ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА,
доктора хімічних наук, професора, завідувача відділу механізмів біоорганічних реакцій Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України А.І. Вовка на дисертаційну роботу Стихиляс Марії Михайлівни «Особливості деацетилювання тубуліну рослин гістондеацетилазами, асоційованими з мікротрубочками», подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності – 091 «Біологія», галузь знань 09 «Біологія»

Актуальність обраної теми та зв'язок з науковими програмами.

Відомо, що посттрансляційні модифікації за рахунок ацетилювання та деацетилювання білків забезпечують регуляцію важливих біологічних процесів в клітинах еукаріотичних організмів. Одним із негістонових субстратів ацетилювання є α-тубулін, співвідношення між ацетильованими і деацетильованими формами якого може впливати на конформаційні зміни і властивості мікротрубочок та їх взаємодію з асоційованими білками, регулюючи поділ клітин, їх ріст та морфогенез. Молекулярні механізми цих процесів багато в чому не з'ясовані, і не в останню чергу через значну кількість мало досліджених рослинних гістондеацетилаз різних класів, функції яких є незамінними і досить специфічними. У порівнянні з гістондеацетилазами людини, що посилено вивчаються останнім часом, ферменти рослинного походження значно менше охарактеризовані як структурно, так і функціонально, включаючи закономірності каталізу та специфічність інгібування.

Метою дисертаційної роботи М. Стихиляс було встановлення структурно-функціональних особливостей рослинних гістондеацетилаз, асоційованих з мікротрубочками, визначення їх потенційної здатності до деацетилювання α-тубуліну та ідентифікація перспективних низькомолекулярних інгібіторів цих ферментів. У відповідності з метою було сформульовано конкретні завдання роботи, серед яких, зокрема: визначення доменної організації та реконструкція просторових структур білків; аналіз філогенетичної спорідненості деацетилаз людини, рослин та дріжджів; визначення рослинних ферментів, близьких до HDAC6 людини; аналіз взаємодії гістондеацетилаз з низькомолекулярними лігандами методом молекулярного докінгу; визначення особливостей взаємодій, важливих для забезпечення ізоформної селективності інгібіторів гістондеацетилаз людини та рослин.

Дисертаційну роботу виконано згідно із планами НДР «Біоінформатичні та молекулярно-клітинні дослідження структури та функцій цитоскелету рослин» (номер держреєстрації 0120U100937, 2020-2024 рр.), «Механізми залучення цитоскелету до розвитку автофагії у рослин як ключового механізму регуляції їх відповіді на абіотичні стресові чинники» (номер держреєстрації 0125U001271, 2025-2029 рр.); «Ензими посттрансляційних модифікацій білків мікротрубочок в якості мішеней для інгібування збудливості первинних ноціцептивних нейронів периферійної нервової системи» (проєкт НФДУ № 0120U104883, 2020-2023рр.).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, та їхня достовірність.

Наукові положення, що обговорюються в дисертаційній роботі, є обґрунтованими. Вони стосуються як методологічних рішень в процесі досліджень, так і отриманих результатів виконаних робіт, отриманих на основі комп'ютерних, біоінформатичних і структурно-біологічних підходів. Зокрема, в роботі використано методи для аналізу амінокислотних і нуклеотидних послідовностей, пошуку гомологічних білків, визначення

доменної організації, побудови філогенетичних дерев та аналізу консервативності ферментів. Було також застосовано бутстреп-аналіз, методи структурного моделювання, молекулярної динаміки і молекулярного докінгу, а також методи аналізу хімічного простору та фізико-хімічних властивостей сполук. Тому отримані результати є достовірними, а зроблені висновки відображають та узагальнюють основні результати дослідження.

Наукова новизна положень, результатів і висновків дисертаційної роботи

Всі авторські формулювання щодо наукової новизни одержаних результатів є об'єктивними. Вони є пріоритетними у напрямі, спрямованому на вирішення наукової проблеми, що пов'язана з особливостями деацетилювання тубуліну гістондеацетилазами, асоційованими з мікротрубочками рослин. Зокрема, вперше встановлено структурно-еволюційну спорідненість деацетилаз HDA14 *A. thaliana* та HDAC10 *O. sativa* з HDAC6 людини, асоційованою з мікротрубочками, що дозволило обґрунтувати можливу участь HDAC10 у процесах деацетилювання α-тубуліну. Вперше ідентифіковано консервативні структурні детермінанти, важливі для взаємодії рослинних гістондеацетилаз з інгібіторами та білковими субстратами деацетилювання, та встановлено спільні патерни фермент-інгібіторних взаємодій. Ідентифіковано нові потенційні селективні інгібітори асоційованих з тубуліном гістондеацетилаз людини, а також обґрунтовано їх перспективність як ефекторів HDA14 *A. thaliana* та HDAC10 *O. sativa*.

Практичне значення отриманих результатів

Практичне значення представленої роботи полягає в розробці підходів для розширення уявлень про структурно-функціональну організацію рослинних гістондеацетилаз, асоційованих із мікротрубочками. Модельні підходи можуть бути використані для регуляції ацетилювання α-тубуліну в рослинних клітинах, для з'ясування механізмів посттрансляційних модифікацій білків цитоскелету, а також для вивчення молекулярних механізмів регуляції росту рослин. Важливо також, що результати роботи можуть бути підґрунтям для пошуку селективних регуляторів активності рослинних гістондеацетилаз для підвищення стійкості сільськогосподарських культур до дії біотичних і абіотичних стресів.

Повнота викладу результатів дисертаційної роботи та наукових положень в наукових публікаціях за темою дисертації, апробація роботи

Наукові публікації повністю відображають зміст дисертаційної роботи. За темою дослідження опубліковано 7 робіт. З них дві статті представлено у виданнях, що входять до міжнародних баз даних Scopus/WoS (**Q3**). Крім того, є додаткова публікація (**Q1**) та препринт статті, а також троє тез доповідей. Основні результати 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 та біотехнології» (15-16 травня 2025 р., Київ, Україна) та IV конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (16–18 травня 2024 р., Київ, Україна).

Структура та обсяг дисертації. Загальна характеристика роботи

Дисертаційна робота має встановлену структуру і складається з з анотації, вступу, семи розділів, узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел та додатку. Рукопис із 24 рисунками, 11 таблицями і списком використаних джерел зі 148 посилань викладено на 184 сторінках.

Вступ містить обґрунтування актуальності теми дисертації, відображає зв'язок роботи з науковими програмами, містить: мету, завдання та методи дослідження, розкриває предмет,

об’єкт і методи дослідження, формулює наукову новизну одержаних результатів та їх практичне значення, визначає особистий внесок дисертанта.

Огляд літератури (розділи 1 і 2) включає аналіз відомих даних щодо процесів ацетилювання та деацетилювання у рослин, а також робіт, що стосуються класифікації та функціональної ролі гістондеацетилази. При цьому охарактеризовано молекулярні механізми ацетилювання та деацетилювання α-тубуліну у рослин. Надалі розглядаються питання класифікації гістондеацетилаз, їх роль у регуляції розвитку та диференціації рослин, фотоморфогенезу та світлових сигналів, гормональній сигналізації, абіотичних стресах, старіння та метаболізму. Окремо подано інформацію про негістонові субстрати гістондеацетилаз та їх цитоплазматичні й органельні функції, а також про інгібітори гістондеацетилаз. Огляд літератури підтверджує актуальність теми дослідження та інтегрований в подальшу інтерпретацію результатів дисертаційного дослідження.

У наступному розділі, присвяченому матеріалам і методам дослідження, розкривається застосовані підходи до реконструкції тривимірної структури білків, молекулярної динаміки, аналізу філогенетичної спорідненості, множинного структурного вирівнювання, ліганд-білкового докінгу у програмних пакетах AutoDock Vina та GOLD.

Розділ 4 вміщує результати порівняльного аналізу гістондеацетилаз різного еволюційного походження, зокрема, blast-аналізу подібності деацетилаз, філогенетичного аналізу гістондеацетилаз, аналізу достовірності гілок філогенетичного дерева та уточнення філогенетичної спорідненості деацетилаз *A. thaliana* за їх CDS-послідовностями.

Розділ 5 присвячено ідентифікації структурних особливостей рослинних гістондеацетилаз, що визначають їх каталітичну активність. Робота потребувала реконструкції тривимірної структури гістондеацетилаз, аналізу хімічної структури та хелатувальних властивостей інгібіторів з відомою активністю до рослинних гістондеацетилаз, визначення ключових подібностей та відмінностей у структурі каталітичних сайтів рослинних гістондеацетилаз.

Розділ 6 вміщує результати досліджень, що стосуються ідентифікації потенційних інгібіторів рослинних гістондеацетилаз, зокрема, аналізу взаємодії інгібіторів гістондеацетилаз людини з рослинними гістондеацетилазами, а також докінг-аналізу взаємодії інгібіторів з гістондеацетилазами різного еволюційного походження та ідентифікації селективних інгібіторів гістондеацетилаз, асоційованих з мікротрубочками.

Дуже доречним видається доповнення дисертаційної роботи аналізом та узагальненням отриманих результатів. Викладений тут матеріал об’єднує отримані дані та формує сприйняття подальших висновків цього дослідження.

Дискусійні питання та зауваження щодо змісту дисертації

Принципових зауважень щодо дисертаційної роботи немає. Дисертація добре оформлена, проілюстрована необхідними рисунками і таблицями. Поряд з цим можна зазначити наступне.

1. Грунтовною частиною роботи є ідентифікація потенційних інгібіторів HDAC6 людини в результаті молекулярного докінгу бібліотеки сполук та порівняльне дослідження низки рослинних ферментів, що привело до передбачення серед них HDAC14 арабідопсису та HDAC10 рису як найвірогідніших мішеней. За виключенням HDAC1 і HDAC3, кристалічні ферменти людини вміщували ліганди. Так, HDAC6 була у вигляді комплексу з трихостатином А в каталітичному домені 2. Здається, додатковим аргументом при викладі результатів порівняльного вивчення інгібіторів HDAC6 могла б бути інформація про

валідацію протоколу докінгу для демонстрації того, що цей протокол відтворює експериментальний режим зв'язування ліганду (редокінг закристалізованих лігандів та порівняння позицій з вихідними кристалічними структурами).

2. Механістичні аспекти ацетилювання та деацетилювання за участю HAT, HDAC, SIRT добре викладено в тексті роботи. Відповідно до цього викладу, лізиновий субстрат на рис. 1.1, 1.2 і 1.3 краще подати як амінокислотний залишок білкової молекули.

3. Іноді текст вміщує не зовсім вдалі вирази або незначні помилки, наприклад, на стор. 5, 53, 97, 108, 133.

Однак, зазначене вище не є суттєвим, не має загального характеру та жодною мірою не впливає на високу позитивну оцінку дисертаційної роботи. Дослідження є добре спланованим і ретельно виконаним, а отримані результати формують нові знання, що стосуються функцій тубуліну, гістодеацетилаз і мікротрубочок в рослинних організмах.

Загальний висновок

Підсумовуючи, можна зробити висновок, що дисертаційна робота М.М. Стихиляс «Особливості деацетилювання тубуліну рослин гістондеацетилазами, асоційованими з мікротрубочками» є цілісним і завершеним науковим дослідженням з актуального напряму в біології. Авторкою отримано нові науково обґрунтовані результати, що мають наукове і практичне значення та представлені у відповідних публікаціях.

Загалом, робота відповідає «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 року № 44 із змінами, та Вимогам до оформлення дисертації, затвердженим наказом МОН України від 12.01.2017 року № 40, які висуваються до дисертаційних робіт на здобуття ступеня доктора філософії. За своєю актуальністю, новизною отриманих результатів, обсягом виконаних досліджень, за повнотою оприлюднення результатів дослідження у науковій періодиці робота відповідає вимогам до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 091 «Біологія», а Стихиляс Марія Михайлівна заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 091 «Біологія».

Доктор хімічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України,
завідувач відділу механізмів біоорганічних реакцій
Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії
ім. В. П. Кухаря НАН України Андрій ВОВК