

Е.П. Хвостова ^{1, 2}, В.О. Пустыльняк ^{1, 2}, А.И. Корбут ², А.А. Отпущенников ³, Л.Ф. Гуляева ^{1, 2},
И.Н. Крылова ²

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К МОЛЕКУЛЯРНОЙ ХАРАКТЕРИСТИКЕ ОПУХОЛЕЙ ПРОСТАТЫ

¹ ФГБУ Институт молекулярной биологии и биофизики СО РАМН (Новосибирск)

² Новосибирский государственный университет (Новосибирск)

³ Центральная Клиническая Больница СО РАН (Новосибирск)

Задачей исследования являлось создание клеточной биосенсорной системы, основанной на факте, что стимулы, активирующие AR, приводят к перераспределению AR из цитоплазмы в ядро. Эти изменения могут быть измерены и использованы для диагностики и персонализированного лечения рака простаты. Были созданы стабильные клеточные линии с флуоресцентно помеченным AR. Для стабильной экспрессии клеток были использованы клетки HeLa, не экспрессирующие AR. Для трансфекции выбраны плазмидные конструкторы, экспрессирующие химеры флуоресцентного белка с AR дикого типа или AR^{T877A} мутантом. Было исследовано изменение CFP-AR-YFP и CFP-AR^{T877A}-YFP в ядрах клеток HeLa при обработке стероидами разной концентрации. Кроме того, проведена оценка количества активированного рецептора в ядрах после воздействия стероидов.

Ключевые слова: рак простаты, биосенсорная система, андрогеновый рецептор, клеточные линии

MODERN APPROACH TO MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PROSTATE TUMORS

E.P. Khvostova ^{1, 2}, V.O. Pustyl'nyak ^{1, 2}, A.I. Korbut ², A.A. Otpuschennikov ³,
L.F. Gulyaeva ^{1, 2}, I.N. Krylova ²

¹ Institute of Molecular Biology and Biophysics, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Central Clinical Hospital Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

The aim of the study was the development of a cell biosensor system based on the fact that AR activator stimuli lead to redistribution of AR from cytoplasm to the nucleus. These changes could be measured and used for the diagnostics and personalized treatment of prostate cancer patient. The stably transfected cell lines with fluorescently tagged AR were generated. For the stable cell expression the non AR expressing HeLa cell line was used. The constructs of chimeric fluorescent proteins wild type AR or mutant AR^{T877A} were used for the transfection. The changes of the CFP-AR-YFP and CFP-AR^{T877A}-YFP proteins in the nucleus of HeLa cells under different concentrations steroids treatment was investigated. Moreover, the quantity of activated receptor in the nucleus was carried.

Key words: prostate cancer, biosensor system, androgen receptor, cell lines

ВВЕДЕНИЕ

Рак предстательной железы является вторым из наиболее часто диагностируемых видов рака у мужчин и занимает третье место в общей структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями в России [1]. Так, в 2011 г. зарегистрировано 40 случаев данного заболевания на 100 тыс. населения, а число смертей от рака простаты составило 10,8 на 100 тыс. населения. Таким образом, опухоли предстательной железы широко распространены, смертность от них чрезвычайно высока, и продолжает расти. Такое положение свидетельствует о необходимости дальнейших исследований как в области изучения механизмов возникновения и метастазирования этих опухолей, так и в области разработки новых методов диагностики и лечения.

Нормальное развитие и функционирование предстательной железы [9, 17] всецело определяется ее гормональной регуляцией. Более того, предстательная железа сама является эндокринным органом, клетки которого превращают синтезированный в яичках тестостерон в значительно

более патентный андроген дегидротестостерон (ДГТ) [20]. Эпителиальные клетки предстательной железы экспрессируют андрогеновый рецептор (AR) и их рост стимулируется половыми стероидными гормонами, которые являются лигандами для AR [3, 12, 20].

Стандартное первичное лечение опухолей простаты основано на уменьшении уровня циркулирующих андрогенов и ингибировании их воздействия на опухоль. Однако в случае значительного числа опухолей предстательной железы в течение короткого времени развивается резистентность к гормональной терапии [9, 19]. Основная проблема гормональной терапии заключается в том, что в условиях драматического снижения соответствующих терапии гормонов в сигнальных путях, регулируемых AR, накапливаются мутации, дающие преимущество тем клеткам опухолей, рост которых (1) не зависит от гормонов, (2) имеет повышенную чувствительность к гормонам или (3) стимулируется неспецифичными гормонами [9, 14, 17, 18]. У больных кастрационно-независимыми опухолями

предстательной железы очень часто находят мутации в AR, приводящие к изменению в лигандной специфичности рецептора. Такие мутанты могут активироваться эстрогенами, кортикостероидами и, парадоксально, даже препаратами, использующимися для кастрационной терапии [18].

Для стероидных гормонов с цитоплазматической локализацией, таких как AR, активационный статус рецептора напрямую коррелирует с перемещением его в ядро клетки [2, 5, 19]; более того, повышенное количество AR в ядрах клеток опухолей в значительной мере коррелирует с худшим прогнозом у больных раком простаты [4, 11]. Эти наблюдения являются основой для создания модельной тестовой клеточной системы, позволяющей проследить за перемещением AR из цитоплазмы в ядро в ответ на стимуляцию экстрактами опухолей простаты. Такие «image-based» технологии представляют собой инновационный подход к изучению биологических явлений [6, 16] и имеют практическое назначение для определения гормонального статуса опухолей.

В онкологии применяется большое число клеточных линий, представляющих из себя клеточные модели онкологических патологий, соответствующих происхождению клеток. Поскольку в живой клетке присутствует полный комплект факторов, обуславливающих функционирование молекул, ответственных за патологию, она является идеальной системой изучения роли этих молекул в патологии. Нам известно о единственной попытке разработать такую систему японскими учеными [13]. В настоящее время биосенсорные системы не имеют широкого распространения. Рак предстательной железы является идеальным кандидатом для применения клеточных биосенсорных систем. Поскольку активационные стимулы неизвестны и могут быть различны для разных больных, наличие тестовой системы, позволяющей получить представление о способности опухоли активировать рецептор, является актуальной проблемой современной онкологии. Задачей нашего исследования являлось создание чувствительной биосенсорной системы, позволяющей получить представление о способности опухоли активировать андрогеновый рецептор.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались плазмиды pECFP и pEYFP (Clontech). Плазида, экспрессирующая полноразмерный андрогеновый рецептор (изоформу 1, AR-B) была получена с помощью ПЦР с использованием праймеров: 5'-GTGGAAGATTTCAGCCAAGCTCAAGGATG-3'; 5'-ACCCAGTGAAGCATTTGGAACCC-3'. Полученный фрагмент был проклонирован в плазмиду pECFP, экспрессирующую флюоресцентный белок CFP в 3'-положении по отношению к CFP. С-терминальная часть AR была соединена с флюоресцентным белком YFP. Наличие двух флюоресцентных белков в будущем обеспечит возможность исследования изменений конформации AR в ответ

на связывание с лигандами. Мутация T877A была внесена в последовательность плазмиды методом локального мутагенеза с использованием коммерческого набора компании Stratagene. САТ кодон в положении 3738-3740 был заменен на кодон ТАС. Все вновь полученные конструкторы были верифицированы секвенированием.

Клетки HeLa росли в среде DMEM-H21 содержащей 5 % глюкозы, в присутствии 5 % БСА. Для трансфекции плазмидами CFP-AR-YFP или CFP-AR^{T877A}-YFP использовались низкопассажные стоки клеток HeLa хранящиеся в жидком азоте. Селекция стабильных клонов производилась в присутствии 700 мкг G418 на мл среды. Клетки, которые продолжали расти в присутствии неомицина в течение двух и более недель, были рассеяны методом лимитирующего разведения до одной клетки на одну лунку в 384-луночный планшет. Клетки, экспрессирующие CFP-AR-YFP или CFP-AR^{T877A}-YFP, были идентифицированы методом сканирования 384-луночных планшетов с помощью высокопропускного микроскопа ImageXpress Micro (Molecular Devices, Sunnyvale, USA).

Для стабильного мечения ядер клеток вновь полученных нами линий HeLa, были созданы конструкторы, кодирующие по две копии белка mCherry (для CFP-AR-YFP) или mPlum (CFP-AR^{T877A}-YFP), разделенные сигнальной последовательностью доставки в ядро. Удвоенные копии белков mCherry и mPlum использовались для улучшения экспрессии и повышения удержания меченного белка в ядре за счет размера. Плазмиды mCherry-NLS-mCherry и mPlum-NLS-mPlum были трансфецированы в клетки. Стабильные клоны были отобраны по устойчивости к бластоцидину. Клетки с наиболее высоким уровнем экспрессии были охарактеризованы на способность AR перемещаться из цитоплазмы в ядро, размножены и заморожены. При использовании клеточных линий в «image-based» технологии такая маркировка ядер необходима для компьютеризированной сегрегации образов.

Клетки полученных стабильных клеточных линий выращивались в 10 см чашках в среде DMEM-H12, содержащей 5 % глюкозы. За один день до пересева клеток в лунки планшета, среда была заменена на среду, содержащую сыворотку плодов телят (5 %), освобожденную от маленьких липофильных молекул с помощью обработки активированным углем. Использование обработанной сыворотки является критичным для использования в создаваемой биосенсорной клеточной системе, поскольку необработанная сыворотка содержит неконтролируемые количества разнообразных гормонов, включая андрогены. На следующий день клетки были посеяны в лунки 384-луночного планшета в количестве 1200 клеток на лунку в среде DMEM/F12 (1:1), содержащей 5 % сыворотки плодов телят.

Чтобы выяснить применимость вновь созданных клеточных линий для их использования в качестве биосенсорной системы, мы осуществили

калибровку этих линий стероидами. Клетки на второй день были обработаны лигандами или этанолом, который использовался в качестве растворителя. На третий день плашки были подвергнуты микроскопии.

Для сбора данных использовался высокопропускной микроскоп ImageXpress Micro (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) с выдержкой 300 миллисекунд, фильтры 500Ex/542Em. Параллельно были собраны данные в канале DAPI (377Ex/447Em) для осуществления количественной обработки изображений. Для анализа данных использовались программы MetaXpress и AcuityXpress (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). MetaXpress осуществляет сегментацию и подсчеты. AcuityXpress — это база данных, позволяющая осуществлять доступ к данным и результатам анализов и визуализировать результаты анализа данных.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы Prism (GraphPad Software) которая позволяет строить графики и рассчитывать EC50.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Чтобы определить достоверность и воспроизводимость биосенсорной системы, основанной на количественной оценке транслокации AR из цитоплазмы в ядро, мы провели серию экспериментов с натуральными лигандами AR, тестостероном (Т) и дегидротестостероном (DHT), с использованием клеточной линии, экспрессирующей дикий вариант рецептора.

В первый день эксперимента клетки HeLa, экспрессирующие CFP-AR-YFP, были засеяны в 384-луночные планшеты. Во второй день эксперимента была проведена обработка стероидами в формате серии трехкратных разведений. В третий день плашки подвергали микроскопии с помощью высокопропускного микроскопа. Полученные нами значения EC50 представлены в таблице 1. Эти значения EC50 характеризуются прекрасной воспроизводимостью, которая следует из очень маленьких значений стандартных отклонений.

Таблица 1
Значения EC50, полученные с помощью биосенсорной системы

AR дикого типа, log EC50 (M)	Т	DHT
Среднее значение log EC50	-8.9175	-9.4583
Стандартное отклонение log EC50	0.1499	0.2081

Кроме того, была проведена серия аналогичных экспериментов с набором стероидных соединений. Эти эксперименты продемонстрировали, что AR дикого типа высокоспецифичен только для натуральных лигандов (Т и DHT) и не может быть использован для выявления активности неспецифичных лигандов (данные не приведены). Поэтому в дальнейшей работе мы исследовали возможность использования AR^{T877A}.

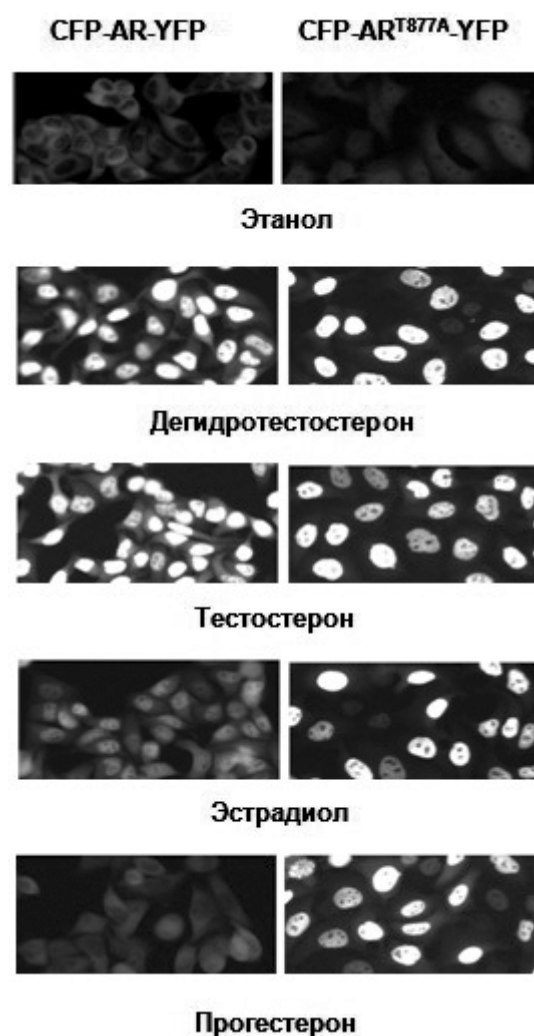


Рис. 1. Визуализация результатов микроскопирования клеток HeLa, стабильно экспрессирующих белки CFP-AR-YFP и CFP-AR^{T877A}-YFP после обработки соединениями. Левая панель показывает результаты по клеточной линии, экспрессирующей CFP-AR-YFP, правая панель показывает результаты по клеточной линии, экспрессирующей CFP-AR^{T877A}-YFP. Визуализация результатов проводилась с помощью высокопропускного микроскопа ImageXpress Micro (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) с выдержкой 300 миллисекунд, фильтры 500Ex/542Em.

На рисунке 1 приведены микроскопические фотографии клеток HeLa, стабильно экспрессирующих CFP-AR-YFP и CFP-AR^{T877A}-YFP. Клетки были обработаны указанными лигандами в концентрации 10⁻⁸ М или растворителем этанолом. Изображения были получены при 20-кратном увеличении объектива. Левая панель показывает результаты по клеточной линии, экспрессирующей CFP-AR-YFP, правая панель показывает результаты по клеточной линии, экспрессирующей CFP-AR^{T877A}-YFP. Полученные нами клеточные линии продемонстрировали ожидаемую реакцию на лиганды. Из представленного рисунка видно, что в отсутствие лигандов как дикий так и мутантный варианты AR остаются в цитоплазме. Оба рецептора транслоцируются в ядро при связывании со специфическими лигандами андрогенового рецептора, Т и DHT, но демонстрируют драматические различия в ответе

на обработку неспецифическими лигандами, такими как эстрадиол и прогестерон. Таким образом, мутантный рецептор представляется хорошим потенциальным биосенсором для детекции широкого спектра стероидов, которые могут присутствовать в опухоли в результате активации ферментов биосинтеза и метаболизма стероидных гормонов. Результаты количественной обработки изображений, представленных на рисунке 1, подтвердили, что мутантный вариант рецептора AR^{T877A} проявляет аномальную активацию нетипичными гормонами, эстрадиолом и прогестероном, выраженную в повышенной концентрации этого белка в ядрах клеток (рис. 2). Более того, мутантный вариант CFP-AR^{T877A}-YFP проявляет повышенную активацию в ответ на DHT и тестостерон по сравнению с диким типом рецептора.

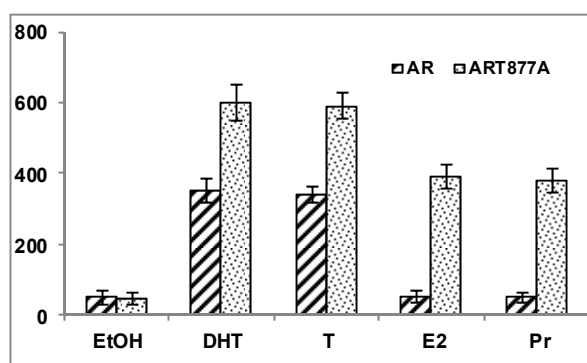


Рис. 2. Результаты количественного измерения содержания AR в ядре клеток HeLa, стабильно экспрессирующих CFP-AR-YFP и CFP-AR^{T877A}-YFP. Клетки были обработаны дигидротестостероном (DHT), тестостероном (T), эстрадиолом (E2), прогестероном (Pr) и растворителем этанолом EtOH. Все гормоны были добавлены в концентрации 10^{-7} М. * – достоверность различий по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Достоверность отличий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным критерием Tukey для определения различий между группами.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Традиционно, измерение концентрации различных молекул в компонентах клетки производится биохимическими методами. При применении биохимических методов клетки разрушаются, и теряется пространственная информация. Кроме того, измерение одного и того же образца осуществляется только один раз. Биосенсорные системы, основанные на «image-based» технологии с использованием автоматической микроскопии, позволяют оценивать пространственную информацию на фиксированных клетках, а в случае флуоресцентно меченых белков, такие технологии позволяют оценить изменения в живых клетках. Дополнительным важным преимуществом «image-based» технологий является способность изучать явления в нефиксированных клетках, минуя проблемы, связанные с артефактами фиксации. Несмотря на очевидные преимущества использования живых клеток, биосенсорные системы не получили пока широкого распространения. Поскольку рост гормо-

нально-зависимых раковых клеток стимулируется активностью стероидных рецепторов, существует возможность создания биосенсорных систем на основе этих рецепторов [7, 21].

Гормонально-зависимые онкологические состояния, такие как рак предстательной железы, являются идеальными кандидатами для применения клеточных биосенсорных систем. Целью настоящей работы являлось создание клеточной биосенсорной системы, основанной на факте, что активирование AR приводит к транслокации рецептора из цитоплазмы в ядро. Эти изменения могут быть измерены и в дальнейшем использованы для диагностики и подбора персонализированного лечения.

Первостепенной задачей настоящей работы было создание клеточной линии, стабильно экспрессирующей флуоресцентно меченный AR, на основе линии HeLa. Эти клетки были выбраны за основу, поскольку они не экспрессируют стероидогенные ферменты, следовательно, фоновый уровень гормонов в клетках низок. Необходимость создания клеточных линий, стабильно экспрессирующих AR, в отличие от технически более простого, быстрого и менее трудоемкого применения трансфекции, обусловлено тем, что при трансфекции уровни экспрессии AR значительно различаются от клетки к клетке, в то время как различия в уровне экспрессии гена AR введенного в геном клеток стабильного клона является незначительным.

Результаты, полученные на клеточной линии, стабильно экспрессирующей CFP-AR-YFP, продемонстрировали высокую специфичность рецептора к своим физиологическим лигандам, так как при использовании неспецифических стероидных гормонов не происходила активация AR. Более того, значения EC₅₀ для T и DHT соответствуют данным, представленным в литературе [8].

В случае кастрат-резистентного рака предстательной железы, AR продолжает играть ведущую роль в росте раковых клеток, но сигнальная ось, базирующаяся на AR, изменена в результате патологии, и AR изменен таким образом, что новые факторы малоисследованной природы поддерживают его в активном состоянии. Поскольку активационные стимулы неизвестны и могут быть различны для разных больных, наличие тестовой системы, позволяющей получить представление о способности опухоли активировать рецептор, является очень важным. В связи с этим, нами была создана клеточная линия, стабильно экспрессирующая мутантный вариант рецептора AR^{T877A}.

Мутация T877A была обнаружена в клеточной линии, полученной от больного кастрат-резистентным раком предстательной железы [15]. Преимущество использования мутанта AR^{T877A} заключается в том, что этот рецептор связывается как с андрогенами, так и с другими гормонами, включая эстрогены и прогестерон. Данный факт был подтвержден серией наших экспериментов. Такое поведение мутантного рецептора отражает

селекционное давление, имеющее место в организме больного, которого лечат в режиме адьювантной гормональной терапии, когда давление отбора в условиях продолжающейся доминантной роли AR в пролиферации клеток приводит к выживанию клонов, способных активироваться атипичными лигандами. Следовательно, клеточная линия, экспрессирующая CFP-AR^{T877A}-YFP, демонстрирует основные черты кастрат-резистентного рака предстательной железы, в случае которого рост опухоли продолжает стимулироваться сигнальными путями с участием AR в условиях недостаточного уровня андрогенов [2].

Таким образом, использование двух клеточных линий, полученных в ходе выполнения нашей работы, когда одна экспрессирует AR дикого типа, а другая AR^{T877A} мутант, позволит в дальнейшем наиболее полным образом оценить спектр присутствующих в экстракте опухолей гормонов и других активирующих факторов (так называемый «активационный потенциал опухоли»). Кроме того, преимуществом нашей системы является еще и тот факт, что исследования активации AR в опухолевых тканях могут проводиться на живых клетках, растущих в микролунках в объеме всего 30 микролитов. Поэтому количество используемой ткани для анализа будет минимальным при высокой статистической достоверности, обеспечиваемой большим числом клеток. Результаты по исследованию перемещения рецептора, полученные на экстрактах опухолей, планируется соотносить с калибровочными кривыми, полученными с использованием известных лигандов, что позволит, таким образом, количественно оценить гормональный статус опухоли.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 г. ГК 14.740.11.0930

ЛИТЕРАТУРА

1. Чисов В.И., Русаков И.Г. Заболеваемость раком предстательной железы в Российской Федерации // Экспериментальная и клиническая урология. — 2011. — № 2–3. — С. 6–7.
2. A differential ligand-mediated response of green fluorescent protein-tagged androgen receptor in living prostate cancer and non-prostate cancer cell lines / H. Nakauchi [et al.] // J. Histochem. Cytochem. — 2007. — Vol. 55. — P. 535–544.
3. Ahmad N., Kumar R. Steroid hormone receptors in cancer development: a target for cancer therapeutics // Cancer letters. — 2011. — Vol. 300. — P. 1–9.
4. Androgen receptor expression is associated with prostate cancer-specific survival in castrate patients with metastatic disease / M.J. Donovan [et al.] // BJU international. — 2010. — Vol. 105. — P. 462–467.
5. Characterization of nuclear import of the domain-specific androgen receptor in association with the importin alpha/beta and Ran-guanosine 5'-triphosphate systems / N. Kaku [et al.] // Endocrinol. — 2008. — Vol. 149. — P. 3960–3969.
6. Day R.N., Schaufele F. Fluorescent protein tools for studying protein dynamics in living cells: a review // J. Biomedical Optic. — 2008. — Vol. 13. — P. 031202.
7. De S., Macara I.G., Lannigan, D.A. Novel biosensors for the detection of estrogen receptor ligands // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. — 2005. — Vol. 96. — P. 235–244.
8. Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays / E. Sonneveld [et al.] // Toxicol Sci. — 2005. — Vol. 83, № 1. — P. 136–148.
9. Dutt S.S., Gao A.C. Molecular mechanisms of castration-resistant prostate cancer progression // Fut. Oncol. — 2009. — Vol. 5. — P. 1403–1413.
10. Gonzalez-Angulo A.M., Morales-Vasquez F., Hortobagyi G.N. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer // Adv. Exp. Med. Boil. — 2007. — Vol. 608. — P. 1–22.
11. High level of androgen receptor is associated with aggressive clinicopathologic features and decreased biochemical recurrence-free survival in prostate: cancer patients treated with radical prostatectomy / R. Li [et al.] // Am. J. Surg. Pathol. — 2004. — Vol. 28. — P. 928–934.
12. Imaging local estrogen production in single living cells with recombinant fluorescent indicators / F. Picazo [et al.] // Biosens. Bioelectron. — 2010. — Vol. 26. — P. 2147–2153.
13. Intracrinology of estrogens and androgens in breast carcinoma / H. Sasano [et al.] // J. Steroid Biochem. Mol. Boil. — 2008. — Vol. 108. — P. 181–185.
14. Rastelli F., Crispino S. Factors predictive of response to hormone therapy in breast cancer // Tumori. — 2008. — Vol. 94. — P. 370–383.
15. Systematic structure-function analysis of androgen receptor Leu701 mutants explains the properties of the prostate cancer mutant L701H / D.J. Wijnngaart [et al.] // J. Biol. Chem. — 2010. — Vol. 285, № 7. — P. 5097–5105.
16. Systems cell biology based on high-content screening / K.A. Giuliano [et al.] // Methods. Enzymol. — 2006. — Vol. 414. — P. 601–619.
17. Scher H.I., Sawyers C.L. Biology of progressive, castration-resistant prostate cancer: directed therapies targeting the androgen-receptor signaling axis // J. Clin. Oncol. — 2005. — Vol. 23. — P. 8253–8261.
18. Taplin M.E. Androgen receptor: role and novel therapeutic prospects in prostate cancer // Expert Rev. Anticancer Ther. — 2008. — Vol. 8. — P. 1495–1508.
19. Trafficking of nuclear receptors in living cells / G.L. Hager [et al.] // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. — 2000. — Vol. 74. — P. 249–254.
20. Vasaitis T.S., Bruno R.D., Njar V.C. CYP17 inhibitors for prostate cancer therapy // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. — 2011. — Vol. 125, № 1–2. — P. 23–31.
21. Visualizing the action of steroid hormone receptors in living cells / A. Griekspoor [et al.] // Nucl. Recap. Signal. — 2007. — Vol. 5. — P. e003.

Сведения об авторах

Хвостова Екатерина Петровна – младший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения «НИИ Молекулярной биологии и биофизики СО РАМН», инженер Научно-исследовательской части Новосибирского национального исследовательского университета (ул. Академика Тимакова 2, Новосибирск, 630117, Россия ivanovakatysha@mail.ru)

Пустыльник Владимир Олегович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения «НИИ Молекулярной биологии и биофизики СО РАМН», старший преподаватель кафедры фундаментальной медицины медицинского факультета Новосибирского национального исследовательского государственного университета (ул. Академика Тимакова 2, Новосибирск, 630117, Россия)

Корбут Антон Иванович – студент 5 курса медицинского факультета Новосибирского национального исследовательского университета

Отпущенников Алексей Александрович – врач урологического отделения Центральной клинической больницы СО РАН (ул. Пирогова 25, Новосибирск, 630090, Россия)

Гуляева Людмила Федоровна – доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией молекулярных механизмов канцерогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения «НИИ Молекулярной биологии и биофизики СО РАМН», профессор кафедры клинической биохимии медицинского факультета Новосибирского национального исследовательского государственного университета, (ул. Академика Тимакова 2, Новосибирск, 630117, Россия)

Крылова Ирина Николаевна – научный сотрудник Научно-исследовательской части Новосибирского национального исследовательского государственного университета (ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия)