

**Diagnostische und prognostische Bedeutung der KLK7 Expression in
humanen Tumoren**

Dissertation

zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Carolina Palacios Castillo
aus Hamburg

2025

Betreuer:in / Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. Guido Sauter

Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. Stefan Schneider

Vorsitz der Prüfungskommission: Prof. Dr. Stefan Schneider

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Ronald Simon

Mitglied der Prüfungskommission: PD Dr. Marianne Sinn

Datum der mündlichen Prüfung: 24.03.2026

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Kallikreine	1
1.2	KLK7	2
1.3	Struktur	3
1.4	Funktion und Expression im Normalgewebe	4
1.5	Bedeutung in Krankheiten	6
1.6	Bedeutung in Tumoren	8
1.7	Ziel der Arbeit	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Tissue-Microarray-Methode	15
2.2	Tissue-Microarrays für die KLK7-Studie	23
2.3	Immunhistochemie	29
2.4	Immunhistochemie für KLK7	33
2.5	Statistik	35
3	Ergebnisse.....	36
3.1	Technische Aspekte.....	36
3.2	KLK7 in Normalgeweben	36
3.3	KLK7 in Tumoren	49
3.4	KLK7-Expression und histopathologischer bzw. molekularpathologischer Phänotyp	63
3.4.1	KLK7-Expression beim Kolonkarzinom.....	63
3.4.2	KLK7-Expression beim Magenkarzinom.....	64
3.4.3	KLK7-Expression beim Pankreaskarzinom	65
3.4.4	Leberzellkarzinom und KLK7-Expression.....	65
3.4.5	KLK7-Expression beim Endometriumkarzinom.....	66
3.4.6	KLK7-Expression beim Ovarialkarzinom.....	66
3.4.7	KLK7-Expression beim Schilddrüsenkarzinom.....	66
3.4.8	KLK7-Expression beim Plattenepithelkarzinom.....	67
4	Diskussion	69
5	Zusammenfassung	76

6	English Summary	77
7	Literaturverzeichnis	78
8	Abkürzungsverzeichnis	89
9	Abbildungsverzeichnis	91
10	Tabellenverzeichnis	93
11	Erklärung des Eigenanteils	94
12	Eidesstattliche Versicherung	95
13	Danksagung	96

1 Einleitung

1.1 Kallikreine

Kallikreine sind spezifische Serinproteasen. Hierbei handelt es sich um Enzyme aus der Gruppe der Endopeptidasen, die in der Lage sind, Proteine und Peptide zu spalten. Die sogenannten Serinendopeptidasen lassen sich nach ihrem Katalysemechanismus in Metallo-, Aspartat-, Serin-, Cystein- und Threoninproteasen sowie Proteasen unbekannten Typs unterteilen (Barrett, 2001; Yousef et al., 2005).

Der Begriff ‚Kallikrein‘ (in Anlehnung an das griechische ‚Kallikreas‘ für ‚Bauchspeicheldrüse‘) wurde erstmalig von Kraut, Werle und Frey um 1930 verwendet, nachdem die Arbeitsgruppe die Protease im Pankreas gefunden hatte (Kraut et al., 1930).

Es wird zwischen Plasma- und Gewebekallikreinen unterschieden. Plasmakallikrein wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert (als Plasma-Präkallikrein) (Mandle & Kaplan, 1977) und von einem Gen kodiert, das auf dem Chromosom 4q35 liegt und aus 15 Exons besteht (Beaubien et al., 1991). Das Gen kodiert für ein Enzym, das Bradykinin aus hochmolekularem Kininogen (HMWK) freisetzt (Takagaki et al., 1985).

Die 15 humanen Gewebekallikreine sind extrazelluläre Serinproteasen, die zur Trypsin-Gruppe und Chymotrypsin-ähnlichen Serinproteasen S1A gehören (Yousef et al., 2005). Das humane Gewebekallikrein (auch KLK1 genannt) und die 14 kallikreinverwandten Peptidasen (KLK2-KLK15) zählen hierzu. Es handelt sich hierbei um 15 homologe Serinproteasen, die vom größten Protease-Gencluster im menschlichen Genom kodiert werden (Yousef, Chang, et al., 2000). Gewebekallikreine spielen eine physiologische Rolle in der Verflüssigung des Spermas (Luo et al., 2006), der Schmelzbildung (Hart et al., 2004; Hart et al., 2003), der Erhaltung der Hauthomöostase (Brattsand & Egelrud, 1999) sowie der Regulation des Blutdrucks (Bhoola et al., 1992). Sie sind auf dem Chromosom 19q13.4 lokalisiert (Beaubien et al., 1991).

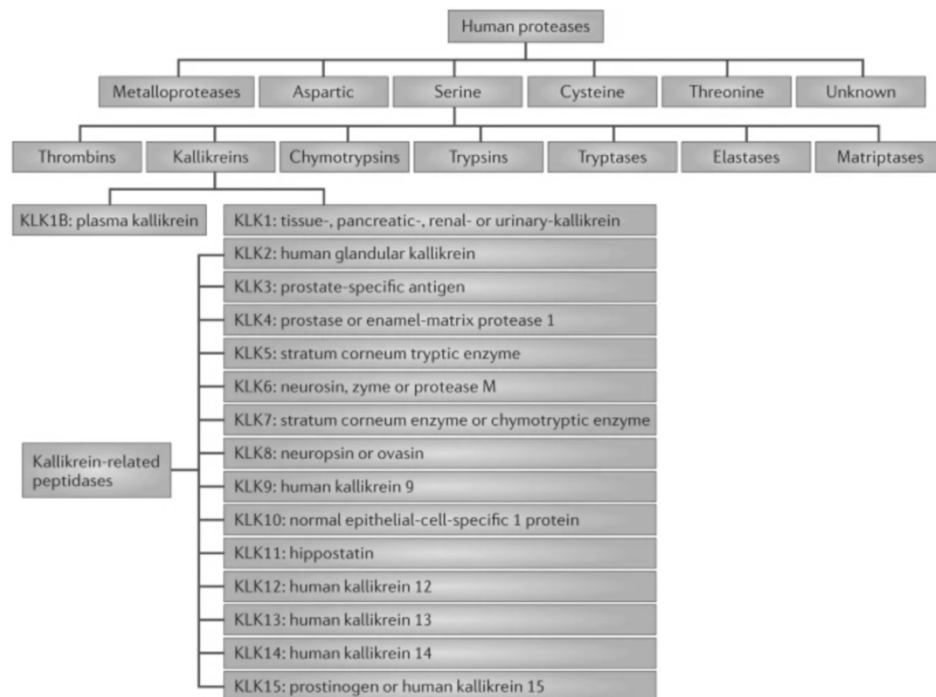


Abbildung 1: Familie der humanen Gewebekallikreine.

Quelle: (Prassas et al., 2015)

1.2 KLK7

KLK7 ist ein Genprodukt aus dem KLK7-Gen, das auf dem 19. Chromosom auf q13.41 lokalisiert ist. Daraus können vier verschiedene gespleißte Transkripte entstehen. Sie besitzen fünf Exons. Die molekulare Masse der daraus resultierenden Proteine kann, je nach Transkript, zwischen 27,5 kDa und 7,8 kDa variieren (The Human Protein Atlas, 2023). Das exprimierte Protein umfasst 253 Aminosäuren (The Human Protein Atlas, 2023).

KLK7 wurde ursprünglich aus dem Stratum corneum isoliert. Deshalb wurde KLK7 auch als Stratum Corneum Chymotryptic Enzym (kurz: SCCE) bekannt (Lundstrom & Egelrud, 1991). Synonyme hierfür sind Human Kallikrein 7 (kurz: HK7) und PRSS6 (The Human Protein Atlas, 2023). Die Protease wurde später aufgrund ihrer Lokalisation im Protease-Gencluster in Kallikrein 7 (KLK7) umbenannt (Yousef, Scorilas, et al., 2000). KLK7 ist eine Serinprotease, die überwiegend in der Epidermis vorkommt und durch die proteolytische Spaltung von Corneodesmosin und Desmocollin zur Desquamation der Haut beiträgt (Egelrud, 2000; Egelrud & Lundstrom, 1991). Sie ist Teil einer proteolytischen Aktivierungskaskade (Borgono et al., 2007; Brattsand et al., 2005). Inhibiert wird KLK7 durch endogene Hemmstoffe wie Serpine (Luo & Jiang, 2006), LEKTI-1 (lympho-epithelial kazal-type inhibitor) (Schechter et al., 2005), alpha2-Makroglobulin (Galliano et

al., 2006) sowie Metallionen wie Cu^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen im niedrigmolekularen Bereich (Debela et al., 2007).

1.3 Struktur

KLK7 hat eine chymotrypsinartige Spezifität und zeichnet sich besonders durch seine S1-Tasche aus, die eine starke Präferenz für Tyrosin sowohl in der P1- als auch in der P2-Position zeigt. Dies wird durch das polare Asn189 der hydrophoben S1-Tasche erklärt. Auch in S2 wird Tyrosin bevorzugt (Debela et al., 2007).

Die Form des KLK7-Moleküls wird als konkav ellipsoid mit den ungefähren Maßen $\text{\AA} \times 40 \text{\AA} \times 35 \text{\AA}$ beschrieben (Fernandez et al., 2008). Die Struktur ähnelt mit ihrer dualen β -Faltung der Struktur der trypsinähnlichen Serinproteasen-Familie (Lesk & Fordham, 1996).

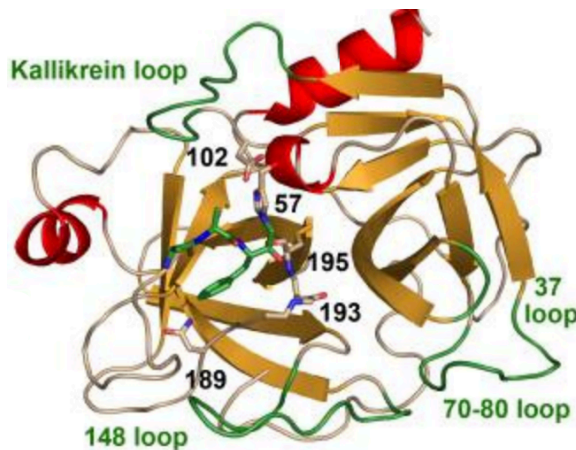


Abbildung 2: Tertiärstruktur von KLK7; Darstellung der Seitenketten der katalytischen Triade (His57, Asp102, Ser195). Quelle: (Fernandez et al., 2008)

Das Molekül kann in zwei hydrophob interagierende Domänen von etwa 120 Resten unterteilt werden. Jede Domäne besteht aus einem sechssträngigen, antiparallelen β -Barrel (Fernandez et al., 2008). Diese sind durch drei Segmente miteinander verbunden (Debela et al., 2007). An der Verbindungsstelle der β -Barrel befinden sich die katalytische Triade sowie die S1-S4-Substratbindungsstellen. Das Sequenzalignment der Aminosäuren von KLK7 ähnelt am ehesten dem vom KLK5 (siehe Abbildung 2) (Debela et al., 2007). KLK7 besitzt eine 70-80-Schleife, die zwei bis drei Reste kürzer ist als bei anderen bereits untersuchten Serinproteasen (Debela et al., 2007). Nichtsdestotrotz weist KLK7 Ähnlichkeit mit den restlichen Serinproteasen aus der KLK-Familie auf, insbesondere in den Schleifen sowie in der räumlichen Ausrichtung der Reste, die die katalytische Triade am aktiven Zentrum bilden (Debela et al., 2007; Fernandez et al., 2008).

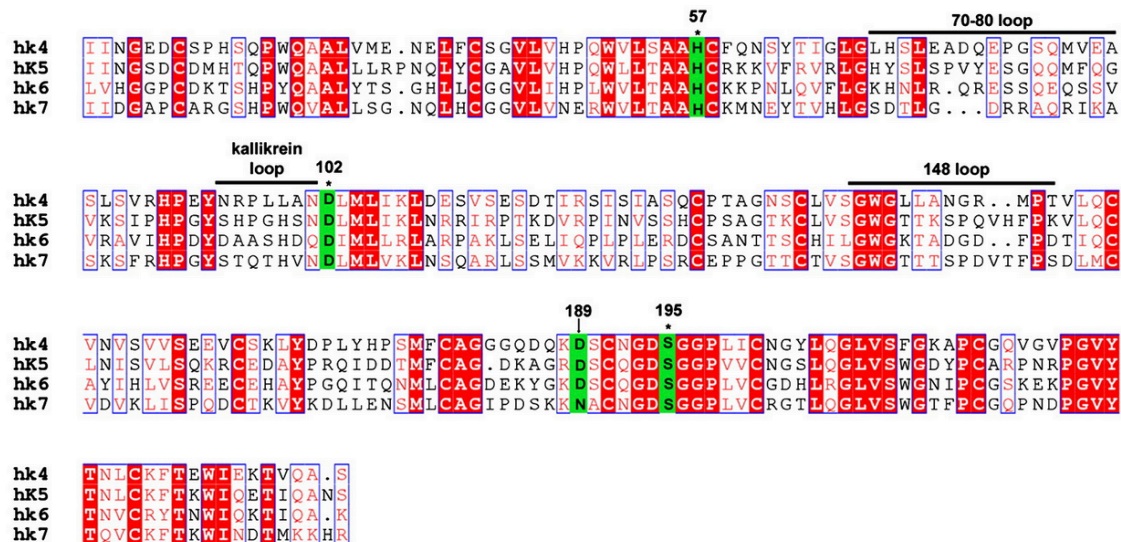


Abbildung 3: Zeigt den Vergleich der Sequenzen von KLK4-KLK7; rot = unveränderte Reste, grün = Reste, die zur katalytischen Triade gehören. Quelle: (Fernandez et al., 2008)

1.4 Funktion und Expression im Normalgewebe

KLK7 spielt eine Schlüsselrolle bei der Erhaltung der Homöostase der Haut. Durch die proteolytische Spaltung der korneodesmosalen Proteine Desmocollin und Corneodesmosin kommt es zur Desquamation (Borgono et al., 2007; Egelrud, 2000; Skerrow et al., 1989).

Die Epidermis ist die oberste Hautschicht. Sie besteht von außen nach innen aus dem Stratum corneum, dem Stratum lucidum (nur in der Leistenhaut vorhanden), dem Stratum granulosum, dem Stratum spinosum und dem Stratum basale. Das Stratum basale grenzt an der Lamina basalis. Im Stratum basale befinden sich Stammzellen, die sich zu Keratinozyten ausdifferenzieren und von nachkommenden Zellen in Richtung des Stratum corneums geschoben werden. Innerhalb von 14 Tagen sind sie ausdifferenziert. In der obersten Epidermisschicht, dem Stratum corneum, befinden sich die abgeflachten und abgestorbenen Korneozyten, die nach weiteren 14 Tagen abgestoßen werden. Während die Zellen die verschiedenen Epidermisschichten durchwandern, verändern sie ihre Form. So verlieren sie ihre Organellen, schrumpfen aufgrund von Flüssigkeitsverlust und flachen zunehmend ab. Das Stratum corneum ist die bedeutsamste Schutzbarriere der Haut gegenüber physikalischen und chemischen Schäden sowie mikrobiellen Erregern. Dort befinden sich nur noch Korneozyten (Borgono et al., 2007). Diese sind durch sogenannte Korneodesmosomen miteinander verbunden. Korneodesmosomen bestehen aus dem Strukturprotein Corneodesmosin, das für die Haftung der Korneozyten untereinander verantwortlich ist. Die Zelladhäsion wird kalziumabhängig von Desmogleinen (DSG1-4)

(Skerrow et al., 1989) und Desmocolline 1-3 vermittelt. Sowohl Desmogleine als auch Desmocolline zählen zu den desmosomalen Cadherinen (Green & Gaudry, 2000). Die Korneodesmosomen enthalten zusätzlich Corneodesmosin, ein Glykoproteinbestandteil (Borgono et al., 2007). Die Korneozyten enthalten ein Keratinfilamentnetz. Der Interzellularraum des Stratum corneums ist mit Lipiden gefüllt (Ovaere et al., 2009; Pierard et al., 2000).

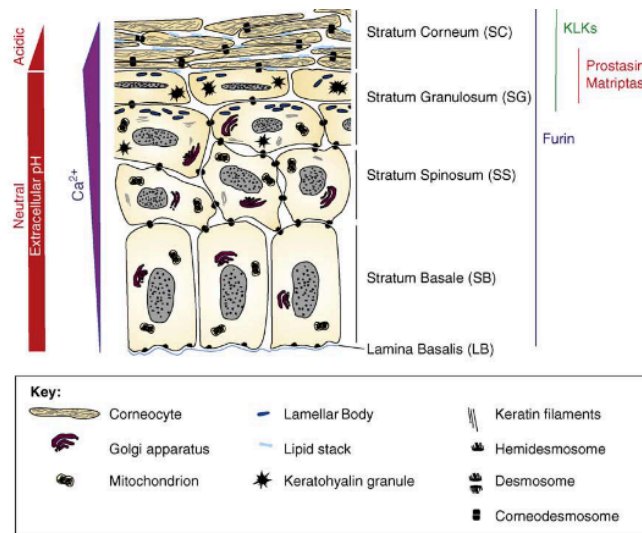


Abbildung 4: **Aufbau der Epidermis**; Darstellung der verschiedenen Schichten. Quelle: (Ovaere et al., 2009)

KLK7 ist reichlich im Stratum granulosum vorhanden und wird vermutlich von Lamellenkörperchen transportiert und in die Zwischenräume des Stratum corneum als inaktives Zymogen sezerniert (Ishida-Yamamoto et al., 2004; Prassas et al., 2015; Sondell et al., 1995). Um aktiv zu werden, benötigt das Zymogen die N-terminale Spaltung des Pro-Peptids (Brattsand et al., 2005).

So kommt es zu einer Aktivierungskaskade. KLK5 aktiviert sich selbst, das inaktive Zymogen pro-KLK7 sowie zusätzlich pro-KLK8 und pro-KLK14. Das aktivierte KLK14 kann nun wiederum pro-KLK5 aktivieren (Borgono et al., 2007).

Das aktivierte KLK7 spaltet in den Korneodesmosomen Desmocollin und Corneodesmosin. Die Verbindung der Korneozyten durch die korneodesmosomalen Proteine wird aufgehoben und es kommt zur Desquamation (Egelrud, 2000).

Die größte Protein- und RNA-Expression findet sich in der Haut. Lokalisiert ist KLK7 im Stratum granulosum und Stratum corneum. Des Weiteren konnte die Expression in deutlich geringeren Mengen auch in Geweben des Ösophagus, der Vagina, der Speicheldrüse, der Eileiter, der Niere, der Brust, der Tonsille und der Zervix nachgewiesen werden. Eine Übersicht findet sich in Abbildung 6 (The Human Protein Atlas, 2023).

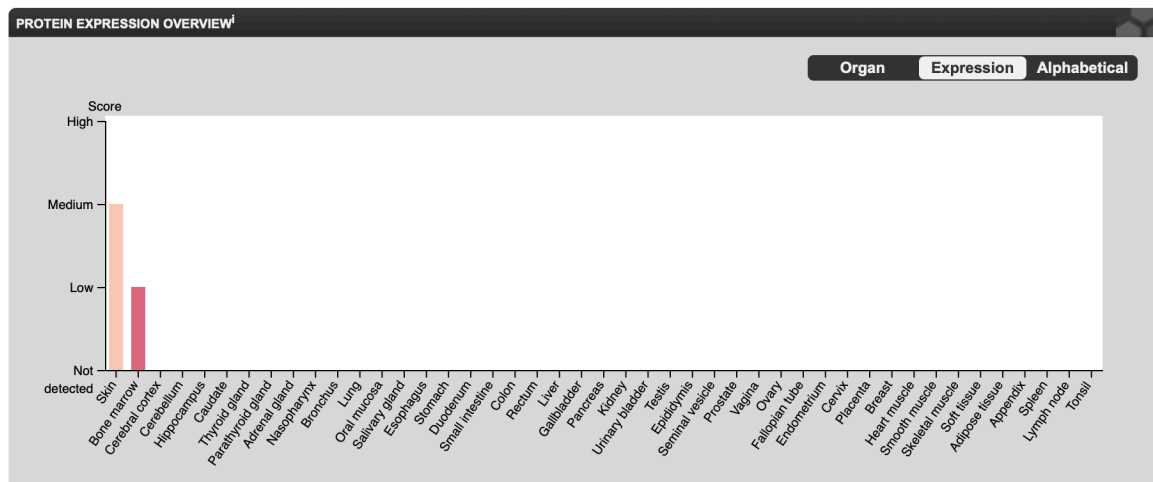


Abbildung 5: Proteinexpression von KLK7 im Normalgewebe

Quelle: The Human Protein Atlas, 2023, Stand 30.07.2023.

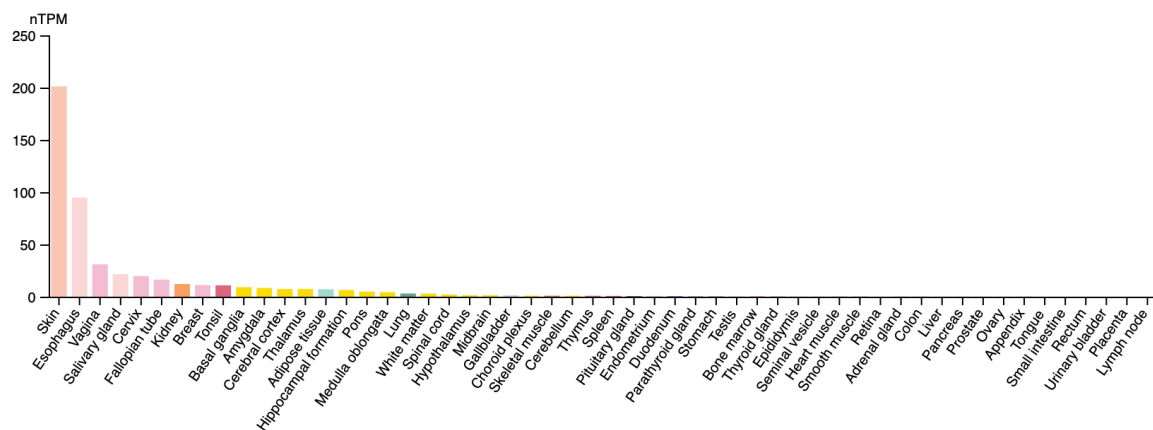


Abbildung 6: mRNA-Expression von KLK7 im Normalgewebe

Quelle: The Human Protein Atlas, 2023, Stand 10.05.2023. Abkürzungen: nTPM = normalized Transcript per million.

1.5 Bedeutung in Krankheiten

Für die Aufrechterhaltung der Homöostase der Haut ist ein Gleichgewicht zwischen Abschuppung und Proliferation neuer Korneozyten notwendig. Die Umsatzzeit des Stratum corneums beträgt etwa zwei bis vier Wochen. Die Desquamation der Korneozyten wird von Proteasen wie KLK7 gesteuert. Der endogene Proteaseinhibitor LEKTI (lympho-epithelial Kazal-type-related inhibitor) ist für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Desquamation und Proliferation von Korneozyten zuständig (Deraison et al., 2007; Schechter et al., 2005).

Bei Störungen der Desquamation kommt es zur Anhäufung von Zellen auf der Hautoberfläche mit oder ohne Verdickung des Stratum corneums. Dies kann symptomfrei verlaufen oder durch Rauigkeit, Trockenheit oder sichtbare Schuppungen auffallen (Egelrud, 2000).

KLK7 aktiviert das antimikrobielle Cathelicidin-Peptid LL-37 (Yamasaki et al., 2006). Ferner konnten Nylander-Lundqvist et al. zeigen, dass KLK7 IL-1 β aktivieren kann (Nylander-Lundqvist & Egelrud, 1997) und somit eine Verbindung zwischen KLK7 und Entzündungsreaktionen der Haut besteht. Erkrankungen wie die atopische Dermatitis (Cork et al., 2009; Egelrud, 2000; Guo et al., 2020) und das Netherton-Syndrom werden mit der Dysregulation von KLK7 in Verbindung gebracht (Hovnanian, 2013; Kishibe, 2019).

Die atopische Dermatitis (Synonyme: atopisches Ekzem, Neurodermitis) ist eine chronische oder chronisch-rezidivierende Erkrankung der Haut, die häufig mit Juckreiz und Begleiterscheinungen wie asthmatischen und/oder allergischen Erkrankungen wie Rhinitis auftreten kann und eine Überproduktion von IgE-Antikörpern aufweist (David Boothe et al., 2017).

Die Aktivität der beiden Serinproteasen KLK5 und KLK7 kann durch Änderungen des pH-Werts auf den Wert 7 um bis zu 50 % erhöht werden. Das pH-Optimum dieser beiden Proteasen liegt im neutralen Bereich (Ekholm et al., 2000). Eine Überaktivierung von KLK5 und KLK7 kann durch die gesteigerte Spaltung die Barrierefunktion der Haut stören. Roedl et al. haben eine verminderte Expression des Gens SPINK5 festgestellt, das für den Serinproteaseinhibitor LEKTI kodiert (Roedl et al., 2009). Zusätzlich wurde festgestellt, dass die KLK7-Expression bei atopischer Dermatitis erhöht ist (Voegeli et al., 2009).

Beim Netherton-Syndrom handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Krankheit der Haut, bei der es durch eine erhöhte IL-1 β -Expression zu Abschuppungen, gestörter Keratinisierung und fehlerhafter Haarbildung kommt. IL-1 β wird durch KLK7 aktiviert. Gleichzeitig gibt es hier eine vermehrte Expression von Mediatoren, die Allergien fördern, weshalb es zu allergischen Reaktionen und schweren Entzündungen kommen kann (Hovnanian, 2013). Bei Neugeborenen besteht die Gefahr von Dehydrierung (Sarri et al., 2017). Das Netherton-Syndrom wird durch Mutationen im Gen SPINK5 verursacht. Das Gen SPINK5 kodiert für den Proteaseinhibitor LEKTI-1 (Chavanas et al., 2000). Studien an Mäusen haben gezeigt, dass ein Mangel an LEKTI-1 eine ungehemmte Aktivität der Proteasen KLK7 und KLK5 zur Folge hat. Dies führt zu einer vermehrten Desquamation (Descargues et al., 2005).

1.6 Bedeutung in Tumoren

Die Entitäten, in denen die KLK7-Expression bisher nachgewiesen wurde, sind in Abbildung 7 dargestellt.

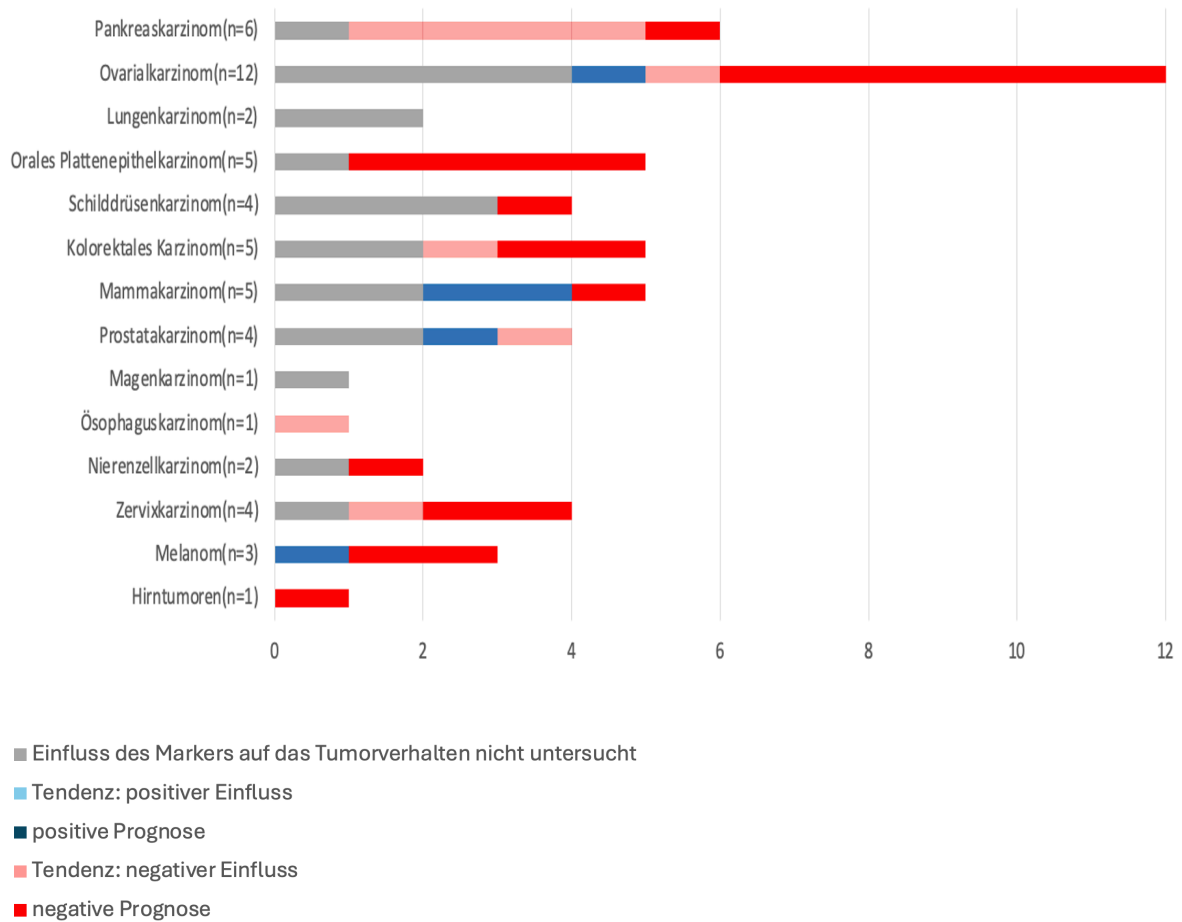


Abbildung 7: **KLK7-Expression in humanen Tumoren**

Die Darstellung zeigt die Literaturdaten bezüglich des Nachweises von KLK7 im Tumorgewebe; n = Anzahl der bisherigen Literatur; grau = Einfluss des Markers auf das Tumorverhalten nicht untersucht; hellblau = Tendenz positiver Einfluss; dunkelblau = positive Prognose, hellrot = Tendenz negativer Einfluss; dunkelrot = negative Prognose

Literaturverweise zu den Daten aus Abbildung 7:

Hirntumoren:

(Prezas et al., 2006)

Kolorektales Karzinom:

(Devetzi et al., 2013; Inoue et al., 2010; Talieri, Li, et al., 2009; Talieri, Mathioudaki, et al., 2009; Walker et al., 2014)

Lungenkarzinom:

(Planque et al., 2005; Singh et al., 2008)

Magenkarzinom:

(Lim et al., 2020)

Fortsetzung zu Literaturverweise zu den Daten aus Abbildung 7:

Mammakarzinom:

(Ejaz et al., 2017; Geng et al., 2020; Li et al., 2009; Talieri et al., 2011; Talieri et al., 2004)

Melanom:

(Delaunay et al., 2017; Haddada et al., 2018; Martins et al., 2011)

Nierenzellkarzinom:

(Gabril et al., 2010; Tailor et al., 2018)

Schilddrüsenkarzinom:

(Kim et al., 2010; Reyes et al., 2019; H. Zhang et al., 2018; Y. Zhang et al., 2018)

Orales Plattenepithelkarzinom:

(Kumar et al., 2020; Leusink et al., 2015; Pettus et al., 2009; Wang et al., 2013; Zhao et al., 2011)

Ösophaguskarzinom:

(Xi et al., 2015)

Ovarialkarzinom:

(Chen et al., 2020; Dong et al., 2003; Dong et al., 2010; Dorn et al., 2014; Gong et al., 2020; Kyriakopoulou et al., 2003; Psyrri et al., 2008; Shan et al., 2006; Shigemasa et al., 2001; Tamir et al., 2014; Tanimoto et al., 1999; Wang et al., 2018)

Pankreaskarzinom:

(Du et al., 2018; Iakovlev et al., 2012; Johnson et al., 2007; Ramani & Haun, 2008a; Ramani et al., 2008; Zheng et al., 2018)

Prostatakarzinom:

(Jamaspishvili et al., 2011; Mo et al., 2010; Xuan et al., 2008; Zhang et al., 2015)

Zervixkarzinom:

(Li et al., 2014; Santin et al., 2004; Termini et al., 2010; Tian et al., 2004)

Die KLK7-Expression ist bei Prostatakarzinomen herunterreguliert (Xuan et al., 2008; Zhang et al., 2015) und es gibt in der Literatur widersprüchliche Aussagen darüber, ob die Expression eine positive oder negative prognostische Relevanz hat.

Beim Pankreaskarzinom wurde eine eindeutig erhöhte Expression festgestellt (Du et al., 2018; Iakovlev et al., 2012; Ramani & Haun, 2008a; Ramani et al., 2008; Zheng et al., 2018). Dabei fiel auf, dass das Expressionslevel bei Pankreaskarzinomen mit einer ungünstigen Prognose assoziiert war. So wurde ein KLK7-Nachweis bei Patienten mit nicht resezierten duktalem Adenokarzinomen des Pankreas mit einem kürzeren Gesamtüberleben in Verbindung gebracht (Iakovlev et al., 2012). Ramani et al. fanden heraus, dass eine Expression von KLK7 zu einer Verringerung der Zelladhäsion an Vitronectin führt (Ramani & Haun, 2008a). Ferner scheint KLK7 ein unabhängiger Risikofaktor für die vaskuläre Invasion von Pankreaskarzinomen zu sein. So scheint KLK7 die Proliferation von Tumorzellen zu fördern und die Chemosensitivität zu verringern

(Zheng et al., 2018). Bei Ovarialkarzinomen sei das KLK7-Expressionslevel ebenfalls erhöht, das überwiegend mit einer negativen Prognose assoziiert ist. Die vermehrte Expression sei mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben verbunden (Chen et al., 2020; Kyriakopoulou et al., 2003). Im Gegensatz dazu fand die Arbeitsgruppe von Dorn et al. heraus, dass ein hoher KLK7-Antigengehalt im Tumorgewebe von 98 Karzinomen mit einer positiven Prognose einhergehen kann. In oralen Plattenepithelkarzinomen wird KLK7 reichlich exprimiert, was mit einer überwiegend ungünstigen Prognose bezüglich des Gesamtüberlebens in Verbindung gebracht wird (Kumar et al., 2020; Pettus et al., 2009; Zhao et al., 2011). Zu papillären Schilddrüsenkarzinomen gibt es bisher wenige Studien. Die vermehrte Expression von KLK7 ist in Geweben und Zelllinien mit einer negativen Prognose für Patienten assoziiert (Y. Zhang et al., 2018). Auch bei kolorektalen Karzinomen ist die Expression erhöht. Das Expressionslevel ist mit einem kürzeren Gesamt- und krankheitsfreien Überleben verbunden (Talieri, Mathioudaki, et al., 2009). Es wurde eine parallele Überexpression von KLK7 und KLK14 gefunden (Devetzi et al., 2013).

Bei Mammakarzinomen ergab die Literaturrecherche Diskrepanzen bezüglich des Einflusses von KLK7. Bei Patienten mit triple-negativem Mammakarzinom (TNB) korrelierte bei Geng et al. ein erhöhter KLK7-Spiegel signifikant mit einem verlängerten Gesamtüberleben (Geng et al., 2020). Die Studie durch Talieri et al. aus dem Jahr 2004 ergab jedoch, dass die KLK7-Genexpression bei KLK7-positiven Tumoren mit einer weniger günstigen Prognose (kürzeres krankheitsfreies Überleben und Gesamtüberleben) assoziiert ist als bei Patienten mit KLK7-negativen Tumoren.

Ferner konnte bei Ösophaguskarzinomen eine Tendenz KLK7-positiver Karzinomen zu ungünstiger Prognose aufgezeigt werden, womöglich weil in KLK7-positiven Tumoren die Proliferation und Invasivität erhöht war (Xi et al., 2015).

Bei Zervixkarzinomen soll das KLK7-Expressionslevel oft deutlich erhöht sein, was in einigen Studien mit einer negativen Prognose verbunden war (Li et al., 2014; Santin et al., 2004). Bei immunhistochemischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die KLK7-Färbung mit dem Schweregrad der Erkrankung zunimmt (Termini et al., 2010). Eine andere Tumorart, bei der die KLK7-Expression erhöht gefunden wurde, ist das maligne Melanom. Hier zeigen sich bezüglich der assoziierten Prognose Diskrepanzen in den Literaturdaten. Martins et al. zeigten, dass die Expression mit einer guten Prognose und Überlebensrate verbunden war (Martins et al., 2011). Im Gegensatz dazu gibt es Studien, in denen gezeigt wird, dass eine aberrante KLK7-Expression zu einem Wechsel vom

proliferativen zum invasiven Phänotyp führt und mit einer negativen Prognose assoziiert ist (Delaunay et al., 2017; Haddada et al., 2018).

Zu Hirntumoren gibt es nur wenig Literatur. Eine hohe Expression korrelierte in einer Studie hierbei mit einem kürzeren Gesamtüberleben sowie mit einem aggressiveren Phänotyp (Prezas et al., 2006). Die Abbildung 8 zeigt den Einfluss einer erhöhten KLK7-Expression in verschiedenen humanen Tumoren. Dabei wird zwischen immunhistochemischen Studien und anderen Untersuchungsmethoden unterschieden.

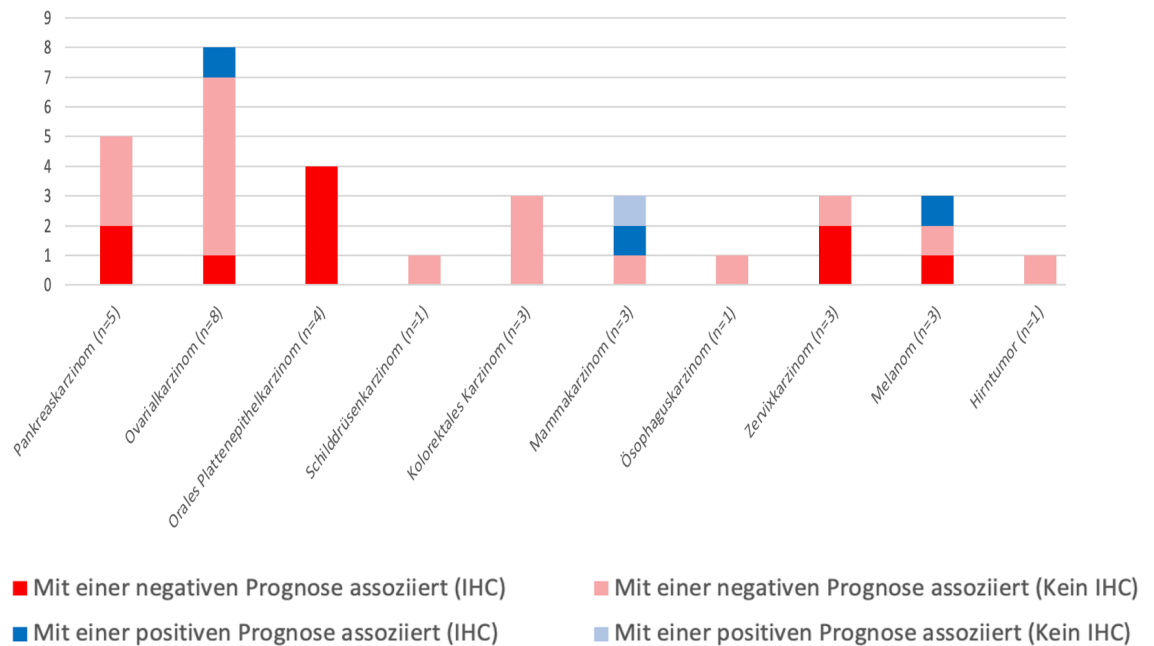


Abbildung 8: Einfluss des KLK7-Expressionslevels in humanen Tumoren

Die Darstellung zeigt die Aussagen in der Literatur bezüglich des Einflusses eines erhöhten KLK7-Expressionslevels auf die Prognose bei verschiedenen Entitäten.

Literaturverweise zu den Daten aus Abbildung 8:

Hirntumoren:

(Prezas et al., 2006)

Kolorektales Karzinom:

(Devetzi et al., 2013; Inoue et al., 2010; Talieri, Mathioudaki, et al., 2009)

Mammakarzinom:

(Geng et al., 2020; Talieri et al., 2011; Talieri et al., 2004)

Melanom:

(Delaunay et al., 2017; Haddada et al., 2018; Martins et al., 2011)

Schilddrüsenkarzinom:

(Y. Zhang et al., 2018)

Fortsetzung zu Literaturverweise zu den Daten aus Abbildung 8:

Orales Plattenepithelkarzinom:

(Kumar et al., 2020; Leusink et al., 2015; Pettus et al., 2009; Zhao et al., 2011)

Ösophaguskarzinom:

(Xi et al., 2015)

Ovarialkarzinom:

(Chen et al., 2020; Dong et al., 2010; Dorn et al., 2014; Gong et al., 2020; Kyriakopoulou et al., 2003; Psyrri et al., 2008; Shan et al., 2006; Tanimoto et al., 1999)

Pankreaskarzinom:

(Du et al., 2018; Iakovlev et al., 2012; Ramani & Haun, 2008a; Ramani et al., 2008; Zheng et al., 2018)

Zervixkarzinom:

(Li et al., 2014; Santin et al., 2004; Termini et al., 2010)

In der Literaturrecherche wurde deutlich, dass in den bisherigen Studien Diskrepanzen in der Häufigkeit der Positivitäten gezeigt werden konnten.

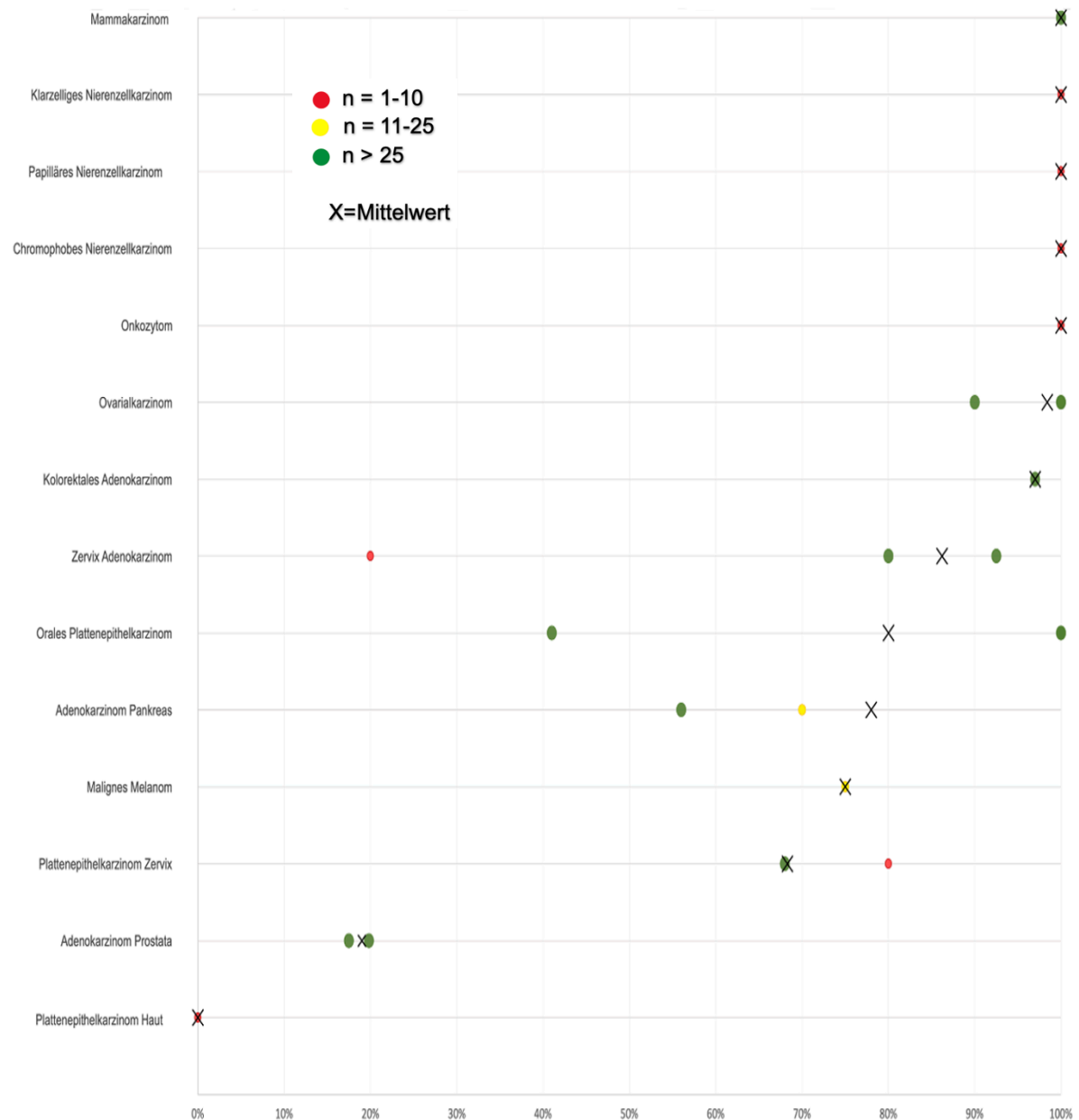


Abbildung 9: Literaturdiagramm

Die Darstellung zeigt die Literaturdaten bezüglich der erhobenen KLK7-Expressionen in verschiedenen Tumorentitäten. Die Größe der eingeschlossenen Tumoren pro Studie ist farblich dargestellt. Rote Punkte entsprechen einer Teilnehmerzahl von eins bis zehn, gelbe Punkte einer Teilnehmerzahl von elf bis 25 und grüne Punkte einer Teilnehmerzahl von über 25. Ein Mittelwert der eingeschlossenen Studienergebnisse ist in Form eines X pro Tumorentität abgebildet. Auf der y-Achse sind die Tumorentitäten nach Mittelwertgröße aufgelistet und auf der x-Achse ist die KLK7-Expression in Prozent dargestellt.

Literaturverweise zu den Daten aus Abbildung 9:

Chromophobes Nierenzellkarzinom:

(Gabril et al., 2010)

Klarzelliges Nierenzellkarzinom:

(Gabril et al., 2010)

Fortsetzung zu Literaturverweise zu den Daten aus Abbildung 9:

Kolorektales Adenokarzinom:

(Walker et al., 2014)

Malignes Melanom:

(Delaunay et al., 2017)

Mammakarzinom:

(Geng et al., 2020)

Onkozytom:

(Gabril et al., 2010)

Orales Plattenepithelkarzinom:

(Kumar et al., 2020; Leusink et al., 2015; Pettus et al., 2009; Zhao et al., 2011)

Ovarialkarzinom Adenokarzinom:

(Dorn et al., 2014; Shigemasa et al., 2001; Wang et al., 2018)

Pankreaskarzinom:

(Iakovlev et al., 2012; Johnson et al., 2007)

Papilläres Nierenzellkarzinom:

(Gabril et al., 2010)

Plattenepithelkarzinom Haut:

(Johnson et al., 2003)

Plattenepithelkarzinom Zervix:

(Santin et al., 2004; Termini et al., 2010)

Prostatakarzinom:

(Xuan et al., 2008; Zhang et al., 2015)

Zervix Adenokarzinom:

(Santin et al., 2004; Termini et al., 2010; Tian et al., 2004)

1.7 Ziel der Arbeit

Bisher gibt es wenige Studien, in denen die KLK7-Expression in verschiedenen Tumoren untersucht wurde. Außerdem weisen die in der Literaturrecherche betrachteten Studien meist eine kleine Anzahl an Tumoren auf. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die KLK7-Expression mittels eines standardisierten immunhistochemischen Verfahrens in einer Vielzahl von humanen Tumorentypen darzustellen. Dabei soll die diagnostische und prognostische Relevanz der KLK7-Expression untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Tissue-Microarray-Methode

Die 1998 von Kononen et al. publizierte Tissue-Microarray (TMA)-Methode ist in dieser Doktorarbeit das zentrale Verfahren (Kononen et al., 1998). Die TMA-Methode erlaubt die gleichzeitige Untersuchung von mehr als 600 Gewebeproben auf einem einzigen Objektträger. Diese Gewebeproben können mit allen Methoden angefärbt werden, die für Schnittpräparaten geeignet sind. Meistens werden TMAs für immunhistochemische Untersuchungen, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) oder RNA-in-situ-Hybridisierung verwendet. Wie normale Gewebeschnitte werden TMA-Schnitte mit einem Mikrotom von Paraffinblöcken geschnitten. Die TMA-Paraffinblöcke bestehen aus hunderten an definierten Positionen aufrechtstehender Zylinder, von denen auf jedem neuen TMA-Schnitt eine Scheibe mit einem Durchmesser von 0,6 mm entnommen wird. Das Prinzip der TMA-Methode ist in Abbildung 10 dargestellt. Ihr Vorteil ist die Beschleunigung von Gewebestudien bei gleichzeitiger Reduzierung der Studienkosten. Unter 600 Tumoren, die auf einem einzigen Objektträger gefärbt werden, reduziert sich die benötigte Reagenzienmenge um einen Faktor von ca. 600 (Simon & Sauter, 2003). Genauso verringert sich die Arbeitszeit für das Herstellen der TMA-Schnitte. Die sparsame Verwendung von Gewebe eines einzelnen Tumors im Rahmen einer Studie – es wird nur eine Scheibe von 2 µm Dicke und 0,6 mm Durchmesser pro Projekt verwendet – ermöglicht es zudem, wertvolle Tumorkollektive für zahlreiche Projekte zu verwenden. Die Paraffinblöcke einer Studienpopulation werden somit weitgehend ‚immortalisiert‘.

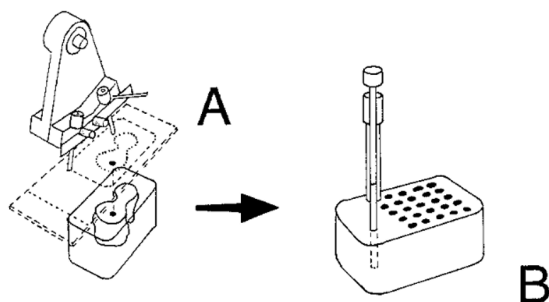


Abbildung 10: Prinzip der TMA-Technik

A = Gewebeprobe mit einem Durchmesser von 0,6 mm wird mit einer Hohlzylinder-Nadel aus einer ausgewählten Region eines Spenderblocks entnommen. Ein HE-Schnitt, auf dem die ausgewählte Region mit Filzstift eingezeichnet ist, wird auf die Oberfläche des Spenderblocks gelegt und dient zur Orientierung bei der Entnahme einer Probe.

B = Die mit der Hohlzylinder-Nadel gewonnene Gewebeprobe wird in ein zuvor gefertigtes Loch an einer definierten Array-Koordinate in dem Empfängerblock übertragen.

Quelle: Abbildung modifiziert nach (Bubendorf et al., 2001)

Der Nachteil des Verfahrens ist der Arbeitsaufwand bei der Herstellung von TMA-Blöcken.

Die TMA-Herstellung beginnt mit der Suche nach Geweben, meistens Tumoren. Am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) ist eine Volltextsuche im Pathologieinformationssystem der erste Schritt. Um die Suche auf Tumoren, die für ein TMA-Projekt groß genug sind, zu limitieren, werden neben dem Tumortyp auch Begriffe verwendet, die auf eine größere Tumormenge schließen lassen, beispielsweise pT1, pT2, pT3 oder pT4. Tumoren, die ohne pT-Kategorie diagnostiziert werden, sind häufig Erstdiagnosen anhand von kleinen Zangen- oder Stanzbiopsien. Die so identifizierten Tumoren werden basierend auf die von Pathologen verfassten Diagnosetexte vorbewertet, um Tumorenbereiche auszuschließen, bei denen von einer kleinen Tumormenge auszugehen ist, die Diagnose unsicher war oder aufgrund einer Beschreibung ausgedehnter Nekrosen oder regressiver Veränderungen nur wenig stanzbarem Tumorgewebe zu erwarten ist. Von den verbliebenen Geweben werden dann die Schnitte aus dem Archiv geholt und einem Pathologen zur Inspektion vorgelegt. Schnitte mit einem zusammenhängenden Tumorareal von mindestens einem Quadratzentimeter werden als für eine TMA-Studie geeignet erachtet. Kleinere Tumoren werden vom Projekt ausgeschlossen. Bei den geeigneten HE-Schnitten werden die Tumorareale von Pathologen mit einem Filzstift markiert und die korrespondierenden Paraffinblöcke aus dem Block-Archiv herausgesucht. Die Blöcke werden von den Medizinisch-technischen Assistenten des TMA-Labors auf Eignung für TMA-Projekte untersucht. Das Mindestkriterium für die Aufnahme eines Blocks in ein TMA-Projekt ist eine Blocktiefe/Blockdicke von mindestens 2 mm. Dicke Paraffinblöcke sind für die TMA-Herstellung wünschenswert, denn die Dicke der Blöcke entscheidet über die Länge der aus diesen Blöcken entnehmbaren Zylinder. Die Länge der Zylinder wiederum entscheidet über die Zahl der TMA-Spots, die letztlich von einem solchen Block untersucht werden können.

Nachdem alle Fälle identifiziert sind, von denen stanzbare TMA-Blöcke vorliegen, werden die Zusammenstellung und Struktur des zu bauenden TMAs definiert. Hierfür wird ein am UKE vordefiniertes System verwendet, bei dem die TMA-Blöcke in sechs Sektoren eingeteilt werden (bezeichnet mit Großbuchstaben von A bis F), wobei in den einzelnen Sektoren die Zeilen mit Zahlen von eins bis neun und die Spalten mit Kleinbuchstaben von a bis r bezeichnet sind. Um in allen Situationen eine Orientierung am Schnitt zu ermöglichen, sind die Sektoren ungleich groß und asymmetrisch angeordnet. Der Aufbau

eines UKE-Standard-TMA-Blocks ist in Abbildung 12 schematisch dargestellt. Die Schnitte und Blöcke werden nun einer Koordinate zugeordnet und in der Reihenfolge des geplanten Einbaus in den TMA-Block in der Umgebung des Gewebearray sortiert.



Abbildung 11: HE-Schnitt und korrespondierender Paraffinblock

Beim HE-Schnitt wurden die Tumorareale von einem Pathologen mit einem Filzstift markiert.

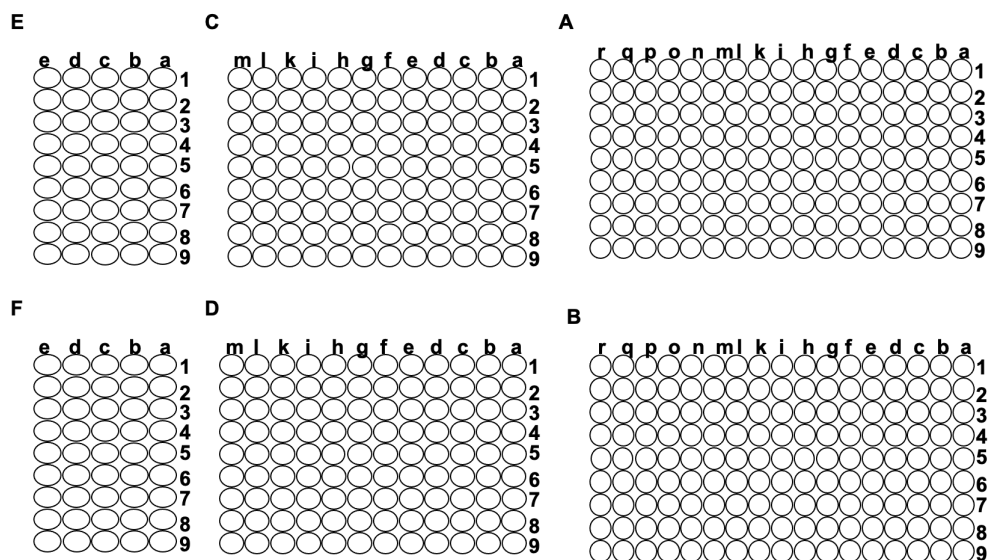


Abbildung 12: Standardaufbau eines UKE-TMA-Blocks

Jeder Spot (insgesamt 612) ist durch eine Koordinate einer Gewebeprobe zuzuweisen. Eingeteilt wird der TMA-Block in Sektor, Zeile und Spalte. Sektor F ist meistens einer Kontrollgruppe (Referenzgewebe) zugeteilt.

Der am UKE verwendete Gewebearrayer ist ein Eigenbau, der von Mitarbeitern des Instituts für Pathologie (Martina und Christian Mirlacher) entwickelt wurde. Die essenziellen Elemente des Tissue-Microarrays sind in den Abbildungen 13 (A + B) dargestellt. Entscheidend für die Funktion des Geräts sind die folgenden Elemente:

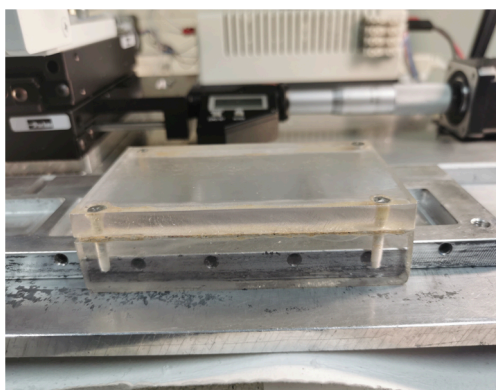
1. Eine Umschaltvorrichtung, die es ermöglicht, an einer vordefinierten Position wahlweise ein Loch zu bohren und hierfür einen elektrischen Bohrer zum Einsatz zu bringen oder mit einer Hohlneedle einen Gewebezyylinder zu entnehmen.
2. Ein Mehrfachblockhalter, der es ermöglicht, sechs Replikate eines TMAs parallel herzustellen.
3. Ein Podest, das schützend über den Empfängerblock gelegt werden kann, um diesen bei der Entnahme des Gewebezyinders aus Spenderblöcken nicht zu beschädigen.
4. Ein Schrittmotor, der die Bohr-/Punktionseinrichtung automatisch von einer Arrayposition auf die nächste bringt.



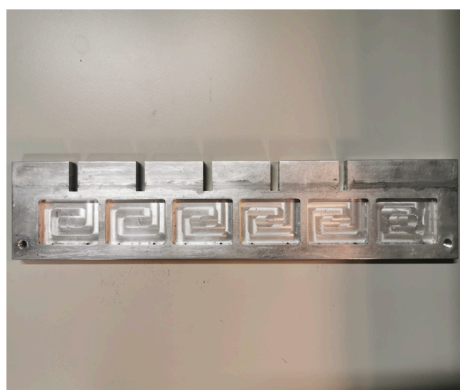
A



B



C



D

Abbildung 13: Elemente eines TMAs

A = Gesamtansicht; B = Schrittmotor, C = Podest, D = Mehrfachblockhalter

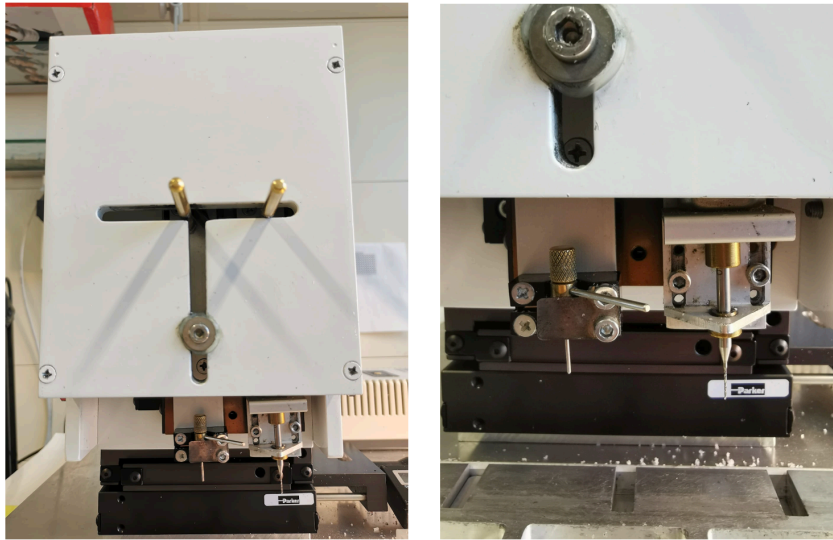


Abbildung 14: Elemente eines TMA

Links ist die Umschaltvorrichtung dargestellt. In der vergrößerten Aufnahme rechts sind die Hohlzylinder-Nadel sowie der Bohrer zu erkennen.

Die TMA-Herstellungsverfahren beginnt mit dem Gießen von leeren Paraffinblöcken (Abbildung 16), die dann in die Positionen 1 bis 6 des Blockhalters eingesetzt werden. Danach beginnt die Befüllung der Replikatblöcke an Position A1a. Zunächst wird in den ersten Replikatblock mit einem elektrischen Bohrer, dessen äußerer Durchmesser 0,6 mm beträgt, ein Loch gebohrt. Danach wird der Empfängerblock mit dem Podest bedeckt und der Spenderblock wird auf das Podest deponiert. Durch Abgleichung mit dem korrespondierenden HE-Schnitt, auf dem der Tumorbereich mit Filzstift markiert wurde, wird die Tumorzone identifiziert und aus dem Tumorbereich wird mit der Hohlzylinder-Nadel (nach Umschalten von ‚Bohren/Stanzen‘) ein Zylinder entnommen. Der hierfür verwendete Hohlzylinder weist einen inneren Durchmesser von 0,6 mm auf. Nach Entfernen des Podests liegt die Hohlzylinder-Nadel exakt über dem vorgefertigten Loch und der entnommene Zylinder kann hineingestoßen werden. Hierfür wird ein Stahldraht verwendet, mit dem die Tumorstanze aus der Hohlzylinder-Nadel ausgestoßen wird (Abbildung 15). Dabei wird darauf geachtet, dass das obere Ende des Zylinders exakt auf dem Niveau der Blockoberfläche zu liegen kommt. Anschließend wird der Replikathalter auf die Position 2 gesetzt und die Prozedur wird am zweiten leeren Empfängerblock – immer noch auf Position A1a – wiederholt. Bei der Entnahme des zweiten Gewebezylinders aus dem Tumorspenderblock wird darauf geachtet, dass die zweite Stanze in unmittelbarer Nachbarschaft zur ersten entnommen wird. Dies ist von Bedeutung, da so im Falle heterogener Tumoren weitgehend vermieden wird, dass sich die molekularen

Charakteristika der in einem Array herausgenommenen Tumoren zwischen den Replikaten relevant unterscheiden.

Nach abgeschlossener Befüllung des Replikats Nummer 6 kann theoretisch ein zweiter Blockhalter für die Herstellung weiterer Replikate (7–12) verwendet werden. Falls dies nicht vorgesehen ist, wird die Bohr-/Stanzeinrichtung durch Aktivierung des elektrischen Schrittmotors an die Position A1b bewegt und der Prozess wird wiederholt. Dies geschieht nun so lange, bis entweder das Tumorkollektiv fertig in den TMA eingebaut wurde oder der Empfängerblock an der Position F9e fertig verbaut ist. Bei den meisten TMA-Blöcken wird darauf geachtet, dass ein Teil der Positionen, meistens im Block F, für Kontrollgewebe (Sammlung verschiedener Normalgewebe) reserviert bleibt.

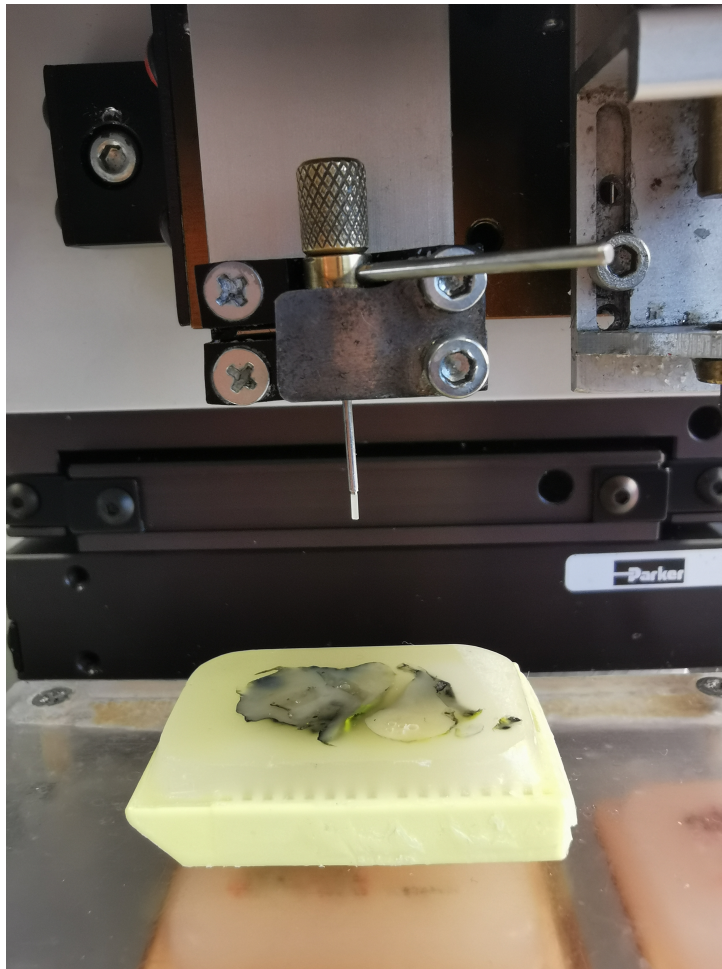


Abbildung 15: Tumorstanze wird aus der Hohnadel ausgestoßen

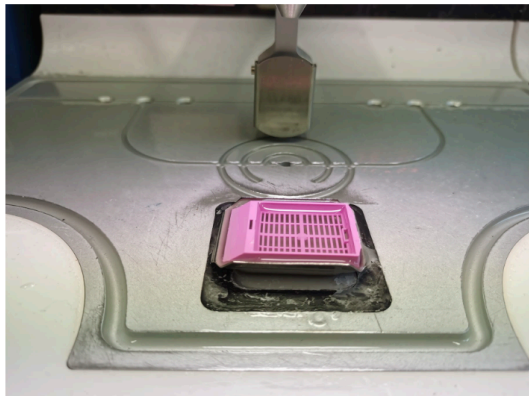
Die zylinderförmige Hohnadel weist einen inneren Durchmesser von 0,6 mm auf. Der Spenderblock liegt auf dem Podest. Nach der Entnahme wird die Gewebeprobe in den Empfängerblock gestoßen.



A



B



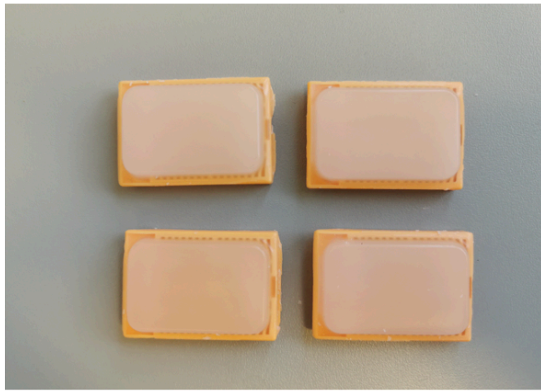
C



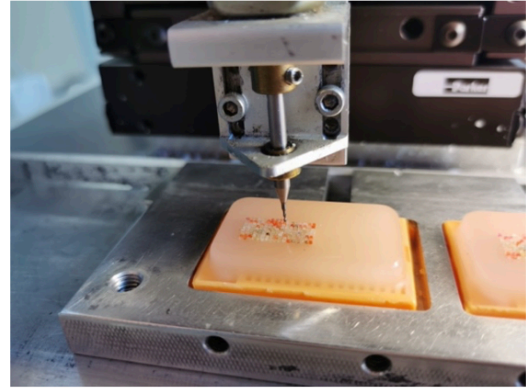
D

Abbildung 16: Herstellung eines Paraffinblocks

Die Abbildungen zeigen den Herstellungsprozess des Paraffinblocks. Die Wanne ist mit flüssigem Paraffin gefüllt (A). Es gibt verschiedene Formen (B), in die das Paraffin gefüllt werden kann. Aus dem Abkühlen (C) resultiert der fertige Block (D).



A



B



C

Abbildung 17: Elemente eines TMA

A = leere Paraffinblöcke

B = Bohrung eines weiteren Lochs

C = Tumorkollektiv der Reihenfolge nach sortiert, HE-Schnitt und korrespondierender Block

Nach der Fertigstellung eines TMA können die für die Herstellung verwendeten Biopsie-Nummern aus der TMA-Datei entfernt werden. Die Biopsie-Nummern sind nicht mehr nötig, denn jeder Tumor ist über eine TMA-Koordinate mit den zum Zeitpunkt der Herstellung bekannten Tumorcharakteristika verlinkt. Ein Beispiel eines hieraus resultierenden TMA-Datenfiles ist in Tabelle 1 dargestellt. Die Entfernung der Biopsie-Nummern ist insofern bedeutsam, als es durch einen unerlaubten Zugriff ins Pathologieinformationssystem möglich wäre, die Klarnamen der Patienten über die Biopsie-Nummern zu ermitteln. Da die Biopsie-Nummern für die weiteren Projekte, die mit einem TMA durchgeführt werden, nicht mehr benötigt werden, können diese entweder ausgeblendet (Pseudoanonymisierung) oder permanent gelöscht werden (Anonymisierung).

Tabelle 1: Beispiel eines TMA-Datenfiles (Ovarialkarzinom-Array)

Die Patientendaten sind bereits anonymisiert. Eine Zuordnung erfolgt über die Koordinate. Zusätzliche Patientendaten wie Follow-up-Daten sind hier übersichtshalber nicht dargestellt.

Array Name	Koordinate	Tumorentität (Subgruppe)	Alter bei Einsendung	pT	pN	Lymphknoten gesamt	Tumorgröße in mm
...	...	...	...	...	...	...	...
OVA6.2	B1a	serös	56	pT2c	pN1	1	100
OVA6.2	B1b	serös	63	pT3b	pN1	1	10
OVA6.2	B1c	serös	45	pT3a	pN1	3	35
OVA6.2	B1d	serös	51	pT3c	pN1	9	30
OVA6.2	B1e	serös	70	pT2a	pN1	1	65
OVA6.2	B1f	serös	66	pT3b	pN1	5	32
OVA6.2	B1g	serös	61	pT2a	pN0	1	60
...	...	...	...	...	...	...	...

2.2 Tissue-Microarrays für die KLK7-Studie

Für dieses Projekt wurden ein Normalgewebe-TMA und eine Kollektion von Tumor-TMAs verwendet. Der Normalgewebe-TMA bestand aus jeweils acht Proben von 76 verschiedenen Normalgewebeskategorien, wobei alle Proben jeweils von unterschiedlichen Patienten stammen. Die genaue Zusammensetzung des Normalgewebe-TMAs ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Normalgewebe-TMAs: Organ, Gewebe

Je acht Proben pro Normalgewebe entsprechen 608 Spots auf dem Array.

Reihenfolge	Organ	Reihenfolge	Organ
1	Endothel, Aorta	39	Rektum, Mucosa
2	Media, Aorta	40	Gallenblase, Epithel
3	Herz	41	Leber
4	Muskulatur, gestreift	42	Pankreas
5	Zunge, Muskulatur	43	Parotis
6	Uterus, Myometrium	44	Gll. submandibularis
7	Appendix, Muskel	45	Gll. sublingualis
8	Ösophagus, Muskel	46	Knochenmark
9	Magen, Muskel	47	Duodenum, Gll. duodenales
10	Ileum, Muscularis	48	Niere, Cortex
11	Colon descendens	49	Niere, Mark
12	Nierenbecken, Muskel	50	Prostata
13	Harnblase, Muskel	51	Gll. vesiculosa
14	Penis, Corpus spongiosum	52	Epididymis
15	Ovar, Stroma	53	Hoden
16	Fett	54	Bronchus, Mucosa
17	Haut	55	Bronchus, Drüsen
18	Haut, Haarfollikel, Talgdrüse	56	Sinus paranasales
19	Lippe, orale Mucosa	57	Lunge
20	Mundhöhle	58	Brust
21	Tonsille, Oberflächenepithel	59	Endozervix
22	Analkanal, Haut	60	Endometrium, Proliferation
23	Analkanal, Übergang Mucosa	61	Endometrium, Sekretion
24	Ektozervix	62	Eileiter, Mucosa
25	Ösophagus, Plattenepithel	63	Plazenta, frühe, Decidua
26	Nierenbecken, Urothel	64	Ovar, Corpus luteum
27	Harnblase, Urothel	65	Ovar, folliculäre Zyste
28	Plazenta, reife, Amnion	66	Plazenta, frühe
29	Lymphknoten	67	Plazenta, reife
30	Milz	68	Nebenniere
31	Thymus	69	Nebenschilddrüse
32	Tonsille	70	Schilddrüse
33	Magen, Antrum	71	Cerebellum, Cortex
34	Magen, Corpus	72	Cerebellum, Substantia grisea
35	Duodenum, Mucosa	73	Cerebrum, grau
36	Ileum, Mucosa	74	Cerebrum, weiß
37	Appendix, Mucosa	75	Hypophyse,
38	Colon descendens, Mucosa		Hinterlappen/Infundibulum
		76	Hypophyse, Vorderlappen

Die Kollektion von Tumor-TMAs beinhaltete 13447 Tumoren von 147 verschiedenen Tumortypen, die auf insgesamt 19 TMA-Blöcken vorlagen. Die genaue Zusammensetzung der verwendeten TMAs ist in Tabelle 3 dargestellt. Von 902 Plattenepithelkarzinomen von insgesamt elf verschiedenen Ursprungsorganen lagen Daten zu pT, pN und Grad vor und es war im Rahmen eines früheren Projekts eine HPV-Untersuchung vorgenommen worden. Klinisch-pathologische Daten lagen auch von Kolonkarzinomen (n = 2351), Leberkarzinomen (n = 301), Endometriumkarzinomen (n = 259), Ovarialkarzinomen (n = 524), Pankreaskarzinomen (n = 598), papillären Schilddrüsenkarzinomen (n = 382) und Magenkarzinomen (n = 327) vor.

Tabelle 3: Zusammensetzung des verwendeten Tumor-TMAs

Tumorgruppe	Tumorentität	Proben auf TMA (n)
Tumoren der Haut	Pilomatrixom	35
	Basalzellkarzinom	89
	Nävuszellnävus	29
	Plattenepithelkarzinom der Haut	145
	Malignes Melanom	65
	Malignes Melanom Lymphknotenmetastasen	86
	Merkelzellkarzinom	48
Kopf-Hals -Tumoren	Plattenepithelkarzinom des Larynx	109
	Plattenepithelkarzinom des Pharynx	60
	Orales Plattenepithelkarzinom (Mundboden)	130
	Pleomorphes Adenom der Parotis	50
	Warthin-Tumor der Parotis	104
	Papilläres seröses Zystadenokarzinom (NOS)	14
	Speicheldrangskarzinom	15
	Azinuszellkarzinom der Speicheldrüse	181
	Adenokarzinom der Speicheldrüse (NOS)	109
	Adenoidzystisches Karzinom der Speicheldrüse	180
	Basalzelladenom der Speicheldrüse	101
	Basalzelladenokarzinom der Speicheldrüse	25
	Epithelial-myoeitheliales Karzinom der Speicheldrüse	53
	Mukoepidermoides Karzinom der Speicheldrüse	343
	Myoeithelium der Speicheldrüse	11
	Myoeitheliales Karzinom der Speicheldrüse	21
	Onkozytaires Karzinom der Speicheldrüse	12
	Polymorphes niedriggradiges Adenokarzinom	41
	Pleomorphes Adenom der Speicheldrüse	53

Fortsetzung Tabelle 3:

Tumorgruppe	Tumorentität	Proben auf TMA (n)
Tumoren der Lunge, Pleura und des Thymus	Adenokarzinom der Lunge	196
	Plattenepithelkarzinom der Lunge	80
	Kleinzelliges Lungenkarzinom	16
	Epitheloides Mesotheliom	40
	Andere Mesotheliome	77
	Thymom	29
Tumoren des weiblichen Genitaltrakts	Plattenepithelkarzinom der Vagina	78
	Plattenepithelkarzinom der Vulva	157
	Plattenepithelkarzinom der Zervix	136
	Adenokarzinom der Zervix	23
	Endometrioides Endometriumkarzinom	338
	Seröses Endometriumkarzinom	86
	Karzinom des Uterus	57
	Endometriumkarzinom, high grade, G3	13
	Kleinzelliges Endometriumkarzinom	9
	Endometrioides Ovarialkarzinom	130
	Seröses Ovarialkarzinom	580
	Muzinöses Ovarialkarzinom	101
	Kleinzelliges Ovarialkarzinom	51
	Karzinom des Ovars	47
	Granulosazelltumor des Ovars	44
	Leydigzelltumor des Ovars	4
	Sertoli-Zelltumor des Ovars	1
	Sertoli-Leydig-Zelltumor des Ovars	3
	Steroidzelltumor des Ovars	3
	Brenner Tumor	41
Tumoren der Mamma	Invasives Mammakarzinom vom nicht speziellen Typ (NST)	80
	Lobuläres Mammakarzinom	122
	Medulläres Mammakarzinom	15
	Tubuläres Mammakarzinom	18
	Muzinöses Mammakarzinom	22
	Phylloides Tumor	50

Fortsetzung Tabelle 3:

Tumorgruppe	Tumorentität	Proben auf TMA (n)
Tumoren des Verdauungstrakts	Kolonadenom, niedriger Dysplasiegrad	50
	Kolonadenom, hoher Dysplasiegrad	50
	Adenokarzinom des Kolons	2483
	Magenadenokarzinom, diffuser Typ	215
	Magenadenokarzinom, intestinaler Typ	215
	Magenadenokarzinom, gemischter Typ	62
	Adenokarzinom des Ösophagus	83
	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	76
	Plattenepithelkarzinom des Analkanals	91
	Cholangiozelluläres Karzinom	58
	Adenokarzinom der Gallenblase	51
	Klatskin-Tumor	42
	Hepatozelluläres Karzinom	312
	Duktales Adenokarzinom des Pankreas	659
	Pankreas-/Ampulla-Vateri-Adenokarzinom	98
	Azinuszellkarzinom des Pankreas	16
	Gastrointestinale Stromatumoren (GIST)	62
Tumoren der Harnwege	Nichtinvasives papilläres Urothelkarzinom pTa G3	32
	Urothelkarzinom pT2-4 G3	162
	Plattenepithelkarzinom der Harnblase	22
	Kleinzelliges neuroendokrines Blasenkarzinom	22
	Sarkomatoides Urothelkarzinom	25
	Urothelkarzinom des Nierenbeckens	62
	Klarzelliges Nierenzellkarzinom	50
	Papilläres Nierenzellkarzinom	50
	Chromophobes Nierenzellkarzinom	50
	Onkozytom	50

Fortsetzung Tabelle 3:

Tumorgruppe	Tumorentität	Proben auf TMA (n)
Tumoren der männlichen Geschlechtsorgane	Adenokarzinom der Prostata, Gleason 3+3	83
	Adenokarzinom der Prostata, Gleason 4+4	80
	Adenokarzinom der Prostata, Gleason 5+5	85
	Adenokarzinom der Prostata, Rezidiv	258
	Kleinzelliges neuroendokrines Karzinom der Prostata	19
	Seminom des Hodens	111
	Embryonales Karzinom des Hodens	54
	Leydigzelltumor des Hodens	31
	Sertoli-Zelltumor des Hodens	2
	Keimstrang-Stromatumor des Hodens	1
	Spermatozytischer Tumor des Hodens	1
	Dottersacktumor des Hodens	53
	Teratom des Hodens	53
	Plattenepithelkarzinom des Penis	92
Endokrine Tumoren	Adenom der Schilddrüse	113
	Papilläres Schilddrüsenkarzinom	391
	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom	154
	Medulläres Schilddrüsenkarzinom	111
	Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom	45
	Nebenschilddrüsenadenom	43
	Nebennierenadenom	50
	Nebennierenrindenkarzinom	28
	Phäochromozytom	50
	Neuroendokriner Tumor des Appendix	3
	Kolorektaler neuroendokriner Tumor	1
	Neuroendokriner Tumor des Ileums	4
	Neuroendokriner Tumor der Lunge	10
	Neuroendokriner Tumor des Pankreas	49
	Neuroendokrines Karzinom des Kolorektums	2
	Neuroendokrines Karzinom des Ileums	8
	Neuroendokrines Karzinom des Pankreas	3

Tumorgruppe	Tumorentität	Proben auf TMA (n)
Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes	Hodgkin-Lymphom	103
	Kleinzelliges lymphozytisches B-Zell-Lymphom	50
	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom	113
	Follikuläres Lymphom	88
	T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom	25
	Mantelzell-Lymphom	18
	Marginalzonenlymphom	16
	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom des Hodens	16
	Burkitt-Lymphom	5
Weichteil- und Knochentumoren	Tenosynovialer Riesenzelltumor	45
	Granularzelltumor	53
	Leiomyom	50
	Leiomyosarkom	94
	Liposarkom	145
	Maligner peripherer Nervenscheidentumor	15
	Myofibrosarkom	26
	Angiosarkom	74
	Angiomyolipom	91
	Dermatofibrosarcoma protuberans	21
	Ganglioneurom	14
	Kaposi-Sarkom	8
	Neurofibrom	117
	Undifferenzierte Sarkome	74
	Paragangliom	41
	Ewing-Sarkom	23
	Rhabdomyosarkom	7
	Schwannom	122
	Synovialsarkom	12
	Osteosarkom	44
	Chondrosarkom	40
	Rhabdoidtumor	5

2.3 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist die zweite zentrale in diesem Projekt verwendete Methode. Es handelt sich dabei um die in der diagnostischen Pathologie am häufigsten eingesetzte molekulare Methode. Vom Konzept her ist die Immunhistochemie eine leicht

zu verstehende Technik. Das entscheidende Reagenz für die Durchführung immunhistochemischer Untersuchungen sind Antikörper, die für diagnostisch relevante Proteine spezifisch sind. Solche Proteine können, wenn sie in einem Gewebeschnitt vorhanden sind, durch gebundene diagnostische Antikörper sichtbar gemacht werden. Antikörper für die Immunhistochemie stammen meistens aus Labortieren, die mit dem Zielprotein oder Teilen davon (sogenannten Peptiden) beimpft wurden, sodass eine Antikörperproduktion einsetzt.

Antikörperproduzierende Zellen können durch Fusion mit immortalisierten Tumorzelllinien in der Folge künstlich produziert werden. Für zahlreiche relevante Proteine gibt es eine Vielzahl kommerziell erhältlicher Antikörper. Die auf einem Schnitt aufgebrauchte Antikörper sind farblos und müssen deswegen durch ein Detektionssystem visualisiert werden. Hierfür werden meist Antikörper aus einer anderen Tierspezies verwendet, die sich gegen den F_c-Teil des Primärantikörpers richten und mit einem Visualisierungssystem gekoppelt sind. Das Prinzip der Immunhistochemie und die möglichen Varianten von Visualisierungssystemen sind in den Abbildungen 18 und 19 dargestellt.

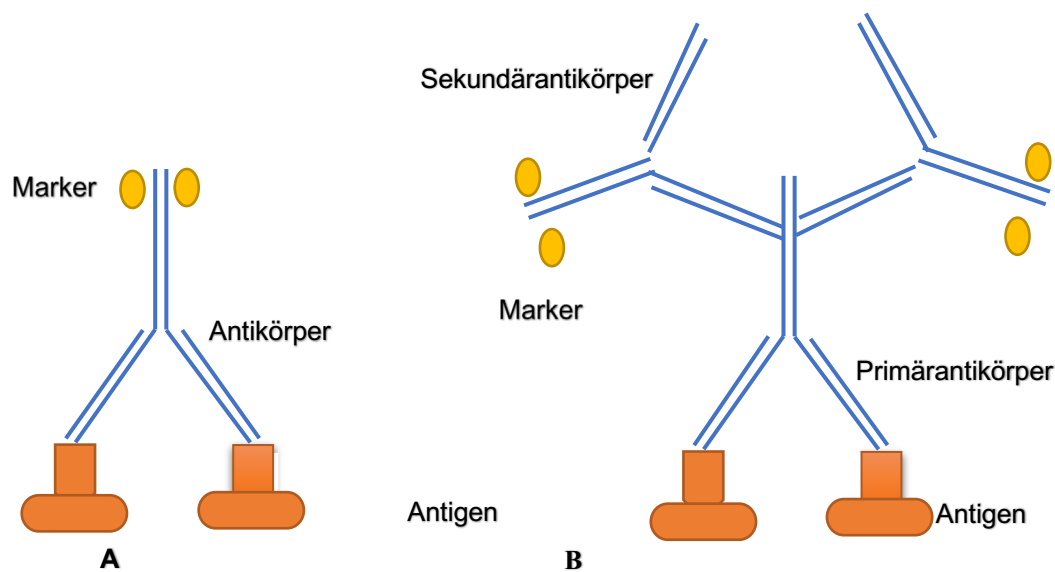


Abbildung 18: Prinzip der Immunhistochemie (Quelle: modifiziert nach Mulisch 2014. (Mulisch, 2014))

A = Direkte Methode: Marker ist mit dem Antikörper gekoppelt, der sich gegen das Antigen richtet. Der Marker wird entweder über eine Farbreaktion sichtbar gemacht (Enzym) oder ist im Elektronenmikroskop/Lichtmikroskop sichtbar.

B = Indirekte Methode: Sekundärantikörper bindet an die F_c-Region des Primärantikörpers. Der Sekundärantikörper ist mit dem Marker gekoppelt.

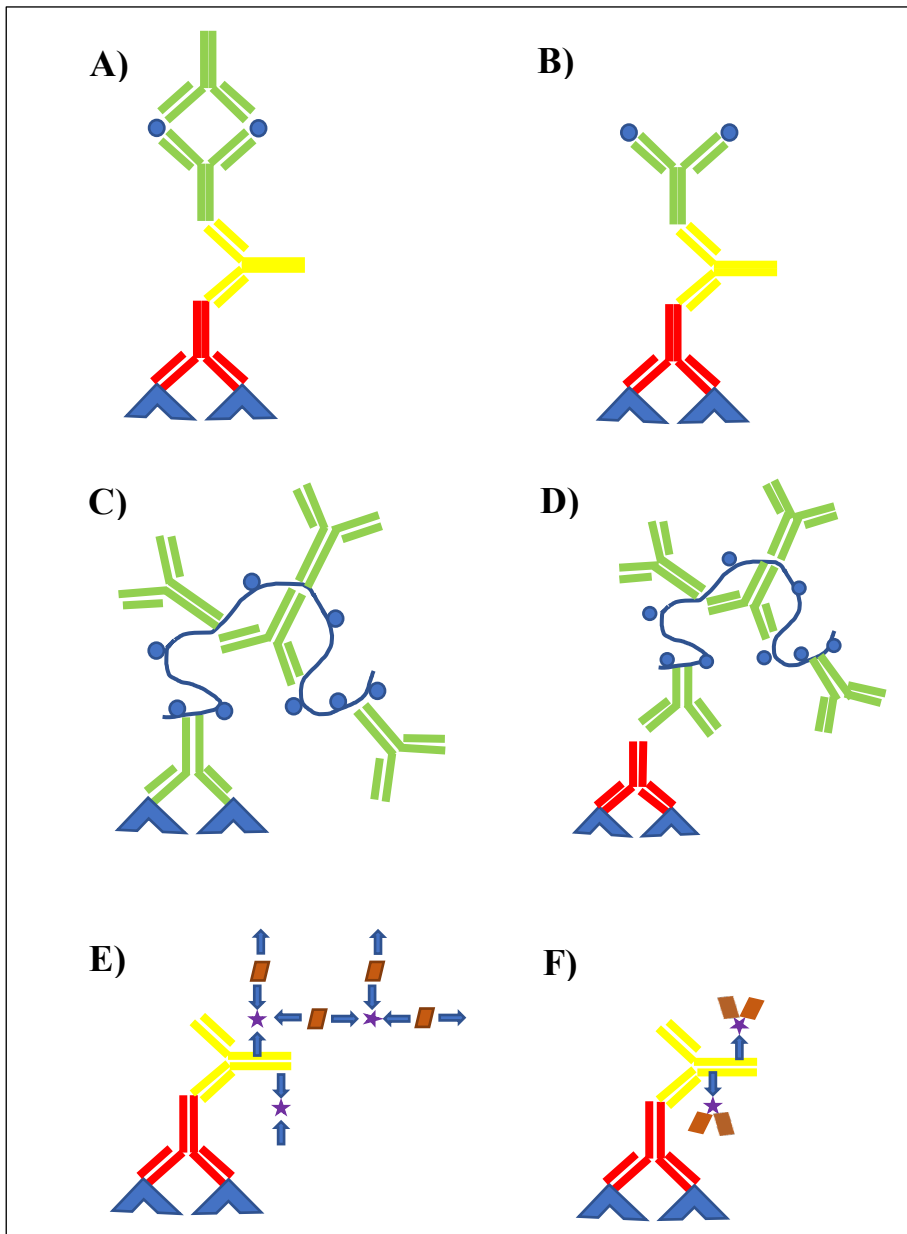


Abbildung 19: Visualisierungssysteme

Quelle: Modifiziert nach Hantschke & Palmedo, 2015. (Hantschke & Palmedo, 2015)

A = PAP-Methode (Peroxidase-anti-Peroxidase):

Primärantikörper und PAP-Komplex müssen von einer Spezies sein, sodass es zur Bindung der Brückenantikörper kommt.

B = APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex):

APAAP wird über einen Brückenantikörper an den Primärantikörper gebunden.

C = EPOS-Methode (Enhanced Polymer-one step):

Direkte Nachweismethode. Ein Dextranpolymer ist mit Enzymmolekülen sowie spezifischen Antikörpern perlenkettenartig konjugiert.

D = En-Vision-Polymer-Konjugat-Methode:

Indirekte Nachweismethode. Dextranpolymere tragen speziesspezifische Sekundärantikörper und Enzymmoleküle.

E = ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex):

Biotinylierte Brückenantikörper können mit zahlreichen Biotin-Molekülen konjugiert sein.

F = LSAB-Methode (Labeled-Streptavidin-Biotin):

Streptavidin ist direkt mit einem Enzym konjugiert.

In der Realität ist die Immunhistochemie allerdings ein komplexeres Verfahren als in der Theorie zu erwarten wäre. Sowohl für die verwendeten Antikörper als auch für die Zielproteine im Gewebeschnitt besteht eine erhebliche Variabilität. Die von Labortieren hergestellten Antikörper spiegeln die gesamte Bandbreite der Immunantwort wider. Es wird geschätzt, dass eine Maus nach der Impfung mit einem Peptid zwischen 30 und 77 verschiedene Antikörper gegen dieses Peptid entwickelt (Eyer et al., 2020; Gerard et al., 2020). Beim Kaninchen wäre diese Zahl zwischen zwölf und 30 (Cheung et al., 2012; Wine et al., 2013) und beim Menschen zwischen 50 und 400 (Wine et al., 2015). Aus einer Vielzahl im Tier hergestellter Antikörper wird einer oder werden wenige zur Kommerzialisierung gewonnen, wobei bei der Auswahl dieser Antikörper keine Verfahren existieren, die sicherstellen würden, dass der für die Immunhistochemie optimalste Antikörper ausgewählt würde. Da unterschiedliche Firmen unterschiedliche Antikörper von unterschiedlichen Forschungen und Tieren kommerzialisieren, bestehen zwischen den Antikörpern für ein bestimmtes Zielprotein große Unterschiede. Die typische Antikörpervalidierung erfolgt an unfixierten Proteinen entweder durch ELISA, Westernblot oder Proteinarrays. Für die Validierung werden Proteinlysate verwendet, die aus einer limitierten Anzahl von Zelllinien oder Geweben bestehen und nicht sicher alle möglicherweise mit einem zu testenden Antikörper kreuzreagierenden Proteine/Epitope enthalten.

Das in der Immunhistochemie untersuchte Gewebe stellt die nächste Unwägbarkeit dar, denn die in der klinischen Routine untersuchten Gewebe befinden sich nicht im Nativzustand, sondern wurden durch die Formalinfixierung modifiziert. Die Formalinfixierung führt zu einer Vernetzung von Proteinen (crosslinking) wobei sich Proteine untereinander und mit der DNA vernetzen (Helander, 1994). Diese Vernetzung stört die dreidimensionale Struktur von Proteinen, markiert zahlreiche Epitope und kann auch zur Neubildung von Epitopen führen (Werner et al., 2000). Antikörper, die an unfixierten Geweben spezifisch mit einem Protein reagieren, reagieren an formalinfixierten Geweben möglicherweise gar nicht oder mit anderen, unbekannten Proteinen (Yamashita, 2007). Die Effekte der Fixierung können durch eine hitzeinduzierte Epitopdemaskierung weitgehend aufgehoben werden (Ramos-Vara, 2005). Hierbei werden Gewebeschnitte bei 100–120 °C gekocht, wobei der pH-Wert der Flüssigkeit Einfluss auf die Reversibilität individueller Epitopdemaskierungen hat. Meistens ist ein basischer pH-Wert (pH 9) besser als ein saurer pH-Wert (pH 6), aber ca. 10 % der Epitope lassen sich besser durch einen

sauren pH-Wert demaskieren. Wegen der erheblichen Einflüsse der Formalinfixierung auf die Proteinstruktur und der Diversität der für die Immunhistochemie verfügbaren Antikörper empfiehlt die internationale Arbeitsgruppe für Antikörpervalidierung (International Working Group for Antibody Validation, IWGAV), dass die Antikörpervalidierung für die Immunhistochemie entweder durch Vergleich mit einer anderen Methode für die Genexpressionsmessung oder mit einem anderen unabhängigen Antikörper erfolgen sollte (Uhlen et al., 2016).

2.4 Immunhistochemie für KLK7

Alle Schnitte der Studie wurden an einem Tag hergestellt und weniger als fünf Tage später an einem Tag und in einem Experiment gefärbt. Die Schnitte wurden mittels Xylols deparaffiniert, durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert und für fünf Minuten in einem Autoklaven bei 121 °C und pH 7,8 (Dako target retrieval solution, Agilent, CA, USA) einer hitzeinduzierten Epitopdemaskierungsprozedur unterzogen. Endogene Peroxidase-Aktivität wurde mit dem DAKO vom Peroxidase-Blocking-System von Agilent für zehn Minuten vorgenommen. Der KLK7-Antikörper (Maus monoklonal, MSVA-707M, MS Validated Antibodies GmbH Hamburg, Deutschland) wurde bei 37 °C für 60 Minuten bei einer Verdünnung von 1:150 appliziert. Für den Zweck der Antikörpervalidierung wurde der Normalgewebearray an einem konsekutiven Schnitt auch mit dem KLK7-Antikörper EPR22594-203 (Abcam, ab254258) bei einer Verdünnung von 1:7,5 und einem ansonsten identischen Protokoll untersucht. Gebundene Antikörper wurden mit dem EnVision-Kit (Agilent, CA, USA, K5007) entsprechend den Anweisungen des Herstellers visualisiert. Die Schnitte wurden dann mit Hämalaun gegengefärbt. Eine detaillierte Darstellung der Immunfärbung ist auch Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Darstellung der Immunfärbung

Vorbehandlung	PT-Link (DAKO) EnVison™FLEX Target Retrieval Solution, High pH EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH → je nach Empfehlung des Datasheets
----------------------	---

Fortsetzung Tabelle 4:

Durchführung	Schnitte werden 30 Minuten bei 60 °C entparaffiniert. Protokollschritte: 1. Vorbehandlung im PT Link 2. Puffer 3. H2O2 → Peroxidase Blocking 4. Puffer 5. Antikörper 6. Puffer 7. Ggf. Linker 8. Puffer 9. HRP 10. Puffer 11. DAB + Sub-Chromo 12. Puffer 13. Hematoxylin 14. Puffer 15. Aqua dest. 16. Fließendes Leitungswasser 17. Aufsteigende Alkoholreihe		
		Inkubation	Temperatur
		30 Min	Max 95 °C
		5 Min	RT
		20 Min	RT
		15 Min	RT
		20 Min	RT
		10 Min	RT
		5 Min	RT
Reagenzien	5 % Puffer	EnVision™FLEX Wash Buffer (20x), for Dako Link Instruments	
	H2O2(KIT)	EnVision™FLEX, High pH, for Dako Link Instruments	
	HRP(KIT)	EnVision™FLEX, High pH, for Dako Link Instruments	
	DAB + Sub-Chromo (KIT)	EnVision™FLEX, High pH, for Dako Link Instruments	
	Hematoxylin	EnVision™FLEX, Hematoxylin, for Dako Link Instruments	

Die gefärbten Schnitte wurden von einem Pathologen beurteilt. Dabei wurden von jedem Gewebespot der prozentuale Anteil der positiven Tumorzellen und die Intensität der Positivität auf einer Skala von 1 bis 3 subjektiv bestimmt. Aus Intensität und prozentualem Anteil positiver Tumorzellen wurden die Tumoren in die Gruppen negativ, schwach positiv, mäßig stark positiv und stark positiv eingeteilt. Das hierfür verwendete System ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Übersicht der semiquantitativen Interpretation der immunhistochemischen Ergebnisse

Gruppe	Definition
negativ	Intensität 0
schwach positiv	Intensität 1 in ≤ 70 % der Tumorzellen Intensität 2 in ≤ 30 % der Tumorzellen
Gruppe	Definition
mäßig stark positiv	Intensität 1 in 70 % der Tumorzellen Intensität 2 in 31–70 % der Tumorzellen Intensität 3 in ≤ 30 % der Tumorzellen
stark positiv	Intensität 2 in > 70 % der Tumorzellen Intensität 3 in > 30 % der Tumorzellen

2.5 Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mittels der Software JMP 16 (SAS Institute Inc., NC, USA) ausgeführt. Es wurden Kontingenztabellen und der Chi-Quadrat-Test durchgeführt, um Assoziationen zwischen KLK7-Immunfärbung und Tumorphänotyp nachzuweisen. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Zur statistischen Anpassung wurde die Bonferroni-Korrektur ($p = p\text{-Wert}/\text{Anzahl der statistischen Tests}$) durchgeführt ($p \leq 0,0018$).

3 Ergebnisse

3.1 Technische Aspekte

12345 (91,8 %) von 13447 Tumorgewebespots und mindestens vier Normalgewebeprobe pro Normalgewebekategorie erwiesen sich in unseren TMAs als auswertbar. Gründe für nicht auswertbare Spots waren das Fehlen eindeutiger Tumorzellen oder das komplette Fehlen einzelner Spots an einzelnen Koordinatenpositionen.

3.2 KLK7 in Normalgeweben

Eine KLK7-Färbung fand sich überwiegend in Plattenepithelien, wobei die Färbung in diesem Gewebetyp im Normalfall eine definierte Zone umfasste, die bei ca. 50 % der Epithelhöhe begann und bei ca. 80 % endete (Abbildung 20).

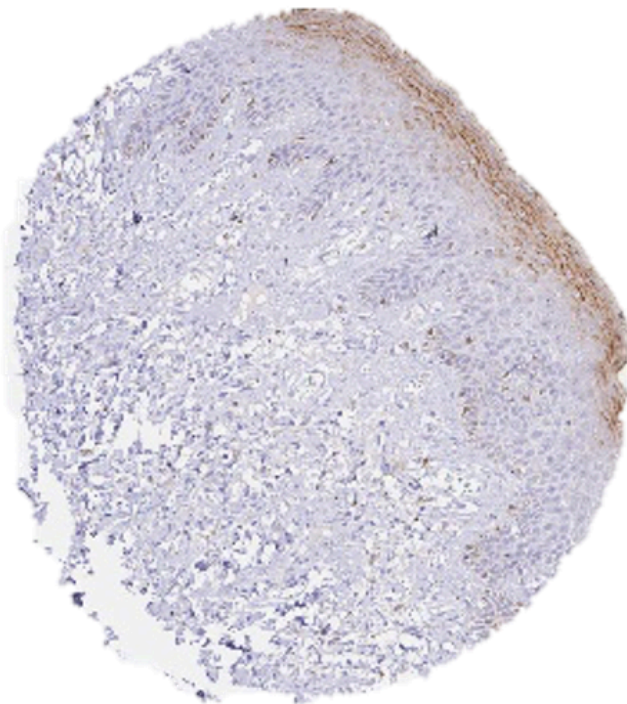


Abbildung 20: **Haut.** Die KLK7-Färbung tritt bei ca. 50 % der Epithelhöhe auf und endet bei ca. 80 %. MSVA-707M Antikörper.

Dieser Bereich von Plattenepithelien beinhaltet bei verhornenden Plattenepithelien die Granularzellschicht. Die KLK7-Färbung war überwiegend membranös, wurde im Fall einer ausgeprägten Färbintensität aber auch von einer zytoplasmatischen Färbung begleitet. Das Ausmaß der KLK7-Färbung in Plattenepithelien variierte abhängig von den Lokalisationen des Plattenepithels. Die KLK7-Anfärbbarkeit erwies sich als besonders gering in der Zervix uteri, war stärker ausgeprägt in der Ösophagusschleimhaut und der

Tonsillenoberfläche und am ausgeprägtesten in der Haut. In der Epidermis der Haut fand sich eine starke KLK7-Färbung im Stratum granulosum und den verhornenden Zellschichten. Eine kräftige KLK7-Färbung fand sich auch im Cortex von Haarfollikeln, der luminalen Zone von Talgdrüsen und den zentralen (verhornenden) Bereichen von Hassall'schen Körperchen des Thymus. Einzelne versprengte KLK7-positive Einzelzellen oder Gruppen von Zellen fanden sich auch in den Nierentubuli, Eileitern und Speicheldrüsen. Repräsentative Bilder von KLK7-positiven Normalgeweben sind in den Abbildungen 21 bis 30 gezeigt.

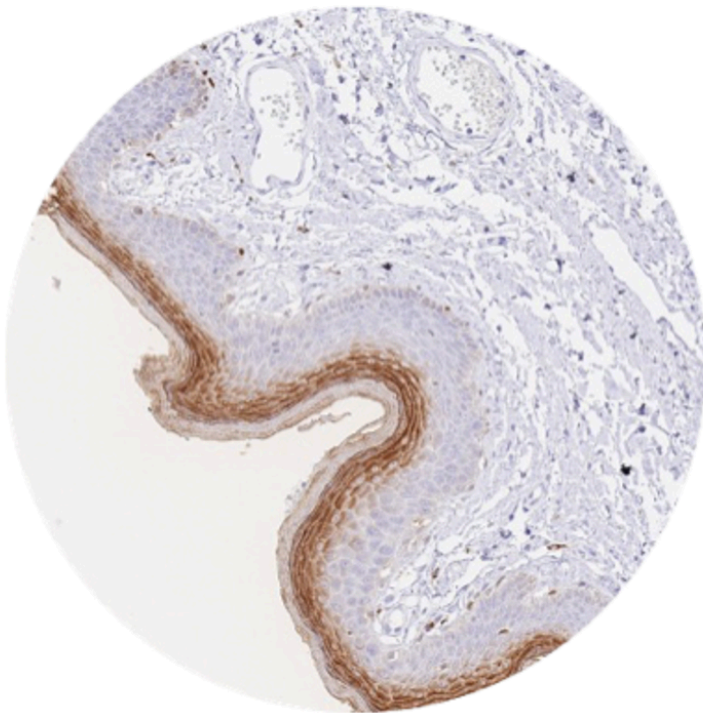


Abbildung 21: Haut (verhörnendes Plattenepithel). Starke KLK7-Färbung der Granularzellschicht.

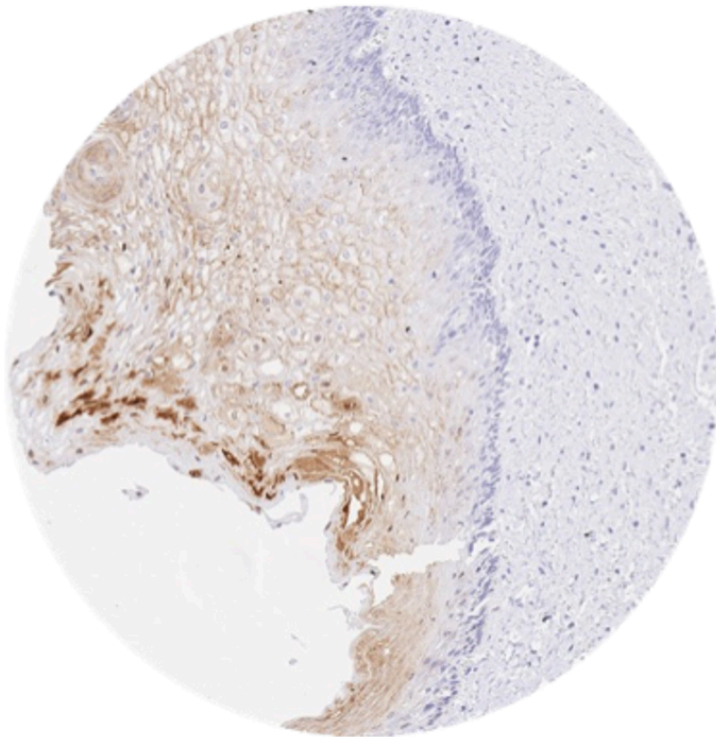


Abbildung 22: **Ösophagus Plattenepithel.** Schwache bis moderate KLK7-Färbung.

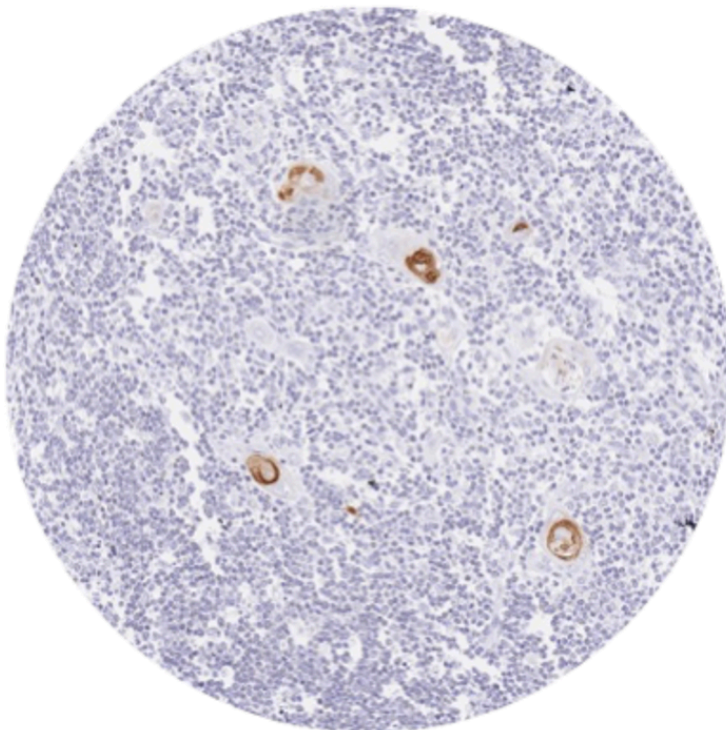


Abbildung 23: **Thymus.** Starke KLK7-Färbung um die keratinisierende Zone der Hassall'schen-Körperchen.

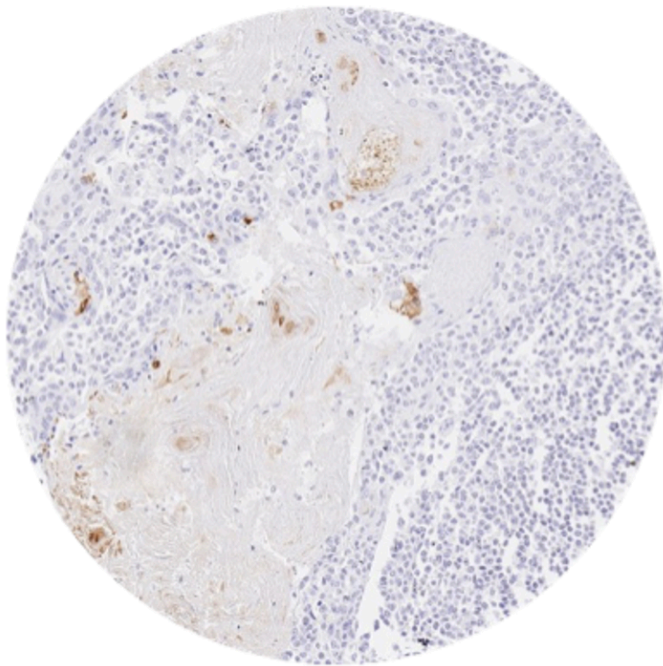


Abbildung 24: **Tonsille (Plattenepithel)**. Schwache bis mäßige KLK7-Färbung des Plattenepithels der Tonsillenkrypten.

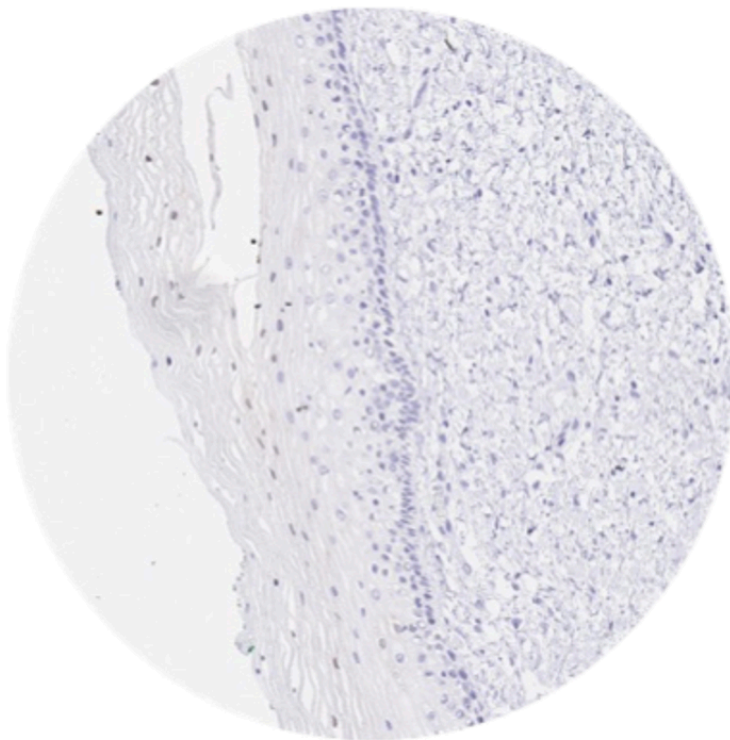


Abbildung 25: **Zervix uteri (Plattenepithel)**. Keine KLK7-Färbung.

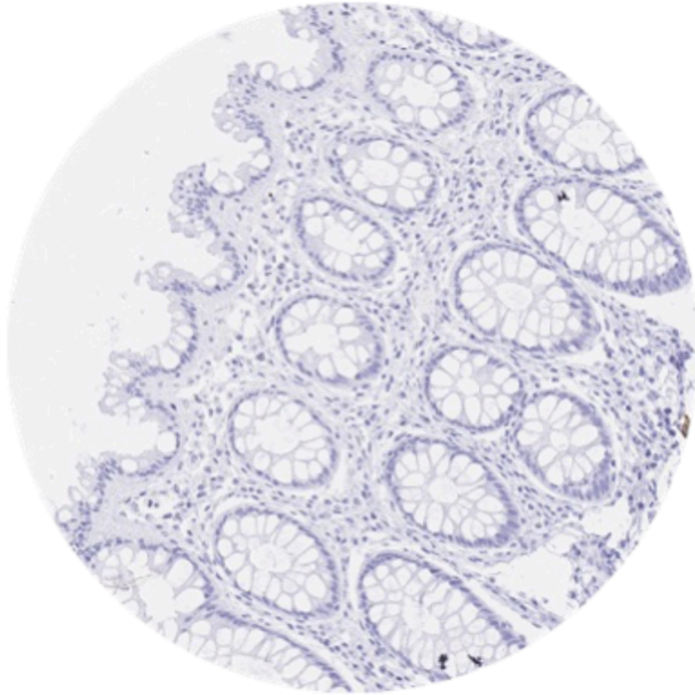


Abbildung 26: **Kolon (Mukosa).** Keine KLK7-Färbung.

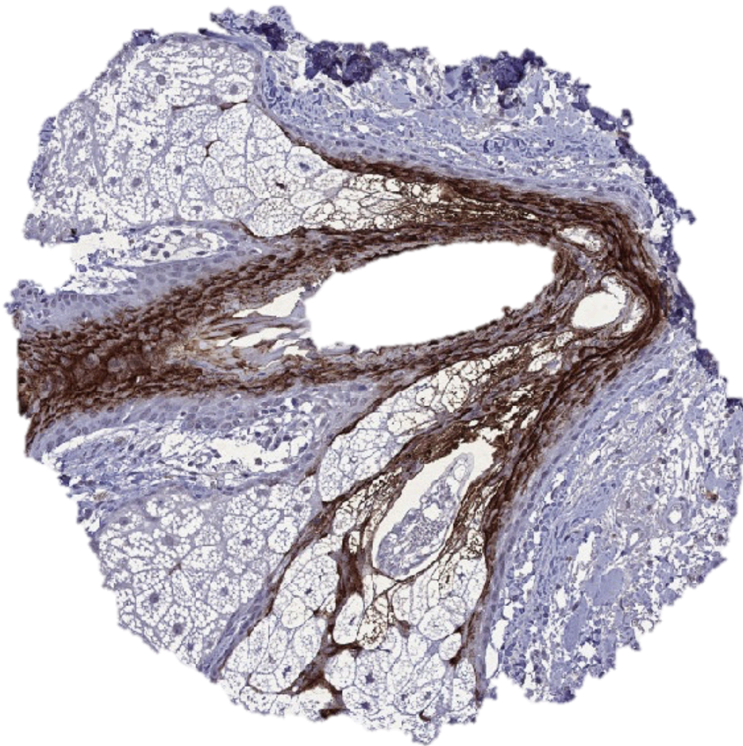


Abbildung 27: **Haut.** Starke KLK7-Färbung im Cortex der Haarfollikel und luminalen Bereich der Talgdrüsen.

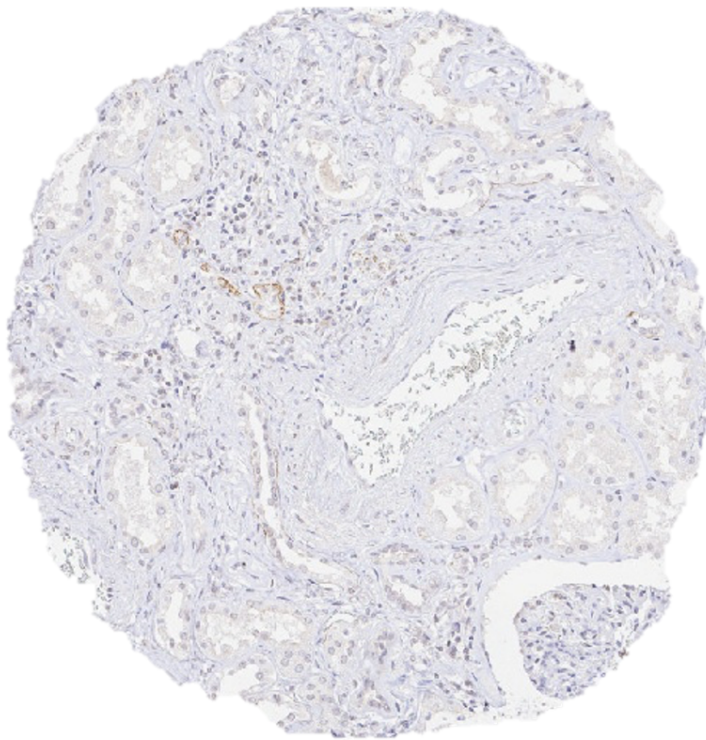


Abbildung 28: Niere (Cortex). Fokale KLK7-Färbung in wenigen Tubuli.

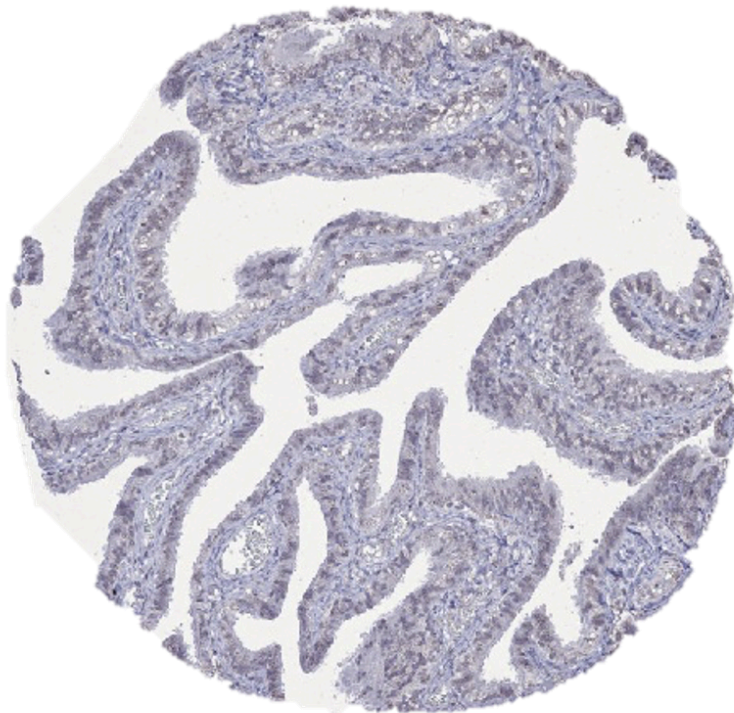


Abbildung 29: Eileiter (Mukosa). Zytoplasmatische KLK7-Färbung in einer Fraktion von Epithelzellen.

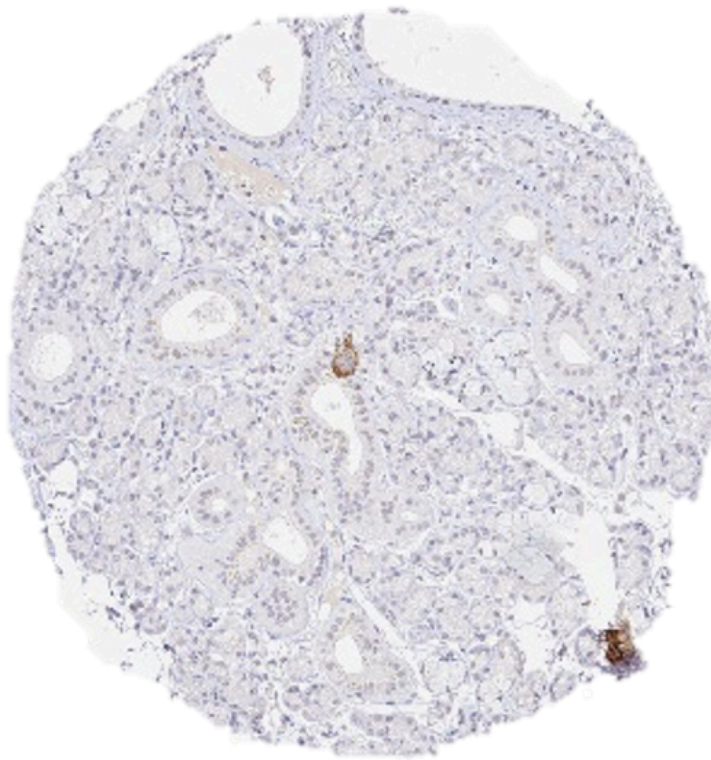


Abbildung 30: Speicheldrüse (Glandula submandibularis). Vereinzelte Epithelzellen zeigen eine moderate KLK7-Färbung.

All diese Befunde wurden sowohl mit dem Antikörper MSVA-707M als auch mit dem Vergleichsantikörper EPR22594-203 gestellt (Abbildungen 31–44). Bei Färbungen unter Verwendung von EPR22594-203 fanden sich zusätzlich zytoplasmatische Anfärbungen von glatter Muskulatur und eine nukleäre Färbung in mehreren Organen. Da diese Färbungen mit dem Antikörper MSVA-707M nicht gefunden wurden, wurden sie als antikörperspezifische Kreuzreaktivitäten von EPR22594-203 interpretiert. Eine KLK7-Färbung wurde (mit MSVA-707M) in folgenden Organen nicht gefunden: Hirn, Neurohypophyse, Adenohypophyse, Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Nebennierendrüse, Lunge, respiratorisches Epithel, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Kolon, Rektum, Leber, Gallenblase, Bauchspeicheldrüse, Urothel, Prostata, Samenblase, Hoden, Nebenhoden, Mamma, Myometrium, Endozervix, Endometrium, Ovar, Plazenta, Muskelzellen (glatte, Skelett- und Herzmuskulatur), Endothel, Knochenmark, Lymphknoten und Milz.

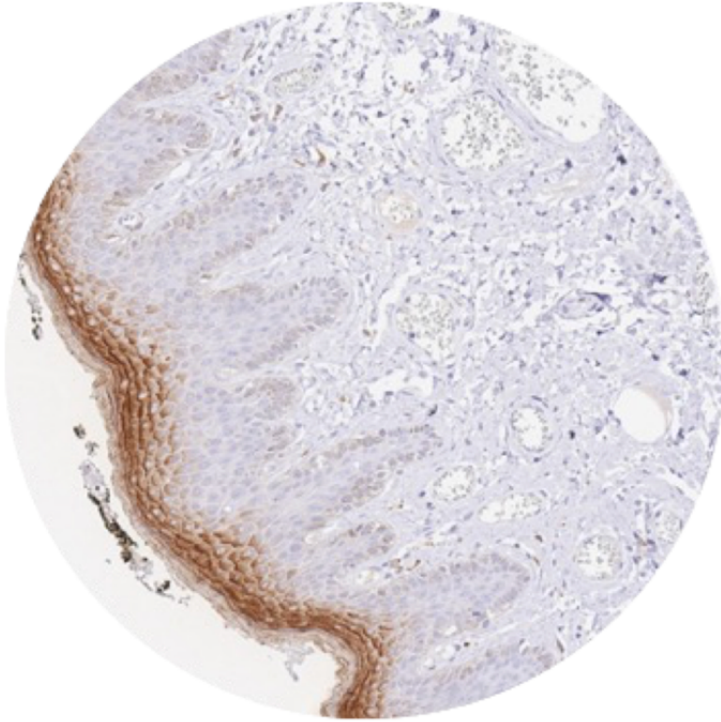


Abbildung 31: Anahaut. Starke KLK7-Färbung der Granularzellschicht. Antikörper MSVA-707M.

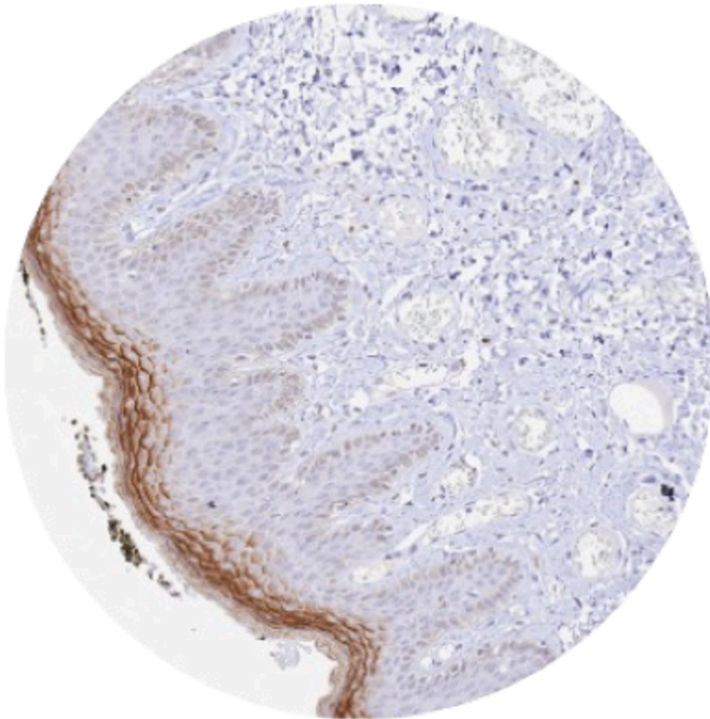


Abbildung 32: Anahaut. Starke KLK7-Färbung der Granularzellschicht. Vergleichsantikörper EPR22594-203.

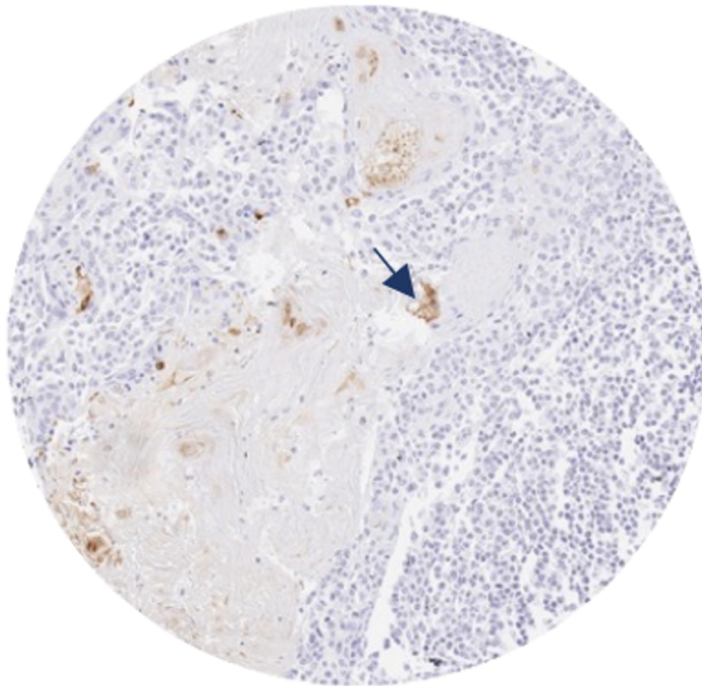


Abbildung 33: **Tonsille**. Moderate KLK7-Färbung von Einzelzellen. Antikörper MSVA-707M.

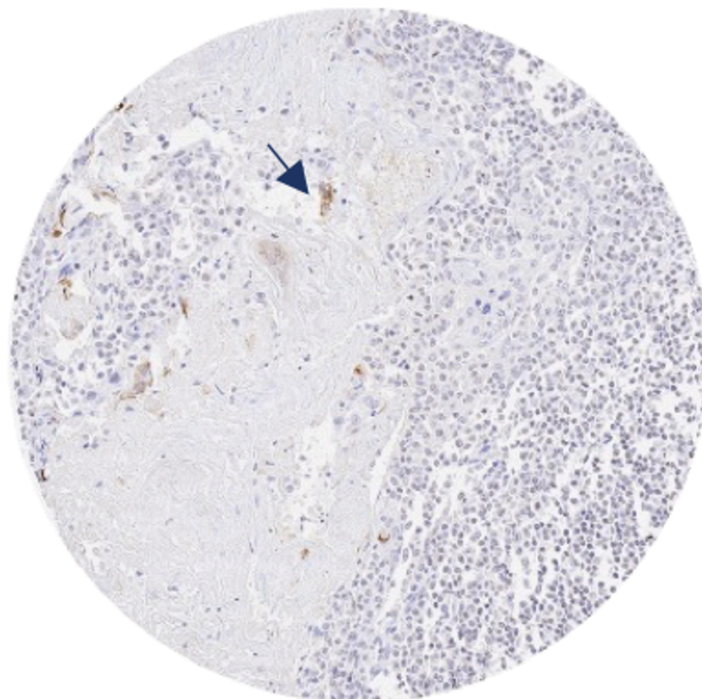


Abbildung 34: **Tonsille**. Moderate KLK7-Färbung von Einzelzellen. Vergleichsantikörper EPR22594-203.

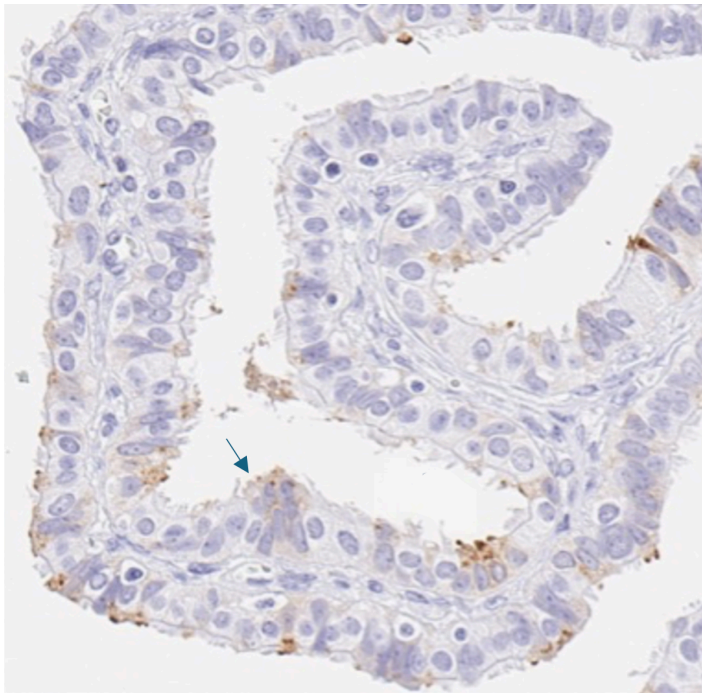


Abbildung 35: **Eileiter**. Moderate KLK7-Färbung vereinzelter Zellen. Antikörper MSVA-707M.

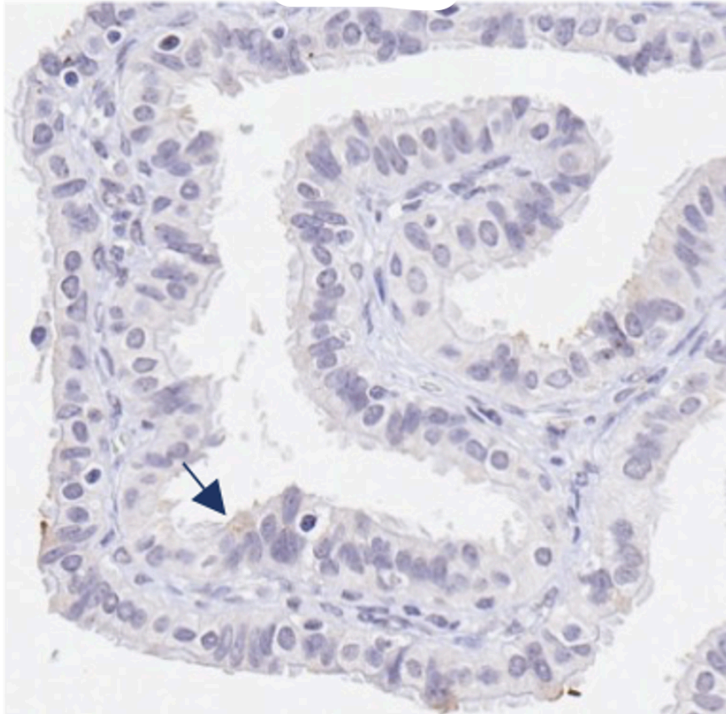


Abbildung 36: **Eileiter**. Schwächere KLK7-Färbung vereinzelter Zellen. Vergleichsantikörper EPR22594-203.

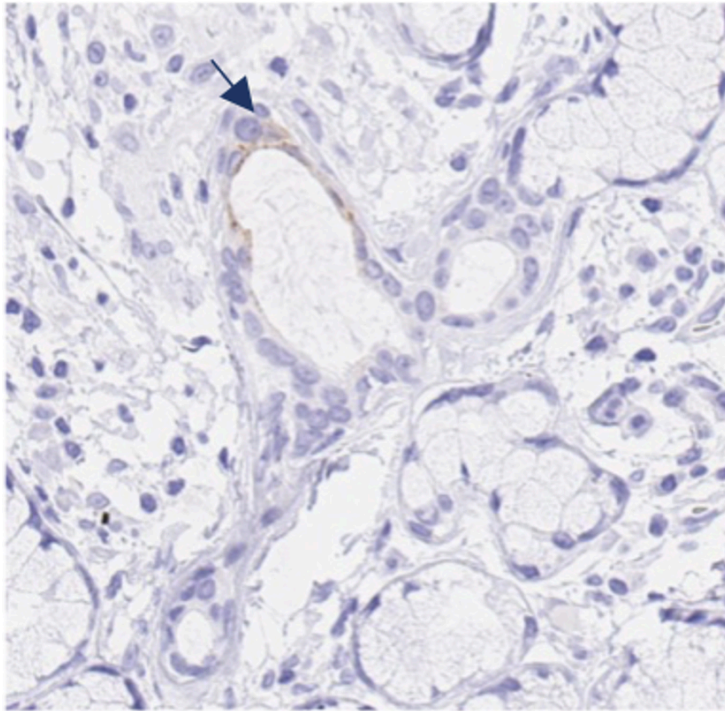


Abbildung 37: Speicheldrüse (Glandula submandibularis). Schwache KLK7-Färbung einzelner Epithelzellen. Antikörper MSVA-707M.

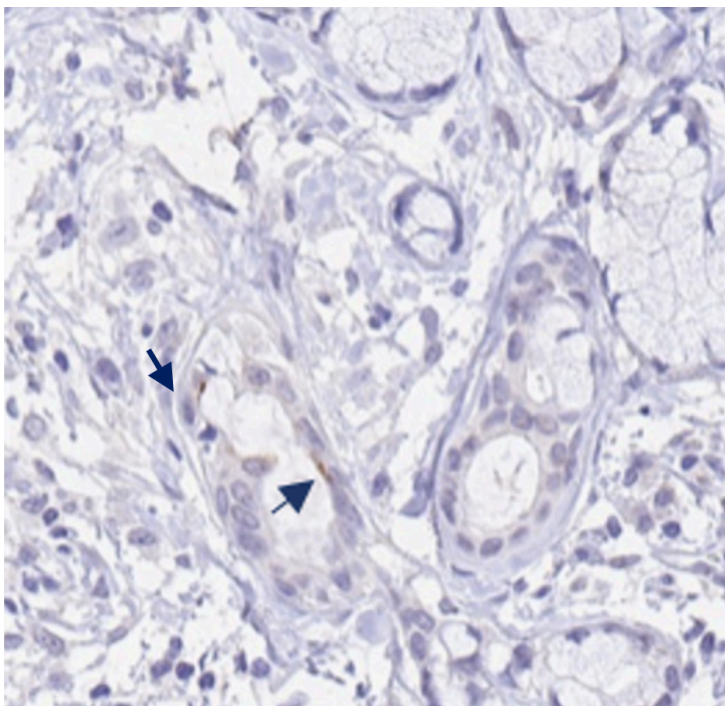


Abbildung 38: Speicheldrüse (Glandula submandibularis). Schwache KLK7-Färbung einzelner Epithelzellen. Vergleichsantikörper EPR22594-203.

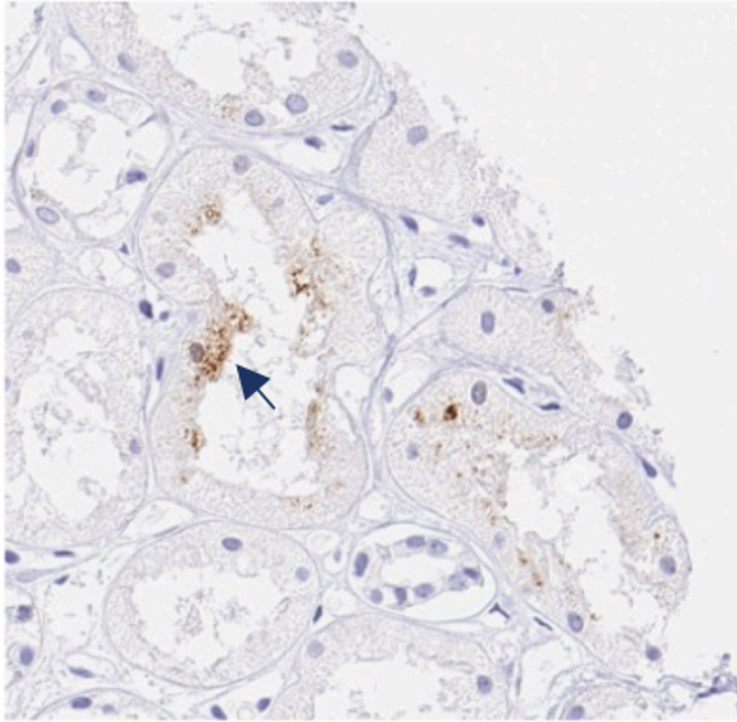


Abbildung 39: Niere (Cortex). Fokale KLK7-Färbung in wenigen Tubuli. Antikörper MSVA-707M.

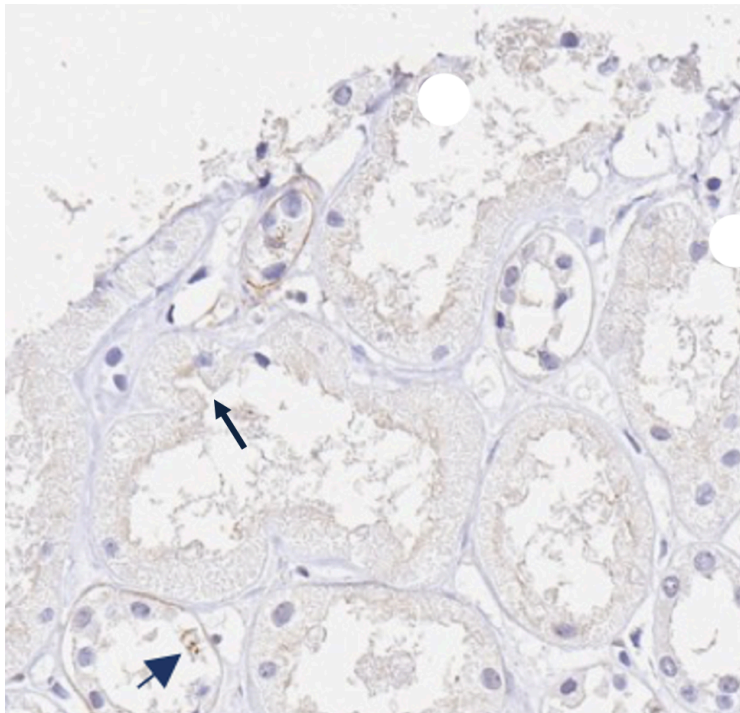


Abbildung 40: Niere (Cortex). Fokale KLK7-Färbung in wenigen Tubuli. Vergleichsantikörper EPR22594-203.

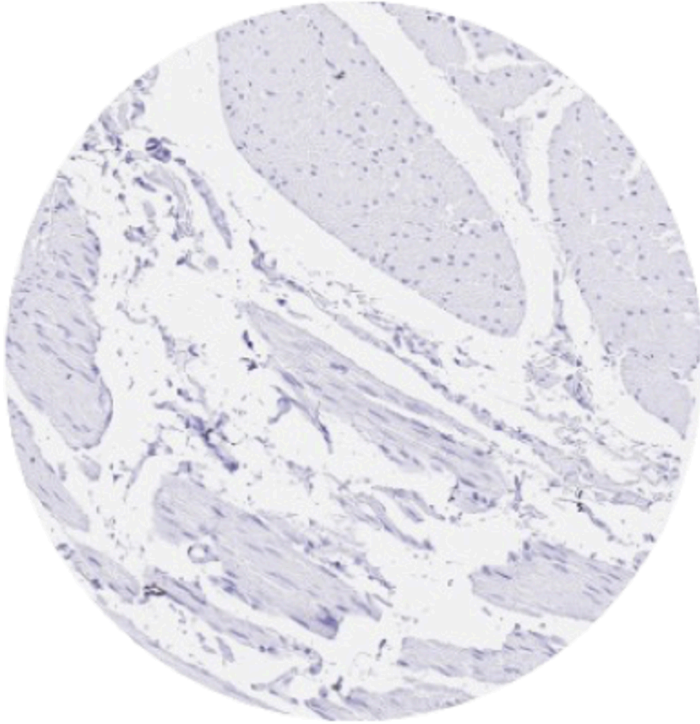


Abbildung 41: Glatte Muskulatur (Kolon). Keine Färbung. Antikörper MSVA-707M.

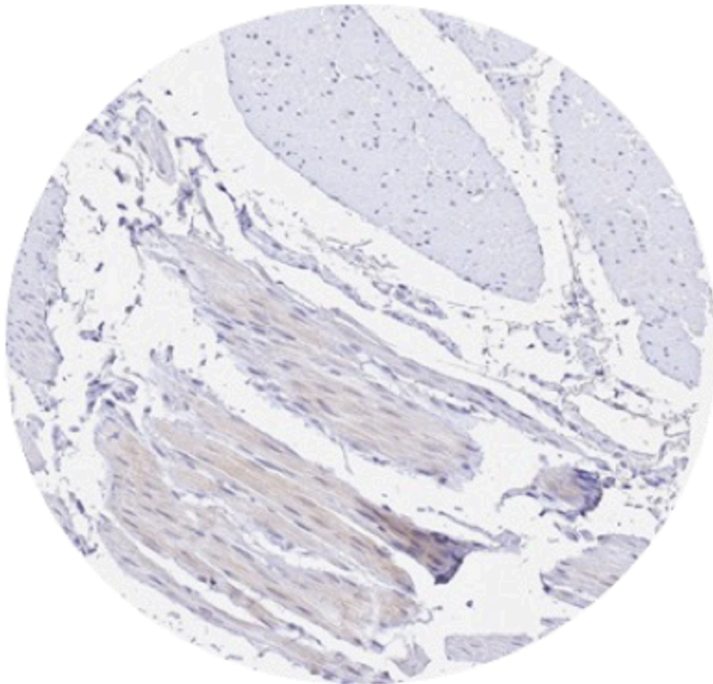


Abbildung 42: Glatte Muskulatur (Kolon). Geringe zytoplasmatische Färbung. Vergleichsantikörper EPR22594-203.

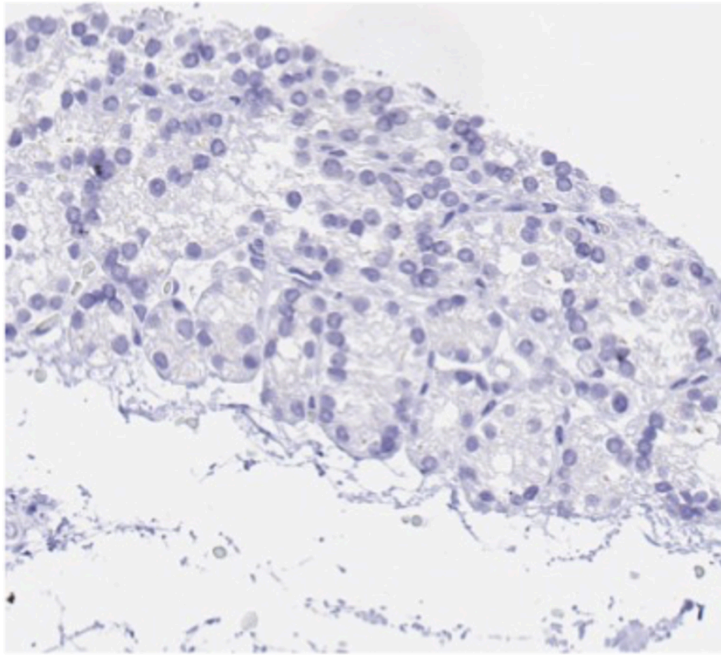


Abbildung 43: Nebenschilddrüse. Keine KLK7-Färbung. Antikörper MSVA-707M.

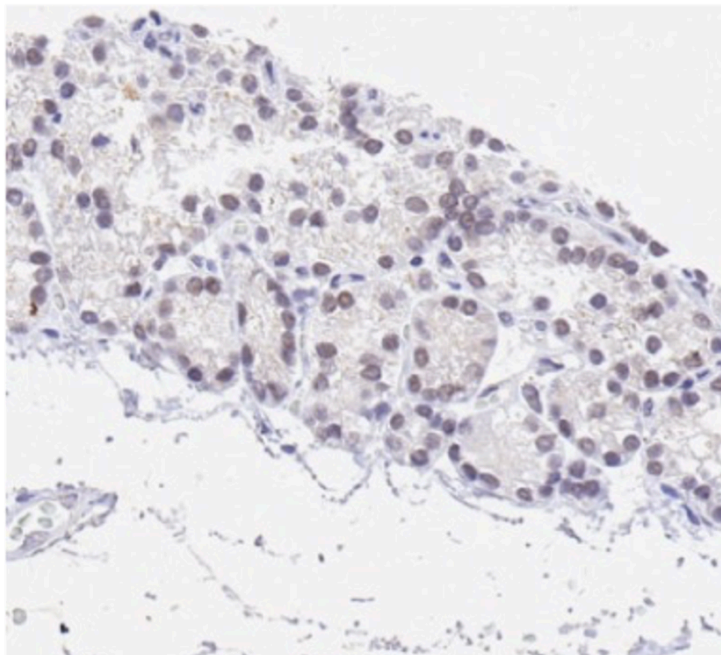


Abbildung 44: Nebenschilddrüse. Nukleäre Färbung der meisten Zellen. Vergleichsantikörper EPR22594-203.

3.3 KLK7 in Tumoren

Eine positive KLK7-Färbung lag in 1600 (13 %) von 12345 auswertbaren Tumoren vor. Darunter fielen 1352 (11 %) mit schwacher, 203 (1,6 %) mit mäßiggradiger und 45 (0,4 %) mit starker Färbung. In 64 (43,5 %) von 147 Tumorkategorien fand sich

mindestens ein Fall mit einer schwachen KLK7-Anfärbung, während nur 17 (11,6 %) der Tumorkategorien mindestens einen Fall mit einer starken KLK7-Positivität aufwiesen. Repräsentative Bilder von KLK7-positiven Tumoren sind in den Abbildungen 45 bis 55 gezeigt. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 5 organsystematisch und in Tabelle 6 und Abbildung 56 als Rangliste nach der Häufigkeit der positiven Fälle dargestellt. Am häufigsten fand sich eine KLK7-Positivität in Plattenepithelkarzinomen verschiedener Ursprungsorgane. In diesen Tumoren variierte die Positivitätsrate von 18,1–63,8 %. Dahinter folgten verschiedene Kategorien von Ovarial- und Endometriumkarzinomen (Positivitäten 4,8–56,2 %), Speicheldrüsentumoren (4,8–13,7 %), biliopankreatischen Adenokarzinomen (20–40,4 %) und Adenokarzinomen des oberen Gastrointestinaltrakts (3,3–12,5 %). Vierundzwanzig weitere Tumorentitäten zeigten eine meist schwache KLK7-Positivität in weniger als 9 % der Fälle.

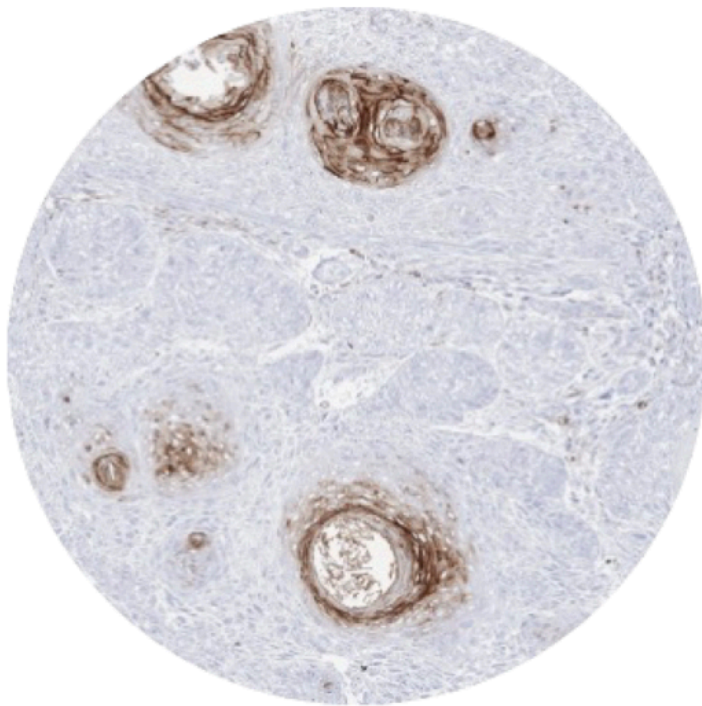


Abbildung 45: Plattenepithelkarzinom Vulva. Fokale KLK7-Färbung im Bereich der Keratinisierung.

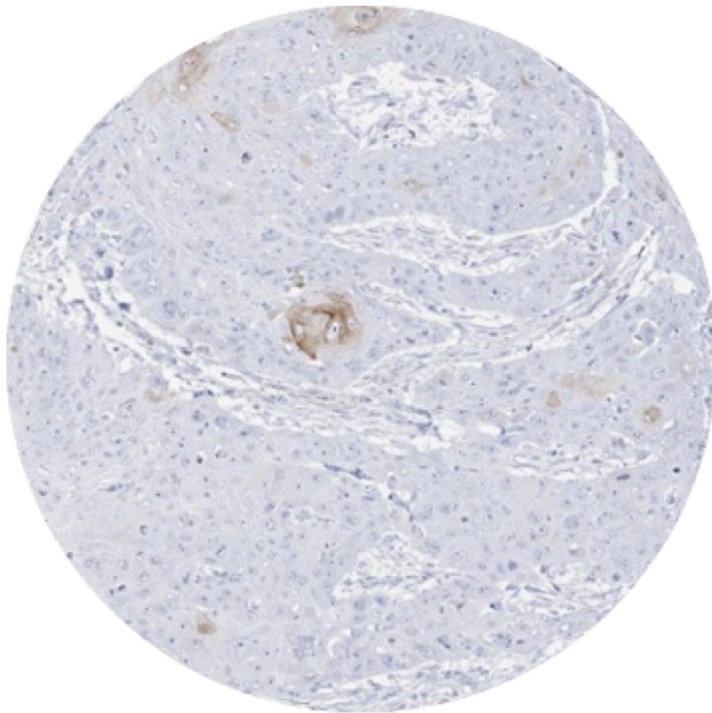


Abbildung 46: **Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle.** Fokale KLK7-Färbung im Bereich der Keratinisierung.

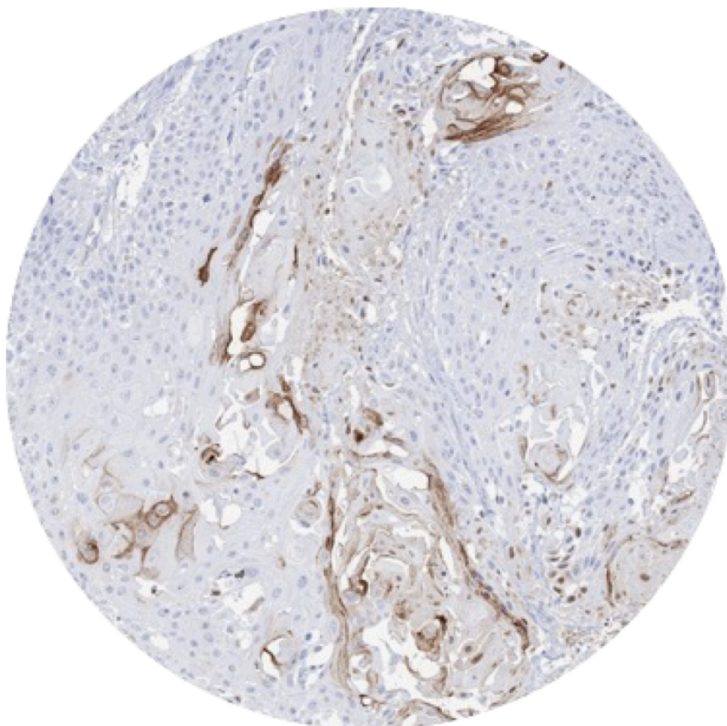


Abbildung 47: **Plattenepithelkarzinom der Harnblase.** Fokale KLK7-Färbung im Bereich der Keratinisierung.

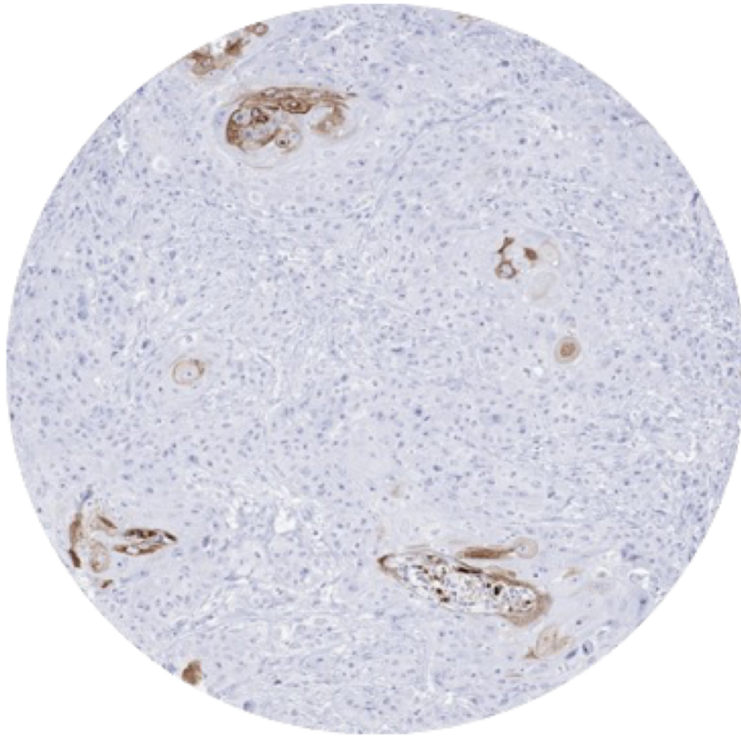


Abbildung 48: Urothelkarzinom der Harnblase. Fokale KLK7-Färbung.

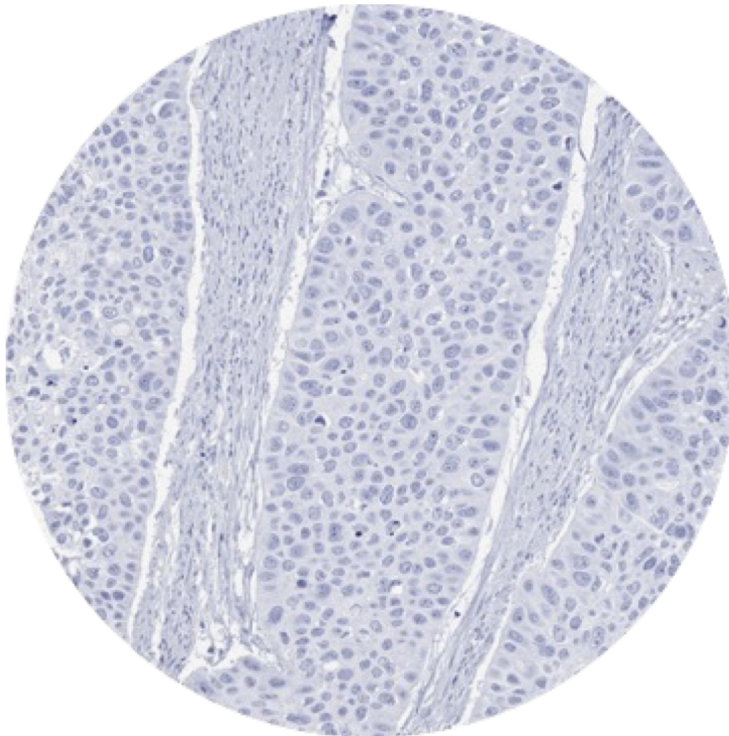


Abbildung 49: Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre (ohne Keratinisierung). Keine KLK7-Färbung.

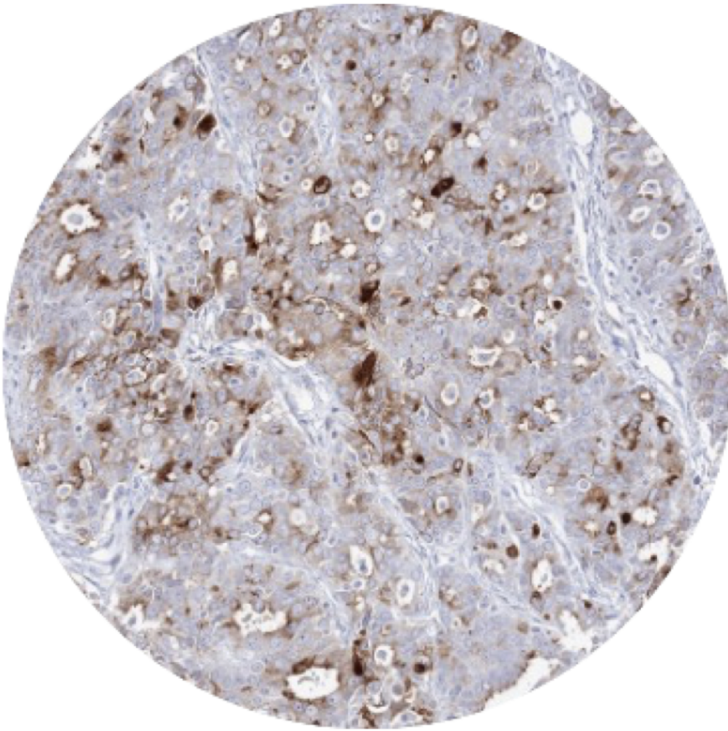


Abbildung 50: Seröses Ovarialkarzinom (high-grade). Starke KLK7-Färbung.

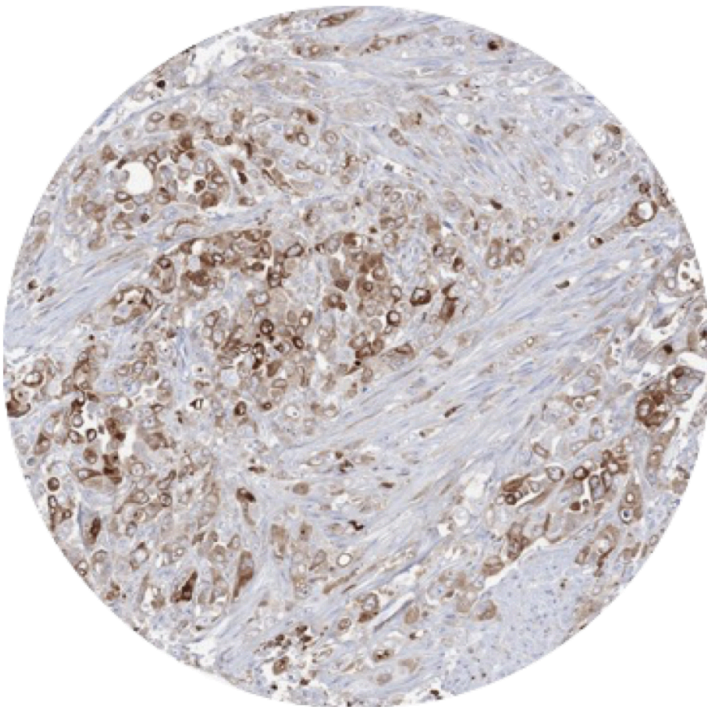


Abbildung 51: Adenokarzinom des Magens. Moderate bis starke KLK7-Färbung.

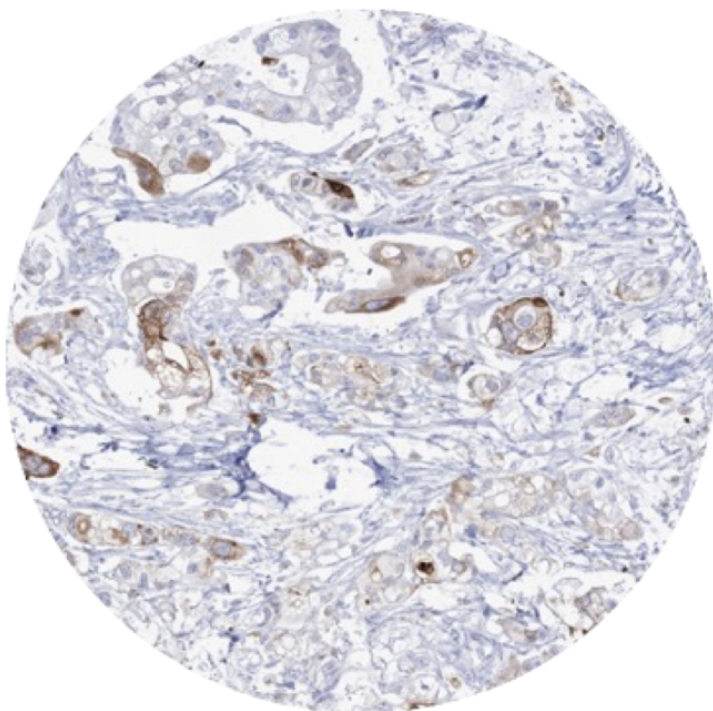


Abbildung 52: **Pankreas-Adenokarzinom.** Moderate KLK7-Färbung.

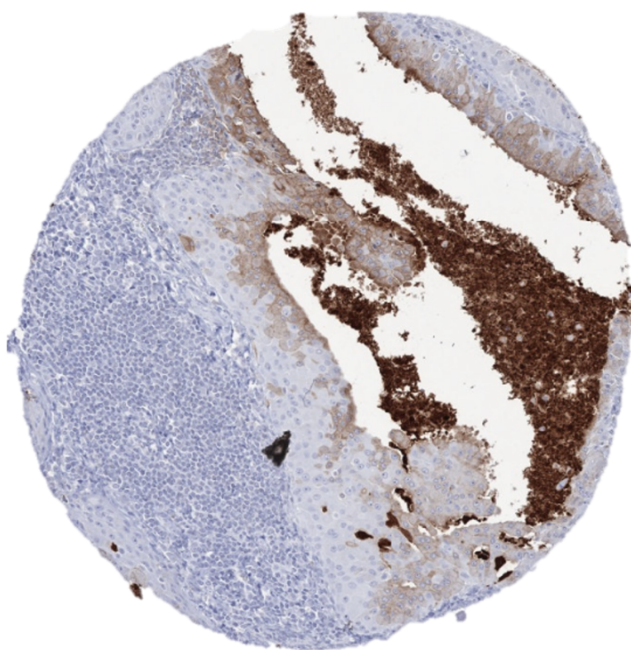


Abbildung 53: **Parotis (Warthin-Tumor).** Starke KLK7-Färbung.

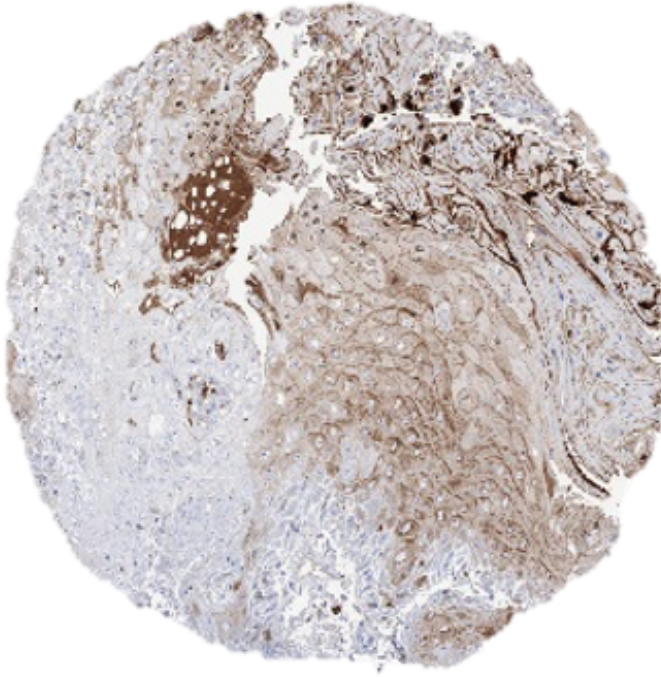


Abbildung 54: Plattenepithelkarzinom Larynx. Moderate bis starke KLK7-Färbung.

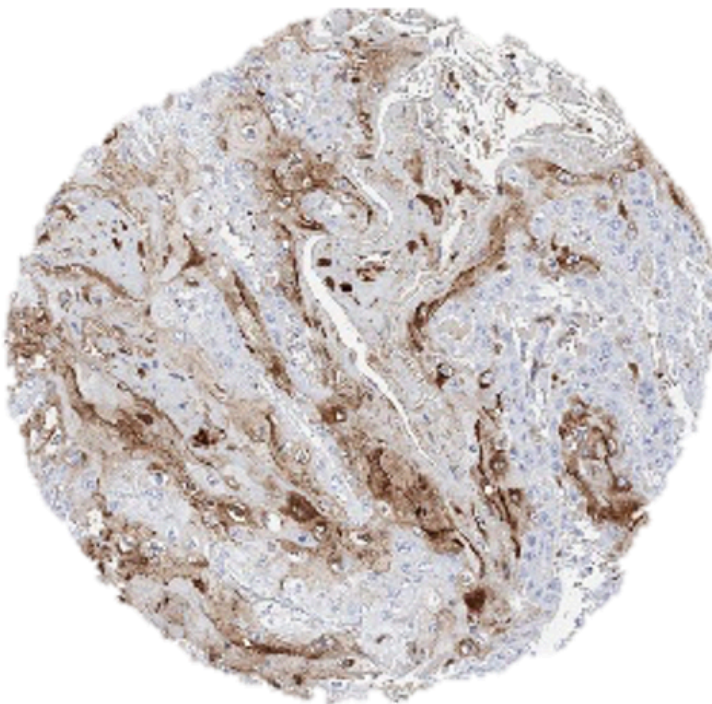


Abbildung 55: Plattenepithelkarzinom Vagina. Moderate bis starke KLK7-Färbung.

Tabelle 6: KLK7-Färbung der analysierbaren Fälle auf dem TMA

Organsystem	Entitäten/Subentitäten	Analysierbare Fallzahl (n)	negativ %	schwach %	moderat %	stark %
Tumoren der Haut	Pilomatrixom	23	100,0	0,0	0,0	0,0
	Basalzellkarzinom	75	84,0	9,3	6,7	0,0
	Nävuszellnävus	28	96,4	0,0	3,6	0,0
	Plattenepithelkarzinom der Haut	141	36,2	55,3	6,4	2,1
	Malignes Melanom	64	90,3	8,1	1,6	0,0
	Malignes Melanom Lymphknotenmetastasen	79	100,0	0,0	0,0	0,0
	Merkelzellkarzinom	43	100,0	0,0	0,0	0,0
Kopf-Hals-Tumoren	Plattenepithelkarzinom des Larynx	106	49,1	48,1	2,8	0,0
	Plattenepithelkarzinom des Pharynx	58	60,3	36,2	3,4	0,0
	Orales Plattenepithelkarzinom (Mundboden)	128	44,5	46,1	7,0	2,3
	Pleomorphes Adenom der Parotis	47	97,9	0,0	2,1	0,0
	Warthin-Tumor der Parotis	103	46,6	38,8	13,6	1,0
	Papilläres seröses Zystadenokarzinom (NOS)	12	100,0	0,0	0,0	0,0
	Speichelgangskarzinom	14	100,0	0,0	0,0	0,0
	Azinuszellkarzinom der Speicheldrüse	160	100,0	0,0	0,0	0,0
	Adenokarzinom der Speicheldrüse (NOS)	89	94,4	5,6	0,0	0,0
	Adenoidzystisches Karzinom der Speicheldrüse	118	89,0	11,0	0,0	0,0
	Basalzelladenom der Speicheldrüse	95	86,3	13,7	0,0	0,0
	Basalzelladenokarzinom der Speicheldrüse	23	87,0	13,0	0,0	0,0
	Epithelial-myoepitheliales Karzinom der Speicheldrüse	53	94,3	5,7	0,0	0,0

Fortsetzung Tabelle 6:

	Entitäten/Subentitäten	Analysierbare Fallzahl (n)	negativ %	schwach %	moderat %	stark %
Kopf-Hals-Tumoren	Mukoepidermoides Karzinom der Speicheldrüse	300	92,0	7,7	0,3	0,0
	Myoepitheliom der Speicheldrüse	10	90,0	10,0	0,0	0,0
	Myoepitheliales Karzinom der Speicheldrüse	21	95,2	4,8	0,0	0,0
	Onkozytäres Karzinom der Speicheldrüse	12	91,7	8,3	0,0	0,0
	Polymorphes niedriggradiges Adenokarzinom der Speicheldrüse	36	88,9	8,3	2,8	0,0
	Pleomorphes Adenom der Speicheldrüse	39	94,9	2,6	2,6	0,0
Tumoren der Lunge, Pleura und des Thymus	Adenokarzinom der Lunge	187	97,3	2,7	0,0	0,0
	Plattenepithelkarzinom der Lunge	72	81,9	16,7	1,4	0,0
	Kleinzelliges Lungenkarzinom	16	100,0	0,0	0,0	0,0
	Epitheloides Mesotheliom	35	97,1	2,9	0,0	0,0
	Andere Mesotheliome	72	98,6	0,0	1,4	0,0
	Thymom	28	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren des weiblichen Genitaltrakts	Plattenepithelkarzinom der Vagina	73	64,4	28,8	4,1	2,7
	Plattenepithelkarzinom der Vulva	145	43,4	48,3	4,8	3,4
	Plattenepithelkarzinom der Zervix	131	74,0	22,9	3,1	0,0
	Adenokarzinom der Zervix	23	91,3	4,3	4,3	0,0
	Endometrioides Endometriumkarzinom	289	93,1	6,6	0,3	0,0
	Seröses Endometriumkarzinom	73	84,9	12,3	1,4	1,4
	Karzinom des Uterus	42	97,6	2,4	0,0	0,0
	Endometriumkarzinom, high grade, G3	10	80,0	10,0	10,0	0,0
	Klarzelliges Endometriumkarzinom	8	87,5	12,5	0,0	0,0
	Endometrioides Ovarialkarzinom	106	76,4	18,9	3,8	0,9
	Seröses Ovarialkarzinom	527	43,8	45,5	8,5	2,1
	Muzinöses Ovarialkarzinom	80	81,3	16,3	1,3	1,3
	Klarzelliges Ovarialkarzinom	42	95,2	2,4	2,4	0,0
	Karzinom des Ovars	41	90,2	9,8	0,0	0,0
	Granulosazelltumor des Ovars	43	100,0	0,0	0,0	0,0

Fortsetzung Tabelle 6:

	Entitäten/Subentitäten	Analysierbare Fallzahl (n)	negativ %	schwach %	moderat %	stark %
Tumoren des weiblichen Genitaltrakts	Sertoli-Zelltumor des Ovars	1	100,0	0,0	0,0	0,0
	Sertoli-Leydig-Zelltumor des Ovars	3	100,0	0,0	0,0	0,0
	Steroidzelltumor des Ovars	3	100,0	0,0	0,0	0,0
	Brenner Tumor	41	97,6	2,4	0,0	0,0
Tumoren der Mamma	Invasives Mammakarzinom vom nicht speziellen Typ (NST)	68	95,6	1,5	2,9	0,0
	Lobuläres Mammakarzinom	108	99,1	0,9	0,0	0,0
	Medulläres Mammakarzinom	15	100,0	0,0	0,0	0,0
	Tubuläres Mammakarzinom	18	100,0	0,0	0,0	0,0
	Muzinöses Mammakarzinom	20	100,0	0,0	0,0	0,0
	Phylloides tumor	49	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren des Verdauungstrakts	Kolonadenom, niedriger Dysplasiegrad	50	100,0	0,0	0,0	0,0
	Kolonadenom, hoher Dysplasiegrad	48	97,9	2,1	0,0	0,0
	Adenokarzinom des Kolons	2354	92,3	7,2	0,5	0,0
	Magenadenokarzinom, diffuser Typ	209	96,7	2,9	0,5	0,0
	Magenadenokarzinom, intestinaler Typ	205	90,2	8,8	0,5	0,5
	Magenadenokarzinom, gemischter Typ	60	88,3	11,7	0,0	0,0
	Adenokarzinom des Ösophagus	80	87,5	10,0	0,0	2,5
	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	64	67,2	32,8	0,0	0,0
	Plattenepithelkarzinom des Analkanals	88	59,1	35,2	5,7	0,0
	Cholangiozelluläres Karzinom	57	91,2	7,0	0,0	1,8
	Adenokarzinom der Gallenblase	34	79,4	11,8	8,8	0,0
	Klatskin-Tumor	40	80,0	17,5	2,5	0,0
	Hepatozelluläres Karzinom	285	95,8	3,2	0,7	0,4
	Duktales Adenokarzinom des Pankreas	631	62,4	30,3	6,2	1,1
	Pankreas-/Ampulla-Vateri-Adenokarzinom	94	59,6	27,7	11,7	1,1
	Azinuszellkarzinom des Pankreas	15	100,0	0,0	0,0	0,0
	Gastrointestinale Stromatumoren (GIST)	62	100,0	0,0	0,0	0,0

Fortsetzung Tabelle 6:

	Entitäten/Subentitäten	Analysierbare Fallzahl (n)	negativ %	schwach %	moderat %	stark %
Tumoren der Harnwege	Urothelkarzinom pT2-4 G3	136	91,9	6,6	1,5	0,0
	Plattenepithelkarzinom der Harnblase	21	52,4	47,6	0,0	0,0
	Kleinzelliges neuroendokrines Blasenkarzinom	22	100,0	0,0	0,0	0,0
	Sarkomatoides Urothelkarzinom	24	95,8	0,0	4,2	0,0
	Urothelkarzinom des Nierenbeckens	59	96,6	1,7	1,7	0,0
	Klarzelliges Nierenzellkarzinom	41	100,0	0,0	0,0	0,0
	Papilläres Nierenzellkarzinom	31	100,0	0,0	0,0	0,0
	Chromophobes Nierenzellkarzinom	34	100,0	0,0	0,0	0,0
	Onkozytom	30	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren der männlichen Geschlechtsorgane	Adenokarzinom der Prostata, Gleason 3+3	83	100,0	0,0	0,0	0,0
	Adenokarzinom der Prostata, Gleason 4+4	76	100,0	0,0	0,0	0,0
	Adenokarzinom der Prostata, Gleason 5+5	82	98,8	1,2	0,0	0,0
	Adenokarzinom der Prostata, Rezidiv	246	100,0	0,0	0,0	0,0
	Kleinzelliges neuroendokrines Karzinom der Prostata	18	100,0	0,0	0,0	0,0
	Seminom des Hodens	93	100,0	0,0	0,0	0,0
	Embryonales Karzinom des Hodens	46	100,0	0,0	0,0	0,0
	Leydigzelltumor des Hodens	29	100,0	0,0	0,0	0,0
	Sertoli-Zelltumor des Hodens	2	100,0	0,0	0,0	0,0
	Keimstrang-Stromatumor des Hodens	1	100,0	0,0	0,0	0,0
	Spermatozytischer Tumor des Hodens	1	100,0	0,0	0,0	0,0
	Dottersacktumor des Hodens	43	100,0	0,0	0,0	0,0
	Teratom des Hodens	27	100,0	0,0	0,0	0,0
	Plattenepithelkarzinom des Penis	84	52,4	40,5	6,0	1,2
Endokrine Tumoren	Adenom der Schilddrüse	111	99,1	0,9	0,0	0,0
	Papilläres Schilddrüsenkarzinom	363	97,0	2,8	0,0	0,3
	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom	147	100,0	0,0	0,0	0,0
	Medulläres Schilddrüsenkarzinom	109	100,0	0,0	0,0	0,0
	Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom	42	100,0	0,0	0,0	0,0

Fortsetzung Tabelle 6:

	Entitäten/Subentitäten	Analysierbare Fallzahl (n)	negativ %	schwach %	moderat %	stark %
Endokrine Tumoren	Nebennierenadenom	38	100,0	0,0	0,0	0,0
	Nebennierenrindenkarzinom	28	100,0	0,0	0,0	0,0
	Phäochromozytom	50	100,0	0,0	0,0	0,0
	Neuroendokriner Tumor des Appendix	3	100,0	0,0	0,0	0,0
	Kolorektaler neuroendokriner Tumor	1	100,0	0,0	0,0	0,0
	Neuroendokriner Tumor des Ileums	4	100,0	0,0	0,0	0,0
	Neuroendokriner Tumor der Lunge	9	100,0	0,0	0,0	0,0
	Neuroendokriner Tumor des Pankreas	49	93,9	4,1	2,0	0,0
	Neuroendokrines Karzinom des Kolorektums	2	100,0	0,0	0,0	0,0
	Neuroendokrines Karzinom des Ileums	8	100,0	0,0	0,0	0,0
	Neuroendokrines Karzinom des Pankreas	3	100,0	0,0	0,0	0,0
Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes	Hodgkin-Lymphom	101	100,0	0,0	0,0	0,0
	Kleinzelliges lymphozytisches B-Zell-Lymphom	48	100,0	0,0	0,0	0,0
	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom	108	100,0	0,0	0,0	0,0
	Follikuläres Lymphom	84	100,0	0,0	0,0	0,0
	T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom	25	100,0	0,0	0,0	0,0
	Mantelzell-Lymphom	17	100,0	0,0	0,0	0,0
	Marginalzonenlymphom	15	100,0	0,0	0,0	0,0
	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom des Hodens	16	100,0	0,0	0,0	0,0
	Burkitt-Lymphom	4	100,0	0,0	0,0	0,0
Weichteil- und Knochentumoren	Tenosynovialer Riesenzelltumor	45	100,0	0,0	0,0	0,0
	Granularzelltumor	48	100,0	0,0	0,0	0,0
	Leiomyom	50	100,0	0,0	0,0	0,0
	Leiomyosarkom	93	100,0	0,0	0,0	0,0
	Liposarkom	142	100,0	0,0	0,0	0,0
	Maligner peripherer Nervenscheidentumor	15	100,0	0,0	0,0	0,0
	Myofibrosarkom	26	100,0	0,0	0,0	0,0
	Angiosarkom	68	100,0	0,0	0,0	0,0
	Angiomyolipom	91	100,0	0,0	0,0	0,0
	Dermatofibrosarcoma protuberans	19	100,0	0,0	0,0	0,0

Fortsetzung Tabelle 6:

Weichteil- und Knochentumoren	Entitäten/Subentitäten	Analysierbare Fallzahl (n)	negativ %	schwach %	moderat %	stark %
	Kaposi-Sarkom	6	100,0	0,0	0,0	0,0
	Neurofibrom	97	100,0	0,0	0,0	0,0
	Undifferenzierte Sarkome	72	100,0	0,0	0,0	0,0
	Paragangliom	40	100,0	0,0	0,0	0,0
	Ewing-Sarkom	19	100,0	0,0	0,0	0,0
	Rhabdomyosarkom	7	100,0	0,0	0,0	0,0
	Schwannom	112	100,0	0,0	0,0	0,0
	Synovialsarkom	11	100,0	0,0	0,0	0,0
	Osteosarkom	38	100,0	0,0	0,0	0,0
	Chondrosarkom	29	100,0	0,0	0,0	0,0
	Rhabdoidtumor	5	100,0	0,0	0,0	0,0

Tabelle 7: Rangliste der positiv gefärbten Tumorgewebe nach absteigender Positivität

Tumortyp	≥ schwach (%)	≥ moderat (%)	stark (%)
Plattenepithelkarzinom der Haut	63,8	8,5	2,1
Plattenepithelkarzinom der Vulva	56,6	8,3	3,4
Seröses Ovarialkarzinom	56,2	10,6	2,1
Orales Plattenepithelkarzinom (Mundboden)	55,5	9,4	2,3
Warthin-Tumor der Parotis	53,4	14,6	1,0
Plattenepithelkarzinom des Larynx	50,9	2,8	0,0
Plattenepithelkarzinom der Harnblase	47,6	0,0	0,0
Plattenepithelkarzinom des Penis	47,6	7,1	1,2
Plattenepithelkarzinom des Analkanals	40,9	5,7	0,0
Pankreas-/Ampulla-Vateri-Adenokarzinom	40,4	12,8	1,1
Plattenepithelkarzinom des Pharynx	39,7	3,4	0,0
Duktales Adenokarzinom des Pankreas	37,6	7,3	1,1
Plattenepithelkarzinom der Vagina	35,6	6,8	2,7
Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	32,8	0,0	0,0
Plattenepithelkarzinom der Zervix	26,0	3,1	0,0
Endometrioides Ovarialkarzinom	23,6	4,7	0,9
Adenokarzinom der Gallenblase	20,6	8,8	0,0
Endometriumkarzinom, high grade, G3	20,0	10,0	0,0
Klatskin-Tumor	20,0	2,5	0,0
Muzinöses Ovarialkarzinom	18,8	2,5	1,3
Plattenepithelkarzinom der Lunge	18,1	1,4	0,0
Basalzellkarzinom	16,0	6,7	0,0
Seröses Endometriumkarzinom	15,1	2,7	1,4
Basalzelladenom der Speicheldrüse	13,7	0,0	0,0
Basalzelladenokarzinom der Speicheldrüse	13,0	0,0	0,0
Klarzelliges Endometriumkarzinom	12,5	0,0	0,0
Adenokarzinom des Ösophagus	12,5	2,5	2,5
Magenadenokarzinom, gemischter Typ	11,7	0,0	0,0
Polymorphes niedriggradiges Adenokarzinom der Speicheldrüse	11,1	2,8	0,0
Adenoidzystisches Karzinom der Speicheldrüse	11,0	0,0	0,0

Fortsetzung Tabelle 7:

Tumortyp	≥ schwach (%)	≥ moderat (%)	stark (%)
Myoepitheliom der Speicheldrüse	10,0	0,0	0,0
Karzinom des Ovars	9,8	0,0	0,0
Magenadenokarzinom, intestinaler Typ	9,8	1,0	0,5
Cholangiozelluläres Karzinom	8,8	1,8	1,8
Adenokarzinom der Zervix	8,7	4,3	0,0
Onkozytisches Karzinom der Speicheldrüse	8,3	0,0	0,0
Urothelkarzinom pT2-4 G3	8,1	1,5	0,0
Mukoepidermoides Karzinom der Speicheldrüse	8,0	0,3	0,0
Adenokarzinom des Kolons	7,7	0,5	0,0
Endometrioides Endometriumkarzinom	6,9	0,3	0,0
Neuroendokriner Tumor des Pankreas	6,1	2,0	0,0
Epithelial-myoepitheliales Karzinom der Speicheldrüse	5,7	0,0	0,0
Adenokarzinom der Speicheldrüse (NOS)	5,6	0,0	0,0
Pleomorphes Adenom der Speicheldrüse	5,1	2,6	0,0
Myoepitheliales Karzinom der Speicheldrüse	4,8	0,0	0,0
Klarzelliges Ovarialkarzinom	4,8	2,4	0,0
Invasives Mammakarzinom ohne besondere Merkmale	4,4	2,9	0,0
Hepatozelluläres Karzinom	4,2	1,1	0,4
Sarkomatoides Urothelkarzinom	4,2	4,2	0,0
Urothelkarzinom des Nierenbeckens	3,4	1,7	0,0
Magenadenokarzinom, diffuser Typ	3,3	0,5	0,0
Papilläres Schilddrüsenkarzinom	3,0	0,3	0,3
Epitheloides Mesotheliom	2,9	0,0	0,0
Adenokarzinom der Lunge	2,7	0,0	0,0
Brenner Tumor	2,4	0,0	0,0
Karzinom des Uterus	2,4	0,0	0,0
Pleomorphes Adenom der Parotis	2,1	2,1	0,0
Adenomatöser Polyp, hoher Dysplasiegrad	2,1	0,0	0,0
Andere Mesotheliome	1,4	1,4	0,0
Adenokarzinom der Prostata, Gleason 5+5	1,2	0,0	0,0
Lobuläres Mammakarzinom	0,9	0,0	0,0
Adenom der Schilddrüse	0,9	0,0	0,0

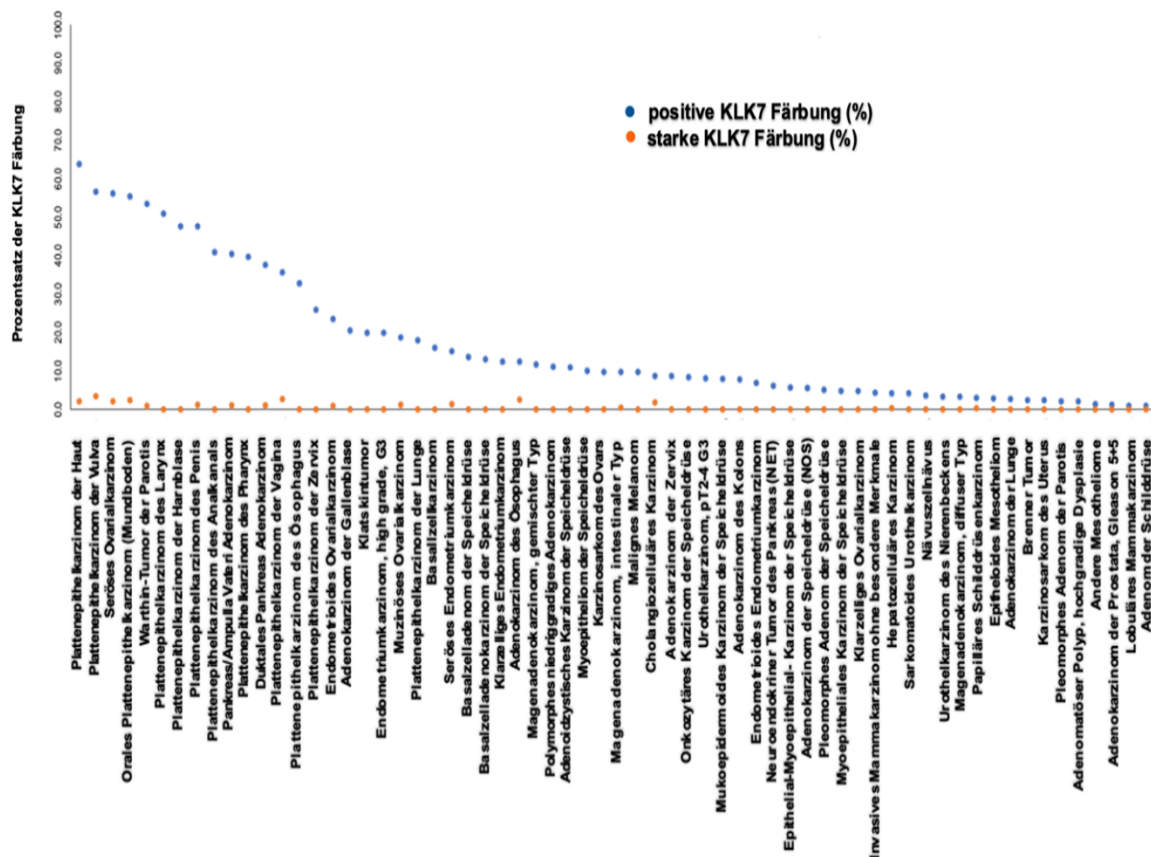


Abbildung 56: Positivitäten der gefärbten Tumortypen. Dargestellt in absteigender Reihenfolge.

3.4 KLK7-Expression und histopathologischer bzw. molekularpathologischer Phänotyp

Ausreichend große Tumorkollektive, die Vergleiche zwischen der KLK7-Expression und dem histopathologischen oder molekularen Tumorphänotyp erlaubten, lagen für Karzinome von Kolon, Magen, Pankreas, Leber, Endometrium, Ovar, Schilddrüse und Plattenepithel vor. Die Befunde sind nachstehend dargestellt.

3.4.1 KLK7-Expression beim Kolonkarzinom

Die Beziehung zwischen dem histologischen Phänotyp und histopathologischen Parametern bzw. der Tumorlokalisation ist in Tabelle 7 dargestellt. Dabei fand sich eine signifikante Assoziation zwischen dem Vorliegen einer nachweisbaren KLK7-Expression und einem positiven Nodalstatus ($p = 0,0005$), einem L1-Status ($p < 0,0001$), einer Tumordinfiltration von Blutgefäßen ($p = 0,0037$) und einer Tumorlokalisation im rechtsseitigen Colon ($p = 0,0088$).

Tabelle 8: KLK7-Immunhistochemie und Phänotyp beim Kolonkarzinom

Alle Tumoren	Anzahl (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	p-Wert
pT1	88	95.5	4.5	0.0	0.0	0.6353
pT2	442	93.7	6.1	0.2	0	
pT3	1258	91.9	7.5	0.6	0.0	
pT4	451	92.0	7.5	0.4	0.0	
pN0	1177	94.0	5.9	0.1	0.1	0.0005
pN+	1057	90.4	8.7	0.9	0.0	
V0	1611	92.8	7.0	0.1	0.1	0.0037
V+	590	90.8	7.8	1.4	0.0	
L0	739	95.5	4.3	0.0	0.1	<0.0001
L1	1474	90.6	8.6	0.7	0.0	
links	1265	94.3	5.5	0.2	0.0	0.0088
rechts	459	90.0	9.4	0.7	0.0	

3.4.2 KLK7-Expression beim Magenkarzinom

Die Beziehung zwischen histopathologischen Parametern bzw. Mikrosatelliteninstabilität und der KLK7-Expression ist in Tabelle 8 dargestellt. Dabei fand sich kein Zusammenhang zwischen der KLK7-Expression und dem pT- oder pN-Status bzw. dem Vorliegen einer Mikrosatelliteninstabilität.

Tabelle 9: KLK7-Immunhistochemie und Phänotyp beim Magenkarzinom

Alle Tumoren	Anzahl (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	p-Wert
diffus	92	96.7	2.2	1.1	0.0	0.1035
intestinal	88	94.3	5.7	0.0	0.0	
gemischt	60	88.3	11.7	0.0	0.0	
pT1-2	59	89.8	10.2	0.0	0.0	0.4286
pT3	128	89.8	10.2	0.0	0.0	
pT4	125	95.2	4.8	0.0	0.0	
pN0	77	93.9	6.1	0.0	0.0	0.5413
pN1	208	90.8	8.7	0.0	0.4	
MS stabil	255	90.2	8.6	0.8	0.4	0.8144
MS instabil	40	90.0	10.0	0.0	0.0	

3.4.3 KLK7-Expression beim Pankreaskarzinom

Die Beziehung zwischen histopathologischen Parametern und der KLK7-Expression ist in Tabelle 9 dargestellt. Dabei ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge zu Tumorstadium, Differenzierungsgrad, Nodalstatus und Tumorbefall des Resektionsrandes.

Tabelle 10: KLK7-Immunhistochemie und Phänotyp beim Pankreaskarzinom

	Anzahl (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	p-Wert
pT1	15	73.3	26.7	0	0	0.2744
pT2	72	63.9	29.2	6.9	0	
pT3	398	61.8	29.9	6.8	1.5	
pT4	31	74.2	12.9	12.9	0	
Grad 1	17	70.6	23.5	0	5.9	0.3752
Grad 2	366	62.3	29.8	7.4	0.5	
Grad 3	109	64.2	27.5	6.4	1.8	
pN0	114	63.2	29.8	5.3	1.8	0.7658
pN+	401	63.3	28.2	7.5	1	
R0	261	67	26.4	5.7	0.8	0.2911
R1	215	59.5	30.7	7.9	1.9	
MS stabil	464	64	28.9	6.3	0.9	0.3143
MS instabil	4	100	0	0	0	

3.4.4 Leberzellkarzinom und KLK7-Expression

Die Beziehung zwischen histopathologischen Parametern und der KLK7-Expression ist in Tabelle 10 dargestellt. Es hat sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Vorliegen einer KLK7-Expression und einem positiven Nodalstatus ($p = 0,0382$) ergeben.

Tabelle 11: KLK7-Immunhistochemie und Phänotyp beim Leberzellkarzinom

Alle Tumoren	Anzahl (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	p-Wert
pT1	72	95.8	1.4	2.8	0.0	0.1118
pT2	109	87.2	11.0	0.9	0.9	
pT3-4	76	93.4	5.3	1.3	0.0	
pN0	93	93.5	4.3	2.2	0.0	0.0382
pN+	62	80.6	16.1	3.2	0.0	
Grad 1	36	97.2	2.8	0.0	0.0	0.4041
Grad 2	157	90.4	6.4	2.5	0.6	
Grad 3	61	91.8	8.2	0.0	0.0	

3.4.5 KLK7-Expression beim Endometriumkarzinom

Die Zusammenhänge zwischen pT- und pN-Status beim Endometriumkarzinom und der KLK7-Expression sind in Tabelle 11 dargestellt. Es wurden keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den untersuchten Parametern festgestellt.

Tabelle 12: KLK7-Immunhistochemie und Phänotyp beim Endometriumkarzinom

	Anzahl (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	p-Wert
pT1	87	94.3	5.7	0.0	0.0	0.1207
pT2	22	95.5	0.0	4.5	0.0	
pT3-4	27	88.9	11.1	0.0	0.0	
pN0	42	90.5	9.5	0.0	0.0	0.3566
pN+	24	87.5	8.3	4.2	0.0	

3.4.6 KLK7-Expression beim Ovarialkarzinom

Die Beziehung zwischen pT- und pN-Status und KLK7-Expression ist für das endometrioiden und das seröse Ovarialkarzinom in Tabelle 12 und 13 dargestellt. Diese Untersuchungen ergaben keine signifikanten Zusammenhänge.

Tabelle 13: KLK7-Immunhistochemie und Phänotyp beim endometrioiden Ovarialkarzinom

	Anzahl (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	p-Wert
pT1	24	83.3	16.7	0.0	0.0	0.3779
pT2	4	75.0	25.0	0.0	0.0	
pT3	5	100.0	0.0	0.0	0.0	
pN0	19	84.2	15.8	0.0	0.0	0.6824
pN1	9	77.8	22.2	0.0	0.0	

Tabelle 14: KLK7-Immunhistochemie und Phänotyp beim serösen Ovarialkarzinom

	Anzahl (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	p-Wert
pT1	36	38.9	52.8	8.3	0.0	0.5420
pT2	43	44.2	48.8	4.7	2.3	
pT3	261	49.4	40.2	9.6	0.8	
pN0	83	44.6	44.6	9.6	1.2	0.4142
pN1	163	47.2	46.0	6.7	0.0	

3.4.7 KLK7-Expression beim Schilddrüsenkarzinom

Die Beziehung zwischen KLK7-Expression und pT- bzw. pN-Status beim papillären Schilddrüsenkarzinom ist in Tabelle 14 dargestellt. Die Untersuchung ergab

einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer nachweisbaren KLK7-Expression und dem Vorliegen eines fortgeschrittenen Tumorstadiums ($p = 0,0132$).

Tabelle 15: KLK7-Immunhistochemie und Phänotyp beim Schilddrüsenkarzinom (papillär)

	Anzahl (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	p-Wert
pT1	140	98.6	1.4	0.0	0.0	0.0132
pT2	75	100.0	0.0	0.0	0.0	
pT3-4	98	91.8	7.1	0.0	1.0	
pN0	85	95.3	4.7	0.0	0.0	0.2076
pN+	120	98.3	1.7	0.0	0.0	

3.4.8 KLK7-Expression beim Plattenepithelkarzinom

Die Beziehung zwischen KLK7-Expression und dem histologischen Phänotyp einer Kohorte von Plattenepithelkarzinomen verschiedener Ursprungsorgane ist in Tabelle 15 dargestellt. Die Daten zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem Nachweisen der KLK7-Expression und einem hohen (niedrigmalignen) Differenzierungsgrad ($p < 0,0001$). Der Vergleich zwischen der KLK7-Expression und dem Vorliegen einer HPV-Infektion ergab bei Zusammenfassung von Tumoren aller Art ($p = 0,0738$) und in Untergruppen von oralen, pharyngealen, laryngealen, zervikalen, vaginalen, vulvären, penilen, analen und dermalen Plattenepithelkarzinomen keine signifikanten Zusammenhänge ($p > 0,05$).

Tabelle 16: KLK7-Immunhistochemie und Phänotyp beim Plattenepithelkarzinom verschiedener Ursprungsorgane

	Anzahl (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	p-Wert
pT1	278	58.6	37.1	2.2	2.2	0.4833
pT2	279	59.9	34.8	4.7	0.7	
pT3	150	54.0	42.0	2.7	1.3	
pT4	137	54.0	40.9	4.4	0.7	
pN0	331	58.3	36.3	3.9	1.5	0.3838
pN+	321	60.7	36.4	2.2	0.6	
Grad 1	34	44.1	38.2	14.7	2.9	<0.0001
Grad 2	418	45.5	47.6	4.8	2.2	
Grad 3	267	70.0	28.5	1.1	0.4	

Tabelle 17: KLK7 vs. HPV-Infektion bei Plattenepithelkarzinomen

	HPV-Status	Anzahl (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	p-Wert
Alle PleCa	negativ	313	50.2	42.8	4.5	2.6	0.0738
	positiv	234	59.8	34.6	4.7	0.9	
Orale PleCa	negativ	65	43.1	44.6	7.7	4.6	0.7654
	positiv	12	50.0	41.7	8.3	0.0	
Pharynx PleCa	negativ	21	52.4	38.1	9.5	0.0	0.1216
	positiv	34	64.7	35.3	0.0	0.0	
Larynx PleCa	negativ	50	44.0	56.0	0.0	0.0	0.0562
	positiv	9	77.8	22.2	0.0	0.0	
Zervix PleCa	negativ	9	55.6	44.4	0.0	0.0	0.3313
	positiv	68	72.1	23.5	4.4	0.0	
Vagina PleCa	negativ	15	66.7	33.3	0.0	0.0	0.4870
	positiv	15	60.0	33.3	0.0	6.7	
Vulva PleCa	negativ	52	46.2	50.0	0.0	3.8	0.0671
	positiv	26	34.6	50.0	11.5	3.8	
Penis PleCa	negativ	30	50.0	40.0	6.7	3.3	0.6262
	positiv	39	48.7	43.6	7.7	0.0	
Haut PleCa	negativ	38	47.4	44.7	2.6	5.3	0.6646
	positiv	1	0.0	100.0	0.0	0.0	
Analkanal PleCa	negativ	5	60.0	40.0	0.0	0.0	0.8315
	positiv	31	61.3	32.3	3.2	0.0	

4 Diskussion

Die erfolgreich durchgeführte Untersuchung von 12345 Tumoren aus 147 Tumortypen und Subtypen führte zum Nachweis einer KLK7-Expression in 64 Tumorkategorien. Dies ermöglichte uns, eine Rangliste der Tumortypen nach Häufigkeit der KLK7-Positivitäten aufzustellen. Zu den am häufigsten und am stärksten KLK7-positiven Tumoren gehörten Plattenepithelkarzinome von verschiedenen Ursprungsorten, Ovarialkarzinome, pankreatische Adenokarzinome und Speicheldrüsentumoren. Dieses Ergebnis ist mit den öffentlich verfügbaren RNA-Expressionsdaten des ICGC (International Cancer Genome Consortium) und der Cancer Genome (TCGA) vereinbar (<https://www.cancer.gov/tcga>). Diese Institutionen hatten besonders hohe KLK7-Positivitätsraten in HNO-, Ovarial- und Pankreaskarzinomen beschrieben. Die Daten unseres Projekts erweitern die existierenden Daten zur KLK7-Proteinexpression. In den von uns identifizierten, immunhistochemischen Untersuchungen zur KLK7-Expression in Tumoren fanden sich Daten zu 1646 individuellen Tumoren aus 14 verschiedenen Tumorentitäten (Zusammenfassung in Abbildung 57). In diesen Studien waren überwiegend höhere Positivitätsraten beschrieben worden als in unserer Studie. Beispielsweise fand sich eine KLK7-Positivität von jeweils $\geq 90\%$ in drei Studien zum Ovarialkarzinom, drei Studien zu Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle (Dorn et al., 2014; Shigemasa et al., 2001; Wang et al., 2018), einer Studie zum Adenokarzinom des Colons (Walker et al., 2014), einer Studie zum Adenokarzinom der Zervix (Termini et al., 2010) und einer Studie zu verschiedenen Subtypen von Nierenzellkarzinomen (Gabril et al., 2010). Diese Diskrepanz zu unseren Befunden könnte am ehesten der Verwendung unterschiedlicher Antikörper, unterschiedlicher Färbebedingungen (Protokolle) und unterschiedlicher Definitionen zur Klassifizierung eines Tumorfalls als ‚KLK-positiv‘ zugeschrieben werden. Die existierenden Daten zur KLK7-RNA-Expression in Tumoren deuten allerdings – ebenso wie unsere Befunde – auf eine geringe Häufigkeit von hochgradig KLK7-exprimierenden Tumoren in den meisten Tumorentitäten hin. Dass die KLK7-Positivitätsrate und das Ausmaß der Positivität bei Plattenepithelkarzinomen verschiedener Ursprungsorgane besonders hoch sind, war aufgrund der Funktion des Proteins erwartet worden. KLK7 übt eine zentrale Rolle bei der Desquamation von Korneozyten aus. Diese Desquamation ist nicht nur im normalen Plattenepithel, sondern auch bei Tumoren von Bedeutung (Okegawa et al., 2004). Passend zu dieser spezifischen Funktion von KLK7 fand sich eine Expression des Proteins überwiegend in denjenigen Abschnitten von Plattenepithelkarzinomen, die auch Verhornungszeichen aufwiesen. Da

die Verhornung ein Kriterium für die Diagnose eines niedrig malignen Differenzierungsgrads darstellt, ist es nicht erstaunlich, dass die KLK7-Expression in Plattenepithelkarzinomen aller Art hochsignifikant mit einem günstigen Differenzierungsgrad assoziiert war. Ähnliche Befunde waren von unserer Arbeitsgruppe (Uhlig et al., 2022) und anderen (Travis et al., 2015) auch für Cytokeratin 10 ausgestellt worden. Cytokeratin 10 ist ein anderes Protein, das insbesondere in der Verhornungszone von Plattenepithelien exprimiert wird (Uhlig et al., 2022). In Übereinstimmung mit den Befunden unserer Studie hatten Leusink et al. (Leusink et al., 2015) bereits früher einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer kräftigen KLK7-Immunfärbung und einer günstigen Patientenprognose in einer Kohorte von 83 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle gefunden. Allerdings gibt es auch Studien, in denen bei Plattenepithelkarzinomen von einem Zusammenhang zwischen besonders ausgeprägter KLK7-Proteinexpression und ungünstigen histopathologischen Prognoseparametern oder einer ungünstigen Patientenprognose berichtet wurde, nämlich in zwei Studien an 30 und 80 Karzinomen der Mundhöhle (Kumar et al., 2020; Zhao et al., 2011). Zur Erklärung der Diskrepanz zwischen diesen Befunden und unseren Daten könnten wiederum verschiedene Antikörper, Färbeprotokolle und Interpretationskriterien infrage kommen, aber auch die in den zitierten Studien geringen Patientenzahlen ($n = 30/80$). Eine ungünstige Prognose KLK7-exprimierender Tumoren ist vereinbar mit experimentellen In-vitro- und In-vivo-Daten, die auf eine Rolle des KLK7-Proteins bei Tumorentstehung, Tumorprogression und Metastasierung hindeuteten (zusammengefasst in (Xiang et al., 2022)). Das KLK7-Zymogen wird in der extrazellulären Matrix aktiviert, um so verschiedene extrazelluläre Matrixsubstrate wie Fibronectin1/FN1 (Silva et al., 2019), Thrombospondin1/TSP1 (Silva et al., 2019), verschiedene Membranproteine, z. B. E-Cadherin (Johnson et al., 2007), Desmoglein/DSG 1 und 2 (Ramani et al., 2008), sezernierte Substrate, z. B. Insulin Growth Factor Binding/IGFBP 3 und 6 (Silva et al., 2019) und andere Substrate, z. B. Midkin (Yu et al., 2015), Pro-Matrix-Metalloprotease/MMP10 (Silva et al., 2019) zu hydrolysieren. In mehreren Studien wurde ein onkogener Effekt des KLK7-Proteins vorgeschlagen. Diese Studien deuten auf direkte Einflüsse von KLK7 auf die Zellproliferation (Delaunay et al., 2017; Yu et al., 2015), die Zell-Zell-Adhäsion (Ramani & Haun, 2008a; Ramani et al., 2008; Silva et al., 2019), die Zellablösung (Silva et al., 2019), die Tumorzellmigration (Mo et al., 2010; Silva et al., 2019; Yu et al., 2015), die Tumorzellinvasion (Delaunay et al., 2017; Johnson et al., 2007; Mo et al., 2010; Yu et al., 2015), die extrazelluläre Matrixorganisation (Ramani & Haun,

2008b; Silva et al., 2019), die epitheliale mesenchymale Transformation (Johnson et al., 2007; Mo et al., 2010), die Angiogenese (Silva et al., 2019; Xiang et al., 2022) und die metabolische Reprogrammierung (Silva et al., 2019; Xiang et al., 2022) hin. Die Effekte von KLK7 bestehen insbesondere durch KLK7-mediierte Inaktivierung oder Aktivierung von KLK7-Substraten, beispielsweise führt die KLK7-mediierte Inaktivierung von E-Cadherin – ein kritisches Ereignis der epithelialen mesenchymalen Transformation – und DSG1/DSG2 zu einer Förderung der Metastasierung durch eine gesteigerte Zellinvasion und -Migration von Tumorzellen bzw. eine verminderte Zell-Zelladhäsion. Eine KLK7-mediierte Inaktivierung von TSP1 soll zu einer gesteigerten Zellproliferation, Tumorzellmigration, Tumorzellinvasion sowie KLK7-induzierten Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Regelsystems und der VEGFR2-Aktivität führen (Bazzazi et al., 2018; Bussolati et al., 2006; Silva et al., 2019). Eine KLK7-mediierte Inaktivierung von IGFBP3 und 6 soll durch die Aktivierung von PIK3/Akt, MEK/ERK und Wnt/ β -Catenin die Regelsysteme zu einer forcierten Zellproliferation führen, während über den PI3K/Akt/mTOR-Regelweg Glykolyse, Glykogensynthese und Gluconeogenese beeinflusst werden (Bach, 2018; Hoxhaj & Manning, 2020; Silva et al., 2019). Die durch KLK7 induzierte Aktivierung von proMMP10 und proMMP9 dürfte ebenfalls einen positiven Effekt auf die Zellteilung von Tumorzellen, das invasive Wachstum und die Zellmigration ausüben, wahrscheinlich durch die MMP-mediierte Hydrolyse von extrazellulärer Matrix und Basalmembrankomponenten (Davidson et al., 2002; Ramani et al., 2011; Silva et al., 2019). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine forcierte KLK7-Expression in Melanom-Zelllinien zu einem Übergang von einem proliferativen in einen invasiven Phänotyp führen kann (Delaunay et al., 2017). Im Gegensatz zu all diesen funktionellen Daten ergaben die Befunde unserer Studie keine deutlichen Anhaltspunkte für einen entscheidenden prognostischen Einfluss der KLK7-Expression in verschiedenen Tumorarten. Nur 7 von 28 Analysen, bei denen die KLK-Immunfärbung mit prognostisch relevanten morphologischen Parametern verglichen werden konnte, führten zu statistisch signifikanten Assoziationen. Angesichts der großen Gesamtzahl statistischer Analysen ($n = 28$) ergibt die notwendige Anpassung der zu fordernden statistischen Signifikanzwerte (Bonferroni-Korrektur) einen p-Wert von $\leq 0,0018$ für eine valide Aussage zu einer möglichen klinischen Bedeutung. Nach Anwendung der Bonferroni-Korrektur erwiesen sich die meisten statistischen Assoziationen zwischen der KLK7-Expression und den prognostisch relevanten Tumorparametern als nicht mehr valide. Allerdings ist trotzdem auffällig, dass vier der sieben ursprünglich signifikanten Zusammenhänge die Parameter

‚Lymphknotenmetastasierung‘ und ‚Blut- oder Lymphgefäßinvasionen‘ betrafen. Diese Beobachtungen wären in der Tat vereinbar mit einer klinisch relevanten Rolle der KLK7-Expression in Tumoren mit Zelldissoziation und Metastasierung.

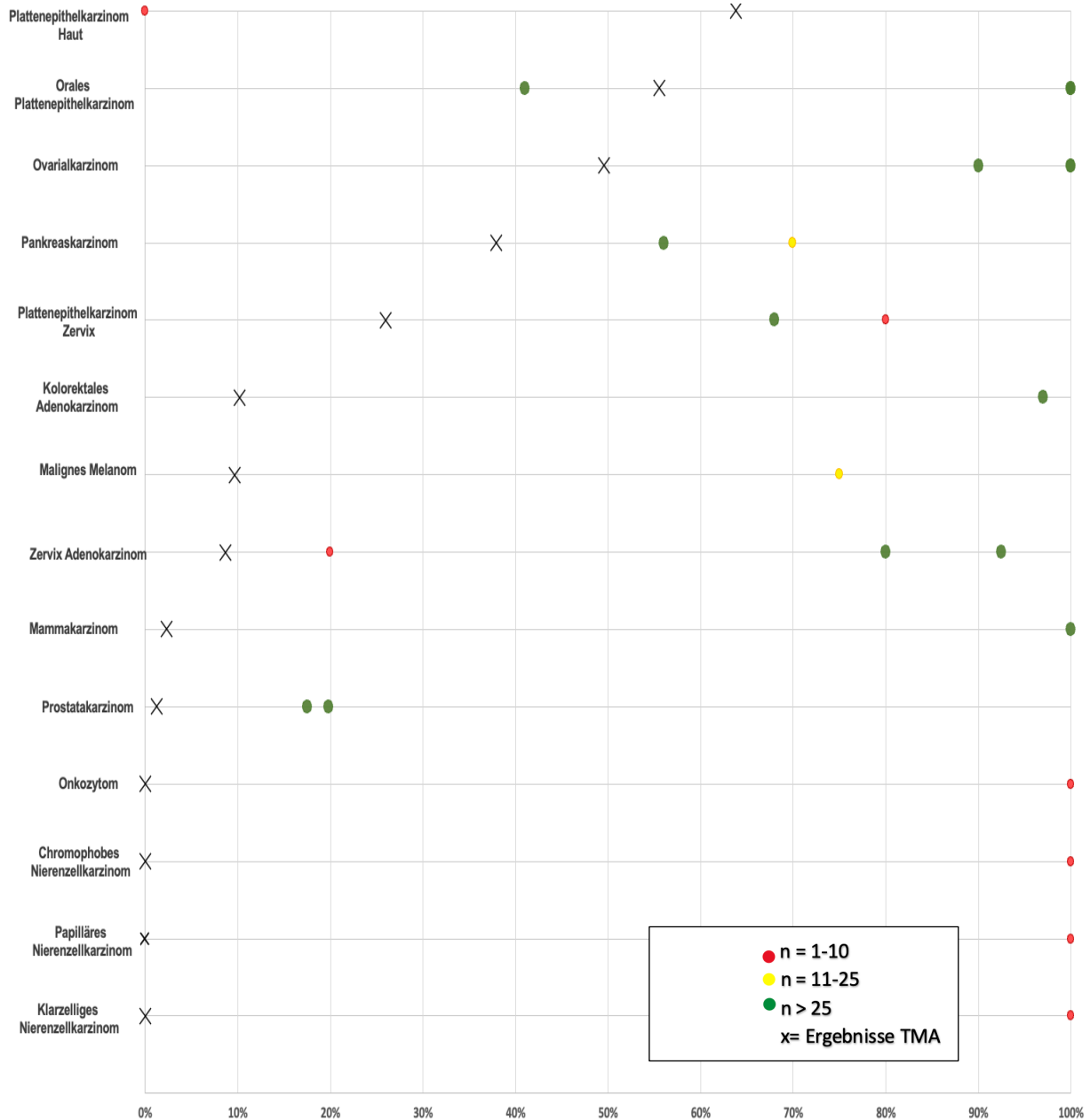


Abbildung 57: Vergleich der Positivitäten der KLK7-Färbung unserer Studie mit früheren Studien.

Die Kreuze geben unsere Ergebnisse an, jeder Punkt kennzeichnet eine Studie, in der der Tumortyp zuvor untersucht wurde. Die Größe der eingeschlossenen Tumoren pro Studie ist farblich dargestellt. Rote Punkte entsprechen einer Teilnehmerzahl von eins bis zehn, gelbe Punkte einer Teilnehmerzahl von elf bis 25 und grüne einer Teilnehmerzahl von mehr als 25.

Literaturverweise zu den Daten aus Abbildung 57:

Chromophobes Nierenzellkarzinom:

(Gabril et al., 2010)

Klarzelliges Nierenzellkarzinom:

(Gabril et al., 2010)

Kolorektales Adenokarzinom:

(Walker et al., 2014)

Malignes Melanom:

(Delaunay et al., 2017)

Mammakarzinom:

(Geng et al., 2020)

Onkozytom:

(Gabril et al., 2010)

Orales Plattenepithelkarzinom:

(Kumar et al., 2020; Leusink et al., 2015; Pettus et al., 2009; Zhao et al., 2011)

Ovarialkarzinom:

(Dorn et al., 2014; Shigemasa et al., 2001; Wang et al., 2018)

Pankreaskarzinom:

(Iakovlev et al., 2012; Johnson et al., 2007)

Papilläres Nierenzellkarzinom:

(Gabril et al., 2010)

Plattenepithelkarzinom Haut:

(Johnson et al., 2003)

Plattenepithelkarzinom Zervix:

(Santin et al., 2004; Termini et al., 2010)

Prostatakarzinom:

(Xuan et al., 2008; Zhang et al., 2015)

Zervix Adenokarzinom:

(Santin et al., 2004; Termini et al., 2010; Tian et al., 2004)

Da KLK7 nur in einer geringen Zahl von Normalgewebe exprimiert wird und in Tumoren, die sich aus KLK7-negativen Normalgeweben entwickeln, eine De-novo-KLK7-Expression auftreten kann, ist KLK7 prinzipiell ein geeignetes Zielprotein für zielgerichtete Krebsmedikamente. In mehreren Studien wurde eine tumorsuppressive Wirkung einer KLK7-Inhibierung gezeigt, entweder durch humanisierte Anti-KLK7-Antikörper oder kleine inhibitorische Moleküle (zusammengefasst in (Xiang et al., 2022)). Dies passt zu funktionellen In-vivo- und In-vitro-Studien, in denen ein tumorinhibierender Effekt der KLK7-Hemmung gezeigt wurde. Beispielsweise hatten kleine KLK7-

inhibierende Moleküle erfolgreich die Proliferation, Migration und Invasion von Pankreastumorzelllinien und die Dissoziation von plantaren Stratum-corneum-Zellen gehemmt. Die Befunde dieser Studien suggerieren, dass im Falle einer erfolgreichen Entwicklung von KLK7-Hemmstoffen mit dokumentierter Wirkung auf KLK7-exprimierende Tumoren Karzinome der Ovarien, des Endometriums, des Pankreas oder der Gallenblase die optimalen Kandidaten für eine Anti-KLK7-Therapie darstellen könnten.

Angesichts der ungewöhnlichen Größe unserer Studie wurde der von uns eingesetzte immunhistochemische Ansatz ausgedehnt validiert. Zu diesem Zweck wurden die mit unserem Antikörper MSVA-707M an Normalgewebe erzielten Ergebnisse zum einen mit RNA-Expressions-Daten und zum anderen mit den Färbeergebnissen verglichen, die mit einem zweiten unabhängigen Anti-KLK7-Antikörper (EPR22594-203) erzielt wurden. Die zu Vergleichszwecken benötigten RNA-Expressions-Daten zu KLK7 wurden aus drei öffentlich zugänglichen Datenbanken (*FANTOM5 Project*, *Human Protein Atlas*, *Genotype-Tissue Expression Project*) entnommen (Consortium, 2013; Karlsson et al., 2021; Lizio et al., 2017; Lizio et al., 2015), die auf der Homepage des *The Human Protein Atlas*, www.proteinatlas.org, zusammengefasst wurden. Um eine möglichst große Menge verschiedener Proteine auf eine potenzielle Reaktivität oder Kreuzreaktivität mit unserem KLK7-Antikörper zu testen, wurden 76 verschiedene Normalgewebekategorien in die Normalgewebeanalyse eingeschlossen. Diese dienten gleichzeitig der Antikörpervalidierung, denn durch die Vielfalt der Normalgewebe wurde die überwiegende Mehrzahl, der in erwachsenen Geweben in relevanter Menge exprimierten Proteine auf Kreuzreaktivität getestet. Die Validität unseres Assays und die Spezifität unseres Antikörpers wurden durch den Nachweis einer signifikanten KLK7-Immunfärbung in Organen mit dokumentierter KLK7-RNA-Expression unterstützt. Hierzu gehören Ösophagus, Speicheldrüse, Niere, Vagina, Zervix, Tuba uterina, Tonsille und die Haut. Die Mamma war das einzige Organ mit dokumentierter RNA-Expression und fehlendem Nachweis einer KLK7-Anfärbung mit unserem Antikörper. Da eine KLK7-RNA-Expression des Mammagewebes auch in einer der verwendeten RNA-Expressionsdatenbanken (FANTOM 5) nicht nachweisbar war (Lizio et al., 2017; Lizio et al., 2015), wäre es möglich, dass der KLK7-Befund in den anderen Datenbanken durch eine Verunreinigung einiger Mammaproben durch bedeckende Haut verursacht worden ist. Die umfangreiche immunhistochemische Analyse erlaubte zudem einen KLK7-Proteinnachweis in Hassall'schen Körperchen des Thymus, obwohl die KLK7-RNA-Analyse zum Thymus keinen Nachweis von KLK7-RNA ergab. Im Thymus macht der

geringe Anteil an KLK7-positiven Zellen nur einen so kleinen Teil der Gesamtzellzahl aus, dass KLK7-RNA in RNA-Proben, die aus dem gesamten Organgewebe extrahiert wurden, möglicherweise nicht in nachweisbaren Mengen vorkommt. Eine echte Expression von KLK7 in Hassall'schen Körperchen ist nicht nur aufgrund der plattenepithelialen Natur dieser Struktur plausibel, sondern wurde auch durch die Verwendung des zweiten unabhängigen Antikörpers EPR22594-203 validiert. Dass der zu der Validierung herangezogene zweite Antikörper EPR22594-203 ein von MSVA-707M unabhängiger Antikörper ist, wird auch dadurch dokumentiert, dass dieser neben plattenepithelialen Strukturen auch das Zytoplasma von glatter Muskulatur und verschiedener anderer Gewebe sowie Zellkerne färbte.

Der ungewöhnliche Umfang dieser Studie wurde ermöglicht durch die Verwendung der Tissue-Microarray-Technik, insbesondere aber auch durch das große, sorgfältig dokumentierte Tumorarchiv der drei beteiligten Pathologien sowie ausgedehnte Vorarbeiten früherer Doktoranden und anderer Forscher, die das jetzige existierende TMA-Archiv des Instituts erstellt und laufend erneuert haben. Da die immunhistochemische Untersuchung unserer 13447 Tumoren und 608 Normalgeweben für den mit der Aufgabe betrauten Pathologen (PD. Dr. med. Stefan Steurer) insgesamt nur weniger als eine Woche Arbeitszeit in Anspruch nahm, wäre es denkbar, TMA-Studien an noch deutlich größeren Tumorkollektiven durchzuführen. Der wesentlichste Vorteil einer Ausweitung der aktuell erarbeiteten Tumorkollektive wären eine vermehrte Zahl seltener Tumoren und die Zusammenführung deutlich größerer Kollektive der häufigen Tumorarten mit klinisch-pathologischen Daten. Kollektive klinisch bedeutsamer und häufiger Tumorarten würden es deutlich erleichtern, klinisch relevante Beziehungen zwischen Biomarkern und histomorphologischen Parametern für Tumoraggressivität zu identifizieren und damit mögliche Prognosemarker zu finden.

Zusammengefasst geben unserer Daten einen umfassenden Überblick über die Prävalenz der KLK7-Expression in einer breiten Palette humaner Tumoren. Die Daten zeigen, dass eine KLK7-Expression insbesondere bei Plattenepithelkarzinomen verschiedener Ursprungsorgane vorkommt, aber auch bei Ovarialkarzinomen, bei Neoplasien der Gallengänge, des Pankreas und des oberen Gastrointestinaltraktes. Für die Zukunft scheinen insbesondere Untersuchungen der prognostischen Bedeutung der KLK7-Expression und der möglichen Bedeutung von KLK7 als Zielprotein für Krebsmedikamente weitere lohnende Forschungsprojekte darzustellen.

5 Zusammenfassung

Die Kallikrein-related Peptidase 7 (KLK7) ist eine Chymotrypsin-ähnliche Serinprotease, die für die Abschuppung von Korneozyten unerlässlich ist. Sie spielt bei der Aufrechterhaltung der Hauthomöostase eine zentrale Rolle. Bisher wird vermutet, dass eine Überexpression von KLK7 bei Tumorerkrankungen einen Weg zur Metastasierung durch Spaltung von Zellverbindungsproteinen und extrazellulären Matrixproteinen von Tumorzellen darstellt. Um die KLK7-Proteinexpression in normalem und neoplastischem Gewebe zu bestimmen, wurde ein Tissue-Microarray mit 13 447 Proben von 147 verschiedenen Tumorarten und -subtypen sowie 608 Proben von 76 verschiedenen normalen Gewebetypen immunhistochemisch analysiert. Eine KLK7-Positivität wurde in 64 von 147 Tumorkategorien gefunden, darunter befanden sich 17 Tumorkategorien mit mindestens einem stark positiven Fall. Die höchste KLK7-Positivitätsrate wurde bei Plattenepithelkarzinomen verschiedener Herkunft (positiv in 18,1–63,8 %), Eierstock- und Endometriumkarzinomen (4,8–56,2 %), Speicheldrüsentumoren (4,8–13,7 %), bilio-pankreatischen Adenokarzinomen (20,0–40,4 %) und Adenokarzinomen des oberen Gastrointestinaltrakts (3,3–12,5 %) festgestellt. Die KLK7-Positivität stand im Zusammenhang mit Lymphknotenmetastasen ($p = 0,0005$), Blutgefäßinfiltration ($p = 0,0037$) und Lymphgefäßinfiltration ($p < 0,0001$) bei kolorektalen Adenokarzinomen, mit Lymphknotenmetastasen bei hepatozellulären Karzinomen ($p = 0,0382$), mit einem fortgeschrittenen pT Stadium bei papillärem Schilddrüsenkrebs ($p = 0,0132$) und einem niedrigen Malignitätsgrad in einer Kohorte von 719 Plattenepithelkarzinomen aus elf verschiedenen Ursprungsorganen ($p < 0,0001$). Zusammenfassend ermöglichen unsere Daten einen Überblick über die Expression von KLK7 in normalen und neoplastischen humanen Geweben. Die prognostische Bedeutung der KLK7-Expression und die mögliche

6 English Summary

Kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) is a chymotrypsin-like serine protease which is essential for the desquamation of corneocytes and thus plays a pivotal role in maintaining skin homeostasis. In cancer, KLK7 overexpression was suggested to represent a route for metastasis through cleavage of cell junction and extracellular matrix proteins of cancer cells. To comprehensively determine KLK7-Protein expression in normal and neoplastic tissues, a tissue microarray containing 13,447 samples from 147 different tumor types and subtypes as well as 608 samples of 76 different normal tissue types was analyzed by immunohistochemistry. KLK7 positivity was found in 64 of 147 tumor categories, including 17 tumor categories with at least one strongly positive case. The highest rate of KLK7 positivity was found in squamous cell carcinomas from various sites of origin (positive in 18.1–63.8 %), ovarian and endometrium cancers (4.8–56.2 %), salivary gland tumors (4.8–13.7 %), bilio-pancreatic adenocarcinomas (20.0–40.4 %), and adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract (3.3–12.5 %). KLK7 positivity was linked to nodal metastasis ($p = 0.0005$), blood vessel infiltration ($p = 0.0037$), and lymph vessel infiltration ($p < 0.0001$) in colorectal adenocarcinoma, nodal metastasis in hepatocellular carcinoma ($p = 0.0382$), advanced pathological tumor stage in papillary thyroid cancer ($p = 0.0132$), and low grade of malignancy in a cohort of 719 squamous cell carcinomas from 11 different sites of origin ($p < 0.0001$). In summary, these data provide a comprehensive overview on KLK7-Expression in normal and neoplastic human tissues. The prognostic relevance of KLK7-Expression and the possible role of KLK7 as a drug target need to be further investigated.

7 Literaturverzeichnis

- Bach, L. A. (2018). What Happened to the IGF Binding Proteins? *Endocrinology*, 159(2), 570-578. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00908>
- Barrett, A. J. (2001). Proteases. *Curr Protoc Protein Sci*, Chapter 21, Unit 21.21. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps2101s21>
- Bazzazi, H., Zhang, Y., Jafarnejad, M., Isenberg, J. S., Annex, B. H., & Popel, A. S. (2018). Computer Simulation of TSP1 Inhibition of VEGF-Akt-eNOS: An Angiogenesis Triple Threat. *Front Physiol*, 9, 644. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00644>
- Beaubien, G., Rosinski-Chupin, I., Mattei, M. G., Mbikay, M., Chrétien, M., & Seidah, N. G. (1991). Gene structure and chromosomal localization of plasma kallikrein. *Biochemistry*, 30(6), 1628-1635. <https://doi.org/10.1021/bi00220a027>
- Bhoola, K. D., Figueroa, C. D., & Worthy, K. (1992). Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev*, 44(1), 1-80. <https://pharmrev.aspetjournals.org/content/pharmrev/44/1/1.full.pdf>
- Borgono, C. A., Michael, I. P., Komatsu, N., Jayakumar, A., Kapadia, R., Clayman, G. L., Sotiropoulou, G., & Diamandis, E. P. (2007). A potential role for multiple tissue kallikrein serine proteases in epidermal desquamation. *J Biol Chem*, 282(6), 3640-3652. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607567200>
- Brattsand, M., & Egelrud, T. (1999). Purification, molecular cloning, and expression of a human stratum corneum trypsin-like serine protease with possible function in desquamation. *J Biol Chem*, 274(42), 30033-30040. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.42.30033>
- 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>
- Bubendorf, L., Nocito, A., Moch, H., & Sauter, G. (2001). Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol*, 195(1), 72-79. <https://doi.org/10.1002/path.893>
- Bussolati, B., Assenzio, B., Derigibus, M. C., & Camussi, G. (2006). The proangiogenic phenotype of human tumor-derived endothelial cells depends on thrombospondin-1 downregulation via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Mol Med (Berl)*, 84(10), 852-863. <https://doi.org/10.1007/s00109-006-0075-z>
- Chavanas, S., Bodemer, C., Rochat, A., Hamel-Teillac, D., Ali, M., Irvine, A. D., Bonafe, J. L., Wilkinson, J., Taieb, A., Barrandon, Y., Harper, J. I., de Prost, Y., & Hovnanian, A. (2000). Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nat Genet*, 25(2), 141-142. <https://doi.org/10.1038/75977>
- Chen, E., Zhu, H., Yang, Y., Wang, L., Zhang, J., Han, Y., & Liu, X. (2020). Analysis of expression and prognosis of KLK7 in ovarian cancer. *Open Med (Wars)*, 15(1), 932-939. <https://doi.org/10.1515/med-2020-0139>
- Cheung, W. C., Beausoleil, S. A., Zhang, X., Sato, S., Schieferl, S. M., Wieler, J. S., Beaudet, J. G., Ramenani, R. K., Popova, L., Comb, M. J., Rush, J., & Polakiewicz, R. D. (2012). A proteomics approach for the identification and cloning of monoclonal antibodies from serum. *Nat Biotechnol*, 30(5), 447-452. <https://doi.org/10.1038/nbt.2167>
- Consortium, G. T. (2013). The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat Genet*, 45(6), 580-585. <https://doi.org/10.1038/ng.2653>
- Cork, M. J., Danby, S. G., Vasilopoulos, Y., Hadgraft, J., Lane, M. E., Moustafa, M., Guy, R. H., Macgowan, A. L., Tazi-Ahnini, R., & Ward, S. J. (2009). Epidermal barrier

- dysfunction in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 129(8), 1892-1908.
<https://doi.org/10.1038/jid.2009.133>
- David Boothe, W., Tarbox, J. A., & Tarbox, M. B. (2017). Atopic Dermatitis: Pathophysiology. *Adv Exp Med Biol*, 1027, 21-37. https://doi.org/10.1007/978-3-319-64804-0_3
- Davidson, B., Reich, R., Risberg, B., & Nesland, J. M. (2002). The biological role and regulation of matrix metalloproteinases (MMP) in cancer. *Arkh Patol*, 64(3), 47-53.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15338725>
- Debela, M., Hess, P., Magdolen, V., Schechter, N. M., Steiner, T., Huber, R., Bode, W., & Goettig, P. (2007). Chymotryptic specificity determinants in the 1.0 Å structure of the zinc-inhibited human tissue kallikrein 7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(41), 16086-16091. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707811104>
- Delaunay, T., Deschamps, L., Haddada, M., Walker, F., Soosaipillai, A., Soualmia, F., El Amri, C., Diamandis, E. P., Brattsand, M., Magdolen, V., & Darmoul, D. (2017). Aberrant expression of kallikrein-related peptidase 7 is correlated with human melanoma aggressiveness by stimulating cell migration and invasion. *Mol Oncol*, 11(10), 1330-1347. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12103>
- Deraison, C., Bonnart, C., Lopez, F., Besson, C., Robinson, R., Jayakumar, A., Wagberg, F., Brattsand, M., Hachem, J. P., Leonardsson, G., & Hovnanian, A. (2007). LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction. *Mol Biol Cell*, 18(9), 3607-3619.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e07-02-0124>
- Descargues, P., Deraison, C., Bonnart, C., Kreft, M., Kishibe, M., Ishida-Yamamoto, A., Elias, P., Barrandon, Y., Zambruno, G., Sonnenberg, A., & Hovnanian, A. (2005). Spink5-deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal protease hyperactivity. *Nat Genet*, 37(1), 56-65.
<https://doi.org/10.1038/ng1493>
- 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>
- Dong, Y., Kaushal, A., Brattsand, M., Nicklin, J., & Clements, J. A. (2003). Differential splicing of KLK5 and KLK7 in epithelial ovarian cancer produces novel variants with potential as cancer biomarkers. *Clin Cancer Res*, 9(5), 1710-1720.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12738725>
- Dong, Y., Tan, O. L., Loessner, D., Stephens, C., Walpole, C., Boyle, G. M., Parsons, P. G., & Clements, J. A. (2010). Kallikrein-related peptidase 7 promotes multicellular aggregation via the alpha(5)beta(1) integrin pathway and paclitaxel chemoresistance in serous epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Res*, 70(7), 2624-2633. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3415>
- Dorn, J., Gkazepis, A., Kotzsch, M., Kremer, M., Propping, C., Mayer, K., Mengele, K., Diamandis, E. P., Kiechle, M., Magdolen, V., & Schmitt, M. (2014). Clinical value of protein expression of kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) in ovarian cancer. *Biol Chem*, 395(1), 95-107. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0172>
- Du, J. P., Li, L., Zheng, J., Zhang, D., Liu, W., Zheng, W. H., Li, X. S., Yao, R. C., Wang, F., Liu, S., & Tan, X. (2018). Kallikrein-related peptidase 7 is a potential target for the treatment of pancreatic cancer. *Oncotarget*, 9(16), 12894-12906.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.24132>
- Egelrud, T. (2000). Desquamation in the stratum corneum. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*, 208, 44-45. <https://doi.org/10.1080/000155500750012513>

- Egelrud, T., & Lundstrom, A. (1991). A chymotrypsin-like proteinase that may be involved in desquamation in plantar stratum corneum. *Arch Dermatol Res*, 283(2), 108-112. <https://doi.org/10.1007/BF00371618>
- Ejaz, S., Nasim, F. U., Ashraf, M., & Ahmad, G. (2017). Down-regulation of hK7 in the sera of breast cancer and benign breast disease patients. *Heliyon*, 3(7), e00356. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00356>
- Ekholm, I. E., Brattsand, M., & Egelrud, T. (2000). Stratum corneum tryptic enzyme in normal epidermis: a missing link in the desquamation process? *J Invest Dermatol*, 114(1), 56-63. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00820.x>
- Eyer, K., Castrillon, C., Chenon, G., Bibette, J., Bruhns, P., Griffiths, A. D., & Baudry, J. (2020). The Quantitative Assessment of the Secreted IgG Repertoire after Recall to Evaluate the Quality of Immunizations. *J Immunol*, 205(4), 1176-1184. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000112>
- Fernandez, I. S., Standker, L., Magert, H. J., Forssmann, W. G., Gimenez-Gallego, G., & Romero, A. (2008). Crystal structure of human epidermal kallikrein 7 (hK7) synthesized directly in its native state in E. coli: insights into the atomic basis of its inhibition by LEKTI domain 6 (LD6). *J Mol Biol*, 377(5), 1488-1497. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.01.089>
- Gabril, M., White, N. M., Moussa, M., Chow, T. F., Metias, S. M., Fatoohi, E., & Yousef, G. M. (2010). Immunohistochemical analysis of kallikrein-related peptidases in the normal kidney and renal tumors: potential clinical implications. *Biol Chem*, 391(4), 403-409. <https://doi.org/10.1515/BC.2010.025>
- Galliano, M. F., Toulza, E., Gallinaro, H., Jonca, N., Ishida-Yamamoto, A., Serre, G., & Guerrin, M. (2006). A novel protease inhibitor of the alpha2-macroglobulin family expressed in the human epidermis. *J Biol Chem*, 281(9), 5780-5789. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508017200>
- Geng, X., Babayeva, L., Walch, A., Aubele, M., Gross, E., Kiechle, M., Bronger, H., Dreyer, T., Magdolen, V., & Dorn, J. (2020). High levels of KLK7 protein expression are related to a favorable prognosis in triple-negative breast cancer patients. *Am J Cancer Res*, 10(6), 1785-1792. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32642290>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7339269/pdf/ajcr0010-1785.pdf>
- Gerard, A., Woolfe, A., Mottet, G., Reichen, M., Castrillon, C., Menrath, V., Ellouze, S., Poitou, A., Doineau, R., Briseno-Roa, L., Canales-Herrerias, P., Mary, P., Rose, G., Ortega, C., Delince, M., Essono, S., Jia, B., Iannascoli, B., Richard-Le Goff, O., . . . Brenan, C. (2020). High-throughput single-cell activity-based screening and sequencing of antibodies using droplet microfluidics. *Nat Biotechnol*, 38(6), 715-721. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0466-7>
- Gong, W., Liu, Y., Diamandis, E. P., Kiechle, M., Bronger, H., Dorn, J., Dreyer, T., & Magdolen, V. (2020). Prognostic value of kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) mRNA expression in advanced high-grade serous ovarian cancer. *J Ovarian Res*, 13(1), 125. <https://doi.org/10.1186/s13048-020-00725-5>
- Green, K. J., & Gaudry, C. A. (2000). Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1(3), 208-216. <https://doi.org/10.1038/35043032>
- Guo, C. J., Mack, M. R., Oetjen, L. K., Trier, A. M., Council, M. L., Pavel, A. B., Guttman-Yassky, E., Kim, B. S., & Liu, Q. (2020). Kallikrein 7 Promotes Atopic Dermatitis-Associated Itch Independently of Skin Inflammation. *J Invest Dermatol*, 140(6), 1244-1252 e1244. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.10.022>
- Haddada, M., Draoui, H., Deschamps, L., Walker, F., Delaunay, T., Brattsand, M., Magdolen, V., & Darmoul, D. (2018). Kallikrein-related peptidase 7

- overexpression in melanoma cells modulates cell adhesion leading to a malignant phenotype. *Biol Chem*, 399(9), 1099-1105. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0339>
- Hantschke, M., & Palmedo, G. (2015). Immunhistologische Techniken. In L. Cerroni, C. Garbe, D. Metze, H. Kutzner, & H. Kerl (Eds.), *Histopathologie der Haut* (pp. 1-28). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-44367-5_2-1
- Hart, P. S., Hart, T. C., Michalec, M. D., Ryu, O. H., Simmons, D., Hong, S., & Wright, J. T. (2004). Mutation in kallikrein 4 causes autosomal recessive hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Med Genet*, 41(7), 545-549. <https://doi.org/10.1136/jmg.2003.017657>
- Hart, P. S., Wright, J. T., Savage, M., Kang, G., Bensen, J. T., Gorry, M. C., & Hart, T. C. (2003). Exclusion of candidate genes in two families with autosomal dominant hypocalcified amelogenesis imperfecta. *Eur J Oral Sci*, 111(4), 326-331. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0722.2003.00046.x>
- Helander, K. G. (1994). Kinetic studies of formaldehyde binding in tissue. *Biotech Histochem*, 69(3), 177-179. <https://doi.org/10.3109/10520299409106282>
- Hovnanian, A. (2013). Netherton syndrome: skin inflammation and allergy by loss of protease inhibition. *Cell Tissue Res*, 351(2), 289-300. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1558-1>
- Hoxhaj, G., & Manning, B. D. (2020). The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nat Rev Cancer*, 20(2), 74-88. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0216-7>
- Iakovlev, V., Siegel, E. R., Tsao, M. S., & Haun, R. S. (2012). Expression of kallikrein-related peptidase 7 predicts poor prognosis in patients with unresectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 21(7), 1135-1142. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-11-1079>
- Inoue, Y., Yokobori, T., Yokoe, T., Toiyama, Y., Miki, C., Mimori, K., Mori, M., & Kusunoki, M. (2010). Clinical significance of human kallikrein7 gene expression in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*, 17(11), 3037-3042. <https://doi.org/10.1245/s10434-010-1132-y>
- Ishida-Yamamoto, A., Simon, M., Kishibe, M., Miyauchi, Y., Takahashi, H., Yoshida, S., O'Brien, T. J., Serre, G., & Iizuka, H. (2004). Epidermal lamellar granules transport different cargoes as distinct aggregates. *J Invest Dermatol*, 122(5), 1137-1144. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22515.x>
- Jamaspishvili, T., Scorilas, A., Kral, M., Khomeriki, I., Kurfurstova, D., Kolar, Z., & Bouchal, J. (2011). Immunohistochemical localization and analysis of kallikrein-related peptidase 7 and 11 expression in paired cancer and benign foci in prostate cancer patients. *Neoplasma*, 58(4), 298-303. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21520985>
- Johnson, B., Horn, T., Sander, C., Kohler, S., & B, R. S. (2003). Expression of stratum corneum chymotryptic enzyme in ichthyoses and squamoproliferative processes. *J Cutan Pathol*, 30(6), 358-362. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0560.2003.00070.x>
- Johnson, S. K., Ramani, V. C., Hennings, L., & Haun, R. S. (2007). Kallikrein 7 enhances pancreatic cancer cell invasion by shedding E-cadherin. *Cancer*, 109(9), 1811-1820. <https://doi.org/10.1002/cncr.22606>
- Karlsson, M., Zhang, C., Mear, L., Zhong, W., Digre, A., Katona, B., Sjostedt, E., Butler, L., Odeberg, J., Dusart, P., Edfors, F., Oksvold, P., von Feilitzen, K., Zwahlen, M., Arif, M., Altay, O., Li, X., Ozcan, M., Mardinoglu, A., . . . Lindskog, C. (2021). A single-cell type transcriptomics map of human tissues. *Sci Adv*, 7(31). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abh2169>

- Kim, H. S., Kim, D. H., Kim, J. Y., Jeoung, N. H., Lee, I. K., Bong, J. G., & Jung, E. D. (2010). Microarray analysis of papillary thyroid cancers in Korean. *Korean J Intern Med*, 25(4), 399-407. <https://doi.org/10.3904/kjim.2010.25.4.399>
- Kishibe, M. (2019). Physiological and pathological roles of kallikrein-related peptidases in the epidermis. *J Dermatol Sci*, 95(2), 50-55. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2019.06.007>
- Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., Barlund, M., Schraml, P., Leighton, S., Torhorst, J., Mihatsch, M. J., Sauter, G., & Kallioniemi, O. P. (1998). Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 4(7), 844-847. <https://doi.org/10.1038/nm0798-844>
- Kraut, H., Frey, E. K., & Werle, E. (1930). Der Nachweis eines Kreislaufhormons in der Pankreasdrüse. (IV. Mitteilung über dieses Kreislaufhormon.). 189(3-4), 97-106. <https://doi.org/doi:10.1515/bchm2.1930.189.3-4.97>
- Kumar, D. V., Sivarajani, Y., & Rao, G. V. (2020). Immunohistochemical expression of kallikrein 7 in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol*, 24(3), 580. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_244_19
- 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://doi.org/10.1016/s0009-9120\(02\)00446-0](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(02)00446-0)
- Lesk, A. M., & Fordham, W. D. (1996). Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. *J Mol Biol*, 258(3), 501-537. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0264>
- Leusink, F. K., van Diest, P. J., Frank, M. H., Broekhuizen, R., Braunius, W., van Hooff, S. R., Willems, S. M., & Koole, R. (2015). The Co-Expression of Kallikrein 5 and Kallikrein 7 Associates with Poor Survival in Non-HPV Oral Squamous-Cell Carcinoma. *Pathobiology*, 82(2), 58-67. <https://doi.org/10.1159/000381904>
- Li, W., Zhao, Y., Ren, L., & Wu, X. (2014). Serum human kallikrein 7 represents a new marker for cervical cancer. *Med Oncol*, 31(10), 208. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0208-0>
- Li, X., Liu, J., Wang, Y., Zhang, L., Ning, L., & Feng, Y. (2009). Parallel underexpression of kallikrein 5 and kallikrein 7 mRNA in breast malignancies. *Cancer Sci*, 100(4), 601-607. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01090.x>
- Lim, S. C., Kee, K. H., Lee, M. J., Hong, R., & Han, S. I. (2020). Extracellular acidity-induced expression of Kallikrein-related peptidases 7 and 8 is involved in increased invasiveness of gastric cancer cells. *Oncol Rep*, 43(5), 1705-1713. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7529>
- Lizio, M., Harshbarger, J., Abugessaisa, I., Noguchi, S., Kondo, A., Severin, J., Mungall, C., Arenillas, D., Mathelier, A., Medvedeva, Y. A., Lennartsson, A., Drablos, F., Ramilowski, J. A., Rackham, O., Gough, J., Andersson, R., Sandelin, A., Ienasescu, H., Ono, H., . . . Kawaji, H. (2017). Update of the FANTOM web resource: high resolution transcriptome of diverse cell types in mammals. *Nucleic Acids Res*, 45(D1), D737-D743. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw995>
- Lizio, M., Harshbarger, J., Shimoji, H., Severin, J., Kasukawa, T., Sahin, S., Abugessaisa, I., Fukuda, S., Hori, F., Ishikawa-Kato, S., Mungall, C. J., Arner, E., Baillie, J. K., Bertin, N., Bono, H., de Hoon, M., Diehl, A. D., Dimont, E., Freeman, T. C., . . . consortium, F. (2015). Gateways to the FANTOM5 promoter level mammalian expression atlas. *Genome Biol*, 16(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0560-6>
- Lundstrom, A., & Egelrud, T. (1991). Stratum corneum chymotryptic enzyme: a proteinase which may be generally present in the stratum corneum and with a possible

- involvement in desquamation. *Acta Derm Venereol*, 71(6), 471-474.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1685827>
- Luo, L. Y., & Jiang, W. (2006). Inhibition profiles of human tissue kallikreins by serine protease inhibitors. *Biol Chem*, 387(6), 813-816.
<https://doi.org/10.1515/BC.2006.103>
- Luo, L. Y., Shan, S. J., Elliott, M. B., Soosaipillai, A., & Diamandis, E. P. (2006). Purification and characterization of human kallikrein 11, a candidate prostate and ovarian cancer biomarker, from seminal plasma. *Clin Cancer Res*, 12(3 Pt 1), 742-750. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-05-1696>
- Mandle, R., Jr., & Kaplan, A. P. (1977). Hageman factor substrates. Human plasma prekallikrein: mechanism of activation by Hageman factor and participation in hageman factor-dependent fibrinolysis. *J Biol Chem*, 252(17), 6097-6104.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/408348>
- Martins, W. K., Esteves, G. H., Almeida, O. M., Rezze, G. G., Landman, G., Marques, S. M., Carvalho, A. F., LF, L. R., Duprat, J. P., & Stolf, B. S. (2011). Gene network analyses point to the importance of human tissue kallikreins in melanoma progression. *BMC Med Genomics*, 4, 76. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-4-76>
- Mo, L., Zhang, J., Shi, J., Xuan, Q., Yang, X., Qin, M., Lee, C., Klocker, H., Li, Q. Q., & Mo, Z. (2010). Human kallikrein 7 induces epithelial-mesenchymal transition-like changes in prostate carcinoma cells: a role in prostate cancer invasion and progression. *Anticancer Res*, 30(9), 3413-3420.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20944116>
<https://ar.iijournals.org/content/anticancer/30/9/3413.full.pdf>
- Mulisch, M. (2014). Nachweisverfahren und Detektion. In M. Mulisch (Ed.), *Verfahren der Immunlokalisation: Ein Überblick* (pp. 11-25). Springer Fachmedien Wiesbaden. https://doi.org/10.1007/978-3-658-03829-8_3
- Nylander-Lundqvist, E., & Egelrud, T. (1997). Formation of active IL-1 beta from pro-IL-1 beta catalyzed by stratum corneum chymotryptic enzyme in vitro. *Acta Derm Venereol*, 77(3), 203-206. <https://doi.org/10.2340/0001555577203206>
- Okegawa, T., Pong, R. C., Li, Y., & Hsieh, J. T. (2004). The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. *Acta Biochim Pol*, 51(2), 445-457.
- Ovaere, P., Lippens, S., Vandenabeele, P., & Declercq, W. (2009). The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. *Trends Biochem Sci*, 34(9), 453-463.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.08.001>
- Pettus, J. R., Johnson, J. J., Shi, Z., Davis, J. W., Koblinski, J., Ghosh, S., Liu, Y., Ravosa, M. J., Frazier, S., & Stack, M. S. (2009). Multiple kallikrein (KLK 5, 7, 8, and 10) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Histol Histopathol*, 24(2), 197-207. <https://doi.org/10.14670/HH-24.197>
- Pierard, G. E., Goffin, V., Hermanns-Le, T., & Pierard-Franchimont, C. (2000). Corneocyte desquamation. *Int J Mol Med*, 6(2), 217-221.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.6.2.217>
- Planque, C., de Monte, M., Guyetant, S., Rollin, J., Desmazes, C., Panel, V., Lemarie, E., & Courty, Y. (2005). KLK5 and KLK7, two members of the human tissue kallikrein family, are differentially expressed in lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 329(4), 1260-1266. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.02.100>
- 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>

- Prezas, P., Scorilas, A., Yfanti, C., Viktorov, P., Agnanti, N., Diamandis, E., & Talieri, M. (2006). The role of human tissue kallikreins 7 and 8 in intracranial malignancies. *Biol Chem*, 387(12), 1607-1612. <https://doi.org/10.1515/BC.2006.200>
- Psyrris, A., Kountourakis, P., Scorilas, A., Markakis, S., Camp, R., Diamandis, E. P., Dimopoulos, M. A., & Kowalski, D. (2008). Human tissue kallikrein 7, a novel biomarker for advanced ovarian carcinoma using a novel in situ quantitative method of protein expression. *Ann Oncol*, 19(7), 1271-1277. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn035>
- Ramani, V. C., & Haun, R. S. (2008a). Expression of kallikrein 7 diminishes pancreatic cancer cell adhesion to vitronectin and enhances urokinase-type plasminogen activator receptor shedding. *Pancreas*, 37(4), 399-404. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e31817f76f7>
- Ramani, V. C., & Haun, R. S. (2008b). The extracellular matrix protein fibronectin is a substrate for kallikrein 7. *Biochem Biophys Res Commun*, 369(4), 1169-1173. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.03.021>
- Ramani, V. C., Hennings, L., & Haun, R. S. (2008). Desmoglein 2 is a substrate of kallikrein 7 in pancreatic cancer. *BMC Cancer*, 8, 373. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-373>
- Ramani, V. C., Kaushal, G. P., & Haun, R. S. (2011). Proteolytic action of kallikrein-related peptidase 7 produces unique active matrix metalloproteinase-9 lacking the C-terminal hemopexin domains. *Biochim Biophys Acta*, 1813(8), 1525-1531. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.05.007>
- Ramos-Vara, J. A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol*, 42(4), 405-426. <https://doi.org/10.1354/vp.42-4-405>
- Reyes, I., Reyes, N., Suriano, R., Jacob, C., Suslina, N., Policastro, A., Moscatello, A., Schantz, S., Tiwari, R. K., & Geliebter, J. (2019). Gene expression profiling identifies potential molecular markers of papillary thyroid carcinoma. *Cancer Biomark*, 24(1), 71-83. <https://doi.org/10.3233/CBM-181758>
- Roedl, D., Traidl-Hoffmann, C., Ring, J., Behrendt, H., & Braun-Falco, M. (2009). Serine protease inhibitor lymphoepithelial Kazal type-related inhibitor tends to be decreased in atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 23(11), 1263-1266. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2009.03302.x>
- Santin, A. D., Cane, S., Bellone, S., Bignotti, E., Palmieri, M., De Las Casas, L. E., Roman, J. J., Anfossi, S., O'Brien, T., & Pecorelli, S. (2004). The serine protease stratum corneum chymotryptic enzyme (kallikrein 7) is highly overexpressed in squamous cervical cancer cells. *Gynecol Oncol*, 94(2), 283-288. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2004.05.023>
- Sarri, C. A., Roussaki-Schulze, A., Vasilopoulos, Y., Zafiriou, E., Patsatsi, A., Stamatis, C., Gidarokosta, P., Sotiriadis, D., Sarafidou, T., & Mamuris, Z. (2017). Netherton Syndrome: A Genotype-Phenotype Review. *Mol Diagn Ther*, 21(2), 137-152. <https://doi.org/10.1007/s40291-016-0243-y>
- Schechter, N. M., Choi, E. J., Wang, Z. M., Hanakawa, Y., Stanley, J. R., Kang, Y., Clayman, G. L., & Jayakumar, A. (2005). Inhibition of human kallikreins 5 and 7 by the serine protease inhibitor lympho-epithelial Kazal-type inhibitor (LEKTI). *Biol Chem*, 386(11), 1173-1184. <https://doi.org/10.1515/BC.2005.134>
- Shan, S. J., Scorilas, A., Katsaros, D., Rigault de la Longrais, I., Massobrio, M., & Diamandis, E. P. (2006). Unfavorable prognostic value of human kallikrein 7 quantified by ELISA in ovarian cancer cytosols. *Clin Chem*, 52(10), 1879-1886. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.071456>
- Shigemasa, K., Tanimoto, H., Underwood, L. J., Parmley, T. H., Arihiro, K., Ohama, K., & O'Brien, T. J. (2001). Expression of the protease inhibitor antileukoprotease and the

- serine protease stratum corneum chymotryptic enzyme (SCCE) is coordinated in ovarian tumors. *Int J Gynecol Cancer*, 11(6), 454-461.
<https://doi.org/10.1046/j.1525-1438.2001.01062.x>
- Silva, L. M., Kryza, T., Stoll, T., Hoogland, C., Dong, Y., Stephens, C. R., Hastie, M. L., Magdolen, V., Kleifeld, O., Gorman, J. J., & Clements, J. A. (2019). Integration of Two In-depth Quantitative Proteomics Approaches Determines the Kallikrein-related Peptidase 7 (KLK7) Degradome in Ovarian Cancer Cell Secretome. *Mol Cell Proteomics*, 18(5), 818-836. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.001304>
- Simon, R., & Sauter, G. (2003). Tissue microarray (TMA) applications: implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med*, 5(26), 1-12.
<https://doi.org/10.1017/S1462399403006781>
- Singh, J., Naran, A., Misso, N. L., Rigby, P. J., Thompson, P. J., & Bhoola, K. D. (2008). Expression of kallikrein-related peptidases (KRP/hK5, 7, 6, 8) in subtypes of human lung carcinoma. *Int Immunopharmacol*, 8(2), 300-306.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.08.015>
- Skerrow, C. J., Clelland, D. G., & Skerrow, D. (1989). Changes to desmosomal antigens and lectin-binding sites during differentiation in normal human epidermis: a quantitative ultrastructural study. *J Cell Sci*, 92 (Pt 4), 667-677.
<https://doi.org/10.1242/jcs.92.4.667>
- Sondell, B., Thornell, L. E., & Egelrud, T. (1995). Evidence that stratum corneum chymotryptic enzyme is transported to the stratum corneum extracellular space via lamellar bodies. *J Invest Dermatol*, 104(5), 819-823. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12607007>
- Tailor, 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>
- Takagaki, Y., Kitamura, N., & Nakanishi, S. (1985). Cloning and sequence analysis of cDNAs for human high molecular weight and low molecular weight prekininogens. Primary structures of two human prekininogens. *J Biol Chem*, 260(14), 8601-8609.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2989293>
- Talieri, M., Devetzi, M., Scorilas, A., Prezas, P., Ardavanis, A., Apostolaki, A., & Karameris, A. (2011). Evaluation of kallikrein-related peptidase 5 expression and its significance for breast cancer patients: association with kallikrein-related peptidase 7 expression. *Anticancer Res*, 31(9), 3093-3100.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21868565>
<https://ar.iijournals.org/content/anticancer/31/9/3093.full.pdf>
- 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>
- Talieri, M., Mathioudaki, K., Prezas, P., Alexopoulou, D. K., Diamandis, E. P., Xynopoulos, D., Ardavanis, A., Arnogiannaki, N., & Scorilas, A. (2009). Clinical significance of kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) in colorectal cancer. *Thromb Haemost*, 101(4), 741-747. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19350120>
- Tamir, A., Jag, U., Sarojini, S., Schindewolf, C., Tanaka, T., Gharbaran, R., Patel, H., Sood, A., Hu, W., Patwa, R., Blake, P., Chirina, P., Oh Jeong, J., Lim, H., Goy, A.,

- Pecora, A., & Suh, K. S. (2014). Kallikrein family proteases KLK6 and KLK7 are potential early detection and diagnostic biomarkers for serous and papillary serous ovarian cancer subtypes. *J Ovarian Res*, 7, 109. <https://doi.org/10.1186/s13048-014-0109-z>
- Tanimoto, H., Underwood, L. J., Shigemasa, K., Yan Yan, M. S., Clarke, J., Parmley, T. H., & O'Brien, T. J. (1999). The stratum corneum chymotryptic enzyme that mediates shedding and desquamation of skin cells is highly overexpressed in ovarian tumor cells. *Cancer*, 86(10), 2074-2082. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10570434>
- Termini, L., Maciag, P. C., Soares, F. A., Nonogaki, S., Pereira, S. M., Alves, V. A., Longatto-Filho, A., & Villa, L. L. (2010). Analysis of human kallikrein 7 expression as a potential biomarker in cervical neoplasia. *Int J Cancer*, 127(2), 485-490. <https://doi.org/10.1002/ijc.25046>
- Tian, X., Shigemasa, K., Hirata, E., Gu, L., Uebaba, Y., Nagai, N., O'Brien, T. J., & Ohama, K. (2004). Expression of human kallikrein 7 (hK7/SCCE) and its inhibitor antileukoprotease (ALP/SLPI) in uterine endocervical glands and in cervical adenocarcinomas. *Oncol Rep*, 12(5), 1001-1006. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15492784>
<https://www.spandidos-publications.com/or/12/5/1001>
- Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H. M., Beasley, M. B., Chirieac, L. R., Dacic, S., Duhig, E., Flieder, D. B., Geisinger, K., Hirsch, F. R., Ishikawa, Y., Kerr, K. M., Noguchi, M., Pelosi, G., Powell, C. A., Tsao, M. S., Wistuba, I., & Panel, W. H. O. (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol*, 10(9), 1243-1260. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000630>
- Uhlen, M., Bandrowski, A., Carr, S., Edwards, A., Ellenberg, J., Lundberg, E., Rimm, D. L., Rodriguez, H., Hiltke, T., Snyder, M., & Yamamoto, T. (2016). A proposal for validation of antibodies. *Nat Methods*, 13(10), 823-827. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3995>
- Uhlig, R., Abboud, M., Gorbokon, N., Lennartz, M., Dwertmann Rico, S., Kind, S., Reisch, V., Viehweger, F., Kluth, M., Hube-Magg, C., Bernreuther, C., Buscheck, F., Clauditz, T. S., Fraune, C., Hinsch, A., Jacobsen, F., Krech, T., Lebok, P., Steurer, S., . . . Menz, A. (2022). Cytokeratin 10 (CK10) expression in cancer: A tissue microarray study on 11,021 tumors. *Ann Diagn Pathol*, 60, 152029. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2022.152029>
- Voegeli, R., Rawlings, A. V., Breternitz, M., Doppler, S., Schreier, T., & Fluhr, J. W. (2009). Increased stratum corneum serine protease activity in acute eczematous atopic skin. *Br J Dermatol*, 161(1), 70-77. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09142.x>
- Walker, F., Nicole, P., Jallane, A., Soosaipillai, A., Mosbach, V., Oikonomopoulou, K., Diamandis, E. P., Magdolen, V., & Darmoul, D. (2014). Kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) is a proliferative factor that is aberrantly expressed in human colon cancer. *Biol Chem*, 395(9), 1075-1086. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0142>
- Wang, P., Magdolen, V., Seidl, C., Dorn, J., Drecol, E., Kotzsch, M., Yang, F., Schmitt, M., Schilling, O., Rockstroh, A., Clements, J. A., & Loessner, D. (2018). Kallikrein-related peptidases 4, 5, 6 and 7 regulate tumour-associated factors in serous ovarian cancer. *Br J Cancer*, 119(7), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0260-1>

- Wang, Y. Y., Lin, Y. C., Hung, H. C., Tien, W. Y., & Shieh, T. Y. (2013). Polymorphisms in Kallikrein7 and 10 genes and oral cancer risks in Taiwan betel quid chewers and smokers. *Oral Dis*, 19(8), 824-832. <https://doi.org/10.1111/odi.12072>
- Werner, M., Chott, A., Fabiano, A., & Battifora, H. (2000). Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*, 24(7), 1016-1019. <https://doi.org/10.1097/00000478-200007000-00014>
- Wine, Y., Boutz, D. R., Lavinder, J. J., Miklos, A. E., Hughes, R. A., Hoi, K. H., Jung, S. T., Horton, A. P., Murrin, E. M., Ellington, A. D., Marcotte, E. M., & Georgiou, G. (2013). Molecular deconvolution of the monoclonal antibodies that comprise the polyclonal serum response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(8), 2993-2998. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213737110>
- Wine, Y., Horton, A. P., Ippolito, G. C., & Georgiou, G. (2015). Serology in the 21st century: the molecular-level analysis of the serum antibody repertoire. *Curr Opin Immunol*, 35, 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.06.009>
- Xi, S., Inchauste, S., Guo, H., Shan, J., Xiao, Z., Xu, H., Miettinen, M., Zhang, M. R., Hong, J. A., Raiji, M. T., Altorki, N. K., Casson, A. G., Beer, D. G., Robles, A. I., Bowman, E. D., Harris, C. C., Steinberg, S. M., & Schrump, D. S. (2015). Cigarette smoke mediates epigenetic repression of miR-217 during esophageal adenocarcinogenesis. *Oncogene*, 34(44), 5548-5559. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.10>
- Xiang, F., Wang, Y., Cao, C., Li, Q., Deng, H., Zheng, J., Liu, X., & Tan, X. (2022). The Role of Kallikrein 7 in Tumorigenesis. *Curr Med Chem*, 29(15), 2617-2631. <https://doi.org/10.2174/0929867328666210915104537>
- Xuan, Q., Yang, X., Mo, L., Huang, F., Pang, Y., Qin, M., Chen, Z., He, M., Wang, Q., & Mo, Z. N. (2008). Expression of the serine protease kallikrein 7 and its inhibitor antileukoprotease is decreased in prostate cancer. *Arch Pathol Lab Med*, 132(11), 1796-1801. <https://doi.org/10.1043/1543-2165-132.11.1796>
- Yamasaki, K., Schaubert, J., Coda, A., Lin, H., Dorschner, R. A., Schechter, N. M., Bonnard, C., Descargues, P., Hovnanian, A., & Gallo, R. L. (2006). Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *FASEB J*, 20(12), 2068-2080. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6075com>
- Yamashita, S. (2007). Heat-induced antigen retrieval: mechanisms and application to histochemistry. *Prog Histochem Cytochem*, 41(3), 141-200. <https://doi.org/10.1016/j.proghi.2006.09.001>
- 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., Obiezu, C. V., Luo, L. Y., Magklara, A., Borgoño, C. A., Kishi, T., Memari, N., Michael I, P., Sidiropoulos, M., Kurlender, L., Economopolou, K., Kapadia, C., Komatsu, N., Petraki, C., Elliott, M., Scorilas, A., Katsaros, D., Levesque, M. A., & Diamandis, E. P. (2005). Human tissue kallikreins: from gene structure to function and clinical applications. *Adv Clin Chem*, 39, 11-79. [https://doi.org/10.1016/s0065-2423\(04\)39002-5](https://doi.org/10.1016/s0065-2423(04)39002-5)
- Yousef, G. M., Scorilas, A., Magklara, A., Soosaipillai, A., & Diamandis, E. P. (2000). The KLK7 (PRSS6) gene, encoding for the stratum corneum chymotryptic enzyme is a new member of the human kallikrein gene family - genomic characterization, mapping, tissue expression and hormonal regulation. *Gene*, 254(1-2), 119-128. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00280-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00280-8)

- Yu, Y., Prassas, I., Dimitromanolakis, A., & Diamandis, E. P. (2015). Novel Biological Substrates of Human Kallikrein 7 Identified through Degradomics. *J Biol Chem*, 290(29), 17762-17775. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.643551>
- Zhang, C. Y., Zhu, Y., Rui, W. B., Dai, J., & Shen, Z. J. (2015). Expression of kallikrein-related peptidase 7 is decreased in prostate cancer. *Asian J Androl*, 17(1), 106-110. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.137613>
- Zhang, H., Cai, Y., Zheng, L., Zhang, Z., Lin, X., & Jiang, N. (2018). Long noncoding RNA NEAT1 regulate papillary thyroid cancer progression by modulating miR-129-5p/KLK7 expression. *J Cell Physiol*, 233(10), 6638-6648. <https://doi.org/10.1002/jcp.26425>
- Zhang, Y., Hu, J., Zhou, W., & Gao, H. (2018). LncRNA FOXD2-AS1 accelerates the papillary thyroid cancer progression through regulating the miR-485-5p/KLK7 axis. *J Cell Biochem*. <https://doi.org/10.1002/jcb.28072>
- Zhao, H., Dong, Y., Quan, J., Smith, R., Lam, A., Weinstein, S., Clements, J., Johnson, N. W., & Gao, J. (2011). Correlation of the expression of human kallikrein-related peptidases 4 and 7 with the prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 33(4), 566-572. <https://doi.org/10.1002/hed.21496>
- Zheng, S. L., Feng, M. Y., Yang, G., Xiong, G. B., Zheng, L. F., Zhang, T. P., & Zhao, Y. P. (2018). [The expression of KLK7 in pancreatic cancer and the effects on the biological behavior of pancreatic cancer cells]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 56(5), 391-397. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0529-5815.2018.05.013>

8 Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
Ca ²⁺	Calciumionen
Cu ²⁺	Kupferionen
DSG	Desmoglein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Fc-Region	Fragment Crystallizable Region
FN1	Fibronectin1
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
His	Histidin
HK7	Human Kallikrein 7
HMWK	Hochmolekulares Kininogen
HPV	Humanes Papillomvirus
ICGC	International Cancer Genome Consortium
IgE	Immunglobulin E
IGFBP	Insulin Growth Factor Binding
IHC	Immunhistochemie
IL-1 β	Interleukin-1beta
kDa	Kilodalton
KLK5	Kallikrein-related Peptidase 5
KLK7	Kallikrein-related Peptidase 7
LEKTI-1	Lympho-epithelial Kazal-type Inhibitor
mm	Millimeter
MMP10	Pro-Matrix-Metalloprotease
μ m	Mikrometer
mRNA	messenger RNA
MTA	Multitumor-Array
PRSS6	Protease Serine 6
pN	histopathologisch beurteilter Lymphknoten
pT	histopathologisch beurteilter Primärtumor
RNA	Ribunucleic Acid

SCCE	Stratum Corneum Chymotryptic Enzyme
Ser	Serin
SPINK-5	Serine Protease Inhibitor Kazal-type 5
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TMA	Tissue-Microarray
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
uPAR	Urokinase-Plasminogen-Aktivator- Rezeptor
VEGFR2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
Zn ²⁺	Zink-Ion

9 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1:</i> Familie der humanen Gewebekallikreine.....	2
<i>Abbildung 2:</i> Tertiärstruktur von KLK7.....	3
<i>Abbildung 3:</i> Zeigt den Vergleich der Sequenzen von KLK4-KLK7.....	4
<i>Abbildung 4:</i> Aufbau der Epidermis.....	5
<i>Abbildung 5:</i> Proteinexpression von KLK7 im Normalgewebe.....	6
<i>Abbildung 6:</i> mRNA-Expression von KLK7 im Normalgewebe.....	6
<i>Abbildung 7:</i> KLK7-Expression in humanen Tumoren	8
<i>Abbildung 8:</i> Einfluss des KLK7-Expressionslevels in humanen Tumoren	11
<i>Abbildung 9:</i> Literaturdiagramm	13
<i>Abbildung 10:</i> Prinzip der TMA-Technik	15
<i>Abbildung 11:</i> HE-Schnitt und korrespondierender Paraffinblock.....	17
<i>Abbildung 12:</i> Standardaufbau eines UKE-TMA-Blocks	17
<i>Abbildung 13:</i> Elemente eines TMAs	18
<i>Abbildung 14:</i> Elemente eines TMAs	19
<i>Abbildung 15:</i> Tumorstanze wird aus der Hohlnadel ausgestoßen.....	20
<i>Abbildung 16:</i> Herstellung eines Paraffinblocks	21
<i>Abbildung 17:</i> Elemente eines TMAs.....	22
<i>Abbildung 18:</i> Prinzip der Immunhistochemie	30
<i>Abbildung 19:</i> Visualisierungssysteme	31
<i>Abbildung 20:</i> Haut..	36
<i>Abbildung 21:</i> Haut (verhornendes Plattenepithel)	37
<i>Abbildung 22:</i> Ösophagus Plattenepithel	38
<i>Abbildung 23:</i> Thymus	38
<i>Abbildung 24:</i> Tonsille (Plattenepithel)	39
<i>Abbildung 25:</i> Zervix uteri (Plattenepithel).....	39
<i>Abbildung 26:</i> Kolon (Mukosa).....	40
<i>Abbildung 27:</i> Haut.	40
<i>Abbildung 28:</i> Niere (Cortex).....	41
<i>Abbildung 29:</i> Eileiter (Mukosa).....	41
<i>Abbildung 30:</i> Speicheldrüse (Glandula submandibularis)	42
<i>Abbildung 31:</i> Analhaut. Antikörper MSVA-707M.....	43
<i>Abbildung 32:</i> Analhaut. Vergleichsantikörper EPR22594-203	43

<i>Abbildung 33:</i> Tonsille. Antikörper MSVA-707M	44
<i>Abbildung 34:</i> Tonsille. Vergleichsantikörper EPR22594-203	44
<i>Abbildung 35:</i> Eileiter. Antikörper MSVA-707M	45
<i>Abbildung 36:</i> Eileiter. Vergleichsantikörper EPR22594-203	45
<i>Abbildung 37:</i> Speicheldrüse (Glandula submandibularis). Antikörper MSVA-707M	46
<i>Abbildung 38:</i> Speicheldrüse (Glandula submandibularis). Vergleichsantikörper EPR22594-203	46
<i>Abbildung 39:</i> Niere (Cortex). Antikörper MSVA-707M	47
<i>Abbildung 40:</i> Niere (Cortex). Vergleichsantikörper EPR22594-203.	47
<i>Abbildung 41:</i> Glatte Muskulatur (Kolon). Antikörper MSVA-707M	48
<i>Abbildung 42:</i> Glatte Muskulatur (Kolon). Vergleichsantikörper EPR22594-203	48
<i>Abbildung 43:</i> Nebenschilddrüse. Antikörper MSVA-707M	49
<i>Abbildung 44:</i> Nebenschilddrüse. Vergleichsantikörper EPR22594-203	49
<i>Abbildung 45:</i> Plattenepithelkarzinom Vulva	50
<i>Abbildung 46:</i> Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle	51
<i>Abbildung 47:</i> Plattenepithelkarzinom der Harnblase	51
<i>Abbildung 48:</i> Urothelkarzinom der Harnblase	52
<i>Abbildung 49:</i> Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre (ohne Keratinisierung)	52
<i>Abbildung 50:</i> Seröses Ovarialkarzinom (high-grade)	53
<i>Abbildung 51:</i> Adenokarzinom des Magens.	53
<i>Abbildung 52:</i> Pankreas-Adenokarzinom	54
<i>Abbildung 53:</i> Parotis (Warthin-Tumor)	54
<i>Abbildung 54:</i> Plattenepithelkarzinom Larynx	55
<i>Abbildung 55:</i> Plattenepithelkarzinom Vagina	55
<i>Abbildung 56:</i> Positivitäten der gefärbten Tumortypen	63
<i>Abbildung 57:</i> Vergleich der Positivitäten der KLK7-Färbung unserer Studie mit früheren Studien.	72

10 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1:</i> Beispiel eines TMA-Datenfiles (Ovarialkarzinom-Array).....	23
<i>Tabelle 2:</i> Zusammensetzung des Normalgewebe-TMAs	24
<i>Tabelle 3:</i> Zusammensetzung des verwendeten Tumor-TMAs	25
<i>Tabelle 4:</i> Darstellung der Immunfärbung	33
<i>Tabelle 5:</i> Übersicht der semiquantitativen Interpretation der immunhistochemischen Ergebnisse	35
<i>Tabelle 6:</i> KLK7-Färbung der analysierbaren Fälle auf dem TMA.....	56
<i>Tabelle 7:</i> Rangliste der positiv gefärbten Tumorgewebe nach absteigender Positivität....	61
<i>Tabelle 8:</i> KLK7-Immunhistochemie und Phänotyp beim Kolonkarzinom	64
<i>Tabelle 9:</i> KLK7-Immunhistochemie und Phänotyp beim Magenkarzinom	64
<i>Tabelle 10:</i> KLK7-Immunhistochemie und Phänotyp beim Pankreaskarzinom.....	65
<i>Tabelle 11:</i> KLK7-Immunhistochemie und Phänotyp beim Leberzellkarzinom	65
<i>Tabelle 12:</i> KLK7-Immunhistochemie und Phänotyp beim Endometriumkarzinom	66
<i>Tabelle 13:</i> KLK7-Immunhistochemie und Phänotyp beim endometrioiden Ovarialkarzinom	66
<i>Tabelle 14:</i> KLK7-Immunhistochemie und Phänotyp beim serösen Ovarialkarzinom	66
<i>Tabelle 15:</i> KLK7-Immunhistochemie und Phänotyp beim Schilddrüsenkarzinom (papillär).....	67
<i>Tabelle 16:</i> KLK7-Immunhistochemie und Phänotyp beim Plattenepithelkarzinom verschiedener Ursprungsorgane	67
<i>Tabelle 17:</i> KLK7 vs. HPV-Infektion bei Plattenepithelkarzinomen	68

11 Erklärung des Eigenanteils

In Zusammenarbeit mit meinem Betreuer, Prof. Dr. Guido Sauter vom Institut für Pathologie des UKE, wurde das Thema meiner Dissertation festgelegt.

Zu Beginn absolvierte ich eine umfassende Literaturrecherche zur „Expression von KLK7 in Normalgeweben und Tumoren“. Ich koordinierte die Selektion sowie die pathologische Bewertung geeigneter Gewebeproben für diese Studie. Anschließend eignete ich mir die Technik der Arrayherstellung an.

Die Entscheidung für die geeigneten Antikörper und die Festlegung der optimalen Verdünnung erfolgten in enger Abstimmung mit meinem Betreuer. Hierfür führte ich verschiedene Testfärbungen durch und analysierte die Ergebnisse.

Des Weiteren war ich verantwortlich für die Erfassung der klinischen Verlaufsdaten. Die immunhistochemischen Färbungen wurden vom technischen Personal und einer erfahrenen Pathologin des Instituts für Pathologie durchgeführt und beurteilt. Abschließend bereitete ich die gewonnenen Daten für die finale statistische Analyse vor, die von Herrn Professor Simon am Institut für Pathologie des UKE durchgeführt wurde. Die vorliegende Dissertation habe ich vollständig selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst.

12 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Guido Sauter für die Ermöglichung dieser Dissertation. Ich bedanke mich für die hervorragende Betreuung während der gesamten Zeit und freue mich, wertvolle Einblicke in das Fach der Pathologie erhalten zu haben. Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Ronald Simon und Frau Dr. Martina Kluth für die wissenschaftliche Betreuung und für die hilfreichen Rückmeldungen danken. Meine Dankbarkeit möchte ich auch Melanie Witt, Laura Behm, Inge Brandt und Maren Eisenberg für die überaus freundliche Zusammenarbeit und Unterstützung im Labor aussprechen. Zum Abschluss möchte ich meiner Familie danken, die mir stets beiseitegestanden hat.