

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL POR INVESTIGACIÓN

Validación de genes inducidos por el calcitriol en células de cáncer cervical

QUE PRESENTA EL ALUMNO

Tomas Misael Lizardi Aguilera

Matrícula 2182027098

ASESORES



Dr. Euclides Avila Chávez-Departamento de Biología de la Reproducción Dr. Carlos Gual
Castro, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán



Dra. María Judith Castellanos Moguel-Departamento de El Hombre y su Ambiente,
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

Departamento de Biología de la Reproducción Dr. Carlos Gual Castro, Instituto Nacional
de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

De 1° de diciembre de 2022 al 31 de mayo de 2023

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	2
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. METODOLOGÍA	3
3.1 Cultivo celular	3
3.2 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	3
3.3 Inmunodetección tipo Western	5
3.4 Análisis estadístico	5
4. ACTIVIDADES REALIZADAS	6
5. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS	7
6. RESULTADOS Y CONCLUSIONES	7
6.1 Resultados	7
6.2 Conclusiones	9
7. RECOMENDACIONES	10
8. BIBLIOGRAFÍA	10

1. INTRODUCCIÓN

En un panorama global, el cáncer cervical es un problema de salud pública ya que es el cuarto cáncer más frecuente en mujeres y la segunda causa de muerte relacionada con cáncer en mujeres, teniendo su mayor incidencia en países de ingresos bajos y medios [1]. La aparición de esta neoplasia maligna está asociada mayormente a una infección crónica de los subtipos de alto riesgo del virus del papiloma humano (VPH); no obstante, existen otros factores de riesgo en el desarrollo de esta neoplasia maligna, entre los que destacan el inicio temprano de la actividad sexual, el consumo de tabaco y el empleo de anticonceptivos orales [2]. Aunado a estos factores, algunos estudios recientes incluyen la deficiencia de vitamina D₃ con un mayor riesgo de cáncer cervical [3-6].

La vitamina D₃ es la precursora de una potente hormona secosteroide denominada 1,25-dihidroxitamina D₃ (calcitriol), la cual requiere de dos hidroxilaciones secuenciales que tiene lugar en el hígado por la vitamina D 25-hidroxilasa mitocondrial y microsomal (CYP27A1), y en el riñón por la 1 α -hidroxilasa mitocondrial renal (CYP27B1), respectivamente [7]. La vitamina D₃ se obtiene de dos maneras: mediante síntesis endógena y por la dieta, siendo la síntesis endógena la principal fuente de esta prohormona. Sin embargo, en todo el mundo se ha documentado deficiencia de vitamina D, la cual es secundaria a la contaminación ambiental, al uso excesivo de filtros solares, la vestimenta, la localización geográfica que incluye poca exposición solar y, sobre todo, al sobrepeso y la obesidad [8].

Aunque la principal función endocrina del calcitriol es controlar la homeostasis del calcio y del fosfato, actualmente también se considera a esta hormona como un regulador maestro de la expresión de genes relacionados con el control de la progresión del ciclo celular, la apoptosis, la diferenciación celular y la angiogénesis [9, 10]. A través de todos estos efectos combinados, el calcitriol es un excelente agente antitumoral endógeno que previene la formación de una gran variedad de neoplasias humanas. El calcitriol realiza sus funciones al unirse a su receptor específico (VDR) el cual tiene un efecto regulador de la expresión génica, el cual forma heterodímeros con el receptor X de retinoides (RXR) sobre la región promotora de genes blancos para regular su transcripción [1].

Recientemente, el grupo de investigación dirigido por el Dr. Avila en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, utilizando microarreglos Affymetrix de expresión del transcriptoma global humano, obtuvo los perfiles de expresión de los transcritos diferencialmente expresados por el calcitriol 1×10^{-7} M en las células CaSki de cáncer cervical, una línea celular muy utilizada para estudiar diferentes aspectos de la biología del cáncer cervical [11]. En el presente informe se presenta el reporte de la validación de 4 transcritos inducidos por el calcitriol en esos

microarreglos y que corresponden a la calcitriol 24-hidroxilasa (CYP24A1), la caspasa 14 (CASP14), la peptidasa 6 relacionada con la kaliceína (KLK6) y la leucotrieno B4 omega hidroxilasa (CYP4F3), que fueron inducidos 216.9, 3.3, 2.3 y 2.2 veces sobre el vehículo, respectivamente. Estas proteínas pueden ser potencialmente importantes en la progresión del cáncer cervical porque sus funciones están relacionadas con la apoptosis (CASP14, [12]), la proliferación (CYP24A1, [13]) y la migración celular (KLK6, [14]) y la supresión de la inflamación mediada por el leucotrieno B4 (CYP4F3, [15]).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Validar los cuatro genes más inducidos previamente obtenidos en el microarreglo de expresión en las células CaSki tratadas en presencia o ausencia de calcitriol.

2.2 Objetivos específicos

- I. Comprobar que los transcritos de CYP24A1, CASP14, KLK6 y CYP4F3 incrementan su expresión en células CaSki tratadas con calcitriol.
- II. Investigar si la abundancia de las proteínas CYP24A1, CASP14, KLK 6 y CYP4F3 se incrementa en células CaSki incubadas en presencia de calcitriol.

3. METODOLOGÍA

3.1 Cultivo celular

Se utilizó la línea celular establecida CaSki de cáncer cervical humano (American Type Culture Collection ATCC, E.E.U.U.), las cuales se cultivaron en medio RPMI suplementado con penicilina/estreptomycin 1% y suero fetal bovino descomplementado 5%. Las células a razón de 1.5 millones en cajas Petri de 100 mm fueron incubadas en presencia de calcitriol 1×10^{-7} M (Sigma, E.E.U.U.) o etanol 0.1% como vehículo. Para los estudios de expresión a nivel de mRNA, se utilizaron células CaSki incubadas durante 24 h; para los experimentos de inmunodetección de proteínas se utilizaron células CaSki incubadas durante 24 y 48 h.

3.2 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Una vez concluidas las incubaciones, se realizó la extracción de RNA total utilizando el reactivo TRIzol basado en el método de un solo paso [16]. El RNA total se transcribió inversamente en DNA complementario (cDNA) utilizando transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina. La

expresión génica se evaluó mediante qPCR [17] y el sistema de detección utilizado fueron las sondas de hidrólisis tipo Taqman (Universal Probe Library, Roche, Alemania). Las reacciones de amplificación se realizaron mediante la modalidad “hot start qPCR” con el kit LightCycler 480 Probes Master en placas de 96 pozos en el equipo LightCycler 480 II (Roche, Alemania). Cada reacción de qPCR consistió en 2 μ L de cada cDNA, 2.5 μ L de agua libre de nucleasas, 0.2 μ L de cada uno de los oligonucleótidos 10 μ M, 5 μ L de la mezcla de reacción 2X que contiene la Taq DNA polimerasa y 0.1 μ L de la respectiva sonda de hidrólisis. En este estudio se evaluó la expresión de los genes de interés normalizada contra la expresión del gen RPL32, el cual ha sido previamente validado en nuestro laboratorio como un excelente gen constitutivo para estudios de expresión génica en las células CaSki [18]. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados, así como las sondas de hidrólisis empleadas se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos y sondas de hidrólisis (Universal Probe Library) utilizadas en este estudio.

Gen	No. de acceso GenBank	Sonda	Amplicón (nucleótidos)	Secuencia (5' a 3')
RPL32	NM_000994	11	77	GAAGTTCCTGGTCCACAACG GAGCGATCTCGGCACAGTA
CYP24A1	NM_000782	88	65	CATCATGGCCATCAAACAA GCAGCTCGACTGGAGTGAC
CASP14	NM_012114	42	79	TCCCCAGCTTTGACCTTTCC CGGGAAGAAAAGCCCTGAGT
KLK6	NM_001012964	68	79	TGCTGAGTCTGATTGCTGCA TGAGATGTCTTGTCGCAGGG
CYP4F3	NM_000896	51	68	AAAGCACCCGGAATACCAGG TAGGCTCACGGTCCTTCAGA

La Tabla 2 muestra las condiciones con las cuales se llevaron a cabo las amplificaciones.

Tabla 2. Condiciones de amplificación por qPCR.

Ciclos	T (°C)	Procesos	Tiempo (s)
1	95	Activación de la Taq DNA polimerasa y desnaturalización inicial del cDNA	600
	95	Desnaturalización del cDNA	10
45	60	Alineamiento de oligonucleótidos	30
	72	Extensión	1
1	4	Enfriamiento	∞

3.3 Inmunodetección tipo Western

Las células fueron lisadas en amortiguador de radioinmunoprecipitación (RIPA; Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, IGEPAL CA-630 1%, desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%) suplementado con inhibidores de proteasas (Complete, Roche). La concentración de proteínas totales en los homogenados sonicados se determinó por el método del ácido bicinonínico utilizando albúmina de suero bovino como estándar [19]. De cada homogenado, se tomó una alícuota de 100 microgramos, la cual se separó por electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida 12% [20]. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa utilizando el sistema semiseco a temperatura ambiente (20 V durante 1.5 h; *Trans blot semi dry transfer system*, Bio-Rad, E.E.U.U.). Las membranas se bloquearon en leche descremada con colágeno 5% en amortiguador TBST (Tris 20 mM pH 7.6, NaCl 150 mM, Tween 20 0.1%). Los anticuerpos y las diluciones utilizadas se muestran en la Tabla 3.

Las proteínas de interés fueron detectadas mediante un kit de quimioluminiscencia (*Pierce_ECL Western Blotting Substrate*, Thermo Scientific, E.E.U.U.) mediante un equipo *Molecular Imager ChemiDoc XRS System* y el programa Image Lab Software (Bio-Rad, E.E.U.U.). Posteriormente a la detección de la señal para las proteínas de interés, se removió la marca mediante el uso de un amortiguador para tal efecto [21] y se realizó la detección de la GAPDH utilizando el anticuerpo apropiado. Los resultados densitométricos de cada una de las cuatro proteínas bajo estudio se normalizaron contra los obtenidos para el control de carga GAPDH.

3.4 Análisis estadístico

Los datos se representaron como el promedio \pm la desviación estándar y se consideraron los resultados de tres experimentos independientes, cada uno con tres réplicas. El análisis estadístico se determinó

mediante la prueba de t de Student para muestras independientes y las diferencias se consideraron significativas con un valor de $P < 0.05$.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en este estudio. GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, HRP: peroxidasa de rábano.

Anticuerpos primarios		
Anticuerpo	Marca (número de catálogo)	Dilución
IgG policlonal de cabra contra CYP24A1 humana	Santa Cruz Biotechnology (sc-32164)	1:500
IgG monoclonal de ratón contra CASP14 humana	Santa Cruz Biotechnology (sc-48336)	1:500
IgG monoclonal de ratón contra KLK6 humana	Santa Cruz Biotechnology (sc-374564)	1:500
IgG monoclonal de ratón contra CYP4F3 humana	Santa Cruz Biotechnology (sc-515735)	1:500
IgG monoclonal de ratón contra GAPDH humana	Santa Cruz Biotechnology (sc-365062)	1:2000
Anticuerpos secundarios		
Anti-inmunoglobulinas IgG de cabra hecho en conejo y acoplada a HRP	Thermo Scientific (31402)	1:1000
Proteína de unión a IgG k de ratón acoplada a HRP	Santa Cruz Biotechnology (sc-516102)	1:1000

4. ACTIVIDADES REALIZADAS

Cultivo y mantenimiento de líneas celulares de cáncer cervical humano.

Purificación y cuantificación de RNA total de células CaSki de cáncer cervical tratadas en presencia y en ausencia de calcitriol.

Estudio de la expresión génica relativa de genes codificantes de proteínas en células CaSki tratadas en presencia y en ausencia de calcitriol.

Purificación y cuantificación de proteínas totales de células de cáncer cervical tratadas en presencia y en ausencia de calcitriol.

Estudio de la expresión de genes codificantes de proteínas en células CaSki tratadas en presencia y en ausencia de calcitriol.

5. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS

Los resultados del presente trabajo validaron experimentalmente los datos del microarreglo de expresión de mRNAs realizado previamente en el laboratorio de Biología de la Reproducción. Los resultados demostraron que los genes CYP24A1, CASP14, KLK6 y CYP4F3 se incrementaron significativamente sobre sus respectivos controles por efecto del calcitriol tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína.

6. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

6.1 Resultados

Después de realizar el estímulo en las células CaSki con calcitriol, se evaluó la expresión de los cuatro genes de interés y los resultados se presentan en la Figura 1. De acuerdo con lo esperado, el gen CYP24A1 fue altamente inducido por el calcitriol (Figura 1A). En promedio, el mRNA de CYP24A1 se incrementó 309 veces sobre su vehículo, una respuesta aún mayor a la observada en el microarreglo (217 veces). Este resultado es congruente con los reportes de la literatura, pues el gen CYP24A1 es el gen más inducible por el calcitriol a nivel transcripcional [22]. Adicionalmente, los otros tres genes estudiados también fueron inducidos significativamente por el calcitriol a nivel de sus mRNAs cuando se comparan con sus vehículos (Figura 1B-D). En específico, el mRNA del gen CASP14 se indujo 3 veces sobre el control (Figura 1B), un valor similar al observado en el microarreglo de origen (3.3 veces). La inducción del gen CASP14 por derivados de la vitamina D se ha descrito previamente en células de la piel [23] pero es la primera vez que se reporta en células de cáncer cervical. Con respecto al gen KLK6, la Figura 1C muestra que el calcitriol incrementó 3 veces su mRNA respecto al vehículo, un valor superior al observado previamente en el microarreglo (2.3 veces). Nuevamente, la regulación del gen KLK6 por el calcitriol había sido previamente reportada en células de la piel [24], pero por primera vez en este estudio. La Figura 1D muestra que el calcitriol incrementó 2.1 veces el mRNA de CYP4F3, prácticamente la misma razón de cambio observada en el microarreglo (2.2 veces). Este es el primer reporte de la inducción de este gen por el calcitriol en la literatura, por ello, se pretende realizar una publicación en un futuro próximo de estos datos.

Los resultados del ensayo de qPCR muestran que las células CaSki presentan una inducción en la expresión a nivel de mRNA de los tres genes evaluados en presencia del calcitriol con respecto a su vehículo (Figura 1B-1D). En efecto, los mRNAs de los genes CASP14 y KLK6 incrementaron su expresión en promedio, 3 veces en relación a sus vehículos respectivos mientras que el mRNA del gen CYP4F3 se indujo 2.11 veces en relación a su vehículo. Los resultados obtenidos fueron los

esperados, ya que son congruentes con los datos del microarreglo previo. La inducción de los genes CASP14 y KLK6 por el calcitriol ya ha sido descrita en la literatura [23, 24]; sin embargo, la regulación del gen CYP4F3 por el calcitriol no ha sido reportada.

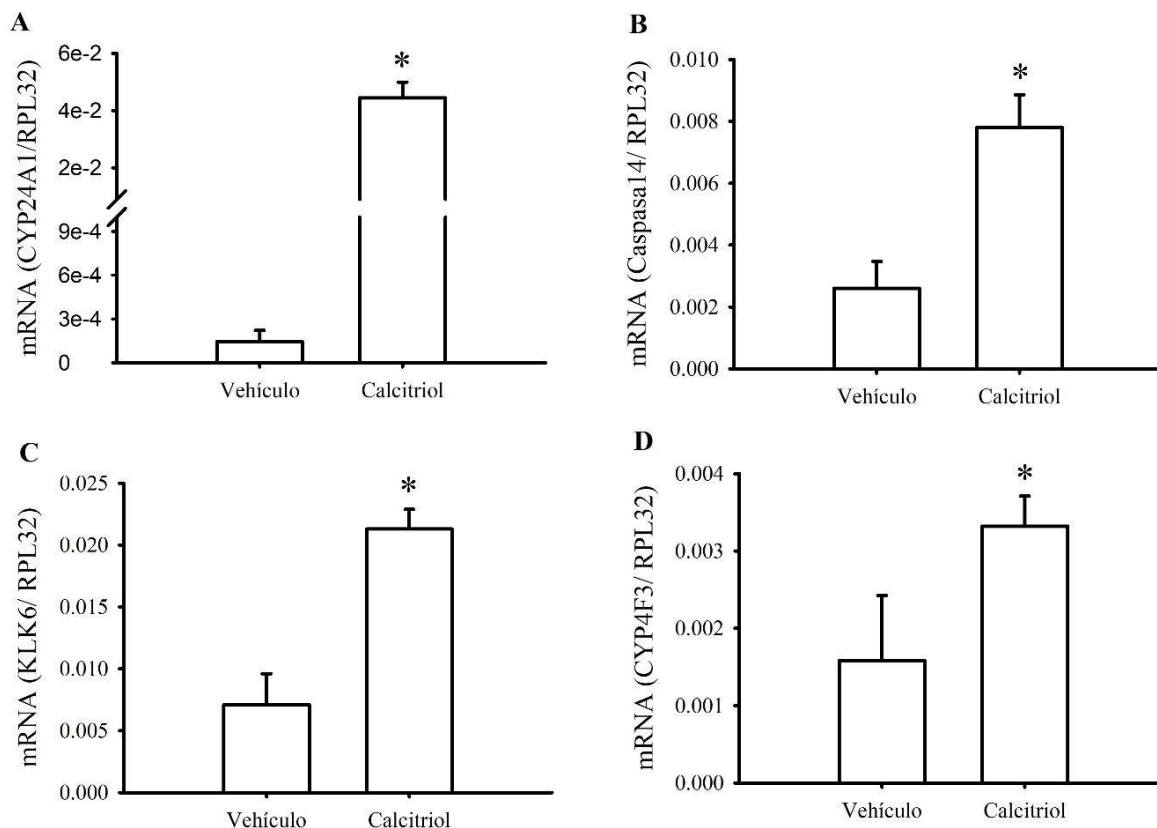


Figura 1. El calcitriol incrementa el mRNA de los genes CYP24A1 (A), CASP14 (B), KLK6 (C) y CYP4F3 (D) en las células CaSki. Las células cultivadas durante 24 h fueron incubadas en presencia de calcitriol 1×10^{-7} M o etanol 0.1% como su vehículo durante 24 h adicionales. Posteriormente, se extrajo el RNA total y la expresión de los genes de interés se evaluó por qPCR. Las barras representan el promedio de 2 experimentos independientes (cada uno con 3 réplicas experimentales) \pm la desviación estándar de cada expresión génica normalizada contra la expresión del gen RPL32. *P<0.05 vs. vehículo respectivo.

Posteriormente estudiamos si los cambios en los mRNAs de los genes de interés se observan también a nivel de abundancia de sus respectivas proteínas mediante western blot (Figura 2). De manera similar a lo mostrado en la figura 1, el calcitriol incrementó la abundancia relativa de las proteínas Caspasa 14, KLK6 y CYP4F3 respecto a sus respectivos vehículos (Figura 2). Desafortunadamente, no se logró determinar si el calcitriol incrementa la abundancia de la proteína CYP24A1, pues el anticuerpo utilizado no fue de buena calidad (datos no mostrados).

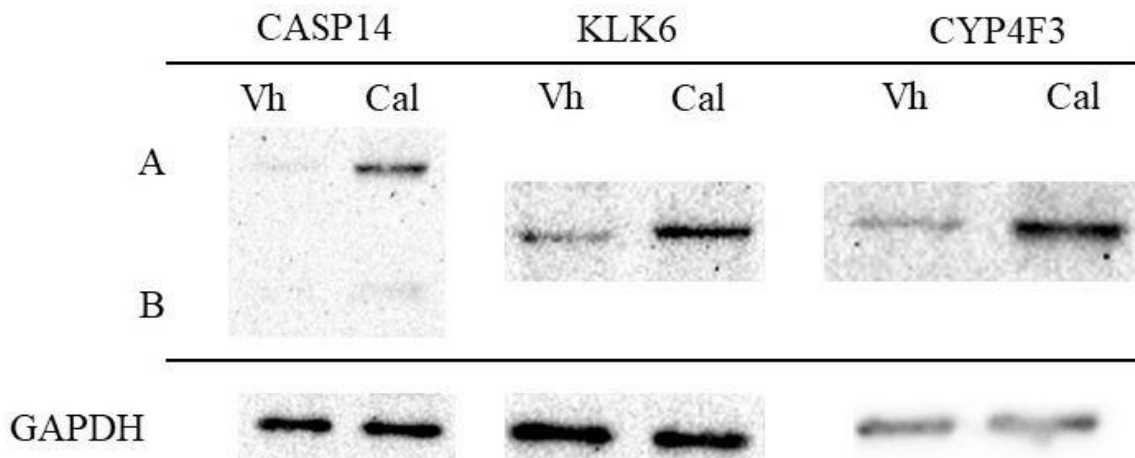


Figura 2. El calcitriol incrementa la abundancia relativa de la caspasa 14 (CASP14), la KLK6 y CYP4F3 en las células CaSki. Se utilizaron 100 µg de proteínas totales de células CaSki por carril. Se muestran membranas representativas de western blot para cada una de las proteínas estudiadas en la parte superior y las mismas membranas reincubadas contra el anticuerpo anti GAPDH empleado como control de carga. Las masas moleculares de CASP14, KLK6 y CYP4F3 son 27 kDa, 26 kDa y 59 kDa, respectivamente. La masa molecular de la GAPDH es de 36 kDa. Vh: vehículo; Cal: calcitriol.

En conjunto, los datos de las Figuras 1 y 2 validan los datos de microarreglo previamente obtenido y sugieren que el calcitriol favorece la apoptosis en las células CaSki mediante la inducción de la caspasa 14 [12, 25] y probablemente también mediante la inducción del gen supresor tumoral KLK6 [26].

6.2 Conclusiones

En las células CaSki, el calcitriol incrementó la expresión de los genes CYP24A1, CASP14, KLK6 y CYP4F3 a nivel de sus mRNAs. En este estudio, también se comprobó que la caspasa 14, la KLK6 y la CYP4F3 incrementan su abundancia en las células CaSki tratadas con calcitriol. Con estos resultados se validan los resultados del microarreglo previamente realizado.

Este es el primer trabajo en el que se reportan estos cambios en células de cáncer, ya que estos solo habían sido estudiados en células cutáneas.

7. RECOMENDACIONES

Se recomienda la utilización de un buen anticuerpo contra CYP24A1 para determinar si el calcitriol incrementa la abundancia de esta proteína en las células CaSki. Se recomienda realizar un estudio similar a este para validar los genes más reprimidos por el calcitriol en el microarreglo.

Sería muy interesante realizar un estudio en mujeres con cáncer cervicouterino que sean tratadas con calcitriol y evaluar la expresión de los genes abordados durante este trabajo en muestras de tejido tumoral. Un proyecto así planteado contribuiría a tener más conocimientos respecto a los efectos benéficos del calcitriol en el cáncer.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Avila E, Noriega-Mejia BJ, Gonzalez-Macias J, Cortes-Hernandez U, Garcia-Quiroz J, Garcia-Becerra R and Diaz L (2023) The Preventive Role of the Vitamin D Endocrine System in Cervical Cancer. *Int J Mol Sci* 24. doi: 10.3390/ijms24108665
2. Garcia-Quiroz J, Vazquez-Almazan B, Garcia-Becerra R, Diaz L and Avila E (2022) The Interaction of Human Papillomavirus Infection and Prostaglandin E2 Signaling in Carcinogenesis: A Focus on Cervical Cancer Therapeutics. *Cells* 11. doi: 10.3390/cells11162528
3. Hosono S, Matsuo K, Kajiyama H, Hirose K, Suzuki T, Kawase T, Kidokoro K, Nakanishi T, Hamajima N, Kikkawa F, Tajima K and Tanaka H (2010) Association between dietary calcium and vitamin D intake and cervical carcinogenesis among Japanese women. *Eur J Clin Nutr* 64:400-9. doi: 10.1038/ejcn.2010.28
4. Grant WB (2010) An ecological study of cancer incidence and mortality rates in France with respect to latitude, an index for vitamin D production. *Dermatoendocrinol* 2:62-7. doi: 10.4161/derm.2.2.13624
5. Vahedpoor Z, Jamilian M, Bahmani F, Aghadavod E, Karamali M, Kashanian M and Asemi Z (2017) Effects of Long-Term Vitamin D Supplementation on Regression and Metabolic Status of Cervical Intraepithelial Neoplasia: a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Horm Cancer* 8:58-67. doi: 10.1007/s12672-016-0278-x
6. Shim J, Perez A, Symanski E and Nyitray AG (2016) Association Between Serum 25-Hydroxyvitamin D Level and Human Papillomavirus Cervicovaginal Infection in Women in the United States. *J Infect Dis* 213:1886-92. doi: 10.1093/infdis/jiw065

7. Olmos-Ortiz A, Avila E, Durand-Carbajal M and Diaz L (2015) Regulation of calcitriol biosynthesis and activity: focus on gestational vitamin D deficiency and adverse pregnancy outcomes. *Nutrients* 7:443-80. doi: 10.3390/nu7010443
8. Holick MF (2007) Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 357:266-81. doi: 10.1056/NEJMra070553
9. Carlberg C, Raczyk M and Zawrotna N (2023) Vitamin D: A master example of nutrigenomics. *Redox Biol* 62:102695. doi: 10.1016/j.redox.2023.102695
10. Deuster E, Jeschke U, Ye Y, Mahner S and Czogalla B (2017) Vitamin D and VDR in Gynecological Cancers-A Systematic Review. *Int J Mol Sci* 18. doi: 10.3390/ijms18112328
11. Pattillo RA, Hussa RO, Story MT, Ruckert AC, Shalaby MR and Mattingly RF (1977) Tumor antigen and human chorionic gonadotropin in CaSki cells: a new epidermoid cervical cancer cell line. *Science* 196:1456-8. doi: 10.1126/science.867042
12. Hsu S, Qin H, Dickinson D, Xie D, Bollag WB, Stoppler H, Pearl H, Vu A, Watkins M, Koehler M and Schuster G (2007) Expression of caspase-14 reduces tumorigenicity of skin cancer cells. *In Vivo* 21:279-83.
13. Albertson DG, Ylstra B, Seagraves R, Collins C, Dairkee SH, Kowbel D, Kuo WL, Gray JW and Pinkel D (2000) Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat Genet* 25:144-6. doi: 10.1038/75985
14. Oikonomopoulou K, Diamandis EP and Hollenberg MD (2010) Kallikrein-related peptidases: proteolysis and signaling in cancer, the new frontier. *Biol Chem* 391:299-310. doi: 10.1515/BC.2010.038
15. Yin J, Liu H, Liu Z, Owzar K, Han Y, Su L, Wei Y, Hung RJ, Brhane Y, McLaughlin J, Brennan P, Bickeboeller H, Rosenberger A, Houlston RS, Caporaso N, Landi MT, Heinrich J, Risch A, Christiani DC, Amos CI and Wei Q (2017) Pathway-analysis of published genome-wide association studies of lung cancer: A potential role for the CYP4F3 locus. *Mol Carcinog* 56:1663-1672. doi: 10.1002/mc.22622
16. Chomczynski P and Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-9. doi: 10.1006/abio.1987.9999
17. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS and Griffith R (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 10:413-7. doi: 10.1038/nbt0492-413
18. Diaz L, Bernadez-Vallejo SV, Vargas-Castro R, Avila E, Gomez-Ceja KA, Garcia-Becerra R, Segovia-Mendoza M, Prado-Garcia H, Lara-Sotelo G, Camacho J, Larrea F and Garcia-Quiroz J (2023) The Phytochemical alpha-Mangostin Inhibits Cervical Cancer Cell Proliferation and Tumor

Growth by Downregulating E6/E7-HPV Oncogenes and KCNH1 Gene Expression. *Int J Mol Sci* 24. doi: 10.3390/ijms24033055

19. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ and Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7

20. Burnette WN (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112:195-203. doi: 10.1016/0003-2697(81)90281-5

21. Alegria-Schaffer A, Lodge A and Vattem K (2009) Performing and optimizing Western blots with an emphasis on chemiluminescent detection. *Methods Enzymol* 463:573-99. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63033-0

22. Chen KS and DeLuca HF (1995) Cloning of the human 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements. *Biochim Biophys Acta* 1263:1-9. doi: 10.1016/0167-4781(95)00060-t

23. Lippens S, Kockx M, Denecker G, Knaapen M, Verheyen A, Christiaen R, Tschachler E, Vandenaabeele P and Declercq W (2004) Vitamin D3 induces caspase-14 expression in psoriatic lesions and enhances caspase-14 processing in organotypic skin cultures. *Am J Pathol* 165:833-41. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63346-9

24. Lu J, Goldstein KM, Chen P, Huang S, Gelbert LM and Nagpal S (2005) Transcriptional profiling of keratinocytes reveals a vitamin D-regulated epidermal differentiation network. *J Invest Dermatol* 124:778-85. doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23641.x

25. Pistrutto G, Jost M, Srinivasula SM, Baffa R, Poyet JL, Kari C, Lazebnik Y, Rodeck U and Alnemri ES (2002) Expression and transcriptional regulation of caspase-14 in simple and complex epithelia. *Cell Death Differ* 9:995-1006. doi: 10.1038/sj.cdd.4401061

26. Pampalakis G, Prosnikli E, Agalioti T, Vlahou A, Zoumpourlis V and Sotiropoulou G (2009) A tumor-protective role for human kallikrein-related peptidase 6 in breast cancer mediated by inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Res* 69:3779-87. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1976