



**Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da
Saúde**

ANA CAROLINA BUZZO STEFANINI

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA
CALICREÍNA 8 EM CÂNCER DE CABEÇA E
PESCOÇO**

**São José do Rio Preto
2014**

ANA CAROLINA BUZZO STEFANINI

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA
CALICREÍNA 8 EM CÂNCER DE CABEÇA E
PESCOÇO**

**Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina de São José do Rio Preto
para obtenção do Título de Mestre no
Curso de Pós-graduação em Ciências
da Saúde.**

**Orientadora: Profa. Dra. Eloiza Helena
Tajara**

**São José do Rio Preto
2014**

Stefanini, Ana Carolina Buzzo

Título Investigação do papel da calicreína 8 em câncer de
cabeça e pescoço/Ana Carolina Buzzo Stefanini

São José do Rio Preto, 2014

134p

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José
do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Ciências da Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara

1. Câncer de cabeça e Pescoço; 2. Calicreína 8; 3. Biologia
Molecular; 4. Serino Proteases.

ANA CAROLINA BUZZO STEFANINI

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA
CALICREÍNA 8 EM CÂNCER DE CABEÇA E
PESCOÇO**

**BANCA EXAMINADORA
TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE**

**Presidente e Orientador: Eloiza Helena Tajara_
2º Examinador: Andréia Machado Leopoldino
3º Examinador: Érika Cristina Pavarino**

São José do Rio Preto, 08/10/2014.

Sumário

DEDICATÓRIA.....	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
EPÍGRAFE.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUÇÃO.....	1
Câncer, conceitos gerais.....	1
Carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço.....	6
O degradoma humano.....	8
O grupo das serino-proteases.....	9
Calicreínas.....	12
Calicreína 8.....	20
OBJETIVOS.....	24
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
Amostras de carcinomas epidermóides primários de cabeça e pescoço..	25
Linhagens celulares de carcinomas de cabeça e pescoço.....	28
Análise Filogenética.....	29
Cultivo Celular.....	29

Análise da expressão gênica.....	32
Ensaio Funcionais.....	38
Ensaio com Meio Condicionado.....	45
Modelagem molecular por homologia.....	50
RESULTADOS.....	51
Casuística.....	51
Análise Filogenética.....	51
Análise da expressão gênica.....	54
Estudos funcionais.....	57
Ensaio com Meio Condicionado.....	63
Modelagem molecular por homologia.....	72
DISCUSSÃO.....	73
CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Aparecido Stefanini, pelo esforço de uma vida, para me criar e educar, pela confiança depositada em mim. Sem a sua estrutura, o seu amor e o seu apoio eu não teria me tornado quem eu sou hoje e me orgulho muito.

Ao meu marido André Vilella Guerreiro, pela sua paciência, seu amor e companheirismo.

À minha família, tias, primos, sogros, cunhado, irmãos, madastra, por estarem ao meu lado, pelos ensinamentos, as orações, o amor e o apoio.

À duas grandes pessoas e companheiros, meu tio João E. Buzzo e minha tia Cláudia R. A. Buzzo, pelo cuidado, pelo carinho e ajuda para que eu pudesse conquistar todos os meus objetivos.

À todos os meus amigos, pelo incentivo, carinho, parceria e alegria em todos os momentos importantes da minha vida.

À minha mãe Fátima D. Buzzo Stefanini e minha avó Edna P. Buzzo (*in memoriam*) que me proporcionaram a grande felicidade, mesmo que por pouco tempo, de estar ao lado delas. Suas vidas, seu amor e doação foram de grande significado para minha formação pessoal. Suas ausências são compensadas pelos maravilhosos exemplos deixados e pelo amor recíproco e incondicional.

Sem vocês esse trabalho não teria se concretizado. Obrigada por fazerem parte da minha vida e a tornarem maravilhosa.

MUITO OBRIGADA.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes que doaram voluntariamente as amostras para essa pesquisa.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Eloiza Helena Tajara, pela paciência, confiança depositada em mim e meu trabalho, pelo incentivo, dedicação e pelo maravilhoso exemplo de ética e competência profissional.

Aos coordenadores e funcionários do programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

Aos pesquisadores do grupo GENCAPO responsáveis pela coleta das amostras biológicas e respectivas análises patológicas.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa Científica do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro.

Aos amigos de laboratório: Bianca, Tiago, Giovana, Larissa e Fernanda pelo grande auxílio e amizade.

À amiga e pesquisadora Carolina Pacca Mazzaro pela paciência e grande ajuda em muitas etapas deste trabalho.

À Dra. Adriana Paes Leme e Dra. Ana Carolina Zeri por me receberem em seus laboratórios e possibilitarem os experimentos de espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear.

À Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino pela colaboração e auxílio com os experimentos funcionais.

MUITO OBRIGADA.

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ilustração original das seis marcas principais da célula tumoral segundo Hanahan e Weinberg (2000): sustentação de sinais de proliferação, resistência à morte celular, indução de angiogênese, capacidade de imortalidade replicativa, ativação de invasão e metástase, evasão de supressores de crescimento⁽¹⁾3
- Figura 2.** (A) Tipos celulares presentes no tumor e (B) microambientes do tumor com fenótipo invasivo e metastático, segundo Hanahan e Weinberg (2011):
(2)3
- Figura 3.** Metabolismo de células com taxas elevadas de proliferação. A proliferação requer glicose, que é convertida em piruvato na glicólise, para síntese de aminoácidos. O piruvato pode ser convertido em acetil-coenzima A, que entra no ciclo TCA na forma de citrato ou é exportado para o citosol para síntese de lipídios. As células requerem glutamina para síntese de proteínas, DNA e RNA. A glutamina também participa da modulação da via do mTOR. A amônia e o lactato são secretados como descarte. Modificado de Munõz-Pinedo et al, 2012 ⁽¹³⁾.5
- Figura 4.** Características de loco, genes e proteínas da família das calicreínas, com **A.** Localização no cromossomo 19, direção de transcrição (setas vermelhas = calicreínas clássicas, seta amarela = pseudogene, setas roxas = demais calicreínas); **B.** Gene *KLK* com os 5 exons codificantes e a posição dos resíduos catalíticos, histidina (H), ácido aspártico (D) e serina (S); **C.** Sequência sinal (Pre), que direciona a proteína hK para o retículo e para secreção, o propeptídeo (Pro) que a mantém inativa, e domínio serina-protease. Modificada de Borgoño et al. (2004)⁽⁶⁴⁾13

- Figura 5.** Isoformas do gene *KLK8*. Estrutura dos transcritos do gene *KLK8* - os retângulos brancos representam as regiões não codificantes e os cinza as codificantes.  codon de início;  codon de parada; H, D, S sítios catalíticos. Modificada de Planque et al. 2010.⁽²²²⁾20
- Figura 6. A.** Esquema do vetor de expressão pCMV6-AC contendo o gene *KLK8*, com o gene NEO^r, de resistência ao antibiótico geneticina, a sequência promotora do CMV (citomegalovírus) e os sítios de restrição. **B.** Esquema linear do vetor apresentando as regiões dos sítios de restrição e a sequência Kozac.....39
- Figura 7.** Esquema dos ensaios de migração e invasão. Os ensaios diferenciam-se pela presença de uma camada de matrigel sobre a membrana da câmara no ensaio de invasão. O matrigel faz a função da matriz extracelular que as células devem degradar para atingir o meio com soro. As células são depositadas na parte superior do inserto e aquelas que não atravessam a membrana após um período específico são retiradas com auxílio de uma haste de algodão.....44
- Figura 8.** Representação esquemática dos ensaios para análise do efeito da expressão ectópica de *KLK8* na concentração de metabólitos e proteínas celulares e secretadas.....45
- Figura 9.** Protocolo do ensaio de meio condicionado para análise do secretoma e proteoma do meio condicionado e das células.....47
- Figura 10.** Árvore filogenética da família de genes das calicreínas humanas, suas isoformas e o pseudogene *KLKP1*, tendo como grupo externo o domínio TRYPSIN1. Os números nos nodos indicam os valores de suporte para esses nodos. Programa MEGA (versão 5.05).....53

- Figura 11. A.** Foto de gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio para visualização das duas bandas ribossomais 18S e 28S em amostras de tumores primários. Linhagem celular Hep-2 (1) e FaDu (2). **B.** Representação gráfica do gel gerado pelo equipamento Bionalyzer para visualização das duas bandas ribossomais 18S e 28S. L=marcador de peso molecular e 10 das 23 amostras estudadas.....54
- Figura 12.** Leituras dos picos de RNA em 18S e 28S, com os dados gerados de quatro amostras de tumores primários, concentração de RNA em ng/uL e integridade do RNA.....55
- Figura 13:** Valores de expressão relativa em logaritmo de base 2 das variantes 1 a 6 de *KLK8* em carcinomas de cabeça e pescoço.....56
- Figura 14. A.** Células controle não transfectadas, com aspecto apoptótico decorrente da presença de geneticina no meio de cultura para a qual não são resistentes. **B.** Células após transfecção com a isoforma 1 do gene da *KLK8*, exibindo proliferação e resistência à geneticina em função da presença do vetor pCMV6- AC com o gene NEO^R.....57
- Figura 15.** Valores de expressão relativa em logaritmo de base 2 da variante 1 de *KLK8* em células transfectadas com o vetor cheio (C) e seu controle com o vetor vazio (V). **A.** HEp-2. **B.** FaDu. A quantificação relativa do gene foi calculada pelo teste t não pareado. O *GAPDH* foi usado como controle constitutivo e a amostra sem vetor como calibrador.....58
- Figura 16. A-C.** Morfologia das células HEp-2, aumento 20x; **D-F.** FaDU, aumento 10x. (A, D) controle de reação sem vetor, (B, E) células transfectadas com vetor vazio e (C, F) com vetor cheio, respectivamente.....59

- Figura 17.** Curva de proliferação evidenciando a diferença entre células transfectadas com o vetor cheio e seus controles negativos. **A.** HEP-2. **B.** FaDu. ANOVA, $p=0,013$ e $p=0,15$, respectivamente.....60
- Figura 18.** Gráfico com os resultados obtidos no ensaio MTS, evidenciando a diferença de viabilidade em células transfectadas com o vetor cheio e seus controles negativos. **A.** HEP-2. **B.** FaDu. ANOVA, $p=0,032$ e $p=0,024$, respectivamente.....60
- Figura 19.** Ensaio de migração. **A-F.** Fotomicrografia de núcleos após 8 horas de cultivo. A marcação com DAPI foi modificada de azul para branco para melhor visualização. Linhagem HEP-2 **(A)** sem vetor/C; **(B)** com vetor vazio/VV; **(C)** com vetor cheio/VC (ANOVA $p=0,004$). Linhagem FaDu. **(D)** sem vetor/C; **(E)** com vetor vazio/VV; **(F)** com vetor cheio/VC (ANOVA $p=0,005$). **G-H.** Gráfico com a média do número de células em 5 fotomicrografias de cada triplicata de **(G)** HEP-2 e **(H)** FaDu.....61
- Figura 20.** Ensaio de invasão. **A-F.** Fotomicrografia de núcleos após 48 horas de cultivo. A marcação com DAPI foi modificada de azul para branco para melhor visualização. Linhagem HEP-2 **(A)** sem vetor/C; **(B)** com vetor vazio/VV; **(C)** com vetor cheio/VC (ANOVA $p=0,370$). Linhagem FaDu. **(D)** sem vetor/C; **(E)** com vetor vazio/VV; **(F)** com vetor cheio/VC (ANOVA $p=0,076$). **G-H.** Gráfico com a média do número de células em 5 fotomicrografias de cada triplicata de **(G)** HEP-2 e **(H)** FaDu.....62
- Figura 21.** Valores de expressão relativa em logaritmo de base 2 dos genes *SCL2A1*, *LDHA*, *PKM2* e *PKM1* nas células transfectadas com o vetor com *KLK8* em comparação com as células controle.....67

Figura 22. Via do metabolismo de aminoácidos, transporte molecular e bioquímica de pequenas moléculas atribuída pelo programa *Ingenuity* a proteínas diferencialmente expressas, celulares e secretadas, em associação com a calicreína 8.....71

Figura 23. Modelo proposto pelo programa MODELLER para a calicreína 8. **A.** Em vermelho, o sítio catalítico da proteína com os resíduos histidina, ácido aspártico e serina. **B.** Alfa hélices em vermelho e folhas beta em amarelo.....72

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Associação das calicreínas com doenças humanas, eventos observados e seu potencial em prognóstico.....	19
Tabela 2. Características clinicopatológicas de 23 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço avaliados pelo presente estudo.....	27
Tabela 3. Características das linhagens utilizadas.....	28
Tabela 4. Iniciadores para os 6 transcritos de interesse da <i>KLK8</i>	38
Tabela 5. Freqüência dos parâmetros sexo, idade, exposição a fumo e álcool, subsítio e classificação TNM das lesões em 23 pacientes portadores de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço.....	52
Tabela 6: Concentração de metabólitos identificados nos secretomas 1 e 2 procedente de células transfectadas com o vetor de expressão contendo o gene <i>KLK8</i> , com o vetor vazio ou sem vetor (teste ANOVA, $p < 0,05$).....	64
Tabela 7. Quantificação relativa das proteínas diferencialmente expressas, atribuídas pelo programa <i>Scaffold</i> (teste exato de Fisher, $p < 0,05$).....	69
Esquema 1. Comparações de valores de Ct entre pares.....	41
Sumário 1: Processos e valores de p atribuídos pelo programa <i>Ingenuity</i> às proteínas diferencialmente expressas.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AREc	Elemento estimulador de resposta a andrógenos
CECP	carcinoma de células escamosas ou epidermóide de cabeça e pescoço
ER	Elementos responsivos
HPV	papilomavírus humano
hK	símbolo para as proteínas caliceínas
<i>KLKs</i>	símbolo para os genes calíceínas
IPA	Ingenuity pathway analysis
LDHA	Lactato desidrogenase-A
MEM	Minimum Essential Medium
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PKM	Piruvato quinase
PSA	Antígeno prostático
PK	Caliceína plasmática
RAREs	Elementos responsivos funcionais ao ácido retinóico
RIN	Número de integridade do RNA
RMN	Ressonância magnética nuclear

RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase pela transcriptase reversa
SAGE	Serial Analysis of Gene expression
SFB	Soro fetal bovino
SCL2A1 (GLUT1)	Transportador de glicose 1
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TCA	ciclo do ácido tricarboxílico
TNM	Tumor-Node-Metastasis
TK	Calicreínas teciduais

RESUMO

Introdução - Os carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (CECPs) estão entre os mais frequentes tipos de câncer, com mais de 600 mil novos casos por ano no mundo e taxas de sobrevida reduzidas. Além de sua incidência e mortalidade altas, os CECPs são clinicamente relevantes por causa de sua morbidade, em geral decorrente do diagnóstico tardio. O entendimento das vias moleculares envolvidas na iniciação e na progressão desses tumores é, portanto, importante, não somente para o entendimento de sua biologia, mas também para o desenvolvimento de abordagens preventivas e terapêuticas mais eficazes. Em estudos prévios do nosso grupo, o gene da calicreína 8 (*KLK8*) foi observado com expressão diferencial entre carcinomas de laringe e suas margens cirúrgicas, o que evidencia seu potencial como marcador tumoral, como ocorre com outro membro de sua família, a calicreína 3 ou PSA. **Objetivos e Metodologia** – O presente projeto teve como objetivo geral investigar a participação da calicreína 8 no desenvolvimento de CECPs. Seus objetivos específicos compreenderam (a) investigar as relações filogenéticas entre os genes *KLKs* com o auxílio do programa MEGA, (b) analisar, por PCR em tempo real, o padrão de expressão do gene *KLK8* e de sua isoforma mais abundante em CECP e em tecidos normais correspondentes, (c) avaliar o efeito da expressão elevada de *KLK8* no secretoma de células de CECP, utilizando ensaios com meio condicionado e abordagens proteômicas e metabolômicas, (d) desenvolver a modelagem molecular por homologia da proteína hK8 com ferramentas de bioinformática. **Resultados** – A análise filogenética da família de genes das calicreínas

humanas e suas isoformas confirmou a idéia de que esses genes evoluíram de um único ancestral comum por sucessivas duplicações em tandem e rearranjos cromossômicos facilitados por elementos repetitivos. Os dados de expressão gênica em tecidos tumorais mostraram que a variante 1 de *KLK8* apresenta níveis significativamente reduzidos em CECP, ao contrário das outras cinco variantes. A indução permanente *in vitro* desta variante resultou em mudança da morfologia celular, aumento de proliferação, viabilidade e capacidade migratória, sem aumento concomitante de invasividade. Os dados obtidos sobre essas células com expressão ectópica de *KLK8* revelaram pequenas diferenças em seu proteoma quando comparadas com células controle. Por outro lado, exibiram modificação no padrão glicolítico e no potencial de seu secretoma de afetar o metabolismo de outras células. **Conclusão** - O presente estudo foi importante para responder a alguns questionamentos e levantar outras questões sobre a função do gene *KLK8* em carcinomas de cabeça e pescoço. O estudo identificou, pela primeira vez, as diferenças de expressão entre as isoformas de *KLK8* em CECP e os efeitos da indução de sua expressão sobre o proteoma e o secretoma de suas células.

ABSTRACT

Introduction - The head and neck squamous cell carcinomas (HNSCCs) are among the most frequent types of cancer, with more than 600,000 new cases per year worldwide. The five-year survival rate is low in this disease and one of the reasons is that patients with tumours in early stages frequently exhibit few symptoms, resulting in diagnosis delay and severe morbidity. The understanding of the molecular pathways involved in the initiation and progression of these tumors is therefore important not only for understanding their biology, but also for the development of more effective preventive and therapeutic approaches. In previous studies of our group, the kallikrein 8 gene (*KLK8*) was observed differentially expressed in laryngeal carcinomas and its surgical margins, which highlights its potential as a tumor marker, similar to another member of *KLK* family, kallikrein 3 or PSA. **Objectives and Methodology** - The overall objective of the present study was to investigate the participation of the kallikrein 8 in the HNSCC development. The specific objectives included (a) to investigate the phylogenetic relationships among *KLKs* genes using the MEGA program, (b) to analyze, by real time PCR, the expression pattern of the *KLK8* gene and its most abundant isoform in HNSCC and their surgical margins, (c) to evaluate the effect of elevated expression of *KLK8* in HNSCC secretome, using conditioned medium and proteomic and metabolomic approaches, (d) to develop molecular homology modeling of protein hK8 by bioinformatics tools. **Results** - The phylogenetic analysis of human kallikrein genes and their isoforms confirmed the idea that these genes evolved from a single common ancestor by successive tandem duplications and

chromosomal rearrangements facilitated by repetitive elements. The results of gene expression analysis in tumor tissues showed that the variant 1 of *KLK8* has significantly reduced levels in HNSCC, unlike the other five variables. The ectopic expression of this variant resulted in changes of cell morphology, increased proliferation, viability and migratory capacity, but no alterations in invasiveness. The data from cells with ectopic expression of *KLK8* revealed small differences in their proteomes compared to control cells. Otherwise, these cells exhibited changes in their glycolytic pattern and in the effect of their secretome on the metabolism of other cells. **Conclusion** - This study was important to answer some questions and raise others questions about the role of *KLK8* gene in carcinomas of the head and neck. For the first time, differences in expression of *KLK8* isoforms were observed in HNSCC and the effects of ectopic *KLK8* expression on the proteome and the secretome of HNSCC cells.

INTRODUÇÃO

Câncer, conceitos gerais

Durante o desenvolvimento do câncer, as células tumorais adquirem uma série de características fenotípicas que permitem sua proliferação, invasão dos tecidos adjacentes e formação de metástase. Para melhor compreender a biologia do câncer, sua diversidade e desenvolvimento, Hanahan e Weinberg (2000) (1) propuseram seis características ou *hallmarks*, que permitem visualizar de forma esquemática a complexidade da doença neoplásica e as propriedades adquiridas pelas células durante a tumorigênese. Essas características incluem manutenção de sinais de proliferação, resistência à morte celular, indução de angiogênese, imortalidade replicativa, ativação de invasão e metástase, evasão de supressores de crescimento (Figura 1).

Com o enorme progresso da pesquisa em câncer que ocorreu nos últimos anos, Hanahan e Weinberg (2011) (2) atualizaram sua proposta e acrescentaram duas outras características envolvidas na patogênese de alguns ou de todos os tumores. Uma delas é a capacidade de reprogramar o metabolismo celular para suportar de modo eficiente a proliferação. A outra diz respeito à capacidade de evasão ao ataque imunológico. Além dessas, foram propostas duas outras características que facilitam a aquisição dos *hallmarks* principais: a instabilidade genômica e, portanto, a mutabilidade que garante à célula com alterações genéticas seguir o processo neoplásico, e a inflamação realizada pelo sistema imune inato, que promove as demais características.

Os autores reforçaram com sua análise a importância das interações entre a célula neoplásica e seu microambiente, cruciais para o fenótipo tumoral. No caso da maioria dos tumores sólidos, além das próprias células neoplásicas, estão presentes diferentes tipos celulares que auxiliam o tumor a invadir e colonizar outros tecidos normais próximos e distantes dele. Entre eles, estão células-tronco com capacidade de auto-renovação e diferenciação em múltiplas linhagens celulares especializadas, fibroblastos, células endoteliais e inflamatórias. A abundância, a organização histológica e as características fenotípicas das células do estroma, bem como da matriz extracelular, modificam-se durante a progressão neoplásica e, portanto, não são as mesmas de um estroma de tecido não neoplásico correspondente (Figura 2) (2).

Atualmente, um tópico importante do estudo em câncer é o secretoma celular – um conjunto de proteínas que são processadas pelo retículo endoplasmático e pelo complexo de Golgi e seguem a via clássica de secreção, bem como proteínas que se desprendem da superfície celular ou são excretadas por vias não-clássicas ou exossomos. Entre as proteínas secretadas estão numerosas enzimas, fatores de crescimento, citocinas e hormônios ou outros mediadores solúveis, fundamentais nos processos de crescimento celular, diferenciação, invasão e angiogênese e que regulam as interações célula-célula e célula-matriz extracelular. Estas características tornam o secretoma um importante alvo de estudo, tanto em relação ao efeito do ambiente celular no desenvolvimento de células normais e neoplásicas, como na descoberta de novos marcadores tumorais (3, 4).

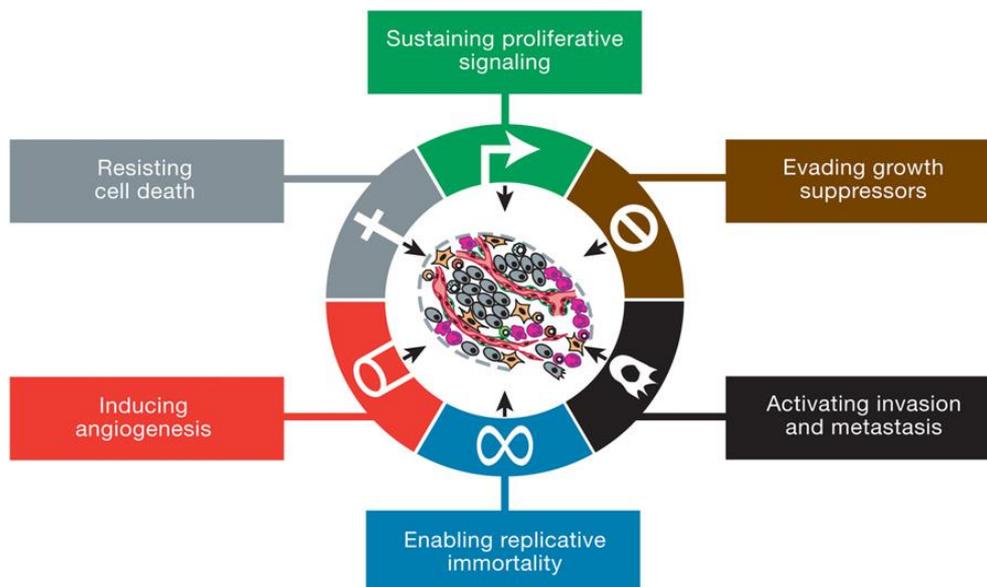


Figura 1. Ilustração original das seis marcas principais da célula tumoral segundo Hanahan e Weinberg (2000): sustentação de sinais de proliferação, resistência à morte celular, indução de angiogênese, capacidade de imortalidade replicativa, ativação de invasão e metástase, evasão de supressores de crescimento ⁽¹⁾.

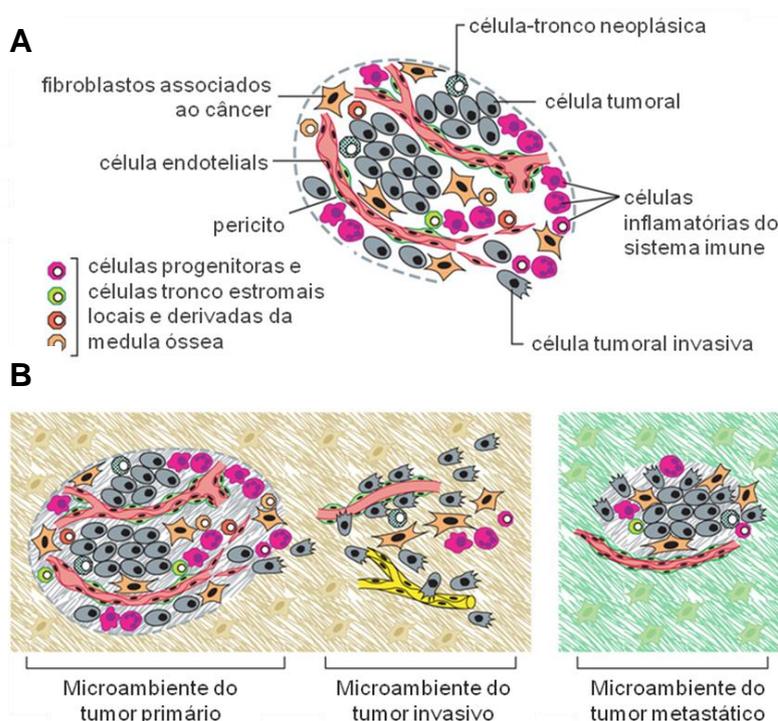


Figura 2. (A) Tipos celulares presentes no tumor e (B) microambientes do tumor com fenótipo invasivo e metastático, segundo Hanahan e Weinberg (2011) ⁽²⁾.

O metabolismo energético de células tumorais é marcadamente alterado em relação ao de células normais em função, principalmente, das necessidades bioenergéticas e biossintéticas de células em constante proliferação (5-7). As principais alterações metabólicas estão relacionadas ao consumo de glicose e glutamina, dois nutrientes abundantes do plasma sanguíneo que são responsáveis pela maior parte do metabolismo de carbono e nitrogênio nas células de mamíferos (8).

O metabolismo alterado da glicose ocorre por glicólise aeróbica, processo também denominado Efeito de Warburg, que consiste no maior consumo de glicose pelas células proliferativas em relação às células quiescentes. A glicose, neste processo, é reduzida a lactato e não fosforilada pelo processo oxidativo da cadeia respiratória, mesmo na presença de oxigênio (5, 9) (Figura 3). Embora existam muitas evidências de que este metabolismo alterado da glicose esteja relacionado com invasão, migração e homeostase energética, suas vantagens para as células tumorais ainda não estão bem esclarecidas (revisto por Choi SY et al, 2013) (10, 11).

Além da glicose, as células podem também oxidar parcialmente a glutamina por um processo denominado glutaminólise (12). O metabolismo da glutamina resulta na geração de α -cetoglutarato, que alimenta o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) para síntese de intermediários reduzidos e piruvato, favorecendo assim o acúmulo de lactato. A glutamina também atua no processo de anaplerose dirigindo o TCA para geração de energia, e repõe os compostos utilizados para a biossíntese de ácidos graxos, purinas, pirimidinas e aminoácidos essenciais. Além disso, a glutamina pode ativar padrões

metabólicos, como a via do mTOR, regulando assim síntese protéica e proliferação (revisto por Yang et al, 2014) (11).

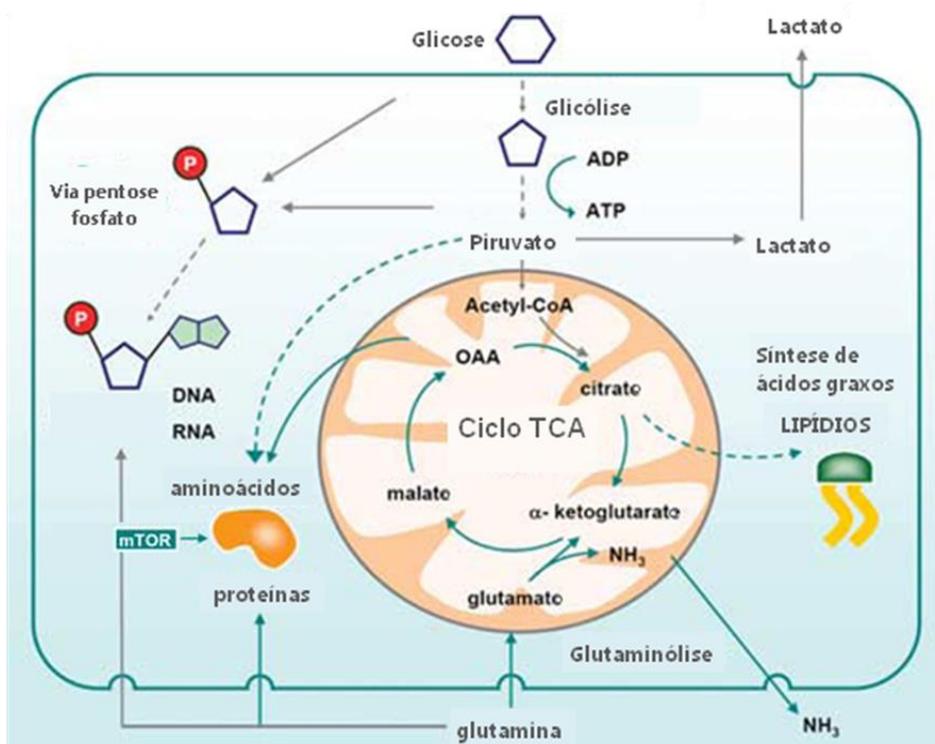


Figura 3. Metabolismo de células com taxas elevadas de proliferação. A proliferação requer glicose, que é convertida em piruvato na glicólise, para síntese de aminoácidos. O piruvato pode ser convertido em acetil-coenzima A, que entra no ciclo TCA na forma de citrato ou é exportado para o citosol para síntese de lipídios. As células requerem glutamina para síntese de proteínas, DNA e RNA. A glutamina também participa da modulação da via do mTOR. A amônia e o lactato são secretados como descarte. Modificado de Munõz-Pinedo et al, 2012 ⁽¹³⁾.

Carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço

Os tumores de cabeça e pescoço compreendem processos neoplásicos que ocorrem no trato aéreo-digestivo superior, incluindo cavidade oral, faringe e laringe. O tipo histológico mais comum é o carcinoma de células escamosas ou epidermóide (CECP). Estes carcinomas são heterogêneos e resultam do acúmulo de mutações somáticas em genes que regulam o crescimento, a proliferação e a morte celular, conseqüentemente levando a alterações na função de seus produtos. Existem muitas evidências de que também resultam de mudanças epigenéticas responsáveis por alterações do padrão de expressão gênica da célula. Esses eventos geralmente conferem vantagens adaptativas à célula que levam a um fenótipo maligno (14).

Estima-se uma incidência anual de aproximadamente 600 mil novos casos de CECP no mundo (15). No Brasil, as estimativas para o ano de 2014 apontam para aproximadamente 23 mil novos casos somente na cavidade oral e na laringe (16).

Embora a origem desse grupo de doenças seja multifatorial, há uma forte associação com o abuso de tabaco e álcool (17, 18), o que é evidenciado pelo aumento de incidência em populações em que estes hábitos são comuns (19). Na literatura, também há indicação do envolvimento do papilomavírus humano (HPV) na etiologia dos CECPs (20-27), primeiramente proposto por Syrjanen et al. (1983) no processo de carcinogênese oral e da orofaringe (28).

Além de sua incidência, os CECPs são clinicamente importantes porque aumentam significativamente as taxas de morbidade e mortalidade (29). O

índice geral de sobrevida em 5 anos para pacientes com CECPs está entre os mais baixos quando comparado a outros tipos de câncer (30).

A análise molecular é uma ferramenta importante no processo de desenvolvimento de novas terapias, com potencial para identificar alterações tumor-específicas ou indicativas do comportamento da lesão. Por exemplo, mudanças no perfil de expressão gênica detectadas exclusivamente ou preferencialmente em determinados tipos de câncer podem ser utilizadas para detecção precoce e avaliação de agressividade (31) e, se identificadas na fase pré-operatória, também na definição de um tratamento apropriado para o paciente (32). Entretanto, poucos marcadores moleculares são conhecidos hoje em dia que apresentam características de sensibilidade e especificidade para diagnóstico ou prognóstico em CECP.

O entendimento das vias moleculares envolvidas na iniciação e na progressão desses tumores é, portanto, muito importante para o conhecimento da biologia do tumor e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de abordagens preventivas e terapêuticas eficazes.

Embora algumas mutações gênicas sejam consistentemente descritas, alterações de expressão gênica na progressão tumoral de CECP não são ainda completamente caracterizadas.

Um estudo prévio de nosso grupo avaliou dados de análise serial de expressão gênica ou SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) em carcinomas de laringe e tecidos normais correspondentes (33). Sua análise estatística de aproximadamente 54 mil tags revelou conjuntos de 1.216 tags diferencialmente expressos entre tumor e tecido normal e 894 entre o tipo

metastático e o não metastático. No grupo dos 60 genes com valores mais discriminativos, está a calicreína 8 (*KLK8*), uma serino-protease que será discutida em detalhes em itens subsequentes.

O degradoma humano

A síntese de proteínas é essencial para células vivas metabolicamente ativas, mas seu inverso, a degradação proteica, não deixa de ser menos importante. Os mecanismos proteolíticos acionados pelas proteases mantêm os níveis de proteínas adequados, reconhecendo e degradando aquelas erroneamente enoveladas ou localizadas em compartimentos celulares incorretos. Além de atuarem no catabolismo não-específico, as proteases estão envolvidas em ativação e clivagem seletiva, modulando as interações proteína-proteína e contribuindo para a sinalização celular, tanto como unidades catalíticas ou complexos multicatalíticos. Em função de suas ações de amplo espectro, as proteases desempenham um papel crítico na regulação de processos biológicos normais, incluindo replicação e transcrição do DNA, proliferação celular, diferenciação e apoptose. Quando alteradas, podem facilitar o desenvolvimento de condições mórbidas, como doenças inflamatórias e degenerativas (34). A importância destas enzimas hidrolíticas é refletida pelo número de genes já identificados em várias espécies de mamíferos, com mais de 500 em humanos e primatas, e mais ainda em roedores (35-38).

O conjunto de proteases humanas – chamado de degradoma humano – está distribuído nas classes aspártico-, treonina-, cisteína-, serina- and metalo-proteases, de acordo com seu grupo químico envolvido na catálise (39, 40), sendo

as três últimas as mais estudadas (34). Seus padrões de clivagem de substratos podem ser específicos para um único peptídeo, como é o caso de proteases envolvidas em vias de sinalização celular, ou comum para uma grande gama de peptídeos, bem exemplificado pelas enzimas digestivas (41). Outras, como as proteases inativas ou pseudo-proteases, ligam-se ao seu substrato sem clivá-los, exercendo assim uma função reguladora (42).

Informações detalhadas sobre proteases em procariotos e eucariotos, famílias de proteases, pseudogenes, sequências derivadas de retrovirus endógenos, estruturas tridimensionais, substratos e eventos proteolíticos têm sido depositadas em diferentes bancos de dados, como o MEROPS (43) e o Degradome (44). O Degradome contém informações sobre genes de protease em humanos, chimpanzés, ratos e camundongos, e sobre doenças hereditárias relacionadas com padrões alterados de proteólise. O MEROPS, por sua vez, apresenta uma classificação de proteases com base em similaridades de sequência e estrutura e as agrupa em clãs e famílias de acordo com ancestralidade e estrutura primária ou mecanismo catalítico, respectivamente. Cada clã é identificado por duas letras, a primeira representando o tipo catalítico das famílias, ou com a letra P quando contém famílias com mais de um tipo catalítico. A segunda letra é sequencial, A-Z.

O grupo das serino-proteases

Cerca de um terço das enzimas proteolíticas são serino-proteases, geralmente endopeptidases, as quais são agrupadas em 13 clãs e dezenas de famílias. Estas enzimas utilizam o resíduo serina presente em seu sítio ativo como um nucleófilo para atacar a ligação peptídica do substrato. A reação também

depende dos aminoácidos histidina e ácido aspártico que, juntamente com a serina, compõem a tríade catalítica (45).

Nos seres humanos, o clã PA das serino-proteases é o mais abundante, com os membros da família S1 envolvidos em muitos processos extra e intracelulares relacionados principalmente com digestão de alimentos, coagulação do sangue e imunidade (revisto por Di Cera et al, 2009 e Heutinck et al, 2010) (46, 47). Embora estes processos sejam essenciais para catabolismo ou clivagens seletivas, necessárias para a sinalização celular, a atividade das serino-proteases (bem como de outras proteases) é potencialmente devastadora e diversos mecanismos celulares foram selecionados para sua regulação. Um desses mecanismos envolve síntese de zimogênios inativos ou proenzimas que atuam em seus substratos apenas quando ativados. Outro mecanismo é realizado por serpinas, uma superfamília de inibidores de serino-proteases, que antagonizam suas atividades em muitas vias metabólicas (47).

Embora rigidamente controladas, várias serino-proteases têm sido associadas a doenças humanas. Por exemplo, níveis elevados de granzima (enzimas armazenadas em grânulos) têm sido observados em doenças inflamatórias crônicas, tais como artrite reumatóide(48), asma (49), diabetes (50), aterosclerose (51), doença pulmonar obstrutiva crônica (52) e doenças cardiovasculares (53). Também têm sido associadas à suscetibilidade a fissuras cutâneas e desorganização de colágeno, como observado em feridas crônicas e danos na pele causados pela idade e por radiação solar (54). O papel da granzima nestas condições reside em sua capacidade de clivar muitos substratos, induzindo apoptose por vias caspase-dependentes e – independentes (55). Além disso, seu

potencial para criar ou destruir epítomos auto-imunes (56) e ser regulada de forma inadequada em feridas ou liberada de maneira inespecífica de células imunes para espaços extracelulares contribui para inflamação crônica ou desorganização da matriz extracelular (52).

Outros exemplos incluem as proteases de neutrófilos, tais como a elastase, a catepsina G e a mieloblastina, cujos níveis aumentados estão relacionados com a gravidade da fibrose cística e da doença pulmonar obstrutiva crônica (57). A triptase e a quimase, duas serino-proteases armazenadas em grânulos de mastócitos, podem contribuir para asma (58), psoríase (59), aterotrombose (60), doença fibrótica (61) e doença renal inflamatória (62).

Em relação ao câncer, várias serino-proteases têm sido incluídas em mecanismos que levam a proliferação tumoral e metástase (revisto por Heutinck et al, 2010 (47)), e identificadas em cascatas de sinalização e em processos proteolíticos associados com o fenótipo neoplásico. Na verdade, um dos biomarcadores de câncer mais usados em medicina clínica - a calicreína 3 ou PSA (antígeno prostático específico) - é membro de uma importante família de serino-proteases expressas e secretadas em muitos tecidos (63). O potencial da família das calicreínas como biomarcadores de várias doenças tem sido evidenciado pela literatura, especialmente em relação à sua utilização em testes diagnósticos, prognósticos e preditivos (revisto por Borgoño et al, 2004 e Dong et al, 2014) (64-67).

Calicreínas

Genes e proteínas – características gerais

As calicreínas humanas (hK), inicialmente detectadas em níveis elevados no pâncreas – *kallikreas* em grego, incluem serino-proteases do plasma e teciduais, duas categorias que diferem em relação a peso molecular, especificidade de substrato e estrutura gênica. A única calicreína plasmática (PK) é uma glicoproteína codificada pelo gene *KLKB1* mapeado na região cromossômica 4q35 e predominantemente sintetizada no fígado como um precursor inativo. Após sua ativação pelo factor de coagulação XII, a PK cliva o quininogênio de alto peso molecular para liberar a bradiquinina, um mediador de coagulação sanguínea, inflamação, pressão arterial e trombose (68).

As 15 calicreínas teciduais (TK) humanas são codificadas por genes agrupados em uma seqüência de aproximadamente 300 kb na região cromossômica 19q13.33-13.41, todos contendo 5 exons codificantes com comprimentos semelhantes e sequências homólogas (Figura 4) (69, 70). Um pseudogene (*KLKP1*) foi encontrado e mapeado nessa região (71) assim como vários elementos repetitivos, entre eles ALU, Tigger2, MER8 e MSR1 (72). Esse extenso cluster de genes das calicreínas humanas é limitado pela família de genes denominada *SIGLEC* (*sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin*) e pelo gene *ACPT* (*testicular acid phosphatase*) nas regiões telomérica e centromérica, respectivamente.

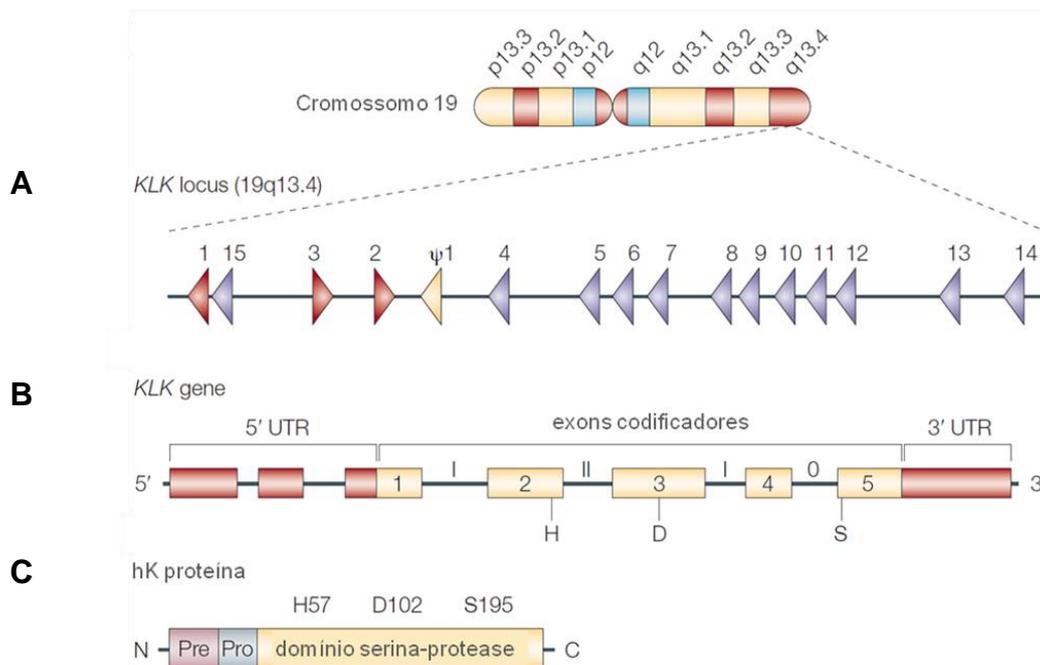


Figura 4. Características de loco, genes e proteínas da família das caliceínas, com **A.** Localização no cromossomo 19, direção de transcrição (setas vermelhas = caliceínas clássicas, seta amarela = pseudogene, setas roxas = demais caliceínas); **B.** Gene *KLK* com os 5 exons codificantes e a posição dos resíduos catalíticos, histidina (H), ácido aspártico (D) e serina (S); **C.** Sequência sinal (Pre), que direciona a proteína hK para o retículo e para secreção, o propeptídeo (Pro) que a mantém inativa, e domínio serina-protease. Modificada de Borgoño et al (2004)⁽⁶⁴⁾

A expressão das caliceínas é regulada tanto no nível transcricional como traducional e pós-traducional. No nível transcricional, vários elementos responsivos (ER) foram identificados nos seus promotores, tais como o receptor γ relacionado a estrógeno (ERR γ) (73), um motivo GATA ligante em *KLK1* (74), e elementos responsivos funcionais ao ácido retinóico (RAREs) em *KLK10* (75). Em função da importância da expressão de *KLK3* no câncer de próstata, uma série de ERs já foram descritos para seu promotor, incluindo Sp1/Sp3 (76) e o sítio de ligação para o fator de transcrição WT1 (77), um ER putativo para p53 (78), um XBE (elemento ligador de fator X, que é específico para a subunidade p65 do NF-kappaB) em

AREc (elemento estimulador de resposta a andrógenos) (79) e três elementos responsivos a andrógeno AREI, ARE II e AREIII. Estes elementos responsivos a andrógenos são também encontrados nos promotores de *KLK2* (AREI e AREII) e de *KLK4*, *KLK8*, *KLK10*, *KLK11*, *KLK12*, *KLK13* e *KLK15* (80-83).

A expressão dos genes *KLKs* também pode ser regulada por meio de mecanismos epigenéticos, quer por metilação do DNA quer por modificações em histonas e microRNAs (84). Se alterados, tais mecanismos afetam a fisiologia celular normal e facilitam a tumorigênese. Realmente, a metilação anormal no promotor de *KLK10* que inibe sua expressão foi descrito em leucemia linfoblástica aguda (85) e em câncer de mama (86), gástrico (87) e próstata (88). Da mesma forma, acetilação anormal de histonas nas seqüências de *KLK2* e *KLK3*, e expressão alterada de miRNAs, que têm como alvo genes *KLKs*, também já foram relatados em linhagens celulares de câncer de rim, próstata e mama (revisto por (84).

Além de eventos epigenéticos, polimorfismos em seqüências regulatórias podem potencialmente alterar as taxas de transcrição e os nível de proteína, como observado para a substituição homozigota da base G (rs266882) no elemento responsivo ao andrógeno (ARE-1) do promoter de *KLK3* (89) e para alelos polimórficos na região flaqueadora 5' do gene *KLK1* (90). A atividade dos genes *KLKs* é igualmente afetada por polimorfismos na região codificadora ou nas seqüências a jusante e 3'-UTR dos genes *KLK1*, *KLK2*, *KLK3* e *KLK7* (revisto por Batra et al, 2012) (91).

De acordo com o banco de dados NCBI Reference Sequence Database (acessado em 02/07/2014), os genes *KLKs* humanos possuem múltiplas isoformas,

exceto *KLK1*, *KLK4*, *KLK9*, *KLK13* e *KLK14*. Os transcritos alternativos são aparentemente espécie-específicos (92) e vários deles são câncer-específicos (93), o que sugere estarem em constante evolução. A diversidade dessas isoformas, especialmente aquelas sem motivos catalíticos peptidase, pode indicar um tipo de controle de atividade, por exemplo, competindo pelos mesmos substratos ou realizando diferentes funções tecido-específicas (92).

O processo de duplicação gênica é essencial e eficiente para gerar novos genes ou novas funções, que segundo sua importância são fixados e preservados pela seleção natural. A família das calicreínas torna-se importante no estudo evolutivo pelo fato de apresentarem um grande número de genes e variantes, exibirem co-localização e serem muito conservadas em uma grande variedade de espécies (94).

Em relação às características de seus produtos, as hKs são proteínas de aproximadamente 230 aminoácidos e 28-33 kD, embora algumas isoformas menores possuam apenas 3kD. Sua estrutura terciária padrão compreende dois conjuntos de seis folhas-beta enoveladas e anti-paralelas, e duas α -hlices, com o sítio ativo entre os conjuntos de folhas-beta (95, 96). Essas proteínas são sintetizadas como preproenzimas, que são processadas proteoliticamente para pró-calicreínas e secretadas após a remoção do peptídeo sinal terminal (Figura 4). Sua habilidade em liberar quininas foi inicialmente vista como definição de uma verdadeira calicreína. No entanto, além da calicreína plasmática, apenas a hK1 é capaz de clivar o quininogênio (neste caso, quininogênio de baixo peso molecular) para liberar bradiquinina.

Como mencionado acima, os promotores das calicreínas possuem vários elementos responsivos a hormônios e sua expressão pode ser regulada por hormônios esteróides (97). O banco de dados UniGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene/>, acessado em 02/07/2014) refere sequências expressas (ESTs) de *KLK* em quase todos os tecidos normais e sítios anatômicos, exceto em linfa, baço, paratireóide e timo. A maioria é predominantemente transcrita em alguns tecidos, mas em baixas taxas em muitos outros, com relativamente maior expressão de *KLK1* em glândula salivar, *KLK2* a *4* em próstata, *KLK5* e *6* em nódulo linfático, *KLK7* em ovário, *KLK8* e *11* em tecido adiposo e *KLK9* a *13* em laringe, faringe e boca.

As correlações entre os dados do UniGene e o perfil de expressão das proteínas não são altos pois os dados do UniGene, embora muito extensos, são inferidos a partir de diferentes fontes de ESTs e não refletem níveis de transcrição absolutos ou taxas de tradução. De fato, Shaw et al.(98) detectaram diferentes perfis para várias delas: hK1 altamente expressa em pâncreas e glândulas salivares, hK2, 3 (também observadas no plasma seminal) e 11 em próstata, hK5 em pele, hK6 em cérebro, hK9 em coração, e hK12 em vários sítios anatômicos. Ao contrário, hK4, 8, 14 e 15 exibiram um perfil mais homogêneo ou não foram detectadas em diversos tecidos. Os padrões de expressão foram compatíveis com suas origens - genes duplicados possuem padrão de expressão semelhante nos mesmos tecidos e padrões de co-expressão são compatíveis com suas funções fisiológicas (94).

O perfil proteico é também dependente do tipo celular considerado. Por exemplo, Komatsu et al. (99), analisando o estrato córneo da pele observou a presença de muitas hKs (hK5-8, 10, 11, 13, 14).

À semelhança do que se observa em outras proteases, diversos mecanismos regulatórios protegem os tecidos de proteólise deletéria pelas calicreínas. Além do controle de ativação da proenzima e seus inibidores endógenos (como α 2-macroglobulina e serpinas), ocorre a inativação de clivagens e regulação alostérica (82). Os mecanismos regulatórios podem ser realizados por outras proteases, incluindo membros da família hK, que são expressas no mesmo tecido. Por exemplo, a hK2 pode clivar a proenzima hK3 para gerar a proteinase madura que participa da cascata proteolítica envolvida na liquefação do sêmen (100). Recentemente, Yoon et al (101) observaram que a metaloproteinase MMP-20, usualmente expressa apenas no esmalte dentário, processa a pró-sequência de nove diferentes KLKs e pode ser um ativador não-específico da família KLK em certas doenças.

Na cascata proteolítica descrita para o processo de descamação da pele, a hK5 pode ser auto-ativada ou ativada pela hK14 em pH neutro e então processada pela hK7. Esta cascata pode ter início com a auto-ativação de hK6, seguindo a clivagem de hK11, que por sua vez ativa hK14. Apesar de não ser completamente compreendida, a descamação da pele também depende de outras proteases, incluindo catepsinas, proteases aspárticas, uroquinase, plasmina e metaloproteinases inflamatórias. Dado que a regulação das hKS é fundamental para uma descamação normal, vários inibidores endógenos participam como atenuadores, principalmente o LEKTI (*serine protease inhibitor Kazal-type 5*).

Outros fatores, tais como um ambiente ácido e irradiação UV (e a inflamação resultante) podem inibir LEKTI, contribuindo também para um aumento da expressão de hKS e descamação (102).

Em relação ao pH extracelular baixo, uma associação importante é conhecida - a desregulação de caliceínas em processos tumorais, cujo microambiente possui acidez elevada resultante da glicólise acelerada e do acúmulo de lactato no espaço extracelular (103). Níveis altos de caliceínas têm sido igualmente observados em metástases (67) e podem estar relacionados com a disseminação das células neoplásicas causada pela perda de integridade juncional como ocorre na descamação cutânea (104).

Não existem dúvidas, portanto, de que as caliceínas estão envolvidas em processos biológicos importantes. Suas intrincadas redes de sinalização e interações proteicas sugerem fortemente que este grupo de proteases pode regular o metabolismo normal e anormal. Não surpreende, portanto, seu envolvimento em câncer e outras doenças, embora seja difícil distinguir em cada caso se elas são vilões ou meros efetores (Tabela 1). As características da hK8 serão detalhadas no item seguinte, bem como seu potencial papel na fisiologia normal e em processos degenerativos.

Tabela 1. Associação das calicreínas com doenças humanas, eventos observados e seu potencial em prognóstico.

Doenças	Calicreínas	Padrão	Observação	Referências
Amelogenese Imperfeita	<i>KLK4</i>	SNP		(105-114)
Aneurisma	<i>KLK6</i>	Expressão Diminuída		(115)
Asma	<i>KLK1</i>	Expressão Elevada		(116, 117)
	<i>KLK3</i>	SNP		
Câncer Colorretal	<i>KLK4, 6, 7, 10</i>	Expressão Elevada	Prognóstico controverso	(118-127)
Câncer de Cabeça e Pescoço	<i>KLK10</i>	Metilação		(33, 128-131)
	<i>KLK4-7, 10</i>	Expressão Elevada	Sugestão de prognóstico favorável	
	<i>KLK8</i>	Expressão Elevada/Diminuída	Prognóstico controverso	
Câncer de Colo de Útero	<i>KLK7</i>	Expressão Elevada	Prognóstico controverso	(132-133)
Câncer de Mama	<i>KLK1, 4, 11, 15, KLKP1</i>	Expressão Elevada		(66, 134-152)
	<i>KLK8, 10-14</i>	Expressão Elevada	Sugestão de prognóstico favorável	
	<i>KLK5, 7</i>	Expressão Elevada	Prognóstico controverso	
	<i>KLK6</i>	Expressão Diminuída		
	<i>KLK10</i>	Metilação		
Câncer de Ovário	<i>KLK4, 6</i>	Expressão Elevada		(134, 140, 146, 153-181)
	<i>KLK8-10, 11, 13, 14</i>	Expressão Elevada	Sugestão de prognóstico favorável	
	<i>KLK5, 7</i>	Expressão Elevada	Prognóstico controverso	
	<i>KLK10, 15, KLKP1</i>	SNP		
Câncer de Próstata	<i>KLK1-4, 15, KLKP1</i>	Expressão Elevada		(83, 91, 134, 182-221)
	<i>KLK7</i>	Expressão Elevada	Prognóstico controverso	
	<i>KLK11</i>	Expressão Diminuída		
	<i>KLK2-6, 12-14</i>	SNP		
Câncer de Pulmão	<i>KLK10</i>	Metilação		(222-226)
	<i>KLK5-7</i>	Expressão Elevada		
	<i>KLK8</i>	Expressão Elevada	Sugestão de prognóstico favorável	
Câncer Gástrico	<i>KLK6, 7, 10, 14</i>	Expressão Elevada	Prognóstico controverso	(87, 126, 227-230)
	<i>KLK13</i>	Expressão Elevada	Sugestão de prognóstico favorável	
	<i>KLK11</i>	Expressão Diminuída		
Câncer Pancreático	<i>KLK7</i>	Expressão Elevada	Prognóstico controverso	(231)
Doença Autoimune	<i>KLK11</i>	Expressão Elevada		(232)
Doença Bipolar	<i>KLK8</i>	SNP		(233)
Doença Coronariana	<i>KLK1</i>	SNP		(234-243)
Doenças de Pele	<i>KLK5-8, 10-13, 15</i>	Expressão Elevada		(244-256)(257)(258)
	<i>KLK7</i>	SNP		(245)
Doenças Neurodegenerativas	<i>KLK1, 5-9</i>	Expressão Elevada		(115, 259-285)
Doenças Renais	<i>KLK1, 3</i>	SNP		(238, 286-290)
Esclerose Múltipla	<i>KLK6</i>	Expressão Elevada		(271, 291-293)
Melanoma	<i>KLK6</i>	Expressão Elevada		(294, 295)
	<i>KLK7, 8</i>	Expressão Elevada	Sugestão de prognóstico favorável	
Tumor Intracranial	<i>KLK6-8</i>	Expressão Elevada	Prognóstico controverso	(296, 297)

Calicreína 8

O gene da calicreína 8 humana (*KLK8*), cujo produto é conhecido como neuropsin ou hK8, foi clonado por Yoshida et al (1998) utilizando inicialmente análise de dados de ESTs seguida por avaliação de expressão em hipocampo e queratinócitos. A hK8 ocorre em seis isoformas (Figura 5). As isoformas 1 e 2 são idênticas exceto pelo fato da segunda possuir uma inserção de 135 bp no segundo éxon codificante (298). As variantes 3, 4, 5 e 6 perdem um ou mais exons, o que gera proteínas menores em função da ausência do segmento correspondente (isoforma 3) ou de um códon de parada prematuro (isoformas 4, 5 e 6). No caso da variante 5, a tradução tem início em um códon a jusante resultando em uma proteína com o N-terminal mais curto que a isoforma 2, a mais longa delas. A isoforma 6, ao contrário, mantém o segmento do peptídeo sinal, o mesmo necessário para secretar as isoformas 1 e 2, e deve, portanto ser também secretada, mas sem atividade serino-protease considerando que não apresenta dois resíduos da tríade catalítica (223, 225, 299, 300).

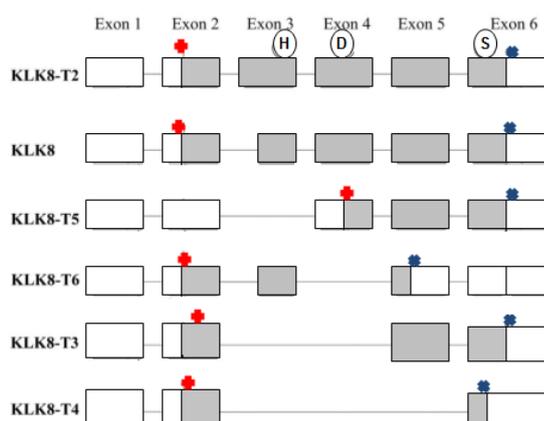


Figura 5. Isoformas do gene *KLK8*. Estrutura dos transcritos do gene *KLK8* - os retângulos brancos representam as regiões não codificantes e os cinza as codificantes. 🚩 codon de início; 🚩 codon de parada; H, D, S sítios catalíticos. Modificada de Planque et al. 2010.⁽²²²⁾.

A caracterização bioquímica da hK8 revelou ter esta protease especificidade semelhante à da tripsina. Sua capacidade em degradar fibronectina e colágeno, componentes de matriz extracelular e da membrana basal, sugere seu envolvimento em etapas de migração e invasão que ocorrem, por exemplo, no processo de metastatização realizado por células neoplásicas com fenótipo agressivo (301, 302).

Esta calicreína é encontrada em fluidos biológicos, como leite materno, líquido amniótico, soro, plasma seminal e saliva, confirmando assim sua secreção. Também é detectada em órgãos como esôfago, rins, mama, tonsila e pele. Sua expressão, da maneira similar à de outros membros de sua família, é regulada por uma variedade de hormônios esteróides, incluindo andrógenos, glicocorticóides e estrógenos (98, 303). A presença da hK8 é referida em várias regiões do cérebro humano adulto, entre elas hipocampo, córtex, amígdala, cerebelo e lobo frontal. Os transcritos 1 e 2 estão expressos em tecido fetal, adulto e em células-tronco embrionárias, sugerindo que a hK8 pode estar envolvida no desenvolvimento do sistema nervoso central [(298, 300) revisto por Luo, 2002 (144)]. A literatura também mostra sua relação com plasticidade neural e resposta a estresse (304, 305), memória (306), distúrbios de aprendizagem (307) e transtorno bipolar (233, 269, 308).

Na epiderme, a hK8 é encontrada no extrato córneo, onde atua em diferenciação de queratinócitos, descamação e formação da barreira de proteção cutânea (309). Os estudos com camundongos *knockout* para o gene *KLK8* mostraram que esses animais exibem diminuição da proliferação celular

na pele e aumento do número de camadas do extrato córneo (256), o que sugere um papel regulador de proliferação para a hK8.

Em psoríase e dermatite atópica, seus níveis encontram-se elevados (310), um achado que foi recentemente confirmado em diversas condições inflamatórias e doenças cutâneas (254, 255). Pelo menos em camundongos, parece estar envolvida em osteoartrite, uma doença que se manifesta com degeneração progressiva da cartilagem articular e inflamação sinovial (311).

Vários estudos têm mostrado a relação da hK8 com câncer. Como referido previamente, a remodelação da matriz extracelular modulada pela clivagem da fibronectina por hK8 pode afetar migração e invasão celular, que são importantes para o processo de metástase. Neste aspecto, a indução de sua expressão em linhagens celulares de diferentes origens e a implantação dessas células em camundongos têm revelado supressão de invasão e adesão celular *in vitro* (provavelmente por causa da degradação da fibronectina) e crescimento celular e invasividade *in vivo*.

Em concordância com esses dados, pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) e expressão elevada de hK8 mostram desfecho clínico favorável (225), exceto no caso da isoforma truncada 4 (223). De maneira similar, pacientes com câncer de ovário e expressão elevada de hK8, tanto nas células neoplásicas como no soro, apresentam um melhor prognóstico com baixa recidiva e maior sobrevida (172, 175). Em câncer de mama, a expressão desta protease mostra-se reduzida (312), apontando para seu papel como supressor de tumor. Por outro lado, uma atuação como supressor de metástase parece ocorrer em melanoma, no qual uma diminuição

coordenada nos níveis de transcritos de várias calicreínas (entre elas a 8) é observada conforme as células metastáticas passam do fenótipo primário para metastático (295).

Em carcinoma de laringe os dados de bibliotecas SAGE apresentaram uma redução de expressão de *KLK8* em tumores metastáticos (33), um achado contrário ao obtido em linhagens celulares de carcinoma oral, que mostraram um aumento de expressão em tumores metastáticos, com comportamento mais agressivo *in vivo* e *in vitro* (129). Este efeito oncogênico é observado também em carcinomas orais primários e em tumores de glândula salivar, colo de útero e endometriais (313-315), que mostram aumento de expressão porém sem relação com agressividade.

O número de trabalhos sobre a calicreína 8 em câncer, especialmente em carcinomas de cabeça e pescoço, é reduzido. Os dados são controversos em relação ao seu papel no processo neoplásico. Alguns estudos indicam um efeito protetor, outros sugerem sua participação no desenvolvimento tumoral ou no fenótipo invasivo. Por esse motivo, torna-se importante seu estudo utilizando diferentes abordagens que tragam novas informações e esclareçam se esta protease é um membro efetor de vias metabólicas oncogênicas ou realmente um componente chave neste cenário.

OBJETIVOS

O presente projeto teve como objetivo geral investigar a participação da calicreína 8 no desenvolvimento dos carcinomas de cabeça e pescoço. Os resultados podem contribuir para o entendimento de seu papel no processo neoplásico. Os objetivos específicos do presente projeto compreendem:

- Investigar as relações filogenéticas entre as isoformas do gene *KLK8*.
- Analisar o padrão de expressão do gene e de suas isoformas em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e de suas margens cirúrgicas aparentemente normais.
- Investigar, em linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço, o efeito da expressão elevada de *KLK8* no proteoma e no secretoma dessas células. Os resultados podem contribuir para entender a função do gene e de seus produtos, e sua atuação no microambiente tumoral.
- Desenvolver a modelagem molecular por homologia da proteína hK8, utilizando ferramentas de bioinformática. Considerando a ausência desses dados na literatura, os resultados podem auxiliar no desenvolvimento de ligantes que inibam ou ativem a protease.

MATERIAL E MÉTODOS

Casuística

A. Amostras de carcinomas epidermóides primários de cabeça e pescoço

No presente estudo, foram analisadas 23 amostras de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (CECPs) e suas respectivas margens cirúrgicas procedentes de pacientes que não receberam quimio ou radioterapia pré-operatória. As amostras foram coletadas após ressecção cirúrgica pela equipe do Projeto Temático FAPESP 04/12054-9 “Busca de marcadores de agressividade em tumores de cabeça e pescoço”, pertencentes ao consórcio de médicos e pesquisadores de hospitais e universidades do estado de São Paulo autodenominado GENCAPO, cujo objetivo é desenvolver análises clínicas, genéticas e epidemiológicas de carcinomas de cabeça e pescoço.

Imediatamente após sua ressecção, as amostras foram cortadas em duas partes: uma foi banhada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer -80°C e outra parte foi fixada em formalina para exame histopatológico de rotina. A parte congelada foi posteriormente transportada em gelo seco para o Laboratório de Marcadores Moleculares da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP, onde também foi armazenada em nitrogênio líquido ou freezer -80°C. Todas as amostras de tumor e margem cirúrgica foram macrodissecadas por um dos patologistas do GENCAPO para confirmação da presença de pelo menos 70% de células tumorais ou de ausência de células neoplásicas, respectivamente. O conjunto de amostras foi obtido a partir de três

subsítios anatômicos segundo os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (WHO) (<http://apps.who.int/classifications/apps/icd/icd10online/>): língua (C02), soalho de boca (C04), amígdala (C09) e laringe (C32).

Os tumores foram classificados pelo sistema TNM (*Tumor-Node-Metastasis*) da *Union Internationale Contre le Cancer* – UICC (<http://www.uicc.org/>). Este sistema descreve a extensão da doença com base na avaliação de três componentes: tamanho do tumor (T), ausência (0) ou presença (+) de metástase em linfonodos regionais (N) e ausência ou presença de metástase à distância (M). As amostras estudadas somaram 23 pares de tumor - margem cirúrgica procedentes de 3 carcinomas de língua (1 N0 e 2 N+), 9 carcinomas de soalho de boca (4 N0 e 5 N+), 3 de amígdala (3 N+) e 8 de laringe (5 N0 e 3 N+).

Os dados clinicopatológicos referentes a idade, sexo, exposição a fumo e álcool, subsítio primário e TNM dos casos analisados estão apresentados na Tabela 2. Todos os pacientes deram seu consentimento por escrito para participar da pesquisa após serem informados sobre os seus objetivos. O protocolo de estudo e o consentimento informado foram aprovados pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis, Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, Hospitais das Clínicas das Faculdades de Medicina de São Paulo e Ribeirão Preto, (Universidade de São Paulo), Universidade do Vale da Paraíba, (São José dos Campos), e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa / CONEP (número de referência 1763-1705, 18/05/2005).

Tabela 2. Características clinicopatológicas de 23 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço avaliados pelo presente estudo.

Caso	Sexo	Idade	Tabagista	Etilista	Sub-sítio	TNM
CP1/0232	F	60	nunca	nunca	Lingua	C02 T3N0M0
CP1/0057	M	57	Sim	no passado	Lingua	C02 T4N2BM0
CP3/0118	M	45	Sim	Sim	Língua	C02 T4N3M0
CP2/0168	F	70	no passado	nunca	soalho de boca	C04 T2N0M0
CP1/0363	M	64	Sim	Sim	soalho de boca	C04 T2N2CM0
CP1/0191	M	63	Sim	Sim	soalho de boca	C04 T3N0M0
CP1/0384	M	46	no passado	Sim	soalho de boca	C04 T3N0M0
CP1/0366	M	49	no passado	Sim	soalho de boca	C04 T4N0M0
CP1/0183	M	72	Sim	Sim	soalho de boca	C04 T4N2BM0
CP1/0032	M	64	Sim	Sim	soalho de boca	C04 T4N2CM0
CP1/0233	F	39	nunca	nunca	soalho de boca	C04 T4N2CM0
CP5/0066	F	63	nunca	nunca	soalho de boca	C04 T4N2M0
CP1/0088	M	53	Sim	Sim	Amígdala	C09 T4N2bM0
CP1/0231	M	58	Sim	Sim	Amígdala	C09 T4N2BM0
CP1/0131	M	59	Sim	no passado	Amígdala	C09 T4N2CM0
CP1/0174	M	68	Sim	no passado	Laringe	C32 T2N0M0
CP4/0001	M	52	no passado	no passado	Laringe	C32 T3N2CM0
CP3/0153	M	49	Sim	no passado	Laringe	C32 T3N3M0
CP1/0348	M	51	Sim	Sim	laringe glote	C32 T4N0M0
CP1/0357	M	76	nunca	nunca	laringe glote	C32 T4N0M0
CP1/0359	M	55	Sim	Sim	Laringe	C32 T4N0M0
CP1/0385	M	39	nunca	nunca	Laringe	C32 T4N0M0
CP3/0136	M	65	Sim	Sim	Laringe	C32 T4N2BM0

B. Linhagens celulares de carcinomas de cabeça e pescoço

No presente estudo, foram também analisadas as linhagens celulares HEp-2 (originalmente descrita como proveniente de carcinoma epidermóide de laringe) e FaDu (procedente de carcinoma epidermóide de faringe), ambas gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Otávia Luisa Silva Damas de Caballero, Instituto Ludwig, NY (Tabela 3).

As linhagens foram selecionadas por terem apresentado, em estudos anteriores do grupo, baixa expressão do gene *KLK8*.

Tabela 3. Características das linhagens utilizadas.

Linhagem	Origem	TNM	Dados dos pacientes	
			Idade (anos)	Sexo
<i>HEp-2</i>	Originalmente descrita como proveniente de carcinoma epidermóide de laringe, com contaminação com a linhagem HeLa (ref. ATCC CCL-23).	Não consta	56	masculino
<i>FaDu</i>	Carcinoma epidermóide de hipofaringe (ref. ATCC HTB-43)	Não consta	56	masculino

Métodos

A. Análise Filogenética

A análise filogenética foi realizada pelo programa MEGA (versão 5.05) (316), utilizando a ferramenta Muscl para alinhamento de sequências. O método selecionado foi o *Maximum Likelihood* (317), que constrói a árvore filogenética a partir de uma matriz com medidas de distâncias entre pares. O programa MEGA também gerou o melhor método de substituição de nucleotídeos para esses dados, que foi o GTR (*general time reversible*), empregando a distribuição Gama, categoria 5, e o *bootstrap* de 1000 para avaliar a robustez dos nodos (318). Para assegurar a confiabilidade dos nodos e enraizar a árvore, foi utilizada a tripsina como grupo externo por sua semelhança de sequência com as calicreínas (319, 320).

As seqüências dos RNAs mensageiros dos genes *KLKs* humanos, de suas isoformas e do pseudogene *KLKP1* utilizadas para a análise filogenética foram obtidas do banco de dados *Reference Sequences* (RefSeq), disponível no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

B. Cultivo Celular

O meio de cultura MEM (*Minimum Essential Medium*, Cultilab, Campinas, SP) foi utilizado para ambas as linhagens, HEp-2 e FaDu, suplementado com soro fetal bovino (SFB, Cultilab) 10%, aminoácidos não essenciais 10 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), L-glutamina 10 mM

(Sigma-Aldrich), piruvato de sódio 1 mM (Sigma-Aldrich) e solução de antibiótico/antimicótico 0,1% (Sigma-Aldrich).

As linhagens foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24h, até se fixarem no substrato. O crescimento e a morfologia celular foram monitorados a cada 24h em microscópio invertido e os meios de cultura foram substituídos a cada três dias. Quando uma subconfluência de aproximadamente 70% foi atingida, as células foram tripsinizadas e subdivididas em duas réplicas. Em resumo, o meio de cultura foi aspirado e as células foram lavadas com solução tampão fosfato-salina sem cálcio e magnésio, pH 7,2 (PBS). A solução de lavagem foi igualmente aspirada e as células foram tripsinizadas com a adição de solução de tripsina 0,05%-EDTA 0,02% (Sigma-Aldrich) e incubadas a 37°C por 2min para que a tripsina pudesse agir. Após a confirmação do descolamento das células em microscópio, a tripsina foi inativada pela adição de meio MEM com soro fetal bovino 10%. O material foi retirado da garrafa com auxílio de uma pipeta e depositado em dois tubos de ensaio, que foram centrifugados a 260 g por 2min. O *pellet* com células foi ressuspenso em meio e recultivado. Para manutenção do estoque de linhagens, um dos pellets foi periodicamente ressuspenso em SFB e solução de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) 9:1 e congelado.

Para avaliação do número de células a serem semeadas na fase de recultivo, foi utilizado o contador automático *Countess® Cell Counter* (Invitrogen, Forster City, CA, USA), que utiliza um algoritmo para análise de imagens e para cálculo do número de células vivas e mortas. Uma alíquota de

5 μ l de meio contendo as células tripsinizadas foi adicionado a um tubo *ependorf* com 5 μ L de azul de tripano (Sigma-Aldrich) e os 10 μ L totais foram aplicados em lâmina própria para contagem. As células vivas brilham devido à ausência do corante em seu interior, pois a membrana celular íntegra impede sua entrada. As células mortas, ao contrário, ficam opacas por causa da presença do azul de tripano em seu citoplasma, uma vez que a membrana celular não é mais seletiva. O número de células viáveis/mL identificadas pelo aparelho foi utilizado para calcular o volume de meio com células a ser semeado.

Para obtenção de réplicas, as células foram semeadas com densidade de 1×10^6 e cultivadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24h. Após sua adesão ao frasco, o meio de cultura foi trocado por meio sem soro para sincronização do ciclo celular. As células foram mantidas nesse meio por 24h, tempo suficiente para que ingressassem na fase G₀. Após este período, o meio foi substituído por meio completo e as células foram cultivadas por 72h, quando foi realizado o bloqueio da cultura com solução de tripsina/EDTA. Uma das réplicas foi encaminhada para extração de RNA, DNA e proteínas e a outra continuou em cultivo para análises posteriores.

Todos os procedimentos de cultivo celular foram realizados em fluxo laminar bidirecional, específico para manutenção da esterilidade dos materiais bem como para evitar a contaminação das culturas.

C. Análise da expressão gênica

Extração seqüencial de RNA, DNA e proteínas

O RNA, o DNA e as proteínas foram extraídos pelo método do trizol (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), segundo protocolo já estabelecido no laboratório (321).

O meio das garrafas de cultura foi retirado e as células foram lavadas com 5 mL de PBS. Após este passo e a retirada do PBS, o protocolo para linhagens celulares e tumores primários foi similar e seguiu com a adição de 3 mL de trizol, uma solução monofásica de fenol e tiocianato de guanidina que mantém a integridade do RNA enquanto promove a lise celular. O material foi distribuído em tubos de 1,5 mL e mantido à temperatura ambiente por 20min. Em seguida, recebeu 200 µL de clorofórmio gelado para cada mL de amostra em trizol, foi homogeneizado por 1min e incubado por 10min à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g, por 15min a 4°C, para separar a fase aquosa, que contém RNA, da interfase branca e leitosa que contém principalmente proteínas, e da fase orgânica, com DNA e proteínas. A fase aquosa com RNA foi transferida para um novo tubo com 500 µL de isopropanol gelado e 10 µg de glicogênio e mantida por 20min à temperatura ambiente. Após esta etapa de precipitação, as amostras foram centrifugadas a 14.000 g por 15min a 4°C e o sobrenadante foi descartado por inversão. O sedimento foi lavado três vezes com 1 mL de etanol 70% gelado, agitado até se soltar do tubo e centrifugado a 14.000 g por 2min a 4°C. O excesso de etanol foi retirado por pipetagem e os tubos foram colocados em banho seco a 42°C por um minuto para secagem total do precipitado. O material foi ressuspensionado em 20-

50 μ L (dependendo do tamanho do sedimento) de água livre de nucleases. As amostras foram colocadas em banho seco a 55°C por 10min para melhor eluição do RNA. Uma alíquota foi utilizada para quantificar e analisar a integridade do RNA. A fase orgânica com DNA e proteínas foi armazenada a -80 °C.

Quantificação e avaliação da integridade do RNA de linhagens celulares

As amostras de RNA provenientes de linhagens celulares foram quantificadas em espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000* (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Neste equipamento, foi avaliada a pureza do RNA em relação à contaminação com proteínas utilizando a razão das absorbâncias. A absorbância máxima dos ácidos nucleicos sob luz UV ocorre no comprimento de onda de 260 nm e das proteínas no comprimento de onda de 280 nm. A razão dos valores de absorbância A_{260}/A_{280} deve ser ~ 2 para identificar pureza de RNA. De forma similar, contaminantes químicos como fenol, guanidina e glicogênio apresentam absorbância no comprimento de onda de 230nm. Por esse motivo, é estabelecido que a razão A_{260}/A_{230} deve ser de 2 a 2,2 para exclusão de contaminação da solução de RNA por esses compostos.

A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1% pela observação das bandas ribossomais 18S e 28S.

O RNA restante foi acondicionado a -80°C até seu uso para síntese de DNA complementar (cDNA).

Quantificação e avaliação da integridade do RNA de tumores primários

O RNA, o DNA e as proteínas de amostras de tumores e suas margens cirúrgicas foram extraídos em trabalhos prévios do grupo. A quantificação e a avaliação da integridade do RNA dessas amostras foram realizadas no *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha). Este sistema utiliza eletroforese capilar em microchip, que é feita em versão microfluídica e não ocorre no interior de uma coluna capilar, mas em microcanais fabricados em pequenos blocos. Com esse tipo de eletroforese, é possível separar fragmentos de DNA, RNA e proteínas e posteriormente detectá-los por fluorescência induzida por laser.

Foi utilizado o *RNA 6000 Nano kit* (Agilent Technologies), que possui chips e reagentes desenhados para análise de fragmentos de RNA. Cada chip contém uma rede interconectada de microcanais e poços definidos para as amostras de interesse e para cada um dos reagentes (gel, solução de corante fluorescente e marcadores de peso molecular).

Reação em Cadeia da Polimerase pela transcriptase reversa (RT-PCR)

De acordo com o resultado da quantificação, foi preparado um volume de RNA com 1 ug para as amostras frescas e 5 ug para as linhagens celulares. O RNA foi tratado com *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega, Madison, WI, USA) para eliminação de DNA genômico, em reação com volume final de 25 uL.

O cDNA foi confeccionado pela reação de transcrição reversa com o sistema *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA). Este sistema utiliza a enzima transcriptase reversa

MultiScribe e iniciadores aleatórios – *random primers* - para a síntese do DNA complementar. Os volumes e as concentrações dos reagentes utilizados na reação de transcrição reversa foram: 5 μL de iniciadores 10X, 2 μL de dNTPs 100 mM, 5 μL de tampão 10X, 2,5 μL de enzima *MultiScribe* 50 U/ μL . Os reagentes foram adicionados aos 25 μL obtidos após processamento com DNase. O volume da reação foi completado para 50 μL com água tratada com DEPC. As condições da reação de RT-PCR foram: 25°C por 10min, 37°C por 120min, 85°C por 5min, 4°C ∞ . No final da reação, foram acrescentados 50 μL de água tratada com DEPC, sendo o volume final igual a 100 μL e a concentração de cDNA igual a 10 ng/ μL para as amostras e 50 ng/ μL para as linhagens. Os cDNAs foram então armazenadas a -20 °C.

Análise de PCR em tempo real

A PCR em tempo real foi realizada no equipamento *ABI Prism 7500 Fast Sequence Detection System* (Applied Biosystems) com o sistema *TaqMan* (Applied Biosystems) para o gene *KLK8* no caso de material obtido de ensaios de transfecção em linhagens celulares e com o sistema *SYBR Green* (Applied Biosystems) para as isoformas 1 a 6 do gene *KLK8* em amostras de tumores primários.

O sistema *TaqMan* utiliza sondas fluorescentes com comprimentos de onda diferentes e, desta forma, permite a amplificação de dois genes (gene de interesse e constitutivo) na mesma reação. Todas as sondas foram desenhadas pela própria empresa. Para amplificação, foi utilizado o *Taqman Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), que contém todos os

reagentes necessários para a reação. A fluorescência é capturada e coletada continuamente para cada amostra, entre 520 e 660 nm, e a intensidade de fluorescência detectada é diretamente proporcional à quantidade de cDNA da amostra. Os dados são traduzidos por um *software* específico e plotados em um gráfico que mostra a intensidade de fluorescência versus o número de ciclos. Quanto maior a quantidade de cDNA molde presente no início da reação, menor é o número de ciclos para detecção de uma intensidade de fluorescência estatisticamente significativa. Este ponto é definido como limiar ou C_t e ocorre durante a fase exponencial de amplificação.

As reações foram feitas em triplicata com um volume final de 10 μ l, que incluiu 5 μ l de *Taqman Universal PCR Master Mix*, 0,5 μ l de sonda específica para o gene de interesse, 1 μ l de cDNA da amostra a ser analisada na concentração de 50 ng/ μ L e 3,5 μ l de água para completar o volume final da reação. Os ciclos foram de 2min a 50°C; 10min a 95°C e 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1min.

No sistema *SYBR Green*, os iniciadores específicos para cada transcrito (Tabela 4) foram desenhados com a ferramenta *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>) e as reações foram realizadas em volumes de 20 μ L, contendo 10 ng de cDNA molde, 1 μ L de iniciadores na concentração 10 nM, 10 μ L de *Power Master Mix SYBR Green*TM (*Applied Biosystems*) e 7 μ L água. O *Power Master Mix SYBR Green*TM contém todos os componentes para a reação de PCR em tempo real, exceto o molde, os oligonucleotídeos iniciadores e a água. As condições das reações compreenderam uma etapa inicial de 10min a 95°C para inativação da uracil-N-

glicosilase (UNG), evitando, dessa forma, que a enzima degradasse os produtos da termociclagem a ser iniciada em seguida, e também para ativação da enzima *AmpliTaq Gold* (*Applied Biosystems*). Posteriormente, seguiram-se 40 ciclos de 15s a 95°C e 1min a 60°C para extensão. Foi acrescentado um passo de dissociação que compreende duas etapas de 15s a 95°C, intercaladas por uma etapa de 30s a 60°C. A curva de dissociação tem como objetivo a verificação de ocorrência de *primer dimers*, produtos inespecíficos e de contaminações. O gene *GAPDH* foi escolhido como normalizador.

A eficiência dos iniciadores foi avaliada por curva padrão para as variantes do gene *KLK8* e para o gene constitutivo *GAPDH*. Foram empregadas cinco concentrações diferentes de cDNA da linhagem celular FaDu, a saber, amostra pura e suas cinco diluições em série em água DEPC 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5.

A fórmula utilizada para avaliação da expressão dos genes foi:

$$\text{Taxa relativa de expressão} = 2^{-(\Delta\text{Ct do gene alvo} - \Delta\text{Ct do calibrador})} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

O ΔCt foi obtido pela subtração da média dos Cts do gene alvo pela média dos Cts do gene constitutivo ou calibrador.

Foram considerados diferencialmente expressos os transcritos que exibiram expressão relativa ≥ 2.0 ou ≤ -2.0 em relação ao tecido controle, após a transformação dos valores para logaritmo de base 2. Dessa forma, um valor de expressão relativa igual a +1 equivale a um aumento de expressão de 2 vezes, e um valor de -1 equivale a uma diminuição de expressão de 2 vezes.

Tabela 4. Iniciadores para os 6 transcritos de interesse da *KLK8*.

Oligonucleotídeo	Sequência
<i>KLK8.1</i> anti-sense	CCTGGGCAGGACACTCC
<i>KLK8.1</i> sense	GGACACCGCCACAGAGTAG
<i>KLK8.2</i> anti-sense	AGACGTGGATGTTCTGCTC
<i>KLK8.2</i> sense	AATGGACACACGGCAAGTTC
<i>KLK8.3</i> anti-sense	GGAGCCTGGGCAGAGAAT
<i>KLK8.3</i> sense	CCTCCAGAATCGCCCT
<i>KLK8.4</i> anti-sense	TGGGCAGGGCGATTCT
<i>KLK8.4</i> sense	CAGTCCAGGTAGCGGCAG
<i>KLK8.5</i> anti-sense	CCTGGGCAGGAAATACACAG
<i>KLK8.5</i> sense	ACATCGCTGCTGTTGTAGCA
<i>KLK8.6</i> anti-sense	CACTGTAAAAAACCAGAATTTTCC
<i>KLK8.6</i> sense	ACAGACCATGCCATCTGTGA

D. Ensaio Funcionais

Indução de expressão

As linhagens celulares (FaDu e HEP-2) foram utilizadas nos experimentos para análise do efeito de indução de expressão do gene *KLK8*. Esse efeito foi avaliado por índice de proliferação, morfologia, migração e invasão celular. As linhagens foram selecionadas por apresentarem expressão diminuída da isoforma 1 de *KLK8* entre aquelas disponíveis no laboratório.

Para indução de expressão, foi utilizado o vetor comercial pMCV6-AC (OriGene Technologies, Rockville, EUA) com o gene de interesse, *KLK8 variante 1* (Figura 6). Como controle negativo, foi utilizado o mesmo vetor sem

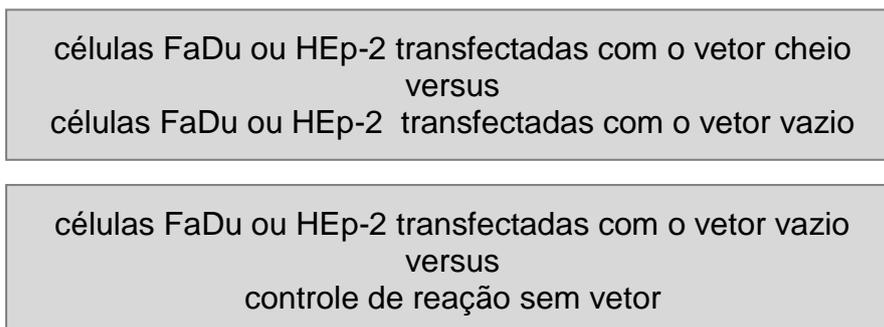
O ensaio de indução de expressão permanente foi realizado utilizando o protocolo do *Neon Transfection System (Invitrogen)*, um equipamento de eletroporação que induz poros na membrana celular permissíveis a fluxo de íons e moléculas.

Previamente à transfecção, as linhagens foram cultivadas em meio MEM contendo SFB 10% até atingirem a confluência de 70% em garrafas médias (75 cm²). No primeiro dia do experimento, as células foram tripsinizadas e contadas no *Countess® Cell Counter (Invitrogen, Forster City, CA, USA)*, como descrito anteriormente. Uma alíquota com 3×10^5 células foi ressuspensa com reagente específico do kit *Neon Transfection*, à qual foi adicionado o vetor (15 µg), seguindo o protocolo do fabricante para reações de 100 µL. Três condições foram realizadas: (a) suspensão de células contendo o vetor com o gene da *KLK8* (vetor cheio), (b) suspensão de células contendo o vetor sem o gene da *KLK8* (vetor vazio) e (c) controle de reação sem vetor. O material das três condições foi submetido a eletroporação com 23 diferentes intensidades de pulsos elétricos para escolha do melhor procedimento (1000 V, 1 pulso, comprimento de pulso de 40s).

As células foram cultivadas em meio MEM com SFB 10% sem antibiótico por 24h e, em seguida, foram selecionadas por 15 dias em meio com o antibiótico geneticina na concentração final de 700 µg/mL. Como os vetores possuem o gene de resistência para a geneticina, apenas as células transfectadas sobrevivem à seleção.

As culturas foram observadas diariamente em microscópio invertido para avaliação da morfologia celular e a cada 48h o meio de cultura com antibióticos

foi substituído por meio novo. A eficiência da indução de expressão do gene *KLK8* foi avaliada por PCR em tempo real quantitativa (segundo protocolo descrito anteriormente, com extração por trizol, confecção de cDNA e uso de sonda Taqman). As comparações de expressão foram realizadas de acordo com o Esquema 1.



Esquema 1. Comparações de valores de Ct entre pares.

Ensaio de proliferação celular

Para avaliar seu potencial proliferativo, as células transfectadas e seus controles foram cultivadas em meio sem SFB por 24h, em triplicatas com 5×10^4 células/poço em placas de 12 poços. As culturas de células transfectadas continuaram recebendo geneticina para garantir sua seleção. Após 24h, o meio foi trocado por meio com SFB 10% e, a cada 24h até completar 96h, uma triplicata de cada condição foi tripsinizada e as células vivas foram contadas no *Countess® Cell Counter* para posterior elaboração de uma curva de proliferação.

Ensaio de Viabilidade Celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado pelo *The CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay- MTS* (Promega), um método colorimétrico utilizado para determinar o número de células viáveis. Neste ensaio, o sal de tetrazolium (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) é biorreduzido pelas células vivas com formação do solúvel formazan, que produz mudança de coloração no meio. A quantidade de formazan é mensurada pela absorbância de 490 nm e diretamente proporcional ao número de células vivas na cultura.

O ensaio de viabilidade foi realizado nas linhagens HEP-2 e FaDu, nas mesmas condições e tempo de duração que o ensaio de proliferação, exceto pela utilização de placas de 96 poços, contagem de células em leitor de placas (TP-Reader-ThermoPlate) e número de células semeadas de 5×10^3 células/poço.

Análise da morfologia celular

A análise de morfologia celular das linhagens foi realizada rotineiramente utilizando microscópio invertido. As culturas foram fotografadas periodicamente para registro de mudanças de morfologia.

Ensaio de Migração e Invasão Celular

O efeito da expressão elevada de *KLK8* na migração celular foi avaliado em células transfectadas com o vetor cheio e seus controles, cultivadas em triplicatas em placas de 24 poços com insertos ou câmaras de 6,5 mm de

diâmetro contendo uma membrana de 8 µm de porosidade (*BD BioCoat™ Migration/Invasion Chambers* – MIC, Franklin Lakes, NJ, USA). Um total de 5×10^4 células/300 µL de meio MEM sem SFB foram semeadas no compartimento superior do inserto. No compartimento inferior (correspondente ao poço da placa de cultivo), foram adicionados 500 µL de meio MEM suplementado com SFB 10%. Em seguida, as placas foram incubadas por um período de 12h a 37°C e CO₂ 5%, durante o qual as células, atraídas pelo soro, migraram pela membrana em direção ao compartimento inferior da câmara. As células presentes no inserto foram fixadas com formaldeído 0,4% à temperatura ambiente por 20min. Aquelas presentes na superfície superior da membrana (e que, portanto, não migraram) foram retiradas com o auxílio de uma haste de algodão, enquanto as células presentes na face inferior foram coradas por 5min com o composto fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol/DAPI (Uniscience, São Paulo, SP, Brasil) e submetidas a um passo de lavagem com PBS 1X. Cinco campos da superfície inferior da membrana, selecionados casualmente, foram fotografados em microscópio de fluorescência invertido utilizando o programa *Axiovision Release 4.8* e as células presentes foram contadas nas fotografias obtidas.

A invasividade de células com expressão elevada de *KLK8* foi avaliada em câmaras de invasão com matrigel, contendo insertos de 6,5 mm de diâmetro com membranas de 8 µm de porosidade (*BD BioCoat™ Migration/Invasion Chambers* – MIC). Este ensaio baseia-se no fato de que células com capacidade invasiva são capazes de degradar o matrigel, que faz

a função da matriz extracelular no tecido vivo, e migrar em direção ao meio com soro.

As células foram inoculadas no inserto, na mesma concentração utilizada no ensaio de migração e, após 48 horas a 37°C e CO₂ 5%, foram fixadas com 0,4% de formaldeído à temperatura ambiente por 20min. As células remanescentes que não degradaram o matrigel (presentes, portanto, na superfície superior da membrana) foram igualmente retiradas com o auxílio de uma haste de algodão. Os passos seguintes seguiram o mesmo protocolo do ensaio de migração (Figura 7).

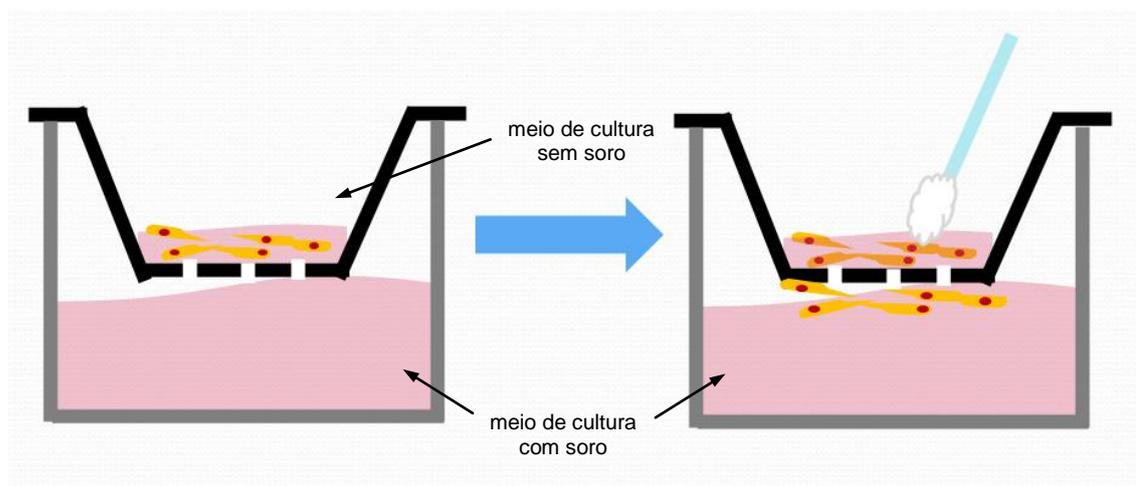


Figura 7. Esquema dos ensaios de migração e invasão. Os ensaios diferenciam-se pela presença de uma camada de matrigel sobre a membrana da câmara no ensaio de invasão. O matrigel faz a função da matriz extracelular que as células devem degradar para atingir o meio com soro. As células são depositadas na parte superior do inserto e aquelas que não atravessem a membrana após um período específico são retiradas com auxílio de uma haste de algodão.

Análise estatística

Os resultados do ensaio de proliferação, viabilidade, migração e invasão foram analisados pelo teste estatístico ANOVA do programa minITAB 16 ($p < 0,05$). O programa *GraphPad prism* (*GraphPad Software Inc.*, San Diego – CA, E.U.A.) foi utilizado para análise estatística e confecção de gráficos dos ensaios de PCR em tempo real (Teste t - não pareado, $p \leq 0,05$).

E. Ensaio com Meio Condicionado

Os ensaios com meio condicionado foram realizados para análise do secretoma de células com expressão elevada do gene *KLK8* ou de células tratadas com este secretoma. Para tais ensaios, foram semeadas células HEp-2 (1×10^6) transfectadas com o vetor cheio, com o vetor vazio ou sem vetor (controle da reação) (Figura 8).

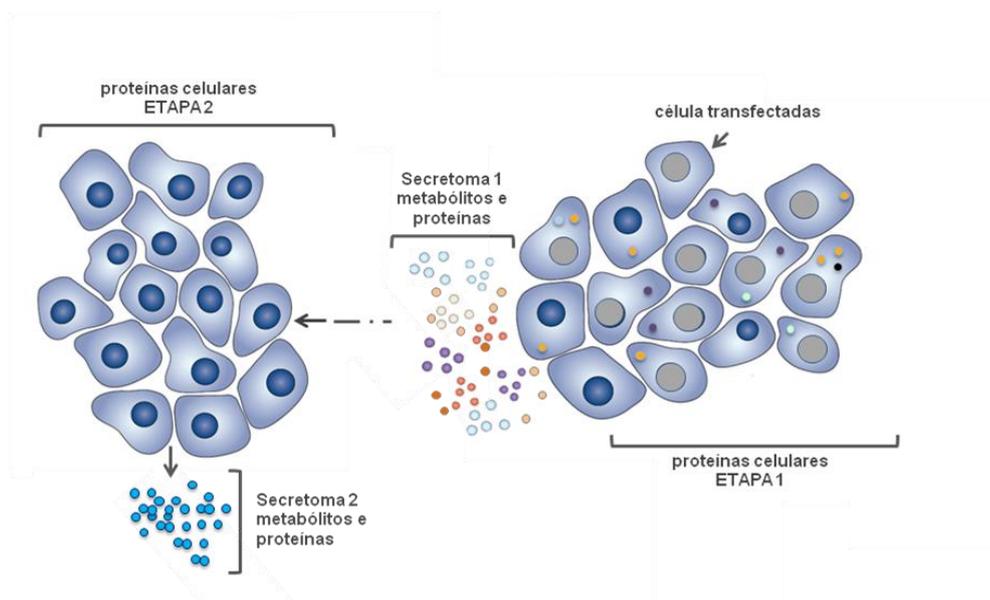


Figura 8. Representação esquemática dos ensaios para análise do efeito da expressão ectópica de *KLK8* na concentração de metabólitos e proteínas celulares e secretadas.

Na ETAPA 1, as células foram cultivadas em meio MEM com SFB 10% por 24h e, em seguida, em meio sem SFB por mais 24h a 37 °C e CO₂ 5% para sincronização do ciclo celular. O meio condicionado por essas células (secretoma 1) foi aspirado e filtrado em Millex-GP 0,22 µm (Millipore) para retirada de debris, enquanto as células que permaneceram no frasco foram tratadas com solução de uréia 8 M, descoladas com um raspador e armazenadas a -80°C para posterior sonicação e digestão de proteínas celulares. O secretoma 1 foi dividido em duas partes: uma delas foi mantida a -80°C para análise posterior de metabólitos e proteínas e outra parte foi utilizada para cultivo de células HEp-2 não transfectadas.

Na ETAPA 2, triplicatas de células HEp-2 não transfectadas foram cultivadas em secretoma 1 diluído em meio MEM com SFB 10% novo na proporção 3:1. Um grupo de triplicatas recebeu o meio condicionado pelas células transfectadas com o vetor cheio, com o vetor vazio ou sem o vetor. Após 24h, este meio foi substituído por meio MEM sem SFB que, após outras 24h, foi coletado para posterior análise de metabólitos e proteínas (secretoma 2). As células da ETAPA 2 foram tratadas da mesma maneira que as células da ETAPA 1, com solução de uréia 8 M e raspagem, e foram reservadas para extração de RNA e proteínas (Figura 9).

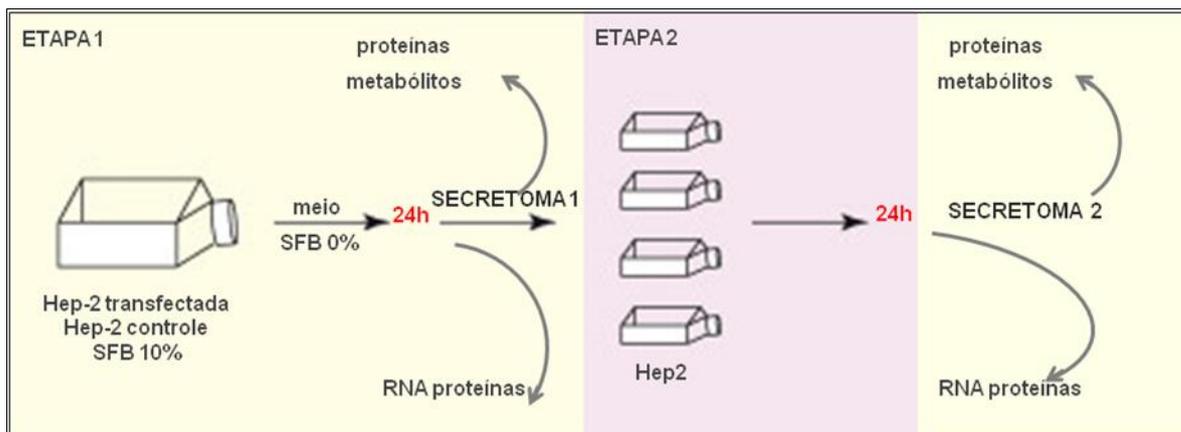


Figura 9. Protocolo do ensaio de meio condicionado para análise do secretoma e proteoma do meio condicionado e das células.

Análise de metabólitos e proteínas

Os secretomas 1 e 2 foram filtrados com Millex-GP 0,22 μm (Millipore) e concentrados utilizando *Amicon Ultra-15, PLBC Membrana Ultracel 3/Microcon Ultracel YM-3* (Millipore), que retêm as proteínas do meio. Os metabólitos filtrados seguiram para análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e as proteínas secretadas e celulares foram quantificadas e digeridas para análise por espectrometria de massas.

Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O secretoma filtrado foi diluído em solução salina e injetado no *probe* do equipamento de RMN. Para quantificação dos metabólitos, foi utilizado um padrão interno, que é o indicador de *chemical shift* (deslocamento químico). Este padrão, TSP (fosfato trissódico), foi adicionado à amostra no momento da análise, na concentração de 0.5 mM, e corresponde ao padrão de frequência zero. O preparo das amostras foi realizado de acordo com os protocolos descritos por Beckonert et al, 2007 (322), e a aquisição e o processamento de

dados foram realizados no LNBio (Laboratório Nacional de Biociências, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais/CNPEM, Campinas-SP), em colaboração com a Profa. Dra. Ana Carolina Zeri.

Os espectros de hidrogênio foram analisados pelo software *Chenomx NMR Suite*, que permite avaliação da composição da amostra pela comparação com mais de 200 espectros de metabólitos na base de dados do próprio programa.

Digestão de proteínas em solução

Os secretomas e a suspensão de células em uréia 8M previamente sonicada para lise celular e liberação das proteínas, foram quantificados pelo método de Bradford através do kit *Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit* (Thermo Scientific).

Para digestão de proteínas em solução, foi utilizado o protocolo padronizado pelo LNBio (Laboratório de espectrometria de massas), adaptado de Villen et al, 2008 (323). Uma solução de DTT 5mM (concentração final) foi adicionada a 100 µg de proteína de cada amostra para redução das pontes dissulfídicas e incubada por 25min a 56°C. Para alquilação de cisteínas, foi acrescentada iodoacetamida 14 mM (concentração final) e os tubos foram mantidos por 30min à temperatura ambiente protegidos da luz. Após este período, foi novamente adicionado DTT 5 mM para ligação da iodoacetamida livre, e o material foi incubado por 15min à temperatura ambiente e protegido da luz.

As amostras receberam uma solução de tripsina com concentração final de 20 ng/ μ L e foram mantidas a 37 °C por 16h. Após este período, foi acrescentado ácido trifluoacético (TFA) na concentração final de 0,4% para inativação da tripsina. O pH de cada amostra foi medido e aquelas com pH acima de 2 receberam TFA até atingirem o valor adequado. Em seguida, foram centrifugadas a 2500 g por 10min à temperatura ambiente e os sedimentos foram descartados.

As amostras foram então submetidas à dessalinização de peptídeos utilizando o protocolo padronizado pelo LNBio. Inicialmente, a coluna SepPack (tC18- Waters 100mg) foi ativada com acetonitrila (ACN) 100% e equilibrada com ACN 50% e TFA 0,1%. Em seguida, foi carregada com a amostra, lavada com TFA 0,1% e equilibrada com ácido fórmico 0,1%. A primeira solução de peptídeos eluídos foi coletada em ACN 50% com ácido fórmico 0,1%. A segunda solução coletada foi eluída em ACN 80% com ácido fórmico 0,1%. As duas soluções foram reunidas em um mesmo tubo, liofilizadas em centrífuga a vácuo e armazenadas em freezer -20°C até sua análise por espectrometria de massas no equipamento *UPLC* acoplado ao sistema *ElectroSpray Ionization Quadrupole Time of Flight MS/MS (ESI Q-TOF Ultima API; Waters Corporation, Milford, MA, USA)*, (LC-MS/MS), no laboratório multiusuário do LNBio, em colaboração com a Profa. Dra. Adriana Franco Paes Leme.

Identificação de proteínas

Para identificação das proteínas, os dados obtidos foram pesquisados no MSDB (*Mass Spectrometry Protein Sequence DataBase*) com o *software Mascot Distiller* versão 2.2.1.0. Os resultados foram exportados para o programa Scaffold Q+ (versão 3.00.5, Proteome Software Inc., Portland, OR, USA). A quantificação relativa das proteínas foi obtida a partir do número de espectros dividido pelo número total de espectros da amostra.

F. Modelagem molecular por homologia

Para desenvolver o modelo da estrutura molecular da proteína hK8, foi realizada a modelagem por homologia, com o programa MODELLER (324). Este programa gera modelos estruturais que seguem diversos parâmetros e restrições estereoquímicas bastante rígidos por meio de similaridades com outras proteínas da mesma família. A calicreína utilizada para modelagem foi a hK5 que possui acima de 40% de similaridade de sequência com a hK8.

RESULTADOS

A. Casuística

Foram analisadas 23 amostras de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço e 23 amostras de suas respectivas margens cirúrgicas, que incluíram 3 casos de tumores de língua (1 N0 e 2 N+), 9 tumores de soalho de boca (4 N0 e 5 N+), 3 de amígdala (3 N+) e 8 de laringe (5 N0 e 3 N+). Entre os 23 pacientes, 19 eram do sexo masculino e 04 do sexo feminino, com idades variando entre 39 e 76 (média = 57,3 anos); 18 eram fumantes ou ex-fumantes; 17 faziam uso abusivo de álcool ou já haviam feito. A maioria dos casos compreendeu tumores grandes (T3 ou T4) com metástases linfonodais (Tabela 5) e sem metástases à distância, procedentes dos quatro subsítios anatômicos de cabeça e pescoço, mas principalmente de soalho de boca e laringe

B. Análise Filogenética

A árvore filogenética obtida pelo método de *Maximum Likelihood* no programa MEGA mostrou, além do ramo isolado de *KLK6*, cinco clados na família das calicreínas (Figura 10): (a) *KLKs* clássicas (1-3), (b) *KLK 5, 4, 7, 14* e pseudogene *KLKP1*, (c) *KLK 12 e 13*, (d) *KLK 9 e 11*, (e) *KLK 8, 15 e 10*. As isoformas de *KLK8* (1, 2, 6 e 3, 4, 5) aparecem em dois ramos separados.

Tabela 5. Freqüência dos parâmetros sexo, idade, exposição a fumo e álcool, subsítio e classificação TNM das lesões em 23 pacientes portadores de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço.

Parâmetros	Grupos	Total de pacientes (%)
Sexo	Masculino	20 (87%)
	Feminino	03 (13%)
Idade*	≥ 40	21 (91,3%)
	< 40	02 (8,7%)
Fumante	Sim	14 (60,9%)
	No passado	04 (17,4%)
	Nunca	05 (21,7%)
Etilista	Sim	12 (52,2%)
	No Passado	05 (21,7%)
	Nunca	06 (26,1%)
Subsítios	C02	6 (26,1%)
	C04	9 (39,1%)
	C32	8 (34,8%)
ClassificaçãoTNM	T1	0
	T2	03 (13%)
	T3	05 (21,7%)
	T4	15 (65,2%)
	N0	10 (43,5%)
	N1	00 (0%)
	N2	11 (47,8%)
	N3	02 (8,7%)
	M0	23 (100%)
	M+	00 (0%)

* Idade média do grupo = 57,3 anos

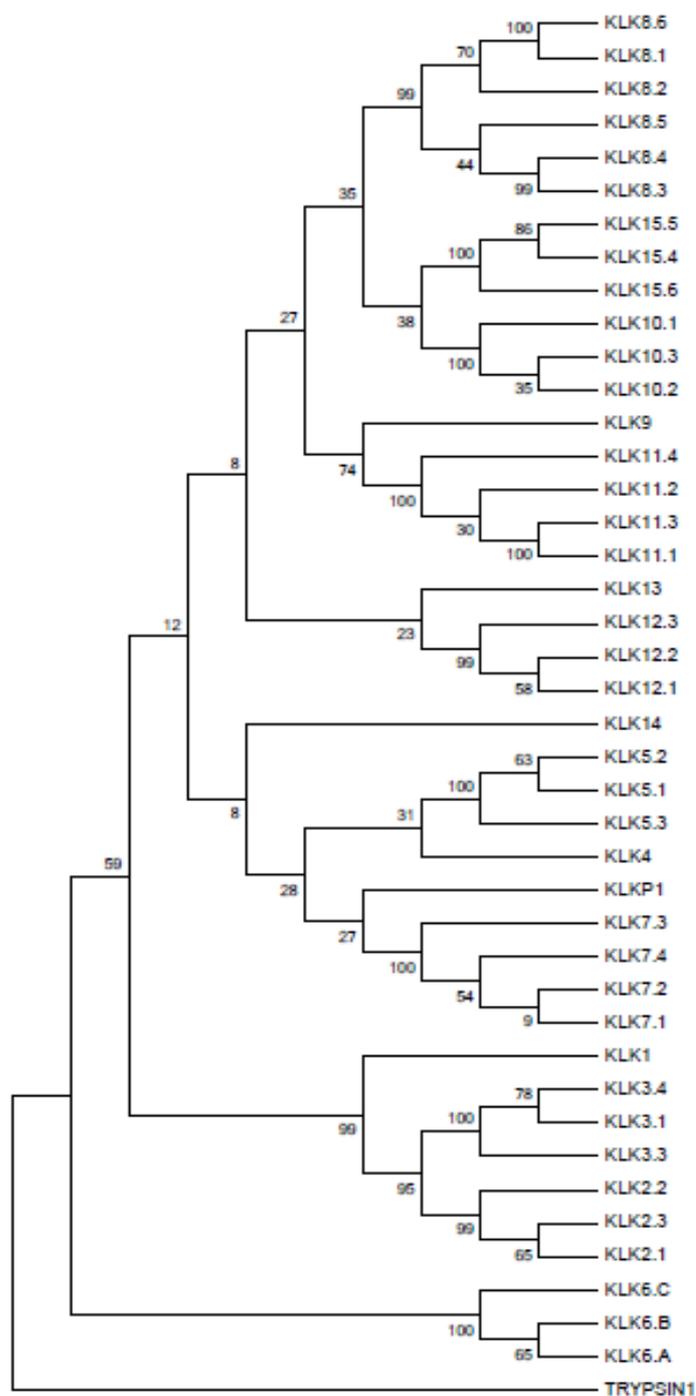


Figura 10. Árvore filogenética da família de genes das calicreínas humanas, suas isoformas e o pseudogene *KLKP1*, tendo como grupo externo o domínio TRYPSIN1. Os números nos nodos indicam os valores de suporte para esses nodos. Programa MEGA (versão 5.05).

C. Análise da expressão gênica

Quantificação e avaliação da integridade do RNA

A extração de RNA por trizol e a síntese de cDNA foram realizadas com sucesso para as linhagens celulares HEP-2 e FaDu. A integridade do RNA mostrou-se adequada, como mostra o resultado da corrida em gel de agarose na Figura 11A. Resultados similares obtidos no equipamento Bioanalyzer foram observados para as amostras de tumores primários selecionadas para estudo (Figura 11B). Apenas amostras com RIN (*RNA integrity number*) acima de 5, calculado pelo equipamento, foram aceitas para os ensaios de expressão gênica por PCR em tempo real (Figura 12).

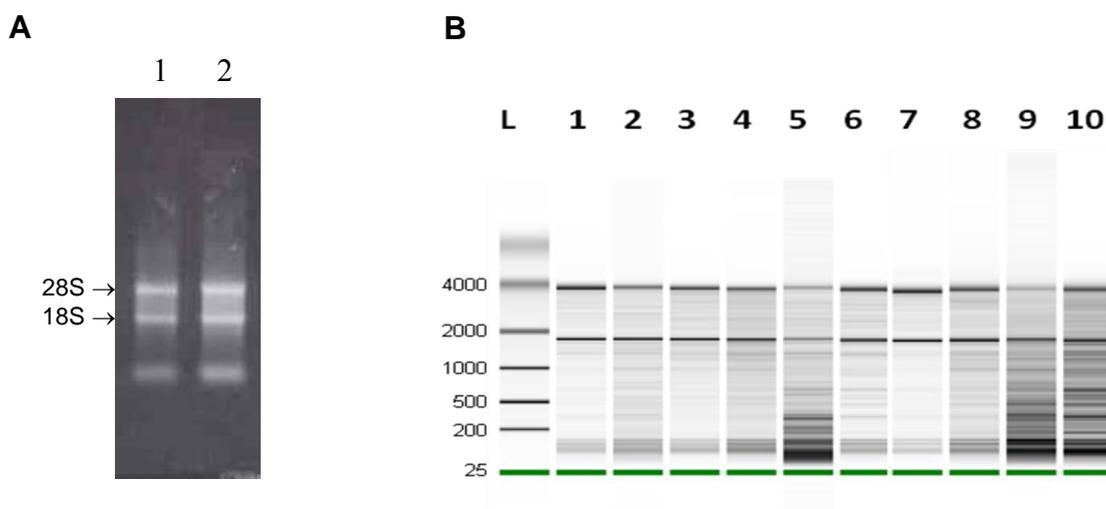


Figura 11. A. Foto de gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio para visualização das duas bandas ribossomais 18S e 28S. Linhagem celular Hep-2 (1) e FaDu (2). **B.** Representação gráfica do gel gerado pelo equipamento Bioanalyzer para visualização das duas bandas ribossomais 18S e 28S em amostras de tumores primários. L=marcador de peso molecular e 10 das 23 amostras estudadas.

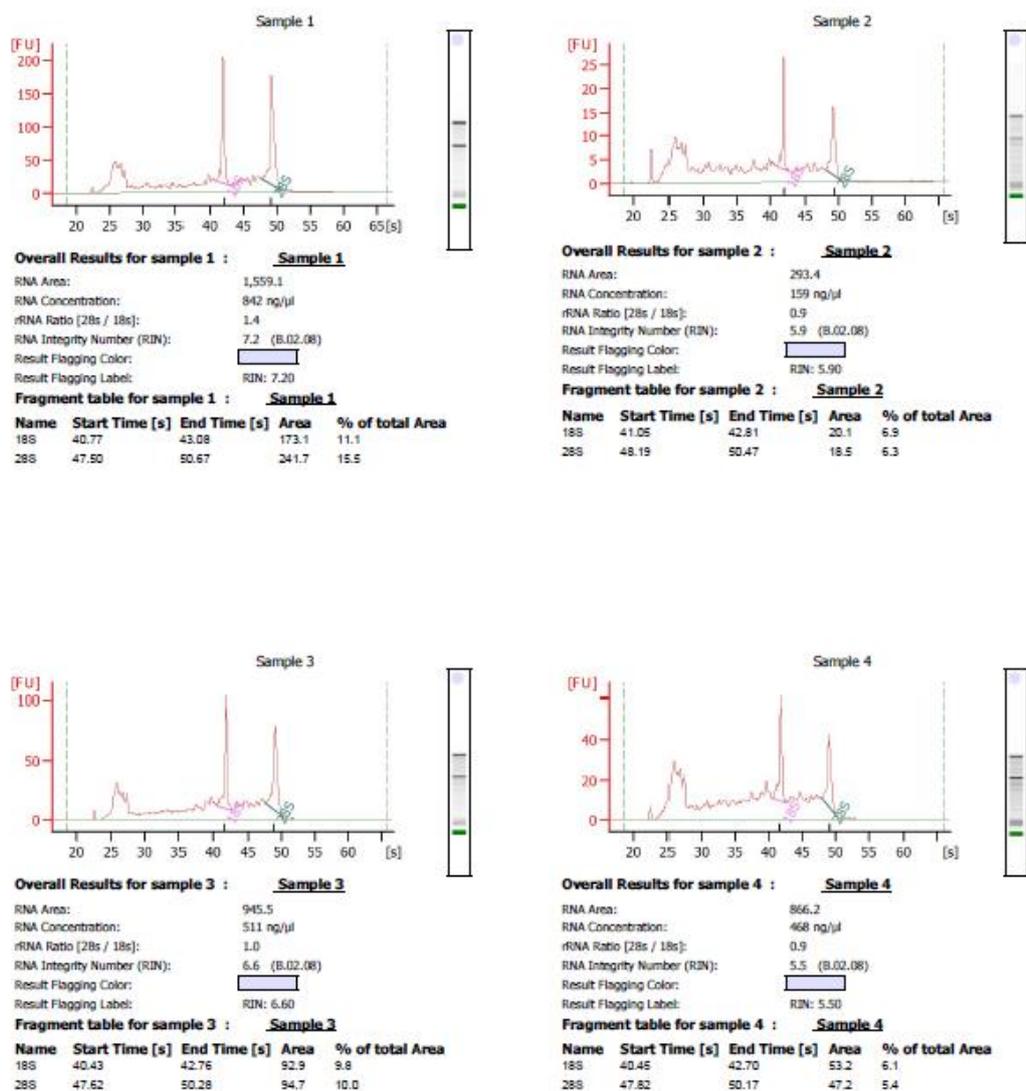


Figura 12. Leituras dos picos de RNA em 18S e 28S, com os dados gerados de quatro amostras de tumores primários, concentração de RNA em ng/uL e integridade do RNA.

PCR em tempo real em amostras de tumores primários

Os iniciadores para os ensaios de PCR em tempo real foram desenhados com o máximo de especificidade para que as seis variantes do gene *KLK8* fossem expressas isoladamente sem sobreposição. A eficiência desses iniciadores analisada por curva padrão mostrou valores próximos de 100%.

Os resultados dos ensaios de PCR em tempo real utilizando o sistema *SYBR Green* indicaram diferença significativa de expressão das variantes 1, 3 e 6 de *KLK8* na comparação dos tecidos tumorais com suas margens (teste t não pareado; $p < 0,001$). A isoforma 1 apresentou níveis significativamente reduzidos nos tumores, enquanto as isoformas 3 e 6 exibiram aumento de expressão, embora com grande variabilidade entre as amostras. O resultado referente a esta última isoforma deve ser visto com cautela considerando sua ausência em 12 das 23 amostras (Figura 13).

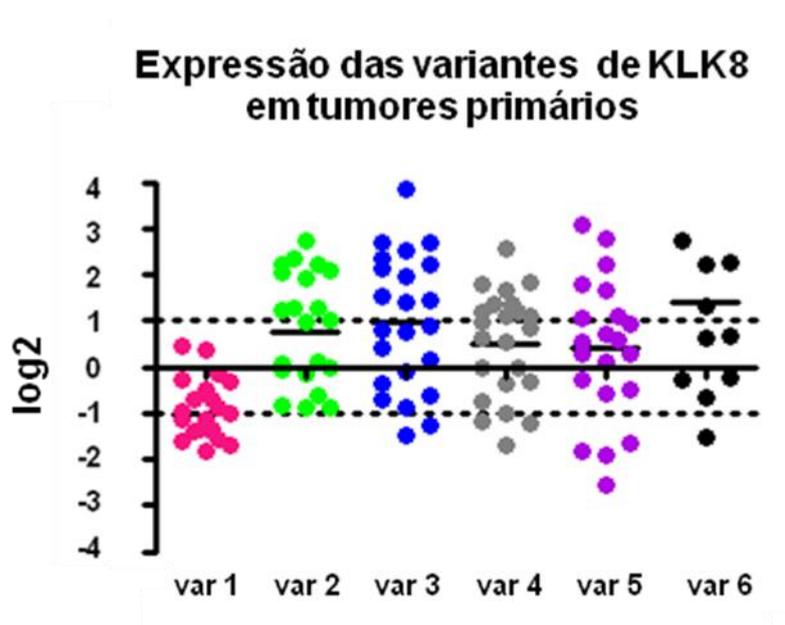


Figura 13: Valores de expressão relativa em logaritmo de base 2 das variantes 1 a 6 de *KLK8* em carcinomas de cabeça e pescoço.

D. Estudos funcionais

O efeito da expressão ectópica da variante 1 de *KLK8* foi avaliado nas linhagens celulares HEp-2 e FaDu por meio de curvas de crescimento, análise da morfologia e viabilidade celular e ensaios de migração e invasão celular. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

Durante o experimento de transfecção, foi observada morte das células controles sem vetor, evidenciada pela mudança da morfologia epitelióide para esférica e perda da aderência à superfície. Como era esperado, as células transfectadas com o vetor mostraram resistência à geneticina presente no meio de cultura (Figura 14).

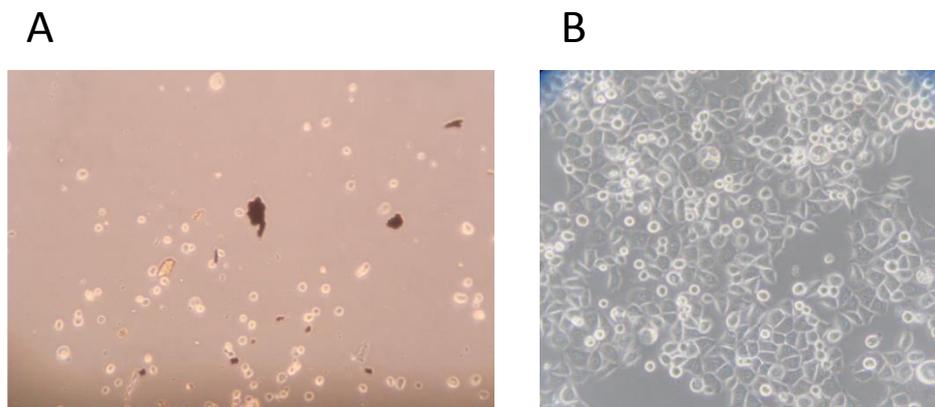


Figura 14. **A.** Células controle não transfectadas, com aspecto apoptótico decorrente da presença de geneticina no meio de cultura para a qual não são resistentes. **B.** Células após transfecção com a isoforma 1 do gene da *KLK8*, exibindo proliferação e resistência à geneticina em função da presença do vetor pCMV6- AC com o gene NEO^R.

A permanência do vetor cheio nas células transfectadas e o consequente aumento de expressão de *KLK8* foram confirmados por PCR em tempo real com sonda *Taqman*. O nível do transcrito aumentou 6,6 vezes na linhagem HEp-2 e 3,8 vezes na FaDu em relação aos dois controles negativos (Figura 15 A e B).

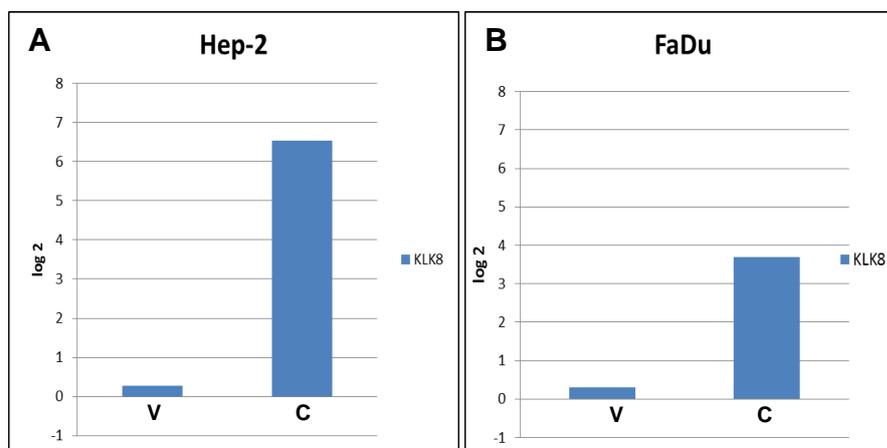


Figura 15. Valores de expressão relativa em logaritmo de base 2 da variante 1 de *KLK8* em células transfectadas com o vetor cheio (C) e seu controle com o vetor vazio (V). **A.** HEp-2. **B.** FaDu. A quantificação relativa do gene foi calculada pelo teste t não pareado. O *GAPDH* foi usado como controle constitutivo em relação a amostra sem vetor.

Efeito da expressão ectópica de KLK8 em morfologia celular

As células HEp-2 apresentam usualmente morfologia fibroblastóide e crescem em monocamadas. Após transfecção com o vetor cheio, passaram a exibir morfologia epitelíóide e a formar agregados empilhados, mesmo quando a confluência estava reduzida (Figura 16A-C). As células FaDu, ao contrário, possuem usualmente morfologia epitelíóide com crescimento em múltiplas

camadas. Após transfecção e expressão do gene *KLK8*, tornaram-se alongadas e cresceram em monocamadas (Figura 16 D-F).

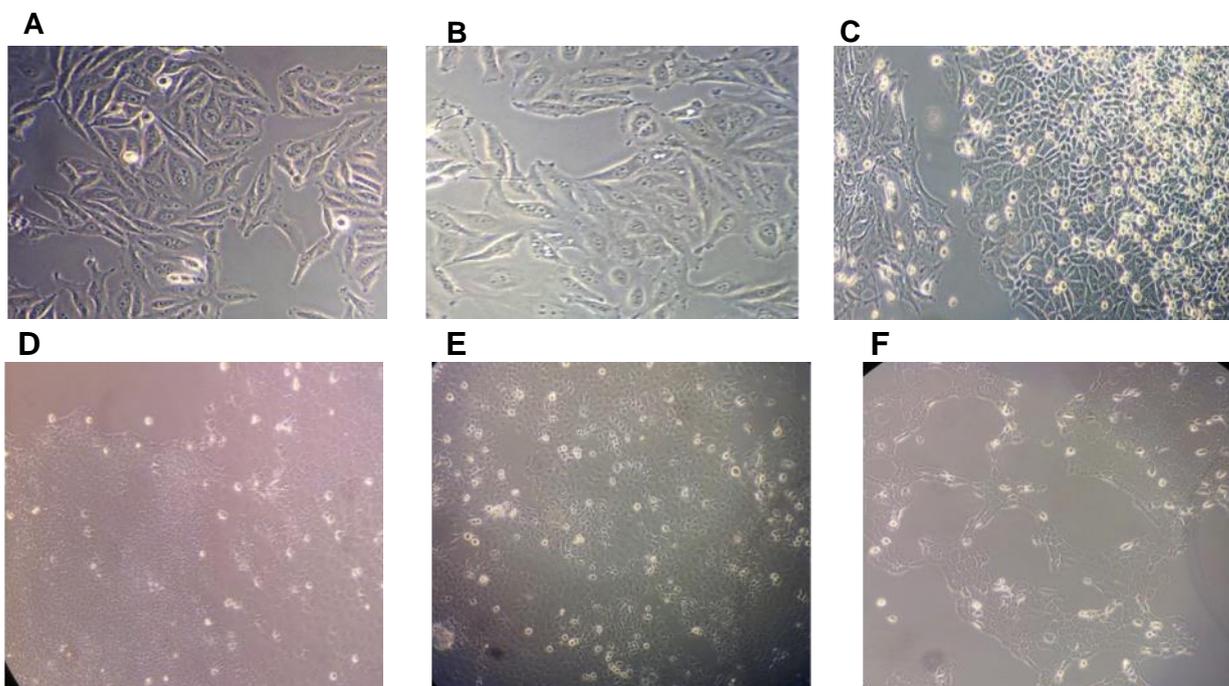


Figura 16. A-C. Morfologia das células HEP-2, aumento 20x; D-F. FaDU, aumento 10x. (A, D) controle de reação sem vetor, (B, E) células transfectadas com vetor vazio e (C, F) com vetor cheio, respectivamente.

Efeito da expressão ectópica de KLK8 em proliferação e viabilidade celular

As linhagens HEP-2 e FaDu também mostraram diferenças nos índices de proliferação entre os controles negativos e as células com vetor cheio. As duas linhagens exibiram proliferação significativamente maior nas condições de expressão elevada de *KLK8* (HEP-2, ANOVA $p=0,013$; FaDu, ANOVA $p=0,015$). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 17.

No ensaio de viabilidade celular, foi obtido um resultado similar, com aumento de número de células viáveis entre aquelas com o vetor cheio

comparadas com seus controles, tanto no caso de HEP-2 ($p=0,032$) como de FaDu ($p=0,024$) (Figura 18).

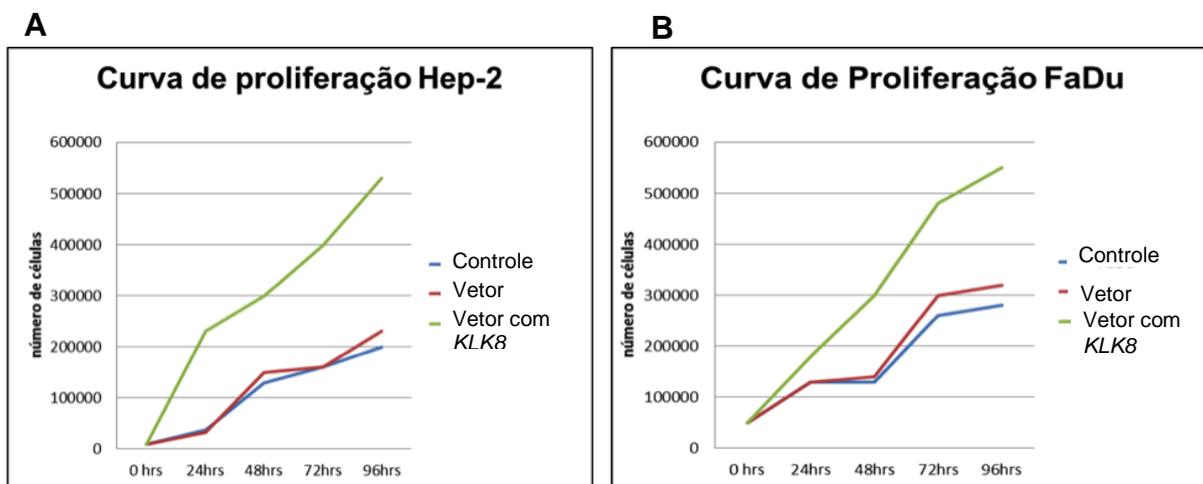


Figura 17. Curva de proliferação evidenciando a diferença entre células transfectadas com o vetor cheio e seus controles negativos. **A.** HEP-2. **B.** FaDu. ANOVA, $p=0,013$ e $p=0,15$, respectivamente.

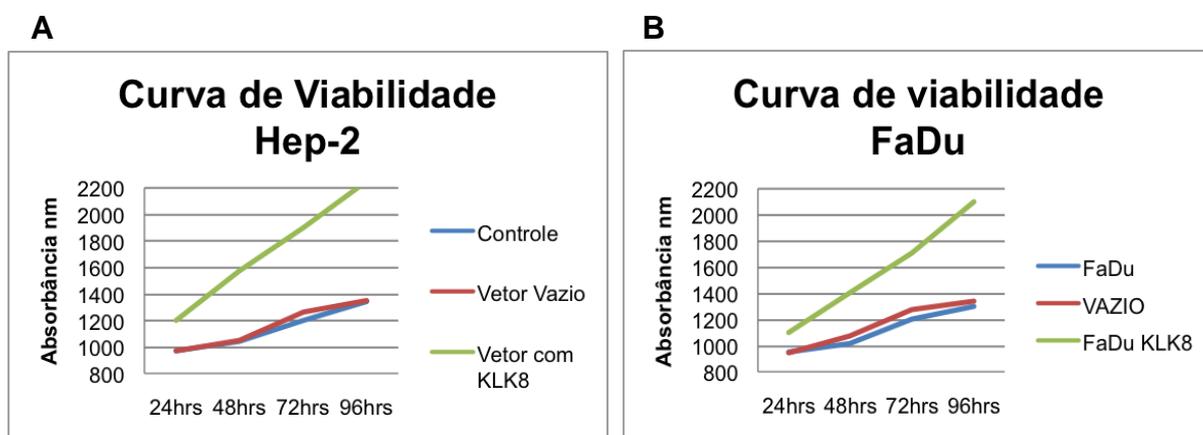


Figura 18. Gráfico com os resultados obtidos no ensaio MTS, evidenciando a diferença de viabilidade em células transfectadas com o vetor cheio e seus controles negativos. **A.** HEP-2. **B.** FaDu. ANOVA, $p=0,032$ e $p=0,024$, respectivamente.

Efeito da expressão ectópica de KLK8 em migração e invasão celular

A expressão ectópica do gene *KLK8* resultou em um aumento significativo no potencial de migração de células transfectadas em relação a seus controles, tanto em HEP-2 (ANOVA, $p=0,004$) como em FaDu (ANOVA, $p=0,005$) (Figura 19).

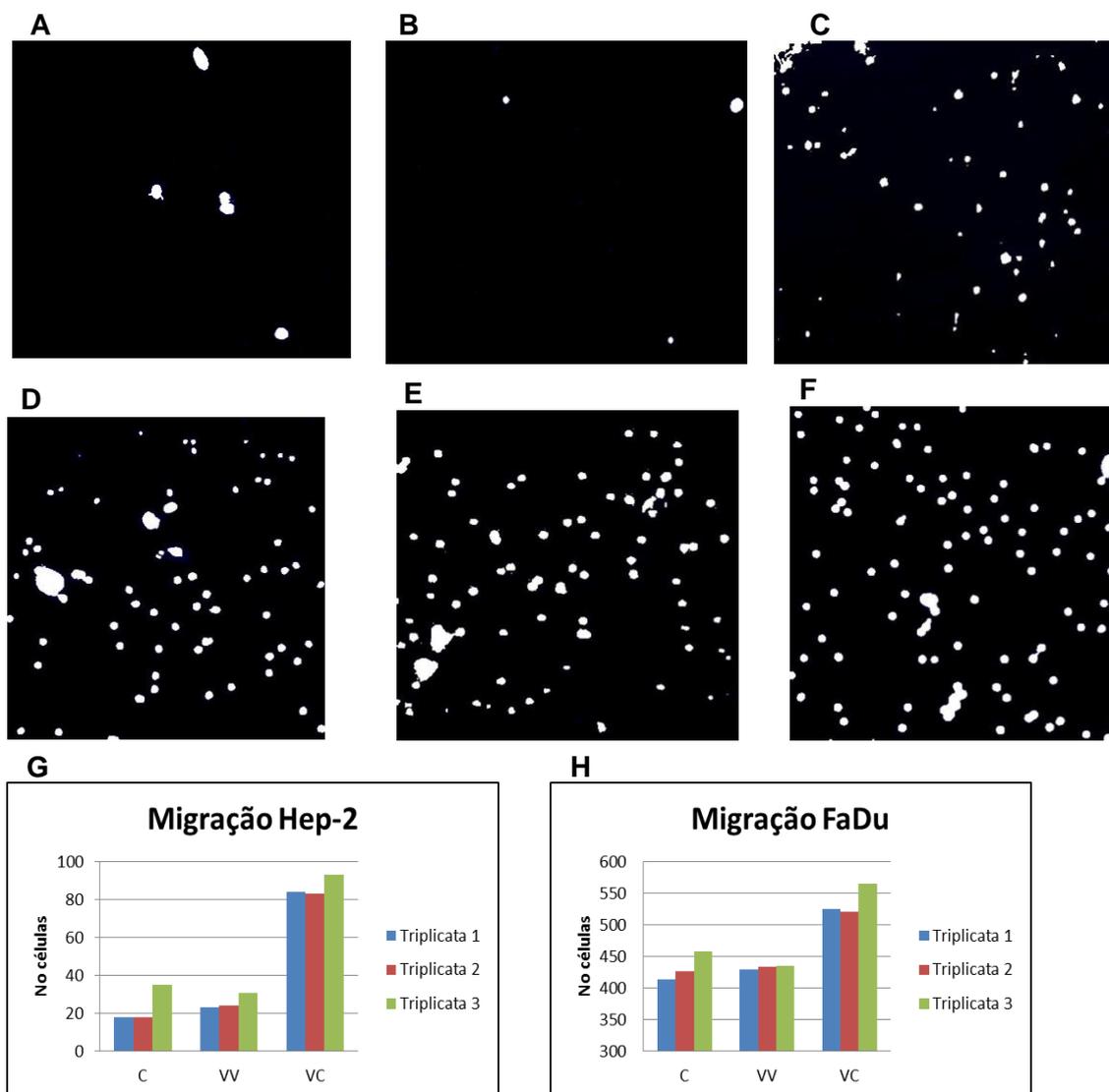


Figura 19. Ensaio de migração. **A-F.** Fotomicrografia de núcleos após 8 horas de cultivo. A marcação com DAPI foi modificada de azul para branco para melhor visualização. Linhagem HEP-2 (**A**) sem vetor/C; (**B**) com vetor vazio/VV; (**C**) com vetor cheio/VC (ANOVA $p=0,004$). Linhagem FaDu. (**D**) sem vetor/C; (**E**) com vetor vazio/VV; (**F**) com vetor cheio/VC (ANOVA $p=0,005$). **G-H.** Gráfico com a média do número de células em 5 fotomicrografias de cada triplicata de (**G**) HEP-2 e (**H**) FaDu.

No ensaio de invasão, inversamente, o número de células com expressão ectópica de *KLK8* que invadiram a membrana de Matrigel não mostrou diferença significativa em relação aos controles, tanto em HEP-2 (ANOVA $p=0,370$) como em FaDu (ANOVA $p=0,076$) (Figura 20).

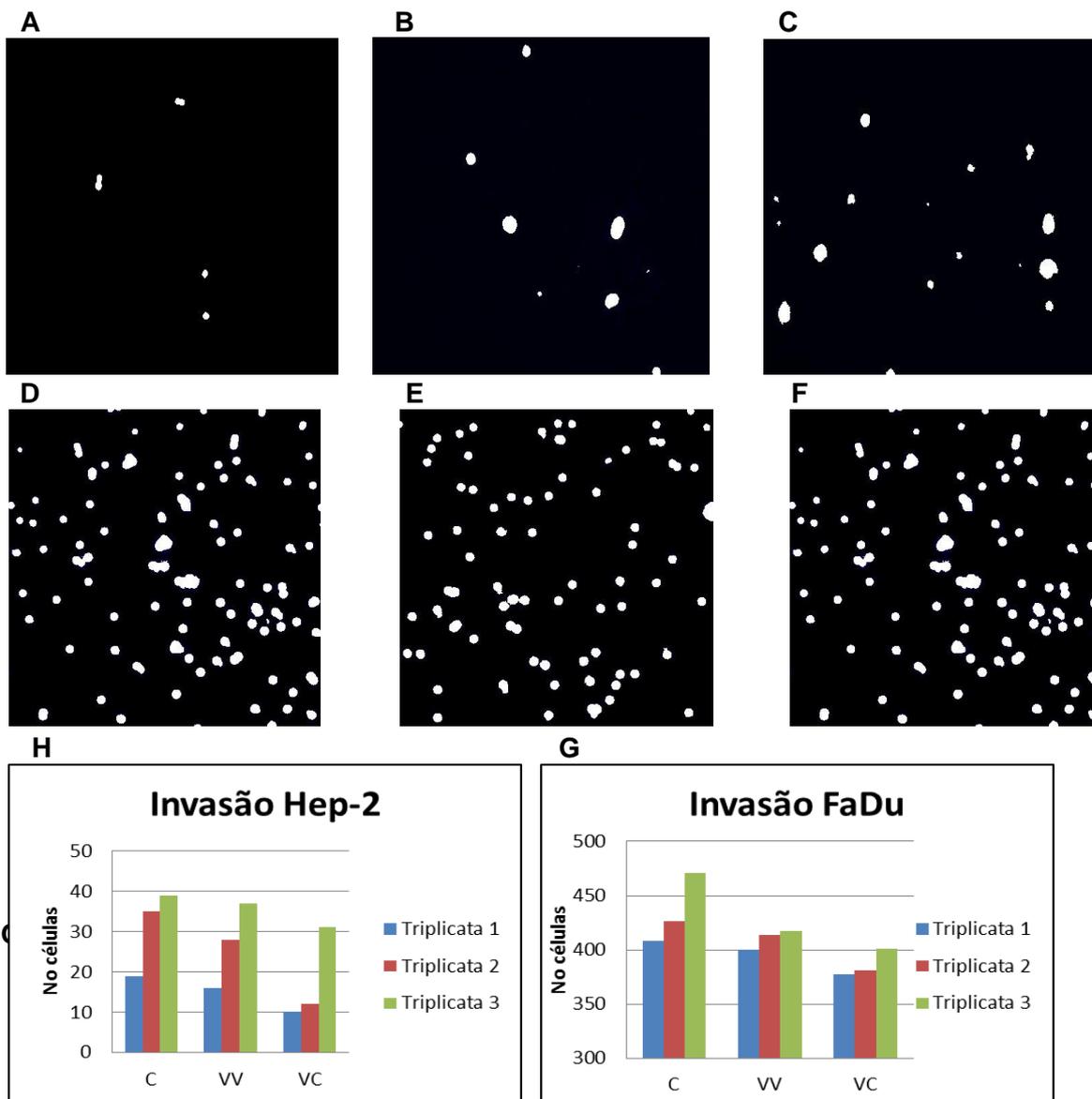


Figura 20. Ensaio de invasão. **A-F.** Fotomicrografia de núcleos após 48 horas de cultivo. A marcação com DAPI foi modificada de azul para branco para melhor visualização. Linhagem HEP-2 (**A**) sem vetor/C; (**B**) com vetor vazio/VV; (**C**) com vetor cheio/VC (ANOVA $p=0,370$). Linhagem FaDu. (**D**) sem vetor/C; (**E**) com vetor vazio/VV; (**F**) com vetor cheio/VC (ANOVA $p=0,076$). **G-H.** Gráfico com a média do número de células em 5 fotomicrografias de cada triplicata de (**G**) HEP-2 e (**H**) FaDu.

E. Ensaio com Meio Condicionado

Análise de metabólitos

Na análise por ressonância magnética dos meios condicionados do secretoma 1 e do secretoma 2, foram identificados 33 metabólitos (Tabela 6): 2-oxoisocaproato, acetato, acetoacetato, alanina, arginina, asparagina, aspartato, cafeína, creatina, creatina fosfato, creatinina, citrato, etanol, formato, fumarato, glicose, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, lactato, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, piroglutamato, piruvato, prolina, succinato, treonina, triptofano, tirosina e valina.

Foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de 21 metabólitos no secretoma 1 (procedente de células HEp-2 com expressão ectópica de *KLK8*) em relação aos seus controles: 17 mostraram aumento (acetato, aspartato, creatina, creatinina, etanol, fenilalanina, fumarato, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, piroglutamato, piruvato, treonina e valina) e quatro mostraram redução (formato, glicose, glutamina e lactato) nas células transfectadas com o vetor cheio.

Foram também observadas diferenças estatísticas entre as concentrações de 13 metabólitos no secretoma 2 (procedente de células HEp-2 tratadas com o secretoma 1) em relação aos seus controles: nove mostraram aumento (acetato, aspartato, citrato, creatinina, formato, glicose, metionina, piroglutamato e prolina) e quatro mostraram redução (etanol, glutamina, lactato e piruvato) no grupo tratado.

Tabela 6. Concentração de metabólitos identificados nos secretomas 1 e 2 procedente de células transfectadas com o vetor de expressão contendo o gene *KLK8*, com o vetor vazio ou sem vetor (teste ANOVA, $p < 0,05$).

METABÓLITOS	SECRETOMA 1			Valor de p	SECRETOMA 2			Valor de p
	Controle	vetor vazio	vetor cheio		controle	vetor vazio	vetor cheio	
2-OXOISOCAPROATO	0.0175 0.0162 0.0133	0.0169 0.0194 0.0125	0.0168 0.0199 0.0193	0.375	0.0136 0.0125 0.0136	0.0137 0.0105 0.01	0.0112 0.0114 0.012	0.211
ALANINA	0.3003 0.3965 0.3363	0.3434 0.3566 0.3775	0.3633 0.3765 0.359	0.562	0.339 0.3775 0.3343	0.338 0.3418 0.37	0.3725 0.359 0.3429	0.841
ACETATO	0.085 0.0786 0.0705	0.0798 0.0736 0.0711	0.0932 0.0919 0.0903	0.013	0.0649 0.0788 0.0736	0.0797 0.0719 0.088	0.0922 0.107 0.1163	0.012
ACETOACETATO	0.0083 0.0147 0.0081	0.0073 0.012 0.008	0.0074 0.0144 0.0089	0.882	0.0088 0.009 0.0081	0.009 0.0063 0.011	0.0118 0.0312 0.0167	0.098
ARGININA	0.3123 0.3434 0.3251	0.35 0.3477 0.303	0.3056 0.3479 0.3389	0.897	0.3426 0.352 0.2179	0.3529 0.2019 0.3472	0.3641 0.3625 0.3868	0.397
ASPARAGINA	0.1258 0.0887 0.0868	0.13 0.0972 0.089	0.127 0.1412 0.1343	0.127	0.1059 0.1248 0.1258	0.1646 0.1259 0.1462	0.1354 0.0746 0.1064	0.151
ASPARTATO	0.0703 0.0713 0.0675	0.0835 0.0902 0.0732	0.178 0.1426 0.1838	0.0001	0.0325 0.0934 0.0871	0.0974 0.0894 0.091	0.2518 0.1591 0.1312	0.038
CITRATO	0.0355 0.05 0.0421	0.0301 0.0475 0.501	0.0422 0.0639 0.0552	0.461	0.0165 0.0151 0.0143	0.016 0.0154 0.0132	0.0437 0.0287 0.0321	0.003
CAFEÍNA	0.0114 0.0094 0.009	0.0088 0.0093 0.0099	0.009 0.0095 0.0087	0.478	0.0102 0.0139 0.0061	0.0137 0.0123 0.0122	0.0127 0.0119 0.0103	0.446

Continuação da tabela 6.

CREATINA	0.0203 0.0205 0.0259	0.0204 0.0242 0.021	0.041 0.0386 0.0397	0.0001	0.0118 0.0148 0.0298	0.0175 0.0308 0.016	0.0264 0.0145 0.0121	0.86
CREATINA FOSFATO	0.0282 0.0376 0.0295	0.0273 0.0373 0.0284	0.0262 0.049 0.0275	0.892	0.0243 0.0378 0.0161	0.0182 0.0377 0.0203	0.0172 0.023 0.0325	0.974
CREATININA	0.0079 0.0086 0.0069	0.007 0.0069 0.0051	0.0295 0.0299 0.0389	0.0001	0.0048 0.0089 0.0052	0.012 0.004 0.0091	0.0234 0.0301 0.0199	0.003
ETANOL	6.2529 6.1148 6.058	6.0371 5.9818 6.2346	7.2942 7.4486 7.9837	0.0001	13.0171 13.7895 13.7683	14.0304 12.1264 11.0625	10.8951 9.9495 10.6309	0.021
FENILALANINA	0.0599 0.0507 0.0564	0.0511 0.061 0.0571	0.0753 0.0952 0.0998	0.004	0.1094 0.0887 0.1134	0.1291 0.0872 0.1358	0.0991 0.0836 0.1163	0.543
FORMATO	0.1826 0.1831 0.1856	0.1926 0.1926 0.1801	0.1603 0.173 0.179	0.049	0.1365 0.1429 0.1338	0.1475 0.1411 0.1488	0.1704 0.1615 0.1747	0.001
FUMARATO	0.0057 0.0058 0.0051	0.0045 0.0049 0.0051	0.0062 0.0062 0.0068	0.004	0.0041 0.0053 0.0056	0.0042 0.0036 0.004	0.0042 0.0042 0.0045	0.098
GLICOSE	0.9011 0.989 0.8253	0.8259 0.9654 0.9002	0.5596 0.4155 0.4898	0.001	0.0491 0.04 0.0441	0.04 0.039 0.049	0.0689 0.0784 0.1077	0.009
GLICINA	0.1641 0.1723 0.1725	0.1899 0.1624 0.1502	0.194 0.2203 0.222	0.019	0.1828 0.2067 0.2031	0.2203 0.1812 0.2082	0.1317 0.198 0.1829	0.293
GLUTAMINA	1.6476 1.222 1.2265	1.3665 1.2325 1.2668	0.8509 0.8196 0.7966	0.008	1.1791 1.1876 1.1597	1.1449 1.1158 1.1301	0.9019 0.4085 0.7836	0.014
HISTIDINA	0.0563 0.0513 0.0459	0.0554 0.0568 0.051	0.1686 0.1444 0.1489	0.0001	0.0363 0.0109 0.0256	0.0403 0.034 0.0402	0.0372 0.0429 0.0143	0.399
ISOLEUCINA	0.16 0.1629 0.1599	0.1572 0.1603 0.1605	0.165 0.1706 0.166	0.012	0.2152 0.2065 0.2042	0.2213 0.1921 0.2067	0.1982 0.2141 0.2215	0.888

Continuação da tabela 6

LACTATO	5.6894 5.7012 5.7154	5.7249 5.7016 5.6962	5.1784 5.1596 5.169	0.0001	8.4883 8.0934 8.1651	8.3765 8.4556 8.1777	7.0978 6.9864 7.1283	0.0001
LEUCINA	0.1153 0.1129 0.1142	0.116 0.1136 0.1155	0.1169 0.1205 0.1225	0.02	0.1642 0.1605 0.1622	0.1693 0.1491 0.1601	0.1214 0.1624 0.1684	0.668
LISINA	0.1436 0.1413 0.1391	0.1486 0.1451 0.1353	0.204 0.1711 0.1871	0.003	0.1809 0.1806 0.1799	0.1798 0.1805 0.181	0.255 0.1825 0.2018	0.185
METIONINA	0.0391 0.0407 0.0403	0.0443 0.0398 0.0409	0.0551 0.0436 0.0525	0.031	0.0414 0.0417 0.042	0.0431 0.04 0.0409	0.1402 0.1526 0.1262	0.0001
PIROGLUTAMATO	0.0739 0.2329 0.2205	0.2208 0.2334 0.2181	0.3463 0.24 0.3573	0.009	0.1477 0.2759 0.2683	0.2819 0.199 0.2266	0.3746 0.3971 0.3866	0.013
PIRUVATO	0.3369 0.3551 0.3261	0.3096 0.3125 0.3012	0.4036 0.4067 0.4082	0.0001	0.1531 0.1462 0.1469	0.1513 0.1451 0.146	0.1126 0.1278 0.119	0.001
PROLINA	0.1298 0.1376 0.1276	0.1235 0.1272 0.1352	0.1176 0.1288 0.1248	0.295	0.1052 0.0968 0.104	0.1035 0.1021 0.0957	0.2268 0.2742 0.2651	0.0001
SUCCINATO	0.0436 0.0433 0.0432	0.0461 0.0426 0.0434	0.0458 0.0442 0.0479	0.172	0.0133 0.019 0.355	0.0469 0.022 0.0149	0.0379 0.047 0.046	0.537
TREONINA	0.2245 0.1993 0.2252	0.2161 0.2321 0.2231	0.255 0.2678 0.2779	0.004	0.1641 0.2197 0.257	0.229 0.218 0.2168	0.2463 0.2646 0.2458	0.276
TRIPTOFANO	0.0182 0.0232 0.0256	0.0242 0.0226 0.0201	0.0307 0.0235 0.0226	0.475	0.0141 0.0261 0.025	0.0271 0.236 0.206	0.0322 0.033 0.0392	0.083
TIROSINA	0.1747 0.1561 0.1632	0.1866 0.1758 0.1481	0.1896 0.1584 0.1794	0.7	0.1041 0.1159 0.163	0.1195 0.1534 0.1212	0.114 0.165 0.1261	0.943
VALINA	0.1698 0.1697 0.1699	0.1717 0.1704 0.165	0.1746 0.1901 0.1852	0.022	0.2769 0.2172 0.2249	0.2316 0.1998 0.2135	0.2093 0.2084 0.211	0.249

A análise de expressão por PCR em tempo real dos genes *PKM1*, *PKM2*, *SLC2A1*, *LDHA*, importantes para o metabolismo da glicose e para a glicólise aeróbica, foi realizada para investigar a ocorrência de alterações no padrão glicolítico das células transfectadas em comparação com as células controle. O resultado mostrou que três desses genes (*PKM2*, *SLC2A1* e *LDHA*) estão significativamente menos expressos nas células com o vetor de expressão contendo *KLK8* (Figura 21).

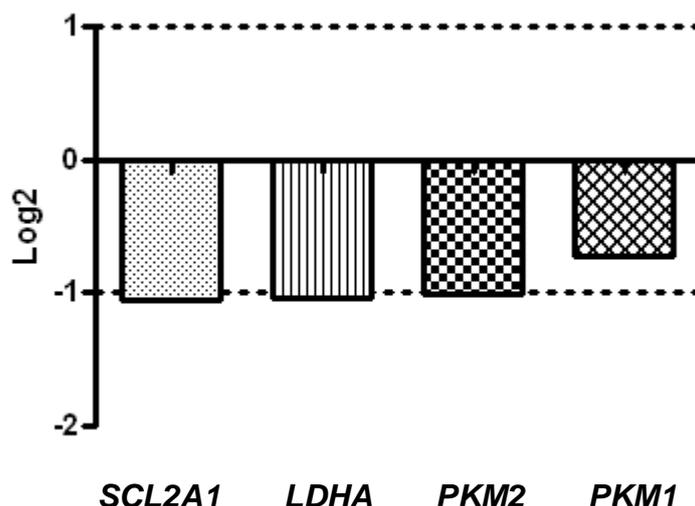


Figura 21. Valores de expressão relativa em logaritmo de base 2 dos genes *SCL2A1*, *LDHA*, *PKM2* e *PKM1* nas células transfectadas com o vetor com *KLK8* em comparação com as células controle.

Análise do proteoma

Os dados obtidos por espectrometria de massas das células transfectadas e seus controles e dos secretomas 1 e 2 foram analisados pelo *software Mascot Distiler*, que utiliza o banco de dados do NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e, em seguida, exportados para o programa Scaffold. A quantificação relativa das proteínas permitiu a comparação entre os vários grupos.

Foi identificado um total de 59 proteínas celulares (aqui designadas pelo símbolo dos genes que as codificam). Destas, seis se mostraram diferencialmente expressas nas células tranfectadas com o vetor cheio em relação aos seus controles, duas delas com aumento (CALR e GPI) e outras quatro proteínas sem evidência de expressão (RPL18, XRCC5, TPM4-ALK, SLC3A2). Também foi observado aumento (HSPA5, HIST1H1E) ou ausência (ALDOA) de expressão nas células tratadas com o secretoma 1 (Tabela 7).

Entre as 40 proteínas secretadas identificadas, duas mostraram aumento (PSAP, PXDN) e três não se expressaram (LDHB, TUBB e ALDOA) no secretoma 1 (Tabela 7). No secretoma 2, apenas a proteína ALDOA exibiu diferença de expressão entre aquelas secretadas por células tratadas com o secretoma 1 (Tabela 7).

As proteínas diferencialmente expressas, tanto celulares como secretadas, foram associadas pelo programa *Ingenuity* a processos de proliferação, diferenciação, apoptose, viabilidade e manutenção celular (Sumário 1). A figura 22 apresenta a via molecular na qual essas proteínas estão associadas à calicreína 8.

Tabela 7. Quantificação relativa das proteínas diferencialmente expressas, atribuídas pelo programa *Scaffold* (teste exato de Fisher, $p < 0,05$).

Proteínas *	Controle			Vetor Vazio			Vetor com <i>KLK8</i>		
	Triplícatas			Triplícatas			Triplícatas		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
ETAPA 1-Proteínas Celulares*									
CALR	6.541	5.625	5.971	5.798	6.66	5.632	1.007	0.235	1.003
GPI	1.021	1.132	1.036	0	1.055	1.147	8.965	9.889	8.751
RPL18	2.667	4.001	4.121	4.132	3.635	4	0	0	0
XRCC5	8.874	9.551	10.002	8.835	8.997	9.963	0	0	0
TPM4-ALK fusion oncopr 2	2.55	2.531	4.658	3.005	2.635	2.33	0	0	0
SLC3A2	3.33	3.834	3.448	2.996	3.348	3.968	0	0	0
ETAPA 1-Secretoma 1									
LDHB	6.279	1.918	3.543	1.8395	3.5658	4.357	0	0	0
ALDOA	1.023	0.959	1.124	1.245	1.5673	1.0034	0	0	0
TUBB	2.627	2.877	2.134	2.9876	2.3543	2.8145	0	0	0
PSAP	0.256	0	0	0	0	0	3.2517	3.5645	3.1101
PXDN	0.056	0	0	0	0	0	4.5067	4.2431	4.3356
ETAPA 2-Proteínas Celulares									
HSPA5	10.189	12.667	10.446	10.8654	11.4055	9.7702	5.1051	6.4518	4.9659
HIST1H1E	5.0946	3.1667	5.2231	3.2885	5.1352	5.3081	2.0421	1.2904	0
ALDOA	3.3964	3.1667	1.3058	1.0962	3.569	0	0	0	0
ETAPA 2-Secretoma 2									
ALDOA	1.437	1.581	1.896	1.998	1.352	2.201	0	0	0

* Designadas pelo símbolo dos genes que as codificam

Sumário 1: Processos e valores de p atribuídos pelo programa *Ingenuity* às proteínas diferencialmente expressas.



Analysis Name: carol ingenuityKLLK - 2014-05-28 04:37

Analysis Creation Date: 2014-05-28

Build version: 308606M

Content version: 18488943 (Release Date: 2014-03-23)

Top Canonical Pathways

Name	p-value	Ratio
Gluconeogenesis I	1.24E-04	2/47 (0.043)
Glycolysis I	1.36E-04	2/41 (0.049)
Lipid Antigen Presentation by CD1	1.59E-04	2/30 (0.067)
Pyruvate Fermentation to Lactate	3.65E-03	1/9 (0.111)
GDP-mannose Biosynthesis	4.38E-03	1/13 (0.077)

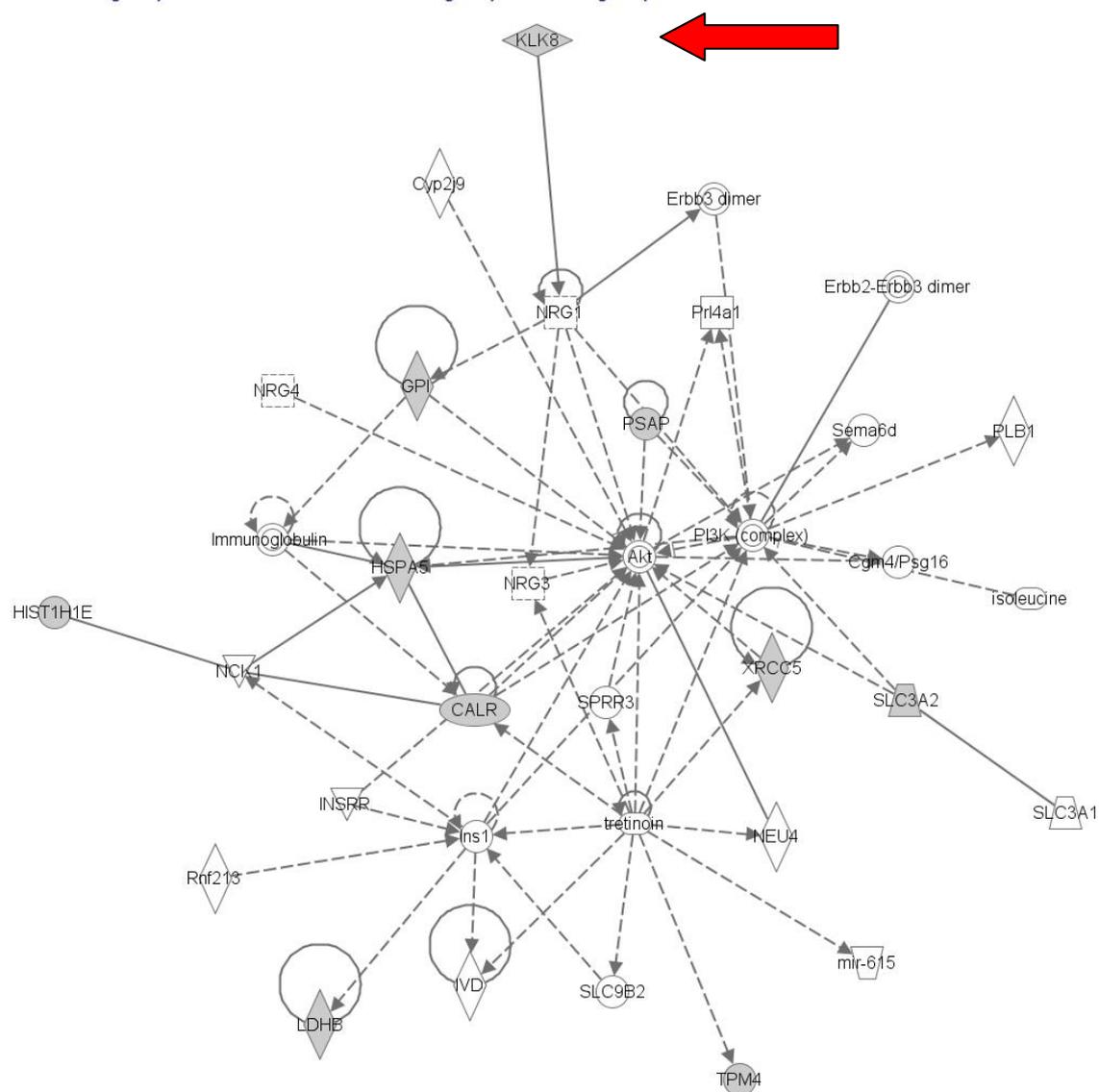
Molecular and Cellular Functions

Name	p-value	# Molecules
Cellular Development	6.76E-06 - 4.37E-02	7
Cellular Growth and Proliferation	6.76E-06 - 4.23E-02	9
Cellular Compromise	2.22E-05 - 3.52E-02	6
Cellular Function and Maintenance	2.22E-05 - 3.71E-02	8
Cell Signaling	4.63E-04 - 4.86E-02	4
Cell Death and Survival	2,15E-04 - 4,78E-02	8

Top Networks

ID	Associated Network Functions	Score
1	Amino Acid Metabolism, Molecular Transport, Small Molecule Biochemistry	27
2	Drug Metabolism, Lipid Metabolism, Molecular Transport	9

Network 1 : carol ingenuityKLK - 2014-05-28 04:37 PM : carol ingenuityKLK : carol ingenuityKLK - 2014-05-28 04:37 PM



© 2000-2014 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Figura 22. Via do metabolismo de aminoácidos, transporte molecular e bioquímica de pequenas moléculas atribuída pelo programa *Ingenuity* a proteínas diferencialmente expressas, celulares e secretadas, em associação com a calicreína 8.

F. Modelagem molecular por homologia

A modelagem molecular da proteína calicreína 8 foi realizada pelo programa MODELLER utilizando como molde a calicreína 5, cuja estrutura já foi resolvida e que possui similaridade superior a 40% com a calicreína 8.

A Figura 23A apresenta o modelo proposto: os 3 pontos em vermelho mostram o sítio catalítico da proteína com os resíduos histidina, ácido aspártico e serina. A Figura 23B exibe em vermelho três alfa-hélices e em amarelo 12 folhas beta.

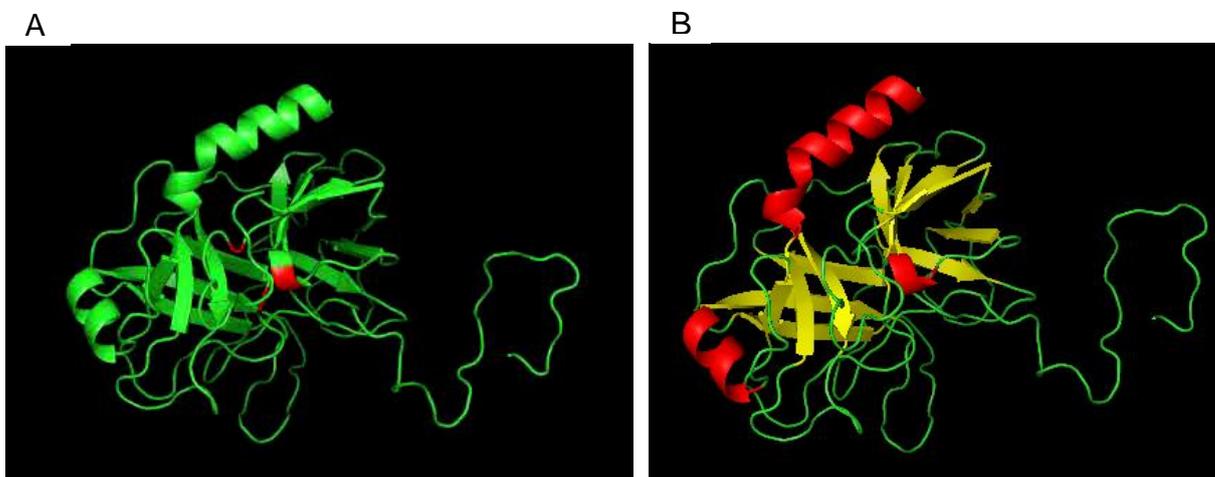


Figura 23. Modelo proposto pelo programa MODELLER para a calicreína 8. **A.** Em vermelho, o sítio catalítico da proteína com os resíduos histidina, ácido aspártico e serina. **B.** Alfa-hélices em vermelho e folhas beta em amarelo.

DISCUSSÃO

A casuística do presente trabalho compreendeu 87% dos pacientes do sexo masculino, 78% fumantes e 74% etilistas. Tais freqüências, com excesso de portadores homens que fazem uso de tabaco e álcool, são esperadas para esse grupo de neoplasias, tendo sido repetidamente confirmada em estudos epidemiológicos amplos (325, 326). A explicação para esse achado é o maior consumo, no sexo masculino, dos dois principais fatores etiológicos da doença.

A idade média observada foi acima de 55 anos, o que também está de acordo com a literatura (327). No presente estudo, a casuística mostrou tumores grandes sem metástases à distância, procedentes dos dois subsítios anatómicos de cabeça e pescoço, boca e laringe. Os dois pacientes mais jovens da amostra (39 anos) nunca fumaram ou beberam, o que sugere um fator etiológico diferente dos demais. A infecção por papilomavírus (HPV) do tipo 16 já foi identificada como responsável por uma fração significativa de CECPs em pacientes abaixo dos 50 anos, em especial os de orofaringe (27).

Na tentativa de contribuir para o entendimento da tumorigênese de cabeça e pescoço, foi estudado o gene da calicreína 8, uma serino-protease que, em análises anteriores do nosso grupo, mostraram níveis reduzidos em bibliotecas SAGE de laringe (33).

Inicialmente, foi investigada a história evolutiva dos genes da família das calicreínas humanas pelo método Maximum Likelihood (319), utilizando as sequências das isoformas dos 15 genes *KLKs* da família, a sequência do pseudogene-1 (*KLKP1*) e a sequência do gene *PRSS1* (tripsin 1) como grupo externo similar. A análise mostrou que a família de genes *KLKs* estão

separados em cinco clados, um deles com *KLK 8, 15 e 10* e um ramo isolado com a *KLK6*. A árvore, similar em vários aspectos a outras análises filogenéticas desse cluster já realizadas (70, 92, 94, 328, 329), reforça a idéia que todos os genes *KLKs* evoluíram de um único ancestral comum por sucessivas duplicações em tandem e rearranjos genômicos facilitados por elementos repetitivos. A alta similaridade entre as sequências de *KLK2* e *KLK3* e o valor elevado de suporte entre seus braços na árvore filogenética sugerem que essas duas calicreínas podem ter sido formadas por eventos de duplicação tardios na evolução da família (94, 328).

Em relação à expressão de *KLK8*, apenas as variantes 1, 3 e 6 apresentaram níveis alterados de transcritos na comparação de amostras tumorais com as de margens cirúrgicas, a primeira das variantes com redução e as outras duas com elevação de expressão. Em câncer de pulmão de células não pequenas, Planque et al. (2010) (223) observaram concentração significativamente mais alta das variantes 2, 3 e 4 nos tecidos neoplásicos que nos controles pareados e obtiveram correlação desse perfil de expressão com tipo histológico, mas não com estágio, tamanho ou status nodal. Os autores também observaram associação da variante 4 com prognóstico desfavorável, em especial a razão *KLK8*-variante 4/*KLK11*. Investigação de uma correlação similar não foi possível no presente trabalho, considerando que o grupo amostral era pequeno, a maioria deles T3 e T4.

Os níveis baixos da variante 1 nas amostras de cabeça e pescoço foi um dos fatores que a fez ser escolhida para o ensaio de indução de expressão. Além disso, a presença do sítio catalítico, localizado nos éxons 3, 4 e 6, que

existe apenas nas isoformas 1 e 2 (70, 225), deu garantias de atividade desta isoforma como serino-protease. A indução de sua expressão nas linhagens celulares de CECP (uma delas procedente de laringe e outra de hipofaringe) provocou mudança de morfologia celular e aumento da capacidade migratória e proliferativa das células, mas não de invasividade. Este resultado foi similar ao de Sher et al. (2006) (225) em câncer de pulmão, que também observaram diminuição de invasividade *in vitro* e desfecho clínico favorável na presença de níveis elevados das variantes 1 e 2. Este efeito protetor foi apontado pelos autores como decorrente da proteólise da fibronectina extracelular pela hK8 e supressão da via de sinalização das integrinas e da polimerização de actina, com conseqüente redução no número de filopódios.

O aumento da capacidade migratória sem aumento concomitante de invasividade nas células HEp-2 e FaDu estudadas pelo presente estudo não seria, portanto, esperado. A explicação para um resultado oposto ao esperado pode estar relacionada ao fato de produtos derivados de *splicing* alternativo terem, algumas vezes, atuações opostas ou competirem pelo mesmo substrato, desencadeando um processo regulatório, ou mesmo terem variação na taxa de atividade dependendo do tipo celular. Esta não é uma afirmação nova e já foi relatada para isoformas do gene *ERBB*, que exibem efeitos marcadamente diferentes na diferenciação e na proliferação de epitélio mamário (330). Pode ser especulado que as várias isoformas de hK8 modulam de forma diversa a degradação da fibronectina, desencadeando sinais distintos de sinalização pela integrina, ativação de efetores secundários, mudanças na

polimerização de actina, reorganização do citoesqueleto e conseqüentemente de mobilidade celular (225).

Todas as variantes da calicreínas 8 possuem, além de diferenças em sua seqüência, o peptídeo sinal. Portanto, são potencialmente secretadas e podem atuar de forma diversa no microambiente tumoral. Este microambiente compreende uma rede complexa de componentes da matriz extracelular, células inflamatórias e miofibroblastos ou fibroblastos associados ao câncer que, juntamente com as células neoplásicas (331-333), geram sinais proliferativos, anti-apoptóticos, angiogênicos e indutores de migração e invasão. Tanto as células neoplásicas interagem com o estroma vizinho via secreção de fatores solúveis, como as células estromais representam uma fonte de sinais importantes para a tumorigênese. A identificação desses fatores e de seu efeito sobre o fenótipo celular é, portanto, de grande importância para o entendimento do processo de iniciação e progressão do câncer.

Entre os compostos secretados tanto por células neoplásicas como por células estromais, estão os metabólitos. No presente estudo, foi observada diminuição na concentração de glicose e lactato no secretoma de linhagens exibindo expressão ectópica de *KLK8*, mas aumento de glicose e diminuição de lactato no secretoma 2, procedente de células tratadas com o secretoma 1. Aparentemente, ocorreu uma modificação no padrão glicolítico das células neoplásicas, que geralmente apresentam preferência energética por glicólise aeróbica (Efeito de Warburg), mas em presença de níveis intra ou extracelulares elevados de hK8 passam a consumir menos a glicose do meio.

Como referido previamente, a energia necessária para manutenção dos processos fisiológicos em células normais é obtida da fosforilação oxidativa. Embora com menor eficiência, essa energia também pode ser obtida da glicólise anaeróbica ou aeróbica que, na ausência ou na presença de oxigênio, forma o lactato (revisto por Vander Heiden et al (2009) (5).

Os tumores são metabolicamente heterogêneos, com sub-populações que realizam a fosforilação oxidativa (fenótipo oxidativo), glicólise aeróbica (fenótipo Warburg) ou glicólise anaeróbica. A manutenção de uma alta taxa de glicólise está sob o controle positivo de HIF-1, um fator de transcrição associado com agressividade do tumor e prognóstico desfavorável (334, 335). Os dados do trabalho de De Saedeleer e colaboradores (2012) (336) sugerem que o lactato, produzido pelas células glicolíticas, ativa HIF-1 em células com fenótipo oxidativo, mas não com fenótipo Warburg.

O lactato não é um subproduto metabólico, mas um combustível para células com fenótipo oxidativo (337) e uma molécula sinalizadora em vários tipos celulares (337, 338). Em tumores, o lactato está no centro de uma simbiose metabólica na qual as células hipóxicas/glicolíticas produzem lactato a partir da glicose e as células oxidativas usam o lactato como combustível (339). Além disso, o lactato em si induz migração e parece contribuir para escape imune e angiogênese, e sua concentração nos tecidos tem sido associada com radiorresistência, metástase e sobrevida de pacientes (103).

A fim de confirmar a modificação no padrão glicolítico das células com níveis elevados de *KLK8*, foi avaliada a expressão dos genes *PKM*, *LDHA* e *SLC2A1*. O gene *PKM* gera duas isoformas (1 e 2) por *splicing* alternativo de

dois exons mutualmente exclusivos, e seu produto (piruvato quinase) cataliza a desfosforilação do fosfoenolpiruvato (PEP) convertendo-o em piruvato. A PKM1 é expressa em tecidos adultos nos quais é produzida grande quantidade de energia, como músculo e cérebro, e a PKM2 é observada em alguns tecidos diferenciados e em células com taxas elevadas de síntese de ácidos nucleicos, como células tronco e neoplásicas. Durante a diferenciação, a PKM2 é substituída por isoformas tecido-específicas, enquanto a PKM1 desaparece durante a tumorigênese e a PKM2 é reexpressa (revisto por Chen (340)).

Christofk et al. (2008) (341) demonstraram que a utilização de PKM1 ou PKM2 pela célula está diretamente ligada ao fenótipo metabólico tumoral. A PKM1 forma tetrâmeros com alta afinidade por PEP, convertendo-o com eficiência em piruvato, que segue preferencialmente a via da fosforilação oxidativa. A PKM2 pode formar tetrâmeros ou dímeros com alta e baixa afinidade por PEP, respectivamente. Em células neoplásicas, são encontrados principalmente dímeros, o que promove o acúmulo e a utilização de intermediários da via glicolítica para biosíntese de ácidos graxos e ácidos nucleicos, importantes para células proliferativas. O piruvato produzido pela PKM2 é convertido preferencialmente em lactato, sem seguir a via da fosforilação oxidativa.

A conversão do piruvato a lactato é catalisada pelo complexo lactato desidrogenase (LDH) e compreende a etapa chave da glicólise. Existem duas isoformas de LDH (A e B); a primeira aumenta a eficiência do complexo e favorece a glicólise, ao contrário da segunda, que promove a conversão inversa (revisto por Shi et al (2008) (342)). A expressão elevada de LDHA é

característica de muitos tumores e sua inibição aumenta apoptose (343) e diminui proliferação e migração (344).

O produto do gene *SLC2A1* (*GLUT-1* ou *glucose transporter 1*) é responsável pelo controle do movimento de glicose entre o meio extra e intracelular em muitos tipos celulares. Sua expressão elevada é observada em tumores primários e está relacionada com maior invasividade e potencial metastático (345-347).

Os resultados da análise de expressão desses genes confirmaram a ocorrência de modificação do padrão glicolítico em células com níveis elevados de transcritos *KLK8*: os genes *PKM2*, *SLC2A1* e *LDHA*, que estão diretamente ligados a uma maior eficiência da glicólise, apresentaram redução de expressão, ao contrário de *PKM1*. Os dados sugerem que a hK8 favorece a via do ácido cítrico, com diminuição da produção de lactato.

Os poucos dados obtidos pela análise do proteoma por espectrometria de massas indicam que as diferenças no perfil proteico entre as células transfectadas e as não transfectadas são pequenas. O número de proteínas identificadas talvez pudesse ser ampliado utilizando-se um espectômetro de última geração mais sensível. De qualquer maneira, o resultado foi confirmado em experimentos realizados em dois momentos diferentes. Embora limitados, chama a atenção nos dados a alteração de expressão de três enzimas que participam da glicólise (*ALDOA* ou aldolase A, frutose-bisfosfato; *GPI* ou glicose-6-fosfato isomerase, *LDHB* ou lactato desidrogenase B), bem como proteínas envolvidas no controle do ciclo celular (*CALR* ou calreticulina), organização da matriz extracelular (*PXDN* ou peroxidase) e transporte de

aminoácidos (SLC3A2 ou antígeno 4F2), processos estes importantes para células proliferativas. Estas últimas, da mesma forma que a oncoproteína de fusão TPM4–ALK (já observada em câncer de esôfago) (348), devem ser usuais nas linhagens neoplásicas estudadas, mas sem relação com a indução de hK8.

Completando o estudo funcional da *KLK8* e seu efeito quando em expressão elevada, foi avaliada a estrutura molecular de seu produto por modelagem comparativa ou por homologia, utilizando-se como molde para predição da conformação a hK5, em função da taxa de similaridade alta entre as sequências. Os dados mostraram a presença de três alfa-hélices e 12 folhas beta, ao contrário da estrutura padrão proposta para as calicreínas que compreende dois conjuntos de seis folhas-beta enoveladas e anti-paralelas, e duas α -hélices, com o sítio ativo entre os conjuntos de folhas-beta (95, 96), abrem perspectivas para predição funcional, identificação e validação de alvos terapêuticos, bem como para identificação e otimização de novas drogas (349, 350).

CONCLUSÕES

O presente estudo foi importante para responder a alguns questionamentos sobre a função do gene *KLK8* em carcinomas de cabeça e pescoço e levantar outras questões sobre sua importância no prognóstico e na terapia desta doença. Foram analisadas, pela primeira vez, as diferenças de expressão das isoformas de *KLK8* em CECP e a indução de sua expressão em linhagens celulares procedentes deste tumor.

O estudo com cultura de células pode ser limitante por não ser fiel ao microambiente *in vivo*, excluindo diversos fatores e interações celulares cruciais. Porém, os resultados aqui apresentados abrem perspectivas de estudos, principalmente relacionados à compreensão dos mecanismos de ação do gene *KLK8* no metabolismo energético da célula neoplásica.

O desenvolvimento da modelagem molecular da proteína hK8, realizado pela primeira vez, é importante para estudos funcionais posteriores e desenvolvimento de ligantes que auxiliem no tratamento do câncer.

As principais conclusões a partir dos dados obtidos no presente trabalho são:

1. Por análise filogenética, a família de genes das calicreínas humanas e suas isoformas mostra cinco clados principais e um ramo isolado com a *KLK6*. A árvore reforça a idéia de que todos os genes *KLKs* evoluíram de um único ancestral comum por sucessivas duplicações em tandem e/ou rearranjos cromossômicos facilitados por elementos repetitivos.

2. A isoforma 1 da calicreína 8 apresenta níveis significativamente reduzidos em CECP, enquanto as isoformas 3 e 6 exibem aumento de expressão, embora com grande variabilidade entre as amostras.

3. A expressão das isoformas de *KLK8* não está associada à presença de metástase linfonodal.

4. A indução permanente de expressão da variante 1 de *KLK8* resulta na mudança de morfologia celular, aumento de proliferação, viabilidade e capacidade migratória sem aumento concomitante de invasividade das linhagens HEP-2 e FaDu, procedentes de CECPs.

5. A modelagem comparativa da calicreína 8 apresenta semelhança com a estrutura terciária padrão das hKs, que compreende dois conjuntos de seis folhas-beta enoveladas e anti-paralelas, e duas α -hélices, exceto pelo número de alfa-hélice, com três alfa-hélices e 12 folhas beta e o sítio ativo entre os conjuntos de folhas beta.

6. Em presença de níveis intra ou extracelulares elevados de *KLK8*, ocorre uma modificação no padrão glicolítico de células neoplásicas, que passam a consumir menos glicose.

7. Os dados obtidos pela análise do proteoma por espectrometria de massas indicam que as diferenças entre as células transfectadas e as não transfectadas com *KLK8* são pequenas e incluem proteínas que atuam na glicólise e em processos associados à tumorigênese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70. Epub 2000/01/27.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74. Epub 2011/03/08.
3. Ohanna M, Giuliano S, Bonet C, Imbert V, Hofman V, Zangari J, et al. Senescent cells develop a PARP-1 and nuclear factor- κ B-associated secretome (PNAS). *Genes Dev*. 2011;25(12):1245-61. Epub 2011/06/08.
4. Dowling P, Clynes M. Conditioned media from cell lines: a complementary model to clinical specimens for the discovery of disease-specific biomarkers. *Proteomics*. 2011;11(4):794-804. Epub 2011/01/14.
5. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-33. Epub 2009/05/23.
6. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, et al. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(49):19345-50. Epub 2007/11/23.
7. Wise DR, Thompson CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci*. 2010;35(8):427-33. Epub 2010/06/24.
8. Eagle H. The specific amino acid requirements of a human carcinoma cell (Strain HeLa) in tissue culture. *J Exp Med*. 1955;102(1):37-48. Epub 1955/07/01.

9. DeBerardinis RJ, Cheng T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene*. 2010;29(3):313-24. Epub 2009/11/03.
10. Choi SY, Collins CC, Gout PW, Wang Y. Cancer-generated lactic acid: a regulatory, immunosuppressive metabolite? *J Pathol*. 2013;230(4):350-5. Epub 2013/06/05.
11. Yang L, Moss T, Mangala LS, Marini J, Zhao H, Wahlig S, et al. Metabolic shifts toward glutamine regulate tumor growth, invasion and bioenergetics in ovarian cancer. *Mol Syst Biol*. 2014;10:728. Epub 2014/05/07.
12. Mazurek S. Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011;43(7):969-80. Epub 2010/02/17.
13. Munoz-Pinedo C, El Mjiyad N, Ricci JE. Cancer metabolism: current perspectives and future directions. *Cell Death Dis*. 2012;3:e248. Epub 2012/01/13.
14. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(1):9-22. Epub 2010/12/17.
15. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol*. 2006;24(14):2137-50. Epub 2006/05/10.
16. Brasil. Ministério da Saúde - Estimativa 2014- Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro 2014.

17. Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP, Pereira RN, Silva ME, et al. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. *Int J Cancer*. 1989;43(6):992-1000. Epub 1989/06/15.
18. Lichtenstein E, Andrews JA, Lee ME, Glasgow RE, Hampson SE. Using radon risk to motivate smoking reduction: evaluation of written materials and brief telephone counselling. *Tob Control*. 2000;9(3):320-6. Epub 2000/09/12.
19. Ho T, Zhao C, Zheng R, Liu Z, Wei Q, Sturgis EM. Glutathione S-transferase polymorphisms and risk of differentiated thyroid carcinomas: a case-control analysis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006;132(7):756-61. Epub 2006/07/19.
20. Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, Wipf GC, Carter JJ, Madeleine MM, et al. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(21):1626-36. Epub 1998/11/12.
21. Smith EM, Hoffman HT, Summersgill KS, Kirchner HL, Turek LP, Haugen TH. Human papillomavirus and risk of oral cancer. *Laryngoscope*. 1998;108(7):1098-103. Epub 1998/07/17.
22. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang DH, Haugen TH, et al. Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(6):449-55. Epub 2004/03/18.
23. Mork J, Lie AK, Glattre E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2001;344(15):1125-31. Epub 2001/04/12.

24. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(23):1772-83. Epub 2003/12/05.
25. Hansson BG, Rosenquist K, Antonsson A, Wennerberg J, Schildt EB, Bladstrom A, et al. Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol.* 2005;125(12):1337-44. Epub 2005/11/24.
26. Ragin CC, Modugno F, Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Dent Res.* 2007;86(2):104-14. Epub 2007/01/26.
27. Monographs I. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human Papillomaviruses. 2007;90:1-636.
28. Syrjanen K, Syrjanen S, Lamberg M, Pyrhonen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg.* 1983;12(6):418-24. Epub 1983/12/01.
29. Rainho CA, Kowalski LP, Rogatto SR. Loss of imprinting and loss of heterozygosity on 11p15.5 in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck.* 2001;23(10):851-9. Epub 2001/10/10.
30. Dasgupta S, Tripathi PK, Qin H, Bhattacharya-Chatterjee M, Valentino J, Chatterjee SK. Identification of molecular targets for immunotherapy of patients

with head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2006;42(3):306-16. Epub 2005/12/03.

31. Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR. Profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(2):127-35. Epub 2005/02/03.

32. Gollin SM. Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck: window to the biology of disease. *Head Neck.* 2001;23(3):238-53. Epub 2001/06/29.

33. Silveira NJ, Varuzza L, Machado-Lima A, Lauretto MS, Pinheiro DG, Rodrigues RV, et al. Searching for molecular markers in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) by statistical and bioinformatic analysis of larynx-derived SAGE libraries. *BMC Med Genomics.* 2008;1:56. Epub 2008/11/19.

34. Lopez-Otin C, Bond JS. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem.* 2008;283(45):30433-7. Epub 2008/07/25.

35. Puente XS, Sanchez LM, Overall CM, Lopez-Otin C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet.* 2003;4(7):544-58. Epub 2003/07/03.

36. Puente XS, Lopez-Otin C. A genomic analysis of rat proteases and protease inhibitors. *Genome Res.* 2004;14(4):609-22. Epub 2004/04/03.

37. Puente XS, Gutierrez-Fernandez A, Ordonez GR, Hillier LW, Lopez-Otin C. Comparative genomic analysis of human and chimpanzee proteases. *Genomics.* 2005;86(6):638-47. Epub 2005/09/16.

38. Quesada V, Velasco G, Puente XS, Warren WC, Lopez-Otin C. Comparative genomic analysis of the zebra finch degradome provides new

insights into evolution of proteases in birds and mammals. *BMC Genomics*. 2010;11:220. Epub 2010/04/03.

39. Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(Database issue):D160-4. Epub 2003/12/19.

40. Fujinaga M, Cherney MM, Oyama H, Oda K, James MN. The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(10):3364-9. Epub 2004/03/03.

41. Fuchs JE, von Grafenstein S, Huber RG, Kramer C, Liedl KR. Substrate-driven mapping of the degradome by comparison of sequence logos. *PLoS Comput Biol*. 2013;9(11):e1003353. Epub 2013/11/19.

42. Bergbold N, Lemberg MK. Emerging role of rhomboid family proteins in mammalian biology and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1828(12):2840-8. Epub 2013/04/09.

43. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Database issue):D343-50. Epub 2011/11/17.

44. Quesada V, Ordonez GR, Sanchez LM, Puente XS, Lopez-Otin C. The Degradome database: mammalian proteases and diseases of proteolysis. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(Database issue):D239-43. Epub 2008/09/09.

45. Page MJ, Di Cera E. Serine peptidases: classification, structure and function. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(7-8):1220-36. Epub 2008/02/09.

46. Di Cera E. Serine proteases. *IUBMB Life*. 2009;61(5):510-5. Epub 2009/01/31.

47. Heutinck KM, ten Berge IJ, Hack CE, Hamann J, Rowshani AT. Serine proteases of the human immune system in health and disease. *Mol Immunol*. 2010;47(11-12):1943-55. Epub 2010/06/12.
48. Saito S, Murakoshi K, Kotake S, Kamatani N, Tomatsu T. Granzyme B induces apoptosis of chondrocytes with natural killer cell-like cytotoxicity in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2008;35(10):1932-43. Epub 2008/09/12.
49. Tschopp CM, Spiegl N, Didichenko S, Lutmann W, Julius P, Virchow JC, et al. Granzyme B, a novel mediator of allergic inflammation: its induction and release in blood basophils and human asthma. *Blood*. 2006;108(7):2290-9. Epub 2006/06/24.
50. Thomas HE, Trapani JA, Kay TW. The role of perforin and granzymes in diabetes. *Cell Death Differ*. 2010;17(4):577-85. Epub 2009/11/21.
51. Chamberlain CM, Granville DJ. The role of Granzyme B in atheromatous diseases. *Can J Physiol Pharmacol*. 2007;85(1):89-95. Epub 2007/05/10.
52. Ngan DA, Vickerman SV, Granville DJ, Man SF, Sin DD. The possible role of granzyme B in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Ther Adv Respir Dis*. 2009;3(3):113-29. Epub 2009/07/30.
53. Saito Y, Kondo H, Hojo Y. Granzyme B as a novel factor involved in cardiovascular diseases. *J Cardiol*. 2011;57(2):141-7. Epub 2010/12/21.
54. Hiebert PR, Granville DJ. Granzyme B in injury, inflammation, and repair. *Trends Mol Med*. 2012;18(12):732-41. Epub 2012/10/27.
55. Boivin WA, Cooper DM, Hiebert PR, Granville DJ. Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma. *Lab Invest*. 2009;89(11):1195-220. Epub 2009/09/23.

56. Darrah E, Rosen A. Granzyme B cleavage of autoantigens in autoimmunity. *Cell Death Differ.* 2010;17(4):624-32. Epub 2010/01/16.
57. Roghanian A, Sallenave JM. Neutrophil elastase (NE) and NE inhibitors: canonical and noncanonical functions in lung chronic inflammatory diseases (cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease). *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2008;21(1):125-44. Epub 2008/06/04.
58. Fajt ML, Wenzel SE. Mast cells, their subtypes, and relation to asthma phenotypes. *Ann Am Thorac Soc.* 2013;10 Suppl:S158-64. Epub 2013/12/01.
59. Namazi MR. Possible molecular mechanisms to account for the involvement of tryptase in the pathogenesis of psoriasis. *Autoimmunity.* 2005;38(6):449-52. Epub 2005/11/10.
60. Kovanen PT. Mast cells and degradation of pericellular and extracellular matrices: potential contributions to erosion, rupture and intraplaque haemorrhage of atherosclerotic plaques. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(Pt 5):857-61. Epub 2007/10/25.
61. Overed-Sayer C, Rapley L, Mustelin T, Clarke DL. Are mast cells instrumental for fibrotic diseases? *Front Pharmacol.* 2013;4:174. Epub 2014/01/31.
62. Blank U, Essig M, Scanduzzi L, Benhamou M, Kanamaru Y. Mast cells and inflammatory kidney disease. *Immunol Rev.* 2007;217:79-95. Epub 2007/05/15.
63. Sotiropoulou G, Pampalakis G, Diamandis EP. Functional roles of human kallikrein-related peptidases. *J Biol Chem.* 2009;284(48):32989-94. Epub 2009/10/13.

64. Borgono CA, Diamandis EP. The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(11):876-90. Epub 2004/11/02.
65. Yousef GM, Diamandis EP. The human kallikrein gene family: new biomarkers for ovarian cancer. *Cancer Treat Res*. 2009;149:165-87. Epub 2009/09/19.
66. Schmitt M, Magdolen V, Yang F, Kiechle M, Bayani J, Yousef GM, et al. Emerging clinical importance of the cancer biomarkers kallikrein-related peptidases (KLK) in female and male reproductive organ malignancies. *Radiol Oncol*. 2013;47(4):319-29. Epub 2013/12/03.
67. Dong Y, Loessner D, Irving-Rodgers H, Obermair A, Nicklin JL, Clements JA. Metastasis of ovarian cancer is mediated by kallikrein related peptidases. *Clin Exp Metastasis*. 2014;31(1):135-47. Epub 2013/09/18.
68. Bjorkqvist J, Jamsa A, Renne T. Plasma kallikrein: the bradykinin-producing enzyme. *Thromb Haemost*. 2013;110(3):399-407. Epub 2013/07/13.
69. Yousef GM, Chang A, Scorilas A, Diamandis EP. Genomic organization of the human kallikrein gene family on chromosome 19q13.3-q13.4. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;276(1):125-33. Epub 2000/09/28.
70. Yousef GM, Diamandis EP. An overview of the kallikrein gene families in humans and other species: emerging candidate tumour markers. *Clin Biochem*. 2003;36(6):443-52. Epub 2003/09/03.
71. Yousef GM, Borgono CA, Michael IP, Diamandis EP. Cloning of a kallikrein pseudogene. *Clin Biochem*. 2004;37(11):961-7. Epub 2004/10/23.
72. Hu JC, Zhang C, Sun X, Yang Y, Cao X, Ryu O, et al. Characterization of the mouse and human PRSS17 genes, their relationship to other serine

proteases, and the expression of PRSS17 in developing mouse incisors. *Gene*. 2000;251(1):1-8. Epub 2000/06/23.

73. Luo Y, Kumar P, Mendelson CR. Estrogen-related receptor gamma (ERRgamma) regulates oxygen-dependent expression of voltage-gated potassium (K⁺) channels and tissue kallikrein during human trophoblast differentiation. *Mol Endocrinol*. 2013;27(6):940-52. Epub 2013/04/16.

74. Son do N, Li L, Katsuyama H, Komatsu N, Saito M, Tanii H, et al. Abundant expression of Kallikrein 1 gene in human keratinocytes was mediated by GATA3. *Gene*. 2009;436(1-2):121-7. Epub 2009/02/24.

75. Zeng M, Zhang Y, Bhat I, Wazer DE, Band H, Band V. The human kallikrein 10 promoter contains a functional retinoid response element. *Biol Chem*. 2006;387(6):741-7. Epub 2006/06/28.

76. Shin T, Sumiyoshi H, Matsuo N, Satoh F, Nomura Y, Mimata H, et al. Sp1 and Sp3 transcription factors upregulate the proximal promoter of the human prostate-specific antigen gene in prostate cancer cells. *Arch Biochem Biophys*. 2005;435(2):291-302. Epub 2005/02/15.

77. Eisermann K, Tandon S, Bazarov A, Brett A, Fraizer G, Piontkivska H. Evolutionary conservation of zinc finger transcription factor binding sites in promoters of genes co-expressed with WT1 in prostate cancer. *BMC Genomics*. 2008;9:337. Epub 2008/07/18.

78. Tsui KH, Chang PL, Lin HT, Juang HH. Down-regulation of the prostate specific antigen promoter by p53 in human prostate cancer cells. *J Urol*. 2004;172(5 Pt 1):2035-9. Epub 2004/11/16.

79. Cinar B, Yeung F, Konaka H, Mayo MW, Freeman MR, Zhou HE, et al. Identification of a negative regulatory cis-element in the enhancer core region of the prostate-specific antigen promoter: implications for intersection of androgen receptor and nuclear factor-kappaB signalling in prostate cancer cells. *Biochem J.* 2004;379(Pt 2):421-31. Epub 2004/01/13.
80. Bigler D, Gulding KM, Dann R, Sheabar FZ, Conaway MR, Theodorescu D. Gene profiling and promoter reporter assays: novel tools for comparing the biological effects of botanical extracts on human prostate cancer cells and understanding their mechanisms of action. *Oncogene.* 2003;22(8):1261-72. Epub 2003/02/28.
81. Wong HY, Demmers JA, Bezstarosti K, Grootegoed JA, Brinkmann AO. DNA dependent recruitment of DDX17 and other interacting proteins by the human androgen receptor. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1794(2):193-8. Epub 2008/12/09.
82. Borgono CA, Michael IP, Diamandis EP. Human tissue kallikreins: physiologic roles and applications in cancer. *Mol Cancer Res.* 2004;2(5):257-80. Epub 2004/06/12.
83. Lawrence MG, Lai J, Clements JA. Kallikreins on steroids: structure, function, and hormonal regulation of prostate-specific antigen and the extended kallikrein locus. *Endocr Rev.* 2010;31(4):407-46. Epub 2010/01/28.
84. Pasic MD, Olkhov E, Bapat B, Yousef GM. Epigenetic regulation of kallikrein-related peptidases: there is a whole new world out there. *Biol Chem.* 2012;393(5):319-30. Epub 2012/04/17.

85. Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Barrios M, Andreu EJ, et al. The normal epithelial cell-specific 1 (NES1) gene, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 19q13.3-4, is downregulated by hypermethylation in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2004;18(2):362-5. Epub 2003/11/25.
86. Li B, Goyal J, Dhar S, Dimri G, Evron E, Sukumar S, et al. CpG methylation as a basis for breast tumor-specific loss of NES1/kallikrein 10 expression. *Cancer Res*. 2001;61(21):8014-21. Epub 2001/11/03.
87. Huang W, Zhong J, Wu LY, Yu LF, Tian XL, Zhang YF, et al. Downregulation and CpG island hypermethylation of NES1/hK10 gene in the pathogenesis of human gastric cancer. *Cancer Lett*. 2007;251(1):78-85. Epub 2006/12/22.
88. Olkhov-Mitsel E, Van der Kwast T, Kron KJ, Ozcelik H, Briollais L, Massey C, et al. Quantitative DNA methylation analysis of genes coding for kallikrein-related peptidases 6 and 10 as biomarkers for prostate cancer. *Epigenetics*. 2012;7(9):1037-45. Epub 2012/08/10.
89. Bharaj B, Scorilas A, Diamandis EP, Gai M, Levesque MA, Sutherland DJ, et al. Breast cancer prognostic significance of a single nucleotide polymorphism in the proximal androgen response element of the prostate specific antigen gene promoter. *Breast Cancer Res Treat*. 2000;61(2):111-9. Epub 2000/08/15.
90. Song Q, Chao J, Chao L. DNA polymorphisms in the 5'-flanking region of the human tissue kallikrein gene. *Hum Genet*. 1997;99(6):727-34. Epub 1997/06/01.

91. Batra J, O'Mara T, Patnala R, Lose F, Clements JA. Genetic polymorphisms in the human tissue kallikrein (KLK) locus and their implication in various malignant and non-malignant diseases. *Biol Chem.* 2012;393(12):1365-90. Epub 2013/05/15.
92. Koumandou VL, Scorilas A. Evolution of the plasma and tissue kallikreins, and their alternative splicing isoforms. *PLoS One.* 2013;8(7):e68074. Epub 2013/07/23.
93. Kurlender L, Borgono C, Michael IP, Obiezu C, Elliott MB, Yousef GM, et al. A survey of alternative transcripts of human tissue kallikrein genes. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1755(1):1-14. Epub 2005/05/10.
94. Pavlopoulou A, Pampalakis G, Michalopoulos I, Sotiropoulou G. Evolutionary history of tissue kallikreins. *PLoS One.* 2010;5(11):e13781. Epub 2010/11/13.
95. Matthews BW, Sigler PB, Henderson R, Blow DM. Three-dimensional structure of tosyl-alpha-chymotrypsin. *Nature.* 1967;214(5089):652-6. Epub 1967/05/13.
96. Lesk AM, Fordham WD. Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. *J Mol Biol.* 1996;258(3):501-37. Epub 1996/05/10.
97. Diamandis EP, Yousef GM, Luo LY, Magklara A, Obiezu CV. The new human kallikrein gene family: implications in carcinogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 2000;11(2):54-60. Epub 2000/02/17.
98. Shaw JL, Diamandis EP. Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. *Clin Chem.* 2007;53(8):1423-32. Epub 2007/06/19.

99. Komatsu N, Tsai B, Sidiropoulos M, Saijoh K, Levesque MA, Takehara K, et al. Quantification of eight tissue kallikreins in the stratum corneum and sweat. *J Invest Dermatol*. 2006;126(4):925-9. Epub 2006/02/04.
100. Lovgren J, Rajakoski K, Karp M, Lundwall a, Lilja H. Activation of the zymogen form of prostate-specific antigen by human glandular kallikrein 2. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;238(2):549-55. Epub 1997/09/23.
101. Yoon H, Blaber SI, Li W, Scarisbrick IA, Blaber M. Activation profiles of human kallikrein-related peptidases by matrix metalloproteinases. *Biol Chem*. 2013;394(1):137-47. Epub 2012/12/18.
102. Rawlings AV, Voegeli R. Stratum corneum proteases and dry skin conditions. *Cell Tissue Res*. 2013;351(2):217-35. Epub 2012/10/12.
103. Hirschhaeuser F, Sattler UG, Mueller-Klieser W. Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer Res*. 2011;71(22):6921-5. Epub 2011/11/16.
104. Jiang R, Shi Z, Johnson JJ, Liu Y, Stack MS. Kallikrein-5 promotes cleavage of desmoglein-1 and loss of cell-cell cohesion in oral squamous cell carcinoma. *J Biol Chem*. 2011;286(11):9127-35. Epub 2010/12/18.
105. Wang SK, Hu Y, Simmer JP, Seymen F, Estrella NM, Pal S, et al. Novel KLK4 and MMP20 mutations discovered by whole-exome sequencing. *J Dent Res*. 2013;92(3):266-71. Epub 2013/01/29.
106. Wang X, Willing MC, Marazita ML, Wendell S, Warren JJ, Broffitt B, et al. Genetic and environmental factors associated with dental caries in children: the Iowa Fluoride Study. *Caries Res*. 2012;46(3):177-84. Epub 2012/04/18.

107. Chan HC, Estrella NM, Milkovich RN, Kim JW, Simmer JP, Hu JC. Target gene analyses of 39 amelogenesis imperfecta kindreds. *Eur J Oral Sci.* 2011;119 Suppl 1:311-23. Epub 2012/01/25.
108. Lee SK, Seymen F, Lee KE, Kang HY, Yildirim M, Tuna EB, et al. Novel WDR72 mutation and cytoplasmic localization. *J Dent Res.* 2010;89(12):1378-82. Epub 2010/10/13.
109. Becerik S, Cogulu D, Emingil G, Han T, Hart PS, Hart TC. Exclusion of candidate genes in seven Turkish families with autosomal recessive amelogenesis imperfecta. *Am J Med Genet A.* 2009;149A(7):1392-8. Epub 2009/06/17.
110. Bailleul-Forestier I, Molla M, Verloes A, Berdal A. The genetic basis of inherited anomalies of the teeth. Part 1: clinical and molecular aspects of non-syndromic dental disorders. *Eur J Med Genet.* 2008;51(4):273-91. Epub 2008/05/24.
111. Papagerakis P, Lin HK, Lee KY, Hu Y, Simmer JP, Bartlett JD, et al. Premature stop codon in MMP20 causing amelogenesis imperfecta. *J Dent Res.* 2008;87(1):56-9. Epub 2007/12/22.
112. Wang XJ, Ji P, Guo HM, Yi XZ. [Exclusion of candidate genes in a family with amelogenesis imperfecta]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2007;25(3):249-52. Epub 2007/07/17.
113. Santos MC, Hart PS, Ramaswami M, Kanno CM, Hart TC, Line SR. Exclusion of known gene for enamel development in two Brazilian families with amelogenesis imperfecta. *Head Face Med.* 2007;3:8. Epub 2007/02/03.

114. Hart TC, Hart PS, Gorry MC, Michalec MD, Ryu OH, Uygur C, et al. Novel ENAM mutation responsible for autosomal recessive amelogenesis imperfecta and localised enamel defects. *J Med Genet.* 2003;40(12):900-6. Epub 2003/12/20.
115. Martinez-Morillo E, Diamandis A, Romaschin AD, Diamandis EP. Kallikrein 6 as a serum prognostic marker in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *PLoS One.* 2012;7(9):e45676. Epub 2012/10/11.
116. Louten J, Mattson JD, Malinao MC, Li Y, Emson C, Vega F, et al. Biomarkers of disease and treatment in murine and cynomolgus models of chronic asthma. *Biomark Insights.* 2012;7:87-104. Epub 2012/07/28.
117. Myers RA, Himes BE, Gignoux CR, Yang JJ, Gauderman WJ, Rebordosa C, et al. Further replication studies of the EVE Consortium meta-analysis identifies 2 asthma risk loci in European Americans. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130(6):1294-301. Epub 2012/10/09.
118. Kontos CK, Chantzis D, Papadopoulos IN, Scorilas A. Kallikrein-related peptidase 4 (KLK4) mRNA predicts short-term relapse in colorectal adenocarcinoma patients. *Cancer Lett.* 2013;330(1):106-12. Epub 2012/12/04.
119. Christodoulou S, Alexopoulou DK, Kontos CK, Scorilas A, Papadopoulos IN. Kallikrein-related peptidase-6 (KLK6) mRNA expression is an independent prognostic tissue biomarker of poor disease-free and overall survival in colorectal adenocarcinoma. *Tumour Biol.* 2014;35(5):4673-85. Epub 2014/01/17.
120. Ohlsson L, Lindmark G, Israelsson A, Palmqvist R, Oberg A, Hammarstrom ML, et al. Lymph node tissue kallikrein-related peptidase 6

mRNA: a progression marker for colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2012;107(1):150-7. Epub 2012/06/16.

121. Petraki C, Dubinski W, Scorilas A, Saleh C, Pasic MD, Komborozos V, et al. Evaluation and prognostic significance of human tissue kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) in colorectal cancer. *Pathol Res Pract*. 2012;208(2):104-8. Epub 2012/01/31.

122. Talieri M, Mathioudaki K, Prezas P, Alexopoulou DK, Diamandis EP, Xynopoulos D, et al. Clinical significance of kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) in colorectal cancer. *Thromb Haemost*. 2009;101(4):741-7. Epub 2009/04/08.

123. Alexopoulou DK, Papadopoulos IN, Scorilas A. Clinical significance of kallikrein-related peptidase (KLK10) mRNA expression in colorectal cancer. *Clin Biochem*. 2013;46(15):1453-61. Epub 2013/03/19.

124. Petraki C, Youssef YM, Dubinski W, Lichner Z, Scorilas A, Pasic MD, et al. Evaluation and prognostic significance of human tissue kallikrein-related peptidase 10 (KLK10) in colorectal cancer. *Tumour Biol*. 2012;33(4):1209-14. Epub 2012/03/23.

125. Talieri M, Alexopoulou DK, Scorilas A, Kypraios D, Arnogiannaki N, Devetzi M, et al. Expression analysis and clinical evaluation of kallikrein-related peptidase 10 (KLK10) in colorectal cancer. *Tumour Biol*. 2011;32(4):737-44. Epub 2011/04/14.

126. Feng B, Xu WB, Zheng MH, Ma JJ, Cai Q, Zhang Y, et al. Clinical significance of human kallikrein 10 gene expression in colorectal cancer and

gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006;21(10):1596-603. Epub 2006/08/25.

127. Feng B, Zheng MH, Ma JJ, Cai Q, Zhang Y, Ji J, et al. [Expression and single nucleotide polymorphisms of kallikrein 10 in colorectal cancer]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* 2006;44(9):623-7. Epub 2006/06/21.

128. Worsham MJ, Chen KM, Meduri V, Nygren AO, Errami A, Schouten JP, et al. Epigenetic events of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006;132(6):668-77. Epub 2006/06/21.

129. Pettus JR, Johnson JJ, Shi Z, Davis JW, Koblinski J, Ghosh S, et al. Multiple kallikrein (KLK 5, 7, 8, and 10) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Histol Histopathol.* 2009;24(2):197-207. Epub 2008/12/17.

130. Liu CJ, Liu TY, Kuo LT, Cheng HW, Chu TH, Chang KW, et al. Differential gene expression signature between primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol.* 2008;214(4):489-97. Epub 2008/01/24.

131. Zhao H, Dong Y, Quan J, Smith R, Lam A, Weinstein S, et al. Correlation of the expression of human kallikrein-related peptidases 4 and 7 with the prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2011;33(4):566-72. Epub 2010/07/29.

132. Termini L, Maciag PC, Soares FA, Nonogaki S, Pereira SM, Alves VA, et al. Analysis of human kallikrein 7 expression as a potential biomarker in cervical neoplasia. *Int J Cancer.* 2010;127(2):485-90. Epub 2009/11/19.

133. Santin AD, Cane S, Bellone S, Bignotti E, Palmieri M, De Las Casas LE, et al. The serine protease stratum corneum chymotryptic enzyme (kallikrein 7) is highly overexpressed in squamous cervical cancer cells. *Gynecol Oncol.* 2004;94(2):283-8. Epub 2004/08/07.
134. Avgeris M, Mavridis K, Scorilas A. Kallikrein-related peptidases in prostate, breast, and ovarian cancers: from pathobiology to clinical relevance. *Biol Chem.* 2012;393(5):301-17. Epub 2012/04/17.
135. Sano A, Sangai T, Maeda H, Nakamura M, Hasebe T, Ochiai A. Kallikrein 11 expressed in human breast cancer cells releases insulin-like growth factor through degradation of IGFBP-3. *Int J Oncol.* 2007;30(6):1493-8. Epub 2007/05/10.
136. Yousef GM, Borgono CA, Scorilas A, Ponzzone R, Biglia N, Iskander L, et al. Quantitative analysis of human kallikrein gene 14 expression in breast tumours indicates association with poor prognosis. *Br J Cancer.* 2002;87(11):1287-93. Epub 2002/11/20.
137. Kioulafa M, Kaklamanis L, Stathopoulos E, Mavroudis D, Georgoulas V, Lianidou ES. Kallikrein 10 (KLK10) methylation as a novel prognostic biomarker in early breast cancer. *Ann Oncol.* 2009;20(6):1020-5. Epub 2009/01/20.
138. Qin W, Zhang K, Kliethermes B, Ruhlen RL, Browne EP, Arcaro KF, et al. Differential expression of cancer associated proteins in breast milk based on age at first full term pregnancy. *BMC Cancer.* 2012;12:100. Epub 2012/03/23.
139. Ewan King L, Li X, Cheikh Saad Bouh K, Pedneault M, Chu CW. Human kallikrein 10 ELISA development and validation in breast cancer sera. *Clin Biochem.* 2007;40(13-14):1057-62. Epub 2007/06/26.

140. Oikonomopoulou K, Scorilas A, Michael IP, Grass L, Soosaipillai A, Rosen B, et al. Kallikreins as markers of disseminated tumour cells in ovarian cancer-- a pilot study. *Tumour Biol.* 2006;27(2):104-14. Epub 2006/03/25.
141. Luo LY, Diamandis EP, Look MP, Soosaipillai AP, Foekens JA. Higher expression of human kallikrein 10 in breast cancer tissue predicts tamoxifen resistance. *Br J Cancer.* 2002;86(11):1790-6. Epub 2002/06/28.
142. Chang A, Yousef GM, Scorilas A, Grass L, Sismondi P, Ponzzone R, et al. Human kallikrein gene 13 (KLK13) expression by quantitative RT-PCR: an independent indicator of favourable prognosis in breast cancer. *Br J Cancer.* 2002;86(9):1457-64. Epub 2002/05/03.
143. Fritzsche F, Gansukh T, Borgono CA, Burkhardt M, Pahl S, Mayordomo E, et al. Expression of human Kallikrein 14 (KLK14) in breast cancer is associated with higher tumour grades and positive nodal status. *Br J Cancer.* 2006;94(4):540-7. Epub 2006/01/26.
144. Yousef GM, Scorilas A, Kyriakopoulou LG, Rendl L, Diamandis M, Ponzzone R, et al. Human kallikrein gene 5 (KLK5) expression by quantitative PCR: an independent indicator of poor prognosis in breast cancer. *Clin Chem.* 2002;48(8):1241-50. Epub 2002/07/27.
145. Talieri M, Devetzi M, Scorilas A, Prezas P, Ardavanis A, Apostolaki A, et al. Evaluation of kallikrein-related peptidase 5 expression and its significance for breast cancer patients: association with kallikrein-related peptidase 7 expression. *Anticancer Res.* 2011;31(9):3093-100. Epub 2011/08/27.
146. Michael IP, Sotiropoulou G, Pampalakis G, Magklara A, Ghosh M, Wasney G, et al. Biochemical and enzymatic characterization of human

kallikrein 5 (hK5), a novel serine protease potentially involved in cancer progression. *J Biol Chem.* 2005;280(15):14628-35. Epub 2005/02/17.

147. Yousef GM, Scorilas A, Magklara A, Memari N, Ponzzone R, Sismondi P, et al. The androgen-regulated gene human kallikrein 15 (KLK15) is an independent and favourable prognostic marker for breast cancer. *Br J Cancer.* 2002;87(11):1294-300. Epub 2002/11/20.

148. Holzscheiter L, Biermann JC, Kotzsch M, Prezas P, Farthmann J, Baretton G, et al. Quantitative reverse transcription-PCR assay for detection of mRNA encoding full-length human tissue kallikrein 7: prognostic relevance of KLK7 mRNA expression in breast cancer. *Clin Chem.* 2006;52(6):1070-9. Epub 2006/04/22.

149. Talieri M, Diamandis EP, Gourgiotis D, Mathioudaki K, Scorilas A. Expression analysis of the human kallikrein 7 (KLK7) in breast tumors: a new potential biomarker for prognosis of breast carcinoma. *Thromb Haemost.* 2004;91(1):180-6. Epub 2003/12/24.

150. Pampalakis G, Sotiropoulou G. Multiple mechanisms underlie the aberrant expression of the human kallikrein 6 gene in breast cancer. *Biol Chem.* 2006;387(6):773-82. Epub 2006/06/28.

151. Pampalakis G, Prosnikli E, Agalioti T, Vlahou A, Zoumpourlis V, Sotiropoulou G. A tumor-protective role for human kallikrein-related peptidase 6 in breast cancer mediated by inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 2009;69(9):3779-87. Epub 2009/04/23.

152. Talieri M, Devetzi M, Scorilas A, Pappa E, Tsapralis N, Missitzis I, et al. Human kallikrein-related peptidase 12 (KLK12) splice variants expression in

breast cancer and their clinical impact. *Tumour Biol.* 2012;33(4):1075-84. Epub 2012/02/22.

153. Loessner D, Quent VM, Kraemer J, Weber EC, Hutmacher DW, Magdolen V, et al. Combined expression of KLK4, KLK5, KLK6, and KLK7 by ovarian cancer cells leads to decreased adhesion and paclitaxel-induced chemoresistance. *Gynecol Oncol.* 2012;127(3):569-78. Epub 2012/09/12.

154. Loessner D, Rizzi SC, Stok KS, Fuehrmann T, Hollier B, Magdolen V, et al. A bioengineered 3D ovarian cancer model for the assessment of peptidase-mediated enhancement of spheroid growth and intraperitoneal spread. *Biomaterials.* 2013;34(30):7389-400. Epub 2013/07/06.

155. Xi Z, Kaern J, Davidson B, Klock TI, Risberg B, Trope C, et al. Kallikrein 4 is associated with paclitaxel resistance in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2004;94(1):80-5. Epub 2004/07/21.

156. Dorn J, Harbeck N, Kates R, Gkazepis A, Scorilas A, Soosaipillai A, et al. Impact of expression differences of kallikrein-related peptidases and of uPA and PAI-1 between primary tumor and omentum metastasis in advanced ovarian cancer. *Ann Oncol.* 2011;22(4):877-83. Epub 2010/10/07.

157. Dorn J, Magdolen V, Gkazepis A, Gerte T, Harlozinska A, Sedlacek P, et al. Circulating biomarker tissue kallikrein-related peptidase KLK5 impacts ovarian cancer patients' survival. *Ann Oncol.* 2011;22(8):1783-90. Epub 2011/01/29.

158. Diamandis EP, Borgono CA, Scorilas A, Yousef GM, Harbeck N, Dorn J, et al. Immunofluorometric quantification of human kallikrein 5 expression in

ovarian cancer cytosols and its association with unfavorable patient prognosis. *Tumour Biol.* 2003;24(6):299-309. Epub 2004/03/09.

159. Kim H, Scorilas A, Katsaros D, Yousef GM, Massobrio M, Fracchioli S, et al. Human kallikrein gene 5 (KLK5) expression is an indicator of poor prognosis in ovarian cancer. *Br J Cancer.* 2001;84(5):643-50. Epub 2001/03/10.

160. Bandiera E, Zanotti L, Fabricio AS, Bucca E, Squarcina E, Romani C, et al. Cancer antigen 125, human epididymis 4, kallikrein 6, osteopontin and soluble mesothelin-related peptide immunocomplexed with immunoglobulin M in epithelial ovarian cancer diagnosis. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(9):1815-24. Epub 2013/09/10.

161. Sarojini S, Tamir A, Lim H, Li S, Zhang S, Goy A, et al. Early detection biomarkers for ovarian cancer. *J Oncol.* 2012;2012:709049. Epub 2013/01/16.

162. Koh SC, Razvi K, Chan YH, Narasimhan K, Ilancheran A, Low JJ, et al. The association with age, human tissue kallikreins 6 and 10 and hemostatic markers for survival outcome from epithelial ovarian cancer. *Arch Gynecol Obstet.* 2011;284(1):183-90. Epub 2010/08/04.

163. Hu CJ, Zhang F, Chen YJ, Sun XM, Zheng JF. [Correlation of hK6 expression with clinicopathological features and prognosis in epithelial ovarian cancer]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2009;31(7):520-3. Epub 2009/12/03.

164. Gunawardana CG, Kuk C, Smith CR, Batruch I, Soosaipillai A, Diamandis EP. Comprehensive analysis of conditioned media from ovarian cancer cell lines identifies novel candidate markers of epithelial ovarian cancer. *J Proteome Res.* 2009;8(10):4705-13. Epub 2009/08/12.

165. Kountourakis P, Psyrris A, Scorilas A, Camp R, Markakis S, Kowalski D, et al. Prognostic value of kallikrein-related peptidase 6 protein expression levels in advanced ovarian cancer evaluated by automated quantitative analysis (AQUA). *Cancer Sci.* 2008;99(11):2224-9. Epub 2008/10/30.
166. Santin AD, Diamandis EP, Bellone S, Soosaipillai A, Cane S, Palmieri M, et al. Human kallikrein 6: a new potential serum biomarker for uterine serous papillary cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11(9):3320-5. Epub 2005/05/04.
167. Hoffman BR, Katsaros D, Scorilas A, Diamandis P, Fracchioli S, Rigault de la Longrais IA, et al. Immunofluorometric quantitation and histochemical localisation of kallikrein 6 protein in ovarian cancer tissue: a new independent unfavourable prognostic biomarker. *Br J Cancer.* 2002;87(7):763-71. Epub 2002/09/17.
168. Psyrris A, Kountourakis P, Scorilas A, Markakis S, Camp R, Kowalski D, et al. Human tissue kallikrein 7, a novel biomarker for advanced ovarian carcinoma using a novel in situ quantitative method of protein expression. *Ann Oncol.* 2008;19(7):1271-7. Epub 2008/03/08.
169. Shan SJ, Scorilas A, Katsaros D, Rigault de la Longrais I, Massobrio M, Diamandis EP. Unfavorable prognostic value of human kallikrein 7 quantified by ELISA in ovarian cancer cytosols. *Clin Chem.* 2006;52(10):1879-86. Epub 2006/08/19.
170. Kyriakopoulou LG, Yousef GM, Scorilas A, Katsaros D, Massobrio M, Fracchioli S, et al. Prognostic value of quantitatively assessed KLK7 expression in ovarian cancer. *Clin Biochem.* 2003;36(2):135-43. Epub 2003/03/14.

171. Kountourakis P, Psyrri A, Scorilas A, Markakis S, Kowalski D, Camp RL, et al. Expression and prognostic significance of kallikrein-related peptidase 8 protein levels in advanced ovarian cancer by using automated quantitative analysis. *Thromb Haemost.* 2009;101(3):541-6. Epub 2009/03/12.
172. Borgono CA, Kishi T, Scorilas A, Harbeck N, Dorn J, Schmalfeldt B, et al. Human kallikrein 8 protein is a favorable prognostic marker in ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12(5):1487-93. Epub 2006/03/15.
173. Shigemasa K, Tian X, Gu L, Tanimoto H, Underwood LJ, O'Brien TJ, et al. Human kallikrein 8 (hK8/TADG-14) expression is associated with an early clinical stage and favorable prognosis in ovarian cancer. *Oncol Rep.* 2004;11(6):1153-9. Epub 2004/05/13.
174. Kishi T, Grass L, Soosaipillai A, Scorilas A, Harbeck N, Schmalfeldt B, et al. Human kallikrein 8, a novel biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 2003;63(11):2771-4. Epub 2003/06/05.
175. Magklara A, Scorilas A, Katsaros D, Massobrio M, Yousef GM, Fracchioli S, et al. The human KLK8 (neuropsin/ovasin) gene: identification of two novel splice variants and its prognostic value in ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2001;7(4):806-11. Epub 2001/04/20.
176. Yousef GM, Kyriakopoulou LG, Scorilas A, Fracchioli S, Ghiringhello B, Zarghooni M, et al. Quantitative expression of the human kallikrein gene 9 (KLK9) in ovarian cancer: a new independent and favorable prognostic marker. *Cancer Res.* 2001;61(21):7811-8. Epub 2001/11/03.
177. Batra J, Tan OL, O'Mara T, Zammit R, Nagle CM, Clements JA, et al. Kallikrein-related peptidase 10 (KLK10) expression and single nucleotide

polymorphisms in ovarian cancer survival. *Int J Gynecol Cancer*. 2010;20(4):529-36. Epub 2010/08/06.

178. Borgono CA, Fracchioli S, Yousef GM, Rigault de la Longrais IA, Luo LY, Soosaipillai A, et al. Favorable prognostic value of tissue human kallikrein 11 (hK11) in patients with ovarian carcinoma. *Int J Cancer*. 2003;106(4):605-10. Epub 2003/07/08.

179. Scorilas A, Borgono CA, Harbeck N, Dorn J, Schmalfeldt B, Schmitt M, et al. Human kallikrein 13 protein in ovarian cancer cytosols: a new favorable prognostic marker. *J Clin Oncol*. 2004;22(4):678-85. Epub 2004/02/18.

180. Yousef GM, Fracchioli S, Scorilas A, Borgono CA, Iskander L, Puopolo M, et al. Steroid hormone regulation and prognostic value of the human kallikrein gene 14 in ovarian cancer. *Am J Clin Pathol*. 2003;119(3):346-55. Epub 2003/03/21.

181. Batra J, Nagle CM, O'Mara T, Higgins M, Dong Y, Tan OL, et al. A Kallikrein 15 (KLK15) single nucleotide polymorphism located close to a novel exon shows evidence of association with poor ovarian cancer survival. *BMC Cancer*. 2011;11:119. Epub 2011/04/05.

182. O'Malley KJ, Eisermann K, Pascal LE, Parwani AV, Majima T, Graham L, et al. Proteomic analysis of patient tissue reveals PSA protein in the stroma of benign prostatic hyperplasia. *Prostate*. 2014;74(8):892-900. Epub 2014/04/09.

183. Thorek DL, Evans MJ, Carlsson SV, Ulmert D, Lilja H. Prostate-specific kallikrein-related peptidases and their relation to prostate cancer biology and detection. Established relevance and emerging roles. *Thromb Haemost*. 2013;110(3):484-92. Epub 2013/08/02.

184. Borque A, del Amo J, Esteban LM, Ars E, Hernandez C, Planas J, et al. Genetic predisposition to early recurrence in clinically localized prostate cancer. *BJU Int.* 2013;111(4):549-58. Epub 2012/07/05.
185. Kohli M, Rothberg PG, Feng C, Messing E, Joseph J, Rao SS, et al. Exploratory study of a KLK2 polymorphism as a prognostic marker in prostate cancer. *Cancer Biomark.* 2010;7(2):101-8. Epub 2010/12/24.
186. Gallagher DJ, Vijai J, Cronin AM, Bhatia J, Vickers AJ, Gaudet MM, et al. Susceptibility loci associated with prostate cancer progression and mortality. *Clin Cancer Res.* 2010;16(10):2819-32. Epub 2010/05/13.
187. Klein RJ, Hallden C, Cronin AM, Ploner A, Wiklund F, Bjartell AS, et al. Blood biomarker levels to aid discovery of cancer-related single-nucleotide polymorphisms: kallikreins and prostate cancer. *Cancer Prev Res (Phila).* 2010;3(5):611-9. Epub 2010/04/29.
188. Bohm M, Locke WJ, Sutherland RL, Kench JG, Henshall SM. A role for GATA-2 in transition to an aggressive phenotype in prostate cancer through modulation of key androgen-regulated genes. *Oncogene.* 2009;28(43):3847-56. Epub 2009/08/18.
189. Helo P, Cronin AM, Danila DC, Wenske S, Gonzalez-Espinoza R, Anand A, et al. Circulating prostate tumor cells detected by reverse transcription-PCR in men with localized or castration-refractory prostate cancer: concordance with CellSearch assay and association with bone metastases and with survival. *Clin Chem.* 2009;55(4):765-73. Epub 2009/02/24.

190. Guy M, Kote-Jarai Z, Giles GG, Al Olama AA, Jugurnauth SK, Mulholland S, et al. Identification of new genetic risk factors for prostate cancer. *Asian J Androl.* 2009;11(1):49-55. Epub 2008/12/04.
191. Nam RK, Zhang WW, Klotz LH, Trachtenberg J, Jewett MA, Sweet J, et al. Variants of the hK2 protein gene (KLK2) are associated with serum hK2 levels and predict the presence of prostate cancer at biopsy. *Clin Cancer Res.* 2006;12(21):6452-8. Epub 2006/11/07.
192. Amaro A, Esposito AI, Gallina A, Nees M, Angelini G, Albin A, et al. Validation of proposed prostate cancer biomarkers with gene expression data: a long road to travel. *Cancer Metastasis Rev.* 2014. Epub 2014/01/31.
193. Shui IM, Lindstrom S, Kibel AS, Berndt SI, Campa D, Gerke T, et al. Prostate cancer (PCa) risk variants and risk of fatal PCa in the National Cancer Institute Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium. *Eur Urol.* 2014;65(6):1069-75. Epub 2014/01/15.
194. Liu Q, Russell MR, Shahriari K, Jernigan DL, Lioni MI, Garcia FU, et al. Interleukin-1beta promotes skeletal colonization and progression of metastatic prostate cancer cells with neuroendocrine features. *Cancer Res.* 2013;73(11):3297-305. Epub 2013/03/29.
195. Soni A, Bansal A, Mishra AK, Batra J, Singh LC, Chakraborty A, et al. Association of androgen receptor, prostate-specific antigen, and CYP19 gene polymorphisms with prostate carcinoma and benign prostatic hyperplasia in a north Indian population. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012;16(8):835-40. Epub 2012/06/27.

196. Bensen JT, Xu Z, Smith GJ, Mohler JL, Fontham ET, Taylor JA. Genetic polymorphism and prostate cancer aggressiveness: a case-only study of 1,536 GWAS and candidate SNPs in African-Americans and European-Americans. *Prostate*. 2013;73(1):11-22. Epub 2012/05/03.
197. Kwon EM, Holt SK, Fu R, Kolb S, Williams G, Stanford JL, et al. Androgen metabolism and JAK/STAT pathway genes and prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol*. 2012;36(4):347-53. Epub 2012/05/01.
198. Nobata S, Hishida A, Naito M, Asai Y, Mori A, Kuwabara M, et al. Association between KLK3 rs2735839 G/A polymorphism and serum PSA levels in Japanese men. *Urol Int*. 2012;89(1):39-44. Epub 2012/03/22.
199. Kote-Jarai Z, Amin AI, Olama A, Leongamornlert D, Tymrakiewicz M, Saunders E, Guy M, et al. Identification of a novel prostate cancer susceptibility variant in the KLK3 gene transcript. *Hum Genet*. 2011;129(6):687-94. Epub 2011/04/06.
200. Penney KL, Schumacher FR, Kraft P, Mucci LA, Sesso HD, Ma J, et al. Association of KLK3 (PSA) genetic variants with prostate cancer risk and PSA levels. *Carcinogenesis*. 2011;32(6):853-9. Epub 2011/03/23.
201. Lindstrom S, Schumacher F, Siddiq A, Travis RC, Campa D, Berndt SI, et al. Characterizing associations and SNP-environment interactions for GWAS-identified prostate cancer risk markers--results from BPC3. *PLoS One*. 2011;6(2):e17142. Epub 2011/03/11.
202. Parikh H, Wang Z, Pettigrew KA, Jia J, Daugherty S, Yeager M, et al. Fine mapping the KLK3 locus on chromosome 19q13.33 associated with

prostate cancer susceptibility and PSA levels. *Hum Genet.* 2011;129(6):675-85. Epub 2011/02/15.

203. Peraldo-Neia C, Migliardi G, Mello-Grand M, Montemurro F, Segir R, Pignochino Y, et al. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) mutation analysis, gene expression profiling and EGFR protein expression in primary prostate cancer. *BMC Cancer.* 2011;11:31. Epub 2011/01/27.

204. Mavridis K, Scorilas A. Prognostic value and biological role of the kallikrein-related peptidases in human malignancies. *Future Oncol.* 2010;6(2):269-85. Epub 2010/02/12.

205. Xu J, Isaacs SD, Sun J, Li G, Wiley KE, Zhu Y, et al. Association of prostate cancer risk variants with clinicopathologic characteristics of the disease. *Clin Cancer Res.* 2008;14(18):5819-24. Epub 2008/09/17.

206. Cunningham JM, Hebring SJ, McDonnell SK, Cicek MS, Christensen GB, Wang L, et al. Evaluation of genetic variations in the androgen and estrogen metabolic pathways as risk factors for sporadic and familial prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(5):969-78. Epub 2007/05/18.

207. Veveris-Lowe TL, Kruger SJ, Walsh T, Gardiner RA, Clements JA. Seminal fluid characterization for male fertility and prostate cancer: kallikrein-related serine proteases and whole proteome approaches. *Semin Thromb Hemost.* 2007;33(1):87-99. Epub 2007/01/27.

208. Lai J, Kedda MA, Hinze K, Smith RL, Yaxley J, Spurdle AB, et al. PSA/KLK3 ARE1 promoter polymorphism alters androgen receptor binding and

is associated with prostate cancer susceptibility. *Carcinogenesis*. 2007;28(5):1032-9. Epub 2006/12/08.

209. Cicek MS, Liu X, Casey G, Witte JS. Role of androgen metabolism genes CYP1B1, PSA/KLK3, and CYP11alpha in prostate cancer risk and aggressiveness. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(9):2173-7. Epub 2005/09/21.

210. Lose F, Srinivasan S, O'Mara T, Marquart L, Chambers S, Gardiner RA, et al. Genetic association of the KLK4 locus with risk of prostate cancer. *PLoS One*. 2012;7(9):e44520. Epub 2012/09/13.

211. Avgeris M, Stravodimos K, Scorilas A. Kallikrein-related peptidase 4 gene (KLK4) in prostate tumors: quantitative expression analysis and evaluation of its clinical significance. *Prostate*. 2011;71(16):1780-9. Epub 2011/04/27.

212. Ramsay AJ, Dong Y, Hunt ML, Linn M, Samaratunga H, Clements JA, et al. Kallikrein-related peptidase 4 (KLK4) initiates intracellular signaling via protease-activated receptors (PARs). KLK4 and PAR-2 are co-expressed during prostate cancer progression. *J Biol Chem*. 2008;283(18):12293-304. Epub 2008/03/01.

213. Day CH, Fanger GR, Retter MW, Hylander BL, Penetrante RB, Houghton RL, et al. Characterization of KLK4 expression and detection of KLK4-specific antibody in prostate cancer patient sera. *Oncogene*. 2002;21(46):7114-20. Epub 2002/10/09.

214. Hural JA, Friedman RS, McNabb A, Steen SS, Henderson RA, Kalos M. Identification of naturally processed CD4 T cell epitopes from the prostate-

specific antigen kallikrein 4 using peptide-based in vitro stimulation. *J Immunol.* 2002;169(1):557-65. Epub 2002/06/22.

215. Lose F, Batra J, O'Mara T, Fahey P, Marquart L, Eeles RA, et al. Common variation in Kallikrein genes KLK5, KLK6, KLK12, and KLK13 and risk of prostate cancer and tumor aggressiveness. *Urol Oncol.* 2013;31(5):635-43. Epub 2011/07/12.

216. Mo L, Zhang J, Shi J, Xuan Q, Yang X, Qin M, et al. Human kallikrein 7 induces epithelial-mesenchymal transition-like changes in prostate carcinoma cells: a role in prostate cancer invasion and progression. *Anticancer Res.* 2010;30(9):3413-20. Epub 2010/10/15.

217. Bi X, He H, Ye Y, Dai Q, Han Z, Liang Y, et al. Association of TMPRSS2 and KLK11 gene expression levels with clinical progression of human prostate cancer. *Med Oncol.* 2010;27(1):145-51. Epub 2009/02/27.

218. Rabien A, Kristiansen G, Diamandis EP, Jung K, Stephan C. [Human kallikreins as tumor markers. Validation of potential marker of prostate cancer in serum and tissue]. *Urologe A.* 2007;46(9):1070-1. Epub 2007/07/03. Humane Kallikreine als Tumormarker. Validierung potenzieller Marker des Prostatakarzinoms in Serum und Gewebe.

219. Mavridis K, Stravodimos K, Scorilas A. Quantified KLK15 gene expression levels discriminate prostate cancer from benign tumors and constitute a novel independent predictor of disease progression. *Prostate.* 2013;73(11):1191-201. Epub 2013/04/27.

220. Lose F, Lawrence MG, Srinivasan S, O'Mara T, Marquart L, Chambers S, et al. The kallikrein 14 gene is down-regulated by androgen receptor

signalling and harbours genetic variation that is associated with prostate tumour aggressiveness. *Biol Chem.* 2012;393(5):403-12. Epub 2012/04/17.

221. Kaushal A, Myers SA, Dong Y, Lai J, Tan OL, Bui LT, et al. A novel transcript from the KLKP1 gene is androgen regulated, down-regulated during prostate cancer progression and encodes the first non-serine protease identified from the human kallikrein gene locus. *Prostate.* 2008;68(4):381-99. Epub 2008/01/16.

222. Planque C, Li L, Zheng Y, Soosaipillai A, Reckamp K, Chia D, et al. A multiparametric serum kallikrein panel for diagnosis of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008;14(5):1355-62. Epub 2008/03/05.

223. Planque C, Choi YH, Guyetant S, Heuze-Vourc'h N, Briollais L, Courty Y. Alternative splicing variant of kallikrein-related peptidase 8 as an independent predictor of unfavorable prognosis in lung cancer. *Clin Chem.* 2010;56(6):987-97. Epub 2010/04/03.

224. Singh J, Naran A, Misso NL, Rigby PJ, Thompson PJ, Bhoola KD. Expression of kallikrein-related peptidases (KRP/hK5, 7, 6, 8) in subtypes of human lung carcinoma. *Int Immunopharmacol.* 2008;8(2):300-6. Epub 2008/01/10.

225. Sher YP, Chou CC, Chou RH, Wu HM, Wayne Chang WS, Chen CH, et al. Human kallikrein 8 protease confers a favorable clinical outcome in non-small cell lung cancer by suppressing tumor cell invasiveness. *Cancer Res.* 2006;66(24):11763-70. Epub 2006/12/21.

226. Zhang Y, Wang R, Song H, Huang G, Yi J, Zheng Y, et al. Methylation of multiple genes as a candidate biomarker in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2011;303(1):21-8. Epub 2011/01/25.
227. Jiao X, Lu HJ, Zhai MM, Tan ZJ, Zhi HN, Liu XM, et al. Overexpression of kallikrein gene 10 is a biomarker for predicting poor prognosis in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2013;19(48):9425-31. Epub 2014/01/11.
228. Devetzi M, Trangas T, Scorilas A, Xynopoulos D, Talieri M. Parallel overexpression and clinical significance of kallikrein-related peptidases 7 and 14 (KLK7KLK14) in colon cancer. *Thromb Haemost.* 2013;109(4):716-25. Epub 2012/12/12.
229. Wen YG, Wang Q, Zhou CZ, Yan DW, Qiu GQ, Yang C, et al. Identification and validation of Kallikrein-related peptidase 11 as a novel prognostic marker of gastric cancer based on immunohistochemistry. *J Surg Oncol.* 2011;104(5):516-24. Epub 2011/05/28.
230. Konstantoudakis G, Florou D, Mavridis K, Papadopoulos IN, Scorilas A. Kallikrein-related peptidase 13 (KLK13) gene expressional status contributes significantly in the prognosis of primary gastric carcinomas. *Clin Biochem.* 2010;43(15):1205-11. Epub 2010/08/04.
231. Iakovlev V, Siegel ER, Tsao MS, Haun RS. Expression of kallikrein-related peptidase 7 predicts poor prognosis in patients with unresectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012;21(7):1135-42. Epub 2012/05/11.

232. El Annan J, Jiang G, Wang D, Zhou J, Foulks GN, Shao H. Elevated immunoglobulin to tissue KLK11 in patients with Sjogren syndrome. *Cornea*. 2013;32(5):e90-3. Epub 2012/10/23.
233. Izumi A, Iijima Y, Noguchi H, Numakawa T, Okada T, Hori H, et al. Genetic variations of human neuropsin gene and psychiatric disorders: polymorphism screening and possible association with bipolar disorder and cognitive functions. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33(13):3237-45. Epub 2008/03/21.
234. Li QD, Li FJ, Liu XC, Jiang H. KLK1 A1789G gene polymorphism and the risk of coronary artery stenosis in the Chinese population. *Genet Mol Res*. 2013;12(2):1636-45. Epub 2013/06/15.
235. Yao YY, Fu C, Ma GS, Feng Y, Shen CX, Wu GQ, et al. Tissue kallikrein is related to the severity of coronary artery disease. *Clin Chim Acta*. 2013;423:90-8. Epub 2013/05/04.
236. Ardiles L, Cardenas A, Burgos ME, Droguett A, Ehrenfeld P, Carpio D, et al. Antihypertensive and renoprotective effect of the kinin pathway activated by potassium in a model of salt sensitivity following overload proteinuria. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013;304(12):F1399-410. Epub 2013/04/05.
237. Chao J, Shen B, Gao L, Xia CF, Bledsoe G, Chao L. Tissue kallikrein in cardiovascular, cerebrovascular and renal diseases and skin wound healing. *Biol Chem*. 2010;391(4):345-55. Epub 2010/02/26.
238. Pizard A, Richer C, Bouby N, Picard N, Meneton P, Azizi M, et al. Genetic deficiency in tissue kallikrein activity in mouse and man: effect on arteries, heart and kidney. *Biol Chem*. 2008;389(6):701-6. Epub 2008/07/17.

239. Zhao W, Wang L, Lu X, Yang W, Huang J, Chen S, et al. A coding polymorphism of the kallikrein 1 gene is associated with essential hypertension: a tagging SNP-based association study in a Chinese Han population. *J Hypertens*. 2007;25(9):1821-7. Epub 2007/09/01.
240. Wang HK, Fung HC, Hsu WC, Wu YR, Lin JC, Ro LS, et al. Apolipoprotein E, angiotensin-converting enzyme and kallikrein gene polymorphisms and the risk of Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Neural Transm*. 2006;113(10):1499-509. Epub 2006/02/09.
241. Dedio J, Wiemer G, Rutten H, Dendorfer A, Scholkens BA, Muller-Esterl W, et al. Tissue kallikrein KLK1 is expressed de novo in endothelial cells and mediates relaxation of human umbilical veins. *Biol Chem*. 2001;382(10):1483-90. Epub 2001/12/01.
242. Clements J, Mukhtar A. Tissue kallikrein and the bradykinin B2 receptor are expressed in endometrial and prostate cancers. *Immunopharmacology*. 1997;36(2-3):217-20. Epub 1997/06/01.
243. Yu H, Song Q, Freedman BI, Chao J, Chao L, Rich SS, et al. Association of the tissue kallikrein gene promoter with ESRD and hypertension. *Kidney Int*. 2002;61(3):1030-9. Epub 2002/02/19.
244. Furio L, de Veer S, Jaillet M, Briot A, Robin A, Deraison C, et al. Transgenic kallikrein 5 mice reproduce major cutaneous and systemic hallmarks of Netherton syndrome. *J Exp Med*. 2014;211(3):499-513. Epub 2014/02/19.
245. Hovnanian A. Netherton syndrome: skin inflammation and allergy by loss of protease inhibition. *Cell Tissue Res*. 2013;351(2):289-300. Epub 2013/01/25.

246. Briot A, Deraison C, Lacroix M, Bonnart C, Robin A, Besson C, et al. Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. *J Exp Med*. 2009;206(5):1135-47. Epub 2009/05/06.
247. Briot A, Lacroix M, Robin A, Steinhoff M, Deraison C, Hovnanian A. Par2 inactivation inhibits early production of TSLP, but not cutaneous inflammation, in Netherton syndrome adult mouse model. *J Invest Dermatol*. 2010;130(12):2736-42. Epub 2010/08/13.
248. Xie H, Li L, Xiong LD, Liao F, Zhang GR. [The changes of skin barrier of patients with different facial dermatitis and the comparison of CE and KLK5]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2013;44(6):940-4, 98. Epub 2014/02/05.
249. Fortugno P, Furio L, Teson M, Berretti M, El Hachem M, Zambruno G, et al. The 420K LEKTI variant alters LEKTI proteolytic activation and results in protease deregulation: implications for atopic dermatitis. *Hum Mol Genet*. 2012;21(19):4187-200. Epub 2012/06/26.
250. de Koning HD, van den Bogaard EH, Bergboer JG, Kamsteeg M, van Vlijmen-Willems IM, Hitomi K, et al. Expression profile of cornified envelope structural proteins and keratinocyte differentiation-regulating proteins during skin barrier repair. *Br J Dermatol*. 2012;166(6):1245-54. Epub 2012/02/15.
251. Cork MJ, Danby SG, Vasilopoulos Y, Hadgraft J, Lane ME, Moustafa M, et al. Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2009;129(8):1892-908. Epub 2009/06/06.
252. Komatsu N, Saijoh K, Kuk C, Shirasaki F, Takehara K, Diamandis EP. Aberrant human tissue kallikrein levels in the stratum corneum and serum of

patients with psoriasis: dependence on phenotype, severity and therapy. *Br J Dermatol.* 2007;156(5):875-83. Epub 2007/04/27.

253. Kanitakis J, Lora V, Chouvet B, Zambruno G, Haftek M, Faure M. Circumscribed palmo-plantar hypokeratosis: a disease of desquamation? Immunohistological study of five cases and literature review. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011;25(3):296-301. Epub 2010/07/16.

254. Shingaki K, Matsuzaki S, Taniguchi M, Kubo T, Fujiwara T, Kanazawa S, et al. Molecular mechanism of kallikrein-related peptidase 8/neurosin-induced hyperkeratosis in inflamed skin. *Br J Dermatol.* 2010;163(3):466-75. Epub 2010/05/27.

255. Shingaki K, Taniguchi M, Kanazawa S, Matsuzaki S, Maeda T, Miyata S, et al. NGF-p75 and neurosin/KLK8 pathways stimulate each other to cause hyperkeratosis and acanthosis in inflamed skin. *J Dermatol Sci.* 2012;67(1):71-3. Epub 2012/04/24.

256. Kishibe M, Bando Y, Terayama R, Namikawa K, Takahashi H, Hashimoto Y, et al. Kallikrein 8 is involved in skin desquamation in cooperation with other kallikreins. *J Biol Chem.* 2007;282(8):5834-41. Epub 2006/12/22.

257. Coda AB, Hata T, Miller J, Audish D, Kotol P, Two A, et al. Cathelicidin, kallikrein 5, and serine protease activity is inhibited during treatment of rosacea with azelaic acid 15% gel. *J Am Acad Dermatol.* 2013;69(4):570-7. Epub 2013/07/23.

258. Yamasaki K, Gallo RL. Rosacea as a disease of cathelicidins and skin innate immunity. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2011;15(1):12-5. Epub 2011/11/15.

259. Shimizu-Okabe C, Yousef GM, Diamandis EP, Yoshida S, Shiosaka S, Fahnestock M. Expression of the kallikrein gene family in normal and Alzheimer's disease brain. *Neuroreport*. 2001;12(12):2747-51. Epub 2001/08/28.
260. Ogawa K, Yamada T, Tsujioka Y, Taguchi J, Takahashi M, Tsuboi Y, et al. Localization of a novel type trypsin-like serine protease, neurosin, in brain tissues of Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2000;54(4):419-26. Epub 2000/09/21.
261. Diamandis EP, Yousef GM, Petraki C, Soosaipillai AR. Human kallikrein 6 as a biomarker of alzheimer's disease. *Clin Biochem*. 2000;33(8):663-7. Epub 2001/02/13.
262. Zarghooni M, Soosaipillai A, Grass L, Scorilas A, Mirazimi N, Diamandis EP. Decreased concentration of human kallikrein 6 in brain extracts of Alzheimer's disease patients. *Clin Biochem*. 2002;35(3):225-31. Epub 2002/06/21.
263. Mitsui S, Okui A, Uemura H, Mizuno T, Yamada T, Yamamura Y, et al. Decreased cerebrospinal fluid levels of neurosin (KLK6), an aging-related protease, as a possible new risk factor for Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;977:216-23. Epub 2002/12/14.
264. Menendez-Gonzalez M, Castro-Santos P, Suarez A, Calatayud MT, Perez-Pinera P, Martinez M, et al. Value of measuring plasmatic levels of neurosin in the diagnosis of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2008;14(1):59-67. Epub 2008/06/06.

265. Ashby EL, Kehoe PG, Love S. Kallikrein-related peptidase 6 in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Brain Res.* 2010;1363:1-10. Epub 2010/09/18.
266. Rovelet-Lecrux A, Legallic S, Wallon D, Flaman JM, Martinaud O, Bombois S, et al. A genome-wide study reveals rare CNVs exclusive to extreme phenotypes of Alzheimer disease. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(6):613-7. Epub 2011/12/15.
267. Shropshire TD, Reifert J, Rajagopalan S, Baker D, Feinstein SC, Daugherty PS. Amyloid beta peptide cleavage by kallikrein 7 attenuates fibril growth and rescues neurons from Abeta-mediated toxicity in vitro. *Biol Chem.* 2014;395(1):109-18. Epub 2013/08/31.
268. Diamandis EP, Scorilas A, Kishi T, Blennow K, Luo LY, Soosaipillai A, et al. Altered kallikrein 7 and 10 concentrations in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Clin Biochem.* 2004;37(3):230-7. Epub 2004/02/20.
269. Radulovic M, Yoon H, Larson N, Wu J, Linbo R, Burda JE, et al. Kallikrein cascades in traumatic spinal cord injury: in vitro evidence for roles in axonopathy and neuron degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2013;72(11):1072-89. Epub 2013/10/17.
270. Biroš E, Norman PE, Walker PJ, Nataatmadja M, West M, Golledge J. A single nucleotide polymorphism in exon 3 of the kallikrein 1 gene is associated with large but not small abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis.* 2011;217(2):452-7. Epub 2011/05/17.

271. Scarisbrick IA, Linbo R, Vandell AG, Keegan M, Blaber SI, Blaber M, et al. Kallikreins are associated with secondary progressive multiple sclerosis and promote neurodegeneration. *Biol Chem*. 2008;389(6):739-45. Epub 2008/07/17.
272. Scarisbrick IA, Radulovic M, Burda JE, Larson N, Blaber SI, Giannini C, et al. Kallikrein 6 is a novel molecular trigger of reactive astrogliosis. *Biol Chem*. 2012;393(5):355-67. Epub 2012/04/17.
273. Terayama R, Bando Y, Takahashi T, Yoshida S. Differential expression of neuropsin and protease M/neurosin in oligodendrocytes after injury to the spinal cord. *Glia*. 2004;48(2):91-101. Epub 2004/09/21.
274. Yousef GM, Kishi T, Diamandis EP. Role of kallikrein enzymes in the central nervous system. *Clin Chim Acta*. 2003;329(1-2):1-8. Epub 2003/02/19.
275. Yoon H, Radulovic M, Wu J, Blaber SI, Blaber M, Fehlings MG, et al. Kallikrein 6 signals through PAR1 and PAR2 to promote neuron injury and exacerbate glutamate neurotoxicity. *J Neurochem*. 2013;127(2):283-98. Epub 2013/05/08.
276. Murakami K, Jiang YP, Tanaka T, Bando Y, Mitrovic B, Yoshida S. In vivo analysis of kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) function in oligodendrocyte development and the expression of myelin proteins. *Neuroscience*. 2013;236:1-11. Epub 2013/02/05.
277. Wennstrom M, Surova Y, Hall S, Nilsson C, Minthon L, Bostrom F, et al. Low CSF levels of both alpha-synuclein and the alpha-synuclein cleaving enzyme neurosin in patients with synucleinopathy. *PLoS One*. 2013;8(1):e53250. Epub 2013/01/12.

278. Sotiropoulou G, Pampalakis G, Prosnikli E, Evangelatos GP, Livaniou E. Development and immunochemical evaluation of a novel chicken IgY antibody specific for KLK6. *Chem Cent J*. 2012;6(1):148. Epub 2012/12/12.
279. Spencer B, Michael S, Shen J, Kosberg K, Rockenstein E, Patrick C, et al. Lentivirus mediated delivery of neurosin promotes clearance of wild-type alpha-synuclein and reduces the pathology in an alpha-synuclein model of LBD. *Mol Ther*. 2013;21(1):31-41. Epub 2012/04/18.
280. Tatebe H, Watanabe Y, Kasai T, Mizuno T, Nakagawa M, Tanaka M, et al. Extracellular neurosin degrades alpha-synuclein in cultured cells. *Neurosci Res*. 2010;67(4):341-6. Epub 2010/04/21.
281. Kasai T, Tokuda T, Yamaguchi N, Watanabe Y, Kametani F, Nakagawa M, et al. Cleavage of normal and pathological forms of alpha-synuclein by neurosin in vitro. *Neurosci Lett*. 2008;436(1):52-6. Epub 2008/03/25.
282. Iwata A, Maruyama M, Akagi T, Hashikawa T, Kanazawa I, Tsuji S, et al. Alpha-synuclein degradation by serine protease neurosin: implication for pathogenesis of synucleinopathies. *Hum Mol Genet*. 2003;12(20):2625-35. Epub 2003/08/21.
283. Magklara A, Mellati AA, Wasney GA, Little SP, Sotiropoulou G, Becker GW, et al. Characterization of the enzymatic activity of human kallikrein 6: Autoactivation, substrate specificity, and regulation by inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;307(4):948-55. Epub 2003/07/25.
284. Hutchinson S, Luo LY, Yousef GM, Soosaipillai A, Diamandis EP. Purification of human kallikrein 6 from biological fluids and identification of its

complex with alpha(1)-antichymotrypsin. *Clin Chem.* 2003;49(5):746-51. Epub 2003/04/24.

285. Bennett MJ, Blaber SI, Scarisbrick IA, Dhanarajan P, Thompson SM, Blaber M. Crystal structure and biochemical characterization of human kallikrein 6 reveals that a trypsin-like kallikrein is expressed in the central nervous system. *J Biol Chem.* 2002;277(27):24562-70. Epub 2002/05/02.

286. Susantitaphong P, Perianayagam MC, Kang SW, Zhang W, Rao F, O'Connor DT, et al. Association of functional kallikrein-1 promoter polymorphisms and acute kidney injury: a case-control and longitudinal cohort study. *Nephron Clin Pract.* 2012;122(3-4):107-13. Epub 2013/05/03.

287. Lee-Chen GJ, Liu KP, Lai YC, Juang HS, Huang SY, Lin CY. Significance of the tissue kallikrein promoter and transforming growth factor-beta1 polymorphisms with renal progression in children with vesicoureteral reflux. *Kidney Int.* 2004;65(4):1467-72. Epub 2004/04/17.

288. Liu K, Li QZ, Delgado-Vega AM, Abelson AK, Sanchez E, Kelly JA, et al. Kallikrein genes are associated with lupus and glomerular basement membrane-specific antibody-induced nephritis in mice and humans. *J Clin Invest.* 2009;119(4):911-23. Epub 2009/03/25.

289. Ponticelli C, Meroni PL. Kallikreins and lupus nephritis. *J Clin Invest.* 2009;119(4):768-71. Epub 2009/04/07.

290. Yiu WH, Wong DW, Chan LY, Leung JC, Chan KW, Lan HY, et al. Tissue kallikrein mediates pro-inflammatory pathways and activation of protease-activated receptor-4 in proximal tubular epithelial cells. *PLoS One.* 2014;9(2):e88894. Epub 2014/03/04.

291. Burda JE, Radulovic M, Yoon H, Scarisbrick IA. Critical role for PAR1 in kallikrein 6-mediated oligodendroglial pathology. *Glia*. 2013;61(9):1456-70. Epub 2013/07/09.
292. Scarisbrick IA, Yoon H, Panos M, Larson N, Blaber SI, Blaber M, et al. Kallikrein 6 regulates early CNS demyelination in a viral model of multiple sclerosis. *Brain Pathol*. 2012;22(5):709-22. Epub 2012/02/18.
293. Hebb AL, Bhan V, Wishart AD, Moore CS, Robertson GS. Human kallikrein 6 cerebrospinal levels are elevated in multiple sclerosis. *Curr Drug Discov Technol*. 2010;7(2):137-40. Epub 2010/09/15.
294. Krenzer S, Peterziel H, Mauch C, Blaber SI, Blaber M, Angel P, et al. Expression and function of the kallikrein-related peptidase 6 in the human melanoma microenvironment. *J Invest Dermatol*. 2011;131(11):2281-8. Epub 2011/07/15.
295. Martins WK, Esteves GH, Almeida OM, Rezze GG, Landman G, Marques SM, et al. Gene network analyses point to the importance of human tissue kallikreins in melanoma progression. *BMC Med Genomics*. 2011;4:76. Epub 2011/10/29.
296. Talieri M, Zoma M, Devetzi M, Scorilas A, Ardavanis A. Kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) gene expression in intracranial tumors. *Tumour Biol*. 2012;33(5):1375-83. Epub 2012/04/06.
297. Prezas P, Scorilas A, Yfanti C, Viktorov P, Agnanti N, Diamandis E, et al. The role of human tissue kallikreins 7 and 8 in intracranial malignancies. *Biol Chem*. 2006;387(12):1607-12. Epub 2006/11/30.

298. Mitsui S, Tsuruoka N, Yamashiro K, Nakazato H, Yamaguchi N. A novel form of human neuropsin, a brain-related serine protease, is generated by alternative splicing and is expressed preferentially in human adult brain. *Eur J Biochem.* 1999;260(3):627-34. Epub 1999/04/02.
299. Lu ZX, Peng J, Su B. A human-specific mutation leads to the origin of a novel splice form of neuropsin (KLK8), a gene involved in learning and memory. *Hum Mutat.* 2007;28(10):978-84. Epub 2007/05/10.
300. Lu ZX, Huang Q, Su B. Functional characterization of the human-specific (type II) form of kallikrein 8, a gene involved in learning and memory. *Cell Res.* 2009;19(2):259-67. Epub 2009/01/07.
301. Tani N, Matsumoto K, Ota I, Yoshida S, Takada Y, Shiosaka S, et al. Effects of fibronectin cleaved by neuropsin on cell adhesion and migration. *Neurosci Res.* 2001;39(2):247-51. Epub 2001/02/27.
302. Rajapakse S, Ogiwara K, Takano N, Moriyama A, Takahashi T. Biochemical characterization of human kallikrein 8 and its possible involvement in the degradation of extracellular matrix proteins. *FEBS Lett.* 2005;579(30):6879-84. Epub 2005/12/13.
303. Kishi T, Grass L, Soosaipillai A, Shimizu-Okabe C, Diamandis EP. Human kallikrein 8: immunoassay development and identification in tissue extracts and biological fluids. *Clin Chem.* 2003;49(1):87-96. Epub 2003/01/01.
304. Momota Y, Yoshida S, Ito J, Shibata M, Kato K, Sakurai K, et al. Blockade of neuropsin, a serine protease, ameliorates kindling epilepsy. *Eur J Neurosci.* 1998;10(2):760-4. Epub 1998/09/28.

305. Okabe A, Momota Y, Yoshida S, Hirata A, Ito J, Nishino H, et al. Kindling induces neuropsin mRNA in the mouse brain. *Brain Res.* 1996;728(1):116-20. Epub 1996/07/22.
306. Tamura H, Ishikawa Y, Hino N, Maeda M, Yoshida S, Kaku S, et al. Neuropsin is essential for early processes of memory acquisition and Schaffer collateral long-term potentiation in adult mouse hippocampus in vivo. *J Physiol.* 2006;570(Pt 3):541-51. Epub 2005/11/26.
307. Akita H, Matsuyama T, Iso H, Sugita M, Yoshida S. Effects of oxidative stress on the expression of limbic-specific protease neuropsin and avoidance learning in mice. *Brain Res.* 1997;769(1):86-96. Epub 1997/11/28.
308. He XP, Shiosaka S, Yoshida S. Expression of neuropsin in oligodendrocytes after injury to the CNS. *Neurosci Res.* 2001;39(4):455-62. Epub 2001/03/29.
309. Kuwae K, Matsumoto-Miyai K, Yoshida S, Sadayama T, Yoshikawa K, Hosokawa K, et al. Epidermal expression of serine protease, neuropsin (KLK8) in normal and pathological skin samples. *Mol Pathol.* 2002;55(4):235-41. Epub 2002/07/31.
310. Komatsu N, Saijoh K, Sidiropoulos M, Tsai B, Levesque MA, Elliott MB, et al. Quantification of human tissue kallikreins in the stratum corneum: dependence on age and gender. *J Invest Dermatol.* 2005;125(6):1182-9. Epub 2005/12/16.
311. Bateman JF, Rowley L, Belluoccio D, Chan B, Bell K, Fosang AJ, et al. Transcriptomics of wild-type mice and mice lacking ADAMTS-5 activity identifies

genes involved in osteoarthritis initiation and cartilage destruction. *Arthritis Rheum.* 2013;65(6):1547-60. Epub 2013/02/26.

312. Yousef GM, Yacoub GM, Polymeris ME, Popalis C, Soosaipillai A, Diamandis EP. Kallikrein gene downregulation in breast cancer. *Br J Cancer.* 2004;90(1):167-72. Epub 2004/01/08.

313. Darling MR, Tsai S, Jackson-Boeters L, Daley TD, Diamandis EP. Human kallikrein 8 expression in salivary gland tumors. *Head Neck Pathol.* 2008;2(3):169-74. Epub 2008/09/01.

314. Cane S, Bignotti E, Bellone S, Palmieri M, De las Casas L, Roman JJ, et al. The novel serine protease tumor-associated differentially expressed gene-14 (KLK8/Neuropsin/Ovasin) is highly overexpressed in cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190(1):60-6. Epub 2004/01/30.

315. Jin H, Nagai N, Shigemasa K, Gu L, Tanimoto H, Yunokawa M, et al. Expression of tumor-associated differentially expressed Gene-14 (TADG-14/KLK8) and its protein hK8 in uterine endometria and endometrial carcinomas. *Tumour Biol.* 2006;27(5):274-82. Epub 2006/08/05.

316. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 2007;24(8):1596-9. Epub 2007/05/10.

317. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987;4(4):406-25. Epub 1987/07/01.

318. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 1985;39(4):183-91.

319. Hasegawa M, Kishino H, Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol.* 1985;22(2):160-74. Epub 1985/01/01.
320. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011;28(10):2731-9. Epub 2011/05/07.
321. Sambrook J RD. *Molecular Cloning a laboratory manual.* ed., editor. New York: Press CSHL; 2001.
322. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc.* 2007;2(11):2692-703. Epub 2007/11/17.
323. Villen J, Beausoleil SA, Gygi SP. Evaluation of the utility of neutral-loss-dependent MS3 strategies in large-scale phosphorylation analysis. *Proteomics.* 2008;8(21):4444-52. Epub 2008/10/31.
324. Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol.* 1993;234(3):779-815. Epub 1993/12/05.
325. Ferlay J, D. M. Parkin, et al. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer.* 2008;46(4):765-81.
326. Hashibe M, P. Brennan, et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(2):541-50.

327. Altekruse SF, McGlynn KA, Reichman ME. Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005. *J Clin Oncol*. 2009;27(9):1485-91. Epub 2009/02/20.
328. Elliott MB, Irwin DM, Diamandis EP. In silico identification and Bayesian phylogenetic analysis of multiple new mammalian kallikrein gene families. *Genomics*. 2006;88(5):591-9. Epub 2006/07/11.
329. Lundwall A. Old genes and new genes: the evolution of the kallikrein locus. *Thromb Haemost*. 2013;110(3):469-75. Epub 2013/04/11.
330. Muraoka-Cook RS, Sandahl MA, Strunk KE, Miraglia LC, Husted C, Hunter DM, et al. ErbB4 splice variants Cyt1 and Cyt2 differ by 16 amino acids and exert opposing effects on the mammary epithelium in vivo. *Mol Cell Biol*. 2009;29(18):4935-48. Epub 2009/07/15.
331. Chlenski A, Guerrero LJ, Yang Q, Tian Y, Peddinti R, Salwen HR, et al. SPARC enhances tumor stroma formation and prevents fibroblast activation. *Oncogene*. 2007;26(31):4513-22. Epub 2007/01/30.
332. Liu D, Hornsby PJ. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res*. 2007;67(7):3117-26. Epub 2007/04/06.
333. Franco OE, Shaw AK, Strand DW, Hayward SW. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2010;21(1):33-9. Epub 2009/11/10.
334. Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E, et al. The hypoxia-inducible factor-1 alpha is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene*. 2003;22(21):3213-20. Epub 2003/05/23.

335. Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. Hypoxia and cancer. *J Mol Med (Berl)*. 2007;85(12):1301-7. Epub 2007/11/21.
336. De Saedeleer CJ, Copetti T, Porporato PE, Verrax J, Feron O, Sonveaux P. Lactate activates HIF-1 in oxidative but not in Warburg-phenotype human tumor cells. *PLoS One*. 2012;7(10):e46571. Epub 2012/10/20.
337. Dhup S, Dadhich RK, Porporato PE, Sonveaux P. Multiple biological activities of lactic acid in cancer: influences on tumor growth, angiogenesis and metastasis. *Curr Pharm Des*. 2012;18(10):1319-30. Epub 2012/03/01.
338. Vegran F, Boidot R, Michiels C, Sonveaux P, Feron O. Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1 supports an NF-kappaB/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis. *Cancer Res*. 2011;71(7):2550-60. Epub 2011/02/09.
339. Sonveaux P, Vegran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, Rabbani ZN, et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest*. 2008;118(12):3930-42. Epub 2008/11/27.
340. Chen M, Zhang J, Manley JL. Turning on a fuel switch of cancer: hnRNP proteins regulate alternative splicing of pyruvate kinase mRNA. *Cancer Res*. 2010;70(22):8977-80. Epub 2010/10/28.
341. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*. 2008;452(7184):230-3. Epub 2008/03/14.
342. Shi Y, Pinto BM. Human lactate dehydrogenase a inhibitors: a molecular dynamics investigation. *PLoS One*. 2014;9(1):e86365. Epub 2014/01/28.

343. Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM, et al. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(5):2037-42. Epub 2010/02/06.
344. Arseneault R, Chien A, Newington JT, Rappon T, Harris R, Cumming RC. Attenuation of LDHA expression in cancer cells leads to redox-dependent alterations in cytoskeletal structure and cell migration. *Cancer Lett*. 2013;338(2):255-66. Epub 2013/04/16.
345. Lopez-Serra P, Marcilla M, Villanueva A, Ramos-Fernandez A, Palau A, Leal L, et al. A DERL3-associated defect in the degradation of SLC2A1 mediates the Warburg effect. *Nat Commun*. 2014;5:3608. Epub 2014/04/05.
346. Adekola K, Rosen ST, Shanmugam M. Glucose transporters in cancer metabolism. *Curr Opin Oncol*. 2012;24(6):650-4. Epub 2012/08/24.
347. Grimm M, Munz A, Teriete P, Nadtotschi T, Reinert S. GLUT-1(+)/TKTL1(+) coexpression predicts poor outcome in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014;117(6):743-53. Epub 2014/04/08.
348. Li R, Morris SW. Development of anaplastic lymphoma kinase (ALK) small-molecule inhibitors for cancer therapy. *Med Res Rev*. 2008;28(3):372-412. Epub 2007/08/19.
349. Hillisch A, Pineda LF, Hilgenfeld R. Utility of homology models in the drug discovery process. *Drug Discov Today*. 2004;9(15):659-69. Epub 2004/07/29.

350. Webb B, Sali A. Protein structure modeling with MODELLER. *Methods Mol Biol.* 2014;1137:1-15. Epub 2014/02/28.