

Исследование цитостатических и цитотоксических свойств модифицированных пептидных ингибиторов CDK4/6, функциональных аналогов p16INK4a (90-97)

В.К. Боженко, Т.М. Кулинич, Е.А. Кудинова, А.В. Иванов, А.М. Шишкин, В.А. Солодкий

ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Профсоюзная, 86

Контакты: Владимир Константинович Боженко vbojenko@mail.ru

Введение. Использование методов математического моделирования для поиска биологически активных молекул – перспективное направление современной науки. Применение численных алгоритмов для оптимизации пептидных последовательностей и методов молекулярной динамики позволило получить модифицированные пептидные последовательности, являющиеся функциональными аналогами последовательности естественного ингибитора циклиновой киназы 4/6 – p16INK4a.

Цель исследования – определение биологических свойств пептидных последовательностей, ингибиторов CDK4/6, полученных с помощью методов математического моделирования.

Материалы и методы. Исследования проведены в условиях *in vitro* на линиях опухолевых клеток (MCF-7, A549, SKOV-3, HCT116). Методом проточной цитофлуориметрии были определены уровень апоптоза, распределение клеток по фазам клеточного цикла, изменение экспрессии белка Bcl-2, изменение уровня фосфорилированного pRb при воздействии на клетки исследуемых пептидных последовательностей. С помощью биосенсорной технологии RTCA iCELLigence проведена оценка динамики пролиферации клеточных популяций.

Результаты. Пептидные последовательности, полученные с помощью методов математического моделирования, при воздействии на активно пролиферирующие клетки вызывают снижение уровня фосфорилированного pRb, снижение экспрессии Bcl-2, которые являются молекулярными «мишенями» комплекса циклинзависимая киназа 4/6–циклин D, и изменение уровней pRb и Bcl-2 может свидетельствовать об ингибировании образования комплекса. Как следствие, наблюдались снижение пролиферативной активности и увеличение уровня апоптоза в клетках. Эффективность пептидных последовательностей зависела от молекулярной структуры, типа клеточной линии, на которую происходит воздействие. Показано, что 2 исследованные модифицированные пептидные последовательности оказывают на опухолевые клетки антипролиферативный и проапоптотический эффекты в большей степени, чем исходная последовательность p16INK4a (90-97).

Заключение. Использование методов математического моделирования для поиска и разработки функционально активных молекул позволило создать пептидные последовательности, обладающие более выраженными свойствами ингибиторов циклиновых киназ, чем естественный ингибитор CDK4/6 – p16INK4a.

Ключевые слова: ингибитор циклиновых киназ, интернализуемые пептиды, циклин, метод математического моделирования

Для цитирования: Боженко В.К., Кулинич Т.М., Кудинова Е.А. и др. Исследование цитостатических и цитотоксических свойств модифицированных пептидных ингибиторов CDK4/6, функциональных аналогов p16INK4a (90-97). *Успехи молекулярной онкологии* 2020; 7(4):37–45.

DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-4-37-45



Study of cytostatic and cytotoxic characteristics of modified peptide CDK4/6 inhibitors – functional analogs of p16INK4a (90-97)

V.K. Bozhenko, T.M. Kulinich, E.A. Kudinova, A.V. Ivanov, A.M. Shishkin, V.A. Solodkiy

Russian Scientific Center of Roentgenoradiology, Ministry of Health of Russia; 86 Profsovnaya St., Moscow 117997, Russia

Background. Application of mathematical modeling for search for biologically active molecules is currently a promising scientific approach. Application of numerical algorithms for optimization of peptide sequences and molecular dynamics allowed to obtain modified peptide sequences that are functional analogs of the sequence of natural inhibitor of cyclin-dependent kinase 4/6 p16INK4a.

The study objective is to establish biological characteristics of peptide sequences of CDK 4/6 inhibitors obtained using mathematical modeling.

Materials and methods. The studies were performed *in vitro* using tumor cell lines (MCF-7, A549, SKOV-3, HCT116). Apoptosis level, cell distribution per cell cycle stages, changes in Bcl-2 expression, changes in the level of phosphorylated pRb under the effect of the studied molecules were investigated using flow cytometry. Proliferation dynamics of cell populations were studied using RTCA iCELLigence biosensor technology.

Results. Peptide sequences obtained using mathematical modeling decrease the level of phosphorylated pRb, Bcl-2 expression when applied to actively proliferating cells. These proteins serve as molecular targets for the cyclin-dependent kinase 4/6–cyclin D complex, and changes in pRb and Bcl-2 levels might indicate inhibition of complex formation. Consequently, decreased proliferative activity and increased apoptosis were observed. Effectiveness of the peptide sequences depended on their molecular structure and type of the used cell line. Two (2) of the studied modified peptide sequences have higher antiproliferative and proapoptotic effect on tumor cells than native p16INK4a (90-97) sequence.

Conclusion. Application of mathematical modeling for search and development of functionally active molecules allowed to create peptide sequences with stronger cyclin-dependent kinase inhibitor effect than p16INK4a, the native inhibitor CDK4/6.

Key words: cyclin dependent kinase inhibitor, internalized peptides (cell-penetrating peptides, CPP), cyclin, mathematical modeling method

For citation: Bozhenko V.K., Kulinich T.M., Kudinova E.A. et al. Study of cytostatic and cytotoxic characteristics of modified peptide CDK4/6 inhibitors – functional analogs of p16INK4a (90–97). *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2020;7(4):37–45. (In Russ.).

Введение

Циклинзависимые киназы (cyclin-dependent kinases, CDKs) образуют семейство гетеродимерных киназ, играющих центральную роль в регуляции клеточного цикла, транскрипции и других важных биологических процессах, включая ангиогенез, протеолиз, гемопоэз, сперматогенез, репарацию повреждений ДНК, сплайсинг, регуляцию транскрипции и т. д. [1]. Первые описания CDKs характеризовали их как направленные регуляторы роста и деления клеток, контролеры прохождения клеточного цикла через последовательное фосфорилирование субстратов [2, 3]. Однако CDKs экспрессируются и обнаруживаются на всем протяжении клеточного цикла, они неактивны в мономерной форме, но, связываясь с белками семейства циклинов, образуют функционально активные гетеродимерные комплексы [4, 5]. В то же время циклины, «партнеры» CDKs, имеют разный концентрационный уровень в различных фазах клеточного цикла, т. е. пространственно-временные профили активности комплексов CDK–циклин, регулируются именно циклинами [6]. Изменение уровней экспрессии и деградации циклинов, а также их структурные и молекулярные особенности обеспечивают способность и своевременное взаимодействие с CDKs и тем самым определяют упорядоченное формирование различных последовательных комплексов CDK–циклин на протяжении клеточного цикла.

Важную функцию регуляторов процессов пролиферации несут ингибиторы циклиновых киназ (CKIs). В настоящее время описано большое количество так называемых структурных CKIs. Наиболее изученными CKIs являются белки 2 семейств – INK4 и CIP/KIP, при взаимодействии CKIs с CDKs происходят конформационные трансформации последних, что препятствует образованию комплексов CDK–циклин [7]. Дисрегуляция циклиновых комплексов отмечается при многих типах онкологических заболеваний, что приводит к нарушению координации клеточного цикла и процессов пролиферации, способствует бесконтрольному клеточному росту [8]. Фактически вместе с мутациями в протоонкогенах мутации, приводящие к гиперактивации CDKs, наиболее часто обнаруживаются в геноме опухолей. Такие мутации обеспечивают клеткам преимущество в росте, а мутации генов-супрессоров опухоли или генов, ответственных за прохождение контрольных точек (checkpoint), приводят к отсутствию контроля пролиферации [2, 9].

Структура и молекулярные механизмы регуляции CDKs достаточно хорошо изучены и описаны в настоящее время, являются научной основой для поиска и разработки лекарственных препаратов – ингибиторов CDKs. Однако большинство CDKs представляют собой трудно уязвимую терапевтическую мишень в силу своих структурных особенностей [10, 11]. Ранее нами была разработана стратегия, объединяющая методы компьютерного моделирования, белкового докинга и молекулярной динамики, направленная на поиск биологически активных пептидных конструкций, в частности ингибиторов CDK4/6 [12, 13].

С помощью методов математического моделирования нам удалось минимизировать исходную функциональную последовательность из ингибитора комплекса CDK4/6–циклин D–p16INK4a. Поисковый анализ оптимальной пептидной последовательности выполняли с помощью программной реализации модели полноатомной молекулярной динамики в неявном и явном растворителях, интеграции разработанных моделей в единую гетерогенную вычислительную систему, проведение численных расчетов – с использованием разработанной гетерогенной вычислительной системы для оптимизации пептидных последовательностей на основе белка p16INK4a. Далее с помощью метода нормальных мод был проведен анализ комплекса p16INK4a–CDK6–циклин D, что позволило найти его собственные частоты и, используя эти значения при анализе комплексомодифицированной последовательности CDK6–циклин D, рассчитать свободную энергию связи (док-баллы) для каждой из анализируемых последовательностей (всего проанализировано 40 вариантов). На основании проведенных расчетов выбраны 4 пептидные последовательности с наиболее высокими значениями энергии взаимодействия с CDK6. Данные последовательности были синтезированы, и результаты экспериментов по изучению их эффектов представлены в настоящей статье.

Цель исследования – определение биологических свойств пептидных последовательностей, ингибиторов CDK4/6, полученных с помощью методов математического моделирования.

Материалы и методы

Объектом исследования явились 4 пептидных последовательности (F26K-1, F26K-2, W26K-1, W26K-2),

потенциальные ингибиторы образования комплекса CDK4/6–циклин D, полученные с помощью методов математического моделирования. Сравнение биологических свойств проведено с пептидом, функциональным фрагментом p16INK4a (90-97) [14, 15]. Для обеспечения внутриклеточного транспорта все исследуемые последовательности включали CPP (cell-penetrating peptide) – Antennapedia (Antp).

Исследование проводили *in vitro* на культивируемых клетках линий опухолей человека: MCF-7 (рак молочной железы), A549 (аденокарцинома легкого), SKOV-3 (рак яичника) и HCT116 (аденокарцинома толстой кишки). Клетки культивировали в стандартных условиях: 37 °C, 5 % CO₂, среда DMEM (ПанЭко), содержащая 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (ПанЭко), 50 мкг/мл гентамицина и 2 мМ L-глутамина. Пересев клеток осуществляли таким образом, чтобы на момент добавления к среде исследуемых пептидных последовательностей конfluence составляла 40–50 %.

Анализ выполняли на проточном цитофлуориметре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США). Для определения уровня апоптоза и некроза использовали набор AnnexinV-FITC Kit – Apoptosis Detection Kit (Beckman Coulter, Inc, Франция). В качестве методов оценки эффективности модифицированных последовательностей с помощью моноклональных антител было проведено определение уровня белка Bcl-2 (Anti Human Bcl-2) (Caltag Laboratories, США) и уровня гипофосфорилированного pRb (Mouse anti-Rb (pS780); Weston, Dickinson and Company, США). Фиксацию и окраску образцов проводили в соответствии с указаниями инструкций к антителам.

Для анализа фаз клеточного цикла выполняли предварительную синхронизацию культур методом обедненной культуральной среды (24 ч 1 % ЭТС) [16], в образцах оценивали процентное распределение клеток в фазах клеточного цикла по содержанию ДНК, окраске фиксированных образцов раствором пропидия йодида. Анализ ДНК-гистограмм проводили с помощью программы ModFit 3.0.

Динамику пролиферации клеточных популяций оценивали с помощью биосенсорной технологии RTCA iCELLigence (ACEA Biosciences) по изменению показателя «клеточный индекс». Принцип метода основан на измерении клеточного сопротивления электродами, располагающимися на дне лунки планшета. В присутствии клеток они присоединяются к сенсорной поверхности электрода и действуют как изолятор, что приводит к изменению локального ионного окружения на границе раствора/электрода и увеличению сопротивления. Таким образом, чем больше клеток располагается на электроде, тем сильнее меняется сопротивление этого электрода. Основным показателем, который оценивали методом RTCA iCELLigence, является клеточный индекс (КИ), рассчитываемый по формуле:

$$\text{КИ} = \frac{(\text{импеданс в определенный момент времени } n) - (\text{импеданс в отсутствие клеток})}{(\text{номинальное значение импеданса})}$$

Значения импеданса зависят от количества адгезированных клеток, их размера и формы, а также от силы адгезии к субстрату.

Анализ и статистическую обработку результатов проводили с помощью функций пакетов анализа Microsoft Excel 2016 и Statistic 10. Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Исследование проапоптотической активности. Показано, что пептидные последовательности p16INK4a-Antp, F26K-1, F26K-2, W26K-1, W26K-2 увеличивают уровень апоптоза в культурах пролиферирующих клеток. При внесении контрольной последовательности p16INK4a-Antp в концентрации 10 мкМ и инкубации в течение 24 ч увеличение уровня апоптоза наблюдалось в пределах $5 \pm 1,6$ %, при концентрации 40 мкМ уровень апоптоза возрастал до $34 \pm 7,4$ %. Исследуемые пептидные последовательности в концентрациях 10 и 40 мкМ вызывали увеличение уровня апоптоза в культурах опухолевых клеток, однако уровень апоптоза зависел как от структуры пептидной последовательности, так и от типа клеточной линии. На рис. 1 представлены диаграммы изменения уровня апоптоза в культурах HCT116 и MCF-7 относительно контрольного значения – апоптоза, индуцированного внесением последовательности p16INK4a-Antp. Наибольший проапоптотический эффект на исследуемые клетки оказывали последовательности F26K-1 и F26K-2. Так, при инкубации клеток линии HCT116 с последовательностью F26K-2 (10 мкМ) уровень апоптоза более чем в 4 раза выше, чем при инкубации с исходной последовательностью p16INK4a-Antp (10 мкМ) (см. рис. 1а).

При исследовании уровня апоптоза клеток линии MCF-7 (см. рис. 1б) показана большая их чувствительность к воздействию естественного ингибитора CDK4/6 (p16INK4a-Antp), уровень апоптоза при инкубации в течение 24 ч с p16INK4a-Antp в концентрации 10 мкМ составил $24 \pm 2,9$ %, что статистически значимо выше, чем при воздействии p16INK4a-Antp в той же дозе на клетки HCT116 ($5 \pm 1,6$ %). Искусственные ингибиторы CDK4/6 (F26K-1, F26K-2, W26K-1, W26K-2) в концентрации 10 мкМ оказывали меньший проапоптотический эффект, чем p16INK4a-Antp. Более высокий уровень апоптоза наблюдался только при воздействии последовательностей F26K-1 и F26K-2 в концентрации 40 мкМ. Апоптоз, индуцируемый последовательностями W26K-1, W26K-2, в обеих исследуемых концентрациях был ниже, чем при воздействии последовательности естественного ингибитора CDK4/6.

Таким образом, для культур HCT116 и MCF-7 было получено, что пептидная последовательность

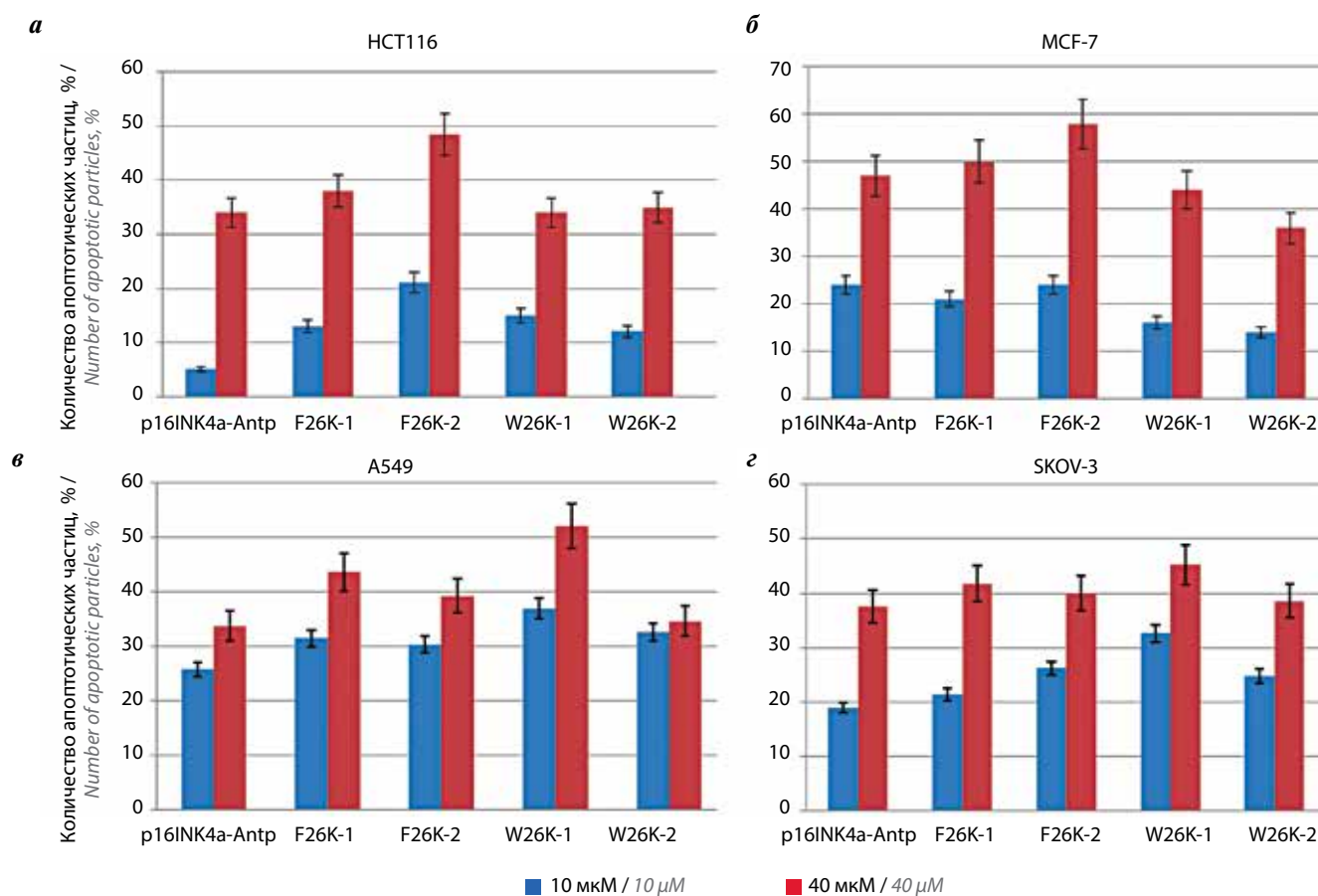


Рис. 1. Сравнение уровней апоптоза в культурах клеток HCT116 (а), MCF-7 (б), A549 (в) и SKOV-3 (г) при инкубации с естественным ингибитором CDK4/6 (p16INK4a-Antp) и пептидными последовательностями, полученными с помощью методов математического моделирования (F26K-1, F26K-2, W26K-1, W26K-2), искусственными ингибиторами CDK4/6, в концентрациях 10 и 40 мкМ. Время инкубации 24 ч

Fig. 1. Comparison of apoptosis levels in cultures of HCT116 (a), MCF-7 (б), A549 (в) and SKOV-3 (г) cells incubated with native CDK4/6 inhibitor CDK4/6 (p16INK4a-Antp) and artificial CDK 4/6 inhibitors – peptide sequences obtained using mathematical modeling (F26K-1, F26K-2, W26K-1, W26K-2); concentrations were 10 and 40 μM. Duration of incubation was 24 hours

F26K-2 (H-Phe-Leu-Asp-Ala-Ile-Leu-Leu-Ile-Ahx) обладает наиболее выраженным проапоптотическим действием по сравнению с естественным ингибитором CDK4/6—циклин D (p16INK4a-Antp) и другими исследованными последовательностями.

При исследовании проапоптотического эффекта пептидных последовательностей на культуры A549 и SKOV-3 показано, что в отношении данных культур наибольшую эффективность оказывают последовательности F26K-1 и W26K-1 (см. рис. 1в, г). Так, для культуры A549 при концентрации последовательностей 40 мкМ и времени инкубации 24 ч уровень апоптоза имел значения $43,5 \pm 4,8$ и $52,1 \pm 5,7$ % соответственно для последовательностей F26K-1 и W26K-1; при воздействии на клетки p16INK4a-Antp уровень апоптоза составил $33,8 \pm 8,4$ %. Уровень апоптоза клеток линии SKOV-3 повышался до $41,8 \pm 6,2$ % при 24-часовой инкубации с F26K-1 (40 мкМ) и до $45,2 \pm 8,9$ % при воздействии W26K-1 (40 мкМ); количество апоптотических частиц в образцах, инкубированных в течение 24 ч с контрольной последовательностью p16INK4a-Antp (40 мкМ), составило $37,6 \pm 5$ %.

Исследование цитостатического эффекта. Анализ цитостатической активности исследуемых ингибиторов CDK4/6 проводили на предварительно синхронизированных в G_0 -фазе клетках, исследуемые пептиды вносили в культуральную среду одновременно со снятием блока синхронизации. Изменения пролиферативной активности клеток оценивали методом проточной цитометрии и с помощью системы RTCA iCELLigence. Оценка ДНК-гистограмм распределения клеток по фазам клеточного цикла, полученных с помощью метода проточной цитофлуориметрии, показала, что исследуемые последовательности, ингибиторы CDK4/6, способны снижать пролиферативную активность делящихся клеток (см. таблицу, рис. 2а, б).

Данный эффект выражается в снижении количества клеток в фазах клеточного цикла S и G_2/M , причем наибольшие различия обнаружены между значениями S-фазы опытных образцов и контрольных образцов после 6 ч снятия блока синхронизации и инкубации опытных образцов с исследуемыми последовательностями. В образцах негативного контроля (без воздействия исследуемых последовательностей)

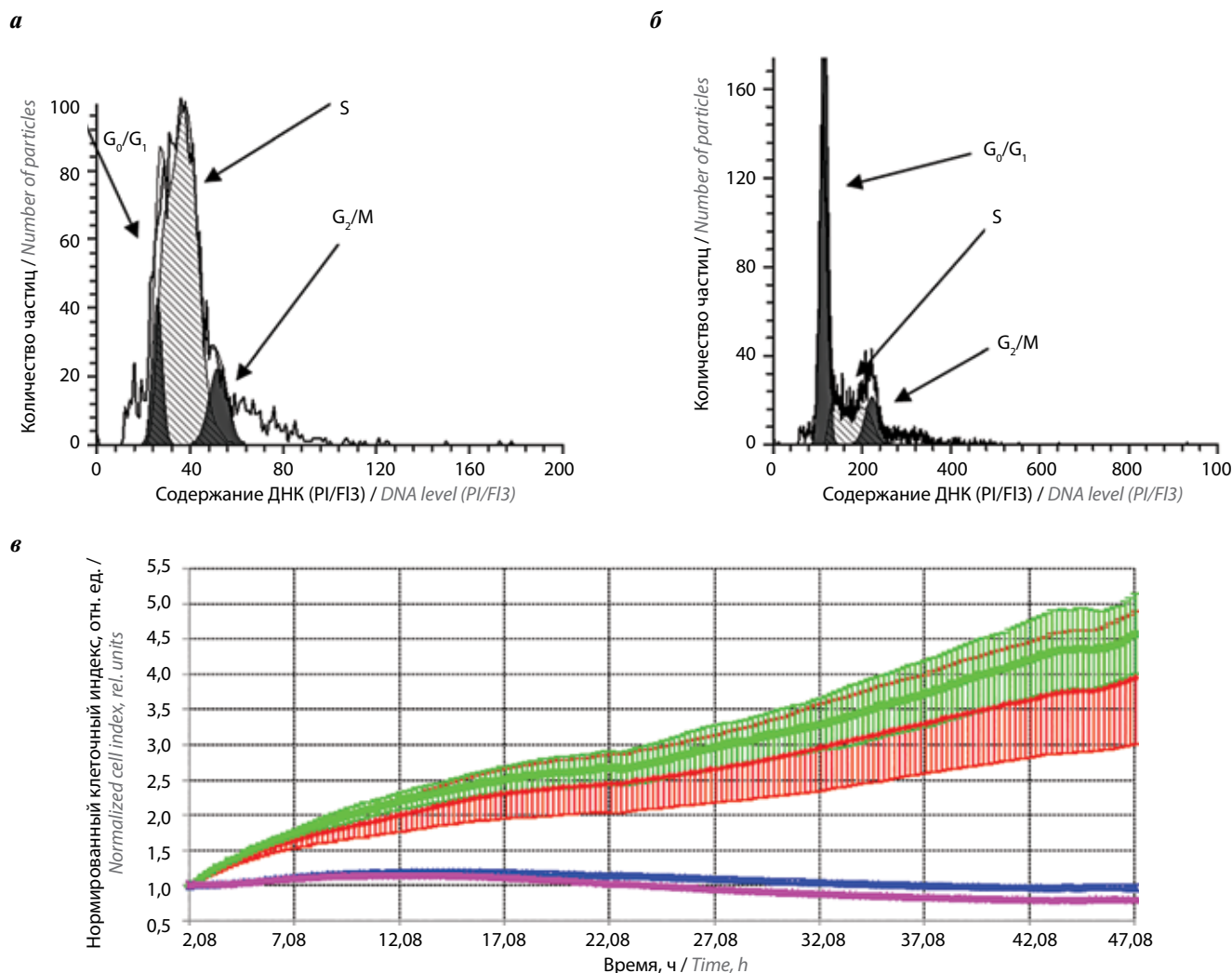


Рис. 2. Изменение пролиферативной активности клеток культур MCF-7 и A549 при воздействии исследуемых пептидных ингибиторов CDK4/6: а – гистограмма распределения клеток по фазам клеточного цикла в контрольных образцах линии MCF-7 через 6 ч после снятия блока синхронизации (G_0/G_1 –10,52 %; G_2/M – 10,84 %; S-фаза – 78,63 %); б – гистограмма распределения клеток по фазам клеточного цикла в образцах линии MCF-7 при воздействии пептидной последовательности F26K-2 в концентрации 40 мкМ через 6 ч после снятия блока синхронизации (G_0/G_1 –71,97 %; G_2/M – 8,76 %; S-фаза – 19,27 %); в – изменение нормированного клеточного индекса, определяемого с помощью биосенсорной технологии RTCA iCELLigence. По оси ординат – показатель «клеточный индекс», определяемый на основе непрерывного измерения импеданса в ячейке с клеточной культурой A549. Красная кривая соответствует интактной культуре (негативный контроль), зеленая – культуре с добавлением CPP (cell-penetrating peptide) – Antennapedia – интернализуемого вектора (10 мкМ), синяя – последовательность F26K-2 (10 мкМ), сиреневая – W26K-2 (10 мкМ)

Fig. 2. Changes in proliferative activity of MCF-7 and A549 cell cultures under the effect of the studied peptide CDK 4/6 inhibitors: а – histogram of cell distribution per cell cycle stages in the control samples of MCF-7 line 6 hours after synchronization block removal (G_0/G_1 –10.52 %; G_2/M – 10.84 %; S-phase – 78.63 %); б – histogram of cell distribution per cell cycle stages in the MCF-7 cell line under the effect of 40 μM of F26K-2 6 hours after synchronization block removal (G_0/G_1 –71.97 %; G_2/M – 8.76 %; S-phase – 19.27 %); в – changes in normalized cell index determined using RTCA iCELLigence biosensor technology. Y-axis – cell index determined using continuous impedance measurement in a well with A549 cell culture. Red line shows intact culture (negative control), green – culture with CPP (cell-penetrating peptide) – Antennapedia – internalization vector (10 μM), blue – F26K-2 sequence (10 μM), purple – W26K-2 (10 μM)

в интервале от 0 до 6 ч после снятия блока синхронизации был отмечен рост количества клеток в S-фазе от $4,6 \pm 3$ % в нулевой точке до $71,3 \pm 6,5$ % через 6 ч, после чего наступало снижение уровня S-фазы (см. таблицу).

При добавлении исследуемых пептидных последовательностей в концентрации 40 мкМ средний уровень S-фазы после 6 ч инкубации составил $19,2 \pm 4$ %, причем достоверных различий между значениями для разных последовательностей и исследуемых

клеточных культур не отмечено. При исследовании воздействия концентрации 10 мкМ с помощью метода проточной цитометрии значимых различий между негативным контролем и опытными образцами не получено.

Анализ распределения популяций по фазам клеточного цикла показал, что внесение в культуральную среду исследуемых последовательностей приводит к задержке «входа» клеток в S-фазу. Если в образцах негативного контроля (не подвергшихся воздействию

Средние значения количества клеток в S-фазе клеточного цикла в зависимости от времени инкубации в культурах HCT116, MCF-7, A549, SKOV-3 при воздействии пептидных последовательностей, ингибиторов CDK6, в концентрации 40 мкМ, %

Mean cell numbers in the S-phase depending on incubation time in HCT116, MCF-7, A549, SKOV-3 cell lines under the effect of 40 μM of peptide sequences – CDK6 inhibitors, %

Клеточная культура Cell line	Пептидная последовательность, концентрация, мкМ Peptide sequence concentration, μM	Время инкубации, ч Incubation time, h						
		0	2	4	6	8	10	12
HCT116	Негативный контроль Negative control	5,2	17,8	36,1	62,8	42,1	38,1	29,4
	p16INK4a, 40	2,6	3,2	10,6	21,5	39,5	33,1	16,05
	F26K-1, 40	4,8	4,2	8,4	19,7	34,2	26,2	14,05
	F26K-2, 40	5,3	2,8	9,1	24,7	43,5	31,6	16,9
	W26K-1, 40	1,9	5,6	10,5	25	40,2	31,6	17,75
	W26K-2, 40	3,1	3,1	11,2	22,4	42,6	35,9	16,8
MCF-7	Негативный контроль Negative control	5,6	16,2	42,1	78,6	54,1	28,1	40,3
	p16INK4a, 40	3,7	6,5	12,6	17,5	32,4	32,5	12,05
	F26K-1, 40	4,2	4,8	15,8	16	21,6	28,4	15,9
	F26K-2, 40	6,9	5,6	12,3	19,3	30,2	32,2	15,8
	W26K-1, 40	3,3	3,9	11,4	18,3	26,4	27,4	12,35
	W26K-2, 40	4,8	6,1	12,2	16,4	32,8	26,4	14,3
A549	Негативный контроль Negative control	2,4	9,7	32,9	71,2	43,2	25,7	32,5
	p16INK4a, 40	3,7	6,1	13,8	21,5	32,6	33,6	17,65
	F26K-1, 40	6,1	7,2	10,6	16,3	21,6	28,9	13,45
	F26K-2, 40	4,2	5,3	14,3	19,4	29,5	29	16,85
	W26K-1, 40	6,4	6,6	13,5	21,3	31,4	35,1	17,4
	W26K-2, 40	3,1	5,7	14,6	23,2	29,7	31,5	18,9
SKOV-3	Негативный контроль Negative control	4,3	14,2	32,5	72,5	45,1	35,6	35,4
	p16INK4a, 40	4,6	3,9	13,6	19,5	32,7	36,1	16,55
	F26K-1, 40	7,2	3,6	12,1	18,3	33,4	35	15,2
	F26K-2, 40	5,4	5,1	12,9	16,2	41,5	38,4	14,55
	W26K-1, 40	6,6	3,8	10,4	21,2	42,2	41,9	15,8
	W26K-2, 40	5,3	4,3	13,7	16,9	39,4	32,1	15,3

исследуемых последовательностей) доля клеток в S-фазе начинает возрастать сразу после снятия блока синхронизации и увеличивается с $4,4 \pm 1,4$ % в нулевой точке до $14,5 \pm 3,5$ % через 2 ч, то в опытных образцах с пептидными ингибиторами CDK6 доля популяции клеток в S-фазе возрастает только через 8 ч после исключения синхронизирующего фактора. Таким образом, определена задержка на уровне первой рестрикционной точки, переход G_1-S . В исследова-

ниях изменений распределения клеток по фазам клеточного цикла, проведенных методом проточной цитометрии, не выявлено значимых различий между воздействием пептидных последовательностей.

С помощью биосенсорной технологии RTCA iCELLigence было показано достоверное различие в пролиферативной активности клеток, подвергшихся воздействию исследуемых ингибиторов CDK6. На рис. 2в представлен пример графика изменения

нормированного клеточного индекса, определяемого с помощью биосенсорной технологии RTCA iCELLigence. Показано, что последовательности F26K-2, W26K-2 в концентрации 10 мкМ способны вызывать угнетение пролиферации, выражающееся в отсутствии роста показателя клеточного индекса, данный эффект был

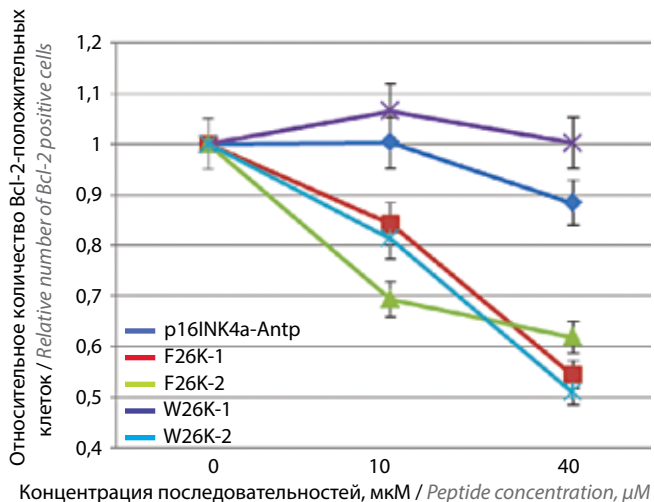


Рис. 3. Изменение относительного уровня экспрессии белка Bcl-2 в клетках линии HCT116 при инкубации с последовательностями p16INK4a-Antrp, F26K-1, F26K-2, W26K-1, W26K-2. За «1» принято значение уровня Bcl-2 в образцах негативного контроля, не подвергшихся воздействию исследуемых пептидных последовательностей – ингибиторов CDK4/6. Время инкубации 24 ч

Fig. 3. Changes in relative expression level of Bcl-2 in HCT116 cell line after incubation with p16INK4a-Antrp, F26K-1, F26K-2, W26K-1, W26K-2 sequences. Level of Bcl-2 in negative control samples without treatment with the studied peptide sequences – CDK4/6 inhibitors are denoted as 1. Incubation time was 24 h

продемонстрирован для всех исследуемых клеточных культур. Последовательности F26K-1 и W26K-1 также оказывали цитостатический эффект, выражающийся в снижении клеточного индекса, однако при концентрации 10 мкМ эффект был слабее и происходило незначительное увеличение клеточного индекса (от 1,5 до 1,8). При концентрации 40 мкМ последовательности F26K-1 и W26K-1 оказывали стойкий цитостатический эффект.

Оценка специфической эффективности пептидных ингибиторов CDK6. Исследование специфической эффективности пептидных ингибиторов CDK6 включало определение уровня белка Bcl-2 и уровня фосфорилированного pRb в клетках HCT116. Культура HCT116 была выбрана на основании ранее проведенных собственных исследований и данных литературы, показывающих, что пролиферация клеток HCT116 эффективно блокируется ингибиторами CDKs, в том числе p16INK4a [17, 18]. Методом проточной цитофлуориметрии была проведена оценка изменения уровня белка Bcl-2 в клетках линии HCT116. Показано, что последовательности F26K-1, F26K-2, W26K-2 способны ингибировать экспрессию белка Bcl-2, достоверно снижая уровень Bcl-2 более чем на 20 % (рис. 3). Для последовательностей p16INK4a-Antrp и W26K-1 в концентрациях 10 и 40 мкМ не получено достоверных различий в уровне Bcl-2 по сравнению с негативным контролем.

Результаты проведенного исследования изменения уровня фосфорилированного pRb при воздействии на клетки HCT116 пептидных ингибиторов CDK4/6 показали, что все исследуемые последовательности

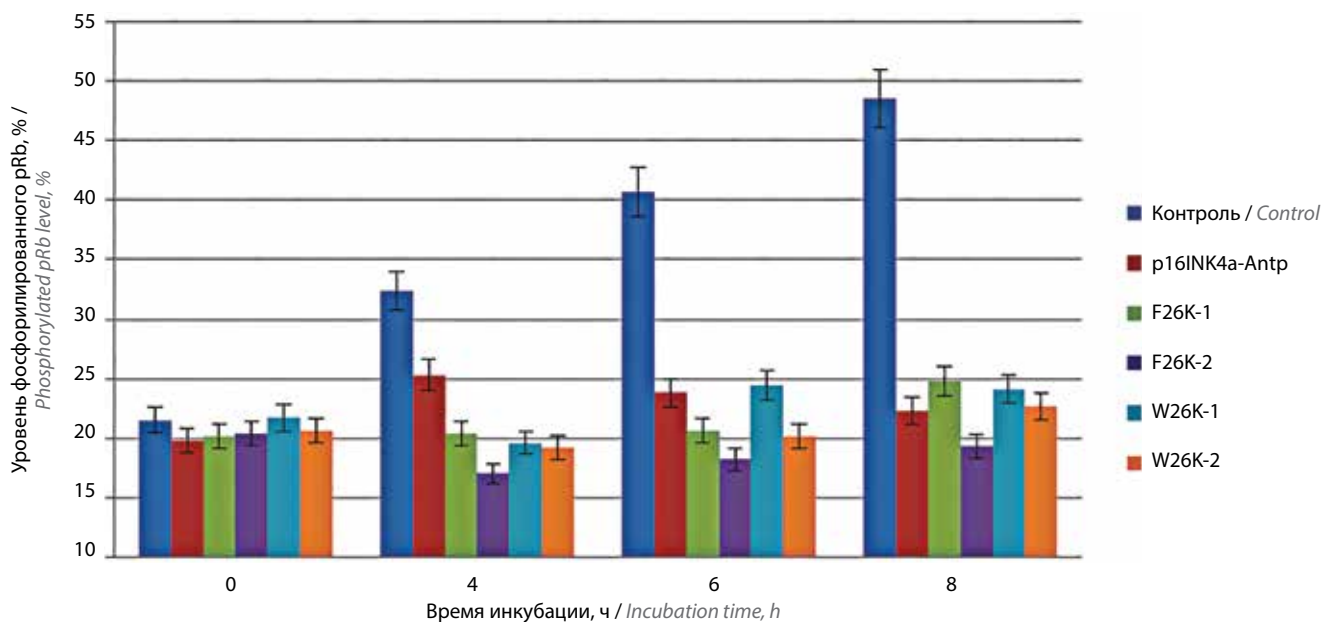


Рис. 4. Оценка изменений уровня фосфорилированного pRb в клетках линии HCT116 при воздействии пептидных последовательностей p16INK4a-Antrp, F26K-1, F26K-2, W26K-1, W26K-2 в концентрациях 40 мкМ. Анализ проведен через 4, 6 и 8 ч после снятия блока синхронизации

Fig. 4. Evaluation of the changes in phosphorylated pRb levels in HCT116 cell line under the effect of 40 μM of p16INK4a-Antrp, F26K-1, F26K-2, W26K-1, W26K-2 peptides. Analysis was performed 4, 6 and 8 h after synchronization block removal

(p16INK4a-Antp, F26K-1, F26K-2, W26K-1, W26K-2) ингибируют процессы фосфорилирования pRb. Уровень фосфорилированного pRb в клетках негативного контроля достоверно возрос после снятия блока синхронизации и увеличивался с $21,5 \pm 4,2$ % в нулевой точке до $48,5 \pm 7,2$ % после 8 ч инкубации. В образцах с пептидными последовательностями показано отсутствие достоверных изменений уровня pRb в течение 8 ч инкубации, уровень фосфорилированного pRb в опытных образцах составил $20,6 \pm 2,6$ % (рис. 4).

Результаты изменений экспрессии Vcl-2 и pRb, увеличение уровня апоптоза и замедление процессов пролиферации, индуцируемые внесением в культуральную среду исследуемых пептидных последовательностей – ингибиторов образования комплекса CDK4/6–циклин D, могут свидетельствовать о их направленном воздействии на активность CDKs.

Обсуждение

Таким образом, в ходе проведенных исследований показано, что исследованные пептидные последовательности (F26K-1, F26K-2, W26K-1, W26K-2), полученные с помощью методов математического моделирования, ингибируют мишень комплекса CDK4/6–циклин D–pRb и, как следствие, оказывают цитостатический эффект на пролиферирующие клетки. Полученные результаты позволяют утверждать, что дан-

ные последовательности обладают специфическими свойствами исходной биологической последовательности – функционального фрагмента p16INK4a – и являются эффективными ингибиторами CDK4/6 [19, 20]. Полученные результаты также показали, что эффективность искусственных ингибиторов CDKs во многом зависит от структуры пептидной последовательности, а также от типа исследуемой клеточной линии и имеет четкую концентрационную зависимость. При сравнении проапоптотических и цитостатических свойств установлено, что W26K-1 является наиболее слабой последовательностью, остальные пептиды (F26K-1, F26K-2, W26K-2) по эффективности превосходят естественный ингибитор CDK4/6 – функциональный фрагмент p16INK4a.

Заключение

Показана перспективность использования методов математического моделирования для поиска и разработки функционально активных пептидных молекул. Полученные модифицированные пептидные последовательности (8 аминокислот) не только обладают свойствами CKIs, но и превосходят по эффективности естественный ингибитор p16INK4a, что позволяет рассматривать их как потенциальные кандидаты при разработке таргетных противоопухолевых препаратов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Ding L., Cao J., Lin W. et al. The roles of cyclin-dependent kinases in cell-cycle progression and therapeutic strategies in human breast cancer. *Int J Mol Sci* 2020;21(6):1960. DOI: 10.3390/ijms21061960.
- Ермак А.В., Ефременко Е.С. Циклины и циклинзависимые киназы. Роль в развитии опухолевых заболеваний. Новое слово в науке и практике: гипотезы и апробация результатов исследований. Сборник материалов XXX Международной научно-практической конференции. Под общ. ред. С.С. Чернова. 2017. [Ermak A.V., Efremenko E.S. Cyclins and cyclin-dependent kinases. Role in development of tumors. Advances in science and practical applications: hypotheses and approbation of research results. Proceedings of the XXX international scientific and practical conference. General ed. S.S. Chernov, 2017. (In Russ.)].
- Asghar U., Witkiewicz A.K., Turner N.C., Knudsen E.S. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2015;14(2):130–46. DOI: 10.1038/nrd4504.
- Chung M., Liu C., Yang H.W. et al. Transient hysteresis in CDK4/6 activity underlies passage of the restriction point in G1. *Mol Cell* 2019;76(4):562–73.e4. DOI: 10.1016/j.molcel.2019.08.020.
- Kernan J., Bonacci T., Emanuele M.J. Who guards the guardian? Mechanisms that restrain APC/C during the cell cycle. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2018;1865(12):1924–33. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2018.09.011.
- Palou R., Malik A., Palou G. et al. G1 cyclin driven DNA replication. *Cell Cycle* 2015;14(24):3842–50. DOI: 10.1080/15384101.2015.1070995.
- Cuomo M.E., Platt G.M., Pearl L.H., Mittnacht S. Cyclin-cyclin-dependent kinase regulatory response is linked to substrate recognition. *J Biol Chem* 2011;286(11):9713–25. DOI: 10.1074/jbc.M110.173872.
- Galbraith M.D., Bender H., Espinosa J.M. Therapeutic targeting of transcriptional cyclin-dependent kinases. *Transcription* 2019;10(2):118–36. DOI: 10.1080/21541264.2018.1539615.
- Goel S., DeCristo M.J., Watt A.C. et al. CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity. *Nature* 2017;548(7668):471–5. DOI: 10.1038/nature23465.
- Martin M.P., Endicott J.A., Noble M.E.M. Structure-based discovery of cyclin-dependent protein kinase inhibitors. *Essays Biochem* 2017;61(5):439–52. DOI: 10.1042/EBC20170040.
- Li Z., Ivanov A.A., Su R. et al. The OncoPPI network of cancer-focused protein-protein interactions to inform biological insights and therapeutic strategies. *Nat Commun* 2017;8:14356. DOI: 10.1038/ncomms14356.
- Kazenov A., Alekseenko A., Bozhenko V. et al. Evaluation of CDK6 and p16/INK4a-derived peptides interaction. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Computat Mol Sci* 2013;3:53.
- Bozhenko V.K., Kulinich T.M., Kudina E.A. New targeted anti CDK4. *J Clin Oncol* 2013;31:e13545.
- Кулинич Т.М., Боженко В.К. Исследование особенности активации апоптоза пептидом – ингибитором циклиновых киназ MM-D37K в клетках линии аденокарциномы толстой кишки HT29. Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии 2015;15(3):3. [Kulinich T.M., Bozhenko V.K. Investigation of apoptosis activation by MM-D37K cyclin kinase inhibitor peptide in colon adenocarcinoma HT29 cells.

- Vestnik Rossiyskogo nauchnogo tsentra rentgenoradiologii = Bulletin of the Russian Scientific Center of Roentgenoradiology 2015;15(3):3. (In Russ.).
15. Кулинич Т.М., Харченко В.П., Филясова Е.И. и др. Цитостатические и цитотоксические свойства химерных пептидов, содержащих циклингибирующие фрагменты. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2008;145(1):43–7. [Kulinich T.M., Kharchenko V.P., Filyasova E.I. et al. Cytostatic and cytotoxic properties of chimeric peptides containing cyclin-inhibiting fragments. Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine 2008;145(1):43–7. (In Russ.)].
 16. Боженко В.К., Шрамова Е.И., Кулинич Т.М. и др. Синхронизация клеточных культур (лекция). Вестник Российского научного центра рентгенорadiологии 2018;18(2):4. [Bozhenko V.K., Shramova E.I., Kulinich T.M. et al. Synchronization of cell cultures (lecture). Vestnik Rossiyskogo nauchnogo tsentra rentgenoradiologii = Bulletin of the Russian Scientific Center of Roentgenoradiology 2018;18(2):4. (In Russ.)].
 17. Le François B.G., Maroun J.A., Birnboim H.C. Expression of thymidylate synthase in human cells is an early G1 event regulated by CDK4 and p16INK4a but not E2F. Br J Cancer 2007;97(9):1242–50. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604020.
 18. Кулинич Т.М. Исследование антипролиферативной активности интернализуемых пептидов, содержащих фрагменты ингибиторов циклиновых киназ p16INK4A и p21CIP/KIP. Дис. ... канд. мед. наук. ГУ «Российский онкологический научный центр РАМН». М., 2006. [Kulinich T.M. Study of the anti-proliferative activity of internalized peptides containing fragments of cyclin kinase inhibitors p16INK4a and p21CIP/KIP. Diss. ... candidate of medical sciences. Russian cancer research center of the Russian Academy of Medical Sciences. Moscow, 2006. (In Russ.)].
 19. Ohtani N., Yamakoshi K., Takahashi A., Hara E. The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. J Med Invest 2004;51(3–4):146–53. DOI: 10.2152/jmi.51.146.
 20. Кулинич Т.М., Шишкин А.М., Иванов А.В. и др. Исследование противоопухолевых свойств пептидных последовательностей, ингибиторов взаимодействия циклина D1 и циклин-зависимых киназ 4/6. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(S):38–40. [Kulinich T.M., Shishkin A.M., Ivanov A.V. et al. Investigation of antitumor properties of peptide sequences, inhibitors of interaction between cyclin D1 and cyclin-dependent kinases 4/6. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(S):38–40. (In Russ.)].

Вклад авторов

В.К. Боженко: разработка дизайна исследования, анализ результатов;
Т.М. Кулинич: проведение экспериментальных исследований, обработка полученных результатов, написание текста рукописи;
Е.А. Кудинова: анализ научной литературы по теме статьи, редактирование текста рукописи;
А.В. Иванов, А.М. Шишкин: проведение экспериментальных исследований, обработка полученных результатов;
В.А. Солодкий: разработка дизайна исследования, анализ результатов, редактирование текста рукописи.

Authors' contributions

V.K. Bozhenko: developing the research design, analysis of results;
T.M. Kulinich: experimental research, processing the results, article writing;
E.A. Kudina: analysis of scientific literature on the topic of the article, article editing;
A.V. Ivanov, A.M. Shishkin: experimental research, processing the results;
V.A. Solodkiy: developing the research design, analysis of results, article editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.К. Боженко / V.K. Bozhenko: <https://orcid.org/0000-0001-8351-8152>
Т.М. Кулинич / T.M. Kulinich: <https://orcid.org/0000-0003-2331-5753>
Е.А. Кудинова / E.A. Kudina: <https://orcid.org/0000-0002-5530-0591>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-015-00068/20).
Financing. The study was performed with the support of the Russian Foundation for Basic Research (project No. 20-015-00068/20).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Российский научный центр рентгенорadiологии» Минздрава России. Протокол № 2 от 28.02.2020.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of Russian Scientific Center of Roentgenoradiology, Ministry of Health of Russia. Protocol No. 2 dated 28.02.2020.

Статья поступила: 09.10.2020. **Принята к публикации:** 14.12.2020.
Article submitted: 09.10.2020. **Accepted for publication:** 14.12.2020.