ВІДГУК
офіційного рецензента на
дисертаційну роботу Стихиляс Марії Михайлівни
«Особливості деацетилювання тубуліну рослин
гістондеацетилазами, асоційованими з мікротрубочками»,
представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії за
спеціальністю 091 – Біологія

Актуальність обраної теми. Серед посттрансляційних модифікацій білків, однією з найпоширеніших і найбільш досліджених є ацетилювання. Ацетилювання гістонів є добре вивченим епігенетичним механізмом регуляції експресії, асоційованим з еухроматином та, зазвичай, активною експресією генів. Відомо, що у рослин ацетилювання гістонів впливає на процеси росту та розвитку, формування коренів, апікальної меристеми пагона, регуляцію цвітіння, розвиток плодів, контроль процесів старіння, регуляцію процесів відповіді на стрес тощо.

Серед інших білків, які, окрім гістонів, зазнають ацетилювання, варто назвати ферменти вуглецевого метаболізму та білки, залучені в реакціях фотосинтезу. Ацетилювання транскрипційних факторів та білків, що є компонентами сигнальних каскадів, є одним із механізмів регуляції реакцій рослин на несприятливі біотичні та абіотичні фактори, а також гормональної регуляції метаболізму.

Одним із ключових білків, що ацетилюється, є тубулін. Мікротрубочки, до складу яких входить ацетильований тубулін, є більш стійкими до механічних деформацій та зберігають структурну цілісність упродовж більш тривалого часу. Ацетильований тубулін приймає участь у процесах клітинного поділу, відкладанні целюлозних волокон у клітинній стінці, організації цитоскелету та адаптації до несприятливих факторів.

Отже, регуляція ацетилювання α-тубуліну потенційно може впливати на організацію цитоскелету, механіку клітинного поділу, морфогенез, адаптацію рослин до стресів. Тому регуляція ацетилювання та деацетилювання тубуліну є перспективним напрямком досліджень сучасної біології рослин.

Незважаючи на це, тубуліндеацетилазну активність експериментально

доведено лише для HDA14 *Arabidopsis thaliana*, тоді як дані щодо тубуліндеацетилаз решти рослин відсутні.

В цьому контексті важливим інструментом досліджень є селективне інгібування гістондеацетилаз. Однак, більшість відомих інгібіторів гістондеацетилаз людини є неселективними. При цьому, для рослинних гістондеацетилаз специфічні інгібітори не розроблені взагалі, а дані щодо інгібування рослинних HDA були отримані за використання інгібіторів HDAC людини. З огляду на вищезазначене, тема дисертаційної роботи «Особливості деацетилювання тубуліну рослин гістондеацетилазами, асоційованими з мікротрубочками» та, зокрема, розроблення селективних інгібіторів рослинних тубуліндеацетилаз як частина цієї роботи, є актуальною.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у відділі геноміки та молекулярної біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» відповідно до планів науково-дослідних робіт установи «Біоінформатичні та молекулярно-клітинні дослідження структури та функцій цитоскелету рослин» (номер держреєстрації 0120U100937, 2020-2024 рр.) та «Механізми залучення цитоскелету до розвитку автофагії у рослин як ключового механізму регуляції їх відповіді на абіотичні стресові чинники» (номер держреєстрації 0125U001271, 2025-2029 рр.). Окрім того, частину роботи виконано в рамках проєкту НФДУ №0120U104883 «Ензими посттрансляційних модифікацій білків мікротрубочок в якості мішеней для інгібування збудливості первинних ноціцептивних нейронів периферійної нервової системи» (2020-2023рр.).

Ступінь обґрунтованості та достовірності. Робота виконана з використанням сучасних методів біоінформатичного аналізу, які були успішно застосовані для виконання поставлених завдань та підтвердження достовірності отриманих результатів. Реконструкцію тривимірної структури гістондеацетилаз здійснювали за допомогою AlphaFold, якість отриманих моделей підтверджували за допомогою серверу MolProbity. Оптимізацію

просторової структури отриманих моделей виконували за використання молекулярно-динамічної симуляції в програмному пакеті GROMACS. Для філогенетичного аналізу спорідненості амінокислотних та нуклеотидних послідовностей використовували програмний пакет MEGA, для статистичної оцінки надійності отриманих клад проводили бутстреп-аналіз із 1000 повторів. Ліганд-білковий докінг виконували за допомогою програмних пакетів AutoDock Vina 1.2.5 та CCDC Gold 5.3, аналіз результатів докінгу та просторових структур гістондеацетилаз виконували у програмному пакеті PyMol. Візуалізацію хімічного простору лігандів проводили за використання бібліотеки ChemPlot, розрахунок фізико-хімічних властивостей інгібіторів та їх ADMET-параметрів проводили за допомогою веб-сервісу SwissADME. Детальний опис алгоритмів та протоколів досліджень, бібліотек та баз даних, використаних у роботі, наведений в розділі Матеріали і методи.

Наукова новизна результатів, отриманих в даному дослідженні, є беззаперечною. Дисертанткою було вперше побудовано структурні моделі гістондеацетилаз рису і арабідопсису, для яких відсутні експериментально визначені просторові структури.

Вперше було проаналізовано доменну архітектуру гістондеацетилаз *A. thaliana* та встановлено, що HDA15 має окрім чотирьох деацетилазних доменів, домен цинкового пальця, що може вказувати на зв’язок HDA15 з автофагією.

Автор класифікувала раніше некласифіковані гістондеацетилази та встановила, що HDA10 *A. thaliana* та HDAC1-3 *Oryza sativa* відносяться до класу I, HDA8 та HDA14 – до класу II. Було проведено філогенетичний аналіз гістондеацетилаз різного еволюційного походження (*Homo sapiens, Saccharomyces cerevisiae, A. thaliana, O. sativa*), на основі якого встановлено, що HDAC10 *O. sativa* та HDA14 *A. thaliana* входять до спільної клади із гістондеацелилазами IIb людини, куди відноситься і тубуліндеацетилаза HDAC6, що дозволяє висловити припущення про тубуліндеацетилазну активність HDAC10 рису.

Було встановлено консервативні мотиви, що формують каталітичну порожнину гістондеацетилаз, та чотири амінокислотні залишки, відповідальні за координацію Zn^{2+}, важливого для деацетилазної активності.

Було перевірено селективність відомих інгібіторів гістондеацетилаз щодо рослинних ферментів та з'ясовано механізми інгібування субстратів. Для пошуку нових селективних інгібіторів HDAC6 людини, було доковано сполуки з бібліотеки Enamine та відібрано 7, що мали високу спорідненість з HDAC6 людини та низьку – з рештою гістондеацетилаз. Було вперше встановлено ключові особливості взаємодії інгібіторів з гістондеацетилазами людини та рослин, що визначають їх селективність, зокрема, координацію каталітичного іона Zn^{2+}, формування консервативних водневих зв'язків, π-π-стекінг взаємодій та залучення консервативного амінокислотного залишку Lys L1 кишені.

Було показано, що 6 із 7 нових ідентифікованих інгібіторів характеризуються високою спорідненістю до HDA14 *A. thaliana* та HDA10 рису. Всі сполуки мали альтернативні Zn^{2+}-зв'язуючі групи – карбонільну та сульфоксидну, які координують Zn^{2+} за монодентатним механізмом. Було встановлено, що ключовим амінокислотним залишком активного центру ферменту, що визначає селективність зв'язування інгібіторів саме з рослинними гістондеацетилазами, є консервативний гліцин: Gly230 у *O. sativa* та Gly210 у *A. thaliana*; а для ізоморфної селективності ключовою амінокислотою виявився лейцин у L1 кишені каталітичного домену, який зв'язується із сар-групами ідентифікованих сполук. Результати аналізу фізико-хімічних властивостей та ADMET-параметрів цих сполук обґрунтовують їх перспективність як селективних інгібіторів HDA14 *A. thaliana* та HDAC10 *O. sativa.*

Практичне значення. У дисертаційній роботі отримано результати, що мають фундаментальне значення для розвитку сучасних уявлень про еволюційну спорідненість, структурну організацію та ліганд-зв'язувальні властивості рослинних гістондеацетилаз, асоційованих з мікротрубочками.

Було розроблено підхід, що дозволяє проводити ефективний пошук та ідентифікацію нових селективних інгібіторів рослинних гістондеацетилаз, що включав молекулярний докінг, аналіз взаємодій у сайтах зв'язування, оцінку фізико-хімічних та ADMET параметрів і експериментальну верифікацію.

Отримані результати можуть бути використаними для аналізу та прогнозування функціональної ролі та субстратної специфічності гістондеацетилаз. Виявлені структурні особливості рослинних тубуліндеацетилаз, механізму каталізу та зв'язування з субстратом можуть слугувати раціональною основою для дизайну нових селективних інгібіторів рослинних гістондеацетилаз, асоційованих з мікротрубочками. Такі інгібітори можуть бути використані як точні та ефективні інструменти подальших досліджень молекулярних механізмів регуляції ацетилювання тубуліну та ролі гістондеацетилаз у регуляції фізіологічних процесів рослин. Результати даної роботи можуть сприяти розробленню стратегій для регуляції росту і розвитку рослин та підвищення їх стійкості до стресових чинників.

Повнота викладу у фахових виданнях та апробація основних результатів. За темою дисертації опубліковано 7 робіт. З них дві статті у виданнях, що входить до міжнародних баз даних Scopus/WoS (Q3), одна додаткова (Q1) та препринт статті, і троє тез доповідей. Основні результати роботи апробовано на науково-практичних конференціях: VI конференції молодих учених «Біологія рослин і біотехнологія» (18-19 травня 2026 р., Київ, Україна); V конференції молодих учених «Біологія рослин і біотехнології» (15-16 травня 2025 р., Київ, Україна) та IV конференції молодих учених «Біологія рослин і біотехнологія» (16–18 травня 2024 р., Київ, Україна).

Академічна доброчесність. Дисертаційна робота виконана з дотриманням принципів академічної доброчесності. В результаті перевірки не було виявлено ознак плагіату, фабрикації, фальсифікації, текстових запозичень або інших порушень академічної доброчесності. Автор належно цитує результати інших дослідників та оформлює посилання на першоджерела, що свідчить про високий рівень наукової етики.

Оцінка структури, змісту та форми дисертації. Текст роботи викладено чистою та зрозумілою літературною мовою із грамотним використанням наукової термінології. Між розділами та підрозділами є чіткі логічні переходи, які поєднують текст у єдину логічну, взаємопов'язану та взаємодоповнюючу структуру. Варто зазначити, що в процесі виконання дисертаційного дослідження було виконано дуже багато рутинної механічної роботи, і в тексті дисертації не наведено детальних описів проміжних етапів, що підвищує зрозумілість та сприйнятливість результатів дослідження для читача. Це дозволяє зосередити увагу саме на результатах роботи, а не на процедурах їх отримання.

Дисертація складається з анотації, вступу, семи розділів, узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел та додатку. Дисертація містить 24 рисунки, 11 таблиць, список використаних джерел, який складається з 148 посилань. Загальний обсяг рукопису становить 184 сторінок.

У вступі наведено актуальність теми дисертаційного дослідження, визначено мету та завдання, охарактеризовано методи, наукову новизну, практичне значення отриманих результатів, особистий внесок здобувача, обсяг та структуру дисертації та зазначено дані про апробацію результатів даної роботи.

У Розділі 1 коротко охарактеризовано гістонацетиилтрансферази (HAT), основні білки рослин, що зазнають ацетилювання, показана важливість цієї посттрансляційної модифікації в процесах росту та розвитку, фізіології фотосинтезу, біохімічних циклах, розмноження, захисту від стресів. Рокрито фізіологічну роль та механізми ацетилювання α-тубуліну. Пояснено механізми ацетилтрансферазної та деацетилазної активності відповідних ферментів, охарактеризовано основні класи та структурні елементи гістондеацетилаз, особливості будови їх активного центру.

У Розділі 2 наведено класифікацію гістондеацетилаз *H. sapiens, S. cerevisiae, A. thaliana, O. sativa*. Розкрито функції гістондеацетилаз рослин, які

відомі на сьогоднішній день, зокрема, у забезпеченні ранніх етапів розвитку рослин, просторово-часових патернів експресії генів, розвитку листків, коренів та квіткових органів, гормональній регуляції і реакціях на біотичний та абіотичний стрес, а також в деацетилюванні негістонових субстратів. Охарактеризовано основні класи інгібіторів гістондеацетилаз та механізми їх інгібуючої активності.

Розділ 3 «Матеріали і методи» містить детальний опис програм, алгоритмів та баз даних, використаних для реконструкції 3D-структур білків, молекулярної динаміки, аналізу філогенетичної спорідненості, множинного структурного вирівнювання, ліганд-білкового докінгу, аналізі хімічного простору інгібіторів, визначення їх фізико-хімічних та ADMET-параметрів.

Розділ 4 присвячений порівняльному аналізу гістондеацетилаз різного еволюційного походження, зокрема, Blast-аналізу повнорозмірних амінокислотних послідовностей гістондеацетилаз, філогенетичному аналізу амінокислотних послідовностей каталітичних доменів гістондеацетилаз різного еволюційного походження, бутстреп-аналізу достовірності гілок філогенетичного дерева та уточненню філогенетичної спорідненості деацетилаз *A. thaliana* за їх CDS-послідовностями. Основними результатами даного розділу є класифікація раніше некласифікованих гістондеацетилаз *A. thaliana* та *O. sativa:* HDA10 *A. thaliana* та HDAC1-3 *O. sativa* віднесено до класу I; HDA8 і HDA14 *A. thaliana* та HDAC10 *O. sativa* – до класу II. Також, було встановлено спорідненість HDA14 арабідопсису та HDAC10 рису із підкласом IIb гістондеацетилаз, до якого належить тубуліндеацетилаза HDAC6 людини.

У Розділі 5 досліджено структурні особливості рослинних гістондеацетилаз, що визначають їх каталітичну активність. В даному розділі проведено детальний аналіз структур рослинних гістондеацетилаз, зокрема їх каталітичних центрів, аналіз структурних особливостей відомих інгібіторів гістондеацетилаз та механізмів їх інгібуючої дії. Основними результатами є отримання та підготовка до подальших досліджень просторових структур

гістондеацетилаз, встановлення структурних особливостей рослинних гістондеацетилаз, особливостей дії відомих інгібіторів на рослинні гістондеацетилази, а також встановлення чотирьох ключових амінокислотних залишків каталітичної кишені, відповідальних за зв'язування Zn^{2+}.

Розділ 6 присвячено пошуку нових потенційних селективних інгібіторів рослинних гістондеацетилаз, і цей розділ містить найбільш суттєві та вагомі результати даної роботи. У підрозділі 6.1 порівнювали ефективність зв'язування інгібіторів гістондеацетилаз в каталітичних доменах. Далі з баз даних CheMBL та DrugBank було обрано сполуки з підтвердженою активністю до HDAC6 людини, та доковано їх до HDAC6 людини та HDA5 *A. thaliana.* Отримані результати вказували на те, що сполуки, активні щодо HDAC6, здатні інгібувати й HDA5, при цьому ідентичність вибірок становила 100%. У підрозділі 6.2 проаналізовано взаємодію інгібіторів з тубуліндеацетилазами різного еволюційного походження. Було встановлено амінокислотні залишки, відповідальні за взаємодію з інгібіторами, та виявлено типи хімічних зв'язків, що стабілізують положення ліганду у сайті зв'язування. Також було проаналізовано, чи перетинаються вибірки інгібіторів що взаємодіють з HDAC6, HDAC10 *H. sapiens*, HDA14 *A. thaliana*, HDAC10 *O. sativa*. Було виявлено, що вибірки гістондеацетилаз найбільш перетинаються у близьких таксонів, що узгоджується з даними філогенетичного аналізу. Також було відмічено те, що сполуки, які зв'язуються з HDA14 *A. thaliana* та HDAC10 *O. sativa*, мають вищу спорідненість до HDAC6, ніж HDAC10 *H. sapiens*. Отримані результати підтверджують доцільність використання HDAC6 *H. sapiens* як референтної гістондеацетилази для пошуку рослинних інгібіторів тубуліндеацетилаз. У підрозділі 6.3 наступним кроком була ідентифікація селективних інгібіторів гістондеацетилаз, асоційованих з мікротрубочками. Автор зазначає, що результати кристалографічного аналізу комплексів HDAC6 з інгібіторами вказують на ключову особливість, що визначає селективність інгібіторів – взаємодію їх сар-груп з 4 консервативними амінокислотами L1-кишені біля входу в каталітичний канал. Далі було

проведено докінг бібліотеки сполук Enamine до HDAC6 людини, і було відібрано сполуки, що мали низьку спорідненість до інших гістондеацетилаз. В результаті було відібрано 7 сполук, для яких було експериментально підтверджено активність відносно HDAC6 людини. Також для них було підтверджено селективність, здатність утворювати зв'язок з L1 та L2 кишенями сайту зв'язування та здатність утворювати міцний хелатний зв'язок з Zn^{2+} в каталітичному центрі. Було встановлено, що всі сполуки формують монодентатний зв'язок з Zn^{2+} за участі кисню сульфоксидної або карбонільної групи. Далі аналізували фізико-хімічні та фармакокінетичні властивості ідентифікованих сполук, зокрема, їх молекулярну масу, ліпофільність, площу полярної поверхні, прогнозовану розчинність, конформаційну гнучкість, кількість донорів та акцепторів водневого зв'язку. Було встановлено, що детектовані сполуки за фізико-хімічними та фармакокінетичними властивостями не поступаються, а іноді й перевершують відомі інгібітори гістондеацетилаз. Подальшим етапом роботи був докінг зазначених сполук в сайти зв'язування HDA14 *A. thaliana* та HDAC10 *O. sativa.* Було встановлено, що 6 із 7 сполук з високою спорідненістю зв'язуються даними гістондеацетилазами, та не формують зв'язки з іншими гістондеацетилазами рису та арабідопсису, що свідчить про селективність досліджуваних сполук. Було показано взаємодію сар-груп з L1 кишенею біля входу в каталітичний канал, що визначає ізоморфну селективність. Також було виявлено, що Gly230 HDAC10 *O. sativa* був ключовим у формуванні зв'язку з карбонільними хелатуючими групами, і цей гліцин відповідав Gly210 у HDA14 *A. thaliana*, і виявлений патерн взаємодії був специфічним саме для рослинних гістондеацетилаз.

Розділ «Аналіз та узагальнення результатів», відповідно, містить узагальнення отриманих результатів.

Висновки до даної роботи чітко сформульовані, логічні, обгрунтовані та зрозумілі. Отже, в дисертаційній роботі автором було блискуче досягнуто мету та виконано всі поставлені завдання.

Запитання та побажання щодо змісту дисертаційної роботи.

Загалом, текст дисертації дуже добре пропрацьований, і принципових запитань не виникло. Однак, виникло запитання щодо підпису до табл. 5.1 на ст. 91. – «Секвеновані амінокислотні послідовності рослинних гістондеацетилаз та інформація про їх просторову структуру». Чи коректним є вживання терміну «секвеновані амінокислотні послідовності», який має на увазі біохімічний метод секвенування? Може, більш коректно вжити термін «анотовані амінокислотні послідовності»?

Також маємо побажання щодо продовження досліджень тубуліндеацетилаз рослин, експериментального підтвердження ефективності нових селективних інгібіторів, ідентифікованих у даній роботі, та їх впливу на фізіологічні процеси у рослин.

Загальний висновок рецензента. Дисертаційна робота Стихиляс Марії Михайлівни «Особливості деацетилювання тубуліну рослин гістондеацетилазами, асоційованими з мікротрубочками» є завершеним дослідженням, що характеризується новизною, практичною значущістю та високим науковим рівнем. Робота 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 12.01.2022 із змінами, та наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації», а її автор, Стихиляс Марія Михайлівна, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії доктора філософії (PhD) зі спеціальності 091 – «Біологія» (галузь знань – 09 «Біологія»).

Рецензент дисертації, кандидат біологічних наук,
науковий співробітник відділу
клітинної біології та біотехнології
ДУ «ІХБГ НАН України» Анастасія БУЗІАШВІЛІ