УДК 581.1:582.683.2:58.032

ГІСТОНДЕАЦЕТИЛАЗИ РОСЛИН, ЇХ КЛАСИФІКАЦІЯ ТА ПОШУК ІНГІБІТОРІВ

М.М. СТИХИЛЯС*, О.В. РАЄВСЬКИЙ, Я.Б. БЛЮМ**

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,
вул. Байди Вишневецького, 2А, Київ, Україна, 04123

E-mail: stihilia@gmail.com; cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net

Автор для кореспонденції – Стихиляс М.М., e-mail: stihilia@gmail.com

Гістондеацетилази є родиною ферментів, залучених до регуляції багатьох важливих процесів у клітинах рослин та тварин. Рослинні гістондеацетилази вивчені значно менше порівняно з людськими. В даному дослідженні увага була зосереджена на поглибленій характеристиці гістондеацетилаз двох модельних видів рослин – Arabidopsis thaliana та Oryza sativa. За допомогою аналізу філогенетичної спорідненості до їх відомих гомологів людини було встановлено близькість до трьох класів гістондеацетилаз людини. Виявлено, що найвищу спорідненість серед гістондеацетилаз різного еволюційного походження мають HDAC6 людини та HDA5 A. thaliana (43,6 % гомології). Результати структурного вирівнювання свідчать про консервативність каталітичних доменів та високу спорідненість інгібіторів до обох гістондеацетилаз. Високий рівень відомих інгібіторів гістондеацетилаз людини до HDA5 A. thaliana продемонстровано за допомогою ліганд-білкового докінгу. Отримані результати дозволяють припустити високу ефективність застосування інгібіторів гістондеацетилаз людини до гістондеацетилаз рослин з метою покращення регуляції процесів їх росту та розвитку, а також стійкості до стресових чинників.

Ключові слова: *гістондеацетилази, Arabidopsis thaliana, Oryza sativa, класифікація за гомологією, молекулярний докінг, інгібітори.*

Вступ. Гістондеацетилази (HDAC/HDA) – родина ферментів, що відіграють важливу роль у регуляції структури і функцій гістонів, а також багатьох інших білків (Fischer and Alves Avelar, 2021). Баланс активності HDAC і гістонацетилтрансфераз (HAT) забезпечує регуляцію транскрипції генів, контролює ріст і розвиток клітини, її реакцію на стресові чинники, а також впливає на біохімічні та фізіологічні події у клітинах (Farsetti et al, 2023). Гістондеацетилази тварин і, зокрема, людини значно краще досліджені та анотовані порівняно з відповідними ферментами рослинного походження (Chen et al, 2021).

Відомо, що у ссавців експресується 18 різних HDAC, які згруповані в чотири класи на основі їх гомології з деацетилазами дріжджів (Haberland et al, 2009; Yang and Seto, 2008). Зокрема, виділяють класичні гістондеацетилази: HDAC класу I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 і HDAC8), HDAC класу IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7 і HDAC9) і класу IIb (HDAC6 і HDAC10), HDAC класу IV (HDAC11); та сиртуїни: HDAC класу III (SIRT1–7), котрі не мають структурної подібності до класичних гістондеацетилаз (Wu et al, 2022). HDAC класу I є гомологами дріжджового білка RPD3 (Lee et al, 2021). Ці HDAC експресуються у всіх тканинах і органах, локалізовані переважно в ядрі (за винятком HDAC3, яку також можна виявити і в цитоплазмі) та мають високу ферментативну активність. HDAC класу II гомологічні білку HDA1 дріжджів і поділяються на HDAC класу IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7 і HDAC9) і класу IIb (HDAC6 і HDAC10). HDAC класу IIa характеризуються великим N-термінальним розширенням, багатим на залишки серину, та консервативною ділянкою зв'язування для транскрипційного фактору MEF2 (Chinellato et al, 2024). HDAC11 має спільні ділянки збереження послідовності як з RPD3, так і з HDA1, і тому виділяється в окремий клас IV. HDAC класів I, II і IV – це цинк-залежні ферменти. Натомість, HDAC класу III потребують нікотинамідаденіндинуклеотиду (NAD^+) і за своєю каталітичною активністю є гомологічними NAD-залежному дріжджовому білку SIR2 (D'Mello, 2009). Окрім гістонів, гістондеацетилази мають значну кількість негістонових субстратів як у ядрі, так і в цитоплазмі. До них належать фактори транскрипції, гормональні рецептори, шаперони та білки цитоскелету (Li et al, 2013).

© ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ НАН УКРАЇНИ, 2024

Щодо гістондеацетилаз рослин, які позначаються як HDA, відомо 17-ть гістондеацетилаз *Arabidopsis thaliana*, які поділяють на три типи: тип I (RPD3-подібна суперродина), тип II (HD-туїни) та тип III (сиртуїни). У HDA типу I виділяють три класи: клас I (HDA19, HDA6, HDA7, HDA9), клас II (HDA5, HDA15, HDA18), клас III (HDA), та некласифіковані (HDA8, HDA10, HDA14) (Hollender and Liu, 2008). За даними бази даних амінокислотних послідовностей білків UniProtKB на сьогоднішній день відомо лише чотири гістондеацетилази *Oryza sativa* (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC10), які не класифіковані за спорідненістю до гістондеацетилаз людини чи гомологічних білків дріжджів. Функції гістондеацетилаз дуже тісно пов'язані з їх гомологічною спорідненістю та локалізацією. Відомо, що HDA19 *A. thaliana* регулює гени ідентичності квіткових органів, тобто разом з генами AP2 та TPL діє як кадастровий регулятор багатьох гомеотичних генів квітки, щоб правильно формувати її структуру (Krogan et al, 2012). Також встановлено, що HDA19 одночасно з HDA5, HDA14, HDA15 та HDA18 *A. thaliana* бере участь у негативній регуляції реакції на сольовий стрес: інгібування її активності сприяє підвищенню стійкості до сольового стресу (Ueda et al, 2017). Також показано, що нокдаун генів гістондеацетилаз HDA19 та HDA9 призводить до дерепресії генів, що реагують на сольовий стрес. Проте участь гістондеацетилаз класу II (HDA5, HDA14, HDA15 та HDA18) у механізмах відповіді на сольовий стрес досі залишається нез'ясованою. Можливо, що це відбувається шляхом залучення негістонових субстратів цих деацетилаз (Ueda et al, 2017).

Раніше повідомлялося про негативну регуляцію реакції на сольовий стрес та стрес від посухи гістондеацетилазою HDA9 *A. thaliana* (Zheng et al, 2016; Han et al, 2016), яка також відіграє ключову роль у регуляції початку старіння листя (Chen et al, 2016), стимулюючи ауксин-залежний термоморфогенез (van der Woude et al, 2019) та здійснюючи позитивну регуляцію передачі сигналу теплового шоку (Niu et al, 2022). А от гістондеацетилаза HDA6 *A. thaliana* залучена до протилежної регуляції реакції на засоленість та посуху порівняно з HDA9 та HDA19 (Luo et al, 2012a). Гістондеацетилаза HDA6 *A. thaliana* також бере участь у регуляції експресії гена KNOX під час розвитку листків (Luo et al, 2012b). На цьому функції гістондеацетилази HDA6 не вичерпуються, вона також залучена до реалізації автономного шляху цвітіння, регулюючи експресію гена FLC (Yu et al, 2011).

Час цвітіння у *A. thaliana* регулюється HDA5. Так мутанти з дефектом експресії HDA5 демонструють фенотип пізнього цвітіння (Luo et al, 2015). HDA15 *A. thaliana* відіграє ключову роль у передачі сигналів абсцизової кислоти, взаємодіючи з транскрипційним фактором MYB96, що призводить до пригнічення негативних регуляторів ранньої передачі сигналів абсцизової кислоти. Це у свою чергу призводить до зниження сприйнятливі до стресу від посухи. Цікавим є і те, що активність HDA15 залежить від умов освітлення. Вона також бере участь у розвитку сім'ядолей, біосинтезі хлорофілу та передачі гормональних сигналів (Lee and Seo, 2019). Також відомо, що HDA15 разом з фактором взаємодії фітохрому 3 (PIF3) пригнічує експресію генів, залучених до біосинтезу хлорофілу (CHLD і GUN5) та фотосинтезу у темряві (PSAE1, PSAE2, PSAF, PSAK, PSAO, LHCB2.2, LHCA6, LHCB5, LHCB4.2, LHCB4.1 і LHB1B2) шляхом зниження рівнів ацетилювання відповідних білків та транскрипції, асоційованої з РНК-полімеразою II (Liu X et al, 2013). HDA15 є негативним регулятором подовження гіпокотилю у фотоморфогенезі, контролюючи подовження клітин гліпокотилю у садженців (Zhao et al, 2019). Крім цього, HDA15 сприяє зниженню реакції рослин на підвищену температуру навколишнього середовища шляхом пригнічення програми експресії генів теплової відповіді (Shen et al, 2019).

Гістондеацетилаза HDA18 бере участь у регуляції механізмів формування клітинного патерну епідермісу коренів та є ключовим компонентом у механізмі регуляції кореневого епідермісу у *A. thaliana*, впливаючи на структуру епідермальних клітин коренів шляхом регуляції транскрипції набору генів кіназ, а саме SCM та BRI1 (Xu et al, 2005; Liu C et al, 2013). Відомо про органельну локалізацію гістондеацетилази HDA14 *A. thaliana*, яка міститься в хлоропластах. Більшість її білко-

вих субстратів виконують функції у фотосинтезі. Показано, що стан активації RuBisCO контролюється ацетилюванням лізину активази RuBisCO в умовах слабкого освітлення (Hartl et al, 2017).

Раніше нами було показано, що розвиток автофагії за участю мікротрубочок під впливом голодування та осмотичного стресу супроводжувався підвищенням рівнів експресії гена *hdac14*, в той час, як за умов сольового стресу рівень експресії цього гена знижувався (Olenieva et al, 2017). Відомо, що деацетилаза HDA14 є деацетилазою α-тубуліну (Tran et al, 2012). Одночасно на тих же самих етапах розвитку автофагії під впливом як голодування, так осмотичного і сольового стресів відбувалось підвищенням рівнів експресії гена *hda6* (Olenieva et al, 2017).

Хоча більшість з відомих функцій гістондеацетилаз рослин пов'язана з їх впливом на експресію певних генів через деацетилювання гістонів, залишається важливим виявлення та з'ясування функцій інших субстратів рослинних гістондеацетилаз, зокрема цитоплазматичного походження. Оскільки гістондеацетилази людини є досить добре класифікованими та охарактеризованими, а гістондеацетилази рослин все ще залишаються значно менш вивченими, нашою метою було класифікувати гістондеацетилази *A. thaliana* та *O. sativa* за їх гомологією до гістондеацетилаз людини, порівняти отримані результати з уже наявними та доповнити їх даними щодо класифікації гістондеацетилаз, зазначених, як некласифіковані на сьогодні. Також ми ставили собі за мету оцінку потенційної ефективності застосування відомих інгібіторів гістондеацетилаз людини до їх рослинних гомологів шляхом порівняння просторових структур гістондеацетилаз різного еволюційного походження, та їх взаємодій зі сполуками, що мають підтверджену активність до гістондеацетилаз людини. Це обумовлено тим, що на сьогоднішній день питання інгібування гістондеацетилаз людини є набагато більш дослідженим, і можливість застосування інгібіторів гістондеацетилаз людини до рослин сприяло б покращенню їх стресостійкості до різних абіотичних факторів, таких як засоленість, посуха тощо.

Матеріали і методи. Амінокислотні послідовності гістондеацетилаз людини, *A. thaliana* і *O. sativa* було відібрано з бази даних UniProtKB (https://www.uniprot.org/). Для відбору подібних до людських HDAC у рослин було використано інструмент пошуку базового локального вирівнювання BLAST (Camacho et al, 2009). Множинне вирівнювання послідовностей було виконано в програмному пакеті MEGA (https://www.megasoftware.net/) з використанням алгоритму ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/) (Tamura et al, 2021; Thompson et al, 1994). Реконструкцію кладистичного дерева та філогенетичний аналіз гістондеацетилаз було проведено з використанням програмного пакету MEGA згідно методу UPGMA (Hua et al, 2017). Реконструкцію просторової структури гістондеацетилази *A. thaliana* здійснювали за допомогою автоматичного режиму моделювання SWISS-MODEL, реалізованого в робочому просторі веб-сайту SWISS-MODEL (http://swissmodel.expasy.org/) (Schwede et al, 2003). Верифікацію отриманої моделі здійснювали за допомогою сервісу MolProbity (http://molprobity.biochem.duke.edu/) (Williams et al, 2018).

Особливості ліганд-білкових взаємодій, аналіз експериментально відомих та альтернативних сайтів зв'язування, аналіз поверхні та фізико-хімічних властивостей деацетилаз було досліджено за допомогою програмного пакету BIOVIA Discovery Studio Visualizer (https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer/) (Naz et al, 2018). Просторове вирівнювання структур та накладання сайтів зв'язування, а також візуалізацію результатів здійснювали за допомогою програмного пакету PyMol (https://pymol.org/2/) (Mooers, 2020). Докінг було проведено за допомогою AutoDock Vina 1.2.5 (https://github.com/ccsb-scripps/AutoDock-Vina/releases) (Eberhardt et al, 2021). Досліджувані білкові моделі було підготовлено до подальшого молекулярного докінгу шляхом оптимізації геометрії та мінімізації енергії за допомогою програмного пакету ADFR (https://ccsb.scripps.edu/adfr/) (Ravindranath et al, 2015). З баз даних ChEMBL, DrugBank та Zinc було відібрано сполуки з підтвердженою інгібіторною активністю щодо гістондеацетилаз людини. Обрані сполуки було підготовлено до проведення лі-

ганд-білкового докінгу за допомогою пакету meeko Python (https://pypi.org/project/meeko/) (Holcomb et al, 2022). Результати аналізу отримували на базі попередньо розробленої методики віртуальної організації VO CSLabGrid з використанням потужностей обчислювального Грід-кластеру інституту (http://ifbg.org.ua/uk/cslabgrid).

Результати та обговорення. Для визначення філогенетичної спорідненості було проаналізовано основні відомі на сьогодні гістондеацетилази *A. thaliana* та *O. sativa* як модельних видів дводольних та однодольних рослин. Амінокислотні послідовності гістондеацетилаз людини, *A. thaliana* та *O. sativa*, проаналізовані в даному дослідженні, наведено в табл. 1. Ці дослідження спирались на результати робіт, отриманих раніше (D'Mello, 2009; Hollender and Liu, 2008). Для класифікації гістондеацетилаз *A. thaliana* та *O. sativa* за їх гомологі-

Таблиця 1. **Перелік досліджуваних гістондеацетилаз та їх класифікація**

Фермент	UniProt ID	Організм	Класифікація
HDAC1	Q13547	*H. sapiens*	Клас I
HDAC2	Q92769	*H. sapiens*	Клас I
HDAC3	O15379	*H. sapiens*	Клас I
HDAC4	P56524	*H. sapiens*	Клас IIa
HDAC5	Q9UQL6	*H. sapiens*	Клас IIa
HDAC6	Q9UBN7	*H. sapiens*	Клас IIb
HDAC7	Q8WUI4	*H. sapiens*	Клас IIa
HDAC8	Q9BY41	*H. sapiens*	Клас I
HDAC9	Q9UKV0	*H. sapiens*	Клас IIa
HDAC10	Q969S8	*H. sapiens*	Клас IIb
HDAC11	Q96DB2	*H. sapiens*	Клас IV
SIRT1	Q96EB6	*H. sapiens*	Клас III/сиртуїни
SIRT2	Q8IXJ6	*H. sapiens*	Клас III/сиртуїни
SIRT3	Q9NTG7	*H. sapiens*	Клас III/сиртуїни
SIRT4	Q9Y6E7	*H. sapiens*	Клас III/сиртуїни
SIRT5	Q9NXA8	*H. sapiens*	Клас III/сиртуїни
SIRT6	Q8N6T7	*H. sapiens*	Клас III/сиртуїни
SIRT7	Q9NRC8	*H. sapiens*	Клас III/сиртуїни
HDA2	Q944K3	*A. thaliana*	Клас III
HDA5	Q8RX28	*A. thaliana*	Клас II
HDA6	Q9FML2	*A. thaliana*	Клас I
HDA7	Q9FH09	*A. thaliana*	Клас I
HDA8	Q94EJ2	*A. thaliana*	Некласифікований
HDA9	Q8H0W2	*A. thaliana*	Клас I
HDA10	Q9M1N8	*A. thaliana*	Некласифікований
HDA14	Q941D6	*A. thaliana*	Некласифікований
HDA15	Q8GXJ1	*A. thaliana*	Клас II
HDA18	Q8LRK8	*A. thaliana*	Клас II
HDA19	O22446	*A. thaliana*	Клас I
SRT1	Q9FE17	*A. thaliana*	сиртуїни
SRT2	Q94AQ6	*A. thaliana*	сиртуїни
HDT1	Q9FVE6	*A. thaliana*	HD-туїни
HDT2	Q56WH4	*A. thaliana*	HD-туїни
HDT3	Q9LZR5	*A. thaliana*	HD-туїни
HDT4	Q9M4T3	*A. thaliana*	HD-туїни
HDAC1	Q7Y0Y8	*O. sativa*	Некласифікований
HDAC2	Q6YV04	*O. sativa*	Некласифікований
HDAC3	Q69VQ0	*O. sativa*	Некласифікований
HDAC10	Q2QWU2	*O. sativa*	Некласифікований

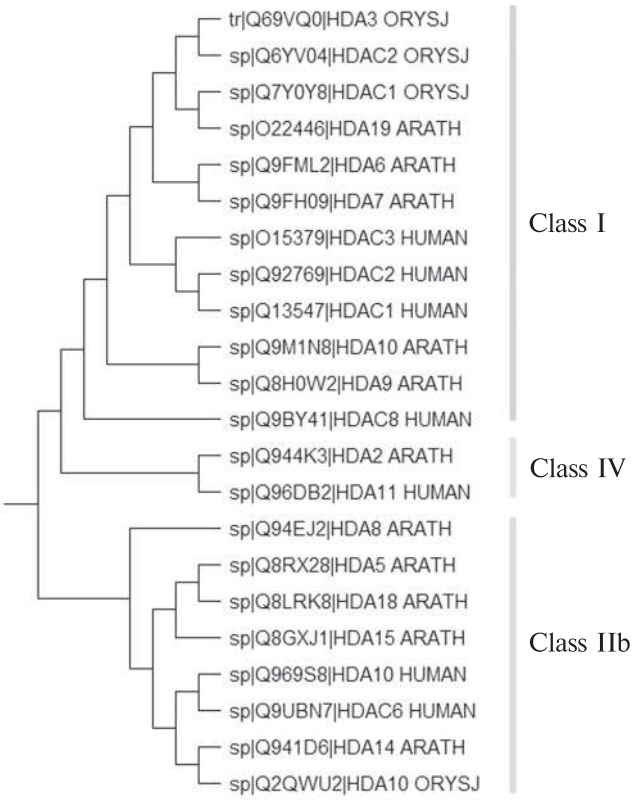

Рис. 1. Філогенетичне дерево гістондеацетилаз *A. thaliana* та *O. sativa,* споріднених до гістондеацетилаз людини

єю до гістондеацетилаз людини з бази даних UniProtKB було завантажено всі відомі анотовані послідовності гістондеацетилаз цих двох видів рослин. Після аналізу спорідненості для класичних гістондеацетилаз людини та гістондеацетилаз рослин, подібних до них, було побудовано філогенетичне дерево (рис. 1). Оскільки дані результати філогенетичного дослідження засвідчили значну консервативність каталітичних доменів, то подальші наші кроки були спрямовані на те, щоб порівняти ефективність зв'язування інгібіторів в каталітичних доменах обраних гістондеацетилаз (табл. 2).

Спершу за допомогою Blast-пошуку було проаналізовано наявність гомологічних послідовностей серед HDAC людини до відомих HDA *A. thaliana* та HDAC *O. sativa.* Виявлено, що рівні гомології гістондеацетилаз *A. thaliana* до відповідних послідовностей *H. sapiens* складають:
HDA6 (Q9FML2): HDAC1 (Q13547) – 58,9 %, HDAC2 (Q92769) – 59,4 %, HDAC3 (O15379) – 56,1 %, HDAC8 (Q9BY41) – 43,9 %;
HDA19 (O22446): HDAC1 (Q13547) – 59,3 %, HDAC2 (Q92769) – 56,1 %, HDAC3 (O15379) – 56,6 %, HDAC8 (Q9BY41) – 43,8 %;
HDA7 (Q9FH09): HDAC1 (Q13547) – 52,3 %, HDAC2 (Q92769) – 52,7 %, HDAC3 (O15379) – 40,0 %, HDAC8 (Q9BY41) – 40,6 %;
HDA9 (Q8H0W2): HDAC1 (Q13547) – 60,1 %, HDAC2 (Q92769) – 60,0 %, HDAC3 (O15379) – 57,8 %, HDAC8 (Q9BY41) – 40,0 %;
HDA5 (Q8RX28): HDAC6 (Q9UBN7) – 43,6 %;
HDA15 (Q8GXJ1): HDAC6 (Q9UBN7) – 41,4 %;
HDA18 (Q8LRK8): HDAC6 (Q9UBN7) – 41,9 %;
HDA2 (Q944K3): HDAC11 (Q96DB2) – 58,9 %;
HDA8 (Q94EJ2): HDAC6 (Q9UBN7) – 31,6 %;
HDA14 (Q941D6): HDAC10 (Q969S8) – 35,3 %;
HDA10 (Q9M1N8): HDAC1 (Q13547) – 44,9 %, HDAC2 (Q92769) – 43,9 %, HDAC3 (O15379) – 38,1 %, HDAC8 (Q9BY41) – 35,6 %;
SIR1 (Q9FE17): SIRT6 (Q8N6T7) – 50,9 %;
SRT2/SIR4 (Q94AQ6): SIRT4 (Q9Y6E7) – 42,8 %.

HD-туїни не мають гомологів серед гістондеацетилаз людини, а найближчим подібним до них білком є нуклеолін.

У випадку порівняння гістондеацетилаз *O. sativa* та гомологічних до них послідовностей *H. sapiens* ці показники складали: HDAC2 (Q6YV04): HDAC1 (Q13547) – 59,4 %, HDAC2 (Q92769) – 60,7 %, HDAC3 (O15379) – 57,0 %, HDAC8 (Q9BY41) – 43,9 %; HDAC1 (Q7Y0Y8): HDAC1 (Q13547) – 61,7 %, HDAC2 (Q92769) – 59,8 %, HDAC3 (O15379) – 59,5 %, HDAC8 (Q9BY41) – 44,1 %; HDAC3 (Q69VQ0): HDAC1 (Q13547) – 63,2 %, HDAC2 (Q92769) – 61,3 %, HDAC3 (O15379) – 59,6 %, HDAC8 (Q9BY41) – 40,3 %; HDAC10 (Q2QWU2): HDAC6 (Q9UBN7) – 35,3 %. Результати множинного вирівнювання амінокислотних послідовностей відібраних гомологів, завантажені з бази даних UniProtKB, підтвердили результати вирівнювання послідовностей методом Blast, що дає змогу припустити схожість сайтів зв'язування інгібіторів гістондеацетилаз людини та їх рослинних гомологів.

Для класичних гістондеацетилаз було побудовано філогенетичне дерево (рис. 1), на основі якого можна зробити висновки про філогенетичну спорідненість гістондеацетилаз *A. thaliana* та *O. sativa* з трьома класами HDAC людини: I, IV і IIb. До гістондеацетилаз класу I

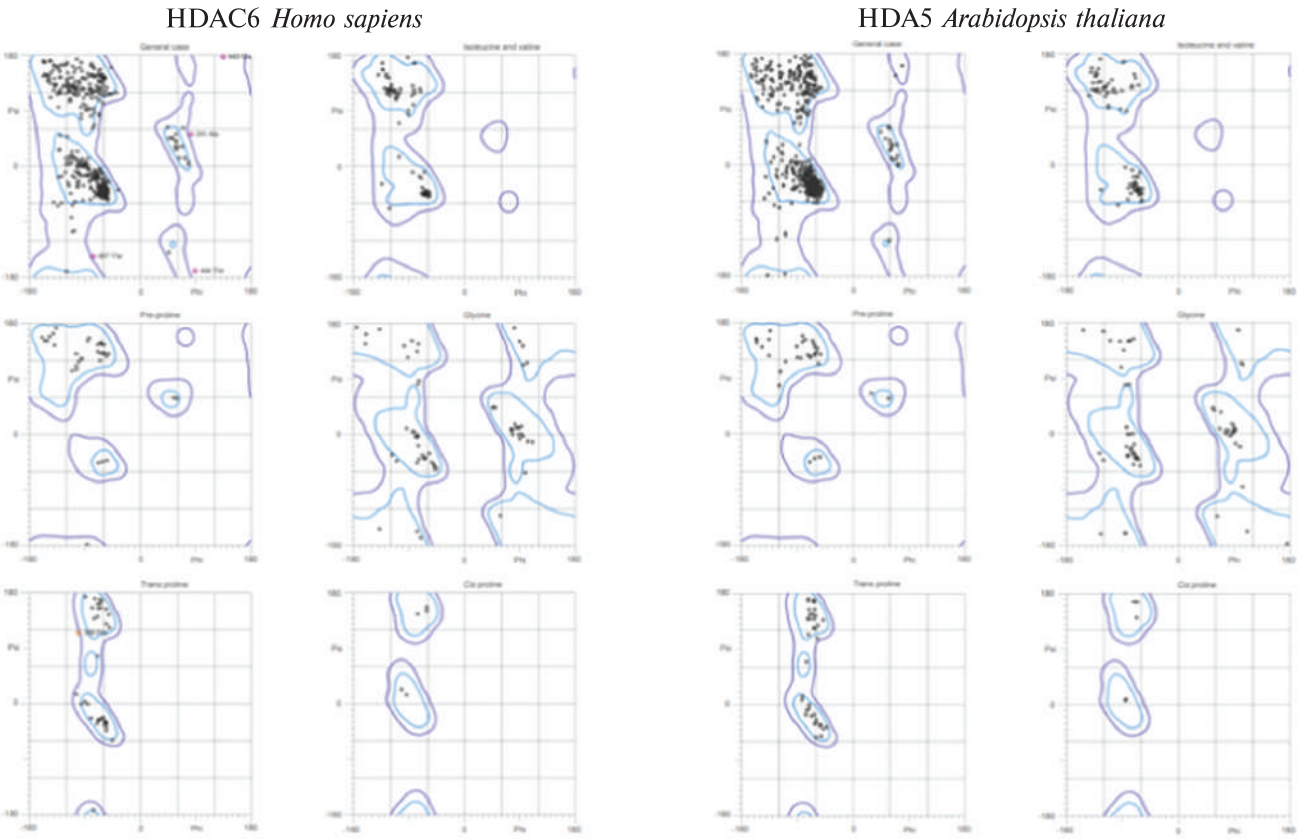

Рис. 2. Карти Рамачандрана реконструйованих моделей просторової структури HDAC6 людини та HDA5 *A. thaliana*

людини (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8) філогенетично спорідненими є гістондеацетилази HDA19, HDA6, HDA7, HDA10, HDA9 *A. thaliana* та HDAC1, HDAC2, HDAC3 *O. sativa*. До гістондеацетилази людини класу IV (HDAC11) філогенетично спорідненою є HDA2 *A. thaliana*. До гістондеацетилаз людини класу IIb (HDAC6, HDAC10) філогенетично спорідненими є гістондеацетилази HDA8, HDA5, HDA18, HDA15, HDA14 *A. thaliana* та HDAC10 *O. sativa*. Таким чином, отримані результати не лише підтверджують вже наявні (Hollender and Liu, 2008), але також дозволяють класифікувати раніше не класифіковані гістондеацетилази. Останнє стосується гомологічності HDA10 *A. thaliana* та HDAC1, HDAC2 і HDAC3 *O. sativa* до гістондеацетилаз людини класу I, а у випадку HDA8 і HDA14 *A. thaliana* та HDAC10 *O. sativa* – гомологічності до гістондеацетилаз людини класу IIb. При цьому уточнено, що дані рослинні гістондеацетилази є гомологами саме класу IIb, а не класу IIa. Отримані результати дозволяють припустити консервативність каталітичних доменів.

Щоб підтвердити припущення про консервативність каталітичних доменів гістондеацетилаз та оцінити спільність механізмів взаємодій в сайтах зв'язування з відомими інгібіторами цих ферментів, було проведено їх докінг у ці сайти двох обраних гістондеацетилаз та проведено порівняння отриманих результатів. Для докінгу та порівняння було обрано гістондеацетилазу HDAC6 людини та гістондеацетилазу HDA5 *A. thaliana*, оскільки дані гістондеацетилази мали найвищий рівень гомологічної спорідненості – 43,6 %. Проаналізувавши наявність експериментально отриманих кристалічних структур гістондеацетилаз в базі даних Protein Data Bank, було встановлено, що HDAC6 людини має всього одну кристалічну структуру (PDB ID: 5EDU), що включає два незалежних тандемних каталітичних домени у комплексі з інгібітором трихостатином А, а до HDA5 *A. thaliana* відповідних структур не було

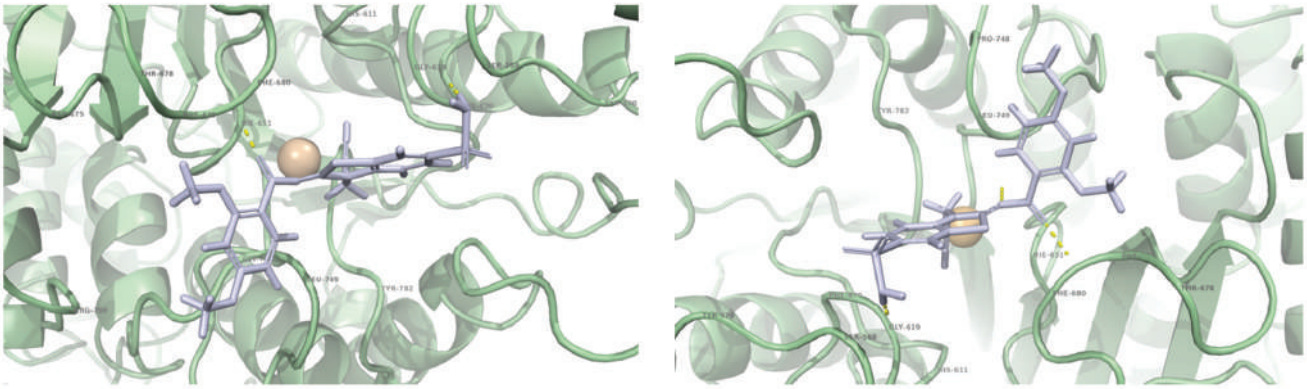

Рис. 3. Сайти зв'язування HDAC6 людини (зліва) та HDA5 *A. thaliana* (справа) з кращими хітами, отриманими з докінгу

знайдено. Для кращої якості просторової структури HDAC6 людини та за відсутності такої для HDA5 *A. thaliana* було проведено реконструкцію їх просторових структур. Якість отриманих моделей було оцінено на основі Clashscore та інших показників, що базуються на основі зв'язків, кутів та відстаней між атомами.

Для більш детального розуміння структури цих двох деацетилаз було побудовано карти Рамачандрана (рис. 2), що дозволяє візуалізувати енергетично дозволені області для двогранних кутів ψ та φ амінокислотних залишків білкового остову. Для моделювання по гомології HDA5 *A. thaliana* було розглянуто такі референси: 5G0J, 5G0I, 7QNO. З трьох отриманих моделей найкращі показники мала просторова структура по 7QNO (QMEANDisCo Global = 0,82 ± 0,05, GMQE = 0,54). Clashscore всіх атомів становила 3,26 до та 4,73 після оптимізації геометрії та мінімізації енергії. З даних, представлених на карті Рамачандрана (рис. 2) видно, що 96,1 % (731/761) усіх залишків знаходяться у привілейованих (98 %) ділянках, 100,0 % (761/761) − у дозволених (>99,8 %) ділянках, амінокислотні залишки з несприятливими двогранними кутами відсутні. HDAC6 людини реконструйовано за референсною структурою 5G0J. Clashscore = 2,32. На карті Рамачандрана фінальна структура має такі показники: 94,8 % (722/762) всіх залишків перебувають в привілейованих (98 %) ділянках; 99,3 % (757/762) всіх залишків перебувають в дозволених (> 99,8 %) ділянках. Відмічено 5 амінокислотних залишків з несприятливими двогранними кутами (phi, psi): Ala201 (82,1; 53,9), Pro308 (−101,9; 116,1), Glu443 (135,5; 179,6), Thr444 (89,5; −170,4), Thr807 (−77,1; −146,7). Таким чином, можна констатувати, що отримані результати оцінки якості просторової структури обох білків відповідають гарній якості даних моделей.

Наступним важливим кроком для розуміння подібності та відмінності в структурі розглянутих гістондеацетилаз було їх структурне

Таблиця 2. **Порівняння ефективності зв'язування інгібіторів деацетилаз, що використовуються як лікарські засоби (DrugBank), з HDAC6 *H. sapiens* та HDA5 *A. thaliana***

Назва	DrugBank ID	Рівень споріднності	
		HDAC6 *H. sapiens*	HDA5 *A. thaliana*
Панобіностат	DB06603	−6,1	−5,9
Гівіностат	DB12645	−5,8	−5,5
Беліностат	DB05015	−5,6	−5,0
Децитабін	DB01262	−5,4	−6,2
Абексіностат	DB12565	−5,3	−5,4
Фенілмасляна кислота	DB06819	−5,0	−5,3
Ентиностат	DB11841	−4,9	−5,4
Працинostат	DB05223	−4,9	−6,9
Вальпроєва кислота	DB00313	−4,8	−4,6
Ромідепсин	DB06176	−4,5	−4,1
Воріностат	DB02546	−4,5	−4,6
Буфексамак	DB13346	−4,3	−4,2
Піроксамід	DB12847	−4,1	−4,2
Пропанова кислота	DB03766	−4,0	−4,2

вирівнювання. Реконструйовані структури HDAC6 людини (Q9UBN7) та HDA5 *A. thaliana* (Q8RX28) було накладено одна на одну в PyMol (Score = 4055,000, RMSD = 0,744). За значенням середньоквадратичного відхилення (RMSD) можна стверджувати про значну подібність їх структури, особливо враховуючи, що порівняння проводиться для двох білків з різних видів організмів, які не є ідентичними за своїми послідовностями. Особлива консервативність просторових структур гістондеацетилаз зберігається в ділянці сайту зв'язування інгібіторів, а відмінності спостерігаються у невпорядкованих ділянках структур гістондеацетилаз.

Отримані білкові структури було підготовано до докінгу інгібіторів з підтвердженою активністю до гістондеацетилаз людини у відповідності до протоколів, що включало протонування, оптимізацію просторових структур та мінімізацію енергії. Сайти зв'язування для проведення такого докінгу визначались на основі комплексу HDAC6 людини з трихостатином А (PDB ID: 5EDU). З баз даних ChEMBL, DrugBank та Zinc було обрано сполуки з інгібіторною активністю до HDAC6 людини та підготовлено їх до докінгу. З 731 сполуки лігандів до активного сайту HDAC6 людини з рівнем спорідненості нижче −4,0 сіло 586 сполук (найнижчий рівень спорідненості = −6,6), HDA5 *A. thaliana* − 618 сполук (найнижчий рівень спорідненості = −6,9). Ідентичність вибірок складала 100 %. В табл. 2 наведено порівняння значень спорідненості HDAC6 *H. sapiens* та HDA5 *A. thaliana* щодо сполук з бази даних DrugBank, котрі мають підтверджену активність до гістондеацетилази типу 6 людини та застосовуються в клінічній практиці. Ґрунтуючись на наведених значеннях можна припустити, що сполуки, активні до гістондеацетилази людини типу 6, також діятимуть і на гістондеацетилазу типу 5 *A. thaliana*. Також варто зазначити, що, наприклад, прациностат (SB939) значно краще зв'язується з HDA5 *A. thaliana*, ніж з HDAC6 *H. sapiens*. Це може свідчити про актуальність розгляду відомих інгібіторів гістондеацетилаз людини щодо їх імовірного інгібування рослинних гістондеацетилаз.

Отже, можна стверджувати, що отримані результати свідчать про високу консервативність каталітичних доменів розглянутих гістондеацетилаз у різних груп організмів. Зокрема, базуючись на результатах проведеного докінгу, можна говорити про значну подібність сайтів зв'язування деацетилаз з інгібіторами у *A. thaliana* та людини. Результати аналізу ліганд-білкової взаємодії в сайтах зв'язування, значення показників спорідненості зв'язування інгібіторів з гістондеацетилазами, геометрія їх просторового розташування, свідчать про значні подібності механізмів взаємодії гістондеацетилаз різного еволюційного походження з розглянутими інгібіторами. Незначні відмінності у показниках спорідненості до інгібіторів та взаємодіях з ними, є, очевидно, пов'язаними з відмінностями амінокислотних послідовностей, проте отримані результати дозволяють припустити ефективність застосування вже відомих інгібіторів гістондеацетилаз людини до рослинних гістондеацетилаз.

Таким чином, в результаті проведених досліджень нами класифіковано гістондеацетилази *A. thaliana* та *O. sativa*, проведено оцінку консервативності їх каталітичних доменів, та перевірено універсальність застосування інгібіторів до гістондеацетилаз рослинного та тваринного походження. Зокрема, було розглянуто гістондеацетилази трьох класів і некласифіковані (HDA8, HDA10, HDA14), HD-туїни та сиртуїни *A. thaliana.* Отримані результати підтверджують дані щодо їх класифікації, а саме те, що HDA19, HDA6, HDA7 та HDA9 *A. thaliana* відносяться до класу I, HDA5, HDA15 та HDA18 − класу II, HDA2 − класу III (Liu et al, 2014). Разом з тим, отримані нами дані також доповнюють інформацію щодо класифікації рослинних гістондеацетилаз, класифікуючи ці гістондеацетилази *A. thaliana* та *O. sativa*, які на сьогоднішній день не були класифіковані.

Окрім того, отримані результати дозволяють оцінити гомологічну спорідненість сиртуїнів та HD-туїнів до їх гомологів в організмі людини. Згідно даних гомології та філогенії HDA8 і HDA14 подібні до класу IIb людини, а отже їх можна віднести до класу II гістондеацетилаз типу II *A. thaliana*, а HDA10 є подібним до кла-

су I гістондеацетилаз людини, що, відповідно, мають гомологічні та філогенетичні ознаки збереження послідовності з класом I типу I *A. thaliana*. Продемонстровано, що HD-туїни взагалі не мають спільних ознак з гістондеацетилазами людини, а їх найближчим гомологом в організмі людини є нуклеолін. На сьогоднішній день відомо два сиртуїни *A. thaliana* (SIR1/SRT1 та SIR4/SRT2), які є гомологами SIRT6 та SIRT4 людини відповідно.

Згідно до даних UniProtKB виявлено лише чотири гістондеацетилази *O. sativa* (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC10). Ці гістондеацетилази класифіковано нами відповідно до їх гомології з гістондеацетилазами людини і на основі реконструкції філогенетичного дерева класичних гістондеацетилаз людини, *A. thaliana* та *O. sativa*. Встановлено, що HDAC1, HDAC2 та HDAC3 *O. sativa* є гомологічними до гістондеацетилаз людини класу I, а HDAC10 має спільні ділянки збереження послідовності з гістондеацетилазами людини класу IIb.

З метою з'ясування консервативності каталітичних доменів гістондеацетилаз різного еволюційного рівня було реконструйовано HDAC6 людини та HDA5 *A. thaliana*. Продемонстрована значна схожість просторової структури обох гістондеацетилаз та майже ідентичність ділянок поблизу активного сайту. Для підтвердження загальних особливостей взаємодій в сайті зв'язування гістондеацетилаз з їх інгібіторами було доковано вже відомі інгібітори до сайту зв'язування з інгібіторами HDAC6 людини та HDA5 *A. thaliana*. Оскільки нині вже відомо про значну кількість клінічних випробувань із залученням інгібіторів гістондеацетилаз людини, механізми взаємодії цих ефекторів, особливості їх структури, основні класи сполук, що можуть мати інгібуючий ефект на різні класи гістондеацетилаз людини є добре вивченими. Інгібітори HDAC людини зазвичай класифікуються як похідні гідроксамової кислоти, бензаміди, похідні карбонової кислоти, електрофільні кетони та циклічні пептиди. Структура фармакофору інігіторів гістондеацетилаз складається з фрагменту, що зв'язує метал, лінкеру, та поверхневого фрагменту, відповідального за розпізнавання, який містить полярну сполучну одиницю та гідрофобну кришку (Bondarev et al, 2021). Основною задачею в розробці інгібіторів до гістондеацетилаз людини лишається отримання селективних інгібіторів, оскільки переважна більшість відомих інгібіторів є pan-HDACis (від HDACs inhibitors) (Yang et al, 2019), тобто такими, що ефективно діють на всі класичні гістондеацетилази людини. В той же час інгібування гістодеацетилаз рослин є питанням менш дослідженим, хоча на сьогоднішній день і існують певні експериментальні дослідження з цього питання, наприклад, відомо про інгібуючу дію на гістондеацетилази рослин алелохімічних речовин, отриманих із загального класу ексудатів коренів, які є циклічними гідроксамовими кислотами (Venturelli et al, 2015).

Отримані нами результати підтверджують спільність механізмів зв'язування інгібіторів в активному сайті гістондеацетилаз різного походження та дозволяють з високою вірогідністю припустити, що відомі інгібітори до гістондеацетилаз людини, а також селективні інгібітори до HDAC6 людини, матимуть інгібуючий ефект і на HDA5 *A. thaliana* та, можливо, інші відповідні гістондеацетилази *A. thaliana* та *O. sativa*, оскільки більшість інгібіторів є pan-HDACis.

Дотримання етичних стандартів. Стаття не містить жодних досліджень, які були виконані з використанням лабораторних препаратів, клітинних ліній або інтактних організмів тварин чи людини.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність будь-якого конфлікту інтересів.

Фінансування. Робота виконана в рамках бюджетної теми Національної академії наук України (номер державної реєстрації 0120U100937, 2020-24)

PLANT HISTONE DEACETYLASES: THEIR CLASSIFICATION AND INHIBITOR SEARCH

M.M. Stykhylias, O.V. Rayevsky, Ya.B. Blume

Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine,
Baidy-Vyshnevetskoho St., 2A, Kyiv, Ukraine, 04123

E-mail: *stihilia@gmail.com; **cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net

Histone deacetylases constitute a family of enzymes pivotal in regulating numerous crucial cellular processes in both plant and animal cells. Plant histone de-

acetylases have been considerably less investigated in comparison to their human counterparts. This study aims to provide an in-depth characterization of histone deacetylases in two model plant species – *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. Phylogenetic analysis of their relationship to known human homologs has revealed their alignment with three classes of human histone deacetylases. Notably, the highest sequence homology among histone deacetylases from different evolutionary origins was observed between human HDAC6 and *A. thaliana* HDA5 (43.6 % homology). Structural alignment results highlight the conservation of catalytic domains and demonstrate a high affinity of inhibitors for both histone deacetylases. Ligand-protein docking studies confirmed the high affinity of human histone deacetylase inhibitors for *A. thaliana* HDA5. These findings suggest the potential efficacy of human histone deacetylase inhibitors in modulating plant histone deacetylases, thereby enhancing growth regulation, development, and stress resistance in plants.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Bondarev AD, Attwood MM et al (2021) Recent developments of HDAC inhibitors: Emerging indications and novel molecules. British J Clin Pharmacol 87(12):4577–4597. https://doi.org/10.1111/bcp.14889

Camacho C, Coulouris G, Avagyan V et al (2009) BLAST+: architecture and applications. BMC Bioin-formatics 10:421. https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421

Chen X, Lu L, Mayer KS et al (2016) POWERDRESS interacts with HISTONE DEACETYLASE 9 to promote aging in Arabidopsis. Elife 5:e17214. https://doi.org/10.7554/eLife.17214

Chen X, Ding AB, Zhong X (2020) Functions and mechanisms of plant histone deacetylases. Sci China Life Sci 63(2):206–216. https://doi.org/10.1007/s11427-019-1587-x

Chinellato M, Perin S, Carli A et al (2024) Folding of class IIa HDAC derived peptides into α-helices upon binding to myocyte enhancer factor-2 in complex with DNA. J Mol Biol 436(9):168541. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2024.168541

D'Mello SR (2009) Histone deacetylases as targets for the treatment of human neurodegenerative diseases. Drug News Perspect 22(9):513–524. https://doi.org/10.1358/dnp.2009.9.1428871

Eberhardt J, Santos-Martins D, Tillack AF, Forli S (2021) AutoDock Vina 1.2.0: new docking methods, expanded force field, and Python bindings. J Chem Inf Model 61(8):3891–3898. https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203

Farsetti A, Illi B, Gaetano C (2023) How epigenetics impacts on human diseases. Eur J Intern Med 114:15–22. https://doi.org/10.1016/j.ejim.2023.05.036

Fischer F, Alves Avelar LA (2021) A short overview of resistance to approved histone deacetylase inhibitors. Future Med Chem 13(14):1153–1155. https://doi.org/10.4155/fmc-2021-0102

Haberland M, Montgomery RL, Olson EN (2009) The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. Nat Rev Genet 10(1):32–42. https://doi.org/10.1038/nrg2485

Han Z, Yu H, Zhao Z et al (2016) AtHD2D gene plays a role in plant growth, development, and response to abiotic stresses in *A. thaliana*. Front Plant Sci 7:310. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00310

Hartl M, Füßl M, Boersema PJ et al (2017) Lysine acetylome profiling uncovers novel histone deacetylase substrate proteins in Arabidopsis. Mol Syst Biol 13(10):949. https://doi.org/10.15252/msb.20177819

Holcomb M, Santos-Martins D, Tillack AF, Forli S (2022) Performance evaluation of flexible macrocycle docking in AutoDock. QRB Discov 3:e18. https://doi.org/10.1017/qrd.2022.18

Hollender C, Liu Z (2008) Histone deacetylase genes in Arabidopsis development. J Integr Plant Biol 50 (7):875–885.https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00704.x

Hua GJ, Hung CL, Lin CY et al (2017) MGUPGMA: A fast UPGMA algorithm with multiple graphics processing units using NCCL. Evol Bioinform Online 13:1176934317734220. https://doi.org/10.1177/1176934317734220

Krogan NT, Hogan K, Long JA (2012) APETALA2 negatively regulates multiple floral organ identity genes in Arabidopsis by recruiting the co-repressor TOPLESS and the histone deacetylase HDA19 Development 139(22):4180–4190. https://doi.org/10.1242/dev.085407

Lee HG, Seo PJ (2019) MYB96 recruits the HDA15 protein to suppress negative regulators of ABA signaling in Arabidopsis. Nat Commun 10(1):1713. https://doi.org/10.1038/s41467-019-09417-1

Lee SH, Farh ME, Lee J et al (2021) A Histone deacetylase, *Magnaporthe oryzae* RPD3, regulates reproduction and pathogenic development in the rice blast fungus. mBio 12(6):e0260021. https://doi.org/10.1128/mBio.02600-21

Li Y, Shin D, Kwon SH (2013) Histone deacetylase 6 plays a role as a distinct regulator of diverse cellular processes. FEBS J 280(3):775–793. https://doi.org/10.1111/febs.12079

Liu C, Li LC, Chen WQ et al (2013) HDA18 affects cell fate in Arabidopsis root epidermis via histone acetylation at four kinase genes. Plant Cell 25(1):257–269. https://doi.org/10.1105/tpc.112.107045

Liu X, Chen CY, Wang KC et al (2013) PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3 associates with the histone deacetylase HDA15 in repression of chlorophyll biosynthesis and photosynthesis in

etiolated Arabidopsis seedlings. Plant Cell 25(4):1258–1273. https://doi.org/10.1105/tpc.113.109710
Liu X, Yang S, Zhao M et al (2014) Transcriptional repression by histone deacetylases in plants. Mol Plant 7(5):764–772. https://doi.org/10.1093/mp/ssu033
Luo M, Tai R, Yu CW et al (2015) Regulation of flowering time by the histone deacetylase HDA5 in Arabidopsis. Plant J 82(6):925–936. https://doi.org/10.1111/tpj.12868
Luo M, Wang YY, Liu X et al (2012a) HD2C interacts with HDA6 and is involved in ABA and salt stress response in Arabidopsis J Exp Bot 63(8):3297–3306. https://doi.org/10.1093/jxb/ers059
Luo M, Yu CW, Chen FF et al (2012b) Histone deacetylase HDA6 is functionally associated with AS1 in repression of KNOX genes in arabidopsis. PLoS Genet 8(12):e1003114. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003114
Mooers BHM (2020) Shortcuts for faster image creation in PyMOL. Protein Sci, 29(1):268–276. https://doi.org/10.1002/pro.3781
Naz F, Khan FI, Mohammad T et al (2018) Investigation of molecular mechanism of recognition between citral and MARK4: A newer therapeutic approach to attenuate cancer cell progression. Int J Biol Macromol 107:2580–2589. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.143
Olenieva VD, Lytvyn DI, Yemets AI, Blume YaB (2017) Influence of sucrose starvation, osmotic and salt stresses on expression profiles of genes involved in the development of autophagy by means of microtubules. Bull Vavilov Soc Genet Breed Ukraine. 15(2): 174–180. https://doi.org/https://doi.org/10.7124/visnyk.utgis.15.2.876
Ravindranath PA, Forli S, Goodsell DS et al (2015) AutoDockFR: advances in protein-ligand docking with explicitly specified binding site flexibility. PLoS Comput Biol 11(12):e1004586. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004586
Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server Nucl Acid Res 31(13):3381–3385. https://doi.org/10.1093/nar/gkg520
Shen Y, Lei T, Cui X et al (2019) Arabidopsis histone deacetylase HDA15 directly represses plant response to elevated ambient temperature. Plant J 100(5):991–1006. https://doi.org/10.1111/tpj.14492
Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. Mol Biol Evol 38(7):3022–3027. https://doi.org/10.1093/molbev/msab120
Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl Acid Res 22(22):4673–4680. https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673
Tran HT, Nimick M, Uhrig RG et al (2012) *Arabidopsis thaliana* histone deacetylase 14 (HDA14) is an α-tubulin deacetylase that associates with PP2A and enriches in the microtubule fraction with the putative histone acetyltransferase ELP3. Plant J 71(2):263–272
Ueda M, Matsui A, Tanaka M et al (2017) The distinct roles of class I and II RPD3-like histone deacetylases in salinity stress response. Plant Physiol 175(4):1760–1773. https://doi.org/.1104/pp.17.01332
van der Woude LC, Perrella G, Snoek BL et al (2019) HISTONE DEACETYLASE 9 stimulates auxin-dependent thermomorphogenesis in *A. thaliana* by mediating H2A.Z depletion. Proc Natl Acad Sci USA 116(50):25343–25354. https://doi.org/10.1073/pnas.1911694116
Venturelli S, Belz RG, Кдmper A et al (2015) Plants release precursors of histone deacetylase inhibitors to suppress growth of competitors. Plant Cell 27(11):3175–3189. https://doi.org/10.1105/tpc.15.00585
Williams CJ, Headd JJ, Moriarty NW et al (2018) MolProbity: More and better reference data for improved allatom structure validation Protein Sci 27(1):293–315. https://doi.org/10.1002/pro.3330
Wu QJ, Zhang TN, Chen HH et al (2022) The sirtuin family in health and disease. Signal Transduct Target Ther 7(1):402. https://doi.org/10.1038/s41392-022-01257-8
Xu CR, Liu C, Wang YL et al (2005) Histone acetylation affects expression of cellular patterning genes in the Arabidopsis root epidermis. Proc Natl Acad Sci USA 102(40):14469–14474. https://doi.org/10.1073/pnas.0503143102
Yang F, Zhao N, Ge D, Chen Y (2019) Next-generation of selective histone deacetylase inhibitors. RSC Adv 9(34):19571–19583. https://doi.org/10.1039/c9ra02985k
Yang XJ, Seto E (2008) The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. Nat Rev Mol Cell Biol 9(3):206–218. https://doi.org/10.1038/nrm2346
Yu CW, Liu X, Luo M et al (2011) HISTONE DEACETYLASE6 interacts with FLOWERING LOCUS D and regulates flowering in Arabidopsis. Plant Physiol 156(1):173–184. https://doi.org/10.1104/pp.111.174417
Zhao L, Peng T, Chen CY et al (2019) HY5 Interacts with the histone deacetylase HDA15 to repress hypocotyl cell elongation in photomorphogenesis. Plant Physiol 180(3):1450–1466. https://doi.org/10.1104/pp.19.00055
Zheng Y, Ding Y, Sun X et al (2016) Histone deacetylase HDA9 negatively regulates salt and drought stress responsiveness in Arabidopsis. J Exp Bot 67(6):1703–1713. https://doi.org/10.1093/jxb/erv562

Надійшла в редакцію 01.06.2024
Після доопрацювання 15.06.2024
Прийнята до друку 18.09.2024