peptidasen spielt eine wichtige Rolle in Tumorwachstum, -migration und -invasion. Sie können sowohl für die Frühdiagnose, Vorhersage der Prognose als auch für das Therapieansprechen angewendet werden. Zusätzlich können KLKs als Zielstrukturen für die Entwicklung von Krebsmedikamenten von Nutzen sein (Dorn et al., 2013; Dorn et al., 2014; Kryza et al., 2016; Prassas et al., 2015; Scorilas & Mavridis, 2014). In Studien konnte gezeigt werden, dass diese als vielversprechende Tumormarker in gynäkologischen Krebserkrankungen dienen können. Die Genexpression der meisten KLKs wird durch Steroidhormone gesteuert. Daher ist es nicht verwunderlich, dass man eine Expressionsdysregulation der KLKs in hormonabhängigen Krebsarten wie Eierstock-, Brust- und Prostatakrebs vorfindet (Dettmar et al., 2018; Dorn et al., 2014; Kryza et al., 2016; Paliouras & Diamandis, 2008). Dabei gilt zum Beispiel KLK3 (= PSA; *prostate spe-*

cific antigen) als der bedeutendste Tumormarker für die Diagnostik als auch Therapieüberwachung des Prostatakarzinoms (Balk et al., 2003). Zusätzlich konnten Studien eine ungünstige Prognose, ein fortgeschrittenes Stadium und einen höheren Gleason-Score im Prostatakarzinom mit einer Überexpression von KLK14 in Verbindung bringen (Borgono et al., 2007; Hooper et al., 2001; Yousef, Stephan, et al., 2003). KLKs sind an neoplastischen Prozessen sowie an der Therapieresistenz beteiligt. Im Allgemeinen können KLKs sowohl bei der Tumorprogression als auch bei der Tumorsuppression relevant sein. Zur Tumorsuppression kann es zum Beispiel durch Proteolyse bestimmter Mediatoren, die für die Tumorproliferation und -invasion notwendig sind, kommen (Dettmar et al., 2018; Kryza et al., 2016). Zusätzlich kann die Aktivierung von antineoplastischen Signalwegen oder die Hemmung des Übergangs von epidermalem in mesenchymales Gewebe eine Rolle spielen (Dettmar et al., 2018; Pampalakis et al., 2009; Sher et al., 2006). In den verschiedenen Tumorarten kann das Expressionsmuster der Proteasen unterschiedlich sein, sodass die gleiche Protease sowohl einen Tumorsuppressions- als auch einen Tumorprogressionseffekt aufweisen kann. Zum Beispiel wurde eine verminderte Tumorzellmotilität und -invasion bei einer Überexpression von KLK13 in oralen Krebszellen beobachtet. Hier konnte eine Überexpression von KLK13 mit einer höheren Konzentration von Adhäsionsmolekülen wie Desmocollin 2, Desmoplakin und E-Cadherin in Verbindung gebracht werden (Dettmar et al., 2018; Ishige et al., 2014). Wohingegen eine Zunahme der Tumorzellmigration und -invasion bei erhöhter KLK13 Expression in Lungenkrebszellen gezeigt wurde. In diesem Fall führt eine Überexpression von KLK13 zu einem verstärkten Abbau des extrazellulären Proteins Laminin und induziert die Expression von N-Cadherin (Chou et al., 2011; Dettmar et al., 2018).

In dieser Arbeit wurde die Überexpression von KLK13 und KLK14 im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom untersucht. Mittels qPCR wurde die mRNA-Expression der beiden KLK-Mitglieder quantifiziert und deren klinische Relevanz in Bezug auf das Gesamtüberleben und progressionsfreie Überleben betrachtet. Wie alle Mitglieder der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen werden KLK13 und KLK14 als inaktive Pro-Formen sezerniert. Durch Proteolyse ihres N-terminalen Pro-Peptids entsteht die aktive Form des KLK. Dies ist ein wichtiger regulatorischer Schritt für sowohl die physiologische als auch pathophysiologische Funktion der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen. Bereits zeigten einige Studien, dass KLK13 und KLK14 durch andere Proteasen wie KLKs 4, 5, 11, 12, 14, 15, Plasmin, uPA und Hepsin aktiviert werden können (Dettmar et al., 2018; Lovgren et al., 1997; Reid et al., 2017; Sotiropoulou et al., 2003; Yoon et al., 2009; Yoon et al., 2008). Es konnte eine Expression all der genannten Proteasen im Ovarialkarzinom gezeigt werden, sodass man davon ausgehen kann, dass KLK13 und KLK14 in aktiver Form dort auch vorzufinden sind (Dettmar et al., 2018; Dorn et al., 2014; Uhlen et al., 2017). Im Vergleich zu ovariellem Normalgewebe konnte eine erhöhte KLK13-mRNA- als auch -Proteinexpression im Ovarialkarzinom beobachtet werden (Adib et al., 2004; Dorn et al., 2014; Kapadia et al., 2003; Scorilas et al., 2004; White, Mathews, Yousef, Prizada, Fontaine, et al., 2009). Jedoch ist die prognostische Bedeutung einer Überexpression von KLK13 im Ovarialkarzinom noch unklar. Einerseits war eine mittels ELISA getestete erhöhte KLK13-Proteinexpression im primären epithelialen Ovarialkarzinom mit einer besseren Prognose für sowohl das progressionsfreie- als auch das Gesamtüberleben verbunden (Scorilas et al., 2004). Andererseits erwies sich eine hohe KLK13-mRNA-Expression als statistisch ungünstiger Faktor für das progressionsfreie- und das Gesamtüberleben im Ovarialkarzinom (White, Mathews, Yousef, Prizada, Popadiuk, & Dore, 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass an einem fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom erkrankte Patientinnen mit hohem KLK13-mRNA-Expressionslevel ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben (HR = 1,81, 95% KI = 1,03-3,19, $p = 0,041$) und erhöhtes Risiko für Rezidive (HR = 1,97, 95%-KI = 1,12-3,47, $p = 0,020$) aufweisen. Für die konträren Ergebnisse könnten die unterschiedlichen Kohorten ausschlaggebend sein. Während in unserer Studie ausschließlich Tumorgewebe von Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinome (FIGO III/ IV) vom serösen Typ untersucht wurden, umfassten andere Studien alle Stadien des Ovarialkarzinoms (FIGO I bis IV) und auch die verschiedenen Untergruppen der Oberflächenepithel- und Stromatumoren (seröse, muzinöse, endometrioide, klarzellige, transitionalzellige, plattenepitheliale, gemischte epitheliale und undifferenzierte Tumoren). Auch könnte der in den anderen Studien gefundene Zusammenhang von hoher KLK13-Expression mit einer besseren Prognose darauf beruhen, dass eine hohe KLK13-Expression mit frühen Krankheitsstadien (FIGO I und II) und weniger aggressiven Tumoren des Ovarialkarzinoms assoziiert ist. Zusätzlich konnte eine Korrelation zwischen hohen KLK13-Expressionen und optimalen Debulkingoperationen ohne Resttumor gezeigt werden, was eine günstige Prognose erklären lässt (Dettmar et al., 2018; Scorilas et al., 2004).

Eine Kombinationsbestimmung von KLK13 und weiteren Tumormarkern wie KLK6 und CA-125 scheint von großer Bedeutung, da dadurch die Gesamtsensitivität des aktuell bestverfügbaren CA-125 für die Früherkennung des Ovarialkarzinoms von 82% auf 93 % gesteigert werden kann. Zusätzlich wird durch die Kombination aus KLK13- und KLK6-mRNA sowie CA-125 der negative Vorhersagewert von 27% auf 50% erhöht (Dettmar et al., 2018; White, Mathews, Yousef, Prizada, Fontaine, et al., 2009).

In weiteren Untersuchungen innerhalb der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar wurde die mRNA-Expression von KLK10 und KLK11 in demselben Patientinnenkollektiv untersucht. Interessanterweise zeigt die vorliegende Arbeit, dass eine moderat hohe Korrelation der mRNA-Expression von sowohl KLK13 und KLK10 ($R = 0,544$, $p < 0,001$) als auch KLK13 und KLK11 ($R = 0,541$, $p < 0,001$) besteht. Eine erhöhte mRNA-Expression von sowohl KLK10 als auch KLK11 geht aber im Gegensatz zu KLK13 mit einer besseren Prognose für das fortgeschrittene seröse Ovarialkarzinom einher (Borgono et al., 2003; Geng et al., 2017; Geng et al., 2018). Weitere Studien anderer Arbeitsgruppen fanden aber auch gegenteilige Ergebnisse, also eine Assoziation einer hohen KLK10-Expression mit einer schlechteren Prognose im Ovarialkarzinom (Luo, Katsaros, et al., 2003). Auch im Falle von KLK10 erscheinen weiterführende klinische Validierungsstudien mit homogenen, klar definierten Patientinnenkollektiven notwendig, um die klinische Relevanz von KLK10 zu definieren. Zudem sind weitere Untersuchungen erstrebenswert, um die tumorbiologische Rolle der Ko-Expression von sowohl KLK13 und KLK10 also auch KLK13 und KLK11 aufzuklären. Möglicherweise ist es sinnvoll, mehrere KLK-Mitglieder gleichzeitig zu testen, um einen besseren Vorhersagewert für die Prognose von Patientinnen im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom zu erhalten.

KLK14 wurde auch in sogenannte Biomarker-Panel mit KLK6, KLK7, KLK11 und B7-H8 und weiteren klinischen Faktoren aufgenommen. Hier waren alle untersuchten Biomarker im Ovarialkarzinom im Vergleich zu Normalgewebe erhöht. Durch die Bestimmung vieler verschiedener Marker konnte für das Ovarialkarzinom eine höhere Spezifität und Sensitivität für die Vorhersage des progressionsfreien Überlebens festgestellt werden (Ahmed et al., 2016; Dettmar et al., 2018; Zheng et al., 2007). Jedoch konnte in dieser

Arbeit keine Korrelation der mRNA-Expression verschiedener KLKs und KLK14 im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom gezeigt werden.

Für die Entwicklung und Progression des Ovarialkarzinoms sind vor allem Steroidhormone wie Androgene und Gestagene verantwortlich. Durch die Regulation von Androgenen und Gestagenen konnte eine vermehrte Expression von KLK14 im Ovarialkarzinom beobachtet werden (Dettmar et al., 2018; Yousef, Fracchioli, et al., 2003). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass eine hohe KLK14-mRNA-Expression im Tumorgewebe von Patientinnen mit fortgeschrittenem serösen Ovarialkarzinom mit einem längeren progressionsfreien Überleben (HR = 0,44, 95%-KI = 0,22-0,86, $p = 0,017$) einhergeht. Erhöhte KLK14-mRNA-Expression in univariaten Regressionsanalysen weisen einen Trend zur Signifikanz für das 5-Jahres-Überleben (HR = 0,54, 95%-KI = 0,28-1,05, $p = 0,070$) auf, wohingegen multivariate Regressionsanalysen nach Cox auch eine Signifikanz für ein längeres Gesamtüberleben (HR = 0,46, 95%-KI = 0,22-0,95, $p = 0,037$) als auch für das progressionsfreie Überleben (HR = 0,36; 95%-KI = 0,17-0,76; $p = 0,007$) zeigen.

Im gesunden Ovar wird KLK14 auf niedrigem Niveau exprimiert (Loessner et al. 2018). Mittels Immunhistochemie konnte in dieser Arbeit in vielen Fällen eine erhöhte Proteinexpression von KLK14 im serösen Ovarialkarzinom beobachtet werden. Eine ausgeprägte Korrelation zwischen KLK14-mRNA und -Proteinexpression konnte jedoch in dieser Studie nicht gezeigt werden, was möglicherweise durch ein zu kleines überlappendes Kollektiv ($n = 50$) bzgl. der mRNA/Proteindaten erklärt werden könnte. Im Gegensatz zu den KLK14 mRNA-Daten war die KLK14-Proteinexpression nicht mit dem Gesamtüberleben oder progressionsfreien Überleben statistisch signifikant assoziiert.

Andere Arbeitsgruppen haben bereits in früheren Publikationen berichtet, dass eine hohe KLK14-Expression vor allem bei Patientinnen mit frühen FIGO-Stadien des Ovarialkarzinoms beobachtet werden. Zusätzlich stehen hohe KLK14-Werte mit der Möglichkeit einer optimalen Debulking-Operation und einem erfolgreichen Ansprechen auf bestimmte Chemotherapieformen im Zusammenhang. Hohes KLK14 könnte daher auch auf Proteinebene ein prognostisch günstiger Tumormarker für das Ovarialkarzinom sein und funktional eine tumorunterdrückende Rolle spielen (Dettmar et al., 2018; Yousef, Fracchioli, et al., 2003). Es wurde bereits eine negative Korrelation des bekannten CA-125 und der KLK14-Expression gezeigt. Das heißt eine hohe KLK14-Expression geht mit niedrigen CA-125-Werten einher. Es ist bekannt, dass hohe CA-125-Werte mit einer schlechten Prognose einher gehen. Jedoch hohe KLK14-Expression prognostisch günstig für Patientinnen mit serösen Ovarialkarzinom ist (Yousef, Fracchioli, et al., 2003). Somit ist eine Bestimmung beider Marker für eine eindeutiger Prognose möglich.

In weiterführenden Untersuchungen sollte man weitere Antikörper gegen KLK14 austesten, um zu überprüfen, ob der in der vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper gegen KLK14 wirklich geeignet ist, alle tumorrelevanten Formen von KLK14 zu detektieren. Tumorzellen weisen ein stark verändertes Protein-Glykosylierungsmuster (Hyperglykosylierung) auf (Haga et al., 2022). KLK14 besitzt eine potenzielle N-Glykosylierungsstelle. Eine übermäßige Glykosylierung (eines Teils) des synthetisierten Proteins könnte somit durch den verwendeten Antikörper nicht mehr oder nicht mehr gut detektiert werden. Dies könnte auch eine Erklärung für die fehlende Korrelation zwischen KLK14-mRNA und Protein beim Ovarialkarzinom sein.

Im Gegensatz zu den Daten der vorliegenden Arbeit, die eine tumorsupprimierende

Funktion von KLK14 nahelegen, zeigte Zhang et. al (2012), dass eine Hemmung der KLK14-Expression durch KLK14-si-RNA das maligne Verhalten von Ovarialkarzinomzellen *in vitro* unterdrücken konnte. Die KLK14-Expression wurde mittels si-RNA in Ovarialkarzinomzellen herunterreguliert. Die Reduktion der Expression von KLK14 führte zu einer Hemmung von Zellwachstum und -invasion sowie zu einer erhöhten Zellapoptoserate in Ovarialkarzinomzellen festgestellt werden (Zhang et al., 2012). Zusätzlich wurde die Expression von verschiedenen Proteinen wie Survivin, Caspase 9, Caspase 3 und MMP2 nach KLK14-Hemmung untersucht. Diese Proteine sind mit für die Zellteilung, Apoptose und Tumoraggressivität durch Induktion und ECM-Abbau verantwortlich (Alenzi et al., 2010; Altieri, 2003; Orlichenko & Radisky, 2008). Es konnte eine verminderte Expression von Survivin und MMP2, sowie eine Erhöhung von Caspase 9 und Caspase 3 durch KLK14-Inhibition festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Hemmung des Zellwachstums, die Aktivierung der Apoptosekaskade und die Unterdrückung des invasiven Potentials von Ovarialkarzinomzellen durch KLK14-si-RNA induziert werden könnte. Diese Ergebnisse deuten also darauf hin, dass KLK14 somit möglicherweise eine Rolle im bösartigen Verhalten der Ovarialkarzinomzellen spielt (Dettmar et al., 2018; Zhang et al., 2012). Weiterführende Untersuchungen, beispielsweise im Tiermodell, sind notwendig, um zu klären, ob diese *in vitro* Daten im Zellkultursystem auch auf *in vivo* Situation übertragbar sind.

Zusammenfassend konnte im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom sowohl eine erhöhte KLK13- als auch KLK14-mRNA-Expression beobachtet werden. Dabei zeigte sich eine umgekehrte prognostische Beziehung der beiden Kallikrein-ähnlichen Peptidasen im Ovarialkarzinom. Während erhöhte KLK13-mRNA-Spiegel sowohl ein schlechteres Gesamtüberleben als auch ein höheres Risiko für ein Rezidiv aufwiesen, sind erhöhte KLK14-mRNA-Spiegel mit einer besseren Prognose für das progressionsfreie und Gesamt-Überleben assoziiert. In multivariaten Cox-Regressionsanalysen sind sowohl KLK13 als auch KLK14 statistisch unabhängige Marker für die Vorhersage des Wiederauftretens der Erkrankung als auch für den Tod. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die beiden Kallikrein-ähnlichen-Peptidasen eine Rolle in der Tumorprogression des serösen Ovarialkarzinoms spielen. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass hierbei KLK13 tumorfördernd und im Gegensatz dazu KLK14 tumorsuppressiv wirkt. Beide Enzyme könnten daher als pharmakologische Zielstrukturen dienen und eine Anpassung und Individualisierung des Therapieansatzes ermöglichen. Dadurch könnten schwerkranken Ovarialkarzinompatienten gegebenenfalls unnötige Behandlungen erspart bleiben.

V.2 KLK14 und deren prognostische Bedeutung im triple-negativen Mammakarzinom

Das triple-negative Mammakarzinom ist durch das Fehlen von Östrogen- und Progesteron- sowie geringer HER2-Rezeptorexpression gekennzeichnet. Etwa 10-24% aller Mammakarzinome sind triple-negativ. Vor allem junge Patientinnen leiden bis zu 30 % an triple-negativen Mammakarzinomen. Charakteristisch ist die sehr heterogene Entität des triple-negativen Mammakarzinoms, welche auch eine mögliche Erklärung für die schlechte Prognose ist. Sowohl histomorphologisch als auch molekular unterscheiden sich die triple-negativen Mammakarzinome von anderen Karzinomtypen. Neben überwiegend invasiven Mammakarzinomen vom nicht speziellen Typ (NST, high grade), Mammakarzinomen mit medullärem Wachstumsmuster, hier häufig mit assoziierter

BRCA1-Keimbahnmutation, gehören metaplastische squamöse und Matrix produzierende Karzinome und Translokationskarzinome (adenoid-zystische und sekretorisches Karzinome) zu den triple-negativen Mammakarzinomen. Auf molekularer Ebene (definiert durch mRNA Expression) zeigen ein Großteil (etwa 70-80%) der TNBC die Charakteristika eines basalen Phänotyps (wegen der Ähnlichkeit zu basal in Drüsen der Mamma lokalisierten myoepithelialen Zellen), zusätzlich können geringe Expressionen von Claudin und luminaler Expression von Androgenrezeptoren auftreten (Ross & Pareja, 2021; Wu & Hicks, 2021).

Für jedes Tumorstadium ist die Prognose der TNBC im Vergleich zu den anderen Typen der Mammakarzinome schlechter. Die Unterschiede in krankheitsfreiem Intervall, krankheitsspezifischem Überleben und Gesamtüberleben vergrößern sich dabei noch mit höheren Tumorstadien. Triple-negative Mammakarzinom-Patientinnen erleiden dabei häufig ein frühes Tumorrezidiv innerhalb von drei Jahren. Triple-negative Mammakarzinome zeigen ein hohes Risiko für Metastasierung in ZNS und Lunge und sind für bis zu 30% aller Sterbefälle an Mammakarzinomen verantwortlich.

Nach aktueller Forschung besteht die einzige Therapie aus Operation und adjuvanter Chemotherapie mit Taxanen, Anthrazyklinen und Carboplatin, da triple-negative Mammakarzinome unempfindlich gegenüber endokriner Therapie und Antikörpertherapie sind. Jedoch kann ein Ansprechen auf die Chemotherapie nicht immer eine Verbesserung der Prognose garantieren, da die Chemotherapieempfindlichkeit bei der Heterogenität der Krebserkrankung sehr unterschiedlich ist. Unterschiede in der Prognose und dem Ansprechen auf Chemotherapie bestehen bei TNBC durch den histologischen Typ und die primäre immunologische Reaktion im Tumorgewebe.

Demzufolge ist es wichtig, spezifische Therapieansätze für das heterogene Krankheitsbild zu finden. In zahlreichen Studien wurden bereits neue pharmakologische Zielstrukturen für die Verbesserung der Überlebenschance der triple-negativen Mammakarzinom-Patientin untersucht (Foulkes et al., 2010; Geng, 2019; Liedtke, 2017; Wolf C., 2011; Yang et al., 2017).

Der Einsatz von sogenannten Poly-ADP-Ribose-Polymerase (= PARP)-Inhibitoren kann das Überleben von Patientinnen mit triple-negativen Mammakarzinomen mit BRCA1-Mutationen verbessern (Geenen et al., 2018; Rottenberg et al., 2008). PARP spielt eine wichtige Rolle in den DNA-Reparaturmechanismen und kann so bei BRCA1-Mutationen den intrazellulären Reparaturdefekt kompensieren. Die Hemmung von PARP führt letztendlich zum Zelltod („synthetische Letalität“) und damit zu einer Tumorsuppression (Liedtke, 2017; Lord et al., 2015). Des Weiteren wurden Anti-Androgene Medikamente für die Therapie des triple-negativen Mammakarzinoms untersucht. Man geht davon aus, dass bei manchen triple-negativen Mammakarzinomen an der Oberfläche der Tumorzellen Androgenrezeptoren präsentiert werden. Diese könnten Zielstrukturen für Medikamente sein (Denkert et al., 2017; Denkert et al., 2010). Zusätzlich können mechanistic Target of Rapamycin (= mTOR) -Inhibitoren im therapeutischen Ansatz der Behandlung von triple-negativen Mammakarzinomen eine Rolle spielen. Dabei wurde herausgefunden, dass eine Kombination aus mTOR- und PARP-Inhibitoren bei BRCA-Mutationen für die Therapie vielversprechend sind (Mo et al., 2016). Studien untersuchten auch die Wirkung von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (= TIL) im Brustkrebs. Dabei konnte gezeigt werden, dass TILs beim triple-negativen Mammakarzinom ein etablierter prognostischer Faktor für das Chemotherapieansprechen und damit einhergehender

besserer Prognose ist (Denkert et al., 2017; Denkert et al., 2010). Antiangiogene Wirkstoffe, die schon bei anderen Krebsarten (Ovarialkarzinom, Lungenkarzinom) eingesetzt werden, könnten auch beim triple-negativem Mammakarzinom erfolgversprechend sein (Geng, 2019; Harbeck & Gluz, 2017). Der Angiogenesehemmer Bevacizumab wird aktuell schon bei HER2-negativen Mammakarzinomen in Kombination mit Chemotherapeutika (Paclitaxel oder Capecitabin) als Erstlinientherapie angewendet. Die oben aufgeführten Angriffspunkte sind interessante pharmakologische Zielstrukturen für das triple-negative Mammakarzinom, jedoch muss die Wahl des Therapieansatzes individuell getroffen werden. Die Heterogenität dieser Tumorentität muss deshalb immer genauestens betrachtet werden. Zusätzliche Tumormarker sind von Nöten, um die bestmögliche individualisierte Therapie für diese Patienten zu erreichen.

Alle Mitglieder der KLK-Familie werden sowohl im gesunden als auch im erkrankten Brustgewebe exprimiert. Dabei werden die Kallikrein-ähnlichen Peptidasen vor allem im Drüsenepithel, aber auch in Brustsekreten (Muttermilch, Nippelaspirat, Zystenflüssigkeit) freigesetzt (Petraiki et al., 2006; Schmitt et al., 2013; Shaw & Diamandis, 2007). Extrazelluläre Proteasen wie uPA, Plasmin, Matrix-Metalloproteasen, Kathepsine und auch die KLKs vermitteln während der Tumorprogression viele der Veränderungen in der Mikroumgebung des Tumors, indem sie u.a. die Basalmembran und die angrenzende ECM aufbrechen. Es ist also nicht verwunderlich, dass KLKs eine regulierende Rolle bei Tumorwachstum und -progression einnehmen und somit in verschiedenen Stadien der Brustkrebsentstehung, -progression und -metastasierung beteiligt sind. Bei derzeitigem Kenntnisstand kann sowohl die Überexpression als auch die verminderte Expression von KLKs im Mammakarzinom eine prognostische Rolle spielen (s. Tabelle 4). Die meisten KLKs scheinen in verminderter Expression in Mammakarzinomzellen im Vergleich zur Normalgewebe aufzutreten. Bisher konnte nur eine vermehrte Expression von KLK4 und KLK15 im Mammakarzinom beobachtet werden (Avgeris et al., 2012; Mange et al., 2008; Schmitt et al., 2013; Yousef et al., 2004). Widersprüchliche Ergebnisse existieren für KLK5, 10 und 14, die im Serum vermehrt, hingegen im Tumorgewebe hingegen vermindert exprimiert sind. Möglicherweise wird die Freisetzung der KLKs im Serum durch den Abbau der Drüsen und die Angiogenese begünstigt (Yousef, Borgono, et al., 2002; Yousef, Magklara, et al., 2001). Interessanterweise entsteht das Mammakarzinom oft durch Androgenstimulation, wobei durch Androgenrezeptoren und deren Reaktion auf Steroidhormone eine veränderte Kallikreinexpression im Mammakarzinom bedingt sein kann (Avgeris et al., 2010; Paliouras & Diamandis, 2008; Schmitt et al., 2013). Obwohl dem triple-negativen Mammakarzinom der Östrogen- und Progesteronrezeptor fehlt, konnte eine Expression der Kallikrein-Mitglieder beobachtet werden. Es ist demnach davon auszugehen, dass die Kallikreinexpression ursächlich nicht nur von der Stimulation dieser Hormone abhängig ist.

In einigen Fällen wurde bereits die Expression und klinische Relevanz bestimmter KLKs in homogenen Patientinnen-Kohorten mit triple-negativem Mammakarzinom untersucht. Dabei wurden ähnliche Kollektive wie in dieser Arbeit von der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar bereitgestellt. In diesen Untersuchungen wurde beobachtet, dass KLK4 vor allem in den Stromazellen und nicht in den Tumorzellen vermehrt exprimiert wird. Eine erhöhte KLK4-Expression in Stromazellen geht in dieser Studie mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben einher (Yang et al., 2017). Eine hohe Expression von KLK5 in Stromazellen geht signifikant mit einer Tu-

mormetastasierung einher. Es ist daher nicht verwunderlich, dass eine hohe KLK5-Expression mit einer schlechteren Prognose beim TNBC zu beobachten ist (Yang et al., 2015). Im Vergleich zu Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen ist die Expression von KLK10 im TNBC höher. Erhöhte KLK10-mRNA-Werte sind auch hier mit einer ungünstigeren Prognose bei TNBC verbunden. Auch eine erhöhte KLK11-mRNA-Expression wurde mit einem kürzeren 15-Jahres-Überleben assoziiert. Zusätzlich wurde eine Ko-Expression von KLK10 und KLK11 in TNBC festgestellt. Diese Kombination aus KLK10 und KLK11 erhöhte den Vorhersagewert des progressionsfreien Überlebens (Geng, 2019; Geng et al., 2018). Des Weiteren zeigte eine positive KLK12-Expression sowohl ein verkürztes progressionsfreies Überleben als auch Gesamtüberleben (Gong et al., 2020). Die oben genannten Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine vermehrte Expression vieler Kallikrein-ähnlicher Peptidasen eine tumorunterstützende Rolle im triple-negativen Mammakarzinom spielt.

Ein Fokus dieser Arbeit bestand darin, die Expression von KLK14 im triple-negativen Mammakarzinom zu untersuchen. Dabei wurde immunhistochemisch die Proteinexpression von KLK14 ermittelt und die Ergebnisse auf die klinische Relevanz in Bezug auf das Gesamtüberleben und 15-Jahres-Überleben überprüft. Damit sollte auch geklärt werden, ob eine hohe KLK14-Expression eine ähnliche Rolle im TNBC wie im fortgeschrittenen, serösen Ovarialkarzinom spielt. Die Expression und dessen klinische Relevanz von KLK14 im Mammakarzinom werden bisher kontrovers diskutiert. Es gibt verschiedene Berichte, in denen die Expression von KLK14 sowohl höher als auch niedriger in Mammakarzinomen im Vergleich zu gesundem Brustgewebe beschrieben werden (Fritzsche et al., 2006; Papachristopoulou et al., 2011; Yousef, Borgono, et al., 2002; Yousef, Magklara, et al., 2001). Weitere Publikationen deuten darauf hin, dass KLK14 sowohl eine tumorstimulierende als auch tumorunterdrückende Wirkung aufweisen kann (Borgoño & Diamandis, 2004; Borgono et al., 2007; Rajapakse & Takahashi, 2007). Möglicherweise liegen die zum Teil widersprüchlichen Daten darin begründet, dass in diesen Studien, verschiedene Patientinnenkollektive betrachtet und nicht zwischen Steroidhormonrezeptor-positiven, -negativen und dem HER2-Status der Mammakarzinome unterschieden wurde. Man geht davon aus, dass KLK14 durch Steroidhormone (Androgene und Gestagene) in hormonabhängigen Tumoren wie Brustkrebs reguliert wird. Daher ist es nicht verwunderlich, dass eine erhöhte KLK14-mRNA und Proteinexpression in Steroidhormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen nachgewiesen werden konnte (Fritzsche et al., 2006; Papachristopoulou et al., 2011; Yousef, Borgono, et al., 2002). Andererseits wird in dieser Studie gezeigt, dass eine KLK14-Überexpression auch in hormonunabhängigen Tumorgewebe (triple-negativen Mammakarzinomen) möglich ist. Es scheint, dass KLK14-Expression nicht nur abhängig von Steroidhormonen ist, sondern auch andere Mechanismen zur Überstimulierung in Frage kommen.

Auch die prognostische Bedeutung der KLK14-Expression ist nicht eindeutig geklärt. Die Überexpression von KLK14-mRNA wurde als unabhängiger Marker für eine ungünstige Prognose bei Mammakarzinomen bewertet. Höhere Konzentrationen von KLK14-mRNA wurden häufiger bei Patientinnen mit fortgeschrittener Erkrankung festgestellt, was zu einem verminderten krankheitsfreien Überleben und Gesamtüberleben führt (Yousef, Borgono, et al., 2002). Auch Papachristopoulou et al. (2011) untermauert das Ergebnis durch die Beobachtung, dass eine hohe KLK14-mRNA-Expression mit höherem Tumorgrading und größerer Tumormasse einhergeht und wiederum mit einer schlechteren

Prognose einhergeht. In dieser Arbeit wurde eine hohe KLK14-Expression im triple-negativen Mammakarzinom festgestellt, jedoch konnte eine eindeutige prognostische Bedeutung nicht dargelegt werden.

Darüber hinaus wurde in Studien die Korrelation von KLK14-mRNA-Expression/-Proteinexpression mit Steroidrezeptorstatus, Tumorgrading und Lymphknotenstatus untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die KLK14-mRNA-Expression eine statistisch signifikante negative Korrelation mit dem Östrogenrezeptorstatus im Brustkrebs (Papachristopoulou et al., 2011). Bei positivem Rezeptorstatus kann entweder Tamoxifen oder Aromatasehemmer als Therapiemöglichkeit eingesetzt werden. Dadurch wird die Prognose der Patientinnen mit hormonrezeptorpositivem Mammakarzinom verbessert. Die negative Korrelation zwischen KLK14 und Östrogenrezeptorstatus kann daher auch als ein prognostischer Marker dienen. Zusätzlich wurde Korrelation von KLK14-Proteinexpression mit einem höheren Tumorgrading und positiven Lymphknotenstatus beobachtet. Höheres Tumorgrading und Lymphknotenbefall gehen mit Tumoraggressivität einher. Jedoch konnte keine Signifikanz zwischen einer hohen KLK14-Proteinexpression mit einem verkürzten progressionsfreien Überleben oder Gesamtüberleben festgestellt werden. Daher ist die KLK14-Proteinexpression mittels IHC als prognostischer Marker im Mammakarzinom bislang fraglich (Fritzsche et al., 2006).

Wie bereits oben erwähnt ist aufgrund der wenigen Therapieoptionen und der Heterogenität das triple-negative Mammakarzinom eine Herausforderung. Tumormarker sind von Nöten, um die individualisierte Therapie zu ermöglichen. Es ist somit wichtig zu bestimmen, ob KLK14 als Zielstruktur fungieren kann. Es wurde bereits gezeigt, dass eine erhöhte Proteinexpression von KLK14 in einem heterogenen Patientenkollektiv von Mammakarzinomen im Vergleich zu Normalgewebe vorliegt, (Fritzsche et al., 2006). In dieser Arbeit zeigte sich, dass in ausschließlich TNBC untersuchten Proben die KLK14-Proteinexpression mittels IHC im Vergleich zu Normalgewebe erhöht ist. Um die prognostische Bedeutung der erhöhten KLK14-Proteinexpression zu bestimmen, wurden Überlebenskurven mittels Kaplan-Meier erstellt. Dabei wurde sowohl der gesamte Beobachtungszeitraum als auch ein 15-Jahres Gesamtüberleben betrachtet. Eine erhöhte KLK14-Proteinexpression lag vor, wenn die immunhistochemische Bewertung über 1 bzw. über 2 lag. Bei beiden Gruppeneinteilungen konnte keine Signifikanz zwischen KLK14-Proteinexpression und dem Gesamtüberleben gezeigt werden. Jedoch wurde ein Trend zur Signifikanz bei einer hohen KLK14-Proteinexpression (2+3) mit einem längeren 15-Jahres Überleben beobachtet ($p = 0,067$). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch mit den zuvor erwähnten Studien. Diese Arbeit zeigt, dass auch bei Fehlen von Hormonrezeptoren eine Überexpression von KLK14 stattfindet. Es muss also davon ausgegangen werden, dass die KLK14-Expression nicht ausschließlich von Steroidhormonen reguliert wird. Es besteht demnach die Möglichkeit, dass eine hohe KLK14-Expression nur bei hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen einen prognostisch schlechteren Effekt hat, jedoch nicht bei triple-negativen Mammakarzinomen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass hohe KLK14-Expressionslevel im fortgeschrittenen, serösen Ovarialkarzinom mit einer besseren Prognose einhergehen. Im Gegensatz dazu konnte eine hohe KLK14-Proteinexpression im triple-negativen Mammakarzinom keine Prognoseverbesserung zeigen. Ob KLK14 sich nur im Ovarialkarzinom tumorsuppressiv verhält und in anderen Tumorarten eine andere Rolle spielt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

VI. Zusammenfassung

Das fortgeschrittene seröse Ovarialkarzinom stellt auf Grund seiner späten Diagnosestellung und hohen Sterblichkeit eine therapeutische Herausforderung dar. Auch das triple-negative Mammakarzinom weist ein aggressives Wachstum und kürzeres Gesamtüberleben auf. Die Heterogenität dieser Karzinome und ihre eingeschränkten Therapiemöglichkeiten (ausschließlich Operation und Chemotherapie) des triple-negativen Mammakarzinoms stellen eine Hürde dar. Die Genexpression der humanen Kallikrein-ähnlichen Peptidasen ist im Ovarial- und im Mammakarzinom dereguliert. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit sowohl die klinische Relevanz von KLK13 und KLK14 im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom (FIGO III/IV) als auch von KLK14 im triple-negativen Mammakarzinom analysiert werden.

Im molekularbiologischen Teil der vorliegenden Arbeit erfolgte die Etablierung eines KLK13-qPCR-Assays unter Verwendung von isolierter RNA aus der humanen ovariellen Zelllinie OV-MZ-6/KLK13 und Tumorgewebe. Anschließend wurde mittels qPCR die mRNA-Expression von KLK13 (und KLK14 von einer Mitdotorandin) in einem Kollektiv von Patientinnen mit fortgeschrittenem serösen Ovarialkarzinom quantifiziert, die Korrelation der KLK13-Expression mit klinisch etablierten Parametern des Ovarialkarzinoms analysiert und der Zusammenhang der KLK13-Expression mit dem Gesamtüberleben/progressionsfreien Überleben untersucht.

Unsere Daten zeigen, dass sowohl KLK13 und KLK 14 im fortgeschrittenen, serösen Ovarialkarzinom als auch KLK14 im triple-negativen Mammakarzinom im Vergleich zu Normalgewebe vermehrt exprimiert sind. In Bezug auf etablierte prognostische Parameter des Ovarialkarzinoms wie das Aszitesvolumen oder Resttumormasse konnte kein signifikanter Zusammenhang mit der mRNA-Expression von KLK13 und KLK14 festgestellt werden. Lediglich eine hohe KLK14-mRNA Expression war mit einem Patientenalter über 60 Jahren assoziiert. Da die klinische Forschergruppe der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar noch weitere KLK-Mitglieder auf deren mRNA-Expression im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom untersuchte, konnte auch eine moderate Korrelation der mRNA-Expression von KLK13 und KLK10 ($R = 0,544$, $p < 0,001$) als auch KLK13 und KLK11 ($R = 0,541$, $p < 0,001$) beobachtet werden. Patienten mit einem erhöhten KLK13-mRNA-Expressionslevel weisen ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben ($HR = 1,81$; $95\%-KI = 1,03-3,19$; $p = 0,041$) und erhöhtes Risiko für Progression der Erkrankung ($HR = 1,97$; $95\%-KI = 1,12-3,47$; $p = 0,020$) auf. Im Gegensatz zu KLK13 waren erhöhte KLK14-mRNA-Expressionswerte signifikant mit einem längeren progressionsfreien Überleben assoziiert ($HR = 0,44$; $95\%-KI = 0,22-0,86$; $p = 0,017$). Ein Trend zur Signifikanz fand sich für das 5-Jahres-Überleben bei einer hohen KLK14-mRNA-Expression konnte beobachtet werden ($HR = 0,54$, $95\%-KI = 0,28-1,05$, $p = 0,070$). Im Gegensatz zu den Daten bzgl. der KLK14 -mRNA-Expression, gab es keine signifikante Assoziation zwischen der KLK14-Proteinexpressionshöhe (semiquantitativ bestimmt mittels Immunhistochemie) dem progressionsfreien bzw. Gesamtüberleben. Zudem gab es keine signifikante Korrelation zwischen KLK-14-mRNA- und Proteinexpression, was darauf hindeuten könnte, dass der für die immunhistochemischen Untersuchungen verwendete KLK14 Antikörper nicht alle Formen des tumor-assoziierten KLK14-Proteins detektiert.

Die multivariate Regressionsanalyse nach Cox sollte die unabhängige Beziehung der KLK13- und KLK14-mRNA-Expression in Bezug zu anderen etablierten klinischen Parametern auf das Gesamt- und progressionsfreie Überleben prüfen. Dem Basismodell aus den

etablierten klinischen Prognoseparametern (Alter, Aszitesvolumen, Resttumormasse) wurden anschließend separat die dichotomisierten KLK13- oder KLK14-mRNA-Expressionslevel hinzugefügt. Es konnte beim separaten Hinzufügen von KLK13 und KLK14 ein Trend zur Signifikanz für das Gesamtüberleben (KLK13: HR = 1,82; 95%-KI = 0,99-3,35; $p = 0,054$; KLK14: HR = 0,52; 95%-KI = 0,25-1,06; $p = 0,073$) gezeigt werden. In Bezug auf das progressionsfreie Überleben stellen sowohl KLK13- als auch KLK14-mRNA-Expressionslevel eine unabhängige prognostische Bedeutung dar (KLK13: HR = 1,87; 95%-KI = 1,02-3,44; $p = 0,043$, KLK14: HR = 0,40; 95%-KI = 0,19-0,84; $p = 0,016$). Werden beide KLKs gleichzeitig zum Basismodell hinzugefügt, konnte gezeigt werden, dass hohe KLK13-Werte für ein kürzeres Gesamtüberleben (HR = 2,05; 95%-KI = 1,08-3,88; $p = 0,020$) sowie progressionsfreies Überleben (HR = 2,14; 95%-KI = 1,13-4,08; $p = 0,037$) und hohe KLK14-Werte für ein längeres Gesamt- und progressionsfreies Überleben (Gesamtüberleben: HR = 0,46; 95%-KI = 0,22-0,95; $p = 0,037$; Progressionsfreies Überleben: HR = 0,36; 95%-KI = 0,17-0,76; $p = 0,007$) sprechen.

In einem weiteren Projekt sollten verschiedene Antikörper gegen KLK13 und KLK14 auf Spezifität gegenüber aller anderen Mitglieder der KLK-Familie getestet werden. Im Labor waren rekombinante produzierte Proteine von pro-KLK2 bis einschließlich pro-KLK15 vorhanden, jedoch nicht pro-KLK1. Daher erfolgte zunächst die Herstellung eines Expressionsplasmids für pro-KLK1, sowie die rekombinante Produktion und Aufreinigung des Proteins. Mittels Western-Blot Analysen konnten verschiedene Antikörper gegen KLK13 und KLK14 charakterisiert werden und einige identifiziert werden, die keine Kreuzreaktionen mit anderen Mitgliedern der KLK-Familie zeigen. Anschließend erfolgte die Austestung auf Eignung dieser in immunhistochemischen Analysen, wobei sich die KLK13-Antikörper als ungeeignet für die IHC-Analysen erwiesen. Dagegen konnte ein Antikörper gegen KLK14 (R&D; AF2626) für die Untersuchung der Proteinexpression in Patientinnenkollektiven mit fortgeschrittenem serösen Ovarialkarzinom bzw. triple-negativen Mammakarzinom verwendet werden.

Zunächst wurde der Zusammenhang zwischen der KLK14-Proteinexpression und den klinisch etablierten prognostischen Markern (Aszitesmenge, Alter und Resttumormasse) des Ovarialkarzinoms untersucht. Dabei konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Zusätzlich konnte keine Signifikanz zwischen der KLK14-Proteinexpression (unterteilt in zwei Gruppen: KLK14 2+3 vs. 0+1; KLK14 3 vs. 0+1+2) und dem progressionsfreien- und Gesamtüberleben festgestellt werden. Auch bestand keine Korrelation zwischen der KLK14-mRNA und -Proteinexpression im fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom.

Schließlich wurde auch ein Kollektiv mit Tumorgewebe von Patientinnen mit triple-negativem Mammakarzinom untersucht. Hier konnte bei einer hohen KLK14-Proteinexpression (IRS-Wert 2+3) ein Trend zur Signifikanz ($p = 0,067$) für ein längeres 15-Jahre-Gesamtüberleben gefunden werden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl KLK13- als auch KLK14-mRNA als unabhängige prädiktive Tumormarker für das fortgeschrittene, seröse Ovarialkarzinom in Frage kommen. Jedoch spielen die beiden Biomarker, KLK13- und KLK14-mRNA, beim fortgeschrittenen serösen Ovarialkarzinom in der Tumorprogression eine entgegengesetzte Rolle, d.h. KLK13 könnte tumorprogressiv wirken, während KLK14 möglicherweise eine tumorsuppressive Wirkung aufweist. Auf Proteinebene gab es mit dem verwendeten KLK14-Antikörper in den immunhistochemischen Untersuchungen keine Assoziation

zwischen KLK14-Expression und Patientinnenprognose. Hier sollten Validierungsstudien mit weiteren spezifischen KLK14-Antikörpern erfolgen.

VII. Literaturverzeichnis

- Adib, T. R., Henderson, S., Perrett, C., Hewitt, D., Bourmpoulia, D., Ledermann, J., & Boshoff, C. (2004). Predicting biomarkers for ovarian cancer using gene-expression microarrays. *Br J Cancer*, *90*(3), 686-692. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601603>
- Ahmed, N., Dorn, J., Napieralski, R., Drecoll, E., Kotzsch, M., Goettig, P., Zein, E., Avril, S., Kiechle, M., Diamandis, E. P., Schmitt, M., & Magdolen, V. (2016). Clinical relevance of kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) and 8 (KLK8) mRNA expression in advanced serous ovarian cancer. *Biol Chem*, *397*(12), 1265-1276. <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0177>
- Albert U.S., A. H., Duda V., (2008). Stufe-3-Leitlinie Brustkrebs-Früherkennung in Deutschland. In. Zuckschwerdt München.
- Alenzi, F. Q., Lotfy, M., & Wyse, R. (2010). Swords of cell death: caspase activation and regulation. *Asian Pac J Cancer Prev*, *11*(2), 271-280. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20843101>
- Altieri, D. C. (2003). Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene*, *22*(53), 8581-8589. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207113>
- Anderson, G. L., Judd, H. L., Kaunitz, A. M., & et al. (2003). Effects of estrogen plus progestin on gynecologic cancers and associated diagnostic procedures: The women's health initiative randomized trial. *JAMA*, *290*(13), 1739-1748. <https://doi.org/10.1001/jama.290.13.1739>
- Antoniou, A., Pharoah, P. D., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., Pasini, B., Radice, P., Manoukian, S., Eccles, D. M., Tang, N., Olah, E., Anton-Culver, H., Warner, E., Lubinski, J., . . . Easton, D. F. (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*, *72*(5), 1117-1130. <https://doi.org/10.1086/375033>
- Avgeris, M., Mavridis, K., & Scorilas, A. (2010). Kallikrein-related peptidase genes as promising biomarkers for prognosis and monitoring of human malignancies. *Biol Chem*, *391*(5), 505-511. <https://doi.org/10.1515/BC.2010.056>
- Avgeris, M., Mavridis, K., & Scorilas, A. (2012). Kallikrein-related peptidases in prostate, breast, and ovarian cancers: from pathobiology to clinical relevance. *Biol Chem*, *393*(5), 301-317. <https://doi.org/10.1515/hsz-2011-0260>
- Bajorath, J., Saenger, W., & Pal, G. P. (1988). Autolysis and inhibition of proteinase K, a subtilisin-related serine proteinase isolated from the fungus *Tritirachium album Limber*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, *954*, 176-182. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0167-4838\(88\)90069-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0167-4838(88)90069-6)
- Balk, S. P., Ko, Y. J., & Bubley, G. J. (2003). Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol*, *21*(2), 383-391. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.02.083>
- Bankhead, C. R., Kehoe, S. T., & Austoker, J. (2005). Symptoms associated with diagnosis of ovarian cancer: a systematic review. *BJOG*, *112*(7), 857-865. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2005.00572.x>
- Bast, R. C., Jr., Badgwell, D., Lu, Z., Marquez, R., Rosen, D., Liu, J., Baggerly, K. A., Atkinson, E. N., Skates, S., Zhang, Z., Lokshin, A., Menon, U., Jacobs, I., & Lu, K. (2005). New tumor markers: CA125 and beyond. *Int J Gynecol Cancer*, *15 Suppl 3*, 274-281. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2005.00441.x>

- Blacque, O. E., & Worrall, D. M. (2002). Evidence for a direct interaction between the tumor suppressor serpin, maspin, and types I and III collagen. *J Biol Chem*, 277(13), 10783-10788. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110992200>
- Borgoño, C. A., & Diamandis, E. P. (2004). The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer [Review Article]. *Nature Reviews Cancer*, 4, 876. <https://doi.org/10.1038/nrc1474>
- Borgono, C. A., Fracchioli, S., Yousef, G. M., Rigault de la Longrais, I. A., Luo, L. Y., Soosaipillai, A., Puopolo, M., Grass, L., Scorilas, A., Diamandis, E. P., & Katsaros, D. (2003). Favorable prognostic value of tissue human kallikrein 11 (hK11) in patients with ovarian carcinoma. *Int J Cancer*, 106(4), 605-610. <https://doi.org/10.1002/ijc.11296>
- Borgono, C. A., Kishi, T., Scorilas, A., Harbeck, N., Dorn, J., Schmalfeldt, B., Schmitt, M., & Diamandis, E. P. (2006). Human kallikrein 8 protein is a favorable prognostic marker in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 12(5), 1487-1493. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2106>
- Borgono, C. A., Michael, I. P., & Diamandis, E. P. (2004). Human tissue kallikreins: physiologic roles and applications in cancer. *Mol Cancer Res*, 2(5), 257-280. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15192120>
- Borgono, C. A., Michael, I. P., Shaw, J. L., Luo, L. Y., Ghosh, M. C., Soosaipillai, A., Grass, L., Katsaros, D., & Diamandis, E. P. (2007). Expression and functional characterization of the cancer-related serine protease, human tissue kallikrein 14. *J Biol Chem*, 282(4), 2405-2422. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608348200>
- Brattsand, M., Stefansson, K., Lundh, C., Haasum, Y., & Egelrud, T. (2005). A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. *J Invest Dermatol*, 124(1), 198-203. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23547.x>
- Cetin, I., Cozzi, V., & Antonazzo, P. (2008). Infertility as a Cancer Risk Factor - A Review. *Placenta*, 29, 169-177. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.08.007>
- 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-L4) splice variants: differential expression in the human testis and testicular cancer. *Anticancer Res*, 21(5), 3147-3152. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11848466>
- Chang, A., Yousef, G. M., Scorilas, A., Grass, L., Sismondi, P., Ponzzone, R., & Diamandis, E. P. (2002). Human kallikrein gene 13 (KLK13) expression by quantitative RT-PCR: an independent indicator of favourable prognosis in breast cancer. *Br J Cancer*, 86(9), 1457-1464. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600283>
- 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(3), 442-447. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.05.022>
- Clarke, M., Collins, R., Darby, S., Davies, C., Elphinstone, P., Evans, V., Godwin, J., Gray, R., Hicks, C., James, S., MacKinnon, E., McGale, P., McHugh, T., Peto, R., Taylor, C., Wang, Y., & Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G. (2005). Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*, 366(9503), 2087-2106. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67887-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67887-7)
- Cramer, D. W., Bast, R. C., Jr., Berg, C. D., Diamandis, E. P., Godwin, A. K., Hartge, P., Lokshin, A. E., Lu, K. H., McIntosh, M. W., Mor, G., Patriotis, C., Pinsky, P. F., Thornquist, M. D., Scholler, N., Skates, S. J., Sluss, P. M., Srivastava, S., Ward, D. C., Zhang, Z., . . . Urban, N. (2011). Ovarian cancer biomarker

- performance in prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial specimens. *Cancer Prev Res (Phila)*, 4(3), 365-374.
<https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0195>
- Dahabreh, I. J., Wieland, L. S., Adam, G. P., Halladay, C., Lau, J., & Trikalinos, T. A. (2014). In *Core Needle and Open Surgical Biopsy for Diagnosis of Breast Lesions: An Update to the 2009 Report*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25275206>
- Denkert, C., Liedtke, C., Tutt, A., & von Minckwitz, G. (2017). Molecular alterations in triple-negative breast cancer-the road to new treatment strategies. *Lancet*, 389(10087), 2430-2442. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32454-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32454-0)
- Denkert, C., Loibl, S., Noske, A., Roller, M., Muller, B. M., Komor, M., Budczies, J., Darb-Esfahani, S., Kronenwett, R., Hanusch, C., von Torne, C., Weichert, W., Engels, K., Solbach, C., Schrader, I., Dietel, M., & von Minckwitz, G. (2010). Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*, 28(1), 105-113.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.7370>
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., Lickley, L. A., Rawlinson, E., Sun, P., & Narod, S. A. (2007). Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*, 13(15 Pt 1), 4429-4434. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-3045>
- Dettmar, L., Ahmed, N., Kotzsch, M., Diersch, S., Napieralski, R., Darmoul, D., Schmitt, M., Weichert, W., Kiechle, M., Dorn, J., & Magdolen, V. (2018). Advanced high-grade serous ovarian cancer: inverse association of KLK13 and KLK14 mRNA levels in tumor tissue and patients' prognosis. *J Cancer Res Clin Oncol*, 144(6), 1109-1118. <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2623-7>
- Deutsche Krebsgesellschaft, D. K., AWMF. (2018). *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms* (Vol. 4.1). Leitlinienprogramm Onkologie
- Devetzi, M., Trangas, T., Scorilas, A., Xynopoulos, D., & Talieri, M. (2013). Parallel overexpression and clinical significance of kallikrein-related peptidases 7 and 14 (KLK7KLK14) in colon cancer. *Thromb Haemost*, 109(4), 716-725.
<https://doi.org/10.1160/TH12-07-0518>
- Diamandis, E. P., Borgono, C. A., Scorilas, A., Harbeck, N., Dorn, J., & Schmitt, M. (2004). Human kallikrein 11: an indicator of favorable prognosis in ovarian cancer patients. *Clin Biochem*, 37(9), 823-829.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2004.04.009>
- Diamandis, E. P., Scorilas, A., Fracchioli, S., Van Gramberen, M., De Bruijn, H., Henrik, A., Soosaipillai, A., Grass, L., Yousef, G. M., Stenman, U. H., Massobrio, M., Van Der Zee, A. G., Vergote, I., & Katsaros, D. (2003). Human kallikrein 6 (hK6): a new potential serum biomarker for diagnosis and prognosis of ovarian carcinoma. *J Clin Oncol*, 21(6), 1035-1043.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2003.02.022>
- Doherty, A. J., & Suh, S. W. (2000). Structural and mechanistic conservation in DNA ligases. *Nucleic Acids Research*, 28(21), 4051-4058.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC113121/>
- Dorn, J., Bayani, J., Yousef, G. M., Yang, F., Magdolen, V., Kiechle, M., Diamandis, E. P., & Schmitt, M. (2013). Clinical utility of kallikrein-related peptidases (KLK) in urogenital malignancies. *Thromb Haemost*, 110(3), 408-422.
<https://doi.org/10.1160/TH13-03-0206>
- Dorn, J., Beaufort, N., Schmitt, M., Diamandis, E. P., Goettig, P., & Magdolen, V. (2014). Function and clinical relevance of kallikrein-related peptidases and other

- serine proteases in gynecological cancers. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 51(2), 63-84.
<https://doi.org/10.3109/10408363.2013.865701>
- Dorn, J., Harbeck, N., Kates, R., Gkazepis, A., Scorilas, A., Soosaipillai, A., Diamandis, E., Kiechle, M., Schmalfeldt, B., & Schmitt, M. (2011). Impact of expression differences of kallikrein-related peptidases and of uPA and PAI-1 between primary tumor and omentum metastasis in advanced ovarian cancer. *Ann Oncol*, 22(4), 877-883. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq462>
- du Bois, A., Neijt, J. P., & Thigpen, J. T. (1999). First line chemotherapy with carboplatin plus paclitaxel in advanced ovarian cancer--a new standard of care? *Ann Oncol*, 10 Suppl 1, 35-41. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10219451>
- du Bois, A., Reuss, A., Pujade-Lauraine, E., Harter, P., Ray-Coquard, I., & Pfisterer, J. (2009). Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: A combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials. *Cancer*, 115(6), 1234-1244.
<https://doi.org/doi:10.1002/cncr.24149>
- Dubsky, P., Brase, J. C., Jakesz, R., Rudas, M., Singer, C. F., Greil, R., Dietze, O., Luisser, I., Klug, E., Sedivy, R., Bachner, M., Mayr, D., Schmidt, M., Gehrman, M. C., Petry, C., Weber, K. E., Fisch, K., Kronenwett, R., Gnant, M., . . . Colorectal Cancer Study, G. (2013). The EndoPredict score provides prognostic information on late distant metastases in ER+/HER2- breast cancer patients. *Br J Cancer*, 109(12), 2959-2964. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.671>
- Dubsky, P., Filipits, M., Jakesz, R., Rudas, M., Singer, C. F., Greil, R., Dietze, O., Luisser, I., Klug, E., Sedivy, R., Bachner, M., Mayr, D., Schmidt, M., Gehrman, M. C., Petry, C., Weber, K. E., Kronenwett, R., Brase, J. C., Gnant, M., . . . Colorectal Cancer Study, G. (2013). EndoPredict improves the prognostic classification derived from common clinical guidelines in ER-positive, HER2-negative early breast cancer. *Ann Oncol*, 24(3), 640-647.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mds334>
- Dupont, W. D., Parl, F. F., Hartmann, W. H., Brinton, L. A., Winfield, A. C., Worrell, J. A., Schuyler, P. A., & Plummer, W. D. (1993). Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia. *Cancer*, 71(4), 1258-1265. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8435803>
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G. (2005). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*, 365(9472), 1687-1717.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66544-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66544-0)
- Egeblad, M., & Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 2(3), 161-174.
<https://doi.org/10.1038/nrc745>
- Elston, C. W., & Ellis, I. O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19(5), 403-410.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1757079>
- Emami, N., Deperthes, D., Malm, J., & Diamandis, E. P. (2008). Major role of human KLK14 in seminal clot liquefaction. *J Biol Chem*, 283(28), 19561-19569.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M801194200>
- Emami, N., & Diamandis, E. P. (2008a). Human kallikrein-related peptidase 14 (KLK14) is a new activator component of the KLK proteolytic cascade. Possible function in seminal plasma and skin. *J Biol Chem*, 283(6), 3031-3041.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M707253200>

- Emami, N., & Diamandis, E. P. (2008b). Utility of kallikrein-related peptidases (KLKs) as cancer biomarkers. *Clin Chem*, *54*(10), 1600-1607.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.105189>
- Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, *127*(12), 2893-2917.
<https://doi.org/doi:10.1002/ijc.25516>
- Fertala, A., Han, W. B., & Ko, F. K. (2001). Mapping critical sites in collagen II for rational design of gene-engineered proteins for cell-supporting materials. *J Biomed Mater Res*, *57*(1), 48-58.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11416848>
- Filipits, M., Rudas, M., Jakesz, R., Dubsky, P., Fitzal, F., Singer, C. F., Dietze, O., Greil, R., Jelen, A., Sevela, P., Freibauer, C., Muller, V., Janicke, F., Schmidt, M., Kolbl, H., Rody, A., Kaufmann, M., Schroth, W., Brauch, H., . . . Investigators, E. P. (2011). A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. *Clin Cancer Res*, *17*(18), 6012-6020.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0926>
- Firth, S. M., & Baxter, R. C. (2002). Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev*, *23*(6), 824-854. <https://doi.org/10.1210/er.2001-0033>
- Foekens, J. A., Diamandis, E. P., Yu, H., Look, M. P., Meijer-van Gelder, M. E., van Putten, W. L., & Klijn, J. G. (1999). Expression of prostate-specific antigen (PSA) correlates with poor response to tamoxifen therapy in recurrent breast cancer. *Br J Cancer*, *79*(5-6), 888-894. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690142>
- Forstner, R., Sala, E., Kinkel, K., Spencer, J. A., & European Society of Urogenital, R. (2010). ESUR guidelines: ovarian cancer staging and follow-up. *Eur Radiol*, *20*(12), 2773-2780. <https://doi.org/10.1007/s00330-010-1886-4>
- Foulkes, W. D., Smith, I. E., & Reis-Filho, J. S. (2010). Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*, *363*(20), 1938-1948. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1001389>
- Fritzsche, F., Gansukh, T., Borgono, C. A., Burkhardt, M., Pahl, S., Mayordomo, E., Winzer, K. J., Weichert, W., Denkert, C., Jung, K., Stephan, C., Dietel, M., Diamandis, E. P., Dahl, E., & Kristiansen, G. (2006). Expression of human Kallikrein 14 (KLK14) in breast cancer is associated with higher tumour grades and positive nodal status. *Br J Cancer*, *94*(4), 540-547.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602956>
- Gadducci, A., Cosio, S., Tana, R., & Genazzani, A. R. (2009). Serum and tissue biomarkers as predictive and prognostic variables in epithelial ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, *69*(1), 12-27.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2008.05.001>
- Geenen, J. J. J., Linn, S. C., Beijnen, J. H., & Schellens, J. H. M. (2018). PARP Inhibitors in the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Pharmacokinet*, *57*(4), 427-437. <https://doi.org/10.1007/s40262-017-0587-4>
- Geng, X. (2019). *Clinical relevance of kallikrein-related peptidases in advanced high-grade serous ovarian (KLK11, KLK15) and in triple-negative breast cancer (KLK11)* [Technische Universität München].
- Geng, X., Liu, Y., Diersch, S., Kotsch, M., Grill, S., Weichert, W., Kiechle, M., Magdolen, V., & Dorn, J. (2017). Clinical relevance of kallikrein-related peptidase 9, 10, 11, and 15 mRNA expression in advanced high-grade serous ovarian cancer. *PLoS One*, *12*(11), e0186847.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186847>

- Geng, X., Liu, Y., Dreyer, T., Bronger, H., Drecoll, E., Magdolen, V., & Dorn, J. (2018). Elevated tumor tissue protein expression levels of kallikrein-related peptidases KLK10 and KLK11 are associated with a better prognosis in advanced high-grade serous ovarian cancer patients. *Am J Cancer Res*, 8(9), 1856-1864. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30323977>
- Gershenson, D. M. (2005). Fertility-sparing surgery for malignancies in women. *J Natl Cancer Inst Monogr*(34), 43-47. <https://doi.org/10.1093/jncimonographs/ligi011>
- Gluz, O., Liedtke, C., Gottschalk, N., Pusztai, L., Nitz, U., & Harbeck, N. (2009). Triple-negative breast cancer--current status and future directions. *Ann Oncol*, 20(12), 1913-1927. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp492>
- Goldhirsch, A., Wood, W. C., Coates, A. S., Gelber, R. D., Thurlimann, B., Senn, H. J., & Panel, m. (2011). Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*, 22(8), 1736-1747. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr304>
- Gong, W., Liu, Y., Preis, S., Geng, X., Petit-Courty, A., Kiechle, M., Muckenhuber, A., Dreyer, T., Dorn, J., Courty, Y., & Magdolen, V. (2020). Prognostic value of kallikrein-related peptidase 12 (KLK12) mRNA expression in triple-negative breast cancer patients. *Mol Med*, 26(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s10020-020-0145-7>
- Gratio, V., Lorient, C., Virca, G. D., Oikonomopoulou, K., Walker, F., Diamandis, E. P., Hollenberg, M. D., & Darmoul, D. (2011). Kallikrein-related peptidase 14 acts on proteinase-activated receptor 2 to induce signaling pathway in colon cancer cells. *Am J Pathol*, 179(5), 2625-2636. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.07.016>
- Gueugnon, F., Barascu, A., Mavridis, K., Petit-Courty, A., Marchand-Adam, S., Gissot, V., Scorilas, A., Guyetant, S., & Courty, Y. (2015). Kallikrein-related peptidase 13: an independent indicator of favorable prognosis for patients with nonsmall cell lung cancer. *Tumour Biol*, 36(7), 4979-4986. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3148-1>
- H.P. Helleman, C. W. (2011). Mammakarzinom-Prävention In T. M. a. d. M. F. d. L.-M.-U. u. T. Universität (Ed.), *Mammakarzinom- Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge* (Vol. 13, pp. 12-30). Zuckschwerdt
- Haga, Y., Yamada, M., Fujii, R., Saichi, N., Yokokawa, T., Hama, T., Hayakawa, Y., & Ueda, K. (2022). Fast and Ultrasensitive Glycoform Analysis by Supercritical Fluid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem*, 94(46), 15948-15955. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c01721>
- Hammond, M. E., Hayes, D. F., Wolff, A. C., Mangu, P. B., & Temin, S. (2010). American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Oncol Pract*, 6(4), 195-197. <https://doi.org/10.1200/JOP.777003>
- Harbeck, N., & Gluz, O. (2017). Neoadjuvant therapy for triple negative and HER2-positive early breast cancer. *Breast*, 34 Suppl 1, S99-S103. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2017.06.038>
- Harris, G. C., Denley, H. E., Pinder, S. E., Lee, A. H., Ellis, I. O., Elston, C. W., & Evans, A. (2003). Correlation of histologic prognostic factors in core biopsies and therapeutic excisions of invasive breast carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 27(1), 11-15. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12502923>
- Hashem, N. N., Mara, T. W., Mohamed, M., Zhang, I., Fung, K., Kwan, K. F., Daley, T. D., Diamandis, E. P., & Darling, M. R. (2010). Human kallikrein 14 (KLK14)

- expression in salivary gland tumors. *Int J Biol Markers*, 25(1), 32-37.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20155713>
- Hooper, J. D., Bui, L. T., Rae, F. K., Harvey, T. J., Myers, S. A., Ashworth, L. K., & Clements, J. A. (2001). Identification and characterization of KLK14, a novel kallikrein serine protease gene located on human chromosome 19q13.4 and expressed in prostate and skeletal muscle. *Genomics*, 73(1), 117-122.
<https://doi.org/10.1006/geno.2000.6490>
- Horowitz, N. S., Miller, A., Rungruang, B., Richard, S. D., Rodriguez, N., Bookman, M. A., Hamilton, C. A., Krivak, T. C., & Maxwell, G. L. (2015). Does Aggressive Surgery Improve Outcomes? Interaction Between Preoperative Disease Burden and Complex Surgery in Patients With Advanced-Stage Ovarian Cancer: An Analysis of GOG 182. *Journal of Clinical Oncology*, 33(8), 937-943. <https://doi.org/10.1200/jco.2014.56.3106>
- Hottinger, A. F., & Hormigo, A. (2011). Serum Biomarkers. In M. Schwab (Ed.), *Encyclopedia of Cancer* (pp. 3390-3394). Springer Berlin Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-16483-5_5269
- Ishige, S., Kasamatsu, A., Ogoshi, K., Saito, Y., Usukura, K., Yokoe, H., Kouzu, Y., Koike, H., Sakamoto, Y., Ogawara, K., Shiiba, M., Tanzawa, H., & Uzawa, K. (2014). Decreased expression of kallikrein-related peptidase 13: possible contribution to metastasis of human oral cancer. *Mol Carcinog*, 53(7), 557-565.
<https://doi.org/10.1002/mc.22007>
- Kapadia, C., Chang, A., Sotiropoulou, G., Yousef, G. M., Grass, L., Soosaipillai, A., Xing, X., Howarth, D. H., & Diamandis, E. P. (2003). Human kallikrein 13: production and purification of recombinant protein and monoclonal and polyclonal antibodies, and development of a sensitive and specific immunofluorometric assay. *Clin Chem*, 49(1), 77-86.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12507963>
- Kapadia, C., Ghosh, M. C., Grass, L., & Diamandis, E. P. (2004). Human kallikrein 13 involvement in extracellular matrix degradation. *Biochem Biophys Res Commun*, 323(3), 1084-1090. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.206>
- Kerbrat, P., Lhomme, C., Fervers, B., Guastalla, J. P., Thomas, L., Basuyau, J. P., Duvillard, P., Cohen-Solal, C., Dauplat, J., Tournemaine, N., Bachelot, T., Ray, I., Voog, E., Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le, C., & Societe Francaise d'Oncologie, G. (2001). [Standards, options and recommendations for the management and initial care of patients with malignant epithelial ovarian tumors (abridged version)]. *Gynecol Obstet Fertil*, 29(11), 853-866.
[https://doi.org/10.1016/s1297-9589\(01\)00249-1](https://doi.org/10.1016/s1297-9589(01)00249-1) (Standards, options et recommandations pour la prise en charge initiale des patientes atteintes de tumeurs epitheliales malignes de l'ovaire (version abregee).)
- Kishi, T., Grass, L., Soosaipillai, A., Scorilas, A., Harbeck, N., Schmalfeldt, B., Dorn, J., Mysliwiec, M., Schmitt, M., & Diamandis, E. P. (2003). Human kallikrein 8, a novel biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res*, 63(11), 2771-2774.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12782581>
- Kommos F. (2009). Aufarbeitung des Operationspräparats und Stadieneinteilung mit FIGO- und TNM-Klassifikation. In *Management des Ovarialkarzinoms - Interdisziplinäres Vorgehen* Springer Medizin Verlag.
- Konstantoudakis, G., Florou, D., Mavridis, K., Papadopoulos, I. N., & Scorilas, A. (2010). Kallikrein-related peptidase 13 (KLK13) gene expressional status contributes significantly in the prognosis of primary gastric carcinomas. *Clin Biochem*, 43(15), 1205-1211. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.07.016>

- Kontos, C. K., Adamopoulos, P. G., Papageorgiou, S. G., Pappa, V., & Scorilas, A. (2016). mRNA overexpression of kallikrein-related peptidase 14 (KLK14) is an independent predictor of poor overall survival in chronic lymphocytic leukemia patients. *Clin Chem Lab Med*, *54*(2), 315-324. <https://doi.org/10.1515/cclm-2015-0456>
- Kountourakis, P., Psyrris, A., Scorilas, A., Camp, R., Markakis, S., Kowalski, D., Diamandis, E. P., & Dimopoulos, M. A. (2008). Prognostic value of kallikrein-related peptidase 6 protein expression levels in advanced ovarian cancer evaluated by automated quantitative analysis (AQUA). *Cancer Sci*, *99*(11), 2224-2229. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00942.x>
- Kountourakis, P., Psyrris, A., Scorilas, A., Markakis, S., Kowalski, D., Camp, R. L., Diamandis, E. P., & Dimopoulos, M. A. (2009). Expression and prognostic significance of kallikrein-related peptidase 8 protein levels in advanced ovarian cancer by using automated quantitative analysis. *Thromb Haemost*, *101*(3), 541-546. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19277417>
- Kryza, T., Silva, M. L., Loessner, D., Heuze-Vourc'h, N., & Clements, J. A. (2016). The kallikrein-related peptidase family: Dysregulation and functions during cancer progression. *Biochimie*, *122*, 283-299. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.09.002>
- Kyriakopoulou, L. G., Yousef, G. M., Scorilas, A., Katsaros, D., Massobrio, M., Fracchioli, S., & Diamandis, E. P. (2003). Prognostic value of quantitatively assessed KLK7 expression in ovarian cancer. *Clin Biochem*, *36*(2), 135-143. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12633763>
- Lakhani, S. R., et al., . (2012). *WHO Classification of Tumours of the Breast* (Vol. 4). IARC Press.
- Liedtke, C. (2017). Fortgeschrittenes Triple-negatives Mammakarzinom: Immuntherapien in Pr, fung. *Dtsch Arztebl International*, *114*(24), -14-. <https://doi.org/10.3238/PersOnko/2017.06.16.03>
- Liedtke, C., Thill, M., & Committee, A. G. O. B. (2016). AGO Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Patients with Early Breast Cancer: Update 2016. *Breast Care (Basel)*, *11*(3), 204-214. <https://doi.org/10.1159/000446941>
- Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W., & Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*, *4*(6), 357-362. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7580930>
- Loessner, D., Quent, V. M., Kraemer, J., Weber, E. C., Hutmacher, D. W., Magdolen, V., & Clements, J. A. (2012). Combined expression of KLK4, KLK5, KLK6, and KLK7 by ovarian cancer cells leads to decreased adhesion and paclitaxel-induced chemoresistance. *Gynecol Oncol*, *127*(3), 569-578. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.09.001>
- London, S. J., Connolly, J. L., Schnitt, S. J., & Colditz, G. A. (1992). A prospective study of benign breast disease and the risk of breast cancer. *JAMA*, *267*(7), 941-944. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1734106>
- Lord, C. J., Tutt, A. N., & Ashworth, A. (2015). Synthetic lethality and cancer therapy: lessons learned from the development of PARP inhibitors. *Annu Rev Med*, *66*, 455-470. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050913-022545>
- Lose, F., Lawrence, M. G., Srinivasan, S., O'Mara, T., Marquart, L., Chambers, S., Gardiner, R. A., Aitken, J. F., Spurdle, A. B., Batra, J., Clements, J. A., & Australian Prostate Cancer, B. (2012). The kallikrein 14 gene is down-regulated by androgen receptor signalling and harbours genetic variation that is associated

- with prostate tumour aggressiveness. *Biol Chem*, 393(5), 403-412.
<https://doi.org/10.1515/hsz-2011-0268>
- Lovgren, J., Rajakoski, K., Karp, M., Lundwall, a., & Lilja, H. (1997). Activation of the zymogen form of prostate-specific antigen by human glandular kallikrein 2. *Biochem Biophys Res Commun*, 238(2), 549-555.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7333>
- Luo, L. Y., Diamandis, E. P., Look, M. P., Soosaipillai, A. P., & Foekens, J. A. (2002). Higher expression of human kallikrein 10 in breast cancer tissue predicts tamoxifen resistance. *Br J Cancer*, 86(11), 1790-1796.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600323>
- Luo, L. Y., Katsaros, D., Scorilas, A., Fracchioli, S., Bellino, R., van Gramberen, M., de Bruijn, H., Henrik, A., Stenman, U. H., Massobrio, M., van der Zee, A. G., Vergote, I., & Diamandis, E. P. (2003). The serum concentration of human kallikrein 10 represents a novel biomarker for ovarian cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Res*, 63(4), 807-811.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12591730>
- Luo, L. Y., Yousef, G., & Diamandis, E. P. (2003). Human tissue kallikreins and testicular cancer. *APMIS*, 111(1), 225-232; discussion 232-223.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12752266>
- Lyman, G. H., Somerfield, M. R., & Giuliano, A. E. (2017). Sentinel Lymph Node Biopsy for Patients With Early-Stage Breast Cancer: 2016 American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update Summary. *J Oncol Pract*, 13(3), 196-198. <https://doi.org/10.1200/JOP.2016.019992>
- Mahner, S., Schwarz, J., & Jänicke, F. (2009). Prognosefaktoren. In *Management des Ovariakarzinoms*. Springer Medizin Verlag.
- Malpica, A., Deavers, M. T., Lu, K., Bodurka, D. C., Atkinson, E. N., Gershenson, D. M., & Silva, E. G. (2004). Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. *Am J Surg Pathol*, 28(4), 496-504.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15087669>
- Mange, A., Desmetz, C., Berthes, M. L., Maudelonde, T., & Solassol, J. (2008). Specific increase of human kallikrein 4 mRNA and protein levels in breast cancer stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 375(1), 107-112.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.138>
- Martin, M., Brase, J. C., Calvo, L., Krappmann, K., Ruiz-Borrego, M., Fisch, K., Ruiz, A., Weber, K. E., Munarriz, B., Petry, C., Rodriguez, C. A., Kronenwett, R., Crespo, C., Alba, E., Carrasco, E., Casas, M., Caballero, R., & Rodriguez-Lescure, A. (2014). Clinical validation of the EndoPredict test in node-positive, chemotherapy-treated ER+/HER2- breast cancer patients: results from the GEICAM 9906 trial. *Breast Cancer Res*, 16(2), R38.
<https://doi.org/10.1186/bcr3642>
- Mayr D., D. P., Högel B., Nähring J., Sotlar K.,. (2011). Pathologie der Mammakarzinome und der intraepithelialen Proliferation der Mamma. In T. München (Ed.), *Mammakarzinom-Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge* (Vol. 13, pp. 56-83). Zuckschwerdt
- McIntosh, M. W., Liu, Y., Drescher, C., Urban, N., & Diamandis, E. P. (2007). Validation and characterization of human kallikrein 11 as a serum marker for diagnosis of ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*, 13(15 Pt 1), 4422-4428.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2224>
- Meindl, A., Ditsch, N., Kast, K., Rhiem, K., & Schmutzler, R. K. (2011). Hereditary breast and ovarian cancer: new genes, new treatments, new concepts. *Dtsch Arztebl Int*, 108(19), 323-330. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2011.0323>

- Menon, U., & Jacobs, I. J. (2000). Recent developments in ovarian cancer screening. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 12(1), 39-42. <https://doi.org/10.1097/00001703-200002000-00007>
- Michael, I. P., Pampalakis, G., Mikolajczyk, S. D., Malm, J., Sotiropoulou, G., & Diamandis, E. P. (2006). Human tissue kallikrein 5 is a member of a proteolytic cascade pathway involved in seminal clot liquefaction and potentially in prostate cancer progression. *J Biol Chem*, 281(18), 12743-12750. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600326200>
- Mo, W., Liu, Q., Lin, C. C., Dai, H., Peng, Y., Liang, Y., Peng, G., Meric-Bernstam, F., Mills, G. B., Li, K., & Lin, S. Y. (2016). mTOR Inhibitors Suppress Homologous Recombination Repair and Synergize with PARP Inhibitors via Regulating SUV39H1 in BRCA-Proficient Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res*, 22(7), 1699-1712. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1772>
- Moja, L., Tagliabue, L., Balduzzi, S., Parmelli, E., Pistotti, V., Guarneri, V., & D'Amico, R. (2012). Trastuzumab containing regimens for early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev*(4), CD006243. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006243.pub2>
- Moore, R. G., MacLaughlan, S., & Bast, R. C., Jr. (2010). Current state of biomarker development for clinical application in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 116(2), 240-245. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.09.041>
- Moore, R. G., Miller, M. C., Steinhoff, M. M., Skates, S. J., Lu, K. H., Lambert-Messerlian, G., & Bast, R. C., Jr. (2012). Serum HE4 levels are less frequently elevated than CA125 in women with benign gynecologic disorders. *Am J Obstet Gynecol*, 206(4), 351 e351-358. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2011.12.029>
- Nam, E. J., Yun, M. J., Oh, Y. T., Kim, J. W., Kim, J. H., Kim, S., Jung, Y. W., Kim, S. W., & Kim, Y. T. (2010). Diagnosis and staging of primary ovarian cancer: correlation between PET/CT, Doppler US, and CT or MRI. *Gynecol Oncol*, 116(3), 389-394. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.10.059>
- O'Sullivan, B., Brierley, J., Byrd, D., Bosman, F., Kehoe, S., Kossary, C., Pineros, M., Van Eycken, E., Weir, H. K., & Gospodarowicz, M. (2017). The TNM classification of malignant tumours-towards common understanding and reasonable expectations. *Lancet Oncol*, 18(7), 849-851. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30438-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30438-2)
- Obiezu, C. V., & Diamandis, E. P. (2005). Human tissue kallikrein gene family: applications in cancer. *Cancer Lett*, 224(1), 1-22. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.09.024>
- ole-MoiYoi, O. K., Pinkus, G. S., Spragg, J., & Austen, K. F. (1979). Identification of human glandular kallikrein in the beta cell of the pancreas. *N Engl J Med*, 300(23), 1289-1294. <https://doi.org/10.1056/NEJM197906073002301>
- Olsen, C. M., Cnossen, J., Green, A. C., & Webb, P. M. (2007). Comparison of symptoms and presentation of women with benign, low malignant potential and invasive ovarian tumors. *Eur J Gynaecol Oncol*, 28(5), 376-380. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17966216>
- Olsen, C. M., Green, A. C., Whiteman, D. C., Sadeghi, S., Kolahdooz, F., & Webb, P. M. (2007). Obesity and the risk of epithelial ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*, 43(4), 690-709. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2006.11.010>
- Orlichenko, L. S., & Radisky, D. C. (2008). Matrix metalloproteinases stimulate epithelial-mesenchymal transition during tumor development. *Clin Exp Metastasis*, 25(6), 593-600. <https://doi.org/10.1007/s10585-008-9143-9>

- Paliouras, M., & Diamandis, E. P. (2007). Coordinated steroid hormone-dependent and independent expression of multiple kallikreins in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*, 102(1), 7-18. <https://doi.org/10.1007/s10549-006-9312-y>
- Paliouras, M., & Diamandis, E. P. (2008). Intracellular signaling pathways regulate hormone-dependent kallikrein gene expression. *Tumour Biol*, 29(2), 63-75. <https://doi.org/10.1159/000135686>
- Pampalakis, G., Prosnikli, E., Agalioiti, T., Vlahou, A., Zoumpourlis, V., & Sotiropoulou, G. (2009). A tumor-protective role for human kallikrein-related peptidase 6 in breast cancer mediated by inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Res*, 69(9), 3779-3787. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1976>
- Pampalakis, G., & Sotiropoulou, G. (2007). Tissue kallikrein proteolytic cascade pathways in normal physiology and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1776(1), 22-31. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2007.06.001>
- Papachristopoulou, G., Avgeris, M., Charlaftis, A., & Scorilas, A. (2011). Quantitative expression analysis and study of the novel human kallikrein-related peptidase 14 gene (KLK14) in malignant and benign breast tissues. *Thromb Haemost*, 105(1), 131-137. <https://doi.org/10.1160/TH10-02-0092>
- Pecorelli, S. (2003). 25th annual report on the results of treatment in gynecologic cancer. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 300.
- Perren, T. J., Swart, A. M., Pfisterer, J., Ledermann, J. A., Pujade-Lauraine, E., Kristensen, G., Carey, M. S., Beale, P., Cervantes, A., Kurzeder, C., du Bois, A., Shouli, J., Kimmig, R., Stahle, A., Collinson, F., Essapen, S., Gourley, C., Lortholary, A., Selle, F., . . . Investigators, I. (2011). A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N Engl J Med*, 365(26), 2484-2496. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103799>
- Petraki, C. D., Karavana, V. N., & Diamandis, E. P. (2003). Human kallikrein 13 expression in normal tissues: an immunohistochemical study. *J Histochem Cytochem*, 51(4), 493-501. <https://doi.org/10.1177/002215540305100411>
- Petraki, C. D., Papanastasiou, P. A., Karavana, V. N., & Diamandis, E. P. (2006). Cellular distribution of human tissue kallikreins: immunohistochemical localization. *Biol Chem*, 387(6), 653-663. <https://doi.org/10.1515/BC.2006.084>
- Petrelli, F., & Barni, S. (2012). Meta-analysis of concomitant compared to sequential adjuvant trastuzumab in breast cancer: the sooner the better. *Med Oncol*, 29(2), 503-510. <https://doi.org/10.1007/s12032-011-9897-9>
- Planque, C., Blechet, C., Ayadi-Kaddour, A., Heuze-Voure'h, N., Dumont, P., Guyetant, S., Diamandis, E. P., El Mezni, F., & Courty, Y. (2008). Quantitative RT-PCR analysis and immunohistochemical localization of the kallikrein-related peptidases 13 and 14 in lung. *Biol Chem*, 389(6), 781-786. <https://doi.org/10.1515/BC.2008.089>
- Planque, C., Li, L., Zheng, Y., Soosaipillai, A., Reckamp, K., Chia, D., Diamandis, E. P., & Goodglick, L. (2008). A multiparametric serum kallikrein panel for diagnosis of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*, 14(5), 1355-1362. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4117>
- 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(3), 183-202. <https://doi.org/10.1038/nrd4534>
- Prat, J. (2009). *Ovarian serous and mucinous epithelial-stromal tumors*.
- Prat, J. (2012). Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch*, 460(3), 237-249. <https://doi.org/10.1007/s00428-012-1203-5>

- Prat, J., & Oncology, F. C. o. G. (2014). Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynaecol Obstet*, *124*(1), 1-5.
<https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2013.10.001>
- Qiagen. (2003). The Qiaexpressionist
A handbook for
high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. In.
- Rajapakse, S., & Takahashi, T. (2007). Expression and enzymatic characterization of recombinant human kallikrein 14. *Zoolog Sci*, *24*(8), 774-780.
<https://doi.org/10.2108/zsj.24.774>
- Reid, J. C., Matsika, A., Davies, C. M., He, Y., Broomfield, A., Bennett, N. C., Magdolen, V., Srinivasan, B., Clements, J. A., & Hooper, J. D. (2017). Pericellular regulation of prostate cancer expressed kallikrein-related peptidases and matrix metalloproteinases by cell surface serine proteases. *Am J Cancer Res*, *7*(11), 2257-2274. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29218249>
- Richtlinie des Gemeinsamen Bundesausschusses über die Früherkennung von Krebserkrankungen (Krebsfrüherkennungs-Richtlinie / KFE-RL).*
Bundesanzeiger AT.
- Risch, H. A. (1998). Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. *J Natl Cancer Inst*, *90*(23), 1774-1786. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9839517>
- Robert Koch Institut. (2017a). Krebs in Deutschland für 2013/2014.
- Robert Koch Institut. (2017b). *Krebs in Deutschland- Eierstockkrebs (Ovarialkarzinom)*. Retrieved Oktober 01,2018 from
<https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Ovarialkrebs/ovarialkrebs.html>
- Romieu, I., Berlin, J. A., & Colditz, G. (1990). Oral contraceptives and breast cancer. Review and meta-analysis. *Cancer*, *66*(11), 2253-2263.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2147122>
- Ross, D. S., & Pareja, F. (2021). Molecular Pathology of Breast Tumors: Diagnostic and Actionable Genetic Alterations. *Surg Pathol Clin*, *14*(3), 455-471.
<https://doi.org/10.1016/j.path.2021.05.009>
- Rottenberg, S., Jaspers, J. E., Kersbergen, A., van der Burg, E., Nygren, A. O., Zander, S. A., Derksen, P. W., de Bruin, M., Zevenhoven, J., Lau, A., Boulter, R., Cranston, A., O'Connor, M. J., Martin, N. M., Borst, P., & Jonkers, J. (2008). High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(44), 17079-17084. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806092105>
- S3-Leitlinie. (2016). *S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren*. In: Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V.
- Sarojini, S., Tamir, A., Lim, H., Li, S., Zhang, S., Goy, A., Pecora, A., & Suh, K. S. (2012). Early detection biomarkers for ovarian cancer. *J Oncol*, *2012*, 709049.
<https://doi.org/10.1155/2012/709049>
- Schaller G., H. S., Jückstock J., Paepke St., Rack B., Schindlbeck Ch., Stötzer O.J., (2011). Prognostische und prädiktive Faktoren beim primären Mammakarzinom In T. München (Ed.), *Mammakarzinome - Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge* (Vol. 13, pp. 92-99). Zuckschwerdt.
- Schmalfeldt, B., Beer, D., Burges, A., Anthuber, C., Schelling, M., & (2014). Früherkennung und Diagnostik. In *Maligne Ovarialtumoren - Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge* Tumorzentrum München, Zuckschwerdt Verlag München.

-
- Schmitt, M., & Magdolen, V. (2009). Using kallikrein-related peptidases (KLK) as novel cancer biomarkers. *Thromb Haemost*, *101*(2), 222-224. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19190801>
- 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*(4), 319-329. <https://doi.org/10.2478/raon-2013-0053>
- Schnitt, S. J., Moran, M. S., Houssami, N., & Morrow, M. (2015). The Society of Surgical Oncology-American Society for Radiation Oncology Consensus Guideline on Margins for Breast-Conserving Surgery With Whole-Breast Irradiation in Stages I and II Invasive Breast Cancer: Perspectives for Pathologists. *Arch Pathol Lab Med*, *139*(5), 575-577. <https://doi.org/10.5858/arpa.2014-0384-ED>
- Scorilas, A., Borgono, C. A., Harbeck, N., Dorn, J., Schmalfeldt, B., Schmitt, M., & Diamandis, E. P. (2004). Human kallikrein 13 protein in ovarian cancer cytosols: a new favorable prognostic marker. *J Clin Oncol*, *22*(4), 678-685. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.05.144>
- Scorilas, A., & Mavridis, K. (2014). Predictions for the future of kallikrein-related peptidases in molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*, *14*(6), 713-722. <https://doi.org/10.1586/14737159.2014.928207>
- Seck, K., Pfab, S., Schmalzried, H., Kiechle, M., & Schmalfeldt, B. (2012). Welche Faktoren bestimmen die Prognose des Ovarialkarzinoms? Eine Analyse anhand eigener Daten von Primärfällen aus den Jahren 1997–2002. In *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* (Vol. 72). Thieme Verlag
- Seiz, L., Dorn, J., Kotzsch, M., Walch, A., Grebenchtchikov, N. I., Gkazepis, A., Schmalfeldt, B., Kiechle, M., Bayani, J., Diamandis, E. P., Langer, R., Sweep, F. C., Schmitt, M., & Magdolen, V. (2012). Stromal cell-associated expression of kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) indicates poor prognosis of ovarian cancer patients. *Biol Chem*, *393*(5), 391-401. <https://doi.org/10.1515/hsz-2011-0264>
- Shaw, J. L., & Diamandis, E. P. (2007). Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. *Clin Chem*, *53*(8), 1423-1432. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.088104>
- Sher, Y. P., Chou, C. C., Chou, R. H., Wu, H. M., Wayne Chang, W. S., Chen, C. H., Yang, P. C., Wu, C. W., Yu, C. L., & Peck, K. (2006). Human kallikrein 8 protease confers a favorable clinical outcome in non-small cell lung cancer by suppressing tumor cell invasiveness. *Cancer Res*, *66*(24), 11763-11770. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3165>
- Shigemasa, K., Gu, L., Tanimoto, H., O'Brien, T. J., & Ohama, K. (2004). Human kallikrein gene 11 (KLK11) mRNA overexpression is associated with poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, *10*(8), 2766-2770. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15102682>
- Shigemasa, K., Tian, X., Gu, L., Tanimoto, H., Underwood, L. J., O'Brien, T. J., & Ohama, K. (2004). Human kallikrein 8 (hK8/TADG-14) expression is associated with an early clinical stage and favorable prognosis in ovarian cancer. *Oncol Rep*, *11*(6), 1153-1159. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15138549>
- Silverberg, S. G. (2000). Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. *Int J Gynecol Pathol*, *19*(1), 7-15. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10638449>

- Smith, C. J., & Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*, 67(1), 6-20. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x>
- Sotiropoulou, G., Pampalakis, G., & Diamandis, E. P. (2009). Functional roles of human kallikrein-related peptidases. *J Biol Chem*, 284(48), 32989-32994. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.027946>
- Sotiropoulou, G., Rogakos, V., Tsetsenis, T., Pampalakis, G., Zafiropoulos, N., Simillides, G., Yiotakis, A., & Diamandis, E. P. (2003). Emerging interest in the kallikrein gene family for understanding and diagnosing cancer. *Oncol Res*, 13(6-10), 381-391. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12725528>
- Sturgeon, C. (2002). Practice guidelines for tumor marker use in the clinic. *Clin Chem*, 48(8), 1151-1159. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12142367>
- Taylor, P. D., Kodeboyina, S. K., Bai, S., Patel, N., Sharma, S., Ratnani, A., Copland, J. A., She, J. X., & Sharma, A. (2018). Diagnostic and prognostic biomarker potential of kallikrein family genes in different cancer types. *Oncotarget*, 9(25), 17876-17888. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24947>
- Talieri, M., Devetzi, M., Scorilas, A., Pappa, E., Tsapralis, N., Missitzis, I., & Ardavanis, A. (2012). Human kallikrein-related peptidase 12 (KLK12) splice variants expression in breast cancer and their clinical impact. *Tumour Biol*, 33(4), 1075-1084. <https://doi.org/10.1007/s13277-012-0347-x>
- Talieri, M., Diamandis, E. P., Gourgiotis, D., Mathioudaki, K., & Scorilas, A. (2004). Expression analysis of the human kallikrein 7 (KLK7) in breast tumors: a new potential biomarker for prognosis of breast carcinoma. *Thromb Haemost*, 91(1), 180-186. <https://doi.org/10.1160/TH03-05-0261>
- Talieri, M., Li, L., Zheng, Y., Alexopoulou, D. K., Soosaipillai, A., Scorilas, A., Xynopoulos, D., & Diamandis, E. P. (2009). The use of kallikrein-related peptidases as adjuvant prognostic markers in colorectal cancer. *Br J Cancer*, 100(10), 1659-1665. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605033>
- Tavassoli FA, & P, D. (2003). *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of the Breast and Female Genital Organs* (Vol. 6) [journal article]. <https://doi.org/10.1186/bcr788>
- Thigpen, T., Brady, M. F., Omura, G. A., Creasman, W. T., McGuire, W. P., Hoskins, W. J., & Williams, S. (1993). Age as a prognostic factor in ovarian carcinoma. The Gynecologic Oncology Group experience. *Cancer*, 71(2 Suppl), 606-614. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8420683>
- Thill, M., Liedtke, C., Muller, V., Janni, W., Schmidt, M., & Committee, A. G. O. B. (2018). AGO Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Patients with Advanced and Metastatic Breast Cancer: Update 2018. *Breast Care (Basel)*, 13(3), 209-215. <https://doi.org/10.1159/000489331>
- Tingulstad, S., Skjeldestad, F. E., Halvorsen, T. B., & Hagen, B. (2003). Survival and prognostic factors in patients with ovarian cancer. *Obstet Gynecol*, 101(5 Pt 1), 885-891. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12738145>
- Trimbos, B., Timmers, P., Pecorelli, S., Coens, C., Ven, K., van der Burg, M., & Casado, A. (2010). Surgical Staging and Treatment of Early Ovarian Cancer: Long-term Analysis From a Randomized Trial. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 102(13), 982-987. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq149>
- Uhlen, M., Zhang, C., Lee, S., Sjostedt, E., Fagerberg, L., Bidkhori, G., Benfeitas, R., Arif, M., Liu, Z., Edfors, F., Sanli, K., von Feilitzen, K., Oksvold, P., Lundberg, E., Hober, S., Nilsson, P., Mattsson, J., Schwenk, J. M., Brunnstrom, H., . . . Ponten, F. (2017). A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science*, 357(6352). <https://doi.org/10.1126/science.aan2507>

- van Nagell, J. R., Jr., & Pavlik, E. J. (2012). Ovarian cancer screening. *Clin Obstet Gynecol*, 55(1), 43-51. <https://doi.org/10.1097/GRF.0b013e3182460c0d>
- Wagner, S. (2009). *Die Kallikrein-verwandten Peptidasen als Bestandteil proteolytischer Kaskaden: Klonierung, Expression und Rückfaltung von Pro-KLK 3-15*. Universitätsbibliothek der TU München. <https://books.google.de/books?id=yAmznQAACAAJ>
- White, N. M., Mathews, M., Yousef, G. M., Prizada, A., Fontaine, D., Ghatage, P., Popadiuk, C., Dawson, L., & Dore, J. J. (2009). Human kallikrein related peptidases 6 and 13 in combination with CA125 is a more sensitive test for ovarian cancer than CA125 alone. *Cancer Biomark*, 5(6), 279-287. <https://doi.org/10.3233/CBM-2009-0113>
- White, N. M., Mathews, M., Yousef, G. M., Prizada, A., Popadiuk, C., & Dore, J. J. (2009). KLK6 and KLK13 predict tumor recurrence in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer*, 101(7), 1107-1113. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605280>
- Wittekind, C., Meyer, H., & Bootz, F. (2002). *UICC TNM Klassifikation maligner Tumoren* (Vol. 6). Springer Medizin Verlag.
- Wolf C., A. C., Ataseven B., Braun M., Eiermann W., Haman M., Hanusch C.A., Michl G., Petrides P., Phiusch R., Rack B., Salat C., Sattler D., . (2011). Adjuvante Systemtherapie In T. München (Ed.), *Mammakarzinom-Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge* (Vol. 13). Zuckerschwerdt.
- Wolff, A. C., Hammond, M. E., Hicks, D. G., Dowsett, M., McShane, L. M., Allison, K. H., Allred, D. C., Bartlett, J. M., Bilous, M., Fitzgibbons, P., Hanna, W., Jenkins, R. B., Mangu, P. B., Paik, S., Perez, E. A., Press, M. F., Spears, P. A., Vance, G. H., Viale, G., . . . College of American, P. (2013). Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*, 31(31), 3997-4013. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.50.9984>
- Wu, J., & Hicks, C. (2021). Breast Cancer Type Classification Using Machine Learning. *J Pers Med*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/jpm11020061>
- Yang, F., Aubele, M., Walch, A., Gross, E., Napieralski, R., Zhao, S., Ahmed, N., Kiechle, M., Reuning, U., Dorn, J., Sweep, F., Magdolen, V., & Schmitt, M. (2017). Tissue kallikrein-related peptidase 4 (KLK4), a novel biomarker in triple-negative breast cancer. *Biol Chem*, 398(10), 1151-1164. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0122>
- Yang, F., Li, J. Y., Yin, Q. N., Yang, K., Dong, S. N., Bai, L. J., Liu, P., & Tong, X. W. (2015). Human kallikrein 5 as a novel prognostic biomarker for triple-negative breast cancer: tissue expression analysis and relationship with disease course. *Genet Mol Res*, 14(3), 9655-9666. <https://doi.org/10.4238/2015.August.14.28>
- Yoon, H., Blaber, S. I., Debela, M., Goettig, P., Scarisbrick, I. A., & Blaber, M. (2009). A completed KLK activome profile: investigation of activation profiles of KLK9, 10, and 15. *Biol Chem*, 390(4), 373-377. <https://doi.org/10.1515/BC.2009.026>
- Yoon, H., Blaber, S. I., Evans, D. M., Trim, J., Juliano, M. A., Scarisbrick, I. A., & Blaber, M. (2008). Activation profiles of human kallikrein-related peptidasen by proteases of the thrombostasis axis. *Protein Sci*, 17(11), 1998-2007. <https://doi.org/10.1110/ps.036715.108>
- Yousef, G. M., Borgono, C. A., Scorilas, A., Ponzzone, R., Biglia, N., Iskander, L., Polymeris, M. E., Roagna, R., Sismondi, P., & Diamandis, E. P. (2002). Quantitative analysis of human kallikrein gene 14 expression in breast tumours

- indicates association with poor prognosis. *Br J Cancer*, 87(11), 1287-1293.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600623>
- Yousef, G. M., Chang, A., & Diamandis, E. P. (2000). Identification and characterization of KLK-L4, a new kallikrein-like gene that appears to be down-regulated in breast cancer tissues. *J Biol Chem*, 275(16), 11891-11898.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766816>
- Yousef, G. M., Chang, A., Scorilas, A., & Diamandis, E. P. (2000). Genomic organization of the human kallikrein gene family on chromosome 19q13.3-q13.4. *Biochem Biophys Res Commun*, 276(1), 125-133.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3448>
- Yousef, G. M., Fracchioli, S., Scorilas, A., Borgono, C. A., Iskander, L., Puopolo, M., Massobrio, M., Diamandis, E. P., & Katsaros, D. (2003). Steroid hormone regulation and prognostic value of the human kallikrein gene 14 in ovarian cancer. *Am J Clin Pathol*, 119(3), 346-355.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12645335>
- Yousef, G. M., Kyriakopoulou, L. G., Scorilas, A., Fracchioli, S., Ghiringhello, B., Zarghooni, M., Chang, A., Diamandis, M., Giardina, G., Hartwick, W. J., Richiardi, G., Massobrio, M., Diamandis, E. P., & Katsaros, D. (2001). Quantitative expression of the human kallikrein gene 9 (KLK9) in ovarian cancer: a new independent and favorable prognostic marker. *Cancer Res*, 61(21), 7811-7818. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11691797>
- Yousef, G. M., Magklara, A., Chang, A., Jung, K., Katsaros, D., & Diamandis, E. P. (2001). Cloning of a new member of the human kallikrein gene family, KLK14, which is down-regulated in different malignancies. *Cancer Res*, 61(8), 3425-3431. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11309303>
- Yousef, G. M., Scorilas, A., Katsaros, D., Fracchioli, S., Iskander, L., Borgono, C., Rigault de la Longrais, I. A., Puopolo, M., Massobrio, M., & Diamandis, E. P. (2003). Prognostic value of the human kallikrein gene 15 expression in ovarian cancer. *J Clin Oncol*, 21(16), 3119-3126.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2003.09.111>
- Yousef, G. M., Scorilas, A., Kyriakopoulou, L. G., Rendl, L., Diamandis, M., Ponzzone, R., Biglia, N., Giai, M., Roagna, R., Sismondi, P., & Diamandis, E. P. (2002). Human kallikrein gene 5 (KLK5) expression by quantitative PCR: an independent indicator of poor prognosis in breast cancer. *Clin Chem*, 48(8), 1241-1250. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12142380>
- Yousef, G. M., Scorilas, A., Magklara, A., Memari, N., Ponzzone, R., Sismondi, P., Biglia, N., Abd Ellatif, M., & Diamandis, E. P. (2002). The androgen-regulated gene human kallikrein 15 (KLK15) is an independent and favourable prognostic marker for breast cancer. *Br J Cancer*, 87(11), 1294-1300.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600590>
- Yousef, G. M., Scorilas, A., Nakamura, T., Ellatif, M. A., Ponzzone, R., Biglia, N., Maggiorotto, F., Roagna, R., Sismondi, P., & Diamandis, E. P. (2003). The prognostic value of the human kallikrein gene 9 (KLK9) in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 78(2), 149-158.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12725415>
- Yousef, G. M., Stephan, C., Scorilas, A., Ellatif, M. A., Jung, K., Kristiansen, G., Jung, M., Polymeris, M. E., & Diamandis, E. P. (2003). Differential expression of the human kallikrein gene 14 (KLK14) in normal and cancerous prostatic tissues. *Prostate*, 56(4), 287-292. <https://doi.org/10.1002/pros.10263>

-
- Yousef, G. M., Yacoub, G. M., Polymeris, M. E., Popalis, C., Soosaipillai, A., & Diamandis, E. P. (2004). Kallikrein gene downregulation in breast cancer. *Br J Cancer*, *90*(1), 167-172. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601451>
- Zhang, R., Shi, H., Chen, Z., Feng, W., Zhang, H., & Wu, K. (2012). Effects of kallikrein-related peptidase 14 gene inhibition by small interfering RNA in ovarian carcinoma cells. *Mol Med Rep*, *5*(1), 256-259. <https://doi.org/10.3892/mmr.2011.625>
- Zheng, Y., Katsaros, D., Shan, S. J., de la Longrais, I. R., Porpiglia, M., Scorilas, A., Kim, N. W., Wolfert, R. L., Simon, I., Li, L., Feng, Z., & Diamandis, E. P. (2007). A multiparametric panel for ovarian cancer diagnosis, prognosis, and response to chemotherapy. *Clin Cancer Res*, *13*(23), 6984-6992. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1409>

VIII. Anhang

Prozedur: Forschung IHC DAB Map XT (Zusammenfassung)

Discovery XT Färbemodul

GSF, Inst. f. Pathologie, Ingolstaedter Landstrasse 1 85780 Neuherberg

Protokoll-Nr.	Protokollname	erstellt am
999	12h CC1 Xtrem	02.06.2016

- 1 Patienten-Material [Ausgewählt]
- 2 Paraffin [Ausgewählt]
- 3 Entparaffinierung [Ausgewählt]
- 4 Hitzevorbehandlung [Ausgewählt]
- 5 Cell Conditioner 1 [Ausgewählt]
- 6 Miles CC1 [Ausgewählt]
- 7 Standard CC1 [Ausgewählt]
- 8 Erweitertes CC1 [Ausgewählt]
- 9 Antikörper [Ausgewählt]
- 10 Antikörper-Titration [Ausgewählt]
- 11 Erweiterte Ak-Inkubation (Titration) [Ausgewählt]
- 12 Inkubieren für [12 Stunden] (Primär Antikörper)
- 13 Sekundärantikörper [Ausgewählt]
- 14 automatischer Auftrag Sekundärantikörper [Ausgewählt]
- 15 1 Tropfen [DETECTION 6] (Nachweis Nr.2), und für [32 Minuten] inkubieren.
- 16 Gegenfärbung [Ausgewählt]
- 17 Standard [Ausgewählt]
- 18 1 Tropfen von [HEMATOXYLIN] (Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für [4 Minuten] inkubieren.
- 19 Nach-Gegenfärbung [Ausgewählt]
- 20 1 Tropfen von [BLUING REAGENT] (Nach-Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für [4 Minuten] inkubieren.
- 21 Objektträger Reinigung [Ausgewählt]

Protokoll-Nr. 999 : 12h CC1 Xtrem (02.05.2016)

Prozedur: Forschung IHC DAB Map XT

Discovery XT Färbemodul

GSF, Inst. f. Pathologie, Ingolstädter Landstrasse 1 85760 Neuherberg

Schritt-Nr	Protokollschritt
1	***** Getrimete Schritte Starten *****
2	***** EZ Prep Auswählen *****
3	Aufheizen des Objektträgers bis 75 °C, und für 8 Minuten inkubieren
4	Einstellen des EZ Prep Volumens (DXT)
5	Einstellen des Entparaffinierungsvolumens (DXT)
6	Abgabe von Coverslip (DXT)
7	Inkubieren für 8 Minuten
8	Objektträger waschen
9	Einstellen des Entparaffinierungsvolumens (DXT)
10	Abgabe von Coverslip (DXT)
11	Aufheizen des Objektträgers bis 37 °C, und für 4 Minuten inkubieren
12	***** SSC Wash Auswählen *****
13	***** EZ Prep Auswählen *****
14	***** EZ Prep Auswählen *****
15	Objektträger waschen
16	Jet Drain (DXT)
17	Abgabe lang: Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
18	Abgabe von Cell Cond. u. Coverslip (DXT)
19	Abgabe lang: Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
20	Abgabe von Cell Cond. u. Coverslip (DXT)
21	Aufheizen des Objektträgers bis 95 °C, und für 8 Minuten inkubieren
22	Abgabe von Coverslip (DXT)
23	Abgabe mittel: Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
24	Aufheizen des Objektträgers bis 100 °C, und für 4 Minuten inkubieren
25	Abgabe von Coverslip (DXT)
26	Abgabe von Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
27	Inkubieren für 4 Minuten
28	Abgabe von Coverslip (DXT)
29	Abgabe von Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
30	Inkubieren für 4 Minuten
31	Abgabe von Coverslip (DXT)
32	Abgabe mittel: Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
33	Inkubieren für 4 Minuten
34	Abgabe von Coverslip (DXT)
35	Abgabe mittel: Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
36	Inkubieren für 4 Minuten
37	Abgabe von Coverslip (DXT)
38	Abgabe von Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
39	Inkubieren für 4 Minuten
40	Abgabe von Coverslip (DXT)
41	Abgabe von Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
42	Inkubieren für 4 Minuten
43	Abgabe von Coverslip (DXT)
44	Abgabe mittel: Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
45	Inkubieren für 4 Minuten

* Ein Tropfen entspricht einer Reagenzienabgabe
GSF, Inst. f. Pathologie, Ingolstädter Landstrasse 1 85760 Neuherberg
NexES v10.4

Gedruckt 18.05.2016 09:14:09
Seite 1 von 4

Protokoll-Nr. 999 : 12h CC1 Xtrem (02.05.2016)

Prozedur: Forschung IHC DAB Map XT

Discovery XT Färbemodul

GSF, Inst. f. Pathologie, Ingolstaedter Landstrasse 1 85760 Neuherberg

Schritt-Nr	Protokollschritt
46	Abgabe von Coverslip (DXT)
47	Abgabe von Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
48	Inkubieren für 4 Minuten
49	Abgabe von Coverslip (DXT)
50	Abgabe von Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
51	Inkubieren für 4 Minuten
52	Abgabe von Coverslip (DXT)
53	Abgabe von Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
54	Inkubieren für 4 Minuten
55	Objektträger-Heizung ausschalten
56	Inkubieren für 8 Minuten
57	Spülen mit Reaktionspuffer
58	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
59	Abgabe von Coverslip (DXT)
60	***** EZ Prep Auswählen *****
61	***** SSC Wash Auswählen *****
62	Aufheizen des Objektträgers bis 37 °C, und für 4 Minuten inkubieren
63	Spülen mit Reaktionspuffer
64	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
65	Abgabe von Coverslip (DXT)
66	1 Tropfen Inhibitor D auftragen, und für 4 Minuten inkubieren
67	Objektträger-Heizung ausschalten
68	Spülen mit Reaktionspuffer
69	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
70	Abgabe von Coverslip (DXT)
71	***** Mischer Aus *****
72	***** Bitte auf Knopf warten (Warteposition) *****
73	***** Mischer An *****
74	Spülen mit Reaktionspuffer
75	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
76	Abgabe von Coverslip (DXT)
77	***** Mischer Aus *****
78	***** Manueller Auftrag (Titration) *****
79	***** Mischer An *****
80	Inkubieren für [12 Stunden] (Primär Antikörper)
81	Spülen mit Reaktionspuffer
82	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
83	Abgabe von Coverslip (DXT)
84	Aufheizen des Objektträgers bis 37 °C, und für 4 Minuten inkubieren
85	Spülen mit Reaktionspuffer
86	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
87	Abgabe von Coverslip (DXT)
88	1 Tropfen [DETECTION 8] (Nachweis Nr 2), und für [32 Minuten] inkubieren
89	Spülen mit Reaktionspuffer
90	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens

* Ein Tropfen entspricht einer Reagenzienabgabe
GSF, Inst. f. Pathologie, Ingolstaedter Landstrasse 1 85760 Neuherberg
NexES v10.4

Gedruckt 18.05.2016 09:14:08
Seite 2 von 4

Protokoll-Nr. 999 : 12h CC1 Xtrem (02.05.2016)**Prozedur: Forschung IHC DAB Map XT****Discovery XT Färbemodul****GSF, Inst. f. Pathologie, Ingolstaedter Landstrasse 1 85760 Neuherberg**

Schritt-Nr	Protokollschritt
91	Abgabe von Coverslip (DX1)
92	1 Tropfen Blocker D auftragen, und für 4 Minuten inkubieren.
93	1 Tropfen SA-HRP D auftragen, und für 18 Minuten inkubieren.
94	Spülen mit Reaktionspuffer
95	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
96	Abgabe von Coverslip (DXT)
97	Spülen mit Reaktionspuffer
98	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
99	Abgabe von Coverslip (DXT)
100	Spülen mit Reaktionspuffer
101	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
102	Abgabe von Coverslip (DXT)
103	Spülen mit Reaktionspuffer
104	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
105	1 Tropfen DAB D und einen Tropfen DAB H2O2 D auftragen, LCS auftragen und für 8 Minuten inkubieren.
106	Spülen mit Reaktionspuffer
107	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
108	1 Tropfen Copper D auftragen, Coverslip auftragen, und für 4 Minuten inkubieren.
109	Spülen mit Reaktionspuffer
110	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
111	Abgabe von Coverslip (DXT)
112	**** EZ Prep Auswählen ****
113	Spülen mit Reaktionspuffer
114	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
115	Abgabe von Coverslip (DX1)
116	Inkubieren für 4 Minuten
117	Objektträger-Halzung ausschälen
118	**** Mischer Aus ****
119	**** Bitte auf Knopf warten (Halteschritt: Gegenfärbung/Blutocierung) ****
120	**** Mischer An ****
121	**** EZ Prep Auswählen ****
122	Aufheizen des Objektträgers bis 37 °C, und für 4 Minuten inkubieren
123	Spülen mit Reaktionspuffer
124	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
125	1 Tropfen von [HEMATOXYLIN] (Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für [4 Minuten] inkubieren.
126	Spülen mit Reaktionspuffer
127	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
128	Abgabe von Coverslip (DXT)
129	Spülen mit Reaktionspuffer
130	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
131	1 Tropfen von [BLUING REAGENT] (Nach-Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für [4 Minuten] inkubieren.
132	Spülen mit Reaktionspuffer
133	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
134	Abgabe von Coverslip (DXT)
135	Spülen mit Reaktionspuffer

* Ein Tropfen entspricht einer Reagenzienabgabe
 GSF, Inst. f. Pathologie, Ingolstaedter Landstrasse 1 85760 Neuherberg
 NexES v10.4

Gedruckt 18.05.2016 09:14:08
 Seite 3 von 4

Protokoll-Nr. 999 : 12h CC1 Xtrem (02.05.2016)**Prozedur: Forschung IHC DAB Map XT****Discovery XT Färbemodul****GSF, Inst. f. Pathologie, Ingolstaedter Landstrasse 1 85760 Neuherberg**

Schritt-Nr	Protokollschritt
136	Spülen mit Reaktionspuffer

IX. Danksagung

Ich möchte mich von ganzem Herzen bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Viktor Magdolen, bedanken. Seine unermüdliche Unterstützung und Geduld die letzten Jahre kann man nicht in Worte fassen. Danke, dass ich durch Dich die Chance hatte, mein Projekt auf einem internationalen Kongress in Australien präsentieren zu dürfen und Du mir einen Forschungsaufenthalt in Paris ermöglicht hast. Beide Erfahrungen haben wesentlich zu meiner persönlichen und beruflichen Entwicklung beigetragen und meinen Horizont erweitert.

Ich bin sehr dankbar, dass ich von Prof. Manfred Schmitt als Mentor begleitet wurde, auch wenn er uns viel zu früh verlassen hat. Sein Ratschlag und seine Anleitung waren unbezahlbar. Gleichzeitig danke ich Dr. Julia Dorn, die nach seinem Tod die Rolle als meine Mentorin übernahm.

Darüber hinaus geht auch ein besonderes Dankeschön an Rudi Napieralski, der mir bei der Durchführung der qPCR-Experimente und der Auswertung immer geduldig zur Seite stand, sowie an Sabine Creutzburg, die mich hervorragend angeleitet und sehr bei meinen Experimenten unterstützt hat.

Ein riesengroßes Dankeschön geht an meine Familie und meinen Ehemann ohne ihre bedingungslose Liebe, ihren unerschütterlichen Glauben an mich und ihre kontinuierliche Unterstützung hätte ich diese Arbeit nicht fertig stellen können.

Am Ende möchte ich nochmal betonen, wie dankbar ich meinem Ehemann bin, der mich die ganze Zeit über durch die Arbeit begleitet hat. Seine Unterstützung und sein Vertrauen in mich waren unerschütterlich. Ich liebe Dich.