

β-ТУБУЛІН *FUSARIUM* ЯК ПОТЕНЦІЙНА МІШЕНЬ ДЛЯ ПРОЯВУ АНТИГРИБНОЇ АКТИВНОСТІ ІВЕРМЕКТИНУ

Є.О. КУСТОВСЬКИЙ^{1,2}, А.Ю. БУЗІАШВІЛІ¹, С.П. ОЖЕРЄДОВ¹, Я.Б. БЛЮМ¹, А.І. ЄМЕЦЬ^{1,2}

¹ Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України, Україна, Київ, 04123, Україна

² Національний університет «Києво-Могилянська Академія», Київ, 04070, Україна

E-mail: ykustovskiy@gmail.com, yemets.alla@nas.gov.ua

Проведено аналіз впливу івермектину на фітопатогенні штами *Fusarium graminearum* (F-55644, F-55748) та *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (F-52897, F-55547,) у результаті чого було встановлено його концентрації, за яких спостерігався фунгістатичний ефект на ріст колоній зазначених штамів (2 та 3 мг/мл). Виявлено, що штами *F. oxysporum* загалом мали вищу чутливість до дії івермектину, ніж штами *F. graminearum*. Оскільки відомо, що івермектин здатен взаємодіяти з β-тубуліном, викликаючи стабілізацію мікротрубочок, для пояснення отриманих результатів було побудовано 3-вимірну модель комплексу цієї речовини з β-тубуліном *Fusarium* та визначено індуковані івермектином зміни у конформації β-тубуліну, до яких, зокрема, належить стабілізація та спіралізація M-петлі молекули β-тубуліну. Цей структурний елемент β-тубуліну відіграє важливу роль у латеральних контактах між субодиницями тубуліну прилеглих протофіламентів у складі мікротрубочки. Підвищення впорядкованості M-петлі є типовою ознакою зв'язування стабілізуючих мікротрубочки агентів з таксановим сайтом β-тубуліну, що свідчить про можливість стабілізуючого впливу івермектину на мікротрубочки *Fusarium*. Отримані результати дозволяють розглядати івермектин чи його похідні у якості потенційних сполук з фунгіцидною активністю.

Ключові слова: івермектин, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, β-тубулін, таксановий сайт, зв'язування івермектину, фунгіцидний ефект.

Вступ. *Fusarium graminearum* Schwabe та *F. oxysporum* Schldtl. належать до найпоширеніших грибних патогенів, що вражають важливі зернові (*F. graminearum*) та овочеві (*F. oxysporum*) культури, призводячи до значних втрат врожаю, знижуючи якість продукції та її без-

печність (Sampaio et al, 2020; Bernhoft et al, 2022). Через розвиток резистентності до традиційних фунгіцидів, що застосовують для контролю фітопатогенних грибів роду *Fusarium* (карбендазим, дазомет, хлоропікрин тощо), виникає потреба пошуку нових ефективних фунгіцидних агентів, безпечних для здоров'я людини та навколишнього середовища. Відомий антипаразитичний агент івермектин загалом вважається безпечним для людини та ссавців через його нездатність долати гематоенцефалічний бар'єр за терапевтичних концентрацій, що у поєднанні з потужною нематоцидною та інсектицидною активністю івермектину призвело до його широкого застосування у ветеринарії та медицині (Crump, 2017; Löscher, 2023). Івермектин є сумішшю двох близьких за своєю структурою молекул: головного компонента 22,23-дигідроівермектину В1а (~90 %) та мінорного – 22,23-дигідроівермектину В1b, що відрізняються у алкільній групі. Хоча обидва компоненти є біологічно активними, через переважання компонента В1а у суміші саме його взаємодії з біологічними макромолекулами є детально описаними.

Вважається, що основними молекулярними мішенями івермектину є глутамат-залежні рецептори нематод та ГАМК-залежні рецептори комах (Martin et al, 2020), але останнім часом були ідентифіковані нові його внутрішньоклітинні мішені (Crump, 2017), зокрема, тубулін мікротрубочок, як це було нещодавно продемонстровано для тубуліну *Haemonchus contortus* (Ashraf et al, 2015). Відповідно до запропонованого механізму стабілізації мікротрубочок івермектин зв'язується з таксановим сайтом β-тубуліну та викликає

конформаційні зміни, що призводять до зміцнення латеральних контактів між субодинами тубуліну. Враховуючи високу консервативність тубуліну (Blume et al, 2010; Breviario et al, 2013; Lykholat et al, 2022), можна припустити, що івермектин може зв'язуватись з β -тубуліном інших еукаріотичних організмів, у тому числі фітопатогенних грибів, що робить важливим дослідження його можливих антигрибних властивостей. У той час як вплив івермектину на гриби-нематофаги є відносно добре дослідженим через сумісні стратегії застосування (Ferraz et al, 2019; Lima et al, 2020), його вплив на фітопатогенні гриби практично не вивчався. Відомо про інгібуючий ефект івермектину у високих концентраціях на біомасу, продукцію та проростання спор *F. oxysporum* та *F. solani* за довготривалої експозиції (Kollmann et al, 2003). У попередньому дослідженні нами було визначено чутливість до івермектину двох штамів *F. graminearum* F-55756 та *F. oxysporum* F-54635, в умовах *in vitro* (Kustovskiy et al, 2022). Нами було встановлено антигрибну активність івермектину, що послугувало підставою для подальшого визначення чутливості до івермектину інших штамів *F. graminearum* та *F. oxysporum*, а також з'ясування механізмів дії івермектину у клітинах цих організмів. Отже, метою цього дослідження було визначення чутливості штамів *F. graminearum* F-55644, F-55748 та *F. oxysporum* F-52897, F-55547, f. sp. *lycopersici* до івермектину, а також з'ясування можливості зв'язування івермектину з β -тубуліном *Fusarium* як однієї з потенційних мішеней для реалізації його внутрішньоклітинної дії.

Матеріали і методи. Штами *Fusarium* та умови вирощування. Штами *F. graminearum* (F-55644, F-55748) та *F. oxysporum* (F-52897, F-55547) були отримані з Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Штам *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* був люб'язно наданий співробітниками кафедри екобіотехнології та біорізноманіття Національного університету біоресурсів та природокористування (д.б.н В.В. Бородай). Досліджувані штами вирощували у темряві в асептичних умовах при температурі 26 °C на картопляно-декстрозному середовищі (КДС) (Westphal et al, 2021). Штами

пересаджували за допомогою фрагментації, для чого фрагмент міцелію видаляли за допомогою металевого циліндру діаметром 5 мм з периферії колонії, переносили та розміщували на поверхні середовища КДС по центру чашки Петрі (d = 90 мм).

Визначення чутливості штамів *F. graminearum* та *F. oxysporum* до івермектину. У дослідженні використовували 22,23-дигідроівермектин В1а («Sigma-Aldrich», США), який розчиняли у диметилсульфоксиді (ДМСО), а stokові та робочі розчини зберігали у темряві при температурі 2–8 °C. Для встановлення чутливості штамів *F. graminearum* та *F. oxysporum* до івермектину використовували метод дифузії в агар (Balouiri et al, 2016). Для цього у середовищі робили чотири рівновіддалені від центру чашки Петрі заглиблення, в які вносили по 100 мкл розчину івермектину в досліджуваній концентрації та ДМСО (як негативний контроль), як показано на рис. 1.

Після висаджування фрагменту міцелію по центру чашки Петрі його вирощували впродовж 7 діб; колонії потім фотографували. Отримані знімки аналізували за допомогою програми ImageJ v.2.9.0/1.54b (Schindelin et al, 2012), обраховуючи, зокрема, зміни у площі вирощених колоній штамів під впливом івермектину в різних концентраціях, на основі яких вираховували відсоток площ колоній від площ колоній у контролі (КДС). Досліди закладали у трикратній повторності для івермектину у кожній з досліджуваних концентрацій (0,25; 0,5; 1, 2 та 3 мг/мл) та відповідних концентрацій ДМСО. Результати визначення чутливості штамів *F. graminearum* F-55644, F-55748 та *F. oxysporum* F-52897, F-55547, f. sp. *lycopersici* порівнювали з результатами визначення чутливості штамів *F. graminearum* F-55756 та *F. oxysporum* F-54635, отриманими нами раніше (Kustovskiy et al, 2022).

Моделювання зв'язування івермектину з β -тубуліном *Fusarium*. Враховуючи, що послідовності β 1-тубуліну *F. graminearum* та *F. oxysporum* є ідентичними, у дослідженні використовували модель β 1-тубуліну *F. graminearum* PH-1, створену за допомогою AlphaFold Monomer v2.0 (Jumper et al, 2021) та завантажену з бази даних UniProtKB (id: Q4HZS8). Після проведення динаміки вільного білка було здійсне-

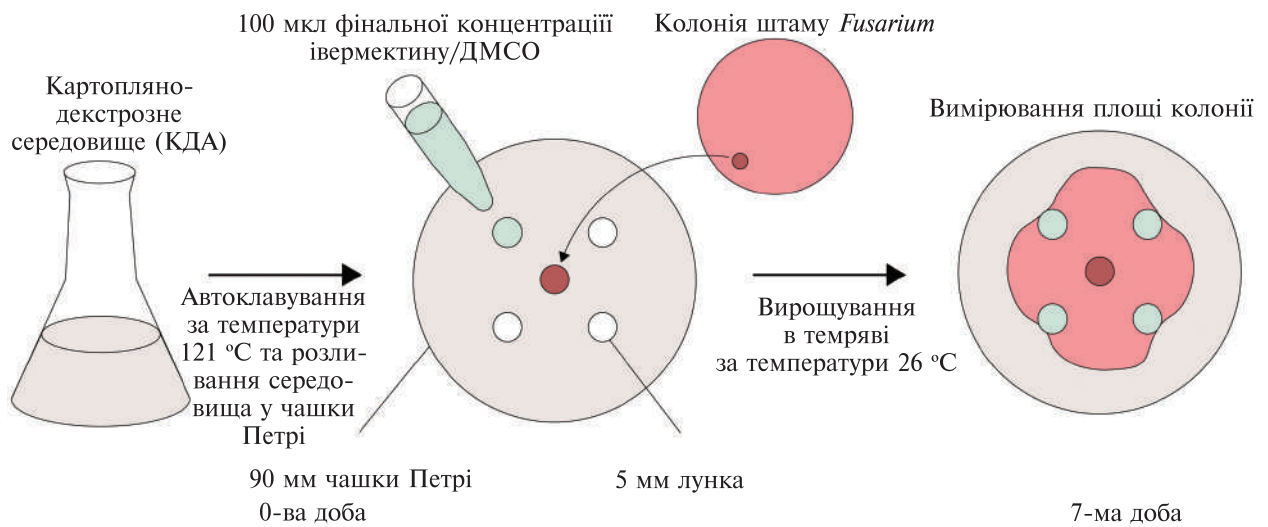


Рис. 1. Схематичне зображення дослідження з визначення чутливості штамів *F. graminearum* та *F. oxysporum* до івермектину

но кластерний аналіз конформаційних станів таксанового сайту стабільної ділянки траєкторії. Центральні структури кожного з отриманих кластерів були проаналізовані у режимі Binding Site Mode SeeSAR v. 13.0.0 (SeeSAR version 13.0.0; BioSolveIT GmbH, Sankt Augustin, Germany, 2023, www.biosolveit.de/SeeSAR) із застосуванням алгоритмів, описаних раніше (Volkamer et al, 2010; 2012). Структуру β 1-тубуліну з найоптимальнішим варіантом розкриття сайту використовували для молекулярного докінгу. Для моделювання зв'язування івермектину з тубуліном використовували пакет GOLD v.5.3 (Jones et al, 1997). Структуру 22,23-дигідро-івермектину B1a (PDB: івермектин; IUPAC Name: (1R,4S,5'S,6R,6'R,8R,10E,12S,13S,14E,16E,20R,21R,24S)-6'-[(2S)-butan-2-yl]-21,24-dihydroxy-12-[(2R,4S,5S,6S)-5-[(2S,4S,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-4-methoxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-5',11,13,22-tetramethylspiro[3,7,19-trioxatetracyclo[15.6.1.14,8.020,24]pentacos-10,14,16,22-tetraene-6,2'-oxane]-2-one) було видобуто з комплексу глутамат-залежного α -гомопентамерного хлоридного рецептору *Caenorhabditis elegans*, доступного у PDB через ідентифікатор 3RI5. Перед проведенням напівгнучкого молекулярного докінгу записи зв'язків молекули івермектину було виправлено у режимі Molecule Editor SeeSAR, молекулу було репротоновано, а геометрію її

структури оптимізовано. Було здійснено 100 ітерацій генетичного алгоритму; при цьому для скорингу використовували стандартну функцію ChemPLP (Korb et al, 2009), а для рескорингу – ASP (Mooij and Verdonk, 2005). Отримані рішення було проаналізовано у Analyzer Mode SeeSAR, у якому відносні афінності комплексів були встановлені з використанням скорингу HYDE (Schneider et al, 2012). Комплекс з найвищою стабільністю за результатами скорингу було використано для проведення молекулярно-динамічної симуляції.

Молекулярно-динамічні симуляції та аналіз траєкторій. Молекулярно-динамічні (MD) симуляції здійснювали за допомогою пакету GROMACS v. 2022.4 (Abraham et al, 2015). Обчислювальні ресурси для проведення MD було отримано з використанням потужностей Українського Національного Гріда (UNG) та кластеру віртуальної організації CSLabGrid Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України (<http://www.ifbg.org.ua/uk/cslab-grid>) (Karpov et al, 2015). У симуляціях використовували силове поле CHARMM36 з відповідними налаштуваннями PME (Huang and MacKerell, 2013). Топології івермектину для силового поля було згенеровано за допомогою серверу SwissParam (Zoete et al, 2011). Як розчинник було використано рекомендовану для силового поля триточкову модель води (TIP3P),

при цьому для імітації фізіологічних умов та нейтралізації заряду у систему також було додано іони Na^+ та Cl^- . Перед продуктивною молекулярною динамікою система була мінімізована та пройшла двоетапну еквілібрацію з відтворенням спочатку канонічного (NVT), а потім ізотермально-ізобаричного ансамблю (NPT), кожен з яких підтримувався впродовж 100 пс; NPT етап еквілібрації був продовжений для продуктивної MD довжиною у 100 нс. Для контролю за температурою в усіх симуляціях використовували V-rescale термостат з референтною температурою 300 К. Для набору тиску в 100 кПа на NPT етапі еквілібрації використовували S-rescale баростат, а для підтримання рівномірного тиску у системі під час продуктивної молекулярної динаміки – Parinello-Rahman barostat. Енергії та координати записували кожні 10 пс.

Досягнення рівноважного стану таксанового сайту вільного тубуліну та комплексу тубуліну з івермектином визначали з урахуванням середньоквадратичного відхилення (RMSD) стабільних елементів третинної структури білка на кожному фреймі від елементів початкової структури; часових змін у кількості водневих зв'язків (відсічка 0,35 нм); часових змін у кількості сольових мостів (відсічки 0,40 та 0,32 нм). Аналіз RMSD, середньоквадратичних флуктуацій (RMSF) та кластерний аналіз траєкторій (метод gromos; відсічка 0,10 нм) проводили за допомогою аналітичних програм пакету GROMACS. Зміни у кількості та стійкості окремих водневих зв'язків аналізували за допомогою скрипту, написаного на мові програмування Python з використанням бібліотеки з відкритим кодом (GNU General Public License версія 2 та вище) MDAnalysis v. 2.5.0 (<https://www.mdanalysis.org/>) (Michaud-Agrawal et al, 2011; Gowers et al, 2016; Smith et al, 2019), та доступного у репозитарії за посиланням <https://github.com/YevhenKustovskiy/md-scripts>.

Статистичний аналіз. Статистичний аналіз отриманих результатів проводили за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA).

Результати і обговорення. Тестування чутливості *F. graminearum* та *F. oxysporum* до івермектину. У результаті *in vitro* експериментів було встановлено інгібуючий вплив івер-

мектину у концентраціях 2 та 3 мг/мл на ріст і розвиток колоній досліджуваних штамів *F. graminearum* та *F. oxysporum* (рис. 2). При використанні івермектину у концентраціях 0,25; 0,5 та 1 мг/мл суттєвих змін ростових показників колоній досліджуваних штамів не спостерігали. Також у жодного штаму не спостерігали суттєвого сповільнення росту колоній при вирощуванні їх на середовищах з ДМСО у відповідних концентраціях (рис. 2, б). Водночас у колоній штамів *F. graminearum* F-55644 та F-55756, що зазнали впливу ДМСО, спостерігали зміну кольору міцелію у порівнянні з контролем (рис. 2, а). У штамів *F. graminearum* F-55756, *F. oxysporum* F-54635 та *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* також спостерігали зменшення об'єму поверхневого міцелію. Попри наведені фізіологічні зміни зон затримок росту внаслідок впливу ДМСО не відзначалось, що дозволяє пов'язати фунгістатичний ефект, який спостерігався при використанні івермектину у концентраціях 2 та 3 мг/мл, виключно з дією івермектину.

Відповідно до результатів ANOVA відмінності між середніми значеннями утворених площ колоній за дії івермектину (2 та 3 мг/мл) виявилися статистично значимими для всіх штамів, а найбільшу різницю у середніх значеннях спостерігали для штамів *F. graminearum*. Зокрема, штами F-55644 та F-55756 виявились, як і попередньо нами було показано (Kustovskiy et al, 2022), найбільш стійкими до дії івермектину з усіх досліджених штамів, а штам F-55748, навпаки, є найчутливішим. Також нами встановлено, що штами *F. oxysporum* (F-52897, F-54635, F-55547) загалом є чутливішими до дії івермектину, ніж штами *F. graminearum*. Штам *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, для якого спостерігалася більша вираженість фунгістатичного ефекту івермектину (особливо помітного за концентрації 3 мг/мл), є другим за чутливістю до івермектину штамом після *F. graminearum* F-55748. До інших ознак антигрибного впливу івермектину належить втрата кольору міцелію у колоній штамів F-55644 та F-55756 *F. graminearum*, на ростові показники яких івермектин мав найменший вплив (рис. 2 та 3). Однак, необхідно відмітити, що зміну кольору міцелію цих штамів також спостерігали і під впливом ДМСО, але вона була менш

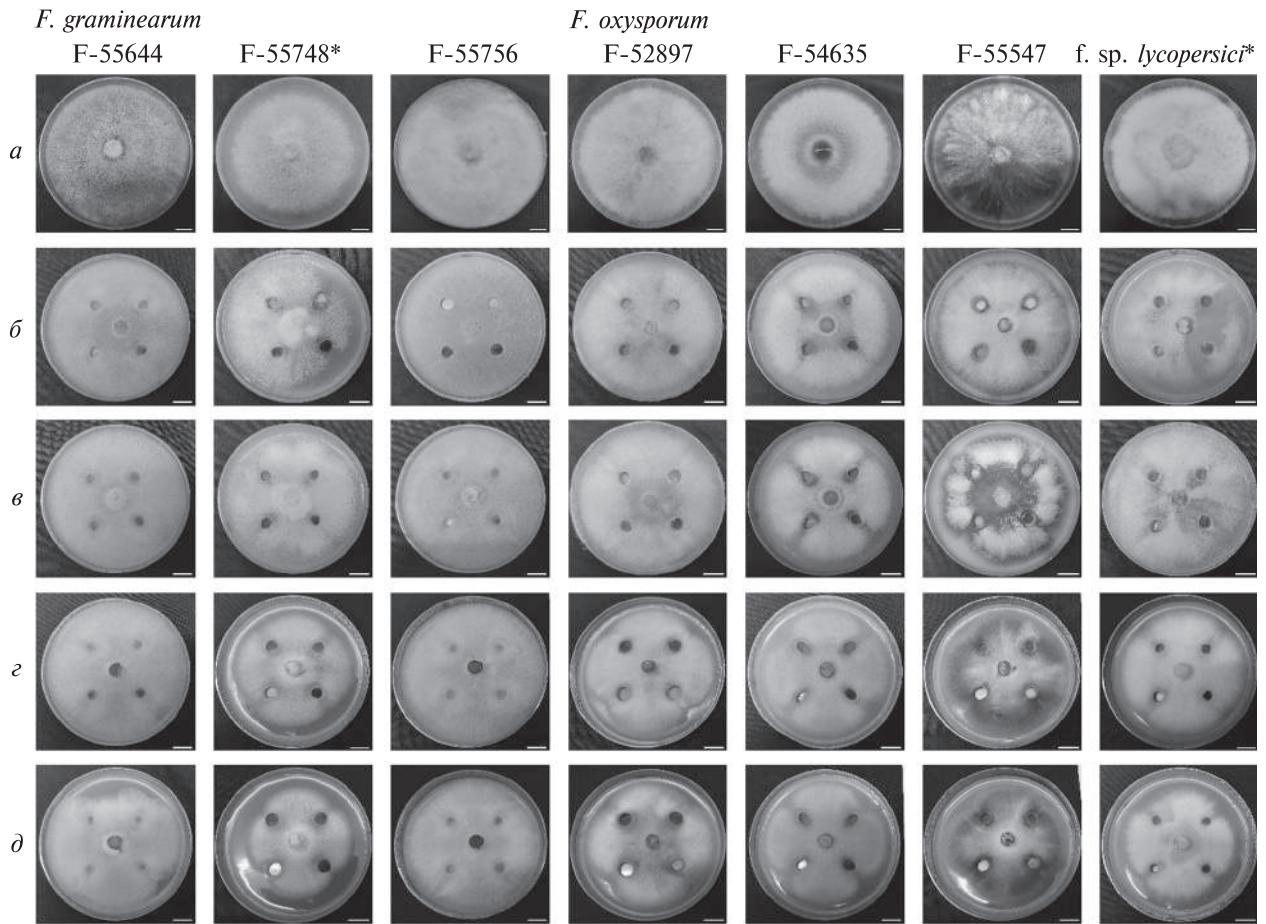


Рис. 2. Колонії штамів *F. graminearum* та *F. oxysporum* після 7 діб вирощування у контролі (а), під впливом ДМСО (б) та івермектину в концентраціях 1 (в), 2 (г) та 3 (д) мг/мл; * найчутливіші штами

вираженою. Зокрема, це свідчить про те, що втрата кольору міцелію, була викликана одночасним впливом івермектину та ДМСО. Зменшення об'єму поверхневого міцелію штамів *F. graminearum* F-55756, а також *F. oxysporum* F-54635 та *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* під впливом ДМСО, було відмічено і для колоній, що зазнали впливу івермектину; при цьому, як і випадку змін у кольорі, зменшення об'єму було більш вираженим під впливом івермектину. На рис. 3 відображені зміни у площі колоній штамів під впливом різних концентрацій агенту.

Відомо, що філаментарні гриби, до яких, зокрема, належать види роду *Fusarium*, здатні існувати у двох життєвих формах: дріжджеподібній формі (рідке середовище) та формі колонії (тверде середовище). Вплив івермектину на *F. oxysporum* та *F. solani* у рідкому

середовищі досліджували раніше Kollmann et al (2003); зокрема, за концентрацій агенту (10^{-3} – 10^{-8} М) у обох видів спостерігалось зменшення споруляції, а у *F. oxysporum* також відбувалося суттєве зменшення продукції біомаси. Водночас саме колоніальна форма розвитку є домінуючою у фітопатогенних грибів та необхідною для успішного проникнення у тканини рослини-хазяїна (Moman and Talbot, 2017). Враховуючи виявлений раніше фунгістатичний вплив івермектину на ріст колоній штамів *F. graminearum* F-55756 та *F. oxysporum* F-54635 (Kustovskiy et al, 2022), нами вперше було досліджено вплив івермектину на колонії *F. graminearum* (штами F-55644, F-55748) та *F. oxysporum* (штами F-52897, F-55547, f. sp. *lycopersici*). Фунгістатичний ефект при використанні івермектину у концентраціях 2 та

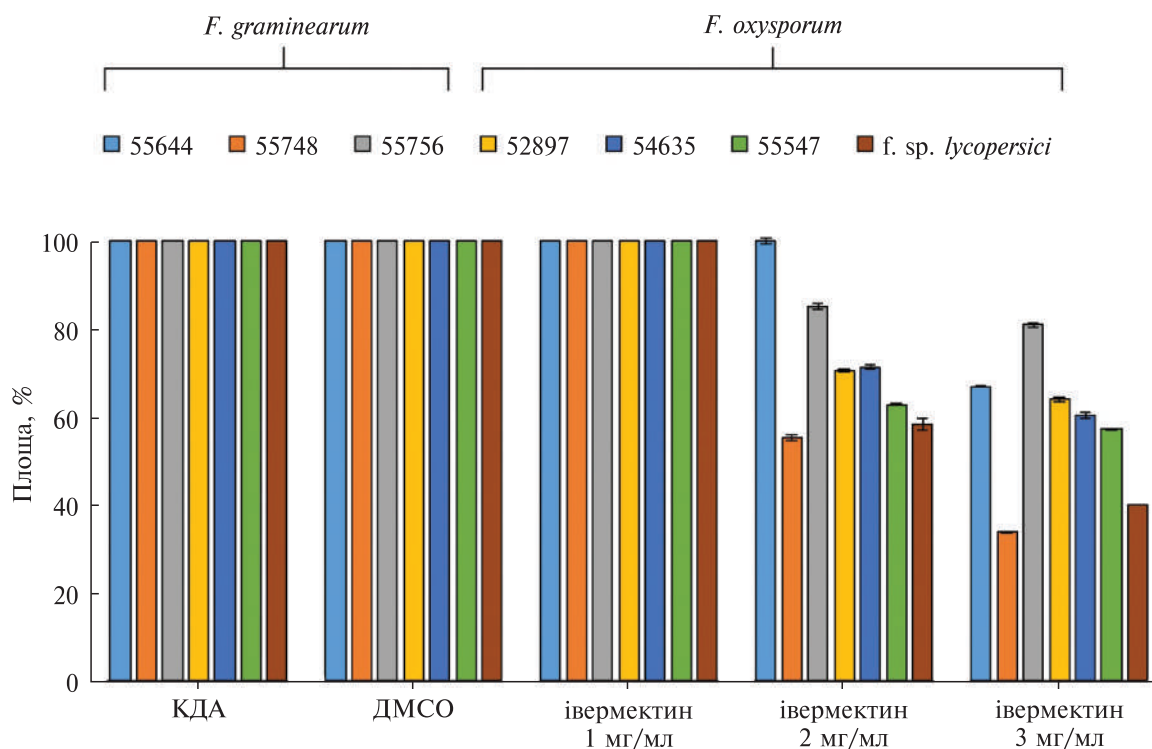


Рис. 3. Вплив івермектину у різних концентраціях та ДМСО на ріст колоній (% по відношенню до контролю: середовища) досліджуваних штамів *F. graminearum* та *F. oxysporum*.

3 мг/мл може бути пов'язаний з особливостями трансмембранного транспорту ліганду до кінцевої мішені, а також особливостями метаболічних механізмів стійкості у досліджуваних штамів *Fusarium*, чим, зокрема, можна пояснити відмінності у антигрибній активності івермектину у різних штамів. Наприклад, на наявність таких метаболічних механізмів може вказувати втрата кольору штамми *F. graminearum* F-55644 та F-55756, фунгістатичний ефект івермектину на колонії яких був значно слабшим у порівнянні з іншими штамми. Зменшення об'єму повітряного міцелію у колоній штамів *F. graminearum* F-55756, *F. oxysporum* F-54635 та *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* узгоджується з результатами Kollmann et al (2003) і свідчить про зниження споруляції та зменшення біомаси колоній цих штамів на твердому середовищі під впливом івермектину.

Іншим поясненням різної чутливості штамів до дії івермектину можуть бути особливості його взаємодії з мікротрубочками. Хоча відмінності амінокислотних послідовностей та

структури молекул тубуліну у близькоспоріднених штамів та видів (*F. graminearum*, *F. oxysporum*) є малоймовірними в силу високого ступеня його консервативності, особливості фунгіцидної активності івермектину можуть бути наслідком точкових змін/мутацій в генах цього білка. Для того, щоб у подальшому можна було б експериментально оцінити таку можливість, нами було проведено структурно-біологічне моделювання взаємодії івермектину з тубуліном *Fusarium*.

Моделювання взаємодії івермектину з β -тубуліном *Fusarium*. Попри експериментальне підтвердження взаємодії івермектину з тубуліном *H. contortus* (Ashraf et al, 2015) та опосередкованої нею стабілізації мікротрубочок клітин цієї нематої, структурно-біологічні характеристики комплексу івермектину та β -тубуліну залишаються не охарактеризованими в достатній мірі. З метою оцінки ефективності зв'язування івермектину з таксановим сайтом β 1-тубуліну *Fusarium* нами було змодельовано відповідний комплекс між білковою молекулою і цим лі-

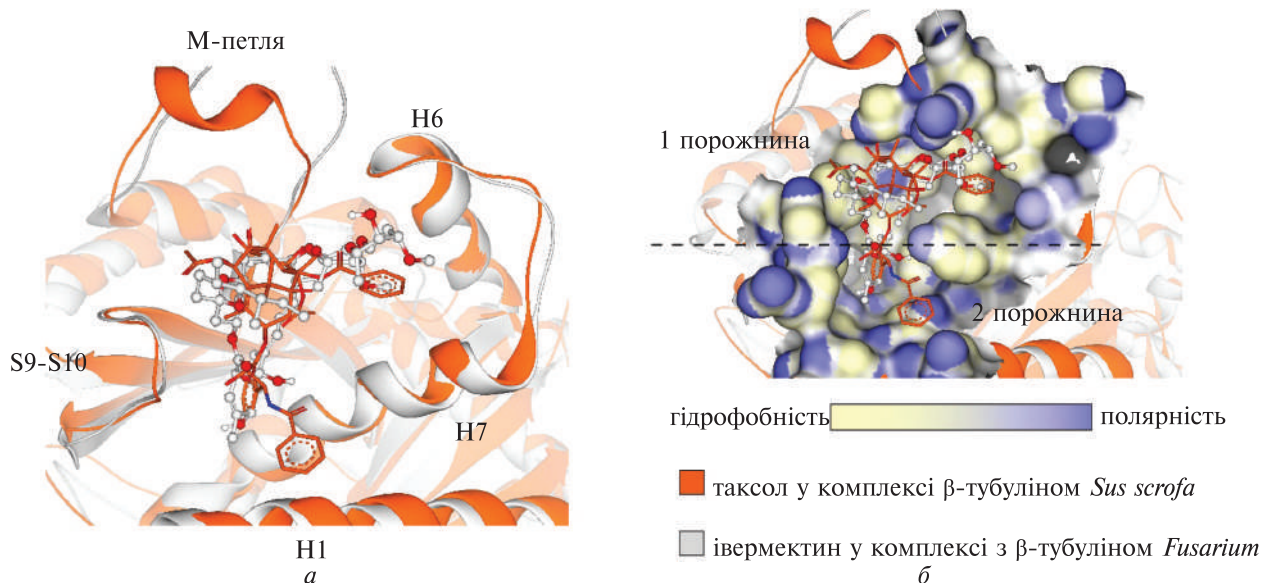


Рис. 4. Результати вирівнювання таксанового сайту комплексу івермектину та β 1-тубуліну *F. graminearum* та комплексу таксолу та β 1-тубуліну *Sus scrofa*, експериментально визначеного Hunter et al (2022): *a* – положення лігандів відносно елементів вторинної структури сайту; *б* – положення лігандів відносно порожнин сайту (поверхня сайту розфарбована за LogP)

гандом. Згідно найоптимальнішого варіанту зв'язування, положення івермектину у сайті побудованої моделі є близьким до положення таксолу, незважаючи на значні відмінності у структурі молекул (рис. 4, *a*, *б*). Це повністю узгоджується з експериментальними даними та результатами попереднього моделювання зв'язування івермектину з β 1-тубуліном *H. contortus* (Ashraf et al, 2015).

Стабільність змодельованого комплексу була підтверджена за допомогою молекулярної динаміки, а найпоширеніші конформації, визначені за допомогою кластерного аналізу, були проаналізовані у SeeSAR. За оцінкою HYDE гетеромакроциклічне лактонне кільце івермектину, а також приєднані до нього спірокетальна та бензофуранова функціональні групи мають найвищий внесок у специфічність взаємодії іверметину з тубуліном (рис. 5, *a*, *б*). Як було раніше описано Mühlethaler et al (2021), порожнина таксанового сайту складається з двох порожнин, одна з яких є переважно гідрофобною, а інша містить полярні та заряджені залишки (рис. 4, *б*). Відповідно до запропонованого варіанту зв'язування бензофуранова група івермектину знаходиться у по-

лярній порожнині таксанового сайту, утвореній залишками H1, H7 та S9-S10, та є осередком водневих зв'язків, серед яких до найстійкіших відносяться зв'язки з Thr23, Glu27 H1 та Ser234 H7 (рис. 5, *в*). Спірокетальна група, зокрема її друге кільце та приєднані алкільні групи, мають контакти з Ser280 М-петлі (установлена назва петлі S7-H9) та Gly360, Leu361 S9-S10. За оцінкою HYDE їхній позитивний внесок у створення комплексу полягає у десольватації білкової мішені та ліганда.

Аналогічний за характером внесок у формування комплексу мають атоми лактонного кільця, що гідрофобно взаємодіють із залишками Leu228 H7, Phe270 S7, Pro272, Leu273, Thr274, Ser275, Gln279 М-петлі, Leu361 S9-S10, за виключенням атому кисню карбонільної групи, який утворює водневий зв'язок з Tyr227. Дисахарид, який є найгнучкішою частиною молекули івермектину, відіграє другорядну роль у зв'язуванні; хоча не зважаючи на це було виявлено відносно стійкі водневі зв'язки дисахариду із залишками Thr274, Arg276 та Gly277 М-петлі (рис. 5, *в*). У результаті аналізу HYDE було також виявлено взаємодію дисахариду з амінокислотними залишками Cys211, Leu215,

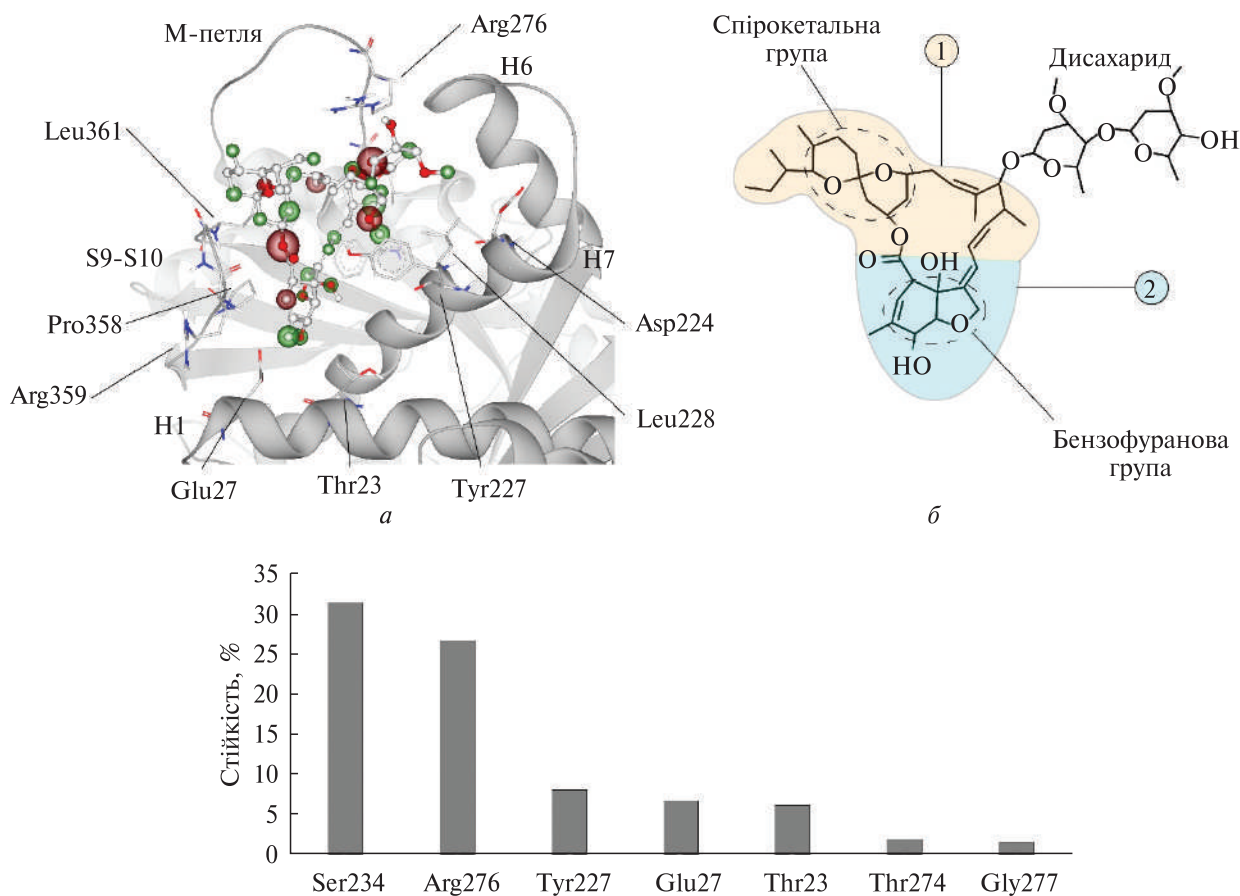


Рис. 5. Модель комплексу івермектину з β 1-тубуліном *F. graminearum* (показана найпоширеніша конформація; зелені та червоні сфери навколо атомів івермектину вказують на внесок атомів у стабільність комплексу за результатами аналізу HYDE (а); схематичне відображення положення функціональних груп івермектину у таксановому сайті (б); результати аналізу водневих зв'язків у траєкторії (в). Примітка: 1 – гідрофобна порожнина; 2 – полярна порожнина

Leu217 H6-H7, Tyr227, Leu228 H7, та залишком Ser275 М-петлі. Таке різноманіття контактів дисахариду пояснюється його гнучкістю (4 зв'язки, навколо яких є можливим обертання цукрових кілець, та 2 рухливі етерні групи) і розташуванням у сайті (рис. 5, а). Завдяки останньому відсутні стеричні обмеження, що могли б перешкоджати частим змінам конформації цієї функціональної групи, внаслідок яких контакти дисахариду з переліченими залишками є нестійкими та, ймовірно, не мають значного впливу на стабільність комплексу.

Враховуючи, що конформація М-петлі молекули β -тубуліну у значній мірі визначає стабільність та структуру мікротрубочки (Debs et al, 2020), а зв'язування всіх лігандів таксано-

вого сайту підвищує впорядкованість її структури, що призводить до підвищення взаємодії між субодинами тубуліну прилеглих протофіламентів та стабілізації мікротрубочок (Xiao et al, 2021), було проведено кластерний аналіз конформацій М-петлі вільного та зв'язаного з івермектином тубуліну, а також аналіз RMSF важких атомів залишків, що входять до складу М-петлі. У результаті кластерного аналізу М-петлі (від 272 до 285 залишку) було виявлено переважання у кількості кластерів М-петлі молекули вільного тубуліну (154 > 133), що загалом свідчить про стабілізуючий вплив івермектину на конформацію М-петлі (рис. 6, б), який підтверджується результатами порівняння показників RMSF залишків М-петлі вільно-

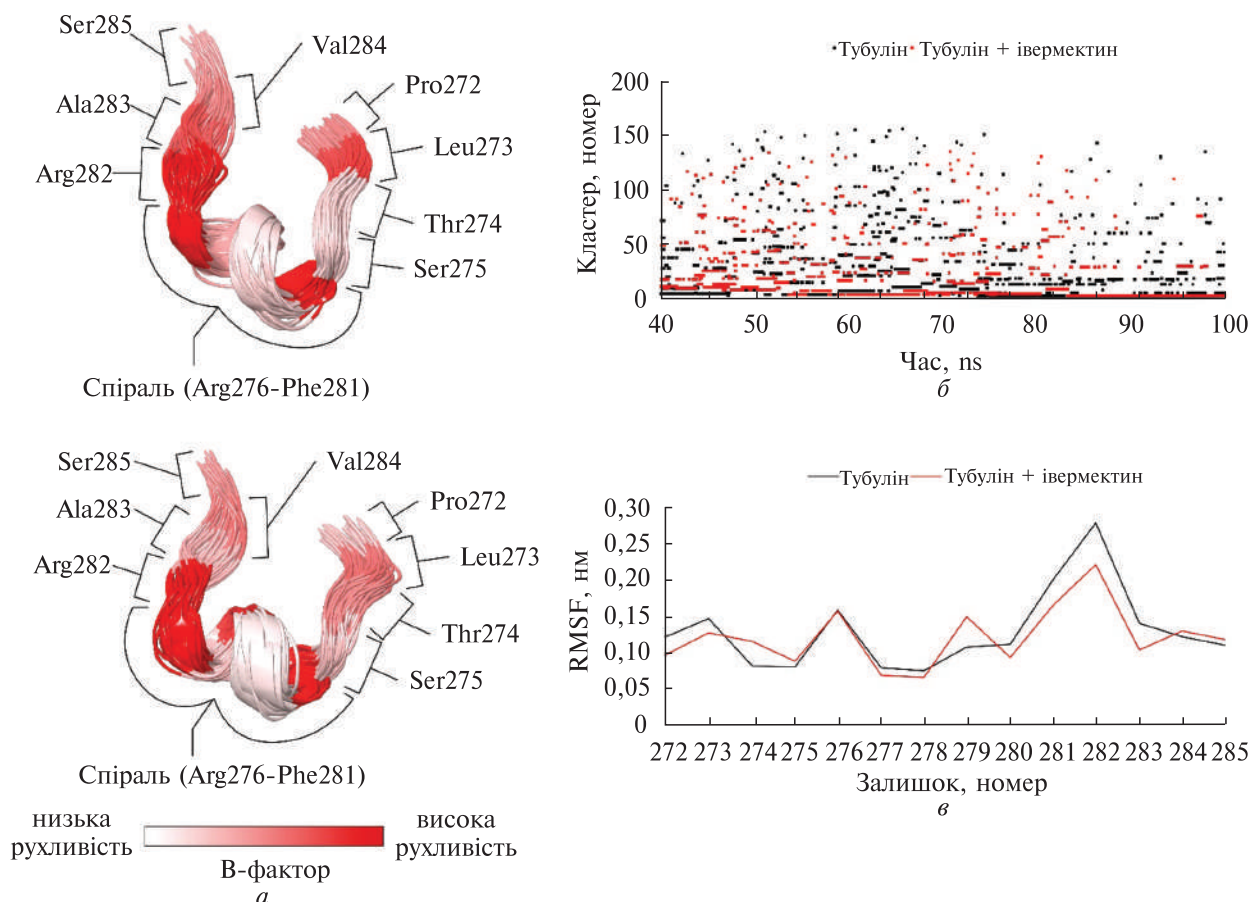


Рис. 6. Вплив івермектину на конформаційні властивості М-петлі β -тубуліну *F. graminearum*: *a* – результати вирівнювання центральних структур ідентифікованих кластерів М-петлі вільного (згори) та зв’язаного з івермектином (знизу) β -тубуліну розфарбовані за теоретично встановленими значеннями В-фактору (візуалізація Free Maestro: Schrödinger Release 2021-1: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021); *b* – порівняння результатів кластерного аналізу траєкторій вільного та зв’язаного з івермектином тубуліну; *c* – порівняння рухливості залишків М-петлі у вільному та зв’язаному стані на основі усереднених значень RMSF їх важких атомів (C, O, N)

го тубуліну та комплексу з івермектином (рис. 6, *a*, *c*). Отже, вплив івермектину на конформацію М-петлі є аналогічним впливу інших відомих лігандів таксанового сайту (таксол, епотіони, дискодермолід, дікгіостатин, зампанолід тощо), що у сукупності з подібністю положення івермектину та таксолу у сайті (рис. 4, *a*, *b*), вказує на високу ступінь достовірності запропонованої моделі зв’язування. Конформаційні зміни М-петлі могли бути наслідком як безпосередніх взаємодій з івермектином (зокрема, з залишками М-петлі взаємодіють спірокетальна група, макроциклічне кільце та дисахарид), так і алостеричних змін у конформа-

ції β -тубуліну, викликаних зв’язуванням івермектину.

Хоча проведені дослідження не дозволяють виключно пов’язати інгібуючий вплив івермектину на ріст та розвиток колоній *F. graminearum* та *F. oxysporum* з безпосереднім впливом на мікротрубочки клітин цих організмів, але експериментальне підтвердження взаємодії івермектину з таксановим сайтом тубуліну нематод (Ashraf et al, 2015), та підтвердження нами стабільності комплексу івермектину з β -тубуліном *F. graminearum* дозволяє у подальшому розглядати цей механізм дії івермектину у клітинах грибних патогенів як цілком

реалістичний. Тому необхідними є подальші дослідження впливу івермектину на мікротрубочки клітин грибів, зокрема потенційного впливу білків, асоційованих з мікротрубочками, на ефективність формування комплексу івермектину та тубуліну, що дозволить остаточно верифікувати запропоновану модель зв'язування та раціоналізувати процес пошуку та дизайну нових, ефективніших лігандів на основі структури івермектину.

Таким чином, нами вперше протестовано чутливість різних штамів *F. graminearum* та *F. oxysporum* до івермектину та виявлено його фунгіцидний ефект. Встановлено, що найчутливішими до івермектину є штами *F. graminearum* F-55748 та *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Для пояснення отриманих результатів було запропоновано механізм дії івермектину, який полягає у його зв'язуванні з таксановим сайтом β -тубуліну *Fusarium*, що було продемонстровано за допомогою методів структурно-біологічного моделювання *in silico*.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить будь-яких досліджень за участю людей або тварин в якості об'єктів дослідження.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Дослідження виконано в рамках бюджетної теми (КПКВК 6541230) та профінансовано за рахунок коштів Національної академії наук України.

β -TUBULIN OF *FUSARIUM* AS A POTENTIAL TARGET FOR REALIZATION OF THE ANTIFUNGAL ACTIVITY OF IVERMECTIN

Y.O. Kustovskiy, A.U. Buziashvili,
S.P. Ozheredov, Y.B. Blume, A.I. Yemets

Institute of Food Biotechnology and Genomics,
National Academy of Sciences of Ukraine,
Baidy-Vyshnevetskooho str., 2a, Kyiv, 04123, Ukraine
National University of Kyiv-Mohyla Academy,
Skovorody str., 2, Kyiv, 04070, Ukraine
E-mail: ykustovskiy@gmail.com, yemets.alla@nas.gov.ua

Ivermectin influence on phytopathogenic strains of *Fusarium graminearum* (F-55644, F-55748) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (F-52897, F-55547) was analysed. As the result, it was determined that ivermectin has antifungal effect on the growth of colonies of these

strains at high concentrations (2–3 mg/ml). Moreover, the *F. oxysporum* strains in general were more susceptible to ivermectin than *F. graminearum* strains. As it is known that ivermectin can cause the microtubules stabilization through binding to β -tubulin, the 3-dimensional model of the interaction of this compound with β -tubulin of *F. graminearum* was developed to identify of ivermectin induced changes in β -tubulin molecular conformation including the stabilization and spiralization of M-loop. This structural element is important for the establishment of lateral contacts between tubulin subunits of adjacent microtubular protofilaments. As the M-loop stabilization reflects a very important feature of microtubules stabilizing agents binding to the taxane site of β -tubulin, it can be supposed, that ivermectin possesses the same effects on *Fusarium* microtubules. Consequently, the obtained results allow to consider fungal tubulin as a potential target for realization of antifungal activity of ivermectin and its derivatives.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Abraham MJ, Murtola T, Schulz R et al (2015) GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1–2:19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
- Ashraf S, Beech RN, Hancock MA, Prichard RK (2015) Ivermectin binds to *Haemonchus contortus* tubulins and promotes stability of microtubules. *Int J Parasitol* 45(9–10):647–654. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.03.010>
- Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* 6(2):71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Blume Ya, Yemets A, Sheremet Ya et al (2010) Exposure of beta-tubulin regions defined by antibodies on a *Arabidopsis thaliana* microtubule protofilament model and in the cells. *BMC Plant Biol* 10:29. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-29>
- Breviario D, Giani S, Morello L (2013) Multiple tubulins: Evolutionary aspects and biological implications. *Plant J* 75(2):202–218. <https://doi.org/10.1111/tpj.12243>
- Crump A (2017) Ivermectin: enigmatic multifaceted 'wonder' drug continues to surprise and exceed expectations. *J Antibiot* 70(5):495–505. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.11>
- Daura X, Gademann K, Jaun B et al (1999) Peptide folding: when simulation meets experiment. *Angew Chem Int Ed* 38(1/2):236–240. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-73\(19990115\)38:1/2%3C236::AID-ANIE236%3E3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-73(19990115)38:1/2%3C236::AID-ANIE236%3E3.0.CO;2-M)
- Debs GE, Cha M, Liu X et al (2020) Dynamic and

- asymmetric fluctuations in the microtubule wall captured by high-resolution cryoelectron microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 117(29):16976–16984. <https://doi.org/10.1073/pnas.2001546117>
- Hunter B, Benoit MPMH, Asenjo AB et al (2022) Kinesin-8-specific loop-2 controls the dual activities of the motor domain according to tubulin protofilament shape. *Nat Commun* 13(1):1–19. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31794-3>
- Huang J, MacKerell AD Jr (2013) CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *J Comput Chem* 34(25):2135–2145. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2017.04.011>
- Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14(1):33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- Jones G, Willett P, Glen RC et al (1997) Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol* 267(3):727–748. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897>
- Jumper J, Evans R, Pritzel A et al (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596(7873):583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Karlsson I, Friberg H, Kolseth AK et al (2017) Agricultural factors affecting *Fusarium* communities in wheat kernels. *Int J Food Microbiol* 252:53–60. <https://doi.org/10.1073/pnas.2001546117>
- Karpov PA, Brytsun VM, Rayevsky AV et al (2015) High-throughput screening of new antimetabolic compounds based on CSLabGrid virtual organization. *Sci Innovat* 11(1):85–93. <https://doi.org/10.15407/scin11.01.092>
- Korb O, Stützel T, Exner TE (2009) Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with plants. *J Chem Inf Model* 49(1):84–96. <https://doi.org/10.1021/ci800298z>
- Kustovskiy YO, Buziashvili AY, Yemets AI (2022) Research of ivermectin influence on *Fusarium graminearum* and *F. oxysporum*. *Faktori eksperimental'noi evolucii organizmiv* 30:91–95. <https://doi.org/10.7124/feeo.v30.1467>
- Löscher W (2023) Is the antiparasitic drug ivermectin a suitable candidate for the treatment of epilepsy? *Epilepsia* 64(3):553–566. <https://doi.org/10.1111/epi.17511>
- Lykholat YV, Rabokon AM, Blume RYa et al (2022) Characterization of β -tubulin genes in *Prunus persica* and *Prunus dulcis* for fingerprinting of their interspecific hybrids. *Cytol Genet* 56(6):481–493. <https://doi.org/10.3103/S009545272206007X>
- Martin RJ, Robertson AP, Choudhary S (2021) Ivermectin: an anthelmintic, an insecticide, and much more. *Trends Parasitol* 37(1):48–64. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.10.005>
- Mittal N, Mittal R (2021) Repurposing old molecules for new indications: Defining pillars of success from lessons in the past. *Eur J Pharmacol* 912:174569. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174569>
- Momany M, Talbot NJ (2017) Septins focus cellular growth for host infection by pathogenic fungi. *Front Cell Dev Biol* 5:33. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00033>
- Mooij WT, Verdonk ML (2005) General and targeted statistical potentials for protein-ligand interactions. *Proteins* 61(2):272–287. <https://doi.org/10.1002/prot.20588>
- Mühlethaler T, Gioia D, Prota AE et al (2021), Comprehensive analysis of binding sites in tubulin. *Angew Chem Int Ed Engl* 60(24):13331–13342. <https://doi.org/10.1002/anie.202100273>
- Sampaio AM, Araújo SdS, Rubiales D, Vaz Patto MC (2020) *Fusarium* wilt management in legume crops. *Agronomy* 10(8):1–25. <https://doi.org/10.3390/agronomy10081073>
- Schneider N, Lange G, Hindle S et al (2013) A consistent description of HYdrogen bond and Dehydration energies in protein-ligand complexes: methods behind the HYDE scoring function. *J Comput Aided Mol Des* 27(1):15–29. <https://doi.org/10.1007/s10822-012-9626-2>
- Volkamer A, Griewel A, Grombacher T, Rarey M (2010) Analyzing the topology of active sites: on the prediction of pockets and subpockets. *J Chem Inf Model* 50(11):2041–2052. <https://doi.org/10.1021/ci100241y>
- Volkamer A, Kuhn D, Rippmann F, Rarey M (2012) DoGSiteScorer: a web server for automatic binding site prediction, analysis and druggability assessment. *Bioinformatics* 28(15):2074–2075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts310>
- Zoete V, Cuendet MA, Grosdidier A, Michielin O (2011) SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules. *J Comput Chem* 32(11):2359–2368. <https://doi.org/10.1002/jcc.21816>
- Westphal KR, Heidelberg S, Zeuner EJ et al (2021) The effects of different potato dextrose agar media on secondary metabolite production in *Fusarium*. *Int J Food Microbiol* 347:109171. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109171>
- Xiao Q, Xue T, Shuai W et al (2021) High-resolution X-ray structure of three microtubule-stabilizing agents in complex with tubulin provide a rationale for drug design. *Biochem Biophys Res Commun* 534:330–336. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.082>

Надійшла в редакцію 21.09.23
Після доопрацювання 10.10.23
Прийнята до друку 18.01.24