

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор Державної установи
«Інститут харчової біотехнології та геноміки
НАН України»

академік НАН України

Ярослав БЛЮМ

(Власне ім'я та ПРІЗВИЩЕ)

України (підпис)



АНОТОВАНИЙ ЗВІТ

про виконану роботу у 2021 році в рамках реалізації проєкту із виконання наукових досліджень і розробок

«Ензими посттрансляційних модифікацій білків мікротрубочок, в якості мішеней для інгібування збудливості первинних ноціцептивних нейронів периферійної нервової системи»
(назва Проєкту)

Назва конкурсу: «Підтримка досліджень провідних та молодих вчених»

Реєстраційний номер Проєкту: 2020.02/0263

Підстава для реалізації Проєкту з виконання наукових досліджень і розробок (реєстраційний номер та назва Проєкту) реєстраційний номер №2020.02/0263, «Ензими посттрансляційних модифікацій білків мікротрубочок, в якості мішеней для інгібування збудливості первинних ноціцептивних нейронів периферійної нервової системи»

Рішення наукової ради Національного фонду досліджень України щодо визначення переможця конкурсу «Наука для безпеки людини та суспільства» протокол від «16-17» вересня 2020 року № 21.

1. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПРОЄКТ

Загальна тривалість виконання проєкту 2020 рік – 2022 рік

Тривалість виконання Проєкту у 2021 році

Початок – 17 травня 2021 р.

(дата укладання Договору про виконання наукового дослідження і розробки)

Закінчення – 15 грудня 2021 р.

Загальна вартість Проєкту, грн. 801100,00 грн

Вартість Проєкту по роках, грн.:

1-й рік 1300000,00 грн.

2-й рік 3511000,00 грн.

3-й рік 3200000,00 грн.

2. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКОНАВЦІВ ПРОЄКТУ

до виконання Проєкту залучено 10 виконавців, з них:

доктори наук 2;

кандидати наук 5;

інші працівники 3.

З них субвиконавці:

доктори наук 1;
кандидати наук 1;
інші працівники 3.

3. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ГРАНТООТРИМУВАЧА ТА ОРГАНІЗАЦІЮ(Ї) СУБВИКОНАВЦЯ(ІВ) ПРОЄКТУ

Виконавець:

Державна Установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України»

Організаційно-правова форма підприємства/установи/організації - Державна організація (установа, заклад, підприємство)

Підпорядкованість підприємства/установи/організації - Національна академія наук України

Код ЄДРПОУ 02128514

Код(и) КВЕД 72.11; 72.19

Стратегічні напрями наукової діяльності

- 1) Вивчення молекулярно-біологічних і клітинно-біологічних механізмів життєдіяльності рослинних клітин на основі розвитку структурної та функціональної геноміки і біоінформатики рослин, структурної біології та молекулярної генетики;
- 2) Розробка нових молекулярних біотехнологій та нанобіотехнологій рослин і прокаріотичних систем; розробка наукових засад ресурсозаощаджувальних технологій переробки сільськогосподарської сировини, одержання нових видів харчових продуктів та отримання біопалива з біомаси;
- 3) Розробка наукових засад ресурсозаощаджувальних технологій переробки сільськогосподарської сировини, одержання нових видів харчових продуктів та отримання біопалива з біомаси;
- 4) Розробка біотехнологій виробництва продуктів харчування, їх складових та біологічно активних компонентів, молекулярногенетичних і біохімічних методів фітосанітарного, медико-біологічного контролю продовольчої сировини, харчових добавок, продуктів і кормів та наукових засад біобезпеки.

ПІБ керівника підприємства/установи/організації - Блюм Ярослав Борисович

Юридична адреса підприємства/установи/організації

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А

Поштова адреса

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А

Фактична адреса

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А

Телефон +380444630532

Адреса електронної пошти office.ifbg@nas.gov.ua

Посилання на веб сторінку підприємства/установи/організації <http://ifbg.org.ua/uk>

Субвиконавець:

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця

Організаційно-правова форма підприємства/установи/організації - Державна організація (установа, заклад, підприємство)

Підпорядкованість підприємства/установи/організації - Національна академія наук України

код ЄДРПОУ 05417093

Коди КВЕД 85.42, 72.11, 72.19
Національна академія наук України.

Стратегічні напрями наукової діяльності

Проведення фундаментальних та прикладних наукових досліджень в галузі природничих наук, вивчення наукових проблем молекулярної фізіології, нейрофізіології, вісцеральних систем тощо з метою одержання наукових знань та їх використання для практичних цілей.

ПІБ керівника підприємства/установи/організації - Кришталь Олег Олександрович

Юридична адреса підприємства/установи/організації

Україна, 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4

Поштова адреса

Україна, 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4

Фактична адреса

Україна, 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4

Телефон +380442562400

Адреса електронної пошти secretar@biph.kiev.ua

Посилання на веб сторінку підприємства/установи/організації <http://biph.kiev.ua>

4. ОПИС ПРОЄКТУ

Мікротрубочки це основна полімерна структура цитоскелету, функціональними мономерами яких є гетеродимери α - та β -тубуліну. Ці динамічні структури вкрай важливі для таких процесів як поділ клітини, везикулярний транспорт, забезпечення сталої форми клітини. Стабільність мікротрубочок, а отже функціональність цієї структури, залежить від ряду факторів, один з яких наявність посттрансляційних модифікацій. Так тубуліни є мішенню для ряду посттрансляційних модифікацій (ПТМ), що представляють собою приєднання хімічних груп, які впливають на поверхневий заряд та форму білка. Як показано, цей процес відбувається, переважно, в полімеризованому стані мікротрубочки. Серед найбільш відомих ПТМ є ацетилювання лізину α -тубулінів на внутрішній поверхні мікротрубочки, детирозинація/тирозинація С-кінця та поліглюамілювання як α -, так і β -тубулінів. Ці модифікації впливають на взаємодію між мікротрубочками та молекулярними двигунами (динейн та кінезин), і здатні ефективно регулювати активність іонних каналів, які також задіяні в процесах ноцицепції. Так, серед трансфераз, що здатні опосередковано впливати на роботу ноцицептивних іонних каналів слід виділити чотири основних типи, які діють на тубулін. Наступним є антагоніст процес ацетилювання - HDAC6 з класу гістонових деацетилаз ІІВ підкласу, що експресується на багатьох рівнях ноцицептивного шляху. Щонайменше чотири залишки лізину (K40, K60, K370 α -тубуліну та K58 β -тубуліну) на внутрішній стороні мікротрубочок вважаються мішенями HDAC6. Першим і одним із найбільш загадковим можна вважати α TAT1 (α -тубулін ацетил трансфераза), що виконує функцію перенесення ацетильної групи на залишок лізину 40 (K40) внутрішньої сторони мікротрубочок. Цей фермент знаходиться в периферійних сенсорних нейронах миші, які демонструють найвищий рівень ацетилювання α -тубуліну. В свою чергу, дисфункція α TAT1 призводить до значної втрати механічної чутливості. ELP3 (субодиниця 3 елонгаторного ацетилтрансферазного комплексу) - каталітична субодиниця ацетилтрансферази тРНК комплексу подовжувача РНК-полімерази II, що залучена у процеси численних модифікацій і може працювати як ацетилтрансфераза шляхом ацетилювання залишків лізину цільових білків. Ацетилювання α -тубуліну за участі ELP3 є чи не основним механізмом нейрогенезу шляхом регуляції міграції та розгалуження проєкційних нейронів у корі головного мозку. Останнім із цільових ензимів актуального проєкту є тубулінова поліглютамілаза (TTLL1), що пов'язана із процесами формування транспортної мережі нейронів та нейродегенерації. Асоціація мікротрубочок із іонними каналами, що відповідають за чутливість до подразників різного генезу, була продемонстрована для ряду представників родини TRPV, а саме TRPV1 та TRPV4. Так, після активації TRPV1 периферичні мікротрубочки швидко деполімеризуються, що призводить до вкорочення конуса росту нейрона. Також показано, що

деполімеризація мікротрубочок впливає на локалізацію серцевих іонних каналів. З іншого боку, цікавим є вплив процесів полімеризації/деполімеризації мікротрубочок (шляхом регуляції ПТМ) на активність таких іонних каналів первинних ноцицепторів як P2X рецептори та ASIC канали. Таким чином, актуальний проєкт уособлює комплексне дослідження ролі цитоскелету та його трансформації у формуванні больового сигналу на сенсорних терміналях первинних ноцицептивних аферентів. Поєднання алгоритмів комп'ютерного моделювання для передбачення фізіологічних процесів і наступна детекція зміни сигналу у відповідь на дію інгібіторів ПТМ ензимів є новою та дуже перспективною комбінацією як з фундаментальної, так і з прикладної сторони. Спираючись на дані щодо специфічності посттрансляційних модифікацій молекул тубулінів в залежності від типу клітин, можна опосередковано впливати на проникність мембрани шляхом регуляції процесів трансформації цитоскелету.

4.1. Мета Проєкту (до 200 знаків) Визначенні ролі ензимів, що беруть участь в модуляції іонних каналів збудливих клітин ПНС та пошуку фармакологічних засобів впливу на них з метою інноваційної корекції порушень при хронічних больових станах різної етіології.

4.2. Основні завдання Проєкту (до 400 знаків)

- 1) Визначити молекулярні регулятори ноцицептивних каскадів.
- 2) Реконструювати системи іонних каналів
- 3) Встановити роль ПТМ мікротрубочок в залежності від типу клітин.
- 4) Виконати пошук інгібіторів цільових ензимів.
- 5) Визначити опосередковану дію речовин на мішені.
- 6) Встановити механізми роботи цільового каскаду.
- 7) Дослідити на тваринних моделях болу дію відібраних інгібіторів ензимів.
- 8) Створити бібліотеки потенційних знеболювальних агентів.

4.3. Детальний зміст Проєкту:

- Сучасний стан проблеми (до 400 знаків) Сучасні дослідження переконливо вказують на те, що вкрай перспективною мішенню у терапії болу та нейродегенерації є мікротрубочки (МТ) цитоскелету, що здатні ефективно регулювати активність іонних каналів, задіяних у процесах ноцицепції. Функціональна регуляція мономерів МТ відбувається за рахунок посттрансляційних модифікацій (ПТМ). Методика детекції активності іонних каналів може стати маркером ПТМ мікротрубочок інструментом впливу на їх роботу.

- Новизна Проєкту (до 400 знаків) Пропонується вперше провести мультидисциплінарне дослідження ролі цитоскелету та його трансформації у формуванні больового сигналу на сенсорних терміналях первинних ноцицептивних аферентів. Поєднання комп'ютерного моделювання біологічних процесів (активація каналу та симуляція потоку заряджених іонів, ліганд-білковий докінг) та фізіологічних методів детекції сигналу у відповідь на модифікації тубулінів мають фундаментальне і практичне значення.

- Методологія дослідження (до 400 знаків) Для дослідження регуляторів посттрансляційних модифікацій (α TAT1, HDAC6, ELP3 та TTL1) будуть залучені методи молекулярної механіки та докінгу і інструменти аналізу пакетів Gromacs та Dock. Тестування антиноцицептивної дії сполук-лідерів буде проводитись на експериментальних тваринних моделях (шкіра-нерв *ex vivo*): сигнал хомогенного соматичного, вісцерального болу з ізольованого нервового закінчення і моделі механічної гіперальгезії та запалення.

5. ОТРИМАНІ НАУКОВІ АБО НАУКОВО-ТЕХНІЧНІ РЕЗУЛЬТАТИ (до 2 сторінок) в поточному році/ в рамках реалізації Проєкту, зокрема:

5.1. Опис наукових або науково-технічних результатів, отриманих в рамках виконання Проекту (із зазначенням їх якісних та кількісних (технічних) характеристик)

Використовуючи *in silico* протокол, розроблений на попередньому етапі, було змодельовано структури іонних каналів Nav1.7, TRPV1, TRPV4 та P2X у активному стані. Після релаксації моделей було проведено дослідження активних сайтів, спираючись на літературні данні та симуляції взаємодій мішеней із референтними сполуками. Отримані в результаті молекулярного докінгу комплекси були вивчені та описані. Після цього було проведено високопропускний скринінг лігандів з доступних баз даних із параметрами обмежень, сформованих на основі досліджених взаємодій референтних сполук із кожною мішенню. Окремо було виконано хемоінформатичний аналіз як референсних, так і потенційно активних сполук з метою порівняння фізико-хімічних характеристик і передбачення їх поведінки в умовах *in vitro*. Спираючись на конформації референсних сполук в активних сайтах структури каналу були розроблені 3D-фармакофорні моделі для використання в подальших дослідженнях та під час пошуку в online базах даних (Zinc, emolecules і т.д.). Для подальших досліджень методом білок-білкового докінгу було виконано оцінку якості програмного забезпечення та обрано оптимальний протокол для білок-білкового докінгу елементів мікротрубочки та одного з досліджуваних іонних каналів. Методами молекулярної динаміки було представлено моделі взаємодії іонного каналу та мікротрубочки, та елементів мікротрубочок із поверхнею мембрани.

Отримані фармакофорні моделі були валідовані за допомогою золотого стандарту у дослідженні фармакології іонних провідностей мембран клітин – методу «петч-клемп». З використанням сучасних електрофізіологічних методик були досліджені активності відібраних сполук по відношенню до Nav1.7 та TRPV рецепторів. Таким чином, були досліджені характеристики модуляторного впливу відібраних сполук та описані можливі молекулярні механізми цього впливу. На завершальному етапі найбільш активні сполуки були протестовані на класичній моделі шкіра-нерв *ex vivo*, що дозволяє вимірювати ноцицептивний сигнал з одиночного ізольованого сенсорного нервового закінчення. Використання цієї унікальної методики дозволяє кількісно оцінювати больовий сигнал первинних ноцицепторів.

Результати досліджень викладені у 1 публікації в фаховому журналі.

5.2. За наявності науково-технічної продукції обґрунтування її переваг у порівнянні з існуючими аналогами

Дослідження мають насамперед фундаментальний характер. Проте, в результаті успішного виконання етапу відібрано серію нових селективних сполук, що структурно відрізняються від стандартних місцевих знеболювальних. При цьому, комп'ютерні розрахунки та передбачені значення афінності були перевірені шляхом фіксації електричного сигналу та модуляції проникності мембрани нейрональних клітин. Були створені комп'ютерні моделі для дослідження і перевірки нових хітів актуальних маркерів епігенетичної регуляції, особливо цікавим є їх використання в якості нових опорних сполук під час скринінгу. Використовуючи експериментальні дані та їх екстраполяцію на отримані тривимірні фармакофорні моделі були представлені та описані найбільш критичні групи-замісники в досліджуваних хімічних сполуках для можливості дизайну нових молекул-кандидатів із знеболювальним ефектом.

5.3. Практична цінність отриманих результатів реалізації Проекту для економіки та суспільства (стосується проєктів, що передбачають проведення прикладних наукових досліджень і науково-технічних розробок)

В результаті виконання етапу проєкту були описані та продемонстровані механізми ініціації больового сигналу на первинних аферентних сенсорних нейронів та запропоновано ряд сполук із передбаченою активністю проти двох груп білків, що беруть участь у цьому процесі. Одним із ключових результатів проєкту є створення бібліотеки модуляторів, що були досліджені *in silico*. Сполуки-лідери з передбаченою активністю проти обох груп, із різним рівнем селективності, були послідовно перевірені експериментально на тваринних моделях болю разом із препаратом шкіра-нерв

Проектом було передбачено проведення фундаментальних досліджень спрямованих на визначення молекулярних детермінант взаємодії цитоскелету та іонних каналів, що задіяні у процесах ноцицепції. Проте, отримані результати мають суттєве значення для впровадження у освітньо-науковій програмі третього рівня освіти з напрямків біологія, медицина та медична фізика.

5.4. Опис шляхів та способів подальшого використання результатів виконання Проекту в суспільній практиці.

Основною перевагою очікуваних результатів є ідентифікація нових селективних інгібіторів, ефективних проти ряду ензимів, залучених у ПТМ мікротрубочок. Спираючись на дослідження референтних речовин було визначено набір та просторову орієнтацію необхідних функціональних груп, що забезпечують зв'язування із мішенями іонних каналів різних класів. На даний момент розроблено корисні фармакофорні моделі для пошуку потенційних ефекторів функціонування каналів, що беруть участь в передачі больового сигналу, та для використання елементів розроблених методологій в подальших роботах. Вже було опосередковано перевірено їх якість при оцінці дії вибраних сполук *in vitro*. Наразі сформовано та буде представлено ряд бібліотек із новими хімічними сполуками, для безпосереднього інгібування іонних каналів, та будуть сформовані групи речовин із передбачено активністю проти цільових ензимів.

Використання методики шкіра-нерв дозволяє максимально адекватно вимірювати больовий сигнал первинних ноцицепторів в умовах максимально наближених до умов *in vivo* та визначити специфічність дії нових сполук. З наявною у нас інформацією дослідження ПТМ на функції каналів з каскаду передачі больових сигналів на даній моделі досліджується вперше в світі.

Примітка: Анотований звіт не повинен містити відомостей, заборонених до відкритого опублікування

Науковий керівник Проекту

Завідувач лабораторії біоінформатики та
структурної біології ДУ ІХБГ НАНУ,
старш. наук. спів., д.б.н.
(посада)

Павло КАРПОВ

(Власне ім'я та ПРІЗВИЩЕ)


(підпис)