

ЗАПИТ
на проведення наукової (науково-технічної) роботи

1. Назва роботи

Функціональна реактивація білка р53 новітніми тіосемікарбазонами для вибіркової елімінації злоякісних клітин з мутаціями TP53

2. Вид тематики

II. Програмно-цільова та конкурсна тематика НАН України

3. Назва цільової програми або цільового проєкту

Гранти НАН України дослідницьким лабораторіям/групам молодих вчених НАН України для проведення досліджень за пріоритетними напрямками розвитку науки і техніки 2024-2025 рр.

4. Назва розділу програми або напрямку цільового проєкту

н е м а є

5. Строки виконання роботи

01 січня 2024 р. - 31 грудня 2025 р.

6. Код програмної класифікації видатків

6541230 (фундаментальні дослідження)

7. Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки

8. Пріоритетний тематичний напрям наукових досліджень і науково-технічних розробок




9. Код та назва наукового напрямку (проблеми) з Основних наукових напрямів та найважливіших проблем фундаментальних досліджень у галузі природничих, технічних і гуманітарних наук

2.2.4.1. Вивчення механізмів регуляції функціональних систем організму за умов норми і патології

10. Науковий керівник роботи

Панчук Ростислав Русланович, д.б.н., с.н.с., старший науковий співробітник, Інститут біології клітини НАН України
телефон: +38 032 261 2287; факс: +38 032 261 2148; e-mail: rpanchuk@ukr.net

11. Відповідальні виконавці

Прізвище, ім'я та по батькові	Науковий ступінь, посада, місце роботи, телефон, електронна адреса	Підпис
Гоцуляк Назарій Ярославович	молодший науковий співробітник, ІМБГ НАН України, тел.: +38 044 200 0356, e-mail: n.ya.gotsulyak@nas.gov.ua	
Кустовський Євген Олексійович	молодший науковий співробітник, ДУ "ІХБГ НАН України", тел.: +38(044)463-05-32, e-mail: kustovskyi_yo@nas.gov.ua	
Кліщ Микола Васильович	аспірант, ІБК НАН України, тел.: (032)2612287, e-mail: klishch_mv@nas.gov.ua	

12. Установи - співвиконавці

н е м а є

13. Ключові слова

реактивація мутованих форм білка p53, тіосемікарбазони, ER стрес, апоптоз, *in silico*, *in vitro*, сигнальні шляхи

14. Резюме

p53 — білок-супресор пухлини та ядерний фактор транскрипції, який задіяний у апоптозі, старінні, зупинці клітинного циклу та відновленні ДНК, за що і отримав почесний титул «охоронця геному» (Hernández Borrero et al., *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021). Тому і не дивно, що багато протипухлинних препаратів елімують злоякісні клітини саме завдяки активації p53-залежного апоптозу. На жаль, цей процес не завжди ефективний, адже ген TP53 мутований у більшості видів раку людини, що призводить або до втрати білка p53, або до експресії його мутантних версій (Mutp53). Дослідження на мишах показали, що відновлення експресії WTp53 призводить до регресії пухлини (Martins et al, *Cell*, 2006) і збільшення виживаності онкохворих (Martins et al, *Cell*, 2006). Для цього достатньо використати малі молекули, які ковалентно зв'язуються із залишками цистеїну у мутантному білку p53, відновлюючи його конформацію до природного стану, і тим самим пригнічуючи ріст пухлини (Vykov et al, *Nat. Rev. Cancer*, 2018; Zache et al, *Cell Oncol*, 2008; Vykov et al, *FEBS Lett*, 2014). Однак більшість виявлених реактиваторів p53 належать до класу акцепторів Міхаеля (наприклад, PRIMA-1, APR-246, MIRA-1 і STIMA-1), що і є основною причиною того, чому жоден з них не потрапив у клінічні випробування через низьку селективність дії, оскільки вони зв'язуються із SH-групами інших білків майже з такою самою спорідненістю, як і з p53 (Zhang et al., *Cell Chem Biol*, 2018). На відміну від них, нове похідне тіосемікарбазону COTI-2 використовує більш тонкі механізми рефолдингу p53 – через хелатію іонів Zn²⁺, відновлюючи здатність p53 до зв'язування з ДНК (Lindemann et al, *Clin. Cancer Res.*, 2019; Synnott et al, *Breast Cancer Res. Treat*, 2020). Ця особливість дозволяє COTI-2 бути набагато селективнішим, ніж інші відомі агенти, що реактивують p53, і наразі цей препарат проходить фазу II клінічних випробувань на онкохворих (Posa et al, *Cancers*, 2022).

Нещодавно нашими партнерами з кафедри неорганічної хімії Університету Відня (наукова група проф. Крістіана Коволя) було синтезовано новітні аналоги COTI-2 – його диметильовану форму COTI-NMe₂ та KP1550, які володіють у 40 раз вищою протипухлинною активністю, знищуючи злоякісні клітини вже у дозі 5 нМ (тест МТТ, 72 години інкубації). Ми вважаємо, що таке різке посилення протипухлинної активності новітніх тіосемікарбазонів зумовлено їх підвищеною афінністю до іонів цинку, а отже – і до зв'язування з мутантним p53 (mutp53), що призводить до потужної активації раніше «сплячого» p53-опосередкованого шляху апоптозу.

Метою роботи є вивчення сигнальних шляхів індукції загибелі злоякісних клітин, що містять дві найбільш поширені мутації гену p53 – R175H та R273H – за дії новітніх представників тіосемікарбазонів, що володіють унікальною здатністю до функціональної реактивації мутованого білка p53. Для цього будуть використані сучасні методи біоінформатики,

клітинної та молекулярної біології на унікальних ізогенних лініях клітин карциноми прямої кишки людини НСТ-116 дикого типу (з інтактним геном p53), нокаутом по гену p53 (НСТ-116/p53 КО) та штучно створеними лініями НСТ-116/p53-R175H і НСТ-116/p53-R273H, які були особисто згенеровані керівником проекту під час його стажування в Медичному університеті Відня шляхом трансфекції клітин НСТ-116/p53 КО лентівірусними векторами, що містили відповідні копії мутованого гену p53.

Принциповою новизною запропонованого підходу для таргетної терапії раку на основі тіосемікарбазонів є те, що дані сполуки не є акцепторами Міхаеля, а отже, не утворюють ковалентних зшивок з SH-групами усіх білків, як-от у інших відомих малих молекул-реактиваторів p53 (MIRA-1, STIMA-1, APR-246 та ін.), і як наслідок – є значно менш токсичними для нормальних клітин організму. Другий, і основний «плюс» цих сполук – надзвичайно висока протипухлинна активність, яка дозволяє знищувати злякисні клітини в наномолярних концентраціях, та відмінна біодоступність навіть при пероральному введенні експериментальним тваринам (миші). Все це вказує на значні перспективи застосування даних протипухлинних препаратів у клінічній медицині як універсального засобу для лікування пухлин з hotspot-мутаціями p53, що складають понад 50% усіх типів раку.

Перший етап проекту буде зосереджений на перевірці його робочої гіпотези, що підвищена протипухлинна активність новітніх аналогів COTI-2 – COTI-NMe2 та KP1550 – зумовлена їх більшою афінністю до мутованих форм білка p53. Методами *in silico* із застосуванням сучасного програмного забезпечення (Maestro, PyMOL, ChimeraX тощо) буде змодельовано зв'язування COTI-2, COTI-NMe2, KP1550 з білком p53 дикого типу та його мутованими формами p53-R175H та p53-R273H. Пошук сайтів зв'язування тіосемікарбазонів з білком p53 та моделювання їх взаємодії буде здійснено за допомогою методу молекулярного докінгу та пакетів програмного забезпечення GOLD та SeeSAR.

Для верифікації даних *in silico* буде використано метод Вестерн-блот аналізу із застосуванням специфічних антитіл до пан-форми p53 (DO-1) та p53 дикого типу (PAb1620). Якщо наша гіпотеза є коректною, то зв'язування тіосемікарбазонів з мутантним p53 супроводжуватиметься часо- та концентраційно-залежним зниженням його рівня з одночасною появою p53 дикого типу.

В подальшому буде проведено всебічний аналіз цитотоксичної активності COTI-2, COTI-NMe2 та KP1550 на панелі клітинних ліній карциноми прямої кишки людини лінії НСТ-116 з інтактним геном TP53 (НСТ-116/wt), нокаутом по ньому (НСТ-116/p53 КО) та з штучно інтродукованими мутантними копіями гену p53-R175H та p53-R273H (НСТ-116/p53-R175H, НСТ-116/p53-R273H). Це дозволить з'ясувати, чи гіперчутливість клітин з мутаціями p53 НСТ-116/p53-R175H, НСТ-116/p53-R273H до COTI-2 також зберігається і для COTI-NMe2 та KP1550.

На другому етапі виконання проекту у 2025 році заплановано провести детальний аналіз сигнальних шляхів, задіяних у процесах проліферації та апоптозу, на модельних лініях клітин з різним функціональним статусом TP53 за дії досліджуваних тіосемікарбазонів. Для цього заплановано використати метод Вестерн-блот аналізу на панелі з специфічних антитіл до понад 20 білків, задіяних у шляхах індукції ER стресу (BiP, PDI, ero-1a, IRE-1a, HSP70, ERK 1/2, phospho-ERK 1/2 та ін), автофагії (Beclin-1, LC3A/B, p62 та ін.) та апоптозу (p21, каспаза-3, каспаза-9, Bax, Bak, PARP-1 та ін.). Для вивчення шляху mTOR заплановано аналіз експресії PTEN, PI3K, Akt та їх низхідних ефекторних білків – S6K1, S6K2, eIF4E та ін. Дослідження заплановано провести на 4 клітинних лініях – НСТ-116/wt, НСТ-116/p53 КО, НСТ-116/p53-R175H, НСТ-116/p53-R273H, на 6, 12, 24 години дії тіосемікарбазонів у різних концентраціях. Для верифікації отриманих результатів нами буде використано специфічні інгібітори кожного з вищезгаданих сигнальних шляхів, що дозволить з'ясувати, як саме «вимкнення» кожного з них впливає на цитотоксичну активність тіосемікарбазонів щодо злякисних клітин з різним статусом TP53.

Ми очікуємо, що гіперчутливість клітин з певними мутаціями TP53 до тіосемікарбазонів зумовлена ефективною реактивацією його білкового продукту до конформації p53 дикого типу та як наслідок, потужної індукції апоптозу. Це, у свою чергу, вказуватиме на доцільність подальших доклінічних досліджень COTI-NMe2 та KP1550 на безтимусних мишах, яким би інокулювали ксенотрансплантати з ліній НСТ-116/wt, НСТ-116/p53 КО, НСТ-116/p53-R175H, НСТ-116/p53-R273H. Такі можливості наразі відсутні в колективу виконавців, однак легко можуть бути реалізованими на базі Медичного Університету Відня, з якими понад 10 років співпрацює керівник проекту, д.б.н. Панчук Р.Р. У разі підтвердження даного феномену отримані результати

можуть легко бути масштабованими для терапії пухлин різного походження, які характеризуються відповідними hotspot мутаціями у гені TP53.

15. Обґрунтування доцільності виконання роботи

15.1. Цілі та завдання роботи, її актуальність, соціальна та економічна значимість.

Ціллю роботи є з'ясування структурно-функціональних закономірностей, що визначають p53-реактиваційну та протипухлинну активність новітніх похідних тіосемікарбазонів, та обґрунтування їх застосування у клінічній практиці для лікування пухлин з hotspot-мутаціями гену TP53.

Для цього поставлено наступні **завдання**:

1. Порівняння ефективності зв'язування тіосемікарбазону COTI-2 (описаний в літературі реактиватор білка p53) та його удосконалених похідних COTI-NMe2 та KP1550 з мутантними формами білка p53 (мутація R175H та R273H) *in silico*.
2. Дослідження цитотоксичної активності COTI-2, COTI-NMe2 та KP1550 на панелі клітинних ліній карциноми прямої кишки людини з інтактним геном TP53 (HCT-116/wt), нокаутом по ньому (HCT-116/p53 KO) та з штучно інтродукованими мутантними копіями гену p53-R175H та p53-R273H (HCT-116/p53-R175H, HCT-116/p53-R273H)
3. Порівняння ефективності реактивації мутантних варіантів білка p53 за дії COTI-2, COTI-NMe2, KP1550 у клітинах лінії HCT-116/p53-R175H та HCT-116/p53-R273H методом Вестерн-блот аналізу із застосуванням специфічних антитіл до пан-форми p53 (DO-1) та p53 дикого типу (PAb1620).
4. Вивчення часо-залежної активації білків (6, 12, 24 год), задіяних у індукції ER стресу (BiP, PDI, ero-1a, IRE-1a, HSP70, ERK 1/2, phospho-ERK 1/2 та ін.), автофагії (Beclin-1, LC3A/B, p62 та ін.) та апоптозу (p21, каспаза-3, каспаза-9, Bax, Bak, PARP-1 та ін.) методом Вестерн-блот аналізу за дії COTI-2, COTI-NMe2, KP1550 на панелі клітинних ліній карциноми прямої кишки людини з інтактним геном TP53 (HCT-116/wt), нокаутом по ньому (HCT-116/p53 KO) та з штучно інтродукованими мутантними копіями гену p53-R175H та p53-R273H (HCT-116/p53-R175H, HCT-116/p53-R273H)
5. Порівняння впливу COTI-2, COTI-NMe2, KP1550 на сигнальний шлях PI3/Akt/mTOR у клітинах карциноми прямої кишки людини з інтактним геном TP53 (HCT-116/wt), нокаутом по ньому (HCT-116/p53 KO) та з штучно інтродукованими мутантними копіями гену p53-R175H та p53-R273H (HCT-116/p53-R175H, HCT-116/p53-R273H)
6. Визначення пріоритетного шляху індукції клітинної загибелі новітніми тіосемікарбазонами у клітинах з різним статусом TP53 шляхом застосування інгібіторів каспаз (z-VAD-fmk), ER стресу (фенілбутират натрію, інгібітори кінрази MEK 1/2 UO126 і PD98058) та сигнального шляху mTOR (темсиролімус, вістусертиб).

Актуальність роботи полягає у розробці нових підходів до лікування раку, що ґрунтуються на використанні «м'яких» реактиваторів мутантного білка p53, який детектується у абсолютній більшості пухлин (Zhu et al, *Frontiers in Oncology*, 2020). Ми вважаємо, що стабілізація порушеної 3D-структури ДНК-зв'язуючого домену мутантного p53 новітніми тіосемікарбазонами дозволяє запуснути на повну потужність p53-опосередкований шлях апоптозу навіть у тих клітинах, які вважалися стійкими до хіміотерапії. Найважливішою особливістю запропонованого авторами підходу є його універсальність для абсолютно різних типів пухлин, незалежно від їх походження чи локалізації – єдиним важливим фактором буде лише наявність у них специфічної hotspot-мутації TP53. Не виключено, що досліджувані тіосемікарбазони будуть здатні стабілізувати широкий спектр мутантних форм білка p53, однак у даній роботі нами було прийнято рішення зосередитися лише на двох найпоширеніших міссенс-мутаціях TP53– R175H та R273H (Hassin et al, *Nature Communications*, 2022).

Соціальна та економічна значимість запропонованого дослідження є очевидною, оскільки експериментальне підтвердження того, що новітні тіосемікарбазони знищують злоякісні клітини саме шляхом реактивації мутантного білка p53, дозволить рекомендувати їх до застосування у хіміотерапії онкохворих у поєднанні з іншими ДНК-пошкоджуючими агентами (цисплатин, гемцитабін) – для досягнення максимального синергічного ефекту у вилікуванні пухлин із певними мутаціями TP53. Оскільки COTI-2 уже знаходиться на II стадії клінічних досліджень, то проходження такого ж шляху для COTI-NMe2 та KP1550, які володіють в 40 раз вищим

протипухлинним потенціалом, є абсолютно реальною подією, особливо з урахуванням величезного досвіду та можливостей у австрійських партнерів проекту. Кінцевою метою впровадження результатів даного проекту є спроба домогтися вилікування раніше інкурабельних форм раку, які містять мутації p53-R175H та p53-R273H. Це, безсумнівно, матиме виражений позитивний вплив як на вітчизняну, так і світову економіку.

15.2. Стан розроблення проблеми.

p53 — білок-супресор пухлини та ядерний фактор транскрипції, який зазвичай називають «охоронцем геному», що бере активну участь в апоптозі, старінні, зупинці клітинного циклу та відновленні ДНК (Hernández Borrero et al., *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021). Тому не дивно, що багато протипухлинних препаратів вбивають пухлинні клітини саме завдяки активації білкового продукту гену p53, та подальшого запуску ланцюжка сигнальних шляхів, що призводять до загибелі клітин-мішеней. На жаль, цей процес не завжди ефективний, адже ген TP53 мутований у більшості видів раку людини, що призводить або до втрати білка p53, або до експресії його мутантних версій (Mutp53). Останні можуть призводити до домінантно-негативного інгібування будь-якого залишкового білка p53 дикого типу або ж можуть набувати нових функцій, які сприяють росту пухлини, метастазуванню та хіміорезистентності (Dolma et al, *Cancers*, 2022). Місценс-мутації гену p53 (TP53) вважаються найнебезпечнішими, оскільки вони, як правило, призводять до експресії стабільних мутантних білків p53 з однією амінокислотою варіацією від WTp53 і значно довшим періодом напіврозпаду. Mutp53 – це дуже складна протипухлинна мішень, головним чином через відсутність у нього алостеричних ділянок, які можна інгібувати ліками, появу термодинамічно порушених станів, а також його внутрішню здатність надавати пухлинам стійкості до ліків (Phatak et al, *Cell Death Dis*, 2021; Gomes et al, *Cancers*, 2021; He et al., *Chemotherapy*, 2017). Зв'язок між експресією mutp53 і зниженою хіміочутливістю спостерігається при різних первинних ракових захворюваннях, у тому числі раку молочної залози (Bergh et al., *Nat. Med*, 1995), яєчників (Righetti et al, *Cancer Res*, 1996), легень (Horio et al., *Cancer Res*, 1993), кровотворної системи (Wattel et al., *Blood*, 1994).

Дослідження на мишах показали, що експресія WTp53 або відновлення експресії WTp53 викликає регресію пухлини (Martins et al, *Cell*, 2006), інколи аж до повної її елімінації (Xue et al, *Nature*, 2007), старіння (Ventura et al, *Nature*, 2007; Xue et al, *Nature*, 2007) і збільшення виживаності онкохворих (Martins et al, *Cell*, 2006). Це вказує на те, що реактиваційна терапія, в якій мутантні форми білка p53 перетворюються на повнофункціональний білок дикого типу, може працювати *in vivo*. Цього можна досягти за допомогою деяких малих молекул, які ковалентно зв'язуються із залишками цистеїну у білку p53. Такий підхід призводить до підвищеної термічної стабільності реактивованого mutp53 у WTp53-подібному стані згортання (Vykov et al, *Nat. Med*, 2002) та пригнічення росту пухлини (Vykov et al, *Nat. Rev. Cancer*, 2018; Zache et al, *Cell Oncol*, 2008; Vykov et al, *FEBS Lett*, 2014). Однак більшість виявлених реактиваторів p53 належать до класу акцепторів Міхаеля (наприклад, PRIMA-1, APR-246, MIRA-1 і STIMA-1), що і є основною причиною того, чому жоден з них не потрапив у клінічні випробування через низьку селективність дії, оскільки вони зв'язуються із SH-групами інших білків майже з такою самою спорідненістю, як і з p53 (Zhang et al., *Cell Chem Biol*, 2018). На відміну від них, нове похідне тіосемікарбазону COTI-2 використовує більш тонкі механізми рефолдингу p53 – через хелатацію іонів Zn²⁺, відновлюючи здатність p53 до зв'язування з ДНК (Lindemann et al, *Clin. Cancer Res.*, 2019; Synnott et al, *Breast Cancer Res. Treat*, 2020). Ця особливість дозволяє COTI-2 бути набагато селективнішим, ніж інші відомі p53-реактуючі агенти, і наразі цей препарат проходить фазу II клінічних випробувань на онкохворих (Posa et al, *Cancers*, 2022).

Нещодавно нашими партнерами з кафедри неорганічної хімії Університету Відня (наукова група проф. Крістіана Коволя) синтезувала новітні аналоги COTI-2 – його диметильовану форму COTI-NMe₂ та KP1550, які володіють у 40 раз вищою протипухлинною активністю, знищуючи злякисні клітини вже у дозі 5 нМ (тест МТТ, 72 години інкубації). Ми вважаємо, що таке різке посилення протипухлинної активності новітніх тіосемікарбазонів зумовлено їх підвищеною афінністю до іонів цинку, а отже – і до зв'язування з мутантним p53, що призводить до потужної активації раніше «сплячого» p53-опосередкованого шляху апоптозу. Ці та інші задачі будуть детально досліджені та розв'язані в ході виконання даного проекту.

15.3. Досвід і доробок авторів.

Даний проект ґрунтується на попередньому доробку виконавців проекту, які є фахівцями в галузі біоінформатичних досліджень *in silico* (Кустовський Є.), сигнального шляху mTOR (Гоцуляк Н.Я.), біохімічних та клітинно-біологічних досліджень механізмів дії новітніх протипухлинних препаратів (Панчук Р.Р.). За період стажування д.б.н. Панчука Р.Р. у Медичному університеті Відня з 21.02.2022 р по 23.10.2023 р. ним було освоєно передові методики молекулярної біології, що дозволило реалізувати перший, підготовчий етап даного проекту – створення коректної клітинної моделі для досліджень р53-реактивуючих функцій новітніх тіосемікарбазонів. Для цього у базі даних AddGene було обрано плазміди, що містили гени найбільш поширених (т.зв. hotspot) міссенс-мутацій гену р53 – R175H та R273H, які перетворюють його з антионкогену у онкоген, та проведено ко-трансфекцію ними клітин НЕК293 разом із допоміжними плазмідами. Це дозволило згенерувати лентівірусні вектори з відповідними цільовими генами, якими в подальшому було трансфіковано клітини НСТ-116/р53 КО, у яких ген р53 було штучно видалено, та шляхом селекції на середовищі з бластисидином у двох незалежних експериментах було отримано нові клони НСТ-116/р53-R175H та НСТ-116/р53-R273H, кожен – у 4-х біологічних повторах. Методом Вестерн-блот аналізу із використанням пан-специфічного антитіла до р53 (DO-1) було показано наявність білкового продукту р53 у всіх без виключення клонах, який завдяки присутності мітки V5 Tag має молекулярну масу на 2 кДа більшу, ніж у р53 дикого типу.

Порівняння цитотоксичної активності тіосемікарбазону СОТІ-2, який є відомим реактиватором р53 (Salim et al, *Oncotarget*, 2016), на панелі клітинних ліній НСТ-116/wt, НСТ-116/р53 КО, НСТ-116/р53-R175H, НСТ-116/р53-R273H, показало, що усі новостворені клони з мутантними копіями гену р53 є гіперчутливими до дії СОТІ-2, що підтверджує нашу робочу гіпотезу. В той же час клітини з нокаутом гену р53 були вдвічі стійкішими до СОТІ-2, у порівнянні з клітинами дикого типу, де присутній інтактний р53. Отже, створена модель для дослідження дії новітніх р53-реактивуючих агентів є коректною та готовою для застосування у задачах даного проекту.

Експертні навички Кустовського Є.О. будуть застосовані у вивченні ефективності зв'язування СОТІ-2 та його новітніх аналогів – СОТІ-NMe2 та КР1550 – з мутантними білками р53-R175H та р53-R273H *in silico*, досвід д.б.н. Панчука Р.Р. – у дослідженні сигнальних шляхів стресу ендоплазматичного ретикулу, автофагії та апоптозу за дії цих сполук щодо клітин з інтактним, видаленим та мутованим р53. У свою чергу, багаторічний досвід к.б.н. Гоцуляка Н.Я. у дослідженні сигнального шляху mTOR буде надзвичайно затребуваним при з'ясуванні, чи справді реактивація мутантного білка р53 є єдиним механізмом дії новітніх тіосемікарбазонів. Зокрема, із даних літератури відомо, що СОТІ-2 також інгібує сигнальний шлях PI3/Akt/mTOR (Salim et al, *Oncotarget*, 2016). Чи стосується це і його аналогів, які володіють у 40 раз вищою цитотоксичною активністю – наразі залишається нез'ясованим.

Наукометричні показники керівника проекту:

H-index – **15**, 605 цитувань у 501 документах, сумарний імпаکت-фактор публікацій за 2023-2017 рр. – **69,5**.

Міжнародні публікації виконавців проекту по тематиці роботи

1. **Panchuk R.**, Skorokhyd N., Chumak V., Lehka L., Kosiakova H., Horid'ko T., Hudz I., Hula N., Riabtseva A., Mitina N., Zaichenko A., Heffeter P., Berger W., Stoika R. Cannabimimetic N-Stearoylethanolamine as "Double-Edged Sword" in Anticancer Chemotherapy: Proapoptotic Effect on Tumor Cells and Suppression of Tumor Growth versus Its Bio-Protective Actions in Complex with Polymeric Carrier on General Toxicity of Doxorubicin In Vivo // *Pharmaceutics*. – 2023. – V.15, N. 3. Art No. 835. doi: 10.3390/pharmaceutics15030835. (IF= 5,4, Q1)
2. Gao X., Zhang B., Zheng Y., Liu X., **Panchuk R.**, Finiuk N., Sik A., Stoika R., Liu K., Jin M. Neuroprotective effect of chlorogenic acid on Parkinson's disease like symptoms through boosting the autophagy in zebrafish // *Eur J Pharmacol*. – 2023. – V. 956. – Art No 175950. doi: 10.1016/j.ejphar.2023.175950. (IF= 5,0, Q1)
3. Manko N., Starykovych M., Mitina N., Volianiuk K., Wang L., Jin M., Liu K., **Panchuk R.**, Klyuchivska O., Zaichenko A., Kit Y., Stoika R. Covalent Conjugate of Ser-Pro-Cys Tripeptide with PEGylated Comb-Like Polymer as Novel Killer of Human Tumor Cells // *ACS Omega*. – 2022. – V. 7, N. 46. – P. 41956-41967. doi: 10.1021/acsomega.2c03611. (IF = 4,1, Q1)
4. Terenzi A., la Franca M., van Schoonhoven S., **Panchuk R.**, Martínez A., Heffeter P., Redding G., Pirker C., Kowol C.R., Stoika R., Salassa L., Rohr J., Berger W. Landomycins as glutathione-depleting agents and unique natural fluorescent probes for cellular Michael adduct-dependent

- quinone metabolization // *Communications Chemistry*. – 2021. – V. 4. – Art. No. 162 (IF= 5,9, Q1)
5. Świątek M., **Panchuk R.**, Skorokhyd N., Černoch P., Finiuk N., Klyuchivska O., Hrubý M., Molčan M., Berger W., Trousil J., Stoika R., Horák D. Magnetic Temperature-Sensitive Solid-Lipid Particles for Targeting and Killing Tumor Cells // *Frontiers in Chemistry*. – 2020. – V.8. – Art. No. 205 (IF= 5,5, Q1).
 6. Martínez R., Geronimo B.D., Pastor M., Zapico J.M., Coderch C., **Panchuk R.**, Skorokhyd N., Maslyk M., Ramos A., de Pascual-Teresa B. Multitarget Anticancer Agents Based on Histone Deacetylase and Protein Kinase CK2 inhibitors // *Molecules*. – 2020. – V. 25, N. 7. – Art. No. 1497. (IF= 4,6, Q1)
 7. Kobylynska L, Ivasechko I, Skorokhyd N, **Panchuk R**, Riabtseva A, Mitina N, Zaichenko A, Lesyk R, Zimenkovsky B, Stoika R, Vari SG. Enhanced Proapoptotic Effects of Water Dispersed Complexes of 4-Thiazolidinone-Based Chemotherapeutics with a PEG-Containing Polymeric Nanocarrie // *Nanoscale Research Letters*. – 2019. – V.14, N.1. – Art No:140. (IF= 6,5, Q2)
 8. Hotsuliak N.Y., Kosach V.V., Tykhonkova I.O., Palchevskii S.S., Khoruzhenko A.I. Fibroblasts modulate the tumor cell motility and their mTOR/S6K1 phosphorylation status *in vitro* // *Biopolymers and Cell*, - 2019. – V. 35, N. 6. – P. 417-426
 9. Bilobrov V., Sokolova V., Prylutska S., **Panchuk R.**, Litsis O., Osetskyi V., Evstigneev M.,Prylutskyu Yu., Epple M., Ritter U., Rohr J. A Novel Nanoconjugate of Landomycin A with C₆₀ Fullerene for Cancer Targeted Therapy: *In Vitro* Studies // *Cellular and Molecular Bioengineering*. – 2019. – V.12, Is. 1. – P.41-51 (IF= 2,8, Q2)
 10. Pastor M, Zapico JM, Coderch C, Maslyk M, **Panchuk R**, de Pascual-Teresa B, Ramos A. From a MMP2/CK2 multitarget approach to the identification of potent and selective MMP13 inhibitors // *Organic and Biomolecular Chemistry*. – 2019. – V. 17, Is. 4. – P. 916-929 (IF=3,2, Q1)
 11. Finiuk N., Klyuchivska O., Ivasechko I., Hreniukh V., Ostapiuk Y., Shalai Y., **Panchuk R.**, Matiychuk V., Obushak M, Stoika R, Babsky A. Proapoptotic effects of novel thiazole derivative on human glioma cells // *Anti-Cancer Drugs*. – 2019. – V.30, Is. 1. – P. 27-37 (IF= 2,3, Q2)
 12. Plichta Z, Kozak Y, **Panchuk R**, Sokolova V, Epple M, Kobylynska L, Jendelová P, Horák D. Cytotoxicity of doxorubicin-conjugated poly[N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide]-modified γ-Fe₂O₃ nanoparticles towards human tumor cells // *Beilstein Journal of Nanotechnology*. – 2018. -V. 9. – P. 2533-2545. (IF= 3,1, Q2)
 13. **Panchuk R.R.**, Skorokhyd N.R., Kozak Y.S., Lehka L.V., Moiseenok A.G., Stoika R.S. Tissue-protective activity of selenomethionine and D-panthetine in B16 melanoma-bearing mice under doxorubicin treatment is not connected with their ROS scavenging potential // *Croatian Medical Journal*. – 2017. -V. 58, N. 2. – P. 171-184 (IF= 1,9, Q2)
 14. Kobylynska L.I., Klyuchivska O.Y., Grytsyna I.I., Finiuk N., **Panchuk R.R.**, Starykovych M.O., Lehka L., Lesyk R.B., Zimenkovsky B.S., Stoika R.S. Differential pro-apoptotic effects of synthetic 4-thiazolidinone derivative Les-3288, doxorubicin and temozolomide in human glioma U251 cells// *Croatian Medical Journal*. – 2017. -V. 58, N. 2. – P. 150-159. (IF= 1,9, Q2)
 15. **Panchuk R.R.***, Lehka L.V.*, Terenzi A., Matselyukh B.P., Rohr J., Jha A.K., Downey T., Kril' I.Y., Herbacek I., van Schonhoven S., Heffeter P., Stoika R.S., Berger W. Rapid generation of hydrogen peroxide contributes to the complex cell death induction by the angucycline antibiotic landomycin E // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2017. -V. 106. – P. 134-147. (IF= 7,4, Q1)
 16. Prylutska S.*, **Panchuk R.***, Gołuński G.*, Skivka L, Prylutskyu Yu., Hurmach V., Skorokhyd N., Borowik A., Wozniwodzka A., Piosik J., Kyzyma O., Garamus V., Bulavin L., Evstigneev M., Buchelnikov A., Stoika R., Berger W., Ritter U., Scharff P.C₆₀ Fullerene Enhances Anticancer Activity of Cisplatin In vitro and In vivo and Facilitates Circumvention of Drug Resistance in Tumor Cells // *Nano Research*. – 2017. – V. 10, N. 2. – P. 652-671 (IF= 9,9, Q1)

15.4. Структура досліджень.

Виконання проекту буде здійснюватися в 2 етапи (по одному на рік).

1. Дослідження впливу структурних елементів у молекулі тіосемікарбазонів на їхню здатність взаємодіяти з різними мутантними формами білка p53 *in silico* та протипухлинну

активність цих сполук *in vitro* на панелі ізогенних ліній злоякісних клітин з різним статусом гену p53 (2024 рік)

2. Ідентифікація сигнальних шляхів загибелі злоякісних клітин з мутаціями p53-R175H та p53-R273H за дії новітніх тіосемікарбазонів із застосуванням сучасних методів клітинної біології *in vitro* (2025 рік)

Перший етап проекту буде зосереджений на перевірці робочої гіпотези проекту, що підвищена протипухлинна активність новітніх аналогів COTI-2 – COTI-NMe₂ та KP1550 – зумовлена їх більшою афінністю до мутованих форм білка p53. У цих сполуках 4-(піридин-2-іл) піперазиновий мотив з молекули COTI-2 замінено на вторинну аміногрупу, а в KP1550 також додатково проведено заміну базового структурного елементу даних сполук – дигідрохінолін-8-аміно-ілідену на піридин.

Методами *in silico* із застосуванням сучасного програмного забезпечення (Maestro, PyMOL, ChimeraX тощо) буде змодельовано зв'язування COTI-2, COTI-NMe₂, KP1550 з білком p53 дикого типу та його мутованими формами p53-R175H та p53-R273H. Пошук сайтів зв'язування тіосемікарбазонів з білком p53 та моделювання їх взаємодії буде здійснено за допомогою методу молекулярного докінгу та пакетів програмного забезпечення GOLD та SeeSAR. Для з'ясування, наскільки стабільними є утворені комплекси тіосемікарбазонів з інтактним та мутованим p53, буде проведено молекулярно-динамічна симуляція білків та ліганд-білкових комплексів за допомогою пакету GROMACS, та визначено їх стабільність та прогнозовану енергію зв'язування ліганда з білком за допомогою методу MM/PB(GB)SA.

На наступному етапі виконання проекту буде проведено всебічний аналіз цитотоксичної активності COTI-2, COTI-NMe₂ та KP1550 на панелі клітинних ліній карциноми прямої кишки людини лінії HCT-116 з інтактним геном TP53 (HCT-116/wt), нокаутом по ньому (HCT-116/p53 KO) та з штучно інтродукованими мутантними копіями гену p53-R175H та p53-R273H (HCT-116/p53-R175H, HCT-116/p53-R273H). Для цього буде використано метод оцінки проліферативної активності клітин із застосуванням барвника МТТ (для довготривалої цитотоксичної активності, 72 год інкубації) та автоматичний лічильник клітин LUNA (Logos Biosystems, Південна Корея) для аналізу короткотривалої цитотоксичної активності (24 год) даних речовин на основі методу екструзії трипанового синього. Завданням цього етапу є з'ясування, чи гіперчутливість клітин з мутаціями p53 HCT-116/p53-R175H, HCT-116/p53-R273H до COTI-2 також зберігається і для COTI-NMe₂ та KP1550. У випадку позитивного результату це слугуватиме першим підтвердженням отриманих раніше даних симуляції *in silico* та вказуватиме на важливу роль реактивації мутантного p53 у механізмах протипухлинної дії COTI-NMe₂ та KP1550.

Завершальним етапом досліджень на 2024 рік буде верифікація даних *in silico* та *in vitro* методом Вестерн-блот аналізу із застосуванням специфічних антитіл до пан-форми p53 (DO-1) та p53 дикого типу (PAb1620). Якщо наша гіпотеза є коректною, то зв'язування тіосемікарбазонів з мутантним p53 супроводжуватиметься часо- та концентраційно-залежним зниженням його рівня з одночасною появою p53 дикого типу. За потреби буде здійснено додаткову перевірку статусу мутантного p53 у цих клітинах (із застосуванням специфічних антитіл PAb240) методом проточної цитометрії (оскільки детекція мутантного p53 можлива лише в неденатуруючих умовах). Відповідно до робочої гіпотези проекту, його рівень повинен знижуватися у часо-залежному діапазоні за дії зростаючих доз тіосемікарбазонів.

У 2025 році заплановано провести детальний аналіз сигнальних шляхів, задіяних у процесах проліферації та апоптозу, на модельних лініях клітин з різним функціональним статусом TP53 за дії досліджуваних тіосемікарбазонів. Відомо, що диметильоване похідне тріапіну Me₂NNMe₂ індукуює параптоз у злоякісних клітинах людини лінії SW480 та HCT-116, першопричиною якого є ER стрес (Hager et al, *Cell Death Dis*, 2016). При цьому спостерігається активація ER стресу, опосередкованого PDI (Protein disulfide-isomerase) та ERK 1/2, однак відсутня активація каспаз. Згідно даних літератури, COTI-2 індукуює розщеплення каспаз (Synnott et al, *Breast Cancer Res Treat*, 2020), однак невідомо, як змінюється профіль сигнальних шляхів загибелі клітин за умови, що злоякісні клітини містять мутацію R175H чи R273H у гені TP53. Дія COTI-NMe₂ та KP1550 на сигнальні шляхи індукції клітинної загибелі взагалі не вивчалася, тож для з'ясування, як саме ці сполуки знищують злоякісні новоутворення з мутаціями TP53, слід обов'язково порівняти отримані результати з такими ж даними на ізогенних клітинних лініях з інтактним та видаленим геном TP53. Це дозволить виокремити лише ті сигнальні

каскади, які прив'язані до реактивації мутантного білка p53 за дії новітніх тіосемікарбазонів, та відкинути ті, активація чи інгібування яких є p53-незалежним явищем.

Саме тому в рамках етапу № 2 (2025 рік) нами заплановано дослідити сигнальні шляхи PI3/Akt/mTOR, ER стресу, автофагії та апоптозу. Кожен з вищезгаданих сигнальних шляхів модулюється за дії різних тіосемікарбазонів, тому критично важливо зробити повноцінний часо-залежний аналіз змін у експресії білків-ефекторів у кожному з них за дії різних доз СОТІ-2, СОТІ-NMe2, КР1550. Для цього заплановано використати метод Вестерн-блот аналізу на панелі з специфічних антитіл до понад 20 білків, задіяних у шляхах індукції ER стресу (BiP, PDI, ego-1a, IRE-1a, HSP70, ERK 1/2, phospho-ERK 1/2 та ін.), автофагії (Beclin-1, LC 3 A/B, p62 та ін.) та апоптозу (p21, каспаза-3, каспаза-9, Bax, Bak, PARP-1 та ін.). Для вивчення шляху mTOR заплановано аналіз експресії PTEN, PI3K, Akt та їх низхідних ефекторних білків – S6K1, S6K2, eIF4E та ін. Дослідження заплановано провести на 4 клітинних лініях – НСТ-116/wt, НСТ-116/p53 КО, НСТ-116/p53-R175H, НСТ-116/p53-R273H, на 6, 12, 24 години дії тіосемікарбазонів у різних концентраціях.

Для верифікації отриманих результатів нами буде використано специфічні інгібітори кожного з вищезгаданих сигнальних шляхів, та з'ясовано, як «вимкнення» кожного з них впливає на цитотоксичну активність тіосемікарбазонів щодо злоякісних клітин з різним статусом TP53. Якщо наша гіпотеза вірна, то реактивація білка p53 новітніми тіосемікарбазонами призводитиме до гіперактивації саме апоптотичного сигнального каскаду, тож пан-каспазний інгібітор z-VAD-fmk повинен бути більш ефективним у інгібуванні дії цих сполук саме щодо клітинних ліній з мутованим TP53, але не до ліній з нокаутом по даному гену. Аналогічно, якщо інгібування шляху PI3/Akt/mTOR є лише доповнюючим до p53-таргетного, то інгібітори mTOR останнього покоління (темсиролімус, вістусертиб) повинні проявляти помірну синергічну дію з тіосемікарбазонами або ж ніяк не впливати на їхню активність.

Також залишається нез'ясованим, наскільки важливою є роль ER стресу у ініціації клітинної загибелі тіосемікарбазонами залежно від статусу p53, що буде перевірено застосуванням тотального інгібітору ER стресу (фенілбутират натрію) та точково – інгібіторами кінази MEK 1/2 (U0126 чи PD98058).

Підсумовуючи вищесказане, використання широкої панелі антитіл до білків маркерів клітинної загибелі та специфічних інгібіторів сигнальних шляхів, які можуть індукуватися тіосемікарбазонами, на відповідних модельних лініях клітин, дозволить чітко розрізнити механізми загибелі злоякісних клітин за дії СОТІ-2, СОТІ-NMe2, КР1550 залежно від статусу їх гену TP53. Ми очікуємо, що гіперчутливість клітин з певними мутаціями TP53 до тіосемікарбазонів зумовлена ефективною реактивацією його білкового продукту до конформації p53 дикого типу та як наслідок, потужної індукції апоптозу. Це, у свою чергу, вказуватиме на доцільність подальших доклінічних досліджень СОТІ-NMe2 та КР1550 на безтимусних мишах, яким би інокулювали ксенотрансплантати з ліній НСТ-116/wt, НСТ-116/p53 КО, НСТ-116/p53-R175H, НСТ-116/p53-R273H. Такі можливості наразі відсутні в колективу виконавців, однак легко можуть бути реалізованими на базі Медичного Університету Відня, з якими понад 10 років співпрацює керівник проекту, д.б.н. Панчук Р.Р.

15.5. Наявність матеріально-технічної бази для виконання роботи.

Відділ регуляції проліферації клітин і апоптозу Інституту біології клітини НАН України, де працює керівник даного проекту, д.б.н. Панчук Р.Р., володіє достатнім досвідом, науковим потенціалом, методичною та технічною базою для успішного виконання проекту. Виконавцями даного проекту мають протягом тривалого часу проводитися дослідження в галузі клітинної та молекулярної біології з метою вивчення механізмів злоякісного переродження клітин тварин і людини та з'ясування принципів дії деяких протипухлинних препаратів та механізмів виникнення стійкості злоякісних клітин до їх дії, що є серйозною проблемою в хіміотерапевтичному лікуванні онкологічних хворих. У відділі є необхідне обладнання для роботи по напрямку проекту – проточний цитофлуориметр BD FACScan, флуоресцентний мікроскоп Zeiss AxioImager A1, три прилади для білкового електрофорезу та Вестерн-блотингу, два СО2-інкубатори, мікропланшетний рідер для імуноферментативних аналізів (ELISA), біохімічний аналізатор крові Sinnova BS-3000M, гематологічний аналізатор крові Dymind DF50 VET, ламінарні бокси для роботи з клітинними лініями, центрифуги та ін., віварій для експериментів *in vivo*. Тут зберігається колекція клітинних ліній, необхідних для виконання запропонованих досліджень, а також підтримуються лабораторні лінії мишей Balb/C і C57/Bl6,

необхідні для підтримки меланоми B16, карциноми прямої кишки СТ26 та фібросаркоми миші MCA205 *in vivo*.

16. Техніко-економічне обґрунтування

н е м а є

17. Власна оцінка науково-технічного рівня розробки, що пропонується, яка очікується за результатами наукової, науково-технічної роботи

- | |
|--|
| <input type="checkbox"/> немає аналогів у світі або краща за існуючі у світі аналоги |
| <input checked="" type="checkbox"/> немає аналогів в Україні |
| <input type="checkbox"/> краща за існуючі в Україні аналоги за всіма основними показниками |
| <input type="checkbox"/> перевищує існуючі в Україні аналогічні розробки за окремими показниками |

18. Використання результатів роботи

18.1. Очікувані наукові та науково-практичні результати, об'єкти права інтелектуальної власності (ОІВ), які плануються до впровадження після завершення роботи

Найменування результатів, ОІВ	Назва підприємства, організації, де передбачається використовувати результати, ОІВ	Заплановані обсяги впровадження
Протоколи досліджень молекулярних та біохімічних механізмів дії новітніх тіосемікарбазонів <i>in vitro</i>	ТОВ "Фармак", корпорація "Артеріум", ТОВ "НВЦ "ХЕМА"	1-2 млн грн

18.2. Шляхи та способи подальшого використання в суспільній практиці результатів виконання роботи

На сьогоднішній момент в Україні відсутнє власне виробництво протипухлинних препаратів, тому МОЗ змушений закуповувати за кордоном дорогі оригінальні версії препаратів, на які ніколи не вистачає коштів, або ж дешеві індійські генерики, якість яких є доволі сумнівною. Зрозуміло, що про вітчизняні засоби таргетної терапії раку взагалі мова не йде – і як наслідок, лише одиниці онкохворих в Україні здатні за власний кошт оплатити космічно дорогу вартість цих засобів, один курс лікування якими може становити 100 000 доларів США.

Саме тому актуальність і економічна доцільність від створення новітніх засобів таргетної терапії раку та їх подальшого впровадження у вітчизняну клінічну практику, не викликає сумнівів. Новітні тіосемікарбазони COTI-NMe₂ та KP1550, які знищують злоякісні клітини у наномолярних концентраціях (показник IC₅₀=5 нМоль), є надзвичайно перспективними кандидатами на цю роль, а їхня потенційна здатність реактивувати певні мутовані форми білка p53 відкривають широкі перспективи для їх застосування у комбінованій хіміотерапії з іншими ДНК-пошкоджуючими агентами – для забезпечення максимальної синергічності їх дії. В ході виконання роботи буде детально вивчено молекулярні та біохімічні механізми індукції загибелі злоякісних клітин новітніми тіосемікарбазонами з p53-реактивуючими властивостями, та обґрунтовано їх застосування у лікуванні злоякісних новоутворень з певними hotspot-мутаціями гену TP53. Це дозволить впритул наблизитися до повномасштабних доклінічних досліджень даних сполук на моделях ксенотрансплантатів пухлин з різним статусом TP53 на безтимиусних мишах, які планується провести у співпраці з австрійськими партнерами проекту з Медичного Університету Відня. У разі підтвердження даного феномену отримані результати можуть легко бути масштабованими для терапії пухлин різного походження, які характеризуються відповідними мутаціями у гені TP53.

18.3. Потенційні споживачі наукових та науково-технічних результатів, об'єктів права інтелектуальної власності (ОІВ)

Країна	Назва підприємства, організації	Найменування результатів, ОІВ	Можливі обсяги споживання
Україна	ТОВ "Фармак", корпорація "Артеріум", ТОВ "НВЦ "ХЕМА"	Протоколи досліджень молекулярних та біохімічних механізмів дії новітніх тіосемікарбазонів in vitro	1-2 млн грн

19. Об'єкти права інтелектуальної власності (ОІВ), використання яких передбачається під час проведення досліджень (для прикладних досліджень та фундаментальних, де використовуються ОІВ)

н е м а є

20. Фінансові аспекти роботи

20.1. Загальна вартість роботи 2000,000 тис. грн.

словами: два мільйони грн.

20.2. Вартість роботи:

Роки виконання роботи	2024 р.	2025 р.
Вартість виконання робіт (тис. грн.)	1000,000	1000,000

21. Наукові ради (комітети, комісії) НАН України, ради регіональних наукових центрів НАН і МОН України, яких доцільно залучити до експертної оцінки запиту

Наукова рада Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (м. Київ) Наукова рада біологічного факультету Львівського національного університету ім. Івана Франка (м. Львів) Наукова рада Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ)

22. Кандидатури можливих експертів у галузі, до якої відноситься робота, що пропонується

Прізвище, ім'я, по батькові	Науковий ступінь, посада	Місце роботи
Костерін Сергій Олексійович	академік НАН України, д.б.н., проф., заступник директора з наукової роботи	Ін-т біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України
Дробот Людмила Борисівна	д.б.н., проф., завідувач відділу	Ін-т біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України
Філоненко Валерій Вікторович	академік НАН України, д.б.н., проф., завідувач відділу	Ін-т молекулярної біології і генетики НАН України
Фільченков Олексій Олексійович	к.б.н., с.н.с., старший науковий співробітник	Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім.Р.С.Кавецького НАН України
Федоренко Віктор Олександрович	д.б.н., проф., завідувач кафедри	Львівський національний університет ім. І.Франка

23. Додатки, що є невід'ємною частиною запиту:

1. Технічне завдання на виконання роботи (Додаток А).
2. Планова калькуляція кошторисної вартості роботи (Додаток Б).

27.10.2023

дата

Директор
Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України



Андрій СИБІРНИЙ

М.П.

Науковий керівник роботи

Старший науковий співробітник
Інституту біології клітини НАН України
д.б.н., с.н.с.

(підпис)

Ростислав ПАНЧУК

ПОГОДЖЕНО

Директор
Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України

25255758

(підпис)

Андрій СИБІРНИЙ

« 27 »

жовтня

2024 р.

М.П.

ЗАТВЕРДЖУЮ

Віцепрезидент НАН України
академік НАН України

Вячеслав КОШЕЧКО

(підпис)

« »

20 р.

М.П.

ТЕХНІЧНЕ ЗАВДАННЯ

на виконання наукової (науково-технічної) роботи

**«Функціональна реактивація білка p53 новітніми тіосемікарбазонами для
вибіркової елімінації злоякісних клітин з мутаціями TP53»**

**Гранти НАН України дослідницьким лабораторіям/групам молодих вчених НАН
України для проведення досліджень за пріоритетними напрямками розвитку науки і
техніки 2024-2025 рр.**

Інститут біології клітини НАН України

1. Рішення про затвердження роботи

2. Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки

н е м а є

3. Пріоритетний тематичний напрям наукових досліджень і науково-технічних розробок

н е м а є

4. Код та назва наукового напрямку або проблеми з Основних наукових напрямів та найважливіших проблем фундаментальних досліджень у галузі природничих, технічних і гуманітарних наук (для фундаментальних досліджень)

2.2.4.1. Вивчення механізмів регуляції функціональних систем організму за умов норми і патології

5. Основний напрям наукової діяльності установи, за яким проводяться роботи

Дослідження молекулярних механізмів регуляції проліферації, диференціації та апоптозу у нормальних та пухлинних клітинах тварин і людини.

6. Мета роботи

Метою роботи є вивчення сигнальних шляхів індукції загибелі злоякісних клітин з мутованими генами p53 (R175H та R273H) за дії новітніх представників тіосемікарбазонів, що володіють унікальною здатністю до функціональної реактивації мутованого білка p53. Для цього будуть використані сучасні методи біоінформатики, клітинної та молекулярної біології на унікальних ізогенних лініях клітин карциноми прямої кишки людини НСТ-116 дикого типу (з інтактним геном p53), нокаутом по гену p53 (НСТ-116/p53 КО) та штучно створеними лініями НСТ-116/p53-R175H і НСТ-116/p53-R273H, які були особисто згенеровані керівником проекту під час його стажування в Медичному університеті Відня шляхом трансфекції клітин НСТ-116/p53 КО лентівірусними векторами, що містили відповідні копії мутованого гену p53.

В ході проекту заплановано дослідити *in silico* взаємодію мутованих форм p53-R175H та p53-R273H з тіосемікарбазоном СОТІ-2 (описаний в літературі реактиватор p53) і його новітніми аналогами СОТІ-NMe2 та КР1550, які володіють в 40 разів вищою цитотоксичною активністю *in vitro*. Ми вважаємо, що функціональна реактивація тіосемікарбазонами мутантних форм білка p53 у злоякісних клітинах призводить до додаткової активації p53-залежного шляху апоптозу за участі білків-ефекторів Вах, Вак, Рума, р21. Це, у свою чергу, повинно суттєво посилити стандартну цитотоксичну активність тіосемікарбазонів, і може бути основною причиною гіперчутливості новостворених клітинних ліній НСТ-116/p53-R175H і НСТ-116/p53-R273H до даних сполук. У разі підтвердження даного феномену отримані результати можуть легко бути масштабованими для терапії пухлин різного походження, які характеризуються відповідними мутаціями у гені TP53.

7. Термін проведення роботи:

початок — 01 січня 2024 р. ; закінчення — 31 грудня 2025 р.

Орієнтовний обсяг коштів на виконання роботи в цілому **2000,000** тис. грн.

та по роках

2024 р. — 1000,000 тис. грн.

2025 р. — 1000,000 тис. грн.

8. Календарний план роботи

№ з/п	Найменування основного етапу роботи	Термін виконання	Відповідальний виконавець
1	Дослідження впливу структурних елементів у молекулі тіосемікарбазонів на їхню здатність взаємодіяти з різними мутантними формами білка p53 <i>in silico</i> та протипухлинну активність цих сполук <i>in vitro</i> на панелі ізогенних ліній злякисних клітин з різним статусом гену p53	01 січня 2024 р. - 31 грудня 2024 р.	д.б.н., с.н.с., Р.Р. Панчук; М.В. Кліщ; Н.Я. Гоцуляк; Є.О. Кустовський.
2	Ідентифікація сигнальних шляхів загибелі злякисних клітин з мутаціями p53-R175H та p53-R273H за дії новітніх тіосемікарбазонів із застосуванням сучасних методів клітинної біології <i>in vitro</i>	01 січня 2025 р. - 31 грудня 2025 р.	д.б.н., с.н.с., Р.Р. Панчук; Н.Я. Гоцуляк; М.В. Кліщ; Є.О. Кустовський.

9. Зміст, основні вимоги до виконання роботи, рівня і способів її виконання

Основним недоліком сучасної таргетної терапії раку є надзвичайно висока ціна новітніх високотехнологічних лікарських засобів (інгібітори протеїнази та моноклональні антитіла) і швидкий розвиток набутої стійкості пухлин до них. У даному проекті нами запропоновано альтернативний підхід для вирішення цієї проблеми, що ґрунтується на використанні деяких тіосемікарбазонів – «м'яких» реактиваторів мутантних форм білка p53, який часто надекспресований у злякисних клітинах. Ключовим завданням даного проекту є перевірка, чи новітні аналоги відомого реактиватора p53 – COTI-2 – володіють вищою афінністю до деяких мутантних форм p53 (R175H, R273H), та які саме p53-залежні та p53-незалежні шляхи загибелі клітин індукуються ними у злякисних клітинах з різним статусом TP53, що були згенеровані авторами проекту шляхом трансфекції лентівірусними векторами під час стажування у Медичному університеті Відня.

У роботі буде використано сучасні клітинно-біологічні та біохімічні методи – Вестерн-блот аналіз, проточна цитофлуориметрія, флуоресцентна мікроскопія, застосування специфічних інгібіторів каспаз та сигнальних шляхів ER стресу, mTOR та ін.

10. Наукові (науково-технічні) результати, що очікуються за основними етапами та роботою в цілому

У ході виконання роботи буде ідентифіковано молекулярні механізми, що визначають здатність новітніх тіосемікарбазонів COTI-NMe2 та KP1550 знищувати злякисні клітини з hotspot мутаціями гену TP53 у наномолярних концентраціях. Буде досліджено *in silico*, наскільки ефективно ці сполуки відновлюють конформацію мутантного білка p53 у порівнянні з відомим реактиватором p53 – COTI-2, та верифіковано отримані результати на панелі ізогенних ліній злякисних клітин з різним статусом TP53. Методом Вестерн-блот аналізу буде досліджено сигнальні шляхи, задіяні у індукції клітинної загибелі цими сполуками, та зроблено висновки, який шлях клітинної загибелі – p53-опосередкований, ER-стрес, автофагія, інгібування mTOR – превалює у тіосемікарбазон-індукованій смерті злякисних клітин з інтактним TP53, нокаутом по ньому та hotspot мутаціями p53-R175H та p53-R273H. За результатами роботи планується опублікувати статтю у престижному науковому виданні з імпаکت-фактором не менше 5, та підготувати спільну проектну заявку з австрійськими партнерами по програмі FWF (<https://www.fwf.ac.at/en/research-funding/fwf-programmes/international-programmes/developing-countries-projects>) для проведення доклінічних досліджень тіосемікарбазонів на моделях ксенотрансплантатів пухлин з мутаціями TP53 у безтимусних мишей.

11. Перелік науково-технічної та іншої документації, що надається по завершенню роботи

- звіт про виконання наукової роботи, оформленого відповідно до ДСТУ 3008-95 «Документація.

Звіти у сфері науки і техніки. Структура і правила оформлення» зі списком публікацій за результатами

виконання роботи у звітному році;

- публікації у міжнародних реферованих журналах по темі проекту

- кошторис фактичних витрат із розрахунками за статтями.

Науковий керівник роботи

Старший науковий співробітник
Інституту біології клітини НАН України
д.б.н., с.н.с.



Ростислав ПАНЧУК

(підпис)

Планова калькуляція кошторисної вартості наукової (науково-технічної) роботи

**«Функціональна реактивація білка р53 новітніми тіосемікарбазонами для
вибіркової елімінації злоякісних клітин з мутаціями TP53»
на 2024 рік**

Термін виконання роботи: початок — 01.01.2024 р., закінчення — 31.12.2025 р.

№ з/п	Найменування статей витрат	КЕКВ	Сума, тис. грн.
1	Заробітна плата	2111	340,000
2	Нарахування на оплату праці	2120	74,800
3	Предмети, матеріали, обладнання та інвентар	2210	151,200
4	Оплата електроенергії	2273	34,000
5	Придбання обладнання і предметів довгострокового користування	3110	400,000
Разом:			1000,000
в т.ч. накладні витрати			34,000
% їх до основної заробітної плати			10,0%

УСТАНОВА-ВИКОНАВЕЦЬ:

Директор

Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України

25255735

Андрій СИБІРНИЙ

(підпис)

М.П.

Науковий керівник роботи

Старший науковий співробітник

Інституту біології клітини НАН України

д.б.н., с.н.с.

Ростислав ПАНЧУК

(підпис)