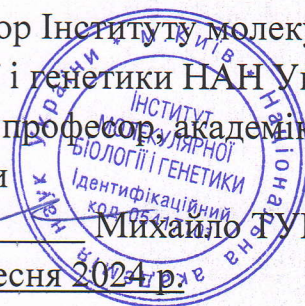


“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Директор Інституту молекулярної
біології і генетики НАН України,
д. б. н., професор, академік НАН
України


“5” вересня 2024 р.



ВИСНОВОК

**про наукову новизну, теоретичне та практичне значення
результатів дисертації**

**на тему «КоАлювання кінази рибосомного білка S6 та його регуляторна
роль»**

**на здобуття ступеня доктора філософії у галузі знань 091 Біологія
за спеціальністю 091 Біологія**

ВИТЯГ

із протоколу засідання об'єднаного семінару відділу сигнальних систем
клітини, відділу генетики людини, відділу біомедичної хімії, відділу
ензимології білкового синтезу, відділу молекулярної генетики, відділу
функціональної геноміки, відділу структурної і функціональної протеоміки
ІМБГ НАН України від “5” вересня 2024 р.

З метою надання висновку про наукову новизну, теоретичне та практичне
значення результатів дисертації 5 вересня 2024 року на об'єднаному семінарі
наукових відділів ІМБГ НАН України – здобувач ступеня доктора філософії
Бджола Анна Володимирівна публічно презентувала наукові результати
дисертації на тему «КоАлювання кінази рибосомного білка S6 та його
регуляторна роль».

Присутні. Головуючий на засіданні – д.б.н., с.н.с, зав. відділу Телегеев
Г.Д, д.б.н., проф., академік НАН України, Філоненко В.В, к.х.н., с.н.с., Бджола
В.Г., д.б.н., професор Негруцький Б.С., к.б.н., с.н.с Кропивко С.В., к.б.н., с.н.с
Савінська Л.О, к.б.н., с.н.с Гаріфулін О.М., к.б.н., с.н.с Крупська І.В., д.б.н.,
проф., заст. директора Лукаш Л.Л., д.б.н., ст.н.с., член-кореспондент НАН
України Сергеева Т. А., д.х.н., проф., зав. відділу Ярмолук С.М., к.б.н., н.с.
Папуга О.С., к.б.н., н.с. Дибков М.В. к.б.н., с.н.с., Антоненко С.В., м.н.с.
Скиданович О.І., пров.інж. Жувака К.С., асп. Яценко М., м.н.с Марцинюк М.,
асп. Атаманчук А.Р., інж. Сухорада О.М., Гармаш Д.В. студ.

На засіданні були присутні 25 осіб, у тому числі 5 докторів біологічних наук, 1 доктор хімічних наук, 7 кандидатів біологічних наук, 1 кандидат хімічних наук.

Порядок денний. Обговорення дисертаційного дослідження аспірантки відділу сигнальних систем клітини Бджоли Анни Володимирівни на тему «КоАлювання кінази рибосомного білка S6 та його регуляторна роль», поданого на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 091 Біологія за спеціальністю 091 Біологія.

Дисертація виконувалася у відділі сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Тема дисертації затверджена на засіданні Вченої ради Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (протокол № 19 від 17 грудня 2019 року).

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

З дисертаційною роботою попередньо ознайомилися доктор біологічних наук, професор, академік НАН України, завідувач відділу сигнальних систем клітини Філоненко Валерій Вікторович, доктор біологічних наук, професор, завідувач відділу структурної і функціональної протеоміки Негруцький Борис Сергійович, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник Кропивко Сергій Вікторович.

Виступили.

Здобувач Бджола Анна Володимирівна представила презентацію за основними положеннями дисертації на тему «КоАлювання кінази рибосомного білка S6 та його регуляторна роль», поданої на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 091 Біологія за спеціальністю 091 Біологія.

З відгуком на роботу рецензенти - доктор біологічних наук, професор, завідувач відділу структурної і функціональної протеоміки Негруцький Борис Сергійович та кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник Кропивко Сергій Вікторович, які дали позитивну оцінку виконаній роботі, підкреслили її наукову новизну та актуальність вивчення посттрансляційних модифікацій, а особливо нової ПТМ КоАлювання, та їх вплив на регуляції ензимів, в тому числі ключової сигнальної молекули кінази рибосомного білка S6.

В обговоренні також взяли участь: д.б.н., с.н.с, зав. відділу Телегєєв Г.Д, д.б.н., проф., академік НАН України, Філоненко В.В., д.б.н., проф., заст. директора Лукаш Л.Л., д.б.н., ст.н.с., член-кореспондент НАН України Сергєєва Т. А., д.х.н., проф., зав. відділу Ярмолук С.М.

На засіданні обговорили проєкт висновку про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів дисертації «КоАлювання кінази рибосомного білка S6 та його регуляторна роль».

Актуальність теми. Кіназа рибосомного білка S6 (p70S6K1) є серин/треоніною 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, факторів росту, рівень енергії та стресові чинники. Одним із основних субстратів p70S6K1 є рибосомний білок S6, фосфорилування якого призводить до стимуляції біосинтезу білків, необхідних для клітинного росту та проліферації. Посилена експресія або активація p70S6K корелює з несприятливим прогнозом у деяких типах раку та прогресії багатьох метаболічних захворювань, що свідчить про те, що вона може служити біомаркером для моніторингу визначених хвороб. Активована p70S6K1 може сприяти різним аспектам прогресії раку, таким як епітеліально-мезенхімальний перехід, стовбуровість ракових клітин та стійкість до лікарських препаратів. Будучи одним із ефекторів PI3K/Akt/mTOR-залежного сигнального шляху, її активація суворо регулюється впорядкованим каскадом послідовного фосфорилування за залишками серину/треоніну. Однак 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. Ці фосфорилування здійснюються за участі mTORC1, PDK1 та інших кіназ.
2. Убіквітінування: p70S6K1 може зазнавати убіквітінування, що призводить до її деградації через протеасомний шлях. Цей механізм є важливим для регулювання рівня p70S6K1 в клітині та запобігання надмірної активації.
3. Ацетилювання та метилювання: Ці модифікації можуть впливати на стабільність p70S6K1 та її взаємодію з іншими білками, хоча їхня роль менш вивчена порівняно з фосфорилуванням.

4. O-ГлцNAцилювання – модифікація S6K1, що інгібує послідовні етапи фосфорилювання кінази, що необхідні для її активації.

Нещодавно було відкрито новий тип посттрансляційної модифікації протеїнів – КоАлювання, що полягає в утворенні дисульфідного зв'язку між тіольною групою пантотеїнового 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, і в регуляції активності цілої низки ензимів. Яскравим прикладом є Аврора А кіназа, що селективно інгібується внаслідок КоАлювання шляхом конкурентності молекули КоА з АТФ за каталітичний центр зв'язування [14]. Інший ензим, GAPDH, також зворотно інгібується за модифікації КоА, що виникає внаслідок оксидативного стресу, таким чином захищаючи ключові цистеїнові залишки каталітичного центру від надмірного окислення, що призвело б до незворотної інактивації. Досліджується також здатність КоАлювання до індукції зміни субклітинної локалізації модифікованих білків.

Розуміння функціональної ролі p70S6K1 та шляхи 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 пов'язаний з активністю цього ензиму. Саме тому, вивчення нового типу посттрансляційної модифікації протеїнів, КоАлювання, та дослідження її регуляторного впливу на S6K1 є 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. З'ясувати можливість КоАлювання S6K1 та визначити сайти утворення дисульфідних зв'язків цистеїнових залишків S6K1 з молекулою КоА, з використанням методів іммунопреципітації, рідинної хроматографії та мас-спектрометрії.
2. Дослідити можливість *in cellular* КоАлювання надекспресованої S6K1 у клітинах за умов оксидативного стресу, використовуючи метод іммунопреципітації та вестерн-блот аналізу.
3. Методом сайт спрямованого мутагенезу створити цистеїнові мутанти S6K1 та дослідити зміну рівня КоАлювання *in cellular* мутантних форм S6K1 за умов оксидативного стресу.

4. Дослідити КоАлювання S6K1 за умов метаболічного та оксидативного стресів *in cellular* з використанням методів імунофлуоресцентного аналізу та PLA.
5. Створити рекомбінантну форму конститутивно активної S6K1, використовуючи Вас-to-Вас бакуловірусну систему експресії з дуальним вектором.
6. Оцінити можливість *in vitro* КоАлювання рекомбінантної конститутивно активної форми S6K1 та визначити вплив КоАлювання на її кіназну активність.
7. Використовуючи біоінформатичні методи молекулярного докінгу та молекулярної динаміки, визначити особливості приєднання молекули КоА до нефосфорильованої та фосфорильованої форм S6K1 в процесі КоАлювання та оцінити стабільність взаємодій між молекулами.
8. Охарактеризувати нові моноклональні антитіла проти Кoenзиму А, що були отримані з відмінним до існуючого підходом до створення антигену, та дослідити спектр їхнього розпізнавання.

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 загальновідомі молекулярні, біохімічні, цитологічні, біоінформатичні, мікробіологічні методи роботи, світлову та конфокальну мікроскопію, 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 vivo*, *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 системи бакуловірусного дуального вектору, що водночас кодує кіназу PDK1 для подальшого фосфорилування та активації S6K1. Проведений біоінформатичний аналіз з використанням молекулярного докінгу та симуляцій молекулярної динаміки дозволив продемонструвати модель зв'язування молекули КоА з S6K1 та оцінити стійкість комплексу КоА з

фосфорильованою та нефосфорильованою 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 розлади, онкологічні та серцево-судинні захворювання. Отримані в цій роботі дані продемонстрували, що КоАлювання є новим способом інгібування активності S6K1, який має здатність пригнічувати активність кінази за допомогою механізму «подвійного якоря», і який реалізується в клітині за умов окислювального стресу. Ці результати дають новий напрямок для розробки ефективних інгібіторів S6K1 і, можливо, інших протеїнкіназ, що містять відповідним чином консервативні залишки Cys. Отже, регуляція активності S6K1 є перспективною стратегією для розробки нових підходів терапії широкого спектру захворювань, особливо пов'язаних з дисбалансом окисно-відновлювального стану, наприклад, нейродегенерації. Дослідження у цьому напрямку може відкрити нові підходи до лікування та профілактики цих патологічних станів.

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

Особистий внесок. Ця робота є результатом самостійного дослідження дисертантки, яка провела аналіз наукової літератури з теми дослідження, здійснила основний обсяг експериментальних досліджень, а також узагальнила, інтерпретувала та статистично опрацювала отримані експериментальні дані.

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 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).

Статті у наукових виданнях, включених до переліку наукових фахових видань України

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

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

Статті у закордонних наукових виданнях

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

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

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)

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.

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.

УХВАЛИЛИ:

1. Дисертаційна робота Бджоли Анни Володимирівни на тему «КоАлювання кінази рибосомного білка S6 та його регуляторна роль», є завершеною науково-дослідною роботою та відповідає всім вимогам, які висуваються до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 091 Біологія за спеціальністю 091 Біологія.

2. Затвердити висновок про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів дисертаційної роботи Бджоли Анни Володимирівни на тему «КоАлювання кінази рибосомного білка S6 та його регуляторна роль».

3. Рекомендувати вченій раді Інституту молекулярної біології і генетики НАН України затвердити склад разової спеціалізованої вченої ради:

Голова ради:

Телегєєв Геннадій Дмитрович доктор біологічних наук, старший науковий співробітник, завідувач відділу молекулярної генетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

Рецензенти:

Негруцький Борис Сергійович доктор біологічних наук, професор, завідувач відділу структурної і функціональної протеоміки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Кропивко Сергій Вікторович кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник

Опоненти:

Дробот Людмила Борисівна доктор біологічних наук, професор, завідувач відділу сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна

Гарманчук Людмила Василівна доктор біологічних наук, професор кафедри екології та зоології ННЦ «Інституту Біології і Медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Голова об'єднаного семінару
доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник,
завідувач відділу молекулярної генетики
Інституту молекулярної біології і генетики
НАН України

Геннадій Телегєєв

