

*Мелехин В.В., Пономарев А.И., Десятова М.А.,
Дербышев Г.С., Макеев О.Г.*

ВЛИЯНИЕ ИНДУЦИРОВАННОЙ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ГЕНА KLOTHO НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА

ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных
технологий»,
ФГБОУ ВО «Уральский государственный
медицинский университет»,
ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница»,
г. Екатеринбург

Резюме

Ген klotho, идентифицированный в 1997 году как ген антистарения, кодирует два белковых продукта: трансмембранную и секретлируемую формы (sKL). В последующих работах было показано его участие в механизмах канцерогенеза. Однако остается неясной степень участия форм Klotho в реализации его противоопухолевых эффектов. В настоящей статье предпринята попытка оценки действия изолированной гиперэкспрессии sKL на характеристики роста культуры клеток глиобластомы человека линии A-172.

Получение результатов исследования стало возможным благодаря протоколу PCR-RT, с использованием разработанного набора праймеров и зондов, применение которого потенциально возможно для идентификации генов как трансмембранного Klotho, так и sKL. Оценка клеточной пролиферации методами построения кривых роста и МТТ-теста продемонстрировала существенное снижение показателей под действием индуцированной гиперэкспрессии. Определено повышение активно-

сти каспаз при повышенной экспрессии sKL. Данный механизм может лежать в основе реализации наблюдаемого эффекта.

Введение

Ген klotho был идентифицирован в 1997 году как ген антистарения [1]. Показано, что klotho может оказывать влияние как на реализацию фенотипических признаков старения у особей, так и на развитие некоторых онкологических заболеваний. Участие klotho в процессах канцерогенеза было показано для рака молочной железы [2, 3, 4], рака легкого [5, 6, 7], рака печени [8, 9, 10, 11] и других онкологических заболеваний. При этом вовлеченность гена в онкопатологию может находить свое подтверждение в клинических исследованиях, когда, например, оценивается экспрессия klotho в опухолевой ткани и сравнивается с аналогичным показателем окружающей здоровой ткани [4, 9, 12] или при сравнении показателей метилирования промоторной области гена [10, 13]. Кроме того, задействованность гена в канцерогенезе исследуется на культурах опухолевых клеток, когда в них нокаутируют ген, или искусственно повышают его экспрессию, используя генетические конструкторы, или добавляют в культуры очищенный белок Klotho [6, 8, 12] с оценкой произведенных эффектов на характеристики роста клеточной культуры. С данными целями могут использоваться как сертифицированные клеточные линии, так и клетки, выделенные из образцов ткани, взятых у пациентов.

В настоящее время уже накоплено некоторое количество результирующих данных, касающихся участия гена klotho в механизмах развития опухолевого процесса. Первоначально, на примере рака молочной железы, было определено снижение экспрессии klotho в опухолевых клетках относительно окружающей нормальной ткани. В данной работе было сделано предположение о метилировании промоторной области гена, а также об участии взаимосвязи инсулина и инсулин-подобного фактора роста 1 (IGF-1) в реализации противоопухолевого эффекта klotho [4]. В последующих работах было сделано предположение о влиянии инсулин/IGF-1 на канонические белки семей-

ства Wnt, что, возможно, способствует более агрессивному течению опухолевого заболевания [9, 11]. Также определена связь klotho с важными участниками каскадных реакций, запускающих апоптоз, белками семейства Bcl-2 и Bax [6].

Ген klotho кодирует два белковых продукта: более длинную трансмембранную форму белка и усеченную секретируемую. Короткая секретируемая форма klotho (sKL) может функционировать как гуморальный фактор, оказывая ауто- и паракринный эффекты на клетки [14, 15]. При этом трансмембранная форма белка имеет набор аминокислот, соответствующий 5 экзонам гена klotho, тогда как белок sKL включает в себе информацию, соответствующую только первым 3 экзонам гена. Между тем, отличия мРНК данных белков вовсе не так категоричны и ограничиваются только вставкой 15 п. н., содержащей стоп-кодон, в конце 3-го экзона [15]. Однако, остается неясным какова доля влияния и роль двух форм белка Klotho в реализации его противоопухолевых эффектов. В связи с этим, интерес представляет исследование воздействия изолированного повышения экспрессии каждой из двух форм Klotho. Если принимать во внимание тот факт, что трансмембранная форма Klotho задерживается в мембране клетки, продуцирующей данный белок, то sKL, предполагается, беспрепятственно поступает в околочелюточную среду и циркулирует в жидкости подобно гуморальному фактору, реализуя, тем самым, потенциальную возможность воздействия на любые клетки организма *in vivo* или культуры клеток *in vitro*. Таким образом, sKL, возможно, имеет более широкое таргетирование, не ограниченное исключительно аутокринным действием.

Целью настоящего исследования стала оценка влияния изолированной гиперэкспрессии гена sKL на характеристики роста клеток глиобластомы человека линии A-172. Клетки глиобластомы ранее не рассматривались в контексте влияния гена klotho на их характеристики. Стоит отметить, что в работе использована генетическая конструкция, включающая в свой состав только 3 экзона klotho, не способная продуцировать полную форму белка.

Материалы и методы

Культура клеток и трансфекция

Исследования проведены на культурах клеток глиобластомы человека линии A-172 (ATCC CRL 160) [16], которая была получена из Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в условиях 95% влажности, 5% CO₂ и температуре 37°C на смеси Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Ham F-12 (Sigma Aldrich, USA), содержащей 10% бычьей фетальной сыворотки. Для исследований культуры предварительно высевали во флаконы площадью 25 см² (Orange Scientific, Belgium) или в 96-луночные планшеты с плоским дном (Orange Scientific, Belgium). Каждая группа включала 7-10 повторностей (для построения кривых роста и оценки каспазной активности) или 30 повторностей (для МТТ-теста). Трансфекция проведена комплексом поликатионных липидов Escort III (Sigma Aldrich, USA) в соответствии с протоколом производителя. Трансфекции подвергали клеточные культуры с показателем конфлюентности находящимся в диапазоне от 40 до 60%. В заранее подготовленные культуры клеток добавляли ДНК-липидные комплексы, инкубировали 16 часов и меняли среду на стандартную ростовую.

Экстракция ДНК и полимеразная цепная реакция

Плаزمид Klotho (secreted) was a gift from Hal Dietz (Addgene plasmid # 17713) [17] любезно предоставлена лабораторией Hal Dietz университета Джона Хопкинса (США) в рамках договора о межвузовском сотрудничестве. Конструкция включает ген секретируемой формы белка Klotho. Плазмиды выделяли из трансгенной линии E.coli с применением торгового набора Miniprep Kit (D4015, Zymo Research, USA) в соответствии с протоколом производителя. Для этого 5 мл бактериальной культуры, выращенной в жидкой LB-среде (Sigma Aldrich, USA) с добавлением селективного антибиотика ампициллина 75 мкг/мл (Sigma Aldrich, USA), центрифугировали при 200g 10 минут. Осадок ресуспендировали в буфере. Затем лизировали бактерии и выделяли плазмидную ДНК с использованием колонок и очи-

щали промывочным буфером из набора Miniprep Kit.

Количественный подсчет pDNA проводили на спектрофотометре (BIO-RAD) при длине волны 260 нм. Качественный анализ проводили по соотношению A260/A280. Образцы считали пригодными при $A260/A280 = 1.8 \pm 0.1$. Копийность полученных растворов плазмидной ДНК определяли по формуле: (количество ДНК(нг) * $6,022 \times 10^{23}$) / (длина плазмиды (п.о.) * 1×10^9 * 650). Длину плазмиды определяли, как сумму длин вставки гена sKL и плазмиды pcDNA3.1/V5/His-TOPO.

Секвенирование

ПЦР продукты, полученные в ходе реакции, разделяли в 6% полиакриламидном геле посредством вертикального электрофореза с использованием камеры (BIO-RAD, USA) при постоянном напряжении 150В в течение 30 минут. Окрашивали 1% бромистым этидием и визуализировали при УФ-излучении.

Секвенирование по Сенгеру проводили для шести образцов в прямом и обратном направлениях. Элюированные ДНК продукты, полученные на предыдущем этапе, добавляли в мастермикс BigDye terminator sequencing kit 3.1 (Applied Biosystems, USA), содержащий 6.6 мкМ прямого sKL (forward) или обратного sKL (reverse) праймера. Проводили секвенирующую реакцию согласно инструкции производителя. Капиллярный электрофорез проводили на анализаторе ABI 3500 (Applied Biosystems, USA). Анализ и выравнивание последовательностей проводили с помощью программы Sequencing Analysis 6.0 (Applied Biosystems, USA). Полученные последовательности сравнивали с референсными в базе данных BLAST.

Обратная транскрипция и анализ экспрессии

Трансфецированные культуры трижды отмывали раствором PBS и снимали с матрасов по стандартной методике 0.25 % раствором трипсина. Полученные суспензии центрифугировали при 200 g в течение 5 минут, осадок ресуспендировали в 200 мкл раствора PBS, а затем смешивали с раствором TRI Reagent (MRC, USA) в соотношении 1:4 и, далее выделяли тотальную

РНК согласно инструкции производителя.

Экспрессию генов изучали методом RT-qPCR (reverse transcriptase quantitative PCR). Для построения калибровочных графиков использовали серийные разведения pDNA sKL с охарактеризованной копийностью, приготовленные на этапе выделения. Для детекции sKL использовали праймеры для качественной ПЦР. Реакции проводили в uniplex формате с использованием мастермикса (Promega). Амплификацию и детекцию флуоресцентного сигнала проводили на приборе Roche LightCycler 96. Анализ кривых накопления сигнала, регистрацию Cq и построение калибровочных графиков проводили в программе LightCycler 96 SW 1.1. В качестве референс гена использовали Abelson gene (Abl1), так как его экспрессия относительно стабильна в разных клетках и мало зависит от прочих факторов. Находили абсолютное число копий генов sKL и Abl1, результаты экспрессии sKL выражали в процентах, относительно Abl1.

Влияние на жизнеспособность и пролиферацию

Влияние гиперэкспрессии гена klotho на характеристики роста клеток глиобластомы оценивали с использованием трех методов: МТТ-тест, построение кривой роста и анализ апоптозной активности по концентрации каспаз.

MTT-test

Для проведения МТТ-теста клетки высаживали на 96-луночные планшеты в посевной концентрации $8 \cdot 10^3$ клеток на лунку и подвергали трансфекции. Оценку жизнеспособности проводили через 24, 48 и 72 часа после отмывки от трансфекционной смеси. После добавления МТТ [3-(4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 20 мкл, 10 мг/мл; Sigma Aldrich, USA] культуры возвращали в инкубатор на 4 часа. Затем из каждой лунки удаляли супернатант и добавляли 200 мкл раствора DMSO/Изопропанол (с соотношением 1:1) на 10 минут. Перед проведением спектрофотометрии суспензию в лунках тщательно пипетировали. Измерения проводили на планшетном спектрофотометре Multiscan Go (ThermoFisher Scientific, Finland).

Оценивали оптическую плотность в каждой лунке при длине волны 570 нм.

Кривые роста

Для оценки пролиферативной активности исследуемых клеток культуры заранее высаживали в культуральные флаконы площадью 25 см² (Orange Scientific, Belgium) с посевной концентрацией равной 4×10^3 клеток/см². Клетки подвергали трансфекции (в случае с опытной группой) или действию трансфекционной смеси без ДНК (в случае с контрольной группой). Культуры последовательно выводили из эксперимента через 24, 48 и 72 часа после трансфекции и подсчитывали количество клеток с помощью автоматического счетчика клеток (Scepter, Handheld Automated Cell Counter, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

Апоптоз

Клетки глиобластомы человека высаживали в культуральные флаконы 25 см² и подвергали трансфекции. Через 24 часа после отмывки от трансфекционной смеси, в культурах оценивали относительное количество апоптотических клеток с помощью флуоресцентного красителя на каспазы (Caspase Apoptosis Kit, Novus, USA) в соответствии с рекомендациями производителя.

Статистика

Статистический анализ проведен в программе RStudio (Version 1.1.419 – © 2009-2018 RStudio, Inc.). Нормальность распределения значений в группе определяли тестом Шапиро-Уилка. Для определения статистически значимых различий количественных параметров двух групп использовался Т-критерий Стьюдента и U-критерий Манна-Уитни. Величина параметра $p < 0.05$ принималась как статистически значимая. Коэффициенты y -intercept и slope для расчета копийности генов получали методом линейной регрессии с использованием ПО для qPCR амплификатора LightCycler 96 SW 1.1. Расчет копийности проводили при коэффициентах детерминации (R^2) $\geq 0,98$.

Результаты

Специфичность и оптимальная температура отжига сконструированных праймеров была оценена на начальном этапе после проведения 1-раундовой ПЦР и оценки наличия гетерогенных продуктов реакции после электрофореза в полиакриламидном геле. В ходе реакций не было зафиксировано наработки неспецифичных продуктов как с плазмидной, так и с геномной ДНК. Наряду с этим отсутствовали димеры праймеров и наблюдалось более интенсивное накопление продукта реакции, сопровождающееся интенсивным свечением. Полученные продукты распределились параллельно маркеру длин фрагментов, что соответствует ожидаемой длине продукта.

Посредством прямого секвенирования было установлено соответствие полученного продукта искомому. Были получены две короткие последовательности длиной 64-71 букв с прямого и обратного праймеров. В ходе сравнения полученных данных с референсными последовательностями, как по отдельности, так и в консенсусном варианте была установлена полная идентичность полученных продуктов мРНК гена Klotho. При этом, консенсусная последовательность ожидаемо располагалась на стыке первого и второго экзонов гена. Это позволяет детектировать как рDNA, так и mRNA гена sKL для построения калибровочных графиков и анализа экспрессии.

В результате проведения qPCR на образцах плазмидной ДНК с охарактеризованной копийностью были получены кривые удовлетворительного качества: выраженные экспоненциальные участки, переходящие в плато, с разницей в 3-4 цикла, что соответствует изменению изначальной копийности в 10 раз. Это позволило плотировать стандартные калибровочные графики и составить регрессионные уравнения ($R^2=0.99$) для расчета абсолютного числа копий: $Lg(\text{число копий}) = (Ct - Y\text{-Intercept}) / \text{Slope}$, где Ct-значение порогового цикла реакции, а Slope и Y-Intercept получены из регрессионной модели.

Эффективность амплификации фрагментов sKL и Abl1 была сопоставимой и составила 91 и 99%, соответственно. Таким образом, была установлена применимость предлагаемой техноло-

гии для детекции экспрессии *given* генов. С помощью последующего анализа экспрессии (RT-qPCR) генов *sKL* и *Abl1* было показано, что в опытной группе относительная экспрессия *sKL* в 8 раз превышала ($p < 0.001$) таковую в опытной группе.

МТТ-тест

Результаты МТТ-теста не продемонстрировали достоверных отличий в показателях опытной и контрольной групп через 24 и 48 часов после трансфекции. При этом на первой временной отметке средний показатель OD570 в опытной группе был на 6% ниже, нежели в контроле ($p = 0.09$). Индуцированная гиперэкспрессия *klotho* не вызвала статистически значимых изменений и на следующие сутки исследований, когда средняя величина OD570 в опытной группе оказалась ниже показателя контрольной группы на 4% ($p = 0.45$). Между тем, на отметке в 72 часа было зарегистрировано существенное снижение метаболической активности клеток опытной группы. Так, расчетный параметр OD570 в опытной группе оказался на 35% ниже, чем в контрольной, при высокой достоверности значений ($p < 0.001$).

Кривые роста

Результаты, полученные методом построения кривых роста, хорошо соотносятся с данными МТТ-теста. На отметке в 24 часа не регистрировалось достоверных отличий в изменении количества клеток в исследуемых группах. Количество клеток в опытной группе всего на 2% уступало количеству клеток в контрольной группе исследований ($p = 0.75$). Однако уже через 48 часов после трансфекции в опытной группе количество клеток уменьшилось на 9% относительно контрольной группы при условии статистической значимости полученных данных ($p < 0.05$). Зарегистрированные изменения усилились по прошествии 72 часов: количество клеток в контрольной группе составляло на 26% меньше, чем в контроле ($p < 0.001$).

Апоптоз

Несмотря на то, что использованные нами методы не про-

демонстрировали достоверных изменений в пролиферативной активности клеток глиобластомы человека через 24 часа после трансфекции, количество клеток с повышенной каспазной активностью под действием гиперэкспрессии *klotho* статистически значимо возросло. При этом было отмечено, что в опытной группе количество клеток с высокой активностью инициаторных и эффекторных каспаз составило 10% от общего количества клеток. В контрольной группе данный показатель не превысил 5%. Тем самым, наблюдается интенсификация метаболических внутриклеточных процессов, лежащих в основе апоптотической гибели клетки, с двукратным повышением исследуемого показателя под действием индуцированной гиперэкспрессии *klotho* при высокой статистической значимости результатов ($p < 0.001$).

Обсуждение

В настоящем исследовании липосомальная трансфекция плазмидой с геном секретируемой формы белка *Klotho* индуцировала повышение экспрессии гена в 8 раз относительно контроля. Однако, стоит отметить, что данный показатель не в полной мере соответствует реальной картине. Несмотря на то, что синтезированные праймеры имеют своей мишенью стык первого и второго экзона гена *klotho*, что повышает точность при исследовании геномной ДНК, часть праймеров могла связаться не с и-РНК, а с плазмидной ДНК, намерено внесенной в клетку при трансфекции и экстрагированной вместе с РНК ввиду относительно низкой молекулярной массы. Отсутствие интронов в данной плазмиде могло привести к случайному шумовому повышению полученных количественных переменных. Тем самым, ошибка возможна в случае контаминации РНК-фракции ДНК-продуктом. Между тем, вероятность описываемого события не высока, так как для RT-qPCR использовалась фракция РНК выделенная с помощью хлороформ-гуанидин тиоционата в кислой среде. Известно, что с помощью данной методики в большинстве случаев удается надежно отделить РНК от ДНК [18]. Повышение точности оценки экспрессии гена *klotho* воз-

можно если проводить постобработку DNaseI, однако в наших исследованиях применение данной методики не выявило каких-либо преимуществ — результаты относительной экспрессии не различались до и после обработки.

Подтверждением индукции гиперэкспрессии гена *klotho* может служить и зарегистрированные изменения характеристик жизнеспособности клеток глиобластомы, так как в трех независимо друг от друга проведенных тестах регистрировался статистически значимый эффект с высокой степенью достоверности (во всех случаях p -значение достигало уровня <0.001). В этом контексте, нельзя не отметить также и разноплановость проводимых экспериментов, основанных на определении различных характеристик исследуемого объекта и разных методологических подходах (калориметрия, флуориметрия, подсчет количества клеток). Обращает на себя внимание высокая каспазная активность в обеих группах исследования — от 5% в контрольной группе и до 10% в опытной. Возможно, это объясняется токсическим действием комплекса поликатионных липидов, применяемых для трансфекции клеток, который, сам по себе мог катализировать апоптотические процессы в клетках.

Однако повышение активности каспаз, как известно, не всегда свидетельствует о реализации апоптотической гибели клетки. Например, активированные каспазы могут не привести к клеточной смерти, если действие этих протеаз будет заблокировано белками-ингибиторами апоптоза (IAPs) [19, 20]. В то же время литературные данные свидетельствуют о вовлеченности некоторых белков, участвующих в инициации митохондриального пути апоптоза, в механизмы подавления клеточной жизнеспособности, опосредованные *klotho*. В частности, в работе Chen B. et al. на примере рака легкого показано участие белков семейства Bcl-2 и Bax в *klotho*-опосредованном противоопухолевом действии [6]. В действительности, речь может идти об активности не только хорошо изученных инициаторных и эффекторных каспаз, но и о каспазах-1, -4 и -5, которые могут быть связаны с воспалительными процессами или какими-либо пока

неизвестными функциями данных ферментов. Таким образом, индукция апоптоза в клетках это лишь один из вероятных вариантов подавления жизнеспособности культуры клеток глиобластомы.

Кроме того, оценка пролиферативной активности двумя разными способами, хотя и соотносится между собой, имеет и свои выраженные различия. Так, МТТ-тест продемонстрировал статистически значимые различия в результатах только на 3 сутки (72 часа) эксперимента, тогда как по кривым роста достоверные отличия проявляются уже на 2 сутки (48 часов). Вероятно, это может быть связано с разницей в подходах к статистическому анализу данных. При построении кривых роста в каждую группу включалось по 7-10 культур, тогда как выборка при проведении МТТ-теста составляла до 30 независимых наблюдений в каждой группе сравнения. В связи с этим были выбраны и различные методы сравнения: непараметрический тест Манна-Уитни и Т-критерия Стьюдента, соответственно. Поэтому, мы полагаем, что МТТ-тест отражает более достоверные значения влияния sKL на пролиферацию клеток глиобластомы человека A-172.

Между тем, в соответствии с литературными данными гиперэкспрессия *klotho* может провоцировать развитие в клетках иных регуляторных нарушений. Так, в ряде работ определено влияние *klotho* на сигнальные взаимодействия инсулина и инсулин-подобного фактора роста 1, которые могут лежать в основе изменений антиоксидантной защиты клетки [21, 22]. Предполагается также взаимосвязь с различными микроРНК, которые могут принимать участие в развитии онкопатологии [23, 24, 25].

Стоит также отметить, что в настоящей работе впервые показан эффект влияния гиперэкспрессии гена секретируемой (3-экзонной) формы белка *Klotho* на рост клеток глиобластомы человека. При этом заслуживает отдельного внимания факт исследования изолированного действия гиперэкспрессии гена sKL на опухолевые клетки, тогда как в работах, описанных в литературе, в условиях искусственной индукции гиперэкспрессии гена,

больше распространена оценка действия полной, т. е. 5-экзонной, формы на клетки тех или иных опухолей [7, 8, 22]. Тем самым, факт применения усеченной, 3-экзонной формы klotho для исследования противоопухолевой активности гена является отличительной особенностью настоящего исследования. Отработанный алгоритм оценки экспрессии гена Klotho методом RT-qPCR может быть применен к исследованиям как естественной, так и искусственно индуцированной гиперэкспрессии гена klotho благодаря разработанным праймерам и зондам, нацеленным на участки ДНК, соответствующие гену klotho в пределах 1-2 экзонов, а использование дополнительного олигонуклеотида (зонда) существенно повышает специфичность реакции. Примечательно, что существующие подходы, применяемые для детекции мембранной формы, используют праймеры, ориентированные на участки гена, локализованные в районах 4 и 5 экзонов с интеркалирующими красителями и не могут быть использованы для секретируемой формы [6], так как данные участки могут отсутствовать в генетических конструктах, разработанных для таргетного повышения экспрессии секретируемой формы белка Klotho (sKL) как и в случае с given plasmide. Между тем, удаление двух «лишних» экзонов может быть целесообразно для уменьшения молекулярной массы генетической конструкции и повышения эффективности трансфекции.

В целом, результаты настоящей работы соотносятся с результатами других исследований. Для глиобластомы человека линии A-172 методами построения кривых роста и МТТ-теста было продемонстрировано ингибирование пролиферативной активности клеток, сочетающееся со значимой активацией каспаз — ключевых ферментов апоптоза. Вероятно, это может быть обусловлено или особой чувствительностью глиобластомы (в частности линии A-172) к Klotho, или какими-либо методологическими особенностями проведенного исследования. Так, sKL, усеченный ген которого применялся в экспериментах, как известно, оказывает не только ауто-, но и паракринный эффект и, в отличие от трансмембранной формы белка Klotho, мишенью для sKL выступают все культивируемые клетки. Возможно поэ-

тому наблюдаемый нами эффект оказался столь значимым.

Между тем данные, имеющиеся к настоящему времени, не позволяют идентифицировать klotho как универсальный противоопухолевый ген, обладающий способностью снижать жизнеспособность опухолевых клеток любого происхождения. Например, в ряде работ были получены противоположные эффекты влияния klotho на рак яичника [12, 26]. Кроме того, в независимых исследованиях было показано противоречивое и подчас взаимоисключающее результирующее действие гена klotho на клетки гепатоцеллюлярной карциномы [8, 9]. Это может свидетельствовать о том, что данный ген оказывает влияние на такие внутриклеточные сигнальные системы, которые могут обладать разнонаправленными функциями в регуляции клеточного цикла опухолевой клетки. Потребуется более детальное исследование для формирования гипотезы участия klotho в механизмах канцерогенеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kuro-o M., Matsumura Y., Aizawa H., Kawaguchi H., Suga T., Utsugi T. et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. – 1997. – Т. 390. – №. 6655. – С. 45. doi:10.1038/36285
2. Rubinek T., Shulman M., Israeli S., Bose S., Avraham A., Zundeleovich A. et al. Epigenetic silencing of the tumor suppressor klotho in human breast cancer // *Breast cancer research and treatment*. – 2012. – Т. 133. – №. 2. – С. 649-657. doi.org/10.1007/s10549-011-1824-4
3. Wolf I., Laitman Y., Rubinek T., Abramovitz L., Novikov I., Beeri R. et al. Functional variant of KLOTHO: a breast cancer risk modifier among BRCA1 mutation carriers of Ashkenazi origin // *Oncogene*. – 2010. – Т. 29. – №. 1. – С. 26. doi:10.1038/onc.2009.301
4. Wolf I., Levanon-Cohen S., Bose S., Ligumsky H., Sredni B., Kanety H. et al. Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer // *Oncogene*. – 2008. – Т. 27. – №. 56. – С. 7094. doi:10.1038/onc.2008.292
5. Chen B., Ma X., Liu S., Zhao W., Wu J. Inhibition of lung

cancer cells growth, motility and induction of apoptosis by Klotho, a novel secreted Wnt antagonist, in a dose-dependent manner. *Cancer biology & therapy*. – 2012. – T. 13. – №. 12. – C. 1221-1228. doi.org/10.4161/cbt.21420

6. Chen B., Wang X., Zhao W., Wu J. Klotho inhibits growth and promotes apoptosis in human lung cancer cell line A549 // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. – 2010. – T. 29. – №. 1. – C. 99. doi.org/10.1186/1756-9966-29-99

7. Wang Y., Chen L., Huang G., He D., He J., Xu W. et al. Klotho sensitizes human lung cancer cell line to cisplatin via PI3k/Akt pathway // *PloS one*. – 2013. – T. 8. – №. 2. – C. e57391. doi.org/10.1371/journal.pone.0057391

8. Chen L., Liu H., Liu J., Zhu Y., Xu L., He H. et al. Klotho endows hepatoma cells with resistance to anoikis via VEGFR2/PAK1 activation in hepatocellular carcinoma // *PLoS One*. – 2013. – T. 8. – №. 3. – C. e58413. doi.org/10.1371/journal.pone.0058413

9. Tang X., Wang Y., Fan Z., Ji G., Wang M., Lin J et al. Klotho: a tumor suppressor and modulator of the Wnt/ β -catenin pathway in human hepatocellular carcinoma // *Laboratory investigation*. – 2016. – T. 96. – №. 2. – C. 197. doi:10.1038/labinvest.2015.86

10. Xie B., Zhou J., Yuan L., Ren F., Liu D.C., Li Q. et al. Epigenetic silencing of Klotho expression correlates with poor prognosis of human hepatocellular carcinoma // *Human pathology*. – 2013. – T. 44. – №. 5. – C. 795-801. doi.org/10.1016/j.humpath.2012.07.023

11. Sun H., Gao Y., Lu K., Zhao G., Li X., Li Z. et al. Overexpression of Klotho suppresses liver cancer progression and induces cell apoptosis by negatively regulating wnt/ β -catenin signaling pathway // *World journal of surgical oncology*. – 2015. – T. 13. – №. 1. – C. 307. doi.org/10.1186/s12957-015-0717-0

12. Yan Y., Wang Y., Xiong Y., Lin X., Zhou P., Che Z. Reduced Klotho expression contributes to poor survival rates in human patients with ovarian cancer, and overexpression of Klotho inhibits the progression of ovarian cancer partly via the inhibition of systemic inflammation in nude mice // *Molecular medicine reports*. – 2017. – T. 15. – №. 4. – C. 1777-1785. doi.org/10.3892/mmr.2017.6172

13. Lee J., Jeong D.J., Kim J., Lee S., Park J.H., Chang B. et

al. The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma // *Molecular cancer*. – 2010. – T. 9. – №. 1. – C. 109. doi.org/10.1186/1476-4598-9-109

14. Chen C.D., Tung T.Y., Liang J., Zeldich E., Zhou T.B.T., Turk B.E. et al. Identification of cleavage sites leading to the shed form of the anti-aging protein klotho // *Biochemistry*. – 2014. – T. 53. – №. 34. – C. 5579-5587. doi: 10.1021/bi500409n

15. Matsumura Y., Aizawa H., Shiraki-Iida T., Nagai R., Kuro-o M., Nabeshima Y. Identification of the Human Klotho Gene and Its Two Transcripts Encoding Membrane and Secreted Klotho Protein // *Biochemical and biophysical research communications*. – 1998. – T. 242. – №. 3. – C. 626-630. doi: 10.1006/bbrc.1997.8019

16. Giard D. J., Aaronson S. A., Todaro G. J., Arnstein P., Kersey J. H., Dosik H. et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1973. – T. 51. – №. 5. – C. 1417-1423.

17. Arking D. E., Krebsova A., Macek M., Arking A., Mian I. S., Fried L. et al. Association of human aging with a functional variant of klotho // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2002. – T. 99. – №. 2. – C. 856-861.

18. Chomzynsky et al. 2009.

19. Shi Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view // *Protein Science*. – 2004. – T. 13. – №. 8. – C. 1979-1987.

20. Vaux D. L., Silke J. IAPs, RINGs and ubiquitylation // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2005. – T. 6. – №. 4. – C. 287-297.

21. Li X.X., Huang L.Y., Peng J.J., Liang L., Shi D.B., Zheng H.T. et al. Klotho suppresses growth and invasion of colon cancer cells through inhibition of IGF1R-mediated PI3K/AKT pathway // *International journal of oncology*. – 2014. – T. 45. – №. 2. – C. 611-618. doi.org/10.3892/ijo.2014.2430.

22. Shu G., Xie B., Ren F., Liu D.C., Zhou J., Li Q. et al. Restoration of klotho expression induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells // *Cellular oncology*. – 2013. – T. 36. – №. 2. – C. 121-129. doi.org/10.1007/s13402-012-0118-0

23. Mehi S.J., Maltare A., Abraham C. R., King, G. D. MicroRNA-339 and microRNA-556 regulate Klotho expression in vitro // *Age*. – 2014. – Т. 36. – №. 1. – С. 141-149. doi.org/10.1007/s11357-013-9555-6

24. He X.J., Ma Y.Y., Yu S., Jiang X.T., Lu Y.D., Tao L. Up-regulated miR-199a-5p in gastric cancer functions as an oncogene and targets klotho // *BMC cancer*. – 2014. – Т. 14. – №. 1. – С. 218. doi.org/10.1186/1471-2407-14-218

25. Pan J.Y., Sun C.C., Li S.J., Huang J., Li D. J. Role of miR-10b in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells by targeting Klotho // *Cancer Cell & Microenvironment*. – 2015. – Т. 2. – №. 4. dx.doi.org/10.14800/ccm.936.

26. Lu L., Katsaros D., Wiley A., Rigault de la Longrais I.A., Puopolo M., Yu H. Klotho expression in epithelial ovarian cancer and its association with insulin-like growth factors and disease progression // *Cancer investigation*. – 2008. – Т. 26. – №. 2. – С. 185-192. doi.org/10.1080/07357900701638343

**Сазонов С.В., Бриллиант А.А.,
Бриллиант Ю.М. Фадеев Ф.А., Демидов С.М.**

ОПЫТ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛЮМИНАЛЬНОГО ПОДТИПА

ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных
технологий»,
ФГБОУ ВО «Уральский государственный
медицинский университет»,
г. Екатеринбург, Россия

Рак молочной железы гетерогенное заболевание, этиология и принципы развития которого до сих пор не установлены. Несмотря на существование таргетных препаратов для терапии групп иммуногистохимических подтипов карцином молочной железы, эффективность лечения может быть выше при более глубоком изучении каждого случая.

На сегодняшний день для изучения свойств опухолей используются методы основанные на определении клеточных рецепторов в фиксированном операционном материале. Однако такое исследование затрудняет выявление генетических особенностей данного случая, а также исключает возможность тестирования эффективности назначаемого препарата. Нужна экспериментальная модель конкретного случая: первичная клеточная культура, клеточная линия, возможно экспериментальное животное. Каждая модель может быть использована для различных исследований: для генетического анализа, Днк метилирования, подбора существующих терапевтических методик. Такие модели снимают ряд этических проблем, такими моделями легко манипулировать, зная их молекулярную характеристику. Такие модели могут быть использованы для изучения сигнальных путей и «критических» генов вовлеченных в канцерогенез.