**ВІДГУК**

офіційного опонента, кандидата біологічних наук, доцента, завідувача кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики ННІ високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка Олексія Юрійовича НИПОРКА

на дисертаційну роботу Стихиляс Марії Михайлівни «Особливості деацетилювання тубуліну рослин гістондеацетилазами, асоційованими з мікротрубочками», представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

**Актуальність теми дисертації та її зв'язок з напрямами науково-дослідних робіт.**

Мікротрубочки є одним із головних компонентів цитоскелету рослинної клітини, залученим до її поділу, внутрішньоклітинного транспорту, формування клітинної стінки та визначення напрямку росту. Функціональні властивості мікротрубочок значною мірою залежать від посттрансляційних модифікацій тубуліну, серед яких особливе місце посідає ацетилювання. Зміна рівня цієї модифікації впливає на механічні властивості мікротрубочок та їхню взаємодію з клітинним оточенням. Відповідно, встановлення молекулярних механізмів регуляції ацетилювання тубуліну є необхідним для розуміння функціонування рослинного цитоскелету.

Попри значний обсяг інформації щодо ферментів ацетилювання та деацетилювання білків у тварин, відповідні процеси у рослин залишаються вивченими нерівномірно. Зокрема, недостатньо з'ясовано, які саме представники родини рослинних гістондеацетилаз здатні взаємодіяти з тубуліном і які особливості їхньої просторової структури визначають субстратну специфічність. Додатковою складністю є обмежена кількість експериментально встановлених структур цих білків. Саме тому поєднання філогенетичного аналізу, структурного моделювання та дослідження

взаємодій з низькомолекулярними ефекторами є обґрунтованим підходом до розв'язання зазначеної проблеми.

Окремий інтерес становить пошук селективних інгібіторів рослинних гістондеацетилаз. Такі сполуки можуть стати інструментами для розмежування функцій окремих ферментів і дослідження їхньої участі в регуляції цитоскелету. У цьому контексті дисертаційне дослідження Марії Михайлівни Стихиляс, присвячене структурно-функціональним особливостям гістондеацетилаз *Arabidopsis thaliana* та *Oryza sativa* й пошуку їхніх потенційних інгібіторів, є актуальним як для молекулярної біології рослин, так і для розвитку методів рецептор-орієнтованого пошуку біологічно активних сполук.

Дисертаційну роботу виконано у відділі геноміки та молекулярної біотехнології ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» в межах науково-дослідних робіт «Біоінформатичні та молекулярно-клітинні дослідження структури та функцій цитоскелету рослин» (№ державної реєстрації 0120U100937, 2020–2024 рр.) та «Механізми залучення цитоскелету до розвитку автофагії у рослин як ключового механізму регуляції їх відповіді на абіотичні стресові чинники» (№ державної реєстрації 0125U001271, 2025–2029 рр.). Частину досліджень виконано в межах проєкту НФДУ «Ензими посттрансляційних модифікацій білків мікротрубочок в якості мішеней для інгібування збудливості первинних ноціцептивних нейронів периферійної нервової системи» (№ державної реєстрації 0120U104883, 2020–2023 рр.).

**Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації.**

Здобувачем виконано значний обсяг роботи, який охоплює аналіз послідовностей і доменної організації білків, встановлення їхньої філогенетичної спорідненості, підготовку просторових моделей, порівняння каталітичних центрів і пошук потенційних інгібіторів. Список використаних джерел містить 148 найменувань. Звертає на себе особливу увагу надзвичайно

висока якість аналізу літературних джерел, здійсненому автором, чіткість і логічність викладення матеріалу в огляді літератури (так само, як і в інших розділах роботи). Літературні дані органічно залучено до обґрунтування вибору об’єктів і методів дослідження та до інтерпретації власних результатів.

Методична основа роботи відповідає її основним завданням. Для аналізу послідовностей і філогенетичних реконструкцій застосовано BLAST, MUSCLE та MEGA, а статистичну підтримку отриманих клад оцінено за допомогою бутстреп-аналізу з 1000 повторів. Просторову структуру досліджуваних деацетилаз реконструйовано з використанням AlphaFold; відсутні ділянки експериментальних структур добудовано методом моделювання за гомологією. Проведено оцінку стереохімічної якості моделей за допомогою MolProbity та їх молекулярно-динамічну релаксацію у GROMACS. Для дослідження взаємодій з лігандами використано AutoDock Vina та GOLD, а для порівняння відібраних сполук - аналіз хімічного простору і прогнозування фізико-хімічних та фармакокінетичних властивостей.

Припущення щодо можливої участі HDAC10 рису (*Orysa sativa* L.) в деацетилюванні тубуліну ґрунтується на її філогенетичній спорідненості з HDA14 різушки (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), подібності будови каталітичних ділянок та результатах порівняльного докінгу. Така сукупність даних дозволяє обґрунтовано визначити цей білок як перспективний об’єкт подальшої експериментальної перевірки. При цьому в розділі узагальнення автор прямо зазначає, що запропонована функціональна інтерпретація потребує експериментального підтвердження.

Дослідження відомих інгібіторів доповнено аналізом 731 сполуки з підтвердженою активністю щодо деацетилаз людини та пошуком потенційних інгібіторів у бібліотеці Enamine. Порівняння результатів докінгу до різних деацетилаз і аналіз міжмолекулярних контактів у змодельованих комплексах дозволили відібрати сім перспективних сполук та охарактеризувати можливі способи зв’язування цих речовин з досліджуваними білками. Для шести з цих сполук отримано розрахункові оцінки, що вказують на переважне зв’язування

з HDA14 різушки та HDAC10 рису порівняно з іншими дослідженими деацетилазами відповідних видів рослин. Ці результати обґрунтовують вибір сполук для подальшої експериментальної перевірки їх інгібуючої активності та селективності.

Основні результати роботи узагальнено у дев'яти висновках, які охоплюють поставлені завдання. Окремо варто відзначити розділ «Аналіз та узагальнення результатів», у якому автор, поєднуючи отримані філогенетичні, структурні та хемінформатичні дані, надає читачам цілісне уявлення про суть виконаної наукової роботи. Викладені міркування є основою для твердження, що положення і висновки, винесені на захист, є обґрунтованими і достовірними.

**Новизна наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації.**

Наукова новизна роботи полягає у встановленні зв'язків між еволюційною спорідненістю рослинних гістондеацетилаз, особливостями їхніх каталітичних центрів і прогнозованою взаємодією з низькомолекулярними лігандами. Серед найбільш вагомих результатів варто відзначити такі:

уточнено класифікацію досліджених цинк-залежних гістондеацетилаз *Arabidopsis thaliana* та *Orysa sativa*, зокрема класову належність HDA8 і HDA14 арабідопсису та HDAC1–3 і HDAC10 рису; охарактеризовано їхню спорідненість із деацетилазами людини та дріжджів;

на підставі філогенетичного і структурного аналізу, доповненого порівнянням результатів докінгу, обґрунтовано гіпотезу щодо можливої участі HDAC10 *O. sativa* у деацетилюванні тубуліну;

визначено п'ять консервативних структурних мотивів, що формують каталітичну порожнину досліджуваних рослинних деацетилаз, та проаналізовано амінокислотні залишки, пов'язані з організацією каталітичного центру і взаємодією з лігандами;

ідентифіковано сім сполук із прогнозованою перевагою зв’язування з HDAC6 людини порівняно з іншими дослідженими деацетилазами людини; для шести з них передбачено переважне зв’язування з HDA14 арабідопсису та HDAC10 рису серед досліджених рослинних ферментів;

охарактеризовано спільні та відмінні взаємодії відібраних сполук у каталітичних центрах HDAC6 людини, HDA14 арабідопсису та HDAC10 рису, зокрема контакти з консервативними залишками в ділянці L1, які можуть бути використані для подальшого пошуку селективних інгібіторів.

Особливий інтерес становить аналіз взаємодій за участю карбонільних і сульфоксидних цинк-зв’язувальних груп відібраних сполук. У запропонованих моделях комплексів їхня взаємодія з каталітичним іоном цинку поєднується з контактами в інших ділянках кишені зв’язування. Це дозволяє розглядати такі сполуки як вихідний матеріал для дослідження внеску окремих структурних фрагментів у спорідненість і селективність лігандів.

**Практичне значення отриманих результатів.**

Практичне значення роботи насамперед полягає у формуванні структурної основи для спрямованого пошуку ефекторів рослинних гістондеацетилаз. Підготовлені моделі білків і результати порівняльного аналізу каталітичних центрів можуть бути використані для відбору сполук, планування експериментів із сайт-спрямованого мутагенезу та перевірки припущень щодо субстратної специфічності окремих ферментів.

Відібрані низькомолекулярні сполуки становлять інтерес як кандидати для подальших біохімічних і клітинних досліджень. Перевірка їхньої дії на очищені рослинні ферменти та в рослинних клітинах дозволить оцінити можливість застосування цих речовин як регуляторів рівня ацетилювання тубуліну. Виявлені відмінності між сайтами зв’язування рослинних деацетилаз і HDAC6 людини можуть бути використані при подальшій оптимізації селективності таких сполук.

У перспективі результати роботи можуть сприяти розширенню наших уявлень про роль посттрансляційних модифікацій тубуліну в процесах роста, розвитку та відповідях рослин на дію різноманітних стресових факторів. Крім того, методичні підходи й отримані результати мають навчальну цінність і можуть бути використані у викладанні біоінформатики, структурної біології та раціонального дизайну/пошуку біологічно активних сполук з таргетним механізмом дії.

**Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях**

За наведеним у дисертації переліком, результати досліджень представлено у семи наукових працях: трьох журнальних статтях, одному препринті та трьох тезах доповідей. Дві статті у журналі Cytology and Genetics присвячено класифікації рослинних гістондеацетилаз, пошуку інгібіторів та структурним детермінантам їхньої каталітичної активності. Стаття у Frontiers in Pharmacology стосується комп'ютерної та експериментальної ідентифікації модуляторів αTAT1. Результати пошуку сполук, спрямованих на HDAC6, викладено у препринті «Small molecules targeting HDAC6: indirect microtubule assembly modulators».

Матеріали роботи апробовано на IV–VI конференціях молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» у 2024–2026 роках.

**Академічна доброчесність.**

Дисертація та наукові публікації, у яких висвітлені основні результати роботи, не містять ознак академічного плагіату, фабрикації або фальсифікації даних.

**Зауваження щодо змісту та оформлення дисертації.**

Представлена до захисту дисертаційна робота є оригінальним науковим дослідженням, що суттєво розширює наші уявлення про структурно-

функціональні особливості рослинних гістондеацетилаз. Однак в плані побажань для подальшої наукової роботи слід зробити деякі зауваження:

1. Стор. 23, незважаючи на свою благозвучність, термін «молекулярно-динамічна оптимізація» не є коректним. Процедура, яку автор називає цим терміном – звичайна градієнтна оптимізація.

2. На стор. 25 у характеристиці наукової новизни згадано консервативний залишок Lys у ділянці L1, тоді як у викладі результатів і висновку 9 йдеться про Leu.

3. Загальне зауваження по термінології, яка використовується в роботі. Автор застосовує загальновживані терміни «експериментально визначені структури» та «експериментальні структури», які по суті є неточними, оскільки просторові структури білків, визначені автором за допомогою обчислювальних методів, теж є експериментальними, оскільки ґрунтуються на результатах комп'ютерних експериментів, на відміну від структур, визначених за результатами експериментів *інструментальних* (рентгенівська кристалографія, ЯМР-спектроскопія та ін.). Відповідно, коректним терміном була б «інструментально визначена» або «інструментальна» просторова структура.

4. Стор. 105, рис. 5.2 є надзвичайно привабливим з естетичної точки зору, проте ніякої корисної інформації щодо взаємодії речовин з гістондеацетилазами з нього отримати неможливо. Рисунок дуже перевантажений, підписи до амінокислотних залишків абсолютно нечитабельні. Автору бажано було розділити наведену на рисунку інформацію на декілька частин, а також навести двовимірні діаграми взаємодії білків з лігандами. Аналогічні зауваження до рис. 6.1 та 6.2 – вони не виглядають перевантаженими, але абсолютно незрозуміло, з якими залишками взаємодіють речовини.

5. Рис. 6.2 – в якій програмі розраховувалися наведені значення оціночної функції?

6. Стор. 128. Яка саме бібліотека компанії Enamine була використана для докінга?

7. Стор. 141. «Отримані результати підтвердили біологічну активність ідентифікованих сполук у клітинній моделі». Ці результати, нажаль, в роботі не наведені. Незрозуміло, що саме було критерієм біологічної активності досліджуваних сполук. Препринт, на який посилається автор, також не містить відповідних даних.

8. Робота тільки б виграла, якщо наряду з аналізом структурних особливостей взаємодії з актуальними та потенціальними низькомолекулярними лігандами автор охарактеризував структурні механізми взаємодії цих ферментів з високомолекулярними партнерами, зокрема молекулами тубулінів.

9. Текст представленої роботи, як і будь-який інший, містить деякі граматичні помилки (стор. 95 – «регіну» замість «регіону», стор. 139 - «рекомендодваних» та ін). Ентропія, куди ж без неї…

Водночас слід зазначити, що наведені зауваження ні в якій мірі не знижують наукової цінності дисертації. Робота Марії Михайлівни написана гарною літературною мовою і легко читається.

**Загальний висновок.**

Дисертаційна робота Стихиляс Марії Михайлівни «Особливості деацетилювання тубуліну рослин гістондеацетилазами, асоційованими з мікротрубочками» є цілісним завершеним науковим дослідженням, у якому отримано нові дані щодо еволюційної спорідненості, структурної організації та особливостей взаємодії з лігандами рослинних гістондеацетилаз. За своєю актуальністю, методичним рівнем, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів, глибиною розкриття поставлених проблем, логічністю і обгрунтованістю висновків дисертаційна робота повністю відповідає вимогам до дисертацій на здобуття ступеня доктора філософії, визначеним «Порядком присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення

разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженим постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44 із змінами, та Вимогам до оформлення дисертації, затвердженим наказом МОН України від 12 січня 2017 р. № 40 із змінами, а її автор Стихиляс Марія Михайлівна заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

**Офіційний опонент:**

Завідувач кафедри
молекулярної біотехнології та біоінформатики
ННІ високих технологій
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка
кандидат біологічних наук, доцент Олексій НИПОРКО