

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Тольяттинский государственный университет»

Институт химии и энергетики

(наименование института полностью)

Центр медицинской химии

(наименование)

04.03.01 Химия

(код и наименование направления подготовки)

Медицинская и фармацевтическая химия

(направленность (профиль))

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА (БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА)

на тему Ингибиторы CDK8 как адьювантные агенты для преодоления резистентности
рака легкого к EGFR ингибиторам

Обучающийся

П.А. Шкляев

(Инициалы Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

А.С. Бунев

(ученая степень (при наличии), ученое звание (при наличии), Инициалы Фамилия)

Консультант

Р.Э. Гасанов

(ученая степень (при наличии), ученое звание (при наличии), Инициалы Фамилия)

Тольятти 2023

Аннотация

Целью данного исследования стало оценка влияние ингибитора CDK8 (BI-1347) на чувствительность к гефитинибу у резистентных клеточных линий рака легкого

Ингибиторы CDK8 способны действовать на достаточно большое количество сигнальных путей, а также влиять на клеточный цикл и на транскрипцию, таким образом такие соединения могут быть использованы ультимативно. Особенно сильное действие проявляется при комбинации таких ингибиторов с EGFR-нацеленными препаратами.

В литературном обзоре описаны общие принципы функций CDK8 в различных сигнальных путях, в транскрипции и в клеточном цикле. Также были обозначены ингибиторы CDK8 за последние 10 лет.

В экспериментальной части описана методика проведения биологических анализов, для обнаружения ингибирования роста опухолевых клеток и описаны протоколы получения и культивирования клеточных линий.

На основе всех проведенных экспериментов удалось доказать, что комбинация селективных ингибиторов тирозинкиназы рецепторов EGFR с ингибиторами CDK8 способна подавлять рост опухолевых клеток рака легкого даже при возникновении резистентности.

Работа изложена на 89 страницах, содержит 32 рисунка.

Abstract

The title of graduation work is CDK8 inhibitors as adjuvant agents for overcoming lung cancer resistance to EGFR inhibitors.

The graduation work consists of an explanatory note, an introduction, three parts on 89 pages, 32 figures, the list of 137 references including foreign sources.

The aim of this graduation project is to evaluate the effect of CDK8 inhibitor (BI-1347) on sensitivity to gefitinib in resistant lung cancer cell lines

The object of the graduation work is combination of CDK8 and EGFR inhibitors tested on lung cancer cells.

The subject of the graduation work is biological assays directed to detecting inhibition of lung cancer cells.

The first part is the general principles of CDK8 functions in various signaling pathways, in transcription and in the cell cycle are described.

The second part considers of the base methodology and discussions of the finished results. The experiment results are also given.

The third part consists deals with biological assays to detect inhibition of tumor cell growth and protocols for obtaining and culturing cell lines are described.

Based on the data obtained, we can conclude that combination of selective EGFR receptor tyrosine kinase inhibitors with CDK8 inhibitors is able to suppress the growth of lung cancer tumor cells even when resistance occurs.

Содержание

Определения, обозначения и сокращения	5
Введение.....	8
1 Литературный обзор	11
1.1 Клеточный цикл	11
1.2 Циклин-зависимая киназа	16
1.3 Биологическая роль CDK8	20
1.4 Значение CDK8 при патологических процессах.....	31
1.5 Ингибиторы CDK8, как противоопухолевые препараты.....	36
2 Результаты и их обсуждение.....	44
2.1 МТТ тест	45
2.2 Анализ индукции апоптоза	57
2.3 Клоногенный тест	59
3 Экспериментальная часть.....	63
3.1 Реагенты и оборудование	63
3.2 Объекты исследования	64
3.3 Методика эксперимента	64
Заключение	67
Список используемой литературы	68
Приложение А Графики анализа индукции апоптоза клеток NCI-H1975GR.	83
Приложение Б Графики анализа индукции апоптоза клеток A549GR.....	86

Определения, обозначения и сокращения

В настоящей работе применяют следующие термины с соответствующими определениями:

AML	острая миелоидная лейкемия
BMP	костный морфогенетический белок
BRD4	бромдомен, содержащий белок 4
CAK	CDK-активирующая киназа
CBD	циклин-бокс домен
CCNC	циклин С
CDK	циклин-зависимая киназа
C/EBPβ	энхансер-связывающий белок β
Cip/Kip	белок, ингибирующий киназу
CKI	CDK-ингибиторы
CKM	CDK-киназный модуль
CLK	CDC-подобная киназа
CRC	колоректальный рак
CTD	С-концевой домен
DFG	мотив аминокислот Asp-Phe-Gly
E2F1	фактор связывания промотора E2 1
EGF	эпидермальный фактор роста
EGFR	рецептор эпидермального фактора роста
EGR	реакция на ранний рост
Elk-1	ETS-схожий белок

ER	рецептор эстрогена
ERK	внеклеточная сигнально-регулируемая киназа
eRNA	энхансерная РНК
GCN5	общий контроль без подавления 5
GSK	гликогенсинтазокиназа
GTF	общие транскрипционные факторы
HER	рецептор эстрогена человека
HIF-1α	фактор, индуцируемый гипоксией 1-альфа
IC₅₀	концентрация полуингибирования
IFN-γ	интерферон- γ
INK4	ингибитор киназы 4
JAK	янус-киназа
lncRNA	длинные ncRNA
MAPK	митоген-активированная протеинкиназа
MAT1	белок, ассоциированный с метастазированием 1
MTT	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5- дифенилтетразолия бромид
mH2A	макро-гистон А
mTOR	мишень рапамицина для млекопитающих
MED	субъединица медиаторного комплекса
ncRNA	некодирующие РНК
NF-κB	ядерный фактор κ -цепи в В-клетках
NICD	внутриклеточный домен NOTCH

NK	натуральные киллеры
NOTCH	гомолог белка NOTCH нейrogenного локуса
PIC	преинициаторный комплекс
pTEF-β	позитивный фактор элонгации транскрипции β
Ras	вирус саркомы крысы
RNA-Pol II	РНК-полимераза II
ROCK	Rho-ассоциированная протеинкиназа
SCF	комплекс содержащий Skp, Cullin, F-box
SE	суперэнхансер
SEC	комплекс суперэлонгации
SERD	селективный деградант рецептора эстрогена
shRNA	малые РНК, образующие шпильки
Skp	S-фаза-киназа-ассоциированный белок
Smad	подавитель матерей против декапентаплегии
SREBP	стерол-регуляторный элемент-связывающий белок
STAT	преобразователи сигналов и активаторы транскрипции
T-ALL	острый лимфобластный T-клеточной лейкоз
TGF-β	трансформирующий фактор роста β
TF	фактор транскрипции
TNBC	тройной негативный рак молочной железы
XPD	ксеродерма пигментозум D

Введение

В наше время интерес к изучению влияния резистентности в раковых клетках, все больше нарастает из-за необходимости в понимании работы механизмов устойчивости к лекарственным средствам. И один из возможных методов борьбы с резистентностью — это использование нескольких противоопухолевых препаратов при терапии, тщательно корректируя схему лечения, учитывая индивидуальные особенности [1].

Один из ключевых признаков появления рака – это неконтролируемое деление (пролиферация) клеток, одна из возможных причин появления такого аномального клонирования клеток – неправильная работа как минимум четырех контрольных пунктов в жизненном цикле клеток. Эти контрольные точки управляются с помощью комплекса, состоящего из СКI, CDKs и циклинов, которые по отдельности, по всей видимости, выполнять свои функции не могут, и для остановки клеточного цикла требуется полное ингибирование данного комплекса [2-4]. В организме СКI будут играть отрицательную регуляторную роль, а комплекс CDK-циклин, наоборот, положительную. Главный белок в этом комплексе (циклин), был найден в эмбрионах морских ежей, он начинает вырабатываться только после оплодотворения и разрушается в определенных точках цикла деления клеток, и благодаря такому механизму его назвали циклином из-за того, что концентрация этого белка изменялась циклически во время клеточного цикла [5].

На сегодня выявлено около 16 семейств CDK и 31 член CDK, которые выполняют различные функции в области деления клеток, но пока большая их часть еще мало изучена и трудно об этом говорить точно. Кроме того, CDKs участвуют не только в транскрипции, но и в разных функциях организма, так, например, они участвуют эпигенетической регуляции в эмбриогенезе, ангиогенезе, гемопоезе, дифференцировке нейронов, самообновлении стволовых клеток, а также в сперматогенезе [6-11]. CDK8 –

впервые была идентифицирована под названием K35 в 1995 году Tassan и его коллегами, как предполагаемого партнера для циклина C, участвующий в транскрипционных механизмах млекопитающих [12]. CDK8 – серин-треониновая киназа, участвующая в транскрипции, но не регулирующая сам клеточный цикл. Эта киназа может привести к активации генов на различных этапах клеточного цикла, при этом оказывая важную роль в индукции бесшумных генов, которые активируются разными TFs [13]. Киназа CDK8 и ее паралог CDK19, могут функционировать только в комплексе из четырех белков – CCNC, CDK8, MED12, MED13, называемом Mediator [14]. Данный комплекс играет главную роль в транскрипции у многоклеточных организмов, он работает, как посредник для передачи сигналов от TF на неактивированный комплекс RNA-Pol II, таким образом влияя почти на все стадии транскрипции [15].

Неудивительно, что нарушения в работе CDK8 дает начало неконтролируемой пролиферации и развитию опухоли, появляющиеся главным образом транскрипционно, а не мутационно, так как CDK8 участвует в нескольких онтогенетических и клеточных путях. Найдены многочисленные данные подтверждающие экспрессию CDK8 в высокоагрессивных видах рака, как рак предстательной железы, рак желудочно-кишечного тракта, рак молочной железы, рак мочевого пузыря и сарком [16]. Ингибирование CDK8 может уменьшать индукцию транскрипции определенных генов, например, как Wnt/ β -катенин, TGF- β , Smad, HIF-1 α , VEGF, IFN- γ , NOTCH и SREBP [8, 17-23]. Одновременное же использование ингибиторов CDK8 с маломолекулярными ингибиторами EGFR должно проявлять хоть и менее селективное взаимодействие, но оно позволит предотвратить устойчивость к лекарствам.

Актуальность данной темы заключается в том, что обычно резистентность к противоопухолевым препаратам со временем вырастает, даже несмотря на высокую селективность препаратов к мишени, но будь бы у онкологов методы долгого почти полного подавления устойчивости к

лекарственным соединениям, это бы уменьшило шанс окончания жизни пациентов от быстромутировавшего рака. И возможное одновременное сочетание ингибиторов CDK8 и ингибиторов EGFR сможет привести к намного более долгой устойчивости к противоопухолевым препаратам.

Предмет исследования – сочетание ингибиторов CDK8 и EGFR тестируемых на раковых клетках легких.

Цель исследования: Изучить чувствительность комбинации ингибитора CDK8 и gefitiniba на резистентных к gefitinibu раковых клеток легких

Задачи исследования:

- Проанализировать литературные данные о том, как VI-1347 могут влиять на опухолевые клетки, и исходя из этого предположить их эффективность во время появления лекарственной устойчивости к gefitinibu.

- Получить резистентные к gefitinibu клеточные линии рака легкого на примере A549 и NCI-H1975

- Оценить синергический эффект VI-1347 и gefitiniba, как в монотерапии, так и в комбинации друг с другом на резистентных и обычных клеточных линиях рака легкого.

- Исследовать влияние комбинации VI-1347 и gefitiniba в клоногенном тесте и в анализе на индукцию апоптоза

1 Литературный обзор

1.1 Клеточный цикл

1.1.1 Представление о клеточном цикле

В соматических клетках млекопитающих клеточный цикл является набором строго скоординированных во времени процессов, так как он начинается с образования ее от материнской клетки путем ее деления и до ее гибели. Клеточный цикл делится на две фазы: интерфазу и митоз. Интерфаза – это самая продолжительная часть жизни клетки, которая включает в себя период подготовки, выполнение ее функций, ее рост и репликацию ДНК для подготовки к делению. Саму интерфазу можно разделить на 3 подфазы: G_1 (от английского слова gap – промежуток), S (от английского слова synthesis – синтез) и G_2 , в каждой из которых протекают определенные действия в клетке для закономерного деления [24]. G_1 -фаза (также называемая пресинтетическая) – следует сразу за предыдущим делением и характеризуется активным ростом клетки. В этот момент синтезируются РНК, белки и увеличивается число рибосом и митохондрий. В S-фазе (синтетической) – происходит репликация ДНК, приводящая к двойному набору хромосом и дубликация центриолей, а также продолжается образование РНК и белков. И G_2 -фаза (постсинтетическая) характеризуется заключительным этапом подготовки клетки к делению. В ней происходит тоже что и в G_1 -фазе. Иногда клетки после прохождения некоторого периода G_1 -фазы вступают в специальную фазу покоя G_0 , в ней клетка может долгое время выполнять свои функции, не подготавливаясь к репликации ДНК, некоторые клетки способны выходить из G_0 -фазы (лимфоциты, гепатоциты и др.), а не которые навсегда утрачивают способность к делению, как например специфические клетки – хрусталика, нейронов и др. (рисунок 1).

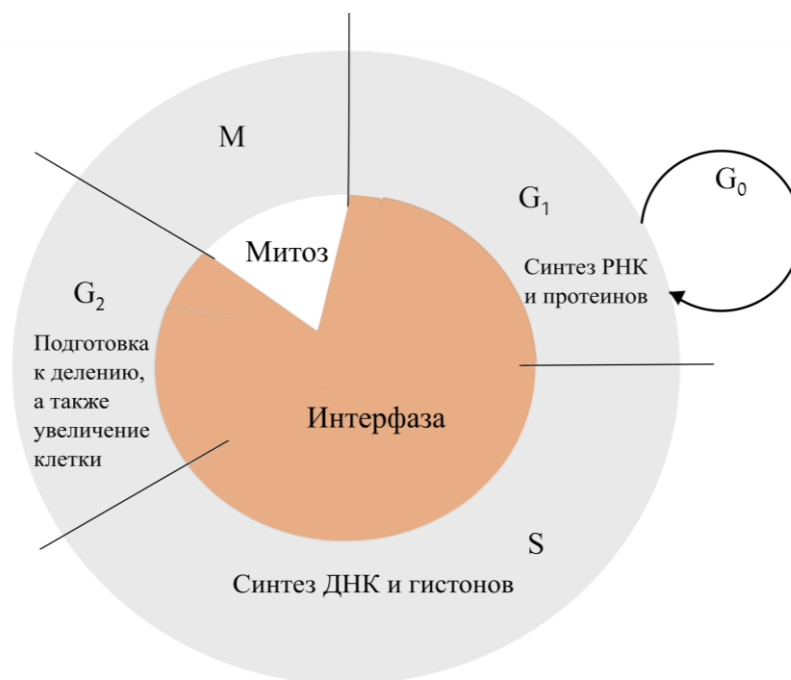


Рисунок 1 – Схема клеточного цикла

Митоз – это деление соматических клеток от материнской к двум дочерним клеткам, и он включает в себя пять этапов: профаза, прометафаза, метафаза, анафаза и телофаза. В профазе начинает спирализоваться хроматин, приводящая к формированию двухроматидных (сестринских) хромосом, вне ядра происходит поляризация центриолей и начинается сборка веретена деления. Далее идет прометафаза, включающая в себя разрушение ядерной оболочки клетки. После этого происходит метафаза, в которой хромосомы выстраиваются по экватору веретена деления (метафазной пластинке) и к ним прикрепляются кинетохорные микротрубочки с разных полюсов веретена. Во время анафазы сестринские хроматиды расходятся по разные стороны клетки образуя две дочерние хромосомы. В телофазе дочерние хромосомы достигают полюсов центриолей и возле них начинает собираться ядерная оболочка. После окончания митоза происходит цитокинез – разделение материнской клетки на две идентичные клетки [25].

1.1.2 Контроль клеточного цикла

В клетке система контроля клеточного цикла работает как определенный таймер, то есть он запускает события клеточного цикла в

конкретном порядке, давая фиксированное количество времени этапу и в то же время клетка реагирует на информацию, исходящую от процессов, которыми она управляет. Для координирования клеточного цикла в клетках существуют переключатели способные запускать и деактивировать события, которые активируются в ответ на сигналы внутри клетки и снаружи. Контрольные точки являются важными регуляторами в клеточном цикле, они обнаруживают дефекты, появляющиеся во время «движения» клеточного цикла. Важность идентичности дочерней клетки по отношению к материнской определяется тем, что при нарушениях в клетке она будет передавать свою мутацию потомкам, тем самым увеличивая в геометрической прогрессии аномальных клеток в организме, что часто приводит к онкологическим заболеваниям.

И как раз для предотвращения таких аномалий в клетке располагаются контрольные точки для проверки нарушений в клетке, действуя тем самым как своего рода контрольные пункты между границами фазами на протяжении всего клеточного цикла. Если клетка проходит контрольную точку, то она продолжает свой клеточный цикл. Но уже при обнаружении нарушения в клетке клеточный цикл останавливается, и следующая фаза не наступает, пока условия не станут благоприятными и нарушения не будут восстановлены, но если это невозможно, то данная клетка подвергнется апоптозу (рисунок 2) [26].

Первой контрольной точкой является точка в конце G_1 -фазы перед S-фазой, называемая также точкой Старта или точкой рестрикции. Точка рестрикции необратима, после прохождения этой точки даже при неблагоприятных условиях клетка войдет в S-фазу. Она проверяет благоприятны ли условия для вхождения в S-фазу, клетка достаточно ли большая, хватает ли у нее энергии и ресурсов и не повреждена ли геномная хромосома.

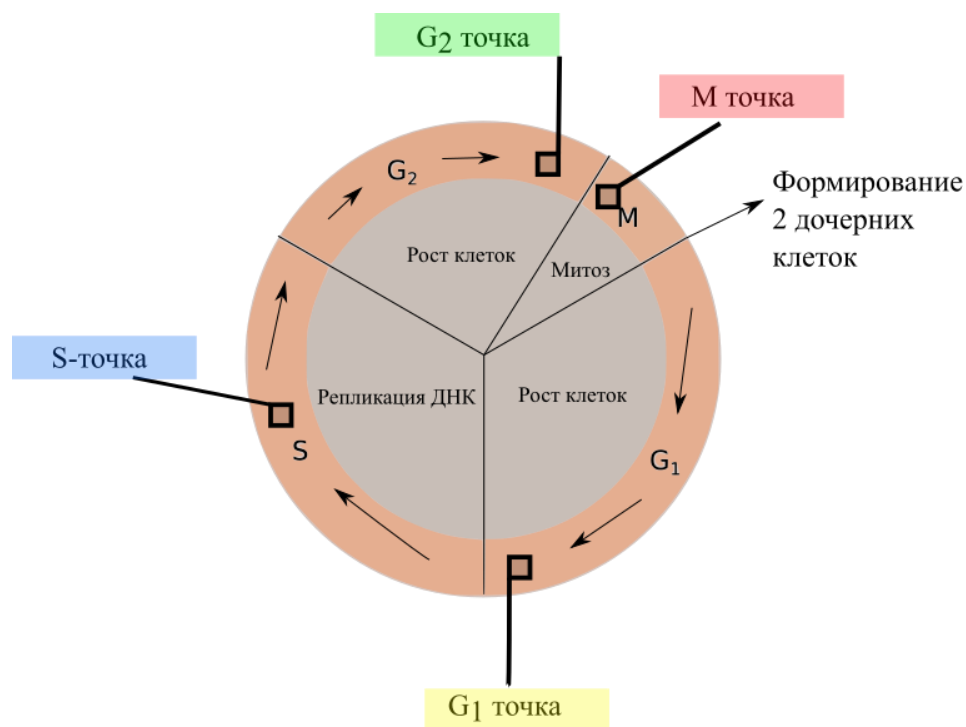


Рисунок 2 – Расположение контрольных точек

Вторая точка присутствует в S-фазе и проверяет полноту репликации ДНК, что геном был полностью продублирован и что нет нарушений в синтезе гистонов и дублировании центросом, а также в сборке нуклеосом.

Третья контрольная точка находится в G₂-фазе перед началом митотического деления клетки. Она выявляет повреждения, пропущенные при прохождении предыдущих контрольных точек, и детектируются все ли хромосомы реплицированы правильно.

Четвертая точка располагается между переходом от метафазы к анафазе. Эта контрольная точка определяет правильно ли расположены сестринские хроматиды для безошибочного разделения на дочерние в разные стороны полюсов веретена деления [27].

Правильное прохождение клеточного цикла определяется специфическим уровнем экспрессии белков, называемых как циклины [28]. Циклины названы так из-за того, что их концентрация в течении клеточного цикла изменяется циклически [29]. Семейство циклинов состоит из 30 белков и так как циклины не обладают ферментативной активностью, то они включают в себя консервативную часть, состоящую из 150 аминокислотных

остатков, называемой CBD, образованную из пяти спиральных участков, которые связываются с CDK [30].

В зависимости от расположения и от времени действия в клеточном цикле циклины традиционно делятся на две группы: канонические, связанные с клеточным циклом, и транскрипционные. Канонические циклины (A, B, D, E) (их название определяют то, они что полностью повторяют изначальные свойства первых циклинов) связываются с CDK и экспрессируются периодически в фазах клеточного цикла. Транскрипционные циклины (T, K, L, Q, S, H), ассоциируясь с транскрипционными CDK, участвуют в регуляции РНК-полимеразы II [31].

Среди этих разнообразных членов семейства циклинов только некоторые из них играют важную роль в клеточном цикле, такие как циклины A, B, C, D и E. Каждый из них разному экспрессируется в определенной фазе и после прохождения этой фазы, он разрушается протеасомой с помощью белка секурина, который убиквитинирует циклин комплексом стимуляции анафазы, из-за этого концентрация различных может повышаться и понижаться во время всего клеточного цикла (рисунок 3) [32]. Так циклины показывают специфическое распределение активности на протяжении всего цикла, как например: циклины C и D – они контролируют вступление в клеточный цикл от периода покоя и на протяжении всех G-фаз [33], [34]; циклин E – контролирует вход в фазу S и вызывает дублирование центросом [35]; циклин A – контролирует завершение репликации ДНК и предотвращает образование нескольких репликационных комплексов, а также обеспечивает продвижение через G₂-фазу, и циклин B, используемым в качестве основным регулятором вступления в митоз и расхождение хромосом, во время анафазы [36], [37].

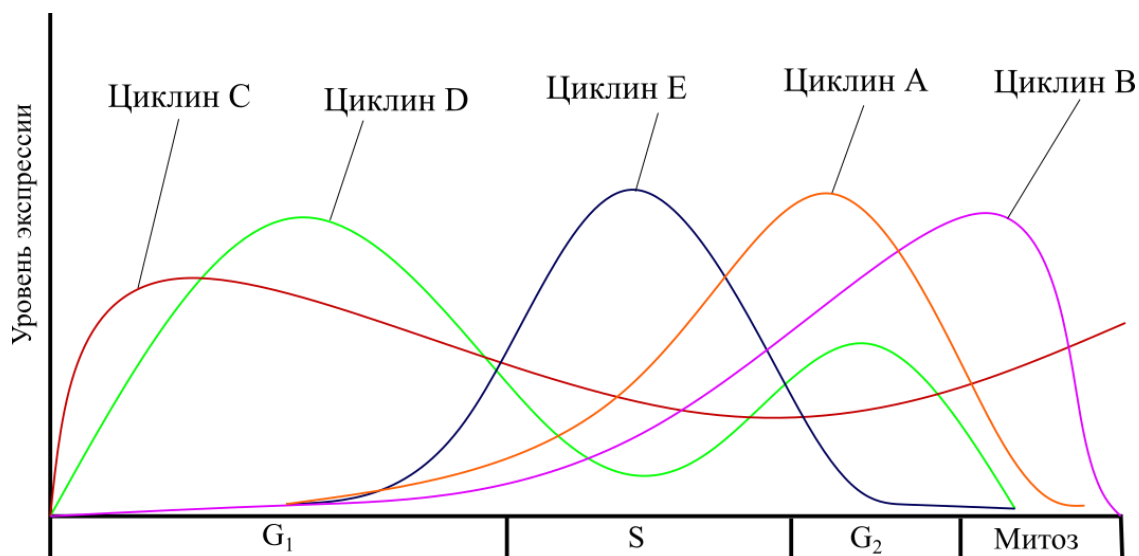


Рисунок 3 – Уровень экспрессии циклинов в клеточном цикле

1.2 Циклин-зависимая киназа

1.2.1 Обзор семейства CDK

Первую CDK1, а именно его ген *cdc2* открыл L. H. Hartwell в 1970-х годах, он обнаружил, что у мутантов дрожжей в первом цикле клеточного деления были заблокированы на различных фазах цикла и не могли полностью завершить клеточный цикл, чем и отличались от других дрожжей [38]. После этого P. Nurse в 1976 году определил еще 14 генов *cdc*, и в 1987 году, подтвердил, что ген *cdc2* схож с его человеческим гомологом [39, 40]. Из-за различных наименований генов, отвечающих за CDK, ученые на собрании 1991 года в Колд-Спринг-Харборе решили объединить это семейство генов в единую номенклатуру под термином «Циклин-зависимые киназы». За все эти исследования Nurse в 2001 году получил Нобелевскую премию вместе L. Hartwell и T. Hunt.

Циклин-зависимые киназы входят в семейство CMGC-киназ, которое названо в честь инициалов подсемейств, таких как: сама CDK, MAPK, GSK и CLK [41]. По сравнению с дрожжами, у которых один CDK может являться сразу несколько функций, у млекопитающих CDK разделены по клеточному циклу и не только. Это усложнение определяется тем, что упорядоченное и последовательное продвижение по клеточному циклу, может дать лучший

контроль над пролиферацией различных типов клеток [42]. Каждая CDK связывается с определенным циклином, что приводит к образованию CDK/циклин комплекса, в котором циклин действует как регулятивная субъединица, а CDK как каталитическая субъединица. Все CDK делятся на три ветви: основная ветвь семейства CDK, регулирующая клеточный цикл (CDK 1,2,4 и 6), транскрипционные CDK (CDK 7, 8, 9, 12 и 13), которые регулируют транскрипцию фосфорилируя повторяющиеся мотивы гептада (непрерывные семичленные повторы аминокислот, опосредующие межбелковые взаимодействия), из которых состоит карбокси-терминальный домен CTD RNA-Pol II; и другие имеющие уникальные и специфичные CDK (CDK 5, 10, 11, 14-18 и 20), которые имеют определенные функции для различных типов тканей [43], [44].

CDK схож с типичными протеинкиназами и имеет складку с двумя глобулярными доменами (С-концевой домен и N-концевой домен), которые скреплены шарнирной областью, где находится АТФ-содержащий сайт для связывания с субстратом [45]. По большей части N-концевой домен состоит из β -листов, но при этом он включает одну α -спираль, которая уникальным отпечатком CDK/циклина. С-домен в основном состоит из α -спиралей и содержит в себе активационную петлю (Т-петлю) со специфическим остатком DFG, состоящий из триады Asp-Phe-Gly, который фосфорилируется с помощью САК. Большинство CDK характеризуются тем, что включают в себя PSTAIRE-подобный циклин-связывающий домен, активирующий мотив Т-петли и консервативное каталитическое ядро, содержащее АТФ-связывающий карман. Эти части CDK участвуют в ее активации, циклин связываясь с консервативным доменом, состоящим из 16 аминокислот PSTAIRE претерпевает конформационные изменения, а Т-петля из-за того, что она гибкая может принимать различные конформации и быть как «закрытой» и «открытой» [46].

1.2.2 CDK-активирующая киназа

Для полной активации CDK требуется фосфорилирование другой киназой САК, так как она схожа с CDK, ее часто называют CDK7. После связывания циклина с CDK Т-петля, содержащая в себе активирующий сайт с треонином, переходит из закрытой конформации в открытую конформацию, где сайт становится доступным для фосфорилирования САК [47] (рисунок 4).

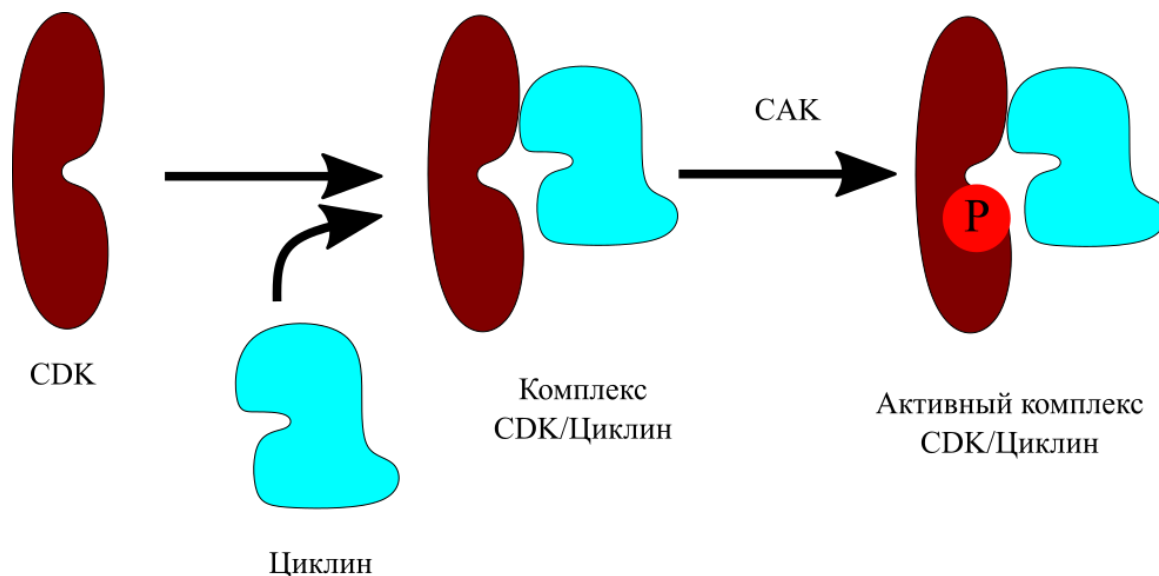


Рисунок 4 – Схема активации CDK с помощью САК

Первоначально САК была найдена, как киназа которая фосфорилирует комплекс CDK/Циклин в условиях *in vitro* с помощью экстрактов яиц лягушек [48]. САК у эукариотов представляет из себя комплекс, состоящий из трех субъединиц: активирующей – циклина H, каталитической – CDK7 и субъединицы MAT1, действующей как фактор сборки всего комплекса и увеличивающий активность САК по отношению к CDK [49], [50]. Помимо функции САК в активирующем фосфорилировании канонических CDK (CDK1, CDK2, CDK4 и CDK6), она участвует в регуляции транскрипции; так комплекс CDK7/Циклин H/MAT1 входит в состав TFIIH, который включен в PIC, фосфорилирующий CTD субъединицы RNA-Pol II [51]. CDK7/Циклин H/MAT1 связываются с TFIIH, с помощью белка XPD. Белок XPD влияет на регуляцию транскрипции, подавляя ее или индуцируя. Избыток XPD

приводит к понижению CDK и вызывает дефекты в митотической фазе, останавливая клеточный цикл, и наоборот при уменьшении XPD увеличивает активность CDK [52].

1.2.3 Внутренние ингибиторы CDK

SKI – это белки, которые блокируют активность только отдельной CDK или комплекс CDK с циклином, при возникновении поломок в клеточном цикле, чтобы предотвратить пролиферацию опухолевых клеток. В большинстве случаев активность SKI происходит в фазе G₁ и во время начала инициации синтеза ДНК в S-фазе, но также может активироваться во время репарации ДНК или вызвана внеклеточными ингибирующими сигналами [53]. SKI у эукариот делятся на два большие семейства, которые различаются по функциональным и структурным особенностям, – это INK4 и белок Cip/Kip (рисунок 5).

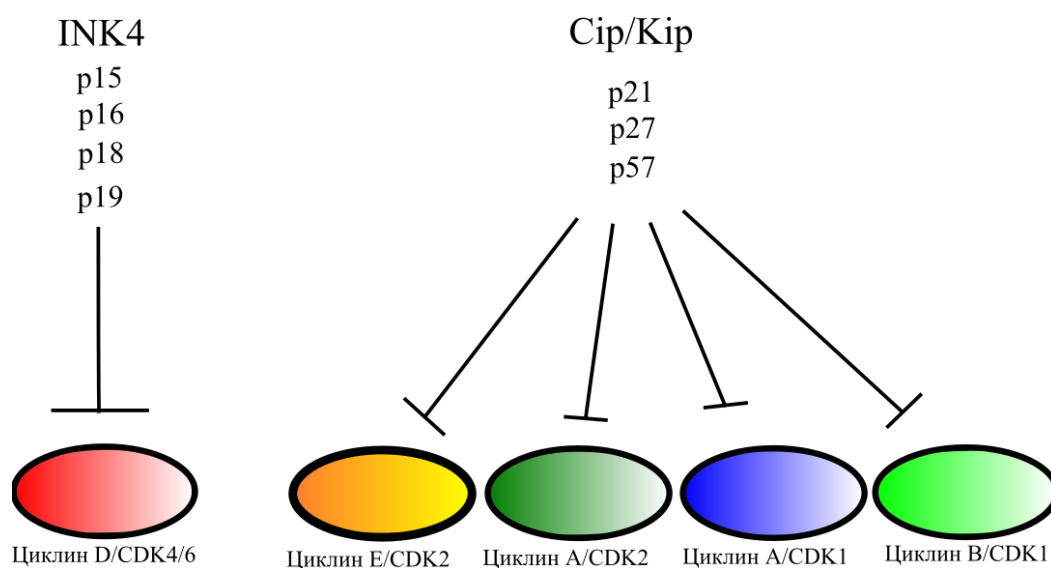


Рисунок 5 – Схема ингибирования комплексов CDK/Циклин SKI

Семейство INK4 включает в себя такие белки, как p15, p16, p18 и p19, состоящие из множества анкириновых повторов (мотив из 33 аминокислот, участвующий с межбелковых взаимодействиях) и связывающиеся только отдельно с CDK4 и CDK6, тем самым предотвращая их активацию, изменив их АТФ-связывающий карман и саму структуру циклина [54], [55], [56].

Семейство белков Cip/Kip состоит из белков p21, p27 и p57, которые содержат определенные аминоконцевые фрагменты, позволяющие связываться с комплексом CDK/Циклин [57], [58], [59]. Это семейство может ингибировать активность CDK1 и CDK2, связанную с циклинами A, B и E, и действовать с CDK4 и CDK6, как ингибиторы, так и модуляторы.

1.3 Биологическая роль CDK8

Первоначально, CDK8 была идентифицирована J. P. Tassan et al., как киназа 35 связывающаяся только с CCNC в условиях *in vitro* и *in vivo*, они также предложили название CDK8 для данного партнера к циклину C [12]. CDK8 относится к транскрипционным CDK, то есть он в основном подавляет транскрипцию, но в последних исследованиях показывается CDK8 его положительная роль в транскрипции [60], [18]. Ген, который экспрессирует CDK8, который находится на хромосоме человека 13q12 экспрессирует белок массой 53 кДа, состоящий из 464 аминокислот и имеющий 11 субдоменов, характерных для серин-треониновых протеинкиназ. Эта киназа проявляет свою активность связываясь с комплексом Mediator, состоящим из Med12, Med13 и CCNC, также возможна роль CDK8 вне этого комплекса [61]. CDK8 может фосфорилировать такие мишени как гистон H3, CTD РНК-полимеразы II и субъединицы GTF [62], [63], [64].

У CDK8 существует паралог CDK19, который эволюционно позже появились у позвоночных, находясь впереди по ветви развития и имея более специфические воздействия на клетку. CDK19 имеет высокое сходство последовательностей аминокислот с CDK8, имея почти схожие домены связывания циклина и киназы. CDK19 собирается в модуль схожим образом, как и CDK8, то есть состоит из CCNC, CDK19, MED12L и MED13L. В отличие от модуля CDK8 у прокариот, сложные модули киназы у позвоночных возникли в результате дупликации генов таких компонентов, как MED12, MED13 и CDK8, только CCNC не изменился [65]. Данные

компоненты называются MED12-подобными (MED12L), MED13-подобными (MED13L) и CDK8-подобными (CDK19), и каждый паралог взаимодействует с Mediator и, следовательно, они являются компонентами модуля CDK-киназы [66].

1.3.1 CDK8 регулирует транскрипцию в клетке

Регуляция транскрипции генов является ключевым фактором в определении экспрессии генов у эукариот. Она представляет из себя комплексный процесс, который состоит из последовательности действий многих факторов транскрипции таких, как корепрессоры и коактиваторы, а также RNAPII и GTF. Кроме того, мультибелковые комплексы, которые могут модифицировать гистоны и распознавать модификации гистонов, могут быть использованы для инициирования регуляции на уровне ремоделирования хроматина, тем самым вызывая рекомбинацию хроматина в ядре. По меньшей мере, три CDK (CDK7, CDK8 и CDK9) регулируют инициацию, элонгацию и транскрипцию (рисунок 6) [67].

У эукариот есть определенные последовательности перед генами в области промотора, куда прикрепятся RNA-Pol. Первый промоторный элемент — это последовательность ATATAA, находящаяся вблизи старта транскрипции, а второй элемент это последовательность GGCCAATC (ТАТА-бокс и СААТ-бокс) Они являются местом связывания RNA-Pol, для чтобы она начинала транскрипцию в нужном ей месте. В то же время определенной особенностью таких последовательностей является то, что они расположены довольно далеко от первого нуклеотида, с которого они транскрибируются. Поскольку RNA-Pol не может одновременно покрывать весь промотор, а именно от СААТ-бокс и до ТАТА-бокса, и сразу же первый необходимый ему нуклеотид старта транскрипции, для этого в клетке имеется большое количество ДНК-связывающих TFs, которые помогут связать ТАТА-бокс и первый нуклеотид для инициации транскрипции. TF содержит отдельные домены активации, которые взаимодействуют с регуляторами транскрипции, такими как комплекс Mediator, через который

регуляторные сигналы непосредственно передаются ферменту RNA-Pol II (рисунок 7) [68].

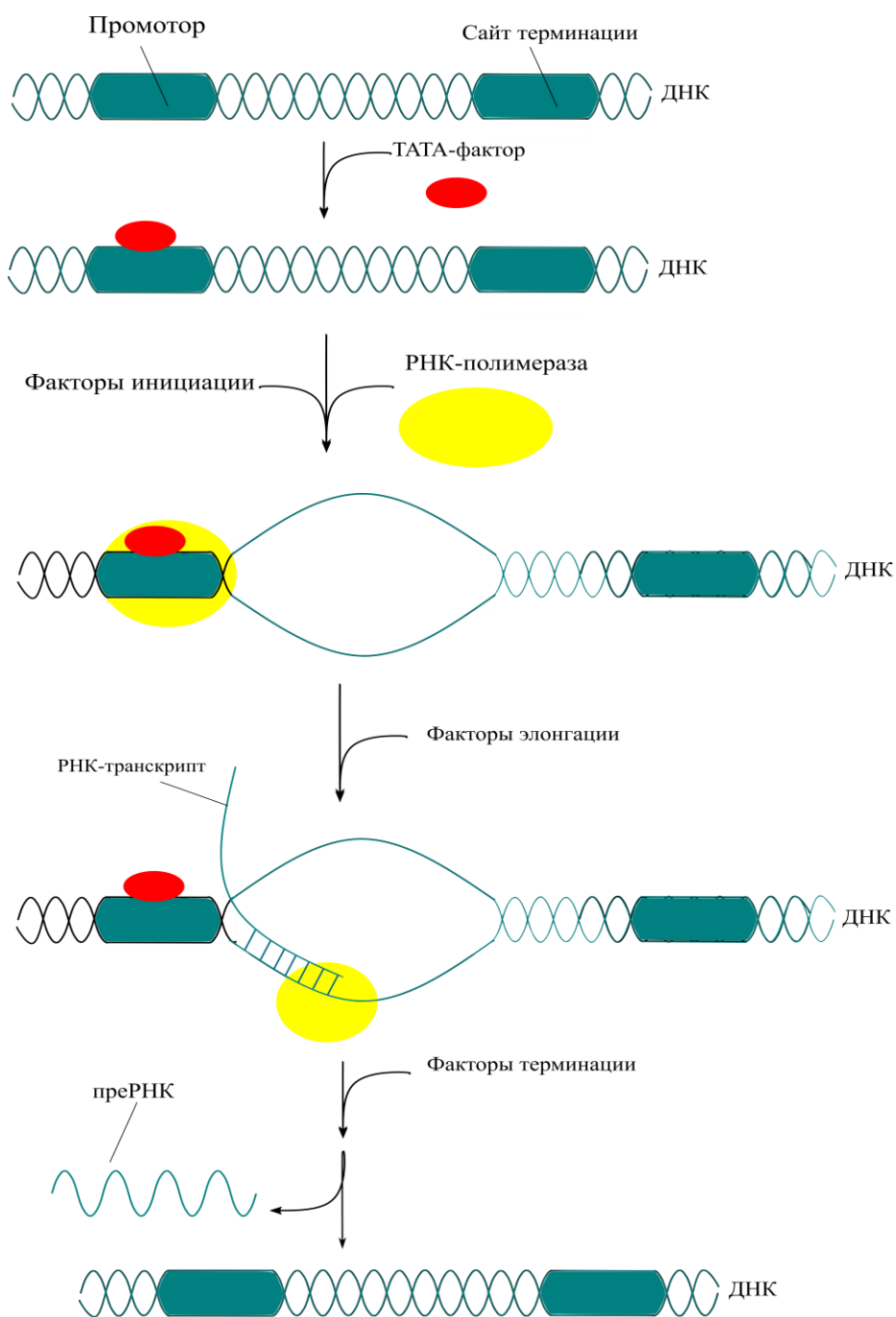


Рисунок 6 – Стадии транскрипции у эукариот

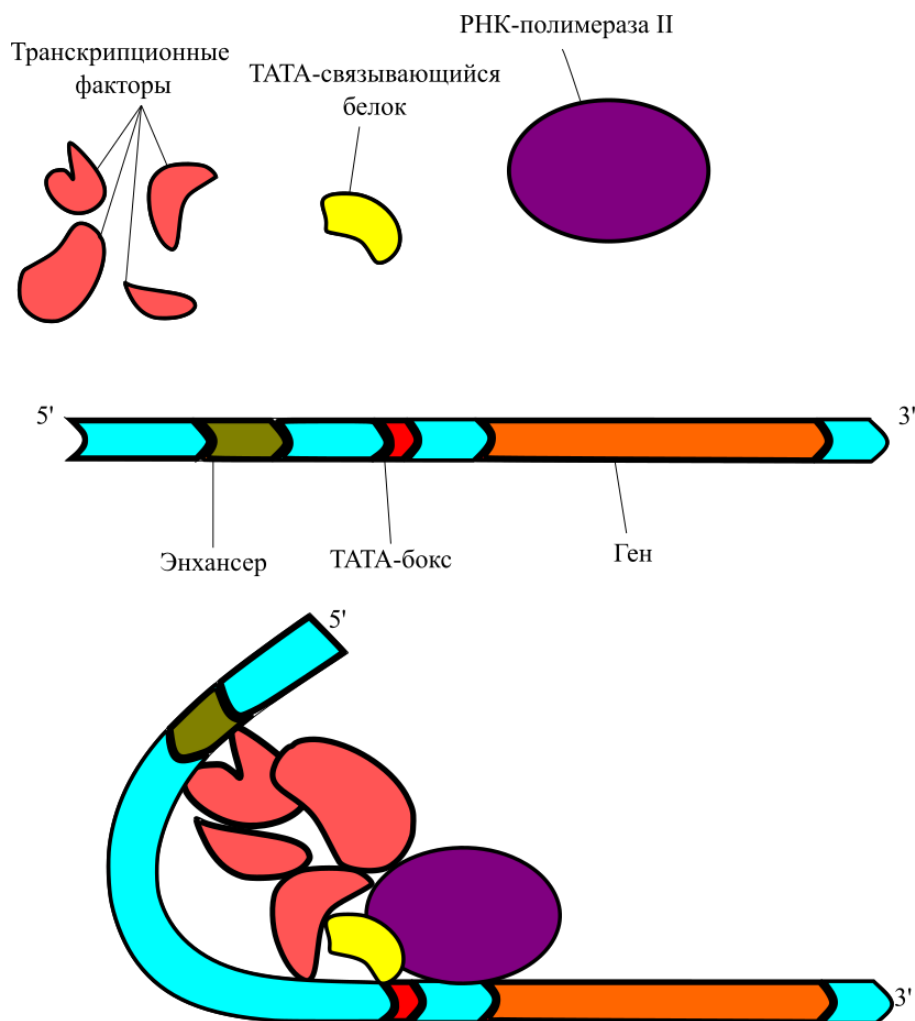


Рисунок 7 – Структура транскрипционного комплекса у эукариот

По сравнению с прокариотами, где только один тип РНК-Рол катализирует синтез всех трех типов РНК: мРНК, рРНК и тРНК, у эукариот есть несколько типов РНК-Рол; каждый из них отвечает за определенный тип фермента, который он может синтезировать. В эукариотах РНК-Рол II инициирует транскрипцию как часть РИС, этот комплекс собирается в том месте, где начинается транскрипция нужного гена [69]. Как фактор РИС, Mediator необходим для транскрипции РНК-Рол II, и он функционирует, как проводник между TF и самим ферментом RNA-Pol II. Из-за большого размера комплекса Mediator он может контролировать сборку и активность нескольких факторов РИС одновременно, включая ТFIИИ и саму RNA-Pol II. Следовательно, Mediator имеет способность стимулировать ТFIИИ-зависимое фосфорилирование СТД, и как в следствие рекрутировать RNA-Pol II, вместе

с тем Mediator необходим для TF-зависимой активации транскрипции [70]. Когда Mediator связан с модулем киназы, все вышеперечисленные действия нарушаются, поскольку он блокирует сборку RNA-Pol II в PIC, то есть связывание модуля киназы с Mediator может блокировать сборку PIC и препятствовать инициации транскрипции [71].

СКМ способен положительно влиять на транскрипцию RNA-Pol II. Очевидно, что СКМ может регулировать событие после инициации, которое происходит после того, как RNA-Pol II иницирует транскрипцию, отсоединяясь от PIC и "избегая" промотора. После выхода из промотора RNA-Pol II обычно приостанавливается после образования транскрипта, состоящего из 20-80 нуклеотидов. Этот приостановленный промежуточный продукт является ключевой стадией регуляции, на которой RNA-Pol II может продолжать транскрипцию или прекращать транскрипцию [72], [73].

Характерной чертой эукариот является наличие такой структуры, как энхансер. У эукариот ДНК расположена в ядре в виде хромосом, которые плотно упакованы гистонами, и для того, чтобы усилить экспрессию требуемых генов, ее необходимо получить из плотно упакованной ДНК. Для этого в ДНК есть энхансер или энхансер (от англ. enhancer – усилитель), который представляет собой комплекс, состоящий из нескольких белков и специальных последовательностей ДНК. Их функция заключается в том, что энхансеры, расположенные по обе стороны от желаемой последовательности генов (транскрипция которых должна быть увеличена), взаимодействуют с ними, связываясь с определенными белками, а эти белки, в свою очередь, связываются друг с другом, образуя расширенное кольцо, которое облегчает им доступ к RNA-Pol II при одновременном увеличении транскрипции [74].

Большой размер и площадь поверхности Mediator позволяют ему взаимодействовать с различным набором ncRNAs, один из них – lncRNA увеличивает транскрипцию генов [75]. Эти lncRNAs взаимодействуют с Mediator через субъединицу MED12, и это взаимодействие связано с активацией транскрипции и образованием петли между локусом lncRNA и

промотором-мишенью [76]. Кроме того, другим типом ncRNA являются eRNA, они необходимы для образования специфических петель энхансер-промотор, зависящих от активации генов, что схоже с lncRNA [77]. Так как MED12 является частью модуля CDK8, взаимодействие MED12 с ncRNA способны связать модуль CDK8 с промотором. Это может приводить к обратимому взаимодействию модуля CDK8 с комплексом Mediator на промоторе, регулируя тем самым рекрутирование RNA-Pol II [62] или удлинение RNA-Pol II [78].

Остановка перед элонгацией RNA-Pol II (pausing) контролируется киназой CDK9, которая является частью комплекса pTEFb или как часть SEC [79]. CDK8 и CDK9 могут работать вместе, регулируя друг друга, подобно CDK7-зависимой регуляции активности CDK9. Следовательно, медиаторные киназы могут также косвенно регулировать паузу перед элонгацией и удлинение цепи RNA-Pol II через CDK9/SEC [80].

После инициации транскрипции и выхода из промотора RNA-Pol II, другая РНК-полимераза может связываться с промотором и иницировать другой транскрипт. Этот процесс, называемый повторной инициацией, может продуцировать множество транскриптов за счет привлечения дополнительных РНК-полимераз. В отличие от основного комплекса Mediator, CDK8-Mediator не взаимодействует с RNA-Pol II, поэтому связывание модуля CDK8 с Mediator не позволяет попасть RNA-Pol II в PIC. Связывание модуля CDK8 с медиатором предотвратит повторное вовлечение промотора второй РНК-полимеразой. Для повторной инициации потребуются разрушить взаимодействие между модулем CDK8 и Mediator, чтобы позволить PIC быть полностью собранным [81].

1.3.2 Нетранскрипционные функции CDK8

CDK8 может активировать сигнальные пути и регулировать экспрессию генов путем фосфорилирования TFs, это включает в себя такие мишени как Smad [18], [19], NOTCH [82], STAT1 [83], SREBP [23] Wnt/ β -катенин [17] и HIF1- α [20], а также модификацию гистонов [63]. Каждый

сигнальный путь, на которые влияет CDK8 нацелен на различные субъединицы медиатора и направлен на отдельные факторы транскрипции, которые помогают рекрутировать и регулировать активность Mediator в выбранных областях генома. Конечным результатом является зависимость от фактора транскрипции индукция или ингибирование определенного набора генов. Благодаря этой промежуточной роли передача и интеграция этих сигналов включается непосредственно в механизм транскрипции (рисунок 8).



Рисунок 8 – Биологические функции CDK8

CDK8 усиливает активацию транскрипции и оборот рецепторного регуляторного белка Smad, действуя как положительный регулятор в сигнальном пути TGF- β /BMP. TGF- β является важным белком, принадлежащим к семейству цитокинов, регулирующим клеточный цикл [84], дифференцировку [85] и апоптоз в большинстве клеток млекопитающих [86]. CDK8/CDK9 фосфорилирует белок Smad, позволяя ему связываться с коактиваторами, специализированные для эффективной транскрипции

определенных генов, готовясь к возможной деградации [18]. В целом, это фосфорилирование регулирует транскрипционную активность, с помощью образования комплексов Smad с TF и кругооборот активированного белка Smad. Субъединица MED12, являясь частью комплекса CDK8, связанного с Mediator, активирует передачу сигналов TGF- β путем прямого связывания с рецептором TGF- β и ингибирования его активности [87]. В тот же момент MED12 одновременно регулирует активность киназы CDK8, а CDK8-зависимое фосфорилирование Smad1 или Smad2/3 полностью активирует эти TFs и тут же маркируется убиквитином [88].

CDK8 контролирует сигнальный путь, связанный с нейрогенным локусом гомолога белка NOTCH, который необходим для межклеточной коммуникации [89] и развития нейронов [90]. Лиганд, связанный с внеклеточным доменом рецептора NOTCH, индуцирует протеолитическое расщепление с высвобождением NICD из рецепторного комплекса, который проникает в ядро и взаимодействует со связывающим фактором, индуцируя транскрипцию гена-мишени NOTCH [91]. Комплекс CDK8/CNC контролирует функцию NICD посредством фосфорилирования, что приводит к его инактивации путем убиквитинирования и последующего прекращения экспрессии специфических генов [83].

Семейство белков STAT являются важными посредниками цитокинового ответа, и их нарушения обычно связаны с вирусными инфекциями, иммунными нарушениями и повышенной уязвимостью к гемопоэтическим злокачественным новообразованиям [92]. При передаче сигналов с помощью IFN- γ фосфорилирование белка STAT1 посредством JAK в области Tyr701 приводит к перемещению гомодимеров или гетеродимеров STAT1 в ядро клетки, где они, связываясь с ДНК, регулируют транскрипцию [93]. Но в то же время для полноценной экспрессии IFN- γ -зависимых генов требуется дополнительное фосфорилирование в STAT1-Ser727 [94]. Так комплекс CDK8/Mediator фосфорилирует STAT1 в месте Ser727, чтобы повысить активность STAT, усиливая транскрипцию, путем

увеличения экспрессии IFN- γ , приводя к реакциям со стороны иммунной системы на внедрившийся в организм патоген, делая это как киназо-зависимым образом через CDK8 или киназо-независимым образом через CDK19 [84].

Регуляция липогенеза в первую очередь опосредуется семейством TF SREBP [95]. При передаче сигналов инсулина SREBP-1C подвергается протеолитическому созреванию в аппарате Гольджи и транслоцируется в ядро для активации транскрипции липогенных генов. CDK8/CCNC отрицательно регулирует липогенез путем фосфорилирования SREBP-1C в Thr402, что приводит к усилению убиквитинирования SREBP-1C и деградации белка, то есть это будет приводить к усилению экспрессии генов, отвечающих за липогенез, тем самым повышая накопление липидов [23].

Гипоксия обычно возникает в растущих тканях, как например эмбриональные клетки и раковые опухоли, и для адаптации к гипоксическим условиям требуется транскрипционный ответ, вызванный HIF. При этом именно CDK8, но не CDK19, необходим для экспрессии HIF-1 α . Что касается механизма действия CDK8 на гены, индуцирующие гипоксию, CDK8 способна положительно влиять на удлинение RNA-Pol II через белок pTEF-b, связанного с CDK9, и с SEC, зависящего от CDK8. Роль HIF-1 α в этой регуляции заключается в более легком введении комплекса CDK8/Mediator в индуцированные гипоксией гены, с помощью взаимодействия трансактивационного домена HIF-1 α с CDK8-медиатором [20].

Ковалентная модификация гистонов посредством фосфорилирования и ацетилирования обычно ассоциируется с активацией транскрипции, в которой участвует специальный комплекс Cdk8/Mediator [96]. Он содержит в себе ацетилтрансферазу GCN5, способную катализировать фосфоацетилирование гистона H3 в областях Ser10/Lys14. Сперва CDK8 фосфорилирует Ser10 на гистоне H3, и далее за этим следует стимуляция ацетилирования Lys14 GCN5 [51].

Сигнальный путь Wnt/ β -катенин контролирует различные процессы развития многочисленных видов тканей, участвуя в дифференцировке и контролируя регенерацию тканей [97]. Таким образом, белок β -катенин транслоцируется в ядро, образует комплекс с TFs и связывается с ДНК, индуцируя транскрипцию. Субъединицы СКМ MED12 и MED13 необходимы для активации передачи сигнала Wnt у эукариот и стимулирования β -катенин-зависимой транскрипции посредством прямого взаимодействия между β -катенином и MED12 [98]. Вместе с тем, в качестве коактиватора, СКМ увеличивает передачу сигналов Wnt/ β -катенина путем фосфорилирования фактора транскрипции белка E2F1 (антагонист β -катенина). Этот процесс фосфорилирования белка E2F1 препятствует его способности ингибировать сигнальный путь Wnt/ β -катенина через расщепление β -катенина [99]. Следовательно, СКМ способствует передаче сигналов в пути Wnt/ β -катенина посредством двух механизмов: опосредует транскрипцию специфических генов β -катенина и ингибирует противоположного пути через его киназную активность.

Системы MAPK-сигнальных путей (в общем называемые Ras-ERK-MAPK) участвуют в регулировании роста, выживания и дифференцировки клеток, с помощью ряда транскрипционных факторов, которые способны функционировать благодаря их взаимодействию с Mediator [100], [101]. Субъединица MED23 необходима для передачи сигналов Ras-ERK через фактор тройного комплекса Elk-1, регулирующий связывание ДНК с генами-мишенями у млекопитающих. Однако, некоторые типы клеток, как например эмбриональные фибробласты мыши (MEF), могут передавать сигналы по сигнальному пути MAPK/ERK без использования MED23. Взаимодействие Elk-1 и MED23 имеет важное значение в этих клетках для ангиогенеза в плюрипотентных мезенхимальных стволовых клетках [102]. Но в то же время, снижение уровня MED23 мезенхимальных стволовых клетках приводит к липогенезу, а не к ангиогенезу, что обусловлено фактором SREBP в тройном комплексе, который взаимодействует с субъединицей

Mediator, отличным от MED23 [103]. Активирование пути Ras-ERK-MAPK может также приводить к фосфорилированию MED1, увеличивая его связывание с Mediator и улучшая транскрипцию в ответ на специфические TFs [104].

1.3.3 Молекулярная структура CDK8

Структурно CDK8 представляет из себя типичную билобальную киназную складку. N-концевой домен в основном включает β -листы с двумя α -спиралями, тогда как C-концевой домен в основном состоит из α -спиралей (рисунок 9).

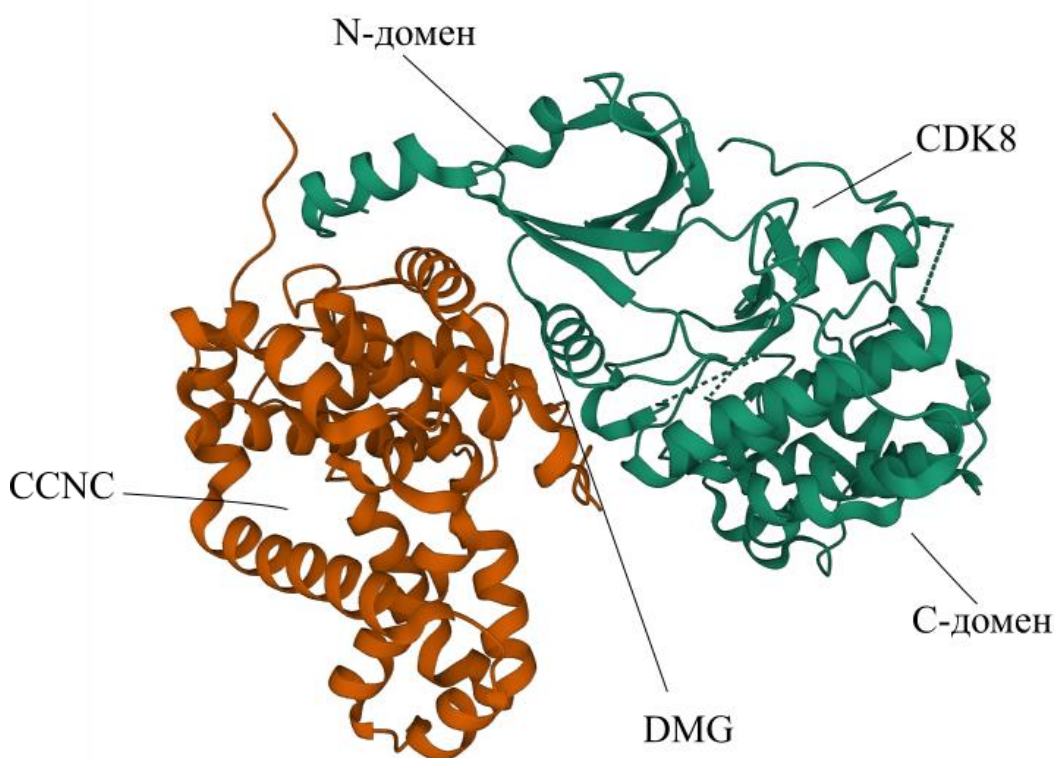


Рисунок 9 – Кристаллическая структура человеческого CDK8/CCNC в DMG конформации (PDB 4G6L)

Эти два домена соединены через область, называемой шарнирной. В нем существует каталитический зазор, который граничит с областью соединения и расположен между двумя областями, обе из которых включают в себя кацостатки активного центра [33]. C-концевой домен, находясь в сайте связывания АТФ, содержит мотив DMG и заменяет мотив DFG, который

очень консервативен в канонических CDK. DMG можно разделить по функциональности как DMG-in или DMG-out. DMG-in способна связывать малые молекулы, которые могут проникать только в неглубокие гидрофобные карманы, состоящие из Arg356, Ile158, Ala155, His106 и Trp105. DMG-out — это своего рода глубокая капсула, через которую соединение проходит после области DMG и попадает в эту, состоящую из Leu70, Leu73, Ser62, Arg65 и Phe176 [105]. В отличие от других канонических CDK, в активной конформации CDK8 нет фосфорилированных остатков в T-кольце, вместо процесса фосфорилирования остаток Glu99 в CCNC имитирует действие фосфорилированных остатков и взаимодействует с тремя сильно законсервированными аргининами, такими как Arg178 (T-петля), Arg150 (C-лепесток) и Arg65 (N-лепесток). Данные взаимодействия могут вызывать конформационные изменения CDK8/CCNC, открывая сайт связывания АТФ [106].

Активная конформация CDK8 достигается путем связывания с CCNC, и в результате перемещается спираль α C и мотив DMG, связанный с ней, при этом убирая стерическую затрудненность на каталитическом сайте. Чтобы привести к снижению эффективности и стабильности CDK8, нужно разрушить консервативный солевой мостик между Lys52 и Glu66. Кроме того, Phe97, прилегающий к области шарнира, выступает в канал выхода растворителя, что приводит к неконтролируемому усилению активности CDK8. Связывание субъединиц MED12/MED13 с CDK8/CCNC также способствует дальнейшим конформационным изменениям, так субъединица MED12 необходим для активности CDK8, а субъединица MED13 является посредником для связывания СКМ с Mediator [107].

1.4 Значение CDK8 при патологических процессах

CDK8 участвует в нескольких ключевых процессах развития и клеточных путях, поэтому неудивительно, что нарушение регуляции CDK8

часто приводит к раку. Однако CDK8, действует по-разному в зависимости от вида рака, хотя в большинстве случаев он действует как промотор при многих видах рака. Он становится сверхэкспрессируемым при меланоме, лейкемии, раке молочной железы, раке толстой кишки, раке предстательной железы и раке поджелудочной железы (рисунок 10).

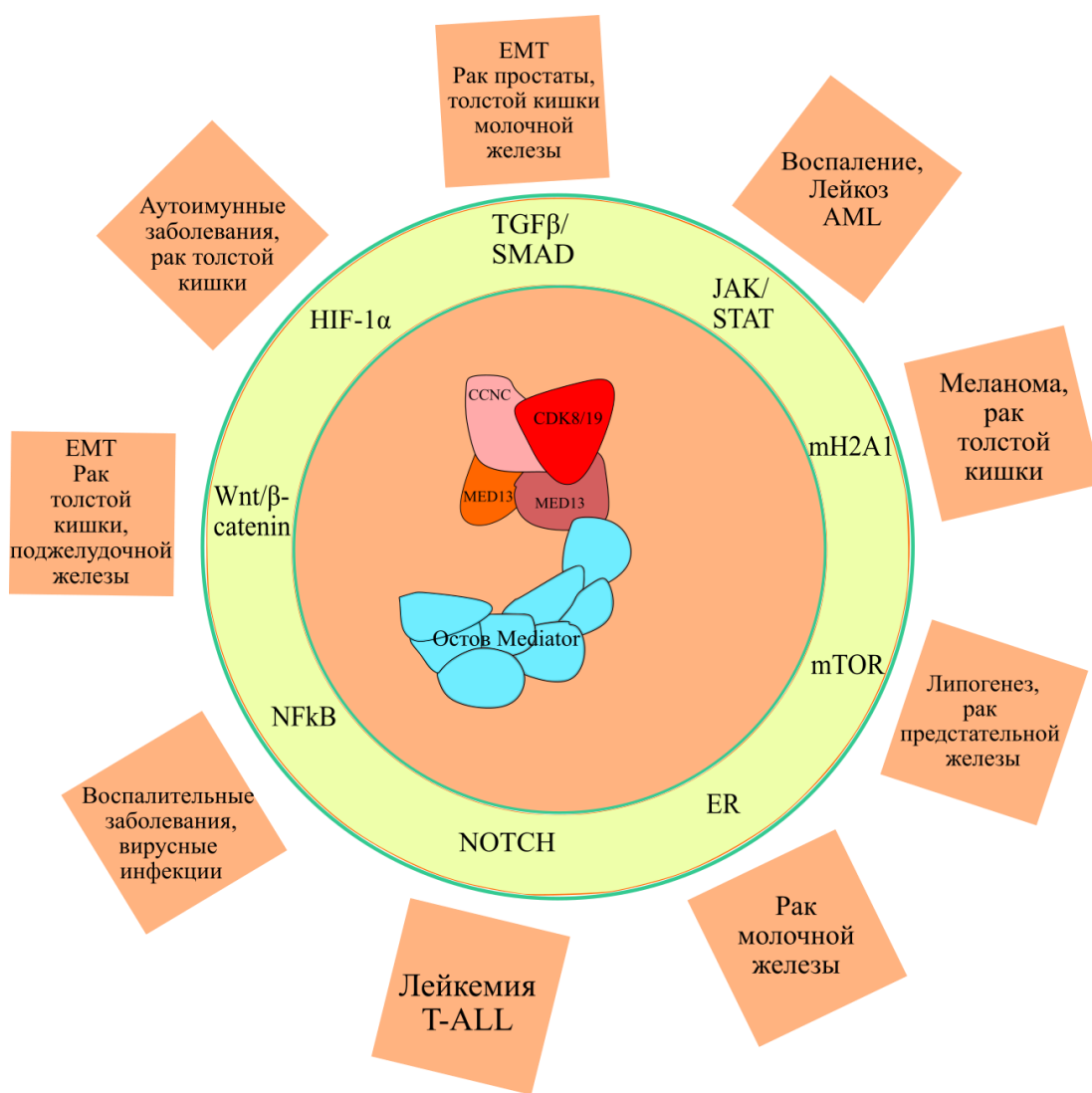


Рисунок 10 – Схема функций CDK8 и их связь с патологиями

1.4.1 Роль CDK8 при раке

Первое упоминание о том, что CDK8 является протоонкогеном появляется в работе Firestein et al. при CRC [108]. Кроме того, статистически рак толстой кишки стоит на втором месте по смертности от агрессивных форм раков в России и в почти половине случаев находится сверхэкспрессия

CDK8. CDK8 действует как протоонкоген, из-за того, что он взаимодействует с путями сайтов интеграции, связанных с сигнальным путем Wnt, для усиления транскрипционной активности β -катенина и способствует прогрессированию колоректальной аденомы до карциномы, вызывая метастазы. Нокдаун CDK8 в клеточных линиях CRC снижает клеточную пролиферацию и уменьшает количество клеток на стадиях G1 и S [109]. Напротив, CDK8 способен ингибировать рост опухоли в модели рака толстой кишки: увеличение выработки CDK8 приводит к увеличению размера опухоли и ускорению пролиферации. Этот эффект обусловлен снижением метилирования гистонов H3K27 и активацией генов, регулируемых группой комплекса Polycomb, участвующих в передаче сигналов в опухолевой клетке [110].

Меланома - редкий рак кожи, но если ее не лечить, уровень смертности от нее очень высок. Меланома регулируется вариантами гистонов H2A, и уменьшение вариантов гистонов связано с тяжестью заболевания. CDK8 участвует в эпигенетических изменениях при меланоме и mH2A является эпигенетическим фактором, участвующим в подавлении генов, включая CDK8. Ткань метастатической меланомы в основном содержит метилированную промоторную область mH2A2 и высокие уровни экспрессии CDK8. Эта ассоциация показывает, что CDK8 контролирует прогрессирование меланомы, усиливая рост клеток и миграцию клеток [111]. В то же время повышенная экспрессия CDK8 может улучшить лечение меланомы и компенсировать потерю функции из-за снижения регуляции mH2A [112].

Рак молочной железы является первым по смертности среди женщин и может быть, как легко поддающимся лечению или наоборот быть устойчивым к любой терапии. При раке молочной железы уровень экспрессии гистона mH2A1 низкий, поскольку белок Skp2, принадлежащий к семейству белков SCF, отвечает за расщепление mH2A1. Вместе с другими Skp1 и cullin-1 Sp2/F-Vox образует комплекс лигазы E3 SCF, который играет важную роль в

регуляции клеточного цикла и поддержании сохранности всего генома [113]. Путь Skp2-mH2A1-CDK8 играет ключевую роль в регуляции контрольной точки G2/M, полиплоидии, клеточной пролиферации и инвазивности и, следовательно, играет ключевую роль в развитии рака молочной железы. Функция паралога CDK19 при раке молочной железы не подтверждена, но CDK8 активируется ниже по пути рецепторов эстрогена, из-за того, что транскрипция, индуцируемая эстрогеном, зависит от активности киназы CDK8 [114].

Лейкемия характеризуется быстрой экспансией и системным поражением организма и является наиболее опасной формой рака, из-за ее возникновения в кроветворной системе, поражающим весь организм. SE состоят из массивных кластеров энхансеров, плотно загруженных комплексом Mediator, факторами транскрипции и регуляторами хроматина. Так BRD4 и CDK7 являются положительными регуляторами SE-опосредованной транскрипции. Напротив, отрицательный регулятор CDK8 ингибирует повышенную активацию важных SE-ассоциированных генов в клетках AML. Комплекс CDK8/CCNC действует как опухоль-супрессор при остром лимфобластном T-ALL [115]. CCNC-опосредованная активация CD8 предотвращает прохождение сигнального пути NOTCH, что усиливает деградацию NICD. Отсутствие CCNC повышает уровень онкогена NICD и увеличивает шанс прогрессирования острого лейкоза [116].

1.4.2 Роль CDK8 в иммунных заболеваниях

Семейство транскрипционных факторов NF-κB вовлечено в несколько основных заболеваний, включая воспалительные расстройства и рак. CDK8 рекрутирует эпигенетические регуляторы для ингибирования генов, ответственных за иммунитет. NF-κB и C/EBPβ и субъединицы CDK8, Med12 и Med13 участвуют в транскрипционной активации воспалительных генов. CDK8 связывается с промотором воспалительного гена на C/EBPβ и NF-κB и положительно регулирует его транскрипцию, увеличивая экспрессию воспалительного гена; это связано с тем, что CDK8 фосфорилирует STAT1

начинается раньше, чем связывание промотора с транскрипцией мРНК этих цитокинов [117].

НК-клетки развиваются и созревают в костном мозге и селезенки, и возглавляют естественную защиту организма от вирусных инфекций и злокачественных клеток. В отсутствие стимуляции цитокинами CDK8 может фосфорилировать STAT1 в Ser727, ингибировать цитотоксичность в поющих NK-клетках и снижать мониторинг появления возможных опухолей [118]. Однако, когда CDK8 расщепляется из NK-клеток с помощью shRNA, это может снизить фосфорилирование STAT1 и увеличить цитотоксичность NK-клеток, благодаря повышенной экспрессией цитолитических эффекторных белков перфорина и гранзима В. Кроме того, NK-клетки участвуют в уничтожении лейкозных стволовых клеток, которые способны вызвать рецидив заболевания [119].

1.4.3 Роль CDK8 в метаболизме рака

Опухолевые клетки перепрограммируют свой метаболизм, чтобы удовлетворять потери в высокой энергии и строительных материалах (нуклеотидах, аминокислотах, липидах) – это позволяет им оставаться быстроделющимися клетками и быть устойчивыми к жестким воздействиям извне. Из-за такой трансформации в метаболизме опухолевые клетки намного сильнее увеличивают свою выраженность характерных признаков, присущим быстропролиферирующим клеткам, и за счет таких особенностей их можно выявлять.

Ускоренная пролиферация раковых клеток требует высокого уровня АТФ, который обычно обеспечивается большим потреблением глюкозы и повышенным уровнем гликолиза, связанного с образованием молочной кислоты. Это явление называется эффектом Варбурга, и каждая клетка будет использовать именно быстрый гликолиз, а не окисление пирувата в митохондриях, используя кислород, как в типичных клетках, такая уникальность может представлять собой терапевтический потенциал [120]. HIF-1 α является главным регулятором транскрипции гликолитических

ферментов и работает одновременно с CDK8, воздействуя на экспрессию генов. CDK8 играет основную роль в экспрессии гликолитических генов и, таким образом, в эффекте Варбурга. Так, например, ингибирование CDK8 в клеточных линиях CRC понижает уровни переносчиков глюкозы, снижает поглощение глюкозы и саму возможность гликолиза, а также снижает пролиферацию клеток и независимый от связывания рост [121].

Аномальный метаболизм липидов и углеводов является еще одной дополнительной особенностью раковых клеток. Например, при раке предстательной железы наблюдается увеличение липогенеза: раковые клетки требуют для себя повышенную потребность в жирных кислотах, как в качестве строительного блока для онкогенеза, так и в качестве сигнальной молекулы, участвующей в сигнальных путях. CDK8 играет ключевую роль в регуляции липогенеза, как описано выше, с помощью белка SREBP-1c. Фосфорилирование SREBP-1c с помощью CDK8 индуцирует его деградацию, препятствуя экспрессии липогенных генов, липогенезу и накоплению липидов в клетках [122].

Сигнальный путь mTOR является основным датчиком клеточной энергии в питательных веществах, а стресс и измененные функции играют определенную роль в таких заболеваниях, как диабет, рак и старение [123]. При ожирении и старении активность mTORC1 обратно пропорциональна уровню CDK8, так что mTORC1 оказывает прямое влияние на уровень белка CDK8, так, например, при неалкогольной жировой болезни печени повышенная активация mTORC1 приводит к образованию комплекса CDK8-CCNC и повышению экспрессии липогенного белка SREBP-1c [124].

1.5 Ингибиторы CDK8, как противоопухолевые препараты

Как уже упоминалось, CDK8 проявляет онкогенную роль при различных типах рака, и его ингибирование может подавлять рост опухоли. Это свойство CDK8 вызвало особый интерес среди исследователей и привело

к разработке ингибиторов CDK8 в качестве возможных противоопухолевых средств, но в последнее время клинически был достигнут очень незначительный прогресс. Все обнаруженные в настоящее время ингибиторы CDK8 также ингибируют CDK19, что обусловлено высоким структурным сходством между двумя киназами.

Кортистатин А (соединение **1**, рисунок 11) является первым соединением, проявляющим высокое сродство к CDK8 [125], показывая к ней $IC_{50} = 5$ нМ. Соединение **1** прошло биохимические тесты на 10 мкМ 402-киназной панели для эффективного ингибирования нескольких рекомбинантных протеинкиназ, включая ROCKs и CDK19. Платформа KiNativ также использовалась для оценки селективности **1** в клеточных лизатах MOLM-14 (клеточные линии лейкемии человека), но не было обнаружено связывания с ROCK1 или ROCK2 на уровне 2,5 мкМ, что указывает на высокую специфичность CDK8 в клетках [19]. В клетках MOLM-14 **1** ингибирует фосфорилирование субстратов CDK8, включая STAT1-Ser727, Smad2-Thr220 и Smad3-Thr179. Хотя он не ингибирует рост клеток HCT116 (клеточные линии колоректального рака человека), **1** проявляет высокую антипролиферативную активность в отношении различных линий лейкозных клеток, и эта активность находится в положении 105 в CDK8. Соединение **1** является единственным ингибитором CDK8 с доминирующей лекарственно-устойчивой аллелью, подтвержденный на этих лейкозных клетках. Клеточная эффективность **1** привела к ингибированию роста опухоли в двух моделях ксенотрансплантата, но сильной токсичности для экспериментальных животных не было обнаружено [115].

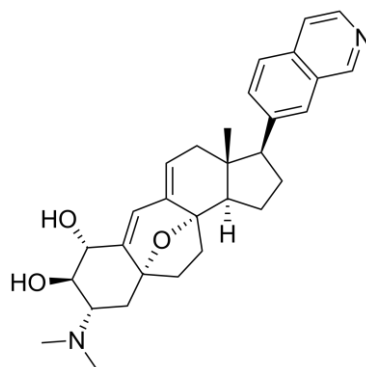


Рисунок 11 – Структурная формула соединения **1**

Трициклобензимидазол SEL120-34A (соединение **2**, рисунок 12), разработанный компанией Selvita, является еще одним сильным АТФ-конкурентным ингибитором CDK8 [126], проявляя к нему $IC_{50} = 4$ нМ. Эта молекула проявляет хорошую селективность в отношении всех канонических CDK и CDK7, но слабо ингибирует CDK9. Соединение **2** может ингибировать фосфорилирование STAT1 в Ser727 и STAT5 в Ser726 *in vitro* и предотвращать рост таких клеток AML с особенно высоким фосфорилированием. В двух моделях ксенотрансплантата AML соединение **2** ингибирует рост опухоли без каких-либо признаков токсичности и дозозависимо ингибирует фосфорилирование STAT5 в Ser726, не влияя на известный субстрат CDK8 STAT1-Ser727. Также можно отметить, что **2** неактивен на клеточных линиях MOLM-14,21, которые чувствительны к **1** [115].

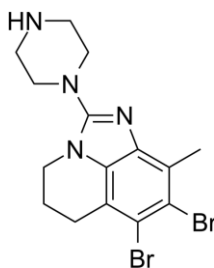


Рисунок 12 – Структурная формула соединения **2**

Производное 4-аминохиназолина Сенексин А (соединение **3**, рисунок 13) является мощным АТФ-конкурентным ингибитором CDK8 проявляя к

нему $IC_{50} = 280$ нМ. Соединение **3** ингибирует транскрипцию, контролируемую β -катенином, в клетках НСТ116 и индукцию определенного TF EGR, во время стимуляции сыворотки в клетках НТ1080 (клеточная линия фибросаркомы человека), что согласуется с биологической функцией CDK8 [78]. Кроме того, **1** подавляет стимулирующую опухоль паракринную активность препарата доксорубина, который повреждает ДНК, как *in vitro* так и *in vivo*. В дополнение к CDK8 он также ингибирует MAPK2/19, но в меньшей степени [127].

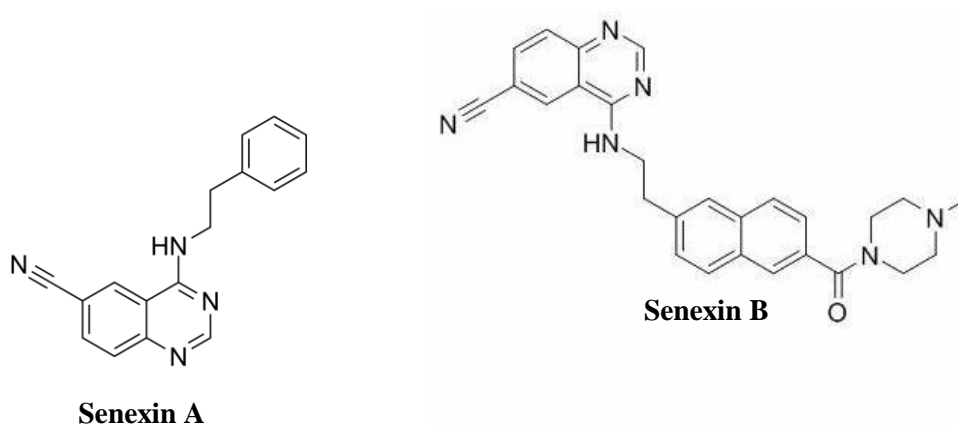


Рисунок 13 – Структурные формулы соединений **3** и **4**

Подобно **3**, аналогичное Сенексин В (соединение **4**, рисунок 13) ингибирует транскрипцию, контролируемую β -катенином, в клетках НСТ116, ингибируя CDK8 на уровне $IC_{50} = 24-50$ нМ. В модели ксенотрансплантата мыши предварительная обработка мышей соединением **4** замедляло приживание клеток рака легких человека A549 (клеточная линия рака легких человека) и TNBC. Также было показано, что **4** повышает чувствительность ксенотрансплантатов TNBC к терапии доксорубицином, и по сравнению с монотерапией доксорубицином комбинированная терапия продемонстрировала значительный антиметастатический потенциал [128]. Тем временем, **4** ингибирует рост AML- и ER-положительных клеточных линий рака молочной железы. В ER-положительной модели рака молочной железы *in vivo* **4** ингибирует рост опухоли и усиливает ингибирующий рост эффекта

фульвестранта SERD, представляющего собой тип препарата, который связывается с ER и при активации вызывает деградацию рецептора эстрогена, без явной токсичности для животного [126].

ССТ251545 (соединение **5**, рисунок 14), производное 3,4,5-тризамещенного пиридина, первоначально было идентифицировано как мощный ингибитор пути Wnt/BMP, нацеленный на CDK8 [129] в пределах $IC_{50} = 5-6$ нМ. В дополнение к CDK8, соединение **5** слабо воздействует на GSK. Впоследствии был представлен аналог, более мощный ингибитор CDK8, под аналогичным названием ССТ251921 (соединение **6**, рисунок 14) с $IC_{50} = 2.3-2.6$ нМ. Хотя было заявлено, что **5**, **6** являются селективными для панелей из 291, 279 и 264 киназ, CDK8 не включен ни в одну из этих панелей киназ в качестве положительного контроля даже при 1 мкМ. Доклинические испытания этих соединений показали, что они ингибируют Wnt-зависимую активность во многих клеточных линиях CRC и фосфорилирование STAT1 в Ser727. Хотя оба соединения сильно ингибируют передачу сигналов Wnt в репортерных анализах, они не ингибируют пролиферацию клеточных линий CRC *in vitro*, но могут умеренно ингибировать рост опухоли в ксенотрансплантатах CRC. Однако соединение **6** вызвало токсичность для ключевых органов, таких как костный мозг, сердце, печень и легкие [130].

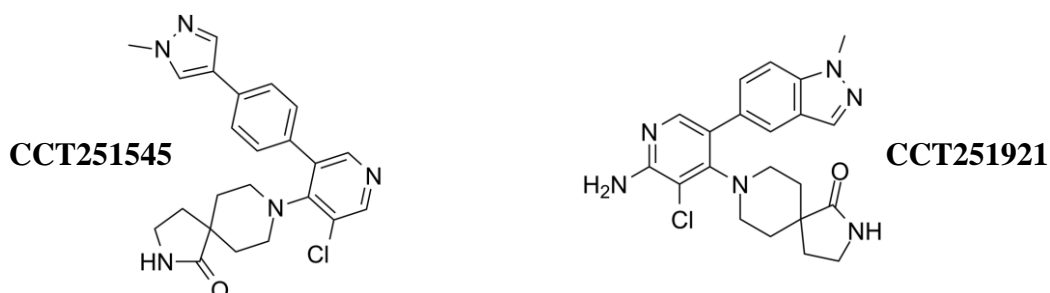


Рисунок 14 – Структурные формулы соединений **5** и **6**

В последнее время намного сильно увеличилась разработка ингибиторов CDK8 за счет включения в молекулу мочевины, что дало более мощные свойства новых соединений. Соединение **7** (рисунок 15) является

перспективным ингибитором CDK8, влияя на регулирование сигнального пути Wnt/ β -катенин в клетках HCT-116 при $IC_{50} = 46.5$ нМ. Более того, он продемонстрировал антипролиферативную активность в отношении клеток HCT-116, устойчивых к сорафенибу, что показало полезность соединения **7** в предотвращении развития устойчивости к препаратам, нацеленным на EGFR. В дополнение к его эффективности *in vitro*, тест на острую токсичность показал более низкую токсичность его в дозе 1000 мг/кг *in vivo* на крысах. Соединение **7** в мышинной модели CRC уменьшал объем опухоли у крыс, что может быть использовано при терапии CRC [131].

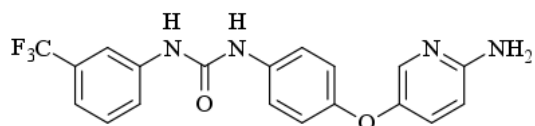


Рисунок 15 – Структурная формула соединения **7**

Производное пирролидиновой мочевины соединение **8** (рисунок 16) эффективно ингибирует CDK8 в биохимических анализах при $IC_{50} = 14.7$ нМ, но не проявляет активности против CDK8 в клетках HCT116. Эта относительно плохая трансляция биохимической активности *in vitro* в клеточную активность ингибитором типа II, обусловлена тем фактом, что он нацелен на неактивную форму CDK8, которая плохо доступна в клетках [132].

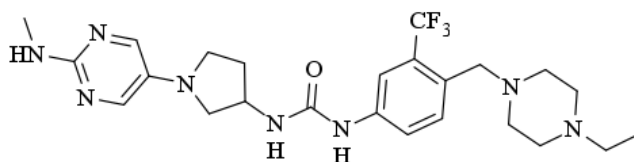


Рисунок 16 – Структурная формула соединения **8**

Производное трициклического бензоксазепинона (соединение **9**, рисунок 17) проявляло мощную эффективность по отношению к CDK8 с IC_{50} 8.25 нМ. Кроме того, **9** продемонстрировало хорошую селективность по

отношению к панели из 456 киназ. Соединение **9** показало умеренное снижение фосфорилирования субстрата CDK8 STAT1 в клетках, в соответствии с другими классическими зарегистрированными ингибиторами CDK8 II типа [133].

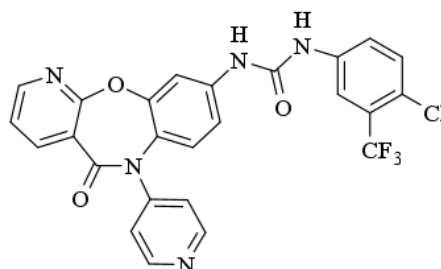


Рисунок 17 – Структурная формула соединения **9**

VI-1347 (соединение **10**, рисунок 18) является самым селективным ингибитором CDK8/CCNC с $IC_{50} = 1$ нМ, при этом одновременно не сильно влияя на CDK19, которая не является преобладающей мишенью для этого соединения. Ингибирование CDK8 с помощью **10** привело к снижению опухолевой нагрузки и увеличению продолжительности выживаемости в модели меланомы. В отличие от большинства других ингибиторов CDK8, которые проявляли антипролиферативное действие на различные линии раковых клеток, соединение **10** избирательно снижали пролиферацию лишь небольшой подгруппы гематологических раковых клеточных линий, активируя противоопухолевый иммунитет с помощью ингибирования фосфорилирования STAT1S727, пока на солидных опухолях такого эффекта не наблюдалось. Из-за непродолжительности эффекта **10** он может быть полезен при терапии с комбинацией лекарственных средств, как было показано с антителом ритуксимабом, активирующим цитотоксичность у NK-клеток в отношении В-клеток первичного лейкоза *in vivo*. Также ингибирование CDK8 соединением **10** было связано с определенными токсическими эффектами в доклинических исследованиях на животных, и только прерывистая терапия **10** связано улучшенной противоопухолевой

эффективностью по сравнению с ежедневным лечением [134]. В данной работе это соединение будет использовано в качестве селективного ингибитора CDK8, из-за его высоких ингибирующих свойств и возможным потенциалом в качестве адьювантного средства в сочетании с EGFR-направленными препаратами, поскольку их взаимодействие может повлиять на схожие друг на друга пути.

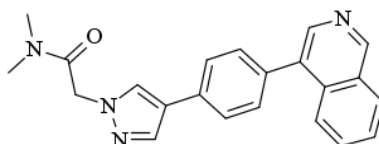


Рисунок 18 – Структурная формула соединения **10**

2 Результаты и их обсуждение

На основе литературного обзора, можно предложить гипотезу, что ингибиторы CDK8 вместе с EGFR-препаратами могут преодолевать возникшую лекарственную резистентность, влияя на появившиеся в изменения в транскрипции. Чтобы данную гипотезу подтвердить, было решено провести тесты для определения эффективности ингибирования роста опухолевых клеток, такие как МТТ-тест, клоногенный анализ и анализ индукции апоптоза.

МТТ-тест является хорошим зарекомендованным методом для обнаружения ингибирования роста клеток, им можно тестировать большое количество соединений за небольшое, по меркам микробиологии, времени. МТТ-тест основан на восстановлении желтой соли тетразолия МТТ до кристаллов формазана. Интенсивность растворившегося формазана показывает оставшееся количество клеток в лунке после обработки соединениями.

Колониеобразующий тест или клоногенный анализ позволяет оценить, способность отдельных клеток образовывать колонии при обработки их исследуемыми соединениями. Данный метод способен продемонстрировать количество выживших клеточных колоний в лунках, но, к сожалению, такой тест требует большое количество времени для образования колоний.

Анализ индукции апоптоза довольно затруднительный тест, но с помощью него можно обнаружить ранний и поздний апоптоз клеток, которые до этого были обработаны интересующими соединениями. Для обнаружения видов апоптоза используются такие красители, как аннексин V-FITC и пропидий йодистый (PI). Ранним признаком апоптоза считается появления фосфатидилсерина на клеточной мембране из цитоплазматической стороны, а аннексин V способен сильно связываться с ним, что делает его хорошей меткой для обнаружения раннего апоптоза. Уже на поздних стадиях клеточная мембрана клетки начинает разрушаться и благодаря этому

пропидий йодистый, проникает внутрь клетки, связываясь в ядре с ДНК клетки и окрашивая его [136].

2.1 МТТ тест

При назначении монотерапии обычно достигается подавление роста опухолевых клеток, но чем больше длится такая терапия, тем чаще будут возникать раковые клетки, способные адаптироваться к жестким условиям и становиться устойчивыми к лекарственным препаратам. Для наглядного сравнения монотерапии и комбинированной терапии, мы построили кривую доза-ответ для gefitinib и BI-1347 по отдельности на нормальных клетках NCI-H1975. На рисунке 19 А видно, что соединение BI-1347 не эффективно ингибирует рост клеток даже при повышении концентрации около 11 %. Gefitinib по сравнению с предыдущим показывает хорошее ингибирование клеток примерно 80 % на рисунке 19 В. При преодолении концентрации порогом в 10 мкМ, наблюдается повышение значения ингибирования, при низких же концентрациях – никакого эффекта терапии селективными ингибиторами EGFR не наблюдалось.

Далее, чтобы проверить гипотезу о более эффективном влиянии комбинированной терапии на клетках с резистентностью, мы построили кривую доза-ответ для gefitinib и BI-1347 по отдельности на gefitinib-резистентных клетках NCI-H1975GR. На рисунке 19 С видно, что соединение BI-1347 слабо ингибирует рост клеток даже при повышении концентрации, но в отличие от того же графика на нормальных клетках NCI-H1975, тут видно заметное улучшение ингибирования. Gefitinib также показывает эффективное ингибирование клеток на рисунке 19 D. По сравнению с нормальными клетками тут gefitinib показывает лучшую чувствительность на резистентных клетках уже при концентрации 1 мкМ, до этого порога никакого ингибирования почти не происходит.

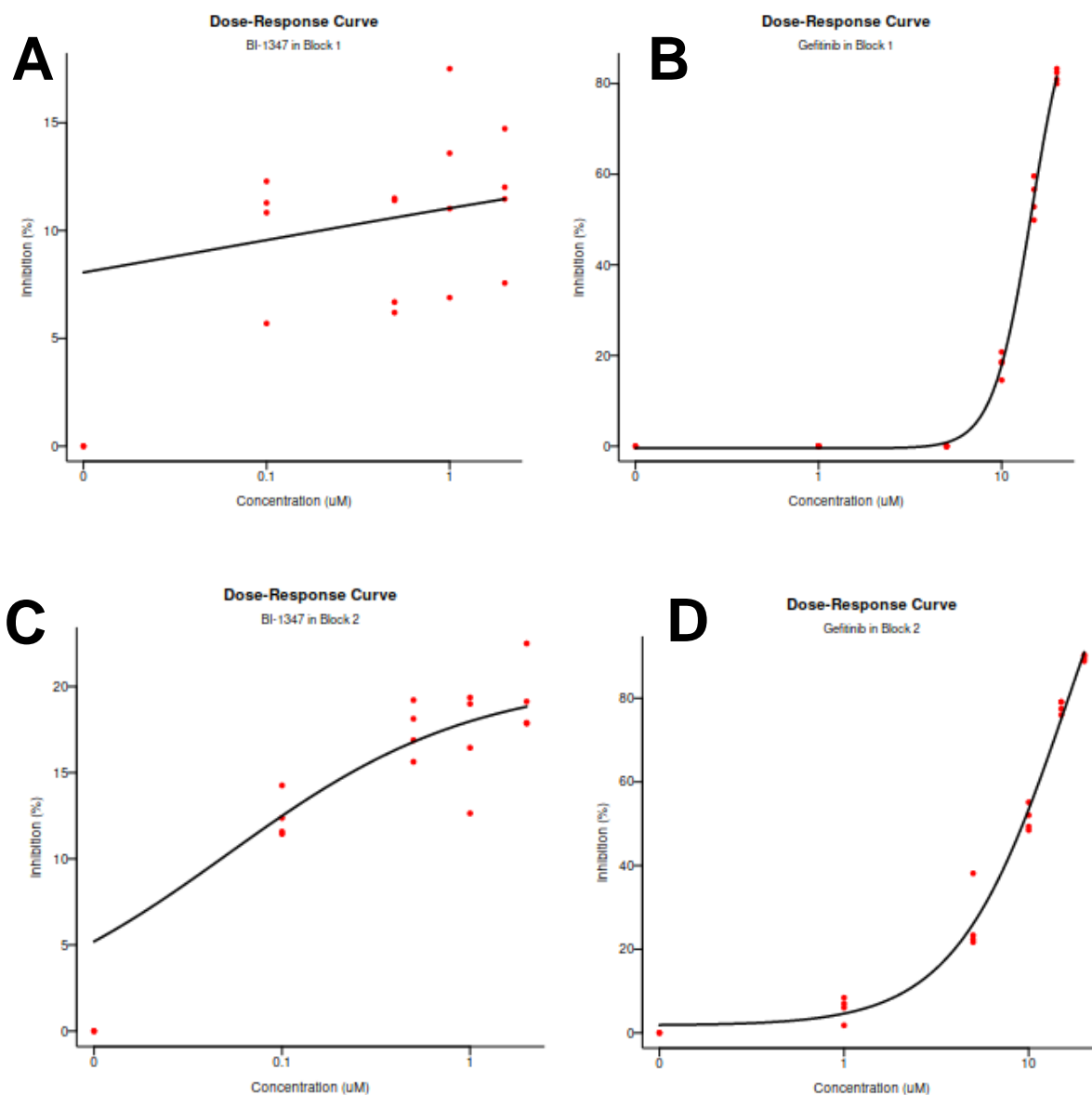


Рисунок 19 – Кривые доза-зависимости BI-1347 (A) и gefitinib (B) на NCI-H1975 и BI-1347 (C) и gefitinib (D) NCI-H1975GR

В дальнейшем использовали не резистентные опухолевые клетки A549. На данной клеточной модели мы исследовали монотерапию gefitinib и BI-1347 (рисунок 20 A), но как показали результаты теста BI-1347 действовал на клетки дозозависимым образом, в то время как gefitinib никаким образом не проявлял биологическую активность на клеточной линии (рисунок 20 B).

В итоге мы решили взять еще одну gefitinib-резистентную клеточную линию A549GR, которая продемонстрировала минимальный ответ при ингибировании соединением BI-1347 (рисунок 20 C), но при

использовании гефитиниба удалось остановить рост клеток лишь на 50% (рисунок 20 D).

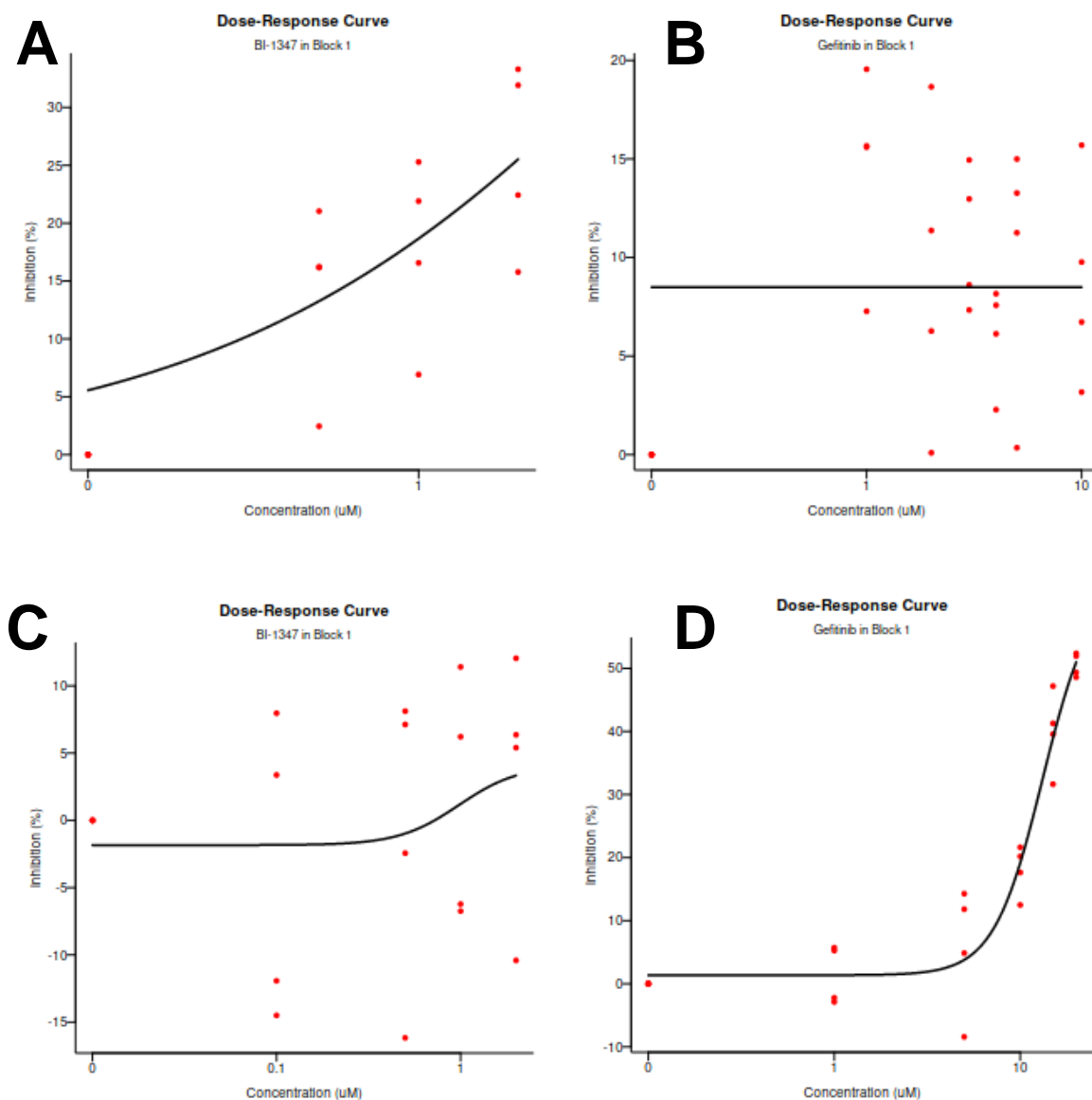


Рисунок 20 – Кривые доза-зависимости BI-1347 (A) и гефитиниба (B) на A549 и BI-1347 (C) и гефитиниба (D) A549GR

Рассматривая эти результаты, можно понять, что на гефитиниб-резистентных клеточных линиях использование исследуемых моноагентов, гораздо эффективнее чем на культурах не резистентных клеток.

Далее были построены матрицы доза-ответ комбинаций гефитиниба и BI-1347, для понимания того как их сочетание будет влиять на клетки и при

каких конкретных концентрациях достигается максимальное ингибирование. И как можно увидеть на рисунке 21, комбинация этих двух препаратов показывает значительное ингибирование роста нормальных клеток NCI-H1975. Самое максимальное значение ингибирования клеток в среднем составляет 90% при концентрациях gefitinib 20 мкМ и BI-1347 0,5 мкМ

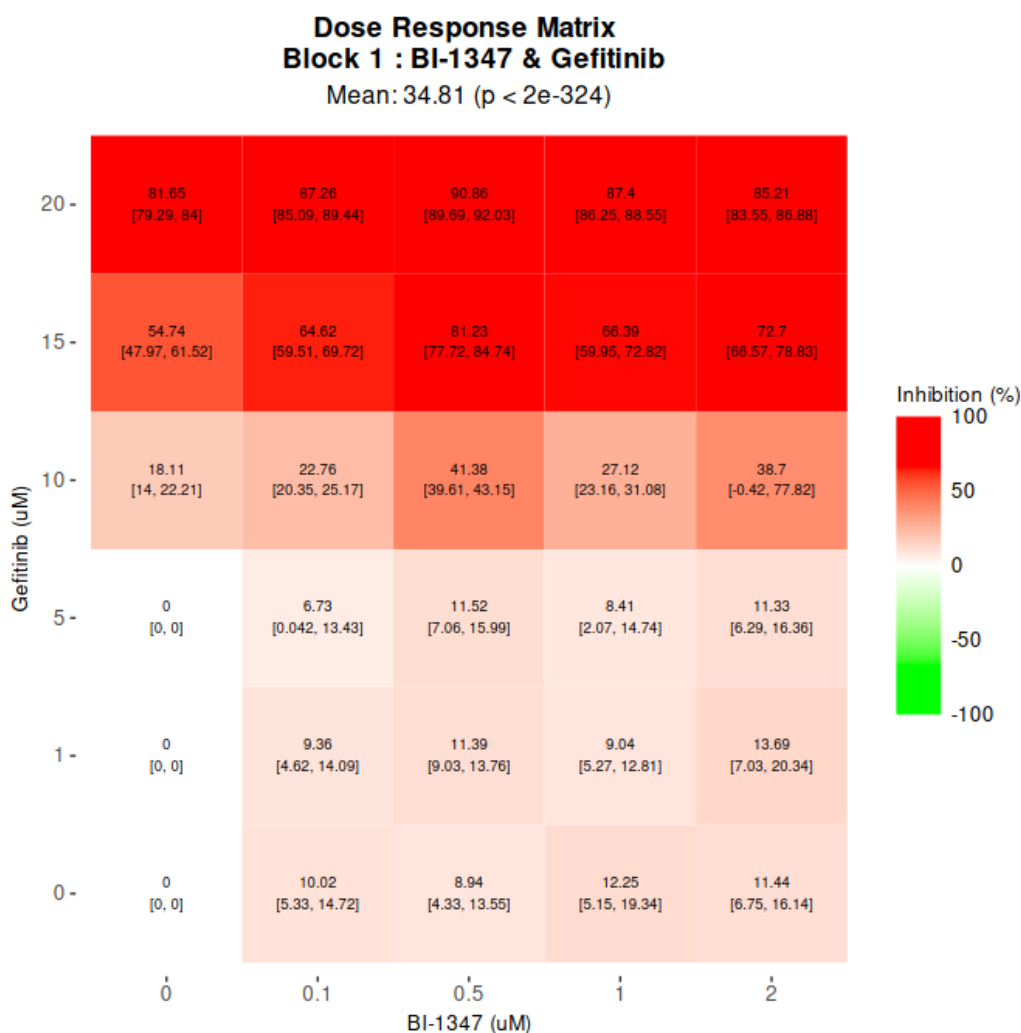


Рисунок 21 – Матрица доза-ответ комбинаций gefitinib и BI-1347 на NCI-H1975

На матрице доза-ответ комбинаций gefitinib и BI-1347 на клеточной линии NCI-H1975GR (рисунок 22), видно, что комбинация этих двух соединений показывает лучшее из всех ингибирование роста клеток чем на не резистентных клетках NCI-H1975. Самое максимальное значение ингибирования клеток в среднем составляет 94% при концентрациях

гефитиниба 20 мкМ и BI-1347 0,5 мкМ, при этом можно заметить, что в этих двух линиях достаточно лишь небольшое добавление соединения BI-1347 для увеличения ингибирования роста клеток.

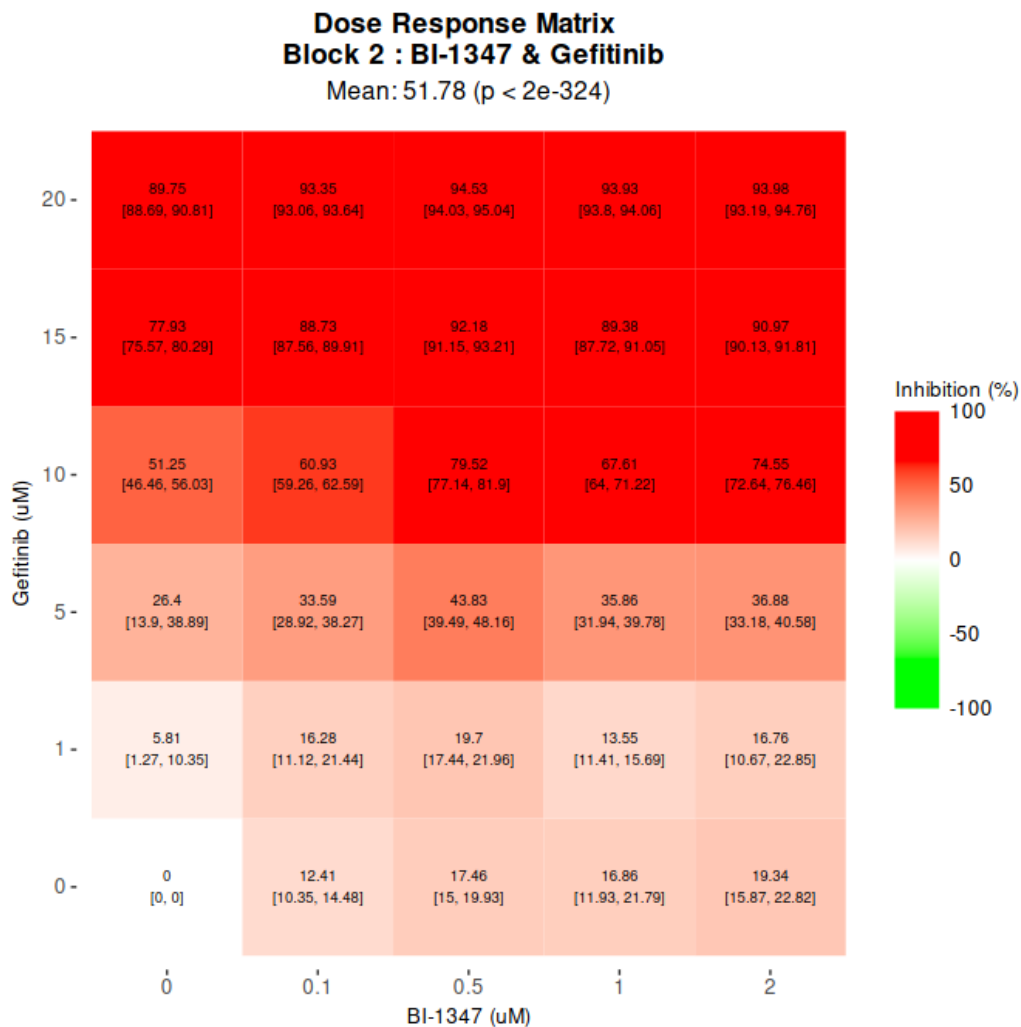


Рисунок 22 – Матрица доза-ответа комбинаций гефитиниба и BI-1347 на NCI-H1975GR

На другой матрице доза-ответ комбинаций гефитиниба и BI-1347 на клеточной культуре A549 (рисунок 23), видно, что сочетания этих двух препаратов показывает незначительное ингибирование роста опухолевых клеток. Самое большое значение ингибирования клеток в среднем 29% показывает при концентрациях гефитиниба 1 мкМ и BI-1347 2 мкМ, из-за устойчивости изначально данной клеточной культуры гефитинибу

эффективного ингибирования мы не наблюдали. Возможное использование других селективных ингибиторов EGFR помогло бы повысить значения.

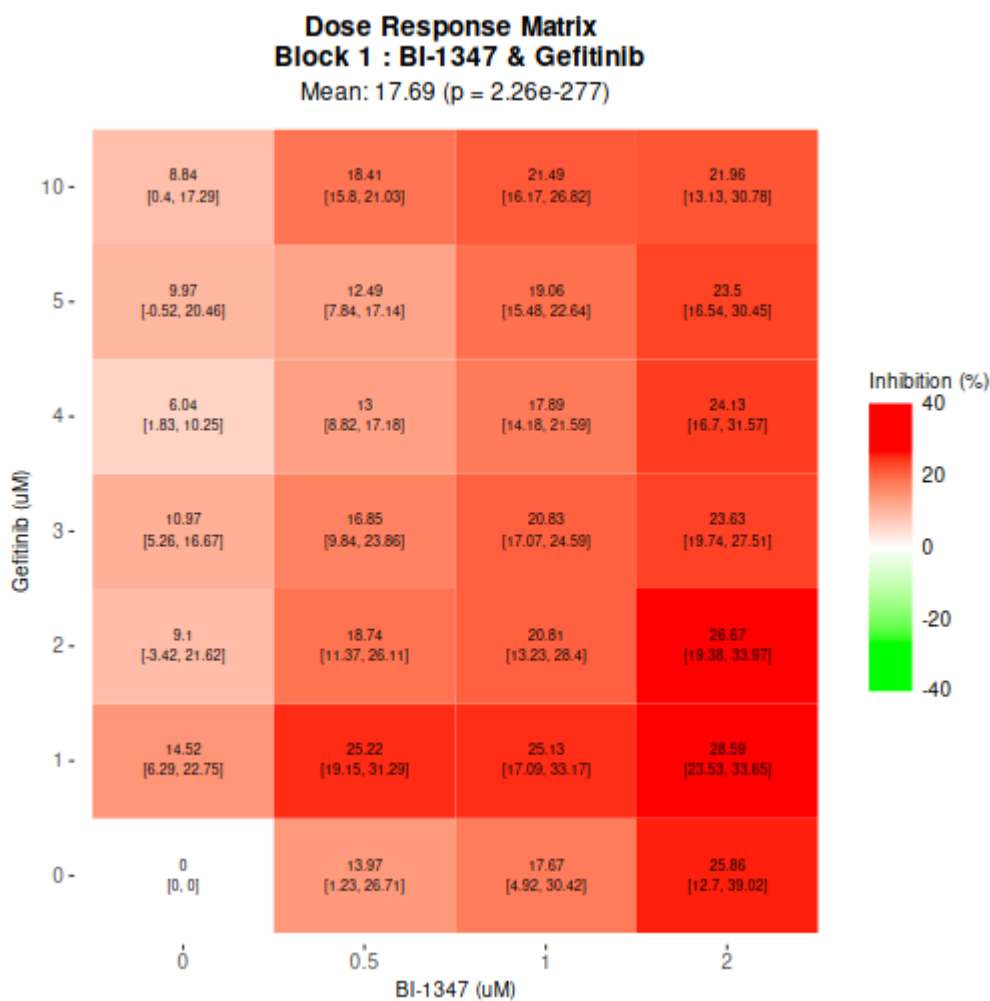


Рисунок 23 – Матрица доза-ответ комбинаций гефитиниба и BI-1347 на A549

Последняя матрица доза-ответ комбинаций гефитиниба и BI-1347 на гефитиниб-резистентной клеточной культуре A549GR (рисунок 24) показывает, что комбинирование этих двух молекул дает значительное ингибирование роста опухолевых клеток. Самое высокое значение ингибирования клеток в среднем 72% показывает при концентрациях гефитиниба 20 мкМ и BI-1347 0.5 мкМ.

**Dose Response Matrix
Block 1 : BI-1347 & Gefitinib**

Mean: 23.5 (p < 2e-324)

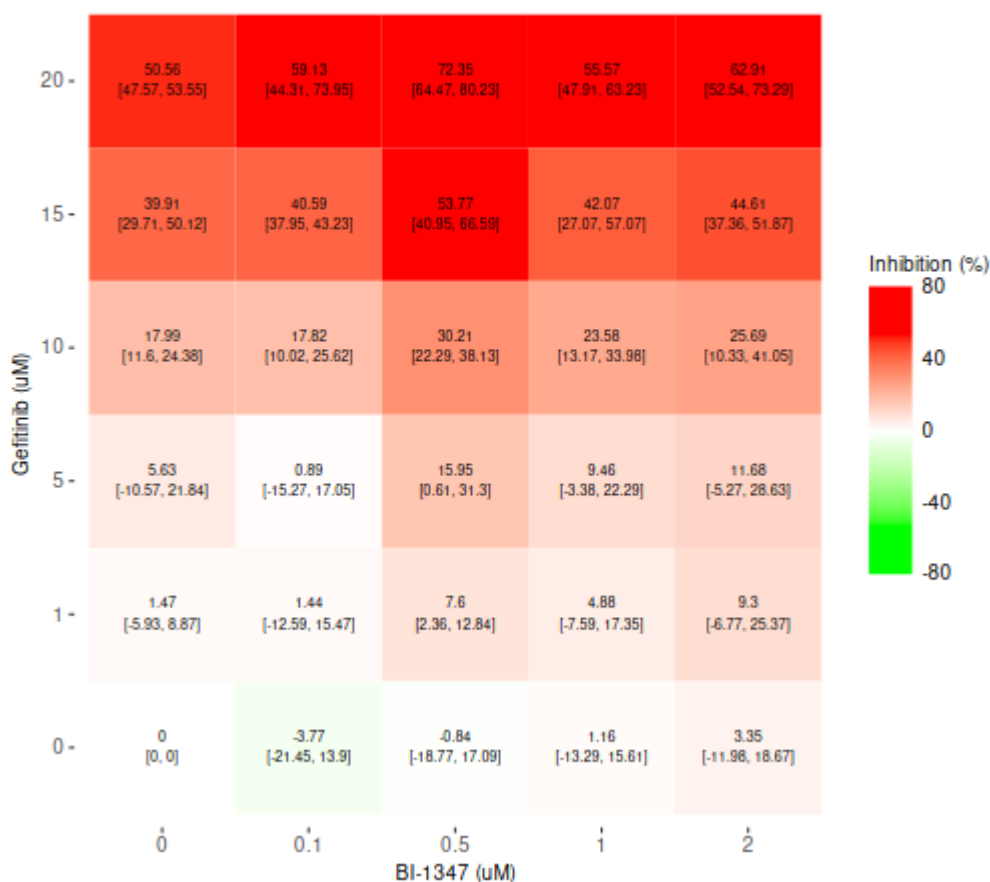


Рисунок 24 – Матрица доза-ответа комбинаций гефитиниба и BI-1347 на A549GR

Вследствие этого можно утверждать, что комбинированная терапия позволяет достигать более эффективного ингибирования клеток при использовании малых концентраций препаратов, особенно на гефитиниб-резистентных клетках, но также нужно учитывать подбор EGFR-препаратов для достижения лучшего ингибирования.

Лекарственные взаимодействия в каждой комбинации были также проанализированы с помощью других четырех эталонных моделей: ZIP, Loewe, Bliss и HSA с использованием веб-приложения SynergyFinder [137]. Модель ZIP оценивает взаимосвязи лекарственного взаимодействия путем сравнения изменения эффективности кривых доза-зависимость между отдельными лекарственными средствами и их комбинациями, предполагая, что ожидалось, что два не взаимодействующих препарата претерпят

минимальные изменения в своих кривых доза-зависимость. Модель аддитивности Loewe рассчитывает ожидаемый ответ, как если бы оба препарата были одинаковыми. Модель независимости Bliss предполагает случайный процесс, в котором два препарата проявляют свои эффекты независимо, и ожидаемый комбинированный эффект может быть рассчитан на основе вероятности независимых событий. Модель HSA является одной из простейших эталонных моделей, в которой говорится, что ожидаемый комбинированный эффект является максимальным из ответов на одно лекарственное средство при соответствующих концентрациях.

Оценки выше 10 указывают на синергизм, а оценка ниже -10 указывают на антагонизм. Анализируя графики синергизма BI-1347 и gefitiniba (рисунок 25) на NCI-H1975, было обнаружено, что лекарственное взаимодействие в этой комбинации было синергичным по моделям ZIP, Loewe, Bliss и HSA с показателями синергизма 4.42; 8.04; 4.15 и 7.34. Анализируя графики синергизма BI-1347 и gefitiniba на gefitinib-резистентных клетках NCI-H1975GR (рисунок 26), было обнаружено, что лекарственное взаимодействие в этой комбинации было синергичным по моделям ZIP, Loewe, Bliss и HSA с показателями синергизма 3.62; 9.42; 3.53 и 9.6. Анализируя графики синергизма BI-1347 и gefitiniba на A549 (рисунок 27), было обнаружено, что лекарственное взаимодействие в этой комбинации было синергичным по моделям ZIP, Loewe, Bliss и HSA с показателями синергизма -5; 1.97; -5.84 и 1.8.

Анализируя графики синергизма BI-1347 и gefitiniba на gefitinib-резистентных клетках A549GR (рисунок 28), было обнаружено, что лекарственное взаимодействие в этой комбинации было синергичным по моделям ZIP, Loewe, Bliss и HSA с показателями синергизма 5.96; 5.79; 6.38 и 6.03.

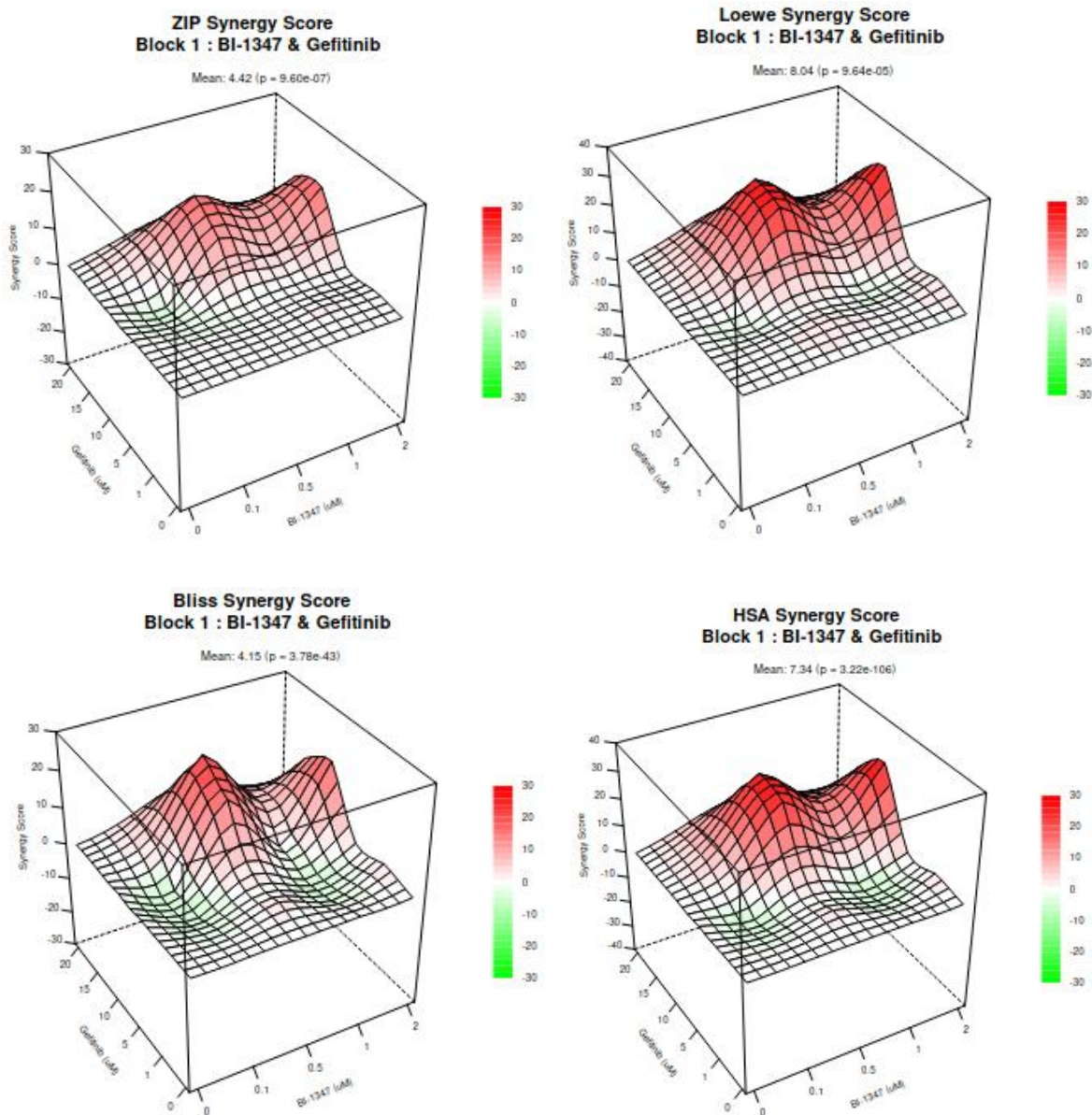


Рисунок 25 – Графики синергической чувствительности комбинаций BI-1347 и gefитиниба на клетках NCI-H1975, рассчитанные с использованием эталонных моделей ZIP, Loewe, Bliss и HSA.

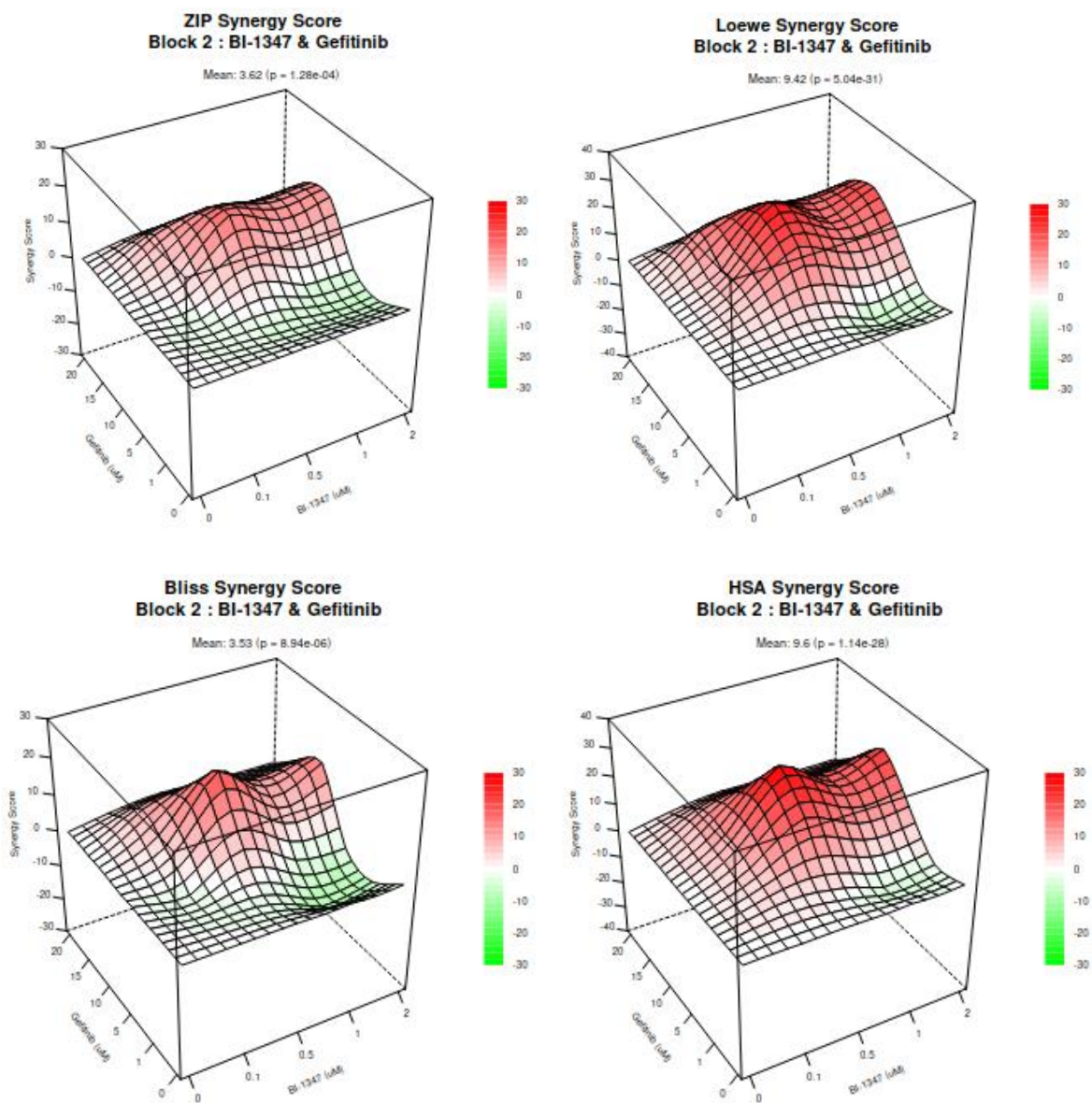


Рисунок 26 – Графики синергической чувствительности комбинаций BI-1347 и gefитиниба на клетках NCI-H1975GR, рассчитанные с использованием эталонных моделей ZIP, Loewe, Bliss и HSA.

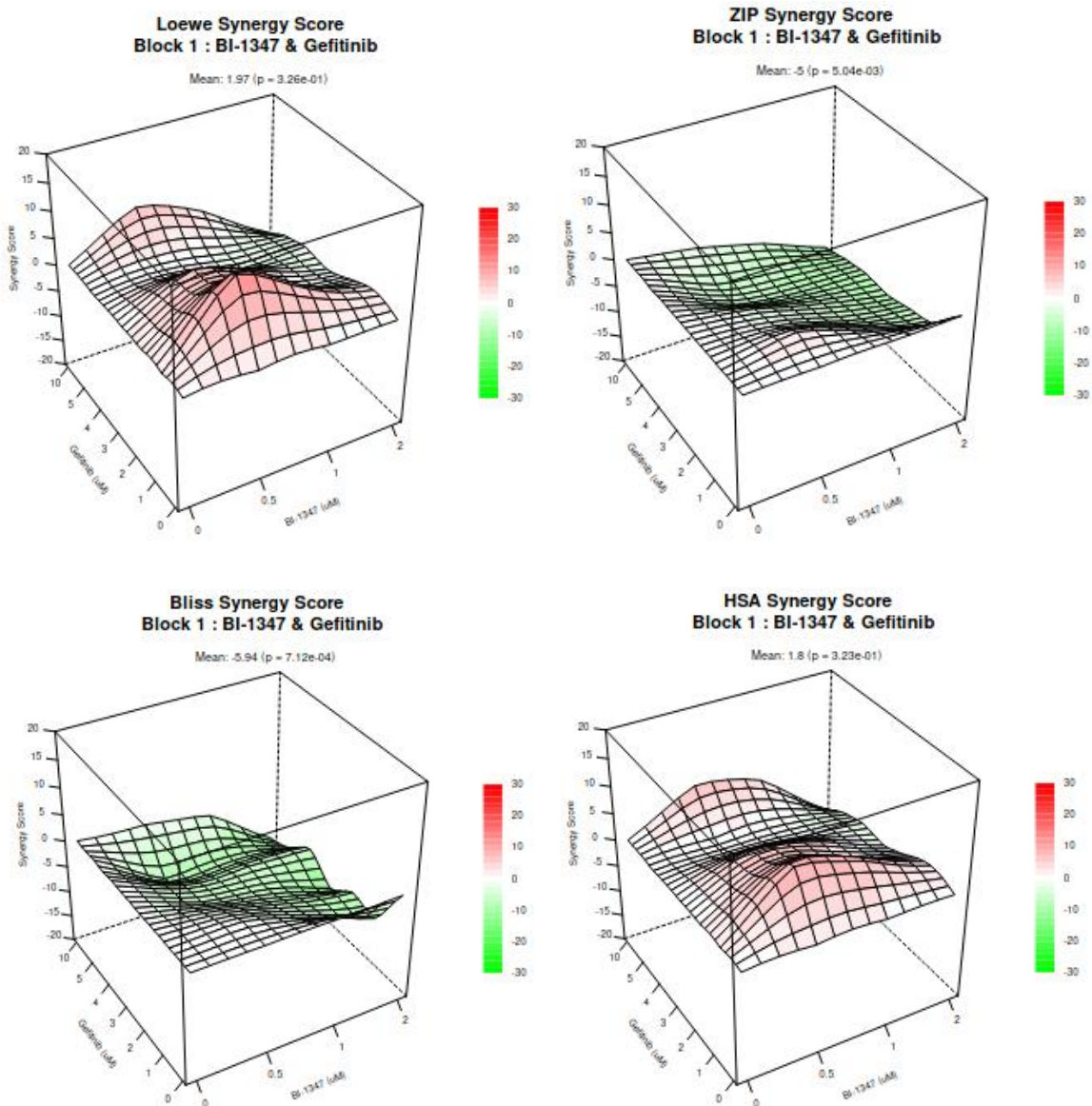


Рисунок 27 – Графики синергической чувствительности комбинаций BI-1347 и gefitiniba на клетках A549, рассчитанные с использованием эталонных моделей ZIP, Loewe, Bliss и HSA.

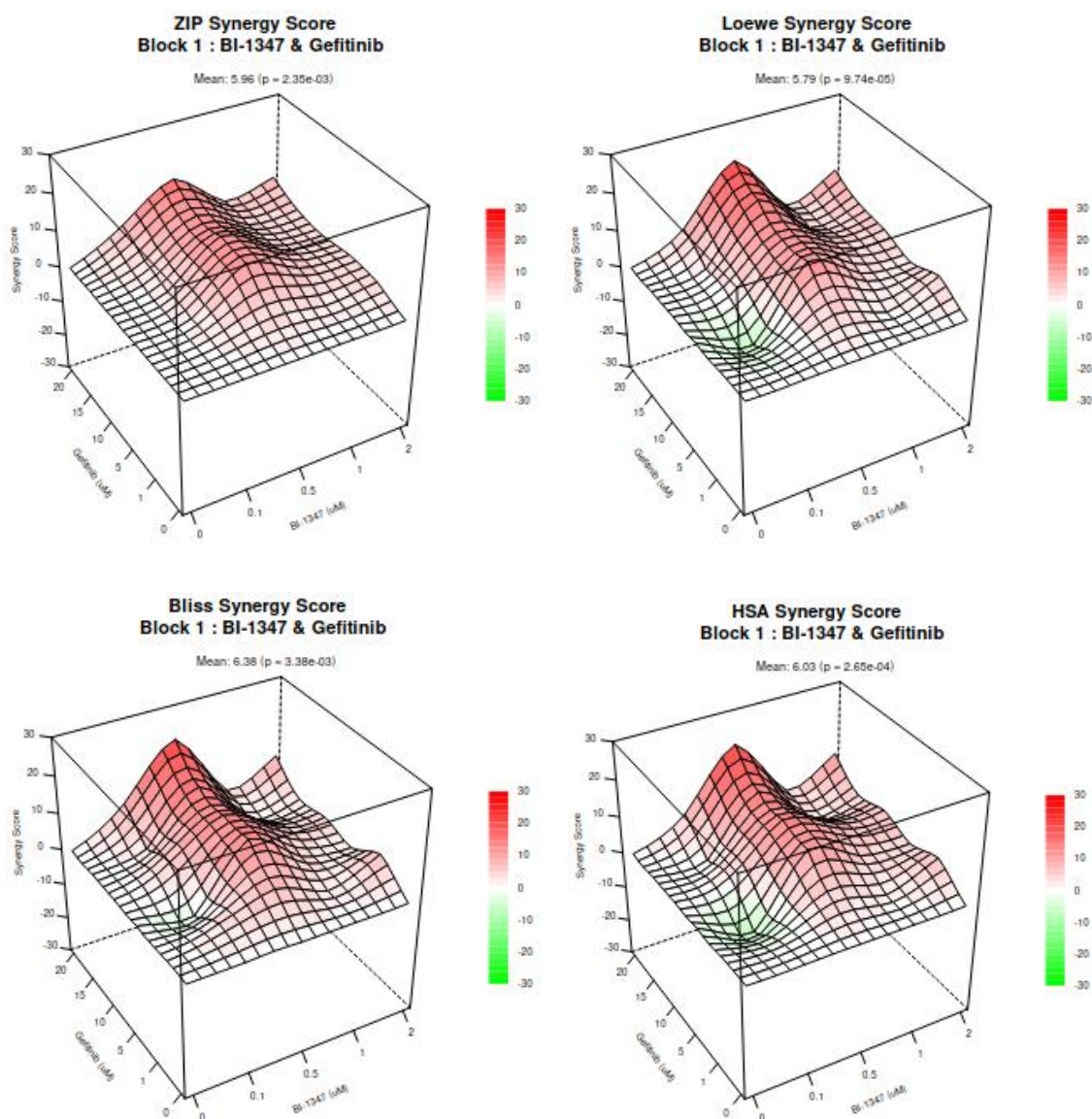


Рисунок 28 – Графики синергической чувствительности комбинаций BI-1347 и gefитиниба на клетках A549GR, рассчитанные с использованием эталонных моделей ZIP, Loewe, Bliss и HSA.

В итоге если рассматривать по показателям синергии, то выше всего показатели модели Loewe, и это означает что данные соединения влияют друг на друга созависимо и способны иметь сходные способы влияния на схожие пути или мишени. Все это подтверждает гипотезу о том, что добавление ингибиторов CDK8 способно предотвращать механизм транскриптомной резистентности во время терапии селективных ингибиторов EGFR. Из-за того, что резистентность у клеточных линий появилась менее чем за 15 недель, в них не было никаких генетических

мутаций, присущим рецепторам EGFR, как например BRAF, PIK3CA и KRAS. Клетки адаптировались к лекарству лишь с помощью транскриптомных изменений, активируя альтернативные пути для устойчивости к ингибиторам EGFR, такие как например EMT, NFκB или Wnt/β-катенин, на которые как раз могут действовать ингибиторы CDK8.

2.2 Анализ индукции апоптоза

Для проверки гипотезы синергии ингибиторов CDK8 и EGFR-препаратов нужно протестировать влияние таких комбинаций в сериях тестах по изучению индукции апоптоза или клеточного цикла, однако анализ клеточного цикла не оправдал ожиданий. И проанализировав графики синергизма модели Loewe, было предложено взять определенные концентрации для резистентных культур клеток.

Для NCI-H1975GR были взяты концентрации 500 нМ ВI-1347 и 10 мкМ gefitiniba (таблица 1), согласно наивысшей области синергии на графике синергической чувствительности по модели Loewe, графики зависимости аннексина V-FITC от PI можно изучить в Приложении А.

Таблица 1 – Результаты анализа индукции апоптоза на клеточной культуре NCI-H1975GR

Соединения	Живые клетки, %	Ранний апоптоз, %	Поздний апоптоз, %	Некроз, %
Контроль	88.75	1.29	8.19	1.77
ВI-1347 500 нМ	77.36	2.85	13.45	5.34
Гефитиниб 10 мкМ	82.69	3.65	9.74	3.93
Гефитиниб 10 мкМ + ВI-1347 500 нМ	71.30	2.31	14.82	11.56

Для клеточной линии A549GR были взяты концентрации 500 нМ ВI-1347 и 10 мкМ и 20 мкМ gefitiniba (таблица 2), согласно наивысшей области синергии на графике синергической чувствительности по модели

Loewe, графики зависимости аннексина V-FITC от PI можно изучить в Приложении Б.

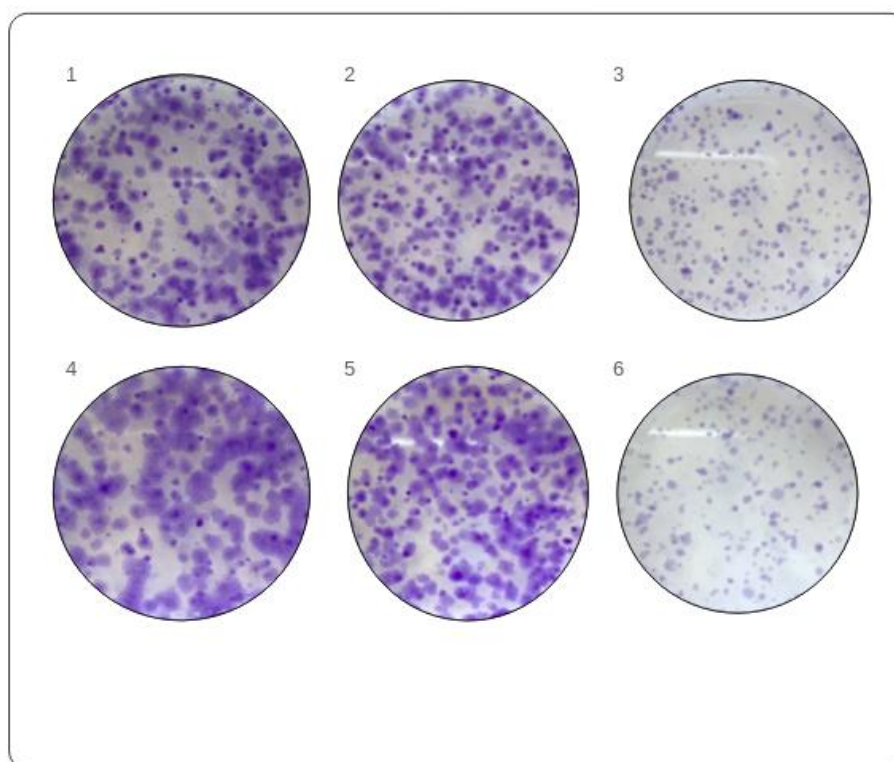
Таблица 2 – Результаты анализа индукции апоптоза на клеточной культуре A549GR

Соединения	Живые клетки, %	Ранний апоптоз, %	Поздний апоптоз, %	Некроз, %
Контроль	94.23	0.99	1.46	3.32
ВI-1347 500 нМ	93.74	1.41	2.20	2.64
Гефитиниб 10 мкМ	95.40	1.08	1.62	1.90
Гефитиниб 20 мкМ	93.63	0.00	0.00	6.37
Гефитиниб 10 мкМ + ВI-1347 500 нМ	95.58	0.84	1.93	1.64
Гефитиниб 20 мкМ + ВI-1347 500 нМ	94.18	0.67	2.64	2.52

Полученные результаты могут говорить о непосредственном влиянии комбинированной терапии, как наилучшем методе по сравнению с монотерапией. Данный эффект хорошо наблюдается на культуре клеток NCI-N1975GR, где больше четверти клеток уже ушли в апоптоз или в некроз. К сожалению, таких же хороших результатов не удалось добиться на клеточной культуре A549GR, и лишь не более 5 % клеток были затронуты, использованной комбинированной терапией, пока на большинство клеток такая терапия мало повлияла. Возможно, использование других EGFR-препаратов могло бы повысить результаты входа клеток в апоптоз, так как все чаще у клеточных линий рака легкого появляются мутации уже геномные. Из-за того, что ингибиторы CDK8 не могут действовать на геномные мутации, а только на изменения в транскрипционных механизмах, лишь использование селективных ингибиторов EGFR последнего поколения может улучшить эффективность данной комбинированной терапии.

2.3 Клоногенный тест

После получения готовых планшетов с фиксированными клетками, было оценено влияние исследуемых соединений на пролиферацию роста колоний клеток. Первый полученный результат (рисунок 29) показал, что 100 нМ VI-1347 не оказывают никакого цитотоксического действия, почти также было и при 500 нМ VI-1347 и 100 нМ VI-1374. Однако уже при концентрациях 1000 нМ оба соединения показывают очевидный цитотоксический эффект, но более эффективным оказался VI-1347 который является проверенным мощным ингибитором CDK8, при воздействии которого количество колоний резко уменьшалось, как и следовало из литературных данных об этих двух соединениях [135].

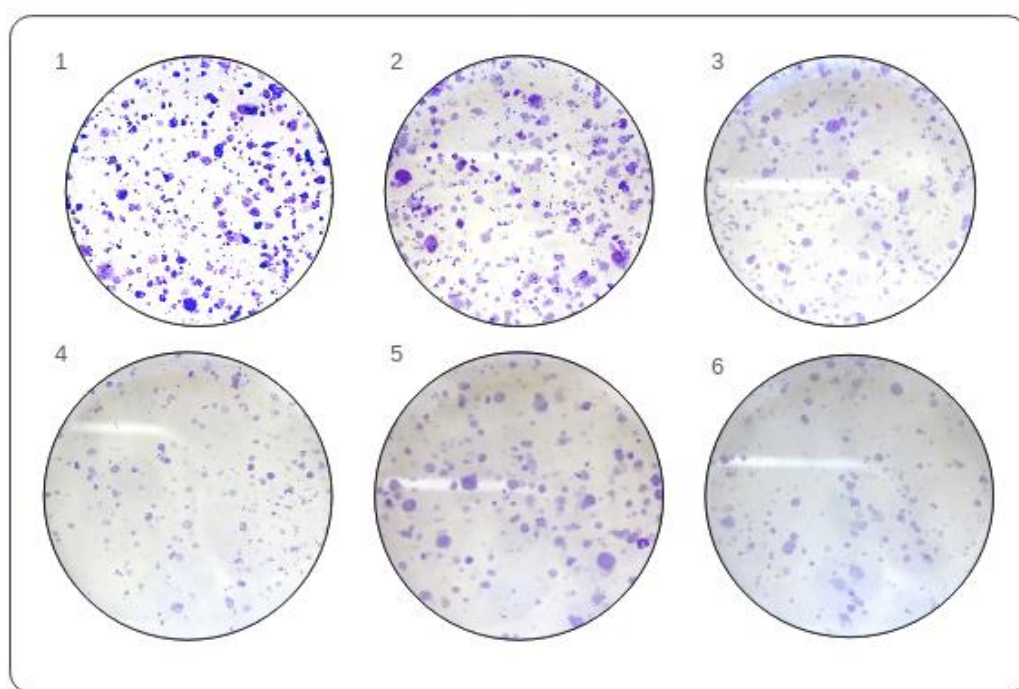


SP1/A549/GR

(1 – контроль, 2 – 100 нМ VI-1374, 3 – 1000 нМ VI-1374, 4 – 100 нМ VI-1347, 5 – 500 нМ VI-1347, 6 – 1000 нМ VI-1347)

Рисунок 29 – Готовые результаты клоногенного теста клеточной линии A549GR при воздействии ингибитора CDK8

Следующий полученный результат (рисунок 30) показал, что при концентрации 100 нМ ВI-1374 отрицательного контроля никакого цитотоксического эффекта не наблюдается, однако при воздействии известного ингибитора CDK8 при 100 нМ ВI-1347 приводит к явному уменьшению количеству клеточных колоний по сравнению с необработанным контролем. При 500 нМ ВI-1347 возникает аномалия и количество клеток по сравнению с меньшей концентрацией довольно много. Но уже при повышении концентрации до 1000 нМ оба соединения показывают хороший цитотоксический эффект, однако ВI-1347 более селективно подавляет колонии клеток по сравнению с отрицательным контролем.



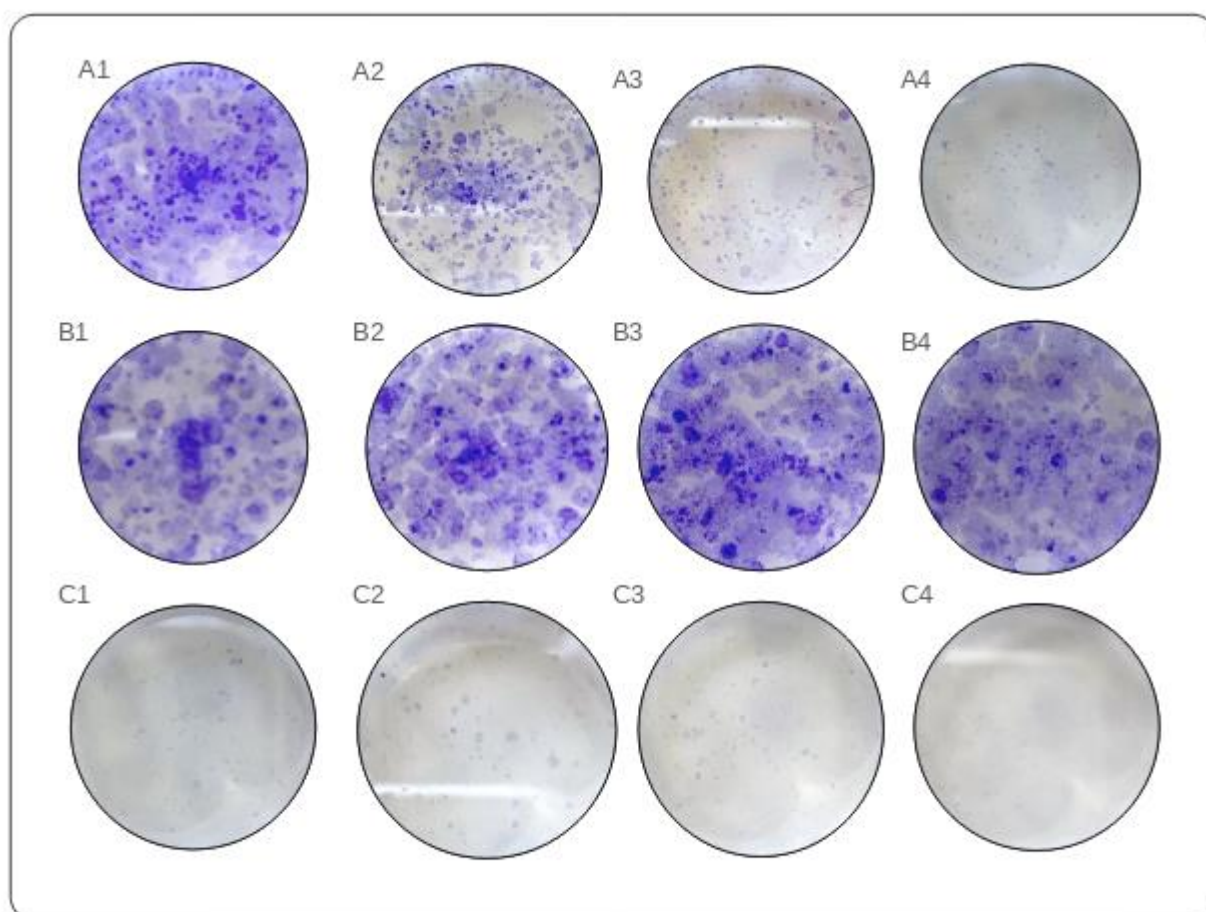
SP2/NCI1975/GR

(1 – контроль, 2 – 100 нМ ВI-1374, 3 – 1000 нМ ВI-1374, 4 – 100 нМ ВI-1347, 5 – 500 нМ ВI-1347, 6 – 1000 нМ ВI-1347)

Рисунок 30 – Готовые результаты клоногенного теста клеточной линии NCI-Н1975GR при воздействии ингибитора CDK8

Два последующих полученных результата (рисунки 31-32) показали, что с увеличением концентрации гефитиниба размер клеточных колоний

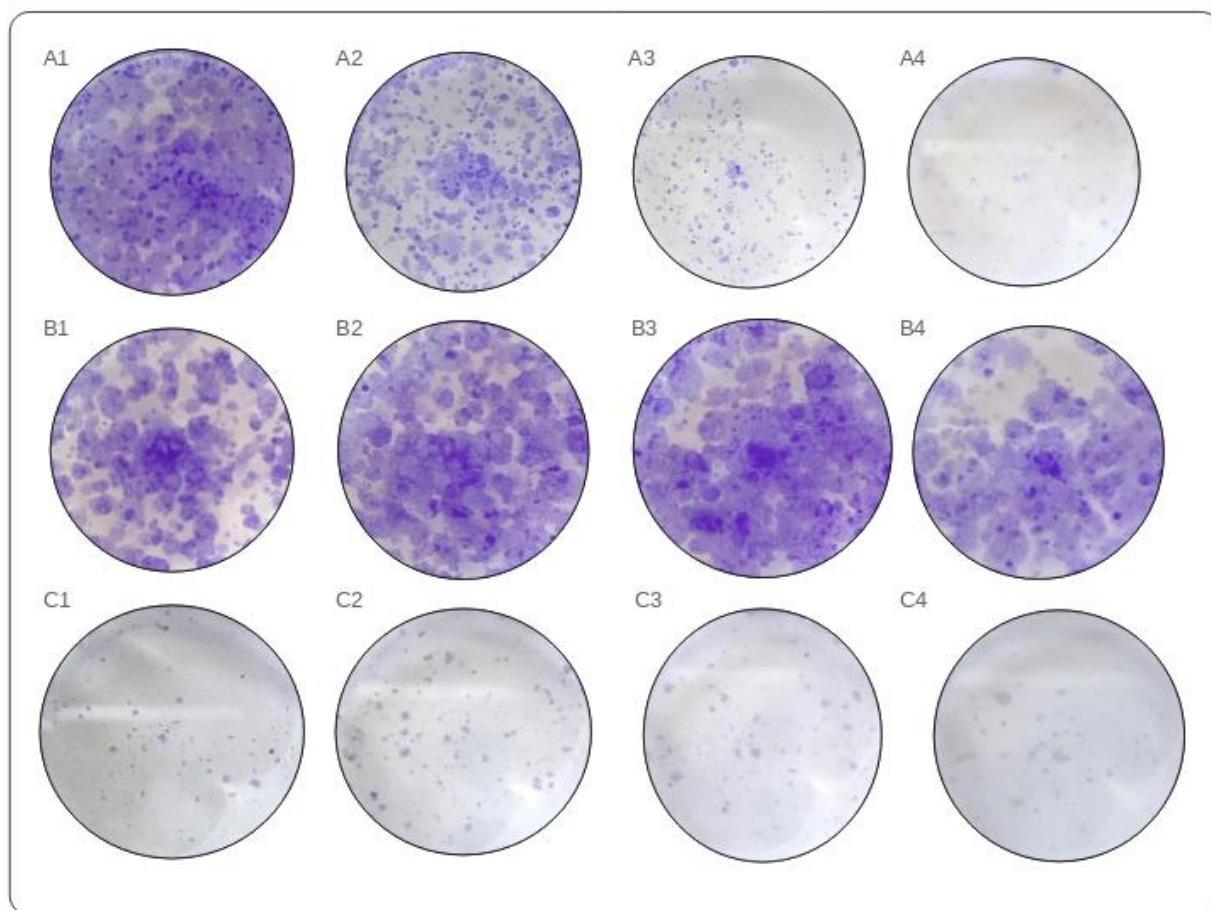
заметно уменьшаются. Однако такого же эффекта не наблюдалось при использовании лишь одного соединения VI-1347. Но в том же случае, если провести комбинацию этих препаратов, то мы получаем отличный цитотоксический эффект, где количество клеточных колоний сводится к минимуму.



SP14aNCIH1975/GR

(A1 – контроль, A2 – 5 мкМ гефитиниба, A3 – 10 мкМ гефитиниба, A4 – 15 мкМ гефитиниба, B1 – 100 нМ VI-1347, B2 – 500 нМ VI-1347, B3 – 1000 нМ VI-1347, B4 – 1500 нМ VI-1347, C1 – 10 мкМ гефитиниба + 100 нМ VI-1347, C2 – 10 мкМ гефитиниба + 500 нМ VI-1347, C3 – 10 мкМ гефитиниба + 1000 нМ VI-1347, C4 – 10 мкМ гефитиниба + 1500 нМ VI-1347)

Рисунок 31 – Готовые результаты клоногенного теста клеточной линии NCI-N1975GR при воздействии ингибитора CDK8



SP14b/NCIH1975/GR

(A1 – контроль, A2 – 5 мкМ гефитиниба, A3 – 10 мкМ гефитиниба, A4 – 15 мкМ гефитиниба, B1 – 100 нМ BI-1347, B2 – 500 нМ BI-1347, B3 – 1000 нМ BI-1347, B4 – 1500 нМ BI-1347, C1 – 10 мкМ гефитиниба + 100 нМ BI-1347, C2 – 10 мкМ гефитиниба + 500 нМ BI-1347, C3 – 10 мкМ гефитиниба + 1000 нМ BI-1347, C4 – 10 мкМ гефитиниба + 1500 нМ BI-1347)

Рисунок 32 – Готовые результаты клоногенного теста клеточной линии NCI-H1975GR при воздействии ингибитора CDK8

На основе полученных данных можно заключить, что использование монотерапии на разных клеточных линиях не всегда способно давать высокое ингибирование. И чтобы компенсировать эти минусы, мы проверили сочетание EGFR-препаратов 1-поколения и ингибиторов CDK8 в разных концентрациях и на различных культурных линиях. Выяснилось, что данная комбинация дает впечатляющую способность ингибировать рост опухолевых клеток и предотвращать тем самым появления резистентности у таких культур, за счет синергического взаимодействия друг с другом, при этом без потери в эффективности в ингибировании.

3 Экспериментальная часть

3.1 Реагенты и оборудование

Для проведения биологических испытаний использовались:

Ламинарный бокс (SafeFAST Elite, Germany); автоматическая раскапывающая станция (Eppendorf epMotion 5070, Germany); проточный цитометр (Beckman, USA); криохранилище (THERMO FISHER, USA); CO₂-инкубатор (BINDER, Germany); инвертированный микроскоп (ZEISS, Germany); автоматический счетчик клеток TC20 (Bio-Rad, USA); настольная центрифуга (Eppendorf, Germany); полная питательная среда RPMI-1640 + 10% FBS, с содержанием гифитиниба 5 мкМ, GlutaMAX, HEPES, пеницилин/стрептомицин (Gibco, UK); планшетный ридер (Promega, USA); вакуумный насос (USSR); микродозатор (Eppendorf, Germany); автоматический дозатор (Eppendorf, Germany); TrypLE (Gibco, UK); PBS (Corning Scientific); МТТ (Merck, Germany); 0.4% раствор трипанового синего (Merck, Germany); DMSO (Gibco, UK); абсолютный метанол (Merck, Germany); аннексин V Binding Buffer (Beckman, USA); аннексин V-FITC (Beckman, USA); пропидий йодистый (Beckman, USA); культуральный флакон с обработанной поверхностью T75 (Eppendorf, Germany); 6, 12, 96-ти луночные планшеты для адгезивных культур (Eppendorf, Germany); наконечники для микродозаторов (0.5-1000 мкл) (Vertex, USA); наконечники для автоматической раскапывающей станции (1000 мкл) (Eppendorf, Germany); серологические пипетки (5, 10, 50 мл) (Eppendorf, Germany); центрифужные пробирки (15, 50 мл) (Eppendorf, Germany); резервуар (100 мл) (Eppendorf, Germany); Кристаллический фиолетовый 1% (Merck, Germany).

3.2 Объекты исследования

В качестве объектов исследования выступают соединения производные изохинолина VI-1347, VI-1374 и известный противоопухолевый препарат gefitinib в различных подбираемых комбинациях для оценки цитотоксического эффекта, тестируемые на четырех клеточных линиях рака легких NCI-H1975, NCI-H1975GR, A549 и A549GR, полученных из некоммерческого глобального биоресурсного центра ATCC (American Type Culture Collection).

3.3 Методика эксперимента

3.3.1 Культивирование клеток NCI-H1975

Клеточная линия NCI-H1975 была получена из ATCC. Клетки NCI-H1975 поддерживали в питательной среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, пенициллина (100 мкг/мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и GlutaMax (2 мМ). Культивировали клеточную линию во влажной атмосфере 95 % воздуха/ 5 % CO₂ при 37 °С. Субконфлюэнтные монослои в логарифмической фазе роста собирали путем кратковременной обработки раствором TrypLE Express в фосфатно-солевом буфере (PBS) и трижды промывали PBS. Количество жизнеспособных клеток определяли по исключению трипанового синего.

3.3.2 Культивирование клеток A549

Клеточная линия A549 была получена из ATCC. Клетки A549 поддерживали в питательной среде DMEM/F12K с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки FBS, пенициллина (100 мкг/мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и GlutaMax (2 мМ). Культивировали клеточную линию во влажной атмосфере 95 % воздуха/ 5 % CO₂ при 37 °С. Субконфлюэнтные монослои в логарифмической фазе роста собирали путем

кратковременной обработки раствором TrypLE Express в фосфатно-солевом буфере и трижды промывали PBS.

3.3.3 Получение gefitinib-резистентных клеточных линий

Клетки NCI-H1975 и A549 поддерживали в питательной среде RPMI-1640 и DMEM/F12K с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки FBS, пенициллина (100 мкг/мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и GlutaMax (2 мМ). Культивировали клеточную линию во влажной атмосфере 100 % воздуха/ 5 % CO₂ при 37 °С. Субконфлюэнтные монослои в логарифмической фазе роста собирали путем кратковременной обработки раствором TrypLE Express в фосфатно-солевом буфере и трижды промывали PBS. Так клетки культивировали 15 недель постепенно увеличивая содержание gefitiniba, повышая его концентрацию с 0.5 мкМ до 5 мкМ, для появления резистентности к gefitinibu.

3.3.4 МТТ-тест

Влияние исследуемых соединений на жизнеспособность клеток определяли с помощью колориметрического теста МТТ. Подготовка клеток к МТТ включала в себя процесс трипсинизации и подсчета клеток. Все исследуемые клетки разбавляли питательной средой до 5×10^3 клеток/лунку в прозрачном 96-луночном планшете. Через 24 ч клетки обрабатывали исследуемыми соединениями по отдельности в различных концентрациях gefitiniba и BI-1347 и инкубировали в течение 72 ч при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Далее клетки обрабатывали 40 мкл раствора МТТ и инкубировали в течение 4 часов при тех же условиях. Затем содержимое лунок удаляли и добавляли DMSO (150 мкМ) для растворения кристаллов формазана и после удаляли раствор DMSO с планшетов. Оптическую плотность каждой лунки определяли при 560 нм с помощью планшетного ридера. Полученные данные загружались в виде таблицы и обрабатывались в веб-приложении SynergyFinder для интерактивного анализа и визуализации результатов.

3.3.5 Анализ индукции апоптоза

Клетки трипсинизировали и ресуспендировали, промыв PBS и открутив два раза. В клеточную суспензию добавили связывающий буфер для разведения до 1×10^6 клеток/мл. Отобрав 100 мкл клеточной суспензии в пробирку, в них было добавлено 5 мкл конъюгата аннексина V - FITC, затем 5 мкл раствора PI и далее оставлено инкубироваться в темноте 15 мин. И готовую клеточную суспензию тестировали на проточном цитометре.

3.3.6 Клоногенный тест

Трипсинизировали, ресуспендировали и производили расчет клеточной линии согласно методике культивирования. Приготовили клеточную суспензию для достижения необходимого количество клеток в лунке. Далее полученный раствор из клеток внесли в 12-луночный планшет в объеме 1 миллилитр, где количество клеток в лунке составляло 4.5×10^2 . Через 24 часа инкубации приготовили рабочие растворы исследуемых соединений в предварительно подогретой ($22-37^\circ\text{C}$) среде для культивирования клеток. Внесли исследуемые образцы в лунки при 2 повторах и инкубировали 2 недели. После этого приступили к фиксации метанолом и окрашиванием кристаллическим фиолетовым образовавшихся колоний. В конце данного этапа оценили количество окрашенных колоний с помощью инвертированного микроскопа.

Заключение

Мы провели исследование по теме использования комбинации соединения VI-1347 с гефитинибом на нормальных и на гефитиниб-резистентных клетках рака легких, чтобы подтвердить гипотезу о том, что использование комбинированной терапии в резистентных клетках, позволяет достичь высокого ингибирования раковых клеток.

- Использование небольшой концентрации ингибитора CDK8 вместе с гефитинибом позволяет повысить чувствительность в устойчивых к гефитинибу клеток рака легкого.

- Данная комбинированная терапия заставляла клетки рака легкого уходить в апоптоз или некроз, действуя не только как цитостатическое соединение.

- Также эта комбинация способна показывать сильное ингибирование у не резистентных раковых клеток по сравнению с использованием таких препаратов по отдельности.

Стоит отметить, что в будущем нужно провести тесты не только с гефитинибом, но также и на других EGFR-направленных ингибиторов последних поколений для нахождения лучшей комбинаций лекарств, чтобы получить максимально возможное ингибирование роста клеток, так как у некоторых культур клеток появились геномные мутации, позволяющие адаптироваться к селективным ингибиторам EGFR.

Дальнейшие исследования могут быть использованы уже на более обширных количествах клеточных линий или уже продвигаться к испытаниям *in vivo*. Полученные результаты данной работы дают наглядные возможности использования комбинаций нескольких препаратов в качестве терапии онкозаболеваний и в качестве последней пилюли для преодоления появившейся устойчивости у опухолей.

Список используемой литературы

1. J. R. Pritchard, P. M. Bruno, L. A. Gilbert, K. L. Capron, D. A. Lauffenburger, M. T. Hemann. Defining principles of combination drug mechanisms of action // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – Vol. 110. – № 2. – P. 170-179.
2. T. Gulappa, R. S. Reddy, S. Suman, A. M. Nyakeriga, C. Damodaran. Molecular interplay between CDK4 and p21 dictates G0/G1 cell cycle arrest in prostate cancer cells // *Cancer Lett.* – 2013. – Vol. 337. – № 2. – P. 177-183.
3. K. Bacevic, G. Lossaint, T. N. Achour, V. Georget, D. Fisher, V. Dulic. CDK2 strengthens the intra-S checkpoint and counteracts cell cycle exit induced by DNA damage // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 13429-13443.
4. S. Sunada, H. Saito, D. Zhang, Z. Xu, Y. Miki. CDK1 inhibitor controls G2/M phase transition and reverses DNA damage sensitivity // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2021. – Vol. 550. – №12. – P. 56-61.
5. T. Evans, E.T. Rosenthal, J. Youngblom, D. Distel, T. Hunt. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division // *Cell.* – 1983. – Vol. 33. – № 2. – P. 389-396.
6. W. Michowski, J. M. Chick, C. Chu, et al. Cdk1 Controls Global Epigenetic Landscape in Embryonic Stem Cells // *Mol. Cell.* – 2020. – Vol. 78. – № 3. – P. 459-476.
7. A. Jerafi-Vider, I. Bassi, N. Moshe, Y. Tevet, G. Hen, D. Splittstoesser, M. Shin, N. D. Lawson, K. Yaniv. VEGFC/FLT4-induced cell-cycle arrest mediates sprouting and differentiation of venous and lymphatic endothelial cells // *Cell Rep.* – 2021. – Vol. 35. – №11. – P. 459-476.
8. K. Kollmann, G. Heller, C. Schneckleithner, et al. A kinase-independent function of CDK6 links the cell cycle to tumor angiogenesis // *Cancer Cell.* – 2013. – Vol. 24. – № 2. – P. 167-181.
9. R. Fukasawa, S. Iida, T. Tsutsui, Y. Hirose, Y. Ohkuma. Mediator complex cooperatively regulates transcription of retinoic acid target genes with

Polycomb Repressive Complex 2 during neuronal differentiation // *J. Biochem.* – 2015. – Vol. 158. – № 5. – P. 373-384.

10. J. Ouyang, W. Yu, J. Liu, N. Zhang, L. Florens, J. Chen, H. Liu, M. Washburn, D. Pei, T. Xie. Cyclin-dependent kinase-mediated Sox2 phosphorylation enhances the ability of Sox2 to establish the pluripotent state // *J. Biol. Chem.* – 2015. – Vol. 290. – № 37. – P. 22782-22794.

11. P. Mikolcevic, R. Sigl, V. Rauch, M. W. Hess, K. Pfaller, M. Barisic, L. J. Pelliniemi, M. Boesl, S. Geley. Cyclin-dependent kinase 16/PCTAIRE kinase 1 is activated by cyclin Y and is essential for spermatogenesis // *Mol. Cell Biol.* – 2012. – Vol. 32. – № 4. – P. 868-879.

12. J. P Tassan, M. Jaquenoud, P. Leopold, S. J. Schultz, E. A. Nigg. Identification of human cyclin-dependent kinase 8, a putative protein kinase partner for cyclin C // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – Vol. 92. – № 19. – P. 8871-8875.

13. R. P. Fisher. CDK regulation of transcription by RNAP II: Not over 'til it's over? // *Transcription.* – 2017. – Vol. 8. – № 2. – P. 81-90.

14. X. Wang, J. Wang, Z. Ding, J. Ji, Q. Sun, G. Cai. Structural flexibility and functional interaction of Mediator Cdk8 module // *Protein Cell.* – 2013. – Vol. 4. – № 12. – P. 911-920.

15. K. Tsai, S. Sato, C. Tomomori-Sato, R. C. Conaway, J. W. Conaway, F. J. Asturias. A conserved Mediator-CDK8 kinase module association regulates Mediator-RNA polymerase II interaction // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 20. – № 5. – P.611-619.

16. I. B. Roninson, B. Györfy, Z. T. Mack, A. A. Shtil, M. S. Shtutman, M. Chen, E. V. Broude. Identifying Cancers Impacted by CDK8/19 // *Cells.* – 2019. – Vol. 8. – № 8. – P.821-836.

17. M. Kim, S. I. Han, S. Lim. Roles of cyclin-dependent kinase 8 and β -catenin in the oncogenesis and progression of gastric adenocarcinoma // *Int. J. Oncol.* – 2011. – Vol. 38. – № 5. – P. 1375-1383.

18. C. Alarcón, A.a Zaromytidou, Q. Xi, et al. Nuclear CDKs drive Smad

transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways // *Cell*. – 2009. – Vol. 139. – № 4. – P. 757-769.

19. E. Tarasewicz, L. Rivas, R. Hamdan, D. Dokic, V. Parimi, B. P. Bernabe, A. Thomas, L. D. Shea, J. S. Jeruss. Inhibition of CDK-mediated phosphorylation of Smad3 results in decreased oncogenesis in triple negative breast cancer cells // *Cell Cycle*. – 2014. – Vol. 13. – № 20. – P. 3191-3201.

20. N. A. Warfel, N. G. Dolloff, D. T. Dicker, J. Malysz, W. S. El-Deiry. CDK1 stabilizes HIF-1 α via direct phosphorylation of Ser668 to promote tumor growth // *Cell Cycle*. – 2013. – Vol. 12. – № 23. – P. 3689-3701.

21. O. Cingoz, S. P. Goff. Cyclin-dependent kinase activity is required for type I interferon production // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2018. – Vol. 115. – № 13. – P. 2950-2959.

22. J. Muhr, D. W. Hagey. The cell cycle and differentiation as integrated processes: Cyclins and CDKs reciprocally regulate Sox and Notch to balance stem cell maintenance // *Bioessays*. – 2021. – Vol. 43. – № 7. – P. 1-12.

23. X. Zhao, D. Feng, Q. Wang, et al. Regulation of lipogenesis by cyclin-dependent kinase 8-mediated control of SREBP-1 // *J. Clin. Invest.* – 2012 – Vol. 122. – № 7. – P. 2417-2427.

24. G. Karp, J. Iwasa, W. Marshall. Karp's Cell and Molecular Biology. – 9th edit. – Pub. Wiley. – 2020. – P. 1365.

25. B. Alberts. Molecular Biology of the Cell – 6th edit. – Pub. Garland Science. – 2015. – P. 963.

26. G. Plopper, D. Sharp, E. Sikorski. Lewin's cells. – 3th edit. – Pub. Jones & Bartlett Learning. – 2017. – P. 686.

27. K. J. Barnum, M. J. O'Connell. Cell cycle regulation by checkpoints // *Methods Mol Biol.* – 2014. – Vol.1170. – № 1. – P. 29-40.

28. K. Nasmyth. A prize for proliferation // *Methods Mol Biol.* – 2014. – Vol. 1170. – № 1. – P. 29-40.

29. P. K. Jackson. The hunt for cyclin // *Cell*. – 2008. – Vol. 134. – № 2. – P. 199-202.

30. E. M. Lees, E. Harlow. Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase // *Semin Cell Dev. Bio.* – 2020. – Vol. 107. – № 1. – P. 28-35.

31. N. A. Stover, J. D. Rice. Distinct cyclin genes define each stage of ciliate conjugation // *Cell Cycle.* – 2011. – Vol. 10. – № 10. – P. 1699-1701.

32. A. Aristarkhov, E. Eytan, A. Moghe, A. Admon, A. Hershko, J. V. Ruderman. E2-C, a cyclin-selective ubiquitin carrier protein required for the destruction of mitotic cyclins // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – . 93. – № 9. – P. 4294-4299.

33. S. Hoepfner, S. Baumli, P. Cramer. Structure of the mediator subunit cyclin C and its implications for CDK8 function // *J. Mol. Biol.* – 2005. – Vol. 359. – № 5. – P. 833-842.

34. L. K. Mullany, P. White, E. A. Hanse, C. J. Nelsen, M. M. Goggin, J. E. Mullany, C. K. Anttila, L. E. Greenbaum, K. H. Kaestner, J. H. Albrecht. Distinct proliferative and transcriptional effects of the D-type cyclins in vivo // *Cell Cycle.* – 2008. – Vol. 7 – № 14. – P. 2215-2224.

35. J. D. Singer, M. Gurian-West, B. Clurman, J. M. Roberts. Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells // *Cell Cycle.* – 1999. – Vol. 13 – № 18. – P. 2375-2387.

36. M. Pagano, R. Pepperkok, F. Verde, W. Ansorge, G. Drae. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle // *EMBO J.* – 1992. – Vol. 11 – № 3. – P. 961-971.

37. P. Marangos, J. Carroll. Securin regulates entry into M-phase by modulating the stability of cyclin B // *Nat. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 10 – № 4. – P. 445-451.

38. L. H. Hartwell, J. Culotti, B Reid. Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1970. – Vol. 66 – № 2. – P. 352-359.

39. P. Nurse, P. Thuriaux, K. Nasmyth. Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* // *Mol. Gen. Genet.* – 1976

– Vol. 146 – № 2. – P. 167-178.

40. M. G. Lee, P. Nurse. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2* // *Nature*. – 1987. – Vol. 327 – № 6117. – P. 31-35.

41. N. Kannan, A. F. Neuwald. Evolutionary constraints associated with functional specificity of the CMGC protein kinases MAPK, CDK, GSK, SRPK, DYRK, and CK2alpha // *Protein Sci*. – 2004. – Vol. 13 – № 8. – P. 2059-2077.

42. L. Cao, F. Chen, X. Yang, W. Xu, J. Xie, L. Yu. Phylogenetic analysis of CDK and cyclin proteins in premetazoan lineages // *BMC Evol. Biol*. – 2014. – Vol. 14 – № 10. – P. 1-16.

43. J. Liu, E. T. Kipreos. Evolution of cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDK-activating kinases (CAKs): differential conservation of CAKs in yeast and metazoa // *Mol. Biol. Evol*. – 2000. – Vol. 17 – № 7. – P. 1061-1074.

44. J. Kohoutek, D. Blazek. Cyclin K goes with Cdk12 and Cdk13 // *Cell Div*. – 2012. – Vol. 7 – № 12. – P. 1-10.

45. T. Takaki, A. Echalié, N. R. Brown, T. Hunt, J. A. Endicott, M. E. M. Noble. The structure of CDK4/cyclin D3 has implications for models of CDK activation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. – Vol. 106 – № 11. – P. 4171-4176.

46. P. D. Jeffrey, A. A. Russo, K. Polyak, E. Gibbs, J. Hurwitz, J. Massagué, N. P. Pavletich. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex // *Nature*. – 1995. – Vol. 376 – № 6538. – P. 313-320.

47. A. A. Russo, P. D. Jeffrey, N. P. Pavletich. Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation // *Nat. Struct. Biol*. – 1996. – Vol. 3 – № 8. – P. 696-700.

48. M. J. Solomon, T. Lee, M. W. Kirschner. Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase // *Mol. Biol. Cell* – 1992. – Vol. 3 – № 1. – P. 13-27.

49. J. P. Tassan, M. Jaquenoud, A. M. Fry, S. Frutiger, G. J. Hughes, E. A. Nigg. In vitro assembly of a functional human CDK7-cyclin H complex requires

MAT1, a novel 36 kDa RING finger protein // *EMBO J.* – 1995. – Vol. 14 – № 22. – P. 5608-5617.

50. B. J. Greber, J. M. Perez-Bertoldi, K. Lim, A. T. Iavarone, D. B. Toso, E. Nogales. The cryoelectron microscopy structure of the human CDK-activating kinase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2020. – Vol. 117 – № 37. – P. 22849-22857.

51. R. Shiekhatar, F. Mermelstein, R. P. Fisher, R. Drapkin, B. Dynlacht, H. C. Wessling, D. O. Morgan, D. Reinberg. Cdk-activating kinase complex is a component of human transcription factor TFIIH // *Nature.* – 1995. – Vol. 374 – № 6519. – P. 283-287.

52. J. Chen, S. Larochelle, X. Li, B. Suter. Xpd/Ercc2 regulates CAK activity and mitotic progression // *Nature.* – 2003. – Vol. 424 – № 6945. – P. 228-232.

53. I. Reynisdottir, K. Polyak, A. Iavarone, J. Massague. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta // *Genes Dev.* – 1995. – Vol. 9 – № 15. – P. 1831-1845.

54. G. J. Hannon, D. Beach. p15(INK4B) is a potential effector of TGF- β -induced cell cycle arrest // *Nature.* – 1994. – Vol. 371 – № 6494. – P. 257-261.

55. M. Serrano, G. J. Hannon, D. Beach. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4 // *Nature.* – 1993. – Vol. 366 – № 6456. – P. 704-707.

56. H. Hirai, M. F. Roussel, J. Y. Kato, R. A. Ashmun, C. J. Sherr. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6 // *Mol. Cell Biol.* – 1995. – Vol. 15 – № 5. – P. 2672-2681.

57. J.W. Harper, G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, S. J. Elledge. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases // *Cell.* – 1993. – Vol. 75 – № 4. – P. 805-816.

58. H. Toyoshima, T. Hunter. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21 // *Cell.* – 1994. – Vol. 78 – № 1. – P. 67-

59. M. H. Lee, I. Reynisdottir, J. Massague. Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution // *Genes Dev.* – 1995. – Vol. 9 – № 6. – P. 639-649.

60. M. T. Knuesel, K. D. Meyer, C. Bernecky, D. J. Taatjes. The human CDK8 subcomplex is a molecular switch that controls Mediator coactivator function // *Genes Dev.* – 2009. – Vol. 23 – № 4. – P. 439-451.

61. M. T. Knuesel, K. D. Meyer, A. J. Donner, J. M. Espinosa, D. J. Taatjes. The human CDK8 subcomplex is a histone kinase that requires Med12 for activity and can function independently of mediator // *Mol. Cell Biol.* – 2009. – Vol. 29 – № 33. – P. 650-661.

62. K. D. Meyer, A. J. Donner, M. T. Knuesel, A. G. York, J. M. Espinosa, D. J. Taatjes. Cooperative activity of CDK8 and GCN5L within Mediator directs tandem phosphoacetylation of histone H3 // *EMBO J.* – 2008. – Vol. 27 – № 10. – P. 1447-1457.

63. P. Rickert, J. L. Corden, E. Lees. Cyclin C/CDK8 and cyclin H/CDK7/p36 are biochemically distinct CTD kinases // *Oncogene.* – 1999. – Vol. 18 – № 4. – P. 1093-1102.

64. S. Akoulitchev, S. Chuikov, D. Reinberg. TFIIF is negatively regulated by CDK8-containing mediator complexes // *Nature.* – 2000. – Vol. 407 – № 6800. – P. 102-106.

65. H. M. Bourbon. Comparative genomics supports a deep evolutionary origin for the large, four-module transcriptional mediator complex // *Nucleic Acids Res.* – 2008. – Vol. 36 – № 12. – P. 3993-4008.

66. S. Sato, C. Tomomori-Sato, T. J. Parmely, et al. A set of consensus mammalian mediator subunits identified by multidimensional protein identification technology // *Mol. Cell.* – 2004. – Vol. 14 – № 5. – P. 685-691.

67. G. Cooper. *The Cell: A Molecular Approach* – 8th edit. – Pub. Sinauer Associates is an imprint of Oxford University Press. – 2018. – P. 297.

68. J. E. Krebs, E. S. Goldstein, S. T. Kilpatrick. *Lewin's GENES XII* – 12th

edit. – Pub. Jones & Bartlett Learning. – 2017. – P. 793.

69. R. Abdella, A. Talyzina, S. Chen, C. J. Inouye, R. Tjian, Y. He. Structure of the human Mediator-bound transcription preinitiation complex // *Science*. – 2021. – Vol. 372 – № 6537. – P. 52-56.

70. Y. J. Kim, S. Bjorklund, Y. Li, M. H. Sayre, R. D. Kornberg. A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II // *Cell*. – 1994. – Vol. 77 – № 4. – P. 599-608.

71. S. Osman, E. Mohammad, M. Lidschreiber, A. Stuetzer, F. L. Bazso, K. C Maier, H. Urlaub, P. Cramer. The Cdk8 kinase module regulates interaction of the mediator complex with RNA polymerase II// *J. Biol. Chem.* – 2021. – Vol. 296 – № 1. – P. 100734-100749.

72. C. B. Fant, C. B. Levandowski, K. Gupta, Z. L. Maas, J. Moir, J. D. Rubin, A. Sawyer, M. N. Esbin, J. K. Rimel, O. Luyties, M. T. Marr, I. Berger, R. D. Dowell, D. J. Taatjes. TFIID Enables RNA Polymerase II Promoter-Proximal Pausing // *Mol. Cell*. – 2020. – Vol. 78 – № 4. – P. 785-793.

73. K. Brannan, H. Kim, B. Erickson, K. Glover-Cutter, S. Kim, N. Fong, L. Kiemele, K. Hansen, R. Davis, J. Lykke-Andersen, D. L. Bentley. mRNA decapping factors and the exonuclease Xrn2 function in widespread premature termination of RNA polymerase II transcription // *Mol Cell*. – 2012. – Vol. 46 – № 3. – P. 311-324.

74. W. Li, D. Notani, Q. Ma, et al. Functional roles of enhancer RNAs for estrogen-dependent transcriptional activation // *Nature*. – 2013. – Vol. 498 – № 7455. – P. 516-520.

75. U. A. Orom, T. Derrien, M. Beringer, K. Gumireddy, A. Gardini, G. Bussotti, F. Lai, M. Zytnicki, C. Notredame, Q. Huang, R. Guigo, R. Shiekhattar. Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells // *Cell*. – 2010. – Vol. 143 – № 1. – P. 46-58.

76. F. Lai, U. A. Orom, M. Cesaroni, M. Beringer, D. J. Taatjes, G. A. Blobel, R. Shiekhattar. Activating RNAs associate with Mediator to enhance

chromatin architecture and transcription // *Nature*. – 2013. – Vol. 494 – № 7438. – P. 497-501.

77. C. Hsieh, T. Fei, Y. Chen, T. Li, Y. Gao, X. Wang, T. Sun, C. J. Sweeney, G. M. Lee, S. Chen, S. P. Balk, X. S. Liu, M. Brown, P. W. Kantoff. Enhancer RNAs participate in androgen receptor-driven looping that selectively enhances gene activation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2014. – Vol. 111 – № 20. – P. 7319-24.

78. A. J. Donner, C. C. Ebmeier, D. J. Taatjes, J. M. Espinosa. CDK8 is a positive regulator of transcriptional elongation within the serum response network // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 17 – № 2. – P. 194-201.

79. S. Gressel, B. Schwalb, T. M. Decker, W. Qin, H. Leonhardt, D. Eick, P. Cramer. CDK9-dependent RNA polymerase II pausing controls transcription initiation // *Elife*. – 2017. – Vol. 6 – № 1. – P. 29736-29759.

80. S. Larochelle, R. Amat, K. Glover-Cutter, M. Sanso, C. Zhang, J. J. Allen, K. M. Shokat, D. L. Bentley, R. P. Fisher. Cyclin-dependent kinase control of the initiation-to-elongation switch of RNA polymerase II // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 19 – № 11. – P. 1108-1115.

81. S. Rengachari, S. Schilbach, S. Aibara, C. Dienemann, P. Cramer. Structure of the human Mediator-RNA polymerase II pre-initiation complex // *Nature*. – 2021. – Vol. 594 – № 7861. – P. 129-133.

82. C. J. Fryer, J. B. White, K. A. Jones. Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover // *Mol. Cell* – 2004. – Vol. 16 – № 4. – P. 509-520.

83. J. Bancerek, Z. C. Poss, I. Steinparzer, et al. CDK8 kinase phosphorylates transcription factor STAT1 to selectively regulate the interferon response // *Immunity*. – 2013. – Vol. 38 – № 2. – P. 250-262.

84. S. J. Park, S. W. Yang, B. Ki. Transforming growth factor- β 1 induces cell cycle arrest by activating atypical cyclin-dependent kinase 5 through up-regulation of Smad3-dependent p35 expression in human MCF10A mammary epithelial cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2016. – Vol. 472 – № 3. –

P. 502-507.

85. J. Lim, W. H. Kim, J. Kim, et al. Involvement of TGF-beta1 signaling in cardiomyocyte differentiation from P19CL6 cells // *Mol. Cells.* – 2007. – Vol. 24 – № 3. – P. 431-436.

86. K. S. Choi, Y. W. Eom, Y. Kang, et al. Cdc2 and Cdk2 kinase activated by transforming growth factor-beta1 trigger apoptosis through the phosphorylation of retinoblastoma protein in FaO hepatoma cells // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274 – № 45. – P. 31775-31783.

87. S. Huang, M. Holzels, T. Knijnenburg, et al. MED12 controls the response to multiple cancer drugs through regulation of TGF- β receptor signaling // *Cell.* – 2012. – Vol. 151 – № 5. – P. 937-950.

88. S. Gao, C. Alarcon, G. Sapkota, et al. Ubiquitin ligase Nedd4L targets activated Smad2/3 to limit TGF-beta signaling // *Mol. Cell.* – 2009. – Vol. 36 – № 3. – P. 457-468.

89. G. Dontu, K. W. Jackson, E. McNicholas, et al. Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells // *Brest Cancer Res.* – 2004. – Vol. 6 – № 6. – P. 605-615.

90. J. Muhr, D. W. Hagey. The cell cycle and differentiation as integrated processes: Cyclins and CDKs reciprocally regulate Sox and Notch to balance stem cell maintenance // *Bioessays.* – 2021. – Vol. 43 – № 7. – P. 2000285-2000297.

91. M. Farshbaf, M. J. Lindberg, A. Truong, et al. Mastermind-Like Is Ubiquitinated: Functional Consequences for Notch Signaling // *Plos One.* – 2015. – Vol. 10 – № 7 – P. 134013-134032.

92. N. R. Comet, J. I. Aguilo, M. G. Rathore, et al. IFN α signaling through PKC- θ is essential for antitumor NK cell functioning // *Oncoimmunology.* – 2014. – Vol. 3 – № 8 – P. 948705-948716.

93. I. Sadzak, M. Schiff, I. Gattermeier, et al. Recruitment of Stat1 to chromatin is required for interferon-induced serine phosphorylation of Stat1 transactivation domain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – Vol. 105 – №. 26 – P. 8944-8949.

94. A. Pilz, K. Ramsauer, H. Heidari, et al. Phosphorylation of the Stat1 transactivating domain is required for the response to type I interferons // *EMBO Rep.* – 2003. – Vol. 4 – №. 4 – P. 368-373.
95. A. K. Walker, R. L. Jacobs, J. L. Watts, et al. A conserved SREBP-1/phosphatidylcholine feedback circuit regulates lipogenesis in metazoans // *Cell.* – 2011. – Vol. 147 – №. 4 – P. 840-852.
96. T. Agalioti, G. Chen, D. Thanos. Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene // *Cell.* – 2002. – Vol 111 – № 3 – P. 381-392.
97. K. S. Yan, C. Y. Janda, J. Chang, et al. Non-equivalence of Wnt and R-spondin ligands during Lgr5+ intestinal stem-cell self-renewal // *Nature.* – 2017. – Vol. 545 – №. 7653 – P. 238-242.
98. S. Kim, X. Xu, A. Hecht, et al. Mediator is a transducer of Wnt/beta-catenin signaling // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281 – №. 20 – P. 14066-14075.
99. J. Zhao, R. Ramos, M. Demma. CDK8 regulates E2F1 transcriptional activity through S375 phosphorylation // *Oncogene.* – 2013. – Vol. 32 – №. 30 – P. 3520-3530.
100. G. Bain, C. B. Cravatt, C. Loomans, et al. Regulation of the helix-loop-helix proteins, E2A and Id3, by the Ras-ERK MAPK cascade // *Nat. Immunol.* – 2001. – Vol. 2 – №. 2 – P. 165-171.
101. M. Yamashita, R. Shinnakasu, H. Asou, et al. Ras-ERK MAPK cascade regulates GATA3 stability and Th2 differentiation through ubiquitin-proteasome pathway // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280 – №. 33 – P. 3520-3530.
102. W. Wang, L. Huang, Y. Huang, et al. Mediator MED23 links insulin signaling to the adipogenesis transcription cascade // *Dev Cell.* – 2009. – Vol. 16 – №. 5 – P. 764-771.
103. J. Yin, Y. Liang, J. Y. Park, et al. Mediator MED23 plays opposing roles in directing smooth muscle cell and adipocyte differentiation // *Genes Dev.* – 2012. – Vol. 26 – №. 19 – P. 2192-2205.
104. M. Belakavadi, P. K. Pandey, R. Vijayvargia, et al. MED1 phosphorylation promotes its association with mediator: implications for nuclear

receptor signaling // *Mol. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 28 – №. 12 – P. 3932-3942.

105. W. Xu, B. Amire-Brahimi, X. Xie, et al. All-atomic molecular dynamic studies of human CDK8: insight into the A-loop, point mutations and binding with its partner CycC // *Comput. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 51 – №. 1 – P. 1-11.

106. E. V. Schneider, J. Bottcher, R. Huber, et al. Structure-kinetic relationship study of CDK8/CycC specific compounds // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – Vol. 110 – №. 20 – P. 8081-8086.

107. Belakavadi, P. K. Pandey, R. Vijayvargia, et al. The structure of CDK8/CycC implicates specificity in the CDK/cyclin family and reveals interaction with a deep pocket binder // *J. Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 412 – №. 2 – P. 251-266.

108. R. Firestein, A. J. Bass, S. Y. Kim, et al. CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates beta-catenin activity // *Nature.* – 2008. – Vol. 455 – №. 7212 – P. 547-551.

109. R. Firestein, K. Shima, K. Nosho, et al. CDK8 expression in 470 colorectal cancers in relation to beta-catenin activation, other molecular alterations and patient survival // *Int. J. Cancer.* – 2010. – Vol. 126 – №. 12 – P. 2863-2873.

110. M. L. McClelland, T. M. Soukup, S. D. Liu, et al. Cdk8 deletion in the Apc(Min) murine tumour model represses EZH2 activity and accelerates tumorigenesis // *J. Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 412 – №. 2 – P. 251-266.

111. A. Kapoor, M. S. Goldberg, L. K. Cumberland, et al. The histone variant macroH2A suppresses melanoma progression through regulation of CDK8 // *Nature.* – 2010. – Vol. 468 – №. 7327 – P. 1105-1109.

112. T. Murakami, S. Toda, M. Fujimoto, et al. Constitutive Activation of Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Migration-Active Melanoma Cells: Role of LEF-1 in Melanoma with Increased Metastatic Potential // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – Vol. 288 – №. 1 – P. 8-15.

113. H. Zhou, Y. Liu, R. Zhu, et al. FBXO32 suppresses breast cancer tumorigenesis through targeting KLF4 to proteasomal degradation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2017. – Vol. 36 – №. 23 – P. 3312-3321.

114. D. Xu, C. Li, X. Zhang, et al. Skp2-macroH2A1-CDK8 axis orchestrates G2/M transition and tumorigenesis // *Nat. Commun.* – 2015. – Vol. 6 – №. 1 – P. 6641-6675.
115. H. E. Pelish, B. B. Liao, I. I. Nitulescu, et al. Mediator kinase inhibition further activates super-enhancer-associated genes in AML // *Nature.* – 2015. – Vol. 526 – №. 7572 – P. 273-276.
116. N. Li, A. Fassel, Joel Chick, et al. Cyclin C is a haploinsufficient tumour suppressor // *Nat. Cell Biol.* – 2014. – Vol. 16 – №. 11 – P. 1080-1091.
117. S. Yamamoto, T. Hagihara, Y. Horiuchi, et al. Mediator cyclin-dependent kinases upregulate transcription of inflammatory genes in cooperation with NF- κ B and C/EBP β on stimulation of Toll-like receptor 9 // *Genes Cells.* – 2017. – Vol. 22 – №. 3 – P. 265-276.
118. E. M. Putz, D. Gotthardt, G. Hoermann, et al. CDK8-mediated STAT1-S727 phosphorylation restrains NK cell cytotoxicity and tumor surveillance // *Cell Rep.* – 2013. – Vol. 4 – №. 3 – P. 437-444.
119. A. Witalisz-Siepracka, D. Gotthardt, M. Prchal-Murphy, et al. NK Cell-Specific CDK8 Deletion Enhances Antitumor Responses // *Cancer Immunol. Res.* – 2018. – Vol. 6 – №. 4 – P. 458-466.
120. O. Warburg, F. Wind, E. Negelein. The metabolism of tumors in the body // *J. Gen Physiol.* – 1927. – Vol. 8 – №. 6 – P. 519-530.
121. M. D. Galbraith, M. A. Allen, C. L. Bensard, et al. HIF1A employs CDK8-mediator to stimulate RNAPII elongation in response to hypoxia // *Cell.* – 2013. – Vol. 153 – №. 6 – P. 1327-1339.
122. J. Yi, J. Zhu, J. Wu, et al. Oncogenic activation of PI3K-AKT-mTOR signaling suppresses ferroptosis via SREBP-mediated lipogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2020. – Vol. 117 – №. 49 – P. 31189-31197.
123. S. E. Antmen, N. Canacankatan, I. Gurses, et al. Relevance of lipogenesis and AMPK/Akt/mTOR signaling pathway in endometrial cancer // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* – 2021. – Vol. 25 – №. 2 – P. 687-695.
124. D. Feng, D. Y. Youn, X. Zhao, et al. mTORC1 Down-Regulates

Cyclin-Dependent Kinase 8 (CDK8) and Cyclin C (CycC) // PLoS One. – 2015. – Vol. 10 – №. 6 – P. 126240-126255.

125. V. J. Cee, D. Y. Chen, M. R. Lee, et al. Cortistatin A is a high-affinity ligand of protein kinases ROCK, CDK8, and CDK11 // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. – 2009. – Vol. 48 – №. 47 – P. 8952-8957.

126. T. Rzymiski, M. Mikula, E. Zylkiewicz, et al. SEL120-34A is a novel CDK8 inhibitor active in AML cells with high levels of serine phosphorylation of STAT1 and STAT5 transactivation domains // Oncotarget. – 2017. – Vol. 8 – №. 20 – P. 33779-33795.

127. D. C. Porter, E. Farmaki, S. Altilia, et al. Cyclin-dependent kinase 8 mediates chemotherapy-induced tumor-promoting paracrine activities // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2012. – Vol. 109 – №. 34 – P. 13799-13804.

128. M. S. McDermott, A. Chumanevich, C. Lim, et al. Inhibition of CDK8 mediator kinase suppresses estrogen dependent transcription and the growth of estrogen receptor positive breast cancer // Oncotarget. – 2017. – Vol. 8 – №. 8 – P. 12558-12575.

129. A. Mallinger, K. Schiemann, C. Rink, et al. Discovery of Potent, Selective, and Orally Bioavailable Small-Molecule Modulators of the Mediator Complex-Associated Kinases CDK8 and CDK19 // J. Med. Chem. – 2016. – Vol. 59 – №. 3 – P. 1078-1101.

130. T. Dale, P. A. Clarke, C. Esdar, et al. A selective chemical probe for exploring the role of CDK8 and CDK19 in human disease // Nat. Chem Biol. – 2015. – Vol. 11 – №. 12 – P. 973-980.

131. Y. Yan, X. Zhang, Y. Xiao, et al. Design and Synthesis of a 2-Amino-pyridine Derivative as a Potent CDK8 Inhibitor for Anti-colorectal Cancer Therapy // J. Med. Chem. – 2022. – Vol. 65 – №. 19 – P. 13216-13239.

132. P. Bergeron, M. F. T. Koehler, E. M. Blackwood, et al. Design and Development of a Series of Potent and Selective Type II Inhibitors of CDK8 // ACS Med. Chem. Lett. – 2016. – Vol. 7 – №. 6 – P. 595-600.

133. S. Martinez-Gonzalez, A. B. Garcia, M. I. Albarran, et al. Pyrido[2,3-

b][1,5]benzoxazepin-5(6H)-one derivatives as CDK8 inhibitors // Eur. J. Med. Chem. – 2020. – Vol. 201 – №. 1 – P. 112443-112490.

134. M. H. Hofmann, R. Mani, H. Engelhardt, et al. Selective and Potent CDK8/19 Inhibitors Enhance NK-Cell Activity and Promote Tumor Surveillance// Mol. Cancer Ther.. – 2020. – Vol. 19 – №. 4 – P. 1018-1030.

135. A. C. Sharko, C. Lim, M. S. J. McDermott, et al. The Inhibition of CDK8/19 Mediator Kinases Prevents the Development of Resistance to EGFR-Targeting Drugs// Cells. – 2021. – Vol. 10 – №. 1 – P. 144-157.

136. R. Jan Freshney. Freshney's Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. – 6th edit. – Pub. Wiley. – 2018. – P. 403

137. <http://synergyfinder.org/>

Приложение А

Графики анализа индукции апоптоза клеток NCI-H1975GR

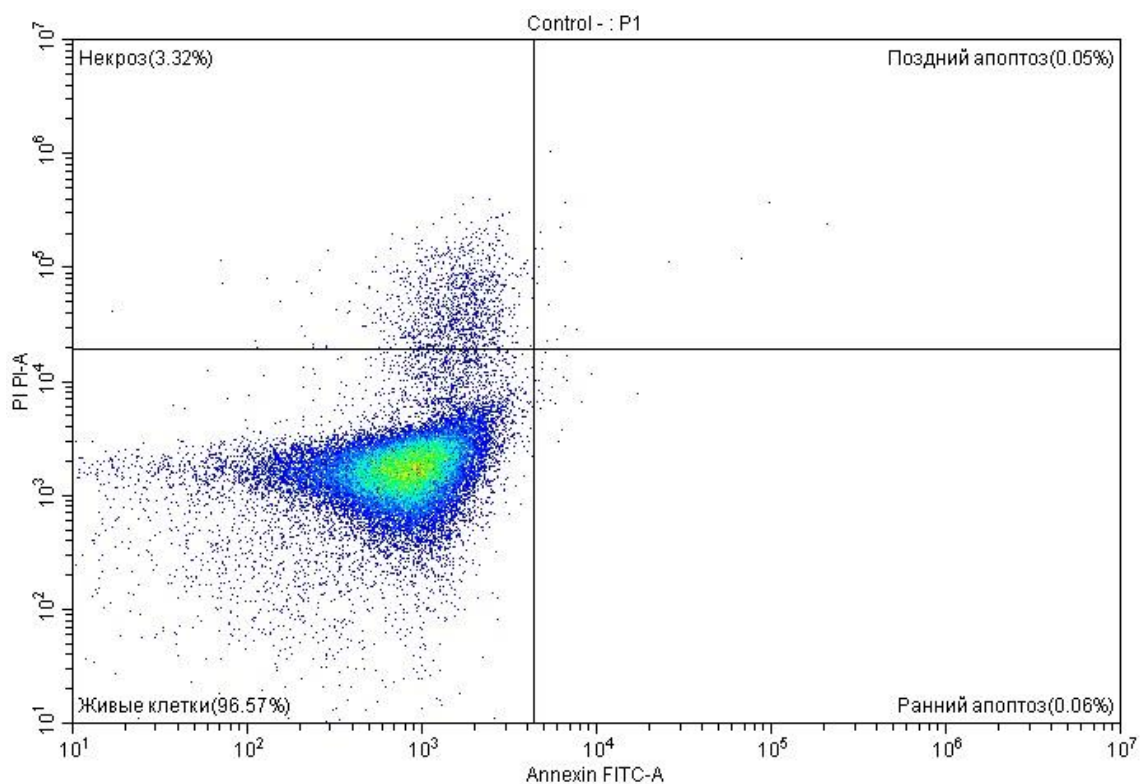


Рисунок А1 – График индукции апоптоза отрицательный контроль

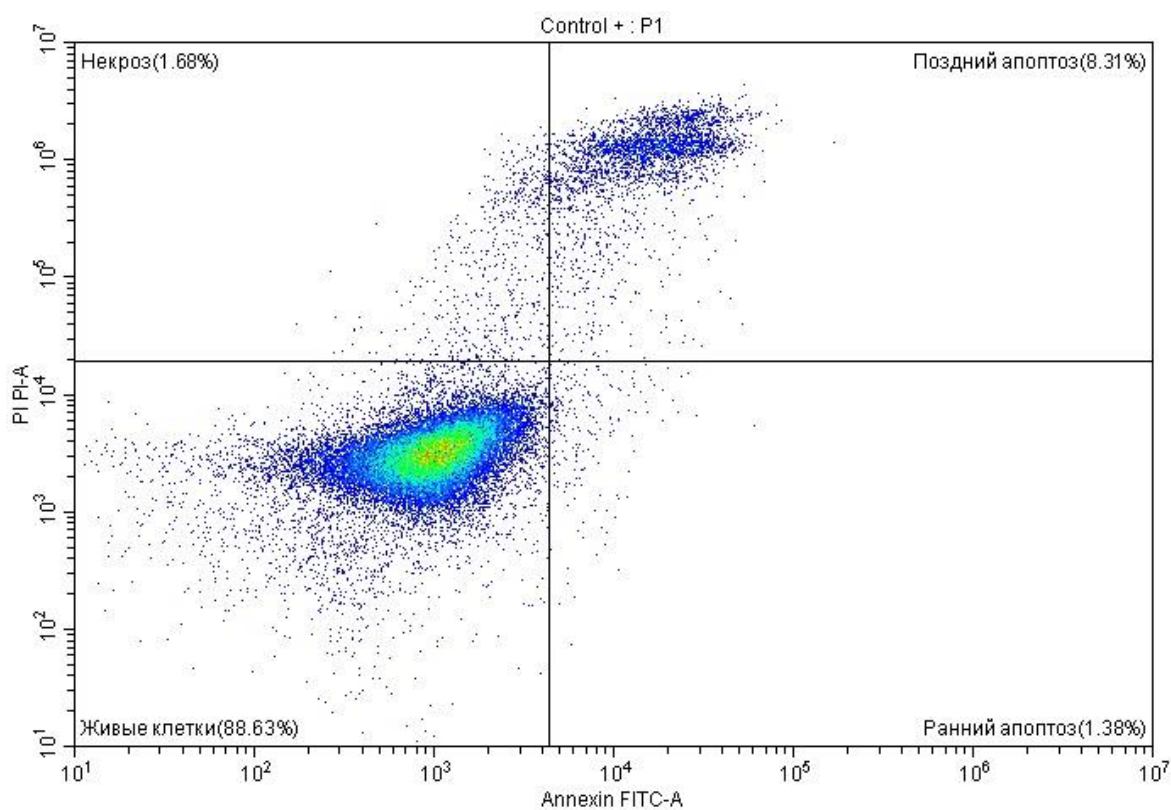


Рисунок А2 – График индукции апоптоза положительный контроль

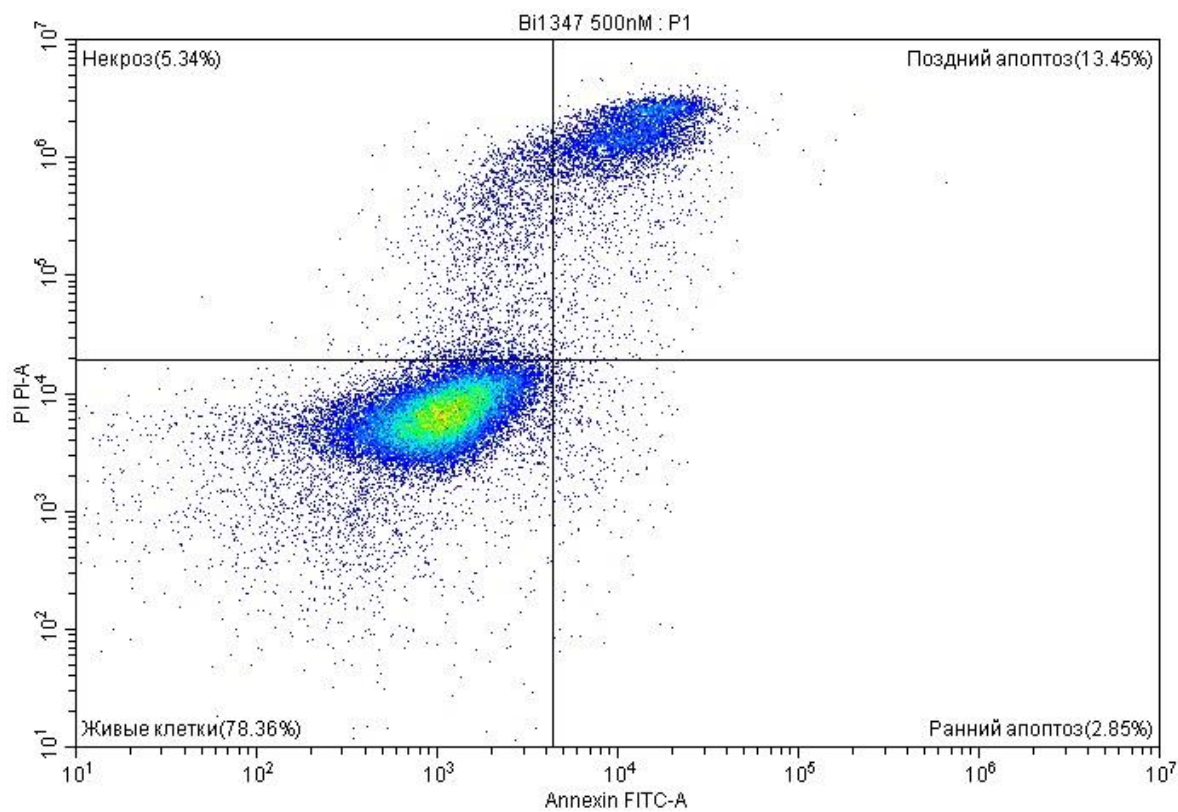


Рисунок А3 – График индукции апоптоза при концентрации BI-1347 500 нМ

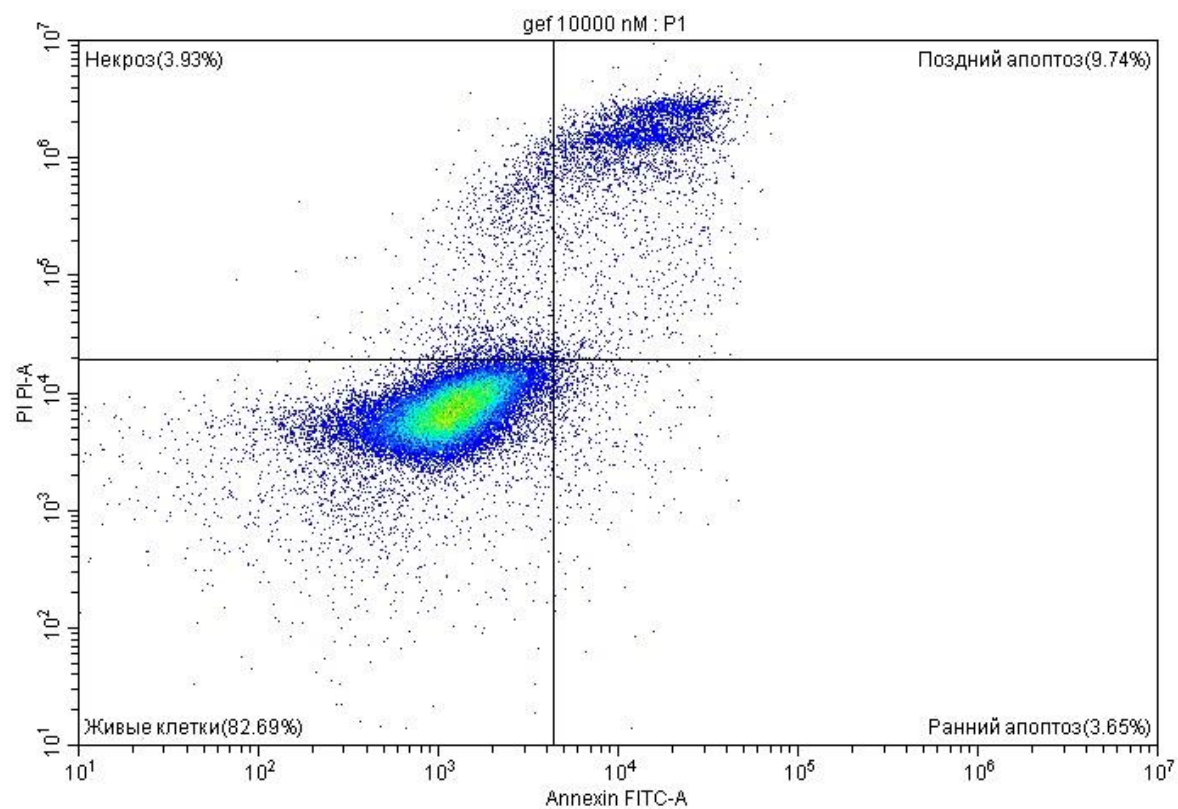


Рисунок А4 – График индукции апоптоза при концентрации гефитиниба 10 мкМ

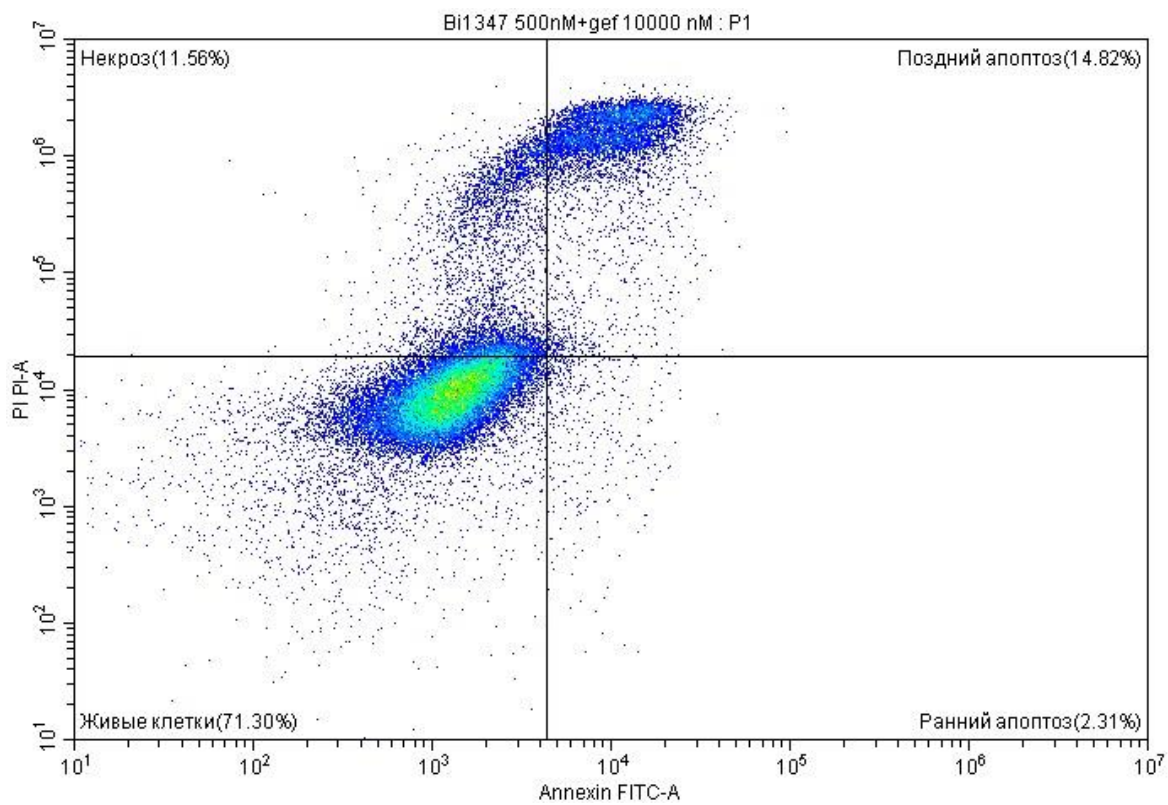


Рисунок А5 – График индукции апоптоза при концентрации гефитиниба 10 мкМ и BI-1347 500 нМ

Приложение Б

Графики анализа индукции апоптоза клеток A549GR

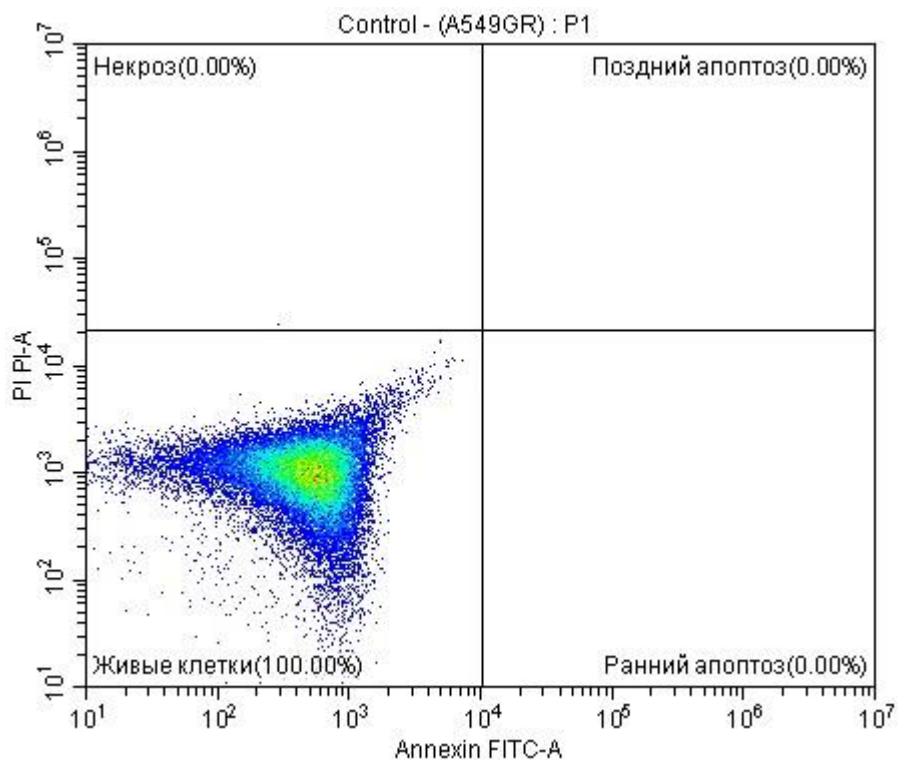


Рисунок Б1 – График индукции апоптоза отрицательный контроль

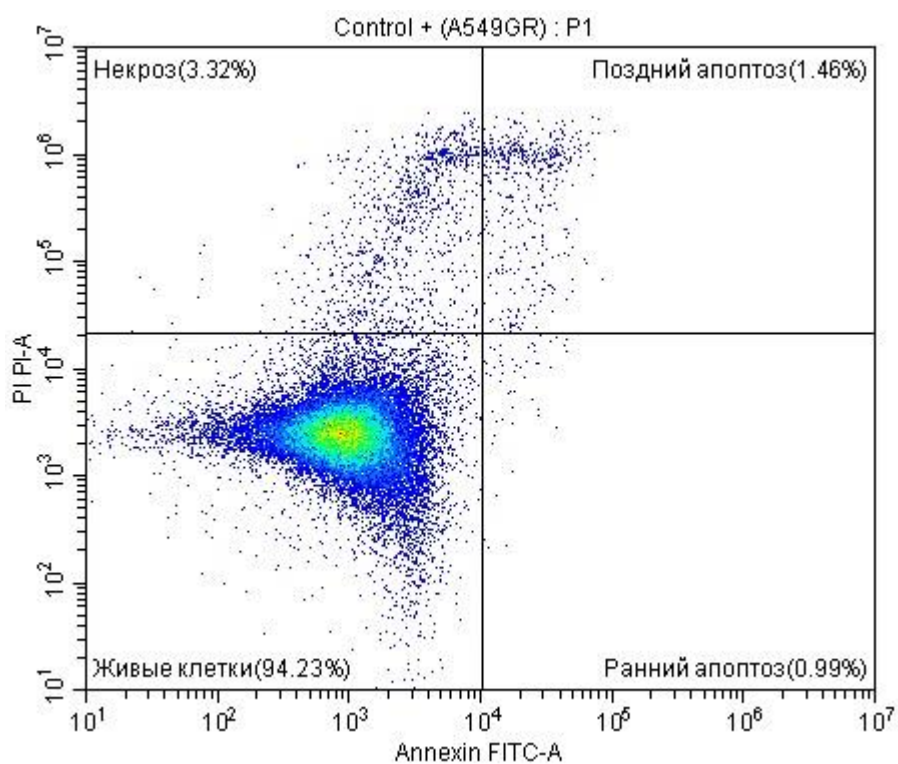


Рисунок Б2 – График индукции апоптоза положительный контроль

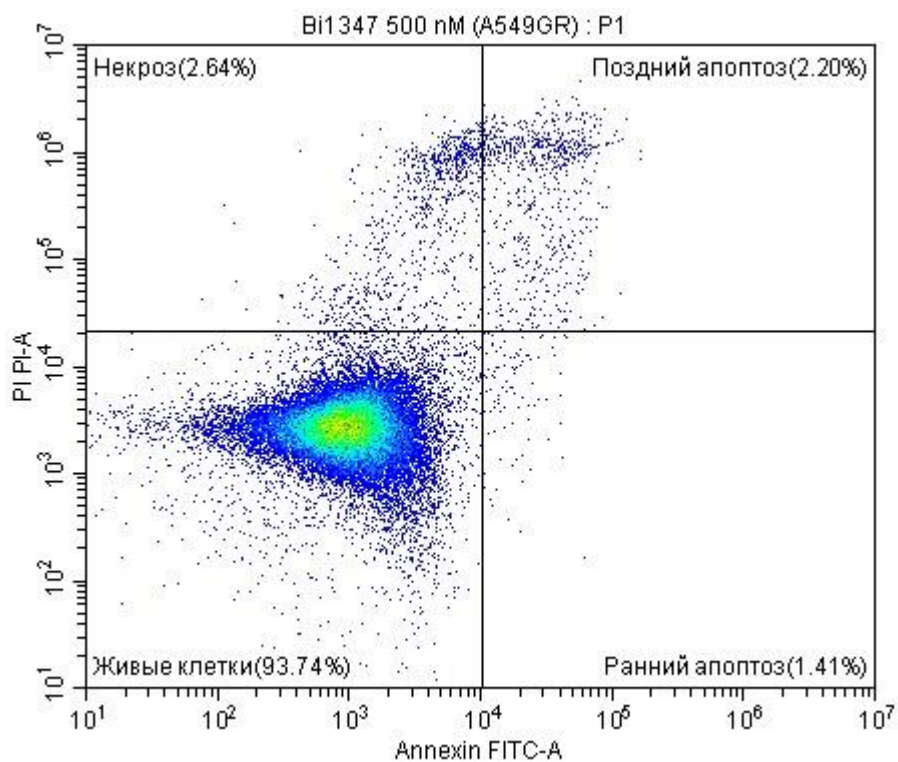


Рисунок Б3 – График индукции апоптоза при концентрации BI-1347 500 нМ

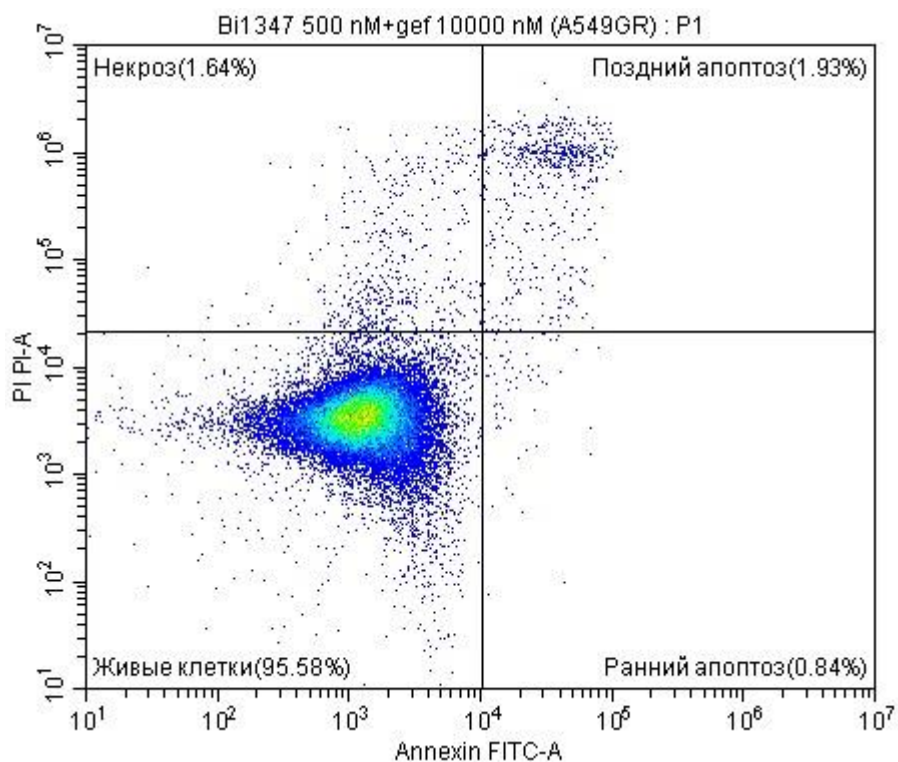


Рисунок Б4 – График индукции апоптоза при концентрации gefitiniba 10 мкМ

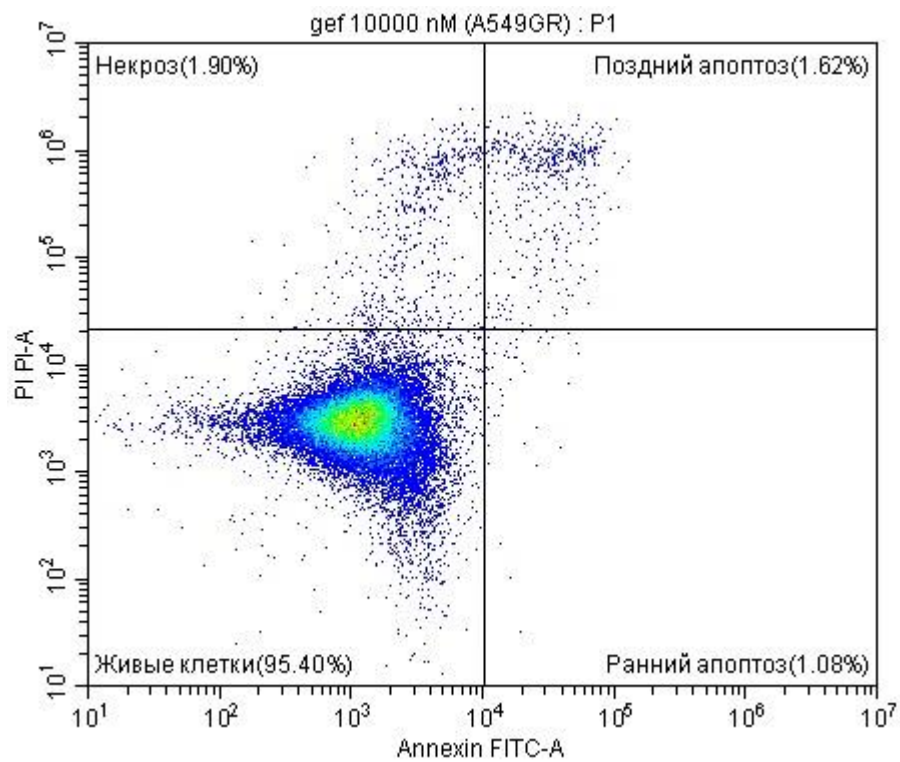


Рисунок Б5 – График индукции апоптоза при концентрации gefитиниба 20 мкМ

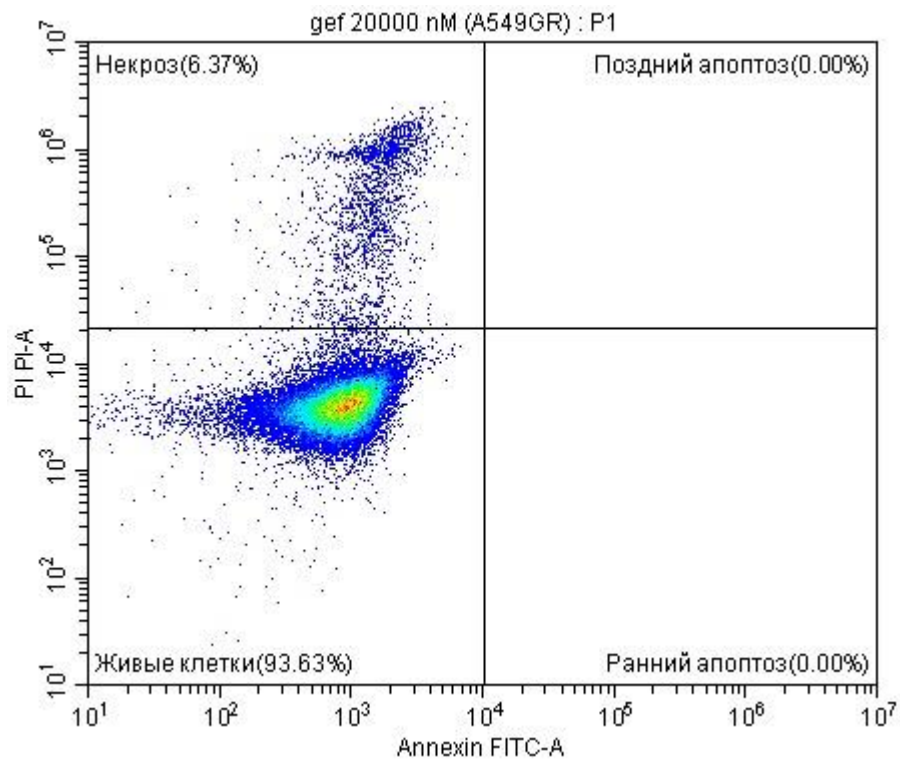


Рисунок Б6 – График индукции апоптоза при концентрации gefитиниба 10 мкМ и VI-1347 500 нМ

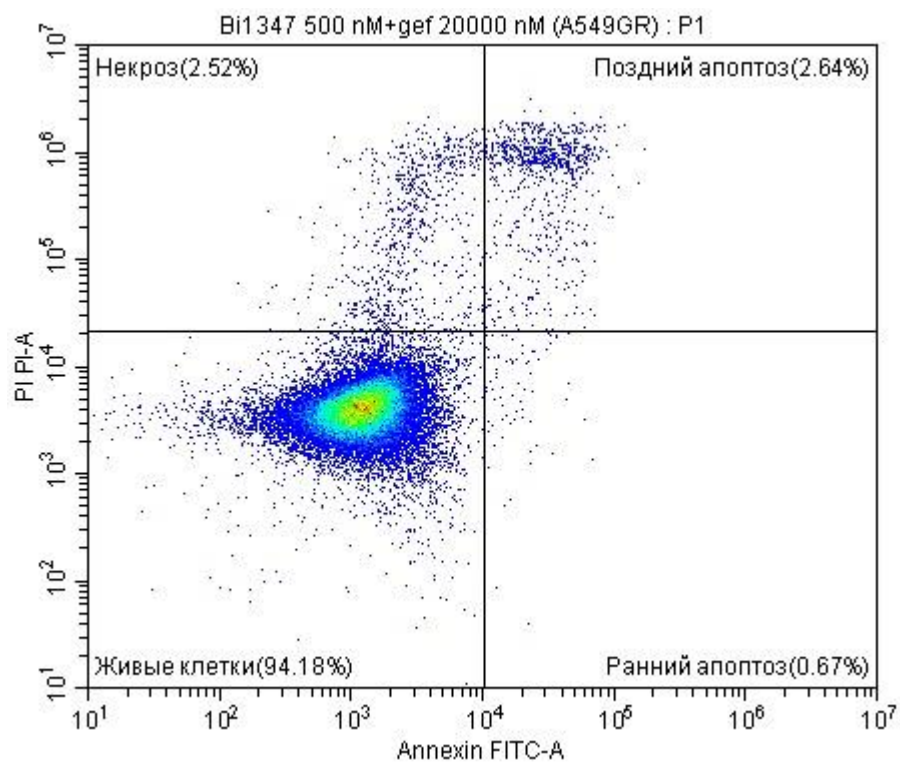


Рисунок Б7 – График индукции апоптоза при концентрации gefитиниба 20 мкМ и BI-1347 500 нМ