



Farklı Hücre Hatlarında KLK4 Gen İfadesinin Belirlenmesi

Expression of KLK4 Gene Expression Different Cell Lines

Fatma Poyrazlı¹ , Sümeyye Aydoğan Türkoğlu^{2*} , Derya Okuyan³ , Feray Köçkar² 

¹Balıkesir Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Balıkesir, Türkiye

²Balıkesir Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Balıkesir, Türkiye

³Bandırma Onyedli Eylül Üniversitesi, Susurluk Meslek Yüksekokulu, Laborant ve Veteriner Sağlık Pr., Bandırma, Türkiye

Öz

Kallikrein related peptidaz (KLK) gen ailesi, insan genomundaki en büyük proteaz geni kümesi tarafından kodlanmaktadır ve yüksek oranda korunmuş 15 serin proteazdan oluşur. Bu ailenin doku kallikrein ve kallikrein ile ilişkili peptidazların en çok bilinen ve biyobelirteç olarak kullanılan üyesi prostata spesifik antijen (PSA- KLK3)'dir. Biyobelirteç olarak kullanılan diğer üyeleri ise, insan glandüler kallikrein 2 (KLK2) ve KLK4 (KLK-L1, PRSS17, AI2A1, ARM1, EMSP, EMSP1, PSTS Tmprss2 ve prostaz) dır. PSA ve diğer KLK'lar arasındaki yapısal benzerlik göz önüne alındığında, ailenin kalan üyelerinin kanser biyobelirteçleri olarak potansiyel rolü son yıllarda çokça araştırılmaktadır. Çalışmamızda PC-3/LNCaP (insan prostat kansinomu), HEP3B (insan hepatoselüler kansinomu), HT-29/SW480 (insan kolon kansinomu), ve HUVEC (insan umbilikal ven endotel hücre) hücre hatlarında KLK4'ün ifadesi mRNA ve protein düzeyinde çalışılmıştır. Çalışılan tüm hücre hatlarında ifadesinin olduğu, yine literatürle tutarlı olarak androjen bağımlı prostat kanserlerinde ise ifadesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca farklı evrelerde olan kolon kanseri hücre hatlarında, kanser ilerleyişi ile ilişkili olarak KLK4 ifadesinin HT-29 hücrelerinde SW480 hücrelerine kıyasla yüksek bulunmuştur. Çalışmamız sonuçlarının KLK4 regülasyonunu hedefleyen kanser çalışmaları için hücre seçiminde yönlendirici olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hepatoselüler kansinomu, İnsan umbilikal ven endotel hücre, KLK4, Kolon kanseri, Prostat kanseri

Abstract


The highly conserved Kallikrein-related peptidase (KLK) gene family, encoded by the largest set of protease genes in the human genome, consists of 15 serine proteases. Prostate-specific antigen (PSA-KLK3) is the most well-known and biomarker member of tissue kallikrein and kallikrein-related peptidases. Others are human glandular kallikrein 2 (KLK2) and KLK4 (KLK-L1, PRSS17, AI2A1, ARM1, EMSP, EMSP1, PSTS Tmprss2 and prostatic). Given the structural similarity between PSA and other KLKs, the potential role of remaining family members as cancer biomarkers has been extensively investigated in recent years. In our study, the expression of KLK4 in PC-3/LNCaP (human prostate carcinoma), HEP3B (human hepatocellular carcinoma), HT-29/SW480 (human colon carcinoma), and HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) cell lines was studied at the mRNA and protein level. KLK4 mRNA and protein expression were found in all studied cell lines and its expression is high in androgen-dependent prostate cancers (LNCaP), which is also consistent with the literature. In addition, a high level of KLK4 expression was found in HT-29 cells than SW480 cells which are different stages of colon carcinoma cell lines, and this high-level expression is correlated with cancer progression. It is thought that the results of our study will be guided in the selection of cells for cancer studies targeting the regulation of KLK4.


Keywords: Human umbilical vein endothelial cell, Hepatocellular carcinoma, KLK4, Colon cancer, Prostate cancer

*Sorumlu yazarın e-posta adresi: saydogan@balikesir.edu.tr

Fatma Poyrazlı  orcid.org/0000-0001-8069-6447

Sümeyye Aydoğan Türkoğlu  orcid.org/0000-0003-1754-0700

Derya Okuyan  orcid.org/0000-0001-6758-8556

Feray Köçkar  orcid.org/0000-0003-2572-8391



Bu eser "Creative Commons Atıf-GayriTicari-4.0 Uluslararası Lisansı" ile lisanslanmıştır.

1. Giriş

Kallikreinler, ilk olarak kininojenaz aktiviteleri ve kininojenlerden vazoaktif peptit (lys) bradikinin üretme yetenekleri ile tanımlanan serin proteazların bir alt grubudur. Kallikrein ilk olarak pankreas özütlerinde tanımlanmıştır (Kraut vd. 1930, Werle E. 1934). Yapılan çalışmalarla karaciğerden türetilen bir plazma kallikreini ve birkaç dokunun lokal doku ortamında aktif olan glandüler veya doku kallikreini belirlenmiştir (Clements vd. 2004).

İnsan genomundaki en büyük proteaz geni kümesi tarafından kodlanan, yüksek oranda korunmuş KLK gen ailesi 15 serin proteazdan oluşmaktadır (Clements vd. 2001, Tefekli 2012, Emami ve Diamandis 2008, Korkmaz vd. 2004, Xi vd. 2004). Tüm bu genler, 19q13.4 kromozomu üzerindeki insan KLK lokusunda kümelenmiştir (Kontos ve Scorilas 2012, Diamandis vd. 2000, Lundwalla ve Brattsandb 2008). Çeşitli türlerde bugüne kadar tanımlanan tüm doku kallikrein genlerinin ortak özellikleri, beş ekzonun benzer bir genomik organizasyonu, serin proteaz katalitik aktivitesi için korunmuş bir amino asit rezidüsü ve birinci ekzonda kodlanmış bir sinyal peptid dizisini içermeleridir (Korkmaz 2004).

Normal ve neoplastik prostat dokuları üzerinde yapılan çalışmalarda, prostata spesifik antijen KLK3 (PSA olarak da bilinir), glandüler kallikrein 2 (KLK2), TMPRSS2 ve prostaz/ KLK4 (diğer isimleri: PRSS17/EMSP1) yüksek oranda ifade oldukları ve androjenik hormonlar tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (Matsumura vd. 2005).

Kallikrein ile ilgili peptidaz 4 (KLK4), androjenler tarafından düzenlenen ve ekspresyonu prostat için oldukça spesifik olan ve prostat kanseri kemik metastazlarında bol miktarda bulunan serin proteazdır (Xi vd. 2004, Fuhrman-Luck vd. 2016). KLK4; KLK-L1, PRSS17, AI2A1, ARM1, EMSP, EMSP1, PSTS olarak da bilinir (Obiezu vd. 2001). 254 amino asitten oluşan 4.38 kb genomik DNA'yı kapsar. 5 ekzon ve 4 introndan oluşur. Bir salgılama sinyaline (pre-) peptit (26 amino asit), ardından bir aktivasyon (pro-) peptit (4 amino asit) ve 1 potansiyel N-bağlı glikosilasyon yerine sahip olgun zincir (224 amino asit) bulunur. His71, Asp116, Ser207 (Met = 1'e göre ve ekson 1' de ATG1 tarafından kodlanan) katalitik üçlüsü korunur ve proteolitik aktivite için gereklidir. Bir KLK4 tam uzunlukta protein olarak sentezlendikten sonra, sinyal peptidi yarılr ve pro-KLK4 (zimogen) daha sonra hücreden salgılanır. Aktivasyon üzerine, olgun aktif enzimi üretmek için propeptit uzaklaştırılır. KLK4 geni orijinal olarak PRSS17 geni olarak

adlandırılmıştır ve EMPS1 (Enamel matrix serine protease 1) proteinini kodlayan dejenere primerler kullanılarak domuzda gelişmekte olan diş emaye epitel hücrelerinden klonlanmıştır (Lai vd. 2009).

RT-PCR deneyleri ile yapılan çalışmalar sonucunda meme, yumurtalık, endometriyum, tükrük bezi, akciğer, adrenal bez, kolon, trakea da KLK4' ün ifade olduğu gösterilmiştir. Northern blot analizi ile insan dokularındaki daha sonraki çalışmalar, KLK4 mRNA ekspresyonunun prostata ağırlıklı olarak lokalize olduğunu göstermiştir; beyin, testis, omurilik, tiroid, deri ve böbrek de düşük ile orta seviyelerde KLK4 mRNA'yı ifade ettiği gösterilmiştir. KLK4 mRNA, in situ hibridizasyon deneyleriyle yağ bezlerinde, ter bezlerinde, kıl folikülleri, stratum bazale, stratum spinosum ve stratum granulosumda da tespit edilmiştir. (Dong vd. 2001, Majumdar ve Diamandis 1999, Lai 2009, Wang, 2018). Yapılan bir çalışmada, KLK4 ekspresyonunun, prostat kanseri kaynaklı LNCaP hücre hattında androjenler tarafından yukarı regüle edildiği ve meme karsinoması hücre hattı BT-474' te hem androjenler hem de progesterinler tarafından yukarı regüle edildiği gösterilmiştir (Obiezu vd. 2001). KLK4, prostat kanseri hücrelerinin çoğalmasının desteklenmesinde ve genel olarak, siklin B1 ve E2F1 gibi hücre döngüsü ile ilgili genlerin düzenlenmesi yoluyla malign fenotip değişikliklerinde eşsiz bir role sahip olduğu gösterilmiştir. (Avgaris vd. 2012).

PSA ve diğer KLK'lar arasındaki yapısal benzerlik göz önüne alındığında, ailenin kalan üyelerinin kanser biyobelirteçleri olarak potansiyel rolü son yıllarda çokça araştırılmıştır. Yakın tarihli araştırmalar, KLK2 ve KLK4 dahil diğer KLK'ların testislerde üretildiğini ve dolayısıyla testis kanseri için biyolojik belirteç olarak potansiyel olabileceğini önermektedir. Biyolojik belirteç olarak kullanımlarının dışında, kanser patogeneğinde bir dizi kritik işlevsel rolünün tespiti KLK'ların terapötik hedefler olarak potansiyel kullanımlarını ortaya çıkarmıştır (Emami ve Diamandis 2008, Kontos ve Scorilas 2012, Kryza vd. 2017). KLK4'ün regülasyonunu hedefleyen kanser çalışmaları için hücre seçimi oldukça önemlidir. Literatür incelendiğinde LNCap, PC-3, DU145 prostat kanseri hücrelerinde (Klokk vd. 2007), HT-29 kolon kanseri hücrelerinde (Gratio vd. 2010), meme karsinoması hücre hattı BT-474, (Obiezu vd. 2001), ameloblast benzeri hücreler (LS8) (Liv d. 2022), dışında bir çalışma bulunmamaktadır. Bu kapsamda çalışmamızda, bu zamana kadar genellikle dokular üzerindeki ifadesine bakılan KLK4'ün, farklı prostat karsinom hücre hatlarında (PC-3/ LNCaP), hepatoselüler kanser hücre hattında (HEP3B),

farklı kolon karsinom hücre hatlarında (HT-29/SW480) ve normal hücre hattı olan HUVEC (insan umbilikal ven endotel hücresi) hücre hattındaki ifadesi belirlenmiştir.

2. Gereç ve Yöntem

2.1. Hücre Kültürü

Çalışmamızda PC-3/LNCaP (insan prostat karsinomu), HEP3B (insan hepatoselüler karsinomu), HT-29/SW480 (insan kolon karsinomu), ve HUVEC (insan umbilikal ven endotel hücresi) hücre hatları kullanılmıştır. PC-3 ve LNCaP hücreleri Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümünden Prof. Dr. Kemal Sami Korkmaz' dan; HEP3B hücreleri Cardiff Üniversitesinden Dr. Dipak P. Ramji' den, HT-29 hücreleri Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden Doç. Dr. Tuğba Boyueğmez' den; SW480 hücreleri Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyolojik Bilimler Bölümünden Prof. Dr. Sreperna Banerjee' nden; HUVEC hücreleri Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Bilimler Bölümünden Prof. Dr. Berrin Tunca' dan temin edilmiştir. Hücre kültürleri, PC-3 hücre hattı DMEMF12 Mix (EuroClone), LNCaP hücre hattı RPMI 1640 (EuroClone), HEP3B/HT-29/SW480 ve HUVEC hücre hattı DMEM high glukoz (EuroClone) medyumunda 2mM L-Glutamin ve %10 FCS içeren 1X antibiyotik-antimikotik (EuroClone) besiyerinde, %5 CO₂ içeren nemli atmosferde 37 °C de gerçekleştirildi.

2.2. Canlı Hücrelerin Belirlenmesi ve Hücre Sayımı

Süspansiyon hale getirilen hücrelerden hücre sayımı yapmak için ve hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla, hücreler tripan mavisini ile boyandı. Boyanan hücrelerin mililitresindeki sayısını bulabilmek için üzerinde 25 küçük kare bulunan, 1 mm² alan içeren ve 0.1 mm derinliğe sahip olan hemositometre lamı kullanıldı. Flasklardan Tripsin-EDTA kullanılarak kaldırılan hücreler, çöktürme işlemi için 1000 rpm'de santrifüj yapıldı. Santrifüjden alınan hücrelerin süpernatant kısmı dökülerek, hücre pelleti FCS içeren medyumda çözüldü. Aynı bir ependorfa süspansiyon hale getirilen hücrelerden ve tripan mavisinden eşit hacimde konularak, bu karışım 3 dakika inkübe edildi. Ardından ölü ve canlı hücreleri ayırt etmek için bu karışım 10µl hemositometre lamına aktarılarak sayım yapıldı. Ölü hücreler tripan mavisini ile mavi renge boyanırken canlı hücreler mavi renge boyanmadı. Mavi renge boyanmayan canlı hücreler sayıldı ve böylelikle hücre süspansiyonunun mililitresindeki canlı hücre sayısı hesaplandı (Türkoğlu vd. 2019). Çalışmamızda kullanılan PC-3/LNCaP (insan prostat

karsinomu), HEP3B (insan hepatoselüler karsinomu), HT-29/SW480 (insan kolon karsinomu), ve HUVEC (insan umbilikal ven endotel hücresi) hücre hatları 25 cm² flasklara, hem RNA hem de protein deneyi için 2x10⁶ olarak ayrı ayrı ekildi. 24 saat sonunda hücreler tripsinizasyon yöntemi ile flasklardan kazınarak RNA pelletleri -80 °C ye kaldırıldı. Yine 24 saat sonunda RIPA Buffer ile flasklardan hücreler bir kazıyıcı spatül ile kazınarak protein izolasyonu yapıldı ve -80 °C ye kaldırıldı.

2.3. Hücre Pelletlerinden RNA İzolasyonu ve cDNA Eldesi

PC-3/LNCaP (insan prostat karsinomu), HEP3B (insan hepatoselüler karsinomu), HT-29/SW480 (insan kolon karsinomu), ve HUVEC (insan umbilikal ven endotel hücresi) hücre hatlarında KLK4 geninin mRNA ifadesini belirlemek amacıyla RNA izolasyonu için -80 °C' den çıkarılan pelletlerden RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Thermo Scientific-GeneJET RNA purification kiti ile RNA izolasyonu yapıldı. RNA' ların saflık ve miktar tayini için spektrofotometre 260 nm ve 280 nm' de absorbansları ölçüldü. Elde edilen RNA' lardan 1µg RNA olacak şekilde alınması gereken miktar hesaplandı. RevertAid RT Reverse Transcription Kiti (Thermo Scientific) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle her bir tüpe 1µg RNA, konuldu ve üzerlerine Oligo dT' den 1µl eklenerek dH₂O ile 12.5µl hacime tamamlandı. PZR cihazına konulan örnekler 65 °C' de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir tüpe, 4µl Buffer RT, 2µl dNTP, 1µl Revers Transkriptaz enzimi ve 0.5µl Ribolock İnhibitöründen oluşan karışımdan 7.5µl paylaştırıldı. Son hacimi 20 µl olan tüpler PZR cihazında 42 °C de 1 saat ve 72 °C 10 dakikalık inkübasyona bırakıldı. İnternal kontrol olarak kullanılan insan β2 primerleri ile Polimeraz zincir reaksiyonu yapılarak cDNA' lar kontrol edildi. Ardından agaroz jel elektroforezi yapılarak cDNA' lar görüntülendi.

2.4. Gerçek Zamanlı PZR (Real Time PCR)

KLK4 mRNA ifadesinin belirlenebilmesi amacıyla elde edilen cDNA' lardan 1µl hacimde (1µg), ileri (forward) ve geri (reverse) primerlerinden 0.5' er µl (100 ng/µl), 6.25µl RealQ Plus 2x Master Mix Green (Ampliqon) ve 4.25µl dH₂O kullanılarak 12.5µl son hacime tamamlanarak PZR gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) için Light Cycler 485 (Roche Diagnostic) cihazı kullanıldı. Bütün cDNA' lar 3 tekrarlı olarak çalışıldı ve elde edilen Ct değerlerinin ortalamaları alındı. KLK4 ekspresyon primerleri için NM_004917.5/NP_004908.4

Çizelge 1. Ekspresyon çalışmasında kullanılan primerler.

KLK4				
Forward	Reverse	Accession Number	Ürün Büyüklüğü	Bağlanma Sıcaklığı
5'-CACTGGTCATGGAAAACGA-ATT-3'	5'-ATGAGGTCGTTAGCGAG-CAAG-3'	NM_004917 XM_001134318	214bp	55°C
Hβ2 (İnsan β2 Mikroglobulinin)				
Forward	Reverse	Accession Number	Ürün Büyüklüğü	Bağlanma Sıcaklığı
5'TTTCTGGCCTGGAGGCTATC'3	5'CATGTCTCCATCCCACT-TAACT'3	NM_004048	314 bp	55°C

kodlu dizi üzerinden 2. ve 3. ekzon arasından biyoinformatik olarak primerler dizayn edildi. KLK4 ekspresyon primerleri ve kontrol genimiz olan Human-β-2 mikroglobülin (Hβ2) genine ait primerler (Çizelge 1) için bağlanma sıcaklığı 55 °C olarak belirlendi.

2.5. Gerçek Zamanlı PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler

Gerçek zamanlı PZR sonuçlarından elde edilen sonuçlar Livak metoduna göre değerlendirildi (Livak ve Schmittgen 2001). KLK4 mRNA seviyesini belirlemek için yapılan gerçek zamanlı PZR sonucunda elde edilen KLK4 Ct değerleri, internal kontrol gen olarak kullanılan insan beta 2 Mikroglobulinin (Hβ2) Ct ortalamasından çıkartılarak normalize edildi. Çalışma sonuçları melting curve analizi ile doğrulandı. Sonuçlar Oneway Anova ile değerlendirildi. Veriler istatistiksel olarak p≤0,05 olduğunda anlamlı olarak kabul edildi.

2.6. Western Blot

25 cm² flaklara, 2x10⁶ olarak ekilen hücrelerden 24 saat sonunda KLK4 geninin protein ifadesini belirlemek amacıyla, RIPA Buffer ile protein izolasyonu gerçekleştirildi. Her bir hücre hattına ait proteinden 35µg kullanılarak %10' luk poliakrilamid jele yüklendi ve PVDF membrana (Millipore) transfer ile aktarıldı. Membranda spesifik olmayan bağlanmayı önlemek için %0,1 (v/v) Tween20 ve %5 (w/v) yağsız süt tozu içeren 1X Tris salin tamponu (TBS) içerisinde 1 saat bloke edildi. Ardından Tween20 içeren 1X TBS tamponu ile 3 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra primer antikor olan KLK4 (İnvitrogen, PA5-72768) antikoruna ile bir gece +4 °C de muamele edildi. Ertesi gün 1X TBS tamponu ile 3 kez yıkama yapıldı ve sekonder antikor (HRP-konjuge anti-rabbit) ile 1.5 saat muamele edildi. Tekrar 3 kez yıkaması

yapılan membran Pierce ECL (Western Blotting Substrate-Thermo) substratıyla muamele edilerek, Fusion FX VIL-BER LOURMAT cihazında görüntüledi. KLK4 protein miktarı, β-Aktin proteini miktarı ile normalleştirildi.

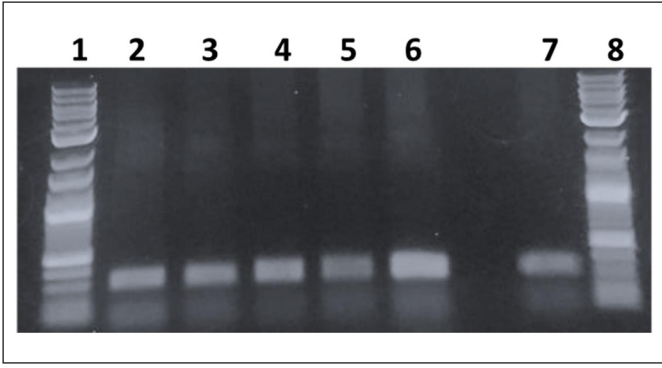
3. Sonuçlar

3.1. KLK4' ün SW480, HT-29, HEP3B, HUVEC, PC-3 ve LNCaP Hücre Hatlarındaki mRNA İfadesi

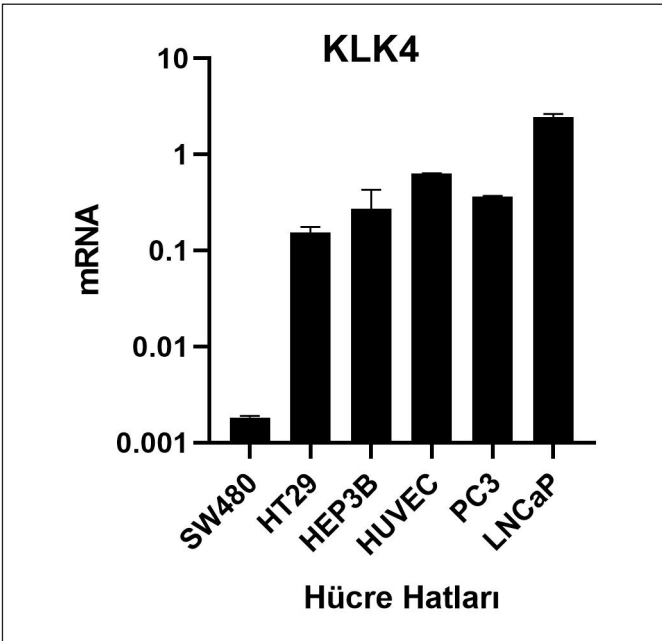
2x10⁶ olacak şekilde ekim yapılan hücrelerden 24 saat sonunda flaklardan kaldırılarak RNA izolasyonları gerçekleştirildi. Bu RNA' lardan 1µg kullanılarak Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ile cDNA sentezi yapıldı. İnternal kontrol gen olarak kullanılan insan β2 Mikroglobulin ile PZR yapılarak cDNA' ların kontrolü sağlandı. PZR sonuçları elektroforez jele yüklenerek görüntüledi (Şekil 1). KLK4 geninin farklı hücre hatları olan PC-3/LNCaP (insan prostat kansinomu), HEP3B (insan hepatoselüler kansinomu), HT-29/SW480 (insan kolon kansinomu), ve HUVEC (insan umbilikal ven endotel hücresi) hücrelerinde mRNA ifadesini belirleyebilmek amacıyla spesifik KLK4 ve Hβ2 primerleri kullanılarak gerçek zamanlı PZR gerçekleştirildi. Yapılan analizlere göre (Şekil 2) KLK4' ün tüm hücre hatlarında ifadesi bulunurken en çok androjen bağımlı prostat kanseri hücresi olan LNCaP hücresinde, en az ise kolon kanseri hücresi olan SW480 de mRNA ifadesinin olduğu görüldü.

3.2. KLK4' ün SW480, HT-29, HEP3B, HUVEC, PC-3 ve LNCaP Hücre Hatlarındaki Protein İfadesi

25 cm² flaklara, 2x10⁶ olacak şekilde ekim yapılan hücrelerden 24 saat sonunda flaklardan Ripa Buffer ile kazanarak elde edilen protein miktarları Bradford yöntemiyle belirlendi. Poliakrilamid jele her bir protein 35µg yüklenerek

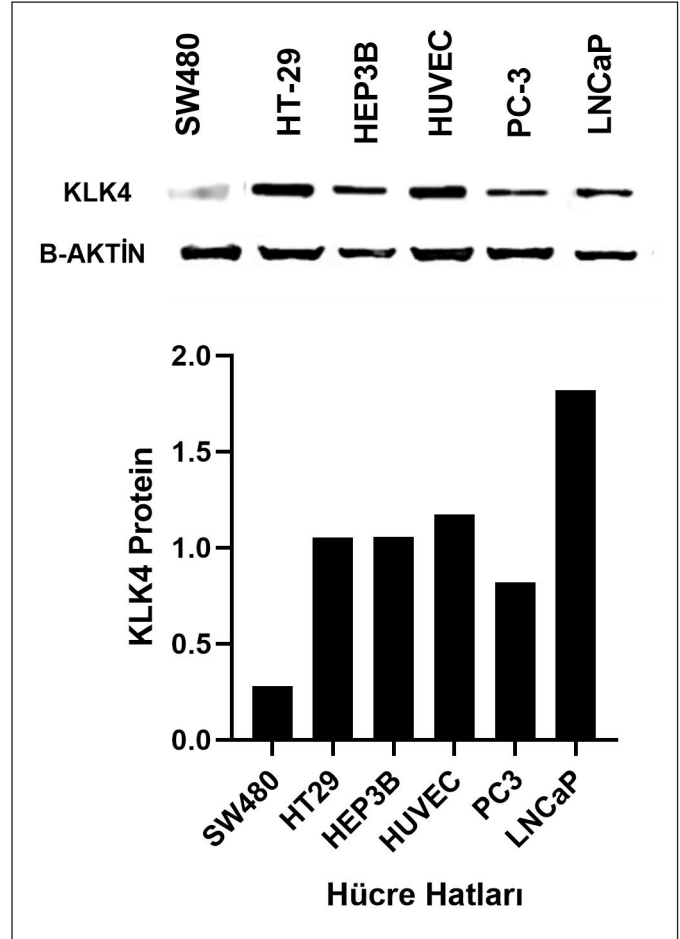


Şekil 1. Farklı hücre hatlarından yapılan cDNA'ların H β 2 PZR elektroforez jel görüntüsü (1:100bç marker, 2: SW480 kolon kanseri hücre hattı, 3: HT-29 kolon kanseri hücre hattı, 4: HEP3B hepatoselüler kanseri hücre hattı, 5: HUVEC umbilikal ven endotel hücresi, 6: PC-3 prostat kanseri hücre hattı, 7: LNCaP prostat kanseri hücre hattı, 8: 100bç marker).



Şekil 2. Farklı hücre hatlarında KLK4 mRNA ifadesi (SW480 kolon kanseri hücre hattı, HT-29 kolon kanseri hücre hattı, HEP3B hepatoselüler kanseri hücre hattı, HUVEC umbilikal ven endotel hücresi, PC-3 prostat kanseri hücre hattı, LNCaP prostat kanseri hücre hattı).

90V da yürütüldü. Yürütülen jellerdeki proteinler membrana transfer işlemi ile aktarıldı. İşlem sonunda membranda spesifik olmayan bağlanmayı önlemek için yağsız süt tozu ve Tween20 içeren 1X TBBS ile 1 saat bloke edildi. Ardından KLK4 primer antikorunu ile bir gece +4 °C de muamele edildi. Ertesi gün 1X TBBS tamponu ile 3 kez yıkama işleme



Şekil 3. Farklı hücre hatlarında KLK4' ün protein ifadesi (SW480 kolon kanseri hücre hattı, HT-29 kolon kanseri hücre hattı, HEP3B hepatoselüler kanseri hücre hattı, HUVEC umbilikal ven endotel hücresi, PC-3 prostat kanseri hücre hattı, LNCaP prostat kanseri hücre hattı).

yapıldıktan sonra sekonder antikor (HRP-konjuge anti-rabbit) ile 1.5 saat muamele edildi. 1X TBBS ile 3 kez yıkaması yapılan membran Pierce ECL (Western Blotting Substrate-Thermo) substratıyla 3 dakika inkübe edildi ve Fusion FX VILBER LOURMAT cihazında görüntüledi. Aynı membranda normalizasyon için İnsan β -aktin bantlarında görüntüledi. KLK4' ün protein seviyesini belirlemek için yapılan western blot sonucunda ise elde edilen bantlar imaj J programında analiz edildi. Analizler sonucunda elde edilen KLK4 protein miktarı, β -Aktin proteini miktarı ile normalize edildi. Yapılan analizlere göre (Şekil 3), KLK4' ün tüm hücre hatlarında ifadesi bulunurken, yine mRNA analizleri ile tutarlı olarak en çok androjen bağımlı prostat kanseri hücresi olan LNCaP hücresinde, en az ise kolon kanseri hücresi olan SW480 de protein ifadesi tespit edildi.

4. Tartışma

Literatürde KLK4'ün ifadesiyle ilgili çalışmalar incelendiğinde, çalışmaların genellikle insana ait kanserli dokular veya normal dokulardaki KLK4 ifadesine yönelik olduğu görülmektedir. Kanser hücre hatları kullanılarak yapılan birkaç çalışma bulunmaktadır.

KLK4 ekspresyonunun, prostat kanseri kaynaklı LNCaP hücre hattında androjenler tarafından yukarı regüle edildiği ve meme karsinoması hücre hattı BT-474' te hem androjenler hem de progesterinler tarafından ifadesinin arttığı gösterilmiştir (Obiezu vd. 2001).

Literatür incelendiğinde bazı serin proteazların, proteazla aktive olan reseptörler (PAR'lar) aracılığıyla hareket eden sinyal molekülleri olduğu düşünülmektedir. İnsan kolon kanser gelişimi PAR1 (proteazla aktive olan reseptör) ve PAR4 (trombin reseptörleri) ayrıca PAR2 (tripsin reseptörü) ile ilişkilendirmiştir. KLK4 ifadesi, normal insan kolonunun epitel hücrelerinde azdır ancak insan kolon adenokarsinomlarında KLK4 ekspresyonu yüksektir. Serin proteaz ailesinin bir üyesi olan KLK4'ün insan kolon kanserinde PAR1 ve PAR2'yi aktive edip etmediğinin araştırıldığı bir çalışmada, PAR1 ve PAR2 ifade eden insan kolon kanseri hücre hattı olan HT-29 hücrelerinde, rekombinat KLK4 uygulanmış ve hücre içi Ca²⁺deki değişiklikler izlenmiştir. HT-29 hücrelerinde KLK4'ün PAR1 yoluyla sinyal ilettiği gösterilmiştir. Western blot analizleri ile yapılan yolak çalışmalarında ise, PAR1 bloke edici antikorların, KLK4'ün kalsiyum geçişleri üzerindeki etkisini tamamen ortadan kaldırdığı ve KLK4 ile indüklenen ERK1/2-MAP kinaz yolunun kalsiyum mobilizasyonu ile indüklenmesi için gerekenden daha az KLK4 konsantrasyonu ile aktivasyonun başladığı gösterilmiştir. Sonuç olarak bu veriler, PAR1 aracılı KLK4 sinyal iletim yolunun kolon tümörjenezinde yeni bir sinyal iletim yolu olabileceğini düşündürmektedir (Gratio vd. 2010).

Kallikrein ailesi üyesi proteinler, farklı dokular arasında ekspresyon ve fonksiyon açısından büyük farklılıklara sahiptir. Kallikrein ailesi genlerinin farklı kanser türlerinde potansiyel biyobelirteç rolü üzerine yapılan bir çalışmada (Tailor vd. 2018), The Cancer Genome Atlas (TCGA) gen ekspresyon verileri kullanılarak kallikrein ailesi üyelerinin farklı kanser türlerinde diferansiyel ekspresyonu incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada kallikrein ailesinin (KLK1-15) 15 üyesinin tümü, TCGA'dan alınan gen ekspresyon verileri kullanılarak incelenmiştir. Her kanser türü için ayrıca kontrol örnekleri de kullanılmıştır. Bu çalışmada özellikle KLK4'ün ifadesine bakılan; 66 Kromofob renal hücreli

karsinom örneği ve 25 kontrol örneği ile yapılan analizde KLK4'ün ifadesinin Kromofob renal hücreli karsinomda 234 kat arttığı, bu artış ürokinaz plazminojen aktivatör (uPA) ekspresyonunun artması ile ilişkilendirilmiştir. 1097 meme invaziv karsinom örneği ve 114 kontrol örneğinde KLK4'ün meme invaziv karsinomda aşırı ifade olan tek kallikrein olduğu, prostat adenokarsinomunda ve üreteryal mesane karsinomunda kontrol gruplarına göre sırasıyla 3 kat ve 2 kat arttığı gösterilmiştir. Özofagus karsinomunun da kontrol örneklerine kıyasla ifadesinin 3 kat arttığı, uterus endometriyal kanserde 6 kat ve tiroid karsinomunda ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Tailor vd. 2018).

Yine ameloblast benzeri hücrelere (LS8) sodyum florür (NaF) uygulanarak KLK4 mRNA ve protein seviyesine bakılan bir çalışmada NaF ile muamele edilmiş LS8 hücrelerinde KLK4 mRNA ve protein seviyesinin belirgin bir şekilde azaldığı gösterilmiştir (Li vd. 2022).

Kallikrein ile ilişkili peptidaz ailesinin üyesi olan KLK4'ün yumurtalık kanseri dokusunda, meme kanseri dokusunda, Polimorf adenokarsinom (PAC) dokusunda, aşırı ifadesi olduğu gösterilmiştir. Yüksek KLK protein seviyelerinin sıklıkla yumurtalık kanseri hastalarının serum ve füzyon sıvılarında da bulunması gerçeğiyle tutarlıdır. Yüksek dereceli seröz yumurtalık kanseri olan 138 hastayı içeren bir deney grubunda, KLK4 tümör dokusu mRNA ekspresyon seviyelerini analiz edildiğinde yaşın yanı sıra asit sıvı hacminde KLK4 mRNA ekspresyon seviyeleri ile önemli ölçüde ilişkili olduğu gösterilmiştir (Gong vd. 2019).

KLK4, normal ve iyi huylu meme dokularına kıyasla kanserli meme dokularında yukarı regüle edildiği gösterilmiştir. Yüksek KLK4 mRNA ve miR-378 ekspresyon seviyelerinin, üçlü negatif meme kanserinde nüks ve hayatta kalma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Gong vd. 2021).

Polimorf adenokarsinom (PAC), minör tükürük bezlerinin ikinci en sık görülen malign tükürük bezi tümörüdür. PAC doku örneklerinde KLK mRNA düzeylerini belirlemek ve KLK ekspresyonunun tümör hücreleriyle sınırlı olup olmadığını anlamak amacıyla 19 vakadan PAC ve normal tükürük bezi dokusu alınarak, KLK1-15'in kantitatif ekspresyon seviyesine bakılan bir çalışmada, yüksek ve düşük KLK ekspresyonu sergileyen numuneler aynı zamanda immünohistokimya boyaması için seçilmiştir. Sonuçlar, normal tükürük bezi dokusu ile karşılaştırıldığında, PAC doku numunelerinde KLK1, KLK4, KLK10, KLK12 ve KLK15 için ortalama KLK mRNA ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir.

İmmünohistokimya sonuçları ise, tümör hücrelerinde KLK4' ların bulunduğunu ve mRNA ve protein düzeyinde tükürük bezi neoplazisinin KLK4 profiline önemli ölçüde katkıda bulunduğunu göstermişlerdir (Cox vd. 2021).

KLK4' ün dokulardaki ekspresyon profili için yapılan bir başka çalışmada ise; plasenta, böbrek, kalp, beyin, iskelet kası, dalak, yumurtalık, lökosit, karaciğer, timüs ve pankreasta neredeyse hiç ekspresyonunun görülmeyeceği bununla birlikte, en yüksek ifadesinin prostatta görüldüğü, testis ve ince bağırsakta ise nispeten yüksek seviyelerde ifadesinin olduğu görülmüştür (Lundwall vd. 2021). Çok sayıda çalışma, KLK4' ün insana ait farklı kanser doku türlerindeki ifadesinin bu kanser türleri için bir anahtar rol oynadığını önermektedir.

Çalışmamızda, qPCR ve western blot analizleriyle, PC-3/LNCaP (insan prostat karsinomu), HEP3B (insan hepatoselüler karsinomu), HT-29/SW480 (insan kolon karsinomu) ve HUVEC (insan umbilikal ven endotel hücresi) hücrelerinde KLK4 mRNA ve protein seviyeleri ölçülmüştür. LNCaP hücreleri, PC-3 hücrelerinden farklı olarak androjen bağımlı prostat kanseri hücreleridir. LNCaP hücreleri, AR (androjen reseptörü)'nü ifade ederken aynı zamanda PSA'yı da eksprese eder ve büyümeleri, insan prostat adenokarsinomuna benzer şekildedir. PC-3 hücreleri, AR ve PSA'yı eksprese etmez ve proliferasyonu, androjenden bağımsızdır (Tai vd. 2011). Yapılan çalışmalar KLK4'ün androjen bağımlı prostat kanserlerinde ifadesinin arttığını göstermektedir. Çalışmamızda KLK4' ün mRNA ve protein seviyesinde ifadesine baktığımızda diğer hücre hatlarına kıyasla en çok androjen bağımlı LNCaP hücrelerinde ifadesinin arttığı literatürle tutarlı olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamızda incelenen kolon kanseri hücre hatlarından biri olan HT-29 hücrelerinde, androjen reseptörü ve estrogen reseptörü β anlatımı olduğu bilinmektedir. c-myc, K-ras, H-ras, N-ras, Myb, sis ve fos onkogenlerin ekspresyonu için pozitifdir. p53 proteini mutasyona (R273H) uğramıştır ve p53 geninin kodon 273'ünde bir Arg-His ile sonuçlanan bir G-A mutasyonu vardır. Ayrıca HT-29 hücreleri Dukes C evresi insan kolon adenokarsinomundan türetilmiştir (Gala de Pablo vd. 2018). Çalışmamızda incelenen diğer kolon kanseri SW480 hücreleri, c-myc, K-ras, H-ras, N-ras, myb, sis ve fos onkogenlerin ekspresyonu için pozitifdir. p53 geninin 273. kodonunda bir Arg-His ikamesi ile sonuçlanan bir G-A mutasyonu ve bir Pro-Ser ile sonuçlanan kodon 309' da bir C-T mutasyonu vardır. SW480 hücreleri Dukes B tipi insan kolon adenokarsinomundan türetilmiştir (Rochette vd. 2005). Sonuç olarak farklı özellikte olan HT-

29 ve SW480 kolon kanseri hücrelerinde KLK4' ün mRNA ve protein düzeyindeki ifadesi karşılaştırıldığında HT-29 hücrelerindeki KLK4 ifadesinin SW480 hücrelerine kıyasla hem mRNA hem de protein düzeyinde daha yüksek ifade edildiği tespit edilmiştir. HT-29 hücre hattında tespit edilen artmış KLK4 ifadesinin özellikle Duke B (SW480) ve Duke C (HT-29) olarak sınıflandırılan kolon kanseri evrelerinden elde edilmiş bu hücre hatlarında ilerleyiş basamaklarında KLK4'ün anahtar rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Literatür incelendiğinde KLK4'ün sağlıklı hücre hatlarıyla ifadesine yönelik çalışmalar daha çok sağlıklı dokular yönündedir. Normal insan derisinde KLK4 mRNA ekspresyonunu ve lokalizasyonunu RT-PCR ve *in-situ* hibridizasyon yoluyla yapılan bir çalışmada kantitatif RT-PCR analizi sonucu KLK4'ün mRNA ifadesinin olduğu gösterilmiştir (Komatsu vd. 2003). Sağlıklı diş dokularında da bulunan KLK4, diş emayesinin nihai sertliğine ulaşabilmesi için ekstraselüler matriks proteinlerini parçalama işlevi görür (Christiono ve Anggarani 2021). Bunun dışında sağlıklı böbrek, karaciğer, prostat, kolon ve akciğer dokularıyla KLK4 immünohistokimya çalışmalarında böbrek, karaciğer ve prostatta immüno yanıt gözlenmiştir (Seiz vd. 2010). Literatürde sağlıklı hücre hattı modeli olarak kullanılan HUVEC (insan umbilikal ven endotel hücresi) hücre hattıyla ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda bir serin proteaz olan KLK4' ün HUVEC hücre hattında mRNA ve protein düzeyindeki ifadesinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Normal karaciğer dokusunda ifade edildiği tespit edilen (Seiz vd. 2010) KLK4'ün HEP3B (insan hepatoselüler karsinoma) hücre hattında ifadesi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda ilk kez karaciğer kanseri hücre hattı olan HEP3B hücrelerinde KLK4'ün hem mRNA hem de protein düzeyinde ifadesi tespit edilmiştir.

5. Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK 118Z369 nolu 1001 projesi ile desteklenmiştir.

Bu çalışma 2018-2022 YÖK 100/2000 ve 2021-2022 Bİ-DEB 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programında bulunan Doktora öğrencisi Fatma POYRAZLI'nın doktora tezinin bir bölümünü kapsamaktadır.

6. Kaynaklar

Avgaris, M., Mavridis K., Scorilas A. 2012. Kallikrein-related peptidases in prostate, breast, and ovarian cancers: from pathobiology to clinical relevance. *Biol. Chem.*, 393, 301-317, DOI: 10.1515/hsz-2011-0260.

- Christiono, S., Anggarani, W. 2021.** The effect of pregnancy milk on the expression of kallikrein related peptidase-4 (KLK-4) and collagen type 1 (Coll-1) in amelogenesis. *Dentino (Jur. Ked. Gigi)*, 6(2), 126-130.
- Clements, J., Hooper, J., Dong, Y., Harvey, T. 2001.** The expanded human kallikrein (KLK) gene family: genomic organisation, tissue-specific expression and potential functions. *Biol. Chem.*, 382(1), DOI: 10.1515/BC.2001.002.
- Clements, J. A., Willemsen, N. M., Myers, S. A., Dong, Y. 2004.** The tissue kallikrein family of serine proteases: functional roles in human disease and potential as clinical biomarkers. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 41(3), 265-312, DOI: 10.1080/10408360490471931.
- Cox, J., Khan, Z., Jackson-Boeters, L., Armstrong, J., Darling, M. 2021.** Human Tissue Kallikreins in Polymorphous Adenocarcinoma: A Polymerase Chain Reaction and Immunohistochemical Study. *Head Neck Pathol.*, 15(1), 169-178, DOI: 10.1007/s12105-020-01196-2.
- Diamandis, E. P., Yousef, G. M., Clements, J., Ashworth, L. K., Yoshida, S., Egelrud, T., Nelson, P.S., Shiosaka, S., Little, S., Lilja, H., Stenman, U.F., Rittenhouse, H.G., Wain, H. 2000.** New nomenclature for the human tissue kallikrein gene family. *Clin., Chem.*, 46(11), 1855-1858, DOI: 10.1093/clinchem/46.11.1855.
- Dong, Y., Kaushal, A., Bui L., Chu S Fuller, P. J., Nicklin, J., Samaratunga H., Clements, J. A. 2001.** Human Kallikrein 4 (KLK4) Is Highly Expressed in Serous Ovarian Carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 7(8), 2363-2371.
- Emami N., Diamandis E.P. 2008.** Utility of Kallikrein-Related Peptidases (KLKs) as Cancer Biomarkers. *Clin., Chem.*, 54(10), 1600-1607, DOI: 10.1373/clinchem.2008.105189.
- Fuhrman-Luck R.A., Stansfield S.H., Stephens C.R., Loessner D., Clements, J. A. 2016.** Prostate Cancer-Associated Kallikrein-Related Peptidase 4 Activates Matrix Metalloproteinase-1 and Thrombospondin-1. *J. Proteome Res.*, 15(8), 2466-2478, DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b01148.
- Gala de Pablo, J., Armistead, F. J., Peyman, S. A., Bonthron, D., Lones, M., Smith, S., Evans, S. D. 2018.** Biochemical fingerprint of colorectal cancer cell lines using label-free live single-cell Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.*, 49(8), 1323-1332, DOI: 10.1002/jrs.5389.
- Gong, W., Liu, Y., Seidl, C., Dreyer, T., Drecoll, E., Kotsch, M., Bronger, H., Dorn, J., Magdolen, V. 2019.** Characterization of kallikrein-related peptidase 4 (KLK4) mRNA expression in tumor tissue of advanced high-grade serous ovarian cancer patients. *PLoS one*, 14(2), e0212968, DOI: 10.1371/journal.pone.0212968.
- Gong, W., Zhu, C., Liu, Y., Muckenhuber, A., Bronger, H., Scorilas, A., Kiechle, M., Dorn, J., Magdolen, V., Dreyer T. 2021.** Elevated levels of both microRNA 378 (miR-378) and kallikrein-related peptidase 4 (KLK4) mRNA are associated with an unfavorable prognosis in triple-negative breast cancer. *Am. J. Transl. Res.*, 13(3), 1594-1606.
- Gratio, V., Beaufort, N., Seiz, L., Maier, J., Virca, G. D., Debela, M., Grebentchikov N., Magdolen, V., Darmoul, D. 2010.** Kallikrein-related peptidase 4: a new activator of the aberrantly expressed protease-activated receptor 1 in colon cancer cells. *Am. J. Pathol.*, 176(3), 1452-1461, DOI: 10.2353/ajpath.2010.090523.
- Klokk, T. I., Kilander, A., Xi, Z., Wæhre, H., Risberg, B., Danielsen, H. E., & Saatcioglu, F. 2007.** Kallikrein 4 is a proliferative factor that is overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res.*, 67(11), 5221-5230, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4728.
- Komatsu, N., Takata, M., Otsuki, N., Toyama, T., Ohka, R., Takehara, K., Saijoh, K. 2003.** Expression and localization of tissue kallikrein mRNAs in human epidermis and appendages. *J. Invest. Dermatol.*, 121(3), 542-549, DOI: 10.1046/j.1523-1747.2003.12363.x.
- Kontos C.K., Scorilas A. 2012.** Kallikrein-related peptidases (KLKs): a gene family of novel cancer biomarkers. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 50(11), 1877-1891, DOI: 10.1515/cclm-2012-0247.
- Korkmaz, S.K., Korkmaz G.C., Pretlow G.T., Saatcioglu F. 2004.** Distinctly Different Gene Structure of KLK4/ KLK-L1/Prostase/ARM1 Compared with Other Members of the Kallikrein Family: Intracellular Localization, Alternative cDNA Forms, and Regulation by Multiple Hormones. *DNA Cell Biol.*, DOI: 10.1089/104454901750361497.
- Kraut H., Frey E.K., Werle E. 1930.** Der nachweis eines kreislaufhormons in der pankreasdrüse. *Hoppeseylers. Z. Physiol. Chem.*, 189, 97-106, DOI: 10.1515/bchm2.1930.189.3-4.97.
- Kryza T., Silva L.M., Bock N., Fuhrman-Luck R. A., Stephens C.R., Gao J., Samaratunga H., Lawrence M.G., Hooper J. D., Dong Y., Risbridger G. P. and Clements J.A. 2017.** Kallikrein-related peptidase 4 induces cancer-associated fibroblast features in prostate-derived stromal cells. *Molecular Oncology*, 11, 1307-1329, DOI: 10.1002/1878-0261.12075.
- Lai J., Dong Y., Clements J.A. 2009.** KLK4 (kallikrein-related peptidase 4). *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.*, 13(12), DOI: 10.4267/2042/44638.
- Li, J., Kou, M., Cui, M., Ruan, J., Cheng, Z. 2022.** NaF reduces KLK4 expression by decreasing Foxo1/Runx2 expression in LS8 cells. *Archives of oral biology*, 133, 105311, DOI: 10.1016/j.archoralbio.2021.105311.

- Livak, K.J., Schmittgen T.D., 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25 (4), 402–408, DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lundwall, A., Ylitalo, E. B., Wikström, P., Brattsand, M. 2021.** Klk4t2 is a hormonally regulated transcript from the klk4 locus. *Int. J. Mol. Sci.*, 22(23), 13023, DOI: 10.3390/ijms222313023.
- Lundwall, Brattsand M. 2008.** Kallikrein-related peptidases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 65, 2019–2038, DOI: 10.1007/s00018-008-8024-3.
- Majumdar S., Diamandis E.P. 1999.** The promoter and the enhancer region of the KLK 3 (prostate specific antigen) gene is frequently mutated in breast tumours and in breast carcinoma cell lines. *Br. J. Cancer*, 79(9/10), 1594–1602.
- Matsumura, M., Bhatt, A. S., Andress, D., Clegg, N., Takayama, T. K., Craik, C. S., Nelson, P. S. 2005.** Substrates of the prostate-specific serine protease prostate/KLK4 defined by positional-scanning peptide libraries. *The Prostate*, 62(1), 1–13, DOI: 10.1002/pros.20101.
- Obiezu, C. V., Scorilas, A., Katsaros, D., Massobrio, M., Yousef, G. M., Fracchioli, S., Rigault de la Longrais, I.A., Arisio R., Diamandis, E. P. 2001.** Higher human kallikrein gene 4 (KLK4) expression indicates poor prognosis of ovarian cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 7(8), 2380–2386.
- Rochette, P. J., Bastien, N., Lavoie, J., Guérin, S. L., Drouin, R. 2005.** SW480, a p53 double-mutant cell line retains proficiency for some p53 functions. *J. Mol. Biol.*, 352(1), 44–57, DOI: 10.1016/j.jmb.2005.06.033.
- Tai, S., Sun, Y., Squires, J. M., Zhang, H., Oh, W. K., Liang, C. Z., Huang, J. 2011.** PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *The Prostate*, 71(15), 1668–1679, DOI: 10.1002/pros.21383.
- Taylor, P. D., Kodeboyina, S. K., Bai, S., Patel, N., Sharma, S., Ratnani, A., Copland, J.A., She, J.X., Sharma, A. 2018.** Diagnostic and prognostic biomarker potential of kallikrein family genes in different cancer types. *Oncotarget*, 9(25), 17876–17888., DOI: 10.18632/oncotarget.24947.
- Tefekli A.H. 2012.** Prostat Kanserinde Yeni Belirteçler ve Phi Skoru. *Türk Urol Sem*, 3: 61-9, DOI: 10.5152/tus.2012.11.
- Türkoğlu, S. A., Tosun, S. G., Köçkar, F. 2019.** Farklı Hücre Hatlarında Hipoksik Koşullarda ADAMTS-2 İfadesinin Değişimi. *AKÜ FEMÜBİD*, 19(1), 22-33, DOI: 10.35414/akufemubid.428822.
- Seiz, L., Kotzsch, M., Grebentchikov, N. I., Geurts-Moespot, A. J., Fuessel, S., Goettig, P., Gkazepis, A., Wirth, M.P., Schmitt, M., Lossnitzer, A., Sweep, F.C.G.J., Magdolen, V. 2010.** Polyclonal antibodies against kallikrein-related peptidase 4 (KLK4): immunohistochemical assessment of KLK4 expression in healthy tissues and prostate cancer. *Biol. Chem.*, DOI: 10.1515/bc.2010.033.
- Wang, P., Magdolen, V., Seidl, C., Dorn, J., Drecoll, E., Kotzsch, M., Yang, F., Schmitt, M., Schilling, O., Rockstroh, A., Clements, J.A., Loessner, D. 2018.** Kallikrein-related peptidases 4, 5, 6 and 7 regulate tumour-associated factors in serous ovarian cancer. *Br. J. Cancer*, 119(7), 1–9, DOI: 10.1038/s41416-018-0260-1.
- Werle E. 1934.** Zur Kenntnis des haushalts des Kallikreins. *Biochem. Z.*, 269: 415–34.
- Xi Z., Klokk T.I., Korkmaz K., Kurys P., Elbi C., Risberg B., Danielsen H., Loda M., Saatcioglu F. 2004.** Kallikrein 4 is a Predominantly Nuclear Protein and Is Overexpressed in Prostate Cancer. *Cancer Res.*, 64, 2365–2370, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-03-2025.