

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

доктора біологічних наук, професора, професора кафедри екології та зоології
ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету
імені Тараса Шевченка

ГАРМАНЧУК ЛЮДМИЛИ ВАСИЛІВНИ

на дисертаційну роботу

БДЖОЛИ АННИ ВОЛОДИМИРІВНИ

**«КОАЛЮВАННЯ КІНАЗИ РИБОСОМНОГОБІЛКА S6 ТА ЙОГО
РЕГУЛЯТОРНА РОЛЬ»,**

представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії
зі спеціальності 091 «Біологія»

Актуальність теми дисертації. Виявлення та характеристика механізму КоАлюванню як нового шляху пост-трансляційної модифікації кінрази рибосомного білка S6 (S6K1), який відбувається в умовах метаболічного та оксидативного стресів є актуальним для розуміння перебудови клітин та виконання функціонально значимих властивостей таких як диференціювання, проліферація, міграція та метаболізм. Порушення в регуляції цього шляху часто асоціюються з розвитком онкологічних, серцевосудинних та метаболічних захворювань, тому вивчення механізмів контролю активності p70S6K1, зокрема нового типу її пост-трансляційної модифікації такої як КоАлювання має значний науковий і прикладний інтерес, що і стало метою та предметом представленого дослідження.

Отже, дисертаційна робота Бджоли Анни Володимирівни «КоАлювання кінрази рибосомного білка S6 та його регуляторна роль» присвячена характеристиці нового типу пост-трансляційної модифікації кінрази рибосомного білка S6, КоАлюванню, та оцінці можливих ефектів цього механізму в основних проявах функціональної активності клітин, в тому числі за патологічних станів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.
Дисертаційна робота Бджоли Анни Володимирівни виконана в рамках тематик

науково-дослідних робіт відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України: «Особливості структурно-функціональної організації mTOR/S6K-залежного сигнального каскаду в нормальних та злоякісних клітинах: множинність сплайсових ізоформ mTOR та S6K кіназ» (2015-2020, № д/р 0110U000692); «Особливості функціональної активності ізоформ кінази рибосомного білка S6 (S6K1) та молекулярних механізмів її регуляції в нормі та патології» (2021-2025, № д/р 0121U109973).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій дисертації, та їх достовірність. Запропоновані в дисертаційній роботі Бджоли А.В. наукові положення, висновки і рекомендації є обґрунтованими та достовірними. Вони базуються на аналізі сучасного первинного матеріалу літературних джерел та баз даних, логічністю постановки завдань, застосуванні великого обсягу сучасних методів дослідження, урахуванні світового теоретичного і практичного досвіду та використанні системного підходу, статистичним аналізом та узагальненням отриманих даних.

Новизна наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації. В дисертаційній роботі Бджоли Анни Володимирівни вперше визначено нові функції коензиму А (КоА), який відіграє ключову роль у багатьох біохімічних клітинних реакціях. Встановлено новий тип посттрансляційної модифікації кінази 1 рибосомального білка S6 — КоАлювання, та було з'ясовано роль цього механізму 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 було експресовано та очищено рекомбінантну конститутивно активну форму p70S6K1 з бакуловірусної системи шляхом використання дуального вектору, що водночас кодує як цільовий білок, так і кіназу PDK1 для подальшого фосфорилювання та активації S6K1. Проведений біоінформативний аналіз з використанням молекулярного докінгу та симуляцій молекулярної динаміки, що дозволив візуалізувати модель зв'язування молекули КоА з S6K1 та оцінити стійкість

комплексів КоА з фосфорильованою та нефосфорильованою за сайтами активації формами S6K1.

Практичне значення дисертаційної роботи. Отримані в дисертаційній роботі Бджоли А.В. дані дозволили продемонструвати, що КоАлювання є новим способом інгібування активності S6K1, що полягає в здатності 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 цистеїну, та можуть стати перспективною стратегією для розробки нових терапевтичних підходів лікування широкого спектру захворювань, зокрема, пов'язаних з дисбалансом метаболічного та окисно-відновлювального стану, при таких захворюваннях як нейродегенерація, цукровий діабет, онкозахворювання, тощо. 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.

Повнота викладу основних результатів у наукових фахових виданнях.

Основні положення дисертації висвітлено у 3 статтях, з них 2 – у періодичних фахових виданнях України, 1 – у зарубіжному виданні Q1, а також 4 тезах доповідей у наукових збірниках міжнародних конференцій.

Відсутність (наявність) порушення академічної доброчесності. У дисертаційній роботі відсутні порушення академічної доброчесності. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Структура і обсяг дисертації, оцінка її змісту, завершеності та відповідності встановленим вимогам. Дисертація Бджоли Анни

Володимирівни оформлена відповідно до вимог наказу МОН України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертації». 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.

В розділі **Огляд літератури** висвітлено сучасний стан проблеми, детально охарактеризовано системи, залучені в формування оксидативного стресу і конформаційну та функціональну зміну захисних антиоксидантних систем за патологічних станів таких як нейродегенеративні захворювання, рак та патології обтяжені метаболічним синдромом. При цьому авторкою було детально проаналізовано досить велику кількість закордонних публікацій, які мають безпосереднє відношення до теми дисертації. Даний розділ розділений на 4 підрозділи добре структурований, містить сучасні дані світової літератури щодо ролі КоА, який може ефективно модифікувати цистеїни білків в умовах *in vitro* в присутності димеру КоА-SS-КоА або окислювальних агентів, таких як H_2O_2 . В огляді літератури охарактеризовано новий тип пост-трансляційної модифікації білків – коАлювання, як потенційний механізм відповіді на оксидативний стрес, спровокований різними патологіями. За модельний об'єкт доведення потенційної значимості даного механізму обрано кіназу рибосомального білка S6, яка 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. При дослідженні кінази S6K1, було ідентифіковано ген ферменту, що залучений в два останні етапи біосинтезу КоА - КоА-синтази, яка виявилася білковим партнером S6K1, хоча доказів функціональної значимості цієї взаємодії поки не встановлено.

Розділ **Матеріали та методи дослідження** побудовано за традиційною схемою, складається із переліку використаного обладнання, реактивів і

матеріалів, спеціалізованих молекулярно-біологічних, біохімічних, імунологічних методик досліджень. Методичні прийоми та підходи детально описані, надано послідовності праймерів для проведення ПЛР, детально описані різнопланові молекулярні методи культивування клітин ссавців та індукції оксидативного та метаболічного стресів, виділення нуклеїнових кислот, експресії та очистки рекомбінантних білків, сайт-спрямованого мутагенезу, методи флуоресцентного аналізу білок-білкових взаємодій в клітині, *in vitro* КоАлювання протеїнів, вестерн блот аналізу, надано методи статистичного аналізу.

В розділі **результати експериментальних досліджень та обговорення** представлено надзвичайно цікаві результати, щодо ідентифікації нового типу посттрансляційної модифікації кінази рибосомного білка S6 (S6K1) – КоАлювання та його впливу на функціональну активність цієї кінази.

Представлено дані щодо характеристики моноклональних антитіла проти Коензиму А (КоА), отриманих за допомогою альтернативного підходу до створення антигену.

За допомогою РХ-МС аналізу серед загального пулу КоАльованих білків з лізатів клітинної лінії HEK293/Pank1 β виявлено кіназу рибосомного білка S6 (S6K1) та встановлено її сайт КоАлювання як цистеїн у положенні 217, що розташований в активаційній Т-петлі кіназного домену. Проведено дослідження для підтвердження КоАлювання ендогенної p70S6K1 під впливом різних стресових чинників. Методами імуофлуоресцентного аналізу та PLA, продемонстровано, що КоАлювання ендогенного білка p70S6K1 відбувається у відповідь на метаболічний стрес різного походження, а також на оксидативний стрес, індукований різноманітними окиснювальними агентами.

Методом сайт-спрямованого мутагенезу підтверджено КоАлювання C217 та встановлено, що C231 має вплив на рівень КоАлювання адже його мутація сприяє підвищенню рівня КоАлювання p70S6K1 на 40%.

Для з'ясування впливу КоАлювання на функціональну активність p70S6K1, із використанням Вас-to-Вас бакуловірусної системи експресії було отримано та охарактеризовано рекомбінантну форму конститутивно активної

p70S6K1. Отримана форма p70S6K1 (His-actS6K1) була використана для дослідження особливостей КоАлювання в умовах *in vitro*. Встановлено, 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.

Досліджено можливість впливу процесу КоАлювання на активність кінази S6K1 (His-actS6K1) в умовах *in vitro* і встановлено, що КоАльована форма His-actS6K1 є на 40% менш активною порівняно з немодифікованим ензимом.

Великий підрозділ присвячено біоінформатичному аналізу взаємодії КоА з S6K1. Результати молекулярного докінгу підтвердили можливість формування дисульфідного ковалентного зв'язку між тільними групами пантетеїнового хвосту КоА та Cys217 в активаційній петлі p70S6K1. Окрім цього, виявлено утворення водневого зв'язку між NH₂-групою аденозинового кільця КоА та залишком глютамінової кислоти основного ланцюга S6K1. Встановлено, що 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.

Крім того, методом симуляції молекулярної-динаміки 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.

Наведені **Висновки**, повністю відображають мету та завдання даного дослідження, логічно випливають із проведеного дослідження, сформульовані чітко і ясно, вони цілком відповідають поставленим завданням та повністю ґрунтуються на отриманих результатах.

Наукові положення, наведені в дисертації Бджоли Анни Володимирівни, є достовірними, що підтверджується використанням великого обсягу експериментальних досліджень, логічністю постановки завдань, статистичним аналізом та узагальненням отриманих даних. Дисертація виконана з дотриманням усіх вимог біоетики.

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

1. В огляді літератури (п.1.3.5.) зазначено, що «Для деяких інших протеїніназ, що КоАлюються в умовах оксидативного стресу за залишками цистеїну, які не розташовані в ділянці активаційної кишені, спостерігався алостеричний спосіб активації». Було б цікаво дізнатися про це детальніше, адже в тексті відсутнє посилання на джерела літератури.

2. В анотації дисертаційної роботи зазначено: «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», однак чи є цьому експериментальне підтвердження?

3. Чи можливо експериментально порівняти ефективність КоАлювання активованої і неактивованої форм S6K1?

4. Для експериментального підтвердження важливості фосфорилування S6K1 за ключовими для її активності Thr229 та Thr389 для КоАлювання за Cys217 бажано було б дослідити вплив подвійної мутації за цими сайтами на ефективність КоАлювання.

5. Цікавим Було б також дослідити яким чином впливає подвійна мутація Cys217Ala-Cys231Ala S6K1 на активність кінази.

6. Оскільки відомо, що одним із захисних механізмів клітини на оксидативний стрес є утворення стресових гранул, то чи досліджували наявність S6K1 в цих гранулах і якщо так, то який статус кінази в них (фосфорильована форма, дефосфорильована, КоАльована чи можливо, якийсь інший шлях посттрансляційної модифікації)?

7. І як підсумок, яке значення, на Вашу думку має КоАлювання – як недавно відкритий тип пост-трансляційної модифікації білків в нормі та за патологічних станів?

Однак незважаючи на запитання та зауваження, переважно дискусійного характеру, які виникли в процесі рецензування дисертаційної роботи Бджоли А.В, не знижують її наукової цінності та перспективи використання результатів дослідження в практичному застосуванні, а робота заслуговує на високу позитивну оцінку.

Висновок. Дисертаційна робота БДЖОЛИ Анни Володимирівни «КоАлювання кінази рибосомного білка S6 та його регуляторна роль» є завершеною науковою працею, яка за актуальністю теми, новизною досліджень, теоретичним і практичним значенням отриманих результатів, а також сучасним методичним рівнем проведених досліджень, свідчить про високі наукові досягнення здобувачки. Базуючись на вищевказаному, вважаю, що дисертаційна робота Бджоли А.В., подана на здобуття ступеня доктора філософії, повністю відповідає 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 № 44 від 12 січня 2022 року.

Тому вважаю, що здобувачка, БДЖОЛА Анна Володимирівна, заслуговує на присудження їй ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія.

Офіційний опонент:

Доктор біологічних наук, професор,
професор кафедри зоології та екології
ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка

Людмила ГАРМАНЧУК