

ĐIỀU HÒA BIỂU HIỆN KLOTHO BỞI TÍN HIỆU PI3K TRONG TẾ BÀO TUA

Nguyễn Văn Phòng¹, Nguyễn Thị Xuân^{1, ✉}, Phí Thị Thu Trang¹, Nguyễn Việt Linh², Nguyễn Thu Thủy³, Nguyễn Huy Hoàng¹

¹Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Viện Nghiên cứu Sinh - Y - Dược, Học viện Quân y

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: xuannt@igr.ac.vn

Ngày nhận bài: 10.3.2016

Ngày nhận đăng: 19.9.2017

TÓM TẮT

Tế bào tua là tế bào trình diện kháng nguyên chuyên nghiệp nhất tới các tế bào lympho T trong quá trình đáp ứng miễn dịch. Klotho là một protein xuyên màng được tìm thấy chủ yếu trong thận. Klotho có vai trò ngăn cản quá trình lão hóa tế bào và làm tăng khả năng hấp thụ ion Ca^{2+} khi tế bào được hoạt hóa bởi kháng nguyên lipopolysaccharide (LPS). Nồng độ ion Ca^{2+} trong tế bào chất tăng lên kích hoạt tín hiệu phân tử PI3 kinase (PI3K)/Akt kéo theo ức chế sự phosphoryl hóa GSK3 β , kết quả làm tăng sự phiên mã của các cytokine viêm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành xác định mức độ biểu hiện của gen *klotho*, nồng độ IL-10 trong môi trường dịch huyền phù và cơ chế phân tử liên quan trong tế bào tua bằng phương pháp RT-PCR, western blotting và ELISA. Vật liệu sử dụng là tế bào tủy xương chuột được nuôi cấy 8 ngày cùng hormone GM-CSF. Kết quả nhận được cho thấy, khi sử dụng chất LY294002 để ức chế tín hiệu PI3K/Akt hoặc nuôi cấy tế bào trong môi trường đối huyết thanh đều làm tăng quá trình phosphoryl hóa GSK3 β dẫn đến mức độ biểu hiện mRNA của gen *klotho* tăng lên. Bên cạnh đó, LY294002 làm giảm sự giải phóng cytokine IL-10 từ 570 pg/ml xuống 306 pg/ml. Ảnh hưởng của LY294002 đến mức độ biểu hiện mRNA gen *klotho* và sự tiết IL-10 bị ngăn chặn bởi chất ức chế đặc hiệu SB16763 của GSK3 β . Kết quả nghiên cứu cho thấy tín hiệu phân tử PI3K/Akt ức chế biểu hiện gen *klotho* và làm tăng khả năng tiết IL-10 thông qua điều hòa sự phosphoryl hóa phân tử GSK3 β trong tế bào tua.

Từ khóa: Akt, DCs, GSK3 β , Klotho, LPS, PI3K

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tế bào DC (dendritic cells) là những tế bào trình diện kháng nguyên chuyên nghiệp của hệ miễn dịch. Chúng đóng vai trò hoạt hóa đáp ứng miễn dịch bẩm sinh tạo ra đáp ứng miễn dịch thu được và trí nhớ miễn dịch thông qua khả năng trình diện kháng nguyên tới tế bào T và sự giải phóng ra các cytokine gây viêm (Banchereau *et al.*, 2000). Ở vị trí ngoại biên, các tế bào tua có khả năng thực bào các kháng nguyên lạ để trở thành tế bào thuần thực, sau đó chúng di cư về cơ quan bạch huyết. Tại đây, các tế bào này tăng cường sự biểu hiện phân tử trình diện kháng nguyên như MHC class II và các phân tử đồng kích thích như CD86, CD40 và CD54 (Fu *et al.*, 2013) cũng như tăng khả năng sản xuất các cytokine gây viêm (Patenaude *et al.*, 2011) và khả năng thực bào của chúng giảm đi rõ rệt (Fu *et al.*,

2013, Patenaude *et al.*, 2011). Hoạt động tiếp nhận kháng nguyên của tế bào tua kích hoạt tín hiệu phân tử PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/Akt. Tín hiệu này có vai trò ức chế phản ứng viêm trong đáp ứng miễn dịch thông qua thụ thể TLR4 (toll-like receptor 4) trong tế bào tua của chuột (Shumilina *et al.*, 2007) và ức chế sự phosphoryl hóa phân tử glycogen synthase kinase 3 (GSK3 β) phía dưới (Sakoda *et al.*, 2003, Wyatt *et al.*, 2006). Tương tự như phân tử PI3K, GSK3 β tham gia điều hòa các quá trình sinh lý trong tế bào tua (Ohtani *et al.*, 2008, Rodionova *et al.*, 2007). Mật độ phân tử này rất cao khi tế bào tua ở trạng thái chưa trưởng thành và biểu hiện của nó giảm đi rõ rệt khi tế bào tua ở trạng thái thuần thực (Rodionova *et al.*, 2007).

Protein klotho là một protein xuyên màng được tìm thấy chủ yếu trong thận và tuyến cận giáp. Protein klotho có vai trò quan trọng ngăn chặn quá

trình lão hóa ở người và động vật nên nó được xem như một trong những yếu tố quyết định tuổi thọ (Kato *et al.*, 2000). Nhiều nghiên cứu đã cho thấy rằng, chuột bị tách gen *klotho* có biểu hiện kiểu hình già trước tuổi, trong khi nếu tăng cường biểu hiện gen *klotho* thì những con chuột này lại sống lâu hơn so với bình thường (Kuro-o *et al.*, 1997, Kurosu *et al.*, 2005). Mức độ biểu hiện của gen *klotho* giảm xuống đáng kể ở những người già (Yamazaki *et al.*, 2010), nhưng không có sự khác biệt về giới tính (Carpenter *et al.*, 2010). Nghiên cứu di truyền đã chỉ ra tình trạng methyl hoá DNA là nguyên nhân chính dẫn đến biểu hiện gen *klotho* giảm xuống (Abramovitz *et al.*, 2011).

Trong một nghiên cứu mới đây, chúng tôi đã phát hiện ra gen *klotho* có mặt trong tế bào tua (Shumilina *et al.*, 2013). *Klotho* tham gia điều hòa sinh lý trao đổi ion calcium và sự di cư phụ thuộc vào chemokine CCL21 trong tế bào tua (Shumilina *et al.*, 2013). Những biến đổi các quá trình sinh lý này được kiểm soát bởi tín hiệu phân tử PI3K trong tế bào tua (Matzner *et al.*, 2008). Vì thế, chúng tôi giả thiết rằng biểu hiện gen *klotho* có thể được điều hòa bởi tín hiệu phân tử PI3K. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành sử dụng các chất ức chế tín hiệu phân tử PI3K/Akt/GSK3 β để xác định mức độ biểu hiện gen *klotho* và khả năng sản xuất cytokine IL-10 của tế bào tua.

ĐỐI TƯỢNG PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Chuột BALB/c mice được mua từ công ty Taconic Farms (Hudson, NY, USA) và được nuôi trong điều kiện sạch, không nhiễm khuẩn tại Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phương pháp

Nuôi cấy và biệt hóa tế bào tua

Tế bào tủy xương chân sau của chuột được rửa sạch bằng PBS (phosphate-buffered saline), diệt tế bào hong cầu và rửa lại bằng môi trường nuôi cấy (MTNC: gồm có môi trường RPMI 1640 + 10% FBS (fetal bovine serum) + 1% Glutamine + 50 μ M β -mercaptoethanol + 1% Penicillin/Streptomycin). Sau đó, tế bào tủy xương được đem nuôi cấy trong tủ ấm với điều kiện nuôi cấy ở 37°C, 5% CO $_2$ cùng với

hormone GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, 35ng/ml) trong vòng 8 ngày. Cứ 3 ngày các tế bào được thay MTNC mới có thêm hormone GM-CSF (35 ng/ml). Sau 8 ngày nuôi cấy, các tế bào được thu hoạch, rửa sạch và phân tích phần trăm ($\geq 85\%$) tế bào tủy xương biệt hóa thành tế bào tua. Tế bào tua được xử lý cùng với kháng nguyên LPS (lipopolysaccharide) và các hóa chất LY294002 hoặc SB16763.

Phương pháp đếm tế bào dòng chảy bằng kỹ thuật Flow cytometry

Các tế bào tua (4×10^5 tế bào) sau khi nuôi cấy 8 ngày được đem rửa sạch bằng PBS và sau đó nhuộm với 100 μ l dung dịch FACS buffer (bao gồm PBS và 0.1% FBS) có chứa kháng thể gắn với fluorochrome ở nồng độ 10 μ g/ml. Kháng thể sử dụng trong nghiên cứu này bao gồm: APC Hamster Anti-Mouse CD11c và FITC-Annexin V. Tế bào được nhuộm với các loại kháng thể trên trong 45 phút ở 4°C, sau đó đem rửa sạch hai lần và tái hòa tan bằng dung dịch đệm FACS. Khoảng 2×10^4 tế bào tua trong mỗi ống nghiệm được sử dụng để phân tích tỷ lệ phần trăm số tế bào dương tính với chỉ thị CD11c và âm tính với chỉ thị Annexin V bằng kỹ thuật flow cytometry sử dụng máy FACS CantoII.

Phân tích nồng độ cytokine trong dịch huyền phù bằng kỹ thuật ELISA

Tế bào tua được hoạt hóa bởi kháng nguyên LPS và xử lý cùng các hóa chất LY294002 hoặc SB16763 trong 24 giờ. Sau nuôi cấy, dịch huyền phù của tế bào được thu thập và trữ đông ở -20°C cho đến khi phân tích nồng độ cytokine bằng kỹ thuật ELISA. Để đo nồng độ IL-10 trong dịch huyền phù chúng tôi sử dụng kit thương mại mouse IL-10 ELISA Ready-SET-Go (eBioscience), cách làm dựa trên những hướng dẫn cụ thể của công ty.

Tách chiết RNA tổng số và phân tích mức độ biểu hiện gen bằng kỹ thuật RT-PCR

Tế bào tua được xử lý cùng LY294002 hoặc LY294002 và SB16763 trong môi trường có hoặc không có huyết thanh trong 24 giờ. Các tế bào sau đó được tách chiết bằng kit Qias shredder và RNeasy Mini Kit của công ty Qiagen để thu được RNA tổng số, cách làm theo sự hướng dẫn cụ thể của công ty. cDNA được tổng hợp từ RNA tổng số theo quy trình như sau: lấy 1 μ g RNA tổng số pha loãng vào nước

cất DEPC thành 12,5 µl. Tiếp đến, thêm 1 µl oligo-dT primer (500 µg/ml, Invitrogen) và ủ ở nhiệt độ 70°C trong 2 phút. Cho thêm vào ống đựng mẫu 2 µl 10x reaction buffer (Biolabs), 1 µl dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10 mM mỗi loại), 0,5 µl chất ức chế RNase (Roche), 0,1 µl enzyme phiên mã ngược M-MuLV (Biolabs) và 2,9 µl nước cất DEPC. Trộn đều mẫu sau đó ủ ở 42°C trong 1 tiếng. Để dừng phản ứng tổng hợp cDNA, các mẫu được ủ ở 94°C trong 5 phút và dự trữ ở -80°C. Mẫu cDNA được phân tích mức độ biểu hiện các gen *Klotho* và *actin*, sử dụng TaqMan primer (Applied Biosystems) bằng kỹ thuật quantitative RT-PCR trên máy Lightcycler 480 system (Roche). Tỷ lệ biểu hiện tương quan giữa hai gen này được tính toán dựa vào điểm crossing point và công thức tính toán chu kỳ ngưỡng (Livak, Schmittgen, 2001).

Điện di protein bằng kỹ thuật western blotting

Tế bào tua được hoạt hóa bằng kháng nguyên LPS trong môi trường có hoặc không có huyết thanh, sau đó phá vỡ tế bào bằng dung dịch RIPA buffer (Sigma Aldrich) để thu được protein tổng số. Mẫu protein được điện di biến tính trên gel SDS-PAGE 10%, sử dụng màng PVDF (polyvinylidene fluoride) để chuyển protein từ bản gel sang màng. Sau đó, màng được phủ bằng dung dịch 5% skim milk + TBS-T (bao gồm TBS và 0,01% tween 20) trong 2 giờ, rửa màng 3 lần với TBS-T trong 30 phút. Tiếp theo ủ màng với kháng thể sơ cấp bao gồm kháng

thể thô kháng chuột p-GSK3β và thể thô kháng chuột GAPDH (cell signaling) ở 4°C qua đêm và rửa lại 3 lần với TBS-T trong 30 phút. Màng tiếp tục được ủ với kháng thể thứ cấp kháng thể gắn với enzyme HRP (GE Healthcare) pha trong dung dịch 5% skim milk + TBS-T trong 1 giờ ở nhiệt độ thường, sau đó rửa màng 3 lần trong 30 phút với dung dịch TBS-T. Protein được phát hiện bằng dung dịch hiện màu ECL Plus kit (GE Healthcare).

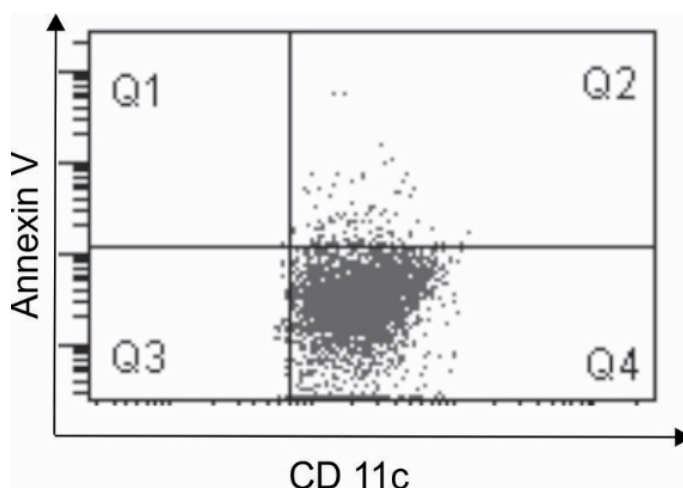
Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả thí nghiệm là trung bình cộng của các giá trị và được xử lý bằng phương pháp unpaired Student *t*-test. Các nghiên cứu được lặp lại ít nhất 3 lần. Sự khác biệt giữa mẫu đối chứng và mẫu được xử lý có ý nghĩa thống kê khi chỉ số *p* value < 0,05.

KẾT QUẢ

Phân tích khả năng sống sót và biệt hóa của tế bào tua

Phân tích khả năng sống sót và sự biệt hóa của tế bào tua bằng kỹ thuật flow cytometry, cho thấy ≥85% số tế bào dương tính với chỉ thị CD11c và gần như không có tế bào nào dương tính với chỉ thị Annexin V. Điều đó chứng tỏ đại đa số các tế bào tủy xương đã được biệt hóa thành tế bào tua sống sót và đang phát triển (Hình 1).



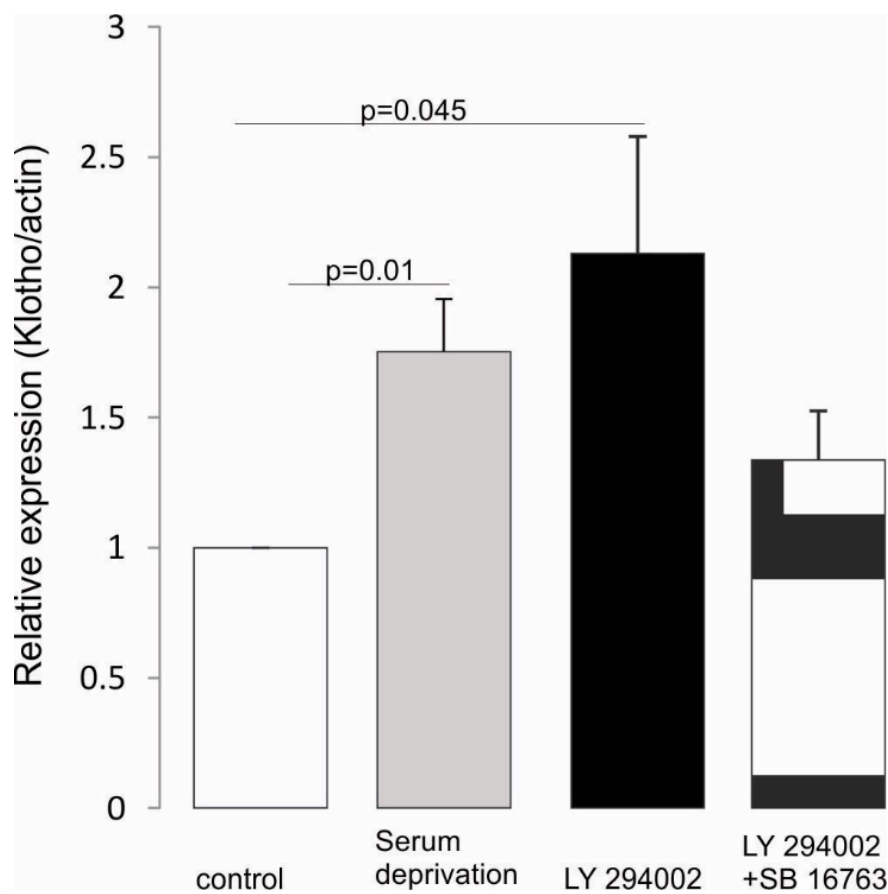
Hình 1. Phân tích khả năng sống sót và biệt hóa của tế bào tua. Q1, Q2, Q3 và Q4 hiển thị các phần khác nhau trong hình dot blot. Tế bào tập trung ở Q4 là dương tính với chỉ thị CD11c và tế bào tập trung ở Q2 là dương tính với chỉ thị CD11c và Annexin V.

Tín hiệu PI3K/GSK3 β điều hòa mức độ biểu hiện của gen *klotho*

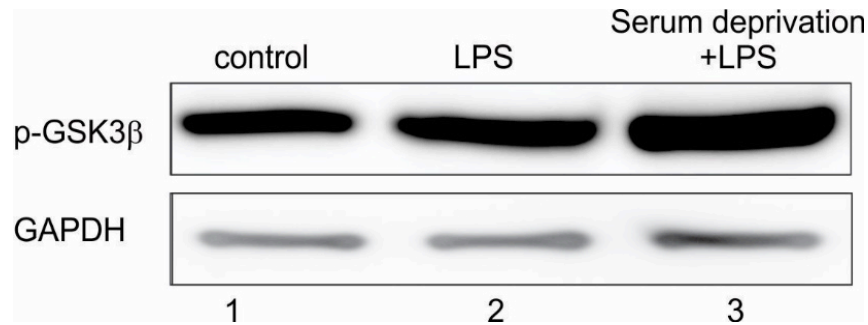
Để xác định vai trò của tín hiệu phân tử PI3K/GSK3 β điều hòa sự phiên mã gen *klotho*, chúng tôi tiến hành đo mức độ biểu hiện của gen *klotho* bằng kỹ thuật real time-PCR.

Kết quả trên hình 2 cho thấy mức độ biểu hiện của gen *klotho* so với gen *actin* của các tế bào đối

chứng hoặc tế bào được nuôi trong môi trường bỏ đói huyết thanh hoặc tế bào được xử lý cùng LY294002 có tỷ lệ tương ứng là 1/1.75/2.13. Ngược lại, khi sử dụng hóa chất ức chế phân tử GSK3 β là SB16763 thì tỷ lệ biểu hiện của gen *klotho* so với gen *actin* bị giảm xuống từ 2.13 thành 1.33. Điều này chỉ ra rằng, mức độ biểu hiện tăng của gen *klotho* do ức chế tín hiệu phân tử PI3K đóng góp vào ảnh hưởng của protein PI3K điều hòa biểu hiện của protein GSK3 β trong tế bào tua.



Hình 2. Sản phẩm real time-PCR các gen *klotho* và β -*actin* từ tế bào tua đối chứng trong môi trường bình thường (control, cột trắng) hoặc trong môi trường không có huyết thanh (cột xám) hoặc được xử lý cùng LY294002 (cột đen) hoặc được xử lý cùng LY294002 và SB16763 (cột hình ca rô).



Hình 3. Điện di protein GSK3 β và GAPDH trên polyacrylamide gel 10%. Các tế bào tua đối chứng (1) hoặc được xử lý cùng kháng nguyên LPS trong môi trường bình thường (2) hoặc trong môi trường không có huyết thanh (3).

Ảnh hưởng của tín hiệu phân tử PI3K đến mức độ biểu hiện của protein GSK3 β

Để chứng tỏ ảnh hưởng của phân tử PI3K làm giảm biểu hiện của phân tử GSK3 β , chúng tôi tiến hành thí nghiệm ngăn chặn hoạt động của phân tử PI3K bằng cách bỏ đói tế bào tua trong môi trường không có huyết thanh. Kết quả hình 3 chỉ ra rằng, khi ức chế tín hiệu phân tử PI3K thì sự phosphoryl hóa của protein GSK3 β tăng lên, chứng tỏ rằng kháng nguyên LPS hoạt hóa tín hiệu phân tử PI3K thông qua ức chế biểu hiện phân tử GSK3 β .

Ảnh hưởng của tín hiệu phân tử PI3K/GSK3 β đến sự giải phóng cytokine IL-10 của tế bào tua

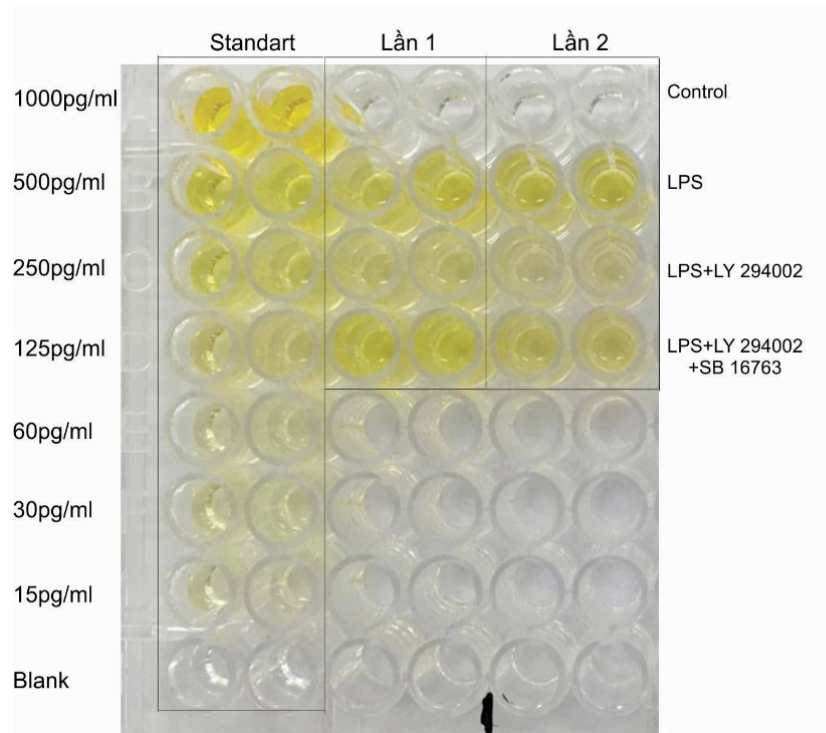
Tín hiệu phân tử PI3K được hoạt hóa bằng kháng nguyên LPS kết quả làm tăng hoạt động phiên mã của gen IL-10 trong nhân của tế bào tua. Để xác định ảnh hưởng ức chế hoạt động phân tử GSK3 β của tín hiệu phân tử PI3K, chúng tôi tiến hành các thí nghiệm ức chế tín hiệu PI3K bằng LY294002 và ức chế tín hiệu GSK3 β bằng SB16763. Kết quả hình 4 cho thấy, xử lý tế bào tua cùng LY29400 làm giảm nồng độ sản phẩm tiết cytokine IL-10 từ 570 pg/ml xuống 306 pg/ml. Sự giảm nồng độ IL-10 không xảy ra khi tế bào tua được xử lý cùng lúc hai chất ức chế LY294002 và SB16763.

THẢO LUẬN

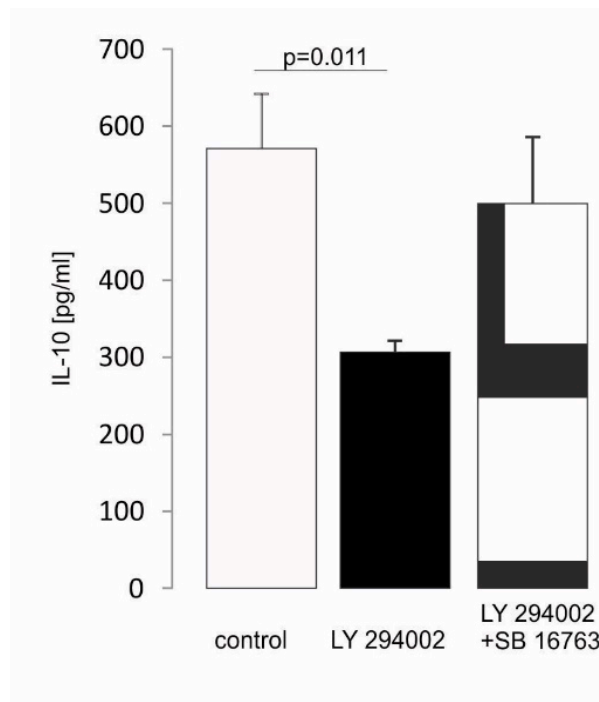
Trong nghiên cứu này, tín hiệu phân tử PI3K/GSK3 β được chỉ ra kiểm soát biểu hiện gen *klotho* và sự giải phóng cytokine IL-10 gây viêm trong tế bào tua. Đây là một phát hiện mới về vai

trò điều hòa của tín hiệu phân tử PI3K/GSK3 β trong tế bào tua. Nhóm nghiên cứu của chúng tôi trước đây đã công bố rằng, tín hiệu PI3K là yếu tố ức chế sự giải phóng IL-12 trong tế bào tua (Shumilina *et al.*, 2007). Trong cơ thể động vật, tế bào miễn dịch được hoạt hóa khi tiếp xúc với kháng nguyên lạ như LPS, để trở thành thuần thực và tham gia vào quá trình đáp ứng miễn dịch. Những tế bào thuần thực này sẽ giải phóng ra các chất trung gian gây viêm như các cytokine như IL-12 và IL-10 với nồng độ tỷ lệ nghịch nhau để đảm bảo cân bằng lượng cytokine của cơ thể. Chính vì thế, sản phẩm tiết cytokine IL-12 của tế bào tua thuần thực giảm đi, dẫn đến thúc đẩy khả năng tiết IL-10 của các tế bào này dưới sự điều hòa của tín hiệu phân tử PI3K (Chen *et al.*, 2014, Kamda, Singer, 2009). Những nghiên cứu tương tự về vai trò kiểm soát của tín hiệu này đến sự giải phóng các chất trung gian gây viêm trong nhiều loại tế bào khác nhau đã được công bố rộng rãi (Ali *et al.*, 2015, Sakoda *et al.*, 2003, Shumilina *et al.*, 2007).

Bên cạnh đó, những nghiên cứu về các tín hiệu phân tử liên quan đến biểu hiện gen *klotho* chưa được chú trọng. Một vài nghiên cứu công bố rằng các yếu tố ngoại bào như: troglitazone và estrogen làm giảm mức độ biểu hiện gen *klotho* (Oz *et al.*, 2007, Yamagishi *et al.*, 2001). Tuy nhiên, các tác giả chưa tập trung nghiên cứu cơ chế phân tử kiểm soát sự phiên mã của gen này. Cho đến nay, một nghiên cứu duy nhất chỉ ra phân tử thụ thể androgen có vai trò kiểm soát gen *klotho* (Abramovitz *et al.*, 2011). Nghiên cứu của chúng tôi phát hiện thêm rằng tín hiệu phân tử PI3K cũng đóng vai trò quan trọng điều hòa biểu hiện gen *klotho*.



A



B

Hình 4. (A) Kết quả đo nồng độ IL-10 bằng phương pháp ELISA, (B) Sản phẩm cytokine IL-10 được tiết ra từ các tế bào tua thuần thực đối chứng (control, cột trắng) hoặc được xử lý cùng LY294002 (cột đen) hoặc được xử lý cùng LY294002 và SB16763 (cột hình ca rô).

Gen *klotho* đã được chỉ ra là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến sự tiết hormone kích thích sinh trưởng trong chuột (Kurosu *et al.*, 2005). Hormone này tham gia vào quá trình điều hòa sự phát triển, biệt hóa và khả năng tăng sinh của các tế bào, mô và các cơ quan nội tạng trong cơ thể động vật. Chính vì thế, thí nghiệm trên chuột khi loại bỏ gen *klotho* làm giảm khả năng sống sót từ 2-4 năm xuống còn khoảng 5 tháng tuổi do các cơ quan bộ phận trong cơ thể bị lão hóa sớm toàn bộ (Kuro-o *et al.*, 1997). Ngược lại, tăng biểu hiện gen *klotho* thì những con chuột này lại sống lâu hơn so với bình thường (Kurosu *et al.*, 2005). Ngoài vai trò ngăn chặn quá trình lão hóa, các công bố trên thế giới đã cho thấy rằng, mức độ biểu hiện của gen *klotho* giảm xuống là một trong những nguyên nhân gây ra các bệnh mãn tính ở thể nặng như suy thận mạn, bệnh tim mạch, bệnh viêm khớp (Koh *et al.*, 2001, Vadakke Madathil *et al.*, 2014) và một số bệnh ung thư như: ung thư vú, ung thư trực tràng, ung thư cổ, ung thư gan và ung thư dạ dày (Lee *et al.*, 2010, Xie *et al.*, 2013).

Như vậy, nghiên cứu về cơ chế phân tử điều hòa biểu hiện gen *klotho* góp phần hiểu biết đầy đủ hơn về một trong những nguyên nhân gây ra bệnh già trước tuổi, một số bệnh mãn tính ở thể nặng và bệnh ung thư như được nêu ra ở trên. Điều này có ý nghĩa quan trọng trong việc nghiên cứu đề xuất liệu pháp miễn dịch trong điều trị các loại bệnh có liên quan đến gen *klotho*.

Lời cảm ơn: Công trình hoàn thành với kinh phí được tài trợ bởi đề tài “Nghiên cứu sự biểu hiện gen mã hóa protein Klotho trong các tế bào hệ miễn dịch ở người và chuột” của Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) số 106-YS.06-2013.21

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abramovitz L, Rubinek T, Ligumsky H, Bose S, Barshack I, Avivi C, Kaufman B, Wolf I (2011) KL1 internal repeat mediates klotho tumor suppressor activities and inhibits bFGF and IGF-I signaling in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 17: 4254–4266.

Ali AK, Nandagopal N, Lee SH (2015) IL-15-PI3K-AKT-mTOR: A Critical Pathway in the Life Journey of Natural Killer Cells. *Front Immunol* 6: 355.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767–811.

Carpenter TO, Insogna KL, Zhang JH, Ellis B, Nieman S, Simpson C, Olear E, Gundberg CM (2010) Circulating levels of soluble klotho and FGF23 in X-linked hypophosphatemia: circadian variance, effects of treatment, and relationship to parathyroid status. *J Clin Endocrinol Metab* 95: E352–357.

Chen L, Zheng L, He W, Qiu M, Gao L, Liu J, Huang A (2014) Cotransfection with IL-10 and TGF-beta1 into immature dendritic cells enhances immune tolerance in a rat liver transplantation model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 306: G575–581.

Fu RH, Liu SP, Chu CL, Lin YH, Ho YC, Chiu SC, Lin WY, Shyu WC, Lin SZ (2013) Myricetin attenuates lipopolysaccharide-stimulated activation of mouse bone marrow-derived dendritic cells through suppression of IKK/NF-kappaB and MAPK signalling pathways. *J Sci Food Agric* 93: 76–84.

Kamda JD, Singer SM (2009) Phosphoinositide 3-kinase-dependent inhibition of dendritic cell interleukin-12 production by *Giardia lamblia*. *Infect Immun* 77: 685–693.

Kato Y, Arakawa E, Kinoshita S, Shirai A, Furuya A, Yamano K, Nakamura K, Iida A, Anazawa H, Koh N, Iwano A, Imura A, Fujimori T, Kuro-o M, Hanai N, Takeshige K, Nabeshima Y (2000) Establishment of the anti-Klotho monoclonal antibodies and detection of Klotho protein in kidneys. *Biochem Biophys Res Commun* 267: 597–602.

Koh N, Fujimori T, Nishiguchi S, Tamori A, Shiomi S, Nakatani T, Sugimura K, Kishimoto T, Kinoshita S, Kuroki T, Nabeshima Y (2001) Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 1015–1020.

Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI (1997) Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390: 45–51.

Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, McGuinness OP, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H, Shimomura I, Takayama Y, Herz J, Kahn CR, Rosenblatt KP, Kuro-o M (2005) Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* 309: 1829–1833.

Lee J, Jeong DJ, Kim J, Lee S, Park JH, Chang B, Jung SI, Yi L, Han Y, Yang Y, Kim KI, Lim JS, Yang I, Jeon S, Bae DH, Kim CJ, Lee MS (2010) The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma. *Mol Cancer* 9: 109.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408.

- Matzner N, Zemtsova IM, Nguyen TX, Duszenko M, Shumilina E, Lang F (2008) Ion channels modulating mouse dendritic cell functions. *J Immunol* 181: 6803–6809.
- Ohtani M, Nagai S, Kondo S, Mizuno S, Nakamura K, Tanabe M, Takeuchi T, Matsuda S, Koyasu S (2008) Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells. *Blood* 112: 635–643.
- Oz OK, Hajibeigi A, Howard K, Cummins CL, van Abel M, Bindels RJ, Word RA, Kuro-o M, Pak CY, Zerwekh JE (2007) Aromatase deficiency causes altered expression of molecules critical for calcium reabsorption in the kidneys of female mice. *J Bone Miner Res* 22: 1893–1902.
- Patenaude J, D'Elia M, Cote-Maurais G, Bernier J (2011) LPS response and endotoxin tolerance in Flt-3L-induced bone marrow-derived dendritic cells. *Cell Immunol* 271: 184–191.
- Rodionova E, Conzelmann M, Maraskovsky E, Hess M, Kirsch M, Giese T, Ho AD, Zoller M, Dreger P, Luft T (2007) GSK-3 mediates differentiation and activation of proinflammatory dendritic cells. *Blood* 109: 1584–1592.
- Sakoda H, Gotoh Y, Katagiri H, Kurokawa M, Ono H, Onishi Y, Anai M, Ogihara T, Fujishiro M, Fukushima Y, Abe M, Shojima N, Kikuchi M, Oka Y, Hirai H, Asano T (2003) Differing roles of Akt and serum- and glucocorticoid-regulated kinase in glucose metabolism, DNA synthesis, and oncogenic activity. *J Biol Chem* 278: 25802–25807.
- Shumilina E, Nurbaeva MK, Yang W, Schmid E, Sztejn K, Russo A, Heise N, Leibrock C, Xuan NT, Faggio C, Kuro-o M, Lang F (2013) Altered regulation of cytosolic Ca²⁺(+) concentration in dendritic cells from klotho hypomorphic mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 305: C70–77.
- Shumilina E, Zahir N, Xuan NT, Lang F (2007) Phosphoinositide 3-kinase dependent regulation of Kv channels in dendritic cells. *Cell Physiol Biochem* 20: 801–808.
- Vadakke Madathil S, Coe LM, Casu C, Sitara D (2014) Klotho deficiency disrupts hematopoietic stem cell development and erythropoiesis. *Am J Pathol* 184: 827–841.
- Wyatt AW, Hussain A, Amann K, Klingel K, Kandolf R, Artunc F, Grahmmer F, Huang DY, Vallon V, Kuhl D, Lang F (2006) DOCA-induced phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta. *Cell Physiol Biochem* 17: 137–144.
- Xie B, Zhou J, Yuan L, Ren F, Liu DC, Li Q, Shu G (2013) Epigenetic silencing of Klotho expression correlates with poor prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 44: 795–801.
- Yamagishi T, Saito Y, Nakamura T, Takeda S, Kanai H, Sumino H, Kuro-o M, Nabeshima Y, Kurabayashi M, Nagai R (2001) Troglitazone improves endothelial function and augments renal klotho mRNA expression in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats with multiple atherogenic risk factors. *Hypertens Res* 24: 705–709.
- Yamazaki Y, Imura A, Urakawa I, Shimada T, Murakami J, Aono Y, Hasegawa H, Yamashita T, Nakatani K, Saito Y, Okamoto N, Kurumatani N, Namba N, Kitaoka T, Ozono K, Sakai T, Hataya H, Ichikawa S, Imel EA, Econs MJ, Nabeshima Y (2010) Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. *Biochem Biophys Res Commun* 398: 513–518.

REGULATION OF KLOTHO EXPRESSION BY PI3K SIGNALING IN DENDRITIC CELLS

Nguyen Van Phong¹, Nguyen Thi Xuan¹, Phi Thi Thu Trang¹, Nguyen Viet Linh², Nguyen Thu Thuy³, Nguyen Huy Hoang¹

¹*Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

³*Institute of Biomedicine and Pharmacy, Vietnam Military Medical University*

SUMMARY

Dendritic cells (DCs) are the most potent antigen-presenting cells regulating naive T cell responses *in vivo*. Klotho is a membrane protein and hormone mainly expressed in the kidney and counteracting ageing thus leading to increase of life span. Klotho induces an increase of bacterial lipopolysaccharides (LPS)-stimulated [Ca²⁺] influx, which enhances activation of phosphatidylinositol (PI) 3 kinase with subsequent activation of Akt and Akt dependent inhibition of GSK3 β , resulting in transcription of inflammatory cytokine production. The present study

explored whether *klotho* expression is mediated by PI3K/AKT/GSK3 β signaling. To this end, DCs have been isolated from bone marrow of wild type mice and cultured for 8 days with GM-CSF. *Klotho* expression, cytokine production and mechanisms underlying these physiological processes in DCs were determined by RT-PCR, Western blotting and ELISA methods. In LPS-stimulated DCs, serum deprivation increased *klotho* transcript levels, an effect mimicked by pharmacological inhibition of PI3 Kinase with LY294002, paralleled by increase of GSK3 β phosphorylation. In addition, LY294002 inhibited an increase of LPS-stimulated IL-10 formation in DCs. The effects of LY294002 on *klotho* transcript levels and IL-10 production in DCs were significantly suppressed by the specific GSK3 β inhibitor SB216763. In conclusion, the present observations indicated that the PI3K/Akt signaling pathway downregulated *klotho* expression and enhanced production of IL-10 mediated through the GSK3 β phosphorylation in in DCs.

Keywords: *Akt, DCs, GSK3 β , Klotho, LPS and PI3K.*