

РІШЕННЯ

разової спеціалізованої вченої ради про присудження ступеня доктора філософії

Разова спеціалізована вчена рада Інституту молекулярної біології і генетики Національної академії наук України, м. Київ (наказ № 19 від 11.09.2024 р.), прийняла рішення про присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія на підставі прилюдного захисту дисертації «КоАлювання кінази рибосомного білка S6 та його регуляторна роль» за спеціальністю 091 Біологія.

«23» жовтня 2024 року.

Бджола Анна Володимирівна, 1996 року народження.

Освіта вища. У 2017 році закінчила ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, отримавши ступінь бакалавра за спеціальністю «молекулярна біологія». В 2019 році отримала звання магістра зі спеціальністю генетика.

В 2019 році вступила в аспірантуру Інститут молекулярної біології і генетики за освітньо-науковою програмою підготовки докторів філософії за спеціальністю 091 Біологія. З січня 2023 і до тепер – молодший науковий співробітник відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Дисертацію виконано на базі відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України у період з 2019 по 2024 рр.

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

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.; усі з опублікованих статей входять до видань з міжнародної наукометричної бази Scopus і одна представлена у електронній базі даних медичних і біологічних публікацій PubMed.

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.

У дискусії взяли участь голова і члени разової спеціалізованої ради:

Телегєєв Геннадій Дмитрович, доктор біологічних наук, професор, завідувач відділу молекулярної генетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Оцінка позитивна без зауважень.

Негруцький Борис Сергійович, доктор біологічних наук, професор, завідувач відділу структурної і функціональної протеоміки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Оцінка позитивна із зауваженнями та запитаннями.

1. Не зовсім зрозуміло, яким чином виявлення того факту, що ступінь КоАлювання кінази є дозо і часо-залежним, підтверджує дані літератури про те, що процес КоАлювання є найбільш ефективним в гепатоцитах і кардіоміоцитах, які містять найвищий рівень КоА, як вказує авторка (стор.4). На мою думку, може йтися хіба що про якусь кореляцію.

2. Логічно передбачити, що протекторна роль КоАлювання може полягати у збереженні активності ферментів. Але ж в даному випадку активність ферменту після КоАлювання суттєво знижується. Який сенс у інгібуванні активності кінази S6K1 під час стресів?

3. Є деякі невдалі вирази, наприклад глицеральдегідфосфатдегідрогеназа, яка названа авторкою сигнальним білком (стор.47), є, головним чином, все ж таки ферментом гліколітичного циклу. Невдалими із літературної точки зору є вислови «за теоретичною гіпотезою» (стор.94) чи «у клітинах кардіоміоцитів і гепатоцитів» (стор.4).

4. Побажання на майбутнє. Бажано дослідити, яким саме чином відбувається видалення КоА з кінази p70S6K1 в клітинах людини. Також бажано прояснити, чи піддаються КоАлюванню інші залишки цистеїну p70S6K1

Кропивко Сергій Вікторович - кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, в.о. завідувача відділу функціональної геноміки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Надав позитивну рецензію із запитаннями:

1. Чи є відомості про існування певної консенсусної послідовності в амінокислотному оточенні Cys 217 залишків, яка впізнається КоА-лігазами чи іншими протеїнами та КоАлюється?

2. Для підтвердження гіпотези про негативний вплив утворення дисульфідного зв'язку між Cys 217 та Cys 231 на рівень КоАлювання кінрази варто було б проаналізувати ефективність КоАлювання подвійних мутантів Cys217Ala-Cys231Ala. Крім того, цікаво як це впливає на активність самої кінрази.

3. Чи існують експериментальні дані про утворення внутрішньомолекулярного дисульфідного зв'язку між Cys 217 та Cys 231 у S6K1 і про його вплив на активність кінрази?

4. За умови гострого оксидативного стресу індукованого арсенітом гранулоподібні структури, що візуалізуються анти-S6K1 антитілами в цитоплазмі дисертант пов'язує з утворенням стресових гранул (рис. 3.8). То чи можна зробити висновок, що за таких умов стресу S6K1 може бути переважно локалізована в стресових гранулах, де крім всього вона і КоАльована?

5. На рис.3.7 за умови метаболічного стресу спостерігається візуалізація анти-КоА антитілами дуже схожих, як і в разі індукованого арсенітом оксидативного стресу, гранулоподібних структур при цьому явної колокалізації з ними S6K1 не спостерігається. Варто було б більш детально обговорити це спостереження і чи не можуть ці структури також відповідати стресовим гранулам замість, або разом з мітохондріями? На мій погляд з'ясування цього питання було б дуже важливим для загального розуміння функціональної активності S6K1 в клітині та механізмах її регуляції.

Дробот Людмила Борисівна - доктор біологічних наук, професор, завідувач відділу сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії імені О.В.Палладіна надала позитивний відгук із зауваженнями та запитаннями:

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-MS.

3. На стор. 89 вказано, що на рис. 3.4.в 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 GSTrpS6(Ct). Поясніть їх природу.

8. Дисертантка зробила правильний висновок, що КоАлювання очищеної рекомбінантної форми His-actS6K за присутності KoASSKoA *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.

Гарманчук Людмила Василівна, доктор біологічних наук, професор кафедри екології та зоології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка надала позитивний відгук із запитаннями:

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?

Результат відкритого голосування:

«За» - 5

«Проти» - 0

«Утримались» - 0

**СПЕЦІАЛІЗОВАНА ВЧЕНА РАДА ІНСТИТУТУ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І
ГЕНЕТИКИ НАН УКРАЇНИ
УХВАЛИЛА:**

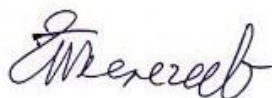
1. Дисертаційна робота Бджоли Анни Володимирівни «КОАЛЮВАННЯ КІНАЗИ РИБОСОМНОГО БІЛКА S6 ТА ЙОГО РЕГУЛЯТОРНА РОЛЬ» на здобуття наукового ступеня доктора філософії, галузь знань 09- Біологія, спеціальність- 091 Біологія є завершеним самостійним науковим дослідженням і відповідає вимогам «Порядку підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у закладах вищої освіти (наукових установах)» затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 23 березня 2016 року №261; 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 січня 2022 р. № 44.
2. Присудити Бджолі Анні Володимирівні науковий ступень доктора філософії галузь знань - 09 Біологія, спеціальність - 091 Біологія.

3. Рішення разової спеціалізованої ради затвердити.

4. Підготувати наказ про видачу Бджолі Анні Володимирівні диплома доктора філософії та додатка до нього європейського зразка.

На підставі результатів відкритого голосування та прийнятого рішення спеціалізована вчена рада Інституту молекулярної біології і генетики НАН України присуджує Бджолі Анні Володимирівні науковий ступень доктора філософії з галузі знань - 09 Біологія, спеціальність - 091 Біологія.

Голова разової спеціалізованої ради
доктор біологічних наук, професор,
завідувач відділу молекулярної генетики
Інституту молекулярної біології
і генетики НАН України



Телегєєв Г.В.

