

**Голові спеціалізованої вченої ради
в Інституті молекулярної біології і
генетики НАН України
доктору біологічних наук,
професору, завідувачу відділу
молекулярної генетики
Інституту молекулярної біології і
генетики НАН України
Телегєєву Геннадію Дмитровичу**

ВІДГУК

**офіційного опонента – доктора біологічних наук, професора, завідувача
відділу сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України
Дробот Людмили Борисівни
на дисертаційну роботу БДЖОЛИ Анни Володимирівни
«КОАЛЮВАННЯ КІНАЗИ РИБОСОМНОГО БІЛКА S6 ТА
ЙОГО РЕГУЛЯТОРНА РОЛЬ»
на здобуття наукового ступеня доктора філософії
у галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія**

Актуальність теми. Кіназа рибосомного протеїну S6 (p70S6K1) є одним із ключових компонентів PI3K/Akt/mTOR-залежного сигнального каскаду, що відіграє провідну роль у регулюванні таких важливих для клітини процесів як ріст, проліферація, диференціювання та інше. Не дивно, що порушення в його функціонуванні спостерігаються при багатьох важких захворюваннях людини і, в тому числі, можуть бути першопричиною цих захворювань. Найбільш дослідженою є роль зазначеного каскаду в розвитку онкологічних захворювань. Варто зазначити, що інгібітори кіназ, які є компонентами сигнального каскаду, мають протипухлинну дію і деякі з них вже рекомендовані як мішені для протипухлинної терапії. На даний час, значна частина запропонованих інгібіторів проходить клінічні випробування, серед яких є і інгібітори S6K1. У світлі сказаного, дослідження нових механізмів регулювання функціонального стану PI3K/Akt/mTOR-залежного сигнального каскаду шляхом контролю активності його складових, зокрема S6K1, є актуальними, адже відкривають нові

можливості на шляху створення ефективних терапевтичних засобів.

Важливо зазначити, що КоАлювання є лише нещодавно відкритим типом посттрансляційної модифікації протеїнів, і дані щодо його ролі в регулюванні активності протеїнкіназ є досить обмежені, що вимагає подальших зусиль для з'ясування вкладу КоАлювання/деКоАлювання до функціонування сигнальних мереж на системному рівні. Останнім часом дана наукова проблема жваво досліджується у світі, що свідчить про беззаперечну затребуваність її вирішення. Сказаним визначається актуальність теми та практична значимість результатів дисертаційної роботи Анни БДЖОЛИ, повністю присвяченої аналізу КоАлювання рибосомного протеїну S6 та з'ясуванню регуляторної ролі цієї модифікації в контролі функціональної активності біологічно активних сполук протеїнового походження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Представлені в дисертаційній роботі дослідження відповідають основному плану науково-дослідних робіт відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України в рамках бюджетних тем: «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).

У першому розділі дисертаційної роботи детально проаналізовано роль окремих компонентів високо узгодженої ієрархічної регуляторної системи (прооксидантної/антиоксидантної) у контролі підтримання редокс-гомеостазу еукаріотичних клітин. Опрацювання великого масиву літератури дозволило дисертанту зробити висновок, що АФК здатні не тільки забезпечувати посилення і подовження активності рецептор-залежних сигнальних каскадів, але й одночасно пов'язані з редокс-залежним регулюванням біологічних відповідей клітин та розвитком низки системних патологічних станів, зокрема онкологічних

захворювань, залежно від їх конкретного порогового рівня та генетичного контексту клітин. Особливу увагу приділено аналізу сучасного стану проблеми функціонування КоА як ключового метаболічного інтегратора, зокрема метаболізму КоА та його функціональному значенню, розвитку патологій при порушенні метаболізму КоА. Значну увагу приділено висвітленню нещодавно охарактеризованої ролі КоА у посттрансляційній модифікації протеїнів шляхом КоАлювання/деКоАлювання та структурно-функціональної організації і механізмів контролю ензиматичної активності кінази рибосомного протеїну S6, S6K1, як субстрата для КоАлювання за умов оксидативного стресу, біологічної значимості цієї модифікації S6K1 у функціонуванні PI3K/Akt/mTOR-залежного сигнального каскаду. Необхідно зазначити, що матеріал, викладений в огляді літератури, свідчить про високу наукову ерудицію дисертантки, а також про її здатність до критичного аналізу і узагальнення фактичного матеріалу. На жаль, в розділі «Огляд літератури» мають місце описки, друкарські помилки, важкі стилістичні звороти, невдалі вирази та переклади термінів з англійської мови.

Ступінь обґрунтованості наукових положень та висновків. Метою представленої дисертаційної роботи було дослідити КоАлювання кінази 1 рибосомного білка S6 за різних умов та в різних системах, з'ясувати роль цієї модифікації в регуляції функціональної активності S6K1. Завдання, які було сформульовано у роботі, є цілком адекватними поставленій меті. Зокрема, дисертанткою було заплановано 8 завдань:

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.

Усі поставлені у роботі завдання були виконані в повній мірі, чому посприяло застосування цілого арсеналу сучасних методів біохімії, молекулярної клітинної біології, мікробіології, імунології: рідинної хроматографії/мас-спектрометрії, імунопреципітації, PLA Вестерн-блот аналізу, світлової та конфокальної мікроскопії, методів біоінформатики та статистичних методів обробки результатів досліджень.

Вважаю, що дисертаційне дослідження Анни БДЖОЛИ базується на результатах аналізу значного масиву власних даних, коректно опрацьованих дисертанткою. Поставлені завдання відповідають меті дослідження, а висновки, сформульовані дисертанткою, є логічними та обґрунтованими й охоплюють основні положення і результати висвітлені у розділах експериментальних досліджень.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше з'ясовано можливість кінази рибосомного протеїну S6, – S6K1, зазнавати КоАлювання за умов метаболічного та оксидативного стресів. Окрім того, встановлено, що сайтом КоАлювання є Cys 217, розташований в активаційній петлі кіназного домену S6K1. Вперше продемонстровано, що КоАлювання призводить до пригнічення активності кінази S6K1. Біоінформатичним аналізом з використанням молекулярного докінгу та симуляцій молекулярної динаміки створено модель взаємодії КоА з S6K1 та запропоновано механізм впливу на її активність. Аналіз стійкості комплексів КоА з фосфорильованою та нефосфорильованою за ключовими для активації кінази сайтами дозволив засвідчити, що мішенню для КоАлювання є саме фосфорильована, а значить активована форма S6K1. Таким чином, було показано, що КоАлювання є новим механізмом регулювання активності S6K1, альтернативним до фосфорилування/дефосфорилування.

Одним із критично важливих етапів дослідження, необхідним для реалізації мети і завдань дисертаційної роботи, стало створення високоспецифічних моноклональних антитіл проти КоА.

Слід також підкреслити важливість розробки нового протоколу отримання активної форми S6K1 з використанням бакуловірусної системи експресії в клітинах комах разом з її ключовим активатором, PDK кіназою.

Практичне значення отриманих результатів. З огляду на те, що порушення в функціонуванні mTOR/S6K-залежного сигнального каскаду супроводжують чи є причиною низки важких патологій людини, зокрема онкологічних, серцево-судинних та нейродегенеративних захворювань, метаболічних розладів та ін., S6K1 є важливою мішенню для корегування функціонального стану зазначеного сигнального каскаду з терапевтичною метою. Інгібітори S6K1 знаходяться на різних стадіях доклінічних та клінічних випробовувань, в першу чергу як протипухлинні засоби. Отримані в представлений роботі результати свідчать, що КоАлювання є новим механізмом регулювання активності S6K1, аналогічним до її фосфорилування/дефосфорилування. Таким чином, дослідження в напрямку розробки стратегії

регулювання КоАлювання/деКоАлювання S6K1 відкривають нові можливості впливу на активність S6K1 і мають потенційну перспективу терапевтичного застосування для лікування та профілактики патологічних станів людини.

До практично важливих здобутків дисертаційної роботи слід також віднести створення простого, надійного та ефективного протоколу отримання активної форми S6K1 з метою її використання для моніторингу дії і селекції ефективних хімічних інгібіторів.

Повнота викладу основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій в опублікованих працях. Результати дисертаційного дослідження достатньо повно представлено у публікаціях та тезах доповідей. Загалом, за темою дисертації опубліковано 7 наукових праць, у тому числі 3 статті у фахових наукових виданнях, що входять до баз даних WoS та Scopus (з них 1 стаття відноситься до 1-го квартилю). Всі статті відповідають вимогам Постанови Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 р. Опубліковано також 4 тез усних та стендових доповідей у збірниках матеріалів конференцій.

Аналіз структури дисертації та результатів наукових досліджень: Структура та зміст дисертації Анни БДЖОЛИ відповідають вимогам щодо оформлення цих рукописів згідно з Наказом МОН № 40 від 12.01.2017 р. Дисертація складається з переліку умовних скорочень, вступу, 3-х основних розділів («Огляд літератури», «Матеріали та методи», «Результати експериментальних досліджень та обговорення»), висновків, списку використаних джерел, який містить 182 посилання, та двох додатків. Рукопис викладений на 156 сторінках комп'ютерного набору, містить 3 таблиці та 34 рисунки.

Зауваження та запитання. Аналіз матеріалу проведених досліджень в цілому дозволяє зробити висновок про повне теоретичне обґрунтування та експериментальне підтвердження положень, висунутих в роботі. Висновки відображають одержані результати і базуються на аналізі експериментальних даних.

Разом з тим до дисертаційної роботи виникли деякі зауваження і запитання.

1. Загальне зауваження стосується правильності підписів до рисунків у розділі «Результати експериментальних досліджень...». Згідно загально прийнятих вимог у зарубіжних, але тепер і англомовних вітчизняних, підпис до рисунку повинен відображати результат дослідження, а не метод, за допомогою якого цей результат був отриманий.
2. На стор. 83 метод ковалентного пришивання КоА до протеїнів-носіїв за допомогою SPDP зазначено як зворотний, тоді як на стор. 84 – як незворотний? Назви сполук і термінів повинні бути однаковими по тексту дисертаційної роботи: пероксид водню/перекис водню, рибосомний/рибосомальний, зв'язувальний/зв'язуючий. Назви нуклеотидів, амінокислот необхідно подавати латиницею, як і деяких методологій, зокрема LS-MS, а не PX-MC.
3. На стор. 89 вказано, що на рис. 3.4.6 представлено спектри, отримані з p70S6K1 КоАльованого пептиду (LTDFGLC*K)?, що містить цистеїн у положенні 217. Очевидно, представлено мас-спектр, в якому ідентифіковано пік, який відповідає пептиду із зазначеною послідовністю. Важливо було б також представити результати мас-спектрометричного аналізу протеїнів клітин HEK293/Pank1 β після обробки їх діамідом і вказати приклади КоАльованих протеїнів.
4. За результатами ефективності КоАлювання S6K1, мутованої за залишками Cys217 і Cys231, встановлено зниження рівня цієї модифікації у випадку S6K1/Cys217Ala лише на 40%, а не очікуваних 100%. Оскільки важливі для фізіології клітини регуляторні події є кооперативними і відбуваються на рівні надмолекулярних комплексів, чи можливо припустити, що імунопреципітація за допомогою EE-tag антитіл може призводити до співімунопреципітації ендогенної S6K1, КоАльованої за умов оксидативного стресу?
5. На стор 110 зазначається, що «значний рівень КоАлювання S6K1 *in vivo* виявлено у різних клітинних лініях, хоча використовувалась лише одна - HEK293/Pank1 β . Варто було б вказати, на яких ще клітинних лініях було

виявлено досліджуваний регуляторний феномен.

6. В тексті та на рис. 3.13. не вказано різницю у препаратах 1-3 His-actS6K. Слід однак зауважити, що комерційний препарат S6K1 у серійних розведеннях демонструє активність, співставну з препаратом 2 His-actS6K.
7. За результатами анти-КоА Вестерн-блот аналізу (Рис. 3.15.a) виявлено інтенсивні сигнали, що відповідають рекомбінантному протеїну GST-grS6(Ct). Поясніть їх природу.
8. Дисертантка зробила правильний висновок, що КоАлювання очищеної рекомбінантної форми His-actS6K за присутності КоASSKoA *in vitro* відбувається за механізмом тіолдисульфідного обміну. Водночас, слід зазначити, що тіолдисульфідний обмін є стохастичним і менш ефективним процесом порівняно з ензиматичною модифікацією *in vivo*. Цікаво дізнатись, чи спрямовані подальші зусилля наукових колективів, що співпрацюють у зазначеній галузі, на ідентифікацію КоА трансфераз і, відповідно, редуктаз, для підтвердження біологічної значимості КоАлювання у контролі біологічних відповідей клітин на системному рівні.
9. В пункті новизна варто було б зазначити не лише те, що було вперше виявлено КоАлювання S6K1, а саме те, що КоАлювання впливає на активність кінази інгібуючи її. Крім того, те, що згідно біоінформатичного аналізу, саме активована, тобто фосфорильована за Thr229 форма S6K1, утворює більш стабільний комплекс з КоА свідчить про можливість існування нового механізму регулювання активності S6K1. Саме такий висновок свідчить про абсолютну новизну.

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам:

Враховуючи беззаперечну актуальність обраної теми, наукову та практичну значимість отриманих результатів, високий методичний рівень, оригінальність запланованих експериментів та значний масив отриманих первинних даних, які відкривають широкі перспективи подальшого розвитку цього напрямку досліджень, наявність наукових публікацій високого рівня, вважаю, що дисертаційна робота Бджоли Анни Володимирівни «КоАлювання кінази

рибосомного білка S6 та його регуляторна роль» відповідає усім вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 12.01.2022 р. № 44 та «Про внесення змін до деяких постанов Кабінету Міністрів України з питань підготовки та атестації здобувачів наукових ступенів», затвердженої Постановою Кабінету Міністрів України від 19.05.2023 р. № 502, а здобувачка Анна БДЖОЛА заслуговує на присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія.

Офіційний опонент:

доктор біологічних наук, професор,

завідувач відділу сигнальних механізмів клітини

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна

НАН України

Людмила ДРОБОТ