



**ФІЛОНЕНКО**  
**Валерій Вікторович** –  
академік НАН України,  
завідувач відділу сигнальних  
систем клітини Інституту  
молекулярної біології і генетики  
НАН України

## НОВИЙ МЕХАНІЗМ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ КЛІТИНИ ЗА УЧАСТІ КОЕНЗИМУ А

### Стенограма доповіді на засіданні Президії НАН України 10 липня 2024 року

*У доповіді наведено результати досліджень вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України щодо з'ясування нових, досі невідомих функцій коензиму А (КоА) – одного з ключових кофакторів численних метаболічних процесів у клітині. Встановлено новий тип модифікації протеїнів за участю коензиму А, названий КоАлюванням. Доведено, що КоАлювання виконує в клітині регуляторну функцію, впливаючи на активність та стабільність білків. Крім того, в умовах оксидативного чи метаболічного стресу КоАлювання захищає протеїни від переокиснення і, як наслідок, перешкоджає їх інактивації й деградації, а отже, виконує антиоксидантну функцію. КоАлювання білків відіграє також важливу роль у патогенезі захворювань, пов'язаних з оксидативним стресом, зокрема й у розвитку нейродегенеративних захворювань людини.*

Шановний Анатолію Глібовичу!

Шановні присутні!

Модифікації протеїнів, що утворюються в усіх без винятку новосинтезованих білків, відіграють вирішальну роль у регуляції їхньої функціональної активності в клітині, зокрема визначають ензиматичну активність білків, локалізацію їх у клітині, взаємодію з іншими протеїнами, стабільність та низку функцій за різних фізіологічних станів. Зміни в рівнях і типах модифікацій певних протеїнів у клітині можуть бути показниками патологічного стану та маркерами тяжких захворювань, у тому числі й онкологічних.

У відділі сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України було започатковано й успішно продовжуються дослідження, спрямовані на з'ясування нових, досі невідомих функцій коензиму А (КоА). Варто нагадати, що коензим А – це універсальний метаболічний фактор, який є абсолютно необхідним для підтримання життєдіяльності будь-якої клітини, оскільки він бере участь у

численних і найрізноманітніших метаболічних процесах, що відбуваються в ній.

Про важливість коензиму А для метаболізму клітини свідчить той факт, що за його відкриття, яке сталося в середині минулого століття, видатному біохіміку Фріцу Ліпману було присуджено Нобелівську премію з фізіології або медицини за 1953 р. Цю найвищу наукову відзнаку він розділив зі своїм колегою Гансом Кребсом, якого було нагороджено за відкриття циклу трикарбонних кислот, що відбувається за участю коензиму А.

Оскільки коензим А синтезується з пантотенової кислоти (вітаміну  $B_5$ ), АТФ та цистеїну, наявність у його структурі гнучкого пантотенового «хвоста» й активної тіолової групи зумовлює утворення ним великої кількості метаболічно активних тіоефірів, унаслідок чого КоА є універсальним переносником ацил- і ацетилгруп. Саме завдяки таким властивостям коензим А бере участь у великій кількості біосинтетичних, анаболічних, катаболічних процесів у клітині (загалом у близько 4 % усіх біохімічних реакцій, що відбуваються в клітині), серед яких можна назвати синтез АТФ, що забезпечує енергетичний метаболізм, синтез амінокислот, ліпідів, нуклеотидів, холестеролу, стероїдних гормонів, нейротрансмітерів тощо. Крім того, коензим А та його похідні залучені до процесу ацетилювання гістонів, а отже, є важливою складовою системи регуляції експресії генів.

Зважаючи на такий широкий спектр функцій коензиму А у життєдіяльності клітини, стає очевидним, що порушення в його біосинтезі спричиняють цілу низку патологій людини, таких як метаболічні розлади, серцево-судинні, нейродегенеративні захворювання тощо.

В Інституті молекулярної біології і генетики НАН України дослідження за цим напрямом розпочалися близько 20 років тому. На той час молекулярні механізми біосинтезу коензиму А та ензими, залучені до цього процесу, були ще остаточно не визначеними, хоча після відкриття КоА минуло вже більш як пів століття. Ми тоді вивчали сигнальні системи клітини і серед білкових партнерів кінази рибосомного

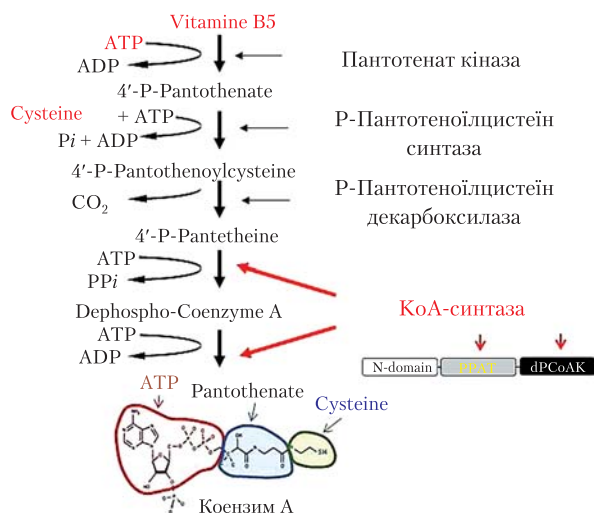
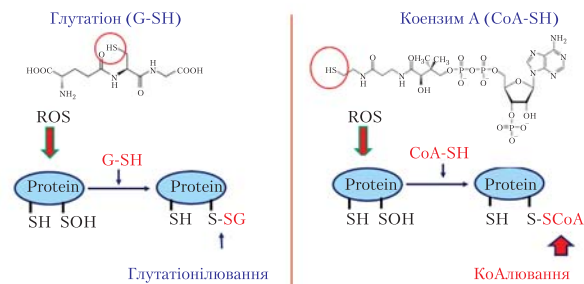


Рис. 1. Схема біосинтезу коензиму А

білка S6 у сигнальних каскадах ідентифікували протеїн, який потім назвали КоА-сінтазою. З'ясувалося, що він відповідає за два останні етапи біосинтезу коензиму А (рис. 1), а отже, є біфункціональним. Власне, це і спонукало нас до більш детального дослідження молекулярних механізмів регуляції біосинтезу КоА в клітині. Слід зазначити, що роботи за цим напрямом проводилися в тісній співпраці з лабораторією клітинної регуляції Університетського коледжу Лондона, яку очолює професор Іван Гут (Ivan Gout).

Зрештою було отримано досить несподівані результати — виявилось, що весь комплекс біосинтезу коензиму А активується в умовах оксидативного та метаболічного стресів, а отже, перед нами постало питання: а чи може КоА, крім того, що він виконує функції активного метаболічного кофактора, бути ще й антиоксидантом, тобто чи може він мати здатність захищати клітини від оксидативного стресу?

Ми зробили припущення, що завдяки активній тіоловій групі коензим А може мати антиоксидантні властивості, подібно до всім відомого глутатіону, який на сьогодні вважають одним з найважливіших антиоксидантів і активно використовують у клінічній практиці (рис. 2). Подальші дослідження підтвердили цю гіпотезу, про що йтиметься далі.



**Рис. 2.** Порівняння активних груп глутатіону і коензиму А

Для цього нам довелося розробити три ключові методології в дослідженні антиоксидантної активності коензиму А. По-перше, ми створили високоспецифічні моноклональні антитіла проти КоА, які здатні розпізнавати як сам коензим А, так і різні модифіковані ним біомолекули; по-друге, розробили модифікований протокол мас-спектрального аналізу для ідентифікації КоАльованих протеїнів і, по-третє, розробили протокол *in vitro* модифікації білків коензимом А.

Було показано, що в разі індукції в клітині оксидативного стресу імунореактивний сигнал антитіл стає значно потужнішим, а отже, наше припущення, що КоА може відігравати роль модифікатора, за аналогією з глутатіоном, виявилось правильним. Надалі ми дослідили цілу низку клітинних ліній різного походження, серед яких були клітини бактерій, дріжджів, кардіоміоцити та клітини печінки щурів, і на всіх цих моделях спостерігали індукцію КоАлювання під дією чинників оксидативного стресу. Крім того, на тваринних моделях було показано, що до інтенсифікації КоАлювання в клітині приводить не лише оксидативний стрес, а й метаболічний, зокрема змінення дієти — голодування.

Було також з'ясовано (і це дуже важливо), що процес КоАлювання є зворотним і спадає відразу після припинення дії стресового чинника. Все це свідчить про регуляторну функцію КоАлювання, подібно до інших поширених посттрансляційних модифікацій протеїнів, таких як фосфорилювання, ацетилювання,

метилування, убіквітинування, які добре вивчені і відіграють надзвичайно важливу роль у регуляції ензиматичної активності клітин. До того ж було показано, що антиоксиданти гальмують індукований оксидантами процес КоАлювання.

Під час досліджень ми виявили широкий спектр білків, що КоАлюються у відповідь на оксидативний стрес. Це спонукало нас провести більш детальний аналіз та ідентифікувати такі протеїни. Для цього нам довелося вдосконалити стандартну методику мас-спектрального аналізу, оскільки, як виявилось, при її застосуванні відбувається фрагментація самого КоА у складі імунопреципованих і вже КоАльованих білків та їхніх пептидів, що не дозволяє ідентифікувати ці КоАльовані білки. Тому ми проводили попереднє ферментативне оброблення досліджуваних препаратів, щоб позбутися АТФ-фрагменту коензиму А, що значною мірою полегшило ідентифікацію КоАльованих протеїнів. У результаті в клітинах бактерій та еукаріотів було виявлено близько 2200 протеїнів, які КоАлюються за стресових умов. До речі, саме необхідністю доопрацювання стандартного методу можна пояснити такий, здавалося б, дивний факт, що, незважаючи на розвиненість і широкі можливості сучасного мас-спектрального аналізу, нікому з численних дослідників посттрансляційних модифікацій білків раніше не вдалося ідентифікувати саме цей тип модифікації.

Однак постає питання: як КоАлювання протеїнів впливає на їхні функції? Серед виявлених нами білків, що КоАлюються під дією стресових чинників, левову частку становили метаболічні ферменти. Ми перевірили кілька з них і виявили, що КоАлювання інгібує активність метаболічних ферментів і запобігає необоротному їх переокисненню, а отже, процес КоАлювання є зворотним і зберігає активність та стабільність ензимів, задіяних у клітинному метаболізмі.

На рис. 3 наведено схему захисного механізму антиоксидантної дії коензиму А.

За наявності в навколишньому середовищі реактивних форм кисню КоАлювання цисте-

їнових залишків білків не дає їм можливості окиснюватися і тим самим захищає протеїни від незворотної деградації.

Аналіз іншої групи ензимів – протеїнкіназ дозволив встановити регуляторну функцію процесу КоАлювання. На прикладі кінази Аугога А ми показали, що КоАлювання відбувається в так званій Т-активаційній петлі внаслідок утворення ковалентного зв'язку між КоА і Cys 290. За даними кристалографічного аналізу ми встановили, що в комплексі Аугога А/КоА блокується активний центр, розташований в АТФ-зв'язувальному сайті.

На основі отриманих даних ми запропонували модель регуляції, тобто активації та інактивації кінази А, і назвали її «модель подвійного якоря», оскільки спочатку відбувається взаємодія АДФ-залишку КоА зі зв'язувальним доменом, а потім зв'язування КоА з цистеїновим залишком, який стабілізує цей зв'язок. Відповідно, активація Аугога А кінази може відбутися лише в разі деКоАлювання. Крім того, ми встановили, що КоАлюється саме активована (фосфорильована) форма кінази, а отже, вперше виявили новий механізм регуляції протеїнкінази шляхом КоАлювання.

Також ми дослідили вплив КоАлювання на активність транскрипційних факторів. Зокрема, на прикладі транскрипційного фактору АгрА було показано, що КоАлювання відбувається в двох доменах, а саме: в регуляторному домені і ДНК-зв'язувальному домені, і в такий спосіб повністю блокується зв'язування АгрА з ДНК. Тому КоАлювання в клітині транскрипційного фактору блокуватиме його активність, а отже, й експресію відповідних генів.

Таким чином уперше було досліджено особливості взаємодії з коензимом А різних груп протеїнів (метаболічних ензимів, протеїнкіназ, транскрипційних факторів, ензимів відповіді на окисидативний стрес, структурних білків тощо) під дією стресових чинників і з'ясовано, що КоАлювання виконує в клітині функції регулювання активності білків, їх взаємодії, субклітинної локалізації і системи сигналювання. Це дало змогу підтвердити припущення, що такий тип модифікації є новим, раніше невідомим механізмом регуляції активності ензимів в умовах окисидативного стресу і захистом їх від переокиснення, а отже, і від інактивації, агрегації та деградації під дією окисних агентів. Цей механізм захищає клітину від наслідків окисидативного стресу.

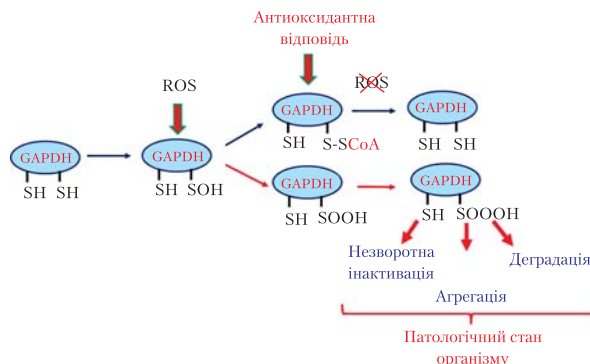


Рис. 3. Механізм антиоксидантної дії коензиму А

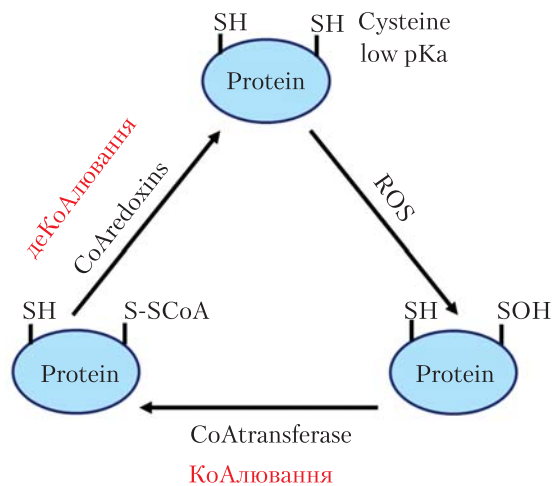
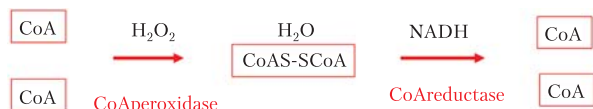


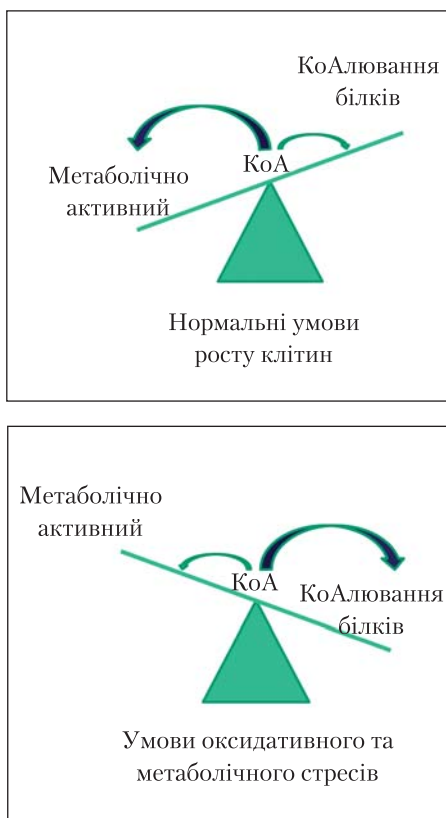
Рис. 4. Цикл КоАлювання/деКоАлювання

мим механізмом регуляції активності ензимів в умовах окисидативного стресу і захистом їх від переокиснення, а отже, і від інактивації, агрегації та деградації під дією окисних агентів. Цей механізм захищає клітину від наслідків окисидативного стресу.

Для розуміння дії цього регуляторного механізму дуже важливо дослідити не лише процес КоАлювання, тобто приєднання КоА, а й зворотний процес деКоАлювання – від'єднання коензиму А від протеїнів (рис. 4). На сьогодні ми вже виявили в клітинах бактерій ензими, здатні деКоАлювати відповідні субстрати. Було ідентифіковано та підтверджено в експе-



**Рис. 5.** Схема можливої антиоксидантної дії коензиму А



**Рис. 6.** Коензим А як ключовий регулятор балансу між клітинним метаболізмом та антиоксидантною відповіддю клітини на оксидативний чи метаболічний стрес

риментах спочатку *in vitro*, а потім *in vivo*, два ензими, що відповідають за від'єднання КоА від субстрату, — це тіоредоксинподібний білок УтрР і тіоредоксин А. Зараз тривають пошуки аналогічних ензимів у клітинах ссавців.

Є ще одне фактично недосліджене на сьогодні питання, на яке варто звернути увагу. Вище ми розглядали антиоксидантну та регуляторну функцію КоА, зумовлену утворенням ковалентного зв'язку з цистеїновими залишками

ми білків, але ж коензим А є також і низькомолекулярним тіолом. Це означає, що він може діяти за аналогією з відомим і добре дослідженим антиоксидантом глутатіоном.

Як показано на рис. 5, коензим А за участі ензиму КоАпероксидази (за аналогією з глутатіонпероксидазою) може інактивувати пероксид водню, а далі відновлюватися за допомогою ензиму КоАредуктази (за аналогією з глутатіонредуктазою). Ця схема гіпотетична, і для того, щоб підтвердити можливість існування такого механізму антиоксидантної дії КоА, необхідно ідентифікувати ці ще невідомі ензими. Власне, це і є метою наших подальших досліджень.

Загалом унікальність коензиму А зумовлена тим, що він, з одного боку, є універсальним метаболічним кофактором, який регулює надзвичайно велику кількість біохімічних процесів у клітині, а з іншого боку, є антиоксидантом. У цьому, до речі, й полягає його відмінність від глутатіону, який є ключовим антиоксидантом у клітині, але не виконує метаболічні функції. Тому ми й розглядаємо коензим А як важливий регулятор балансу між клітинним метаболізмом та антиоксидантною відповіддю клітини на стрес (рис. 6). Тобто за нормальних умов життєдіяльності клітини КоА переважно бере участь у метаболічних процесах і при цьому лише незначна кількість білків є КоАльованими, однак у разі появи стресових чинників метаболічні процеси пригальмовуються, оскільки переважна кількість КоА в клітині стає залученою до захисту ензимів від оксидативного стресу.

З огляду на все зазначене вище логічно припустити, що КоАлювання білків відіграє важливу роль у патогенезі захворювань, пов'язаних з оксидативним стресом. Особливо це стосується розвитку нейродегенеративних захворювань, адже в генах ключових у біосинтезі КоА-ензимів, а саме: фосфопантотенат кінази та відкритої нами КоА-синтази, при нейродегенерації було виявлено мутації, що впливають на їхню активність. Крім того, підвищені рівні КоАлювання білків спостерігаються при хворобі Альцгеймера і хворобі Паркінсона.



Отже, за результатами досліджень, проведених у відділі сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, можна зробити висновок, що ми ідентифікували новий тип післятрансляційної модифікації протеїнів – КоАлювання, який є оборотним і досить поширеним клітинним процесом. Коензим А бере участь у регуляції окисно-відновних процесів, модуляції активності редокс-чутливих протеїнів і відіграє важливу роль у захисті білків, клітин та організму в цілому від можливих наслідків оксидативного стресу.

Напрями наших подальших робіт пов'язані з дослідженням молекулярного механізму КоАлювання/деКоАлювання, вивченням антиоксидантної функції КоА в окисно-відновній регуляції, ідентифікацією КоАпероксидази і КоАредуктази в клітинах ссавців, визначенням ролі КоАлювання протеїнів та антиоксидантних функцій КоА за різних патологічних станів людини, передусім у процесі розвитку нейродегенеративних захворювань.

*За матеріалами засідання підготувала О.О. Мележик*

Valeriy V. Filonenko

*Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine*

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-6480-0619>

#### NEW MECHANISM OF ANTIOXIDANT DEFENSE OF CELLS INVOLVING COENZYME A

Transcript of scientific report at the meeting of the Presidium of NAS of Ukraine, July 10, 2024

The report presents the results of research conducted by scientists from the Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine to identify new, hitherto unknown functions of coenzyme A (CoA), one of the key cofactors of numerous metabolic processes in the cell. A new type of protein modification involving coenzyme A, called CoAlation, has been identified. It was proved that CoAlation performs a regulatory function in the cell, affecting the activity and stability of proteins. In addition, under conditions of oxidative or metabolic stress, CoAlation protects proteins from overoxidation and, as a result, prevents their inactivation and degradation, and thus performs an antioxidant function. Protein CoAlation also plays an important role in the pathogenesis of oxidative stress-related diseases, including the development of human neurodegenerative diseases.

**Cite this article:** Filonenko V.V. New mechanism of antioxidant defense of cells involving coenzyme A. *Visn. Nac. Akad. Nauk Ukr.* 2024. (9): 32–37. <https://doi.org/10.15407/visn2024.09.032>