

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИКИ

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИКИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

БДЖОЛА АННА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 577.21:577.22

ДИСЕРТАЦІЯ

**КОАЛЮВАННЯ КІНАЗИ РИБОСОМНОГО БІЛКА S6 ТА ЙОГО
РЕГУЛЯТОРНА РОЛЬ**

09 Біологія

091 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело_____ А. В. Бджола

Науковий керівник – Маланчук Оксана Миколаївна, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології та генетики НАН України

Київ – 2024

АНОТАЦІЯ

Бджола А.В. **КоАлювання кінрази рибосомного білка S6 та його регуляторна роль** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія. – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2024.

Дисертація присвячена дослідженню нового типу посттрансляційної модифікації кінрази рибосомного білка S6 (S6K1) – КоАлюванню та його впливу на функціональну активність цієї кінрази. S6K1 є одним із ключових компонентів mTOR/Akt1/S6K-залежного сигнального шляху, що регулює клітинний ріст, проліферацію, метаболізм та диференціацію. Порушення в регуляції цього шляху часто асоціюються з розвитком онкологічних, серцево-судинних та метаболічних захворювань, тому вивчення механізмів контролю активності p70S6K1 має значний науковий і прикладний інтерес. Окрім найбільш вивченого фосфорилування, p70S6K1 зазнає ряду інших посттрансляційних модифікацій, зокрема КоАлювання, яке може впливати на її функціональність і стабільність. Це і стало основним предметом дослідження.

У ході дослідження було охарактеризовано моноклональні антитіла проти Коензиму А (КоА), отримані за допомогою альтернативного підходу до створення антигену. Антитіла продемонстрували високу специфічність до КоАльованих білків і можуть надалі слугувати потужним інструментом для детекції цих модифікацій в низці імунологічних методів, таких як рідинна хроматографія/мас-спектрометрія, імуоферментний та вестерн-блот аналізи, імуоцито- та імуногістохімія.

За допомогою РХ-МС аналізу серед загального пулу КоАльованих білків з лізатів клітинної лінії HEK293/Pank1 β , оброблених діамідом, було виявлено

пептидну послідовність LTDFGLC*K, що належить родині S6K. Ідентифікація сайтів КоАлювання показала, що єдиним модифікованим амінокислотним залишком S6K1 є цистеїн у положенні 217. Цей цистеїн є одним із шести, що містяться в S6K1, і розташований в активаційній петлі поруч із трипептидним мотивом DFG кіназного домену, який відіграє ключову роль у регуляції активності кінази. Дослідження *in cellular* КоАлювання імунопреципітованої надекспресованої p70S6K1 з лізатів клітин HEK293/Pank1 β , оброблених діамідом, підтвердило, що оксидативний стрес значно підвищує рівень КоАлювання кінази порівняно з клітинами, які культивували в нормальних умовах. Окрім того, було проведено експерименти для визначення рівня КоАлювання ендогенної p70S6K1 під впливом різних стресових чинників. Використовуючи методи імунофлюоресцентного аналізу та PLA, було продемонстровано, що КоАлювання ендогенного білка p70S6K1 відбувається у відповідь на метаболічний стрес різного походження, а також на оксидативний стрес, індукований різноманітними окиснювальними агентами. Це дає підстави вважати, що КоАлювання виконує протекторну роль, захищаючи S6K1 від надмірного окислення і подальшої інактивації чи деградації за умов підвищення рівня активних форм кисню (АФК) у середовищі.

Існування додаткового консервативного цистеїну Cys231 в каталітичному центрі S6K1 в положенні «T+2» передбачає можливість утворення внутрішньомолекулярного дисульфідного зв'язку між ним та Cys217, що може перешкоджати приєднанню молекули КоА до сайту зв'язування за цистеїном 217. Для з'ясування цього питання було використано метод сайт-спрямованого мутагенезу і досліджено зміни рівня КоАлювання S6K1 в залежності від мутації одного з перерахованих цистеїнів у активаційній петлі. Отже, за результатами експериментів з експресії мутантних форм S6K1 в клітинах HEK293/Pank1 β , що містили відповідно C217A та C231A заміни, в умовах *in cellular* було продемонстровано, що відсутність сайту КоАлювання Cys217 знижує рівень КоАлювання кінази на 30% порівняно з немутованою p70S6K1. Водночас, мутація

цистеїну в позиції 231 сприяє підвищенню рівня КоАлювання p70S6K1 на 40%, ймовірно, за рахунок звільнення тіольної групи Cys217 для молекули КоА, у випадку існування інтрамолекулярного дисульфідного зв'язку між Cys217 та Cys231. Отримані результати підтверджують КоАлювання цистеїну 217 S6K1 і вказують на можливу регуляторну роль Cys231 в цьому процесі.

Для подальших досліджень впливу КоАлювання на функціональну активність p70S6K1, із використанням Vac-to-Vac бакуловірусної системи експресії було отримано та охарактеризовано рекомбінантну форму конститутивно активної p70S6K1. Новаторство цього підходу полягало у використанні «дуального» вектору, що дозволяє інфікованій клітині експресувати цільовий білок p70S6K1 в активній формі за рахунок ко-експресії PDK1 кінази, яка є її ключовим активатором і забезпечує фосфорилювання за критичним Thr229 сайтом. Конститутивна активність отриманого рекомбінантного продукту також є результатом видалення С-термінального домену p70S6K1, що містить аутоінгібіторну ділянку, та запровадженню мутації T389D, що мімікрує mTOR-залежне фосфорилювання за сайтом Thr389. Отримана форма p70S6K1 (6His-p70S6K1(Δ AID)-T389D, скорочено His-actS6K1) була використана для дослідження особливостей КоАлювання в умовах *in vitro*. Було виявлено, що ступінь КоАлювання рекомбінантного білка є дозо- та часозалежним, тобто інтенсивність КоАлювання зростала зі збільшенням кількості вільного КоА у реакційній суміші та збільшенням тривалості інкубації. Ці результати підтверджують дані літератури про те, що процес КоАлювання є найбільш ефективним в клітинах кардіоміоцитів та гепатоцитів, які містять найвищий рівень КоА та його похідних серед усіх тканин ссавців.

Оскільки відомо, що посттрансляційні модифікації S6K1, перш за все фосфорилювання, є ключовими в регуляції активності кінази, було досліджено можливість впливу процесу КоАлювання на активність кінази S6K1 (His-actS6K1) в умовах *in vitro*. Аналізуючи рівень фосфорилювання рибосомного білка S6, що використовувався як субстрат в *in vitro* кіназній реакції, було продемонстровано,

що КоАльована форма His-actS6K1 є на 40% менш активною порівняно з немодифікованим ензимом.

Для розуміння механізму зв'язування КоА з p70S6K1 у процесі КоАлювання, та детальнішого вивчення інгібуючого впливу КоА на активність кінази, були застосовані біоінформатичні методи, серед яких молекулярний докінг і молекулярна динаміка. Результати молекулярного докінгу підтверджують можливість формування дисульфідного ковалентного зв'язку між тільними групами пантетеїнового хвосту КоА та Cys217 в активаційній петлі p70S6K1. Проте, окрім цього, спостерігається утворення водневого зв'язку між NH_2 -групою аденозинового кільця КоА та залишком глютамінової кислоти основного ланцюга S6K1. Стабілізація АДФ залишку КоА відбувається також унаслідок численних гідрофобних та йонних взаємодій всередині АТФ-зв'язуючої кишені. Такий спосіб приєднання КоА до ензиму нагадує механізм «подвійного якоря», що є основою інгібуючого впливу КоАлювання на активність Аврори кінази А. Внаслідок утворення такого комплексу відбувається конкуренція між молекулою КоА та АТФ за активний центр ферменту, що призводить до зниження ензиматичної активності кінази.

Методом симуляції молекулярної-динаміки було встановлено, що комплекс КоА з активованою формою кінази (фосфорильованої за сайтами Thr229 та Thr389) більш стабільний у порівнянні з комплексом з нефосфорильованою формою ферменту. Отримані дані свідчать про те, що фосфорилування є критично важливим для стабілізації взаємодії між p70S6K1 і КоА, що підкреслює значення КоАлювання у регуляції активованої форми кінази.

Результати, отримані внаслідок проведеної роботи, свідчать, що КоАлювання S6K1 перш за все є важливим механізмом захисту білка від надмірного окислення, адже інтенсивність цієї модифікації критично зростає при індукції стресу, викликаного окислювальними агентами різного механізму дії, такими як перекис водню, арсеніт, діамід тощо. Відносний рівень КоАлювання S6K1 спостерігається

за умов метаболічного стресу, адже він є також причиною утворення надлишку АФК. Окрім того, КоАлювання S6K1 за Cys217 має потенціал до регуляції активності S6K1, а саме до її інгібування. Ймовірно такий механізм регуляції пов'язаний з типом взаємодії молекули КоА з S6K1 під час процесу КоАлювання, адже, окрім утворення дисульфідного зв'язку між тільними групами пантетеїнового хвоста КоА та цистеїну кінази, КоА також стабілізує свій АДФ фрагмент в каталітичному центрі, перешкоджаючи зв'язуванню молекули АТФ та подальшій функціональній активності ферменту. Ці результати закладають основу для дослідження ролі КоА та КоАлювання у регуляції інших білків та відкривають нові можливості для розробки ефективних терапевтичних стратегій корекції патологій, що виникають внаслідок надмірної активності S6K1.

Ключові слова: p70S6K1, внутрішньоклітинна локалізація, клітинний сигналінг, КоАлювання білків, культура клітин, мутації, окислювальний метаболізм, окислювальний стрес, пероксид водню, посттрансляційні модифікації, просторова організація білків, рак молочної залози, реактивні форми кисню, токсичність, функціональний стан клітин.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у Scopus

1. **A. V. Bdzhola**, V. V. Filonenko, I. T. Gout, and O. M. Malanchuk, ‘The use of the in situ proximity ligation assay for validating S6 kinase 1 CoAlation under oxidative stress.’, Biopolym. Cell, vol. 39, no. 4, pp. 277–282, Dec. 2023, doi: 10.7124/bc.000AA5. Q4, Impact Factor 0,5

Особистий внесок здобувача: культуральна робота з клітинами, візуалізація результатів методом конфокальної мікроскопії, статистична обробка результатів, написання манускрипту.

2. O. M. Malanchuk, **A. V. Bdzhola**, I. O. Tykhonkova, I. T. Gout, and V. V. Filonenko, ‘Monoclonal antibodies to Coenzyme A’, Biopolym. Cell, vol. 38, no. 4, pp. 215–223, Dec. 2022, doi: 10.7124/bc.000A7F. Q4, Impact Factor 0,5

Особистий внесок здобувача: культуральна робота з клітинами, тестування антитіл у вестерн-блот аналізі, тестування антитіл в імунофлуоресцентному аналізі, статистична обробка результатів.

3. O. Malanchuk*, **A. Bdzhola*** et al., ‘Investigating the Regulation of Ribosomal Protein S6 Kinase 1 by CoAlation’, IJMS, vol. 25, no. 16, p. 8747, Aug. 2024, doi: 10.3390/ijms25168747. Q1, Impact Factor 6,7

*Особистий внесок здобувача: проведення усіх дослідів in cellular та in vitro, статистична обробка результатів, написання манускрипту. *-рівний внесок авторів.*

Публікації у матеріалах доповідей наукових конференцій

1. **Bdzhola A**, Filonenko V, Malanchuk O ‘Purification and characterization of highly specific anti-CoA antibodies’ XIV IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists. - Kyiv. – 2020. – p.22

2. **Bdzhola A**, Malanchuk O ‘Analysis of protein coalation in the set of the MCF7 cell lines with selective expression of S6K1 isoforms under oxidative stress conditions’. XI annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine. Biopolymers and Cell. – 2021. – Vol. 37. N 3 (p.49)
3. **Bdzhola A**, Filonenko V, Malanchuk O ‘Generation and characterization of novel antibodies specific to Coenzyme A’. Materials of the XVII International conference of young scientists, Kyiv, IMBG. – 2023 – p.65.
4. **Bdzhola A**, Filonenko V, Malanchuk O ‘S6K1 CoAlation as cellular response to oxidative stress’. Materials of the XVIII All Ukrainian conference of young scientists, Kyiv, IMBG. – 2024. – p.8.

SUMMARY

Bdzhola A.V. CoAlation of Ribosomal Protein S6 Kinase 1 and its regulation by this modification. – The manuscript.

A dissertation submitted in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy (091 Biology). – Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2024.

The thesis investigates a novel post-translational modification of ribosomal protein kinase S6 (S6K1) known as CoAlation, which occurs under metabolic and oxidative stress, and explores its impact on the kinase's functional activity. S6K1 is a crucial component of the mTOR/Akt1/S6K-dependent signaling pathway, which regulates cell growth, proliferation, metabolism, and differentiation. Dysregulation of this pathway is frequently associated with cancer, cardiovascular diseases, and metabolic disorders, highlighting the importance of understanding the mechanisms controlling p70S6K1 activity from both scientific and practical perspectives.

Beyond the well-studied phosphorylation, p70S6K1 also undergoes other post-translational modifications, including CoAlation, which can affect the kinase's functionality and stability. This study focused on these modifications.

Monoclonal antibodies against Coenzyme A (CoA) were characterized using an innovative approach to antigen creation. These antibodies exhibited high specificity for CoAlated proteins and have the potential to serve as powerful tools for detecting these modifications through various immunological techniques, such as liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Western blotting, immunocytochemistry, and immunohistochemistry.

LC-MS analysis identified a peptide sequence, LTDFGLC*K, from the total pool of CoAlated proteins in HEK293/Pank1 β cell lysates treated with diamide. This peptide belongs to the S6K family. The identification of CoAlation sites revealed that the only

modified amino acid residue in S6K1 was cysteine at position 217. This cysteine, one of six in S6K1, is situated in the activation loop near the DFG tripeptide motif of the kinase domain, which is critical for regulating kinase activity.

In cellular studies, CoAlation of immunoprecipitated overexpressed p70S6K1 from HEK293/Pank1 β cell lysates treated with diamide was shown to be significantly increased under oxidative stress compared to cells cultured under normal conditions. Further experiments determined the CoAlation level of endogenous p70S6K1 under various stress factors. Using immunofluorescence and proximity ligation assay (PLA) methods, it was demonstrated that CoAlation of endogenous p70S6K1 occurs in response to metabolic and oxidative stress induced by different agents. These findings suggest that CoAlation functions as a protective mechanism, shielding S6K1 from excessive oxidation and subsequent inactivation or degradation in environments with elevated reactive oxygen species (ROS).

The presence of an additional conserved cysteine, Cys231, at the "T+2" position within the catalytic center of S6K1, suggests the potential for forming an intramolecular disulfide bond between Cys231 and Cys217. This bond could potentially obstruct CoA binding to Cys217. To explore this, site-directed mutagenesis was utilized to analyze changes in S6K1 CoAlation levels based on mutations in the activation loop cysteines. Mutant forms of S6K1 were expressed in HEK293/Pank1 β cells, followed by immunoprecipitation and western blot analysis. The results showed that the absence of the Cys217 CoAlation site reduced CoAlation by 30% compared to the wild-type p70S6K1. In contrast, mutating Cys231 increased p70S6K1 CoAlation by 40%, likely due to the availability of the Cys217 thiol group for CoA binding. These findings confirm the CoAlation of Cys217 in S6K1 and suggest a regulatory role for Cys231 in this process.

To further explore the impact of CoAlation on the functional activity of p70S6K1, a recombinant form of constitutively active p70S6K1 was generated and characterized using the Bac-to-Bac baculovirus expression system. The novelty of this approach lies in the use of a "dual" vector, enabling the infected cells to co-express PDK1 kinase, a crucial

upstream activator of p70S6K1, which facilitates phosphorylation at the critical Thr229 site. The constitutively active state of the kinase was achieved by removing the C-terminal domain of p70S6K1, which houses an autoinhibitory region, and introducing a T389D mutation that mimics mTOR-dependent phosphorylation at Thr389. The resulting form of p70S6K1 (6His-p70S6K1(Δ AID)-T389D, later termed His-actS6K1) was used to investigate CoAlation *in vitro*. The findings revealed that CoAlation of the recombinant protein is both dose- and time-dependent, with the modification increasing proportionally to the amount of free CoA in the reaction mixture and the incubation time. These results corroborate literature data indicating that CoAlation is most prominent in cardiomyocytes and hepatocytes, which have the highest levels of CoA and its derivatives among mammalian tissues.

Since post-translational modifications of S6K1, particularly phosphorylation, are essential for regulating kinase activity, the effect of CoAlation on S6K1 activity was examined *in vitro*. The phosphorylation level of ribosomal protein S6, used as a substrate in the *in vitro* kinase assay, revealed that the CoAlated form of His-actS6K1 exhibits 40% reduced activity compared to the unmodified enzyme.

To elucidate the mechanism of CoA binding to p70S6K1 during CoAlation and to further explore CoA's inhibitory effect on kinase activity, bioinformatics techniques, including molecular docking and molecular dynamics, were employed. The molecular docking results confirm that a disulfide covalent bond can form between the thiol groups of the CoA pantetheine tail and Cys217 in the activation loop of p70S6K1. Additionally, a hydrogen bond is observed between the NH₂ group of the CoA adenine ring and a glutamic acid residue in the S6K1 backbone. The stabilization of the CoA ADP-moiety is also supported by multiple hydrophobic and ionic interactions within the ATP-binding pocket. This mode of CoA binding to the enzyme mirrors the "dual anchor" mechanism, which is the basis for the inhibitory effect of CoAlation on Aurora kinase A. The formation of this complex results in competition between CoA and ATP for the enzyme's active site, leading to a reduction in kinase activity.

Molecular dynamics simulations revealed that the CoA complex with the phosphorylated form of the kinase (phosphorylated at Thr229 and Thr389) is significantly more stable than the complex with the non-phosphorylated form of the enzyme. These findings underscore the critical role of phosphorylation in stabilizing the interaction between p70S6K1 and CoA, highlighting the importance of CoAlation in regulating the activated kinase.

Overall, this study shows that CoAlation of S6K1 primarily functions as a protective mechanism against excessive oxidation. The intensity of CoAlation significantly increases under stress induced by various oxidative agents, such as hydrogen peroxide, arsenite, and diamide. Additionally, elevated levels of CoAlation are observed under metabolic stress, which is associated with increased production of reactive oxygen species (ROS). CoAlation at Cys217 appears to regulate S6K1 activity, specifically by inhibiting it. This regulatory effect is likely related to the interaction between CoA and S6K1 during CoAlation. Besides forming a disulfide bond between the thiol groups of the CoA pantetheine tail and the kinase cysteine, CoA also stabilizes its ADP fragment in the catalytic center, preventing ATP binding and reducing enzymatic activity. These results provide a foundation for further investigation into the role of CoA and CoAlation in regulating other proteins and open new avenues for developing therapeutic strategies to address conditions associated with excessive S6K1 activity.

Key words: breast cancer, cell culture, cell functional state, cell signalling, hydrogen peroxide, intracellular localization, mutations, oxidative metabolism, oxidative stress, p70S6K1, post-translational modifications, protein CoAlation, protein spatial organization, reactive oxygen species, toxicity.

List of publications

Articles:

4. **A. V. Bdzhola**, V. V. Filonenko, I. T. Gout, and O. M. Malanchuk, ‘The use of the in situ proximity ligation assay for validating S6 kinase 1 CoAlation under oxidative stress.’, Biopolym. Cell, vol. 39, no. 4, pp. 277–282, Dec. 2023, doi: 10.7124/bc.000AA5. Q4, Impact Factor 0,5
5. O. M. Malanchuk, **A. V. Bdzhola**, I. O. Tykhonkova, I. T. Gout, and V. V. Filonenko, ‘Monoclonal antibodies to Coenzyme A’, Biopolym. Cell, vol. 38, no. 4, pp. 215–223, Dec. 2022, doi: 10.7124/bc.000A7F. Q4, Impact Factor 0,5
6. O. Malanchuk*, **A. Bdzhola*** et al., ‘Investigating the Regulation of Ribosomal Protein S6 Kinase 1 by CoAlation’, IJMS, vol. 25, no. 16, p. 8747, Aug. 2024, doi: 10.3390/ijms25168747. Q1, Impact Factor 6,7

Conference abstracts:

5. **Bdzhola A**, Filonenko V, Malanchuk O ‘Purification and characterization of highly specific anti-CoA antibodies’ XIV IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists. - Kyiv. – 2020. – p.22
6. **Bdzhola A**, Malanchuk O ‘Analysis of protein coalation in the set of the MCF7 cell lines with selective expression of S6K1 isoforms under oxidative stress conditions’. XI annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine. Biopolymers and Cell. – 2021. – Vol. 37. N 3 (p.49)
7. **Bdzhola A**, Filonenko V, Malanchuk O ‘Generation and characterization of novel antibodies specific to Coenzyme A’. Materials of the XVII International conference of young scientists, Kyiv, IMBG. – 2023 – p.65.
8. **Bdzhola A**, Filonenko V, Malanchuk O ‘S6K1 CoAlation as cellular response to oxidative stress’. Materials of the XVIII All Ukrainian conference of young scientists, Kyiv, IMBG. – 2024. – p.8.

ЗМІСТ

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	19
ВСТУП.....	21
РОЗДІЛ 1	27
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	27
1.1. Окисно-відновний (редокс) гомеостаз клітини	27
1.1.1. Активні форми кисню у клітинному сигналінгу	28
1.1.1.1. Шляхи утворення активних форм кисню	28
1.1.1.2. Клітинні мішені активних форм кисню.....	29
1.1.2. Клітинний стрес, обумовлений надмірною кількістю АФК.....	32
1.1.2.1. Оксидативний стрес.....	32
1.1.2.2. Метаболічний стрес.	32
1.1.3. Антиоксидантні системи клітини	33
1.1.3.1. Каталаза.....	33
1.1.3.2. Супероксиддисмутаза.....	34
1.1.3.3. Глутатіонпероксидаза.....	34
1.1.3.4. Система тіоредоксину.....	34
1.1.3.5. Система глутаредоксинів.	35
1.1.4. Низькомолекулярні тіоли	37
1.1.4.1. Глутатіон.....	50
1.1.4.2. Коензим А.....	38
1.2. Коензим А – ключовий метаболічний інтегратор.....	38

1.2.1. Коензим А, його метаболізм та його похідні	38
1.2.1.1. Біосинтез КоА.....	39
1.2.1.2. Розщеплення КоА	39
1.2.1.3. Тіоефірні похідні КоА.	41
1.2.2. Функціональне значення Коензиму А	41
1.2.3. Патології при порушенні метаболізму КоА	44
1.3. КоАлювання білків.....	46
1.3.1. КоАлювання як нова посттрансляційна модифікація білків.	46
1.3.2. Молекулярні механізми процесів КоАлювання/деКоАлювання	47
1.3.3. Типи взаємодії молекули КоА з білками	48
1.3.5. Вплив КоАлювання на активність білків.....	51
1.4. Кіназа рибосомального білка S6	54
1.4.1. Доменна структура ізоформ S6K1	55
1.4.2. Функціональна роль S6K1 та залученість у патологіях.	56
1.4.3. Регуляція S6K1 посттрансляційними модифікаціями.....	57
1.4.3.1. Фосфорилування/дефосфорилування S6K1	57
1.4.3.2. Убіквітинування S6K.....	59
1.4.3.3. Ацетилювання S6K	60
1.4.3.4. О-ГлцНАцилювання S6K	61
1.4.3.5. КоАлювання S6K1	61
РОЗДІЛ 2.....	75
МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	62
2.1. Матеріали та обладнання.....	62
2.2. Методи роботи з плазмідною ДНК.....	63

2.2.1.	Створення компетентних клітин <i>E.coli</i>	63
2.2.2.	Трансформація клітин <i>E.coli</i> плазмідною ДНК.	64
2.2.3.	Сайт спрямований мутагенез	65
2.2.4.	Отримання рекомбінантної бакмідної ДНК	66
2.2.5.	Бактеріальна система експресії рекомбінантного білка.....	67
2.2.6.	Електрофорез ДНК в агарозному гелі	68
2.3.	Методи роботи з культурами клітин еукаріотів.....	68
2.3.1.	Культивування клітинних ліній ссавців.....	68
2.3.2.	Трансфекція клітин ссавців плазмідною ДНК	69
2.3.3.	Індукція метаболічного та оксидативного стресу в клітинах ссавців ..	69
2.3.4.	Культивування клітинних ліній комах.....	70
2.3.5.	Інфекція клітин комах бакмідною ДНК.....	70
2.4.	Методи роботи з білками.....	71
2.4.1.	Приготування екстрактів з клітин ссавців	71
2.4.2.	Імунопреципітація білків.....	72
2.4.3.	Реакція <i>in vitro</i> КоАлювання	72
2.4.4.	<i>In vitro</i> кіназна реакція	73
2.4.5.	Електрофорез білків у поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах.....	73
2.4.6.	Вестерн-блот аналіз.....	75
2.4.7.	Виділення та очистка рекомбінантного білка використовуючи Ni-NTA афінну хроматографію.....	76
2.4.8.	Виділення та очистка рекомбінантного білка, кон'югованого з GST- тагом	77
2.5.	Методи флуоресцентного аналізу білок-білкових взаємодій	77

2.5.1. Імунофлуоресцентний аналіз та конфокальна мікроскопія	77
2.5.2. <i>In situ</i> proximity ligation assay	79
2.6. Статистичний аналіз.....	80
РОЗДІЛ 3	94
РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРЕМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА	
ОБГОВОРЕННЯ.....	81
3.1. Отримання та характеристика нових моноклональних антитіл проти Коензиму А	81
3.2. КоАлювання як новий тип посттрансляційної модифікації кінрази рибосомного білка S6	86
3.3. Аналіз КоАлювання S6K1 <i>in cellular</i>	90
3.3.1. Транзйентна експресія EE-p70S6K1 в клітинах HEK293/Pank1 β та її КоАлювання за умов оксидативного стресу.....	90
3.3.2. Вплив мутацій C217A та C231A у p70S6K1 на рівень її КоАлювання в клітинах HEK293/Pank1 β за умов оксидативного стресу	93
3.4. Імунофлуоресцентний аналіз КоАлювання S6K1	98
3.4.1. Детекція КоАлювання S6K1 за визначенням співлокалізації молекул методом імунофлуоресцентного аналізу	98
3.4.2. PLA аналіз КоАлювання S6K1 за умови оксидативного стресу	104
3.5. Дослідження <i>in vitro</i> КоАлювання рекомбінантного білка p70S6K1	108
3.5.1. Отримання конститутивно активної рекомбінантної форми p70S6K1, з використанням співекспресії генів <i>RPS6KB1</i> та <i>PDPK1</i> в Vac-to-Vac бакуловірусній системі експресії	108
3.5.2. <i>In vitro</i> КоАлювання рекомбінантної p70S6K1	114
3.6. Вплив <i>in vitro</i> КоАлювання на кіназну активність рекомбінантної p70S6K1.	

3.7. Біоінформатичний аналіз КоАлювання p70S6K1	120
3.7.1. Дослідження взаємодії КоА з p70S6K1 методом молекулярного докінгу.....	120
3.7.2. Молекулярна динаміка комплексів p70S6K1 з КоА.....	125
ВИСНОВКИ	130
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	144
ДОДАТОК А.....	155
ДОДАТОК Б	156

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АДФ - аденозинтрифосфат

АФК – активні форми кисню

БСА – бичачий сироватковий альбумін

ВБ – вестерн блот

НТФ – нуклеозидтрифосфат

ІП – імунопреципітація

ІПТГ – ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозид

ІФА – імуноферментний аналіз

КоА – Кoenзим А

мАт – моноклональні антитіла

ПААГ – поліакриламідний гель

РХ-МС – рідинна хроматографія і маспектрометрія

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – dimethyl sulfoxide (диметилсульфоксид)

DTT – dithiothreitol (дітіотреїтол)

ECL – electrogenerated chemiluminescence

EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid (етилендіамінтетраоцтова кислота)

KLH – keyhole limpet hemocyanin, гемоціанін молюска

LB – Lysogeny broth

MOI – multiplicity of infection, множинність інфекції

NEM – N-Ethylmaleimide

OD – optical density, оптична густина

PBS – phosphate buffered saline (натрій-фосфатний буфер)

PIC – protease inhibitor cocktail, коктейль протеазних інгібіторів

PVDF – polyvinylidene fluoride (полівініліденфторид)

RMSD – root mean square deviation, кореневе середньоквадратичне відхилення

RMSF – root mean square fluctuation, середньоквадратичне коливання

SDS – sodium dodecyl sulfate (лаурилсульфат натрію)

SPDP – N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate

TBS – Tris-buffered saline

TE – Tris/EDTA

TEMED – tetramethylethylenediamine (тетраметилендіамін)

ВСТУП

Актуальність теми. Кіназа рибосомного білка S6 (p70S6K1) є серин/треоніновою кіназою, що відіграє ключову роль у регуляції клітинного росту, проліферації, метаболізму та диференціації. p70S6K1 є одним із ключових компонентів PI3K/Akt/mTOR-залежного сигнального шляху, який відповідає за координацію клітинної відповіді на різні екзогенні сигнали, такі як наявність поживних речовин, фактори росту, рівень енергії та стресові чинники. Одним із основних субстратів p70S6K1 є рибосомний білок S6, фосфорилування якого стимулює біосинтез білків, необхідних для клітинного росту та проліферації [1]. Посилена експресія або активація p70S6K корелює з несприятливим прогнозом при деяких типах раку та прогресуванні багатьох метаболічних захворювань, що свідчить про те, що вона може використовуватися як біомаркер для моніторингу певних хвороб. Активована p70S6K1 може впливати на різні етапи розвитку раку, такі як епітеліально-мезенхімальний перехід [2], стовбуровість ракових клітин [3], [4] та стійкість до лікарських препаратів [5], [6], [7], [8]. Будучи одним із ефекторів PI3K/Akt/mTOR-залежного сигнального шляху, активація p70S6K1 суворо регулюється послідовним каскадом фосфорилування за залишками серину/треоніну [9]. Проте варто зазначити, що існують і інші механізми регуляції p70S6K1.

Загалом, p70S6K1 зазнає низки посттрансляційних модифікацій, які визначають її активність, стабільність та локалізацію в клітині. Найважливіші з них включають:

1. Фосфорилування – основна посттрансляційна модифікація p70S6K1, яка регулює її активацію. Фосфорилування за різними сериновими і треоніновими залишками, такими як Thr389, Ser371 та Thr229, є критичними для активації кінази та здійснюються за участі mTORC1, PDK1 та інших кіназ [1].

2. Убіквітинування: p70S6K1 може зазнавати убіквітинування, що призводить до її деградації через протеасомний шлях [10]. Цей механізм є важливим для регулювання рівня p70S6K1 в клітині та запобігання її надмірної активації.
3. Ацетилювання та метилювання: ці модифікації можуть впливати на стабільність p70S6K1 та її взаємодію з іншими білками, їхня роль менш досліджена порівняно з фосфорилуванням [11].
4. О-ГлцНАцилювання – модифікація S6K1, що інгібує послідовні етапи фосфорилування кінази, необхідні для її активації [12].

Нещодавно було відкрито новий тип посттрансляційної модифікації протеїнів – КоАлювання, що полягає в утворенні дисульфідного зв'язку між тіольною групою пантетеїнового хвоста КоА та тіольною групою цистеїну білка [13]. Продемонстровано важливу роль цього типу модифікації в захисті протеїнів від надмірної оксидації під впливом реактивних форм кисню, а також в регуляції активності цілої низки ензимів. Яскравим прикладом є Аврора А кіназа, що селективно інгібується в процесі КоАлювання шляхом конкуренції молекули КоА з АТФ за каталітичний центр зв'язування [14]. Інший ензим, GAPDH, також зворотно інгібується при КоАлюванні, що виникає внаслідок оксидативного стресу, захищаючи ключові цистеїнові залишки активаційного центру від надмірного окислення, що могло б призвести до незворотної інактивації [15]. Досліджується також здатність КоАлювання до індукції зміни субклітинної локалізації модифікованих білків.

Розуміння функціональної ролі p70S6K1 та шляхів її регуляції, з акцентом на посттрансляційні модифікації, має не лише фундаментальне наукове значення, але й надзвичайно важливе для розробки нових терапевтичних підходів до лікування різних захворювань, зокрема раку, діабету та неврологічних розладів, патогенез яких асоційований з активністю цього ензиму. Саме тому вивчення нового типу посттрансляційної модифікації білків — КоАлювання — та дослідження його регуляторного впливу на S6K1 є надзвичайно актуальним

Мета роботи: дослідити КоАлювання кінази 1 рибосомного білка S6 за різних умов та в різних системах, з'ясувати роль цієї модифікації в регуляції функціональної активності S6K1.

Для досягнення мети було визначено такі **завдання:**

1. Охарактеризувати моноклональні антитіла проти Коензиму А та дослідити спектр їхнього розпізнавання.
2. Визначити можливість КоАлювання S6K1 та ідентифікувати сайти утворення дисульфідних зв'язків між цистеїновими залишками S6K1 та молекулою КоА з використанням методів рідинної хроматографії та мас-спектрометрії.
3. Дослідити можливість *in cellular* КоАлювання надекспресованої S6K1 у клітинах за умов оксидативного стресу, використовуючи методи імунопреципітації та вестерн-блот аналізу.
4. Методом сайт-спрямованого мутагенезу створити цистеїнові мутанти S6K1 та дослідити зміну рівня КоАлювання *in cellular* мутантних форм S6K1 за умов оксидативного стресу.
5. Визначити особливості КоАлювання S6K1 за умов метаболічного та оксидативного стресів *in cellular* з використанням методів імунофлуоресцентного аналізу та PLA.
6. Створити рекомбінантну форму конститутивно активної p70S6K1, використовуючи Bac-to-Bac бакуловірусну систему експресії з дуальною експресією генів.
7. Оцінити можливість *in vitro* КоАлювання рекомбінантної конститутивно активної форми S6K1 та дослідити вплив КоАлювання на її кіназну активність.
8. Використовуючи біоінформатичні методи молекулярного докінгу та молекулярної динаміки, дослідити взаємодію молекули КоА з нефосфорильованою та фосфорильованою формами S6K1 в процесі КоАлювання та оцінити стабільність утворених комплексів.

Об'єкт дослідження: процес КоАлювання S6K1 за умов метаболічного та оксидативного стресів в різних системах.

Предмет дослідження: роль КоАлювання S6K1 в регуляції її функціональної активності в клітині за різних умов.

Методи дослідження. Для вирішення поставлених завдань було використано методи рідинної хроматографії/мас-спектрометрії, імунопреципітації, PLA вестерн-блот аналізу, світлової та конфокальної мікроскопії та інші загальновідомі молекулярні, біохімічні, цитологічні, біоінформатичні, мікробіологічні методи роботи і статистичні методи обробки результатів

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше було з'ясовано можливість кінази 1 рибосомального білка S6 КоАлюватися у відповідь на метаболічний та оксидативний стреси в умовах *in cellular, in vitro*. Було визначено сайт КоАлювання S6K1 з використанням PX-МС та створено мутантні форми S6K1 для більш детального розуміння можливостей КоАлювання досліджуваної кінази. Вперше була експресована та очищена рекомбінантна конститутивно активна форма p70S6K1 з бакуловірусної системи шляхом використання дуального вектору, що водночас кодує як білок інтересу, так і кіназу PDK1 для подальшого фосфорилювання та активації S6K1. Проведений біоінформатичний аналіз з використанням молекулярного докінгу та симуляцій молекулярної динаміки дозволив візуалізувати модель зв'язування молекули КоА з S6K1 та оцінити стійкість комплексів КоА з фосфорилюваною та нефосфорилюваною за сайтами активації формами S6K1.

Практичне значення отриманих результатів. Завдяки своїй ключовій ролі в синтезі білка та регуляції клітинного циклу, p70S6K1 є залученою до виникнення та прогресії великої кількості захворювань людини, таких як метаболічні, онкологічні та серцево-судинні розлади. Отримані в цій роботі дані дозволили продемонструвати, що КоАлювання є новим способом інгібування активності S6K1, здатним пригнічувати активність кінази за допомогою механізму

«подвійного якоря», який реалізується в клітині за умов окислювального стресу. Ці результати пропонують новий напрямок для розробки ефективних інгібіторів S6K1 і, потенційно, інших протеїнкіназ, які містять консервативні залишки Cys, та можуть стати перспективною стратегією для розробки нових терапевтичних підходів лікування широкого спектру захворювань, зокрема, пов'язаних з дисбалансом окисно-відновлювального стану, таких як нейродегенерація. Дослідження в цьому напрямку може призвести до відкриття нових підходів лікування та профілактики таких патологічних станів.

Крім того, розроблено простий, надійний та ефективний протокол для експресії, очищення та тестування високоактивної S6K1 у необхідній кількості та якості, придатній для проведення високопродуктивних ензиматичних аналізів S6K1, в тому числі і для пошуку хімічних інгібіторів як основи для створення терапевтичних препаратів.

Особистий внесок. Викладені в дисертації результати були отримані автором самостійно або за його безпосередньої участі в проведенні експериментів та обробці даних. Дисертантка особисто здійснила аналіз та узагальнення літературних джерел, що стосуються теми дослідження.

Планування дослідження та обговорення отриманих даних було проведено за участі наукового керівника к.б.н., с.н.с. О.М. Маланчук та завідувача відділу сигнальних систем клітини д.б.н., проф., академіка НАНУ В.В. Філоненка. Результати висвітлено у спільних публікаціях.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалась в рамках бюджетних тематик: «Особливості структурно-функціональної організації mTOR/S6K-залежного сигнального каскаду в нормальних та злоякісних клітинах: множинність сплайсових ізоформ mTOR та S6K кіназ» (2015-2020, 0110U000692); «Особливості функціональної активності ізоформ кінази рибосомного білка S6

(S6K1) та молекулярних механізмів її регуляції в нормі та патології» (2021-2025,0121U109973).

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації були висвітлені на наступних конференціях: XIV ІМБіГ Всеукраїнська конференція молодих вчених (Київ, 2020); XI річна конференція молодих вчених ІМБіГ (Київ, 2021); XVII Міжнародна конференція молодих вчених ІМБіГ (Київ, 2022); XVIII Всеукраїнська конференція молодих вчених ІМБіГ (Київ, 2024).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 3 статті, з них 2 – у періодичних фахових виданнях України, 1 – у зарубіжному виданні Q1, а також 4 тез доповідей у наукових збірниках вищезазначених конференцій.

Обсяг і структура роботи. Дисертація складається зі вступу, розділу огляду літератури (містить 4 підпункти), розділу матеріалів та методів (включає 6 підпунктів), розділу результатів та обговорення (складається з 7 підпунктів), висновків, списку використаних джерел, який містить 182 посилання, та двох додатків. Загальний обсяг роботи складає 156 сторінок. Основна частина дисертації викладена на 110 сторінках, містить 25 рисунків та 3 таблиці.

Авторка висловлює щире подяку своєму науковому керівникові, к.б.н., с.н.с. Оксані Миколаївні Маланчук, за безцінну підтримку, керівництво та натхнення протягом усього процесу написання дисертації; а також завідувачу відділу сигнальних систем клітини, д.б.н., професорові, академіку Валерію Вікторовичу Філоненку, за мудрі поради та допомогу впродовж роботи. Окрема подяка всім співробітникам відділу сигнальних систем клітини та м.н.с. відділу ензимології білкового синтезу Олександрі Скиданович, за їхню допомогу, яка суттєво сприяла успішному виконанню дослідження.

Велика вдячність родині та друзям за безперервну підтримку, та найголовніше безмежна подяка Силам Оборони України за можливість жити і працювати в умовах війни.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Окисно-відновний (редокс) гомеостаз клітини

Еволюційна поява фотосинтезу призвела до накопичення кисню в атмосфері, тому живим організмам довелося адаптуватися до середовища, в якому регулярно відбуваються окислювальні реакції. Як наслідок, в процесі розвитку були розроблені нові молекулярні механізми, які регулюють і підтримують баланс між відновлювальними та окислювальними реакціями. Цей так званий окислювально-відновний, або редокс, гомеостаз не лише дозволив організмам продовжувати та підтримувати життєдіяльність у новому окислювальному середовищі, але й сприяв розширенню біорізноманіття [16], [17].

Всупереч тому, що назва «редокс гомеостаз» може вказувати на сталість цієї системи, насправді це дуже динамічний процес. Стабільність окисно-відновного стану в клітинах підтримується не завдяки постійному редокс стану, а шляхом переналагодження метаболічної активності для відновлення окисно-відновлювального балансу. Редокс біологія клітини виявилася складною для вивчення, а взаємодія між донорами та акцепторами електронів набагато важчою для розуміння ніж вважалося раніше. Системи, відповідальні за підтримання окисно-відновного балансу в клітині, такі як глутатіон, тіоредоксин, НАДФ-регенеруючі системи та пов'язані з ними ферменти, були детально вивчені та охарактеризовані [18], [19], [20]. Окисно-відновні взаємодії впливають на регуляцію різноманітних біологічних процесів, включаючи метаболізм, загибель клітин, диференціацію та розвиток, імунні відповіді, циркадний ритм та інші [21].

1.1.1. Активні форми кисню у клітинному сигналінгу

Активні (радикальні) форми кисню (АФК, ROS) складаються з радикальних і нерадикальних форм, таких як супероксид ($\cdot\text{O}_2^-$), пероксид ($\cdot\text{O}_2^{-2}$), перекис водню (H_2O_2) та гідроксильна ($\cdot\text{HO}$) форми, утворення яких є наслідком втрати електрона(ів).

1.1.1.1. Шляхи утворення активних форм кисню. Ендогенні джерела АФК. Клітинні АФК виникають або поза її межами, або продукуються ендогенно, як прямо, так і опосередковано, будучи побічними продуктами клітинного метаболізму. Клітини пристосувалися використовувати радикальні форми кисню як важливі молекули в регуляції безлічі процесів, включаючи клітинний сигналінг, проліферацію та диференціацію [22]. Внутрішньоклітинні АФК в основному походять з мітохондріального електронно-транспортного ланцюга, який забезпечує утворення H_2O_2 в мітохондріях шляхом розщеплення супероксиду ($\cdot\text{O}_2^-$). Окрім того, ендоплазматичний ретикулум містить ферменти, які можуть генерувати АФК як побічні продукти під час каталізу.

Серед головних чинників виникнення активних форм кисню є клас ферментів оксидоредуктази, що каталізують перенесення електронів з однієї молекули на іншу. Основними джерелом АФК в клітині серед оксидоредуктаз є мембранозв'язуючий фермент НАДФ оксидаза (НОГ, NOX). Її мРНК транскрибує кілька ізоформ, що безпосередньо окислюють O_2 і генерують АФК, використовуючи НАДФ як донора електронів. Вид згенерованих активних форм кисню залежить від ізоформи білка НОК, наприклад, 1, 2, 3 і 5ий типи ізоформ продукують супероксид $\cdot\text{O}_2^-$, тоді як 4тий переважно утворює перекис водню [23]. Також важливими ендогенними генераторами АФК в клітині є ліпоксигеназа (ЛОГ, LOX) і циклооксигеназа (ЦОГ, COX). Ці ферменти сприяють біосинтезу ейкозаноїдів, таких як лейкотрієни, простагландини і тромбоксани, з арахідонової

кислоти (АК), що виділяється з клітинних мембран внаслідок дії фосфоліпаз [24]. Під час окислення арахідонової кислоти вивільняються ROS як побічні продукти.

Екзогенні джерела АФК. Окрім ендогенного утворення, АФК також можуть виникати під впливом зовнішніх факторів, наприклад, іонізуючого випромінювання (рентгенівського, ультрафіолетового або гамма-випромінювання), забруднення повітря або токсичних газів, гіпоксії, хімічних речовин та іонів важких металів. АФК, що утворюються з вищеперерахованих джерел, здебільшого не залучені до клітинного сигналіngu чи підтримання гомеостазу, що опосередковані ендогенними реактивними формами кисню. Однак вони можуть пошкоджувати клітини, а при тривалому впливі – викликати розвиток ряду захворювань. Багато екзогенних джерел АФК, включно з тютюновим димом, такими метали, як залізо, миш'як, хром і кадмій, пов'язані з розвитком раку і старінням через утворення вільних радикалів [25].

1.1.1.2. Клітинні мішені активних форм кисню. За фізіологічних умов, шляхом окислення, АФК можуть модифікувати внутрішньоклітинні макромолекули: переважно білки, ліпіди та ДНК, - забезпечуючи оберненість процесу та відновлення функціонального стану молекул. Це важливо для регуляції безлічі клітинних процесів, таких як внутрішньоклітинний рух везикул, диференціація і дозрівання клітин [26]. Однак тривалий вплив підвищеного рівня активних форм кисню може призвести до серйозних і незворотних біологічних ефектів на молекулярному рівні, а згодом і на тканинному та організмовому рівнях. Для більшого розуміння взаємодії АФК з клітинними мішенями варто розглянути кожен клас молекул-мішеней окремо.

Однією з важливих мішеней для АФК є білки, які можуть зазнавати як зворотних, так і незворотних модифікацій. Білки, що містять такі амінокислотні залишки як метіонін, цистеїн, селеноцистеїн, триптофан, гістидин, фенілаланін чи

тирозин, є більш чутливими до окислення, а отже, більш вразливими до окислювального пошкодження.

Дослідження в даній роботі в основному зосереджене на окисленні залишків цистеїну білка та його посттрансляційній модифікації як антиоксидантній відповіді. Особливо чутливим до окислювальної дії є бічний ланцюг цистеїну. Загалом залишки цистеїну відіграють важливу роль: (а) як каталітично активні залишки, (б) як координатори іонів металів та (в) в утворенні між- та внутрішньомолекулярних дисульфідів, важливих для структурної стабільності та окисно-відновних властивостей [27].

Тіольні групи цистеїну білка (-SH) можуть тимчасово окислюватися до сульфенових кислот (-SOH) під дією активних форм кисню, що дозволяє здійснювати редокс-регуляцію, включаючи каталіз, сигналінг та посттрансляційні модифікації (ПТМ). Підвищений рівень АФК може спричинити подальше окислення сульфенових кислот до стану сульфінової кислоти (SO₂H), який може бути оберненим шляхом ферментативного відновлення сульфїредоксином. Однак наступні підвищення рівня АФК в клітині здатні викликати переокислення тіолів цистеїну до стану сульфатної кислоти (SO₃H), що часто призводить до незворотної інактивації білка і робить його мішенню для деградації (рис.1.1) [28].

Основними мішенями атаки для АФК є ліпіди, а пероксиди ліпідів (містять групу -O-O-), які є продуктом окислення ліпідів, пов'язані з різними патологіями людини [29]. Пероксидні ліпіди є більш полярними і можуть бути коротшими за довжиною, що може порушувати цілісність клітинної мембрани, оскільки порушується ліпідний бішару, і як наслідок підвищується проникність мембрани. Такий результат може призвести до інактивації мембранних рецепторів та ініціювати шляхи загибелі клітин.

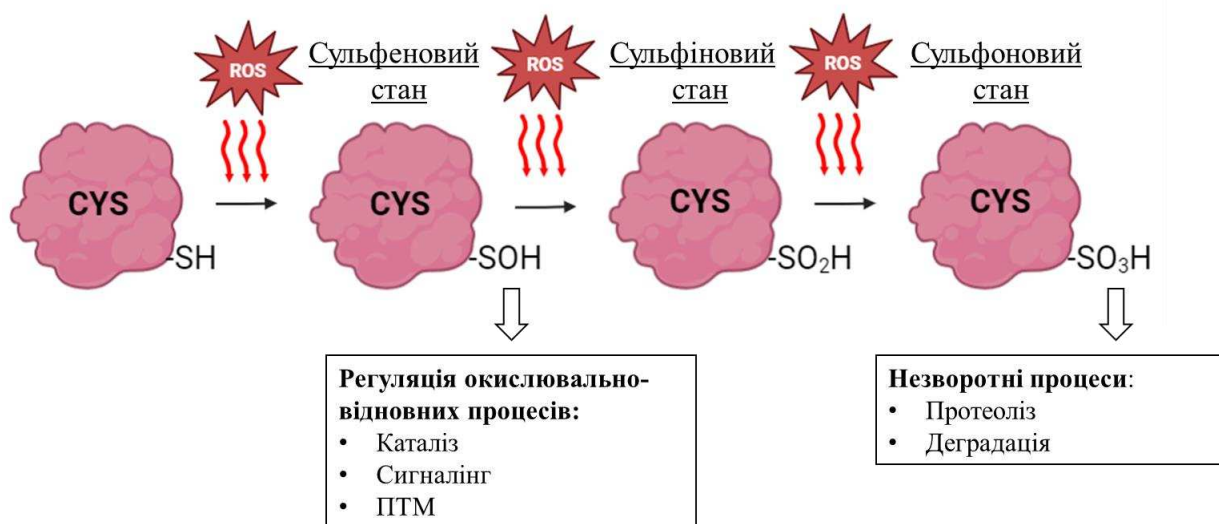


Рис.1.1. Ступені окислення цистеїну білка у відповідь на підвищення кількості АФК в клітинному середовищі

ДНК також схильна до окислення під впливом АФК. Активні форми кисню можуть викликати модифікацію пуринових і піримідинових основ, а також рибозної основи ДНК. Окислювальні пошкодження ДНК включають утворення одностанцюгових розривів, які в свою чергу можуть призвести до двостанцюгових [30]. Якщо пошкодження внаслідок надмірного окислення не репаруються, вони можуть призвести до мутацій, оскільки окислений гуанозин (G) буде формувати водневі зв'язки з тиміном (T), що призведе до точкових мутацій, які можуть успадковуватися. Крім того, окислення основ ДНК може порушувати метилювання ДНК, що є епігенетичним механізмом пригнічення експресії генів. Також білки, асоційовані з ДНК, можуть окислюватися, що результуватиме в утворенні неспецифічного крослінкування ДНК-білок, які можуть блокувати транскрипцію генів або реплікацію ДНК [31].

Вплив активних форм кисню відбувається також на РНК, яка руйнується легше, адже є одностанцюговою. На клітинному рівні окислена мРНК зупиняє синтез білка [32] або індукує помилки трансляції, які можуть призвести до ранньої стадії термінації трансляції або деградації поліпептидних ланцюгів, результатом чого є збільшення варіативності білка або накопичення коротких поліпептидних

ланцюгів [33]. Було продемонстровано, що окисне пошкодження РНК є однією з ранніх подій розвитку ряду патологічних станів, включаючи діабет II типу [34], нейродегенеративні захворювання, такі як хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, бічний аміотрофічний склероз, деменція з тільцями Леві та пріонна хвороба [35], [36], серцево-судинні захворювання [37] та рак.

1.1.2. Клітинний стрес, обумовлений надмірною кількістю АФК

1.1.2.1. Оксидативний стрес. Клітини повинні підтримувати тонкий баланс між продукуванням та утилізацією АФК для забезпечення належної регуляції клітинних процесів. Збільшення та тривале накопичення активних форм кисню, іншими словами, оксидативний стрес, може призвести до незворотніх наслідків. Окислювальний (оксидативний) стрес визначають як дисбаланс між оксидантами та антиоксидантами на користь оксидантів, що призводить до порушення редокс-сигналіngu та пошкодження певних молекул. Оксидативний стрес тісно пов'язаний з безліччю патологій людини, включаючи старіння, рак, нейродегенеративні захворювання та діабет [38], [39], [40], [41], [42], [43], [44].

1.1.2.2. Метаболічний стрес. Метаболічний стрес виникає в той час, як клітині екстремально починає бракувати поживних речовин для своїх біоенергетичних потреб. Тривалий період збільшення або зменшення доступності поживних речовин може призвести до утворення патофізіологічних рівнів АФК. Під час нормального клітинного метаболізму мітохондріальний електронно-транспортний ланцюг виробляє низький рівень АФК, який утилізується в процесі звичайного функціонування клітинної антиоксидантної системи. Рівень реактивних форм кисню може зростати зі змінами в метаболізмі мітохондрій, що можуть бути спричинені надлишком поживних речовин у середовищі, який призводить до надмірного утворення АФК порівняно з рівнем,

необхідним для нормальних фізіологічних реакцій [45]. Для індукції метаболічного стресу, клітини піддають впливу гіпоксії, хімічних речовин, таким як сорбіт, зміні середовища з нестачею або надлишком поживних речовин або індукують активацію онкогенів [46].

1.1.3. Антиоксидантні системи клітини

Антиоксидантні системи важливі для підтримки окисно-відновного гомеостазу. Антиоксиданти – це речовини, що присутні в клітині в низьких концентраціях, та які значно зменшують або запобігають окисленню субстрату [47]. До антиоксидантних систем належать ферменти та низькомолекулярні тіоли, які підтримують клітинний гомеостаз шляхом (а) забезпечення захисту клітинних компонентів під час окисдативного стресу, (б) шляхом безпосередньої нейтралізації АФК та (в) шляхом забезпечення редокс-сигналізації разом з АФК. Антиоксиданти мають вирішальне значення при протидії різним біохімічним реакціям, що були ініційовані високими рівнями АФК. Ця протидія виконується трьома способами: а) інгібування ферментів, які виробляють АФК або хелатування таких металів як хром (Cr), залізо (Fe) і мідь (Cu), що каталізують утворення вільних радикалів, б) пряме знешкодження АФК, і в) підсилення антиоксидантного захисту [48].

1.1.3.1. Каталаза. Першим ідентифікованим антиоксидантним ферментом була каталаза, а її механізм розщеплення H_2O_2 до молекулярного кисню і води був вперше описаний ще у 1900 році [49], [50]. Каталаза має найвищу швидкість каталізу серед усіх ферментів, перетворюючи $\sim 6 \times 10^6$ молекул пероксиду водню за хвилину, використовуючи НАДФ як відновник [51]. Каталаза ссавців міститься виключно в пероксисомах, а не в мітохондріях, експресується у всіх тканинах, а її найвища активність спостерігається в еритроцитах і печінці.

1.1.3.2. Супероксиддисмутаза. Супероксиддисмутаза (СОД, SOD) є першою лінією захисту від АФК, каталізуючи інактивацію супероксиду ($\cdot\text{O}_2^-$), що утворюється при втраті молекулою кисню одного електрону. СОД поширена у переважній більшості організмів, які живуть за аеробних умов. Існує три класи СОД, які категоризуються в залежності від того, який йон металу є її каталітичним кофактором: Cu/Zn, Mn/Fe або Ni [52]. Клітини ссавців експресують лише два з таких класів СОД, але вони виражені у вигляді трьох структурно відмінних ізоферментів, які мають різну субклітинну локалізацію: СОД1 – цитоплазматична, Cu/ZnSOD; СОД2 – мітохондріальна MnSOD [53] та SOD3 – позаклітинна Cu/ZnSOD.

1.1.3.3. Глутатіонпероксидаза. Глутатіонпероксидази (GPX) є важливими ферментами для підтримки клітинного окисно-відновного балансу. Вони відновлюють H_2O_2 та алкільні гідропероксиди (R-OOH) до води та відповідних спиртів [54]. У ссавців існує 8 представників родини GPX, які мають дещо різні механізми дії та активні центри, хоча всі вони використовують глутатіон як відновник. GPX1-4 і GPX6 використовують селеноцистеїн (Secys) як каталітичний залишок, тоді як GPX5, GPX7 і GPX8 використовують залишки цистеїну як активні центри. GPX6 притаманний лише організму людини [54]. Слід зазначити, що GPX4, на відміну від інших глутатіонпероксидаз, відіграє додаткову роль у безпосередньому розщепленні складних гідропероксидів ліпідів, включаючи холестерин, фосфоліпіди та ефіри холестерину, захищаючи клітинні мембрани від переокислення [55].

1.1.3.4. Система тіоредоксину. Система тіоредоксину (Trx) – ключова антиоксидантна система для захисту від окислювального стресу шляхом своєї дисульфідредуктазної активності, що регулює дитіол/дисульфідний баланс, збільшуючи кількість відновлених тіолів [56]. До цієї системи належать НАДФ, ферменти тіоредоксин (Trx) та тіоредоксин-редуктаза (TrxR). Механізм дії системи

Trx у відновленні ініціюється тіоредоксином, який містить два каталітичні цистеїнові залишки у своєму активному центрі. Наближуючись до окисненої молекули, Trx стає донором атомів водню, утворюючи дисульфідний зв'язок між своїми каталітичними доменами, але водночас відновлюючи білок мішень [57]. Потім внутрішньомолекулярний дисульфідний зв'язок в молекулі тіоредоксину відновлюється тіоредоксин-редуктазою за допомогою НАДФ як кінцевого донора електронів для TrxR.

Тіоредоксини є життєво важливими ферментами антиоксидантного захисту, а нокаут Trx є ембріонально летальним у мишей [58]. Маючи здатність взаємодіяти і модулювати редокс статус білків, Trx бере участь у ряді сигнальних функцій, модулюючи апоптоз, ріст, диференціацію і зв'язування ДНК з численними факторами транскрипції [59]. Наприклад, за нормальних умов відновлений Trx1 зв'язується з апоптозною сигнальною кіназою 1 (ASK1), пригнічуючи таким чином активацію кінази Jun (JNK) і запобігаючи апоптозу [60]. Продемонстровано, що Trx і TrxR беруть участь у розвитку раку, але можуть відігравати як стимулюючу, так і пригнічуючу роль, залежно від стадії захворювання [61]. Часто виявляється, що Trx/TrxR надмірно експресуються в пухлинних тканинах [62], [63]. Більш того, надекспресія Trx/TrxR в деяких видах раку призводила до резистентності до хіміотерапії [64]. Тому для лікування раку були створені інгібітори проти Trx/TrxR [65], [66]. Розробляються також нові стратегії лікування раку, спрямовані на систему Trx, оскільки багато ознак раку модулюються за допомогою окисно-відновної сигналізації.

1.1.3.5. Система глутаредоксинів. Глутаредоксини (Grx) – білки, функція яких полягає в відновленні білково-глутатіонових змішаних дисульфідів (R-SS-G) [67], [68], [69], [70]. Система Grx є життєво важливою для клітинного захисту від оксидативного стресу, механізм якої передбачає взаємодію між собою

таких ключових ферментів, як глутатіон-S-трансфераза (GST), глутатіонредуктаза (GR) і глутаредоксин (Grx).

Система глутаредоксинів нагадує систему тіоредоксинів, але різниця полягає в тому, що на відміну від Trx, які відновлюються тероксиредоксин-редуктазою, глутаредоксин відновлюється глутатіоном (GSH). Grx можна розділити на дві групи, залежно від кількості каталітичних залишків цистеїну в їхньому активному центрі, а саме монотіоли (CXXS) та дитіоли (CXXC). Grx переважно використовують монотіоловий механізм для відновлення білок-глутатіон дисульфідних комплексів (R-SS-G) і дитіоловий механізм для відновлення внутрішньомолекулярних білкових дисульфідів (R-SS-R). В обох випадках каталітичний Cys-SH глутаредоксину атакує дисульфідний зв'язок субстрату, і в ході реакції, за участі глутатіон-S-трансферази, утворює проміжний продукт Grx-SS-G. Отримана форма Grx відновлюється іншою молекулою GSH (вивільняючи димер GSSG) і повертається в активний стан. Дисульфід глутатіону (GSSG) зрештою відновлюється каталітичним селеноцистеїном глутатіонредуктази (GR) за допомогою коферменту НАДФ [70].

Функція Grx у відновленні внутрішньо- та міжмолекулярних дисульфідів в комплексі білок-глутатіон важлива для регуляції проліферації та диференціації клітин через MAPK-шлях, апоптозу через інгібування активації каспази та вивільнення цитохрому C, а також транскрипції через модуляцію NF- κ B і H₂O₂ [69] тощо.

Глутатіон-S-трансфераза

Глутатіон-S-трансфераза (GST) була вперше виявлена у тварин через їх важливість у метаболізмі та детоксикації лікарських засобів/електролітів [71], [72], [73]. Деякими екзогенними субстратами для GST є різного виду хімічні речовини навколишнього середовища, гербіциди, канцерогени, фармацевтичні препарати, хіміотерапевтичні засоби для лікування раку [74], [75], [76], [77]. Окрім детоксикації, GST виконують різноманітні клітинні функції: модифікація білків

шляхом приєднання глутатіону, клітинний сигналінг, антиоксидатна дія, ізомеризація молекул. Деякі цитозольні GST мають активність глутатіонредуктази і можуть каталізувати GSH-залежне відновлення H_2O_2 і органічних пероксидів до води та спирту, відповідно з вивільненням GSSG як побічного продукту [78], [79].

1.1.4. Низькомолекулярні тіоли

Низькомолекулярні тіоли присутні у великій кількості в клітинах і діють додатково до інших антиоксидантних ферментів як підтримка гомеостазу окисно-відновного середовища в субклітинних компартментах. Низькомолекулярні тіоли мають фундаментальне значення для всіх форм життя, оскільки вони беруть участь у регуляції окисно-відновних/метаболических процесів через свої реакційноздатні тіольні (-SH) групи. До низькомолекулярних тіолів належать цистеїн (Cys), глутатіон (GSH), ерготіонеїн (ERG), бацілітіол (BSH), мікотіол (MSH), коензим А (КоА), овотіол (OSH) і трипанотіон ($\text{T}(\text{SH})_2$) [80].

1.1.4.1. Глутатіон. Відкритий приблизно 150 років тому трипептид L-γ-глутаміл-L-цистеїніл-гліцин, також відомий як глутатіон (GSH), є ключовим клітинним антиоксидантом, що міститься в організмах рослин, тварин і грамнегативних бактерій [81], [82]. Він бере участь у різноманітних клітинних функціях, включаючи антиоксидантну відповідь, окисно-відновну регуляцію, детоксикацію ксенобіотиків, метаболізм заліза, сигнальну трансдукцію та експресію генів [83], [84], [85], [86]. GSH також бере участь у глутатіонуванні білків – зворотному процесі утворення змішаних дисульфідних зв'язків глутатіону з цистеїнами білків (R-S-S-G) під час клітинного стресу. Процес глутатіонування здебільшого пригнічує каталітичну активність білків, захищаючи білки від надмірного окислення і незворотного пошкодження в умовах тривалого стресу.

1.1.4.2. Кoenзим А. Кoenзим А (КоА) є універсальним коферментом, який виконує функції перенесення ацильних груп та активації карбонільних груп молекул в різноманітних біохімічних реакціях (рис. 1.2) [87]. Молекула КоА складається із залишків аденілової кислоти та пантотенової кислоти, зв'язаних пірофосфатом.

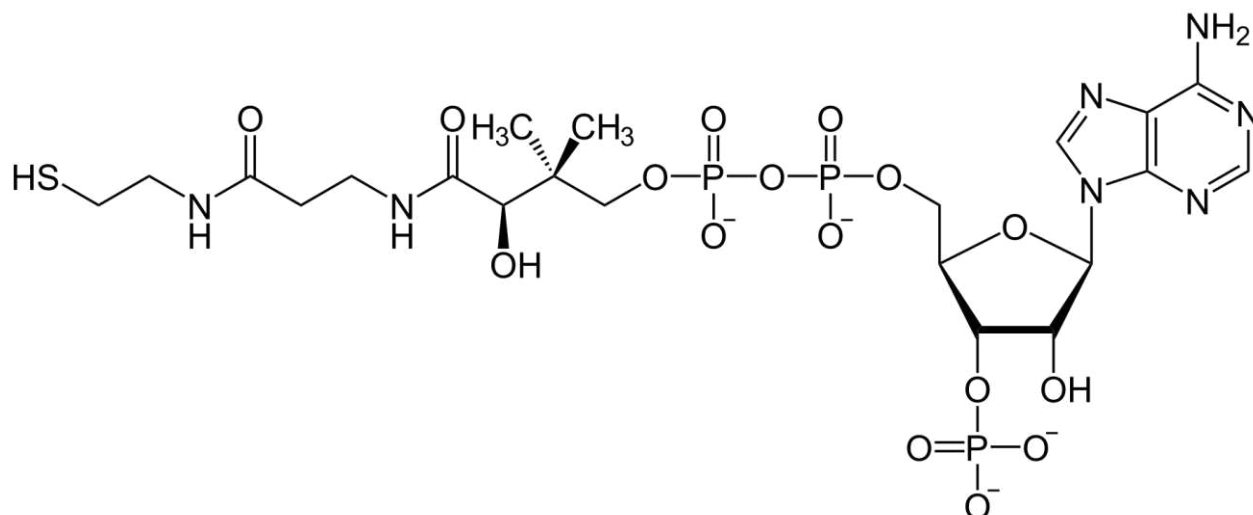


Рис. 1.2. Хімічна структура молекули Кoenзиму А, що складається із залишків аденілової кислоти та пантотенової кислоти, зв'язаних пірофосфатом

1.2. Кoenзим А – ключовий метаболічний інтегратор

1.2.1. Кoenзим А, його метаболізм та його похідні

Фріц Ліпманн відкрив КоА в середині минулого століття і показав, що вона є фундаментальною каталітичною молекулою в клітинному перетворенні поживних речовин в енергію і важливим учасником проміжного метаболізму [87]. За це відкриття Ліпманн отримав Нобелівську премію, яку він розділив з Гансом Кребсом, відзначеним за відкриття циклу трикарбонових кислот.

1.2.1.1. Біосинтез КоА. Біосинтез молекули КоА відбувається в п'ять етапів з пантотенової кислоти, також відомої як вітамін В5 (рис.1.3). Перший крок - фосфорилування пантотенату до 4'-фосфопантотенату за допомогою ензиму пантотенаткіназа (ПАНК, PANK). Наступним є етап конденсації 4'-фосфопантотенату з цистеїном (4'-фосфопантотеноїлцистеїнсинтетаза, ФПЦС), що супроводжується реакцією декарбоксилювання з утворенням 4'-фосфопантетеїну (4'-фосфопантотеноїлцистеїн декарбоксилаза, ФПЦДК). Останні дві реакції у прокаріотів протікають за рахунок різних доменів біфункціонального ензиму, тоді як у еукаріотів каталізуються двома окремими ферментами. Далі до 4'-фосфопантетеїну від донорської АТФ приєднується АМФ-фрагмент (фосфопантеїн-аденілаттрансфераза) з утворенням дефосфо-КоА, який згодом фосфорилується (дефосфо-КоА-кіназа) в позиції 3'-гідроксилу рибози; це результує в формуванні цільової молекули КоА. Протікання останніх двох реакцій відбувається окремими ферментами у прокаріотів і у рослин, але у ссавців перебіг цих двох процесів забезпечує біфункціональний фермент КоА-синтаза (КоАСИ, CoASY) [88].

1.2.1.2. Розщеплення КоА. Порівняно з детально дослідженим біосинтезом КоА, відносно мало відомо про його деградацію. У ссавців КоА може дефосфорилуватися лізосомальною фосфатазою до дефосфо-КоА [89], і як КоА, так і дефосфо-КоА розщеплюються нуклеотидпірофосфатазою плазматичної мембрани. Однак ці активності вважаються неспецифічними через їхню локалізацію в клітині, широку субстратну селективність і низьку спорідненість до неацильованого КоА [90].

Пероксисомальна КоА-дифосфатаза, також відома як Nudix-гідролаза, можливо є специфічним ферментом, що розщеплює КоА, і нещодавно була клонована з *S. cerevisiae*. Дріжджова Nudix-гідролаза PCD1 активна по відношенню до КоА, причому переважним субстратом є окислена форма коензиму - дисульфід КоА (КоА-SS-КоА) [88].

Деградація пантотеїну до пантотенату і цистеаміну (має антиоксидантні властивості), є також важливим шляхом метаболізму КоА. Ця біохімічна реакція здійснюється сімейством глікозилфосфатидилінозитол-зв'язаних позаклітинних пантотеїназ, які називають ванінами (Vanins). У людини є три типи ванінів (ванін 1, 2 і 3), а у мишей - два типи (ванін 1 і 3) [91].

1.2.1.3. Тіоефірні похідні КоА. Наявність високореактивної тіольної групи та нуклеотидного фрагмента в структурі КоА є ключовими фрагментами, що лежать в основі його клітинних функцій. Ця унікальна хімічна структура дозволяє КоА активувати карбонільвмісні ($C=O$) молекули в катаболічних та анаболічних реакціях, а також зв'язувати різноманітні органічні молекули з утворенням активних тіоефірних похідних, таких як ацетил-КоА, малоніл-КоА, 3-гідрокси3-метилглутарил-КоА, ацил-КоА тощо. За консервативними оцінками, КоА та його тіоефірні похідні беруть участь приблизно в 4% клітинних реакцій бактерії *Escherichia coli*, і є аналогічно поширеними в еукаріотів, функціонуючи практично в кожному компартменті клітини. До таких процесів належать біосинтез і деградація ліпідів, багато вторинних метаболічних шляхів, а також біосинтез амінокислот, холестерину і нейромедіатора ацетилхоліну [92], [93], [94].

1.2.2. Функціональне значення Коензиму А

Загальний пул КоА включає відновлений КоА (КоASH), ряд похідних КоА, утворених через його активну -SH групу (ацил-КоА тощо), дисульфід КоА

(КоА-SS-КоА) або гетеродимери КоА (R-SS-КоА), білок-SS-КоА і димери КоА-глутатіону (КоА-SS-G).

Чисельні хімічні реакції можуть відбуватися саме завдяки високореактивній сульфгідрильній групі. КоА використовує її для утворення різних тіоефірних похідних та активації карбонільованих сполук [92]. Його структурна конформація, розміри та полярність мають значення для, перше, транспортування молекули між клітинними компартментами; друге, для визначення її функцій у клітинному метаболізмі. Залученість молекули КоА до метаболічних шляхів різноманітна, наприклад, синтез і окислення жирних кислот, цикл трикарбонових кислот, виробництво енергії, метаболізм ліпідів і амінокислот, кетогенез [95] (рис.1.4).

Орім безпосереднього впливу на метаболізм, КоА та його похідні також беруть участь у регуляції білків шляхом посттрансляційних модифікацій (ПТМ) [96] (рис.1.4).

Найпоширенішим похідним КоА є ацетил-КоА, який є метаболічним проміжним продуктом у виробництві енергії при катаболізмі вуглеводів, ліпідів, білків та етанолу. Співвідношення ацетил-КоА/КоА відображає і контролює загальний енергетичний стан клітини. При цьому ацетил-КоА діє як найпоширеніший внутрішньоклітинний донор ацетильних груп [97]. Численні структурні білки та метаболічні ферменти можуть регулюватися за допомогою перенесення залишків ацетильної групи на залишки лізину [98]. Ацетилювання білка може впливати на його функцію, змінюючи каталітичну активність, локалізацію, взаємодію з іншими молекулами та період напіврозпаду [99]. Наприклад, ацетилювання гістонів, перший ідентифікований і найбільш вивчений процес ацетилювання білків, є фундаментальним механізмом, який контролює доступність хроматину та експресію генів, використовуючи пул ацетил-КоА ядра [100]. Першим виявленим субстратом ацетилювання, окрім гістонів, був тубулін, білок, що відіграє структурну роль у цитоплазмі [101].

КоА також опосередковує ковалентне перенесення інших ацильних фрагментів до білків для динамічної модуляції їхньої активності. Кілька метаболітів ацил-КоА, включно з сукциніл-КоА, пропіоніл-КоА та пальмітоіл-КоА, можуть бути ковалентно приєднані до бічних ланцюгів лізинів білків у різних клітинних компартментах. Ацилювання білків відіграє важливу роль у регуляції клітинних процесів, таких як експресія генів і доступність хроматину, регуляція метаболізму, білок-мембранні взаємодії, стабільність білків і фолдинг [102].

Іншою КоА-залежною посттрансляційною модифікацією білків є 4'-фосфопантотенілювання (4ФФПТ). Воно полягає у ковалентному приєднанні 4'-фосфопантотеїну від КоА до специфічних залишків серину в певних білках, що призводить до їхньої активації [103].

Нещодавно було описано новий механізм модифікації білків на основі редокс-регуляції, який отримав назву КоАлювання і полягає в ковалентній модифікації клітинних білків за допомогою КоА. В умовах окислювального та метаболічного стресу КоА може функціонувати як низькомолекулярний антиоксидант, що запобігає переокисленню білків [13]. Крім того, КоА модифікує молекулярну масу і заряд білків, що може впливати на їхню стабільність, субклітинну локалізацію та ферментативну активність [90].

Наприкінці 1970-х років з'явилися докази того, що КоА утворює дисульфідні зв'язки з –SH групами цистеїнових залишків білків. Зокрема, було виявлено, що в спорах бактерій 42% від загального клітинного пулу КоА знаходиться саме в дисульфідному зв'язку з білками [104], [105]. Через відсутність технологічного прогресу в методології досліджень наслідки цієї модифікації не вивчалися до недавнього часу, що відкрило потенціал КоА як антиоксиданту та редокс-сигналізації не лише у бактерій, але й у вищих організмів [13], [106], [107], [108].

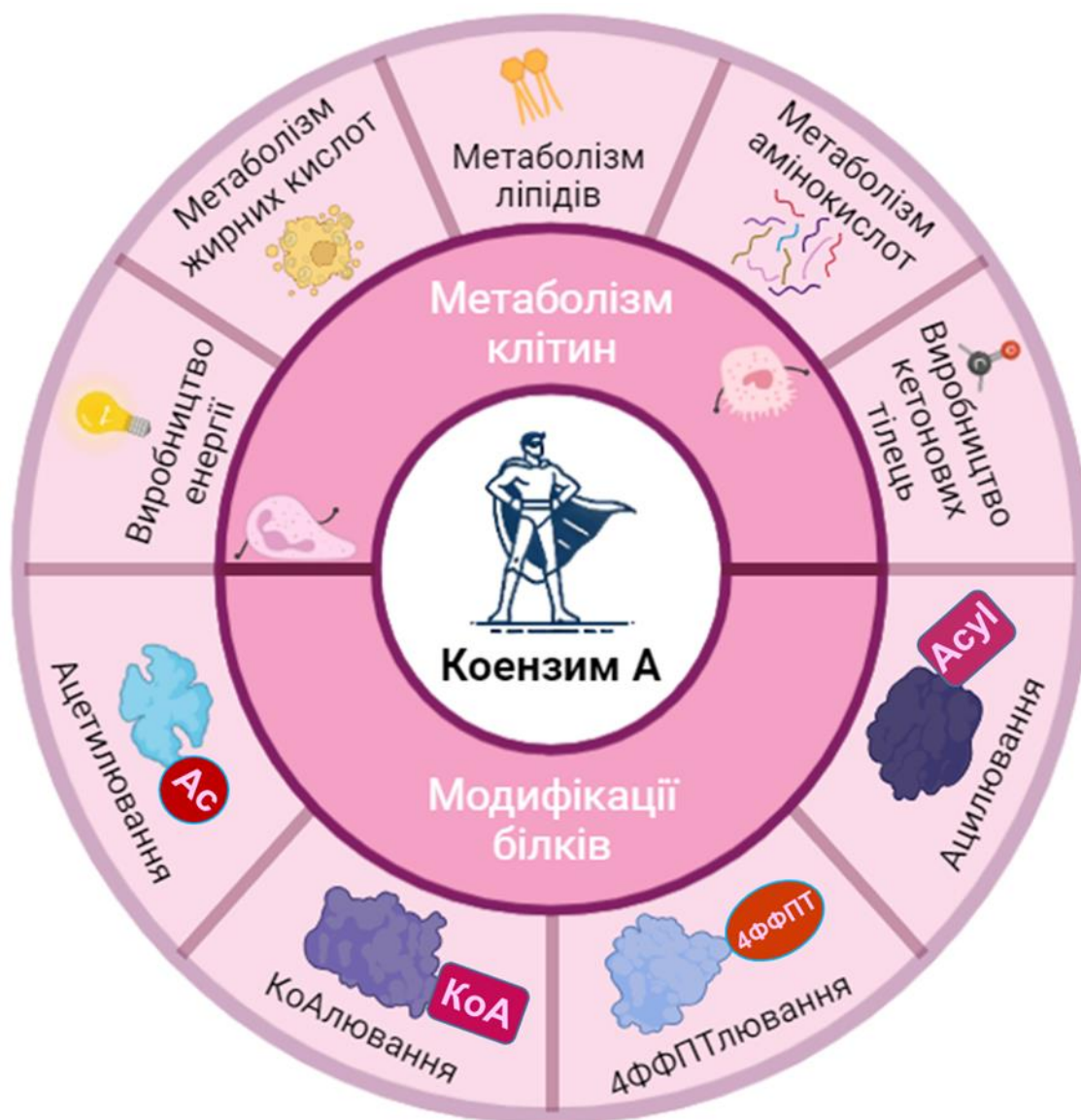


Рис. 1.4. Функції коензиму А. КоА бере участь у різноманітних клітинних процесах, які можна розділити на метаболічні та функції модифікації білків

1.2.3. Патології при порушенні метаболізму КоА

Численні дослідження довели, що загальний рівень клітинного КоА змінюється залежно від джерела поживних речовин, доступних організму або клітинам. Здатність клітин регулювати рівень КоА є життєво важливою для метаболізму тканин і органів. Найбільш вивченим механізмом регуляції КоА є механізм за участю пантотенової кінази ПАНК. Зазвичай, розщеплення

метаболітів, які генерують енергію, зокрема пірувату, жирних кислот, гормону інсуліну та глюкози, знижує біосинтез КоА. І навпаки, глюкокортикоїди, глюкагон і гіполіпідемічні препарати, які беруть участь у катаболічних процесах, підвищують продукцію КоА [109], [110]. Відповідно, гомеостаз КоА порушується за патологій, пов'язаних з метаболічним стресом, таких як діабет [111] та голодування [112], надмірне споживання алкоголю [113] та рак [114]. Крім того, здатність належним чином регулювати рівень КоА в клітинах має вирішальне значення, а порушення регуляції синтезу КоА асоціюється з кількома нейродегенеративними захворюваннями. Наприклад, мутації в генах ПАНК2 і КоАСИ можуть призвести до зниження рівня КоА і часто спостерігаються при важкому нейродегенеративному розладі, відомому як нейродегенерація з накопиченням заліза в мозку (NBIA) [115].

Ацетил-КоА, як ключова молекула метаболізму та основний виробник енергії, відіграє важливу роль в інвазії та міграції раку. Окрім своєї ролі у забезпеченні циклу Кребса та біосинтезі жирних кислот, ацетил-КоА є онкометаболітом і разом з α -кетоглутаратом та S-аденозилметіоніном бере участь в епігенетичному репрограмуванні, яке з часом може індукувати генетичні зміни цих метаболітів у пухлинах, що сприяють їх утворенню [116]. Фактично, ацетил-КоА пов'язує метаболізм ліпідів з ацетилюванням гістонів, створюючи більш складну регуляторну систему, яка впливає на ріст, агресивність і лікарську стійкість злоякісних пухлин, таких як гліобластома, рак молочної залози і гепатоцелюлярна карцинома.

Сигнальний шлях фосфоінозитид-3-кінази (PI3K) часто виявляється патологічно активованим при ракові. Нещодавнє дослідження показало, що активована PI3K регулює біосинтез КоА *de novo*, де лімітуючі ферменти біосинтезу КоА, ПАНК2 і ПАНК4, є прямими субстратами PI3K [117]. Відомо, що деякі метаболіти, такі як фумарат, можуть ковалентно зв'язуватися з тіловими групами білків, таких як PTEN, та пептидів, таких як глутатіон, і згодом змінювати їх функцію та сприяти розвитку злоякісних фенотипів [118], [119].

1.3. КоАлювання білків

1.3.1. КоАлювання як нова посттрансляційна модифікація білків. Цистеїн є однією з найбільш еволюційно консервативних амінокислот і найменш поширеною в протеомі людини [120]. Незважаючи на це, залишки цистеїну відіграють важливу роль у визначенні структури та функції білка, утворюючи між- та внутрішньомолекулярні дисульфідні зв'язки, координуючи іони металів та беручи участь у каталітичних реакціях. Крім того, білкові цистеїни є мішенями для численних посттрансляційних модифікацій, які слугують для модуляції активності, регуляторних взаємодій та локалізації різноманітних білків. До них належать S-ацилювання, окиснення, S-нітרוзування, персульфгідрування та S-тіолування [121]. Нещодавно спільними зусиллями кількох лабораторій було відкрито новий спосіб регуляції окисно-відновних процесів, що включає ковалентну модифікацію цистеїнових залишків клітинних білків за допомогою КоА, ця модифікація була названа КоАлюванням білків [13].

Розробка методики тандемної мас-спектрометрії з рідинною хроматографією (PX-МС) [13] та отримання унікальних моноклональних анти-КоА антитіл, специфічних до КоАльованих білків [122], надали можливості провести скринінг білків, кон'югованих з КоА, у різних модельних організмах на рівні всього протеому. На сьогоднішній день ідентифіковано понад 2100 КоАльованих білків в клітинах і тканинах бактерій і ссавців, які підлягали оксидативному або метаболічному стресові [13], [108]. Процес КоАлювання білків спостерігався також при дослідженні амеби *Dictyostelium discoideum* [107], *C. elegans*, рослин (дані не опубліковані) та спор бактерій [104], [105], [106]. Цікавою знахідкою став факт того, що в клітинах і тканинах, у відповідь на оксидативний стрес, патерн КоАльованих білків відрізняється від патерну тих білків, до яких приєднується антиоксидант глутатіон. Це свідчить про те, що GSH і КоА регулюють окисно-відновні процеси через різні білкові мішені [13].

Дослідження продемонстрували, що КоА може ефективно модифікувати цистеїни білків в умовах *in vitro* в присутності димеру КоА-SS-КоА або окислювальних агентів, таких як H_2O_2 . У клітинах було виявлено багато сигнальних білків, КоАльованих у відповідь на окислювальний або метаболічний стрес, серед яких гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (GAPDH) [15], пероксиредоксин 5 (PRDX5) [123], Аврора кіназа А (AurKA) [14], транскрипційний фактор AgrA [124], нуклеозиддифосфаткіназа (NDPK) [125], білок-супресор пухлин p53 тощо. Сукупність КоАльованих білків у клітинах з індукованим стресом було названо КоАломом (CoAlome).

1.3.2. Молекулярні механізми процесів

КоАлювання/деКоАлювання. На сьогоднішній день молекулярні механізми циклів КоАлювання/деКоАлювання білків не були повністю досліджені. Припускаємо, що за аналогією до системи GSH/Grx, запропонована система КоА/КоА_{гх} має включати КоА-трансферази (КоАСТ), КоА-редоксин (КоА_{гх}) та КоА-дисульфідредуктази (КоАДР). Однак, ідентифікувати та охарактеризувати ці ферменти все ще належить в майбутньому, особливо в клітинах і тканинах ссавців.

Відносно висока константа асоціації тіолової групи ($\text{pK}_a = 9,8$) молекули КоА може потребувати допомоги спеціальних ферментів, які б асистували відщепленню воднів і перенесення КоА на тіоли цистеїну, так як, наприклад, потребує глутатіон, що використовує глутатіонтрансферазу для модифікації білків. Проте біоінформаційний аналіз КоАльованих пептидів виявив, що модифікований цистеїн (з високим pK_a) оточений переважно гідрофобними і позитивно зарядженими амінокислотами, які знижують pK_a та роблять цистеїн та тіолову групу КоА, що потрапляє у близькість до цього цистеїну, більш реакційно здатними до самостійного донорства атомів водню. На основі цих даних та ефективного методу КоАлювання білків *in vitro* без залучення спеціальних ензимів, було припущено, що за умов окисдативного стресу КоASH може ковалентно

модифікувати залишки цистеїну в середовищі основних амінокислот, оскільки вони знижують загальний рКа і підвищують швидкість реакції з H_2O_2 та іншими окиснювальними сполуками [126], [127].

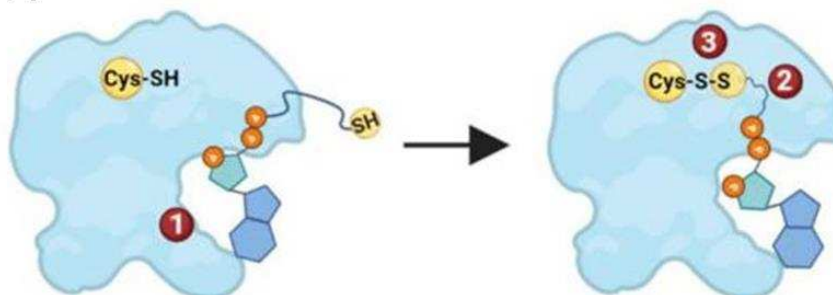
Що стосується системи редуктаз, то окисно-відновна система КоА потенційно може включати ферменти для видалення КоА модифікації з білків після того, як умови повертаються до норми. КоА-дисульфідредуктази були охарактеризовані і вивчені у багатьох бактеріальних і деяких архейних видів, але не були виявлені в клітинах ссавців. Вони підтримують співвідношення КоASH/КоА-SS-КоА, каталізуючи відновлення дисульфідів КоА до КоASH з використанням НАДФ як донора електронів. Прокаріотичні КоАДР - це переважно гомодимерні ферменти, що належать до підгрупи пероксидаза-оксидаза-редуктаза (ПОР) сімейства флавіндисульфідредуктаз [128]. Натомість вони використовують один окисно-відновний активний цистеїн для утворення змішаного дисульфіду з КоА в якості нефлавінового окисно-відновного центру. Також нещодавно за допомогою хроматографії та ІФА було виявлено, що ферменти з лізатів *B. subtilis*, а саме YtpP і тіоредоксин А (TrxA), мають здатність відщеплювати КоА від білків (потенційні КоАредоксини) [129], проте, їх специфічність щодо видалення КоА не була перевірена.

1.3.3. Типи взаємодії молекули КоА з білками. Для глибшого розкриття антиоксидантної ролі процесу КоАлювання в клітині важливим є розуміння того, як дана ПТМ впливає на подальшу сигналізацію та функції модифікованих білків [130]. На основі сучасних літературних даних та аналізу стабілізаційних взаємодій КоА з білками у відомих структурах було запропоновано три підходи до класифікації способів зв'язування КоА з білками-мішенями [130] (рис. 1.5). Перший запропонований спосіб ініціюється стабілізацією 3'-фосфорильованого фрагмента АДФ КоА в межах гідрофобної ділянки, що складається з ароматичних та/або неполярних аліфатичних амінокислот (напр. АТФ-зв'язуючий сайт). Приєднання

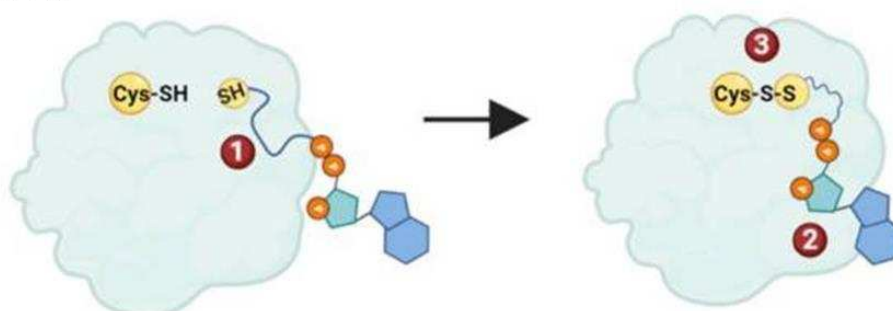
аденінового кільця викликає конформаційні зміни, які дозволяють пантетеїновому хвосту прийняти оптимальне положення для отримання доступу до зануреного або поверхневого білкового цистеїну з подальшим утворенням дисульфідного зв'язку (рис.1.5 - Тип I). Цей спосіб був запропонований як механізм приєднання молекули КоА до, наприклад, білка Аврори кінази А [14]. Другий запропонований спосіб КоАлювання передбачає спочатку зв'язування і стабілізацію пантетеїнового хвоста КоА. Це створює основу для зв'язування фрагмента АДФ з подальшим утворенням дисульфідного зв'язку (рис.1.5 - Тип II). Залишки, розташовані поруч із сайтом зв'язування КоА, відіграють важливу роль у правильній орієнтації пантетеїнового хвоста для отримання доступу до цистеїнового залишку протеїну. Тип III вимагає одночасного зв'язування і стабілізації фрагмента АДФ і пантетеїнового хвоста КоА (рис.1.5 - Тип III). Розташування пантетеїнового хвоста має бути оптимальним для приєднання тіольної групи Cys залишку білка та полегшеного утворення міжмолекулярного дисульфідного зв'язку між КоА і білком. Цей спосіб зв'язування КоА був запропонований для КоАлювання GAPDH [108].

1.3.4. Загальні функції білкового КоАлювання. На сьогоднішній день характеристика і потенційний функціонал процесу КоАлювання полягає в наступному (рис.1.6): а) виникає як антиоксидантна відповідь під час окислювального та метаболічного стресу і ефективно редукується після відновлення клітинного окислювально-відновного балансу, б) ступінь КоАлювання білків залежить від рівня КоА в клітинах. Наприклад, клітини HEK293/Pank1 β , концентрація КоА в яких у 6-8 разів вища, ніж у батьківських клітинах HEK293, демонструють значно вищий рівень КоАльованих білків [13], в) приєднання КоА пригнічує активність модифікованих ензимів, а в деяких випадках підсилює їх активність, наприклад, p38 кіназа активується через алостеричне зв'язування КоА, г) зв'язування КоА може регулювати субклітинну локалізацію, стабільність або взаємодії КоАльованих білків між собою, оскільки пантотеїн та АДФ-фрагмент КоА можуть бути скаффолдами між білками [124].

Тип I



Тип II



Тип III

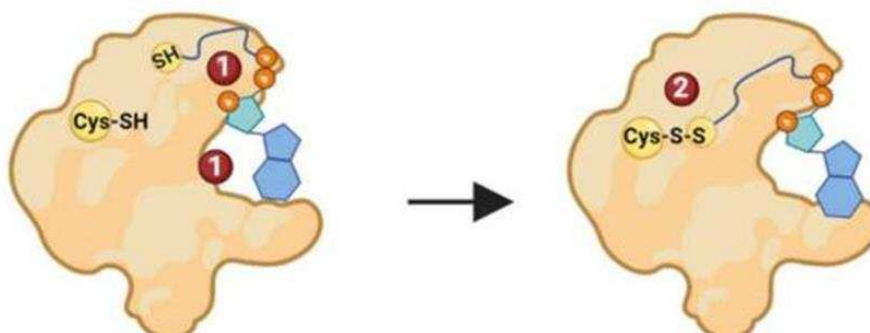


Рис.1.5. Способи зв'язування КоА з білками. У першому способі спочатку з білком зв'язується АДФ-фрагмент КоА, що створює передумови для стабілізації пантетеїнового хвоста з подальшим утворенням змішаного дисульфідного зв'язку. У II способі КоАлювання білка ініціюється стабілізацією пантетеїнового хвоста КоА, що створює передумови для зв'язування і стабілізації АДФ-фрагмента КоА та утворення змішаного дисульфідного зв'язку. У режимі III одночасно зв'язуються і АДФ-фрагмент, і пантетеїновий хвіст білка, після чого утворюється змішаний дисульфідний зв'язок. Різні етапи КоАлювання позначені цифрами [130]

Біоінформаційний аналіз КоАльованих білків показав, що модифіковані молекулою КоА залишки цистеїну часто розташовані в безпосередній близькості до мотивів, які визначають їх субклітинну локалізацію, включно з сигналом ядерної локалізації. Мутаційний аналіз одного з таких залишків цистеїну в протеїнкіназі, що бере участь у регуляції клітинного циклу, показав, що він модулює її ядерну локалізацію як клітинну відповідь на вплив оксидативних агентів (неопубліковані дані).

Процес КоАлювання білка привертає чималу увагу через його потенційний вплив на різні захворювання, включно з метаболічними розладами, такими як ожиріння [13], та нейродегенеративними, наприклад, хворобою Альцгеймера [131]. Більше того, нещодавні дані вказують на зв'язок між КоАлюванням білків та чоловічим безпліддям, впливаючи на окисно-відновну регуляцію під час дозрівання сперматозоїдів [132]. Проте і надалі зберігається прогалина в розумінні складних молекулярних механізмів, що лежать в основі КоАлювання білків у фізіологічному контексті та його зв'язок з патофізіологією захворювань.

1.3.5. Вплив КоАлювання на активність білків. Було продемонстровано, що КоАлювання *in vitro* інгібує ферментативну активність кількох метаболічних та сигнальних білків, які містять залишок цистеїну в каталітичній кишені [13]. До них належать аконітаза, креатинкіназа, піруватдегідрогеназа кіназа 2 (PDK2), гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (GAPDH), гідроксиметилглутарил-КоА-синтаза (HMGCS2), кіназа Аврора А і білок-супресор метастазування NME1 [13], [14], [123], [125]. Для деяких інших протеїнкіназ, що КоАлюються в умовах оксидативного стресу за залишками цистеїну, які не розташовані в ділянці активаційної кишені, спостерігався алостеричний спосіб активації. Було показано, що багато факторів транскрипції та регуляторів транскрипції, особливо у бактерій, КоАлюються у відповідь на оксидативний стрес у клітинах. *In vitro* КоАлювання редокс-чутливого транскрипційного фактора AgrA за залишком цистеїну в

ДНК-зв'язуючому домені призвело до пригнічення його зв'язування з ДНК, що, найімовірніше, було опосередкованим стеричною інтерференцією [124].

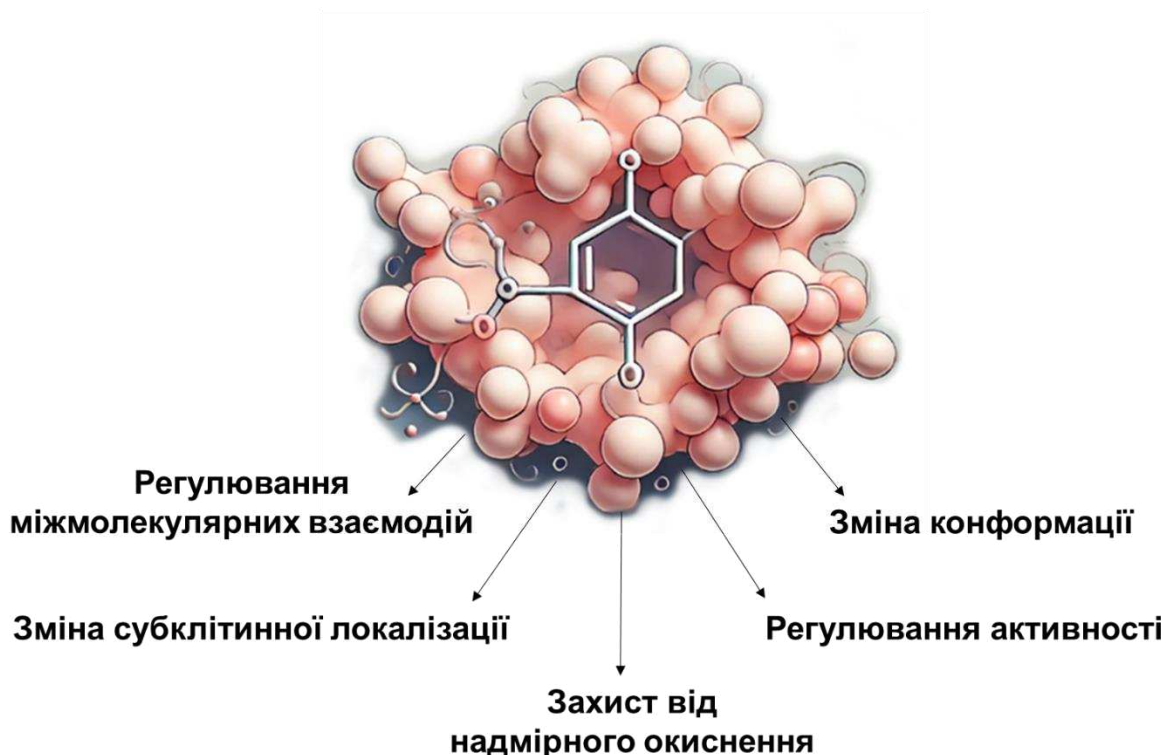


Рис.1.6. Функції КоАльованих білків. КоАлювання білків - це ковалентне приєднання КоА до тіольної групи цистеїну білка через міжмолекулярний дисульфідний зв'язок під час окисного стресу. Це антиоксидантна реакція, яка захищає білок від надмірного окислення і регулює активність модифікованого білка шляхом блокування каталітичної частини або індукції конформаційних змін. Це може змінювати регуляторні взаємодії між білками, утворюючи нові нековалентні взаємодії з іншими білками

Встановлено, що тривалий оксидативний стрес може спричиняти надлишкове окислення поверхневих сульфгідрильних залишків цистеїну до сульфокислот, що призводить до інактивації та подальшої деградації модифікованих білків. Було продемонстровано, що *in vitro* КоАлювання рекомбінантного GAPDH *S. aureus* захищає фермент від незворотного окислення пероксидом водню та пов'язаної з ним втрати активності [15]. Пригнічення

активності GAPDH, що спостерігалось під час КоА модифікації, повністю відновлювалося після додавання агенту ДТТ, тобто стан інгібування активності ферменту КоА модифікацією був оберненим; за що можливо є відповідальною КоАДР за фізіологічних умов.

Також продемонстровано, що рекомбінантний NME1 ефективно КоАлюється *in vitro*, а індукція оксидативного чи метаболічного стрес сприяють КоАлюванню NME1 в клітинах в умовах *in vivo* [125]. Крім того, при проведенні *in vitro* КоАлювання рекомбінантного NME1 спостерігалось інгібування NDPK (нуклеозид дифосфат кіназої)-активності, такий механізм інгібування є зворотнім та відновлюється за допомогою додавання ДТТ. Виявлено, що молекула КоА може функціонувати як конкурентний АТФ-зв'язуючий інгібітор NDPK-активності NME1.

Відомо, що ковалентні ПТМ індують значні конформаційні зміни модифікованих білків, таку саму властивість має і процес КоАлювання. Біохімічні, біофізичні, кристалографічні та клітинні підходи були використані для виявлення унікального способу зв'язування та регуляції кінази Аврора А за допомогою КоА, що включає значні конформаційні зміни [14]. Було виявлено, що КоА є специфічним АТФ-конкурентним інгібітором Аврори А *in vitro*. Структурна валідація способу зв'язування КоА підтверджує що 3'-фосфо-АДФ-фрагмент молекули КоА використовує Thr217 у сайті зв'язування АТФ для стабілізації, вочас позиціонує пантетеїновий хвіст так, щоб його тіоловий залишок міг утворити дисульфідний зв'язок з тіолом Cys290, розташованим у петлі активації. Внаслідок такого приєднання, модель якого було названо механізмом «подвійного якоря» («dual anchor»), спостерігається значне інгібування активності Аврори А, адже стає неможливим фосфорилювання за сайтом Thr288 (рис.1.7). Таким чином ці дані свідчать про те, що Аврора А є новою мішенню для ключового метаболічного регулятора КоА, що відкриває двері для розробки нового класу низькомолекулярних інгібіторів, які використовують механізм «подвійного якоря».

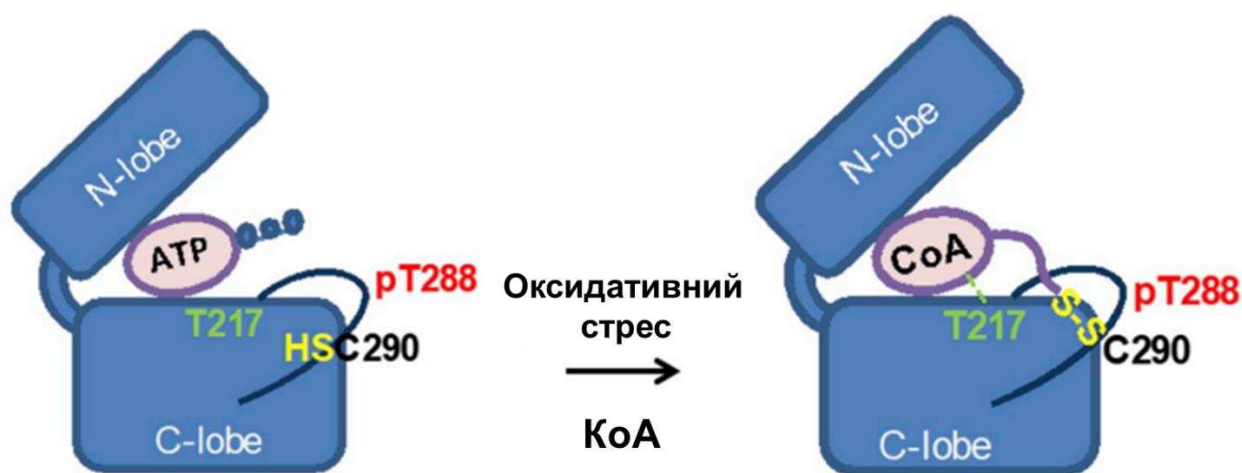


Рис. 1.7. Схематична ілюстрація, що демонструє ключові особливості механізму «подвійного якоря» взаємодії КоА з Thr217 та Cys290 в Аврорі А за нормальних умов та умов окисидативного стресу [14]

1.4. Кіназа рибосомального білка S6

S6K це серин-треонінова кінази, що належить до кіназної родини AGC, названа так в честь трьох її складових компонентів: протеїнкіназа А, протеїнкіназа G та сГМФ-залежна протеїнкіназа. Родина білків S6-кінази ссавців (S6K) складається з двох білків: S6K1 і S6K2.

В загальному вигляді S6K1 складається з кіназного домену, меншого N-термінального домену та більшого C-термінального домену, який здатен зв'язуватись з АТФ [133]. Відомо декілька ізоформ цієї кінази, які відрізняються як за будовою, так і за функціями. p70S6K1 - це переважна ізоформа S6K1, що синтезується з гена *RPS6KB1* [134], [135], саме на p70S6K1 буде акцентована увага в даній роботі. У той час також існують такі ізоформи як p85S6K1 і p60S6K1 [136], [137], [138], що транслюються з того ж зрілого транскрипту мРНК, що й p70S6K1, проте з використанням альтернативних стартових сайтів трансляції.

S6K2 кодується геном *RPS6KB2* і, подібно до S6K1, існує в клітині у двох різних ізоформах: p54S6K2 і p56S6K2, які транслюються з одного і того ж зрілого

транскрипту мРНК за допомогою використання альтернативних сайтів старту трансляції [139], [140].

1.4.1. Доменна структура ізоформ S6K1. Білок S6K1 побудований з кількох важливих регуляторних доменів. Послідовність кінази починається з кислого N-кінцевого домену, який містить сигнальний мотив TOR (TOS) для зв'язування білка Raptor у комплексі з TOR-кіназою. Ізоформа p85S6K1 має додаткові 23 амінокислоти на N-термінальному домені, що містять сигнал ядерної локалізації (NLS), проте всі подальші нумерації амінокислот та послідовностей будуть наведені відносно p70S6K1. Після N-кінцевого знаходиться каталітичний домен. Подібно до інших кіназ родини AGC, каталітичний домен містить T-петлю (T229), яка необхідна для максимальної активації p70S6K1 внаслідок фосфорилювання PDK1. Далі йде лінкерна ділянка, яка містить два сайти фосфорилювання: T389 на гідрофобному мотиві, сайт фосфорилювання для mTOR, та S371 на поворотному мотиві («turn motif»). Нарешті, C-кінцевий домен, який має чотири сайти фосфорилювання (S411, S418, S421 і S424) що собою формує автоінгібіторний домен, який в неактивній конформації взаємодіє з N-кінцевим, щоб стерично запобігти кіназному домену приєднуватися до цільового субстрату [9] (рис.1.8).

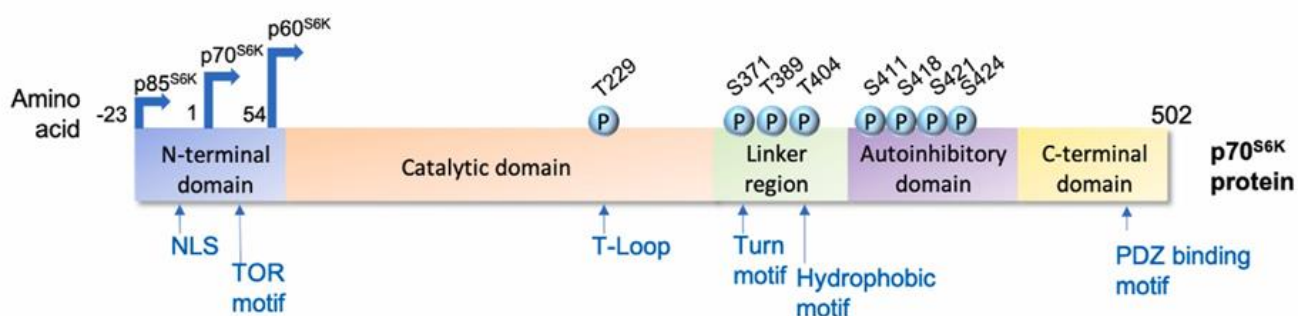


Рис.1.8. Доменна структура ізоформ S6K1 (p70-S6K1, p85-S6K1, p60-S6K1) та сайти фосфорилювання [9]

1.4.2. Функціональна роль S6K1 та залученість у патологіях. S6K1 найбільш відома своєю регуляторною роллю в синтезі білка та рості клітин, що досягається шляхом фосфорилювання свого первинного субстрату, рибосомального білка S6, після стимуляції мітогенами чи ростовими факторами. До головних мішеней цього протеїну належать PDCD4 (білок програмування смерті клітини 4), eIF4B (еукаріотичний фактор ініціації трансляції 4B), та eEF2K (кіназа еукаріотичного фактора елонгації-2), саме фосфорилювання цих мішеней забезпечує стимуляцію синтезу білку. Також досліді вказують, що S6K1 забезпечує виживання клітини блокуванням апоптозу, а саме фосфорилюванням з подальшим інгібуванням протеїнів сигнальних шляхів, що програмують смерть клітини. Наприклад, S6K1 здатна фосфорилювати та інгібувати білок GSK3 (глікоген синфазна кіназа 3) або проапоптозний білок BAD (Bcl-2-пов'язаний зі смертю промотер) [141], [142]. S6K1 залучена також до регуляції транскрипційних процесів та процесу сплайсингу мРНК [143], приймає участь в організації цитоскелета. Фосфорильована S6K1 зв'язується з актином та спричинює його реорганізацію, що може забезпечувати міграцію клітин [143].

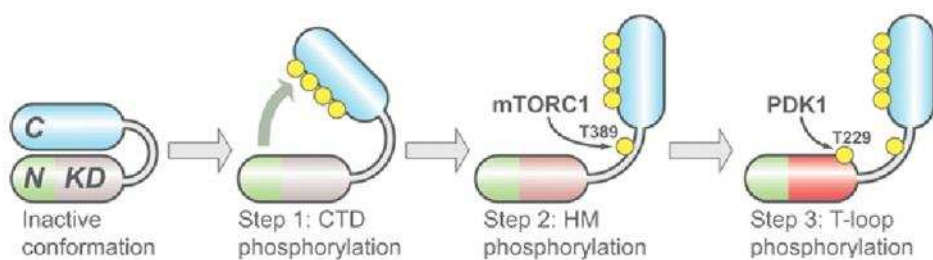
Завдяки своїй ключовій ролі в синтезі білка та регуляції клітинного циклу, p70S6K1 є залученою до великої кількості захворювань людини, таких як ожиріння, діабет та рак. Підвищена активність p70S6K1 спостерігалася у пацієнтів з раком молочної залози [144], шийки матки [145], товстої кишки [146], печінки [147], шлунку [148], жовчного міхура [149] та інших типах пухлинних захворювань. Існують також різні маркери прогресії раку, на які може впливати регуляція активності p70S6K або її конститутивна активація, такі як стовбуровість ракових клітин (ракові клітин, що нагадують стовбурові, зокрема їх здатність до самовідновлення і ініціювання росту пухлин), епітеліально-мезенхімальний перехід [150], [151], [152] та резистентність до лікарських препаратів [153].

1.4.3. Регуляція S6K1 посттрансляційними модифікаціями

1.4.3.1. Фосфорилювання/дефосфорилювання S6K1. Активація p70S6K включає поступові конформаційні зміни та фосфорилювання за багатьма сайтами. Як уже згадувалося, білок має вісім відомих сайтів фосфорилювання серину/треоніну, з яких три (T229, S371 та T389) є критичними для активності кінази. Сигнальний шлях інсуліну активує mTOR через PI3K/PDK/АКТ для активації p70S6K. Однак було показано, що інші даунстрім ефектори PI3K, такі як PKC ζ і PKC λ , а також G-білки родини Rho (Cdc42 та Rac), також сприяють максимальній активації p70S6K [1], [154]. На сьогодні існують дві моделі активації p70S6K – традиційна модель та альтернативна модель, які відрізняються послідовністю етапів фосфорилювання. Деталі послідовних кроків активації обох моделей зображені та описані на рис. 1.9.

Окрім Ser/Thr кіназ, p70S6K також може фосфорилюватися рецепторними тирозинкіназами. Наприклад, вона може бути фосфорилюваною за тирозином у позиції Y39 за участі шляху PDGFR/Src [155]. Вважалося, що субклітинна локалізація p70S6K є цитоплазматичною, доки дані досліджень не вказали на те, що p70S6K може транспортуватися в ядро, і цей процес може бути стимульований фосфорилюванням T389 [156], [157].

А. Модель 1: Конвенційна



Б. Модель 2: Альтернативна

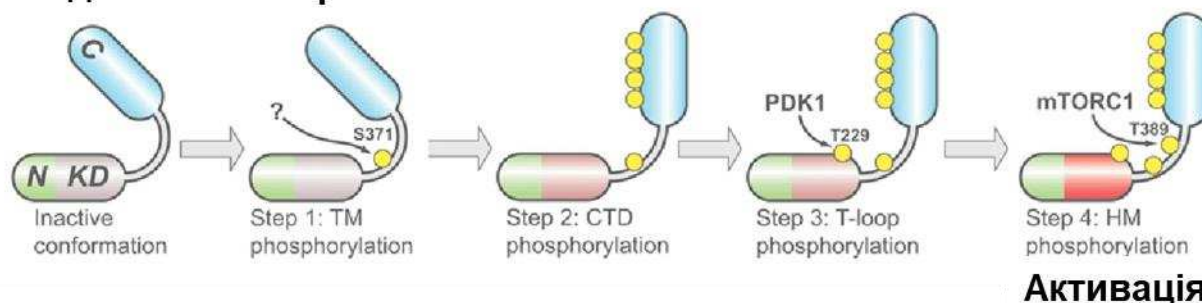


Рис.1.9. Покрокова активація S6K1 через фосфорилювання за багатьма сайтами. (А) Модель 1: традиційна модель. Взаємодія між С- і N-кінцевими доменами призводить до аутоінгібування S6K1. Крок 1: мітогени сприяють фосфорилюванню С-кінцевого домену (С) на кількох ділянках, що індукує більш розслаблену конформацію. Крок 2: вивільнення аутоінгібіторного С-кінцевого домену (CTD) дозволяє кіназі mTORC1 отримати доступ до НМ, і таким чином фосфорилювати сайт Thr389. Крок 3: вивільнення аутоінгібіторного CTD та фосфорилювання Thr389 дозволяє фосфорилювання у Т-петлі сайту Thr229 під впливом PDK1, що призводить до повної активації S6K1. Фосфо-Thr389 служить як місце зв'язування для PDK1.(В) Модель 2: альтернативна модель. Крок 1: невідома кін аза фосфорилює неактивну форму S6K за сайтом ТМ Ser371. Крок 2: мітогени сприяють фосфорилюванню С-кінцевого домену (С) на кількох ділянках, що індукує більш розслаблену конформацію. Крок 3: вивільнення аутоінгібіторного С-кінцевого домену надає доступ PDK1 до Т-петлі та забезпечує фосфорилювання сайту Thr229. Крок 4: фосфорилювання Thr229 сприяє фосфорилюванню НМ за сайтом Thr389 за участі mTORC1. KD — кін азний домен; N — N-кінцевий домен [1]

З іншого боку, процес деактивації p70S6K відбувається за допомогою дефосфорилювання. Однак, на відміну від фосфорилювання, механізми дефосфорилювання p70S6K менш детально охарактеризовані. Фосфатази, які, як було показано, взаємодіють з p70S6K та дефосфорилюють його, включають білкову фосфатазу 2A (PP2A) і PHLPP [158], [159]. Цікаво додати, що шлях PI3K не тільки впливає на фосфорилювання p70S6K, але й водночас інгібує дефосфорилювання кінази, таким чином підсилюючи її активність. Показано [160], що субодиниця p85 PI3K може опосередковувати утворення трьохкомпонентного комплексу з p70S6K та білком FKBP-12, асоційованим з рапаміцином (FRAP), тим самим інгібуючи дефосфорилювання кінази за допомогою PP2A та підтримуючи стійку активацію p70S6K.

Окрім фосфорилювання, S6K1 регулюється низкою інших ПТМ у клітинах: убіквітинуванням, ацетилюванням та О-ГлцНАцилюванням ((GlcNAcylation), форма глікозилування), які були виявлені на сьогоднішній день.

1.4.3.2. Убіквітинування S6K. Існує два способи ковалентного приєднання убіквітину до клітинних білків: моно- та поліубіквітинування. Моноубіквітинування білків наразі розглядається як сигнал, що запускає внутрішньоклітинний транспорт. Тоді як однією з найбільш вивчених функцій поліубіквітинування є деградація білків. Завдяки цій модифікації білки спрямовуються до протеасоми, яка деградує й утилізує пошкоджені або неправильно складені білки. Процес убіквітинування має широкий спектр функцій, включаючи клітинну сигналізацію, апоптоз, процесинг білків, імунну відповідь та репарацію ДНК. Було продемонстровано, що процес поліубіквітинування притаманний обом ізоформам кінази, як S6K1, так і S6K2. Доведено, що модифікація убіквітинування відбувається в кіназному домені S6K і значно підвищується при делеціях N- або C-кінцевих регуляторних доменів, що вказує на роль цих двох ділянок у захисті S6K від убіквітинування і подальшої деградації

[161]. Убіквітинування ізоформ S6K координується сигнальними шляхами, індукованими мітогенними стимулами та позаклітинними стресами. Індукція сигнальної трансдукції сироваткою та ростовими факторами значно підвищує рівень убіквітинування S6K, тоді як обробка клітин ультрафіолетом або стауроспорином має протилежний ефект. Крім того, було виявлено, що рівень фосфорилювання/активації S6K, що виникає у відповідь на різні клітинні стимули не має безпосереднього впливу на процес убіквітинування. Це дослідження дозволяє припустити, що убіквітинування і подальша протеасомна деградація S6K контролюються сигнальними шляхами, що відповідають на стимули поживних речовин або стресів, і які є асоційованими з компонентами механізму убіквітинації [10]. Також є дані, які вказують на те, що S6K1 специфічно взаємодіє з убіквітинлігазою ROC1 в умовах *in vitro* та *in vivo*. Крім того, надмірна експресія ROC1 призводить до збільшення убіквітинування S6K1 [162].

1.4.3.3. Ацетилювання S6K. S6K також зазнають ацетилювання за залишками лізину. Ацетилювання S6K1 ідентифікували за лізином 516 - ділянки, близької до С-кінця кінази, яка є висококонсервативною серед ортологів S6K1 хребетних тварин. Ацетилювання ендогенної S6K1 у цій ділянці потужно індукується при стимуляції факторами росту. Хоча для індукції обох модифікацій і ацетилювання, і фосфорилювання S6K1 необхідна стимуляція факторами росту, ці події виявляються функціонально незалежними. Дійсно, експерименти з використанням інгібіторів активації S6K1 та впливу на клітини різних стресів вказують на те, що ацетилювання S6K1 може відбуватися за відсутності фосфорилювання і навпаки. Припускається, що ацетилювання K516 може слугувати для модуляції важливих кінаzoneзалежних функцій S6K1 у відповідь на сигнали від факторів росту [11].

Щодо безпосередньо механізму регуляції S6K шляхом ацетилювання, було показано, що після стимуляції мітогенними факторами S6K взаємодіють з

ацетилтрансферазами p300 та p300/CBP-асоційованим фактором (PCAF). При додаванні агенту трихостатину А інгібуються гістонові деацетилази класу I/II (HDAC), а при обробці нікотинамідом інгібуються сиртуїнові деацетилази, кожен з процесів забезпечує підсилення ацетилювання S6K1 і S6K2 за рахунок зниження рівню їх деацетилювання [163].

1.4.3.4. О-ГлкНАцилювання S6K. Кілька досліджень припустили, що ожиріння пов'язане з підвищеною активністю mTOR, і дефіциту його даунстрім медіатора S6K1 може захистити мишей від інсулінорезистентності, спричиненої харчуванням та віком, а також забезпечити пригнічення запальних процесів, викликаних активацією макрофагів. Було визначено, що ОГТ (О-ГлкНАц трансфераза) є ключовим регулятором шляху mTOR/S6K1. Показано, що О-ГлкНАцилювання пригнічує mTORC1 сигнальний шлях, прямо впливаючи на S6K1. О-ГлкНАцилювання модифікація S6K1 інгібуює послідовні етапи фосфорилювання кінази, що необхідні для її активації, це призводить до пригнічення транскрипції прозапальних генів [12].

1.4.3.5. КоАлювання S6K1. У співробітництві з лабораторією Структурної та молекулярної біології в UCL було виявлено КоАлювання багатьох кіназ, субстратна специфічність яких варіювала від білків до ліпідів, вуглеводів і нуклеотидів [13], [130]. Одним із визначених ензимів, що піддаються КоАлюванню у відповідь на оксидативний стрес, виявилася кіназа рибосомального білка S6 (S6K1). Цікаво, що саме завдячуючи S6K1, було ідентифіковано ген ферменту, що залучений в два останні етапи біосинтезу КоА - КоА-синтази, що виявилася білковим партнером S6K1 за даними з використанням двогібридної системи дріжджів [164]. Однак на жаль доказів функціональної значимості цієї взаємодії поки не встановлено.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Матеріали та обладнання

Усі використані реагенти відповідали вимогам, прийнятим для застосованих методів. В роботі використовували хімічні реактиви компаній “Sigma” (США), “Cerva” (Німеччина), “NEB” (Великобританія), “Bio Rad” (США), “Amersham Pharmacia Biotech” (Швеція/Великобританія), Roche (Німеччина), Abcam (Великобританія), “Fermentas” (Литва) або вітчизняні реактиви кваліфікації “х.ч.” і “ос.ч.”. Буферні системи та розчини готували на основі води надвисокої чистоти, очищеної від органічних та неорганічних домішок за допомогою сертифікованої системи очистки води виробництва “Millipore” (США). рН розчинів контролювали за допомогою цифрової вимірювальної системи з комбінованим водневим електродом від компанії “Beckman Coulter” (США), що забезпечує точність до 0,01 рН. Середовища, антибіотики, трипсин та глютамін для культивування еукаріотичних клітинних ліній були виробництва компаній “Invitrogen”, “HyClone” та “Lonza Xpress™” (США). Для роботи у стерильних умовах використовували вертикальний ламінарний бокс II класу захисту з HEPA фільтром виробництва “Nuair” (США). Культивування проводили у CO₂-інкубаторі “Nuair” (США). Також, для проведення досліджень використовували автоклав настільний GSM 200 (Швейцарія). Для морфологічних досліджень культури клітин використовували інвертований мікроскоп CETI Versus (CETI, Бельгія) з можливістю використання ефекту фазового контрасту та люмінесцентний мікроскоп Leica DM 1000 (Німеччина), обладнаний цифровою фотокамерою Canon Power Shot S70 (Японія). Вивчення імунофлуоресценції та субклітинної локалізації проводили за допомогою лазерного скануючої Leica TCS SPE конфокальної системи з DMI8 інвертованим мікроскопом (Leica, Німеччина). Усі процедури, пов'язані з

приготуванням, транспортуванням і зберіганням хімічних речовин та розчинів, проводили з використанням сертифікованого пластикового і скляного лабораторного посуду високої чистоти, одноразових гумових рукавичок, кінчиків для піпеток і автоматичних піпеток фірми «Eppendorf». Для роботи з культурами клітин використовували стерильний одноразовий посуд TRP (Швейцарія).

Антитіла: Раніше було описано отримання та характеристика мишачих моноклональних анти-KoA антитіл 1F10 [122] (розведення ВБ 1:6000), а також кролячих поліклональних анти-S6K1 С-кінцевих антитіл (розведення ВБ 1:4000) [165]. Мишачі антитіла проти EE (розведення ВБ 1:6000) були отримані, охарактеризовані та люб'язно надані професором Пітером Паркером (Королівський коледж Лондона та Інститут Френсіса Кріка); антитіла проти рибосомного білка phospho-rpS6 S235/236 та phospho-rpS6 Ser240/244, а також антитіла проти phospho-Thr229 S6K1 були придбані у компанії Cell Signaling Technology (розведення ВБ 1:5000, №2211, Cell Signaling Technology, Inc., США).

2.2. Методи роботи з плазмідною ДНК

2.2.1. Створення компетентних клітин *E.coli*. Для приготування компетентних клітин *E.coli* штаму XL 10-Gold спершу вирощували нічну культуру, інокулювавши аліквоту клітин з кріоконсервованого гліцеринового стоку в 5 мл поживного середовища LB з тетрацикліном (10 мкг/мл) та інкубувавши за умов +37°C з достатньою аерацією при 250 об/хв протягом ночі. На наступний день в кожні 100 мл середовища LB інокулювали нічну культуру в співвідношенні 1/100 та інкубували за умов +37°C при 250 об/хв допоки $OD_{600} = 0,4 - 0,6$ (відповідає логарифмічній фазі росту культури *E.coli*). Щойно концентрація клітин досягала необхідної, колбу з культурою залишали на льоду на 15 хв, далі переносили суспензію в дві 50 мл пробірки та центрифугували при 4000 g за температури +4°C протягом 10 хв. Подальші етапи для створення електро- та хімічно компетентних клітин описані окремо.

Електрокомпетентні клітини. Отриманий після центрифугування осад кожної пробірки ресуспендували в 20 мл крижаної автоклавованої води та знову центрифугували при 4000 g за температури +4°C протягом 10 хв. Останній етап повторювали тричі. Після фінального центрифугування осади об'єднували в одну пробірку, додавали 40 мл автоклавованого крижаного 10% гліцерину, ресуспендували та знову центрифугували при 4000 g за температури +4°C протягом 10 хв. Відбирали надосад та додавали об'єм 10% гліцерину в розрахунку до фінальної концентрації суспензії – 2×10^{11} клітин/мл, якщо при $OD_{600}=1$ концентрація 8×10^8 клітин/мл. Аліквотили по 50-100 мкл у попередньо охолоджену пробірку та зберігали при -80°C.

Хімічно компетентні клітини. Отриманий після центрифугування осад кожної пробірки ресуспендували в 20 мл крижаного 100 mM CaCl₂ та інкубували на льоду протягом 16 год. Центрифугували при 4000 g за температури +4°C протягом 10 хв, до осаду кожної пробірки додавали 2 мл крижаного 85 mM CaCl₂, що містив 15% гліцерин, ресуспендували та аліквотили по 50-100 мкл у попередньо охолоджену пробірку, зберігали при -80°C.

2.2.2. Трансформація клітин *E.coli* плазмідною ДНК. В експериментах даної роботи трансформацію векторів в бактеріальні компетентні клітини проводили методами електропорації або теплового шоку.

Електропорація. Аліквоту об'ємом 50 мкл кріоконсервованого гліцеринового стоку компетентних клітин *E.coli* штаму XL 10-Gold розморожували у крижаній бані та вносили до них в пробірку 2-10 нг рекомбінантної ДНК, обережно перемішували піпетуванням. Суміш компетентних клітин і плазмід інкубували на льоду протягом 5 хв. Далі вносили суспензію в завчасно охолоджену кювету (SLS Flowgen, Велика Британія) та проводили електропорацію при 1,8 кВ для кювети з 1 мм щілиною. Оброблені клітини з кювети переносили в пробірку.

Тепловий шок. Аліквоту об'ємом 50 мкл кріоконсервованого гліцеринового стоку компетентних клітин *E.coli* штаму XL 10-Gold розморожували на крижаній бані, потім додавали 2-10 нг плазмідної ДНК у пробірку та обережно перемішували за допомогою піпетування. Суміш компетентних клітин з рекомбінантною ДНК тримали на льоду 30 хв. Проводили тепловий шок при +42°C протягом 90 сек, далі охолоджували на льоду ще 2 хв.

До клітинної суспензії після будь-якого з вищезгаданих варіантів додавали 1 мл середовища LB кімнатної температури, без антибіотику. Інкубували 40 хв за температури +37°C при 250 об/хв. Суспензію клітин центрифугували 5 хв при 3000 g та відбирали надосад, залишаючи 1/5 об'єму середовища. Ресуспендований осад висівали виснажувальним штрихом на попередньо залиті поживним середовищем 10 см чашки Петрі. Поживне середовище для чашок містило LB з 1,5% бакагаром та селективний антибіотик, відповідний до гену резистентності плазміди. Вектор pcDNA3.1 має ампіцилінову резистентність, в даних дослідженнях для селекції носіїв цього вектора використовувався карбеніцилін (100 мкг/мл). Чашки Петрі з висіяною культурою інкубували протягом ночі при +37°C. Отримані колонії вибірково інокулювали в 5 мл середовища LB з селективним антибіотиком та інкубували за температури +37°C при 250 об/хв протягом ночі. Суспензії культури клітин центрифугували 5 хв при максимальних обертах та виділяли рекомбінантну ДНК, використовуючи ZymoPURE Plasmid Kit (Zymo Research, США) згідно рекомендацій виробника. Концентрацію виділеної плазміди вимірювали нанодропом.

2.2.3. Сайт спрямований мутагенез. Сайт-спрямований мутагенез проводили, використовуючи QuikChange II-E Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, США), згідно інструкції виробника. До реакційної суміші входили PfuUltra High-Fidelity ДНК полімераза (2,5 U/ мкл), 1x реакційний буфер, суміш дНТФ, матрична плазміда pcDNA3.1-EEp70S6K1 та пара праймерів (прямий та

зворотній), підібрана для створення мутантної форми p70S6K1 (табл.2.2.3.1.). Полімеразно ланцюгову реакцію суміші проводили в 16 циклів, за схемою: 30 секунд денатурація при +95°C; 1 хв відпал праймерів при +55°C; 8 хв елонгація при +68°C. Після завершення циклів ПЛР до суміші додавали рестриктазу Dpn I (10 U/мкл) та інкубували при +37 °C протягом ночі. Dpn I впізнає метильовані сайти Gm6A^TC та розрізає матричну ДНК, залишаючи у суміші лише ПЛР фрагменти, що містять мутації. Отриману ДНК з точковими мутаціями трансформували в *E.coli* штаму XL 10-Gold та висівали на чашки Петрі з відповідним селективним антибіотиком (карбеніциліном). З отриманих колоній виділяли ДНК, наявність і відповідність мутованих сайтів підтверджували шляхом секвенування.

Таблиця 2.2.3.1.

Перелік праймерів для сайт-спрямованого мутагенезу p70S6K1

Сайт мутації p70S6K1	Праймер	Нуклеотидна послідовність
C217A	Прямий	5'-AACAGACTTTGGACTAGCCAAAGAATCTATTCAT
	Зворотній	5'-ATGAATAGATTCTTTGGCTAGTCCAAAGTCTGTT
C231A	Прямий	5'-AGTCACACACACATTTGCTGGAACAATAGAATAC
	Зворотній	5'-GTATTCTATTGTTCCAGCAAATGTGTGTGTGACT

2.2.4. Отримання рекомбінантної бакмідної ДНК. Конструкт, що складався з pFastBac-DUAL (Invitrogen, США) вектору та закодованих в ньому двох генах інтересу, трансформували в клітини DH10Bac *E. coli* шляхом електропорації. До трансформованої суспензії додавали 1 мл середовища LB та інкубували протягом 2 год за температури +37 °C при 250 об/хв. Культуру клітин центрифугували 5 хв при 3500 об/хв та відбирали надосад, залишаючи 1/5 об'єму

середовища. Готували чашки Петрі з поживним середовищем LB та 1,5% агаром, що містило наступні компоненти: 50 мкг/мл канаміцин, 7 мкг/мл гентаміцин, 10 мкг/мл тетрациклін, 100 мкг/мл X-gal, 40 мкг/мл ІПТГ. Ресуспендований осад клітин висівали виснажувальним штрихом на 10 см чашки Петрі. Чашки інкубували протягом ночі при +37 °С. Після 48 год інкубації спостерігали утворення блакитних та білих колоній, білі колонії експресували рекомбінантну бакміду.

Колонії, що експресували бакміду, інокулювали в 5 мл рідкого поживного середовища LB, в яке додавали селективні антибіотики канаміцин, тетрациклін та гентаміцин. Нарощували нічну культуру за температури +37°C при достатній аерації. На наступний день центрифугували 5 хв при 5000 g. Осад клітин ресуспендували в 300 мкл Розчину I (15 mM тріс-HCl (pH 8,0), 10 mM ЕДТА, 100 мкг/мкл РНКаза А). Далі додавали 300 мкл Розчину II (0,2 M NaOH, 1% SDS), обережно перемішували та інкубували 5 хв за кімнатної температури. Повільно додавали 300 мкл 3 M ацетату калію (pH 5,5), обережно перемішували обертанням пробірки, залишали на льоду на 5-10 хв та центрифугували 10 хв при 14000 g. В окрему пробірку додавали 800 мкл ізопропанолового спирту. Далі надосадову фракцію обережно переносили в пробірку з ізопропанолом, перемішували шляхом обертання пробірки та ставили у лід на 5-10 хв. Центрифугували 15 хв при 14000 g за кімнатної температури. Наступним видаляли надосад та додавали 500 мкл 70% етанолу, центрифугували 5 хв при 14000 g. Видаляли супернатант та залишали пробірку відкритою на 15 хв за кімнатної температури до повного висихання осаду. Ресуспендували осад в 30 мкл ТЕ буферу.

2.2.5. Бактеріальна система експресії рекомбінантного білка. Провівши трансформацію плазмід, що несе ген білка інтересу, в компетентні клітинні лінії штаму BLR *E. Coli* та отримавши одиничні колонії, готували нічну культуру в 5 мл середовища LB з селективними антибіотиками. На наступний день культуру

бактерій інокулювали в свіже LB (без антибіотика) в співвідношенні 1:100 та інкубували при +37°C з перемішуванням до досягнення OD = 0,6 – 0,8. Експресію білка індукували шляхом додавання 1 мМ IPTG в бактеріальну суспензію та інкубували 3 год при +24°C з постійним перемішуванням. За закінченням індукції культуру осаджували при 1200 g протягом 20 хв в охолодженій до +4°C центрифугі. В якості контролю експресії білка використовували неіндуковану IPTG бактеріальну культуру. Отриманий осад бактерій зберігали при -80°C.

2.2.6. Електрофорез ДНК в агарозному гелі. Для розділення ДНК фрагментів в даній роботі використовували 0,5% агарозний гель, що готували шляхом розчинення відповідної кількості агарози в 1x TAE буфері (40 мМ тріс, 20 мМ льодяна оцтова кислота, 1 мМ EDTA), цей буфер також використовували як електродний. До зразків ДНК додавали, наносили на гель та розділяли за напруги 5 В/см. Для візуалізації фрагментів під ультрафіолетовим випромінюванням використовували SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, США).

2.3. Методи роботи з культурами клітин еукаріотів

2.3.1. Культивування клітинних ліній ссавців. У ході виконання дисертаційної роботи були використанні епітеліальні клітинні лінії ембріональної нирки людини HEK293 та модельна клітинна лінія з стабільною надекспресією пантотенової кінази HEK293/Pank1 β [13]. Кріоконсервовані в рідкому азоті (-196°C) клітини, що зберігалися в розчині DMEM/FBS (1:1) з додаванням 10% диметилсульфоксиду, пасажували у стерильну чашку Петрі. Надалі клітини культивували у середовищі DMEM (Lonza, Швейцарія) з високим вмістом глюкози (4,5 г/л), в яке додавали 10% ембріональної сироватки бика (FBS) (HyClone, США), 2 мМ L-глутаміну, 50 од/мл пеніциліну та 0,25 мкг/мл стрептоміцину (Lonza, Швейцарія). Ведення клітинних ліній відбувалося за умов температури +37°C, в зволоженій атмосфері, у присутності 5% CO₂. При досягненні ~80% клітини

пересаджували з необхідною концентрацією на нові стерильні чашки Петрі або мікропланшети. Для відкріплення адгезивного моношару з поверхні пластику, клітини спершу відмивали PBS (без катіонів Кальцію та Магнію), далі або знімали механічно струменем (у випадку клітин з низьким рівнем адгезії (HEK293, HEK293/Pank1 β)), або додавали розчин з 0,25% трипсину та 0,02% ЕДТА (Gibco BRL, США) та інкубували протягом 2-4 хв при +37°C. Після обробки клітин протеолітичним розчином до чашок додавали культуральне середовище з 10% FBS, ресуспендували, та вносили у нові чашки Петрі чи збирали суспензії для подальших досліджень. Перед використанням усі клітинні лінії були протестовані на наявність контамінування мікоплазмою.

2.3.2. Трансфекція клітин ссавців плазмідною ДНК. Клітинну лінію HEK293/Pank1 β культивували на 6 см чашках Петрі до ~50% конфлюентності моношару та трансфікували вектором pcDNA3.1/EE-p70S6K1, що кодує повнорозмірну p70S6K1 людини, кон'юговану з EE-тагом. Трансфекція плазмідною відбувалася за допомогою реагента TurboFect (Thermo Scientific, США) згідно рекомендацій виробника. Через 24 год трансфекції клітинам змінювали поживне середовище на 10% FBS DMEM з низьким вмістом глюкози (1 г/л) та без пірувату натрію, та інкубували ще 24 год, щоб підготувати клітинну лінію до подальшої індукції оксидативного стресу.

2.3.3. Індукція метаболічного та оксидативного стресу в клітинах ссавців. Моношар клітин, що досягнув конфлюентності ~70% площі поверхні пластику готували до подальшої індукції метаболічного та/або оксидативного стресів. Для цього проводили зміну середовища в чашках чи мікропланшетах на 10% FBS DMEM з низьким вмістом глюкози (1 г/л) та без пірувату натрію (оскільки піруват діє як антиоксидант, зменшуючи вплив вільних радикалів на клітину), та інкубували протягом 24 год. Для індукції більш інтенсивного метаболічного стресу

клітини інкубували в 0% FBS DMEM з низьким вмістом глюкози (1 г/л) та без пірувату натрію. Окисний стрес індукували додаванням 0,5 мМ пероксид водню (Sigma-Aldrich, США) або 0,5 мМ діаміду (Sigma-Aldrich, США), розведеними у тому ж середовищі, на 30 хв при +37°C. Оксидативний стрес, викликаний додаванням арсеніту поділявся на гострий (500 мкМ протягом 30 хв) та хронічний (30 мкМ протягом 2 год). Після закінчення часу інкубації клітини двічі промивали PBS та збирали в пробірки або фіксували на предметних скельцях, залежно від типу експерименту.

Для дослідів, метою яких є детекція рівня КоАлювання, подальше приготування лізатів з індукованих клітин та фіксування таких клітин на скельцях для імуофлуоресцентних препаратів має відбуватися швидко, оскільки реакція КоАлювання є оберненою.

2.3.4. Культивування клітинних ліній комах. Клітинну лінію комах Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) підтримували або як суспензію в конічних колбах Ерленмейера, або як моношар в культуральних флаконах T25 за умов постійного перемішування (~120 об/хв) при +27°C. Поживне середовище Insect-XPRESS (Lonza, Швейцарія) містило 10% FBS та 1% антибіотик пеніцилін/стрептоміцин (Cytiva, Велика Британія).

2.3.5. Інфекція клітин комах бакмідною ДНК. Для первинного отримання рекомбінантного білка системою експресії Bac-to-Bac клітини Sf9 в кількості $2,5 \times 10^6$ сіяли на культуральні флакони T25 та залишали для адгезії на щонайменше 1 год при +27°C. Реагент для трансфекції CellFECTIN (Gibco-BRL, США) використовували згідно інструкції виробника. Спершу CellFECTIN та бакмідну ДНК розчиняли окремо в середовищі без сироватки, потім розчини об'єднували між собою для формування ліпід-ДНКових комплексів та інкубували суміш протягом 30 хв за кімнатної температури. Обережно вносили суміш для трансфекції

до клітин, інкубували 5-7 год та змінювали поживне середовище на свіже, без трансфікуючих агентів. Через наступні 72 год неінфіковані контрольні клітини та інфіковані клітини збирали та тестували; середовище, що містило вірус, зберігали при +4°C.

Для рутинної експресії рекомбінантного білка Sf9 клітини в стартовій концентрації 2×10^6 клітин/мл сіяли в колби Ерленмейера та інфікували середовищем, що містило бакуловірус зі значенням кратності інфекції (MOI) 4 – 5. Після 48 год інкубації за умов постійного перемішування та температури +27°C клітини збирали та центрифугували 30 хв при 1200 g в охолодженому до +4°C роторі.

2.4. Методи роботи з білками

2.4.1. Приготування екстрактів з клітин ссавців. Еукаріотичні клітини культивували на чашках Петрі, двічі промивали PBS та лізували буфером, що містив 50 mM тріс-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 5 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 1 % Triton X-100, з додаванням коктейлю інгібіторів протеаз та фосфатаз (Roche, Швейцарія), а також 0,1 M NEM, що перешкоджає утворенню нових дисульфідних зв'язків. Екстракція у лізуючому буфері відбувалася протягом 20 хвилин на льоду, після чого клітинні лізати центрифугували при 16000 g за температури +4°C з метою видалення нерозчинної фракції. Надосад, що містив розчинну фракцію білків, використовували в подальших дослідях для приготування проб для електрофорезу або в імунопреципітації. Концентрацію білків у розчині вимірювали колориметрично за методом Бредфорд на мікропланшетному фотометрі за поглинанням при довжині хвилі 595 нм. Розраховували концентрацію відносно кривої поглинання стандартних розчинів БСА. Отримані білкові екстракти або використовували в подальшій імунопреципітації, або готували з них проби для нанесення на поліакриламідний

гель (ПААГ), додаючи 5X буфер Лемлі (200 мМ Тріс, 5% SDS, 50% гліцерол, 0,1% бромфеноловий синій, 250 мМ ДТТ) з наступним кип'ятінням протягом 5 хв.

2.4.2. Імунопреципітація білків. До сефарози протеїн G (Generon, Велика Британія), попередньо тричі відмитої PBS, додавали моноклональні антитіла проти ЕЕ-тагу та інкубували протягом 2 год на ротаторі при +4°C. Далі проводили чергову серію відмивок та додавали до комплексу з антитілами білкові екстракти клітин, з розрахунку 1 мг тотального білка на зразок, та інкубували протягом ночі на ротаторі при +4°C. Отримані після зв'язування імунні комплекси 5 разів відмивали PBS. Центрифугування зразків, що містили сефарозу, після інкубацій та відмивок проводили при 3000 g за температури +4°C. Як контроль проти неспецифічного зв'язування використовували протеїн G, інкубовану лише з антитілами, та протеїн G, інкубовану лише з лізатами клітин. До усіх зразків та контролів після фінальної відмивки додавали 2x буфер Лемлі, кип'ятили протягом 5 хв, центрифугували на максимальних обертах, наносили на ПАА гель та аналізували методом вестерн-блоту.

2.4.3. Реакція *in vitro* КоАлювання. Для проведення реакції *in vitro* КоАлювання, що була розроблена раніше у колаборації [13], 1 мг очищеного рекомбінантного білка His-actS6K1 інкубували з 100 мкМ дисульфідом КоА (КоА-SS-КоА) у буфері, що містив 20 мМ тріс-НСl (pH 7,5), 100 мМ NaCl, протягом 30 хвилин за кімнатної температури у термоміксері за низьких обертів (600 об/хв). Для підтвердження специфічності реакції готували контрольний зразок, в який додавали 10 мМ ДТТ, агенту, що забезпечує відновлення дисульфідних зв'язків, утворених між цистеїном білка та сульфгідрильною групою КоА, та інкубували 10 хвилин за кімнатної температури. Реакцію зупиняли додаванням 5x буферу Лемлі з 100 мкМ NEM за відсутності ДТТ. В подальшому зразки були досліджені методом вестерн-блоту.

2.4.4. *In vitro* кінзна реакція. Для визначення активності S6K1 застосовували *in vitro* кінзну реакцію. Методику проводили за температури +37°C протягом 30 хвилин у термоміксері, використовуючи 1 мкг рекомбінантної His-actS6K1, 1 мкг рекомбінантного GST-rpS6(Ct) як субстрату та 100 мкМ АТФ в буфері для кінзної реакції (25 мМ тріс-HCl (pH 8,0), 10 мМ MgCl₂, 5 мМ β-гліцерофосфат). Реакцію зупиняли додаванням 5х буферу Лемлі. В якості негативного контролю використовували зразок з відсутнім АТФ. У випадку дослідження активності His-actS6K1 модифікованої КоА, кінзній реакції передувала реакція *in vitro* КоАлювання, що була здійснена шляхом додавання до суміші димеру КоА (КоА-SS-КоА), як зазначено вище у пункті (2.4.3). В подальшому зразки досліджували методом вестерн-блоту, сигнали детектували антитілами проти фосфорильованих серинів рибосомального білка S6 (pSer235/236 та pSer240/244). У деяких випадках вимірювався рівень фосфорилування, за рахунок взаємодії вторинних антитіл, кон'югованих з пероксидазою хрому, з буфером ECL. Утворений хемілюменісцентний сигнал в результаті детектувався рентгенівською плівкою, сканувався Odyssey XF та обчислювався програмою Image Studio.

2.4.5. Електрофорез білків у поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах. Аналіз білків методом електрофоретичного розділення проводили використовуючи денатуруючі умови з додаванням SDS за методом Лемлі. Спершу готували розчини для розділяючого (табл. 2.4.5.1) та концентруючого гелів (табл. 2.4.5.2), додаючи TEMED безпосередньо перед нанесенням. Далі в зібрану вертикальну камеру для фореку моментально заливали суміш розділяючого гелю, відсотковість якого підбирали залежно від розміру білкових фрагментів інтересу, залишаючи місце для концентруючого. Гель полімеризувався під шаром води протягом 10 хв за температури +37°C. Після застигання гелю видаляли воду та вносили тefлонову гребінку для формування лунок, простір, що залишився, заповнювали концентруючим 5% гелем. Опісля полімеризації гребінку обережно

видаляли, лунки промивали водою. В камеру заливали тріс-гліциновий буфер для електрофорезу, за протоколом QIAGEN (0,1 М тріс, 385 мМ гліцин, 0,1% SDS), а в лунки вносили зразки з навантаженням 20 – 40 мкг тотального білка на комірку. В якості маркера використовували PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoFischer Scientific, США).

В серії дослідів також використовували комерційний градієнтний ПААГ 4–20% Precast Gel (Sigma-Aldrich, США), який поміщали в електрофоретичну камеру Bio-Rad (США) та проводили фореуз у MOPS буфері (Millipore, Німеччина). В якості маркера використовували Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, США).

Електрофореуз у обох випадках проводили спершу за фіксованої сили струму 17 мА, за входженням зразків в розділяючий гель підвищували струм до 25 мА. Після закінчення процесу гель візуалізували барвником InstantBlue Coomassie (Abscam, США) або використовували в подальшому імуноблоті.

Таблиця 2.4.5.1.

Композиція розділяючого ПАА гелю

Складники	Об'єм (мл)		
	8%-й гель	10%-й гель	12%-й гель
Вода	4,6	4,0	3,3
30% суміш акриламід (співвідношення акриламід та біс-акриламід 29:1)	2,7	3,3	4,0
1,5 М тріс, рН 8,8	2,5	2,5	2,5
10% SDS	0,1	0,1	0,1
10% персульфат амонію	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,006	0,004	0,004

Таблиця 2.4.5.2.

Композиція концентруючого 5% ПАА гелю

Складники	Об'єм (мл)
Вода	1,4
30% суміш акриламідів (співвідношення акриламідів та біс-акриламідів 29:1)	0,33
1 М тріс, pH 6,8	0,25
10% SDS	0,02
10% персульфат амонію	0,02
TEMED	0,002

2.4.6. Вестерн-блот аналіз. Для проведення імуноблоту білки після електрофоретичного розділення переносили з гелю на полівініліденфторидну (PVDF) мембрану Immobilon-P (Millipore, Німеччина), попередньо інкубовану в 100% метанолі протягом 15 сек. У разі подальшого використання вторинних антитіл з флуоресцентними мітками, PVDF мембрана мусила бути з низьким рівнем фонові флуоресценції Immobilon-FL PVDF (Millipore, Німеччина). Далі мембрану калібрували протягом 5 хв у буфері для переносу, що готували за протоколом QIAGEN, містив 25 мМ тріс, 150 мМ гліцин, 20% метанол, pH 8,3. Електроперенесення проводили протягом 1 год 30 хв при постійному струмі 250 мА в камері для мокрого перенесення Bio-Rad (США). Після перенесення мембрану промивали 1 хв в буфері TBS-Tween (20 мМ тріс-HCl (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 0,1% Tween-20) та блокували сайти неспецифічного зв'язування шляхом інкубації в 5% розчині знежиреного молока або БСА в TBS-T протягом 30 хв за кімнатної температури. Після закінчення процесу блокування мембрану тричі відмивали в TBS-T та наносили розчин первинних антитіл (1мкг/мл у TBS-T буфері), інкубували протягом ночі за температури +4°C. За завершенням інкубації

в первинних антитілах мембрану промивали 5 разів по 7 хв у TBS-T та наносили розчин видоспецифічних, мишиних або кролячих, вторинних антитіл, кон'югованих з пероксидазою хрому (Jackson ImmunoResearch, Велика Британія) або з флуоресцентною міткою відповідної довжини хвилі (Alexa Fluor, Invitrogen, Велика Британія), інкубували протягом 40 хв за кімнатної температури. Після чергової серії відмивок мембрани у TBS-T специфічні сигнали детектували за допомогою реакції підвищеної хемілюменісценції (ECL) або флуоресцентним методом, відповідно до типу використаних вторинних антитіл. Детектування методом реакції ECL полягало в інкубуванні мембрани в розчині, що містив 100 мМ тріс (pH 8,8), 0,002% люмінол (Sigma, США), 0,004% кумарову кислоту (Sigma, США) та 0,001% пероксид водню (Sigma, США); та експонуванні сигналів на рентгенівську плівку (Afga, США). У випадку використання флуоресцентних міток імунні сигнали детектували на приладі Odyssey Scanner CLx з використанням програмного забезпечення Image Studio Lite (LI-COR Biosciences, США). Денситометрію сигналів вимірювали за допомогою програмного забезпечення ImageJ.

2.4.7. Виділення та очистка рекомбінантного білка використовуючи Ni-NTA афінну хроматографію. Осади контрольних неінфікованих та інфікованих бакуловірусом Sf9 клітин ресуспендували в холодному лізуючому буфері, що містив 20 мМ тріс-HCl (pH 8,0), 200 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂, 2 мМ NaF, 10% гліцерин, 10 мМ імідазол, 1% Nonidet P40, 1мМ PMSF, 50 мМ β-гліцерофосфат, 1х коктейль інгібіторів протеаз (без EDTA), 25 U/мл бензонази. Всі подальші кроки очистки виконувались за температури +4°C. Клітини лізували на льоду протягом 30 хв з періодичним перемішуванням та центрифугували 30 хв при 13 000 g. Надосади, що містили рекомбінантний продукт, збирали та наносили на попередньо відмиту (20 мМ тріс-HCl (pH 8,0), 200 мМ NaCl) Ni-NTA агарозу (Neo Biotech, Франція). Зв'язування лізату з сефарозою відбувалось протягом 2-х год з постійною повільною ротацією. Далі

зв'язаний комплекс промивали 5 разів буфером, що містив 20 мМ тріс-НСІ (рН 8,0), 200 мМ NaCl, 20 мМ імідазол. Процес елюювання білка з Ni-NTA агарози проводили використовуючи буфер, композиція якого була 20 мМ тріс-НСІ (рН 8,0), 200 мМ NaCl, 350 мМ імідазол. Діаліз очищеного продукту проводили в два етапи, заміщуючи буфер для елюції буфером для зберігання (20 мМ тріс-НСІ (рН 7,5), 200 мМ NaCl, 50% гліцерин), з використанням мембрани для діалізу Spectra/Por MWCO 3,5 кДа (Thermo Scientific, США).

2.4.8. Виділення та очистка рекомбінантного білка, кон'югованого з GST-тагом. Осад з бактерій, що експресували злитий з GST-тагом білок інтересу, лізували протягом 1 год у холодному буфері, що містив 20 мМ тріс-НСІ (рН 8,0), 250 мМ NaCl, 1 мМ β -меркаптоетанол, 3 мМ $MgCl_2$, 5 мМ імідазол, ДНКазу 50 мкг/мл, протеазні інгібітори (без EDTA). Далі проводили лізис ультразвуком та центрифугували на максимальній швидкості протягом 20 хв в охолодженому до +4°C роторі. Надосад, що містив білкову фракцію, наносили на попередньо відмиту буфером (1x PBS, 1 мМ $MgCl_2$) GST-сефарозу та зв'язували протягом 1 год при +4°C на обертальному колесі. Після зв'язування комплекс повторно відмивали тричі та проводили елюювання білка з сефарози буфером з 50 мМ тріс-НСІ (рН 8,0), 10% гліцерином, 10 мМ відновленим глутатіоном. Діаліз з буферу для елюції в буфер для зберігання (50 мМ тріс-НСІ (рН 8,0), 150 мМ NaCl, 50% гліцерин) відбувався в три етапи з використанням мембрани для діалізу Spectra/Por MWCO 3,5 кДа (Thermo Scientific, США).

2.5. Методи флуоресцентного аналізу білок-білкових взаємодій

2.5.1. Імунофлуоресцентний аналіз та конфокальна мікроскопія. Клітини ссавців культивували на покривних скельцях (Menzel-Gläser, Німеччина) в 24-лунковому планшеті (TPP, Швейцарія) до досягнення рівня конфлюентності

моношару ~80%, обробляли відповідними реагентами в залежності від експерименту, видаляли середовище та відмивали PBS. Забарвлення мітохондрій проводили шляхом їх прижиттєвого мічення, інкубуючи клітини протягом 30 хв при +37°C в середовищі з 0,05 мМ MitoTracker™ Red CMXRos (Invitrogen, США). Фіксування клітин на скельцях відбувалося протягом 15 хв у 10% формаліні (Sigma, США) з додаванням 100 мМ NEM. Фіксація та усі подальші кроки були виконані за кімнатної температури, якщо не зазначено інакше. Задля підвищення проникності клітинних мембран в лунки додавали 0,2 % Triton X-100 у PBS впродовж 15 хв. Для блокування сигналів автофлуоресценції, що можуть бути зумовлені наявністю гетероциклічних сполук (НАДФ, рибофлавін тощо), ароматичних амінокислот, клітинних органел (мітохондрії, лізосоми), скельця зі зразками інкубували в буфері з 10 мМ купрум сульфату (CuSO_4) та 50 мМ ацетату амонію ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$) розчинених у воді, pH 5,0 протягом 15 хв. Надалі проводили блокування вільних сайтів зв'язування, інкубуючи зразки в 10% FBS в PBS протягом 30 хв при +37°C, таким чином запобігаючи подальшому неспецифічному зв'язуванню антитіл. Далі скельця інкубували в первинних антитілах (мАТ анти-КоА, поліклональні антитіла проти С-кінця S6K1) протягом ночі при +4°C у вологій камері. Вторинні антитіла FITC, кон'юговані козині анти-мишині (Jackson ImmunoResearch Laboratories, США); Cyanine5, кон'юговані козині анти-мишині IgG (H+L) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., США), додавали до препаратів у співвідношенні 1:400 (в 10% FBS/PBS) на 1 год при +37°C у вологій камері. Зафарбовування ядер відбувалося шляхом нанесення на клітини барвника Hoechst 33342 (Molecular Probes, США) у кінцевій концентрації 5 мкг/мл протягом 30 хв. Наприкінці зразки фіксували в середовищі для заключення Mowiol 4-88 (Sigma, США) у присутності 0,1 % DABCO (Sigma, США). Кожному етапові передувало триразове відмивання скелець PBS від попереднього реагенту. Зразки аналізували використовуючи Leica TCS SPE конфокальну систему з вбудованим DMi8 інвертованим мікроскопом (Leica, Німеччина) .

2.5.2. *In situ* proximity ligation assay. Метод наближеного лігування або proximity ligation assay (PLA) здійснювали використовуючи Duolink In Situ Red Starter Kit Mouse/ Rabbit (Sigma-Aldrich, Dorset, Велика Британія) згідно інструкції виробника. Клітини HEK293/Pank1 β , що були культивовані на препаративних скельцях (Menzel-Gläser, Німеччина) в 24-лунковому планшеті (TPP, Швейцарія), фіксували протягом 15 хв у 10% формаліні (Sigma, США) з додаванням 100 мМ NEM. Фіксація та усі наступні кроки були виконані за кімнатної температури, якщо не зазначено інше. Пермеабілізацію мембран клітин та демаскування антигену проводили шляхом додавання на скельця 0,2 % Triton X-100 у PBS протягом 15 хв. Для усунення автофлуоресценції зразки інкубували в буфері з 10 мМ купрум сульфату (CuSO_4) та 50 мМ ацетату амонію ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$), pH 5,0 протягом 15 хв. Для запобігання неспецифічного зв'язування антитіл клітини були інкубовані в PBS з Duolink блокуючим буфером протягом 30 хв при +30 °C. Між усіма інкубаціями препарати тричі промивали PBS. Первинні мишачі моноклональні антитіла проти КоА (1F10/B11 [122]) та кролячі поліклональні антитіла проти S6K1 додавали до кожної лунки зі скельцем у пропорції 1:100 з Duolink реагентом для розведення. Як негативний контроль використовували зразок оброблений лише Duolink реагентом для розведення. Скельця інкубували в вологій камері при +4 °C протягом ночі. Згодом зразки промивали буфером, що містив 10 мМ Tris-HCl pH 7,4, 150 мМ NaCl, 0,05 % Твін-20 та наносили вторинні антитіла в співвідношенні 1:5 з Duolink реагентом для розведення на 1 год при +37 °C в вологій камері. В методі наближеного лігування вторинні антитіла кон'юговані з PLA пробами ПЛЮС та МІНУС, які несуть нуклеотидні послідовності комплементарні одна одній. Після серії послідовних промивок препарати інкубували в реагенті для гібридизації протягом 15 хв. На наступному етапі лігазу (попередньо розведену в Duolink реагенті для лігування в співвідношенні 1:40) наносили на скельця та проводили інкубацію протягом 30 хв, впродовж якої відбувалося з'єднання та циркуляризація ДНК олігонуклеотидів між наближеними молекулами. Ампліфікація здійснювалась за рахунок додавання в лунки ДНК-полімерази, розведеної в Duolink

реагенті для ампліфікації (1:80), зразки інкубували протягом 100 хв. Скельця промивали буфером за відсутності Твін-20 і залишали сушитися на ніч. Потім знову відмивали PBS буфером та закріплювали препарати на покривних скельцях, додаючи Duolink середовище для закріплення, що містив DAPI для фарбування ядра. Зразки аналізували використовуючи Leica TCS SPE конфокальну систему з вбудованим DMi8 інвертованим мікроскопом (Leica, Germany).

2.6. Статистичний аналіз

Для кількісних обрахунків денситометрії сигналів вестерн-блоту, колокалізації білків в імунофлюоресцентному аналізі та для підрахунку сигналів PLA використовували програмне забезпечення ImageJ з відповідними плагінами. Обробку отриманих результатів проводили з використанням програми Excel 2016. Усі експерименти відтворювали в 3–6 повторах. Дані представлені у вигляді стовпчикових діаграм середнього арифметичного значення із зображенням стандартного відхилення ($\pm$ SD). Результати досліджень відповідно до непараметричного двостороннього t-критерію Стюдента були статистично достовірними, критичний рівень достовірності при перевірці статистичних гіпотез приймали $p \leq 0,05$ та $p \leq 0,01$. Ступінь колокалізації білків визначали згідно критерію Пірсона.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРЕМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Отримання та характеристика нових моноклональних антитіл проти Коензиму А

Для проведення якісних досліджень необхідно володіти потужним інструментарієм. Саме тому першим з поставлених у роботі завдань стала характеристика нових анти-КоА мАт, які б можливо було використовувати у вивченні процесів КоАлювання чи низки інших досліджень, пов'язаних з КоА. Раніше у відділі вже було задокументовано отримання специфічних моноклональних антитіл проти коензиму А (1F10) [122], що розпізнавали КоА в різних імунологічних аналізах, включно з вестерн-блотом, імунопреципітацією, імуноцитото- та імуногістохімією. Як антиген для розпізнавання антитілами використовували незворотно крослінковану сульфгідрильною групою молекулу КоА до малеїмід активованого гемоціаніну молюска (Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH). Безпосереднім антигенним епітопом розпізнавання для антитіл 1F10 слугував ключовий 3'-фосфат дезоксирибозного кільця молекули КоА. Однак, попри існування специфічних до КоА мАт, одним із завдань моєї роботи була характеристика нових анти-КоА мАт з альтернативним способом створення антигенного епітопу порівняно до існуючого. Маючи антитіла різної специфічності, ми, наприклад, могли б створити підхід для визначення рівня вільного КоА в різних біологічних зразках, використовуючи імунологічні тести.

Отже, у відділі було використано новий підхід до створення анти-КоА мАт, а саме зворотне крослінкування КоА до KLH за допомогою хімічного крослінкера SPDP (N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate) через сульфгідрильну групу КоА (KLH-S-S-КоА). Новий спосіб презентації антигену при імунізації, ймовірно, міг би надавати доступу до інших антигенних ділянок КоА, змінюючи

специфічність антитіл та загальний пул розпізнаних молекул. Антиген KLN-S-S-KoA був використаний для імунізації мишей та отримання гібридомних клонів, що продукували моноклональні антитіла проти KoA. Після двох раундів ІФА було відібрано позитивну колонію A11, яку надалі тестували та характеризували методами вестерн блоту, імунопреципітації та імуноцитохімії.

Для подальшого дослідження специфічності спершу було крослінковано БСА з сульфгідрильною групою KoA (з утворенням БСА-S-S-KoA) аналогічним способом, що використовувався для створення нового антигену – незворотного зшивання за допомогою крослінкера SPDP. Згідно даних, зображених на рис.3.1.а, на якому продемонстровано специфічне розпізнавання антитілами БСА-S-S-KoA, мАт отримані з гібридами A11 виявляють високий рівень розпізнавання БСА, кон'югованого з KoA, у вестерн-блоті. Також специфічність отриманих антитіл підтверджує зникнення сигналу після обробки зразка відновлювальним агентом ДТТ, що руйнує дисульфідні зв'язки між молекулами. Надалі досліджували можливість специфічної преципітації отриманими антитілами KoA-модифікованих молекул. Результати проведеної імунопреципітації (ІП), що зображені на рис.3.1.б, демонструють здатність антитіл A11 зв'язувати KoA-модифікований БСА, що дає підстави припускати можливість отриманих мАт преципітувати і інші KoA-модифіковані протеїни.

Для подальшого аналізу здатності мАт A11 детектувати ендогенні KoАльовані білки, було проведено вестерн-блот з лізатів HEK293/Pank1 β клітин, культивованих за нормальних умов та умов оксидативного стресу, індукованого додаванням H₂O₂. Було продемонстровано, що як нові A11, так і раніше охарактеризовані 1F10 антитіла мають подібний патерн розпізнавання ендогенних KoАльованих білків з лізатів стресованих клітин (рис.3.2.а). На рисунку також проілюстрована специфічна залежність імунореактивного сигналу від наявності у зразку ДТТ. Характеризуючи раніше одержані антитіла 1F10, було виявлено, що антигенний епітоп розпізнавання мАт на молекулі KoA розташований в дезоксирибозному кільці та залежить від фосфорилювання дезоксирибози в

3' положенні. Тому для визначення антигенного епітопу A11 мАт ми досліджували їх здатність розпізнавати дефосфорильовану форму КоА. Відповідно до даних, зображених на рис.3.2.б, антитіла A11, аналогічно до 1F10, не детектують БСА, кон'югованого з дефосфо-КоА, дозволяючи припустити, що фосфатна група в 3' положенні дезоксирибози має вирішальне значення для формування антигенного епітопу в обох випадках.

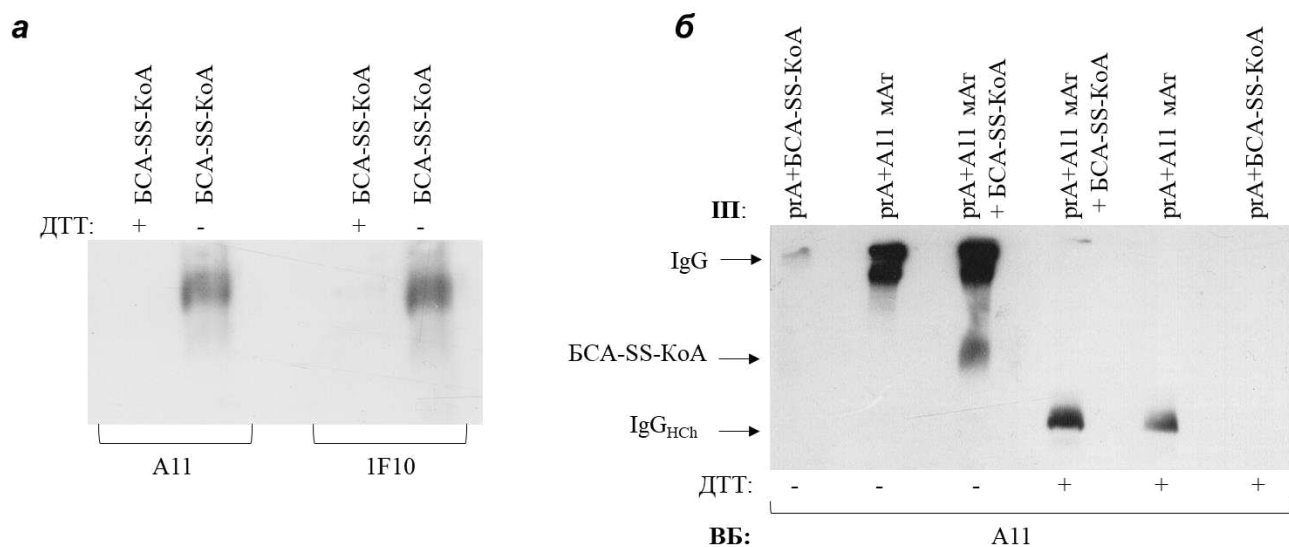


Рис. 3.1. Блотограми аналізу специфічності A11 КоА-антитіл; *а* – в вестерн-блоті проти БСА-S-S-КоА; *б* – в імунопреципітації проти БСА-S-S-КоА

Однією з важливих властивостей антитіл є їхня можливість специфічно розпізнавати антиген в імуофлуоресцентних аналізах. Тому наступним кроком для характеристики анти-КоА A11 антитіл було проведення імуоцитохімії на фіксованих модельних клітинах НЕК293/Pank1 β за нормальних умов та за умов індукції оксидативного стресу. На рис. 3.3 можемо спостерігати підвищення інтенсивності флуоресцентного сигналу у відповідь на обробку клітин окислювальними агентами H₂O₂ (рис.3.3.б) та діамідом (рис.3.3.в), у порівнянні з інтактними клітинами (рис.3.3.а), що співпадає з очікуваним результатом. Окрім того, розподіл детектованих сигналів мАт A11 відповідає розпізнаванню сигналів антитілами 1F10 (рис.3.3.г), які є високоспецифічними в імуофлуоресцентних аналізах.

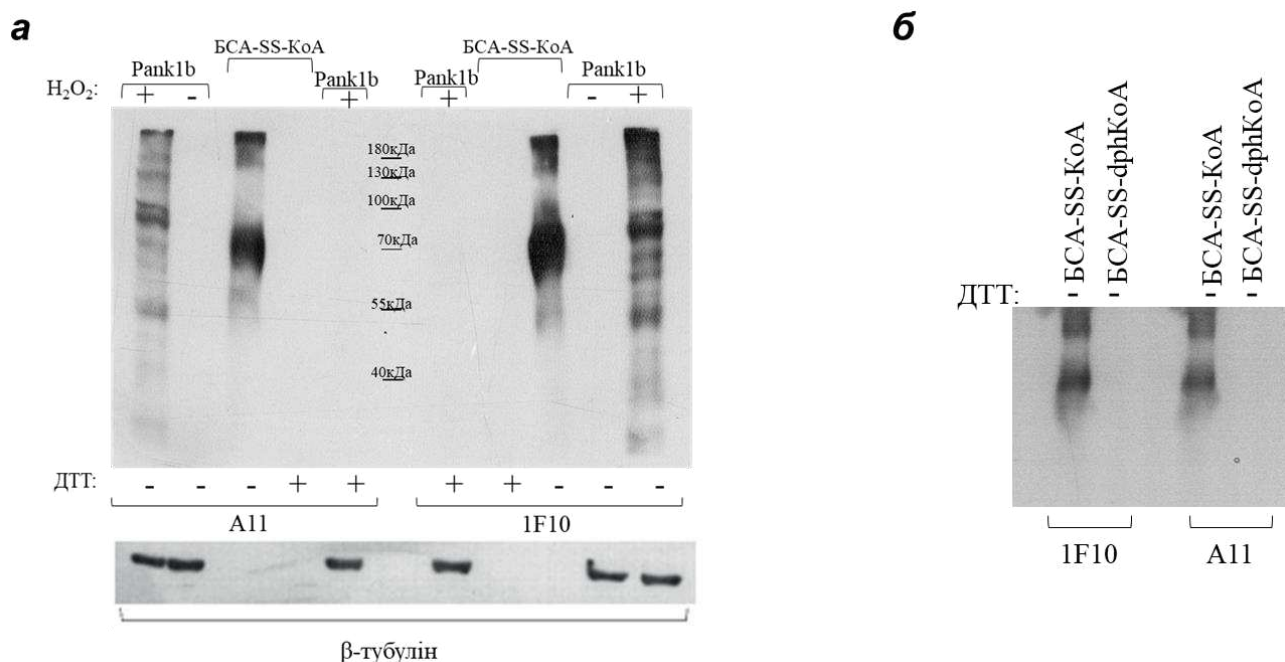


Рис. 3.2. Блотограми аналізу специфічності A11 KoA-антитіл; *а* – порівняльний аналіз спектру розпізнавання ендогенних білків з лізатів клітин антитілами A11 та 1F10, контроль навантаження тубуліном; *б* – ВБ проти BSA-SS-дефосфоКоА

Отже, отримуючи нові моноклональні антитіла проти коензиму А з використанням модифікованого підходу до створення антигену, ми очікували виявити доступ до інших антигенних епітопів КоА, якби такі існували. В результаті проведеної частини роботи можна зробити висновок, що обернене зшивання КоА з KLN за допомогою SPDP, так само як і незворотне крослінкування КоА з активованим малеїмідом KLN, може бути використано для отримання високоспецифічних мАт. Антитіла демонструють схожу високу специфічність, що є зумовленою розпізнаванням одного й того ж антигенного епітопу. Ми припускаємо, що КоА, швидше за все, має лише один антигенний епітоп, а 3'-фосфат дезоксирибозного кільця ймовірно є ключовою молекулою в утворенні епітопів для обох типів мАт. Отримані результати будуть корисними для подальшого дослідження КоАлювання білків за допомогою обох типів мАт.

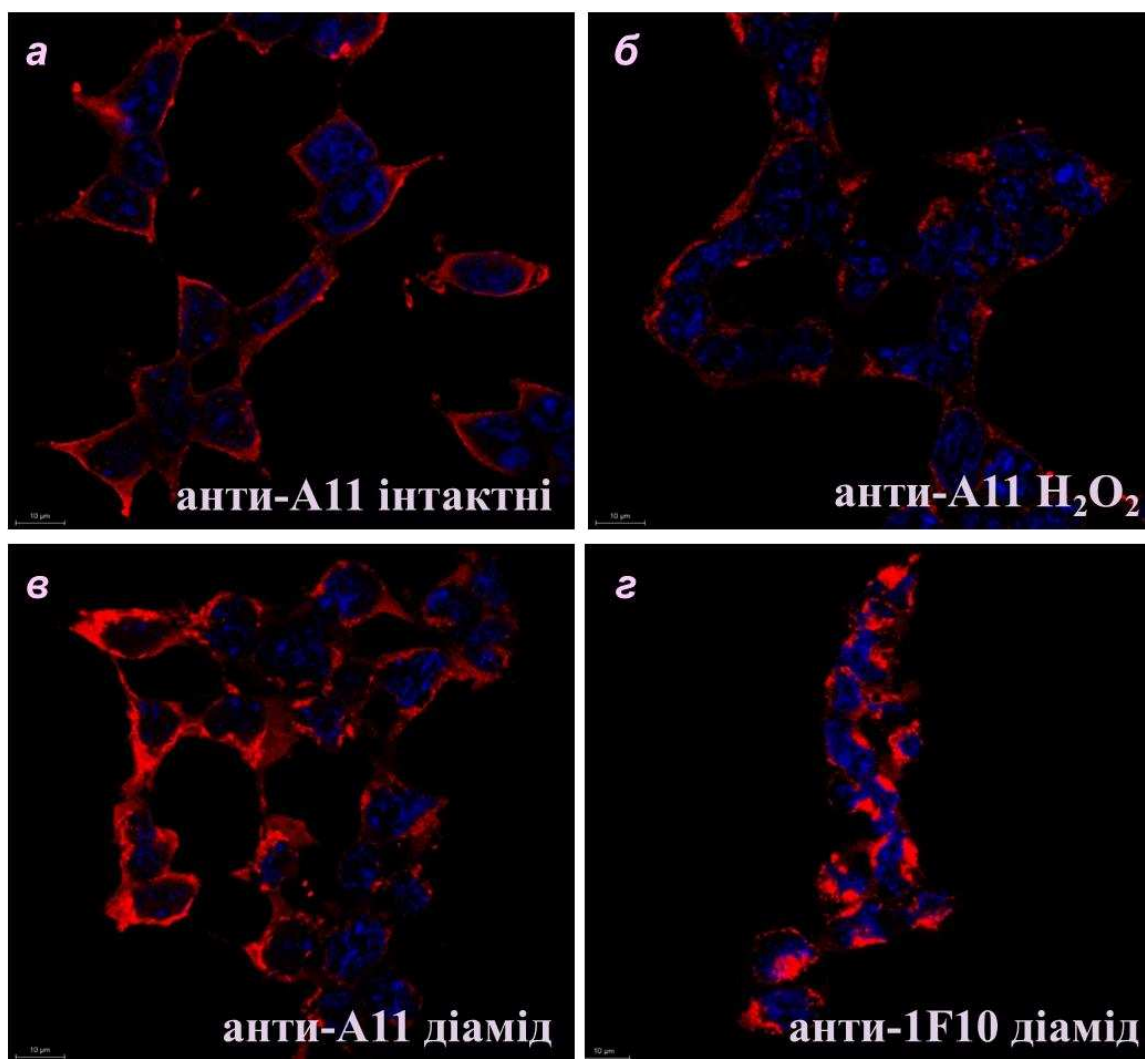


Рис. 3.3. Мікропрепарати клітинної лінії HEK293/Pank1 β , культивованої за нормальних (*а*) та стресових умов при обробці перекисом водню (*б*) або діамідом (*в*, *г*). Детекція КоАльованих протеїнів відбувалася антитілами A11 або 1F10 та вторинними антитілами Cyanine 5 (червоний). ДНК клітин візуалізували барвником Hoechst 33342 (синій). Масштаб 10 мкм

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

- 1) Malanchuk OM, *Bdzhola* AV, Tykhonkova IO, Gout IT, Filonenko VV (2022) Monoclonal antibodies to Coenzyme A. Biopolym Cell 38:215–223;

- 2) **Bdzhola A**, Filonenko V, Malanchuk O ‘Generation and characterization of novel antibodies specific to Coenzyme A’. Materials of the XVII International conference of young scientists, Kyiv, IMBG. – 2023 – p.65.

3.2. КоАлювання як новий тип посттрансляційної модифікації кінази рибосомного білка S6

Наявність у структурі молекули КоА високореактивної тіольної групи та фрагмента АДФ забезпечує її залучення до різноманітних функцій в біохімічних процесах. Згідно попередніх спостережень було виявлено інтенсивну модифікацію Коензимом А протеїнів у клітинах і тканинах ссавців, що підлягали впливу окисдативного та метаболічного стресів. Це відбулося завдяки розробленим у відділі, в колаборації з лабораторією структурної та молекулярної біології UCL, інструментам дослідження, серед яких, отримані раніше в нашій лабораторії моноклональні антитіла проти КоА [122] та модифікована методика РХ-МС (рідинна хроматографія — мас-спектрометрія) [13]. Використання вищеперерахованого інструментарію дозволило ідентифікувати 58 КоАльованих білків в тканинах серця щура за експериментальної перфузії з використанням перекису водню [13]. Біоінформативним аналізом пулу КоАльованих протеїнів встановлено, що більшість з них беруть участь у різноманітних клітинних процесах, включаючи клітинний метаболізм (близько 60%), синтез білків, реакцію на стрес, що є свідченням важливості молекули КоА в підтримці функціонування низки білків та регуляції активності ферментів. Подальшими дослідженнями в клітинах *S. aureus* було виявлено 356 білки, що КоАлюються у відповідь на окисний стрес. В цих дослідженнях стрес індукували діамідом, що виявився більш потужним окиснювачем ніж пероксид водню, що було підтверджено нами і для клітин ссавців. На рис. 3.4.a представлено дані ВБ аналізу лізатів клітин HEK293/Pank1 β після їхньої обробки 500 мкМ пероксидом водню та 500 мкМ

діамідом. Саме тому діамід використовували надалі для визначення спектру білків, КоАлювання яких ініціюється окисним стресом. Зазначений підхід дозволив ідентифікувати біля 2000 білків ссавців в клітинах HEK293/Pank1 β після обробки діамідом. Клітини HEK293/Pank1 β використовуватимуться в подальших експериментах як модельна клітинна лінія зі стабільною надекспресією пантотенаткінази 1 β (PANK1 β), що є основним лімітуючим ферментом швидкості біосинтезу КоА.

Серед ідентифікованих білків було виявлено КоАлювання багатьох кіназ, субстратна специфічність яких варіювала від білків до ліпідів, вуглеводів і нуклеотидів [130]. Одним із визначених ензимів, що піддаються КоАлюванню у відповідь на оксидативний стрес, виявилася кіназа рибосомального білка S6 (S6K1), що є предметом багаторічних досліджень в нашому відділі. Цікаво, що саме завдячуючи S6K1, було ідентифіковано ген ензиму, що залучений в два останні етапи біосинтезу КоА - КоА-синтази, що виявилася білковим партнером S6K1 за даними з використанням двогібридної системи дріжджів [164]. Однак, на жаль доказів функціональної значимості цієї взаємодії поки не встановлено.

Як відомо посттрансляційні модифікації S6K1, як то фосфорилювання, ацетилювання [10], [103], [143], [149], [163] відіграють важливу роль в регуляції функціональної активності S6K1, в тому числі і визначенні її специфічності до множинних субстратів. Нами було висунуто припущення, що ковалентна модифікація S6K1 молекулою КоА (КоАлювання) також може виконувати важливу регуляторну роль. Ця гіпотеза ґрунтувалася на наступних критеріях. По-перше, у клітинах HEK293/Pank1 β , оброблених діамідом, було виявлено КоАльований пептид, що відповідає p70S6K1. На рисунку 3.4.в показано спектри PX-МС отримані з p70S6K1 КоАльованого пептиду (LTDFGLC*K), що містить цистеїн у положенні 217. По-друге, КоАльований Cys217 розташований в активаційній петлі та є віддаленим лише на одну амінокислоту від консервативного мотиву DFG, трипептиду що є необхідним для каталітичної активності кінази. Крім того, сайт фосфорилювання PDK1 (Thr229), який є критично важливим для активації

p70S6K1, також розташований в активаційній петлі, в безпосередній близькості до Cys217. Тому не виключено, що КоАлювання за сайтом Cys217 може регулювати активність p70S6K1 шляхом впливу на фосфорилювання сайту Thr229, що відбувається за участі PDK1. Положення Cys217 відносно загальної структури p70S6K1 схематично зображена на рисунку 3.4.б. Нарешті, за аналогією до КоАлювання кінази Аврора А, для якої було продемонстровано блокування АТФ-зв'язуючого сайту, шляхом утворення комплексу з молекулою КоА [14], ми передбачали ймовірність інгібуючого впливу КоАлювання на активність, подальшу сигналізацію та функцію p70S6K1 за умов оксидативного стресу.

Отже, внаслідок проведеного у співпраці PX-МС аналізу лізатів клітин HEK293/Pank1 β з індукцією оксидативного стресу діамідом, було виявлено пептидну послідовність LTDFGLC*K, цистеїн (Cys217) якої утворює дисульфідний зв'язок з молекулою КоА.

Результати викладені у підрозділі, висвітлено у науковій публікації:

Malanchuk O, **Bdzhola** A, Palchevskyi S, et al (2024) Investigating the Regulation of Ribosomal Protein S6 Kinase 1 by CoAlation. IJMS 25:8747 DOI: 10.3390/ijms25168747.

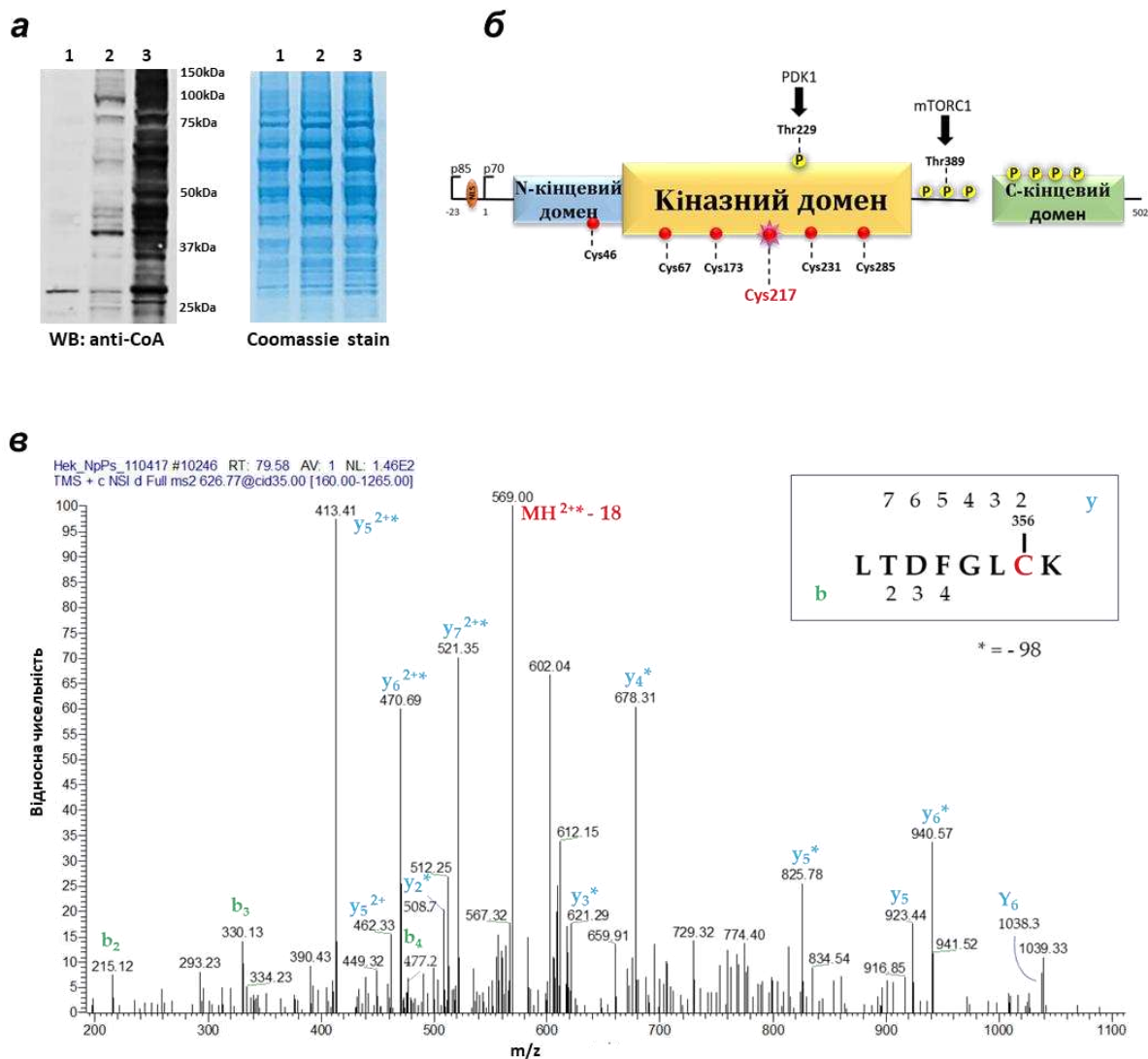


Рис. 3.4. Виявлення КоАлювання p70S6K1 у клітинах HEK293/PanK1β, оброблених діамідом, за допомогою PX-МС; *а* – вестерн-блот аналізом з використанням анти-КоА мАт виявлено значне підвищення рівня КоАлювання протеїнів в клітинах HEK293/PanK1β, оброблених 500 мкМ H₂O₂ (доріжка 2) та 500 мкМ діаміду (доріжка 3) протягом 30 хв, в порівнянні з необробленими контрольними клітинами (доріжка 1). Експеримент повторювали щонайменше тричі з отриманням подібних результатів; *б* – схематична доменна структура p70S6K1. КоАльований Cys217 (червоним) знаходиться в активаційній петлі, так само як і Cys231. Thr229 фосфорилується PDK1, що є критично важливим для активації S6K1; *в* – спектр PX-МС КоАльованого пептиду (LTDFGLC*K), що відповідає p70S6K1

3.3. Аналіз КоАлювання S6K1 *in cellular*

3.3.1. Транзйєтна експресія EE-p70S6K1 в клїтинах HEK293/Pank1 β та її КоАлювання за умов оксидативного стресу. Виявлення КоАльованої p70S6K1 за допомогою мас-спектрометрії в клїтинах HEK293/Pank1 β , оброблених діамїдом, спонукало нас до подальших досліджень КоА-модифікованої S6K1 *in cellular*. Як показано на рис. 3.5, індукція оксидативного стресу, при додаванні до клїтин діамїду, сприяє підвищеному загальному рівню КоАльованих білків у тотальному лізатї клїтин (дорїжка 6), порівняно з необробленими клїтинами (дорїжка 5). Для ідентифікації КоАлювання безпосередньо досліджуваної S6K1 спершу була проведена транзйєтна трансфекція клїтин HEK293/Pank1 β плазмїдою, що кодує p70S6K1, кон'юговану з EE-тагом (Glu-Glu tag). Експерименти з КоАлюванням преципітованої ендогенної p70S6K1 з клїтин HEK293/Pank1 β не демонстрували видимого сигналу при використанні методу вестерн-блоту, у зв'язку з недостатньою чутливістю технології (Додаток А). Тому надалі досліджували надекспресовану кїназу, яку специфічно преципітували з необроблених та оброблених діамїдом клїтин антитїлами проти EE-тагу. На вестерн-блотї, зображеному на рис.3.5.a, чїтко продемонстровано, що їмуопреципітована EE-p70S6K1, з молекулярною масою ~70 кДа, є КоАльованою у клїтинах, оброблених діамїдом (дорїжка 4), порівняно з необробленими трансфікованими клїтинами (дорїжка 3). Задля підтвердження експресії EE-p70S6K1 (дорїжки 3-6) та ефективності їмуопреципітації (дорїжки 3 і 4) мембрану їнкубували з анти-S6K1 (С-кінцевим) полїклональними антитїлами. В результатї високий рівень експресії p70S6K1 внаслідок транзйєнтної трансфекції був наочно продемонстрований. Шифт p70S6K1 в електрофоретичному роздїленнї на дорїжках 4 та 6, у порівняннї з дорїжками 3 та 5, можна пояснити наявністю їнтенсивного КоАлювання внаслідок оксидативного стресу, адже приєднання молекули КоА до білків змїнює як їхню молекулярну масу, так і заряд. Негативними контролями були

імунопреципітати анти-ЕЕ мАт з оброблених діамідом нетрансфікованих клітин (доріжка 2) та сефарози Protein G зв'язаної лише з анти-ЕЕ антитілами (доріжка 1). Для більш наочного підтвердження КоАлювання ЕЕ-p70S6K1 в клітинах НЕК293/Pank1 β , оброблених діамідом, мембрана була проаналізована за допомогою ближньої інфрачервоної флуоресцентної системи детектування. На рисунку 3.5.б проілюстрований рівень імунопреципітованих білків ЕЕ-p70S6K1 (зеленим кольором) та КоАльованих білків (червоним кольором). Накладання флуоресцентних сигналів (жовтий) між імунореактивностями анти-КоА та анти-S6K1 відповідає КоАльованій ЕЕ-p70S6K1.

Отже, досліджуючи КоАлювання p70S6K1 в умовах *in cellular*, було продемонстровано, що при преципітації надекспресованої кінази з клітин, що піддавалися впливу індукованого діамідом оксидативного стресу, спостерігається значний рівень її модифікації молекулою КоА. Підтвердженням були, отримані у вестерн-блоті, сигнали анти-КоА мАт, що належали білку з молекулярною масою ~70 кДа, накладання сигналів анти-КоА та анти-S6K1 антитіл при детекції ближньою інфрачервоною флуоресценцією, та шифт рухливості модифікованих білків при проходженні гель-електрофоретичного розділення за денатуруючих умов.

Результати викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

- 1) Malanchuk O, **Bdzhola A**, Palchevskyi S, et al (2024) Investigating the Regulation of Ribosomal Protein S6 Kinase 1 by CoAlation. IJMS 25:8747 DOI: 10.3390/ijms25168747.
- 2) **Bdzhola A**, Filonenko V, Malanchuk O (2024) S6K1 CoAlation as cellular response to oxidative stress. Materials of the XVIII All Ukrainian conference of young scientists, Kyiv, IMBG (p.8).

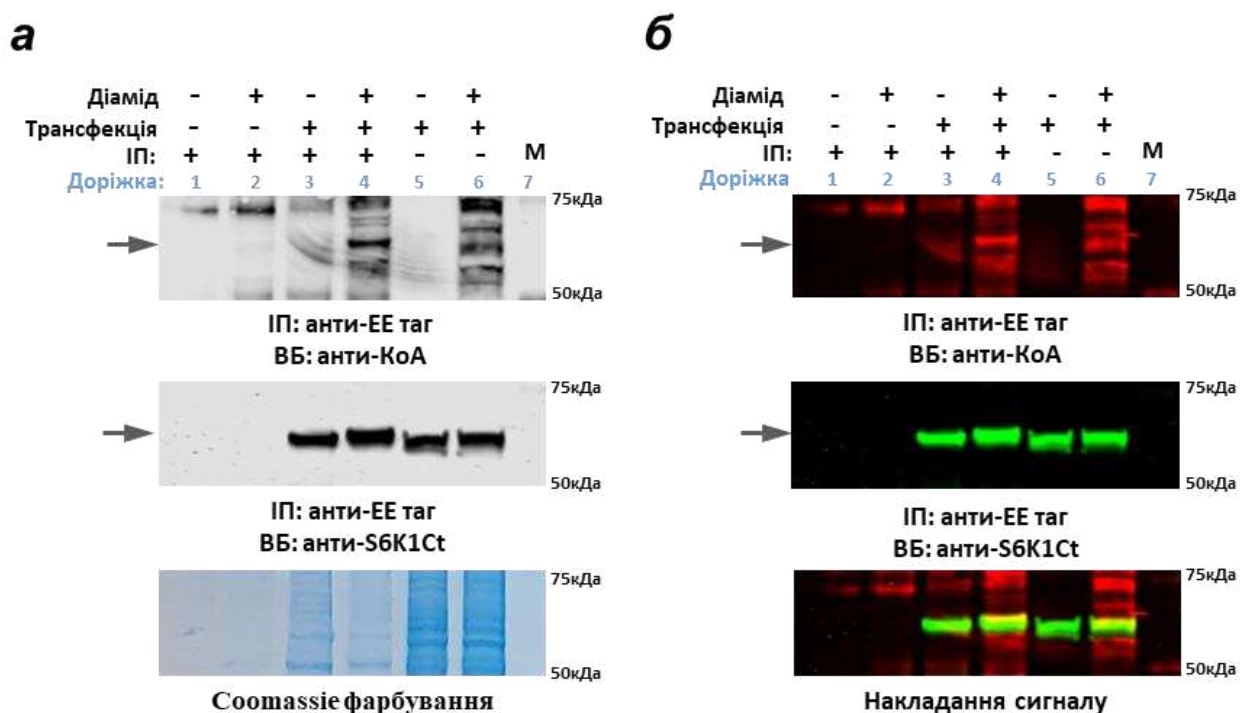


Рис. 3.5. Блотограма аналізу транзійентно надекспресованої ЕЕ-p70S6K1, що КоАлюється в клітинах HEK293/Pank1 β за умов оксидативного стресу; *а* – КоАлювання транзійентно надекспресованої преципітованої ЕЕ-p70S6K1 та білків тотального лізату в необроблених та оброблених діамідом клітин досліджували за допомогою вестерн-блотингу (ВБ) з антитілами проти КоА. Успішність трансфекції детектували антитілами проти S6K1. Доріжка 7 - білкові маркери; *б* – КоАлювання ЕЕ-p70S6K1 у клітинах HEK293/Pank1 β з використанням системи ближньої інфрачервоної флуоресцентної детекції. Рівень імунопреципітованого ЕЕ-p70S6K1 показано зеленим кольором, КоАльованих білків - червоним. Жовтий колір демонструє накладання флуоресцентних сигналів між анти-КоА та анти-S6K1, відповідає КоАльованій ЕЕ-p70S6K1. Стрілками вказана ЕЕ-p70S6K1. Контроль навантаження за допомогою InstantBlue Coomassie фарбування гелю після електропереносу. Експеримент було відтворено шість разів

3.3.2. Вплив мутацій C217A та C231A у p70S6K1 на рівень її КоАлювання в клітинах HEK293/Pank1 β за умов оксидативного стресу.

Зображена на рис.3.4.б схема доменної організації кінази демонструє наявність шести цистеїнів (Cys46, Cys67, Cys173, Cys217, Cys231, Cys285) у амінокислотній послідовності досліджуваної S6K1. Використовуючи програмне забезпечення Discovery Studio, ми виявили, що усі вони знаходяться на поверхні білка таким чином, що їхні тиольні –SH групи орієтовані назовні. Таке розташування цистеїнових залишків потенційно могло б забезпечувати КоАлювання будь-якого з них. Проте, згідно даних, отриманих в результаті проведеного мас-спектрометричного аналізу, за умови індукції оксидативного стресу КоАлюється лише цистеїн у положенні 217, що розташований у активацій петлі кіназного домену S6K1 на відстані двох амінокислот від DFG мотиву («DFG+2» позиція). Однак, окрім згаданого Cys217 у ділянці активаційної петлі також розташований Cys231, який є у безпосередній близькості до Thr229 («T+2» позиція), ключового для активності кінази PDK1-залежного сайту фосфорилювання.

Згідно даних літератури близько 1,4% усіх еукаріотичних протеїнкіназ мають консервативне розташування обох цистеїнових залишків у позиціях «DFG+2» та «T+2» [166]. Вважається, що пара таких цистеїнів може бути залученою до утворення внутрішньомолекулярних та/або міжмолекулярних аутоінгібуючих дисульфідних зв'язків в AKT, MELK, а також BRSK1/2 та інших кіназах. Крім того понад 11,5% усіх протеїнкіназ еукаріотів містять хоча б один з консервативних цистеїнів, в перерахованих вище позиціях [166]. Серед них є Аврора кіназа А, в якій з консервативних цистеїнів присутній лише Cys290 «T+2», для якого було продемонстровано інтенсивне КоАлювання у відповідь на окислювальні агенти [14]. Досліди, проведені на Аврора А зі штучним створенням додаткового цистеїну в положенні «DFG+2», шляхом сайт-спрямованого мутагенезу (S278C), також продемонстрували значний рівень інактивації кінази при індукції оксидативного стресу, внаслідок утворення інтрамолекулярного дисульфідного зв'язку

C290-SS-C278 [166]. Такий механізм інгібування виникає у відповідь на оксидативний стрес і є зворотнім процесом, що відновлюється при додаванні агенту ДТТ в умовах *in vitro*, відіграючи роль досить важливого редокс-регулюючого фактору у підтримці подальшого функціонування кінази.

Оскільки для багатьох кіназ, було продемонстровано формування інтрамолекулярного зв'язку між цистеїнами в каталітичному домені, очевидним стає факт, що при підвищенні вмісту АФК у клітині може відбуватися утворення ковалентного дисульфідного зв'язку і між залишками Cys217 та Cys231 в молекулі S6K1, що в свою чергу може призводити до стеричних змін і, як наслідок, блокування доступу молекули АТФ до АТФ-зв'язуючої кишені та подальшої деактивації кінази.

Зважаючи на те, що методом РХ-МС було визначено КоАлювання саме цистеїнового залишку в позиції 217, нашим завданням було підтвердити те, що Cys217 є ключовим сайтом КоАлювання та перевірити гіпотетичну можливість впливу Cys231 на ефективність його КоАлювання шляхом існування дисульфідного зв'язку між Cys217 та Cys231 по аналогії з іншими кіназами, що мають консервативну активаційну Т-петлю. Для цього було створено мутантні форми S6K1, що містили C217A та C231A заміни та перевірено рівень їхнього КоАлювання за умов індукції оксидативного стресу.

Відповідно, у ході роботи було створено плазмід, на основі повнорозмірної EE-p70S6K1 дикого типу, з мutowаними сайтами Cys217 та Cys231, використовуючи протокол сайт-спрямованого мутагенезу. Замінюючи амінокислотні залишки цистеїну на аланін, на основі вектору pcDNA3.1 було створено плазмід EE-p70S6K1 (C217A) та EE-p70S6K1 (C231A), послідовності яких підтверджувались секвенуванням. За теоретичною гіпотезою, при надмірному окисненні, S6K1 з мutowаним Cys217 повинна мати нижчий або відсутній рівень КоАлювання у порівнянні з контрольною кіназою дикого типу. На противагу, кіназа, що не містить Cys231 в послідовності, не має містити перешкод для

взаємодії КоА з сайтом Cys217, отже, рівень КоАлювання EE-p70S6K1 (C231A) мусить зростати.

В ході експерименту, модельну клітинну лінію HEK293/Pank1 β транзійтно трансфікували плазмідами EE-p70S6K1 дикого типу та мутантними формами C217A та C231A. Після індукції оксидативного стресу клітини збирали, лізували та преципітували з них надекспресовану кіназу на сефарозу, кон'юговану з антитілами проти EE-тагу. Вестерн-блот, проведений зі зразків імунопреципітатів та тотальних лізатів, детектували антитілами проти КоА для визначення рівня модифікації, а також анти-S6K1 антитілами для визначення якості трансфекції (рис.3.6.а).

У випадку рис.3.6.а,б варто зацентувати увагу та порівняти між собою доріжки 4, 9 та 13, що відображають рівень КоАлювання преципітованої p70S6K1. Щоб точно визначити зміну рівня КоА модифікацій, проводили денситометрію сигналів КоАлювання відносно рівня експресованої S6K1 у програмі обробки зображень ImageJ та статистичний аналіз з використанням двостороннього t-критерію Стьюдента. Згідно стовпчикової діаграми зображеної на рис.3.6.в рівень КоАлювання мутантної форми C217A знижувався лише на 30% замість очікуваних 100%. Натомість КоАлювання форми C231A навпаки зростало на 40%. Перше спостереження свідчить на користь існування, або щонайменше одного додаткового сайту КоАлювання, або ж його появу в наслідок внесення мутації C217A. Таким сайтом може бути і Cys231, що КоАлюється лише за відсутності Cys217. З іншої сторони підвищення КоАлювання мутантної форми C231A дійсно може свідчити на користь існування інтрамолекулярного дисульфідного зв'язку між Cys217 та Cys231, який виявлено для деяких кіназ, що мають два цистеїнових залишки в межах активаційної Т-петлі і який може мати негативний вплив на рівень КоАлювання Cys217.

Варто зазначити, що Cys231 кінази S6 в позиції «Т+2» є аналогом Cys290 Аврори кінази А, що має відповідне розташування поруч з сайтом активації Thr288.

Оскільки Cys290 Аврори А є єдиним цистеїном в активаційній петлі, саме він піддається активному КоАлюванню, забезпечуючи регуляцію ензиму [14]. Висока лабільність молекули КоА, а особливо її пантетеїнового хвоста, довжиною до 11Å, дозволяє їй КоАлювати Cys231 за відсутності Cys217, відстань між тільними залишками яких становить 7Å.

Для вибірки експериментів, зображеної на Рис.3.3.В, значення коефіцієнту Пірсона було <0,05, а отже, отримані результати співпадають з запропонованою гіпотезою. Проте наведені дані є виключно попередніми висновками, оскільки лише частина експериментів (три з шести) продемонструвала наведений патерн розподілу сигналів КоАлювання. Для остаточного підтвердження висунутої нами гіпотези планується проведення мас-спектрометричного аналізу мутантних форм p70S6K1 для визначення рівня взаємодії КоА з модифікованою кіназою. Надалі також планується дослідити вплив немодифікованих та КоАльованих цистеїнових мутантів на активність кінази, а також підтвердити чи спростувати гіпотезу щодо інгібування p70S6K1 шляхом утворення інтрамолекулярного дисульфідного зв'язку між цистеїнами 217 та 231. Варто також зазначити необхідність створення подвійного цистеїнового мутанту C217A:C231A, та визначення можливості КоАлювання кінази з такою модифікацією, а також дослідити активність подвійного мутанту в *in vitro* кіназних реакціях.

Отже, згідно попередніх результатів, отриманих внаслідок окислення цистеїнових мутантів C217A та C231A преципітованої надекспресованої p70S6K1 в умовах *in cellular*, заміщення цистеїну в положенні 217 може негативно впливати на рівень КоАлювання кінази. Паралельно з цим мутація цистеїну в позиції 231 ймовірно підсилює рівень КоАлювання p70S6K1, шляхом звільнення тільної групи Cys217 для формування дисульфідного зв'язку з пантетеїновим хвостом КоА. Отримані дані потребують додаткової верифікації шляхом проведення мас-спектрометричного аналізу.

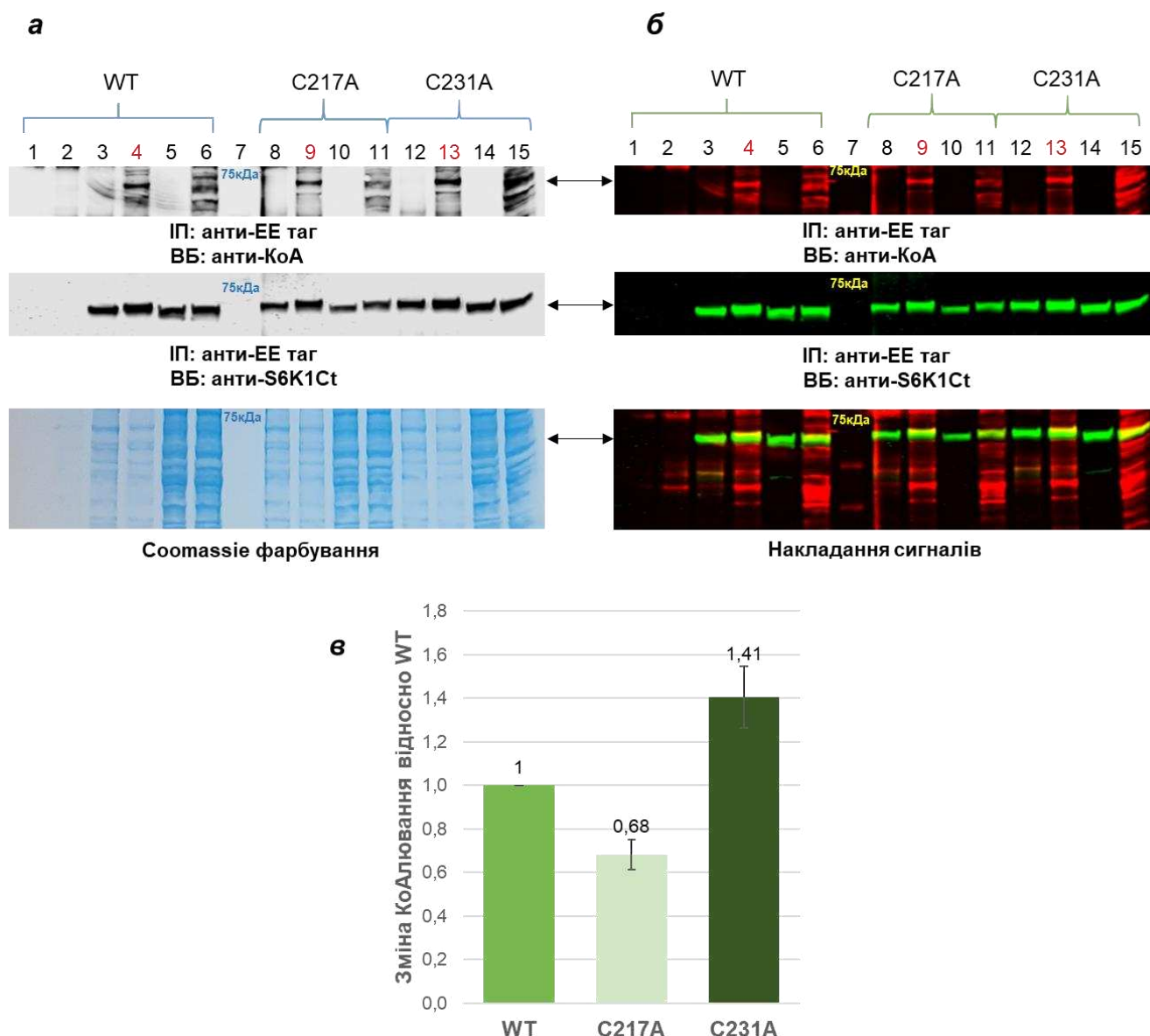


Рис. 3.6. Вестерн-блот аналіз КоАлювання транзійентно експресованої ЕЕ-р70S6K1 дикого типу (WT) та мутантних форм, що містять заміни цистеїнових залишків (C217A; C231A), в клітинах HEK293/Pank1 β за умов оксидативного стресу з використанням анти-КоА антитіл; *а* – Рівень КоАлювання імунопреципітованих ЕЕ-р70S6K1 (WT, C217A, C231A) та білків тотальних лізатів з необроблених та оброблених діамідом клітин. Успішність трансфекції детектували антитілами проти S6K1. В якості негативних контролів використовували сефарозу Protein G, кон'юговану з анти-ЕЕ антитілами (доріжка 1) та імунопреципітацію анти-ЕЕ мАт з оброблених діамідом нетрансфікованих клітин (доріжка 2). Зразки імунопреципітатів з необроблених клітин відповідають

доріжкам 3 (дикий тип), 8 (C217A), 12 (C231A), в той час як преципітати зі стресованих діамідом клітин нанесені на доріжках позначених червоною нумерацією – 4 (дикий тип), 9 (C217A), 13 (C231A). Тотальні лізати з необроблених клітин відповідають доріжкам 5 (дикий тип), 10 (C217A), 14 (C231A), лізати зі стресованих клітин доріжкам 6 (дикий тип), 11 (C217A), 15 (C231A). Доріжка 7 - білкові маркери; *б* – КоАлювання EE-p70S6K1 у клітинах HEK293/Pank1 β з використанням системи ближньої інфрачервоної флуоресцентної детекції. Рівень імунопреципітованого EE-p70S6K1 показано зеленим кольором, КоАльованих білків - червоним. Жовтий колір демонструє накладання флуоресцентних сигналів між анти-КоА та анти-S6K1, відповідає КоАльованій EE-p70S6K1. Нумерація червоним кольором позначає преципітовану кінразу різних форм зі стресованих клітин. Стрілками вказана EE-p70S6K1. Контроль навантаження за допомогою InstantBlue Coomassie фарбування гелю після електропереносу; *в* – Графік даних кількісного визначення ступеню КоАлювання відносно дикого типу (WT) кінрази. Кількісний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення ImageJ, для статистичного аналізу використовували непараметричний двосторонній t-критерій Стьюдента, $p < 0,05$. Експеримент проводили в трьох повторах. Експеримент було відтворено 3 рази

3.4. Імунофлуоресцентний аналіз КоАлювання S6K1

3.4.1. Детекція КоАлювання S6K1 за визначенням співлокалізації молекул методом імунофлуоресцентного аналізу. Використання методів імунофлуоресцентного аналізу для визначення співлокалізації КоАльованих білків та кінрази S6K1, за допомогою конфокальної мікроскопії, є доцільним оскільки дозволяє візуалізувати субклітинну локалізацію саме КоАльованої кінрази в клітині. Крім того, імунофлуоресцентний аналіз забезпечує можливість проведення

кількісної оцінки вмісту КоАльованої форми S6K1, що доповнює результати імунопреципітації та вестерн-блоту. Вагомою перевагою імунофлуоресцентного методу є його чутливість, що дозволяє досліджувати КоАлювання ендогенної форми S6K1 без потреби у надекспресії кінази, що наближує умови проведення досліду до фізіологічних. Таким чином, поєднання цих методів дозволяє отримати більш повне уявлення про КоАлювання S6K1, підвищуючи достовірність висновків і розширюючи межі дослідження.

Відомо, що КоАлювання протеїнів спостерігається не лише за умов оксидативного стресу, але і під час метаболічного стресу, що викликається, зокрема, дефіцитом або надлишком поживних речовин, або відсутністю чи низьким рівнем глюкози у середовищі [108]. На першому етапі ми досліджували вплив саме метаболічного стресу на рівень КоАлювання S6K1. На рис.3.7.в, представлено результати імунофлуоресцентного аналізу клітин HEK293/Pank1 β , що піддавалися метаболічному стресові за умов культивування в середовищі з 10% FBS та низьким рівнем глюкози (1 г/л) протягом 24 год. Перш за все варто відмітити досить високий рівень КоАлювання цитоплазматичних білків за умов індукції низькоглюкозного метаболічного стресу. На зображеній мікрофотографії спостерігаємо часткову співлокалізацію (оранжевий, жовтий) сигналів від S6K1 (червоний), що детектувалася антитілами проти С-кінцевої ділянки кінази, та пулу КоАльованих білків клітини (зелений), що візуалізувалися специфічними моноклональними антитілами. Надалі проводили вимірювання коефіцієнту співлокалізації з використанням програмного забезпечення ImageJ та плагіну JACoP. Коефіцієнт Пірсона для співлокалізації за умов метаболічного стресу у цьому випадку становив 0,7. Коефіцієнт Пірсона надає можливість розрахувати ступінь колокалізації двох молекул, варіює від 1 до -1, чим ближче отримане значення до 1, тим вищий ступінь співлокалізації білків чи молекул інтересу. У випадку метаболічного стресу, індукованого як низьким рівнем глюкози, так і відсутністю поживних речовин протягом 24 годин (рис.3.7.г), клітини демонстрували вищий рівень загального КоАлювання білків, і відповідно вищий рівень їхньої

колокалізації кінази з S6K1 та Коензиму А, що вказує на інтенсивніше КоАлювання кінази за умови нестачі поживних речовин для підтримки нормального метаболізму клітиною. Коефіцієнт співлокалізації Пірсона в умовах даного виду стресу становив – 0,765. Для порівняння, коефіцієнт співлокалізації Пірсона для імунофлуоресцентних сигналів в клітинах, що культивувалися за нормальних умов, становив 0,562 (рис.3.7.б).

Наступним етапом досліджували колокалізацію S6K1 з КоА за умов оксидативного стресу, викликаного додаванням арсеніту. Використання альтернативного оксидативного агента – арсеніту, обумовлюється тим, що діамід, пероксид водню та арсеніт відрізняються механізмом дії, а отже кожен із них може ініціювати КоАлювання та пов'язані із ним процеси різними шляхами. Так, H_2O_2 , насамперед, впливає на білки, що містять тіолові групи, це призводить до окислення залишків цистеїну з утворенням дисульфідних зв'язків. Діамід є тіол-специфічним окислювачем, який безпосередньо впливає на загальний тіоловий пул клітини, зокрема на глутатіон (GSH), окислюючи його до глутатіон-дисульфіду (GSSG). Діамід не генерує активних форм кисню, як H_2O_2 , але натомість викликає оксидативний стрес шляхом накопичення окисленого GSSG, який не здатен утворити глутатіонпероксидази, що і сприяє акумулюванню H_2O_2 та відповідно АФК в клітині [167]. Арсеніт, в свою чергу, зв'язується з -SH групами білків, особливо тих, що містять близько розташовані тіоли (пари цистеїнів), порушуючи їхню структуру та функцію, опосередковано викликаючи оксидативний стрес через інгібування антиоксидантних систем (глутатіонову, тіоксиредоксинову тощо). Кожен із цих окислювальних агентів має свій автентичний вплив на метаболічний стан клітини та її гомеостаз в цілому, тому важливо вивчати їхні ефекти нарізно. Дослідження цих відмінностей може надати більш повне розуміння ролі КоАлювання в клітинній відповіді на стрес.

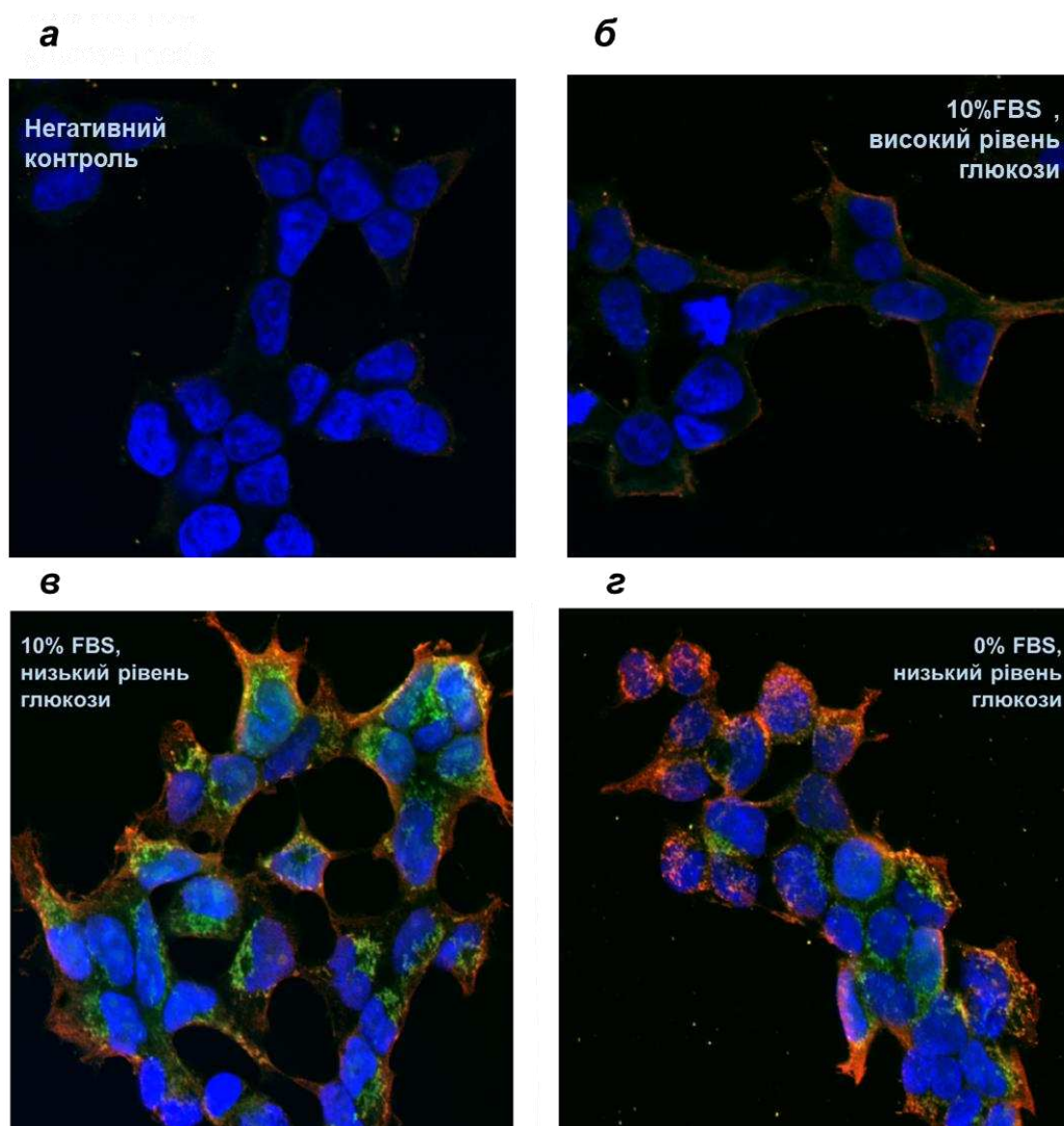


Рис. 3.7. Імунофлуоресцентний аналіз внутрішньоклітинної S6K1 та рівень її співлокалізації з КоА за умов метаболічного стресу у клітинах лінії HEK293/Pank1 β ; *а* – негативний контроль без додавання первинних антитіл; *б* – КоАлювання S6K1 за нормальних умов культивування клітин; *в* – КоАлювання S6K1 за умов метаболічного стресу, спричиненого культивуванням у середовищі з 10% FBS та низьким вмістом глюкози (1 г/л) протягом 24 годин; *г* – КоАлювання S6K1 за умов метаболічного стресу, викликаного культивуванням у середовищі з 0% FBS та низьким вмістом глюкози (1 г/л) протягом 24 годин. Антитіла проти С-кінцевої ділянки S6K1 – червоний (FITC). Моноклональні антитіла проти КоА – зелений (TRITC). Жовтий (оранжевий) колір відповідає співлокалізації КоА з S6K1. Ядра клітин візуалізували барвником Hoechst (синій). Масштаб 10 мкм

При гострому оксидативному стресі, викликаному додаванням 500 мкМ арсеніту протягом 30 хв (рис.3.8.*а*), ми спостерігали вищий рівень КоАлювання білків порівняно з хронічним стресом (рис.3.8.*б*), що було підтверджено методом імунофлуоресценції. Цікавим спостереженням при гострому стресі, викликаному арсенітом, є конденсація сигналів анти-КоА антитіл в клітинах, що нагадують стресові гранули. Крім того, у даних зразках було виявлено вищий рівень колокалізації S6K1 з КоАльованими білками порівняно з хронічним. Коефіцієнт Пірсона для гострого стресу – 0,828, для хронічного – 0,793. Ці дані також

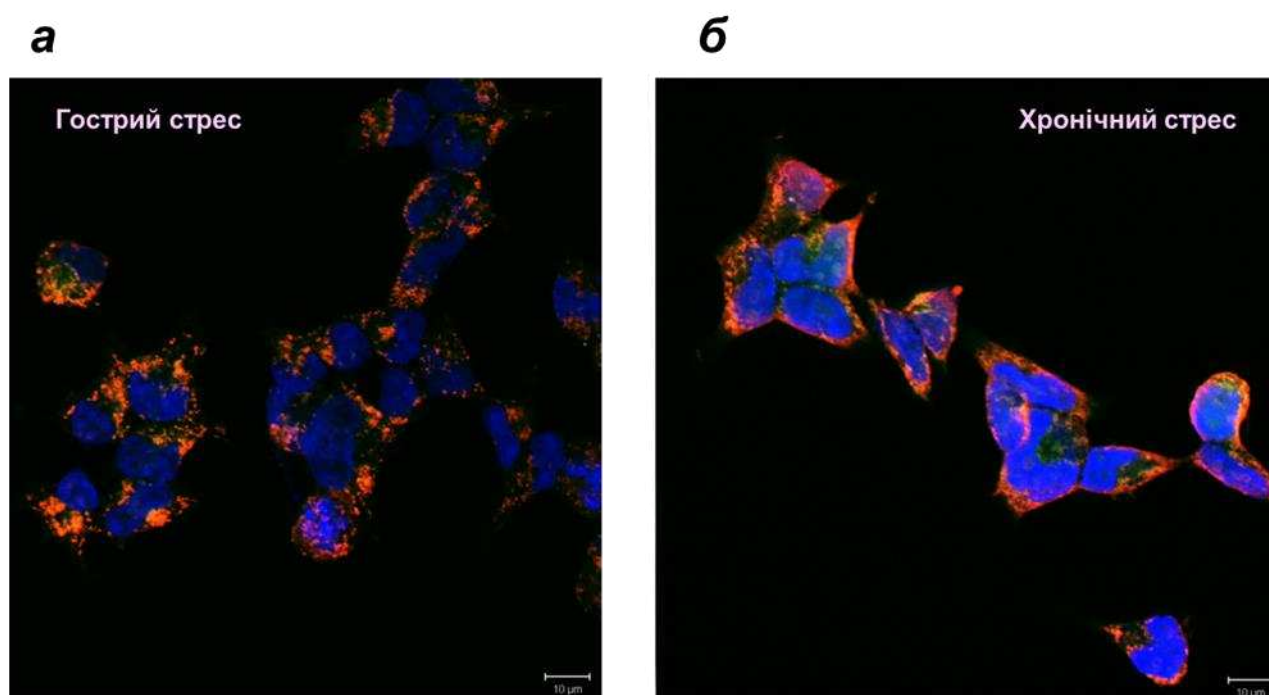


Рис. 3.8. Імунофлуоресцентний аналіз внутрішньоклітинної S6K1 та рівень її співлокалізації з КоА за умов оксидативного стресу у клітинах лінії HEK293/Pank1β; *а* – КоАлювання S6K1 за умов гострого оксидативного стресу, спричиненого додаванням 500 мкМ арсеніту протягом 30 хв; *б* – КоАлювання S6K1 за умов хронічного оксидативного стресу, спричиненого додаванням 30 мкМ арсеніту протягом 2 год. Антитіла проти С-кінцевої ділянки S6K1 – червоний (FITC). Моноклональні антитіла проти КоА – зелений (TRITC). Жовтий колір співлокалізації відповідає КоАльованій S6K1. Ядра клітин візуалізували барвником Hoechst (синій). Масштаб 10 мкм

продemonстрували, що рівень КоАлювання S6K1 є вищим за умов оксидативного стресу, ніж метаболічного. Це може бути пов'язано з тим, що оксидативний стрес викликає більш інтенсивне утворення реактивних форм кисню, які безпосередньо впливають на модифікації білків, зокрема на КоАлювання, що в свою чергу сприяє їх захисту від незворотних окислювальних пошкоджень.

Також важливим аспектом є визначення розподілу КоАльованих білків, в даному випадку КоА-SS-S6K1 у клітині. Отримані раніше у відділі дані [Malanchuk O, Bdzhola A *et al.* «Immunofluorescent detection of Protein CoAlation in mammalian cells», *Biology Open, in press*] демонстрували переважну локалізацію КоАльованих білків у мітохондріях клітини, що цілком пояснюється високим вмістом вільного КоА (в 10 – 30 разів вищим в порівнянні з цитоплазмою) та метаболічних ензимів в даному компартменті [88]. Ці результати були наочно продемонстровані методами імунофлуоресцентного аналізу, під час якого спостерігалась співлокалізація КоАльованих білків та мітохондрій у клітинах, що підлягали оксидативному стресові, а також методом клітинного фракціонування, в якому сигнали КоАльованих протеїнів переважно детектувались у мітохондріях, проте певна кількість КоАльованих була виявлена в цитозолі. Відомо, що за стресових умов S6K1 одночасно каталітично інактивується та дефосфорилується за залишком Thr389, а фосфорилування за цим сайтом не тільки необхідне для кіназної активності S6K1, але й також регулює ядерно-цитоплазматичну локалізацію білка, зміщуючи кіназу в основному в цитоплазму [168]. На рисунках 3.5 та 3.6 спостерігаємо цитоплазматичний розподіл колокалізації S6K1 з КоА. Ми також можемо припустити, що міграція кінази з ядерної в цитоплазматичний компартмент у відповідь на стрес може бути пов'язана також з необхідністю захистити себе від незворотної втрати функції, шляхом зв'язування з КоА.

Отже, методом імунофлуоресцентного аналізу з використанням принципу колокалізації ми визначили, що співлокалізація молекул, яка має відповідати КоАлюванню S6K1 виникає як у відповідь на метаболічний, так і оксидативний стрес, в залежності від умов культивування клітин.

3.4.2. PLA аналіз КоАлювання S6K1 за умови оксидативного стресу. У наступному дослідженні ми застосували *in situ* метод проксимального лігування (PLA, proximity ligation assay) як альтернативний метод детекції КоАлювання S6K1 у клітинах HEK293/Pank1 β , що були культивовані за умов окислювального стресу. PLA метод може доповнювати імунофлуоресцентний аналіз, оскільки він є чутливим до виявлення та кількісного визначення ступеню взаємодії між двома молекулами. Його переваги полягають у зменшенні фонового та неспецифічного забарвлення, що може спостерігатись при використанні традиційних методів імунофлуоресценції. Також, детектуючи наближені між собою молекули, PLA дозволяє виявити посттрансляційні модифікації (ПТМ), які важко встановити за допомогою простих досліджень співлокалізації.

Для виявлення ПТМ методом PLA необхідні два типи первинних антитіл, що були отримані з тварин різних видів. Одним з таких антитіл має бути антитіло, специфічне до білка-мішені, в нашому випадку С-кінцеві анти-S6K1; інше таке, що розпізнає безпосередньо посттрансляційну модифікацію, в нашому випадку це КоАлювання і відповідно анти-КоА мАт. PLA пробями є вторинні антитіла, отримані з різних видів тварин, та кон'юговані з нуклеотидними мітками, що є комплементарними одна до одної (рис.3.9). У випадку, якщо PLA проби знаходяться в безпосередній близькості одна від одної, комплементарні послідовності гібридизуються та забезпечується їх з'єднання при додаванні ферменту лігази. Наступне додавання ДНК-полімерази сприяє утворенню кільцевої ДНК, що містить флуоресцентно мічені олігонуклеотиди. Якщо ПТМ присутня на білку, генерується флуоресцентний сигнал, що детектується у вигляді точки [169]. Максимальна відстань між двома молекулами, які можуть в подальшому генерувати сигнал для детекції, становить від 15 до 40 нм залежно від довжини олігомерів і того, чи було використано первинні антитіла безпосередньо кон'юговані з олігомером, чи додатково наносили кон'юговані вторинні антитіла [170].

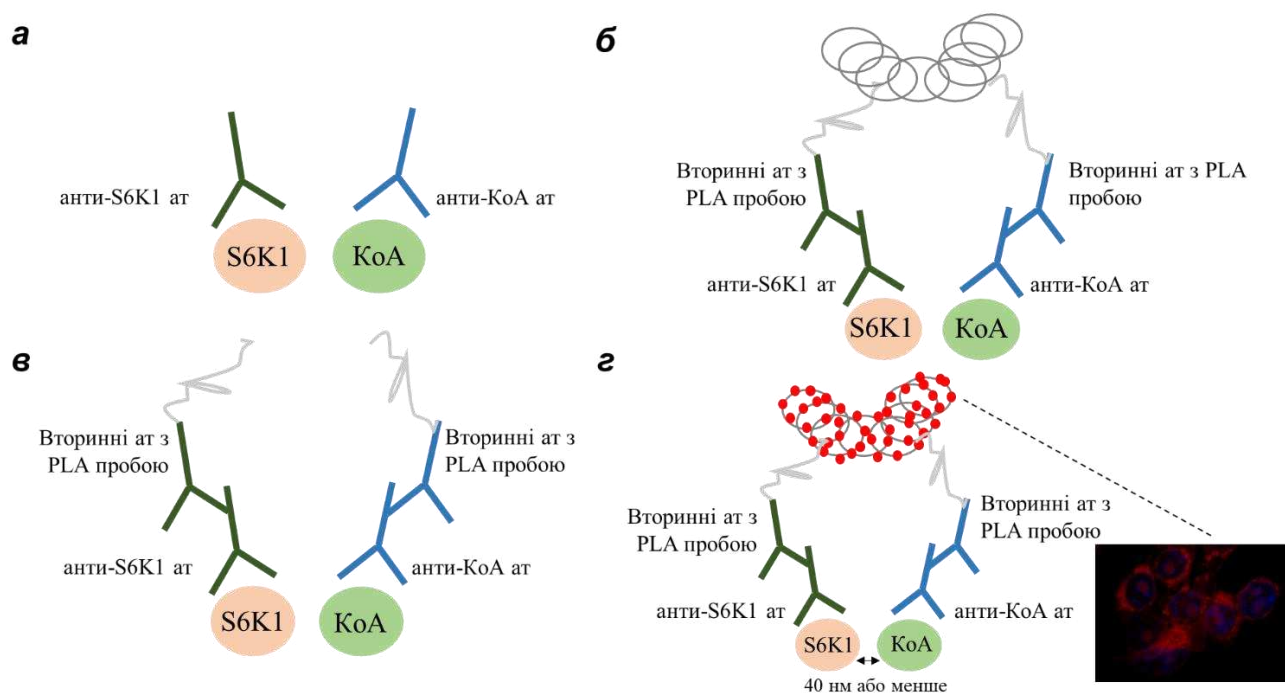


Рис. 3.9. Схема PLA для дослідження КоАлювання S6K1; *а* – додавання первинних антитіл проти S6K1 та КоА, відповідно; *б* – додавання вторинних антитіл з PLA-пробами PLUS ДНК та MINUS ДНК відповідно; *в* – додавання лігази та циркуляризації двох ДНК олігонуклеотидів; *г* – додавання ДНК-полімерази та ампліфікація. Флуоресцентно мічені комплементарні олігонуклеотидні проби зв'язуються з ампліфікованою ДНК. Сигнал з'являється у вигляді чіткої точки і може бути візуалізований за допомогою флуоресцентної мікроскопії

Дані, представлені на рис. 3.10, вказують про низький флуоресцентний PLA сигнал взаємодії молекули КоА з S6K1 в клітинах HEK293/Pank1 β , не оброблених H₂O₂ (рис.3.10.б). Значне збільшення імунореактивного сигналу спостерігаємо в клітинах, що підлягали оксидативному стресу при додаванні пероксиду водню (рис.3.10.в). Негативним контролем (рис.3.10.а), згідно якого вираховувався ступінь КоАлювання кінази, був зразок, що не інкубувався в первинних антитілах. Кількісний аналіз імунофлуоресцентної активності PLA (рис.3.10.г), що вираховувався в програмі обробки зображень ImageJ, полягав у розрахунку кількості точок флуоресцентного сигналу на клітину. Згідно аналізу одержаних мікрофотографій відбувається двократне збільшення кількості точок для зразків,

що зазнали індукованого пероксидом водню оксидативного стресу (362 ± 22 точки/клітину) відносно необроблених клітин (177 ± 12 точки/клітину). Такі показники свідчать про вищий рівень асоціації утворення КоА-SS-S6K1 при збільшенні кількості АФК у середовищі за умови оксидативного стресу.

В результаті проведених експериментів методом PLA були підтверджені дані щодо КоАлювання S6K1 в умовах *in cellular*, що узгоджуються з попередніми відомостями, отриманими мас-спектрометрією, імунофлуоресцентним аналізом, імунопреципітацією та вестерн блот аналізом.

Отже, шляхом методів імунофлуоресценції та застосуванням протоколів PLA та конфокальної мікроскопії, було виявлено значний рівень КоАлювання S6K1 *in vivo* у різних клітинних лініях за умов оксидативного стресу, індукованого низкою агентів.

Результати викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

- 1) **Bdzhola AV**, Filonenko VV, Gout IT, Malanchuk OM (2023) The use of the in situ proximity ligation assay for validating S6 kinase 1 CoAlation under oxidative stress. *Biopolym Cell* 39:277–282
- 2) **Bdzhola A**, Filonenko V, Malanchuk O (2024) S6K1 CoAlation as cellular response to oxidative stress. *Materials of the XVIII All Ukrainian conference of young scientists, Kyiv, IMBG* (p.8).

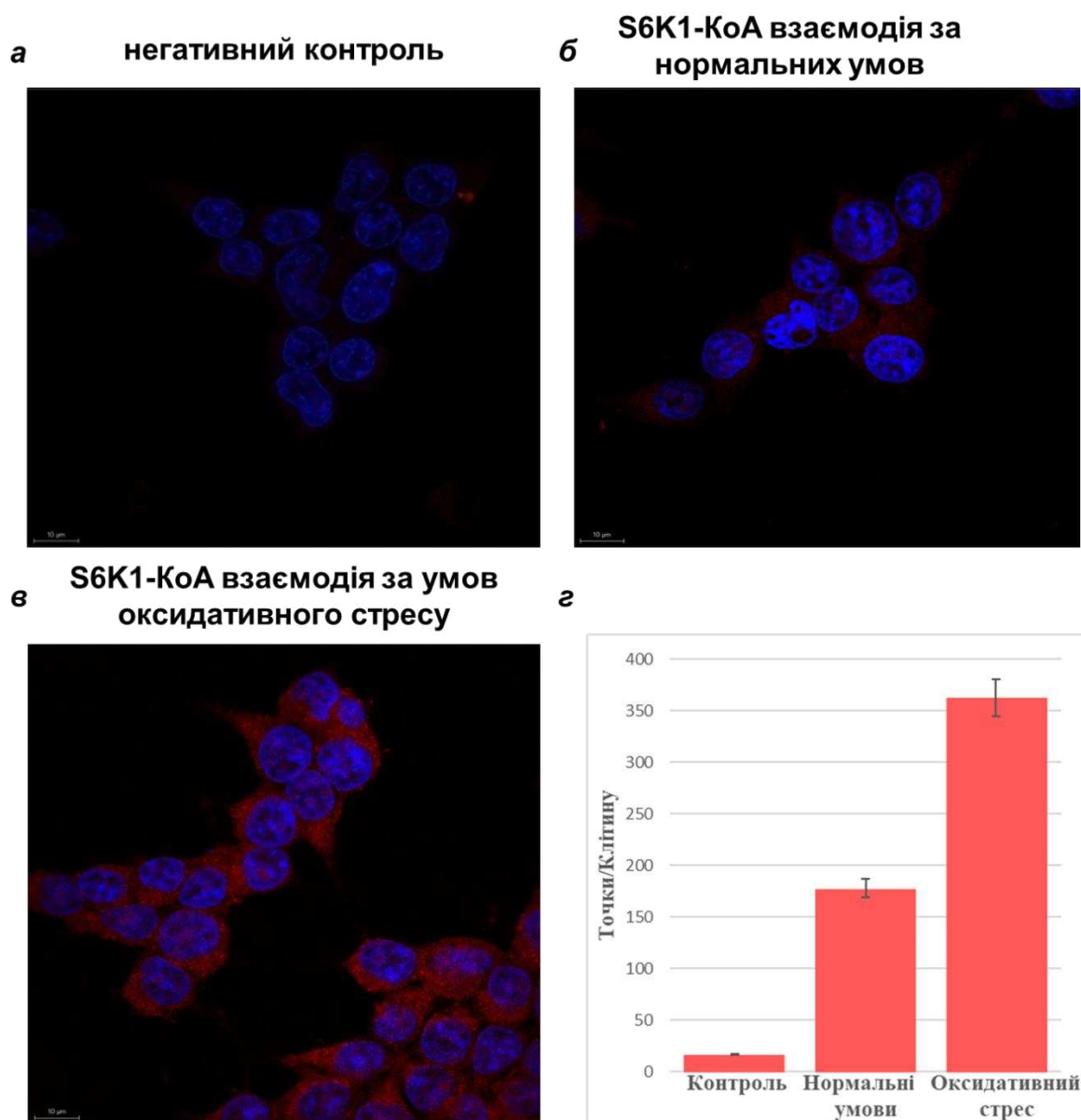


Рис.3.10. Використання методі PLA для детекції КоАльованої S6K1; *а* –негативний контроль; оксидативний стрес, індукований обробкою клітин HEK293/Pank1 β H₂O₂ (*в*) посилює рівень КоАлювання p70S6K1 порівняно з контролем за нормальних умов культивування (*б*). PLA для КоА-SS-p70S6K1 (червоний); ядра забарвлені DAPI (синій). Масштаб: 10 мкм; *г* – Графік даних кількісного визначення PLA в точках на клітину. Кількісний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення ImageJ, для статистичного аналізу використовували непараметричний двосторонній t-критерій Стюдента, $p < 0,05$. Експеримент проводили в трьох повторях

3.5. Дослідження *in vitro* КоАлювання рекомбінантного білка p70S6K1

3.5.1. Отримання конститутивно активної рекомбінантної форми p70S6K1, з використанням співекспресії генів *RPS6KB1* та *PDPK1* в Vac-to-Vac бакуловірусній системі експресії. Для вивчення особливостей КоАлювання рекомбінантної форми кінази, а також для визначення впливу цієї модифікації на активність p70S6K1, пріоритетом наступного завдання була розробка універсального методу експресії та очищення високоактивної p70S6K1. Оскільки, як згадувалось раніше, активація S6K1 є досить складним механізмом, що включає поетапне фосфорилювання за багатьма сайтами [1], процес створення рекомбінантної конститутивно активної форми S6K1 потребує детального розуміння низки подій, що відбуваються з цільовою кіназою у відповідь на фактори росту, цитокіни тощо. Механізм активації кінази має два ключових послідовних етапи: фосфорилювання гідрофобного мотиву (НМ) в положенні Thr389 з боку кінази mTORC1 та фосфорилювання Thr229 в Т-петлі кінази за допомогою PDK1. Однак у неактивній конформації С-кінцевий автоінгібіторний домен (AID) S6K1 стерично блокує доступ до гідрофобного мотиву і Т-петлі, і, таким чином, пригнічує активацію кінази. Тому спершу відбувається фосфорилювання численних сайтів в AID, що призводять до конформаційних змін, які надають можливість mTORC1 та PDK1 фосфорилювати Thr389 і Thr229 в НМ і Т-петлі, відповідно [154]. Згідно існуючих даних, відомо, що етап фосфорилювання Thr389 у гідрофобному мотиві не є обов'язковим для подальшої промоції фосфорилювання Thr229 в петлі активації з боку PDK1. Натомість фосфорилювання сайту Thr229 є критичним для того, щоб mTORC1 міг фосфорилювати гідрофобний мотив [171], [172].

Наразі існує декілька варіантів отримання рекомбінантної S6K1 з високим рівнем активності. Наприклад, комерційно доступну активну форму p70S6K1 (Thermo Fisher Scientific, #PV3815) спершу експресували в бакуловірусній системі,

а потім *in vitro* активували, фосфорилуючи сайт Thr229 за допомогою рекомбінантної PDK1. Високоактивна форма S6K1 також була отримана з транзійтно трансфікованої культури клітин ссавців HEK293 [173]. Незважаючи на високу якість ферментів, отриманих за допомогою таких підходів, вищезгадані методології є складними, трудомісткими та вартісними.

Опосередкована бакуловірусом експресія конститутивно активної рекомбінантної p70S6K1, отриманої шляхом ко-інфекції з вірусом, що несе ген рекомбінантної PDK1, була описана Кешвані та ін. [174], [175]. Раніше у відділі також тестували експресію активної S6K1 за рахунок ко-інфекції з вірусом, що несе PDK1 (дані не опубліковано). Ми виявили, що якість та кількість експресованої S6K1, одержаної внаслідок ко-інфекції, прямо залежали від оптимального співвідношення двох вірусів і загального MOI (multiplicity of infection, значення кратності інфекції), які варіювали для вірусів з різних стоків. Щоб унеможливити виникнення таких проблем, було вирішено створити єдину конструкцію, яка б водночас експресувала білки S6K1 та PDK1. Отже, в результаті, нами вперше було отримано експресію конститутивно активної p70S6K1 з використанням вектора pFastBac™ Dual у системі бакуловірусної експресії Bac-to-Bac.

Вектор pFastBac™ Dual має два сайти клонування, один з яких контролюється поліедриновим промотором (Ppol), інший промотором p10, забезпечуючи одночасну експресію двох гетерологічних генів. Спершу була сконструйована плазмідна за основи вектору pFastBac™ Dual для експресії мутантної форми S6K1, що була позбавлена аутоінгібіторного домену та містила заміну T389D, що, в свою чергу мімікрувала фосфорилування Thr389 (6His-p70S6K1(ΔAID)-T389D); та мутантної форми PDK1, що містила делецію PH домену відповідального за закорювання кінази на плазматичній мембрані (PDK1ΔPH) (рис.3.11.а).

PDK1-залежне фосфорилування сайту Thr229 є критичним етапом в активації S6K1 (рис.3.11.б), і на відміну від Thr389 його фосфорилування

неможливо імітувати заміною на фосфомімікуючі амінокислотні залишки. Було виявлено, що активність S6K1 для двічі мutowаного (T389E, T229E) білка, експресованого бакуловірусу, є дуже низькою [176]. Отже, для активації S6K1 необхідно лише безпосереднє фосфорилювання Thr229 її прямим регулятором PDK1. Схематична структура отриманого рекомбінантного ДНК конструкту представлена на рисунку 3.11.б, де зображено ДНК послідовність нативної форми p70S6K1, що була модифікована додаванням 6His-мітки до N-кінцевого регуляторного домену (NR), видаленням С-кінцевого домену, що містить автоінгібіторний мотив (AID), та мутацією ділянки T389 на D389 для імітації mTORC1-залежного фосфорилювання. Отриману рекомбінантну плазмиду було використано для клонування 6xHis-міченого S6K1 (залишки 3-398, T389D), під контролем промотора P_{pol}, та неміченого PDK1, без мембранозв'язуючого PH домену (залишки 51-309), під контролем промотора P₁₀ (рис.3.11.а).

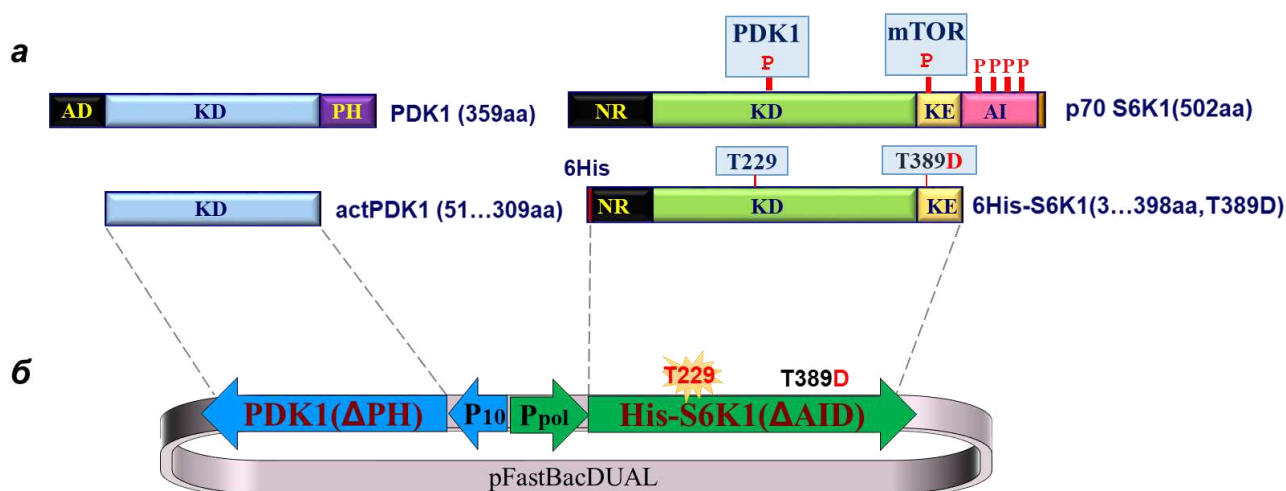


Рис. 3.11. Схематичне зображення рекомбінантного бакуловірусного ДНК конструкту; *а* – доменна структура нативних та рекомбінантних форм PDK1 та p70S6K1; *б* – схема ДНК конструкту рекомбінантної плазмиди для ко-експресії модифікованої p70S6K1 разом з PDK1 в pFastBac™ Dual векторі

Використовуючи традиційний метод культивування клітин Sf9 в суспензії, Ni-NTA афінну хроматографію та подальший діаліз, було отримано

рекомбінантний продукт (надалі His-actS6K1) високої чистоти з розрахованою молекулярною масою 46,4 кДа (рис.3.12.а). Як показано на рисунку 3.12.б, білок відповідного розміру був розпізнаний у вестерн-блот аналізі з використанням специфічних анти-pT229 S6K1 антитіл, як в лізаті інфікованих клітин Sf9 (доріжка 2), так і очищеному препараті рекомбінантного His-actS6K1 (доріжка 3). Рекомбінантний білок не був виявлений у 20 мкг загального лізату неінфікованих клітин (доріжка 1). Імуноблот, зображений на рисунку 3.12.б, продемонстрував не лише специфічність отриманого білка, але і його ефективне фосфорилювання за сайтом Thr229 за участі співекспресованої PDK1(Δ PH), що є вирішальним для активації S6K1. Розроблений протокол полегшує очищення вже фосфорилюваної рекомбінантної S6K1, експресованої у значній кількості, забезпечуючи ефективно та спрощене виділення кінази для подальших досліджень.

Для перевірки активності експресованої кінази було проведено *in vitro* кіназний тест з використанням, як субстрату, пептиду S6 рибосомного білка, що містить специфічні для S6K1 сайти фосфорилювання Ser235/236 та Ser240/244. Результати вестерн-блот аналізу з використанням фосфоспецифічних антитіл pSer235/236 кінази, наведені на рисунку 3.13.а, демонструють високий рівень фосфорилювання рибосомного білка S6 очищеною His-actS6K1. Також було проведено порівняльний аналіз рівня активності кількох очищених препаратів His-actS6K1 та комерційної p70S6K1 (Enzo Life Sciences, #SE-345) з використанням інших фосфоспецифічних антитіл субстратного білка (pSer240/244) (рис.3.13.б). Препарати, отримані за допомогою методу співекспресії, продемонстрували значно вищу активність порівняно з комерційним ферментом (рис. 3.13.б). Середня активність трьох препаратів становила $137,9 \pm 13,7$ (Од/мг) порівняно з $69 \pm 3,2$ (Од/мг) комерційного стандарту. Результати аналізу свідчать про здатність очищеної кінази (His-actS6K1) фосфорилювати субстрат за усіма відомими сайтами фосфорилювання S6K1.

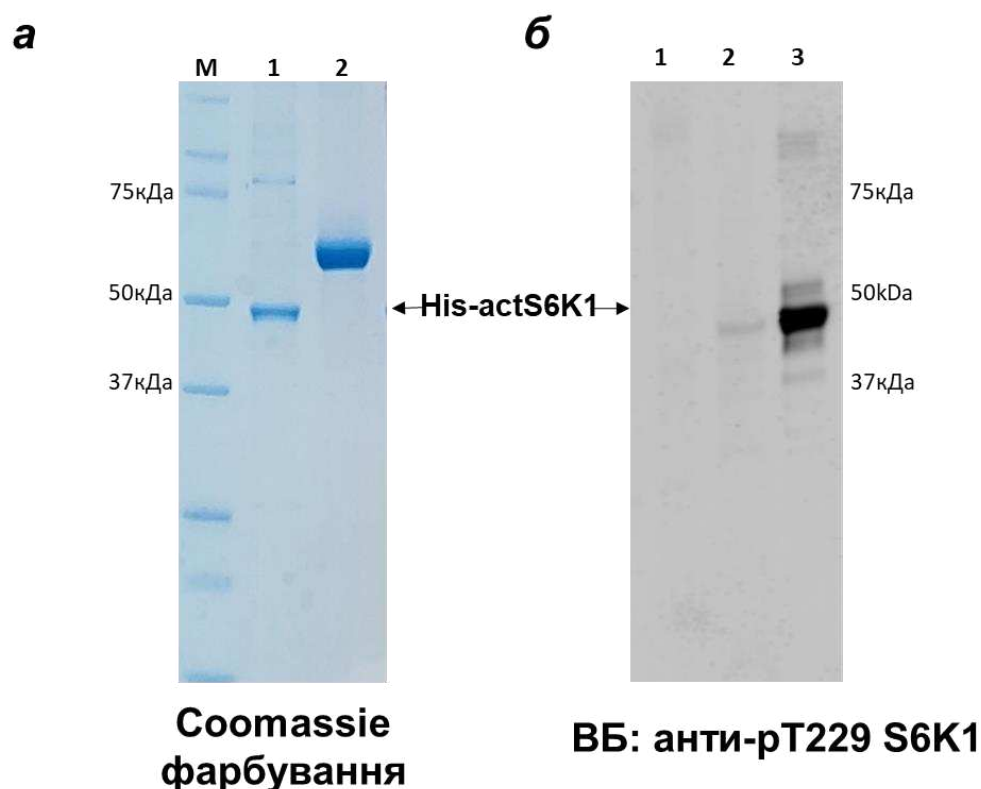


Рис. 3.12. His-actS6K1 ефективно експресується з рекомбінантного бакуловірусу та фосфорилується за PDK1-специфічним сайтом Thr229; *а* – ПАА гель очищеного білка His-actS6K1, забарвленого Coomassie InstantBlue. Доріжка 1 – 1 мкг очищеного білка; доріжка 2 – 2 мкг БСА; *б* – вестерн-блот аналіз фосфорилування очищеного His-actS6K1 з використанням фосфо-T229 антитіл. 1 – лізат (20 мкг) неінфікованих клітин Sf9; 2 – лізат (20 мкг) клітин Sf9, інфікованих рекомбінантним бакуловірусом His-actS6K1; 3 - очищений His-actS6K1 (1 мкг)

Таким чином, ми виявили, що співекспресія генів *RPS6KB1* і *PDPK1*, що здійснюється єдиним бакуловірусним вектором в Vac-to-Vac системі експресії, забезпечує надійний та продуктивний вихід р70S6K1, яка має високу каталітичну активність та може бути використана у низці ензиматичних реакцій та інших *in vitro* досліджень.

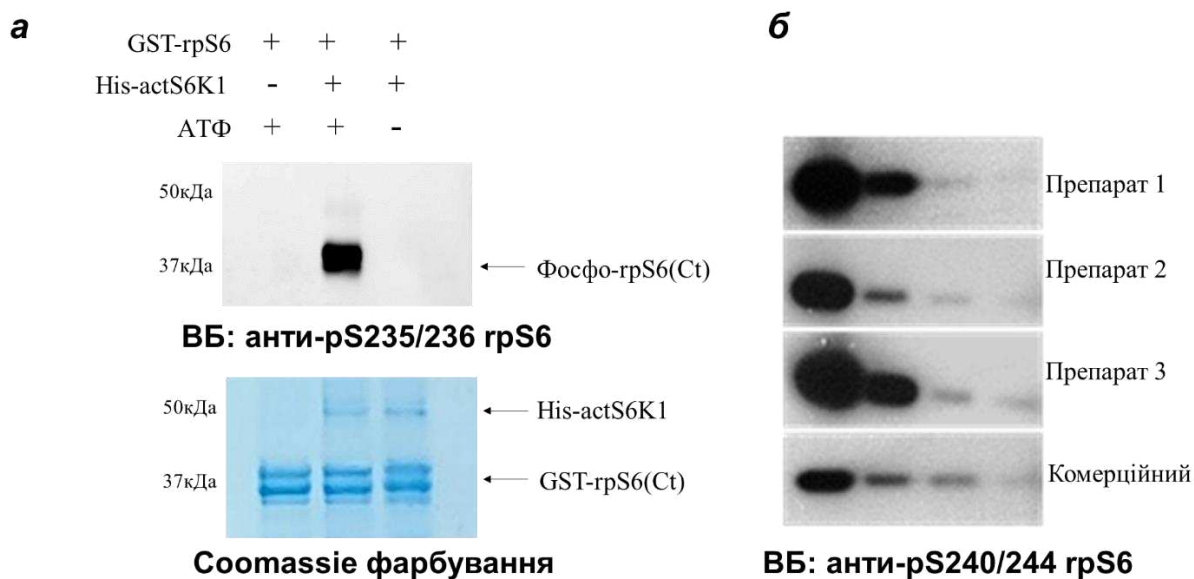


Рис. 3.13. Аналіз активності His-actS6K1 в *in vitro* кіназних реакціях з використанням як субстрату GST-rpS6; *а* – блотограма фосфорилювання рекомбінантного білка GST-rpS6 за допомогою фосфо-rpS6 (Ser235/236) антитіл; *б* – блотограма, що демонструє кіназну активність препаратів His-actS6K1 та комерційного S6K1 в серійних розведеннях 1:5 з використанням аналогічного субстрату та фосфо-rpS6 (Ser240/244) антитіл. Контроль навантаження за допомогою InstantBlue Coomassie фарбування гелю після електропереносу

Таким чином, ми виявили, що співекспресія генів *RPS6KB1* і *PDPK1*, що здійснюється єдиним бакуловірусним вектором в Bac-to-Bac системі експресії, забезпечує надійний та продуктивний вихід p70S6K1, що має високу каталітичну активність та може бути використаною у низці ензиматичних реакцій та інших *in vitro* досліджень.

Згідно результатів, викладених у підрозділі, будуть опубліковані стаття (Bdzhola A *et al* «Co-expression of the RPS6KB1 and PDPK1 genes for production of activated p70S6K1 using Bac-to-Bac baculovirus expression system», Molecular Biology Reports, 2024, *in press*) та тези (Expression and purification of constitutively active S6K1 using Dual Bac-to-Bac protein expression system, BioGENext conference, Київ, 2024)

3.5.2. *In vitro* КоАлювання рекомбінантної p70S6K1. Досліджуючи КоАлювання надекспресованої преципітованої форми EE-p70S6K1 в умовах *in cellular*, що виникало у відповідь на оксидативний стрес в клітині, ми зіштовхнулися з кількома лімітуючими факторами методики. Процес КоАлювання є оберненою модифікацією, що досить швидко редукується або за умов додавання відновлювального агенту, що руйнує дисульфідні зв'язки, або за участі безпосередніх процесів в клітині за умов видалення окислювальних агентів з середовища. Оскільки метод імунопреципітації потребує тривалої інкубації та чисельних відмивок, зв'язок між молекулою КоА та цільовим цистеїном може бути зруйнованим внаслідок сукупності факторів: а) можливістю ензиматичного відщеплення КоА внаслідок існування КоА-специфічної редуктази; б) процесу дисульфідного обміну, під час якого тіольна група іншої молекули «атакує» S-S місток між КоА та Cys217, руйнуючи цей дисульфідний зв'язок та формуючи власний; в) присутність в клітинному компартменті фізіологічних антиоксидантів, таких як піруват, НАДФН, глутатіон та інші ендogenous ензиматичні та неензиматичні захисні механізми. Також наразі невідома детальна стехіометрія КоАлювання. Усе вищенаведене може бути причиною неефективної імунопреципітації КоАльованої ендogenous форми p70S6K1. Таким чином, ми потребували кількох підходів до вивчення КоАлювання S6K1, одним з яких стало дослідження КоАлювання рекомбінантної форми p70S6K1 в умовах *in vitro*. Проведення досліджень *in vitro* із використанням рекомбінантної His-actS6K1 є важливим етапом для розширення та підтвердження попередніх результатів, отриманих *in cellular*. *In vitro* використання, створеної нами конститутивно активної рекомбінантної форми кінази, дозволяє ізолювати систему від впливу клітинних компонентів, забезпечуючи більш контрольоване середовище для вивчення впливу процесу КоАлювання на функціональну активність p70S6K1. Крім того, дослідження *in vitro* з використанням рекомбінантного білка є необхідними для подальшої перевірки гіпотез, які виникли на основі клітинних

експериментів, а також можуть потенційно слугувати основою для розробки нових терапевтичних стратегій або біомаркерів у майбутньому.

Отже, наступним завданням було підтвердити можливість рекомбінантного білка p70S6K1 КоАлюватися *in vitro*. У цьому дослідженні було використано конститутивно активну форму p70S6K1 (His-actS6K1), отриману за допомогою системи експресії білка Dual Bac-to-Bac (П.3.5.1) (Bdzhola et al., Co-expression of the RPS6KB1 and PDPK1 genes for production of activated p70S6K1 using Bac-to-Bac baculovirus expression system, Molecular Biology Reports, рукопис подано до друку).

Нещодавно ми розробили ефективний протокол КоАлювання *in vitro*, який дозволяє з високою точністю з'ясувати чи здатен білок інтересу КоАлюватися [13]. Ключовим є використання вже окисненої, димерної форми КоА (КоА-SS-КоА), що позбуває необхідності використання окремо оксиданта у реакційній суміші. За допомогою цього методу ми продемонстрували, що КоАлювання рекомбінантної форми His-actS6K1 відбувається дозозалежним чином, тобто зі збільшенням концентрації КоА зростає інтенсивність КоАлювання кінрази (рис. 3.14.a). Найоптимальнішою мінімальною дозою димеру КоА для реакцій *in vitro* та подальшої детекції методом вестерн-блоту виявилась концентрація 10 мкМ, що демонструє 8-кратне зростання інтенсивності сигналу, у порівнянні з 1 мкМ КоА. Подальше збільшення концентрації до 50 мкМ та 100 мкМ забезпечувало зростання сигналу в 1,6 та 1,2 рази, відповідно, відносно попереднього значення. Такі спостереження підтверджують гіпотезу того, що рівень КоАлювання вищий у тканинах та клітинах з високим рівнем вільного КоА, наприклад кардіоміоцитах чи гепатоцитах [13]. Присутність 100 мМ ДТТ у реакційній суміші повністю усувала КоАлювання His-actS6K1, що є додатковим доказом утворення дисульфідного зв'язку між окисненим залишком цистеїну та сульфгідрильною групою КоА. Отримані дані дають розуміння того, що молекула КоА не потребує обов'язкової наявності певного ензиму КоА-трансферази (ідентифікація якої триває надалі) для ефективної модифікації протеїнів, в даному випадку

His-actS6K1. Механізмом КоАлювання в умовах *in vitro* вірогідніше за все є реакція ковалентного приєднання молекули КоА, що відбувається внаслідок тіол-дисульфідного обміну.

Також було продемонстровано збільшення рівню КоАлювання зі зростанням часу інкубації рекомбінантного білка з окисненою формою КоА (рис.3.14.б). За результатами денситометрії, проведеної в програмному забезпечення ImageJ, динаміка зростання ступеню КоАлювання становила ~30% кожні 2 години. Ці дані в умовах *in vitro* для КоАлювання S6K1 також повторюють результати, отримані для загального пулу білків в клітинах HEK293/Pank1 β , в котрих сигнали КоАлювання з'являлися вже після 5 хв індукції окисдативного стресу, та пропорційно зростали зі збільшенням періоду інкубації [13].

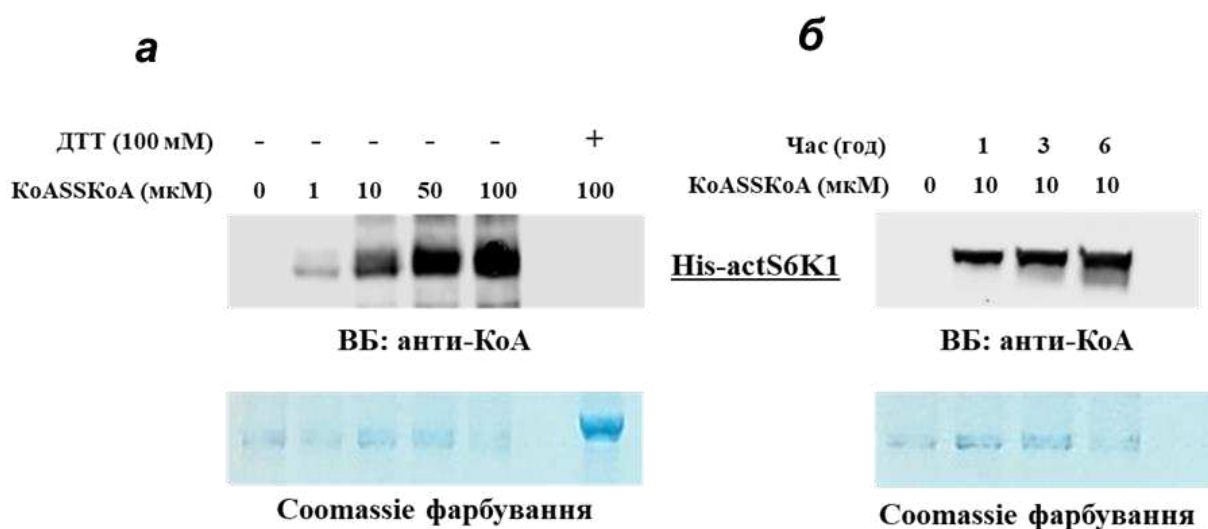


Рис. 3.14. Блотограма *in vitro* КоАлювання рекомбінантного p70S6K1 (His-actS6K1); а – дозозалежне збільшення рівню КоАлювання; б – збільшення ступеню КоАлювання зі зростанням часу інкубації. Контроль навантаження кінрази за допомогою InstantBlue Coomassie фарбування гелю після електропереносу

Отже, успішність *in vitro* КоАлювання отриманого рекомбінантного білка His-actS6K1, дозволяє зробити висновок, щодо можливості використовувати наведений підхід для вивчення більш детального впливу даної ПТМ на функціональну активність p70S6K1.

3.6. Вплив *in vitro* КоАлювання на кіназну активність рекомбінантної p70S6K1.

Відомо, що активність і функції p70S6K1 регулюються посттрансляційними модифікаціями, такими як ацетилювання, убіквітінування та О-ГлцНАцилювання (GlcNAcylation). Згідно даних мас-спектрального аналізу у клітинах і тканинах ссавців за умов оксидативного стресу виявлено КоАлювання 35 протеїнкіназ [130], серед яких і об'єкт досліджень p70S6K1, що, як вже зазначено, виявилась КоАльованою за сайтом Cys217 у клітинах HEK293/Pank1 β , оброблених діамідом. З огляду на те, що Cys217 розташований в активаційній Т-петлі кіназного домену і знаходиться на відстані однієї амінокислоти від трипептидного DFG-мотиву (консервативної послідовності, необхідної для активації кінازی, координуючи йон магнію для приєднання АТФ), було висунуто припущення щодо можливого впливу КоАлювання Cys217 на активність кінازی.

Дослідженнями, проведеними у відділі, у співпраці з лабораторією структурної та молекулярної біології UCL, було виявлено унікальний спосіб інгібування Аврора А кінازی внаслідок приєднання до неї молекули КоА. Такий механізм блокування активності було названо «dual anchor» («подвійний якор») [14]. В процесі такого інгібування АДФ-фрагмент молекули КоА селективно приєднується до АДФ-зв'язувальної кишені кінازی, що зі свого боку дозволяє сульфгідрильній групі гнучкого пантетеїнового хвоста КоА утворювати дисульфідний зв'язок з Cys290 в активаційній петлі. Як наслідок, Коензим А має два місця приєднання («якоря») в активаційній петлі Аврори А, перешкоджаючи зв'язуванню АТФ і тим самим блокуючи її активність. У подальших дослідженнях було також продемонстровано, що білок-супресор метастазування NME1 є основним КоА-зв'язуючим білком, і його нуклеозиддифосфаткіназна активність також інгібується за допомогою ковалентних або нековалентних взаємодій з молекулою КоА [125]. Серед інших ферментів, що зворотно інактивуються внаслідок КоАлювання (з різним ступенем інгібування) є креатинфосфокіназа

савців, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (ГАФДГ), ізоцитратдегідрогеназа та піруватдегідрогеназа кіназа [13].

Щоб перевірити вплив КоАлювання на активність S6K1, рекомбінантний білок His-actS6K1 КоАлювали *in vitro* за вже описаним вище протоколом. Ефективність КоАлювання було підтверджено за допомогою імуноблоту з анти-КоА антитілами (рис.3.15.а). *In vitro* кіназну активність КоАлюваної та контрольної немодифікованої кінази His-actS6K1 проти субстрату GST-rpS6(Ct) детектували у вестерн-блоті антитілами до pS6 (pS235/pS236) (рис.3.15.а). Згідно даних представлених на рис.3.15.б, *in vitro* КоАлювання His-actS6K1 призводить до значного пригнічення активності кінази (~40%) порівняно з немодифікованим контролем.

У певних білках наявність залишку цистеїну, що знаходиться поруч з сайтом КоАлювання, може конкурувати з КоА за утворення а) внутрішньомолекулярного дисульфідного зв'язку між двома цистеїнами, б) змішаного дисульфідного зв'язку КоА-цистеїн, відповідно. Це може залежати від присутності різних окислювальних агентів чи мікрооточення залишку цистеїну. Тому, наявність другого цистеїну в безпосередній близькості може відігравати роль у визначенні стану окиснення білка (КоА-SS-Cys чи Cys-SS-Cys). Зважаючи на існування в активаційній петлі S6K1 додаткового Cys231, розташованого поруч з основним сайтом активації Thr229, не можна виключати, що КоАлювання залишку Cys217 може слугувати захистом від утворення внутрішньомолекулярного дисульфідного зв'язку, що утворюється внаслідок надмірного окиснення кінази під час оксидативного стресу. Подібне утворення дисульфідних зв'язків всередині активаційної петлі було продемонстровано для багатьох інших кіназ, наприклад, АКТ, MELK та BRSK1/2, у випадку яких спостерігалася цілковита інактивація ферменту [177], [178], [179], [180].

Такий механізм захисту від деактивації кінази контрастує з отриманими нами результатами щодо зниження активності кінази на 40% після КоАлювання

p70S6K1. Це дозволяє припустити, що дана ПТМ може регулювати активність кінази за умови оксидативного стресу. Крім того, як це вже було показано для низки метаболічних ензимів, КоАлювання може виконувати і функцію захисту ключових цистеїнів від надмірного окиснення [13] і неминучої незворотної інактивації ензиму. Вирішення цих та інших наукових питань щодо функціональної ролі КоАлювання p70S6K1 залишається у фокусі подальших досліджень.

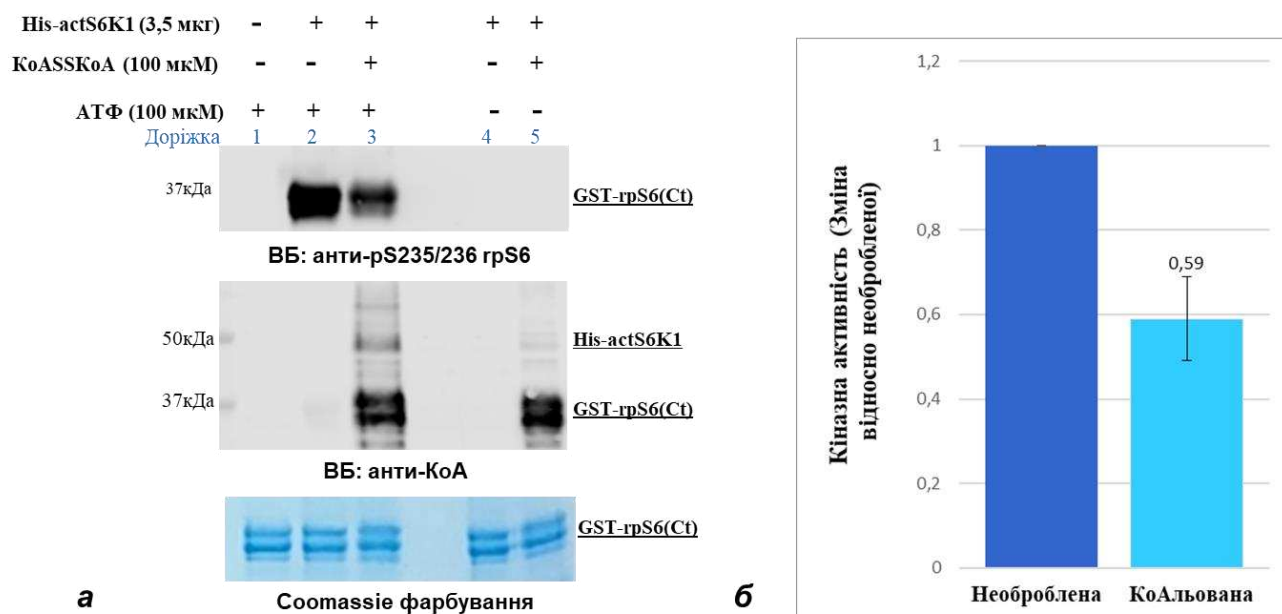


Рис. 3.15. Дослідження впливу КоАлювання S6K1 на її активність. *In vitro* КоАлювання та *in vitro* кіназна реакція рекомбінантної p70S6K1 з використанням GST-rpS6(Ct) як субстрату; *а* – блотограма кіназної реакції за присутності інтактної (доріжка 2) та КоАльованої (доріжка 3) His-actS6K1 детектована анти-фосфо-Ser234/235 rpS6 та анти-КоА. Як контроль специфічності методу використовували зразки за відсутності в реакційній суміші кінази (доріжка 1), або АТФ в реакційній суміші інтактної (доріжка 4) та КоАльованої (доріжка 5) His-actS6K1. Контроль навантаження субстрату аналізували за допомогою InstantBlue Сомассіє фарбування гелю; *б* – результати денситометричного аналізу кіназної активності *in vitro* КоАльованої та контрольної інтактної His-actS6K1 (4 незалежні експерименти). Кількісний аналіз проводили за допомогою ImageJ, для статистичного аналізу використовували непарний t-критерій Стюдента, $p < 0,01$

Отже, отриманий результат свідчить про те, що ковалентна модифікація каталітично активної His-actS6K1 за допомогою КоА призводить до інгібування її кіназної активності, яка буде відновленою внаслідок повернення клітини до нормальних умов існування або при додаванні відновлювального агенту (напр. ДТТ) в умовах *in vitro*. Таким чином продемонстровано, що КоАлювання може функціонувати не лише як важливий антиоксидантний захист, запобігаючи незворотному окисненню тіолових груп цистеїнових залишків білків у відповідь на оксидативний стрес, але й бути частиною нового механізму регуляції активності клітинних ферментів.

Результати викладені у підрозділі, опубліковано у науковій праці:

Malanchuk O, **Bdzhola A**, Palchevskyi S, et al (2024) Investigating the Regulation of Ribosomal Protein S6 Kinase 1 by CoAlation. IJMS 25:8747 DOI: 10.3390/ijms25168747.

3.7. Біоінформатичний аналіз КоАлювання p70S6K1

3.7.1. Дослідження взаємодії КоА з p70S6K1 методом молекулярного докінгу. Вибір методу молекулярного докінгу для дослідження взаємодії Коензиму А з p70S6K1 є обґрунтованим, враховуючи результати дослідів, що наведені вище, які підтверджують існування взаємодії між цими молекулами. Молекулярний докінг дозволить здійснити детальний аналіз просторового розташування КоА відносно АТФ-зв'язуючої кишені кінази, визначити афінність зв'язування та ідентифікувати ключові взаємодії, що залучені у формуванні комплексу. Цей підхід є особливо ефективним для розуміння механізмів молекулярного розпізнавання і специфічності взаємодій, що має критичне значення для подальшого планування

експериментальних досліджень, зокрема з розробки потенційних інгібіторів p70S6K1.

Як було показано раніше [181] молекула КоА може знаходитись або у витягнутій, або у зігнутій формі. КоА може згинатися як на дифосфатах, так і в інших ділянках пантетеїнового хвоста. Цікавим є те, що КоА демонструє дуже високу структурну гнучкість. Наприклад, у витягнутій формі АДФ-фрагмент КоА разом з пантетеїновим хвостом мають довжину ~ 23 Å, тоді як у максимально зігнутій формі хвіст КоА може згинатися до $\sim 11 - 12$ Å в одному напрямку і ~ 5 Å в іншому напрямку. Цей аналіз показує, що КоА є дуже гнучкою молекулою, здатною модифікувати свою структуру для встановлення стабілізуючих взаємодій з білками [130].

Для проведення досліджень з бази даних білків RCSB була вибрана просторова структура комплексу p70S6K1 з АТФ конкурентним інгібітором 5FI (PDB_ID: 4L46) [182]. Кристалічна структура p70S6K1 (4L46) містила пропущені ділянки, тому відсутні залишки в структурі p70S6K1 були змодельовані та додані за допомогою веб-сервера Swiss-Model. Рисунок 3.16.a ілюструє просторову структуру кінази p70S6K1 людини (4L46) (амінокислотна послідовність від 1 до 398 залишку), що має типову білатеральну архітектуру з АТФ-зв'язуючою ділянкою, сформованою між N-кінцевим та C-кінцевим доменами. Оскільки за нашою гіпотезою, молекула КоА має фіксуватися в АТФ-зв'язувальній кишені, за аналогією до модельного комплексу КоА-Аврора А, логічно було проводити дослідження взаємодії КоА з різними конформаціями p70S6K1: неактивною та активною, моделюючи активну шляхом додавання фосфатів до двох критичних для активації залишків, Thr229 та Thr389, що надалі найменуватиметься p70S6K1 – 2P.

Оскільки методом PX/MC було продемонстровано КоАлювання за цистеїновим залишком в положенні 217, саме взаємодія з цим цистеїном досліджувалась надалі. Ковалентне приєднання сульфгідрильної групи КоА до Cys217 нефосфорильованої та фосфорильованої (за двома основними сайтами

Thr229 та Thr389) форм p70S6K1 (рис. 3.16) проводили за допомогою модуля CovDock у режимі Pose Prediction (Thorough) в пакеті Schrödinger 2023. Початкова позиція докінгу КоА в кіназі не відрізнялась для фосфорильованої та нефосфорильованої форм. Найкраща позиція мала docking score -9,796. При ковалентному приєднанні молекули КоА до тільної групи цистеїну, аденозинове кільце КоА було спрямоване в шарнірну ділянку (хіндж-регіон) кінازی. Взаємодія КоА з білком у найкращій докінговій позиції проілюстрована на рисунку 3.17. Фіалкові стрілки на схемі вказують на потенційне утворення водневих зв'язків, тоді як чорна лінія між атомами сірки вказує на ковалентний зв'язок. Відстань між атомом сірки КоА та атомом сірки Cys217 кінازی становить 2,151 Å. Стабільність найкращого положення перевірено за допомогою симуляцій молекулярної динаміки, як для нефосфорильованої, так і для фосфорильованої (за Thr229 та Thr389 сайтами) форм p70S6K1.

Стабільність КоА в АТФ-зв'язувальній кишені p70S6K1 забезпечується численними гідروفобними взаємодіями аденозинового кільця КоА із залишками Leu74, Val82, Ala98, Val133, Leu149, Leu152, Met202, Thr212, Phe359, а також водневим зв'язком між 6'-аміногрупою аденозинового кільця КоА і карбонільною групою залишку Glu150 в шарнірній ділянці S6K1 (відстань для водневого зв'язку 2,87 Å).

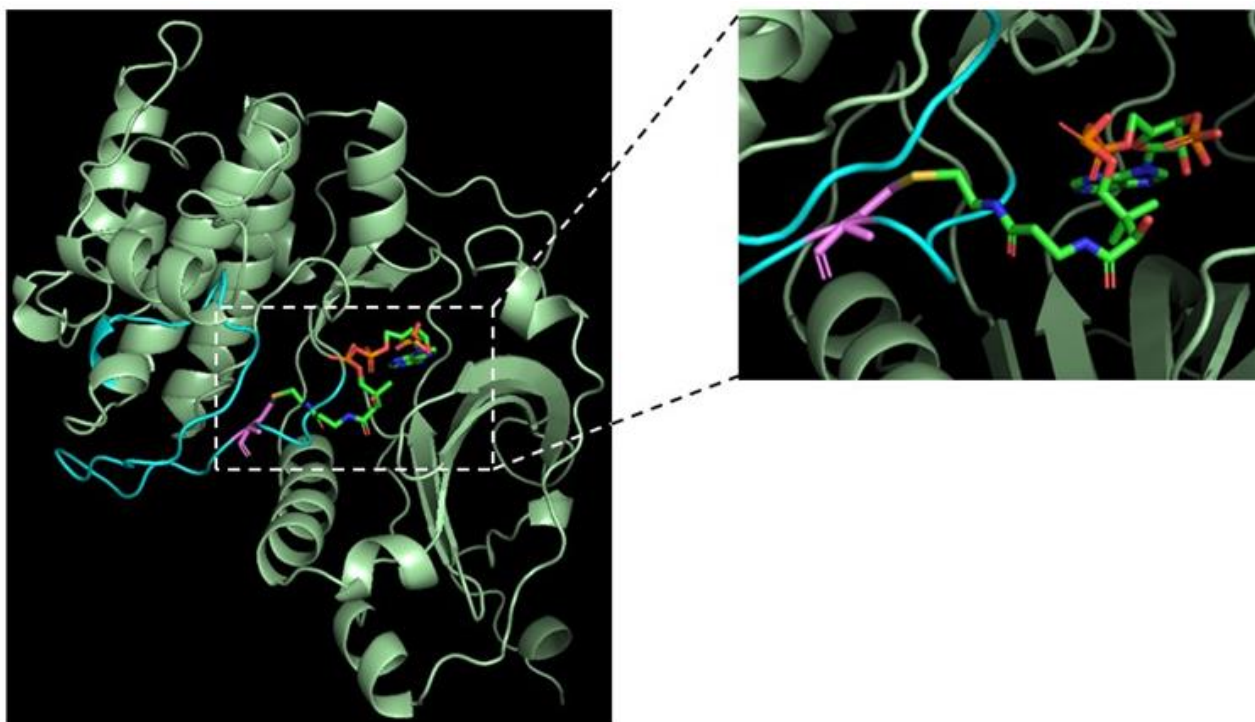


Рис.3.16. Ковалентне приєднання молекули КоА до Cys217 сайту p70S6K1 шляхом застосування молекулярного докінгу. Найкраща докінгова позиція КоА в кристалічній структурі нативної форми p70S6K1 (4L46); На схемі в збільшеному вигляді продемонстроване ковалентне зв'язування КоА (виділено червоно-зелено-синьо-жовтим кольором) з Cys217 (фіалковий) в активаційній петлі (блакитний) p70S6K1 (блідозелений). Рисунок згенерований в PyMol

Отже, за допомогою молекулярного докінгу, в співпраці з колегами, було досліджено взаємодію КоА з нефосфорильованою та фосфорильованою (Thr229 та Thr389) формами кінази p70S6K1. Було визначено, що для успішного КоАлювання p70S6K1 необхідні наступні взаємодії між молекулами: 1) ковалентне приєднання –SH залишку пантетеїнового хвоста КоА до тільної групи цистеїну; 2) утворення водневого зв'язку між NH₂-групою аденозинового кільця КоА і залишком глютамінової кислоти основного ланцюга S6K1; 3) утворення багатьох гідрофобних взаємодій, що стабілізують аденінове кільце всередині АТФ-зв'язуючої кишені S6K1. Такий тип взаємодії нагадує описаний раніше «dual-anchor» механізм зв'язування кінази Аврора А з молекулою КоА. Однак, не можна виключати ймовірність приєднання молекули КоА до інших цистеїнів, у випадку, наприклад,

точкової мутації Cys217, що було частково продемонстровано шляхом дослідів зі сайтспрямованим мутагенезом у п.3.2.2. Так як довжина пантетоїнового хвоста у витягнутій конформації сягає до 12Å, а відстань між спрямованими на поверхню атомами сірки Cys217 та Cys231 становить 7Å, то з високою вірогідністю, тіольна група КоА може сягнути –SH залишку Cys231 кінзи, залишаючись при цьому у АТФ-зв'язуючій кишені, та виконуючи аналогічну функцію.

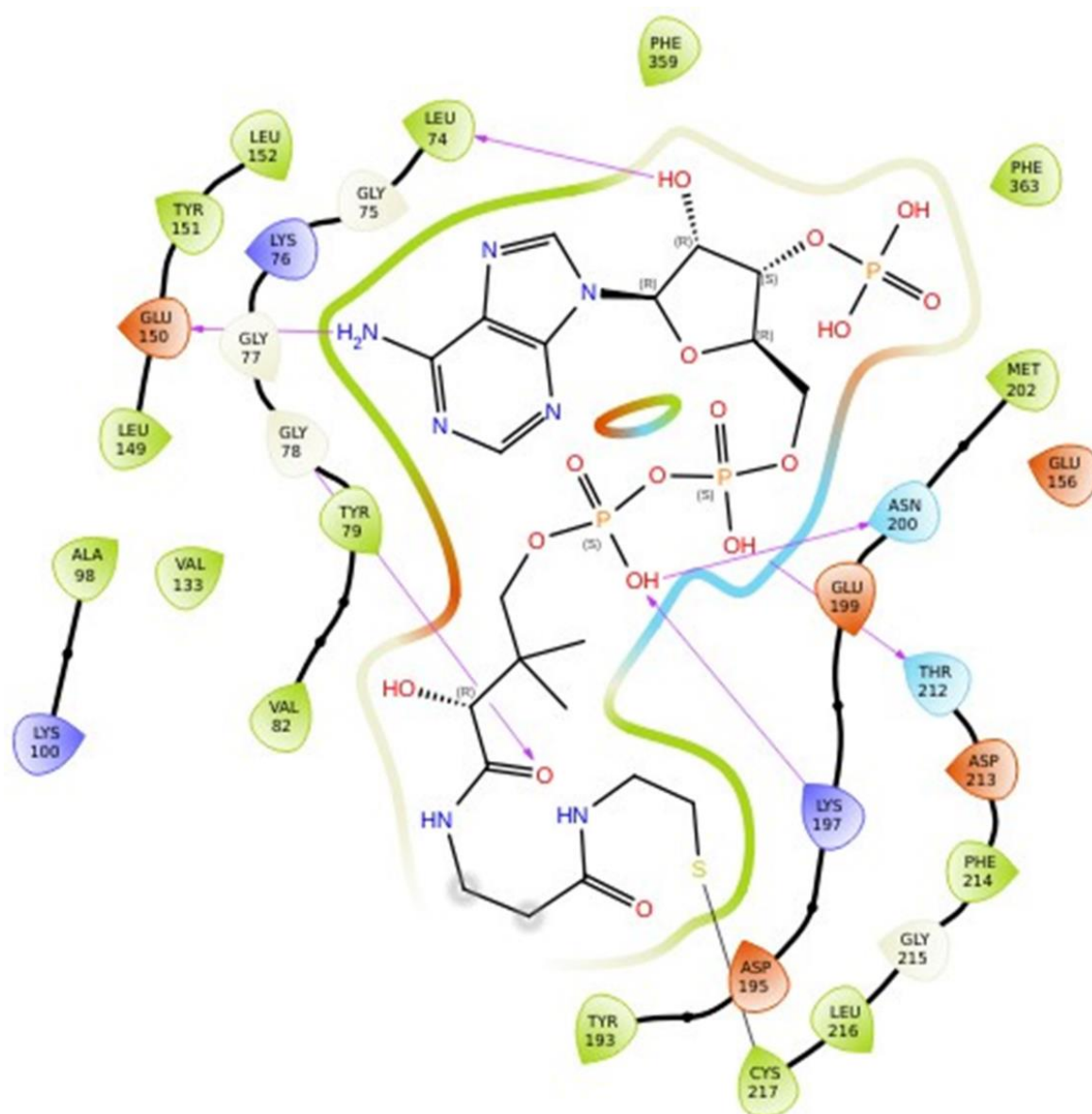


Рис. 3.17. Діаграма, що демонструє амінокислотні залишки АТФ-зв'язуючої кишені, які взаємодіють з молекулою КоА. Фіалкові стрілки вказують на водневі взаємодії, чорна лінія вказує на утворення ковалентного зв'язку між молекулами сірки

3.7.2. Молекулярна динаміка комплексів p70S6K1 з КоА. Для отримання більш глибокого розуміння процесу взаємодії молекули КоА з p70S6K1, було проведено симуляції молекулярної динаміки (МД) досліджуваних комплексів. Метод МД, в принципі, може описати еволюцію системи в будь-які моменти часу, а в випадку нашого дослідження - проілюструвати рівень стабільності комплексу КоА-SS-S6K1.

Для комплексів нефосфорильованої та фосфорильованої (за сайтами Thr229 та Thr389 (p70S6K1-2P)) форм p70S6K1 з молекулою КоА у найкращій докінговій позі (Рис.3.16.А,Б), проводили молекулярно-динамічну симуляцію протягом 250 нс за допомогою програми Amber22. Після отримання МД було проаналізовано кореневе середньоквадратичне відхилення (RMSD) за C α атомами. RMSD – показник, що вказує відхилення координат атомів від початкової точки симуляції, що дозволяє нам спостерігати, як ці координати змінюються в часі відносно початкової точки, відповідно вище значення середньоквадратичного відхилення відповідає більшому відхиленню. Отже, за результатами проведених МД симуляцій показано що нефосфорильована форма p70S6K1 (рис.3.18.а), фіалковий колір) мала значно більші структурні флуктуації та вищий рівень RMSD, що варіювало від 2 до 6 Å, порівняно з фосфорильованою формою (Рис. 3.16.Б), фіалковий колір). RMSD для p70S6K1-2P стабільно становило ~3,5 Å впродовж всього часу симуляції, окрім незначних відхилень через 10 та 100 нс. Аналогічно, молекула КоА демонструє менше, а також стабільне середньоквадратичне відхилення (~ 3 Å) у комплексі з p70S6K1-2P (рис. 3.18.б, оранжевий колір) у порівнянні з нефосфорильованою формою. Такі спостереження є свідченням того, що взаємодія між КоА та фосфорильованою формою кінази є стабільнішою, ніж з нефосфорильованою. Однак, в обох системах аденінове кільце молекули КоА залишалось спрямованим до шарнірної ділянки впродовж усього моделювання, фіксуючи себе у АТФ-зв'язуючій кишені, флуктуації спостерігались саме для пантетеїнового хвоста Коензиму А. Згенерувавши сукупність конфігурацій, вже на початкових етапах моделювання МД було виявлено, що хвіст КоА віддалявся від

початкової докінгової пози нефосфорильованої форми кінази, змінюючи своє розташування. Такі спостереження вказують на високий рівень гнучкості хвоста КоА, проте, навіть не зважаючи на доволі динамічну зміну його положення, хвіст все одно залишався в межах зв'язувальної кишені p70S6K1 (рис. 3.18.в). На противагу цьому, для фосфорильованої форми білка пантетеїновий хвіст КоА зміщувався ближче до Р-петлі, що виконує функцію зв'язування з молекулою АТФ, та α С-спіралі, а також був менш гнучким, (рис. 3.18.г) порівняно з комплексом з нефосфорильованою кіназою.

З метою наочно проілюструвати безпосередню динаміку флуктуацій молекули КоА у комплексі з фосфорильованою формою кінази, на рис.3.19.а зображена зміна конфігурацій молекули КоА всередині АТФ-зв'язуючої щілини кристалічної структури p70S6K1-2P. Цікавим є спостереження, що в комплексі з p70S6K1-2P атом сірки молекули КоА залишався у близькості до атому сірки сульфгідрильної групи Cys217 кінази протягом усього часу молекулярно-динамічної симуляції (рис.3.19.а). Отже, це є свідченням того, що фосфорильована за двома критичними сайтами форма p70S6K1, що є аналогом до її активованого стану, здатна утворювати стабільні дисульфідні взаємодії з пантетеїновим хвостом КоА, водночас утримуючи АДФ-частину коензиму у шарнірній ділянці. В той же час при взаємодії з нефосфорильованою формою ферменту, молекула КоА демонструє високий рівень флуктуації, що перешкоджає стабільному формуванню комплексу з білком.

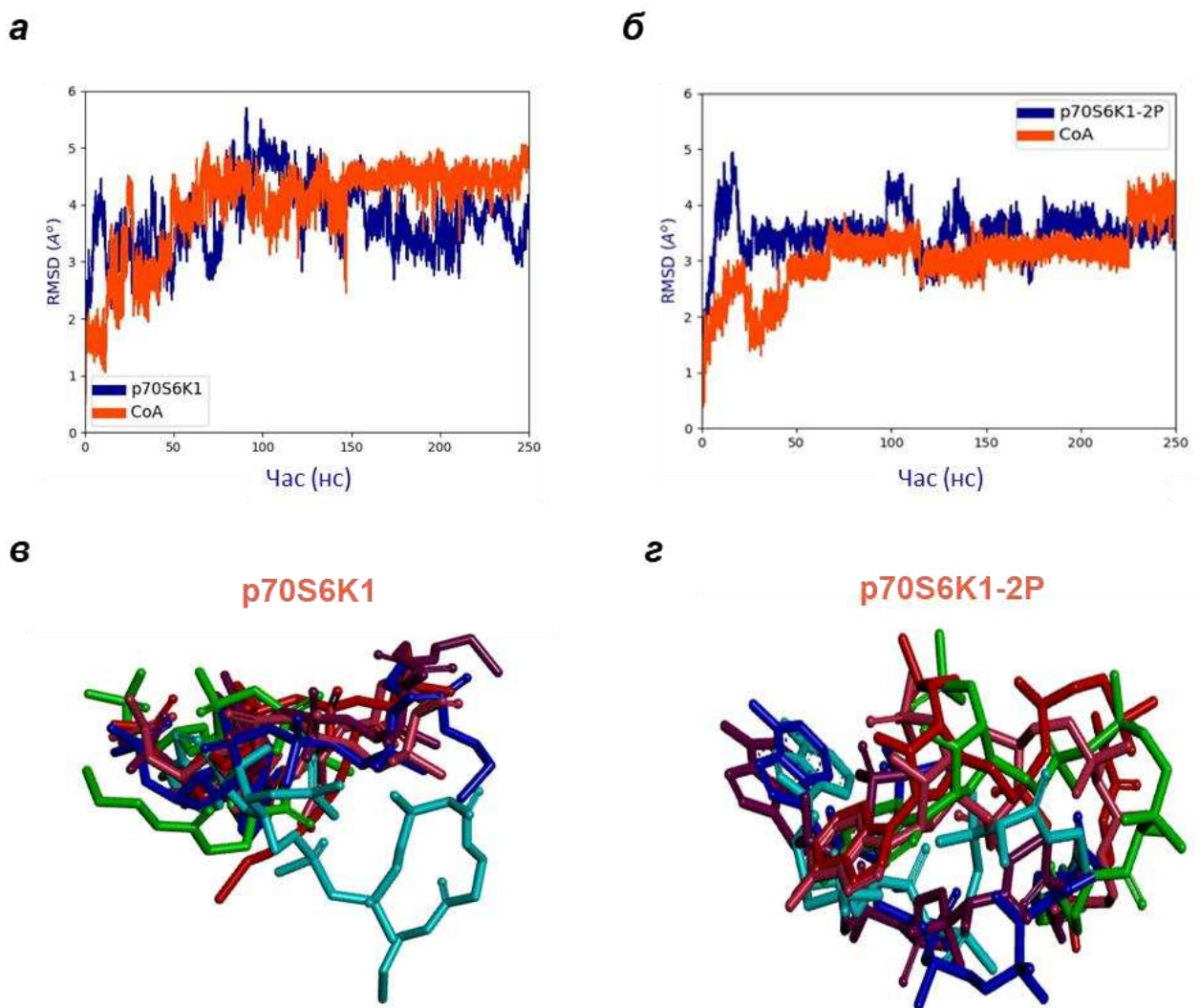


Рис.3.18. Молекулярна динаміка комплексів p70S6K1-КоА. *a* – середньоквадратичні відхилення за С α атомами для молекулярної динаміки взаємодії p70S6K1 (фіалковий) та КоА (оранжевий); *б* – RMSD для p70S6K1-2P (фіалковий) та КоА (оранжевий) з МД-симуляції; *в* – накладання розташувань докінгових поз КоА та знімки кожні 50 нс у комплексі p70S6K1-КоА під час моделювання МД. Початкова поза докінгу (блакитний), 50 нс (бордовий), 100 нс (синій), 150 нс (рожевий), 200 нс (червоний) і 250 нс (зелений); *г* – накладання розташувань докінгових поз КоА та знімки кожні 50 нс у комплексі p70S6K1-2P– КоА під час моделювання МД. Початкова поза докінгу (блакитний), 50 нс (бордовий), 100 нс (синій), 150 нс (рожевий), 200 нс (червоний) і 250 нс (зелений)

Щодо динаміки безпосередньо Са атомів молекули досліджуваної кінрази, ділянка амінокислотної послідовності 220 – 226 у петлі активації ензиму демонструвала вищий рівень RMSF (середньоквадратичне коливання), тобто вищі координаційні коливання, як для p70S6K1, так і для p70S6K1-2P форм білка (рис.3.19.б). Показник RMSF, в свою чергу, не вказує на позиційні зміни в часі на відміну від RMSD, а вимірює індивідуальну гнучкість амінокислотних залишків, тобто наскільки сильно певний залишок змінює своє положення під час симуляції. Таким чином, графік RMSD був побудований проти часу, а RMSF проти номера залишку.

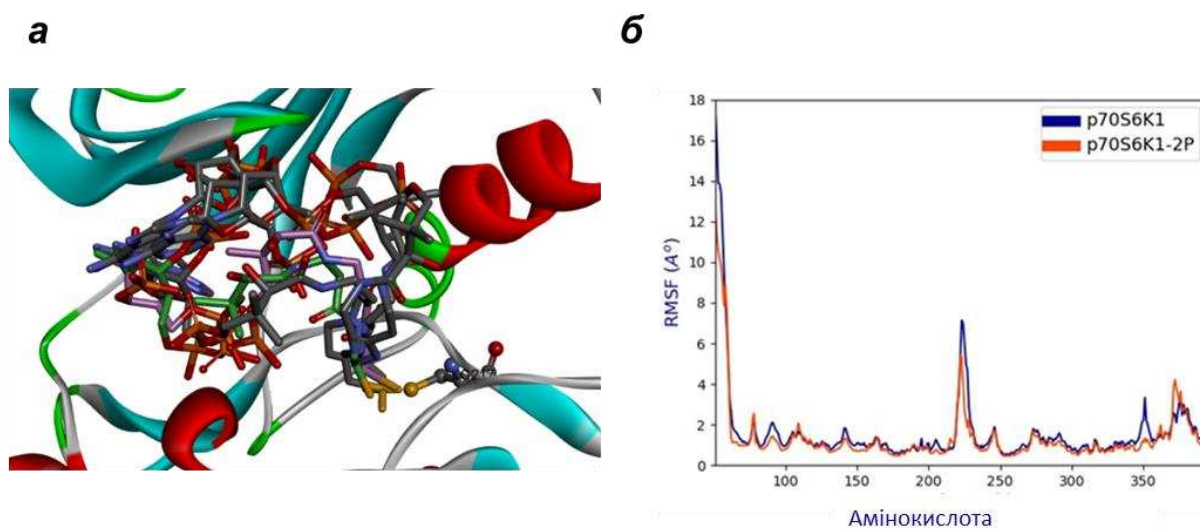


Рис. 3.19. Молекулярно-динамічне моделювання комплексу p70S6K1-KoA; *a* – збільшене зображення KoA у комплексі з p70S6K1-2P через кожні 50 нс під час моделювання МД. Бічний ланцюг Cys217 позначений у вигляді кульок і паличок, атоми сірки зображені жовтим кольором. Атом сірки Cys217 залишається близько до S-атома KoA; *б* – графіки RMSF для комплексу p70S6K1-KoA (фіалковий) та p70S6K1-2P (оранжевий) з KoA

Отже, під час проведених у співпраці молекулярно-динамічних симуляцій ми спостерігали, що модель активованої форми p70S6K1 (з фосфорильованими Thr229 та Thr389) утворює стабільні S-S взаємодії в комплексі з KoA, в той час як в комплексі з нефосфорильованою формою ферменту стійкість таких взаємодій не

спостерігалася. На основі цих спостережень було помічено, що пантетеїновий хвіст КоА залишався близьким до Cys217, що знаходиться в активаційній петлі, фосфорильованої кінази протягом усього часу моделювання МД, тоді як АДФ-фрагмент коензиму був стабільно орієнтований у бік шарнірної ділянки кінази. Зважаючи на ці результати ми висунули гіпотезу, що рухливість шарнірної ділянки кінази p70S6K1-2P дозволяє КоА стабілізувати ковалентний дисульфідний зв'язок з Cys217 у петлі активації, що виявилось неможливим для з нефосфорильованої форми кінази.

Отримані результати вказують, що за умови оксидативного стресу має КоАлюватися саме активована, фосфорильована форма кінази, а отже КоАлювання S6K1 за Cys217 можна вважати новим механізмом негативної регуляції активності кінази саме за умови оксидативного стресу, що є альтернативою дефосфорилюванню. Не можна виключати, що такий механізм існує і за нормальних умов за участі реактивних форм кисню, відомих вторинних посередників в клітинному сигналюванні.

Результати викладені у підрозділі, опубліковано у науковій праці:

Malanchuk O, **Bdzhola** A, Palchevskyi S, et al (2024) Investigating the Regulation of Ribosomal Protein S6 Kinase 1 by CoAlation. IJMS 25:8747 DOI: 10.3390/ijms25168747.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі досліджено КоАлювання протеїнкінази рибосомного білка S6 (S6K1) за умов індукції оксидативного та метаболічного стресів. Отримані результати вказують, що КоАлювання відіграє важливу роль у регуляції функціональної активності кінази S6K1.

1. Охарактеризовано моноклональні антитіла проти КоА, що були отримані методом гібридомної технології. Встановлено, що анти-КоА антитіла специфічно розпізнають КоАльовані білки в лізатах клітин ссавців з використанням методів імунопреципітації, вестерн-блот аналізу, імунофлуоресценції та PLA. Визначено, що 3'-фосфат дезоксирибозного кільця КоА входить до складу антигенної детермінанти і є ключовим для розпізнавання антитілами.

2. Методом РХ-МС аналізу було встановлено КоАлювання S6K1 в клітинах HEK293/Pank1 β за умов оксидативного стресу. Сайтом КоАлювання було визначено цистеїн у положенні 217, що знаходиться в активаційній петлі кіназного домену S6K1, на відстані двох амінокислот від DFG домену.

3. Доведено *in cellular* КоАлювання надекспресованої p70S6K1 в клітинах HEK293/Pank1 β за умов оксидативного стресу, індукованого діамідом.

4. Встановлено, що мутація Cys217 (C217A), ключового сайту КоАлювання, призводить лише до часткового пригнічення КоАлювання S6K1 в клітинах за умов оксидативного стресу, що свідчить про можливість існування додаткових сайтів КоАлювання, зокрема таких, що можуть виникати лише у випадку мутації. Натомість мутація цистеїну, розташованого в межах активаційної петлі кінази, Cys231 (C231A) навпаки призводить до підвищення рівню КоАлювання, ймовірно завдяки неможливості утворення інтрамолекулярних дисульфідних зв'язків між Cys 217 та Cys231, які могли б перешкоджати КоАлюванню Cys217.

5. За допомогою використання імунофлюоресцентного аналізу та методики PLA було підтверджено індукцію КоАлювання S6K1 під впливом окисного та метаболічного стресів різного походження.

6. У процесі виконання роботи з використанням Vac-to-Vac бакуловірусної системи експресії та «дуального» вектора, що містив генні послідовності рекомбінантної S6K1 і її активатора кінази PDK1, було експресовано та очищено конститутивно активну p70S6K1. Розроблена методика ко-експресії двох генів *RPS6KB1* та *PDPK1* однією бакмідою виявилась більш ефективною за існуючі задокументовані протоколи створення конститутивно активної S6K1.

7. На основі проведених *in vitro* досліджень з використанням рекомбінантної His-actS6K1 було встановлено, що процес КоАлювання є дозозалежним, тобто рівень модифікації збільшувався пропорційно до концентрації вільного коензиму А (КоА) у реакційній суміші, а також часозалежним, що означає зростання рівня КоАлювання з подовженням часу інкубації.

8. Виявлено, що активність КоАльованої рекомбінантної His-actS6K1 в *in vitro* кіназній реакції знижена на 40% порівняно з немодифікованим ензимом, що свідчить про інгібуючий вплив КоАлювання на функціональну активність кінази.

9. Методом молекулярного докінгу проілюстровано, що пантетеїновий хвіст КоА утворює дисульфідний зв'язок з тіольною групою Cys217 кінази, з одночасною стабілізацією АДФ-фрагменту молекули КоА в АТФ-зв'язувальній кишені кінази за допомогою гідروفобних, йонних і водневих зв'язків. Отримані результати нагадують спосіб інгібування ферменту за механізмом «подвійного якоря», що забезпечує стабільне зв'язування КоА з активним центром кінази, і який було описано раніше для Аврора А кінази.

10. Методом симуляції молекулярної-динаміки було встановлено, що комплекс КоА з активованою формою кінази (фосфорильованої за сайтами Thr229 та Thr389) більш стабільний в порівнянні з комплексом з нефосфорильованою

формою ферменту. Отримані дані свідчать про те, що фосфорилування є критично важливим для стабілізації взаємодії між p70S6K1 і КоА, що підкреслює значення КоАлювання в регуляції активованої форми кінази.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- [1] B. Magnuson, B. Ekm, and D. C. Fingar, 'Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks', *Biochemical Journal*, vol. 441, no. 1, pp. 1–21, Jan. 2012, doi: 10.1042/BJ20110892.
- [2] Y. L. Pon, H. Y. Zhou, A. N. Y. Cheung, H. Y. S. Ngan, and A. S. T. Wong, 'p70 S6 Kinase Promotes Epithelial to Mesenchymal Transition through Snail Induction in Ovarian Cancer Cells', *Cancer Research*, vol. 68, no. 16, pp. 6524–6532, Aug. 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6302.
- [3] H. Y. Zhou and A. S. T. Wong, 'Activation of p70^{S6K} Induces Expression of Matrix Metalloproteinase 9 Associated with Hepatocyte Growth Factor-Mediated Invasion in Human Ovarian Cancer Cells', *Endocrinology*, vol. 147, no. 5, pp. 2557–2566, May 2006, doi: 10.1210/en.2005-1404.
- [4] J. Ghosh *et al.*, 'S6K1 regulates hematopoietic stem cell self-renewal and leukemia maintenance', *Journal of Clinical Investigation*, vol. 126, no. 7, pp. 2621–2625, Jun. 2016, doi: 10.1172/JCI84565.
- [5] H. Foster, H. M. Coley, A. Goumenou, G. Pados, A. Harvey, and E. Karteris, 'Differential expression of mTOR signalling components in drug resistance in ovarian cancer', *Anticancer Res*, vol. 30, no. 9, pp. 3529–3534, Sep. 2010.
- [6] Y. Qin *et al.*, 'AMPK activation induced in pemetrexed-treated cells is associated with development of drug resistance independently of target enzyme expression', *Molecular Oncology*, vol. 13, no. 6, pp. 1419–1432, Jun. 2019, doi: 10.1002/1878-0261.12496.
- [7] E.-K. Kim *et al.*, 'Phosphorylated S6K1 is a possible marker for endocrine therapy resistance in hormone receptor-positive breast cancer', *Breast Cancer Res Treat*, vol. 126, no. 1, pp. 93–99, Feb. 2011, doi: 10.1007/s10549-010-1315-z.
- [8] M. Li *et al.*, 'p70S6K Promotes Acquired Resistance of Erlotinib Through Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition in Non-Small Cell Lung Carcinoma', *OTT*, vol. Volume 13, pp. 5257–5270, Jun. 2020, doi: 10.2147/OTT.S249695.

- [9] M. Artemenko, S. S. W. Zhong, S. K. Y. To, and A. S. T. Wong, ‘p70 S6 kinase as a therapeutic target in cancers: More than just an mTOR effector’, *Cancer Letters*, vol. 535, p. 215593, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.canlet.2022.215593.
- [10] J. Gwalter, M.-L. Wang, and I. Gout, ‘The ubiquitination of ribosomal S6 kinases is independent from the mitogen-induced phosphorylation/activation of the kinase’, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 41, no. 4, pp. 828–833, Apr. 2009, doi: 10.1016/j.biocel.2008.08.018.
- [11] T. R. Fenton, J. Gwalter, R. Cramer, and I. T. Gout, ‘S6K1 is acetylated at lysine 516 in response to growth factor stimulation’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 398, no. 3, pp. 400–405, Jul. 2010, doi: 10.1016/j.bbrc.2010.06.081.
- [12] Y. Yang *et al.*, ‘OGT suppresses S6K1-mediated macrophage inflammation and metabolic disturbance’, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 117, no. 28, pp. 16616–16625, Jul. 2020, doi: 10.1073/pnas.1916121117.
- [13] Y. Tsuchiya *et al.*, ‘Protein CoAlation: a redox-regulated protein modification by coenzyme A in mammalian cells’, *Biochemical Journal*, vol. 474, no. 14, pp. 2489–2508, Jul. 2017, doi: 10.1042/BCJ20170129.
- [14] Y. Tsuchiya *et al.*, ‘Covalent Aurora A regulation by the metabolic integrator coenzyme A’, *Redox Biology*, vol. 28, p. 101318, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.redox.2019.101318.
- [15] K. Tsuji, K. Yoon, and S. Ogo, ‘Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Citrobacter* sp. S-77 is post-translationally modified by CoA (protein CoAlation) under oxidative stress’, *FEBS Open Bio*, vol. 9, no. 1, pp. 53–73, Jan. 2019, doi: 10.1002/2211-5463.12542.
- [16] A. L. Sessions, D. M. Doughty, P. V. Welander, R. E. Summons, and D. K. Newman, ‘The Continuing Puzzle of the Great Oxidation Event’, *Current Biology*, vol. 19, no. 14, pp. R567–R574, Jul. 2009, doi: 10.1016/j.cub.2009.05.054.
- [17] H. D. Holland, ‘The oxygenation of the atmosphere and oceans’, *Phil. Trans. R. Soc. B*, vol. 361, no. 1470, pp. 903–915, Jun. 2006, doi: 10.1098/rstb.2006.1838.

- [18] P. G. Winyard and D. R. Blake, 'Antioxidants, Redox-Regulated Transcription Factors, and Inflammation', in *Advances in Pharmacology*, vol. 38, Elsevier, 1996, pp. 403–421. doi: 10.1016/S1054-3589(08)60993-X.
- [19] B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, 2015. doi: 10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001.
- [20] E. Cadenas, 'Basic mechanisms of antioxidant activity', *BioFactors*, vol. 6, no. 4, pp. 391–397, Jan. 1997, doi: 10.1002/biof.5520060404.
- [21] K. Le Gal, E. E. Schmidt, and V. I. Sayin, 'Cellular Redox Homeostasis', *Antioxidants*, vol. 10, no. 9, p. 1377, Aug. 2021, doi: 10.3390/antiox10091377.
- [22] P. D. Ray, B.-W. Huang, and Y. Tsuji, 'Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling', *Cellular Signalling*, vol. 24, no. 5, pp. 981–990, May 2012, doi: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008.
- [23] A. B. García-Redondo, A. Aguado, A. M. Briones, and M. Salaices, 'NADPH oxidases and vascular remodeling in cardiovascular diseases', *Pharmacological Research*, vol. 114, pp. 110–120, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.phrs.2016.10.015.
- [24] S. Y. Kim *et al.*, 'Regulation of pro-inflammatory responses by lipoxygenases via intracellular reactive oxygen species in vitro and in vivo', *Exp Mol Med*, vol. 40, no. 4, p. 461, 2008, doi: 10.3858/emm.2008.40.4.461.
- [25] S. J. Mulware, 'Trace elements and carcinogenicity: a subject in review', *3 Biotech*, vol. 3, no. 2, pp. 85–96, Apr. 2013, doi: 10.1007/s13205-012-0072-6.
- [26] D. Trachootham, W. Lu, M. A. Ogasawara, N. R.-D. Valle, and P. Huang, 'Redox Regulation of Cell Survival', *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 10, no. 8, pp. 1343–1374, Aug. 2008, doi: 10.1089/ars.2007.1957.
- [27] T. J. Bechtel and E. Weerapana, 'From structure to redox: The diverse functional roles of disulfides and implications in disease', *Proteomics*, vol. 17, no. 6, p. 1600391, Mar. 2017, doi: 10.1002/pmic.201600391.
- [28] C. L. Hawkins and M. J. Davies, 'Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 294, no. 51, pp. 19683–19708, Dec. 2019, doi: 10.1074/jbc.REV119.006217.

- [29] A. Negre-Salvayre *et al.*, 'Pathological aspects of lipid peroxidation', *Free Radical Research*, vol. 44, no. 10, pp. 1125–1171, Oct. 2010, doi: 10.3109/10715762.2010.498478.
- [30] A. P. Breen and J. A. Murphy, 'Reactions of oxyl radicals with DNA', *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 18, no. 6, pp. 1033–1077, Jun. 1995, doi: 10.1016/0891-5849(94)00209-3.
- [31] N. L. Klages-Mundt and L. Li, 'Formation and repair of DNA-protein crosslink damage', *Sci. China Life Sci.*, vol. 60, no. 10, pp. 1065–1076, Oct. 2017, doi: 10.1007/s11427-017-9183-4.
- [32] Q. Ding, E. Dimayuga, and J. N. Keller, 'Oxidative stress alters neuronal RNA- and protein-synthesis: Implications for neural viability', *Free Radical Research*, vol. 41, no. 8, pp. 903–910, Jan. 2007, doi: 10.1080/10715760701416996.
- [33] M. Tanaka, P. B. Chock, and E. R. Stadtman, 'Oxidized messenger RNA induces translation errors', *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 104, no. 1, pp. 66–71, Jan. 2007, doi: 10.1073/pnas.0609737104.
- [34] X. Chen *et al.*, 'Oxidative RNA Damage in the Pathogenesis and Treatment of Type 2 Diabetes', *Front. Physiol.*, vol. 13, p. 725919, Mar. 2022, doi: 10.3389/fphys.2022.725919.
- [35] Z. Liu *et al.*, 'Role of RNA Oxidation in Neurodegenerative Diseases', *IJMS*, vol. 21, no. 14, p. 5022, Jul. 2020, doi: 10.3390/ijms21145022.
- [36] E. Y. Liu, C. P. Cali, and E. B. Lee, 'RNA metabolism in neurodegenerative disease', *Disease Models & Mechanisms*, vol. 10, no. 5, pp. 509–518, May 2017, doi: 10.1242/dmm.028613.
- [37] Z. Li, S. Malla, B. Shin, and J. M. Li, 'Battle against RNA oxidation: molecular mechanisms for reducing oxidized RNA to protect cells', *WIREs RNA*, vol. 5, no. 3, pp. 335–346, May 2014, doi: 10.1002/wrna.1214.
- [38] B. Halliwell, 'Biochemistry of oxidative stress', *Biochemical Society Transactions*, vol. 35, no. 5, pp. 1147–1150, Nov. 2007, doi: 10.1042/BST0351147.

- [39] S. Ebrahimi, A. Soltani, and S. I. Hashemy, ‘Oxidative stress in cervical cancer pathogenesis and resistance to therapy’, *J of Cellular Biochemistry*, vol. 120, no. 5, pp. 6868–6877, May 2019, doi: 10.1002/jcb.28007.
- [40] M. S. Karvandi, F. Sheikhzadeh Hesari, A. R. Aref, and M. Mahdavi, ‘The neuroprotective effects of targeting key factors of neuronal cell death in neurodegenerative diseases: The role of ER stress, oxidative stress, and neuroinflammation’, *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 17, p. 1105247, Mar. 2023, doi: 10.3389/fncel.2023.1105247.
- [41] U. Saleem, S. Sabir, S. G. Niazi, M. Naeem, and B. Ahmad, ‘Role of Oxidative Stress and Antioxidant Defense Biomarkers in Neurodegenerative Diseases’, *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, vol. 30, no. 4, pp. 311–322, 2020, doi: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2020029202.
- [42] G. H. Kim, J. E. Kim, S. J. Rhie, and S. Yoon, ‘The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases’, *Exp Neurobiol*, vol. 24, no. 4, pp. 325–340, Dec. 2015, doi: 10.5607/en.2015.24.4.325.
- [43] V. R. Pasupuleti *et al.*, ‘A Review on Oxidative Stress, Diabetic Complications, and the Roles of Honey Polyphenols’, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2020, pp. 1–16, Nov. 2020, doi: 10.1155/2020/8878172.
- [44] T. Finkel and N. J. Holbrook, ‘Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing’, *Nature*, vol. 408, no. 6809, pp. 239–247, Nov. 2000, doi: 10.1038/35041687.
- [45] K. E. Wellen and C. B. Thompson, ‘Cellular Metabolic Stress: Considering How Cells Respond to Nutrient Excess’, *Molecular Cell*, vol. 40, no. 2, pp. 323–332, Oct. 2010, doi: 10.1016/j.molcel.2010.10.004.
- [46] T. Hayashi, M. F. Hirshman, N. Fujii, S. A. Habinowski, L. A. Witters, and L. J. Goodyear, ‘Metabolic stress and altered glucose transport: activation of AMP-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism.’, *Diabetes*, vol. 49, no. 4, pp. 527–531, Apr. 2000, doi: 10.2337/diabetes.49.4.527.

- [47] E. B. Kurutas, ‘The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state’, *Nutr J*, vol. 15, no. 1, p. 71, Dec. 2015, doi: 10.1186/s12937-016-0186-5.
- [48] B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, ‘The definition and measurement of antioxidants in biological systems’, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 18, no. 1, pp. 125–126, Jan. 1995, doi: 10.1016/0891-5849(95)91457-3.
- [49] P. Jones and A. Suggett, ‘The catalase–hydrogen peroxide system. A theoretical appraisal of the mechanism of catalase action’, *Biochemical Journal*, vol. 110, no. 4, pp. 621–629, Dec. 1968, doi: 10.1042/bj1100621.
- [50] O. Loew, ‘A New Enzyme of General Occurrence in Organisms’, *Science*, vol. 11, no. 279, pp. 701–702, May 1900, doi: 10.1126/science.11.279.701.
- [51] C. Glorieux and P. B. Calderon, ‘Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach’, *Biological Chemistry*, vol. 398, no. 10, pp. 1095–1108, Sep. 2017, doi: 10.1515/hsz-2017-0131.
- [52] Y. Wang, R. Branicky, A. Noë, and S. Hekimi, ‘Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling’, *Journal of Cell Biology*, vol. 217, no. 6, pp. 1915–1928, Jun. 2018, doi: 10.1083/jcb.201708007.
- [53] A.-F. Miller, ‘Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights’, *FEBS Letters*, vol. 586, no. 5, pp. 585–595, Mar. 2012, doi: 10.1016/j.febslet.2011.10.048.
- [54] R. Brigelius-Flohé and M. Maiorino, ‘Glutathione peroxidases’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1830, no. 5, pp. 3289–3303, May 2013, doi: 10.1016/j.bbagen.2012.11.020.
- [55] J. Pei, X. Pan, G. Wei, and Y. Hua, ‘Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxitation’, *Front. Pharmacol.*, vol. 14, p. 1147414, Mar. 2023, doi: 10.3389/fphar.2023.1147414.
- [56] J. Lu and A. Holmgren, ‘The thioredoxin antioxidant system’, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 66, pp. 75–87, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036.

- [57] G. Powis and W. R. Montfort, 'Properties and Biological Activities of Thioredoxins', *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, vol. 30, no. 1, pp. 421–455, Jun. 2001, doi: 10.1146/annurev.biophys.30.1.421.
- [58] M. Matsui *et al.*, 'Early Embryonic Lethality Caused by Targeted Disruption of the Mouse Thioredoxin Gene', *Developmental Biology*, vol. 178, no. 1, pp. 179–185, Aug. 1996, doi: 10.1006/dbio.1996.0208.
- [59] J. Nordberg and E. S. J. Arnér, 'Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system' 1This review is based on the licentiate thesis "Thioredoxin reductase—interactions with the redox active compounds 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and lipoic acid" by Jonas Nordberg, 2001, Karolinska Institute, Stockholm, ISBN 91-631-1064-4.', *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 31, no. 11, pp. 1287–1312, Dec. 2001, doi: 10.1016/S0891-5849(01)00724-9.
- [60] K. Psenakova, R. Hexnerova, P. Srb, V. Obsilova, V. Veverka, and T. Obsil, 'The redox-active site of thioredoxin is directly involved in apoptosis signal-regulating kinase 1 binding that is modulated by oxidative stress', *The FEBS Journal*, vol. 287, no. 8, pp. 1626–1644, Apr. 2020, doi: 10.1111/febs.15101.
- [61] E. S. J. Arnér and A. Holmgren, 'The thioredoxin system in cancer', *Seminars in Cancer Biology*, vol. 16, no. 6, pp. 420–426, Dec. 2006, doi: 10.1016/j.semcancer.2006.10.009.
- [62] Q. Xu and J. Zhang, 'Novel strategies for targeting the thioredoxin system for cancer therapy', *Expert Opinion on Drug Discovery*, vol. 17, no. 5, pp. 437–442, May 2022, doi: 10.1080/17460441.2022.2045270.
- [63] M. Bian, R. Fan, S. Zhao, and W. Liu, 'Targeting the Thioredoxin System as a Strategy for Cancer Therapy: Miniperspective', *J. Med. Chem.*, vol. 62, no. 16, pp. 7309–7321, Aug. 2019, doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b01595.
- [64] B. Haas, L. Schütte, M. Wos-Maganga, S. Weickhardt, M. Timmer, and N. Eckstein, 'Thioredoxin Confers Intrinsic Resistance to Cytostatic Drugs in Human Glioma Cells', *IJMS*, vol. 19, no. 10, p. 2874, Sep. 2018, doi: 10.3390/ijms19102874.

- [65] V. Gandin and A. Fernandes, 'Metal- and Semimetal-Containing Inhibitors of Thioredoxin Reductase as Anticancer Agents', *Molecules*, vol. 20, no. 7, pp. 12732–12756, Jul. 2015, doi: 10.3390/molecules200712732.
- [66] M. T. Harper, 'Auranofin, a thioredoxin reductase inhibitor, causes platelet death through calcium overload', *Platelets*, vol. 30, no. 1, pp. 98–104, Jan. 2019, doi: 10.1080/09537104.2017.1378809.
- [67] J. J. Mieyal, M. M. Gallogly, S. Qanungo, E. A. Sabens, and M. D. Shelton, 'Molecular Mechanisms and Clinical Implications of Reversible Protein S - Glutathionylation', *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 10, no. 11, pp. 1941–1988, Nov. 2008, doi: 10.1089/ars.2008.2089.
- [68] C. H. Lillig, C. Berndt, and A. Holmgren, 'Glutaredoxin systems', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1780, no. 11, pp. 1304–1317, Nov. 2008, doi: 10.1016/j.bbagen.2008.06.003.
- [69] C. H. Lillig and C. Berndt, 'Glutaredoxins in Thiol/Disulfide Exchange', *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 18, no. 13, pp. 1654–1665, May 2013, doi: 10.1089/ars.2012.5007.
- [70] M. Deponte, 'Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1830, no. 5, pp. 3217–3266, May 2013, doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.018.
- [71] B. Combes and G. S. Stakelum, 'A LIVER ENZYME THAT CONJUGATES SULFOBROMOPHTHALEIN SODIUM WITH GLUTATHIONE*', *J. Clin. Invest.*, vol. 40, no. 6, pp. 981–988, Jun. 1961, doi: 10.1172/JCI104337.
- [72] J. Booth, E. Boyland, and P. Sims, 'An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione', *Biochemical Journal*, vol. 79, no. 3, pp. 516–524, Jun. 1961, doi: 10.1042/bj0790516.
- [73] W. H. Habig, M. J. Pabst, G. Fleischner, Z. Gatmaitan, I. M. Arias, and W. B. Jakoby, 'The Identity of Glutathione S -Transferase B with Ligandin, a Major Binding Protein of Liver', *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 71, no. 10, pp. 3879–3882, Oct. 1974, doi: 10.1073/pnas.71.10.3879.

- [74] S. Lien, A.-K. Larsson, and B. Mannervik, 'The polymorphic human glutathione transferase T1-1, the most efficient glutathione transferase in the denitrosation and inactivation of the anticancer drug 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea', *Biochemical Pharmacology*, vol. 63, no. 2, pp. 191–197, Jan. 2002, doi: 10.1016/S0006-2952(01)00846-2.
- [75] D. S. Hamilton *et al.*, 'Mechanism of the Glutathione Transferase-Catalyzed Conversion of Antitumor 2-Crotonyloxymethyl-2-cycloalkenones to GSH Adducts', *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 49, pp. 15049–15058, Dec. 2003, doi: 10.1021/ja030396p.
- [76] J. D. Hayes and D. J. Pulford, 'The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance Part I', *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 30, no. 6, pp. 445–520, Jan. 1995, doi: 10.3109/10409239509083491.
- [77] J. D. Hayes, J. U. Flanagan, and I. R. Jowsey, 'GLUTATHIONE TRANSFERASES', *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 45, no. 1, pp. 51–88, Sep. 2005, doi: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857.
- [78] D. Bartling, R. Radzio, U. Steiner, and E. W. Weiler, 'A glutathione S-transferase with glutathione-peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*: Molecular cloning and functional characterization', *European Journal of Biochemistry*, vol. 216, no. 2, pp. 579–586, Sep. 1993, doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18177.x.
- [79] I. Cummins, D. J. Cole, and R. Edwards, 'A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass', *The Plant Journal*, vol. 18, no. 3, pp. 285–292, May 1999, doi: 10.1046/j.1365-313X.1999.00452.x.
- [80] K. Ulrich and U. Jakob, 'The role of thiols in antioxidant systems', *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 140, pp. 14–27, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.035.

- [81] R. C. Fahey, W. C. Brown, W. B. Adams, and M. B. Worsham, 'Occurrence of glutathione in bacteria', *J Bacteriol*, vol. 133, no. 3, pp. 1126–1129, Mar. 1978, doi: 10.1128/jb.133.3.1126-1129.1978.
- [82] A. Meister, 'Glutathione metabolism and its selective modification.', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 263, no. 33, pp. 17205–17208, Nov. 1988, doi: 10.1016/S0021-9258(19)77815-6.
- [83] R. Hider, M. V. Aviles, Y.-L. Chen, and G. O. Latunde-Dada, 'The Role of GSH in Intracellular Iron Trafficking', *IJMS*, vol. 22, no. 3, p. 1278, Jan. 2021, doi: 10.3390/ijms22031278.
- [84] T. Daniel, H. M. Faruq, J. Laura Magdalena, G. Manuela, and L. Christopher Horst, 'Role of GSH and Iron-Sulfur Glutaredoxins in Iron Metabolism—Review', *Molecules*, vol. 25, no. 17, p. 3860, Aug. 2020, doi: 10.3390/molecules25173860.
- [85] K. Aquilano, S. Baldelli, and M. R. Ciriolo, 'Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant', *Front. Pharmacol.*, vol. 5, Aug. 2014, doi: 10.3389/fphar.2014.00196.
- [86] I. A. Cotgreave and R. G. Gerdes, 'Recent Trends in Glutathione Biochemistry—Glutathione–Protein Interactions: A Molecular Link between Oxidative Stress and Cell Proliferation?', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 242, no. 1, pp. 1–9, Jan. 1998, doi: 10.1006/bbrc.1997.7812.
- [87] J. Baddiley, E. M. Thain, G. D. Novelli, and F. Lipmann, 'Structure of Coenzyme A', *Nature*, vol. 171, no. 4341, pp. 76–76, Jan. 1953, doi: 10.1038/171076a0.
- [88] R. Leonardi, Y. Zhang, C. Rock, and S. Jackowski, 'Coenzyme A: Back in action', *Progress in Lipid Research*, vol. 44, no. 2–3, pp. 125–153, Mar. 2005, doi: 10.1016/j.plipres.2005.04.001.
- [89] J. Bremer, A. Wojtczak, and S. Skrede, 'The Leakage and Destruction of CoA in Isolated Mitochondria', *Eur J Biochem*, vol. 25, no. 1, pp. 190–197, Jan. 1972, doi: 10.1111/j.1432-1033.1972.tb01684.x.

- [90] P. Naquet, E. W. Kerr, S. D. Vickers, and R. Leonardi, 'Regulation of coenzyme A levels by degradation: the "Ins and Outs"', *Progress in Lipid Research*, vol. 78, p. 101028, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.plipres.2020.101028.
- [91] G. Pitari *et al.*, 'Pantetheinase activity of membrane-bound Vanin-1: lack of free cysteamine in tissues of Vanin-1 deficient mice', *FEBS Letters*, vol. 483, no. 2–3, pp. 149–154, Oct. 2000, doi: 10.1016/S0014-5793(00)02110-4.
- [92] H. Davaapil, Y. Tsuchiya, and I. Gout, 'Signalling functions of coenzyme A and its derivatives in mammalian cells', *Biochemical Society Transactions*, vol. 42, no. 4, pp. 1056–1062, Aug. 2014, doi: 10.1042/BST20140146.
- [93] O. C. M. Sibon and E. Strauss, 'Coenzyme A: to make it or uptake it?', *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 17, no. 10, pp. 605–606, Oct. 2016, doi: 10.1038/nrm.2016.110.
- [94] F. L. Theodoulou, O. C. M. Sibon, S. Jackowski, and I. Gout, 'Coenzyme A and its derivatives: renaissance of a textbook classic', *Biochemical Society Transactions*, vol. 42, no. 4, pp. 1025–1032, Aug. 2014, doi: 10.1042/BST20140176.
- [95] C. Cavestro, D. Diodato, V. Tiranti, and I. Di Meo, 'Inherited Disorders of Coenzyme A Biosynthesis: Models, Mechanisms, and Treatments', *IJMS*, vol. 24, no. 6, p. 5951, Mar. 2023, doi: 10.3390/ijms24065951.
- [96] Y. Yu, I. F. Moretti, N. A. Grzeschik, O. C. M. Sibon, and H. Schepers, 'Coenzyme A levels influence protein acetylation, CoAlation and 4'-phosphopantetheinylation: Expanding the impact of a metabolic nexus molecule', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1868, no. 4, p. 118965, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.bbamcr.2021.118965.
- [97] Y. Wang *et al.*, 'The multiple facets of acetyl-CoA metabolism: Energetics, biosynthesis, regulation, acylation and inborn errors', *Molecular Genetics and Metabolism*, vol. 138, no. 1, p. 106966, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.ymgme.2022.106966.
- [98] L. Shi and B. P. Tu, 'Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences', *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 33, pp. 125–131, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.ceb.2015.02.003.

- [99] F. Pietrocola, L. Galluzzi, J. M. Bravo-San Pedro, F. Madeo, and G. Kroemer, 'Acetyl Coenzyme A: A Central Metabolite and Second Messenger', *Cell Metabolism*, vol. 21, no. 6, pp. 805–821, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.cmet.2015.05.014.
- [100] C. E. Barnes, D. M. English, and S. M. Cowley, 'Acetylation & Co: an expanding repertoire of histone acylations regulates chromatin and transcription', *Essays in Biochemistry*, vol. 63, no. 1, pp. 97–107, Apr. 2019, doi: 10.1042/EBC20180061.
- [101] I. Ali, R. J. Conrad, E. Verdin, and M. Ott, 'Lysine Acetylation Goes Global: From Epigenetics to Metabolism and Therapeutics', *Chem. Rev.*, vol. 118, no. 3, pp. 1216–1252, Feb. 2018, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00181.
- [102] S. Shang, J. Liu, and F. Hua, 'Protein acylation: mechanisms, biological functions and therapeutic targets', *Sig Transduct Target Ther*, vol. 7, no. 1, p. 396, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41392-022-01245-y.
- [103] J. Beld, E. C. Sonnenschein, C. R. Vickery, J. P. Noel, and M. D. Burkart, 'The phosphopantetheinyl transferases: catalysis of a post-translational modification crucial for life', *Nat. Prod. Rep.*, vol. 31, no. 1, pp. 61–108, 2014, doi: 10.1039/C3NP70054B.
- [104] B. Setlow and P. Setlow, 'Levels of acetyl coenzyme A, reduced and oxidized coenzyme A, and coenzyme A in disulfide linkage to protein in dormant and germinated spores and growing and sporulating cells of *Bacillus megaterium*', *J Bacteriol*, vol. 132, no. 2, pp. 444–452, Nov. 1977, doi: 10.1128/jb.132.2.444-452.1977.
- [105] B. Setlow and P. Setlow, 'Most of the Coenzyme A in dormant spores of *Bacillus megaterium* is in disulfide linkage to protein', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 75, no. 1, pp. 45–50, Mar. 1977, doi: 10.1016/0006-291X(77)91286-4.
- [106] A. Zhyvoloup *et al.*, 'Analysis of disulphide bond linkage between CoA and protein cysteine thiols during sporulation and in spores of *Bacillus* species', *FEMS*

- Microbiology Letters*, vol. 367, no. 23, p. fnaa174, Dec. 2020, doi: 10.1093/femsle/fnaa174.
- [107]L. Aloum *et al.*, ‘Coenzyme A and protein CoAlation levels are regulated in response to oxidative stress and during morphogenesis in Dictyostelium discoideum’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 511, no. 2, pp. 294–299, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.bbrc.2019.02.031.
- [108]Y. Tsuchiya *et al.*, ‘Protein CoAlation and antioxidant function of coenzyme A in prokaryotic cells’, *Biochemical Journal*, vol. 475, no. 11, pp. 1909–1937, Jun. 2018, doi: 10.1042/BCJ20180043.
- [109]J. D. Robishaw, D. Berkich, and J. R. Neely, ‘Rate-limiting step and control of coenzyme A synthesis in cardiac muscle.’, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 257, no. 18, pp. 10967–10972, Sep. 1982, doi: 10.1016/S0021-9258(18)33918-8.
- [110]E. A. Siess, D. G. Brocks, and O. H. Wieland, ‘Distribution of Metabolites Between the Cytosolic and Mitochondrial Compartments of Hepatocytes Isolated from Fed Rats’, *Hoppe-Seyler’s Zeitschrift für physiologische Chemie*, vol. 359, no. 2, pp. 785–798, Jan. 1978, doi: 10.1515/bchm2.1978.359.2.785.
- [111]S. Jackowski and R. Leonardi, ‘Deregulated coenzyme A, loss of metabolic flexibility and diabetes’, *Biochemical Society Transactions*, vol. 42, no. 4, pp. 1118–1122, Aug. 2014, doi: 10.1042/BST20140156.
- [112]D. K. Reibel, B. W. Wyse, D. A. Berkich, and J. R. Neely, ‘Regulation of coenzyme A synthesis in heart muscle: effects of diabetes and fasting’, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 240, no. 4, pp. H606–H611, Apr. 1981, doi: 10.1152/ajpheart.1981.240.4.H606.
- [113]M. R. Munday, M. R. Milic, S. Takhar, M. J. Holness, and M. C. Sugden, ‘The short-term regulation of hepatic acetyl-CoA carboxylase during starvation and re-feeding in the rat’, *Biochemical Journal*, vol. 280, no. 3, pp. 733–737, Dec. 1991, doi: 10.1042/bj2800733.

- [114]R. McAllister, L. Fixter, and E. Campbell, ‘The effect of tumour growth on liver pantothenate, CoA, and fatty acid synthetase activity in the mouse’, *Br J Cancer*, vol. 57, no. 1, pp. 83–86, Jan. 1988, doi: 10.1038/bjc.1988.14.
- [115]S. Dusi *et al.*, ‘Exome Sequence Reveals Mutations in CoA Synthase as a Cause of Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation’, *The American Journal of Human Genetics*, vol. 94, no. 1, pp. 11–22, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.ajhg.2013.11.008.
- [116]A. Genovese and M. G. Butler, ‘The Autism Spectrum: Behavioral, Psychiatric and Genetic Associations’, *Genes*, vol. 14, no. 3, p. 677, Mar. 2023, doi: 10.3390/genes14030677.
- [117]C. C. Dibble *et al.*, ‘PI3K drives the de novo synthesis of coenzyme A from vitamin B5’, *Nature*, vol. 608, no. 7921, pp. 192–198, Aug. 2022, doi: 10.1038/s41586-022-04984-8.
- [118]S. E. Claridge and B. D. Hopkins, ‘Circling back to PTEN: Fumarate inhibits canonical tumor suppressor’, *Molecular Cell*, vol. 82, no. 7, pp. 1244–1245, Apr. 2022, doi: 10.1016/j.molcel.2022.03.013.
- [119]X. Ge *et al.*, ‘Fumarate inhibits PTEN to promote tumorigenesis and therapeutic resistance of type2 papillary renal cell carcinoma’, *Molecular Cell*, vol. 82, no. 7, pp. 1249–1260.e7, Apr. 2022, doi: 10.1016/j.molcel.2022.01.029.
- [120]L. B. Poole, ‘The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry’, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 80, pp. 148–157, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.013.
- [121]C. Jacob, E. Battaglia, T. Burkholz, D. Peng, D. Bagrel, and M. Montenarh, ‘Control of Oxidative Posttranslational Cysteine Modifications: From Intricate Chemistry to Widespread Biological and Medical Applications’, *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 25, no. 3, pp. 588–604, Mar. 2012, doi: 10.1021/tx200342b.
- [122]O. M. Malanchuk, G. G. Panasyuk, N. M. Serbin, I. T. Gout, and V. V. Filonenko, ‘Generation and characterization of monoclonal antibodies specific to Coenzyme A’, *Biopolym. Cell*, vol. 31, no. 3, pp. 187–192, Jun. 2015, doi: 10.7124/bc.0008DF.

- [123]J. Baković *et al.*, ‘A key metabolic integrator, coenzyme A, modulates the activity of peroxiredoxin 5 via covalent modification’, *Mol Cell Biochem*, vol. 461, no. 1–2, pp. 91–102, Nov. 2019, doi: 10.1007/s11010-019-03593-w.
- [124]J. Baković *et al.*, ‘Redox Regulation of the Quorum-sensing Transcription Factor AgrA by Coenzyme A’, *Antioxidants*, vol. 10, no. 6, p. 841, May 2021, doi: 10.3390/antiox10060841.
- [125]B. Y. K. Yu *et al.*, ‘Regulation of metastasis suppressor NME1 by a key metabolic cofactor coenzyme A’, *Redox Biology*, vol. 44, p. 101978, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.redox.2021.101978.
- [126]I. Gout, ‘Coenzyme A, protein CoAlation and redox regulation in mammalian cells’, *Biochemical Society Transactions*, vol. 46, no. 3, pp. 721–728, Jun. 2018, doi: 10.1042/BST20170506.
- [127]V. Filonenko and I. Gout, ‘Discovery and functional characterisation of protein CoAlation and the antioxidant function of coenzyme A’, *BBA Advances*, vol. 3, p. 100075, 2023, doi: 10.1016/j.bbadv.2023.100075.
- [128]A. Argyrou and J. S. Blanchard, ‘Flavoprotein Disulfide Reductases: Advances in Chemistry and Function’, in *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, vol. 78, Elsevier, 2004, pp. 89–142. doi: 10.1016/S0079-6603(04)78003-4.
- [129]M.-A. Tossounian *et al.*, ‘Bacillus subtilis YtpP and Thioredoxin A Are New Players in the Coenzyme-A-Mediated Defense Mechanism against Cellular Stress’, *Antioxidants*, vol. 12, no. 4, p. 938, Apr. 2023, doi: 10.3390/antiox12040938.
- [130]M.-A. Tossounian *et al.*, ‘Profiling the Site of Protein CoAlation and Coenzyme A Stabilization Interactions’, *Antioxidants*, vol. 11, no. 7, p. 1362, Jul. 2022, doi: 10.3390/antiox11071362.
- [131]T. Lashley *et al.*, ‘Extensive Anti-CoA Immunostaining in Alzheimer’s Disease and Covalent Modification of Tau by a Key Cellular Metabolite Coenzyme A’, *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 15, p. 739425, Oct. 2021, doi: 10.3389/fncel.2021.739425.

- [132]O. Petrone, S. Serafini, B. Y. K. Yu, V. Filonenko, I. Gout, and C. O’Flaherty, ‘Changes of the Protein CoAlation Pattern in Response to Oxidative Stress and Capacitation in Human Spermatozoa’, *IJMS*, vol. 24, no. 15, p. 12526, Aug. 2023, doi: 10.3390/ijms241512526.
- [133]L. R. Pearce, D. Komander, and D. R. Alessi, ‘The nuts and bolts of AGC protein kinases’, *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 11, no. 1, pp. 9–22, Jan. 2010, doi: 10.1038/nrm2822.
- [134]D. Kim, A. Akcakanat, G. Singh, C. Sharma, and F. Meric-Bernstam, ‘Regulation and localization of ribosomal protein S6 kinase 1 isoforms’, *Growth Factors*, vol. 27, no. 1, pp. 12–21, Jan. 2009, doi: 10.1080/08977190802556986.
- [135]V. Ben-Hur *et al.*, ‘S6K1 Alternative Splicing Modulates Its Oncogenic Activity and Regulates mTORC1’, *Cell Reports*, vol. 3, no. 1, pp. 103–115, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.celrep.2012.11.020.
- [136]I. V. Zaiets, A. S. Sivchenko, A. I. Khoruzhenko, L. O. Savinska, and V. V. Filonenko, ‘The P60-S6K1 isoform of ribosomal protein S6 kinase 1 is a product of alternative mRNA translation’, *Ukr.Biochem.J.*, vol. 90, no. 4, pp. 25–35, Jul. 2018, doi: 10.15407/ubj90.04.025.
- [137]I. V. Zaiets, V. V. Holiar, and V. V. Filonenko, ‘Identification of a novel S6K1 splice variant coding for the p60-S6K1 isoform’, *Biopolym. Cell*, vol. 35, no. 2, pp. 99–106, Apr. 2019, doi: 10.7124/bc.00099B.
- [138]I. V. Zaiets, V. V. Holiar, A. S. Sivchenko, V. V. Smialkovska, and V. V. Filonenko, ‘p60-S6K1 represents a novel kinase active isoform with the mode of regulation distinct from p70/p85-S6K1 isoforms’, *Ukr.Biochem.J.*, vol. 91, no. 4, pp. 17–25, Jun. 2019, doi: 10.15407/ubj91.04.017.
- [139]K. K. Lee-Fruman, C. J. Kuo, J. Lippincott, N. Terada, and J. Blenis, ‘Characterization of S6K2, a novel kinase homologous to S6K1’, *Oncogene*, vol. 18, no. 36, pp. 5108–5114, Sep. 1999, doi: 10.1038/sj.onc.1202894.
- [140]M. Saitoh, P. Ten Dijke, K. Miyazono, and H. Ichijo, ‘Cloning and Characterization of p70S6K β Defines a Novel Family of p70 S6 Kinases’, *Biochemical and*

- Biophysical Research Communications*, vol. 253, no. 2, pp. 470–476, Dec. 1998, doi: 10.1006/bbrc.1998.9784.
- [141] S. N. Sehgal, H. Baker, and C. Vézina, ‘Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization.’, *J. Antibiot.*, vol. 28, no. 10, pp. 727–732, 1975, doi: 10.7164/antibiotics.28.727.
- [142] H. Harada, J. S. Andersen, M. Mann, N. Terada, and S. J. Korsmeyer, ‘p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD’, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 98, no. 17, pp. 9666–9670, Aug. 2001, doi: 10.1073/pnas.171301998.
- [143] A. Romanelli, K. A. Martin, A. Toker, and J. Blenis, ‘p70 S6 Kinase Is Regulated by Protein Kinase C ζ and Participates in a Phosphoinositide 3-Kinase-Regulated Signalling Complex’, *Molecular and Cellular Biology*, vol. 19, no. 4, pp. 2921–2928, Apr. 1999, doi: 10.1128/MCB.19.4.2921.
- [144] S. Sridharan and A. Basu, ‘Distinct Roles of mTOR Targets S6K1 and S6K2 in Breast Cancer’, *IJMS*, vol. 21, no. 4, p. 1199, Feb. 2020, doi: 10.3390/ijms21041199.
- [145] W. Feng, X. Duan, J. Liu, J. Xiao, and R. E. Brown, ‘Morphoproteomic evidence of constitutively activated and overexpressed mTOR pathway in cervical squamous carcinoma and high grade squamous intraepithelial lesions’, *Int J Clin Exp Pathol*, vol. 2, no. 3, pp. 249–260, 2009.
- [146] Q. Lu, J. Wang, G. Yu, T. Guo, C. Hu, and P. Ren, ‘Expression and clinical significance of mammalian target of rapamycin/P70 ribosomal protein S6 kinase signaling pathway in human colorectal carcinoma tissue’, *Oncology Letters*, vol. 10, no. 1, pp. 277–282, Jul. 2015, doi: 10.3892/ol.2015.3228.
- [147] P. D. Li *et al.*, ‘Overexpression of RPS6KB1 predicts worse prognosis in primary HCC patients’, *Med Oncol*, vol. 29, no. 5, pp. 3070–3076, Dec. 2012, doi: 10.1007/s12032-012-0268-y.
- [148] L. Xiao, Y. C. Wang, W. S. Li, and Y. Du, ‘The role of mTOR and phospho-p70S6K in pathogenesis and progression of gastric carcinomas: an immunohistochemical

- study on tissue microarray’, *J Exp Clin Cancer Res*, vol. 28, no. 1, p. 152, Dec. 2009, doi: 10.1186/1756-9966-28-152.
- [149]J. C. Roa Strauch *et al.*, ‘AKT/mTOR substrate P70S6K is frequently phosphorylated in gallbladder cancer tissue and cell lines’, *OTT*, p. 1373, Oct. 2013, doi: 10.2147/OTT.S46897.
- [150]O. M. Garifulin *et al.*, ‘Alterations in S6K1 isoforms expression induce Epithelial to Mesenchymal Transition and Estrogen Receptor 1 Silencing in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells’, *Biopolym. Cell*, vol. 39, no. 3, pp. 189–200, Sep. 2023, doi: 10.7124/bc.000A9D.
- [151]M. Li *et al.*, ‘p70S6K Promotes Acquired Resistance of Erlotinib Through Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition in Non-Small Cell Lung Carcinoma’, *OTT*, vol. Volume 13, pp. 5257–5270, Jun. 2020, doi: 10.2147/OTT.S249695.
- [152]Y. L. Pon, H. Y. Zhou, A. N. Y. Cheung, H. Y. S. Ngan, and A. S. T. Wong, ‘p70 S6 Kinase Promotes Epithelial to Mesenchymal Transition through Snail Induction in Ovarian Cancer Cells’, *Cancer Research*, vol. 68, no. 16, pp. 6524–6532, Aug. 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6302.
- [153]R. Dhar and A. Basu, ‘Constitutive activation of p70 S6 kinase is associated with intrinsic resistance to cisplatin’, *Int J Oncol*, vol. 32, no. 5, pp. 1133–1137, May 2008.
- [154]F. Bahrami-B, P. Ataie-Kachoie, M. H. Pourgholami, and D. L. Morris, ‘p70 Ribosomal protein S6 kinase (*Rps6kb1*): an update’, *J Clin Pathol*, vol. 67, no. 12, pp. 1019–1025, Dec. 2014, doi: 10.1136/jclinpath-2014-202560.
- [155]H. Rebholz *et al.*, ‘Receptor association and tyrosine phosphorylation of S6 kinases’, *The FEBS Journal*, vol. 273, no. 9, pp. 2023–2036, May 2006, doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05219.x.
- [156]M. Rosner, K. Schipany, and M. Hengstschläger, ‘p70 S6K1 nuclear localization depends on its mTOR-mediated phosphorylation at T389, but not on its kinase activity towards S6’, *Amino Acids*, vol. 42, no. 6, pp. 2251–2256, Jun. 2012, doi: 10.1007/s00726-011-0965-4.

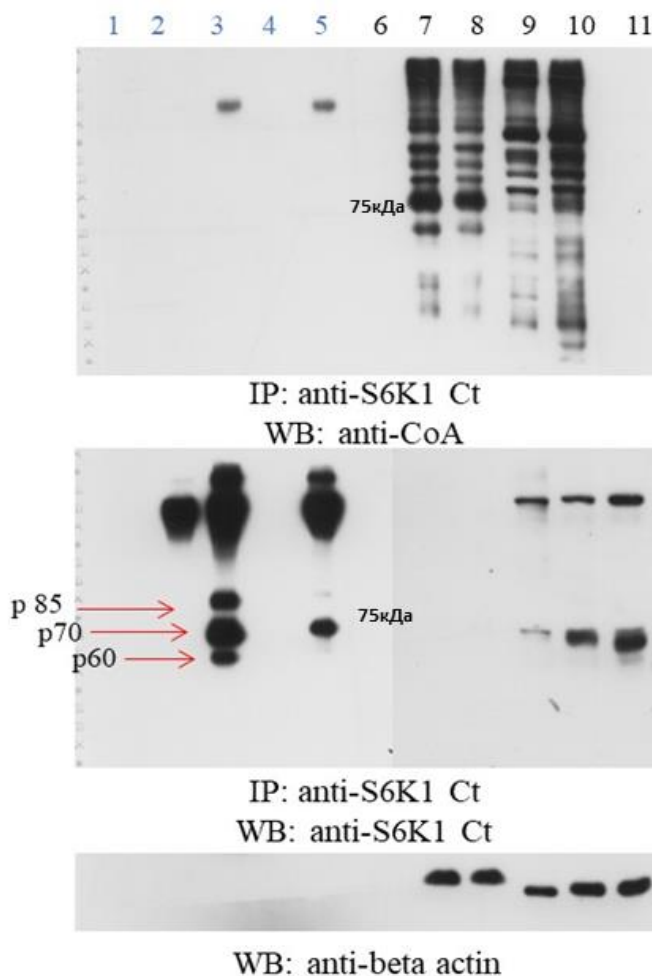
- [157]S. A. Yi *et al.*, ‘S6K1 Phosphorylation of H2B Mediates EZH2 Trimethylation of H3: A Determinant of Early Adipogenesis’, *Molecular Cell*, vol. 62, no. 3, pp. 443–452, May 2016, doi: 10.1016/j.molcel.2016.03.011.
- [158]J. Liu, P. D. Stevens, X. Li, M. D. Schmidt, and T. Gao, ‘PHLPP-Mediated Dephosphorylation of S6K1 Inhibits Protein Translation and Cell Growth’, *Molecular and Cellular Biology*, vol. 31, no. 24, pp. 4917–4927, Dec. 2011, doi: 10.1128/MCB.05799-11.
- [159]R. T. Peterson, B. N. Desai, J. S. Hardwick, and S. L. Schreiber, ‘Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12–rapamycin-associated protein’, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 96, no. 8, pp. 4438–4442, Apr. 1999, doi: 10.1073/pnas.96.8.4438.
- [160]A. González-García *et al.*, ‘A New Role for the p85-Phosphatidylinositol 3-Kinase Regulatory Subunit Linking FRAP to p70 S6 Kinase Activation’, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 2, pp. 1500–1508, Jan. 2002, doi: 10.1074/jbc.M103808200.
- [161]M.-L. Wang *et al.*, ‘Regulation of ribosomal protein S6 kinases by ubiquitination’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 369, no. 2, pp. 382–387, May 2008, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.02.032.
- [162]G. Panasyuk, I. Nemazanyy, V. Filonenko, and I. Gout, ‘Ribosomal protein S6 kinase 1 interacts with and is ubiquitinated by ubiquitin ligase ROC1’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 369, no. 2, pp. 339–343, May 2008, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.02.016.
- [163]T. R. Fenton, J. Gwalter, J. Ericsson, and I. T. Gout, ‘Histone acetyltransferases interact with and acetylate p70 ribosomal S6 kinases in vitro and in vivo’, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 42, no. 2, pp. 359–366, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.biocel.2009.11.022.
- [164]I. Nemazanyy, G. Panasyuk, A. Zhyvoloup, G. Panayotou, I. T. Gout, and V. Filonenko, ‘Specific interaction between S6K1 and CoA synthase: a potential link between the mTOR/S6K pathway, CoA biosynthesis and energy metabolism’,

- FEBS Letters*, vol. 578, no. 3, pp. 357–362, Dec. 2004, doi: 10.1016/j.febslet.2004.10.091.
- [165] L. O. Savinska, R. G. Kijamova, P. V. Pogrebnoy, G. V. Ovcharenko, I. T. Gout, and V. V. Filonenko, ‘Comparative characterization of S6 kinase α ; and β ; isoforms expression in mammalian tissues’, *Biopolym. Cell*, vol. 17, no. 5, pp. 374–379, Sep. 2001, doi: 10.7124/bc.0005C7.
- [166] D. P. Byrne *et al.*, ‘Aurora A regulation by reversible cysteine oxidation reveals evolutionarily conserved redox control of Ser/Thr protein kinase activity’, *Sci. Signal.*, vol. 13, no. 639, p. eaax2713, Jul. 2020, doi: 10.1126/scisignal.aax2713.
- [167] N. S. Zinkevich and D. D. Gutterman, ‘ROS-induced ROS release in vascular biology: redox-redox signaling’, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 301, no. 3, pp. H647–H653, Sep. 2011, doi: 10.1152/ajpheart.01271.2010.
- [168] A. Hać, K. Pierzynowska, and A. Herman-Antosiewicz, ‘S6K1 Is Indispensible for Stress-Induced Microtubule Acetylation and Autophagic Flux’, *Cells*, vol. 10, no. 4, p. 929, Apr. 2021, doi: 10.3390/cells10040929.
- [169] M. Hegazy *et al.*, ‘Proximity Ligation Assay for Detecting Protein-Protein Interactions and Protein Modifications in Cells and Tissues in Situ’, *CP Cell Biology*, vol. 89, no. 1, p. e115, Dec. 2020, doi: 10.1002/cpcb.115.
- [170] W. Romero-Fernandez *et al.*, ‘Detection, visualization and quantification of protein complexes in human Alzheimer’s disease brains using proximity ligation assay’, *Sci Rep*, vol. 13, no. 1, p. 11948, Jul. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-38000-4.
- [171] A. E. Leroux, J. O. Schulze, and R. M. Biondi, ‘AGC kinases, mechanisms of regulation and innovative drug development’, *Seminars in Cancer Biology*, vol. 48, pp. 1–17, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.semcancer.2017.05.011.
- [172] M. M. Keshwani, S. Von Daake, A. C. Newton, T. K. Harris, and S. S. Taylor, ‘Hydrophobic Motif Phosphorylation Is Not Required for Activation Loop Phosphorylation of p70 Ribosomal Protein S6 Kinase 1 (S6K1)’, *Journal of*

- Biological Chemistry*, vol. 286, no. 26, pp. 23552–23558, Jul. 2011, doi: 10.1074/jbc.M111.258004.
- [173] W.-G. Zhang, B. Shor, and K. Yu, ‘Identification and characterization of a constitutively T-loop phosphorylated and active recombinant S6K1: Expression, purification, and enzymatic studies in a high capacity non-radioactive TR-FRET Lance assay’, *Protein Expression and Purification*, vol. 46, no. 2, pp. 414–420, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.pep.2005.08.012.
- [174] M. M. Keshwani, D. B. Ross, T. J. Ragan, and T. K. Harris, ‘Baculovirus-mediated expression, purification, and characterization of a fully activated catalytic kinase domain construct of the 70kDa 40S ribosomal protein S6 kinase-1 α II isoform (S6K1 α II)’, *Protein Expression and Purification*, vol. 58, no. 1, pp. 32–41, Mar. 2008, doi: 10.1016/j.pep.2007.11.003.
- [175] M. M. Keshwani and T. K. Harris, ‘Kinetic Mechanism of Fully Activated S6K1 Protein Kinase’, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 18, pp. 11972–11980, May 2008, doi: 10.1074/jbc.M800114200.
- [176] M. M. Keshwani, D. B. Ross, T. J. Ragan, and T. K. Harris, ‘Baculovirus-mediated expression, purification, and characterization of a fully activated catalytic kinase domain construct of the 70kDa 40S ribosomal protein S6 kinase-1 α II isoform (S6K1 α II)’, *Protein Expression and Purification*, vol. 58, no. 1, pp. 32–41, Mar. 2008, doi: 10.1016/j.pep.2007.11.003.
- [177] G. N. Bendzunas *et al.*, ‘Redox Regulation of Brain Selective Kinases BRSK1/2: Implications for Dynamic Control of the Eukaryotic AMPK family through Cys-based mechanisms’, Oct. 06, 2023. doi: 10.1101/2023.10.05.561145.
- [178] M. Beullens *et al.*, ‘Substrate Specificity and Activity Regulation of Protein Kinase MELK’, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 48, pp. 40003–40011, Dec. 2005, doi: 10.1074/jbc.M507274200.
- [179] X. Huang *et al.*, ‘Crystal Structure of an Inactive Akt2 Kinase Domain’, *Structure*, vol. 11, no. 1, pp. 21–30, Jan. 2003, doi: 10.1016/S0969-2126(02)00937-1.

- [180]H. Murata, Y. Ihara, H. Nakamura, J. Yodoi, K. Sumikawa, and T. Kondo, 'Glutaredoxin Exerts an Antiapoptotic Effect by Regulating the Redox State of Akt', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 50, pp. 50226–50233, Dec. 2003, doi: 10.1074/jbc.M310171200.
- [181]C. Engel and R. Wierenga, 'The diverse world of coenzyme A binding proteins', *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 6, no. 6, pp. 790–797, Dec. 1996, doi: 10.1016/S0959-440X(96)80009-1.
- [182]J. Wang, C. Zhong, F. Wang, F. Qu, and J. Ding, 'Crystal structures of S6K1 provide insights into the regulation mechanism of S6K1 by the hydrophobic motif', *Biochemical Journal*, vol. 454, no. 1, pp. 39–47, Aug. 2013, doi: 10.1042/BJ20121863.

ДОДАТОК А



Блотограма імунопреципітації КоАльованої ендогенної S6K1 з лізату клітин HEK293/Pank1 β , антитілами проти S6K1 (С-кінець).

1 – ргА з лізатом обробленим перекисом водню; 2 – ргА з анти-S6K1; 3 – ІП лізату, обробленого H_2O_2 ; 4 - ргА з лізатом обробленим діамідом; 5 - ІП лізату, обробленого діамідом; 6 – маркер; 7 –лізат з діамідом після зв'язування з антитілами; 8 – тотальний лізат клітин, оброблених діамідом; 9 - лізат з H_2O_2 після зв'язування з антитілами; 8 – тотальний лізат клітин, оброблених H_2O_2 ; 9 – тотальний лізат необроблених клітин. Детекція вестерн-блоту анти-КоА МАт та анти-S6K1 (С-кінцеві). Контроль навантаження актином.

ДОДАТОК Б

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у Scopus

1. **A. V. Bdzhola**, V. V. Filonenko, I. T. Gout, and O. M. Malanchuk, ‘The use of the in situ proximity ligation assay for validating S6 kinase 1 CoAlation under oxidative stress.’, Biopolym. Cell, vol. 39, no. 4, pp. 277–282, Dec. 2023, doi: 10.7124/bc.000AA5. Q4, Impact Factor 0,5
2. O. M. Malanchuk, **A. V. Bdzhola**, I. O. Tykhonkova, I. T. Gout, and V. V. Filonenko, ‘Monoclonal antibodies to Coenzyme A’, Biopolym. Cell, vol. 38, no. 4, pp. 215–223, Dec. 2022, doi: 10.7124/bc.000A7F. Q4, Impact Factor 0,5
3. O. Malanchuk, **A. Bdzhola** et al., ‘Investigating the Regulation of Ribosomal Protein S6 Kinase 1 by CoAlation’, IJMS, vol. 25, no. 16, p. 8747, Aug. 2024, doi: 10.3390/ijms25168747. Q1, Impact Factor 6,7

Публікації у матеріалах доповідей наукових конференцій

- 1) **Bdzhola A**, Filonenko V, Malanchuk O ‘Purification and characterization of highly specific anti-CoA antibodies’ XIV IMBG All-Ukrainian Conference of Young Scientists. - Kyiv. – 2020. – p.22 – очна участь.
- 2) **Bdzhola A**, Malanchuk O ‘Analysis of protein coalation in the set of the MCF7 cell lines with selective expression of S6K1 isoforms under oxidative stress conditions’. XI annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine. Biopolymers and Cell. – 2021. – Vol. 37. N 3 (p.49) – очна участь.
- 3) **Bdzhola A**, Filonenko V, Malanchuk O ‘Generation and characterization of novel antibodies specific to Coenzyme A’. Materials of the XVII International conference of young scientists, Kyiv, IMBG. – 2023 – p.65. – очна участь.
- 4) **Bdzhola A**, Filonenko V, Malanchuk O ‘S6K1 CoAlation as cellular response to oxidative stress’. Materials of the XVIII All Ukrainian conference of young scientists, Kyiv, IMBG. – 2024. – p.8. – очна участь.