Облікова картка дисертації

I. Загальні відомості

Державний обліковий номер: 0825U000262

Особливі позначки: відкрита

Дата реєстрації: 15-01-2025

Статус: Захищена

Реквізити наказу МОН / наказу закладу:

II. Відомості про здобувача

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Бджола Анна Володимирівна
2. Anna V. Bdzhola

Кваліфікація: 091

Ідентифікатор ORCID ID: 0000-0001-6571-2058

Вид дисертації: доктор філософії

Аспірантура/Докторантура: так

Шифр наукової спеціальності: 091

Назва наукової спеціальності: Біологія

Галузь / галузі знань: біологія

Освітньо-наукова програма зі спеціальності: 091 Біологія

Дата захисту: 23-10-2024

Спеціальність за освітою: Біологія

Місце роботи здобувача: Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 05417101

Місцезнаходження: вул. Академіка Заболотного, буд. 150, Київ, 03143, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR:

III. Відомості про організацію, де відбувся захист

Шифр спеціалізованої вченої ради (разової спеціалізованої вченої ради): 6926

Повне найменування юридичної особи: Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 05417101

Місцезнаходження: вул. Академіка Заболотного, буд. 150, Київ, 03143, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR:

IV. Відомості про підприємство, установу, організацію, в якій було виконано дисертацію

Повне найменування юридичної особи: Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 05417101

Місцезнаходження: вул. Академіка Заболотного, буд. 150, Київ, 03143, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR:

V. Відомості про дисертацію

Мова дисертації: Українська

Коди тематичних рубрик: 34, 34.15

Тема дисертації:

1. КоАлювання кінази рибосомного білка S6 та його регуляторна роль
2. CoAlation of Ribosomal Protein S6 Kinase 1 and its regulation by this modification

Реферат:

1. Дисертація присвячена дослідженню нового типу посттрансляційної модифікації кінази рибосомного білка S6 (S6K1) – КоАлюванню та його впливу на функціональну активність цієї кінази. 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 чисельних метаболічних захворювань, тому вивчення механізмів контролю активності p70S6K1 має значний науковий і прикладний інтерес. p70S6K1 зазнає ряду посттрансляційних модифікацій, зокрема КоАлювання, яке може впливати на її функціональність і стабільність. У ході дослідження було охарактеризовано моноклональні антитіла проти КоА. Антитіла продемонстрували високу специфічність до КоАльованих білків і можуть надалі слугувати потужним інструментом для детекції цих модифікацій в низці імунологічних методів. За допомогою РХ-МС аналізу серед загального пулу КоАльованих білків було виявлено пептидну послідовність

LTDFGLC*K, що належить родині S6K, а єдиним модифікованим амінокислотним залишком є цистеїн у положенні 217, що розташований в активаційній петлі кінази. Дослідження in cellular КоАлювання імунопреципітованої надекспресованої p70S6K1 підтвердило, що оксидативний стрес значно підвищує рівень КоАлювання кінази порівняно з клітинами, які культивували в нормальних умовах. Використовуючи методи імунофлюоресцентного аналізу та PLA, було продемонстровано, що КоАлювання ендогенного білка p70S6K1 відбувається у відповідь на метаболічний та оксидативний стрес різного походження. Це дає підстави вважати, що КоАлювання виконує протекторну роль, захищаючи S6K1 від надмірного окислення і подальшої інактивації чи деградації за умов підвищення рівня АФК у середовищі. Існування додаткового Cys231 в каталітичному центрі S6K1 передбачає можливість утворення зв'язку між ним та Cys217, що може перешкоджати приєднанню молекули КоА до Cys217. 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. За результатами експериментів з експресії мутантних форм S6K1 в клітинах HEK293/Pank1п, що містили відповідно C217A та C231A заміни, було продемонстровано, що відсутність сайту КоАлювання Cys217 знижує рівень КоАлювання кінази на 30% порівняно з немутованою p70S6K1. Водночас, мутація Cys231 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 Cys217 S6K1 і вказують на можливу регуляторну роль Cys231 в цьому процесі. Із використанням Bac-to-Bac системи експресії було отримано та охарактеризовано рекомбінантну форму конститутивно активної p70S6K1. Був використаний «дуальний» вектор, що дозволяє інфікованій клітині експресувати p70S6K1 в активній формі за рахунок ко-експресії з її активатором PDK1. Було виявлено, що ступінь КоАлювання рекомбінантного білка є дозо- та часозалежним. Оскільки відомо, що посттрансляційні модифікації S6K1 є ключовими в регуляції активності кінази, було досліджено можливість впливу процесу КоАлювання на активність рекомбінантної кінази S6K1 в умовах in vitro та продемонстровано, що КоАлювання знижує активність ензиму на 40%. Результати молекулярного докінгу підтверджують можливість формування дисульфідного ковалентного зв'язку між –SH групами КоА та Cys217 в активаційній петлі p70S6K1. Стабілізація АДФ залишку КоА відбувається унаслідок водневого, численних гідрофобних та йонних взаємодій всередині АТФ-зв'язуючої кишені. Внаслідок утворення такого комплексу відбувається конкуренція між молекулою КоА та АТФ за активний центр ферменту, що призводить до інгібування кінази. Методом симуляції молекулярної динаміки було встановлено, що комплекс КоА з активованою формою кінази більш стабільний у порівнянні з комплексом з нефосфорильованою формою ферменту. Отримані дані свідчать про те, що фосфорилювання 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 є важливим механізмом захисту білка від надмірного окислення. Окрім того, КоАлювання S6K1 за Cys217 має потенціал до інгібування активності S6K1. Такий механізм регуляції пов'язаний з типом взаємодії молекули КоА з S6K1 під час процесу КоАлювання, адже, окрім утворення дисульфідного зв'язку між -SH групами 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.

2. The dissertation is devoted to the study of a novel post-translational modification of ribosomal protein kinase S6 (S6K1) — CoAlation and its impact on the functional activity of this kinase. S6K1 is one of the key components of the mTOR/Akt1/S6K-dependent signaling pathway, which regulates cell growth, proliferation, metabolism, and differentiation. Dysregulation of this pathway is associated with the development of various metabolic diseases, making the study of mechanisms controlling p70S6K1 activity of significant scientific and practical interest. p70S6K1 undergoes several post-translational modifications, including CoAlation, which can affect its functionality and stability. In the course of the study, monoclonal antibodies against CoA were characterized. These antibodies demonstrated high specificity toward CoAlated proteins and can serve as powerful tools for detecting these

modifications using various immunological methods. Using LC-MS analysis, a peptide sequence LTDFGLC*K was identified among the general pool of CoAlated proteins, which belongs to the S6K family, with cysteine at position 217 as the only modified amino acid residue, located in the kinase's activation loop. In cellular studies, the CoAlation of immunoprecipitated overexpressed p70S6K1 confirmed that oxidative stress significantly increases the level of kinase CoAlation compared to cells cultured under normal conditions. Using immunofluorescence and PLA methods, it was shown that the CoAlation of endogenous p70S6K1 occurs in response to various metabolic and oxidative stresses. This suggests that CoAlation plays a protective role, shielding S6K1 from excessive oxidation and subsequent inactivation or degradation in environments with elevated ROS levels. The existence of an additional Cys231 in the catalytic center of S6K1 suggests the potential for forming a bond between Cys231 and Cys217, which could hinder CoA attachment to Cys217. To investigate this, site-directed mutagenesis was used to study changes in S6K1 CoAlation levels depending on the mutation of one of the cysteines in the activation loop. Based on the experimental results of expressing mutant forms of S6K1 containing C217A and C231A substitutions, it was demonstrated that the absence of the Cys217 CoAlation site reduces the kinase's CoAlation level by 30% compared to the wild-type p70S6K1. In contrast, the Cys231 mutation increases the CoAlation level of p70S6K1 by 40%, likely due to the availability of the Cys217 -SH group for CoA attachment, if there is an intramolecular bond between Cys217 and Cys231. These findings confirm the CoAlation of Cys217 in S6K1 and indicate a possible regulatory role for Cys231 in this process. Using the Bac-to-Bac expression system, a recombinant constitutively active form of p70S6K1 was generated and characterized. A "dual" vector was employed, allowing infected cells to express p70S6K1 in its active form through co-expression with its activator PDK1. It was discovered that the degree of CoAlation of the recombinant protein is dose- and time-dependent. Since it is known that post-translational modifications of S6K1 are crucial in regulating kinase activity, the potential influence of the CoAlation process on the activity of recombinant S6K1 kinase was investigated in vitro, and it was demonstrated that CoAlation reduces the enzyme's activity by 40%. Molecular docking results confirm the possibility of forming a disulfide bond between the –SH groups of CoA and Cys217 of p70S6K1. The ADP moiety of CoA is stabilized through hydrogen, multiple hydrophobic, and ionic interactions within the ATP-binding pocket. As a result of this formation, competition occurs between CoA and ATP for the enzyme's active site, leading to kinase inhibition. Molecular dynamics simulations established that the CoA complex with the activated form of the kinase is more stable compared to the complex with the non-phosphorylated enzyme. These data indicate that phosphorylation is critically important for stabilizing the interaction between p70S6K1 and CoA, highlighting the importance of CoAlation in regulating the activated form of the kinase. The results obtained from this study indicate that CoAlation of S6K1 is an important mechanism for protecting the protein from excessive oxidation. Additionally, CoAlation of S6K1 at Cys217 has the potential to inhibit S6K1 activity. This regulatory mechanism is associated with the type of interaction between the CoA molecule and S6K1 during the CoAlation process, in addition to forming a disulfide bond between the –SH groups of the CoA tail and the kinase cysteine, CoA also stabilizes its ADP moiety in the catalytic center, preventing ATP binding and further functional activity of the enzyme. These results lay the foundation for further exploration of the role of CoAlation in the regulation of other proteins and open new opportunities for developing effective therapeutic strategies for correcting related pathologies.

Державний реєстраційний номер ДіР:

Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки: Фундаментальні наукові дослідження з найбільш важливих проблем розвитку науково-технічного, соціально-економічного, суспільно-політичного, людського потенціалу для забезпечення конкурентоспроможності України у світі та сталого розвитку суспільства і держави

Стратегічний пріоритетний напрям інноваційної діяльності: Впровадження нових технологій та обладнання для якісного медичного обслуговування, лікування, фармацевтики

Підсумки дослідження: Новий напрямок у науці і техніці

Публікації:

- 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
- 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
- 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

Наукова (науково-технічна) продукція: матеріали; методи, теорії, гіпотези; методичні документи

Соціально-економічна спрямованість: поліпшення якості життя та здоров'я населення, ефективності діагностики та лікування хворих

Охоронні документи на ОПІВ:

Впровадження результатів дисертації: Планується до впровадження

Зв'язок з науковими темами: 0110U000692 0121U109973

VI. Відомості про наукового керівника/керівників (консультанта)

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Маланчук Оксана Миколаївна

2. Oksana M. Malanchuk

Кваліфікація: к. б. н., старший науковий співробітник, 03.00.03

Ідентифікатор ORCID ID: 0000-0002-2568-9014

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи: Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 05417101

Місцезнаходження: вул. Академіка Заболотного, буд. 150, Київ, 03143, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR:

VII. Відомості про офіційних опонентів та рецензентів

Офіційні опоненти

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Дробот Людмила Борисівна

2. Liudmyla B. Drobot

Кваліфікація: д. б. н., професор, 03.00.11

Ідентифікатор ORCID ID: 0000-0002-3711-2909

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи: Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 05417288

Місцезнаходження: вул. Леонтовича, буд. 9, Київ, 01054, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR:

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Гарманчук Людмила Василівна
2. Liudmyla V. Garmanchuk

Кваліфікація: д. б. н., професор, 03.00.11

Ідентифікатор ORCID ID: 0000-0002-1527-2346

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи: Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Код за ЄДРПОУ: 02070944

Місцезнаходження: вул. Володимирська, буд. 60, Київ, 01033, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Міністерство освіти і науки України

Ідентифікатор ROR:

Рецензенти

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Негруцький Борис Сергійович
2. Boris S. Negrutskii

Кваліфікація: д. б. н., професор, 03.00.03

Ідентифікатор ORCID ID: 0000-0001-5974-1629

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи: Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 05417101

Місцезнаходження: вул. Академіка Заболотного, буд. 150, Київ, 03143, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR:

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Кропивко Сергій Вікторович
2. Serhii V. Kropyvko

Кваліфікація: к. б. н., старший науковий співробітник, 03.00.03

Ідентифікатор ORCID ID: 0000-0002-2685-080X

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи: Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 05417101

Місцезнаходження: вул. Академіка Заболотного, буд. 150, Київ, 03143, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR:

VIII. Заключні відомості

Власне Прізвище Ім'я По-батькові голови ради	Телєгєєв Геннадій Дмитрович
Власне Прізвище Ім'я По-батькові головуючого на засіданні	Телєгєєв Геннадій Дмитрович
Відповідальний за підготовку облікових документів	Крупська І.В.
Реєстратор	УкрІНТЕІ
Керівник відділу УкрІНТЕІ, що є відповідальним за реєстрацію наукової діяльності	Юрченко Тетяна Анатоліївна