

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ «КИЄВО-МОГИЛЯНСЬКА АКАДЕМІЯ»

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

КУСТОВСЬКИЙ ЄВГЕН ОЛЕКСІЙОВИЧ

УДК 615.285.7:577.112(043.3/.5)

ДИСЕРТАЦІЯ

**ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТІ ВЗАЄМОДІЇ
ІВЕРМЕКТИНУ З ТУБУЛІНОМ
ГРИБНОГО ТА РОСЛИННОГО
ПОХОДЖЕННЯ**

Спеціальність 091 «Біологія»

Галузь знань 09 «Біологія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело



Є. О. Кустовський

Науковий керівник **Алла Іванівна Ємець**, доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент Національної академії наук України

Київ – 2025

АНОТАЦІЯ

Кустовський Є.О. Дослідження особливості взаємодії івермектину з тубуліном грибного та рослинного походження. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія». – Національний університет «Києво-Могилянська академія», Київ, 2025.

Івермектин є нематоцидом та інсектицидом, активність якого реалізується через зв'язування з Cys-петльовими рецепторами безхребетних. Окрім Cys-петльових рецепторів, відомо про взаємодії івермектину з іншими молекулярними мішенями: фарнезоїдним X-рецептором, рецептором епідермального фактору росту, α/β -імпортином, NS3 геліказою тощо. Ідентифікація нових мішеней івермектину є підставою для переосмислення можливостей його застосування. До нещодавно встановлених мішеней івермектину належить β -тубулін – консервативний білок еукаріотичних організмів. Гетеродимери α - та β -тубуліну є структурними компонентами мікротрубочок, які є частиною цитоскелету, необхідного для функціонування еукаріотичних клітин. Мікротрубочки забезпечують транспорт органел, синтез клітинної стінки, клітинний поділ тощо. Все це робить α - та β -тубулін мішенню для багатьох лігандів, які через зв'язування з різними сайтами спричиняють стабілізацію або дестабілізацію мікротрубочок, порушуючи клітинний цикл. Наразі відомо про зв'язування івермектину з β -тубуліном нематоди *Haemonchus contortus*, що призводить до стабілізації мікротрубочок цієї нематоди. Водночас консервативність амінокислотних послідовностей тубуліну еукаріотичних організмів дозволяє припустити, що івермектин може також зв'язуватися з β -тубуліном рослинного та грибного походження, стабілізуючи мікротрубочки у клітинах рослин та грибів. Дослідження взаємодії івермектину з рослинним та грибним β -тубуліном дозволить оцінити потенціал івермектину як можливого засобу для захисту рослин від грибних патогенів, а також покращити розуміння загрози від застосування

івермектину для нецільових організмів. Враховуючи це, дисертаційне дослідження було присвячене вивченню взаємодії івермектину з β -тубуліном рослин і грибів та її наслідків на клітинному та організмовому рівнях.

Для вивчення впливу івермектину на вищі рослин як модельний об'єкт було використано дикий тип *Arabidopsis thaliana* L. (екотип Col-1). У результаті *in vitro* експериментів було встановлено спричинені івермектином зміни у морфо-фізіологічних параметрах проростків *A. thaliana*. Зокрема, при вирощуванні проростків *A. thaliana* на середовищі, що містило івермектин у концентраціях 250 та 500 мкг/мл, спостерігали зменшення загальної довжини проростків та довжини їхніх коренів на 6-ту та 12-ту добу вирощування. Враховуючи, що найбільших змін зазнали корені проростків, було порівняно морфологічні властивості коренів 12-денних проростків у контролі та при вирощуванні на середовищі з івермектином. У результаті було встановлено, що івермектин спричинив сповільнення росту бічних коренів, вкорочення зони елонгації головного кореня, викривлення головного кореня, а також вкорочення та деформацію кореневих волосків.

Для пояснення спричинених івермектином морфо-фізіологічних змін у проростків дикого типу *A. thaliana* було вивчено вплив івермектину на структурно-просторову організацію мікротрубочок клітин головного кореня за використання трансгенних ліній *A. thaliana* GFP-MAP4 та GFP-TUA6, що експресують химерні гени MAP4 та TUA6, злиті з репортерним геном GFP. У результаті було встановлено, що івермектин у концентрації 250 мкг/мл спричиняє порушення у організації мікротрубочок після 1 та 2 годин обробки; за концентрацій 50 та 100 мкг/мл не спостерігали змін у організації мікротрубочок. Також клітини різних зон кореня мали різну чутливість до дії івермектину: найчутливішими були клітини зони кореневого апексу, перехідної зони та зони елонгації, а найменш чутливими – клітини зони диференціації та кореневі волоски. У чутливих до івермектину клітин спостерігали фрагментацію та вкорочення мікротрубочок, втрату ними орієнтацій, а також виникнення коротких пучків мікротрубочок.

Нами було вивчено чутливість фітопатогенних штамів *Fusarium graminearum* Schwabe (F-55644, F-55748, F-55756) та *F. oxysporum* Schltdl. (F-52897, F-54635,

F-55547, *f. sp. lycopersici*) до івермектину. Вибір штамів був пов'язаний з тим, що вони є небезпечними патогенами, які вражають зернові та овочеві культури, знижуючи врожайність, а також якість та безпечність агропродукції. У результаті *in vitro* експериментів було встановлено, що івермектин є токсичним для колоній наведених штамів за концентрацій 2 та 3 мг/мл. Антигрибна активність івермектину не проявлялася за нижчих концентрацій: 0,25; 0,5; та 1 мг/мл. Серед досліджених штамів найчутливішими до івермектину були штами *F. graminearum* F-55748 та *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, площа колоній яких на 7-му добу вирощування на середовищі з 3 мг/мл івермектину становила менше 50% від площ колоній у контролі. Найменш чутливими до івермектину були штами *F. graminearum* F-55644 та F-55756. Водночас у колоній цих штамів внаслідок впливу івермектину відбулися фізіологічні зміни: втрата міцелієм кольору та зменшення площі поверхневого міцелію, що також спостерігали у штамів *F. oxysporum* F-54635 та *f. sp. lycopersici*.

Перед моделюванням взаємодії івермектину та β 1-тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* та *H. contortus* (використаний як контроль) порівняли амінокислотні послідовності та конформаційні властивості β -тубуліну цих організмів. Спочатку було зроблено множинне вирівнювання послідовностей β 1-тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* та *H. contortus* та порівняно ідентичність та подібність послідовностей загалом та у ділянках елементів вторинної структури таксанового сайту, з яким зв'язується івермектин. У результаті було встановлено, що послідовності β 1-тубуліну *F. graminearum* та *F. oxysporum* є повністю ідентичними, а тому для моделювання взаємодії було використано лише модель β 1-тубуліну *F. graminearum*. Також було визначено, що послідовності β 1-тубуліну *A. thaliana* та *H. contortus* є консервативними на 91%, послідовності β 1-тубуліну *A. thaliana* та *F. graminearum/F. oxysporum* – на 88%, а послідовності β 1-тубуліну *H. contortus* та *F. graminearum/F. oxysporum* – на 89%. Серед елементів вторинної структури таксанового сайту найбільшу консервативність мала послідовність **H1**. Найбільші відмінності у послідовностях спостерігали у невпорядкованих петльових ділянок таксанового сайту, а саме **М-петлі** та **S9-S10**.

У подальшому було проведено молекулярно-динамічні симуляції вільного β 1-тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*/*F. oxysporum* та *H. contortus*. Аналіз отриманих траєкторій передбачав встановлення інтервалу траєкторій, у якому знаходяться конформації рівноважного стану β 1-тубуліну та відбір конформацій з оптимальним розкриттям сайту зв'язування для проведення молекулярного докінгу івермектину. Досягнення структурами рівноважного стану після 40 нс було визначено на підставі результатів аналізу часових змін середньоквадратичного відхилення важких атомів від початкової структури та кількості водневих зв'язків. У результаті кластерного аналізу конформацій таксанового сайту β -тубуліну було ідентифіковано конформації, які характеризуються найбільшим об'ємом порожнини сайту та оптимальним положенням бічних ланцюгів залишків для моделювання зв'язування івермектину. Ці конформації було використано для проведення молекулярного докінгу івермектину.

Модель зв'язування івермектину з таксановим сайтом β -тубуліну була розроблена з урахуванням взаємодій івермектину з його відомими мішенями. Зокрема, нами було проаналізовано комплекси івермектину та α -гомопентамерного глутамат-хлоридного рецептора *Caenorhabditis elegans*, порівняно фізико-хімічні властивості сайтів зв'язування та встановлено патерни алостеричної взаємодії івермектину. Відповідно до запропонованого положення івермектину у таксановому сайті β -тубуліну бензофуранова група івермектину знаходиться у меншій за об'єм субпорожнині сайту (утворена такими елементами структури як **H1**, **H7** та **S9-S10**). Макроциклічне кільце та спірокетальна група розташовані в більшій за об'єм, переважно гідрофобній, субпорожнині сайту (**H6**, **H6-H7**, **S7**, **H7** та **М-петлі**). Гнучка та полярна дисахаридна група розташована за межами цих двох порожнин та відіграє другорядну роль у взаємодії IVM з β 1-тубуліном.

Стабільність комплексів івермектину та β 1-тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*/*F. oxysporum* та *H. contortus* було перевірено за допомогою молекулярно-динамічних симуляцій. У результаті ММ/ПБСА розрахунків було встановлено, що івермектин мав найбільшу афінність до β 1-тубуліну *A. thaliana*, енергія зв'язування з яким становила $-12,26 \pm 3,33$ ккал/моль; нижчу афінність

івермектин мав до $\beta 1$ -тубуліну *F. graminearum*/*F. oxysporum* ($-11,30 \pm 5,20$ ккал/моль); найнижчу афінність івермектин мав до $\beta 1$ -тубуліну *H. contortus* ($-9,05 \pm 5,32$ ккал/моль). Для визначення залишків, що мають найбільший внесок у афінність комплексів, було виконано енергетичну декомпозицію загальної енергії зв'язування та проведено аналіз стійкості водневих зв'язків між івермектином та $\beta 1$ -тубуліном. Було встановлено, що взаємодії з залишками у положеннях 27 у **H1**, 225(224), 228(227) у **H7**, 277(276) у **М-петлі**, 319(318) у **S8**, 360(359) та 362(361) у **S9-S10** є найважливішими для підтримання стабільності комплексів. Також здійснили порівняльний аналіз конформаційних властивостей елементів структури таксанового сайту у вільному та зв'язаному з івермектином стані та встановили, що взаємодія івермектину з β -тубуліном призводить до стабілізації **М-петлі**. Оскільки стабілізація мікротрубочок лігандами таксанового сайту опосередкована конформаційними змінами **М-петлі**, було зроблено висновок про можливість стабілізуючого впливу івермектину на мікротрубочки *A. thaliana*. Це було підтверджено результатами експериментів з вивчення впливу івермектину на структурно-просторову організацію та орієнтацію мікротрубочок у клітинах кореня *A. thaliana* GFP-MAP4 та GFP-TUA6.

Таким чином, у результаті дисертаційного дослідження було вперше визначено структурно-функціональні особливості взаємодії івермектину з β -тубуліном вищих рослин (*A. thaliana*) та грибів (*F. graminearum*/*F. oxysporum*), виявлено зміни у організації мікротрубочок клітин кореня *A. thaliana* внаслідок дії івермектину, а також його вплив на розвиток *A. thaliana*, *F. graminearum* та *F. oxysporum*. Верифіковано стабільність комплексів івермектину та $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana* та *F. graminearum*/*F. oxysporum*. Отримані дані можуть бути використані для подальшого вивчення взаємодії івермектину з тубуліном інших еукаріотичних організмів, а також для пошуку нових ефективних біологічно активних сполук з високою афінністю до таксанового сайту β -тубуліну.

Ключові слова: івермектин, тубулін, цитоскелет, мікротрубочки, молекулярно-клітинні механізми, ріст клітин, *Arabidopsis*, корінь, стійкість рослин, патогени, *Fusarium*, антигрибна активність, *in silico*, молекулярний докінг, молекулярна динаміка.

ABSTRACT

Kustovskyi Y.O. The research of specifics of ivermectin's interaction with tubulin of plant and fungal origin. – Qualified research work (manuscript).

Dissertation to obtain the scientific degree of Doctor of Philosophy in the field of 09 «Biology» in specialty 091 «Biology». – National University "Kyiv-Mohyla Academy", Kyiv, 2025.

The ivermectin is nematocide and insecticide, which activity is based on its binding to Cys-loop receptors of invertebrates (i.e., glutamate receptors, γ -aminobutyric acid receptors). In addition to these traditional targets, ivermectin interacts with other macromolecules (e.g., farnesoid X receptor, epidermal growth factor receptor, α/β -importin, NS3 helicase). Identification of ivermectin's new molecular targets leads to the necessity to reconsider possible directions of ivermectin's application. One of the recently identified targets of ivermectin is tubulin – conserved protein of eukaryotic organisms. Heterodimers of α - and β -tubulin are structural components of microtubules, which are the part of cytoskeleton required for functioning of eukaryotic cells. Microtubules are involved in transport of organelles, cell wall's synthesis, signal cascades, cell division, etc. These makes α - and β -tubulin target for many ligands, which via binding to different sites cause stabilization or destabilization of microtubules thus disrupting the cell cycle. It is known that ivermectin binds to β -tubulin of *Haemonchus contortus*, which leads to the stabilization of microtubules. The conservation of aminoacid sequences of eukaryotic tubulin allows us to hypothesize that ivermectin may also bind to β -tubulin of plant and fungal origin stabilizing microtubules in cells of plants and fungies. The research of ivermectin's interaction with tubulin of plant and fungal origin is necessary to evaluate ivermectin's potential as a possible agent for plant protection from phytopathogenic fungies and to improve the understanding of ivermectin's threat for non-target organisms. Considering the above, this research aimed to study ivermectin's interaction with tubulin of plants and fungies and its consequences on cellular and organismal levels.

To study ivermectin influence on higher plants the wild type of *Arabidopsis thaliana* L. (ecotype Col-1) was selected as model object. As the result of *in vitro* experiments, ivermectin-induced changes in morpho-physiological properties of *A. thaliana* seedlings were determined. Particularly, while cultivating *A. thaliana* seedlings on medium, which contained ivermectin in concentrations of 250 and 500 µg/ml, the reduction of seedlings length was observed on 6 and 12 day of growth. Considering that the most significant morphological alterations were observed for roots of seedlings, morphological properties of 12-day seedlings grown on normal and ivermectin-supplemented medium were compared. Consequently, it was determined that ivermectin caused the delay in growth of lateral roots, the reduction of elongation zone of primary root, the curvature of primary root, and the shortening and deformation of root hair.

To explain morpho-physiological alterations of *A. thaliana* wild type seedlings for the first time ivermectin influence on the organization of microtubules in primary root cells of *A. thaliana* transgenic lines GFP-MAP4 and GFP-TUA6, which express MAP4 and TUA6 genes fused with the reporter GFP gene. As the result, it was determined that ivermectin in concentration of 250 µg/ml disrupts microtubules' organization after 1 and 2 hours of exposure; at concentrations of 50 and 100 µg/ml no changes in microtubules' organization were observed. Also, cells of different root zones had different susceptibility to ivermectin's action: particularly, the cells of root apex, transition zone, and elongation zone were the most susceptible to ivermectin; the least susceptible were cells of differentiation zone and root hair. In susceptible to ivermectin cells were observed fragmentation and shortening of microtubules, loss of their orientations, and the formation of short bundles of microtubules.

The susceptibility of phytopathogenic strains of *Fusarium graminearum* Schwabe (F-55644, F-55748, F-55756) and *F. oxysporum* Schltdl. (F-52897, F-54635, F-55547, *f. sp. lycopersici*) to ivermectin was studied. These strains were selected as dangerous pathogens of cereal and vegetable crops, which cause yield losses and the decrease of quality and safety of agricultural products. As the result of *in vitro* experiments, it was found that ivermectin causes delays of growth of the strains' colonies at concentrations of 2 and 3 mg/ml. The antifungal activity of ivermectin was not observed at concentrations of 0.25,

0.5, and 1 mg/ml. Among the studied strains, *F. graminearum* F-55748 and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* were the most susceptible to ivermectin as the mean area of their colonies on the 7th day of growth on medium supplemented with 3 mg/ml of ivermectin was less than 50% as compared to the area in control. The least susceptible to ivermectin were strains *F. graminearum* F-55644 and F-55756. In the meantime, under the influence of ivermectin, the loss of color and the decrease in area of surface mycelium was observed for these strains, which was also observed for *F. oxysporum*'s strains F-54635 and f. sp. *lycopersici*.

Prior to modelling of ivermectin interactions with β 1-tubulin of *A. thaliana*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, and *H. contortus* (used as control), the comparison of aminoacid sequences and conformational properties of β -tubulin of these organisms was performed. Initially, the multiple sequence alignment of the sequences of β 1-tubulin of *A. thaliana*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, and *H. contortus* was done and the identity and similarity of sequences in general and in regions of secondary structure elements of taxane site, to which ivermectin binds, was compared. As the result, it was determined that the sequences of β 1-tubulin of *F. graminearum* and *F. oxysporum* are totally identical; thus, only the model of β 1-tubulin of *F. graminearum* was used in the study of ivermectin-tubulin interactions. Also, it was determined that sequences of β 1-tubulin of *A. thaliana* and *H. contortus* exhibit 91% conservation, sequences of β 1-tubulin of *A. thaliana* and *Fusarium* – 88%, and sequences of β 1-tubulin *H. contortus* and *F. graminearum*/*F.oxysporum* – 89%. Among the elements of secondary structure of taxane site **H1** had the most conserved sequence; it was found that the most diverged sequences had unstable loop segments, i.e, **M-loop** and **S9-S10**.

Further, the molecular dynamics simulations of the unbound β 1-tubulin of *A. thaliana*, *F. graminearum*, and *H. contortus* were performed and the resulting trajectories were analyzed. The analysis of trajectories included determination of time interval, which contains conformations of β 1-tubulin equilibrium state and selection of conformations with optimal opening of taxane site to perform the molecular docking of ivermectin. Based on the time-dependent changes in root mean squared deviation of heavy atoms on each frame from the original structures and number of hydrogen bonds, it was determined that the

structures reached equilibrium state after 40 ns. As the result of cluster analysis, conformations characterized by the largest volume of site cavity and the optimal position of side chains for modelling of ivermectin binding were identified. These conformations were used for the molecular docking of ivermectin.

The model of ivermectin binding to β -tubulin was developed in consideration with ivermectin's interactions with its known targets. Particularly, the ivermectin complexes with α -homopentameric glutamate receptor of *Caenorhabditis elegans* from RCSB PDB (identificators 3RHW and 3RIF) were analyzed, physico-chemical properties of binding sites were compared, and patterns of ivermectin's allosteric interaction with these targets were determined. According to the proposed position of ivermectin in binding site, the benzofuran group of ivermectin is located in the smaller subcavity of taxane site surrounded by polar and charged residues of **H1**, **H7**, and **S9-S10**. The macrocyclic ring and the spiroketal group are located in the larger primarily hydrophobic cavity formed by residues of **H6**, **H6-H7**, **S7**, **H7**, and **M-loop**. The flexible and polar disaccharide group of ivermectin is located outside these two cavities and has secondary role in interactions.

The stability of ivermectin's complexes with β 1-tubulin of *A. thaliana*, *F. graminearum*/*F. oxysporum*, and *H. contortus* was verified using molecular dynamics simulations. As the result of MM/PBSA calculations, it was determined that ivermectin had the highest affinity for β 1-tubulin of *A. thaliana* with the binding energy of -12.26 ± 3.33 kcal/mol. The complex of ivermectin and β 1-tubulin of *F. graminearum*/*F. oxysporum* had lower affinity (-11.30 ± 5.20 kcal/mol). The lowest affinity was observed in the complex of ivermectin and β 1-tubulin of *H. contortus* (-9.05 ± 5.32 kcal/mol). To determine residues which had the highest contribution to complexes' affinities the energy decomposition was performed and the persistence of hydrogen bonds between ivermectin and β 1-tubulin was analyzed. It was determined that interactions with residues in positions 27 of **H1**, 225(224), 228(227) of **H7**, 277(276) of **M-loop**, 319(318) of **S8**, 360(359) and 362(361) of **S9-S10** are the most crucial for the maintenance of complexes' stability. Also, with the comparative analysis of taxane site's conformational properties in unbound and ivermectin-bound states it was found that ivermectin's binding to the studied β 1-tubulin structures causes spiralization and

stabilization of **M-loop**. Considering that stabilization of microtubules by ligands of taxane site is mediated by conformational changes of **M-loop**, it was concluded that ivermectin can have stabilizing effect on microtubules *A. thaliana*. This conclusion is also supported with the results of experimental studies of ivermectin influence on the organization and orientation of microtubules in cells of *A. thaliana* GFP-MAP4 and GFP-TUA6 roots.

Consequently, for the first time were determined structural and functional specifics of the ivermectin's interaction with β -tubulin of higher plants (*A. thaliana*) and filamentous fungies (*F. graminearum*/*F. oxysporum*), ivermectin-induced changes in the organization of plant microtubules, and also ivermectin's influence on the development of *A. thaliana*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*. The stability of ivermectin complexes with β 1-tubulin of *A. thaliana*, *H. contortus*, and *F. graminearum*/*F. oxysporum* was verified. The results of research provide foundations for future studies of ivermectin interactions with tubulin of other eukaryotic organisms and for the search of new effective biologically active substances with high affinity for the taxane site of β -tubulin on the basis of ivermectin structure.

Key words: Ivermectin, tubulin, cytoskeleton, microtubules, molecular and cellular mechanisms, cell growth, *Arabidopsis*, plant root, plant resistance, pathogens, *Fusarium*, antifungal activity, *in silico*, molecular docking, molecular dynamics

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. **Kustovskiy, Y.O.**; Karpov, P.A.; Blume, Y.B.; Yemets, A.I.; Ivermectin affects *Arabidopsis thaliana* microtubules through predicted binding site of β -tubulin. *Plant Physiol. Biochem.* **2024**, 206, 108296. DOI: [10.1016/j.plaphy.2023.108296](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.108296) (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення експериментів, участь у аналізі та інтерпретації отриманих даних, участь у написанні статті).
(Scopus / WoS; Q1; IF -6.1)
2. **Kustovskiy, Y.O.**; Buziashvili, A.Y.; Ozheredov, S.P.; Blume, Y.B.; Yemets, A.I. β -Tubulin of *Fusarium* as a potential target for realization of the antifungal activity of ivermectin. *Cytol. Genet.* **2024**, 58, 1, 3–13. DOI: [10.3103/S009545272401002X](https://doi.org/10.3103/S009545272401002X) (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення експериментів, участь у аналізі та інтерпретації отриманих даних, участь у написанні статті).
(Scopus / WoS; Q3; IF -0.5)
3. **Кустовський, Є.О.**; Ємець, А.І. Визначення патернів алостеричної взаємодії івермектину з глутаматзалежним хлоридним іонним каналом *Caenorhabditis elegans*. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* **2023**, 4, 84–92. DOI: [10.15407/dopovidi2023.04.076](https://doi.org/10.15407/dopovidi2023.04.076) (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, аналіз та інтерпретація даних, участь у написанні статті).
(Наукове фахове видання України, **Категорія Б**).
4. **Кустовський, Є.О.**; Бузіашвілі, А.Ю.; Ємець, А.І. Дослідження впливу івермектину на *Fusarium graminearum* та *F. oxysporum*. Фактори експериментальної еволюції організмів. **2022**, 30, 90–94 DOI: [10.7124/feeo.v30.1467](https://doi.org/10.7124/feeo.v30.1467) (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення експериментів, участь у аналізі та інтерпретації отриманих даних, участь у написанні статті).
(Наукове фахове видання України, **Категорія Б**).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

5. **Kustovskiy, Y.O.**; Yemets, A.I. Comparison of stability of ivermectin complexes with β 1-tubulin of *Arabidopsis thaliana*, *Haemonchus contortus*, *Fusarium graminearum*, and *Fusarium oxysporum*. *IV Conference for Young Scientists "PLANT BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY"*, Україна, м. Київ, 2024, 16–18 трав., 9.
6. **Kustovskiy, Y.O.**; Yemets, A.I. The search of structural patterns of ivermectin allosteric interaction with glutamate-gated chloride channel of *Caenorhabditis elegans*. *Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2023. Biotechnologia Acta*. Україна, м. Київ, 2023, 26 трав., 16, 2, 32–34. DOI: [10.15407/biotech16.02.032](https://doi.org/10.15407/biotech16.02.032)
7. **Кустовський, Є.О.**; Ємець А.І. Пошук потенційних сайтів зв'язування івермектину з β -тубуліном *Fusarium graminearum*. *Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології: матеріали VI Міжнародної наукової конференції*. Україна, м. Дніпро, 2022, 6–7 жовтня, 93–95.
8. **Кустовський, Є.О.** Розчинна здатність івермектину як важливий етап вивчення його механізму дії. *Хімія, біо- і нанотехнології, екологія та економіка в харчовій та косметичній промисловості: Збірник матеріалів IX міжнародної науково-практичної конференції*. Україна, м. Харків, 2021, 18–19 лист., 49–54.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	16
ВСТУП.....	17
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ.....	23
1.1 Структура та динамічні властивості мікротрубочок еукаріотичних організмів	23
1.2 Особливості організацій та функцій мікротрубочок рослин.....	28
1.3 Особливості організацій та функцій мікротрубочок нитчастих грибів.....	31
1.4 Особливості взаємодії тубуліну зі сполуками, що дестабілізують мікротрубочки.....	34
1.5 Особливості взаємодії тубуліну з агентами, що стабілізують мікротрубочки.....	36
1.6 Івермектин та механізми його дії.....	38
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	44
2.1 Характеристика речовин, використаних у дослідженні.....	44
2.2 Рослини та умови їхнього вирощування.....	45
2.3 Вивчення впливу IVM на морфо-фізіологічні показники проростків <i>A. thaliana in vitro</i>	46
2.4 Вивчення впливу IVM на мікротрубочки клітин кореня <i>A. thaliana</i> за допомогою лазерної конфокальної скануючої мікроскопії.....	47
2.5 Штами <i>F. graminearum</i> та <i>F. oxysporum</i> та умови їхнього вирощування.....	47
2.6 Визначення чутливості штамів <i>F. graminearum</i> та <i>F. oxysporum</i> до IVM.....	48
2.7 3-D моделювання тубуліну <i>A. thaliana</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F.oxysporum</i> та <i>H.contortus</i>	49
2.8 Моделювання зв'язування IVM з тубуліном <i>A. thaliana</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F.oxysporum</i> та <i>H. contortus</i>	50
2.9 Проведення молекулярно-динамічних симуляцій вільного тубуліну та комплексів IVM з тубуліном <i>A. thaliana</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F.oxysporum</i> та <i>H. contortus</i>	52

2.10 Статистичний аналіз даних	53
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	54
3.1 Вплив IVM на морфо-фізіологічні показники проростків <i>A. thaliana</i>	54
3.2 Вивчення впливу IVM на організацію мікротрубочок клітин головного кореня <i>A. thaliana</i>	62
3.3 Вплив IVM на ріст фітопатогенних штамів <i>F. graminearum</i> та <i>F. oxysporum</i>	72
3.4 Порівняння послідовностей β -тубуліну <i>A. thaliana</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> та <i>H. contortus</i>	77
3.5 Визначення рівноважного стану та порівняння конформаційних властивостей β 1-тубуліну <i>A. thaliana</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> та <i>H. contortus</i>	86
3.6 Пошук оптимального конформаційного стану таксанового сайту для моделювання зв'язування IVM з β 1-тубуліном <i>A. thaliana</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> та <i>H. contortus</i>	93
3.7 Визначення особливостей алостеричної взаємодії IVM з α -гомопентамерним глутаматзалежним рецептором <i>C. elegans</i> та моделювання зв'язування івермектину з таксановим сайтом β 1-тубуліну <i>A. thaliana</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> та <i>H. contortus</i>	100
3.8 Визначення енергії зв'язування та порівняння динамічних властивостей комплексів IVM та β -тубуліну <i>A. thaliana</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> та <i>H. contortus</i>	105
РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	117
ВИСНОВКИ.....	122
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	125
ДОДАТКИ.....	142
ДОДАТОК А. Список публікацій здобувача за темою дисертації.....	142
ДОДАТОК Б. Результати порівняння кількості та стійкості контактів між полярними та зарядженими залишками β 1-тубуліну <i>A. thaliana</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> та <i>H. contortus</i>	144

ДОДАТОК В. Результати порівняння конформаційних властивостей β 1-тубуліну <i>A. thaliana</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> та <i>H. contortus</i> у незв'язаному з IVM стані.....	148
ДОДАТОК Г. Результати визначення взаємозв'язків таксанового сайту β 1-тубуліну <i>A. thaliana</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> та <i>H. contortus</i>	151
ДОДАТОК Д. Результати порівняння фізико-хімічних властивостей проаналізованих конформацій сайту зв'язування IVM з GluCl α та таксанового сайту β 1-тубуліну <i>A. thaliana</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> та <i>H. contortus</i>	152
ДОДАТОК Е. Результати порівняння конформаційних властивостей М-петлі β 1-тубуліну <i>A. thaliana</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> та <i>H. contortus</i>	154
ДОДАТОК Ж. Результати математичного аналізу часових рядів траєкторій молекулярно-динамічних симуляцій.....	156

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ДМСО – диметилсульфоксид;

КДА – картопляно-декстрозне агаризоване середовище;

МС – агаризоване середовище Мурасіге-Скуга;

МТ – мікротрубочки;

AUC – площа під графіком (англ. area under the curve);

CLSM – конфокальна лазерна скануюча мікроскопія
(англ. confocal laser scanning microscopy);

IVM – 22,23-дигідроавермектин В1 (івермектин);

МАР – асоційновані з мікротрубочками білки
(англ. microtubule-associated proteins)

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Мікротрубочки еукаріотичних клітин – це порожні циліндричні об’єднання протофіламентів з зовнішнім діаметром близько 25 нм, які складаються з гетеродимерів α - та β -тубуліну [123, 125]. Роль мікротрубочок відрізняється в залежності від функцій клітини та стадії клітинного циклу: вони забезпечують транспорт органел, синтез клітинної стінки, мітоз, клітинний поділ тощо. Відома велика кількість біологічно активних речовин, які зв’язуються з α - та β -тубуліном [110]. За характером впливу на структуру та динамічні властивості мікротрубочок ці речовини поділяють на стабілізуючі та дестабілізуючі мікротрубочки агенти [29]. До стабілізуючих мікротрубочки біологічно активних речовин належить івермектин – антипаразитарний агент природнього походження з нематоцидною та інсектицидною активністю [82]. Нещодавно було експериментально підтверджено зв’язування івермектину з таксановим сайтом β -тубуліну *Haemonchus contortus* та продемонстровано можливі положення молекули у сайті [7, 8], проте не було проведено детального вивчення структурно-функціональних особливостей взаємодії івермектину з β -тубуліном. Визначення положення івермектину у таксановому сайті β -тубуліну та найважливіших контактів між івермектином та амінокислотними залишками β -тубуліну закладе основу для пошуку та створення нових біологічно активних сполук з високою афінністю до β -тубуліну. Також висока консервативність β -тубуліну вказує на можливість взаємодії івермектину з β -тубуліном інших еукаріотичних організмів, зокрема, рослин та нитчастих грибів.

З огляду на здатність івермектину накопичуватися в ґрунті та рослинних тканинах, а також наявність доказів його впливу на фізіологічні процеси вищих рослин [58, 73, 74, 94, 95, 126, 135], івермектин є потенційно фітотоксичною речовиною, небезпечною для сільськогосподарських рослин. Незважаючи на це, досі не було встановлено механізмів дії івермектину та молекулярних мішеней у рослинних клітинах. Враховуючи можливість зв’язування івермектину з тубуліном рослин, необхідним є вивчення впливу івермектину на мікротрубочки рослинних

організмів та встановлення концентрацій івермектину, за яких виникають зміни у морфо-фізіологічних параметрах рослин. Зручним модельним об'єктом для вивчення впливу івермектину на рослинні мікротрубочки є *Arabidopsis thaliana* L. та, зокрема, трансгенні лінії *A. thaliana* GFP-MAP4 та GFP-TUA6 [81, 84, 130], оскільки завдяки ним можна досліджувати вплив івермектину на структурно-просторову організацію мікротрубочок у живих клітинах у реальному часі.

Фітопатогенні гриби є одним з головних біотичних чинників, що спричиняють хвороби сільськогосподарських рослин, знижуючи їхню врожайність, а також якість та безпечність агропродукції через накопичення в ній мікотоксинів [28]. Тоді як вплив івермектину на гриби-нематофаги є дослідженим через сумісні стратегії застосування для боротьби з паразитичними нематодами [35, 46, 80], вплив івермектину на фітопатогенні нитчасті гриби є малодослідженим. Отже, не менш важливими є вивчення взаємодії івермектину з тубуліном фітопатогенних видів нитчастих грибів та оцінка ефективності івермектину як антигрибного агенту. Серед поширених видів фітопатогенних нитчастих грибів особливу загрозу агроценозам становлять види *Fusarium graminearum* Schwabe та *F. oxysporum* Schltdl. [15, 115], а тому є необхідним пошук ефективних засобів протидії цим патогенам. Раніше було показано зниження продукції та проростання спор та зменшення біомаси *F. oxysporum* при вирощуванні у рідкому середовищі з івермектином [68]. Незважаючи на це, досі не було встановлено механізмів дії івермектину у грибних клітинах, які б пояснювали його антигрибну активність. Одним з можливих пояснень є вплив івермектину на мікротрубочки – саме тому важливим є вивчення особливостей взаємодії івермектину з тубуліном *F. graminearum* та *F. oxysporum* та спричинених івермектином змін у рості колоній цих видів.

Враховуючи все вищезазначене, актуальним є дослідження взаємодії івермектину з тубуліном рослинного та грибного походження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційне дослідження виконано на базі ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» в межах проєкту «Отримання рослин зі стійкістю до фузаріозу за допомогою поліфункціональних біостимуляторів на основі авермектину»

(№ ДР 0120U103109) цільової програми наукових досліджень НАН України «Геномні, молекулярні та клітинні основи розвитку інноваційних біотехнологій» (2020–2024 рр.), а також бюджетних тем: «Біоінформатичні та молекулярно-клітинні дослідження структури та функцій цитоскелету рослин» (2020–2022 рр., № ДР 0120U100937); «Розробка нових стратегій підвищення стійкості рослин до біотичних та абіотичних стресових чинників за допомогою біотехнологічних та нанобіотехнологічних підходів» бюджетної програми наукових досліджень НАН України (2024–2028 рр., № ДР 0124U002424).

Мета і завдання дослідження. Метою дослідження було вивчити взаємодію івермектину з рослинним та грибним тубуліном та спричинені ним зміни у морфології та фізіології рослин та грибів на клітинному та організмовому рівнях.

Враховуючи мету дослідження, було поставлено такі завдання:

1. Вивчити вплив івермектину на ріст та розвиток проростків *A. thaliana*.
2. Дослідити вплив івермектину на структурно-просторову організацію мікротрубочок у живих клітинах головного кореню *A. thaliana*.
3. Визначити чутливість до івермектину колоній фітопатогенних штамів *F. graminearum* (F-55644, F-55748, F-55756) та *F. oxysporum* (F-52897, F-54635, F-55547, f. sp. lycopersici).
4. Порівняти послідовності β -тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum* та *F. oxysporum* загалом та у ділянках елементів структури таксанового сайту, з яким зв'язується івермектин.
5. Провести молекулярно-динамічні симуляції вільного β -тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum* та *F. oxysporum* та відібрати конформації для молекулярного докінгу івермектину до β -тубуліну.
6. Провести молекулярний докінг івермектину до таксанового сайту β -тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum* та *F. oxysporum* та відібрати комплекси івермектину для вивчення їхніх динамічних властивостей.
7. Верифікувати стабільність комплексів івермектину та β -тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum* та *F. oxysporum* та визначити головні взаємодії між івермектином та залишками β -тубуліну

Об'єкт дослідження: закономірності взаємодії івермектину з тубуліном рослинного та грибного походження на різних рівнях організації.

Предмет дослідження: особливості взаємодії івермектину з тубуліном, зміни у структурно-просторовій організації мікротрубочок *A. thaliana* та вплив на ріст і розвиток *A. thaliana*, *F. graminearum* та *F. oxysporum*.

Методи дослідження. Методи культивування *in vitro*: метод дифузії в агар. Методи клітинної біології: конфокальна лазерна скануюча мікроскопія (CLSM). Методи *in silico*: метод множинного вирівнювання послідовностей, метод молекулярного докінгу, метод молекулярно-динамічних симуляцій. Методи статистичного та математичного аналізу.

Наукова новизна отриманих результатів. У результаті виконання роботи вперше було встановлено, що івермектин зв'язується з β -тубуліном *A. thaliana*, *F. graminearum* та *F. oxysporum* та спричиняє зміни у рості та розвитку цих організмів.

Вперше визначено концентрації івермектину, за яких відбуваються зміни у структурно-просторовій організації мікротрубочок клітин головного кореня *A. thaliana*, охарактеризовано ефекти івермектину на організацію мікротрубочок та описано його вплив на ріст та розвиток проростків *A. thaliana*.

Вперше визначено чутливість до івермектину фітопатогенних штамів *F. graminearum* (F-55644, F-55748, F-55756) та *F. oxysporum* (F-52897, F-54635, F-55547, f. sp. lycopersici) та концентрації івермектину, за яких проявлявся його фунгістатичний вплив на зазначені штами.

Вперше порівняно послідовності та конформаційні властивості β -тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum* та *F. oxysporum*, визначено та охарактеризовано головні конформаційні стани таксанового сайту та алостеричні взаємозв'язки таксанового сайту з іншими сайтами та порожнинами β -тубуліну.

Вперше змодельовано комплекси івермектину та β -тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum* та *F. oxysporum*, перевірено та порівняно їхню стабільність, визначено найважливіші взаємодії між івермектином та залишками β -тубуліну. Охарактеризовано спричинені івермектином зміни у конформаціях елементів структури β -тубуліну, що мають важливе структурно-функціональне значення. Також

вперше визначено роль функціональних груп івермектину у зв'язуванні з таксановим сайтом та взаємодії з β -тубуліном.

Практичне значення отриманих результатів. У результаті дисертаційного дослідження було оцінено потенціал івермектину як засобу для захисту рослин від фітопатогенних видів *F. graminearum* та *F. oxysporum* та окреслено перспективи подальших досліджень. Зокрема, отримані результати можуть бути взяті за основу для досліджень по скринінгу сполук з фунгіцидною активністю, а також для вивчення взаємодії івермектину з тубуліном інших еукаріотичних організмів, наприклад, фітопатогенних нематод, які знижують врожайність важливих культур рослин. Розроблена модель зв'язування та визначені структурно-функціональні особливості взаємодії івермектину з β -тубуліном можуть бути використані для пошуку та створення нових ефективних біологічно активних речовин з високою афінністю до β -тубуліну фітопатогенів.

Особистий внесок здобувача. Спільно з науковим керівником були поставлені завдання дисертаційного дослідження та розроблено структуру роботи. Здобувачем самостійно було опрацьовано літературні джерела за темою дослідження, виконано експериментальну роботу та проведено теоретичні розрахунки, отримано, проаналізовано та інтерпретовано оригінальні дані, які були закладені в основу тексту дисертації та опублікованих наукових праць. Наукові роботи написано та опубліковано у співавторстві з А. І. Ємець, Я. Б. Блюмом, А. Ю. Бузіашвілі, П. А. Карповим, С. П. Ожерєдовим. Науковий керівник та інші співавтори брали участь в обговоренні отриманих здобувачем експериментальних результатів та підготовці фінальних версій опублікованих праць.

Апробація матеріалів дисертації. Отримані результати були представлені для обговорення на конференціях: IX міжнародна науково-практична конференція «Хімія, біо- і нанотехнології, екологія та економіка в харчовій та косметичній промисловості» (18–19 листопада 2021 р., м. Харків, Україна); XVII Міжнародна наукова конференція «Фактори експериментальної еволюції організмів» (3–5 жовтня 2022, м. Умань, Україна); VI Міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології» (6–7 жовтня 2022 р., м. Дніпро,

Україна); конференція молодих науковців «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2023» (26 травня 2023 р., м. Київ, Україна); IV-та конференція молодих учених «Біологія рослин і біотехнологія» (16–18 травня 2024 р., м. Київ, Україна).

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, чотирьох розділів, висновків, списку використаних джерел з 155 найменувань та 7 додатків. Загальний обсяг тексту дисертації становить 158 сторінок, а обсяг основного тексту – 107 сторінок. Робота містить 5 таблиць та 35 рисунків.

Автор висловлює подяку за підтримку та консультації під час проведення дисертаційного дослідження науковому керівнику – доктору біологічних наук, професору, члену-кореспонденту НАН України, Заслуженому діячу науки і техніки України Аллі Іванівні ЄМЕЦЬ. Також за можливість проведення дисертаційного дослідження на базі ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» автор висловлює подяку директору інституту – доктору біологічних наук, професору, академіку НАН України Ярославу Борисовичу БЛЮМУ.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1.1 Структура та динамічні властивості мікротрубочок еукаріотичних організмів

Цитоскелет клітин еукаріотичних організмів складається з МТ, проміжних філаментів та актинових філаментів, а також асоційованих з ними білків (МАР) та білкових комплексів [117, 123, 125]. Структурно МТ є порожніми циліндричними утвореннями з зовнішнім діаметром ≈ 25 нм та внутрішнім діаметром ≈ 15 нм, які складаються з протофіламентів. Більшість МТ складаються з 13 протофіламентів, проте їхня кількість варіює в залежності ізотипів α - та β -тубуліну у складі МТ, пострасляційних модифікацій тубуліну, а також взаємодій з МТ білків та біологічно активних речовин [110, 146]. Структурними компонентами протофіламентів є гетеродимери α - та β -тубуліну довжиною ≈ 8 нм та з молекулярною масою ≈ 50 кДа. Ріст МТ відбувається на (+)-кінці, а (–)-кінець в залежності від особливостей нуклеації МТ може або бути стабільним, або деполімеризуватися [49]. Для МТ є характерною динамічна нестабільність або стохастичні переходи між полімеризацією та деполімеризацією [20]. При полімеризації гетеродимери повздовжньо приєднуються до протофіламентів, що супроводжується зв'язуванням та гідролізом ГТФ у консервативному сайті β -тубуліну. Перед гідролізом ГТФ відбувається формування повздовжнього інтерфейсу між β -тубуліном одного гетеродимеру та α -тубуліном іншого [20]. У залежності від кількості та місця розташування ростучих кінців протофіламентів на (+)-кінці МТ виділяють три конфігурації протофіламентів: поодинокі конфігурація (наявний один протофіламент), кутова конфігурація (об'єднання з двох протофіламентів) та потрійна конфігурація (об'єднання з трьох протофіламентів). Переважання тої чи іншої конфігурації на (+)-кінці МТ призводить до змін у динаміці МТ, які можна описали трьома моделями [20]:

1) “розчеплена” модель – при слабких бічних контактах та сильних повздовжніх контактах спостерігається ріст окремих протофіламентів (поодинокі конфігурація).

Для росту МТ за цією моделлю є необхідним посилення бічних контактів та об'єднання незалежних протофіламентів;

2) модель “наконечника” – при підвищенні сили бічних контактів та зниженні сили повздовжніх контактів (кутова конфігурація) спостерігається ріст наконечника з декількох об'єднаних протофіламентів (це найпоширеніша модель росту);

3) “тупа” модель – при однаковій силі бічних та повздовжніх контактів спостерігається лише кутове приєднання гетеродимерів (потрійна конфігурація).

Об'єднання протофіламентів призводить до формування МТ, яка в залежності від розташування субодиниць, між якими встановлюються бічні зв'язки, може бути В- (α - α , β - β) або А-типу (α - β , β - α). Тоді як контакти В-типу є домінуючими, контакти А-типу зустрічаються у зоні “швів”, що порушують спіральну симетрію МТ та вважаються слабким місцем з якого починається її деполімеризація. Головну роль у бічних зв'язках α - та β -тубуліну відіграють контакти **М-петлі** однієї субодиниці з **Н1-S2** та **Н2-S3** прилеглої до неї субодиниці [23]. **М-петля** у складі цих структурних об'єднань має властивості “шарніра”, а зміна її конформаційних станів впливає на кут між протофіламентами. Наслідком змін у конформації **М-петлі** є варіювання кількості протофіламентів у складі МТ, зміни у формі та динамічних властивостях МТ. Можуть відбуватися локальні зміни у певних ділянках МТ, що супроводжується формування змішаних АВ-типів МТ з відхиленнями від традиційної спіральної симетрії [45]. Також у стінці МТ можуть виникати отвори, що свідчить про домінуючу роль бічних контактів між субодиницями при полімеризації МТ, яка може відбуватися навіть при перериванні повздовжньої полімеризації окремих протофіламентів на (+)-кінці МТ.

Більшість еукаріотичних організмів мають декілька ізотипів α - та β -тубуліну, які кодуються різними генами. Наприклад, *Caenorhabditis elegans* має 9 генів α -тубуліну та 6 генів β -тубуліну, *F. graminearum* – 2 гени α -тубуліну та 2 гени β -тубуліну, *A. thaliana* – 6 генів α -тубуліну та 9 генів β -тубуліну тощо [17, 97]. Важливу роль у регуляції динамічних властивостей МТ має гетерогенність, тобто здатність МТ містити різні ізо типи α - та β -тубуліну [110]. Від ізо типів α - та β -тубуліну залежать структурні та динамічні властивості МТ. Варіювання у якісному та

кількісному складі ізотипів α - та β -тубуліну призводить до виникнення субпопуляцій МТ зі спеціалізованою функцією (наприклад, кортикальні МТ, мітотичні МТ тощо) на різних стадіях клітинного циклу [37, 60, 110].

Також на структурні та динамічні властивості МТ впливають посттрансляційні модифікації тубуліну [12, 37, 146]. Відомо про велику кількість посттрансляційних модифікацій, як загальних для всіх білків, так і специфічних для α - чи β -тубуліну, їхніх ізотипів та стану, вільного чи вбудованого в МТ [110, 146]. Деякі з модифікацій (наприклад, гліцилювання) відбуваються лише в клітинах певного типу, що зумовлено унікальними функціями цих клітин. Серед неспецифічних для тубуліну посттрансляційних модифікацій можна виокремити ацетилювання, фосфорилювання, метилювання, пальмітоїлювання, убіквітинування та сумоїлювання. Ацетилювання тубуліну здійснюється ацетилтрансферазою, а його значення для структури та динаміки МТ варіює для α -тубуліну та β -тубуліну та залежить від стану гетеродимеру – вільного чи вбудованого в МТ. Ацетилювання Lys40 α -тубуліну у складі МТ підвищує її гнучкість та захищає від структурних деформацій [107, 110]. Ацетилювання Lys252 β -тубуліну вільного димеру вповільнює процес його вбудовування у МТ, тоді як фосфорилювання, яке здійснюється протеїнкіназами, може інгібувати вбудовування. Відомо про велику кількість залишків, які підлягають фосфорилюванню: у ссавців це Thr80, Thr94, Ser277, Thr257, Tyr357 α -тубуліну та Ser172 β -тубуліну, а у рослин – Ser413, Ser420 тощо [66]. Метилювання Lys40 α -тубуліну, що здійснюється метилтрансферазою, зустрічається у МТ мітотичного веретена (але не астральних МТ) та впливає на динаміку МТ [146]. Поліамінування стабілізує МТ та може впливати на зв'язування або гідроліз ГТФ [146]. Ідентифікованими залишками, які підлягають поліамінуванню, є Glu15 β -тубуліну, Glu128, Glu133, Glu256 та Glu285 α -тубуліну. Пальмітоїлювання залишків цистеїну підвищує гідрофобність тубуліну, сприяє зміцненню взаємодії МТ з плазматичною мембраною та є необхідним для проходження мітозу [32]. Основним залишком, що підлягає пальмітоїлюванню є Cys376 α -тубуліну, у меншій мірі пальмітоїлюванню підлягають Cys20, Cys213 та Cys305. Убіквітинування тубуліну впливає на стабільність МТ, активність моторних білків, мітотичний поділ тощо [91].

Сумоїлування ослаблює взаємодії між протофіламентами у складі МТ та, як наслідок, спричиняє деполімеризацію МТ. У α -тубуліну ссавців сумоїлуванню підлягають Lys96, Lys166, Lys304 [33].

Сайти специфічних для тубуліну посттрансляційних модифікацій розташовані на негативно зарядженому С-кінцевому хвості α - та β -тубуліну. До специфічних для α -тубуліну модифікацій належать тирозилування та детирозилування, які впливають на стабільність МТ та їхні взаємодії з біологічно активними речовинами та МАР [116]. Зокрема, відомим є стабілізуючий вплив детирозилування на структуру та динаміку МТ, який знижує чутливість МТ до деполімеризуючого агенту нокодазолу. Також детирозилування інгібує деполімеризуючу активність моторних білків родини кінезин-13 (МСАК, KIF2A) та моторного білка KIF17 родини кінезин-2. Пов'язаною з детирозилуванням посттрансляційною модифікацією є вкорочення С-хвоста через відщеплення двох або трьох кінцевих залишків з утворенням $\Delta 2$ -тубуліну та $\Delta 3$ -тубуліну відповідно. Модифікований таким чином тубулін перестає бути частиною циклу тирозилування/детирозилування. Іншою пов'язаною посттрансляційною модифікацією є специфічне для α -тубуліну нітротирозилування. Зокрема, 3-нітротирозилування α -тубуліну спричиняє інгібування росту коренів та порушення у морфології кореневих волосків *A. thaliana* [16]. Глутамілування α -/ β -тубуліну, тобто приєднання Glu до сайтів С-кінцевого хвоста білка з утворенням вторинних пептидних ланцюгів, каталізується глутамілтрансферазами та впливає на активність таких МАР як тау-білок, катанін та кінезин-1 [38]. Наразі є маловивченою фізіологічна роль такої посттрансляційної модифікації як гліцилювання, але відомо про зміни у властивостях МТ у результаті цієї посттрансляційної модифікації. Зокрема, було встановлено, що полігліцилювання тубуліну підвищує стабільність МТ, а поліглутамілування – навпаки, її знижує [139].

Залишки α - та β -тубуліну, які підлягають посттрансляційним модифікаціям, а також ензими, що каталізують реакції посттрансляційних модифікацій, відрізняються у різних еукаріотичних організмів. Наприклад, консервативним сайтом фосфорилювання є залишок у 172 положенні послідовності β -тубуліну. Тоді як у ссавців це Ser172, β -тубулін дріжджів у 172 положенні містить аланін або глутамат,

які не фосфорилуються, що впливає на динаміку МТ [146]. Прикладом відмінностей у ензимах у різних еукаріотичних організмів є відсутність у рослин ацетилтрансферази АТАТ1, яка є головною ацетилтрансферазою грибів та ссавців [37]. Навіть у близькоспоріднених видів високу варіабельність має послідовність С-кінця α -/ β -тубуліну, що призводить до відмінностей у перебігу реакцій таких посттрансляційних модифікацій як тирозилування, детирозилування, гліцилювання, глутамілування тощо.

МАР регулюють структурні та динамічні властивості МТ, організацію МТ, беруть участь у везикулярному транспорті, координують МТ та інші компоненти цитоскелету тощо [53, 117, 125, 127, 128]. Зокрема, моторні білки кінезини та динеїни рухаються по МТ до їхніх (+)- та (-)-кінців або навпаки, переміщуючи органели [5, 38, 57, 125, 147]. CLASP регулює динаміку (+)-кінця МТ, стабілізує МТ, а також забезпечує їхній зв'язок з клітинною мембраною [111, 117, 125]. Катаніни, навпаки, мають дестабілізуючий вплив на структуру МТ [38, 78]. МАР65 змінюють структурно-просторову організацію МТ, об'єднуючи прилеглі МТ у пучки [117, 125]. Форміни забезпечують взаємозв'язок між МТ та актиновими філаментами [117, 128]. Окрім МАР, на динаміку МТ впливають біологічно активні речовини, які зв'язуються з α - та β -тубуліном, про які мова йтиме в підрозділах 1.4 та 1.5 [29, 90, 142]. Наприклад, колхіцин та майтанзин сприяють деполімеризації МТ, а таксол та пелорузид – навпаки, стабілізують структуру МТ, посилюючи полімеризацію [86, 87, 103, 104].

Таким чином, МТ – це біополімери, які є частиною цитоскелету еукаріотичних клітин. Особливістю МТ є періодичні переходи між стадіями росту та вкорочення, які лежать в основі здатності МТ до швидких перебудов. Властивості МТ залежать від ізотипів α - та β -тубуліну у складі МТ, посттрансляційних модифікацій тубуліну, взаємодій МТ з МАР та біологічно активними речовинами. Функціональна роль МТ та їхня організація відрізняються в залежності від організму, типу клітини та стадії клітинного циклу.

1.2 Особливості організації та функцій мікротрубочок рослин

Рослинні МТ мають унікальні організації на різних етапах клітинного циклу [81, 133]. Інтерфазною організацією МТ є кортикальна сітка – розгалужена мережа МТ, нуклеація яких відбувається у центрах організації в примембранній області клітини [44, 53, 152]. Нуклеація та ріст кортикальних МТ починається з γ -тубулінового кільцевого комплексу (γ -TuRC), який складається з γ -тубуліну, шести білків кільцевого комплексу та асоційованих регуляторних білків [30, 100]. Такі комплекси найчастіше розміщуються на вже існуючих МТ, але у 1–2% випадків нуклеація починається з γ -тубулінових кільцевих комплексів, не пов'язаних з МТ [30]. Динаміка кортикальних МТ характеризується повільною деполімеризацією на (–)-кінці та швидкою полімеризацією на (+)-кінці. У разі зіткнення двох кортикальних МТ у залежності від кута між ними відбувається їхнє об'єднання у пучок, перехрещування або деполімеризація. Наприклад, якщо кут між МТ становить менше ніж 40° , то (+)-кінець МТ змінює напрямок та формує пучок, а якщо кут становить більше ніж 40° – відбувається або деполімеризація МТ у точці зіткнення, або перехрещування МТ та подальший ріст. Орієнтації кортикальних МТ, тобто направленість їхнього росту, пов'язані з функціями МТ. До таких функцій належать внутрішньоклітинний та позаклітинний везикулярний транспорт, рух та ремоделювання органел. Враховуючи наведені функції кортикальних МТ, слід зазначити, що МТ беруть комплексну участь у рості клітини, регуляції її форми, синтезу клітинної стінки, а також реакції клітини на біотичний та абіотичний стрес [44, 53, 152]. Під час синтезу клітинної стінки кортикальні МТ направляють комплекси целюлозосинтази, визначаючи орієнтацію мікрофібрил целюлози та форму клітин [44, 100, 111]. Кортикальні МТ клітин різних зон кореня *A. thaliana* мають різні орієнтації [81, 111]. Зокрема, МТ меристематичних клітин мають змішану повздовжню та поперечну орієнтацію; МТ клітин перехідної зони та зони елонгації мають поперечну орієнтацію; МТ клітин зони диференціації мають змішані орієнтації; МТ кореневих волосків мають повздовжні орієнтації [101]. Також кортикальній сітці МТ притаманні періодичні перебудови, зумовлені зовнішніми та

внутрішніми чинниками [81, 100]. Одними з таких чинників є світло та фітогормони. Наприклад, як зазначено у статті [100], у епідермальних клітинах пагона та кореня *A. thaliana* зміна орієнтації кортикальних МТ з поперечної на повздовжню індукується ауксинами та світлом синього спектру. Оскільки за нормальних умов рослина росте під впливом доцентрової гравітаційної сили Землі, зміна положення рослини відносно вектору гравітації спричиняє механічний стрес. Такий стрес виникає при кліноостатуванні, коли розподіл гравітаційного навантаження всередині клітини є рівномірним [117]. У клітин кореня *A. thaliana*, що зазнали кліноостатування, спостерігається порушення в орієнтації та організації МТ кортикальної сітки. Кожен чинник має власний клітинний механізм реорганізації МТ з залученням різних регуляторних білків [100].

На ранніх етапах формування препрофазної стрічки відбувається руйнування мережі кортикальних МТ, накопичення МТ у зоні поділу та утворення паралельних побудов МТ [22]. Препрофазна стрічка остаточно формується у переході між інтерфазою та профазою та є побудовою МТ, що займає $\approx 2/3$ клітини. У профазі відбувається поступове звуження препрофазної стрічки, яке супроводжується збільшенням щільності перинуклеарних МТ та завершується руйнуванням стрічки у прометафазі. Основною функцією препрофазної стрічки є закладання місця поділу клітини.

На відміну від клітин ссавців та грибів в рослинних клітинах відсутні центріолі та астральних МТ [76]. Структура мітотичного веретена відрізняється на різних стадіях мітозу. У профазі відбувається конденсація хроматину, починається руйнування ядерної мембрани, формуються полюси веретена з перинуклеарних МТ. У прометафазі відбувається остаточне руйнування ядерної мембрани та вивільнення сестринських хроматид. До кінетохору кожної хроматиди приєднуються МТ. У метафазі кінетохорні МТ переміщують хроматиди у площину зони поділу, а у анафазі – переміщують хроматиди до полюсів. Після цього відбувається деконденсація розділених хромосом та формування нових ядерних мембран. Деполімеризацію МТ мітотичного веретена відбувається у переході між анафазою та телофазою з

утворенням фрагмопласту, який є комплексною структурою, що містить МТ, актинові філаменти, асоційовані з ними білки та мембранні компартменти [14, 124].

Головною функцією фрагмопласту є побудова клітинної стінки, яка відбувається у телофазі через кругове розширення фрагмопласту від центру до країв материнської клітини у зоні поділу. Розширення фрагмопласту потребує транспорту везикул від комплексів Гольджі по МТ, (–)-кінці яких закріплені біля новоутворених ядер, а (+)-кінці направлені до ростучої зони фрагмопласту [124]. У міру руху фрагмопласту відбувається відкладання полісахаридів у новоутвореній клітинній стінці, яке забезпечує її жорсткість [121]. Приєднання клітинної стінки до плазматичної мембрани завершує процес клітинного поділу утворенням двох дочірніх клітин. Після цього відбувається розформування фрагмопласту, а МТ кожної з новоутворених клітин набувають інтерфазної організації [53].

Як зазначено у статті [53], MAP відіграють важливу роль у регуляції організації МТ рослинних клітин. До важливих структурних білків належать MAP65, які зв'язують МТ у паралельні пучки, та CLASP, які зв'язуються з (+)-кінцями МТ, посилюючи полімеризацію МТ [111, 117, 125]. Окрім MAP, загальних для клітин всіх тканин рослини, виділяють також MAP, що мають специфічну функцію у окремих клітинах та на певних етапах клітинного циклу. Наприклад, MDP60, що дестабілізує МТ, є важливим для регуляції розвитку клітин пагона при проростанні насіння. Активність інших АТФ-залежних ензимів, катанінів, що спричиняють фрагментацію МТ, спостерігається на всіх етапах клітинного циклу та є необхідною для реорганізації МТ [78]. Моторні білки у рослин представлені лише надродинию кінезинів (мінімум 13 родин з 17 ідентифікованих) [5]. Через відсутність динеїнів, які забезпечують (–)-спрямований рух у ссавців та грибів, у рослин цю функцію виконують кінезини-14.

Отже, рослинним МТ притаманні певні побудови на різних стадіях клітинного циклу, а саме: кортикальна сітка (існує протягом інтерфазі), препрофазна стрічка (препрофаза), мітотичне веретено (профаза-метафаза-анафаза) та фрагмопласт (телофаза). Кортикальні МТ регулюють ріст та позначають форму клітини, забезпечують відповідь клітини на зовнішні чинники. МТ у складі препрофазної

стрічки закладають місце мітотичного та клітинного поділу. МТ веретена забезпечують мітотичний поділ, а МТ фрагмопласту – утворення первинної клітинної стінки.

1.3 Особливості організацій та функцій мікротрубочок нитчастих грибів

Центрами організації МТ, притаманними як дріжджам, так і нитчастим грибам, є полюсні тільця поділу – дископодібні, багат шарові білкові комплекси, вбудовані у ядерні мембрани [112, 128]. Окрім полюсних тілець поділу, аскоміцети мають й інші центри організації МТ, які знаходяться у зонах поблизу септ, проте структура цих центрів наразі до кінця нез'ясована. У гіфі нитчастих грибів (–)-кінці МТ закріплені у центрах організації МТ, а (+)-кінці переважно направлені до апексу гіфи, де знаходиться специфічна структура нитчастих грибів, що має назву апікальне тіло. МТ забезпечують опосередкований кінезинами транспорту везикул до апікального тіла, яке розподіляє доставлені везикули та визначає напрямок росту гіфи [128]. Важливими MAP нитчастих грибів є TeaA та TeaR: TeaA кепують ростучий (+)-кінець МТ, яка доставляє їх до апексу гіфи, де відбувається їхнє зв'язування з мембранним білком TeaR [127]. Особливості розподілу цих MAP на мембрані апексу гіфи відрізняються для гіф різних видів грибів. Наприклад, у *Aspergillus nidulans* (Eidam) G.Winter TeaR розташовані у центрі апексу, а у *Schizosaccharomyces pombe* Lindner – рівномірно розподілені по всьому апексу. Наслідком відмінностей у розподілі маркерів апексу гіфи є відмінності у організації МТ: у *A. nidulans* МТ сходяться до центру апексу, а у *S. pombe* не мають чітко визначеної точки сходження. Окрім TeaR, відомо про зв'язок TeaA з іншими білками, такими як МТ-полімераза AlpA та формін SepA. Зокрема, TeaA інгібує активність AlpA, посилюючи деполімеризацію МТ біля апексу гіфи. Взаємодія TeaA з SepA є необхідною для забезпечення взаємозв'язку між МТ та актиновими філаментами [128]. Загалом організація та функції МТ клітин гіфи є подібними до організації та функцій МТ інших клітин з направленим ростом, таких як кореневі волоски та пилкові трубки рослин [101]. Як і МТ корневих волосків та

пилкових трубок, МТ гіф грибів орієнтовані (+)-кінцем до апексу клітини, а їхніми основними функціями є транспорт везикул та визначення напрямку росту клітини.

Гіфи нитчастих грибів можуть містити велику кількість ядер, для яких у залежності від виду грибів є характерним асинхронний, парасинхронний або синхронний поділ [42]. При асинхронному поділі кожне ядро у цитоплазмі гіфи зазнає поділу незалежно від сусідніх ядер. Асинхронний поділ є характерним для *Neurospora crassa* Shear & B.O.Dodge, *Ashbya gossypii* (S.F.Ashby & W.Nowell) Guillerm. тощо. Іншим грибам притаманний синхронний (*Ceratocystis fagacearum* (Bretz) J.Hunt) та парасинхронний поділ ядер (*A. nidulans*, *F. oxysporum*). При синхронному поділі ядер всі ядра гіфи діляться одночасно, а при парасинхронному – поділ ядер відбувається хвилями та починається у апексі (*A. nidulans*) або центрі (*F. oxysporum*) гіфи [42]. Однією з функцій МТ дріжджів та нитчастих грибів є переміщення ядер та мітотичних веретен для їхнього рівномірного розподілу у гіфі. Виділяють два механізми переміщення ядер та веретен у нитчастих грибів, ключову роль в яких відіграють (–)-направлені моторні білки динеїни [147]. За першим механізмом динеїн утворює комплекс з мембранним білком Num1. При наближенні (+)-кінця МТ закріплений на мембрані динеїн зв'язується з ним та протягує МТ вздовж мембрани разом з ядром/веретеном. Другим механізмом переміщення ядер/веретен у нитчастих грибів є механізм антипаралельного ковзання МТ, при якому динеїн знаходиться між МТ, що відходять від різних ядер та мають різну направленість. При цьому динеїн є прикріпленим до однієї з МТ та рухається до (–)-кінця іншої МТ, зближаючи ядра/веретена. Переміщення ядер/веретен за обома механізмами можуть відбуватися в одній гіфі одночасно з залученням багатьох динеїнів та асоційованих з ними білків. Динамічна нестабільність МТ відіграє важливу роль в описаних механізмах. Наприклад, за першим механізмом полімеризація (+)-кінця МТ сприяє зближенню МТ з закріпленим на мембрані динеїном, а деполімеризація – протягуванню МТ вздовж мембрани. У *Magnaporthe oryzae* B.C.Couch, що уражає *Oryza sativa* L., переміщення ядер відбувається під час формування апресорія – спеціалізованої клітини, необхідної для проникнення у рослинні тканини [147]. Також у *F. oxysporum* переміщення ядер

відбувається після злиття гіф і є важливим для росту колоній та інфікування рослинних тканин. Таким чином, переміщення ядер у гіфах фітопатогенних нитчастих грибів відіграє важливу роль у патогенезі.

На відміну від рослин, клітинам яких притаманний відкритий мітоз, у більшості нитчастих грибів мітоз є закритим [76]. Головну роль у мітозі грибних клітин відіграють полюсні тільця поділу, що пронизують ядерну мембрану та є центрами організації цитоплазматичних та внутрішньоядерних МТ. У інтерфазі кожне ядро має одне полюсне тільце поділу, від якого відходять цитоплазматичні МТ. У ранній профазі відбувається утворення другого полюсного тільця поділу, розділення двох тілець поділу та їхній рух вздовж ядерної мембрани у протилежних напрямках [112]. Паралельно на кожному полюсному тільці поділу відбувається нуклеація та полімеризація МТ мітотичного веретена, формування якого завершується зупинкою руху полюсних тілець поділу [4]. У метафазі МТ приєднуються до кінетохорів конденсованих хроматид, формуючи фібрили МТ. У анафазі відбувається розділення хроматид, асинхронне розходження сестринських хромосом до різних полюсів веретена та видовження веретена, яке завершується руйнуванням ядерної мембрани. Із залишків ядерної мембрани формуються мембрани дочірніх ядер, при цьому мембрана кожного з новоутворених ядер містить одне з полюсних тілець поділу. На відміну від рослин нитчастим грибам не притаманний клітинний поділ – по завершенню мітозу новоутворені ядра рівномірно розподіляються всередині ростучої гіфи [147].

У підсумку, клітини нитчастих грибів мають певні побудови МТ: цитоплазматичні МТ спрямовані від полюсних тілець поділу на ядерних мембранах до апексу гіфи та внутрішньоядерні МТ мітотичного веретена. Роль МТ у клітинах нитчастих грибів полягає у забезпеченні транспорту везикул до апексу гіфи, мітотичного поділу та розподілу генетичного матеріалу у цитоплазмі гіфи.

1.4 Особливості взаємодії тубуліну зі сполуками, що дестабілізують мікротрубочки

Відповідно до загальноприйнятої класифікації в залежності від ефекту на МТ речовини (або ліганди), які зв'язуються з α - та β -тубуліном, поділяють на стабілізуючі та дестабілізуючі МТ сполуки [142]. Наразі детально вивченими є шість сайтів зв'язування лігандів з α - та β -тубуліном ссавців [29]. Також нещодавно було описано сьомий сайт на α -тубуліні, з яким зв'язуються триазолопіримідини [85, 149]. Хоча ці сайти є характерними для тубуліну всіх еукаріотичних організмів навіть незначні відмінності у амінокислотних послідовностях тубуліну рослин, грибів та ссавців впливають на зв'язування з ними лігандів. Наприклад, відомо про стійкість до таксолу β -тубуліну *Saccharomyces cerevisiae* (Desm.) Meyen, пов'язану з залишками Ala19, Thr23, Gly26, Asn227 та Tyr270 [145]. Враховуючи відмінності у послідовностях тубуліну різних еукаріотичних організмів, при описі сайтів зв'язування у цьому та наступному підрозділі вказано спільні для тубуліну всіх еукаріотичних організмів елементи структури сайтів зв'язування: спіралі (**H**), складки (**S**) та невідпорядковані ділянки між ними.

До сайтів дестабілізуючих агентів належать колхіциновий, вінбластинний та майтанзинний сайти β -тубуліну, а також піронетинний сайт α -тубуліну. Колхіциновий сайт розташований у інтерфейсі між α та β -тубуліном гетеродимеру [86]. Порожнина сайту утворена спіралями **β H7** та **β H8**, невідпорядкованою ділянкою **β H7-H8** та складкою **β S9**. Особливістю колхіцинового сайту є ліганд-індуковане розкриття: при зв'язуванні ліганда з сайтом відбувається зміна конформації **β H7-H8**, наслідком якої є збільшення об'єму порожнини сайту, яке сприяє глибшому зануренню ліганда. Окрім колхіцину, до лігандів цього сайту належать подофілотоксин, комбретастатин, нокодазол, карбендазим, беноміл тощо. Вінбластинний сайт розташований поруч з сайтом зв'язування та гідролізу ГТФ β -тубуліну у інтерфейсі між гетеродимерами [141]. Цей сайт утворений спіралями **β H6**, **β H7**, **α H10**, складкою **α S9** та невідпорядкованими ділянками **β H6-H7**, **β S5-H5**, **α H7-H8**. До дестабілізуючих агентів, що зв'язуються з вінбластинним сайтом, належать

алкалоїди барвінку та діазонаміди. Майтанзиновий сайт розташований на β -тубуліні у міждимерному інтерфейсі та утворений спіралями **β H3, β H11'** та невідповідною ділянкою **β S5-H5** [87]. Окрім майтанзину з цим сайтом зв'язуються спонгістатин, різоксин, плокабулін тощо. Піронетинний сайт також розташований у інтерфейсі між двома гетеродимерами, але на α -тубуліні [105]. Цей сайт сформований спіралями **α H7** та **α H8**, складками **α S1, α S4, α S5** та **α S6** та петлею **α H7-H8**.

Ефект від зв'язування деполімеризуючих МТ агентів відрізняється в залежності від розташування сайту зв'язування на α - чи β -тубуліні, концентрації агенту та стану гетеродимеру, вільного чи вбудованого в МТ. Наприклад, при зв'язуванні лігандів колхіцинового сайту з вбудованим у МТ гетеродимером втрачається випрямлена конформація гетеродимеру, ослаблюються бічні контакти між прилеглими протофіламентами, а також контакти між α - та β -тубуліном гетеродимеру [86]. Ліганди вінбластинного сайту стерично перешкоджають полімеризації МТ, запобігаючи приєднанню нових гетеродимерів до протофіламентів та їхньому переходу з викривленого до вирівняного конформаційного стану [141]. При зв'язуванні з вільними гетеродимерами, ліганди цього сайту порушують полімеризацію, спричиняючи утворення кільцеподібних олігомерів. До подібного ефекту призводить зв'язування лігандів розташованого поруч майтанзинового сайту, які або блокують полімеризацію протофіламентів, або спричиняють утворення немікротрубочкових об'єднань гетеродимерів [87].

Специфічними для тубуліну рослин та найпростіших дестабілізуючими агентами є динітроаніліни та ціаноакрилати [98, 99]. Один з виявлених можливих сайтів зв'язування динітроанілінів та ціаноакрилатів на α -тубуліні знаходиться у інтерфейсі між гетеродимерами поруч з **N-кінцем** та утворений **α H3-S4, α H7, α H7-H8, α H8**. У α -тубуліну *Eleusine indica* (L.) Gaertn. головними залишками сайту є Arg2 **N-кінцевої ділянки**, Gln133 **α H3-S4**, Arg243 **H7**, Val250, Asp251 **α H7-H8**, Val252, Asn253, Glu254 **α H8**. Повний перелік залишків сайту варіює в залежності від походження α -тубуліну, ізо типу, особливостей хімічної структури лігандів та взаємодій. Динітроанілінами, які зв'язуються з цим сайтом, є оризалін, трифлюралін, еталфлюралін, динітрамін, а ціаноакрилатами – етил-(2Z)-3-аміно-2-ціано-4-

етилгекс-2-еноат та ізопропіл-(2Z)-3-аміно-2-ціано-4-етилгекс-2-еноат. Нещодавно було показано інший сайт зв'язування динітроанілінів на α -тубуліні *Lolium rigidum* Gaudin, а саме піронетиновий сайт [65]. Зокрема, було продемонстровано зв'язування трифлюораліну, еталфлюораліну, пендіметаліну, аміпрофосметилу та оризаліну з цим сайтом з утворенням стабільних комплексів. Про зв'язування динітроанілінів з піронетиновим сайтом свідчать мутації залишків сайту, які спричиняють стійкість до динітроанілінів *L. rigidum*: Val202Phe, Ile235Val(Met), Leu238Val, Thr239Ile, Arg243(Lys, Ser, Met), Val252Met.

Отже, до дестабілізуючих МТ агентів належать колхіцин, вінбластин, майтанзин, піронетин, цевіпабулін, динітроаніліни, фосфороамідати та ціаноакрилати, а також споріднені за структурою біологічно активні речовини, які зв'язуються з α - та β -тубуліном. Механізм дестабілізуючого впливу відрізняється в залежності від сайту зв'язування, але спільною ознакою впливу всіх дестабілізуючих МТ агентів є ослаблення повздовжніх контактів між α - та β -тубуліном та порушення полімеризації протофіламентів.

1.5 Особливості взаємодії тубуліну з агентами, що стабілізують мікротрубочки

Головними сайтами зв'язування β -тубуліну зі стабілізуючими МТ агентами є таксановий сайт та сайт лаулімаліду/пелорузиду. Таксановий сайт є історично першим та найбільш дослідженим сайтом стабілізуючих МТ агентів. Він утворений такими структурними елементами β -тубуліну як спіралі **H1**, **H6** та **H7**, складки **S7**, **S8** та **S10** та невідповідні ділянки **H6-H7**, **S7-H9** (**М-петля**), **S9-S10**. З таксановим сайтом зв'язуються таксол, івермектин, епотилони, дискодермолід, діктіостатин, а також ліганди з ковалентним зв'язуванням (зампанолід, циклострептин, таккалонолід) [36, 67, 104]. Другий сайт стабілізуючих агентів – сайт лаулімаліду/пелорузиду, що утворений залишками спіралей **H9**, **H10**, та петель **H9-S8** та **H10-S9**, має менший об'єм у порівнянні з таксановим сайту, а спосіб зв'язування з ним характеризується неповним входженням ліганда у сайт [103].

Аналогічні до таксанового сайту та сайту лаулімаліду/пелорузиду порожнини на α -тубуліні не є відкритими для зв'язування, а тому взаємодія відомих лігандів цих сайтів є специфічною для β -тубуліну [142].

Спільним молекулярним механізмом лігандів таксанового сайту та сайту лаулімаліду/пелорузиду є стабілізація **М-петлі**, яка збільшує афінність **М-петлі** до **H1-S2** та **H2-S3** сусідньої β -субодиниці, посилюючи бічні контакти між прилеглими протофіламентами [18, 104]. Окрім стабілізації **М-петлі**, зв'язування більшості лігандів таксанового сайту спричиняє також спіралізацію **М-петлі**, проте цей ефект є нехарактерним для діктіостатину та діскодермоліду. Тобто спіралізація **М-петлі** на відміну від її стабілізації не є обов'язковою умовою для стабілізації МТ [104]. На відміну від лігандів таксанового сайту ліганди сайту лаулімаліду/пелорузиду безпосередньо взаємодіють з **H3** субодиниці β -тубуліну прилеглого протофіламенту, що має додатковий стабілізуючий ефект на МТ. Відомо про відмінності у структурі МТ, стабілізованої лігандами таксанового сайту та сайту лаулімаліду/пелорузиду [67]. Зокрема, структура стабілізованої пелорузидом МТ характеризуються більшою гомогенністю конформацій тубуліну у порівнянні зі структурою МТ, стабілізованої таксолем та зампанолідом, що свідчить про більш виражений стабілізуючий ефект пелорузиду.

Стабілізуючими МТ агентами, які не зв'язуються з таксановим сайтом та сайтом лаулімаліду/пелорузиду, є триазолопіримідини (цевіпабулін, гаторбулін). Особливістю взаємодії триазолопіримідинів з тубуліном є наявність двох сайтів зв'язування: відомого сайту вінбластину та специфічного для них сайту зв'язування, який знаходиться на α -тубуліні поруч з сайтом ГТФ у інтерфейсі між α - та β -тубуліном гетеродимеру [85, 113, 149]. Цей сайт утворений залишками спіралей **α H6, α H7, β H10**, складки **β S9**, а також неупорядкованих ділянок **α H6-H7, α S5-H5, β H7-H8**. Зв'язування з ним триазолопіримідинів має дестабілізуючий ефект на структуру α -тубуліну, сприяючи його деградації. Попри те, що сайт вінбластину традиційно пов'язують з деполімеризацією МТ, зв'язування з ним триазолопіримідинів має стабілізуючий ефект на МТ. На відміну від лігандів таксанового сайту та сайту лаулімаліду/пелорузиду стабілізуючий ефект

триазолопіримідинів проявляється не через посилення бічних контактів між протофіламентами, а через посилення повздовжніх контактів між гетеродимерами у складі протофіламенту.

Таким чином, більшість стабілізуючих МТ агентів зв'язуються з таксановим сайтом та сайтом лаулімаліду/пелорузиду β -тубуліну, а основою їхнього стабілізуючого впливу на МТ є посилення бічних контактів між прилеглими протофіламентами. Винятком є триазолопіримідини, стабілізуючий вплив яких реалізується через зв'язування з сайтом вінбластину та посилення контактів між α - і β -тубуліном прилеглих гетеродимерів у складі протофіламенту.

1.6 Івермектин та механізми його дії

Івермектин або 22,23-дигідроавермектин В1 (IVM; суміш $\geq 90\%$ В1а та $\leq 10\%$ В1b компонента) – є відомим антипаразитарним агентом, який використовується для боротьби з безхребетними [21, 82]. IVM належить до класу макролідів, оскільки має характерне для них гетеромакроциклічне лактонне кільце з 16 атомів. До макроциклічного кільця приєднані дисахаридна, бензофуранова та спірокетальна функціональні групи [75]. Відмінність між В1а та В1b компонентами суміші полягає у алкільній групі, приєднаній до другого кільця спірокетальної групи: *сек*-бутил у В1а та ізопропіл у В1b. Незважаючи на наявність полярних груп, IVM є гідрофобним, а тому для його розчинення найчастіше використовують ДМСО, ацетонітрил та метанол. Через гідрофобність IVM та його нестабільність у водних розчинах терапевтичне застосування IVM є неможливим без формуляцій, які збільшують його біодоступність. Перелік, опис та порівняння відомих формуляцій IVM та шляхів його використання представлено у огляді [122]. До відомих формуляцій IVM належать стабілізовані водні формуляції, капсули контрольованого вивільнення, біорозкладні підшкірні імпланти, ліпідні нанокапсули тощо. Використання різних носіїв у формуляціях дозволяє змінювати фармакокінетику IVM. Наприклад, використання ліпосом сповільнює біотрансформацію IVM та збільшує тривалість його дії [122].

Встановлено, що антипаразитарний механізм дії IVM базується на його зв'язуванні з Cys-петльовими рецепторами безхребетних, а саме глутамат-залежними (GluCl^-), pH-чутливими та гістамін-залежними хлоридними рецепторами нематод та ГАМК-рецепторами комах [50, 92, 151]. Молекулярно-механічні особливості взаємодії IVM з GluCl^- нематод є детально дослідженими. Зокрема, було експериментально визначено структури комплексів IVM з GluCl^- *C. elegans*, доступні у RCSB PDB за ідентифікаторами 3RHW, 3RI5, 3RIA, 3RIF [50]. Зв'язування IVM з GluCl^- нервових та м'язових клітин паразитичних нематод має алостеричний ефект на конформацію рецептора, спричиняючи його перехід від закритого до відкритого стану або посилення вже існуючого потоку йонів [50]. Наслідком активації GluCl^- IVM є збільшення внутрішньоклітинної концентрації Cl^- та гіперполяризація клітинної мембрани. За цим механізмом IVM інгібує роботу глоткового м'язу, рухових нервів, репродуктивної системи та імунної системи нематоди [82]. Інший механізм дії IVM у клітинах нематод описано у роботах [7,8], у яких показано зв'язування IVM з тубуліном *H. contortus* за концентрації 33 μM . Оскільки IVM стабілізував МТ *H. contortus* та конкурував за зв'язування з таксоллом, було запропоновано таксановий сайт β -тубуліну як сайт зв'язування IVM [7, 8].

Відомі й інші мішені IVM, як теоретично зпрогнозовані, так і експериментально підтверджені. Зокрема, у RCSB PDB наявні комплекси IVM з Cys-петльовими рецепторами хребетних: гліциновим рецептором *Homo sapiens* L. та *Danio rerio* Hamilton, 1822 (3JAF, 5VDH, 5VDI, 6VM0, 6VM2, 6VM3, 8FE1) та нікотинним ацетилхоліновим рецептором *H. sapiens* (8UZJ, 8F4V) [13, 25, 40, 54, 70]. До рецепторів нервової системи ссавців, з якими взаємодіє IVM, також належать ГАМК_A-рецептор, калієвий G-білокспряжений рецептор, P2X4 та P2X7 рецептори [19, 25, 26]. Оскільки IVM здатний зв'язуватися з іонотропними рецепторами нервових клітин *H. sapiens*, було запропоновано його застосування для лікування хвороб нервової системи: алкогольної залежності, епілепсії, патологій рухових нейронів тощо. Водночас у нещодавній оглядовій статті наведено аргументи проти такого застосування IVM [79], серед яких неспецифічність дії IVM та неможливість подолання IVM гематоенцефалічного бар'єру ссавців через гідрофобність IVM та дію

Р-глікопротеїнів. Р-глікопротеїни належать до надродини ABC-транспортів та також наявні у нематод, зумовлюючи тканин-специфічну чутливість до IVM [39]. Окрім Р-глікопротеїнів, IVM також взаємодіє з іншими ABC-транспортерами, MRP2 та BCRP1. Як описано у роботі [108], в залежності від концентрації IVM, його взаємодія з ABC-транспортером завершується або виведенням IVM з клітини, або інгібуванням активності транспортеру, що впливає на фармакокінетику інших біологічно активних речовин у клітині. Біотрансформація IVM у ссавців в основному відбувається через реакції С-гідроксилювання та О-деметилування, що у людини каталізуються цитохромами P450 3A4, 3A5 та 2C9 [108]. Водночас більш ніж 90% від застосованих доз агенту виводяться незміненими з організмів ссавців з фекаліями та ще близько 2% виводиться з сечею, що спричиняє накопичення IVM у навколишньому середовищі. Важливою мішенню IVM у організмі людини є фарнезоїдний Х-рецептор, що регулює метаболізм холестерину, жовчної кислоти, глюкози тощо [61]. Це свідчить про можливість використання IVM та структурних аналогів для зниження рівня глюкози та холестерину.

Протипухлинну активність IVM пояснюють його впливом на перебіг сигнальних каскадів у злоякісних клітинах, який описано у оглядах [77, 129]. Зокрема, блокування IVM сигналів PAK1 індукує аутофагію у клітинах раку молочної залози, меланоми та гліоми через порушення Akt/mTOR каскаду, а також має цитотоксичний ефект на клітини меланоми та назофарингальної карциноми через порушення MAPK каскаду. IVM інгібує проліферацію клітин мозкової гліоми через порушення сигнального каскаду DDX23/miR-12. Порушення IVM експресії важливого онкогенного фактору YAP1 призводить до інгібування проліферації клітин раку травної системи. Взаємодії IVM з ГАМК, гліциновими та пуринергічними рецепторами також пов'язують з його інгібуючим впливом на злоякісні клітини деяких форм лейкемії. Також відомо про інгібування IVM активності Ca^{2+} -активованих Cl^- каналів (TMEM16A) у клітинах аденокарциноми легень миші [153]. Протипухлинна активність IVM у клітинах раку простати, легень та колоректального раку базується на інгібуванні IVM HSP27, яке запобігає фосфорилюванню HSP27 та його деполімеризації [93]. Також відомо про вплив IVM

на експресію генів інших білків теплового шоку ссавців (HSPA1) та безхребетних (HSP70, HSP90) [31, 41, 48, 63, 93, 134]. Відомо про стабілізуючий ефект впливу IVM на МТ ракових клітин HeLa, який призводив до зупинки клітинного циклу [9]. Іншим механізмом дії IVM у клітинах HeLa, а також клітинах раку яєчника, лейкемії, карциноми та гліобластоми, є індукція апоптозу, спричинена підвищенням вмісту реактивних форм кисню у клітині. Як описано в роботі [59], IVM зменшував проліферацію Т-клітин людини, інфікованих вірусом лейкозу Т-клітин людини 1 типу, який спричиняє розвиток лейкозу/лімфоми. Механізмом дії IVM у інфікованих Т-клітинах було блокування ним опосередкованого α/β -імпортинами ядерного транспорту білків.

Взаємодія IVM з α -імпортином є основою антивірусної та антималярійної активності IVM, оскільки наслідком блокування IVM ядерного транспорту вірусних білків є зупинка реплікації геномів РНК- та ДНК-вірусів [59, 140]. Зокрема, інгібування IVM α/β -імпортинів перешкоджає транспорту всередину ядра вірусних РНК- та ДНК-полімерази, РНК-гелікази тощо. За цим механізмом IVM інгібує реплікацію вірусів грипу, вірусу денге, вірусу Західного Нілу, вірусу псевдосказу тощо [109]. Окрім α/β -імпортинів існують й інші молекулярні мішені IVM, пов'язані з його антивірусною активністю. Наприклад, експериментально підтверджено інгібування реплікації флавівірусів через зв'язування IVM з NS3 геліказою [83]. Теоретично було змодельовано зв'язування IVM з 13 відомими мішенями COVID-19: головною протеазою, папаїн-подібною протеазою, геліказою, ендорибонуклеазою, РНК-залежною РНК-полімеразою тощо [120]. Серед досліджених комплексів найбільшу стабільність мав комплекс IVM, РНК-залежної РНК-полімерази та РНК.

Через накопичення IVM у навколишньому середовищі внаслідок його тривалого використання як терапевтичного агенту важливим є вивчення впливу IVM на нецільові організми та, зокрема, на вищі рослини. Відомо про накопичення IVM у тканинах вищих рослин на пасовищах, де залишалися випорожнення тварин [58]. Вплив IVM на вищі рослини охарактеризовано у роботах [73, 74, 94, 95, 126, 135]. Зокрема, було вивчено вплив IVM на транскриптом та метаболізм *A. thaliana* та виявлено зміни у активності генів пагона та коренів, що задіяні у регуляції відповіді

рослини на абіотичний та біотичний стрес [126]. Також було досліджено вплив IVM на ростові показники *Sinapis alba* L. – спостерігалось зменшення довжини коренів за дії наномолярних концентрацій агенту [135]. Спричинені IVM зміни у активності ферментів, що захищають рослинні клітини від активних форм кисню у *Plantago lanceolata* L., *Glycine max* (L.) Merr., та *Trifolium pratense* L. описано у роботах [74, 94, 95]. Як показано у статті [73], IVM у концентрації 10 мг/мл спричиняв зміни у проростанні насіння *Centaurea jacea* L., *P. lanceolata*, *P. media* L., *Cerastium holosteoides* Fr., *Lychnis flos-cuculi* L., *Phleum phleoides* (L.) H.Karst. тощо.

Підставою для вивчення впливу IVM на патогенні гриби переважно слугують сумісні стратегії застосування IVM та грибів-нематофагів для боротьби з паразитичними нематодами [6, 24, 35, 46]. У цьому напрямку досліджували вплив IVM на *Duddingtonia flagrans* (Dudd.) R.C.Cooke, *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler) de Hoog & Oorschot, *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) A.H.S.Br. & G.Sm. тощо. Загалом IVM не мав вираженого антигрибного впливу на зазначені види грибів, а тому є придатним для сумісного застосування з грибами-нематофагами. Раніше досліджували вплив IVM на штами нитчастих грибів *F. oxysporum*, *F. solani* (Mart.) Sacc., *Mucor racemosus* Fresen., *Phanerochaete chrysosporium* Burds. та *Trametes versicolor* (L.) Lloyd [68]. IVM спричинив зміни у рості та розмноженні дріжджеподібної форми розвитку зазначених видів грибів, при цьому чутливість до IVM та його ефект відрізнявся в залежності від виду [68]. Зокрема, спостерігали зменшення споруляції *F. oxysporum* та *F. solani* та зменшення біомаси *F. oxysporum* внаслідок впливу IVM у концентрації 10^{-5} М. Вплив IVM на колоніальну форму *F. graminearum* та *F. oxysporum* раніше не досліджували.

Таким чином, IVM є біологічно активною речовиною з нематоцидною, інсектицидною, протипухлинною, антивірусною та антималярійною активністю. Нематоцидна та інсектицидна активності IVM базуються на його взаємодії з GluCl^- та ГАМК-рецепторами, що належать до надродина Cys-петльових рецепторів. Основою протипухлинної активності IVM є порушення сигнальних каскадів, зміни у експресії генів, взаємодії IVM з мембранним рецепторами, підвищення вмісту реактивних форм кисню тощо [77, 129, 153]. Головний механізм антивірусної дії IVM полягає в

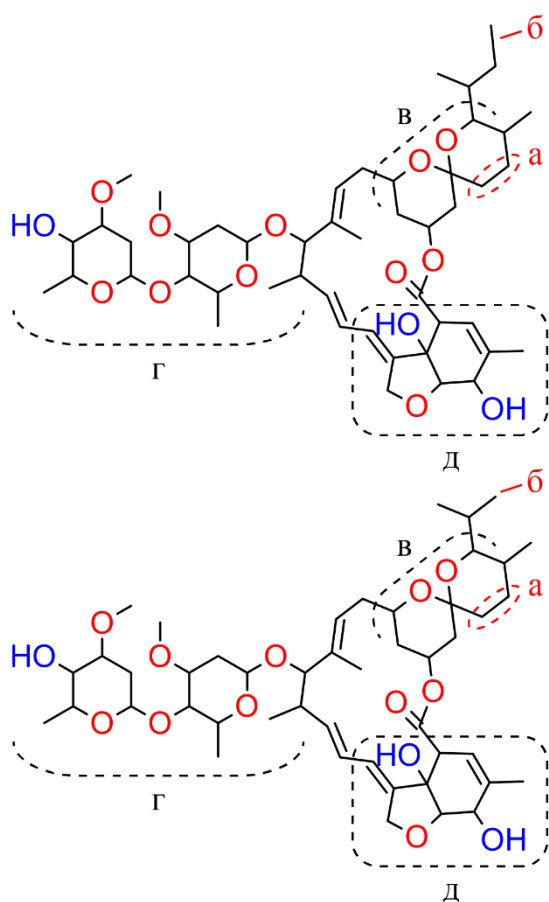
перешкоджанні реплікації геномів РНК- та ДНК-вірусів шляхом блокування транспорту необхідних для реплікації вірусних білків всередину ядра [59, 140]. Наразі відсутні підтверджені молекулярні мішені IVM у організмах рослин та грибів, водночас їхній пошук є необхідним для пояснення впливу IVM на ці організми [68, 73, 74, 94, 95, 126, 135]. Раніше було показано зв'язування IVM з таксановим сайтом β -тубуліну *H. contortus* та опосередковану IVM стабілізацію МТ цього організму [7, 8]. Також відомо про стабілізацію IVM МТ клітин HeLa [9]. Оскільки β -тубулін є консервативним білком еукаріотичних організмів, одним з можливих механізмів дії IVM у рослинних та грибних клітинах є стабілізація МТ через зв'язування IVM з рослинним та грибним β -тубуліном.

Тому, метою дисертаційного дослідження було вивчити взаємодію IVM з β -тубуліном рослинного та грибного походження, а також спричинених IVM змін у морфології та фізіології рослин і грибів.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Характеристика речовин, використаних у дослідженні

У дослідженні використовували 22,23-дигідроавермектин В1 (IVM) (Sigma-Aldrich, США) (<https://www.sigmaaldrich.com>). IVM є похідним авермектину В1 з гідрогенізованим подвійним зв'язком між 22 та 23 атомом вуглецю (рис. 2.1 а).



Назва IUPAC: 22,23-дигідроавермектин В1а

Формула: $C_{48}H_{74}O_{14}$

Молекулярна маса: 875,10 г/моль

Назва IUPAC: 22,23-дигідроавермектин В1b

Формула: $C_{47}H_{72}O_{14}$

Молекулярна маса: 861,07 г/моль

Рис. 2.1 Структурні формули 22,23-дигідроавермектину В1а та 22,23-дигідроавермектину В1b: зв'язок між 22 та 23 атомом вуглецю (а); *сек*-бутил (В1а) або ізопропіл (В1b) (б); спірокетальна група (в); дисахаридна група (г); бензофуранова група (д)

IVM є сумішшю двох компонентів: головного 22,23-дигідроавермектину В1а ($\approx 90\%$ суміші; PubChem CID: 6321424) та другорядного 22,23-дигідроавермектину

B1b ($\approx 10\%$; PubChem CID: 6321425). B1a та B1b компоненти IVM є структурними аналогами, які складаються з гетеромакроциклічного кільця та приєднаних до нього дисахаридної, бензофуранової та спірокетальної групи (рис. 2.1 в, г, д). Єдиною відмінністю у структурі B1a та B1b компоненту є функціональна група, приєднана до 25 атому вуглецю, – у B1a компоненту це *сек*-бутил, а у B1b компоненту – ізопропіл (рис. 2.1 б). Оскільки B1a є головним компонентом суміші та вважається більш біологічно активним, саме комплекси 22,23-дигідроавермектину B1a є структурно описаними (<https://www.rcsb.org/ligand/IVM>). IVM розчиняли у диметилсульфоксиді (ДМСО; C_2H_6OS ; молекулярна маса: 78,14 г/моль). Маточний розчин IVM у концентрації 10 мг/мл зберігали у темряві за температури 4°C.

2.2 Рослини та умови їхнього вирощування

Для вивчення впливу IVM на рослинні організми використовували проростки дикого типу *A. thaliana* (екотип Columbia Col-1), а також трансгенних ліній *A. thaliana* GFP-MAP4 та GFP-TUA6 (отриманих з Nottingham Arabidopsis Stock Center, NASC; <https://arabidopsis.info>) [81, 84, 130]. Лінія *A. thaliana* GFP-MAP4 (NASC ID: N799990) експресує химерний ген білка GFP та зв'язувального домену MAP4 [81, 84]. Лінія GFP-TUA6 (NASC ID: N6551) експресує химерний ген α 6-тубуліна *A. thaliana* з приєднаним до N-кінця GFP [130]. GFP-MAP4 та GFP-TUA6 є загальноприйнятими модельними об'єктами для дослідження структурно-просторової організації МТ у живих клітинах проростків *A. thaliana*.

Поверхню насіння *A. thaliana* стерилізували у 0,5% розчині гіпохлориду натрію (NaOCl), як описано у статті [72]. Стерилізоване насіння висаджували на середовище Мурасіге-Скуга (МС; Sigma-Aldrich, США, M5519), що містило макросолі, мікросолі та вітаміни у загальній концентрації 4,4 г/л. Під час приготування до середовища було додано 10 г/л сахарози та 4 г/л агару, рН 5,7. Після висаджування насіння здійснювали його стратифікацію за температури 4 °C протягом 1 доби. Чашки Петрі зі стратифікованим насінням *A. thaliana* розміщували вертикально у культуральній

кімнаті, де насіння пророщували та проростки вирощували за температури 23 °C та 16/8-годинного фотоперіоду.

2.3 Вивчення впливу IVM на морфо-фізіологічні показники проростків *A. thaliana in vitro*

Для вивчення впливу IVM на ріст та розвиток проростків *A. thaliana* (Col-1) *in vitro* додавали до середовища МС IVM у концентраціях 50, 100, 250 та 500 мкг/мл та ДМСО у концентраціях 0,5%, 1,0%, 2,5% та 5,0% відповідно. Проростки фотографували на 3-тю, 6-ту та 12-ту добу вирощування, використовуючи камеру Canon PowerShot G6. Під час аналізу зображень заміряли зміни у загальній довжині проростків та довжині їхніх коренів та порівнювали середні значення цих показників з контролем (проростки, що росли на звичайному МС).

Спричинені IVM зміни у морфології головних та бічних коренів *A. thaliana* вивчали за допомогою лазерного скануючого мікроскопу Carl Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss, Єна, Німеччина) на базі інвертованого мікроскопу Axiovert 200 M. Для спостережень за живими коренями *A. thaliana* використовували об'єктив EC Plan-Neoflural 10x/0,30. Поверхню коренів *A. thaliana* сканували діодним лазером (405–430 нм). Випромінювання лазера фільтрували дихроїчним дзеркалом HFT 405/488. Сигнал, отриманий від поверхні кореня, вловлювали детектором, обладнаним фотопомножувачем (PMT) прохідного світла (канал ChD).

Загальну довжину проростків, довжину та морфологію головних коренів та кореневих волосків аналізували у FIJI – дистрибуції ImageJ з додатковими плагінами для роботи з мікроскопічними знімками [118]. Для доступу до зображень в форматі LSM використовували плагін LSM ToolBox. Висновок про вплив IVM на приріст та морфологію проростків та їхніх головних коренів формували на підставі спостережень 30 проростків кожної групи (IVM, ДМСО, МС). Експерименти закладали у трикратній повторності.

2.4 Вивчення впливу IVM на мікротрубочки клітин кореня *A. thaliana* за допомогою лазерної конфокальної скануючої мікроскопії

Для визначення гострого впливу IVM на МТ (1 та 2 години обробки) корені шестиденних проростків трансгенних ліній *A. thaliana* GFP-MAP4 та GFP-TUA6 занурювали у розчин фінальної концентрації агенту (50, 100, 250 мкг/мл). Контролі робили з відповідною концентрацією ДМСО (0,5%; 1,0%; 2,5%) та дистильованою H₂O.

Вплив IVM на структурно-просторову організацію МТ клітин головного кореня *A. thaliana* вивчали за допомогою лазерного скануючого мікроскопу Carl Zeiss LSM 510 META. Для спостережень за МТ клітин кореня *A. thaliana* використовували об'єктив Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil DIC. GFP збуджували випромінюванням аргонного лазера з довжиною хвилі 488 нм. Випромінювання лазера фільтрували, використовуючи дихроїчне дзеркало HFT 488/543, а сигнал від GFP – за допомогою фільтру емісії BP 505–530. Корені сканували з кроком у 100–300 нм у режимі однопрохідного сканування, роблячи зрізи 1024x1024 на кожному кроці. Для отримання зображень зрізи проєктували на z-вісь.

Аналіз зображень здійснювали у FIJI, використовуючи плагіни LSM ToolBox та Directionality для визначення орієнтацій МТ у клітинах [118]. Висновок про вплив IVM на МТ клітин різних зон головного кореня ліній *A. thaliana* GFP-MAP4 та GFP-TUA6 робили на підставі спостережень коренів 30 проростків.

2.5 Штами *F. graminearum* та *F. oxysporum* та умови їхнього вирощування

У експериментах з визначення чутливості штамів до IVM використовували штам *F. graminearum* (F-55644, F-55748, F-55756) та *F. oxysporum* (F-52897, F-54635, F-55547), отримані з Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Штам *F. oxysporum* f. sp. lycopersici був наданий співробітником Кафедри екобіотехнології та біорізноманіття

Національного університету біоресурсів та природокористування України, д.с.-г. н.,
Бородай Вірою Віталіївною.

Колонії вирощували у темряві за температури 26 °С на картопляно-декстрозному агаризованому середовищі (КДА), який містив 285 г/л картоплі, 20 г/л декстрази та 15 г/л агару, рН 5.5 [144]. При здійсненні пасажу колоній з периферії 7-денної батьківської колонії виділяли фрагмент міцелію, який розміщували по центру чашки Петрі зі свіжим живильним середовищем.

2.6 Визначення чутливості штамів *F. graminearum* та *F. oxysporum* до IVM

Чутливість штамів *F. graminearum* та *F. oxysporum* до IVM визначали в умовах *in vitro* за допомогою методу дифузії в агар [1, 10, 71]. На рис. 2.2 представлено схематичне зображення експериментів.

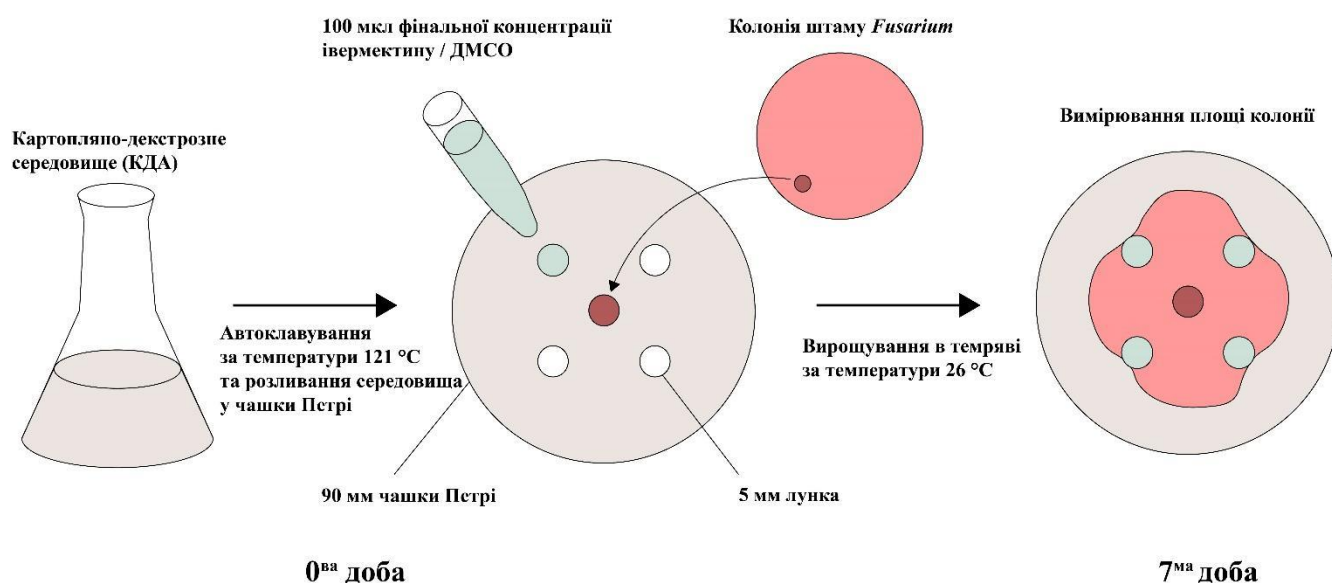


Рис. 2.2 Схема проведення дослідження з визначення чутливості штамів *F. graminearum* та *F. oxysporum* до IVM в умовах *in vitro*

У лунки в живильному середовищі КДА вносили IVM у концентрації 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 та 3,0 мг/мл та відповідні концентрації ДМСО (контроль). По центру чашки Петрі на поверхні живильного середовища розміщували фрагмент міцелію

7-денної батьківської колонії. Фотографії 7-денних колоній штамів, отримані за допомогою камери Canon PowerShot G6, аналізували у FIJI [118]. Під час аналізу отриманих зображень вимірювали площу колоній штамів, вирощених за різних концентрацій IVM та за контрольних умов (ДМСО та КДА). Чутливість *F. graminearum* та *F. oxysporum* до IVM визначали з урахуванням відмінностей у середніх значеннях площ колоній за різних умов (IVM, ДМСО, КДА). Досліди закладали у трикратній повторності, висновок про вплив IVM на ріст та розвиток кожного штаму робили на підставі спостережень щонайменше 3 чашок Петрі для кожного штаму/концентрації.

2.7 3-D моделювання тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*, *F.oxysporum* та *H. contortus*

Таксаний сайт, з яким зв'язується IVM, є недоступним для зв'язування на α -тубуліні, тому у дослідженні використовували моделі β -тубуліну, теоретично зпрогнозовані за допомогою AlphaFold та видобуті з UniProtKB (табл. 2.1) [64].

Таблиця 2.1

Моделі β -тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*, *F.oxysporum* та *H. contortus*

№	Організм	Ізотип	UniProtKB ID
1	<i>A. thaliana</i>	1	P12411
2	<i>H. contortus</i>	1	A2TF56
3	<i>F. graminearum</i>	1	Q4HZS8
4	<i>F. oxysporum</i>	1	A0A2C8CYR1

Перед моделюванням взаємодій IVM з β 1-тубуліном моделі β 1-тубуліну та їхні послідовності було порівняно за допомогою Free Maestro v. 13.1 (Schrödinger Release 2021-1: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021). Попарне порівняння та множинне вирівнювання послідовностей β 1-тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* та *H. contortus* було здійснене у Multiple Sequence Viewer/Editor Free Maestro v. 13.1. Множинне вирівнювання послідовностей було зроблено за використання методу MUSCLE [27]. Результати множинного

вирівнювання послідовностей були візуалізовані та проаналізовані у Jalview v. 2.11.2.6 [143]. Також було зроблено порівняння вмісту різних типів залишків β 1-тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* та *H. contortus* та їхніх фізико-хімічних властивостей відповідно до класифікації Тейлора, продемонстрованої на рис. 2.3.

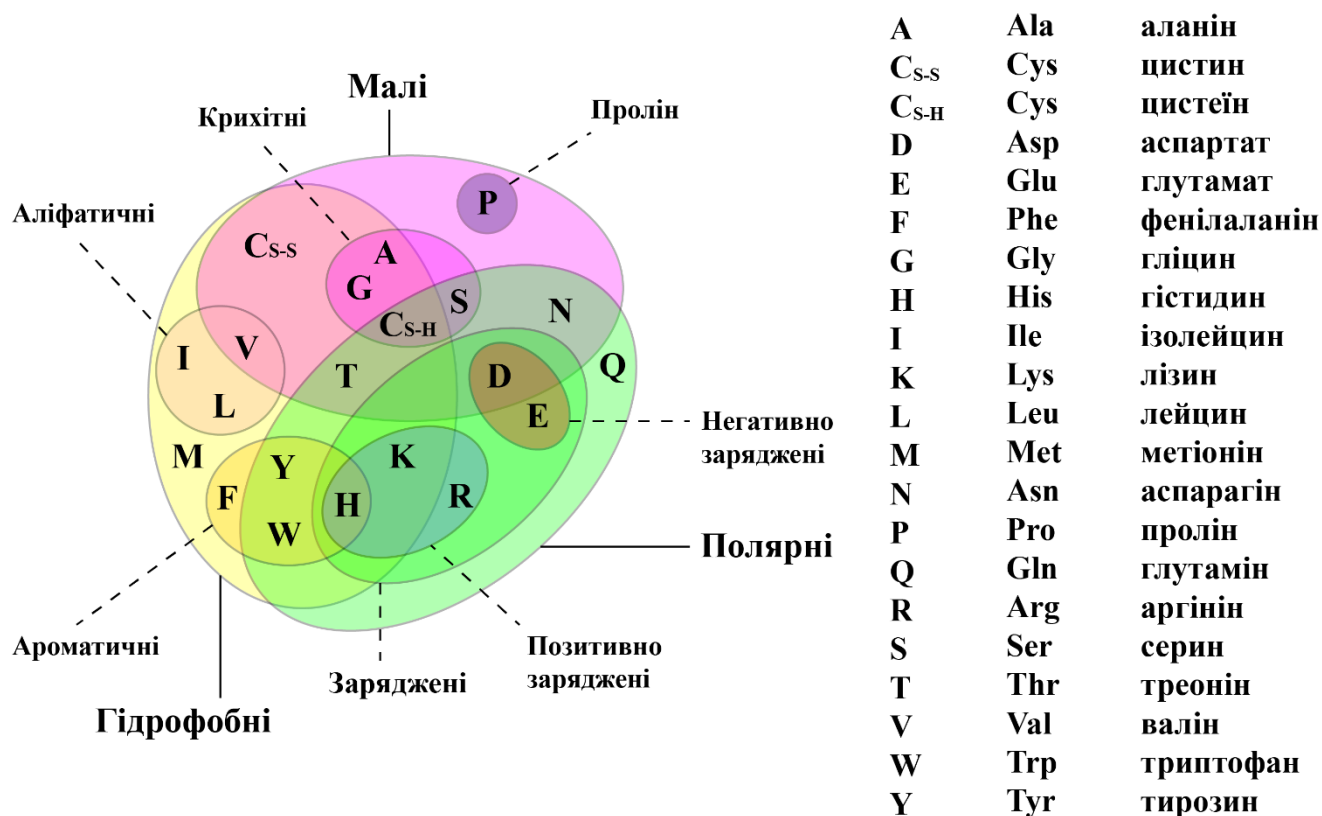


Рис. 2.3 Класифікація залишків за Тейлором (діаграма Вена)

2.8 Моделювання зв'язування IVM з тубуліном *A. thaliana*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* та *H. contortus*

Перед моделюванням зв'язування IVM з тубуліном було проаналізовано комплекси IVM з його відомими мішенями та визначено біологічно активні функціональні групи IVM. Зокрема, було здійснено профілювання сайту зв'язування та визначено структурні патерни алостеричної взаємодії IVM з GluCl α *C. elegans*. Для цього використовували експериментально визначені структури комплексів з RCSB

PDB: 3RHW та 3RIF [50]. Профілювання сайту зв'язування комплексів IVM з GluCla *C. elegans* здійснювали у SeeSAR v. 12.1.0 [136, 137]. Структурні патерни взаємодії IVM з GluCla *C. elegans* визначали на підставі внеску атомів кожної функціональної групи IVM у стабільність комплексів, визначеного за допомогою методу HYDE [2, 119]. Залишки ідентифікованих структурних патернів розподіляли за типами та фізико-хімічними властивостями відповідно до класифікації Тейлора [2, 131], показаній на рис. 2.3. Результати аналізу використовували при моделюванні зв'язування IVM з β -тубуліном *A. thaliana*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* та *H. contortus*. Також було здійснено негнучкий редокінг IVM до GluCla у програмному пакеті GOLD v. 5.3 та оцінено афінність IVM до GluCla *C. elegans* за допомогою функцій скорингу ChemPLP та ASP [62, 69, 89].

Зв'язування IVM з таксановим сайтом β -тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* та *H. contortus* моделювали за допомогою методу напівгнучкого молекулярного докінгу з використанням GOLD v. 5.3. Перед проведенням докінгу біологічно активну конформацію IVM було видобуто з комплексу 3RIF та енергетично мінімізовано у вакуумі. Оптимізацію геометричних властивостей структури IVM (енергетичну мінімізацію) здійснювали у Free Maestro v. 13.1. Для оцінювання афінності IVM до β -тубуліну у отриманих за допомогою докінгу комплексах використовували функції скорингу ChemPLP та ASP (для рескорингу) [62, 69, 89]. На підставі оцінок функцій скорингу ChemPLP та ASP та методу HYDE порівнювали афінність IVM до β -тубуліну та GluCla *C. elegans*. З урахуванням результатів скорингу та рескорингу у GOLD було відібрано комплекси з найбільшою афінністю IVM до β -тубуліну кожного організму. Ці комплекси додатково були проаналізовані у SeeSAR з використанням методу HYDE [71, 72, 119]. Найвірогідніший з варіантів зв'язування IVM з кожною моделлю β -тубуліну було верифіковано за допомогою молекулярно-динамічних симуляцій тривалістю 100 нс.

2.9 Проведення молекулярно-динамічних симуляцій вільного тубуліну та комплексів IVM з тубуліном досліджуваних видів

Молекулярно-динамічні симуляції тривалістю 100 нс проводили двічі для кожної моделі β -тубуліну:

1) симуляції β -тубуліну у незв'язаному з IVM стані здійснювали для відбору конформаційних станів мішеней для проведення молекулярного докінгу та вивчення динамічних властивостей вільного β -тубуліну. Зібрані конформації вільного β -тубуліну в подальшому використовували як негативний контроль при вивченні впливу IVM на β -тубулін.

2) симуляції комплексу β -тубуліну з IVM здійснювали для верифікації стабільності комплексів, вивчення взаємодії IVM з β -тубуліном та визначення спричинених IVM змін у конформації β -тубуліну.

Для проведення молекулярно-динамічних симуляцій використовували пакет GROMACS v. 2022.4, скомпільований у змішаній точності з підтримкою GPU розрахунків [3]. Симуляції здійснювали з використанням силового поля CHARMM36 та рекомендованої, модифікованої під силове поле триточкової моделі води TIP3P [55]. Перед проведенням продуктивних молекулярно-динамічних симуляцій здійснювали двохетапну еквілібрацію кожної системи з набором референтної температури та тиску. Для цього спочатку відтворювали канонічний (NVT) ансамбль, а потім – ізотермально-ізобаричний (NPT) ансамбль. У симуляціях використовували референту температуру у 300 K та тиск у 100 кПа. Для контролю за температурою під час еквілібрації та продуктивної динаміки використовували V-rescale термостат. Для набору референтного тиску у 100 кПа на NPT етапі еквілібрації застосовували S-rescale баростат, а для підтримання тиску під час продуктивної динаміки – баростат Парінілло-Рахмана.

Отримані траєкторії аналізували за допомогою програм пакету GROMACS, плагінів VMD та програми gmx_MMPBSA (інструмент для ММ/PBSA розрахунків) [56, 132], яку використовували для визначення енергії зв'язування комплексів та внеску окремих залишків у афінність. Часові ряди, отримані в результаті первинного

аналізу траєкторій симуляцій, у подальшому аналізували за допомогою програм GROMACS та скриптів на мові програмування Python3, розроблених з використанням Jupyter notebook (<https://jupyter.org/>) та бібліотек: NumPy v. 1.26.4 (<https://numpy.org/>), Pandas v. 1.5.3 (<https://pandas.pydata.org/>), SciPy v. 1.10.1 (<https://scipy.org/>) та tslearn v. 0.6.3 (<https://pypi.org/project/tslearn/>). Часові ряди (RMSD, об'єм, водневі зв'язки, сольові містки тощо) порівнювали попарно на підставі показників евклідових відстаней між графіками, площ під графіками, площ між графіками та RMSE (перший ряд кожної пари використовували як референтний). Площі під та між графіками встановлювали за допомогою числового інтегрування – апроксимація за правилом Трапезоїдів.

2.10 Статистичний аналіз даних

Нормальність розподілу вибірок перевіряли за допомогою тесту Шапіро-Вілка, а гомогенність дисперсій – тесту Левена: розподіл вважали нормальним, а дисперсії гомогенними при $p > 0,05$. Для порівняння ростових показників, отриманих у результаті *in vitro* експериментів, застосовували однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) для 0,05 рівня значущості. У разі підтвердження наявності статистично значущих відмінностей між вибірками груп ($p < 0,05$) проводили порівняння середніх значень вибірок за допомогою пост-хок тесту Тьюкі-Крамера. Тест Тьюкі-Крамера був обраний нами з урахуванням особливостей вибірок, для яких були притаманними однакові розміри та гомогенність дисперсій. Для визначення статистичної значущості відмінностей у середніх значеннях показників SASA та RMSF, а також у складі амінокислотних послідовностей застосовували пермутаційний тест. Рівень значущості пермутаційного тесту становив 0,05/3 з урахуванням поправки Бонферонні; при кожному порівнянні здійснювали по 10000 пермутацій. Для побудови графіків та діаграм використовували Microsoft Excel.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Вплив IVM на морфо-фізіологічні показники проростків *A. thaliana*

Накопичення IVM у великих концентраціях у навколишньому середовищі може становити загрозу для нецільових організмів, якими першочергово є рослини, що ростуть в місцях масового перебування тварин. У зв'язку з цим було досліджено вплив IVM на фізіологічні процеси деяких вищих рослин, а саме *Arabidopsis thaliana* L., *Sinapis alba* L., *Trifolium pretense* L., *Plantago lanceolata* L. тощо [73, 74, 94, 95, 126, 135]. Зокрема, було встановлено спричинені IVM (5 μ M; 4,4 мкг/мл) зміни у активності генів *A. thaliana*. При застосуванні 4,4 мкг/мл IVM не спостерігали значущих змін у ростових показниках проростків *A. thaliana* [126]. Враховуючи здатність IVM до накопичення у рослинних тканинах, а отже й можливість збільшення його внутрішньоклітинної концентрації з часом, необхідним є детальне вивчення впливу IVM на морфо-фізіологічні параметри рослин. Саме тому нами вперше було вивчено вплив 50–500 мкг/мл IVM на ріст та розвиток проростків *A. thaliana* (Col-1) в умовах *in vitro*. У результаті було встановлено, що IVM у концентраціях 250 та 500 мкг/мл та ДМСО (2,5% та 5%) як його розчинник не спричиняли статистично значущих відмінностей у ростових показниках проростків на 3-тю добу вирощування. Водночас на 6-ту та 12-ту добу вирощування за цих концентрацій IVM та ДМСО спостерігали статистично значуще зменшення загальної довжини проростків та довжини їхніх головних коренів відносно контролю (МС). За нижчих концентрацій IVM (50 та 100 мкг/мл) та ДМСО (0,5% та 1,0%) нами не було зафіксовано змін у загальній довжині проростків та їхніх коренів на 3-тю, 6-ту та 12-ту добу вирощування у порівнянні з контролем. Також слід зазначити, що IVM та ДМСО у всіх досліджених концентраціях не спричиняли змін у проростанні насіння *A. thaliana*.

Відмінності у довжині проростків та їхніх головних коренів при вирощуванні на середовищі з IVM та на середовищі з ДМСО свідчать про безпосередній вплив IVM на ріст та розвиток проростків *A. thaliana*. Зокрема, зменшення довжини проростків

та коренів було більш вираженим при вирощуванні на середовищі з IVM у концентрації 500 мкг/мл, ніж при вирощуванні на середовищі з 5% ДМСО, як показано на рис. 3.1.

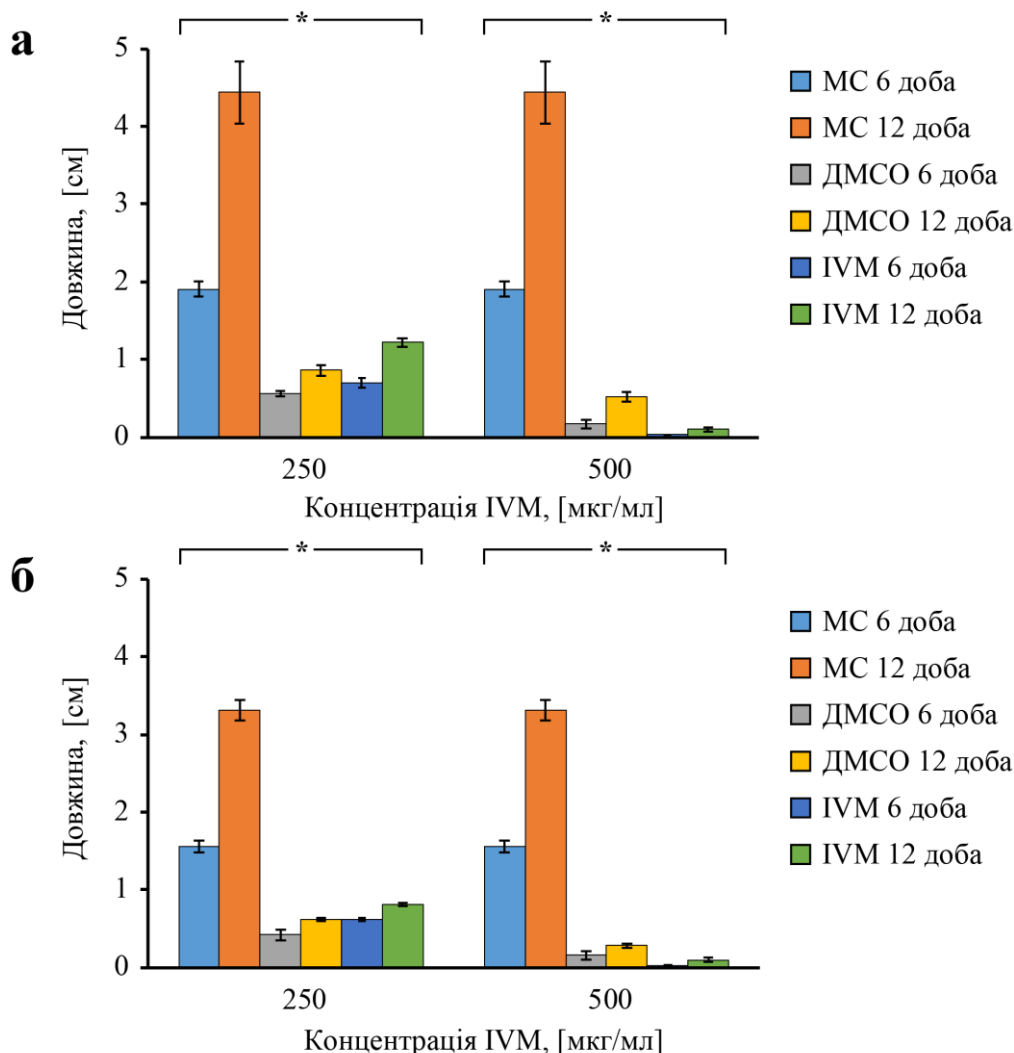


Рис. 3.1 Вплив IVM на ріст та розвиток проростків *A. thaliana* (Col-1). Довжина проростків (а) *A. thaliana* та їхніх коренів (б) на 6-ту та 12-ту добу вирощування на середовищі з 250 та 500 мкг/мл IVM. * – статистично значущі відмінності між досліджуваними групами, визначені за допомогою тесту Тьюкі-Крамера

Вплив IVM на ріст проростків *A. thaliana* залежав від його концентрації. При вирощуванні на середовищі з IVM у концентрації 250 мкг/мл загальна довжина проростків та довжина їхніх коренів була більшою, ніж при вирощуванні на середовищі з 2,5% ДМСО. Середні значення загальної довжини проростків на 12-ту

добу вирощування становили $4,4 \pm 0,40$ см у контролі, $1,22 \pm 0,05$ см у проростків, що росли на середовищі з IVM, та $0,86 \pm 0,13$ см у проростків, що росли на середовищі з ДМСО (рис. 3.1 а). За концентрації IVM у 500 мкг/мл, навпаки, негативний вплив IVM на ріст проростків переважав вплив ДМСО: середня довжина проростків становила $0,1 \pm 0,08$ см при вирощуванні на середовищі з IVM та $0,51 \pm 0,06$ см при вирощування на середовищі з ДМСО (рис. 3.1 б). Проростки *A. thaliana*, що зазнали впливу IVM та ДМСО, показано на рис 3.2, за виключенням проростків, що росли на середовищі з IVM у концентрації 500 мкг/мл через практично повну відсутність росту за цієї концентрації.

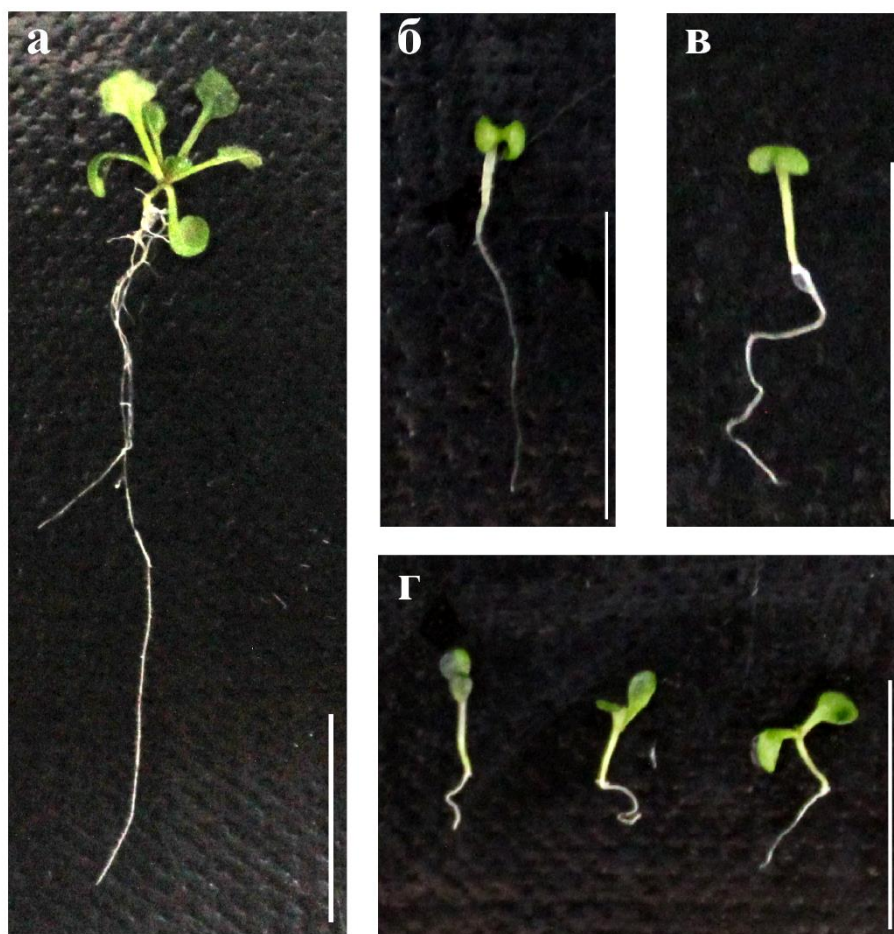


Рис. 3.2 Макроскопічні знімки проростків *A. thaliana* (Col-1) на 12-ту добу вирощування: МС (а); 250 мкг/мл IVM (б); ДМСО у концентрації (в) 2,5% та (г) 5,0%. Шкала = 1 см (а, б, в, г)

Після 12-ти діб вирощування середня довжина коренів проростків становила $3,3 \pm 0,13$ см при вирощуванні на звичайному середовищі МС, $0,81 \pm 0,02$ см – на середовищі з 250 мкг/мл IVM, $0,62 \pm 0,06$ см – на середовищі з 2,5% ДМСО, $0,09 \pm 0,08$ см – на середовищі з 500 мкг/мл IVM та $0,28 \pm 0,03$ см – на середовищі з 5,0% ДМСО (рис. 3.1 б).

Одним з пояснень стимулюючого впливу 250 мкг/мл IVM на ріст проростків *A. thaliana* можуть бути зміни у активності певних генів. Як зазначається у статті [126], IVM у концентрації 4,4 мкг/мл впливав на експресію генів пагона та кореня. Зокрема, спостерігали зміни у активності генів, залучених у відповіді на сольовий та осмотичний стрес, а також стрес від посухи та пошкодження рослини патогенами. Також було показано інгібуючий вплив IVM на ранній ріст коренів *S. alba* [135]. На 3-й день вирощування на фільтрувальному папері з живильним середовищем та IVM спостерігали зменшення довжини коренів проростків *S. alba* на 20% за концентрації IVM у 0,044 мкг/мл (50 нМ) та на 24% за концентрації у 0,44 мкг/мл (500 нМ) у порівнянні з контролем. Ці результати свідчать про високу чутливість *S. alba* до IVM, водночас відмінності в умовах експериментів не дозволяють прямо порівнювати чутливість *A. thaliana* та *S. alba* [126, 135]. Відмінності у чутливості до IVM різних видів вищих рослин описано у роботі [73], присвяченій дослідженню впливу IVM, моксидектину, абамектину та дорамектину та їхніх формуляцій на проростання рослин. Вплив IVM на відсоток проростання насіння, а також на тривалість та синхронність проростання залежав від концентрації IVM та виду рослини [73]. Зокрема, IVM у концентрації 10 мкг/мл мав стимулюючий вплив на проростання насіння *C. jacea* (+79,6%) та *P. lanceolate* (+68,0%) та інгібуючий вплив на проростання насіння *C. holosteoides* (-45,5%), *P. media* (-76,6%) тощо. У результати порівняння впливу всіх концентрацій (0,1, 1 та 10 мкг/мл) чистого IVM та IVM у формуляції (Oramec®) на 17 досліджуваних видів рослин, було визначено, що чистий IVM загалом збільшив проростання насіння на 12,9%, а IVM у формуляції, навпаки, зменшив на 8,7% [73]. Таким чином, враховуючи видоспецифічну чутливість вищих рослин до IVM, необхідними є подальші дослідження впливу різних концентрацій

IVM на ріст та розвиток інших видів вищих рослин, а також пошук нових формуляцій, безпечних для рослинних організмів.

Окремо досліджували вплив IVM на морфологію коренів *A. thaliana*, які виявилися чутливішими до дії IVM, ніж пагони (рис. 3.3).

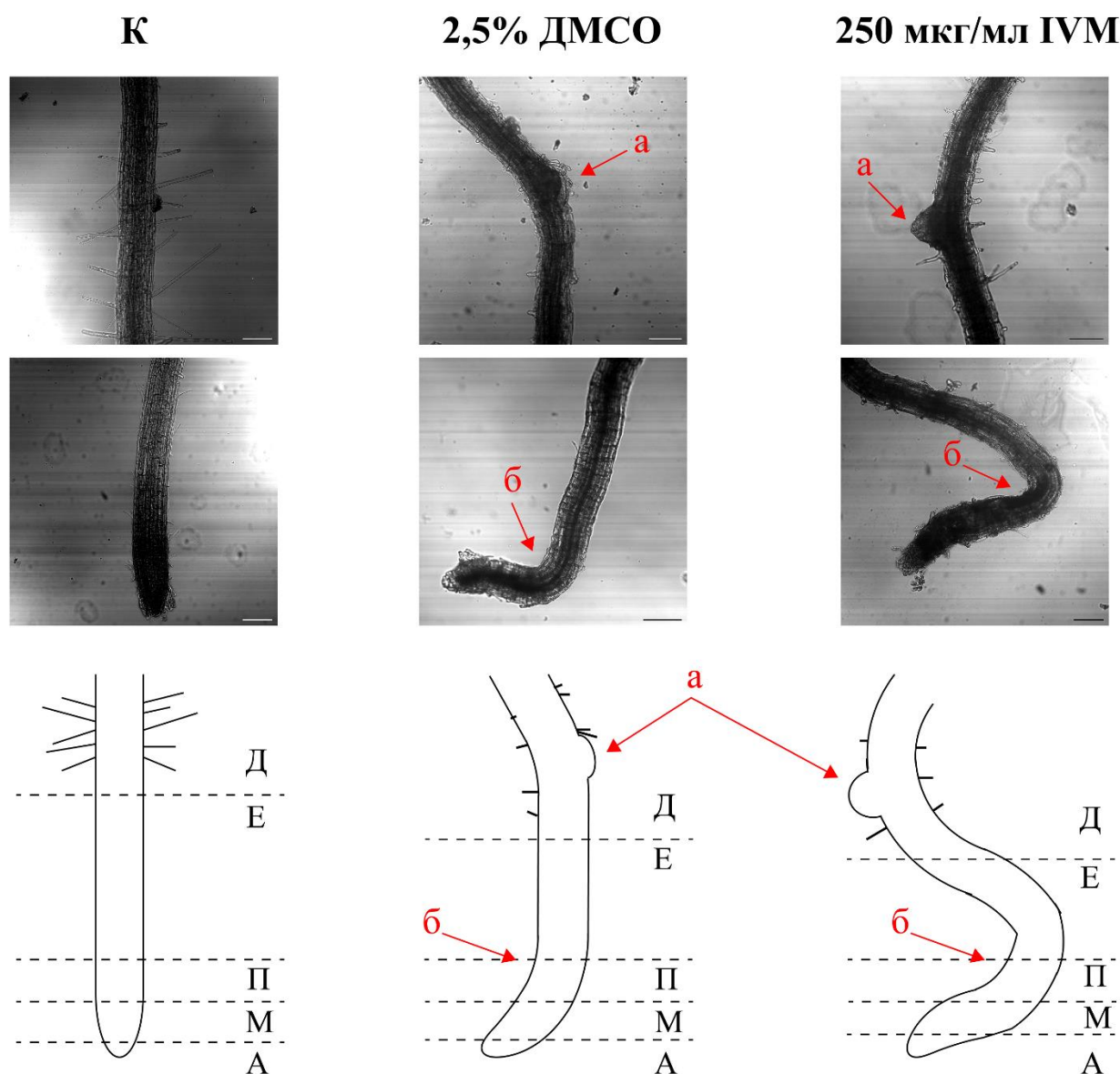


Рис. 3.3 Порівняння морфології головних коренів проростків *A. thaliana* на 12-ту добу вирощування на середовищі з IVM, ДМСО та контрольному середовищі МС: ділянки формування бічних коренів (а); викривлення коренів (б). Схематично зображено зони кореневого апексу (А), поділу (М), перехідну (П), елонгації (Е) та диференціації (Д). Шкала = 100 мкм

За дії IVM у концентраціях 50 та 100 мкг/мл не спостерігали змін у морфології коренів, а 500 мкг/мл IVM майже повністю інгібував ріст та розвиток коренів. Спричинені IVM зміни у морфології коренів були найвиразнішими за дії 250 мкг/мл IVM на 12-ту добу вирощування (рис. 3.3). Було встановлено, що головні корені проростків, які зростали на середовищі з IVM протягом 12-ти діб, мали вигнуту та закручену форму. Як показано на рис. 3.3, викривлення коренів відбувалося у перехідній зоні та зоні елонгації. Також у контрольних проростків на 12-ту добу вирощування спостерігали активний ріст бічних коренів, а у проростків, які зростали на середовищі з IVM, бічні корені лише починали утворюватися (рис. 3.3). Іншою характерною особливістю впливу IVM на морфологію коренів були зміни у довжині та формі кореневих волосків.

Порівняння середньої довжини кореневих волосків проростків після 12-ти діб вирощування на середовищі з IVM та ДМСО та у контролі (МС), показано на рис. 3.4.

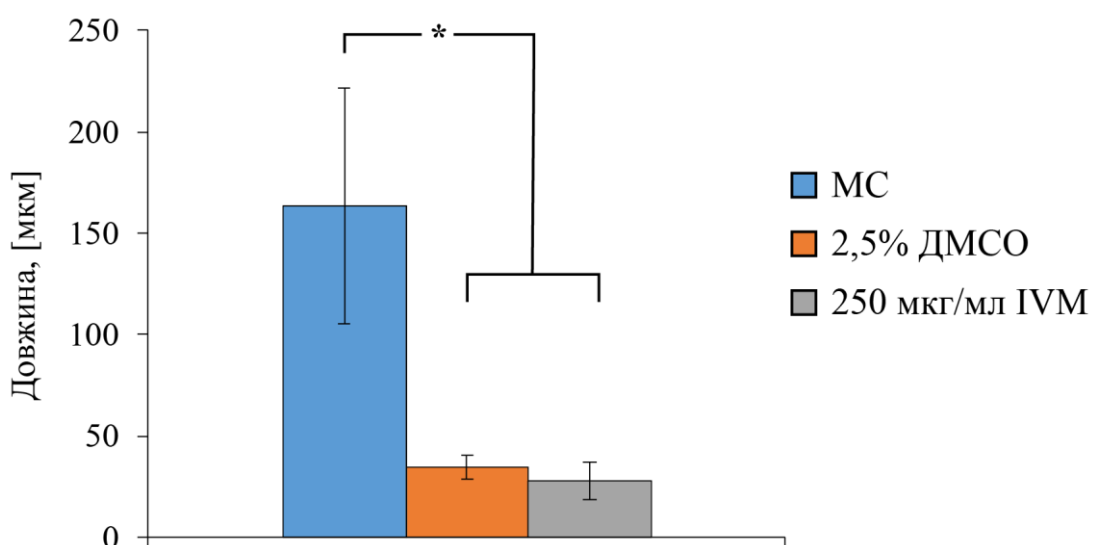


Рис. 3.4 Середні значення довжини кореневих волосків проростків *A. thaliana* на 12-ту добу вирощування на середовищі з IVM, ДМСО та у контролі (МС).

* – позначені статистично значущі відмінності відповідно до пост-хок тесту Тьюкі-Крамера

Зокрема, довжина корневих волосків у контролі суттєво варіювала та у середньому становила $163,63 \pm 57,97$ мкм. У корневих волосків проростків, що зазнали впливу IVM та ДМСО, спостерігали статистично значуще зменшення середньої довжини відносно контролю. Середня довжина корневих волосків становила $34,76 \pm 5,59$ мкм у проростків, що росли на середовищі з ДМСО, та $28,14 \pm 9,36$ мкм у проростків, що росли на середовищі з IVM. Окрім значного зменшення довжини корневих волосків, IVM та ДМСО також спричиняли зміни (рис. 3.5 г, д).

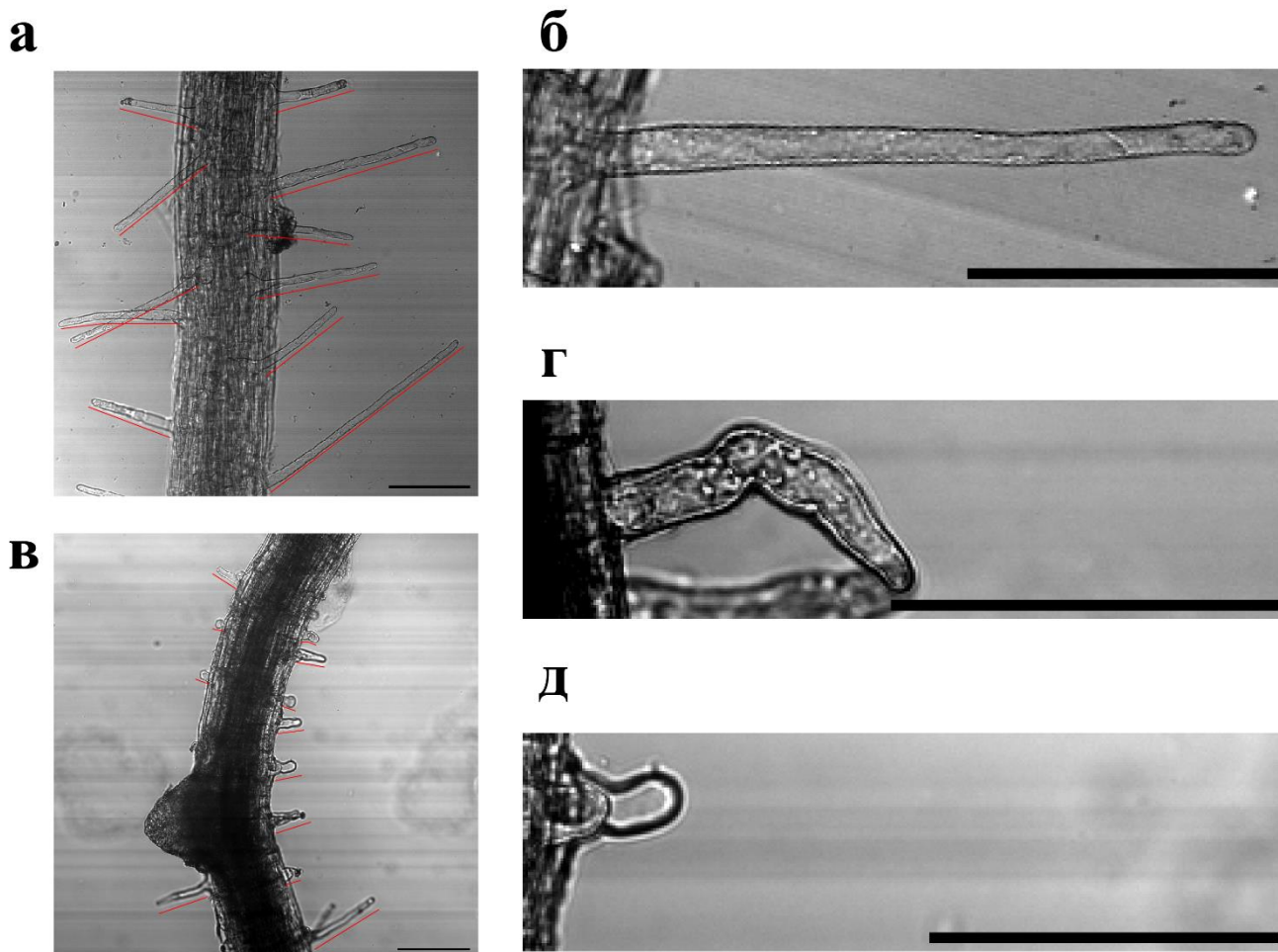


Рис. 3.5 Морфологія корневих волосків проростків *A. thaliana* на 12-ту добу вирощування: контроль (МС) (а, б); IVM 250 мкг/мл (в, д); ДМСО (г).

Шкала = 100 мкм (а, б, в, г, д)

Кореневі волоски у контролі мали правильну, видовжену форму та чітку направленість росту. Кореневі волоски, що зазнали впливу IVM, були

деформованими та подекуди не мали чіткої направленості росту. Оскільки кореневі волоски забезпечують живлення рослини, спричинені IVM зміни у їхніх розмірах та морфології є, ймовірно, однією з причин відмінностей у довжині проростків, що зростали на середовищі з IVM та у контролі (рис. 3.1; 3.2). Зменшення ефективної площі поверхні кореневих волосків негативно вплинуло на поглинання води та речовин з живильного середовища та цим сповільнило ріст проростків.

Досі не було описано шляхів транспорту IVM у рослинні клітини та механізмів його дії в клітинах рослин. Видоспецифічний вплив IVM на проростання насіння вищих рослин може бути пов'язаним з відмінностями у товщині, структурі та хімічному складі насінневої оболонки, яка запобігає потраплянню IVM всередину насінини [73]. Можливим пояснення залежності впливу IVM від концентрацій є взаємодії IVM з мембранними білками, зокрема Р-глікопротеїнами та іншими АВС-транспортерами, наявними у рослин. Як можливий механізм дії IVM у рослинних раніше було запропоновано взаємодії IVM з рослинними мембранними каналами, подібними до глутамат-хлоридних рецепторів нематод [73, 126]. Враховуючи різноманіття механізмів дії IVM у еукаріотичних організмах (підрозділ 1.6), для рослин ймовірною є наявність декількох механізмів та пов'язаних молекулярних мішеней IVM на мембранах та всередині рослинних клітин. Залученість МТ у процесах росту та розвитку органів рослин дозволяє розглядати морфологічні зміни коренів та кореневих волосків *A. thaliana* наслідком впливу IVM на МТ. Як зазначено у статті [53], МТ направляють комплекси целюлозо-синтаз при синтезі мікрофібрил клітинної стінки, а отже впливають на її жорсткість та напрямок росту клітини. МТ є особливо важливими для розвитку бічних коренів, клітин апікальної меристеми та кореневих волосків. Порушення у організації МТ на ранніх етапах розвитку клітини впливають на формування клітинної стінки, а отже й напрямку росту та форму клітин. Оскільки для нормального росту та розвитку рослин є необхідним правильне функціонування цитоскелету та, зокрема, МТ, спричинені IVM зміни у довжині проростків та морфології коренів можна пояснити порушеннями у організації МТ. Саме тому нами було досліджено вплив IVM на МТ клітин кореня *A. thaliana*.

3.2 Вивчення впливу IVM на організацію мікротрубочок клітин головного кореня *A. thaliana*

Раніше було досліджено вплив IVM на МТ *H. contortus* та ракових клітин HeLa [7, 8, 9]. Як зазначено у статті [8], IVM у концентрації 33 μM (28,88 мкг/мл) зв'язувався з таксановим сайтом β -тубуліну та спричиняв стабілізацію МТ *H. contortus*. Також було показано стабілізуючий ефект впливу IVM у концентрації 10 μM (8,75 мкг/мл) на МТ клітин HeLa, який був подібним до ефекту впливу таксолу [9]. Зокрема, у клітинах HeLa внаслідок дії 8,75 мкг/мл IVM спостерігали посилення полімеризації МТ та утворення пучків МТ. Також про стабілізуючий вплив IVM на МТ свідчить запобігання ним деполімеризації МТ, яка відбувалася внаслідок інкубації клітин HeLa за температури 4 °C протягом 16 годин. Нами було вперше вивчено короткотривалий (1 та 2 години) вплив IVM у концентраціях 50–250 мкг/мл на організацію МТ живих клітин різних зон кореня ліній *A. thaliana* GFP-MAP4 та GFP-TUA6 за допомогою CLSM. За дії 50 та 100 мкг/мл IVM через 1 та 2 години обробки не спостерігали змін у організації МТ. За концентрації 250 мкг/мл після 1 години обробки відбувалося порушення орієнтацій МТ та подекуди спостерігали руйнування кортикальної сітки МТ, утворення пучків МТ, а також перехресних та закручених побудов МТ. Після 2 годин обробки за цієї ж концентрації IVM посилювалися втрата МТ орієнтацій та руйнування кортикальної сітки МТ. Оскільки за дії 500 мкг/мл IVM ріст проростків був практично відсутнім, вплив цієї концентрації IVM на МТ не вивчали. Ефект 250 мкг/мл IVM на МТ спостерігали у епідермальних клітин зони кореневого апексу, меристематичної зони, перехідної зони та зони елонгації. МТ клітин цих зон кореня мали різну чутливість до IVM: найчутливішими були МТ епідермальних клітин кореневого апексу та зони елонгації, а нечутливими – МТ клітин зони диференціації та кореневі волоски.

Отже, клітини кореневого апексу були одними з найчутливіших до IVM. Порівняння організацій МТ клітин зони кореневого апексу у контролі та після 1 години обробки 250 мкг/мл IVM показано на рис. 3.6.

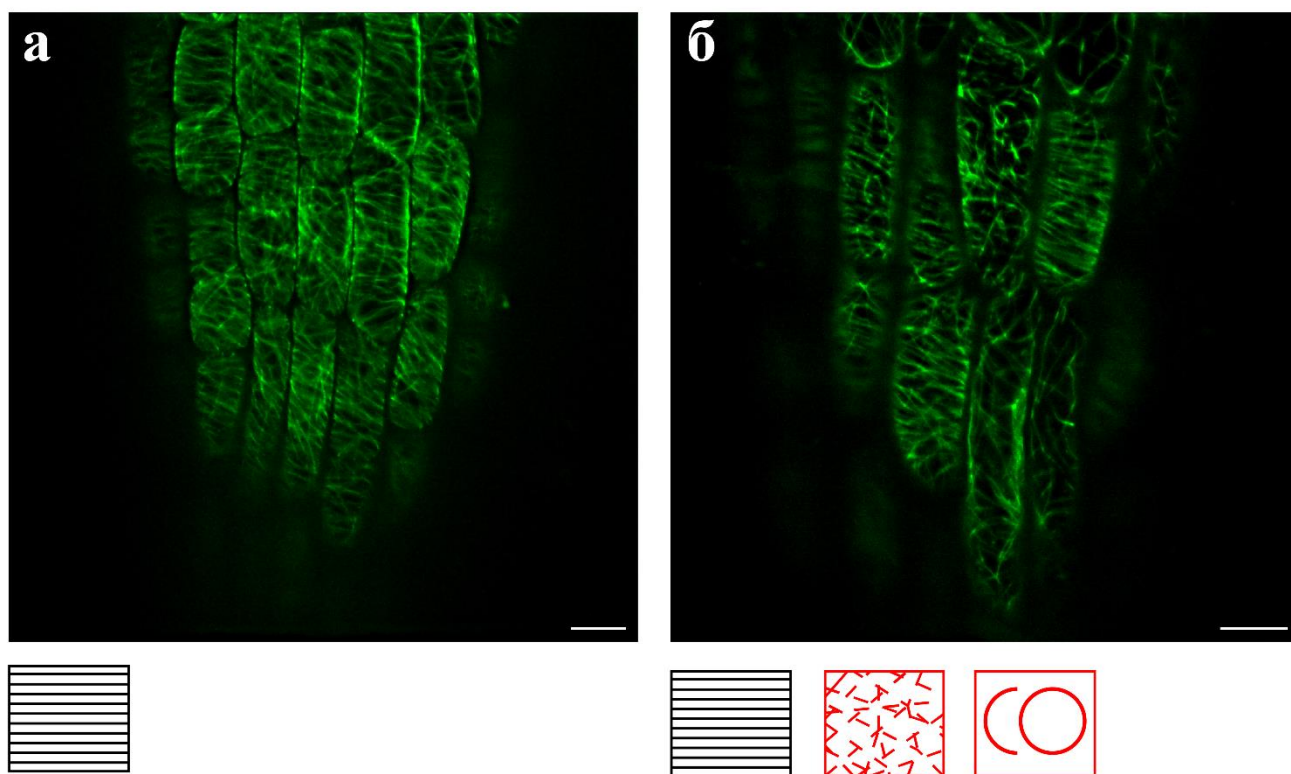


Рис. 3.6 Вплив 250 мкг/мл IVM на організацію МТ епідермальних клітин зони кореневого апексу лінії *A. thaliana* GFP-MAP4: контроль (а); 250 мкг/мл IVM (б). Шкала = 10 мкм (а, б)

У контролі (H_2O) МТ кортикальної сітки епідермальних клітин зони кореневого апексу мали поперечну орієнтацію, тобто були розташовані перпендикулярно до осі росту клітини (рис. 3.6 а). Після 1 години обробки 250 мкг/мл IVM у клітин кореневого апексу спостерігали порушення орієнтації МТ та руйнування кортикальної сітки МТ (рис. 3.6 б). Специфічною ознакою ефекту IVM було накопичення МТ в примембранній області та утворення пучків МТ. Клітини кореневого апексу залучені у передачі сигналів від колумелярних клітин (статоцитів) кореневого чохла, які є головними центрами сприйняття гравітації в корені, далі до клітин кореневого апексу та через них до клітин інших зон кореня [47]. МТ та актинові філаменти відіграють важливу роль у функціонуванні статоцитів, переміщуючи статоліти та передаючи сигнали [34]. Враховуючи це, порушення організації МТ клітин кореневого апексу та колумелярних клітин кореневого

чохлика, ймовірно, є одним з можливих пояснень морфологічних змін коренів після 12-ти діб вирощування на середовищі з 250 мкг/мл IVM (рис. 3.3).

IVM у концентрації 250 мкг/мл спричиняв також порушення орієнтацій кортикальних МТ меристематичних клітин після 1 години обробки. На рис. 3.7 показано кортикальну сітку МТ епідермальних клітин меристематичної зони кореня *A. thaliana*.

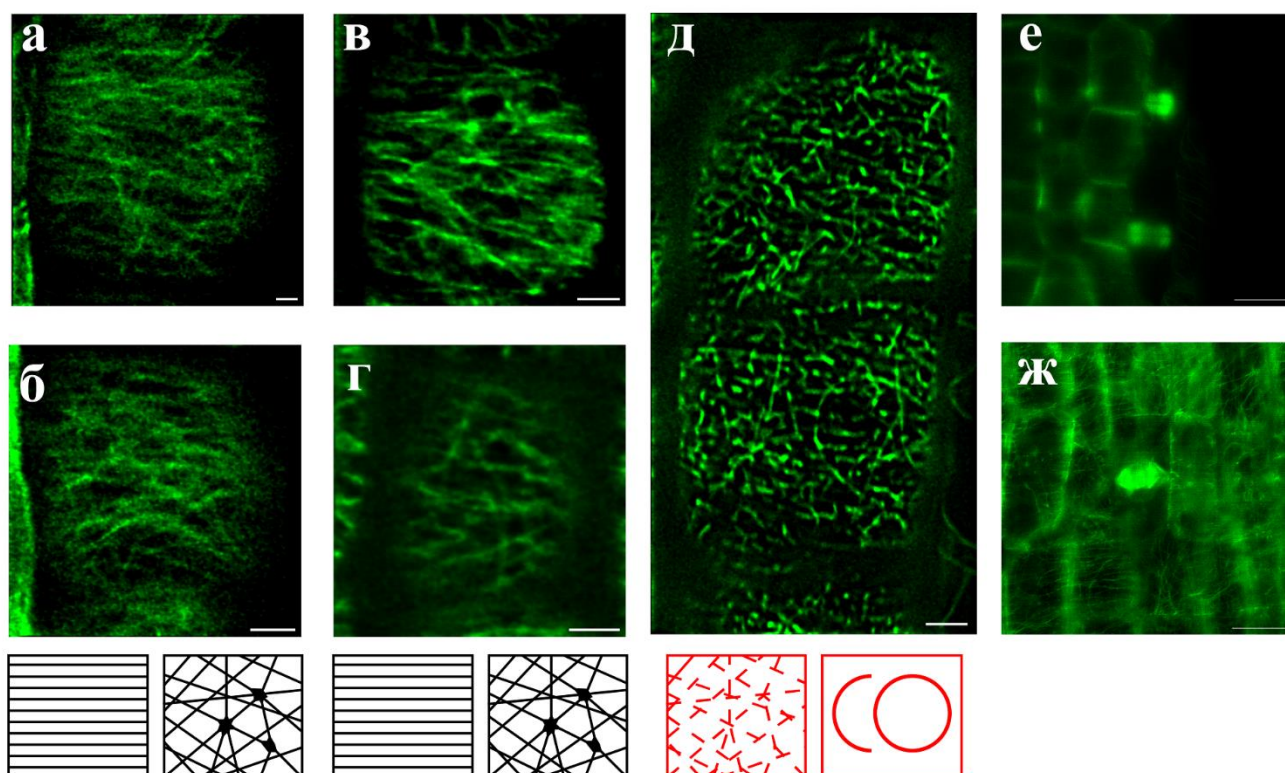


Рис. 3.7 Вплив 250 мкг/мл IVM на організацію МТ клітин меристематичної зони лінії *A. thaliana* GFP-MAP4: контроль (а, б, е); 2,5% ДМСО (в, г); 250 мкг/мл IVM (д, ж). Шкала = 3 мкм (а, б, в, г, д), 10 мкм (е, ж)

На відміну від клітин зони кореневого апексу у клітин меристематичної зони не спостерігали повного руйнування кортикальної сітки та утворення пучків МТ після обробки 250 мкг/мл IVM (рис. 3.6; 3.7). Попри вплив IVM на кортикальні МТ клітин меристематичної зони, IVM не викликав суттєвих порушень у структурі мітотичних веретен (рис. 3.7 ж). Одним з пояснень цієї особливості впливу IVM на МТ

меристематичних клітин може бути менша чутливість мітотичних МТ до IVM. Наприклад, у роботі Yemets та ін. (2008) показано різну чутливість популяцій кортикальних та мітотичних МТ до ізопропіл-N-феніл карбамату, ймовірно, зумовлену відмінностями у динамічних властивостях МТ [150]. Зміни у організації кортикальних МТ внаслідок впливу 250 мкг/мл IVM також були вираженими у клітин перехідної зони (рис. 3.8 д, е).

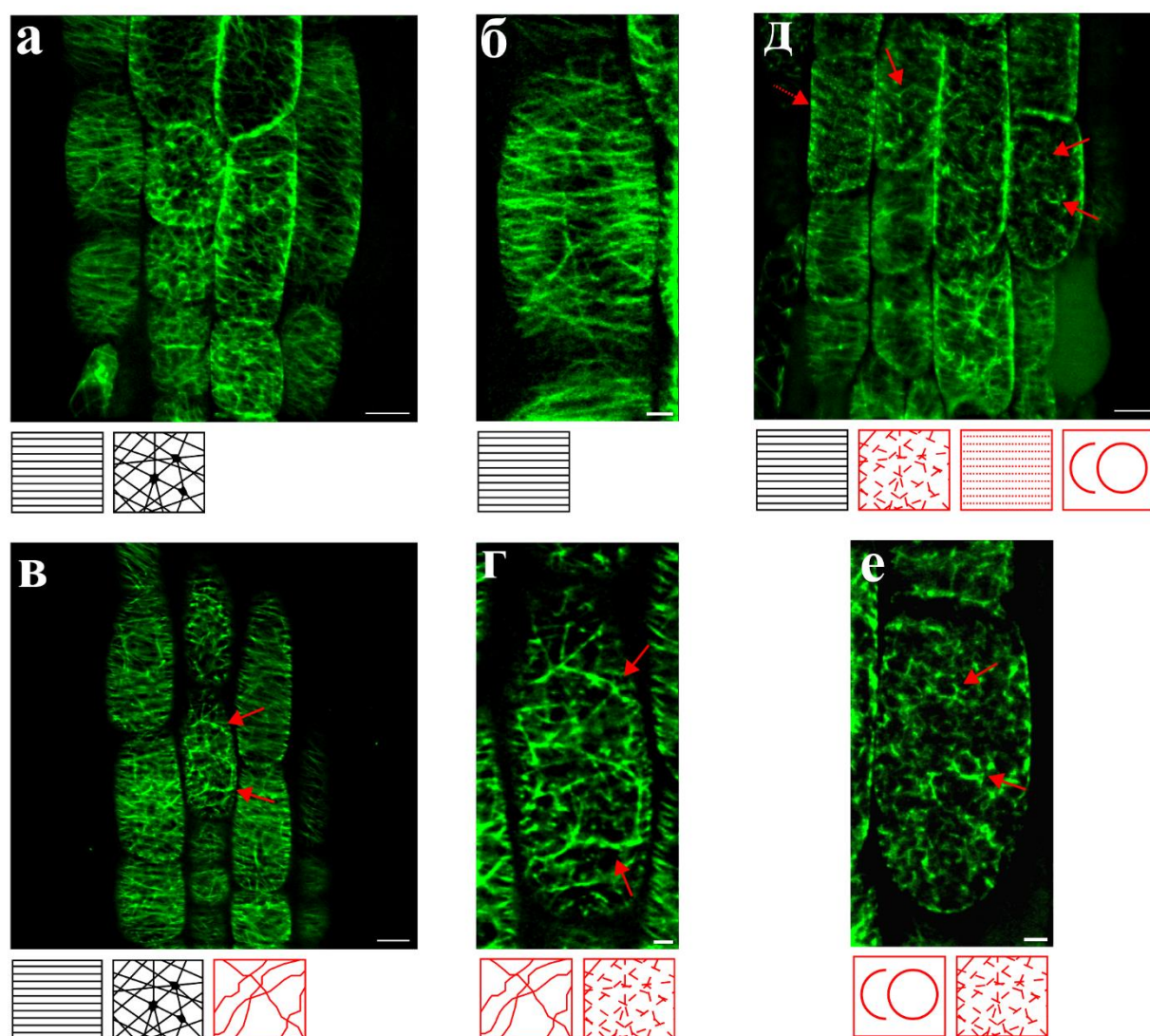


Рис. 3.8 Вплив 250 мкг/мл IVM на організацію МТ клітин перехідної зони лінії *A. thaliana* GFP-MAP4: контроль (а, б); 2,5% ДМСО (в, г); 250 мкг/мл IVM (д, е). Шкала = 3 мкм (б, г, е), 10 мкм (а, в, д)

Зокрема, після 1 години обробки 250 мкг/мл IVM у клітинах перехідної зони спостерігали порушення орієнтацій МТ (близьких до поперечної у контролі) та часткове руйнування кортикальної сітки МТ, а після 2 годин – практично повне її руйнування (рис. 3.8 д, е). Як і у клітинах кореневого апексу, у клітинах перехідної зони внаслідок впливу IVM утворювалися пучки та закручені побудови МТ (рис. 3.8 е). Вплив 250 мкг/мл IVM на МТ клітин зони елонгації був подібним до впливу IVM у цій концентрації на МТ клітин перехідної зони (рис. 3.9 г, ж).

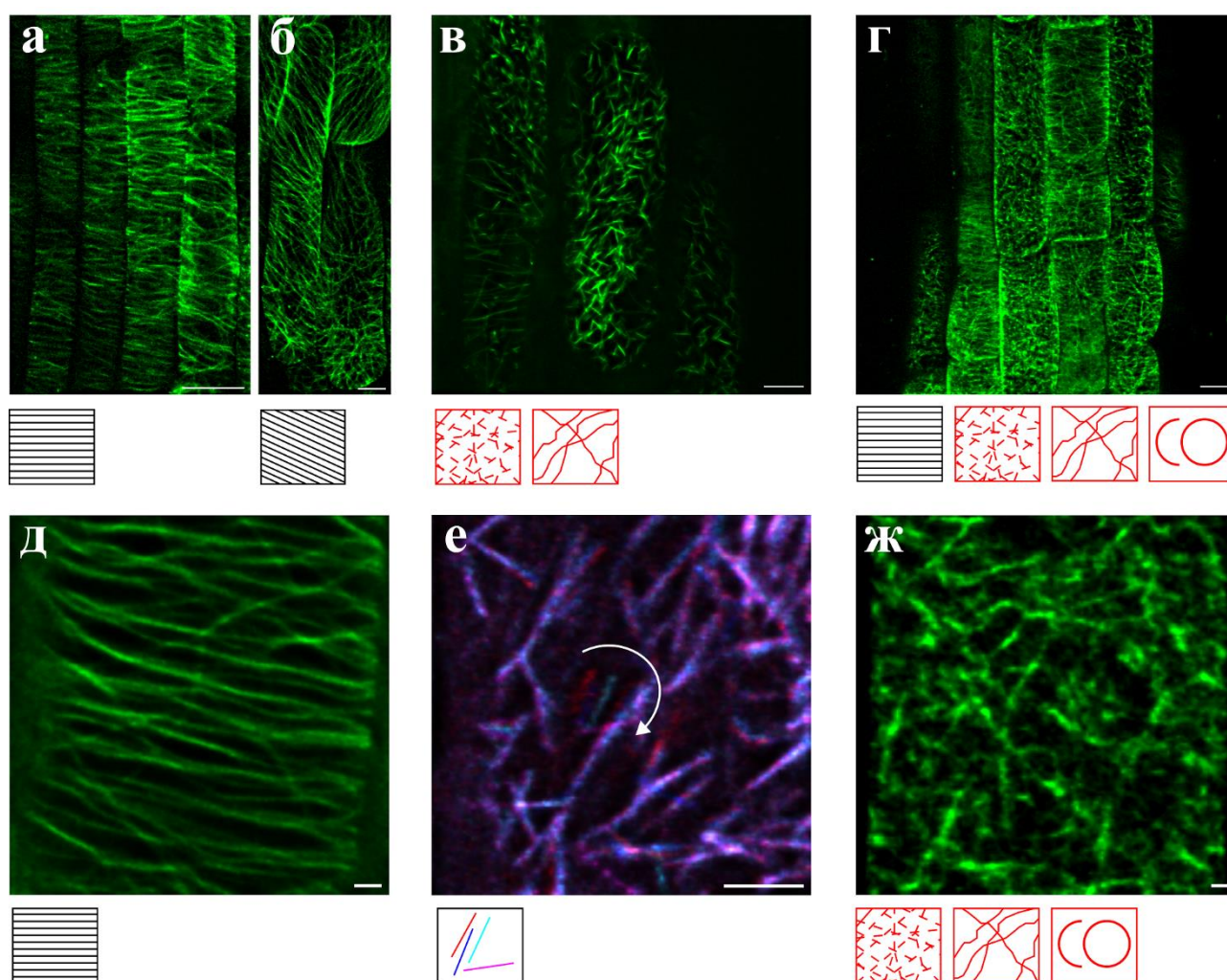


Рис. 3.9 Вплив 250 мкг/мл IVM на організацію МТ клітин зони елонгації кореня проростка лінії *A. thaliana* GFP-MAP4: контроль (а, б, д); 2,5% ДМСО (в, е); 250 мкг/мл IVM (г, ж). Шкала = 3 мкм (д, е, ж), 10 мкм (а, б, в, г)

Як зазначено в огляді [114], клітини перехідної зони, так і клітини зони елонгації зазнають видовження вдовж своїх осей. При цьому клітини перехідної зони

характеризуються повільним видовженням, а клітини зони елонгації – швидким. Швидке видовження клітин зони елонгації зумовлене збільшенням гнучкості клітинної стінки та зростанням тургорного тиску через збільшення та злиття вакуоль. Оскільки МТ координують ці процеси, зміни у організації МТ клітин перехідної зони та зони елонгації призводять до порушень у видовженні клітин цих зон [52]. Прикладом таких порушень є зміна направленості видовження, якою можна пояснити викривлення коренів у перехідній зоні та зоні елонгації у проростків, що зростали на середовищі з 250 мкг/мл IVM (рис. 3.3). Також впливом 250 мкг/мл IVM на МТ можна пояснити вкорочення зони елонгації після 12-ти діб вирощування на живильному середовищі з IVM. Відсутність подібного вкорочення перехідної зони при вирощуванні проростків у присутності 250 мкг/мл IVM можна пояснити різною чутливістю МТ клітин перехідної зони та зони елонгації до IVM (рис. 3.3; 3.8 д, е; 3.9 г, ж).

Оскільки для розчинення IVM використовували ДМСО, також було вивчено вплив ДМСО на організацію МТ клітин різних зон кореня. МТ епідермальних клітин перехідної зони та зони елонгації були чутливими до 2,5% ДМСО. Зокрема, після 1 години (рис. 3.8 в, г) та 2 годин (рис. 3.9 в, е) обробки 2,5% ДМСО у епідермальних клітинах перехідної зони та зони елонгації спостерігали фрагментацію МТ та перебудови МТ кортикальної сітки. Також було порівняно організації МТ у клітинах, що зазнали впливу 2,5% ДМСО (рис. 3.9 е) та 250 мкг/мл IVM (рис. 3.9 ж). На відміну від IVM ДМСО не спричиняв утворення пучків МТ та об'єднань МТ, неможливих за відсутності стабілізуючого впливу на МТ – характерної ознаки дії IVM та інших лігандів таксанового сайту [103]. У клітинах, що зазнали впливу 250 мкг/мл IVM не відбувалося перебудов кортикальних МТ, як під впливом 2,5% ДМСО, а отже зміни у організації МТ, які спостерігали після обробки проростків 250 мкг/мл IVM були спричинені безпосереднім впливом IVM. Фітотоксичність ДМСО та чутливість МТ до ДМСО є загальновідомими фактами [43, 154], а використання 2,5% ДМСО у цьому дослідженні зумовлене неможливістю розчинення 250 мкг/мл IVM у нижчій концентрації ДМСО.

На відміну від епідермальних клітин кореневого апексу, меристематичної зони, перехідної зони та зони елонгації, епідермальні клітини зони диференціації були нечутливим до впливу 250 мкг/мл IVM (рис. 3.10 в, ж).

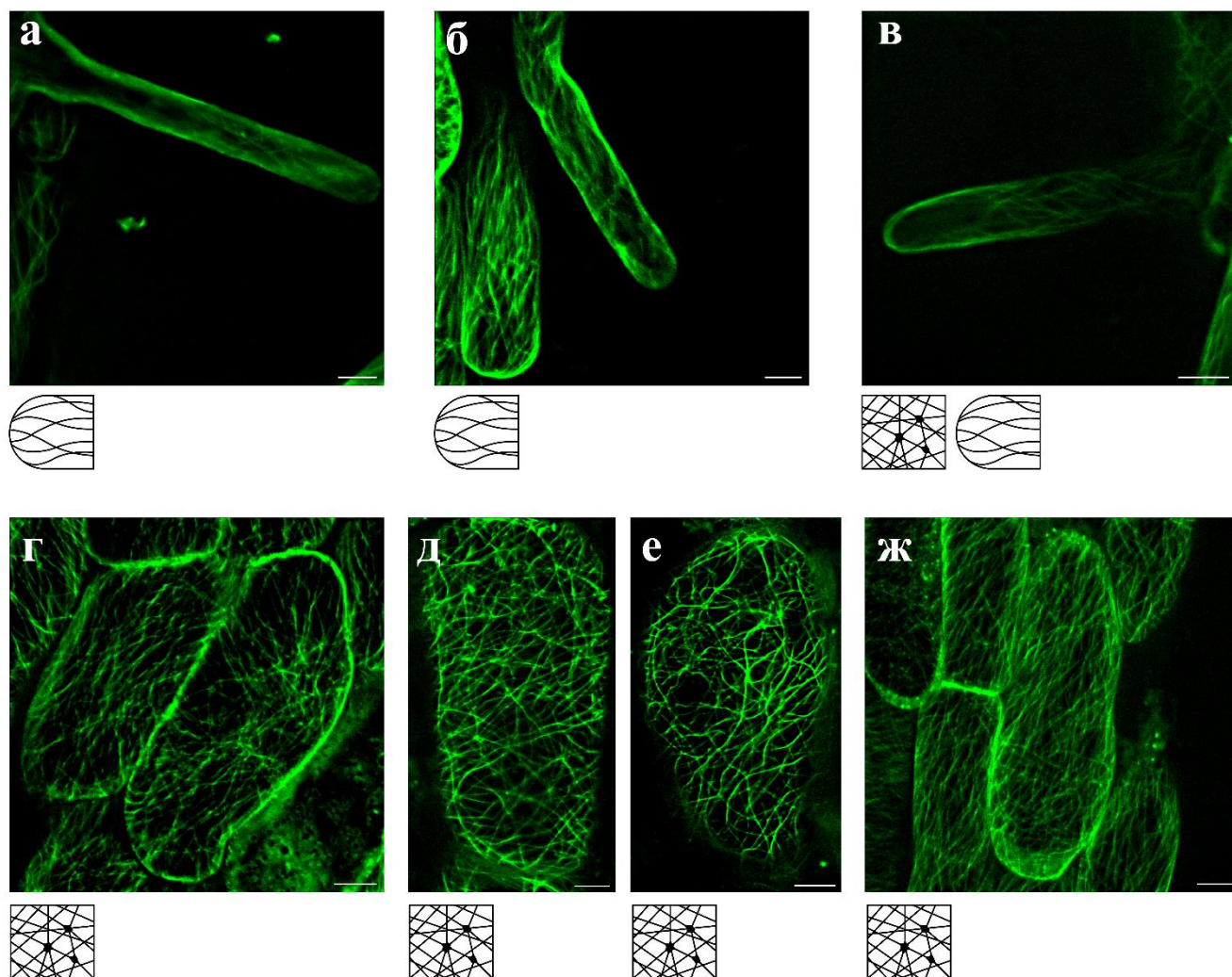


Рис. 3.10 Вплив 250 мкг/мл IVM на організацію клітин зони диференціації та корневих волосків кореня проростків лінії *A. thaliana* GFP-MAP4: контроль (а, г); 2,5% ДМСО (б, д, е); 250 мкг/мл IVM (в, ж). Шкала = 10 мкм.

Зокрема, у корневих волосків після 2 годин обробки 250 мкг/мл IVM зберігали продольну орієнтацію МТ, яка є притаманною клітинам з направленим ростом (рис. 3.10 в). Водночас враховуючи морфологічні зміни корневих волосків проростків після 12-ти діб вирощування на середовищі з 250 мкг/мл IVM, порушення у організації МТ корневих волосків є ймовірними за довготривалого впливу IVM.

У епідермальних клітинах зони диференціації після 2 годин обробки 250 мкг/мл IVM спостерігали невідповідну організацію МТ, як і у контролі (рис. 3.10 г, ж).

Враховуючи, що зміни у орієнтаціях МТ є однією з ознак впливу IVM, нами було також проведено кількісне порівняння орієнтацій МТ у клітинах кореня лінії *A. thaliana* GFP-MAP4, результати якого наведено на рис. 3.11.

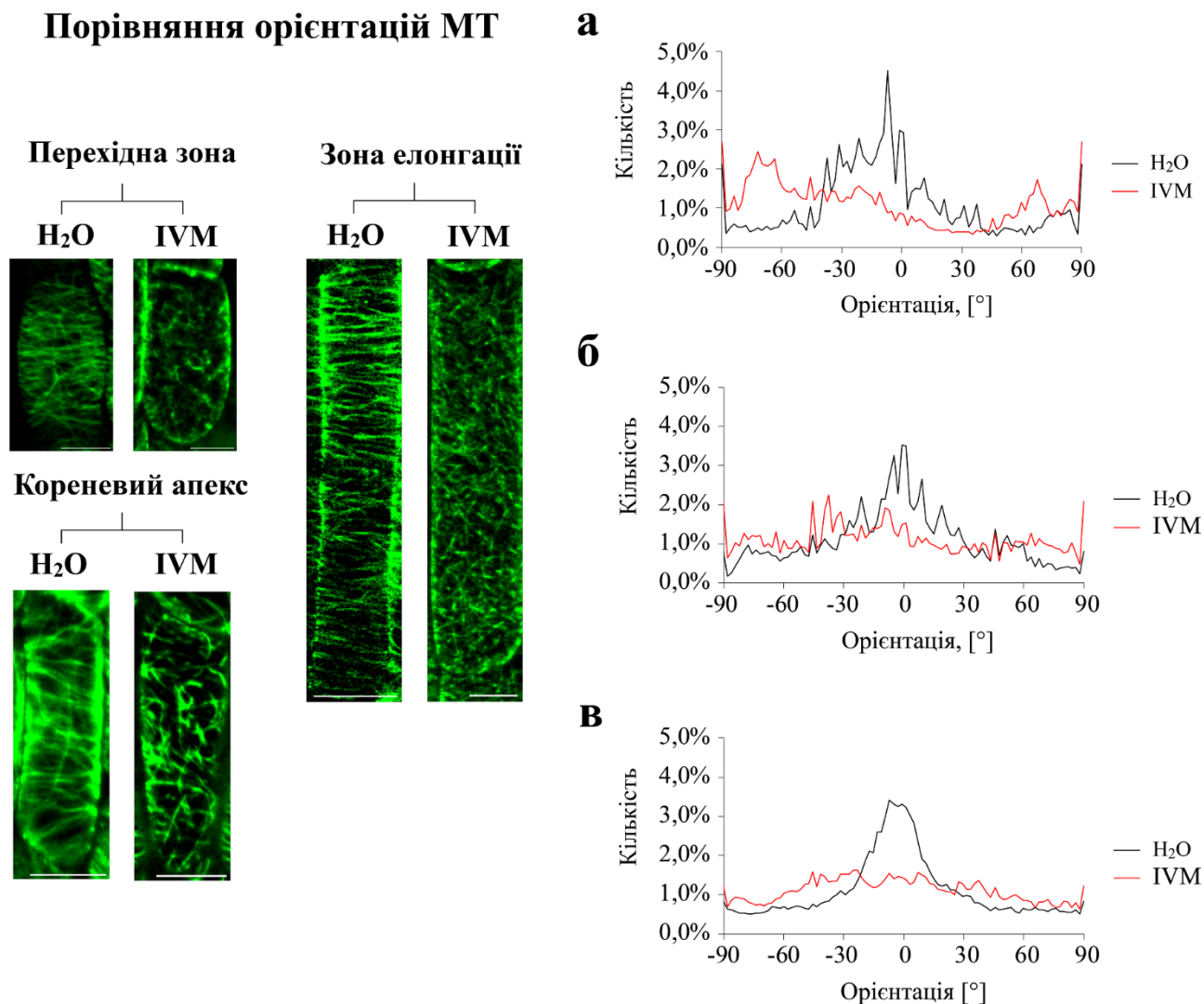


Рис. 3.11 Порівняння орієнтацій МТ епідермальних клітин лінії *A. thaliana* GFP-MAP4 у контролі та після 1 години обробки 250 мкг/мл IVM. Порівняння розподілу орієнтацій МТ клітин представлено на діаграмах: клітини зони апексу (а); клітини перехідної зони (б); клітини зони елонгації (в).

Шкала = 10 мкм

Порівняння розподілу МТ за орієнтаціями нами було зроблено для клітин зони кореневого апексу, перехідної зони та зони елонгації, які були найчутливішими до IVM (рис. 3.6 б; 3.8 д, е; 3.9 г, ж). Для кожної клітини було створено розподіл МТ, за яким ідеально поперечній орієнтації МТ відповідає кут у 0° відносно горизонталі, а продольній – кут у 90° . Було встановлено, що більшість МТ клітин зазначених зон у контролі були розташовані під кутом $0 \pm 30^\circ$, тобто мали орієнтації близькі до ідеально поперечної (рис. 3.11 а, б, в). У епідермальних клітинах зони кореневого апексу, перехідної зони та зони елонгації після 1 години впливу 250 мкг/мл IVM спостерігали втрату нативної поперечної орієнтації МТ та відсутність переважаючої орієнтації (рис. 3.11 а, б, в).

Для підтвердження достовірності даних, отриманих з лінією *A. thaliana* GFP-MAP4, було проведено експерименти з використанням лінії *A. thaliana*, що експресує химерний ген GFP-TUA6 (рис. 3.12).

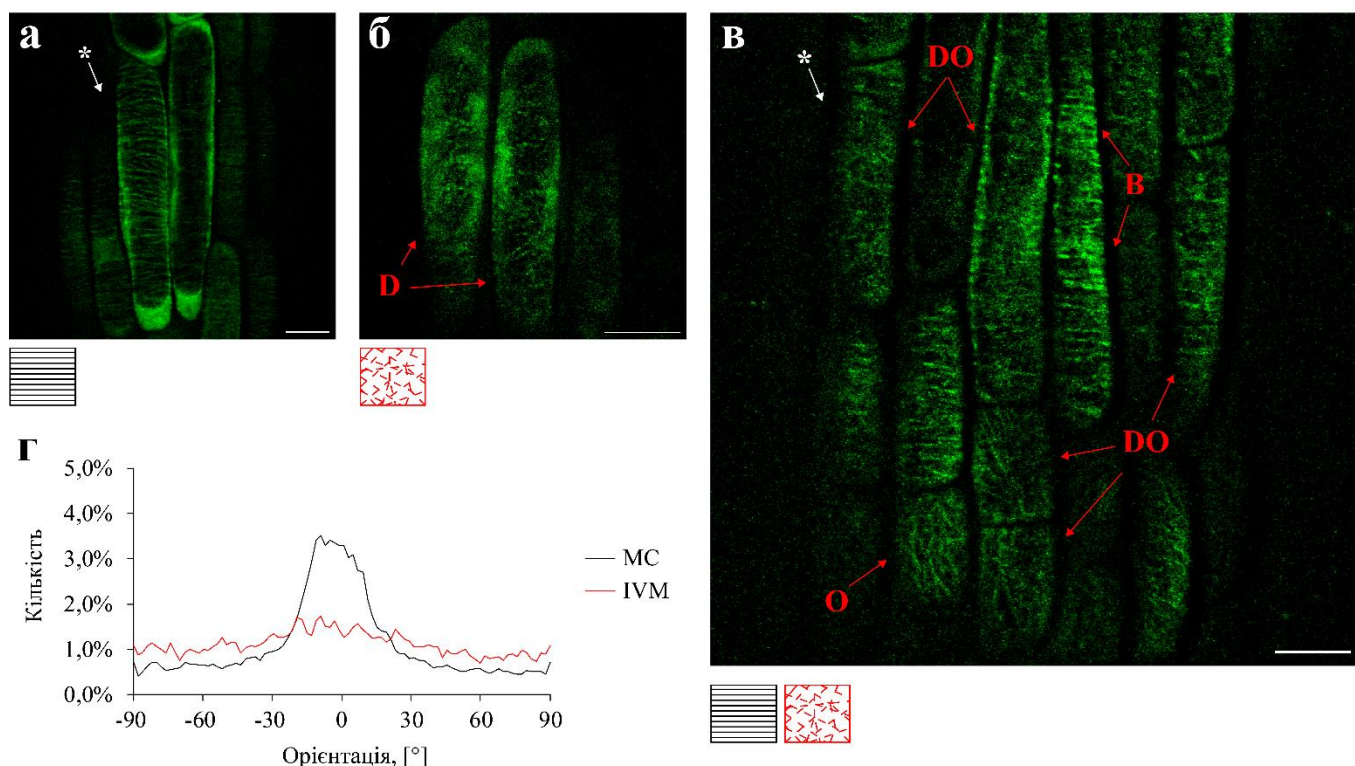


Рис. 3.12 Вплив 250 мкг/мл IVM на МТ клітин кореневого апексу лінії *A. thaliana* GFP-TUA6: контроль (а); IVM (б, в); порівняння орієнтацій МТ (г). Клітини, орієнтації МТ яких порівнювали, позначені *. Шкала = 10 мкм (а, б, в)

Після 1 години обробки IVM у концентрації 250 мкг/мл проростків лінії *A. thaliana* GFP-TUA6 спостерігали порушення у організації МТ (позначено D на рис. 3.12 б, в), орієнтаціях МТ (DO на рис. 3.12 б, в), а також об'єднання МТ у пучки (B на рис. 3.12 б, в). Як і у епідермальних клітинах кореневого апексу кореня *A. thaliana* лінії GFP-MAP4, обробка IVM призвела до втрати МТ орієнтацій, яка у контрольних клітинах знаходилася у інтервалі $0\pm 30^\circ$ відносно горизонталі (рис. 3.12 г). Загалом спричинені IVM зміни у організації кортикальних МТ епідермальних клітин кореневого апексу *A. thaliana* GFP-TUA6 були подібними до змін у *A. thaliana* GFP-MAP4 (рис. 3.6; 3.12 б, в, г).

Отже, у результаті вивчення впливу IVM на організацію МТ клітин головного кореня ліній *A. thaliana* GFP-MAP4 та GFP-TUA6 було вперше показано руйнування кортикальної сітки, порушення орієнтацій МТ, об'єднання МТ у пучки після 1 та 2 годин обробки IVM у концентрації 250 мкг/мл. Наслідком спричинених IVM порушень у організації МТ є зміни у фізіології та морфології коренів (рис. 3.1 в; 3.2 б; 3.3). Відсутність змін у організації МТ за нижчих концентрацій IVM (50 та 100 мкг/мл) та відмінності у чутливості до IVM клітин різних зон кореня можна пояснити особливостями механізмів транспорту IVM у рослинні клітини, а також взаємодіями IVM з іншими мішенями, які наразі є недослідженими. Оскільки тубулін рослинного походження набагато складніше полімеризувати в умовах *in vitro* [148], ніж тваринний тубулін, нами не було вивчено вплив IVM на полімеризацію МТ *A. thaliana*. Водночас, оскільки тубулін є консервативним білком еукаріотичних організмів, взаємодію IVM з тубуліном *A. thaliana* можна передбачити теоретично за використання методів *in silico* та з урахуванням отриманих раніше експериментальних даних, що підтверджують зв'язування IVM з таксановим сайтом рекомбінантного $\beta 1$ -тубуліну *H. contortus* та тубуліну свині [8]. Актуальним є також вивчення впливу IVM на інші еукаріотичні організми та, зокрема, патогени, що вражають сільськогосподарські культури рослин. Враховуючи це, наступний підрозділ було присвячено впливу IVM на фітопатогенні нитчасті гриби роду *Fusarium* – *F. graminearum* та *F. oxysporum*.

3.3 Вплив IVM на ріст фітопатогенних штамів *F. graminearum* та *F. oxysporum*

Fusarium graminearum та *F. oxysporum* є патогенами зернових та овочевих культур, які зменшують врожайність, а також якість та безпечність харчових продуктів, забруднюючи їх мікотоксинами [15, 115]. Як зазначено у роботі [15], *F. graminearum* уражають злакові культури рослин, такі як *Triticum aestivum* L., *Avena sativa* L., *Zea mays* L. тощо. *F. oxysporum* уражають овочеві культури: *Solanum lycopersicum* L., *Cucumis melo* L., *Pisum sativum* L. тощо [115]. Відомо, що в залежності від умов середовища нитчасті гриби можуть існувати у дріжджеподібній або колоніальній життєвій формі. Вплив IVM на дріжджеподібну форму нитчастих грибів та, зокрема, *F. oxysporum* та *F. solani* при вирощуванні у рідкому середовищі раніше вивчали [68]. Зокрема, було досліджено вплив IVM у концентраціях 10^{-8} – 10^{-3} М (0,008751–875,1 мкг/мл) на споруляцію, приріст біомаси та активність оксидаз цих видів [68]. Було встановлено, що IVM у концентраціях 10^{-5} – 10^{-3} М (8,75–875,1 мкг/мл) спричинив зниження споруляції *F. oxysporum* та *F. solani*: за дії 87,51 мкг/мл IVM кількість спор відносно контролю становила $42 \pm 46\%$ у *F. oxysporum* та $83 \pm 46\%$ у *F. solani*. Також внаслідок впливу IVM у концентраціях 8,75–875,1 мкг/мл зменшувався приріст біомаси *F. oxysporum* у 45–50% після трьох та чотирьох життєвих циклів (проростання спор, вегетативний ріст та споруляція) [68]. Вплив IVM на колоніальну життєву форму фітопатогенних штамів *F. graminearum* та *F. oxysporum* раніше не було досліджено. Оскільки інфікування рослинних тканин через вростання в них гіф здійснюється колоніями нитчастих грибів [88, 147], чутливість саме колоніальної життєвої форми до IVM потребує першочергового вивчення. У результаті *in vitro* експериментів нами вперше було визначено чутливість до 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 та 3,0 мг/мл IVM колоній зазначених штамів *F. graminearum* (F-55644, F-55748, F-55756) та *F. oxysporum* (F-52897, F-54635, F-55547, f. sp. *lycopersici*). Нами було встановлено, що штами *F. graminearum* (F-55644, F-55748, F-55756) та *F. oxysporum* (F-52897, F-54635, F-

55547, f. sp. *lycopersici*) були нечутливими до 1 мг/мл та нижчих концентрацій IVM (0,05, 0,1, 0,25 та 0,5 мг/мл) (рис. 3.13).

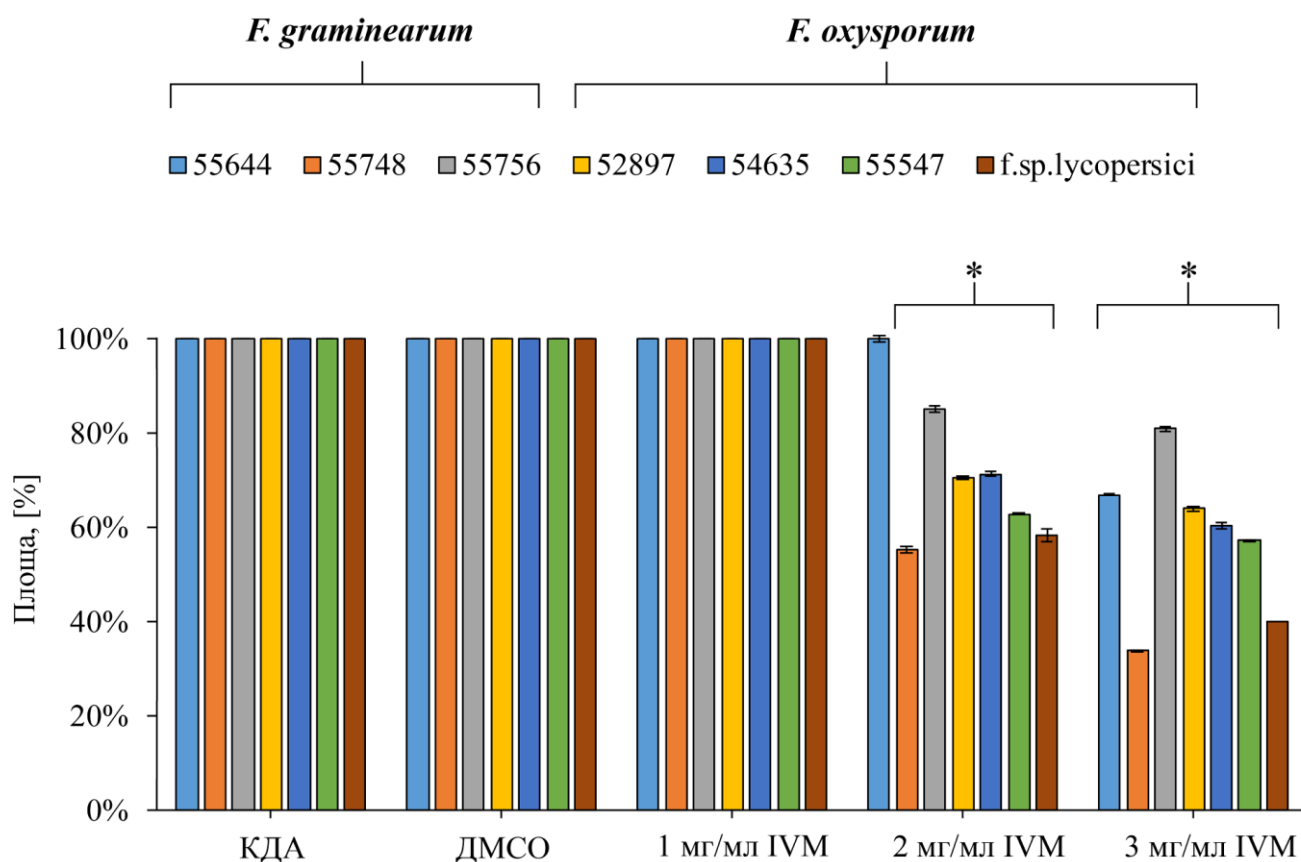


Рис. 3.13 Площа колоній штамів *F. graminearum* та *F. oxysporum*, що зростали в присутності 1, 2 та 3 мг/мл IVM, на 7-му добу вирощування

* – показані статистично значущі відмінності у середній площі колоній штамів відносно контролю (КДА) та ДМСО

Водночас за дії 2 та 3 мг/мл IVM спостерігали зменшення площі колоній досліджуваних штамів. Зокрема, при вивченні впливу 2 мг/мл IVM було встановлено статистично значущі відмінності у середніх значеннях площі колоній відносно контролю (КДА) на 7-му добу вирощування у всіх штамів за виключенням *F. graminearum* F-55644 (рис. 3.13). За дії 3 мг/мл IVM відмінності у середніх значеннях площі колоній відносно контролю були статистично значущими у всіх досліджуваних штамів. Спостерігалися відмінності у чутливості до IVM

F. graminearum та *F. oxysporum*, а також окремих штамів кожного виду. Штами *F. graminearum* F-55748 та *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* виявилися найчутливішими до IVM, а найменш чутливими були штами *F. graminearum* F-55644 та F-55756. Зокрема, на 7-му добу вирощування в присутності 3 мг/мл IVM середнє значення площі колоній становило $34 \pm 0,015\%$ у *F. graminearum* F-55748, $40 \pm 0,013$ у *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, $67 \pm 0,021\%$ у *F. graminearum* F-55644 та $81 \pm 0,014\%$ у *F. graminearum* F-55756. Також слід зазначити, що нами не спостерігали відмінностей у площі колоній, що росли у контролі та в присутності ДМСО, а отже вплив 2 та 3 мг/мл IVM на колонії досліджуваних штамів не був пов'язаним з одночасною дією розчинника.

Слід зазначити, що досліджувані штами *F. graminearum* та *F. oxysporum* були чутливим до 2 та 3 мг/мл IVM, а негативний вплив IVM на проростки *A. thaliana* спостерігали за 250 та 500 мкг/мл IVM. Водночас відмінності у концентраціях IVM, за яких проявлявся його вплив на дріжджеподібну форму *F. oxysporum* (8,75–875,1 мкг/мл) у дослідженні [68] та на колоніальну форму *F. oxysporum* (2 та 3 мг/мл) у нашому дослідженні, свідчать про різну чутливість форм *F. oxysporum* до IVM. Враховуючи це, необхідними є подальші дослідження впливу IVM на фітопатогенні гриби на різних стадіях розвитку та пошук шляхів ефективного застосування IVM як фунгіцида. Також оскільки раніше було встановлено, що чутливість до IVM відрізняється у різних видів рослин [73, 74, 94, 95, 126, 135], потрібно дослідити вплив IVM на важливі сільськогосподарські культури рослин на різних етапах онтогенезу. Як і у рослин, можливим поясненням загалом низької чутливості штамів *F. graminearum* та *F. oxysporum* до IVM є робота ABC-транспортерів, які здійснюють транспорт сполук усередину та назовні клітини. Відомо, що у нематод та ссавців ABC-транспортери (P-глікопротеїн, BCRP та MRP) здійснюють виведення IVM з клітин, а також, що за мікромолярних концентрацій IVM є інгібітором ABC-транспортерів [39, 108]. Оскільки мембрани клітин *F. graminearum* та *F. oxysporum* також містять ABC-транспортери [106], взаємодіями IVM з ними можна пояснити чутливість *F. graminearum* та *F. oxysporum* до

2 та 3 мг/мл IVM (рис. 3.13), але не за нижчих його концентрацій (0,05, 0,1, 0,25, 0,5 та 1 мг/мл).

Як показано на рис. 3.14, 2 та 3 мг/мл IVM спричинили знебарвлення міцелію штамів *F. graminearum* F-55644 та F-55756, які також були найменш чутливими до IVM, оскільки площа колоній цих штамів на 7-му добу вирощування була найбільшою у порівнянні з іншими штамами (рис. 3.13).

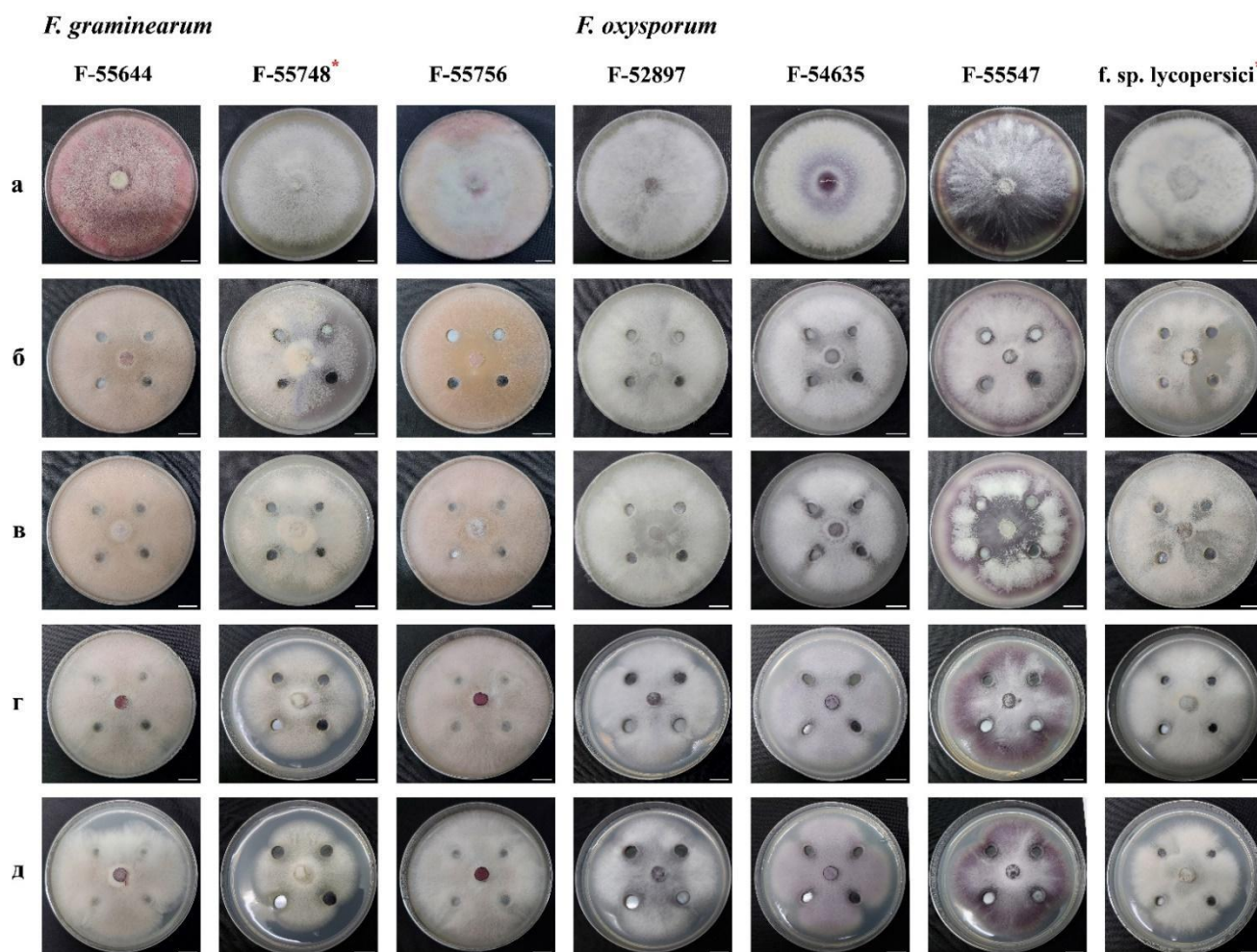


Рис. 3.14 Колонії штамів *F. graminearum* та *F. oxysporum* на 7-му добу вирощування: контроль (КДА) (а); ДМСО (б); 1 мг/мл IVM (в); 2 мг/мл IVM (г); 3 мг/мл IVM (д).

* – позначені найчутливіші до IVM штами

Зміни у ростових показниках (площа колоній, приріст біомаси тощо) вважаються головним критерієм чутливості штамів нитчастих грибів до хімічних агентів, проте деякі автори вказують на залежність між змінами у кольорі міцелію та

вмістом мікотоксинів у грибних клітинах. Зокрема, раніше спостерігали зниження біосинтезу ауурофузарину у клітинах *F. graminearum* внаслідок антагоністичної активності *Sphaerodes mycoparasitica*, яке супроводжувалося зміною кольору міцелію з червоного на білий [138]. Враховуючи це, червоний колір міцелію штаму *F. graminearum* F-55644 та у меншій мірі F-55756 у контролі, ймовірно, є індикатором біосинтезу ауурофузарину та накопичення його у стінках клітин цих штамів. Знебарвлення міцелію внаслідок дії IVM може бути пов'язане зі зменшенням концентрації ауурофузарину у клітинах колоній *F. graminearum* F-55644 та F-55756, що потребує експериментального підтвердження. Також за концентрацій 2 та 3 мг/мл IVM у штамів спостерігали зменшення площі поверхневого міцелію у штамів *F. graminearum* F-55756, *F. oxysporum* F-54635 та *f. sp. lycopersici* (рис. 3.14 г, д). Оскільки поверхневий міцелій відіграє важливу роль у нестатевому розмноженні, зменшення його площі у цих штамів свідчить про зменшення споруляції. Раніше було встановлено зменшення споруляції внаслідок впливу 87,51 мкг/мл IVM на дріжджеподібну форму розвитку *F. oxysporum* (кількість спор становила $42 \pm 46\%$ відносно контролю) та *F. solani* ($83 \pm 46\%$) [68]. Нами було вперше встановлено, що 2 та 3 мг/мл IVM спричиняють подібні зміни у колоній фітопатогенних штамів *F. graminearum* та *F. oxysporum*.

Таким чином, у результаті дослідження було визначено чутливість штамів *F. graminearum* (F-55644, F-55748, F-55756) та *F. oxysporum* (F-52897, F-54635, F-55547, *f. sp. lycopersici*) до IVM. Як показано на рис. 3.13 та рис. 3.14 г, д, характерними ознаками впливу IVM у концентрації 2 та 3 мг/мл є зменшення загальної площі колоній та площі поверхневого міцелію, а також знебарвлення поверхневого міцелію. Залишається невстановленою причина антигрибного впливу 2 та 3 мг/мл IVM на колонії фітопатогенних штамів *F. graminearum* та *F. oxysporum* (рис. 3.1; 3.2). Як описано у роботах [127, 128, 147], МТ відіграють важливу роль у рості гіф нитчастих грибів, забезпечуючи везикулярний транспорт, мітоз та рівномірний розподіл генетичного матеріалу у гіфах. Враховуючи вплив IVM на МТ *H. contortus*, клітин HeLa та встановлений нами вплив IVM на МТ клітин кореня *A. thaliana*, зміни у рості колоній штамів за концентрацій 2 та 3 мг/мл IVM можна

пояснити також взаємодією IVM з тубуліном *F. graminearum* та *F. oxysporum*. Як і тубулін *A. thaliana*, тубулін *F. graminearum* та *F. oxysporum* дуже складно виділити та полімеризувати в умовах *in vitro*. Водночас враховуючи консервативність тубуліну та, зокрема, таксанового сайту, а також результати попередніх досліджень [8, 9], можна передбачити взаємодію IVM з β -тубуліном цих організмів. Тому наступним етапом роботи було *in silico* моделювання комплексів IVM і β -тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum* та *F. oxysporum* та перевірка їхньої стабільності.

3.4 Порівняння амінокислотних послідовностей β -тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* та *H. contortus*

Перед здійсненням молекулярно-динамічних симуляцій було порівняно ідентичність, подібність та консервативність амінокислотних послідовностей β -тубуліну загалом та у ділянках елементів таксанового сайту, а також розподіл залишків послідовностей β -тубуліну за типами та фізико-хімічними властивостями відповідно до класифікації Тейлора (рис. 2.3) [131]. Оскільки раніше було продемонстровано зв'язування IVM з β 1-тубуліном *H. contortus* [7, 8], нами було використано 1-й ізотип β -тубуліну *H. contortus* як позитивний контроль на всіх етапах *in silico* дослідження (UniProtKB ID: A2TF56). Враховуючи встановлений нами вплив IVM на МТ клітин кореня *A. thaliana*, було обрано один із восьми ізотипів β -тубуліну (UniProtKB ID: P12411) для подальшого аналізу [17]. Види роду *Fusarium* мають два ізо типи β -тубуліну, які є однаково важливими для росту гіфи, проте мають різне значення для статевого розмноження. Як показано у статті [155], у мутантного штаму *F. graminearum* з видаленим геном, що кодує β 1-тубулін, не відбувалося утворення аск, тобто β 2-тубулін *Fusarium* нездатний замінити β 1-тубулін під час статевого розмноження. Оскільки аски аскоміцетів формуються у аскокарпах на поверхні живильного середовища, зменшення площі поверхневого міцелію у штамів *F. graminearum* F-55756, *F. oxysporum* F-54635 та f. sp. lycopersici внаслідок впливу 2 та 3 мг/мл IVM може свідчити про зв'язування IVM з β 1-тубуліном *Fusarium*. Тому

з індекс груп, властивості яких аналізували при вивченні траєкторій молекулярно-динамічних симуляцій. Інсерція Ala у 41 положенні β 1-тубуліну *A. thaliana* (позначена на рис. 3.15) спричиняє зміщення положень всіх амінокислотних залишків відносно послідовностей β -тубуліну *H. contortus*, *F. graminearum* та *F. oxysporum*.

Окрім множинного вирівнювання, було здійснено попарне порівняння послідовностей та встановлено, що послідовності β 1-тубуліну *F. graminearum* та *F. oxysporum* є повністю ідентичними і для проведення молекулярно-динамічних симуляцій доцільно використати β 1-тубулін лише одного з цих організмів. Враховуючи результати оцінки точності моделей, нами було обрано модель β 1-тубуліну *F. graminearum* (UniProtKB ID: Q4HZS8; надалі β 1-тубулін *F. graminearum/F. oxysporum*). Також було встановлено більшу спорідненість послідовності β 1-тубуліну *A. thaliana* з β 1-тубуліном *H. contortus* (81% ідентичності; 91% подібності; 91% консервативності), ніж з β 1-тубуліном *F. graminearum* та *F. oxysporum* (78%; 90%; 88%). Водночас послідовність β 1-тубуліну *H. contortus* мала більшу спорідненість з послідовністю β 1-тубуліну *F. graminearum/F. oxysporum* (80%; 92%; 89%), ніж з послідовністю β 1-тубуліну *A. thaliana* (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Результати попарного порівняння послідовностей β 1-тубуліну *A. thaliana*, *Fusarium* (*F. graminearum/F. oxysporum*) та *H. contortus*

Пара β 1-тубуліну	Показник		
	I, [%]	П, [%]	К, [%]
<i>A. thaliana</i> та <i>H. contortus</i>	81	91	91
<i>A. thaliana</i> та <i>Fusarium</i>	78	90	88
<i>H. contortus</i> та <i>Fusarium</i>	80	92	89

Примітка. I – ідентичність, П – подібність, К – консервативність.

У результаті порівняння вмісту амінокислотних залишків у послідовностях β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum/F. oxysporum* було встановлено

відмінності у розподілі залишків за типами, які, однак, не були статистично значущими (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Результати порівняння вмісту амінокислотних залишків у послідовностях β 1-тубуліну *A. thaliana*, *Fusarium* (*F. graminearum*/*F. oxysporum*) та *H. contortus*

Залишки	β 1-тубулін					
	<i>A. thaliana</i>		<i>H. contortus</i>		<i>Fusarium</i>	
	Кількість	%	Кількість	%	Кількість	%
Ala (A)	23	5,4	30	7,0	28	6,6
Arg (R)	22	5,1	22	5,2	24	5,6
Asn (N)	23	5,4	22	5,2	24	5,6
Asp (D)	24	5,6	23	5,4	20	4,7
Cys (C)	10	2,3	8	1,9	8	1,9
Gln (Q)	21	4,9	21	4,9	22	5,2
Glu (E)	28	6,5	29	6,8	28	6,6
Gly (G)	35	8,2	35	8,2	36	8,4
His (H)	9	2,1	10	2,3	8	1,9
Ile (I)	18	4,2	15	3,5	14	3,3
Leu (L)	33	7,7	31	7,3	33	7,7
Lys (K)	14	3,3	16	3,7	11	2,6
Met (M)	20	4,7	20	4,7	20	4,7
Phe (F)	22	5,1	20	4,7	26	6,1
Pro (P)	19	4,4	19	4,4	18	4,2
Ser (S)	34	7,9	26	6,1	32	7,5
Thr (T)	23	5,4	25	5,9	25	5,9
Trp (W)	5	1,2	4	0,9	4	0,9
Tyr (Y)	15	3,5	18	4,2	13	3,0
Val (V)	30	7,0	33	7,7	33	7,7
(+)-заряджені*	45	10,5	48	11,2	43	10,1
(-)-заряджені*	52	12,1	52	12,2	48	11,3
полярні*	228	53,3	224	52,5	219	51,3
гідрофобні*	234	54,7	239	55,8	240	56,1
аліфатичні*	81	18,9	79	18,5	80	18,7
циклічні*	51	11,9	52	12,2	51	11,9
малого розміру*	221	51,6	221	51,6	224	52,3

Примітка. * – розподіл залишків за фізико-хімічними властивостями відповідно до класифікації Тейлора (рис. 2.3).

У табл. 3.3 наведено результати попарного порівняння послідовностей структурних елементів таксанового сайту.

Таблиця 3.3

Результати порівняння послідовностей структурних елементів таксанового сайту $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*/*F. oxysporum* та *H. contortus*

Пара $\beta 1$ -тубуліну	Показник	Елемент вторинної структури				
		H1	H6-H7	H7	М-петля	S9-S10
<i>A. thaliana</i> та <i>H. contortus</i>	I ¹ , [%]	95	57	75	47	78
	П ² , [%]	95	86	85	80	89
	K ³ , [%]	95	100	90	60	89
<i>A. thaliana</i> та <i>Fusarium</i>	I ¹ , [%]	68	86	70	47	56
	П ² , [%]	79	86	85	80	67
	K ³ , [%]	68	100	80	73	67
<i>H. contortus</i> та <i>Fusarium</i>	I ¹ , [%]	74	71	85	47	78
	П ² , [%]	84	100	90	87	78
	K ³ , [%]	74	100	90	73	78

Примітка. 1 – ідентичність, 2 – подібність, 3 – консервативність.

Очікувано серед елементів таксанового сайту найбільшу варіабельність послідовностей мали невідсортовані ділянки: **H6-H7** [215(214)–222(221)], **М-петля** [272(271)–286(285)] та **S9-S10** [356(355)–364(363)]. Серед них послідовність **М-петлі** мала найменший відсоток ідентичності, подібності та консервативності. Зокрема, спостерігали більшу спорідненість послідовностей **М-петлі** $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* (47%, 80% та 73% ідентичності, подібності та консервативності), ніж $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana* та *H. contortus* (47%; 80%; 60%). Найбільшу спорідненість мали послідовності **М-петлі** $\beta 1$ -тубуліну *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* (47%; 87%; 73%). Враховуючи важливу структурно-функціональну роль **М-петлі** як регулятора властивостей решітки МТ [23], відмінності у послідовності **М-петлі** мають вплив на динамічні властивості, а отже й організацію МТ. Також **М-петля** впливає на зв'язування та взаємодії з таксановим сайтом відомих лігандів, зокрема, IVM, та прояв їхнього ефекту на МТ. Як

зазначається у статті [103], конформаційний рух **М-петлі** неполімеризованого β -тубуліну знижує афінність лігандів до таксанового сайту β -тубуліну [103]. З огляду на важливість ролі **М-петлі** у взаємодії IVM з β -тубуліном нами було здійснено вирівнювання 3-D моделей **М-петлі** та більш детально порівняно їхні послідовності. Результати вирівнювання моделей та послідовностей **М-петлі** β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* представлено на рис. 3.16.

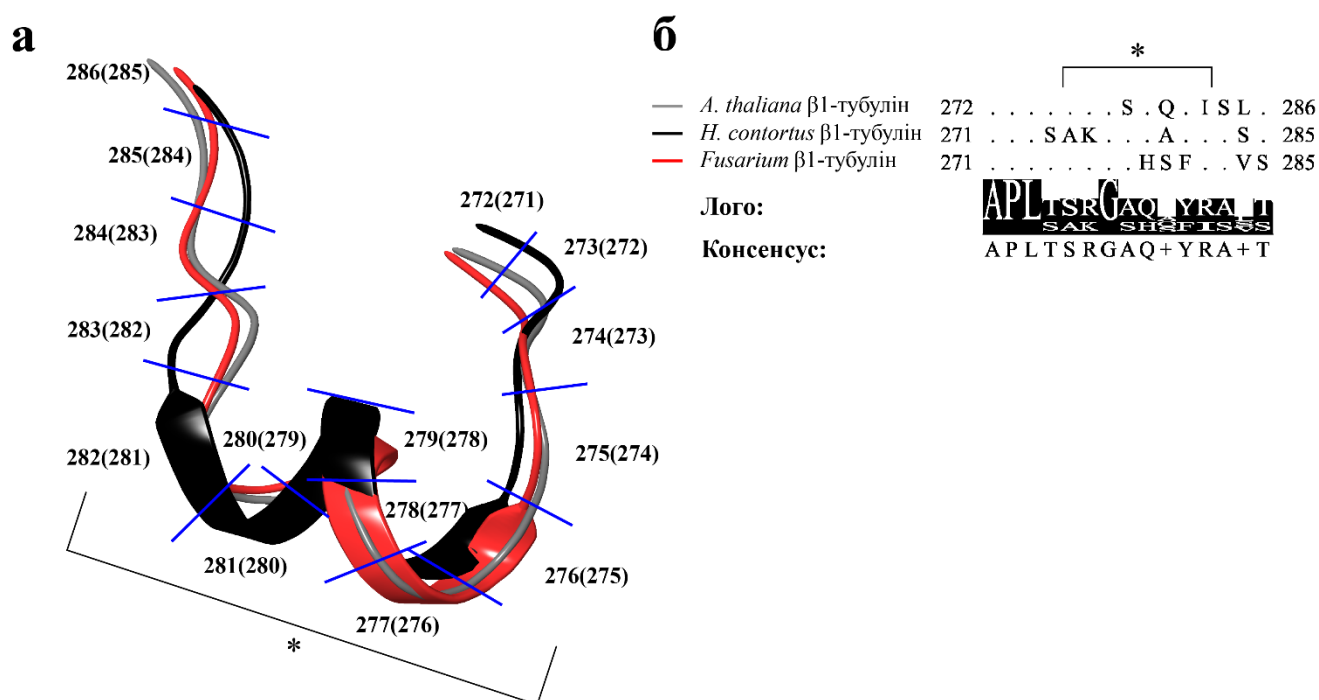


Рис. 3.16 Вирівнювання 3-D моделей (а) та послідовностей (б) **М-петлі** [272(271)–286(285)] β 1-тубуліну *A. thaliana*, *Fusarium* (*F. graminearum* та *F. oxysporum*) та *H. contortus*. * – відмічені найрухливіша ділянка **М-петлі**

Було встановлено ідентичність послідовностей **М-петлі** β 1-тубуліну *A. thaliana* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* на ділянці від 272(271) до 278(277) залишку. Послідовність **М-петлі** β 1-тубуліну *H. contortus* має відмінності у 275(274), 276(275) та 277(276) положеннях. Найбільше відмінностей містить ділянка послідовностей з 280(279) по 286(285) положення. Зокрема, залишки у положеннях 281(280) та 285(284) відрізняються у β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та

F. graminearum/*F. oxysporum*. Зазначені відмінності у послідовностях **М-петлі** впливають на її конформаційні властивості, які описані нами у підрозділах 3.6 та 3.7.

Відмінності у послідовності **S9-S10** також вплинуть на взаємодії з таксановим сайтом IVM, бензофуранова група якого при зв'язуванні займає меншу субпорожнину сайту, утворену такими елементами структури як **S9-S10**, **H1** (10–27), **H7** [223(222)–242(241)] та **S8** [311(310)–320(319)], тому нами було здійснено попарне порівняння **S9-S10**. У результаті було встановлено вищу спорідненість послідовностей β 1-тубуліну *A. thaliana* та *H. contortus* (78%; 89%; 89%), ніж пари β 1-тубуліну *A. thaliana* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* (47%; 80%; 73%). Ідентичність, подібність та консервативність послідовностей **S9-S10** β 1-тубуліну *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* становили 78%. **S9-S10** β -тубуліну також залучена до алостеричного взаємозв'язку таксанового сайту з сайтом колхіцину (Додаток Г, рис. 1 а, б). Водночас структурно-функціональне значення **S9-S10** β -тубуліну є не настільки важливим, як у α -тубуліну, у якого **S9-S10** блокує доступ до таксанового сайту, запобігаючи зв'язуванню з ним лігандів [90]. Саме через цю особливість **S9-S10** α -тубуліну *in silico* дослідження було присвячене взаємодіям IVM з β -тубуліном *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum*, а не α -тубуліном цих організмів.

Відмінності у послідовності **H6-H7** не впливають на взаємодії з сайтом лігандів через віддаленість **H6-H7** від активної частини сайту. Водночас положення спорідненого елемента **H7** у значній мірі впливає на об'єм порожнини сайту, зв'язування та взаємодії з ним лігандів. **H7** також відіграє важливу роль у переходах між конформаційними станами таксанового сайту та його взаємозв'язках з сайтом колхіцину та β -нуклеотиду (Додаток В, рис. 1 а, д). У результаті порівняння пар послідовностей **H7** було встановлено вищу спорідненість у послідовностях **H7** β 1-тубуліну *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* (85%; 90%; 90%). Ідентичність, подібність та консервативність послідовностей інших пар була нижчою (табл. 3.3). Очікувано стабільні елементи β 1-тубуліну мали менше відмінностей у послідовностях. Серед стабільних елементів структури найбільшу спорідненість мали послідовності **H1** β 1-тубуліну *A. thaliana* та *H. contortus* (95%; 95%; 95%). Також, як

наведено у табл. 3.3, послідовності **H1** β 1-тубуліну *A. thaliana* та *H. contortus* мали значно нижчу спорідненість з послідовністю **H1** β 1-тубуліну *F. graminearum*/*F. oxysporum*. З залишками **H1** взаємодіють деякі ліганди таксанового сайту та, зокрема, IVM. Цей структурний елемент також залучений до взаємозв'язку між таксановим сайтом та сайтом β -нуклеотиду (сайт ГТФ/ГДФ; Додаток В, рис. 1 а, б, д).

Окрім порівняння послідовностей елементів таксанового сайту, нами було здійснено порівняння залишків, з якими взаємодіє IVM, результати якого представлені у табл. 3.4.

Таблиця 3.4

Результати порівняння залишків, що формують інтерфейс таксанового сайту β 1-тубуліну *A. thaliana*, *Fusarium* (*F. graminearum*/*F. oxysporum*) та *H. contortus*

Елемент вторинної структури	Положення амінокислотного залишку		β 1-тубулін		
	β 1-тубулін <i>A. thaliana</i>	Інші структури	<i>A. thaliana</i>	<i>H. contortus</i>	<i>Fusarium</i>
H1	23	23	Val	Val	Thr*
	26	26	Asp	Asp	Gly*
	27	27	Glu	Glu	Glu
H6	211	210	Ile	Ile	Ile
	212	211	Cys	Cys	Cys
H6-H7	215	214	Thr	Thr	Thr
	216	215	Leu	Leu	Leu
	217	216	Lys	Lys	Lys
	218	217	Leu	Leu	Leu
	219	218	Ser	Thr*	Ser
H7	225	224	Asp	Asp	Asp
	226	225	Leu	Leu	Leu
	227	226	Asn	Asn	Asn
	228	227	His	His	Tyr*
	229	228	Leu	Leu	Leu
	230	229	Val	Val	Val
	232	231	Ala	Val*	Ala
	235	234	Ser	Ser	Ser
	236	235	Gly	Gly	Gly
	239	238	Cys	Thr*	Thr*

S7	270	269	Gly	Gly	Gly
	271	270	Phe	Phe	Phe
М-петля	273	272	Pro	Pro	Pro
	274	273	Leu	Leu	Leu
	275	274	Thr	Thr	Thr
	277	276	Arg	Lys*	Arg
	280	279	Gln	Gln	His*
S8	318	317	Phe	Phe	Phe
	319	318	Arg	Arg	Arg
S9-S10	358	357	Pro	Pro	Pro
	359	358	Pro	Pro	Pro
	360	359	Thr	Arg*	Arg*
	362	361	Ile	Leu*	Leu*
S10	365	364	Ala	Ala	Ser*

Примітка. * – відмінності у послідовностях β 1-тубуліну *F. graminearum*/*F. oxysporum* та *H. contortus* відносно послідовності *A. thaliana*

Було встановлено наявність відмінностей у положеннях 23, 26 у **H1**, 219(218) у **H6-H7**, 228(227), 232(231), 239(238) у **H7**, 277(276), 280(279) у **М-петлі**, 360(359), 362(361) у **S9-S10**, 365(364) у **S10**. Відмінність у положеннях 23 у **H1** (Val у β 1-тубуліну *A. thaliana* та *H. contortus*; Thr у β 1-тубуліну *F. graminearum*/*F. oxysporum*) та His(Tyr)228(227) у **H7** є важливою, оскільки з цими залишками IVM має полярні контакти та водневі зв'язки. В залежності від просторового розташування бічного ланцюга His(Tyr)228(227) може перешкоджати зв'язуванню з сайтом IVM та сприяти переходу таксанового сайту у конформаційний стан розділених порожнин. Ala(Val)232(231) у **H7** впливає на зв'язування та взаємодії з сайтом IVM. Між Arg(Lys)277(276) у **М-петлі** та IVM виникають водневі зв'язки та полярні контакти. Як і His228(227)Tyr у **H7**, Arg(Lys)277(276) у **М-петлі** в залежності від конформації та положення може перешкоджати зв'язуванню з сайтом IVM. Також між Arg(Lys)277(276) у **М-петлі** та Asp225(224) у **H7** утворюється сольовий місток, що має значний вплив на конформаційні властивості таксанового сайту. Thr у положенні 360(359) послідовності **S9-S10** β 1-тубуліну *A. thaliana* унеможливорює

виникнення сольового мосту з Glu27 у **H1**. Цей сольовий місток утворюється у β 1-тубуліну *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum*, послідовності яких у положенні 360(359) у **S9-S10** містять Arg.

Отже, було встановлено високу ідентичність, подібність та консервативність послідовностей β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* загалом (рис. 3.15; табл. 3.1). Водночас, як показано на рис. 3.15 та наведено у табл. 3.3, спорідненість послідовностей елементів таксанового сайту та, зокрема, петльових ділянок (**H6-H7**, **М-петля**, **S9-S10**) була нижчою (табл. 3.3). Також було встановлено важливі відмінності у залишках, з якими взаємодіє IVM у β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum*. Зокрема, на взаємодію IVM з β -тубуліном впливають відмінності амінокислотних послідовностей у положеннях 23 у **H1**, 228(227), 232(231) у **H7**, 277(276) у **М-петлі**, 360(359) у **S9-S10**, наведені у табл. 3.4. На наступному етапі *in silico* дослідження нами було вивчено як встановлені відмінності у амінокислотних залишках вплинули на конформаційний рух β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum*.

3.5 Визначення рівноважного стану та порівняння конформаційних властивостей β 1-тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* та *H. contortus*

Необхідною умовою для моделювання взаємодії між IVM та β 1-тубуліном є визначення оптимального для зв'язування IVM конформаційного стану таксанового сайту β 1-тубуліну. Це передбачає пошук інтервалу траєкторії молекулярно-динамічних симуляцій, що містить конформації рівноважного стану β 1-тубуліну, який є наближеним до нативного, а також аналіз конформацій цього інтервалу траєкторій та відбір серед них конформацій з оптимальним розкриттям таксанового сайту для проведення молекулярного докінгу IVM. У результаті молекулярно-динамічних симуляцій тривалістю 100 нс було отримано траєкторії з конформаціями вільного β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum*. Для визначення конформацій рівноважного стану білка траєкторії були проаналізовані за використання таких показників як середньоквадратичне відхилення (RMSD),

визначений на основі SASA об'єм β -тубуліну, радіус гірації β -тубуліну, а також зміни у кількості полярних контактів, водневих зв'язків та сольових містків. Спочатку було проаналізовано RMSD позицій атомів конформацій кожного фрейму траєкторії від атомів у початковій конфігурації системи. На рис. 3.17 представлено порівняння часових рядів RMSD атомів амінокислотних залишків $\beta 1$ -тубуліну (N, C α , C, O, H) відносно відповідних атомів у початковому, інерційному фреймі кожної системи. Було встановлено вихід часових рядів RMSD на плато у інтервалі між 30 та 40 нс, після чого не відбувалося подальшого зростання RMSD (у інтервалі між 40 та 100 нс).

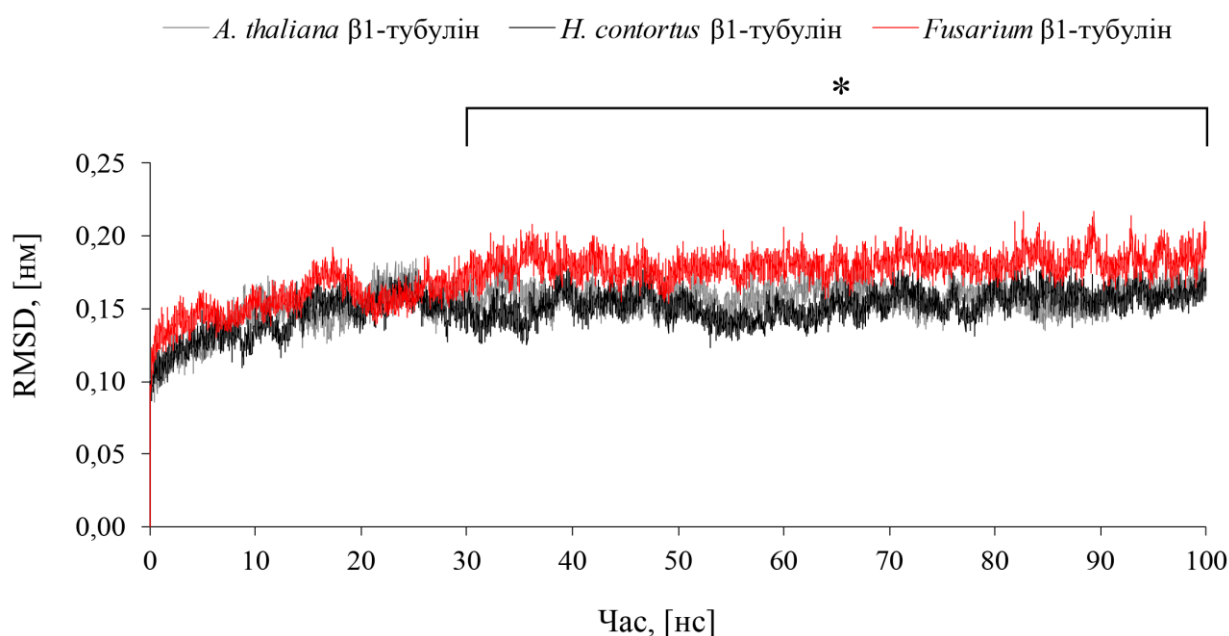


Рис. 3.17 Порівняння графіків RMSD атомів амінокислотних залишків без бічних ланцюгів $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana*, *Fusarium* (*F. graminearum* та *F. oxysporum*) та *H. contortus* зібраних конформацій відносно початкового фрейму.

* – відмічено часовий інтервал траєкторій, який відповідає рівноважному стану білка.

Полярні контакти, водневі зв'язки та сольові містки між амінокислотними залишками мають значний вплив на стабільність структури білків [11, 102], тому часові зміни у їхній кількості були використані нами для визначення рівноважного стану β -тубуліну. Водневий зв'язок вважався утвореним, якщо відстань між донором

та акцептором становила $\leq 0,35$ нм, а кут між атомом водню та вектором донорно-акцепторної пари становив $\leq 30^\circ$. У результаті аналізу часових рядів водневих зв'язків між залишками $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* було встановлено вихід графіків RMSD на плато у інтервалі між 30 та 40 нс (рис. 3.18), що свідчить про досягнення $\beta 1$ -тубуліном рівноважного стану у цьому часовому інтервалі.

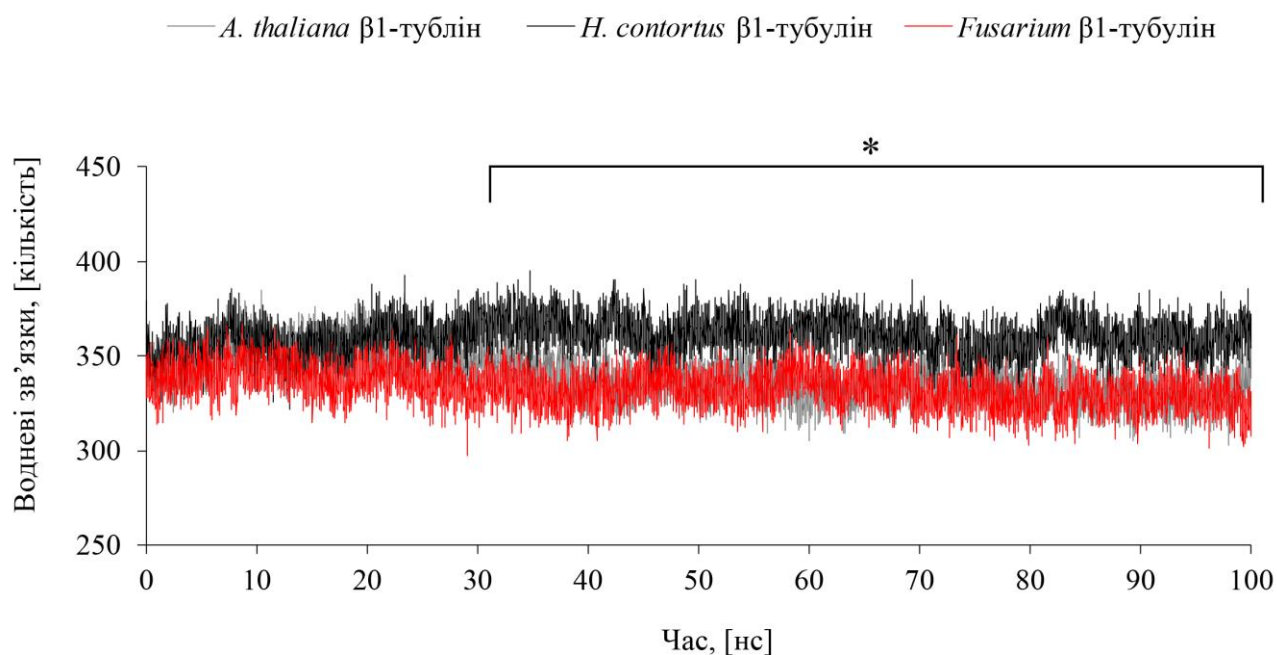


Рис. 3.18 Порівняння змін у кількості водневих зв'язків між залишками $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana*, *Fusarium* (*F. oxysporum* та *F. graminearum*) та *H. contortus*.

* – позначено інтервал виходу графіків часових змін водневих зв'язків на плато

Також було проаналізовано часові зміни полярних контактів та сольових містків. Для підрахунку полярних контактів між залишками $\beta 1$ -тубуліну використовували геометричний критерій, відповідно до якого полярний контакт вважався утвореним за відстані між донором та акцептором у $\leq 0,35$ нм. Сольовий місток – це електростатична взаємодія між різнозарядженими групами кислотних (аспартат та глутамат) та основних (аргінін, гістидин, лізин) залишків, яка характеризується утворенням змішаних водневих та йонних зв'язків. Під час аналізу

траєкторій сольовий місток вважався утвореним при зближенні атомів кисню кислотних залишків та атомів азоту основних залишків на відстань 0,32 нм. Спостерігалися періодичні коливання у кількості сольових містків: у β 1-тубуліну *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* відбувалося зменшення кількості сольових містків у проміжках 20-30 нс та 70-80 нс, а у β 1-тубуліну *A. thaliana*, навпаки, – збільшення їхньої кількості у останньому проміжку (Додаток Б, рис. 1). Подібні періодичні коливання також спостерігалися під час порівняльного аналізу часових рядів полярних контактів (Додаток Б, рис. 1) та водневих зв'язків (рис. 3.18), проте вони були менш вираженими. Ці коливання є індикаторами переходів між конформаційними станами β 1-тубуліну.

Загалом спостерігали переважання у кількості полярних контактів, водневих зв'язків та сольових містків на фрейм у траєкторії β 1-тубуліну *H. contortus*, поясненням якого є більша кількість заряджених залишків у послідовності β 1-тубуліну *H. contortus* (табл. 3.2). Всього нами було ідентифіковано 80 пар залишків донорів та акцепторів, між якими можливе утворення сольових містків у β 1-тубуліну *H. contortus*. На відміну від β 1-тубуліну *H. contortus* β 1-тубулін *A. thaliana* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* мали 70 пар донорів та акцепторів (рис. 3.15; табл. 3.1–3.4). Результати порівняння стійкості найпоширеніших сольових містків β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* зведені у табл. 1 Додатка Б. Графіки часових змін об'єму та радіусу гірації не були показовими для встановлення рівноважного стану β 1-тубуліну (Додаток В, рис. 1 та рис. 2).

Відмінності у кількісному складі амінокислотних залишків призвели до відмінностей у конформаційному русі β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* (табл. 3.2; рис. 3.15). Для загального порівняння конформаційного руху досліджуваних моделей додатково було проведено математичний аналіз та попарне порівняння часових рядів RMSD, об'єму, радіусу гірації, водневих зв'язків та сольових містків β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* (Додаток Ж, табл. 1). Було встановлено, що за більшістю показників (зокрема, за об'ємом, радіусом гірації та RMSD) конформаційний рух β 1-тубуліну *A. thaliana* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* має найбільшу спорідненість.

Найменшу спорідненість у конформаційному русі мала пара $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana* та *H. contortus*.

У підрозділі 3.4 було показано, що амінокислотні послідовності $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* мають загалом високу ідентичність, подібність та консервативність (табл. 3.1). Водночас локальні, невідповідні ділянки послідовностей $\beta 1$ -тубуліну є варіабельними (рис. 3.15; табл. 3.2) та спричиняють відмінності у конформаційних властивостях $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum*. Саме тому нами були розраховані та порівняні показники SASA та RMSF залишків рівноважного стану $\beta 1$ -тубуліну. Графіки RMSF залишків $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* показано на рис. 3.19.

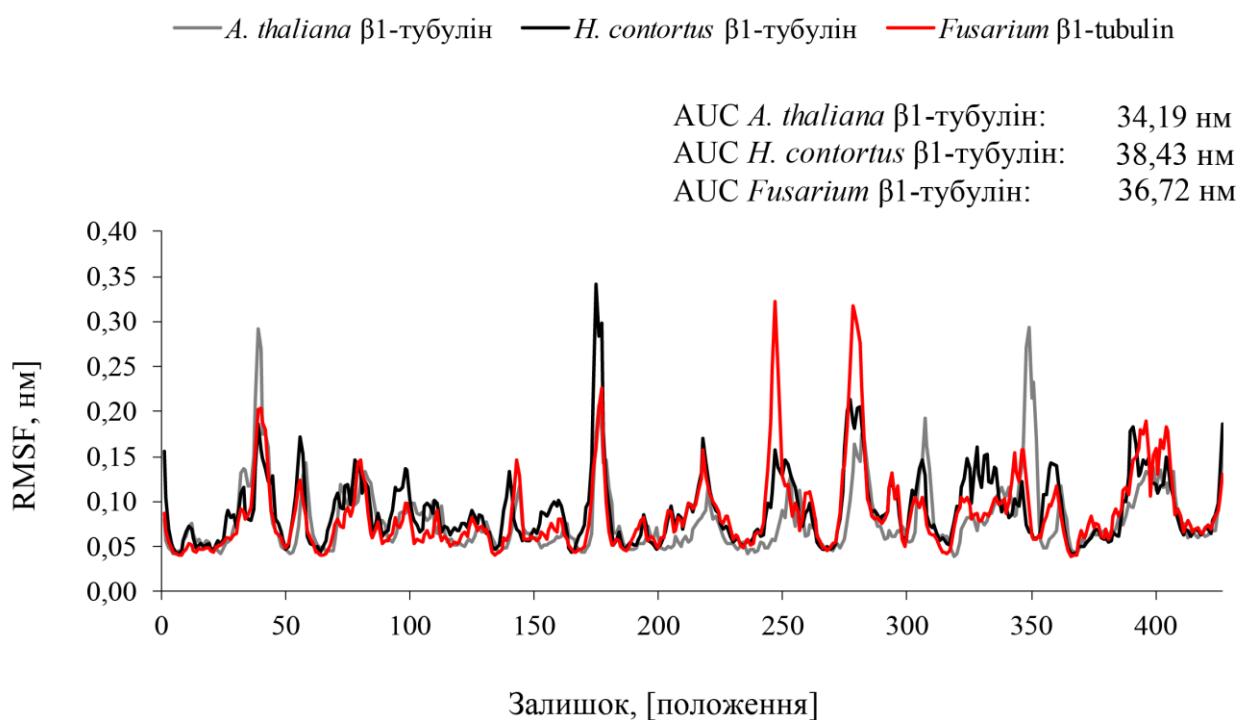


Рис. 3.19 Порівняння графіків RMSF атомів амінокислотних залишків без бічних ланцюгів у положенні 1–428(427).

AUC – площа під графіком

Оскільки у результаті статистичного аналізу було встановлено наявність значущих відмінностей між середніми значеннями RMSF атомів залишків β 1-тубуліну, нами було визначено та порівняно площу під кожним графіком RMSF, яка відображає загальну рухливість залишків моделі (рис. 3.19). Відповідно до отриманих результатів залишки β 1-тубуліну *H. contortus* мали найбільший кумулятивний показник RMSF (AUC: 38,43 нм), а отже найбільшу загальну рухливість. Дещо нижчий показник кумулятивної RMSF мали залишки β 1-тубуліну *F. graminearum/F. oxysporum* (AUC: 36,72 нм), а найнижчий – залишки β 1-тубуліну *A. thaliana* (AUC: 34,19 нм). Також залишки в положенні 1–200 β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum/F. oxysporum* мали приблизно однакову рухливість. У цій ділянці послідовності знаходяться залишки **H1** (10–27) таксанового сайту. Було встановлено значні відмінності у рухливості залишків інших елементів таксанового сайту (**H6**, **H6-H7**, **H7**, **М-петля**, **S9-S10**), що знаходяться у положенні 200–427. До елементів β 1-тубуліну з найбільшими показниками RMSF, не враховуючи **С-кінець**, який є найрухливішим елементом, належали **H1-S2** [28–63(62)], **S5-H5** [172(171)–181(180)], **H7-H8** [(243(242)–250(249)], **М-петля**, **H9-S8** [295(294)–310(309)], **H10-S9** [338(337)–349(348)]. Отже, очікувано найбільшу рухливість мали невідповідні структурні елементи β 1-тубуліну: **H1-S2**, **S5-H5**, **H6-H7**, **М-петля (S7-H9)**, **H9-S8**, **H10-S9**, **S9-S10**.

Не спостерігали статистично значущих відмінностей у показниках SASA залишків β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum/F. oxysporum* (Додаток В, рис. 3). Як і випадку з кумулятивною RMSF, β 1-тубулін *H. contortus* загалом мав найбільшу SASA – 182,10 нм²; на другому місці за SASA був β 1-тубулін *F. graminearum/F. oxysporum*, SASA якого становила 181,99 нм², а на третьому місці β 1-тубулін *A. thaliana* (AUC SASA: 176,44 нм²). Переважання SASA залишків β 1-тубуліну *H. contortus* можна пояснити більшою кількістю заряджених амінокислотних залишків (табл. 3.2). Зокрема, кількість пар донорів та акцепторів, розташованих на поверхні білка, становила 80 у β 1-тубуліна *H. contortus*, а у β 1-тубуліну β 1-тубуліна *A. thaliana* та *F. graminearum/F. oxysporum* – 70. Взаємодії заряджених залишків з розчинником (H₂O + йони) дестабілізують β 1-тубулін, тобто

спричиняють збільшення рухливості залишків та кумулятивної RMSF. В основі дестабілізуючого впливу розчинника на структуру $\beta 1$ -тубуліну лежить порушення полярних контактів, водневих зв'язків та сольових містків між амінокислотними залишками. Наприклад, це відбувається через оточення молекулами H_2O залишків $\beta 1$ -тубуліну та конкурування з ними за утворення водневих зв'язків з іншими залишками. Аналогічно йони Na^+ та Cl^- можуть утворювати йонні зв'язки з позитивно та негативно зарядженими амінокислотними залишками $\beta 1$ -тубуліну, перешкоджаючи утворенню сольових містків між залишками.

Таким чином, було встановлено, що моделі $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*/*F. oxysporum* та *H. contortus* досягають рівноважного стану у інтервалі траєкторій молекулярно-динамічних симуляцій між 40 та 100 нс. Також відмінності у складі амінокислотних залишків спричинили відмінності у конформаційному русі досліджуваних моделей $\beta 1$ -тубуліну. Зокрема, у $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*/*F. oxysporum* та *H. contortus* спостерігали відмінності у показниках RMSD, RMSF, SASA, змінах у об'ємі, гірації, а також кількості водневих зв'язків, полярних контактів та сольових містків на фрейм траєкторії (Додаток Ж, табл. 1). На підставі результатів порівняльного аналізу цих показників було визначено, що найбільшу подібність у конформаційного русі мали моделі $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana* та *F. graminearum*/*F. oxysporum*, а найменшу – моделі $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana* та *H. contortus*. Встановлені відмінності у конформаційному русі в подальшому враховували при моделюванні комплексів IVM та $\beta 1$ -тубуліну та під час аналізу траєкторій молекулярно-динамічних симуляцій комплексів (підрозділ 3.7; 3.8). Зокрема, враховували, що невідповідні ділянки таксанового сайту **М-петля** та **S9-S10** є одними з найваріабельніших та найрухливіших елементів $\beta 1$ -тубуліну, а отже відмінності у їхніх властивостях вплинуть на стабільність комплексів IVM та $\beta 1$ -тубуліну. У подальшому серед зібраних конформації рівноважного стану $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*/*F. oxysporum* та *H. contortus* було відібрано конформації з оптимальним розкриттям таксанового сайту для проведення молекулярного докінгу IVM – цьому етапу дослідження відведено підрозділ 3.6.

3.6 Пошук оптимального конформаційного стану таксанового сайту для моделювання зв'язування IVM з β 1-тубуліном *A. thaliana*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* та *H. contortus*

Під час пошуку оптимального конформаційного стану таксанового сайту для моделювання зв'язування IVM нами було проаналізовано зібрані конформації, визначено та порівняно конформаційні властивості таксанового сайту β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum*. Зокрема, було ідентифіковано конформації таксанового сайту, які зустрічаються з найбільшої частотою. Найпоширеніші конформації таксанового сайту досліджуваних моделей β 1-тубуліну показано на рис. 3.20.

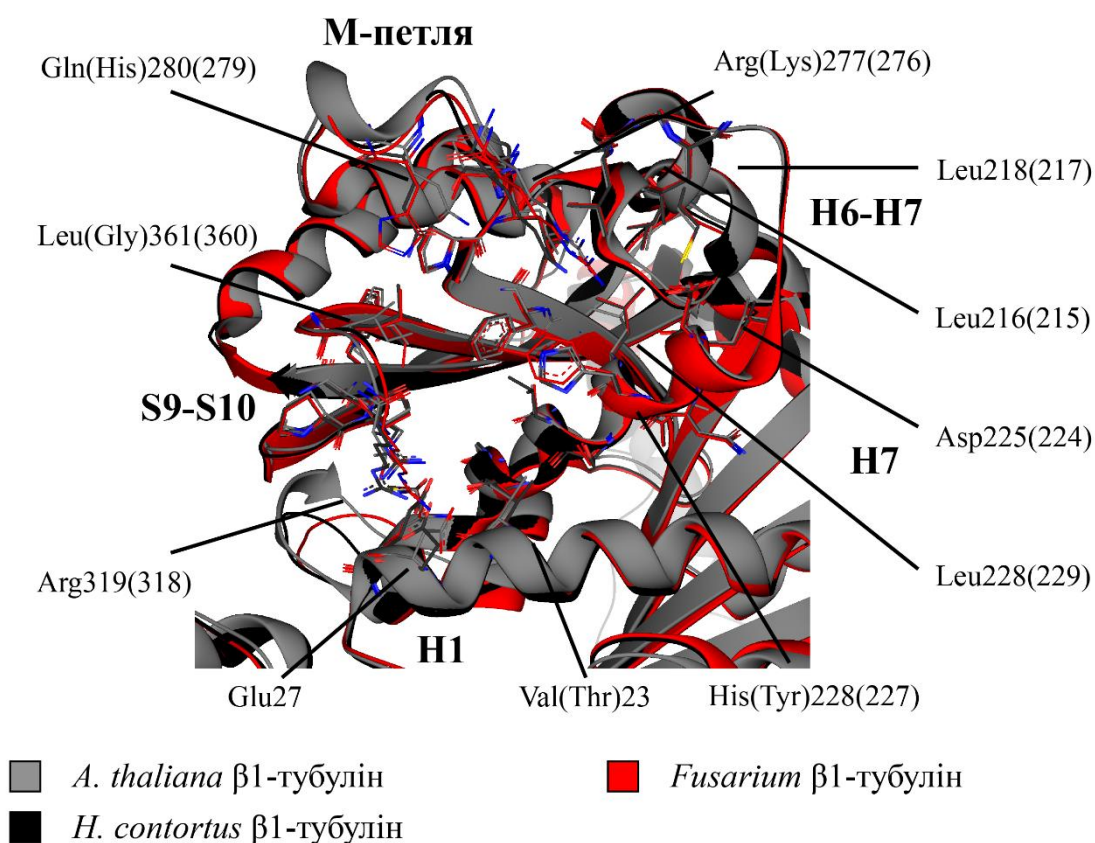


Рис. 3.20 3-D вирівнювання таксанового сайту β 1-тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*/*F. oxysporum* та *H. contortus*. Вказано найважливіші для зв'язування IVM амінокислотні залишки таксанового сайту

Було проведено кластерний аналіз конформацій таксанового сайту. Найбільшу кількість кластерів (75) мав таксановий сайт β 1-тубуліну *F. graminearum* та *F. oxysporum*. Другим за кількістю кластерів був β 1-тубулін *H. contortus* (61). Конформації таксанового сайту β 1-тубуліну *A. thaliana* були розподілені лише між 22 кластерами. Оскільки **М-петля** та **S9-S10** є найрухливішими елементами таксанового сайту, відмінності у конформаційному русі цих елементів β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* мали значний вплив на властивості сайту та кількість ідентифікованих кластерів. Також на результати кластерного аналізу вплинули відмінності у одинадцяти положеннях залишків, що формують інтерфейс сайту, а саме 23, 26 у **H1**; 219(218), 228(227) у **H7**; 275(274), 276(275), 277(276), 280(279) у **М-петлі**; 360(359), 362(361), 365(364) у **S9-S10** (табл. 3.4). У результаті аналізу властивостей центральних конформацій кластерів таксанового сайту β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* було ідентифіковано чотири конформаційні стани сайту (рис. 3.21).

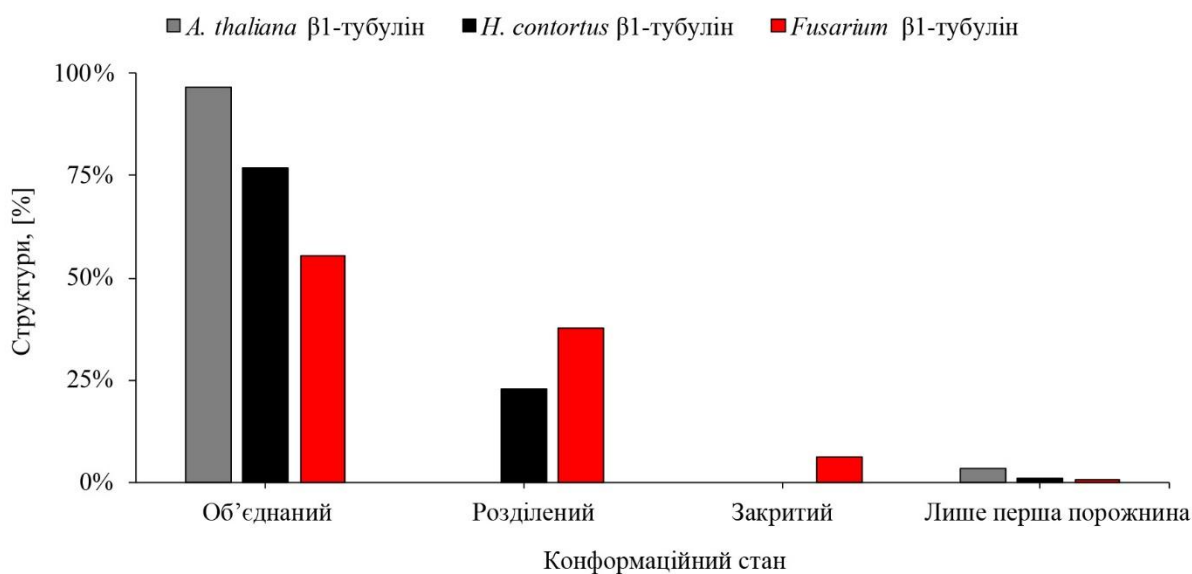


Рис. 3.21 Відсотковий розподіл конформацій таксанового сайту сайту β 1-тубуліну *A. thaliana*, *Fusarium* (*F. graminearum* та *F. oxysporum*) та *H. contortus* між ідентифікованими конформаційними станами

Було встановлено, що більшість конформацій таксанового сайту мають об'єднаний стан порожнини. Цей стан мали 96,64% конформацій $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana*, 76,84% $\beta 1$ -тубуліну *H. contortus* та 55,33% конформацій $\beta 1$ -тубуліну *F. graminearum*/*F. oxysporum*. Другим за частотою конформаційним станом $\beta 1$ -тубуліну *H. contortus* (22,05%) та *F. graminearum*/*F. oxysporum* (37,75%) є стан за якого відбувається розділення порожнини сайту. Цей стан не спостерігався серед конформацій $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana*. Об'єднаний та розділений конформаційні стани таксанового сайту показані на рис. 3.22

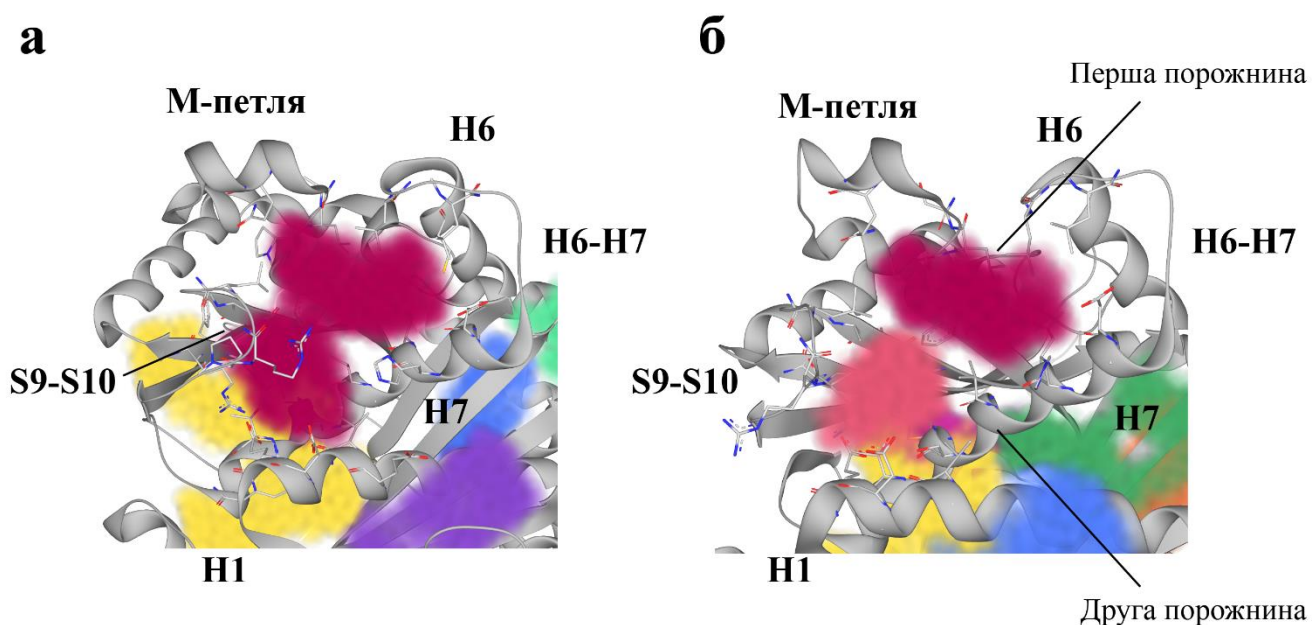


Рис. 3.22 Конформаційні стани відкритої (а) та розділеної (б) субпорожнини таксанового сайту.

Третім за частотою виникнення під час конформаційного руху був конформаційний стан таксанового сайту, за якого відкритою є лише перша, гідрофобна субпорожнина. Цей стан був найпоширенішим у траєкторії $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana* (3,32%), тоді як траєкторії $\beta 1$ -тубуліну *H. contortus* та *F. graminearum* та *F. oxysporum* містили 1,12% та 0,73% конформацій відповідно. Лише у 6,20% конформацій $\beta 1$ -тубуліну *F. graminearum*/*F. oxysporum* був виявлений закритий стан сайту, за якого відбувається зближення **H1**, **H7**, **М-петлі** та **S9-S10**, а бічні ланцюги

His(Tyr)228(227) **H7**, Arg(Lys)277(276) **М-петлі** перешкоджають зв'язуванню з ними лігандів.

Про існування двох субпорожнин таксанового сайту у β -тубуліну ссавців описано у роботі [90]. Нами вперше було описано ці субпорожини таксанового сайту у β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum*, а також проаналізовано та порівняно частоту виникнення різних конформаційних станів таксанового сайту (рис. 3.21). Об'єднаний конформаційний стан сайту характеризується найбільшим об'ємом, а тому саме цей стан сайту є оптимальним для проведення молекулярного докінгу IVM. Періодичне зближення **H7**, **S7** та **S9-S10** під час конформаційного руху спричиняє перехід сайту з об'єданого конформаційного стану у стан розділених субпорожнин. Також важливим є положення бічних ланцюгів His228(His227 *H. contortus* та Tyr227 *F. graminearum*/*F. oxysporum*), Ala232(Val231 та Ala231) **H7**, Phe272(271) **S7**, Ile362(Leu361) **S9-S10**. Відмінностями у стереохімічних властивостях залишків у відповідних положеннях послідовностей можна пояснити вищу частоту виникнення розділеного стану сайту у β 1-тубуліну *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* (рис. 3.18; рис. 3.19 б). Наприклад, бічний ланцюг Tyr227 послідовності β 1-тубуліну *F. graminearum*/*F. oxysporum* є довшим (0,55 нм > 0,45 нм) та об'ємнішим (12,26 нм³ > 8,24 нм³), ніж бічний ланцюг His228(227) послідовності β 1-тубуліну *A. thaliana* та *H. contortus*. Аналогічно Val231 β 1-тубуліну *H. contortus* має більші розміри, ніж Ala232(231) β 1-тубуліну *A. thaliana* та *F. graminearum*/*F. oxysporum*, зменшуючи об'єм порожнини таксанового сайту, доступної для зв'язування.

Як описано у статті [51], сольові містки значно впливають на стабільність та конформаційні властивості локальних ділянок білків. Саме тому нами було ідентифіковано сольові містки між залишками таксанового сайту та проаналізовано їхню стійкість (% фреймів траєкторії, на яких спостерігався кожен сольовий місток). У результаті аналізу траєкторій було встановлено можливість утворення 5 сольових містків між донорно-акцепторними парами залишків таксанового сайту. Як представлено на рис. 3.23, до таких пар належать: Asp225(224) **H7** та Arg277(Lys276 у послідовності *H. contortus*) **М-петлі**, Glu22 та Lys19 **H1**, Glu27 **H1** та Arg242(241)

H7, Glu27 **H1** та Arg319(318) **S8**, Glu27 **H1** та Arg359 **S9-S10** (β 1-тубулін *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum*).

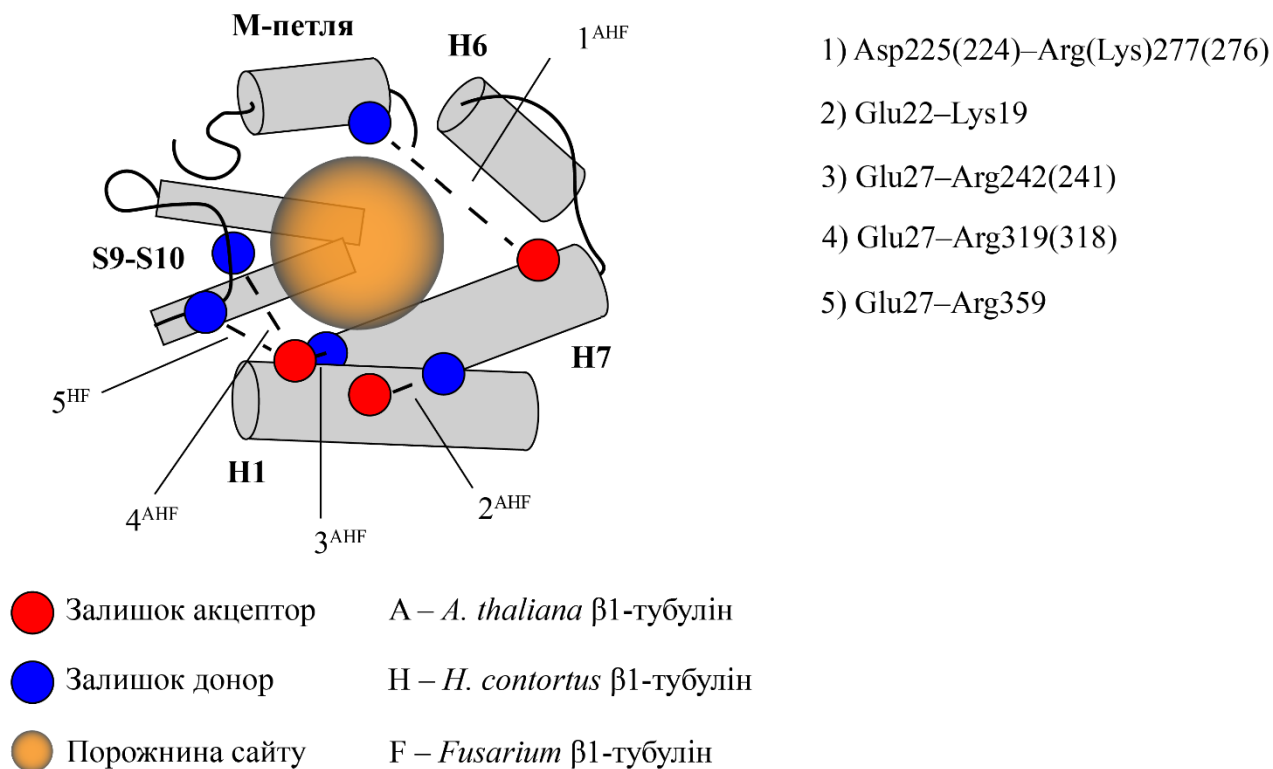


Рис. 3.23 Схематичне відображення мережі сольових містків між залишками таксанового сайту β 1-тубуліну *A. thaliana* (A), *H. contortus* (H) та *F. graminearum*/*F. oxysporum* (F)

Сольовий місток між Glu27 **H1** та Arg359 **S9-S10** було виявлено лише у траєкторіях β 1-тубуліну *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum*, оскільки у відповідному положенні (360) послідовності β 1-тубуліну *A. thaliana* знаходиться Thr. Місток між Asp225(224) **H7** та Arg(Lys)277(276) **М-петлі** було ідентифіковано у всіх досліджуваних моделей β 1-тубуліну, попри відмінності у стереохімічних властивостях Arg та Lys у 277(276) положенні. Однак у стабільній формі цей місток наявний лише у траєкторії β 1-тубуліну *H. contortus* на 1,65% фреймів (Додаток Б, табл. 1). Враховуючи це, Asp225(224)–Arg(Lys)277(276) не має значного впливу на конформацію сайту. Високу стабільність у β 1-тубуліну *A. thaliana* та *H. contortus* має

місток Glu22–Lys19, який утворюється між залишками **H1**. Місток між Glu27 **H1** та Arg319(318) **S8** стабілізує таксановий сайт через зв'язування **H1** та **S8**. Також стабілізуючий вплив має місток між Glu27 **H1** та Arg242(241) **H7** та місток між Glu27 **H1** та Arg359 **S9-S10** β 1-тубуліну *H. contortus* та *F. graminearum/F. oxysporum*. Містки Glu27–Arg242(241), Glu27–Arg319(318), Glu27–Arg359 формують мережу зв'язків, яка об'єднує **H1**, **H7**, **S8** та **S9-S10**, стабілізуючи другу субпорожнину сайту.

Для встановлення можливого алостеричного впливу IVM на конформацію β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum/F. oxysporum* було вивчено взаємозв'язки таксанового сайту з іншими сайтами та порожнинами цих моделей β 1-тубуліну (Додаток Г, рис. 1 а). Зокрема, у результаті аналізу було ідентифіковано взаємозв'язок таксанового сайту з сайтом колхіцину. Злиття таксанового сайту та сайту колхіцину відбувається через утворення внутрішньоглобулярного тунелю вздовж **H7** у напрямку **H7-H8**, сформованого залишками **H7**, **S8**, **S9**, **S10** та **S9-S10** (Додаток Г, рис. 1 б). Відомо, що індуковані IVM заміни Phe на Tyr у 167 (**S5**) та 200 (**S6**) положеннях амінокислотної послідовності β 1-тубуліну *H. contortus* призводять до зниження афінності бензимидазолів до сайту колхіцину [7, 8]. Водночас IVM безпосередньо не контактує з залишками у цих положеннях, які є частиною сайту колхіцину, а отже алостеричний взаємозв'язок між таксановим сайтом та сайтом колхіцину є одним з можливих пояснень виникнення цих замін. Іншим встановленим взаємозв'язком є зв'язок таксанового сайту з консервативним сайтом ГТФ/ГДФ, утвореним такими структурними елементами як **H1**, **H6**, **H7**, **H6-H7** (Додаток Г, рис. 1 д). Іншими ідентифікованими взаємозв'язками були розширення порожнини таксанового сайту у напрямку **М-петлі** та **H9** (Додаток Г, рис. 1 в) та розширення сайту у напрямку порожнини між структурними елементами **H1**, **H1-S2** та **H2** (Додаток Г, рис. 1 г). Виявлені взаємозв'язки таксанового сайту β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum/F. oxysporum* з сайтами колхіцину та ГТФ/ГДФ вказують на можливість алостеричних змін у конформаціях цих сайтів, спричинених зв'язуванням лігандів, зокрема IVM, з таксановим сайтом. Наприклад, виникнення таких змін унаслідок ковалентного зв'язування зампаноліду з β 2-тубуліном *Bos taurus* описано у роботі [36].

Як показано у статті [23], флуктуації конформації **М-петлі** змінюють структурні та динамічні властивості МТ. Також стабілізація **М-петлі** є основною біологічної активності лігандів таксанового сайту та, зокрема, IVM. Враховуючи це, було визначено та порівняно перший головний компонент PC₁ конформаційного руху **М-петлі** та показники RMSF атомів амінокислотної основи залишків **М-петлі** у проміжку від 272(271) до 286(285). У результаті порівняння графіків PC₁ було встановлено відмінності у конформаційному русі **М-петлі** β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* у незв'язаному з IVM стані (Додаток Е, рис. 2 а; Додаток Ж, табл. 1). Також відрізнялася рухливість залишків – найбільш рухливими були залишки **М-петлі** β 1-тубуліну *F. graminearum*/*F. oxysporum* (AUC: 2,64 нм), залишки **М-петлі** β 1-тубуліну *H. contortus* (AUC: 2,16 нм) були менш рухливими, а найменш рухливими були залишки **М-петлі** *A. thaliana* (AUC: 1,65 нм) (Додаток Е, рис. 1 а). Зазначені відмінності у конформаційних властивостях **М-петлі** впливають на зв'язування та взаємодії IVM з β 1-тубуліном, як описано нами у підрозділі 3.8.

Таким чином, було встановлено, що відмінності у складі амінокислотних залишків призвели до відмінностей у конформаційних властивостях таксанового сайту β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum*. Серед елементів структури таксанового сайту найбільше відмінностей спостерігали у послідовностях та конформаційному русі невідпорядкованих ділянок **S9-S10** та **М-петлі**. Було ідентифіковано чотири конформаційні стани таксанового сайту – стан об'єднаних субпорожнин, стан розділених субпорожнин, закритий стан та стан з відкритою лише першою субпорожниною. Встановлено, що саме стан об'єднаних субпорожнин таксанового сайту є оптимальним для зв'язування IVM, а тому з пулу конформацій β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* було відібрано конформації з об'єднаними субпорожнинами сайту для проведення молекулярного докінгу IVM. Також для пояснення можливого алостеричного ефекту від зв'язування IVM було ідентифіковано та описано алостеричні взаємозв'язки таксанового сайту з іншими сайтами та порожнинами β 1-тубуліну. Зокрема, було виявлено взаємозв'язки таксанового сайту з сайтом колхіцину та сайтом ГТФ/ГДФ.

3.7 Визначення особливостей алостеричної взаємодії IVM з α -гомопентамерним глутаматзалежним рецептором *C. elegans* та моделювання зв'язування IVM з β 1-тубуліном *A. thaliana*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* та *H. contortus*

Як описано у підрозділі 1.6, є різні механізми дії та мішені IVM у клітинах еукаріотичних організмів [13, 19, 25, 26, 40, 50, 54, 59, 70, 82, 140]. Зокрема, відомо про зв'язування IVM з Cys-петльовими рецепторами (GluCl⁻, ГАМК-рецептор, гліциновий рецептор тощо), фарнезоїдним X-рецептором, HSP27, α -імportiном тощо. Використання фізико-хімічних властивостей комплексів біологічно активних сполук з відомими мішенями для пошуку нових мішеней є поширеним підходом у біоінформатиці та біомедичних дослідженнях [96]. Попри те, що β -тубулін та Cys-петльові рецептори є еволюційно віддаленими мішенями з різними амінокислотними послідовностями, зв'язування з ними IVM, ймовірно, свідчить про наявність у них подібних порожнин з високою афінністю до IVM та його окремих функціональних груп. Тому визначення ролі функціональних груп IVM у взаємодії з GluCl⁻ може допомогти при моделюванні зв'язування IVM з β -тубуліном. Враховуючи це, було проаналізовано структури комплексів IVM та GluCl α *C. elegans*, наявні у RCSB PDB ([3RHW](#); [3RI5](#)).

Зокрема, було здійснено профілювання сайту зв'язування IVM та GluCl α *C. elegans* та визначено патерни взаємодії IVM з цим білковим комплексом. У результаті профілювання було визначено фізико-хімічні властивості сайту, які було порівняно з властивостями таксанового сайту β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum*. Відповідно до результатів порівняння, представлених у табл. 1 Додатку Г, сайт зв'язування IVM з GluCl α та таксановий сайт β -тубуліну є переважно гідрофобними: показник гідрофобності в середньому становить $0,69 \pm 0,1$ у сайту GluCl α та $0,71 \pm 0,2$ у таксанового сайту β 1-тубуліну по шкалі від 0 до 1. Незважаючи на загальну однакову кількість залишків (22–25 в залежності від конформації), сайт GluCl α має більший об'єм ($55 > 44 \text{ нм}^3$). На відміну від таксанового сайту, який розташований на поверхні субодиниці β -тубуліну, сайт

зв'язування IVM з GluCl α знаходиться у інтерфейсі між трансмембранними доменами двох субодиниць рецептора (рис. 3.24 а, в).

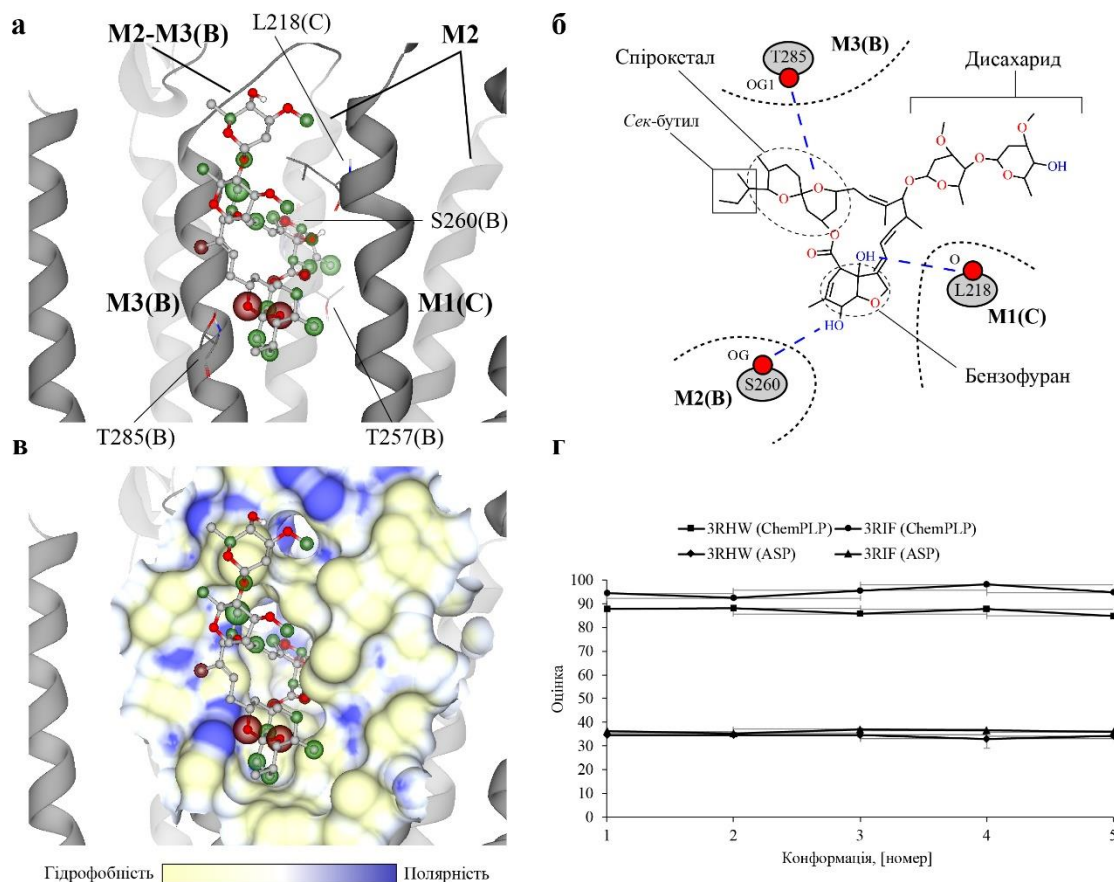


Рис. 3.24 Взаємодії IVM з сайтом GluCl α (комплекси 3RHW та 3RIF RCSB PDB): положення IVM у сайті зв'язування, розташованому у інтерфейсі В–С субодиниці (а); схематичне зображення положення функціональних груп IVM у сайті та мережі водневих зв'язків (М – трансмембранна спіраль) (б); поверхня сайту зв'язування, розфарбована за показником LogP (в); порівняння афінності IVM до сайту зв'язування GluCl α відповідно до оцінки функцій ChemPLP та ASP (г)

Трансмембранний домен кожної субодиниці складається з чотирьох спіралей, які проходять крізь мембрану, та завершується внутрішньоклітинним доменом. Як схематично показано на рис. 3.24 б, сайт зв'язування IVM з GluCl α утворений залишками М2, М3 та М2-М3 (+)-субодиниці та залишками М1 (–)-субодиниці. Оскільки зовнішня поверхня сайту є переважно гідрофобною (рис. 3.24 в), а

внутрішня містить полярні та заряджені залишки, сайт можна умовно розділити на більшу, гідрофобну та меншу, полярну та заряджену субпорожнини.

Щоб оцінити афінність IVM до GluCl α за допомогою функцій скорингу ChemPLP та ASP, нами було здійснено ригідний редокінг IVM до кожного з п'яти сайтів зв'язування комплексів 3RHW та 3RIF, результати якого продемонстровані на рис. 3.24 г; середні значення скорів зведені у табл. 2 Додатку Е. Було встановлено, що хоча IVM мав загалом високу афінність до GluCl α , середні оцінки функцій відрізнялися у 3RHW (ChemPLP: 86,89 $\pm$ 1,50; ASP: 34,22 $\pm$ 2,57) та 3RIF (ChemPLP: 95,05 $\pm$ 1,90; ASP: 36,21 $\pm$ 0,67) через відмінності у конформаціях рецепторів. Оцінка афінності IVM до GluCl α за допомогою методу HYDE загалом підтвердила більшу спорідненість IVM до сайту зв'язування у комплексі 3RIF (μ M–mM) у порівнянні з комплексом 3RHW (nM– μ M). У результаті аналізу комплексів IVM з GluCl α було визначено, що бензофуранова група занурюється у інтерфейс сайту та взаємодіє з залишками **M2** (Thr257, Ala258, Ser260, Asn264), **M3** (Asp277, Val278, Ile280, Gly281, Ala282, Met284) (+)-субодиниці та залишками **M1** (Leu217, Leu218, Gln219, Ile222, Pro223) (–)-субодиниці. Найстійкішими є водневі зв'язки бензофуранової групи IVM з Ser260 **M2** та Leu218 **M1** (рис. 3.24 а, б). Загалом бензофуранова група IVM є найбільш активною, оскільки вона необхідна для зв'язування IVM з GluCl α та індукції алостеричних змін у конформації рецептору. На відміну від бензофуранової групи макроциклічне кільце IVM знаходиться у гідрофобній частині сайту та взаємодіє з Ile273 **M2-M3**, залишками **M3** (Asp277, Val278, Ile280, Gly281, Ala282, Met284) (+)-субодиниці, а також залишками **M1** (Leu218, Ile222, Pro223) (–)-субодиниці. Спірокетальна група взаємодіє з **M3** (Met284, Thr285, Phe288) (+)-субодиниці та **M1** (Cys225, Met226, Ile229) (–)-субодиниці. Попри те, що спірокетальна група має переважно неполярні контакти з залишками сайту характерним є водневий зв'язок між Thr285 **M3** та атомом кисню першого кільця спірокетальної групи (рис. 3.24 б). Гнучкий дисахарид взаємодіє з Ile273 **M2-M3** (+)-субодиниці та такими залишками **M1** (–)-субодиниці як Leu217, Leu218 та Ile222. Враховуючи, що дисахарид знаходиться за межами інтерфейсу сайту, він не є важливим для прояву біологічної активності IVM.

Моделі комплексів IVM та β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus*, *F. graminearum*/*F. oxysporum* були створені нами з урахуванням оцінок функцій скорингу ChemPLP, ASP та HYDE, фізико-хімічних властивостей IVM та порожнин таксанового сайту (Додаток Е, табл. 1), а також визначених патернів взаємодії IVM з GluCl α . Подібно до сайту GluCl α , таксановий сайт β -тубуліну складається з гідрофобної (**H6**, **H6-H7**, **H7**, **S7** та **М-петлі**) та полярної (**H1**, **H7**, **S8** та **S9-S10**) субпорожнин. Відповідно до передбаченої нами моделі зв'язування IVM з β -тубуліном бензофуранова група знаходиться у другій субпорожнині таксанового сайту через аналогічне оточення бензофуранової групи у комплексі IVM та GluCl α . Також було враховано афінність другої субпорожнини таксанового сайту до бензенового кільця, виявлену раніше у результаті кристалографічного аналізу [90]. Враховуючи переважну відсутність полярних та заряджених груп у їхньому складі, макроциклічне кільце IVM та спірокетальна група молекули взаємодіятимуть з залишками гідрофобної субпорожнини сайту. Комплекси IVM та β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum*, що задовольняють встановлені нами критерії, були відібрані з комплексів, отриманих у результаті напівгнучкого молекулярного докінгу IVM у GOLD. При цьому були враховувані оцінки функцій скорингу ChemPLP та ASP та результати визначення афінності комплексів за допомогою методу HYDE у SeeSAR, наведені у табл. 2 Додатку Е. Зокрема, скорі комплексів обраних для проведення молекулярно-динамічних симуляцій за оцінкою ChemPLP та ASP становили: 74,4978 та 28,0308 у β 1-тубуліну *A. thaliana*, 63,4529 та 25,7280 у β 1-тубуліну *H. contortus*; 67,0342 та 30,2378 у β 1-тубуліну *F. graminearum*/*F. oxysporum*. Відповідно до результатів аналізу комплексів за допомогою методу HYDE афінність IVM до таксанового сайту β -тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* знаходилася в межах μ М–мМ інтервалу.

Відомо декілька лігандів, які зв'язуються з таксановим сайтом β -тубуліну [67, 103]. Відмінності у структурі та способі зв'язування лігандів з таксановим сайтом зумовлюють відмінності у взаємодії, а отже й механізму прояву їхнього стабілізуючого впливу на МТ. Враховуючи це, нами було порівняно положення IVM

у сайті з положенням інших лігандів та встановлено, що серед лігандів таксанового сайту положення IVM у сайті є найближчим до положення таксолу (<https://www.rcsb.org/ligand/TA1>). Результати вирівнювання таксанового сайту змодельованого комплексу β 1-тубуліну *H. contortus* та IVM і комплексу β -тубуліну *Sus scrofa* та таксолу показані на рис. 3.26.

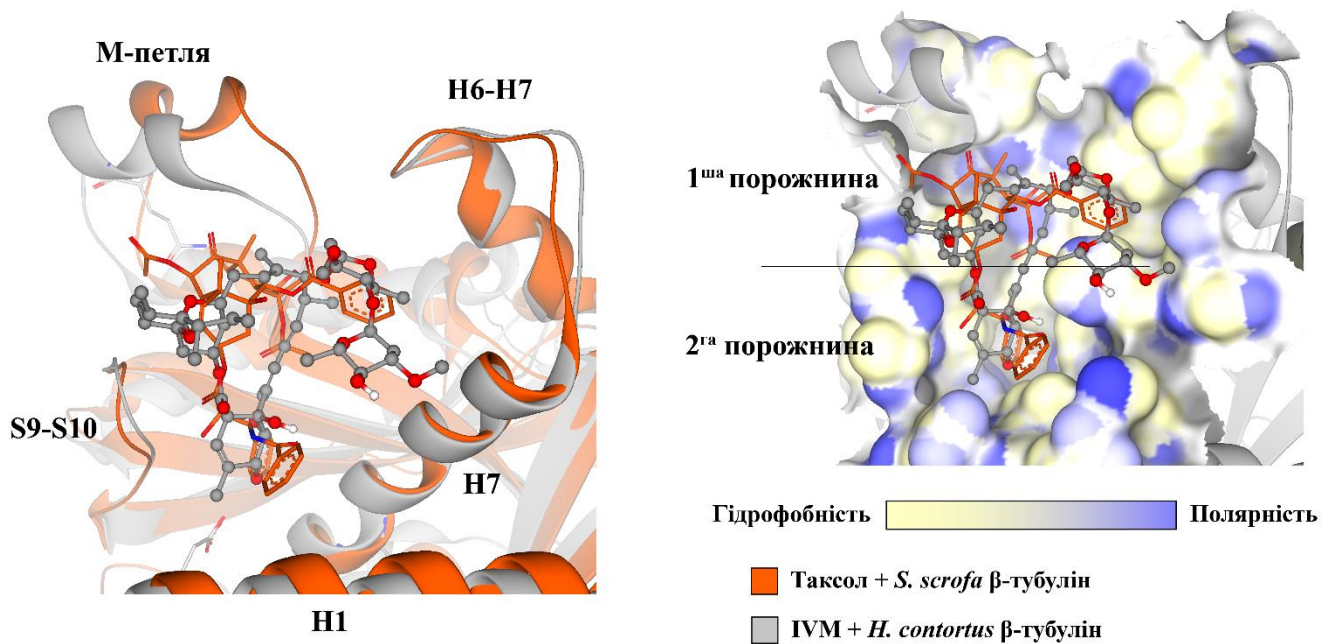


Рис. 3.26 Вирівнювання таксанового сайту комплексу β 1-тубуліну *H. contortus* з IVM та комплексу β -тубуліну *Sus scrofa* з таксолом (RCSB PDB ID: [7TQY](https://www.rcsb.org/structure/7TQY); [47]): положення відносно елементів вторинної структури сайту (а); положення відносно субпорожнин сайту (б) (поверхня сайту розфарбована за LogP)

Раніше було експериментально підтверджено зв'язування IVM з таксановим сайтом β -тубуліну *H. contortus* [7, 8]. Ці дослідження, здійснені Ashraf та колегами (2015), були взяті нами за основу для подальшого вивчення особливостей взаємодії IVM з β -тубуліном еукаріотичних організмів. Зокрема, нами було детально проаналізовано можливі положення IVM у таксановому сайті β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* та з них відібрано найвірогідніший з варіантів зв'язування IVM. Як описано у роботі [7], IVM конкурував з таксолом за зв'язування з таксановим сайтом β 1-тубуліну *H. contortus*. Оскільки положення IVM

у сайті є подібним до положення таксолу (рис. 3.26), отримані нами результати теоретичного моделювання узгоджуються з результатами експериментів [7, 8]. Про зв'язування IVM з β -тубуліном *A. thaliana* свідчать зміни у організації МТ у клітинах головного кореня ліній *A. thaliana* GFP-MAP4 та GFP-TUA6 (рис. 3.6–3.12). Враховуючи стабілізацію IVM МТ *H. contortus* та загалом високу консервативність β -тубуліну та таксанового сайту *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum* та *F. oxysporum* (рис. 3.15; табл. 3.1–3.4), зв'язування IVM з β -тубуліном *A. thaliana* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* та його стабілізуючий вплив на МТ цих організмів є ймовірними.

Таким чином, нами було змодельовано комплекси IVM та β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum*, уточнено положення IVM у таксановому сайті та визначено роль функціональних груп IVM при зв'язуванні з β -тубуліном. На підставі оцінок функцій ChemPLP, ASP та методу HYDE, результатів аналізу взаємодії IVM з GluCl α та попередніх досліджень було відібрано комплекси IVM та β 1-тубуліну для подальшої верифікації за допомогою молекулярно-динамічних симуляцій, про що детально йде мова у наступному підрозділі.

3.8 Визначення енергії зв'язування та порівняння динамічних властивостей комплексів IVM та β -тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* та *H. contortus*

Для верифікації стабільності комплексів β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* та визначення молекулярно-механічних особливостей взаємодії IVM з ними було проведено молекулярно-динамічні симуляції. Отримані траєкторії були проаналізовані, а конформаційні властивості комплексів порівняні. Головним критерієм стабільності комплексів білків та біологічно активних сполук є вільна енергія зв'язування комплексів (ΔG_{bind}), яка дозволяє кількісно оцінити афінність ліганда до білка та порівняти стабільність різних комплексів. Тому нами було розраховано та порівняно ΔG_{bind} для 500 конформацій кінцевих ділянок траєкторій комплексів IVM та β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та

F. graminearum/*F. oxysporum* (з 50 по 100 нс; з кроком у 100 пс) за допомогою методу ММ/PBSA.

На рис. 3.27 показано часові зміни енергії зв'язування ΔG_{bind} досліджуваних комплексів.

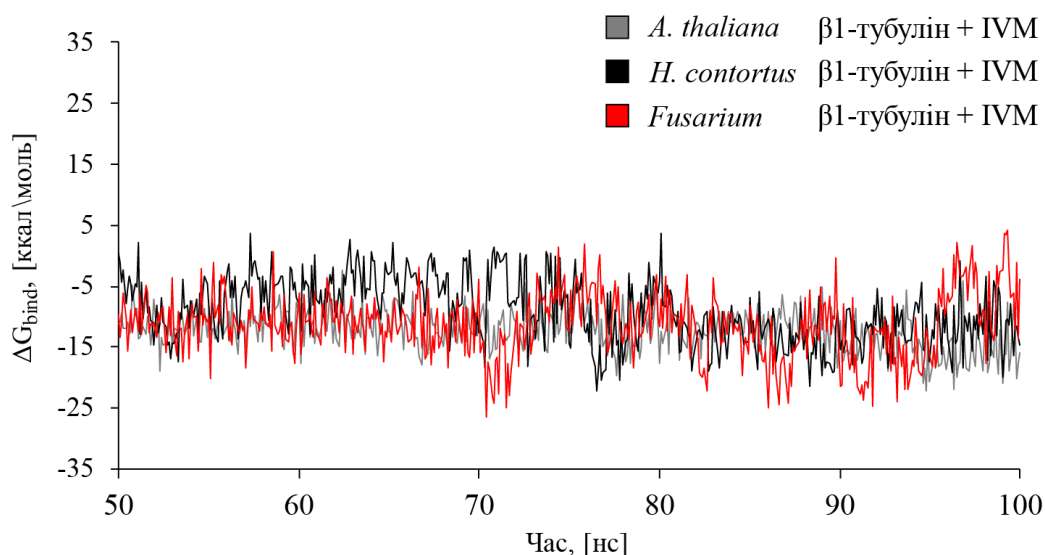


Рис. 3.27 Порівняння часових змін енергії зв'язування (ΔG_{bind}) комплексів IVM та $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana*, *Fusarium* (*F. graminearum* та *F. oxysporum*) та *H. contortus*

Від'ємні значення ΔG_{bind} свідчать про те, що всі досліджувані комплекси були стабільними у зазначеному часовому інтервалі. Враховуючи перетинання графіків ΔG_{bind} , взаємодії IVM з $\beta 1$ -тубуліном *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* були загалом подібними. Відповідно до результатів порівняння часових рядів ΔG_{bind} , зведених у табл. 2 Додатку Ж, найбільша спорідненість у змінах ΔG_{bind} була притаманна комплексам IVM та $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana* та *F. graminearum*/*F. oxysporum*. Це можна пояснити більшою подібністю конформаційних властивостей $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* (Додаток Ж табл. 1), а отже й взаємодій IVM з $\beta 1$ -тубуліном цих організмів.

Окрім змін ΔG_{bind} в залежності від часу, нами також було порівняно середні значення ΔG_{bind} досліджуваних комплексів. У результаті порівняння середніх значень ΔG_{bind} було встановлено, що IVM має найбільшу афінність до $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana* ($\Delta G_{\text{bind}} = -12,26 \pm 3,33$ ккал/моль); афінність IVM до $\beta 1$ -тубуліну *H. contortus* була

навпаки, найменшою, оскільки середня ΔG_{bind} становила $-9,05 \pm 5,32$ ккал/моль; середнє значення ΔG_{bind} комплексу IVM та $\beta 1$ -тубуліну *F. graminearum*/*F. oxysporum* становило $-11,30 \pm 5,20$ ккал/моль (рис. 3.28).

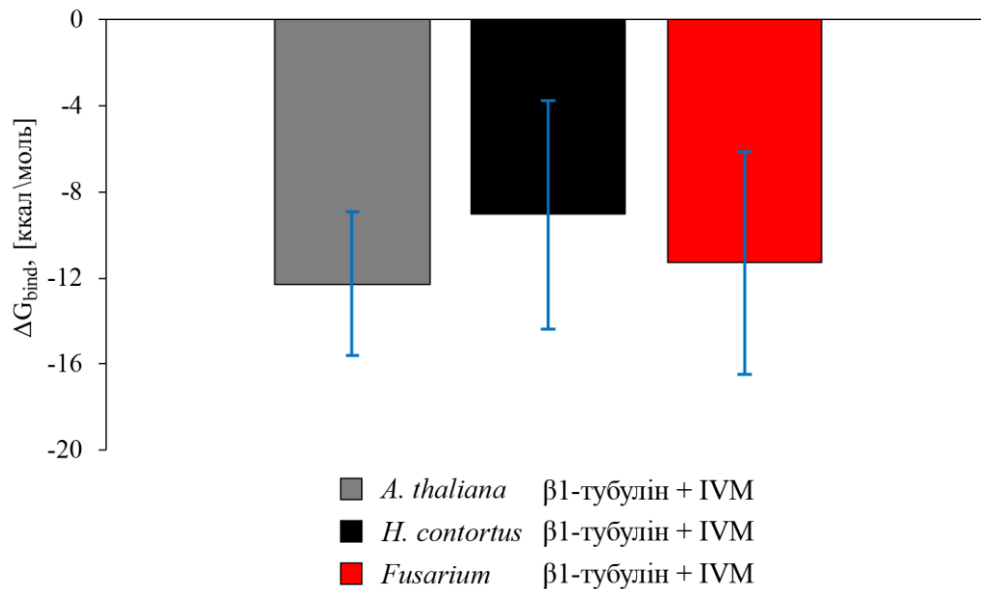


Рис. 3.28 Порівняння середніх значень ΔG_{bind} комплексів IVM та $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana*, *Fusarium* (*F. graminearum*/*F. oxysporum*) та *H. contortus*

Оскільки нижчі значення ΔG_{bind} відповідають більшій стабільності комплексів, найвищу стабільність мав комплекс $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana* ($-12,26 \pm 3,33$ ккал/моль), а найнижчу – комплекс $\beta 1$ -тубуліну *H. contortus* ($-9,05 \pm 5,32$ ккал/моль). Нами було встановлено взаємозв'язок між значеннями ΔG_{bind} та концентраціями, за яких спостерігався вплив IVM на проростки *A. thaliana* та колонії *F. graminearum* та *F. oxysporum* в умовах *in vitro*. Зокрема, вплив IVM на проростки *A. thaliana* спостерігали за концентрації у 250 мкг/мл (рис. 3.1–3.5), а енергія зв'язування комплексу IVM та $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana* була найнижчою $-12,26 \pm 3,33$ ккал/моль. Комплекс IVM та $\beta 1$ -тубуліну *F. graminearum*/*F. oxysporum* мав вищу енергію зв'язування ($-11,30 \pm 5,20$ ккал/моль), тобто нижчу стабільність, що, ймовірно, призвело до вищих концентрацій (2 та 3 мг/мл), за яких проявлялася антигрибна активність IVM (рис. 3.13–3.14).

Окрім загальної ΔG_{bind} кожного комплексу, було також визначено взаємодії IVM з якими залишками мають найбільше значення для підтримання стабільності комплексів. Для встановлення внеску окремих залишків у стабільність комплексів було здійснено енергетичну декомпозицію загальної ΔG_{bind} комплексів, результати якої продемонстровано на рис. 3.29.

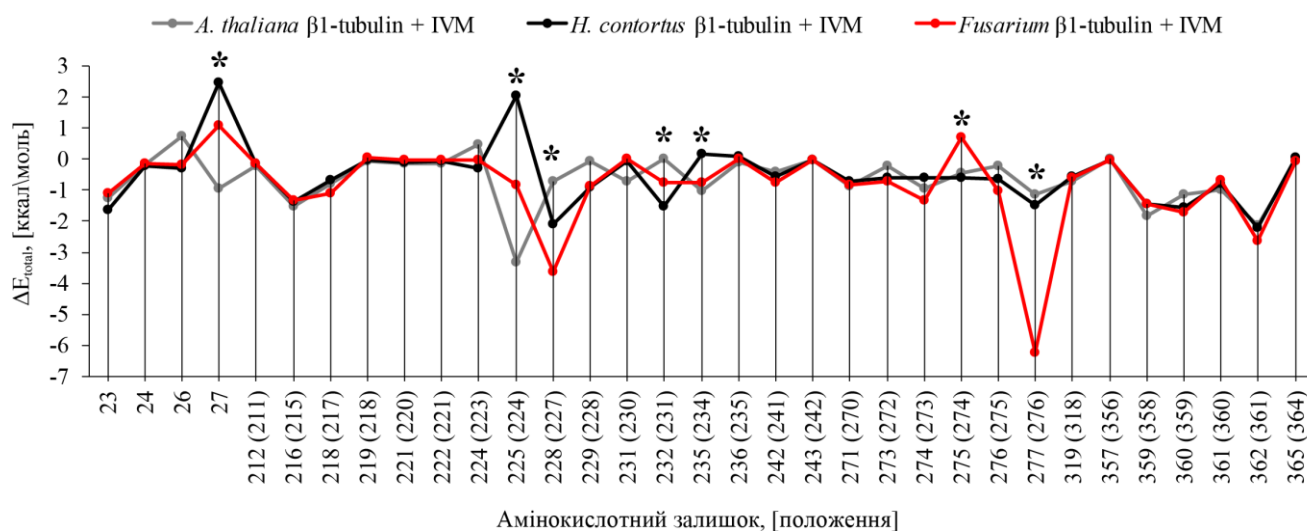


Рис. 3.29 Порівняння енергетичного внеску (ΔE_{total}) амінокислотних залишків комплексів IVM та $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana*, *Fusarium* (*F. graminearum*/*F. oxysporum*) та *H. contortus*.

* – позначені положення амінокислотних залишків, у яких спостерігалися найбільші відмінності в ΔE_{total}

У результаті порівняння загального енергетичного внеску (ΔE_{total}) залишків у стабільність комплексів було встановлено, що ΔE_{total} більшості залишків був подібним у всіх комплексах. Водночас у залишків у деяких положеннях значення ΔE_{total} варіювали в залежності від комплексу. Зокрема, відмінності у ΔE_{total} спостерігалися у Glu27 **H1**; Asp225(224), His(Tyr)228(227), Ala(Val)232(231), Gly235(234) **H7**; Thr275(274) та Arg(Lys)277(276) **М-петлі** (рис. 3.27). Відмінності у ΔE_{total} таких залишків як His(Tyr у *F. graminearum*/*F. oxysporum*)228(227) та Ala(Val у *H. contortus*)232(231) **H7** та Arg(Lys у *H. contortus*)277(276) **М-петлі** були зумовлені

відмінностями у послідовностях $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* (табл. 3.4). Іншим поясненням відмінностей у ΔE_{total} деяких залишків є алостеричний ефект, який виникає від руху та контактів з IVM розташованих поруч залишків, а також загального конформаційного руху комплексу. Враховуючи це, було досліджено конформаційні властивості комплексів та, зокрема, зміни у кількості водневих зв'язків через часові інтервали у 10 пс (рис. 3.30).

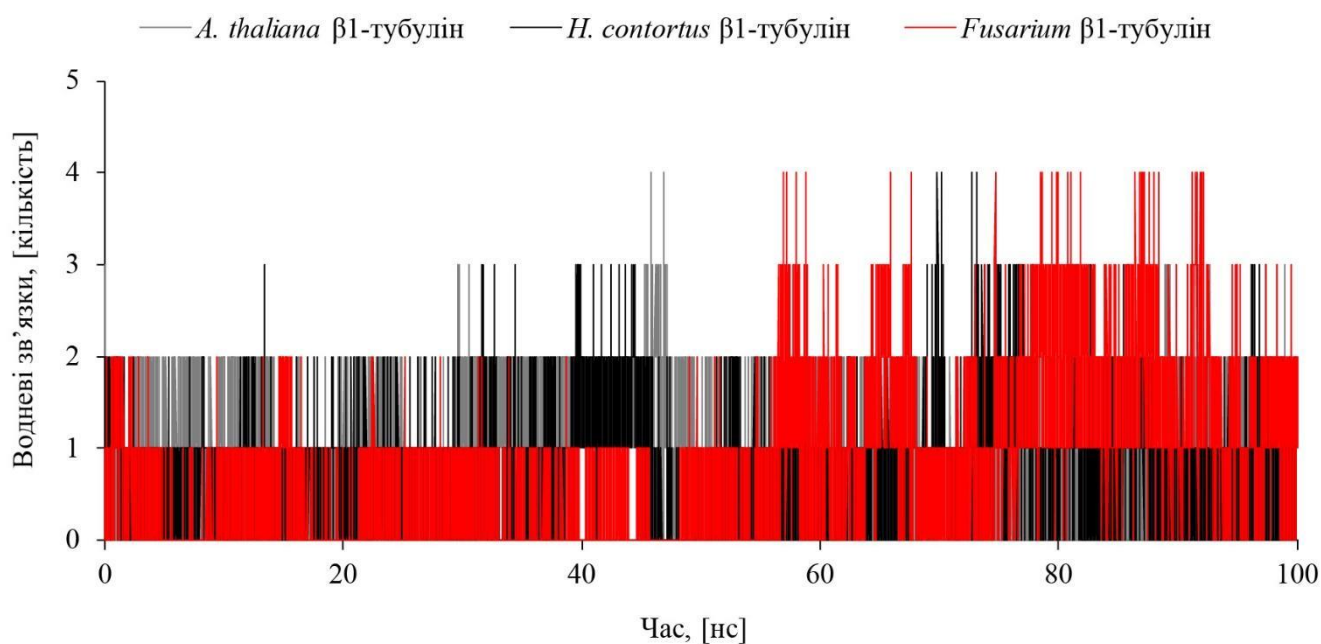


Рис. 3.30 Порівняння змін у кількості водневих зв'язків на фрейм траєкторій молекулярно-динамічних симуляцій (0–100 нс) комплексів IVM з $\beta 1$ -тубуліном *A. thaliana*, *Fusarium* (*F. graminearum*/*F. oxysporum*) та *H. contortus*

У результаті аналізу та порівняння часових змін водневих зв'язків між IVM та залишками таксанового сайту $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* було визначено, що максимальна кількість водневих зв'язків на фрейм становила 4 у всіх комплексів, а переважна більшість фреймів містили 1 та 2 зв'язки (рис. 3.30). Кількість водневих зв'язків на фрейм значно зросла після 40 нс, що свідчить про стабілізацію комплексів з часом. У результаті порівняння графіків було встановлено, що найбільшу подібність у динаміці (руйнуванні та утворенні) водневих зв'язків мали комплекси IVM та $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana* та

H. contortus (Додаток Ж, табл. 2). Для пояснення відмінностей у динаміці водневих зв'язків було зроблено аналіз та порівняння стійкості водневих зв'язків між IVM та залишками таксанового сайту. Стійкість кожного водневого зв'язку між IVM та амінокислотними залишками таксанового сайту $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* оцінювали по кількості фреймів, на яких водневий зв'язок вважався утвореним. Результати порівняння стійкості водневих зв'язків представлено на рис. 3.31.

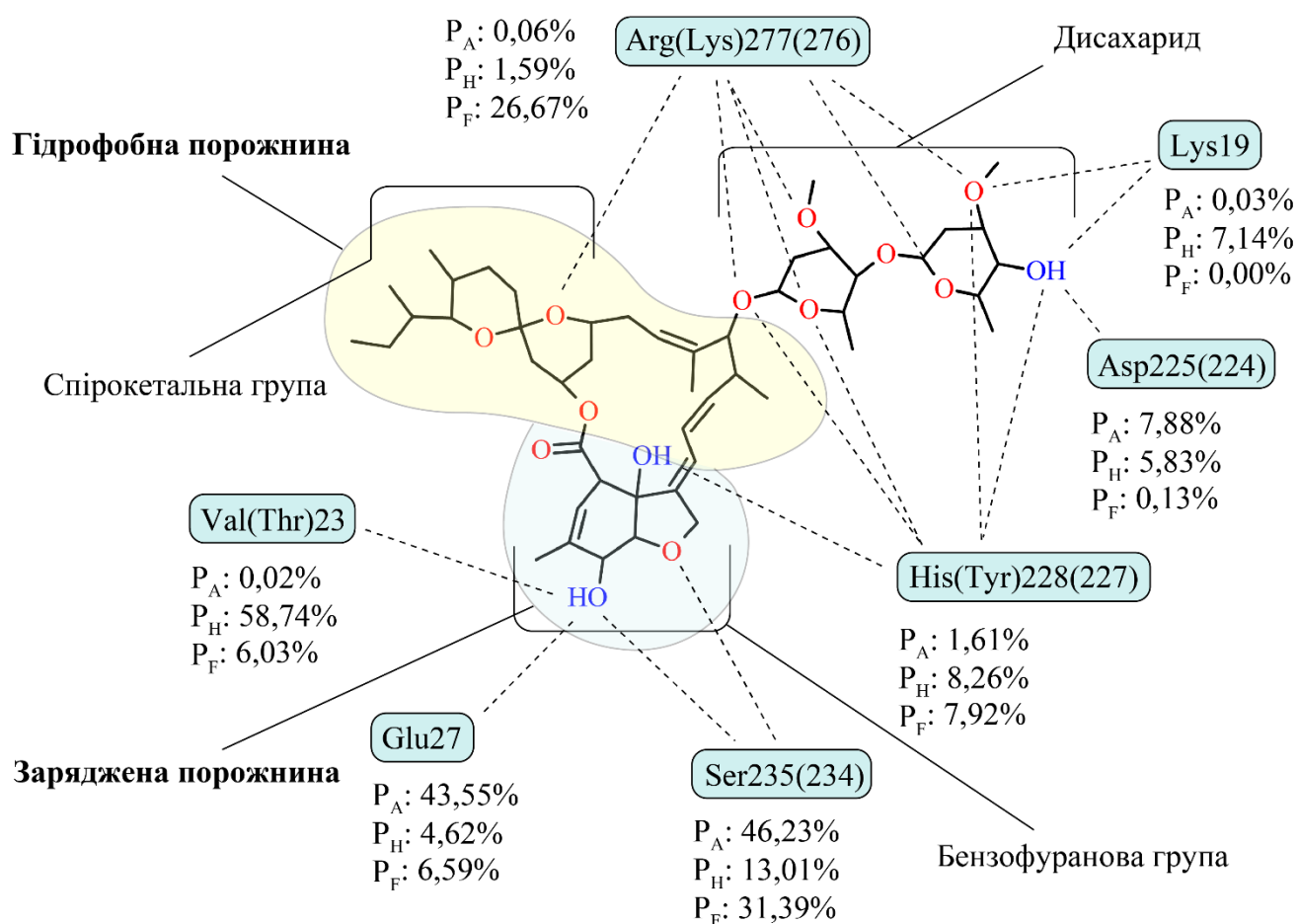


Рис. 3.31 Стійкі водневі зв'язки IVM з залишками $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana* (позначено P_A), *F. graminearum*/*F. oxysporum* (P_F) та *H. contortus* (P_H). На схемі відображено лише найстійкіші водневі зв'язки, характерні для більшості комплексів

Нами було встановлено, що внесок бензофуранової групи IVM у стабільність комплексів реалізується через водневі зв'язки та полярні контакти IVM з полярними та зарядженими групами залишків другої субпорожнини таксанового сайту. Зокрема, спостерігали утворення водневих зв'язків між атомами бензофуранової групи та Glu27 у **H1**, Ser235(234) та His(Tyr)228(227) у **H7**. Незважаючи на заміну Val на Thr у 23 положенні **H1** послідовності β 1-тубуліну *F. graminearum*/*F. oxysporum*, було встановлено наявність стійких водневих зв'язків з Thr23. Інша відмінність у послідовності β 1-тубуліну *F. graminearum*/*F. oxysporum* – Tyr замість His у 227 положенні **H7** – також не мала значного впливу на стійкість водневих зв'язків. На відміну від водневих зв'язків з бензофурановою групою, водневим зв'язкам з дисахаридом притаманна менша стійкість, але більша різноманітність. Це пояснюється фізико-хімічними властивостями дисахариду та положенням цієї функціональної групи. Рух дисахариду у просторі призводить до частого утворення та руйнування водневих зв'язків, а його взаємодії з розчинником дестабілізують комплекс. Також взаємодії дисахариду з Arg(Lys)277(276) у **M-петлі** мають вплив на конформаційні властивості цього структурного елементу. Прикладом є комплекс IVM з β 1-тубуліном *F. graminearum*/*F. oxysporum*, для якого характерна відносно висока стійкість водневого зв'язку між дисахаридом та Lys276 (наявний на 26.67% від загальної кількості фреймів). Значну стабільність також має водневий зв'язок з Lys19 у **H1** у траєкторії комплексу IVM з β 1-тубуліном *H. contortus*. Однак, аналогічний зв'язок має низьку стабільність у комплексі IVM з β 1-тубуліном *A. thaliana* та відсутній у комплексі IVM з β 1-тубуліном *F. graminearum*/*F. oxysporum*. Останнє можна пояснити тим, що послідовність β 1-тубуліну *F. graminearum*/*F. oxysporum* містить Ala замість Lys у 19 положенні послідовності. Зв'язок з Asp225(224) наявний на значній кількості фреймів траєкторій комплексів IVM та β 1-тубуліну *A. thaliana* та *H. contortus*, але відсутній у траєкторії комплексу IVM та β 1-тубуліну *F. graminearum*/*F. oxysporum*.

Отже, було встановлено, що водневі зв'язки бензофуранової групи з Val(Thr)23, Glu27 у **H1**, His(Tyr)228(227), Ser235(234) у **H7** β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* є найстійкішими водневими зв'язками, необхідними

для підтримання стабільності комплексів. Окрім наведених вище залишків, важливими є полярні та неполярні контакти IVM з Asp225(224) у **H7**, Arg(Lys)277(276) у **М-петлі**, Arg319(318) у **S8**, Thr(Arg)360(359) та Ile(Leu)362(361) у **S9-S10**.

У подальшому було здійснено кластерний аналіз конформацій таксанового сайту після зв'язування IVM та на підставі результатів аналізу відібрано найпоширеніші конформації комплексів IVM та β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum*, представлені на рис. 3.32.

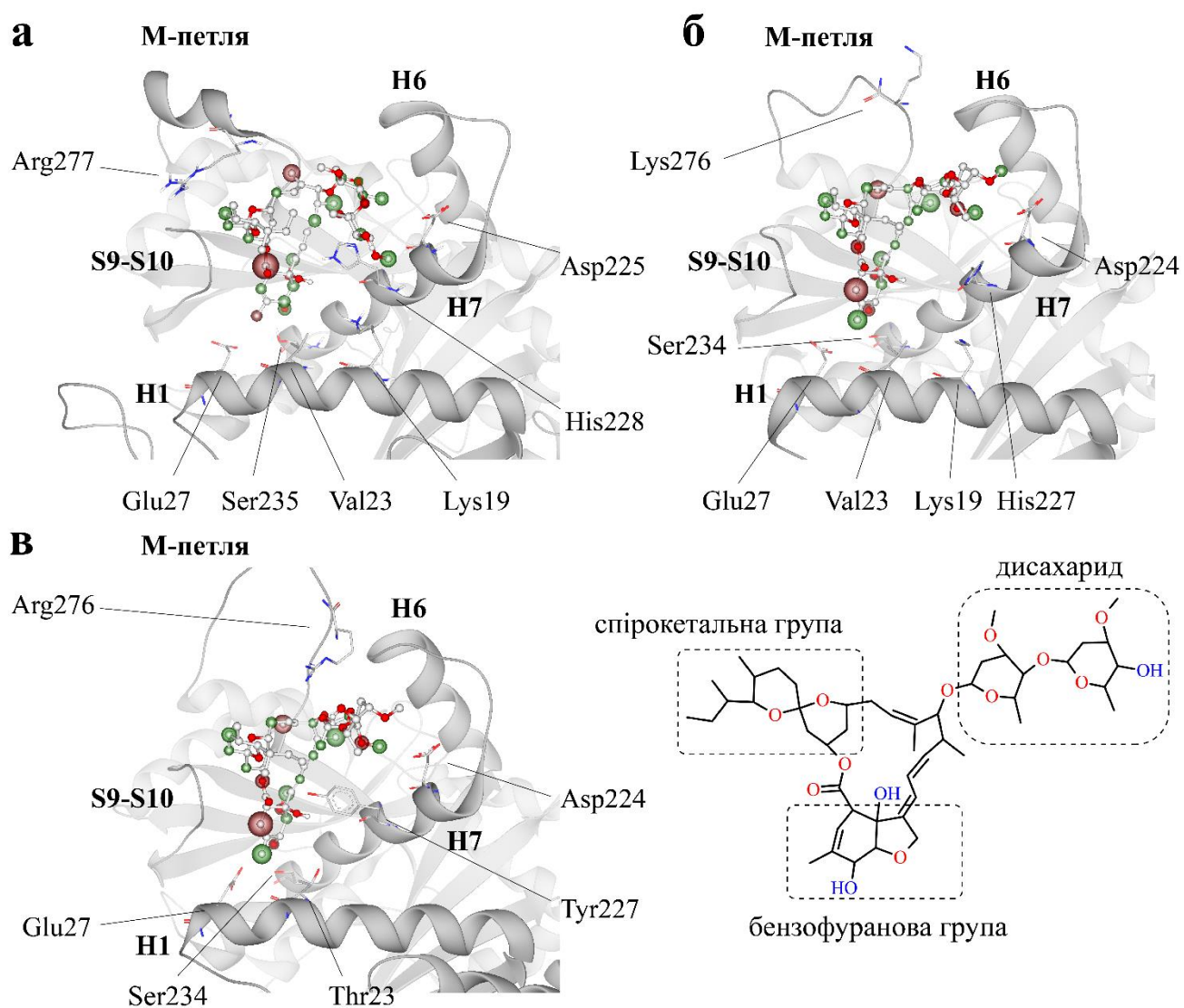


Рис. 3.32 Найпоширеніші конформації комплексів IVM та β 1-тубуліну *A. thaliana* (а), *H. contortus* (б) та *Fusarium* (*F. graminearum* та *F. oxysporum*) (в)

Загалом спостерігали суттєве зменшення у кількості ідентифікованих кластерів конформацій таксанового сайту у порівнянні з незв'язаним з IVM β 1-тубуліном *A. thaliana* ($8 < 22$), *H. contortus* ($41 < 61$) та *F. graminearum*/*F. oxysporum* ($52 < 75$). Це свідчить про те, що зв'язування IVM з таксановим сайтом змінює його конформаційний рух та, зокрема, спричиняє стабілізацію залишків сайту. У результаті аналізу комплексів у SeeSAR було розширено перелік залишків, з якими контактує бензофуранова група IVM: окрім Val(Thr)23, Glu27 у **H1**, Ser235(234), His(Tyr)228(227) у **H7**, до переліку входять також Asp(Gly)26, Ala(Val)232(231) у **H7**, Phe271(270) у **S7**, Arg319(318) у **S8**, Pro359(358), Thr(Arg)360(359) у **S9-S10**. Внесок у стабільність комплексів від контактів IVM з Phe271(270) у **S7** та Pro359(358) у **S9-S10** реалізується через десольвацію поверхні білка. Контакти з Leu361 у **S9-S10** спостерігали лише у комплексів IVM з β 1-тубуліном *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum*. Полярні контакти з Ser364 у **S9-S10** наявні лише у комплексу IVM та β 1-тубуліну *F. graminearum*/*F. oxysporum*, оскільки послідовності β 1-тубуліну *A. thaliana* та *H. contortus* містять Ala у положенні 364. Попри наявність естерної групи, спостерігали лише неполярні контакти гетеромакроциклічного кільця IVM з His(Tyr)228(227), Leu229(228) у **H7**, Phe271(270) у **S7**, Pro273(272), Leu274(273), Thr(Ser)275(274), Gln280(279) у **М-петлі**, Ile(Leu)362(361) у **S9-S10**. Подібно до гетеромакроциклічного кільця, спірокетальна група IVM має переважно неполярні контакти з Arg(Lys)277(276), Gln(Ala, Ser)281(280) у **М-петлі**, Thr(Arg)360(359) та Gly361(360) у **S9-S10**. Також спостерігали нестійкі водневі зв'язки спірокетальної групи з Arg(Lys)277(276), відображені на рис. 3.31. Дисахарид контактує з Cys212(211), Leu216(215), Leu218(217) у **H6**, Gly224(223), Asp225(224), His(Tyr)228(227), Leu229(228) у **H7**, Leu274(273), Ser(Ala)276(275), Arg(Lys)277(276) у **М-петлі**. Незважаючи на велику кількість і різноманіття контактів, через гнучкість та взаємодії з розчинником дисахарид дестабілізує комплекс.

Загалом стабільність комплексів забезпечують полярні контакти та водневі зв'язки бензофуранової групи з залишками другої порожнини таксанового сайту (**H1**, **H7**, **S8** та **S9-S10**), а також неполярні контакти гетеромакроциклічного кільця з залишками першої порожнини сайту, що утворюють такі структурні елементи

β -тубуліну як **H7**, **S7** та **M-петля**. Серед груп у складі гетеромакроцикла, що мають дестабілізуючий вплив в усіх комплексів, можна виокремити естерну групу та одну з метильних груп, позначених червоними сферами на рис. 3.32. Менший дестабілізуючий внесок мали атом кисню першого кільця спірокетальної групи та атоми дисахариду.

Також було детально проаналізовано та порівняно конформаційні властивості **M-петлі** у вільному та зв'язаному з IVM стані β 1-тубуліну. Зокрема, було порівняно головні компоненти конформаційного руху (PC), а також рухливість залишків на підставі змін у кількості кластерів та RMSF. Було встановлено відмінності часових рядів PC₁ **M-петлі** β 1-тубуліну у вільному та зв'язаному з IVM стані (Додаток Е, рис. 2 а, б). Це свідчить про те, що взаємодія IVM з β 1-тубуліном призвела до змін у конформаційному русі **M-петлі**. Найбільшу подібність PC₁ спостерігали у β 1-тубуліну *A. thaliana* та *H. contortus*, а найнижчу – у β 1-тубуліну *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* (Додаток Ж, табл. 1, табл. 2). Спостерігали значне зменшення кількості кластерів конформацій **M-петлі** у порівнянні з контролем (вільний стан β -тубуліну). Всього було ідентифіковано 40 (142 у контролі) кластерів **M-петлі** у траєкторії комплексу IVM та β 1-тубуліну *A. thaliana*, 102 (242) – у траєкторії комплексу IVM та β 1-тубуліну *H. contortus* та 133 (154) кластери – у траєкторії комплексу IVM та β 1-тубуліну *F. graminearum*/*F. oxysporum*. Також було встановлено, що взаємодія IVM з β 1-тубуліном призводить до зменшення RMSF залишків **M-петлі** [273(272)–286(285)] (Додаток Е, рис. 1 а, б). Зокрема, у β 1-тубуліну *A. thaliana* загальна рухливість **M-петлі** зменшилася з 1,65 нм до 0,59 нм; у β 1-тубуліну *H. contortus* – з 2,16 нм до 0,90 нм; у β 1-тубуліну *F. graminearum* та *F. oxysporum* – з 2,64 нм до 1,11 нм. У β 1-тубуліну всіх досліджених комплексів відбувалася стабілізація ділянки **M-петлі** з 281(280) по 286(285). Саме ця ділянка **M-петлі** стабілізується та спіралізується при зв'язуванні деяких стабілізуючих агентів з таксановим сайтом та контактує з **H1-S2** та **H2-S3** β -тубуліну прилеглого протофіламента [18].

Таким чином, у результаті *in silico* дослідження змодельовано та структурно охарактеризовано взаємодію IVM з β 1-тубуліном *A. thaliana*, *H. contortus*,

F. graminearum/*F. oxysporum*. Верифіковано стабільність комплексів, визначено та порівняно енергію зв'язування та амінокислотні залишки β 1-тубуліну, контакти з якими є найважливішими для підтримання стабільності комплексів. Спричинені зв'язуванням IVM з таксановим сайтом β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus*, *F. graminearum*/*F. oxysporum* зміни у конформаційному русі **М-петлі** β 1-тубуліну є характерними для деяких лігандів таксанового сайту [18], наприклад, таксолу, та свідчать про можливість стабілізуючого впливу IVM на МТ. Результати *in silico* дослідження узгоджуються з результатами, отриманими під час *in vitro* та *in vivo* досліджень. Зокрема, наслідком зв'язування IVM з β -тубуліном *A. thaliana* можуть бути порушення у організації МТ, які спостерігалися нами *in vivo* у клітинах зони кореневого апексу, меристематичної зони, перехідної зони та зони елонгації головного кореня *A. thaliana* у результаті експериментів за використання CLSM (підрозділ 3.2). На організмовому рівні наслідком спричинених IVM порушень у організації МТ є морфо-фізіологічні зміни проростків *A. thaliana* (підрозділ 3.1). Також, враховуючи результати моделювання, одним з можливих механізмів дії IVM у клітинах *F. graminearum*/*F. oxysporum* є його антимікротрубочкова дія, якою можна пояснити вплив IVM на колонії фітопатогенних штамів *F. graminearum* та *F. oxysporum* (підрозділ 3.3).

Матеріали цього розділу викладені у публікаціях:

Статті:

1. **Kustovskiy, Y.O.**; Karpov, P.A.; Blume, Y.B.; Yemets, A.I.; Ivermectin affects *Arabidopsis thaliana* microtubules through predicted binding site of β -tubulin. *Plant Physiol. Biochem.* **2024**, 206, 108296. DOI: [10.1016/j.plaphy.2023.108296](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.108296) (WoS/Scopus; **Q1**; IF -6.1).

2. **Kustovskiy, Y.O.**; Buziashvili, A.Y.; Ozheredov, S.P.; Blume, Y.B.; Yemets, A.I. β -Tubulin of *Fusarium* as a potential target for realization of the antifungal activity of ivermectin. *Cytol. Genet.* **2024**, 58, 1, 3–13. DOI: [10.3103/S009545272401002X](https://doi.org/10.3103/S009545272401002X) (WoS/Scopus; **Q3**; IF -0.5).

3. **Кустовський, Є.О.**; Ємець, А.І. Визначення патернів алостеричної взаємодії івермектину з глутаматзалежним хлоридним іонним каналом *Caenorhabditis elegans*. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* **2023**, 4, 84–92. DOI: [10.15407/dopovidi2023.04.076](https://doi.org/10.15407/dopovidi2023.04.076) (Категорія Б).

4. **Кустовський, Є.О.**; Бузіашвілі, А.Ю.; Ємець, А.І. Дослідження впливу івермектину на *Fusarium graminearum* та *F. oxysporum*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. **2022**, 30, 90–94 DOI: [10.7124/feeo.v30.1467](https://doi.org/10.7124/feeo.v30.1467) (Категорія Б).

Тези:

5. **Kustovskiy, Y.O.**; Yemets, A.I. Comparison of stability of ivermectin complexes with β 1-tubulin of *Arabidopsis thaliana*, *Haemonchus contortus*, *Fusarium graminearum*, and *Fusarium oxysporum*. *IV Conference for Young Scientists “PLANT BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY”*, Ukraine, Kyiv, 2024, May 16–18, 9.

6. **Kustovskiy, Y.O.**; Yemets, A.I. The search of structural patterns of ivermectin allosteric interaction with glutamate-gated chloride channel of *Caenorhabditis elegans*. *Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2023. Biotechnologia Acta*. Ukraine, Kyiv, 2023, May 26, 16, 2, 32–34. DOI: [10.15407/biotech16.02.032](https://doi.org/10.15407/biotech16.02.032).

7. **Кустовський, Є.О.**; Ємець А.І. Пошук потенційних сайтів зв'язування івермектину з β -тубуліном *Fusarium graminearum*. *Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології: матеріали VI Міжнародної наукової конференції*. Україна, Дніпро, 2022, 6–7 жовтня, 93–95.

8. **Кустовський, Є.О.** Розчинна здатність івермектину як важливий етап вивчення його механізму дії. *Хімія, біо- і нанотехнології, екологія та економіка в харчовій та косметичній промисловості: Збірник матеріалів IX міжнародної науково-практичної конференції*. Україна, Харків, 2021, 18–19 лист., 49–54.

РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дисертаційне дослідження присвячене вивченню особливостей взаємодії івермектину з $\beta 1$ -тубуліном *A. thaliana* та *F. graminearum*/*F. oxysporum*, спричинених IVM змін у структурно-просторовій організації МТ у живих клітинах головного кореня *A. thaliana*, а також у рості і розвитку проростків *A. thaliana* та колоній фітопатогенних нитчастих грибів *F. graminearum* та *F. oxysporum*. Необхідність проведення дослідження обумовлена відсутністю відомих мішеней та механізмів дії івермектину у клітинах *A. thaliana*, *F. graminearum* та *F. oxysporum*, а також потребою у нових ефективних засобах для протидії *F. graminearum* та *F. oxysporum* для підвищення стійкості рослин до грибних патогенів [15, 28, 115, 126].

Дослідження взаємодії IVM з тубуліном рослинного походження нами було виконано за використання дикого типу *A. thaliana* (Col-1) як загальноприйнятого модельного об'єкту, а також трансгенних ліній *A. thaliana* GFP-MAP4 та GFP-TUA6 для вивчення впливу IVM на структурно-просторову організацію МТ у живих клітинах [81, 84, 130]. Спочатку вивчили вплив IVM (50–500 мкг/мл) на ріст та розвиток проростків дикого типу *A. thaliana* та встановили, що за дії 50 та 100 мкг/мл IVM не спостерігали змін у ростових показниках та морфології проростків на 3-тю, 6-ту та 12-ту добу вирощування [72]. Водночас визначено, що 250 та 500 мкг/мл IVM негативно впливали на проростки *A. thaliana*. Зокрема, на 12-ту добу вирощування на середовищі з 250 мкг/мл IVM довжина проростків була меншою у 3,64 раза у порівнянні з контролем, а довжина коренів – у 4,07 раза. Відповідно довжина проростків *A. thaliana*, що росли на середовищі з 500 мкг/мл IVM, на 12-ту добу вирощування була меншою у 44,97 раза відносно контролю, а довжина коренів – у 33,59 раза. Морфологічними змінами коренів проростків *A. thaliana*, спричиненими IVM у концентрації 250 мкг/мл, були вкорочення зони елонгації, викривлення коренів, а також зміни у довжині та формі кореневих волосків. Зокрема, на 12-ту добу вирощування проростків *A. thaliana* на середовищі з 250 мкг/мл IVM спостерігали зменшення довжини кореневих волосків у 5,81 раза у порівнянні з контролем.

Оскільки МТ залучені до процесів росту та розвитку рослин [53], встановлені зміни у морфо-фізіологічних параметрах проростків *A. thaliana*, що росли на середовищі з 250 та 500 мкг/мл IVM, можна пояснити впливом IVM на МТ та їхню організацію у клітинах рослин *A. thaliana*. Тому було вивчено вплив 50–250 мкг/мл IVM на структурно-просторову організацію МТ у живих клітинах головного кореня проростків трансгенних ліній *A. thaliana* GFP-MAP4 та GFP-TUA6 за допомогою лазерної конфокальної мікроскопії. Виявлено зміни у організації МТ, які проявлялися за 250 мкг/мл IVM після 1 та 2 годин обробки проростків. Зміни внаслідок впливу 250 мкг/мл IVM спостерігали у клітинах кореневого апексу, меристематичної зони, перехідної зони та зони елонгації, а клітини зони диференціації виявилися нечутливими до дії 250 мкг/мл IVM. Через 1 годину обробки проростків 250 мкг/мл IVM спостерігали порушення у організації та орієнтаціях МТ: вкорочення МТ, виникнення пучків та циклічних побудов МТ, нехарактерних для клітин у контролі. Через 2 години обробки зазначені зміни посилювалися, а у епідермальних клітинах зони кореневого апексу, перехідної зони та зони елонгації подекуди відбувалося повне руйнування кортикальної сітки МТ. При цьому не спостерігали деполімеризації МТ попри те, що виникали циклічні побудови та пучки з МТ, – це свідчить про стабілізуючий вплив IVM на МТ та узгоджується з результатами попередніх досліджень з використанням тубуліну *H. contortus* та тубуліну ссавців [7–9].

Наступним етапом дисертаційного дослідження було вивчення впливу IVM на колонії фітопатогенних нитчастих грибів *F. graminearum* та *F. oxysporum* для оцінки його потенціалу як можливого фунгіциду. Для цього було визначено чутливість до IVM (0,05–3,0 мг/мл) фітопатогенних штамів *F. graminearum* (F-55644, F-55748, F-55756) та *F. oxysporum* (F-52897, F-54635, F-55547, *f. sp. lycopersici*) в умовах *in vitro*. Встановлено, що досліджувані штами *F. graminearum* та *F. oxysporum* є нечутливими до 0,05–1,0 мг/мл IVM. За дії 2 та 3 мг/мл IVM спостерігали зменшення площі колоній у порівнянні з контролем (середовище КДА). На 7-му добу вирощування під впливом 3 мг/мл IVM площа колоній найчутливіших штамів *F. graminearum* F-55748 та *F. oxysporum f. sp. lycopersici* в середньому становила $34 \pm 0,015\%$ та $40 \pm 0,013\%$ від площі у контролі, а площа колоній найменш чутливих штамів *F. graminearum* F-55644

та F-55756 – $67 \pm 0,021\%$ та $81 \pm 0,014\%$. Також внаслідок впливу IVM у деяких штамів спостерігали фізіологічні зміни, а саме: зменшення площі поверхневого міцелію (*F. graminearum* F-55756, *F. oxysporum* F-54635 та *f. sp. lycopersici*) та втрату міцелієм кольору (*F. graminearum* F-55644 та F-55756). Враховуючи роль МТ у рості та розвитку нитчастих грибів [127, 128, 147, 155], антимікротрубочковий механізм дії IVM є одним з можливих механізмів дії IVM у клітинах *F. graminearum* та *F. oxysporum*.

Раніше було продемонстровано стабілізуючий вплив IVM на МТ *H. contortus*, реалізований через його зв'язування з таксановим сайтом β -тубуліну цієї нематоди [7, 8]. Враховуючи це та консервативність амінокислотної послідовності таксанового сайту β -тубуліну, нами було передбачено взаємодію IVM з таксановим сайтом β 1-тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum* та *F. oxysporum* за допомогою методів *in silico*. Спочатку було змодельовано та порівняно послідовності β 1-тубуліну зазначених організмів. Зокрема, виявлено, що послідовності β 1-тубуліну *F. graminearum* та *F. oxysporum* є повністю ідентичними. Також встановлено, що послідовності β 1-тубуліну *A. thaliana* та β 1-тубуліну *H. contortus* мають 81% ідентичності, 91% подібності та 91% консервативності. Спорідненість послідовностей β 1-тубуліну *A. thaliana* з β 1-тубуліном *F. graminearum*/*F. oxysporum* була нижчою (78%; 90%; 88%), а послідовності β 1-тубуліну *H. contortus* та β 1-тубуліном *F. graminearum*/*F. oxysporum* були ідентичними на 80%, подібними на 92% та консервативними на 89%.

У подальшому було зібрано конформації β 1-тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*/*F. oxysporum* та *H. contortus* за допомогою молекулярно-динамічних симуляцій, проаналізовано властивості зібраних конформацій загалом та елементів структури у складі таксанового сайту (**H1, H6-H7, H7, S7, М-петля, S9-S10**). Зокрема, було визначено, що моделі β 1-тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*/*F. oxysporum* та *H. contortus* досягли рівноважного стану після 40 нс, а тому конформації у часовому інтервалі траєкторій з 40 по 100 нс використовували при подальшому аналізі. До ідентифікованих конформаційних станів таксанового сайту належать: об'єднаний стан сайту, який є оптимальним для проведення молекулярного докінгу IVM; стан

розділеної порожнини; закритий стан сайту; стан з лише однією відкритою субпорожниною. На підставі результатів аналізу було відібрано конформації β 1-тубуліну для молекулярного докінгу IVM до таксанового сайту β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *F. graminearum/F. oxysporum*.

На наступному етапі *in silico* дослідження за допомогою молекулярного докінгу було змодельовано комплекси IVM та β 1-тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum/F. oxysporum* та *H. contortus*. Далі було відібрано комплекси IVM та β 1-тубуліну для проведення молекулярно-динамічних симуляцій. Оцінки ChemPLP та ASP обраних комплексів становили: 74,50 та 28,03 у комплексу IVM та β 1-тубуліну *A. thaliana*; 63,50 та 25,73 у комплексу IVM та β 1-тубуліну *H. contortus*; 67,03 та 30,24 у комплексу IVM та β 1-тубуліну *F. graminearum/F. oxysporum*. Згідно оцінки за методом HYDE афінність IVM до β -тубуліну знаходилася у μ M–mM інтервалі. Також було визначено роль функціональних груп IVM у зв'язуванні з β -тубуліном та встановлено, що бензофуранова група відіграє головну роль у забезпеченні стабільності комплексів. Макроциклічне лактонне кільце та спірокетальна група роблять значний внесок у стабільність комплексу через переважно неполярні контакти з залишками таксанового сайту.

На заключному етапі *in silico* моделювання було проведено молекулярно-динамічні симуляції відібраних комплексів, проаналізовано траєкторії та перевірено, що комплекси IVM та β -тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum/F. oxysporum* та *H. contortus* є стабільними. Серед досліджених комплексів найменшу енергію зв'язування (ΔG_{bind}) та найбільшу стабільність мав комплекс IVM та β 1-тубуліну *A. thaliana* ($\Delta G_{\text{bind}} = -12,26 \pm 3,33$ ккал/моль), другим за стабільністю був комплекс IVM та β 1-тубуліну *F. graminearum/F. oxysporum* ($-11,30 \pm 5,20$ ккал/моль); найменш стабільним був комплекс IVM та β 1-тубуліну *H. contortus* ($-9,05 \pm 5,32$ ккал/моль). Також було встановлено, що найважливішими для підтримання стабільності комплексів були контакти IVM з Glu27 **H1**, Asp225(224), His(Tyr)228(227) **H7**, Arg(Lys)277(276) **M-петлі**, Arg319(318) **S8**, Thr(Arg)360(359) та Ile(Leu)362(361) **S9-S10**. Отримані нами результати *in silico* моделювання узгоджуються з результатами попередніх досліджень, здійснених Ashraf та колегами (2015) [7–9], а

також експериментів, закладених нами з використанням ліній *A. thaliana* GFP-MAP4 та GFP-TUA6.

Таким чином, результати дисертаційного дослідження можуть бути використані для подальшого вивчення взаємодії IVM з тубуліном інших еукаріотичних організмів, а також для пошуку та створення нових біологічно активних сполук з високою специфічністю до таксанового сайту β -тубуліну. Наприклад, потенційними агентами, стабілізуючими МТ, є споріднені за структурою до IVM молекули: абамектин (авермектин В1), селамектин, мілбеміцин, дорамектин, епріномектин тощо. Оскільки концентрації 250 та 500 мкг/мл, за яких IVM був токсичним для проростків *A. thaliana*, є значно вищими, ніж концентрації, за яких проявляється антипаразитарна активність IVM [82], актуальним є вивчення взаємодій IVM з β -тубуліном фітопатогенних нематод. Важливою є розробка та використання нових формуляцій IVM, які б дозволили зменшити його токсичність для рослин та інших нецільових організмів і посилити антигрибну активність IVM. Це потребує вивчення механізмів транспорту IVM у клітинах рослин та грибів, а також особливостей біотрансформації IVM цими організмами. Впровадженню для захисту рослин від патогенів препаратів на основі IVM повинна передувати розробка сталих стратегій застосування IVM, що потребує дослідження чутливості до нього сільськогосподарських рослин на різних стадіях розвитку.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі досліджено вплив івермектину (IVM) на *Arabidopsis thaliana* та фітопатогенні гриби *Fusarium graminearum* і *F. oxysporum*. Встановлено, що IVM викликає зміни в організації МТ живих клітин головного кореня *A. thaliana*, що призводить до затримки росту та розвитку *A. thaliana*, а також здатен пригнічувати ріст і розвиток *F. graminearum* та *F. oxysporum in vitro*. За допомогою методів *in silico* продемонстровано, що IVM зв'язується з таксановим сайтом $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana* та *F. graminearum/F. oxysporum* з утворенням стабільних комплексів. Встановлено роль функціональних груп IVM при зв'язуванні з $\beta 1$ -тубуліном, а також ідентифіковано амінокислотні залишки таксанового сайту, контакти IVM з якими мають найбільший енергетичний внесок у стабільність комплексів.

1. Встановлено, що серед досліджуваних концентрацій (0-500 мкг/мл) 250 та 500 мкг/мл IVM інгібують ріст та розвиток *in vitro* проростків *A. thaliana* у порівнянні з контролем. На 6-ту та 12-ту добу вирощування на середовищі з 250 та 500 мкг/мл IVM спостерігали зменшення довжини проростків *A. thaliana*, особливо їхніх коренів, а також деформацію коренів та кореневих волосків. Зокрема, на 6-ту добу вирощування довжина проростків на середовищі з 250 та 500 мкг/мл IVM становила 36,37% та 1,49% від контролю, а на 12-ту добу вирощування – 27,48% та 2,22% відповідно.

2. Показано, що 1- та 2-годинна обробка 250 мкг/мл IVM призводить до порушення організації та орієнтації МТ в живих клітин коренів трансгенних ліній *A. thaliana*, що експресують химерні гени *gfp-mar4* та *gfp-tua6*. Зокрема, спостерігали часткове руйнування кортикальної сітки МТ, вкорочення та об'єднання МТ у пучки.

3. Виявлено, що найбільш чутливими до дії 250 мкг/мл IVM були клітини зони кореневого апексу, меристематичної зони, перехідної зони та зони елонгації головного кореня проростків *A. thaliana*.

4. Встановлено, що інгібуючий вплив на ріст і розвиток *in vitro* колоній фітопатогенних штамів *F. graminearum* F-55644, F-55748, F-55756 та *F. oxysporum* F-52897, F-54635, F-55547, *f. sp. lycopersici* чинив IVM у концентраціях 2 та 3 мг/мл.

Найбільш чутливими до дії IVM виявилися штами *F. graminearum* F-55748 та *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, а найменш чутливими – штами *F. graminearum* F-55644 та F-55756.

5. Виявлено високу консервативність послідовностей β 1-тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*/*F. oxysporum* та *H. contortus* (позитивний контроль). Зокрема, послідовності β 1-тубуліну *A. thaliana* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* є консервативними на 88%, послідовності β 1-тубуліну *A. thaliana* та *H. contortus* – на 91%, а послідовності β 1-тубуліну *H. contortus* та *F. graminearum*/*F. oxysporum* – на 89%.

6. Серед структурних елементів таксанового сайту β 1-тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*/*F. oxysporum* та *H. contortus* найменше відмінностей у послідовностях спостерігали у **H1** та **H7**, а найбільше – у **H6-H7**, **М-петлі** та **S9-S10**. На зв'язування IVM з β 1-тубуліном вплинули відмінності амінокислотних залишків у положеннях 23, 26 у **H1**, 228(227), 232(231), 239(238) у **H7**, 277(276), 280(279) у **М-петлі**, 360(359), 362(361) у **S9-S10**.

7. Визначено, що оптимальним для зв'язування IVM конформаційним станом таксанового сайту β 1-тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*/*F. oxysporum* та *H. contortus* є стан, при якому перша (**H6**, **H6-H7**, **H7**, **S7** та **М-петлі**) та друга субпорожнини (**H1**, **H7**, **S8** та **S9-S10**) сайту об'єднуються в єдину порожнину. Серед можливих положень IVM у таксановому сайті β -тубуліну найвірогіднішим є положення, при якому макроциклічне кільце та спірокетальна група IVM знаходяться у першій субпорожнині сайту, а бензофуранова група – у другій субпорожнині.

8. Верифіковано стабільність комплексів IVM та β 1-тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*/*F. oxysporum* та *H. contortus*, енергія зв'язування IVM з якими становила $-12,26 \pm 3,33$ ккал/моль, $-11,30 \pm 5,20$ ккал/моль та $-9,05 \pm 5,32$ ккал/моль відповідно. Теоретично передбачені показники енергії зв'язування комплексів узгоджуються з концентраціями, за яких спостерігали дію IVM на проростки *A. thaliana* та колонії *F. graminearum* і *F. oxysporum* у *in vitro* та *in vivo* експериментах. Нижча енергія зв'язування у $-12,26 \pm 3,33$ ккал/моль комплексу IVM та β 1-тубуліну *A. thaliana* позитивно корелює з нижчою концентрацією у 250 мкг/мл, за якої IVM мав

вплив на ріст і розвиток проростків *A. thaliana* та організацію МТ у живих клітинах головного кореня *A. thaliana*. Вища енергія зв'язування комплексу IVM та β 1-тубуліну *F. graminearum*/*F. oxysporum* у $-11,30 \pm 5,20$ ккал/моль узгоджується з вищими концентраціями у 2 та 3 мг/мл, за яких спостерігали антигрибну активність IVM в умовах *in vitro*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Кустовський, Є.О.; Бузіашвілі, А.Ю.; Ємець, А.І. Дослідження впливу івермектину на *Fusarium graminearum* та *F. oxysporum*. Фактори експериментальної еволюції організмів. **2022**, 30, 90–94 DOI: [10.7124/feeo.v30.1467](https://doi.org/10.7124/feeo.v30.1467).
2. Кустовський, Є.О.; Ємець, А.І. Визначення патернів алостеричної взаємодії івермектину з глутаматзалежним хлоридним іонним каналом *Caenorhabditis elegans*. Допов. Нац. акад. наук Укр. **2023**, 4, 84–92. DOI: [10.15407/dopovidi2023.04.076](https://doi.org/10.15407/dopovidi2023.04.076).
3. Abraham, M.J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Pall, S.; Smith, J.C.; Hess, B.; Lindahl, E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. **2015**, 1–2, 19–25. DOI: [10.1016/j.softx.2015.06.001](https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001).
4. Aist, J.R.; Morris, N.R. Mitosis in filamentous fungi: how we got where we are. *Fungal Genet. Biol.* **1999**, 27, 1, 1–25. DOI: [10.1006/fgbi.1999.1146](https://doi.org/10.1006/fgbi.1999.1146).
5. Ali, I.; Yang, W.C. Why are ATP-driven microtubule minus-end directed motors critical to plants? An overview of plant multifunctional kinesins. *Funct. Plant Biol.* **2020**, 47, 6, 524–536. DOI: [10.1071/fp19177](https://doi.org/10.1071/fp19177).
6. Arias, M.; Cazapal-Monteiro, C.; Valderrábano, E.; Miguélez, S.; Rois, J. L.; López-Arellano, M.E.; de Carvalho L.M.; de Gives P.M.; Sánchez-Andrade R.; Paz-Silva A. A preliminary study of the biological control of strongyles affecting equids in a zoological park, *J. Equine Vet. Sci.* **2013**, 33, 12, 1115–1120. DOI: [10.1016/j.jevs.2013.04.013](https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.04.013).
7. Ashraf, S.; Beech, R.N.; Hancock, M.A.; Prichard, R.K. Ivermectin binds to *Haemonchus contortus* tubulins and promotes stability of microtubules. *Int. J. Parasitol.* **2015**, 45, 9-10, 647–654. DOI: [10.1016/j.ijpara.2015.03.010](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.03.010).
8. Ashraf, S.; Mani, T.; Beech, R.; Prichard, R. Macrocyclic lactones and their relationship to the SNPs related to benzimidazole resistance. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2015**, 201, 2, 128–134. DOI: [10.1016/j.molbiopara.2015.07.007](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.07.007).
9. Ashraf, S.; Prichard, R. Ivermectin exhibits potent anti-mitotic activity. *Vet. Parasitol.* **2016**, 226, 1–4. DOI: [10.1016/j.vetpar.2016.06.015](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.06.015).

10. Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibnsouda, S.K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: a review. *J. Pharm. Anal.* **2016**, *6*, 2, 71–79. DOI: [10.1016/j.jpha.2015.11.005](https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005).
11. Ban, X.; Lahiri, P.; Dhoble, A.S.; Li, D.; Gu, Z.; Li, C.; Cheng, L.; Hong, Y.; Li, Z.; Kaustubh, B. Evolutionary stability of salt bridges hints its contribution to stability of proteins. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2019**, *17*, 895–903. DOI: [10.1016/j.csbj.2019.06.022](https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.06.022).
12. Bar, J.; Popp, Y.; Bucher, M.; Mikhaylova, M. Direct and indirect effects of tubulin post-translational modifications on microtubule stability: insights and regulations. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* **2022**, *1869*, 6, 119241, 1–11. DOI: [10.1016/j.bbamcr.2022.119241](https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2022.119241).
13. Bondarenko, V.; Chen, Q.; Singewald, K.; Haloi, N.; Tillman, T.S.; Howard R.J.; Lindahl, E.; Xu, Y.; Tang, P. Structural elucidation of ivermectin binding to $\alpha 7$ nAChR and the induced channel desensitization. *ACS Chem. Neurosci.* **2023**, *14*, 6, 1156–1165. DOI: [10.1021/acscchemneuro.2c00783](https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.2c00783).
14. Buschmann, H.; Müller, S. Update on plant cytokinesis: rule and divide. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2019**, *52*, 97–105. DOI: [10.1016/j.pbi.2019.07.003](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.07.003).
15. Bernhoft, A.; Wang, J.; Leifert, C. Effect of organic and conventional cereal production methods on *Fusarium* head blight and mycotoxin contamination levels. *Agronomy*, **2022**, *12*, 797. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy12040797>.
16. Blume, Y.B.; Krasylenko, Y.A.; Demchuk, O.M.; Yemets, A.I. Tubulin tyrosine nitration regulates microtubule organization in plant cells. *Front. Plant. Sci.* **2013**, *4*, 530, 1–14 DOI: [10.3389/fpls.2013.00530](https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00530).
17. Blume, Y.; Yemets, A.; Sheremet, Y.; Nyporko, A.; Sulimenko, V.; Sulimenko, T.; Dráber P. Exposure of beta-tubulin regions defined by antibodies on an *Arabidopsis thaliana* microtubule protofilament model and in the cells. *BMC Plant Biol.* **2010**, *10*, 29, 1–10. DOI: [10.1186/1471-2229-10-29](https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-29).
18. Castro-Alvarez, A.; Pineda, O.; Vilarrasa, J. Further insight into the interactions of the cytotoxic macrolides laulimalide and peloruside A with their common binding site. *ACS Omega*. **2018**, *3*, 2, 1770–1782. DOI: [10.1021/acsomega.7b01723](https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01723).

19. Chen, I.S.; Tateyama, M.; Fukata, Y.; Uesugi, M.; Kubo, Y. Ivermectin activates GIRK channels in a PIP₂ -dependent, G_{βγ} -independent manner and an amino acid residue at the slide helix governs the activation. *J. Physiol.* **2017**, *595*, 17, 5895–5912. DOI: [10.1113/jp274871](https://doi.org/10.1113/jp274871).
20. Cleary, J.M.; Hancock, W.O. Molecular mechanisms underlying microtubule growth dynamics. *Curr. Biol.* **2021**, *31*, 10, 560–573. DOI: [10.1016/j.cub.2021.02.035](https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.02.035).
21. Crump, A.; Omura, S. Ivermectin, 'wonder drug' from Japan: the human use perspective. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **2011**, *87*, 2, 13–28. DOI: [10.2183/pjab.87.13](https://doi.org/10.2183/pjab.87.13).
22. Dahiya, P.; Bürstenbinder, K. The making of a ring: assembly and regulation of microtubule-associated proteins during preprophase band formation and division plane set-up. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2023**, *73*, 102366, 1–10. DOI: [10.1016/j.pbi.2023.102366](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2023.102366).
23. Debs, G.E.; Cha, M.; Liu, X.; Huehn, A.R.; Sindelar, C.V. Dynamic and asymmetric fluctuations in the microtubule wall captured by high-resolution cryoelectron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2020**, *117*, 29, 16976–16984. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2001546117>.
24. Dimander, S.O.; Höglund, J.; Waller, P.J. Disintegration of dung pats from cattle treated with the ivermectin anthelmintic bolus, or the biocontrol agent *Duddingtonia flagrans*. *Acta. Vet. Scand.* **2003**, *44*, 3–4, 171–180. DOI: [10.1186/1751-0147-44-171](https://doi.org/10.1186/1751-0147-44-171).
25. Du, J.; Lü, W.; Wu, S.; Cheng, Y.; Gouaux, E. Glycine receptor mechanism elucidated by electron cryo-microscopy. *Nature.* **2015**, *526*, 7572, 224–229. DOI: [10.1038/nature14853](https://doi.org/10.1038/nature14853).
26. Duveau, A.; Bertin, E.; Boué-Grabot, E. Implication of neuronal versus microglial P2X₄ receptors in central nervous system disorders. *Neurosci. Bull.* **2020**, *36*, 11, 1327–1343. DOI: [10.1007/s12264-020-00570-y](https://doi.org/10.1007/s12264-020-00570-y).
27. Edgar, R.C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics.* **2004**, *5*, 113. DOI: [10.1186/1471-2105-5-113](https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113).
28. Ekwomadu, T.I.; Akinola, S.A.; Mwanza, M. *Fusarium* mycotoxins, their metabolites (free, emerging, and masked), food safety concerns, and health impacts. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **2021**, *18*, 22, 11741, 1–18. DOI: [10.3390/ijerph182211741](https://doi.org/10.3390/ijerph182211741).

29. Eli, S.; Castagna, R.; Mapelli, M.; Parisini, E. Recent approaches to the identification of novel microtubule-targeting agents. *Front. Mol. Biosci.* **2022**, *9*, 841777, 1–9. DOI: [10.3389/fmolb.2022.841777](https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.841777).
30. Elliott, A.; Shaw, S.L. Update: plant cortical microtubule arrays. *Plant Physiol.* **2018**, *176*, 1, 94–105. DOI: [10.1104/pp.17.01329](https://doi.org/10.1104/pp.17.01329).
31. El-Maddawy, Z.K.; Abd El Naby, W.S.H. Effects of ivermectin and its combination with alpha lipoic acid on expression of IGFBP-3 and HSPA1 genes and male rat fertility. *Andrologia.* **2018**, *50*, 3. DOI: [10.1111/and.12891](https://doi.org/10.1111/and.12891).
32. Fang, C.T.; Kuo, H.H.; Amartuvshin, O.; Hsu, H.J.; Liu, S.L.; Yao, J.S.; Yih, L.H. Inhibition of acetyl-CoA carboxylase impaired tubulin palmitoylation and induced spindle abnormalities. *Cell Death Discov.* **2023**, *9*, 1, 1–12. DOI: [10.1038/s41420-023-01301-8](https://doi.org/10.1038/s41420-023-01301-8).
33. Feng, W.; Liu, R.; Xie, X.; Diao, L.; Gao, N.; Cheng, J.; Zhang, X.; Li, Y.; Bao, L. SUMOylation of α -tubulin is a novel modification regulating microtubule dynamics. *J. Mol. Cell Biol.* **2021**, *13*, 2, 91–103. DOI: [10.1093/jmcb/mjaa076](https://doi.org/10.1093/jmcb/mjaa076).
34. Farooq, M.; Ali, S.; Khan, M.; Jang, Y. H.; Kim, E. G.; Zhao, D. D.; Kim, K. M.; Investigating plant responses to microgravity and adaptations in gravisensitive environments. *Environ. Sci. Eur.* **2024**, *36*, 1. DOI: [10.1186/s12302-024-00851-7](https://doi.org/10.1186/s12302-024-00851-7).
35. Ferreira, G.F.; Freitas, T.M.; Gonçalves, C.L.; Mendes, J.F.; Vieira, J.N.; Villareal, J.P.; Nascente, P.S. Antiparasitic drugs: *in vitro* tests against nematophagous fungi. *Braz. J. Biol.* **2016**, *76*, 4, 990–993. DOI: [10.1590/1519-6984.05615](https://doi.org/10.1590/1519-6984.05615).
36. Field, J.J.; Pera, B.; Gallego, J.E.; Calvo, E.; Rodríguez-Salarichs, J.; Sáez-Calvo G, Zuwerra, D.; Jordi, M.; Andreu, J.M.; Prota, A.E.; Ménchon, G.; Miller, J.H.; Altmann, K.H.; Díaz, J.F. Zampanolide binding to tubulin indicates cross-talk of taxane site with colchicine and nucleotide sites. *J. Nat. Prod.* **2018**, *81*, 3, 494–505. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00704>.
37. Gardiner J. Posttranslational modification of plant microtubules. *Plant Signal. Behav.* **2019**, *14*, 10, e1654818, 1–6. DOI: [10.1080/15592324.2019.1654818](https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1654818).
38. Genova, M.; Grycova, L.; Puttrich, V.; Magiera, M.M.; Lansky, Z.; Janke, C.; Braun, M. Tubulin polyglutamylation differentially regulates microtubule-interacting proteins. *EMBO J.* **2023**, *42*, 5, e112101, 1–17. DOI: [10.15252/emboj.2022112101](https://doi.org/10.15252/emboj.2022112101).

39. Gerhard, A.P.; Krücken, J.; Neveu, C.; Charvet, C.L.; Harmache, A.; von Samson-Himmelstjerna, G. Pharyngeal pumping and tissue-specific transgenic P-glycoprotein expression influence macrocyclic lactone susceptibility in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmaceuticals (Basel)*. **2021**, *14*, 2, 153, 1–17. DOI: [10.3390/ph14020153](https://doi.org/10.3390/ph14020153).
40. Gibbs, E.; Klemm, E.; Seiferth, D.; Kumar, A.; Ilca, S.L.; Biggin, P.C.; Chakrapani, S. Conformational transitions and allosteric modulation in a heteromeric glycine receptor. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 1363, 1–15. DOI: [10.1038/s41467-023-37106-7](https://doi.org/10.1038/s41467-023-37106-7).
41. Gillan, V.; O'Neill, K.; Maitland, K.; Sverdrup, F.M.; Devaney, E. A repurposing strategy for Hsp90 inhibitors demonstrates their potency against filarial nematodes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, 2, 1–9. DOI: [10.1371/journal.pntd.0002699](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002699).
42. Gladfelter, A.S. Nuclear anarchy: asynchronous mitosis in multinucleated fungal hyphae. *Curr. Opin. Microbiol.* **2006**, *9*, 6, 547–552. DOI: [10.1016/j.mib.2006.09.002](https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.09.002).
43. Guan, P.; Shi, W.; Riemann, M.; Nick, P. Dissecting the membrane-microtubule sensor in grapevine defence. *Hortic. Res.* **2021**, *8*, 1, 260, 1–16. DOI: [10.1038/s41438-021-00703-y](https://doi.org/10.1038/s41438-021-00703-y).
44. Gu, Y.; Rasmussen, C.G. Cell biology of primary cell wall synthesis in plants. *Plant Cell*. **2022**, *34*, 1, 103–128. DOI: [10.1093/plcell/koab249](https://doi.org/10.1093/plcell/koab249).
45. Guyomar, C.; Bousquet, C.; Ku, S.; Heumann, J.M.; Guilloux, G.; Gaillard, N.; Heichette, C.; Duchesne, L.; Steinhilber, M.O.; Gibeaux, R.; Chrétien, D. Changes in seam number and location induce holes within microtubules assembled from porcine brain tubulin and in *Xenopus* egg cytoplasmic extracts. *Elife*. **2022**, *11*, e83021, 1–26. DOI: [10.7554/elife.83021](https://doi.org/10.7554/elife.83021).
46. Hao, L.; Guo, Y.; Wang, X.; Gao, M.; Liu, T.; Ma, Y.; Zhang, Y.; Li, Q.; Wang, R.; You, X. Preparation and application of biocontrol formulation of nematode-trapping fungus-*Duddingtonia flagrans*. *Vet. Parasitol.* **2024**, *327*, 110119, 1–7. DOI: [10.1016/j.vetpar.2024.110119](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2024.110119).
47. Hashiguchi, Y.; Tasaka, M.; Morita, M.T. Mechanism of higher plant gravity sensing. *Am. J. Bot.* **2013**, *100*, 1, 91–100. DOI: [10.3732/ajb.1200315](https://doi.org/10.3732/ajb.1200315).
48. Heiserman, J.P.; Nallanthighal, S.; Gifford, C.C.; Graham, K.; Samarakoon, R.; Gao, C.; Sage, J.J.; Zhang, W.; Higgins, P.J.; Cheon, D.-J. Heat shock protein 27, a novel

downstream target of collagen type XI alpha 1, synergizes with fatty acid oxidation to confer cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancers*. **2021**, *13*, 4855, 1–18. DOI: [10.3390/cancers13194855](https://doi.org/10.3390/cancers13194855).

49. Henkin, G.; Brito, C.; Thomas, C.; Surrey, T. The minus-end depolymerase KIF2A drives flux-like treadmilling of γ TuRC-uncapped microtubules. *J. Cell Biol.* **2023**, *222*, 10, 1–22. DOI: [10.1083/jcb.202304020](https://doi.org/10.1083/jcb.202304020).

50. Hibbs, R.E.; Gouaux, E. Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature*. **2011**, *474*, 7349, 54–60. DOI: [10.1038/nature10139](https://doi.org/10.1038/nature10139).

51. Hinzman, M.W.; Essex, M.E.; Park, C. Salt bridge as a gatekeeper against partial unfolding. *Protein Sci.* **2016**, *25*, 5, 999–1009. DOI: [10.1002/pro.2908](https://doi.org/10.1002/pro.2908).

52. Hornick, J.E.; Bader, J.R.; Tribble, E.K.; Trimble, K.; Breunig, J.S.; Halpin, E.S.; Vaughan, K.T.; Hinchcliffe, E.H. Live-cell analysis of mitotic spindle formation in taxol-treated cells. *Cell Motil. Cytoskeleton*. **2008**, *65*, 8, 595–613. DOI: [10.1002/cm.20283](https://doi.org/10.1002/cm.20283).

53. Hsiao, A.S.; Huang, J.Y. Microtubule regulation in plants: from morphological development to stress adaptation. *Biomolecules*. **2023**, *13*, 4, 627. DOI: [10.3390/biom13040627](https://doi.org/10.3390/biom13040627).

54. Huang, X.; Chen, H.; Shaffer, P.L. Crystal structures of human GlyR α 3 bound to ivermectin. *Structure*. **2017**, *25*, 6, 945–950. DOI: [10.1016/j.str.2017.04.007](https://doi.org/10.1016/j.str.2017.04.007).

55. Huang, J.; MacKerell, A.D. Jr. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *J. Comput. Chem.* **2013**, *34*, 25, 2135–2145. DOI: [10.1002/jcc.23354](https://doi.org/10.1002/jcc.23354).

56. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 1, 33–38, 27–28. DOI: [10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).

57. Hunter, B.; Benoit, M.P.M.H.; Asenjo, A.B.; Doubleday, C.; Trofimova, D.; Frazer, C.; Shoukat, I.; Sosa, H.; Allingham, J.S. Kinesin-8-specific loop-2 controls the dual activities of the motor domain according to tubulin protofilament shape. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 1, 4198, 1–19. DOI: [10.1038/s41467-022-31794-3](https://doi.org/10.1038/s41467-022-31794-3).

58. Iglesias L.E.; Saumell, C.; Sagüés, F.; Sallovitz, J.M.; Lifschitz, A.L. Ivermectin dissipation and movement from feces to soil under field conditions. *J. Environ. Sci. Health B*. **2018**, *53*, 1, 42–48. DOI: [10.1080/03601234.2017.1371554](https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1371554).

59. Ishikawa, C.; Senba, M.; Mori, N. Importin β 1 regulates cell growth and survival during adult T cell leukemia/lymphoma therapy. *Invest. New Drugs*. **2021**, *39*, 317–329. DOI: [10.1007/s10637-020-01007-z](https://doi.org/10.1007/s10637-020-01007-z).
60. Janke, C.; Magiera, M.M. The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 6, 307–326. DOI: [10.1038/s41580-020-0214-3](https://doi.org/10.1038/s41580-020-0214-3).
61. Jin L.; Feng X.; Rong H.; Pan Z.; Inaba Y.; Qiu L.; Zheng W.; Lin S.; Wang R.; Wang, Z.; Wang, S.; Liu, H.; Li, S.; Xie, W.; Li, Y. The antiparasitic drug ivermectin is a novel FXR ligand that regulates metabolism. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1937, 1–8. DOI: [10.1038/ncomms2924](https://doi.org/10.1038/ncomms2924).
62. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R.C.; Leach, A.R.; Taylor, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 3, 727–748. DOI: [10.1006/jmbi.1996.0897](https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897).
63. Jordão, R.; Campos, B.; Lemos, M.F.; Soares, A.M.; Tauler, R.; Barata, C. Induction of multixenobiotic defense mechanisms in resistant *Daphnia magna* clones as a general cellular response to stress. *Aquat. Toxicol.* **2016**, *175*, 132–143. DOI: [10.1016/j.aquatox.2016.03.015](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.03.015).
64. Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Žídek, A.; Potapenko, A.; Bridgland, A.; Meyer, C.; Kohl, S.A.A.; Ballard, A.J.; Cowie, A.; Romera-Paredes, B.; Nikolov, S.; Jain, R.; Adler, J.; Back, T.; Petersen, S.; Reiman, D.; Clancy, E.; Zielinski, M.; Steinegger, M.; Pacholska, M.; Berghammer, T.; Bodenstein, S.; Silver, D.; Vinyals, O.; Senior, A.W.; Kavukcuoglu, K.; Kohli, P.; Hassabis, D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. **2021**, *596*, 7873, 583–589. DOI: [10.1038/s41586-021-03819-2](https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2).
65. Karpov, P.A.; Han, H.; Chen, J.; Ozheredov, S.; Blume, Y.; Powles, S.; Yu, Q. Alpha tubulin mutations conferring resistance to dinitroaniline herbicides in *Lolium rigidum*: molecular and structural understanding. *SSRN*. **2025**. DOI: [10.2139/ssrn.5063696](https://doi.org/10.2139/ssrn.5063696) (accessed 2025-02-26).

66. Karpov, P.A.; Rayevsky, A.V.; Sheremet, Y.A.; Yemets, A.I.; Blume, Y. Structural biological characteristics of CK1-like protein kinase isotypes associated with regulation of plant microtubules. *Cytol. Genet.* **2020**, *54*, 293–304 DOI: [10.3103/S0095452720040052](https://doi.org/10.3103/S0095452720040052).
67. Kellogg, E.H.; Hejab, N.M.A.; Howes, S.; Northcote, P.; Miller, J.H.; Díaz, J.F.; Downing, K.H.; Nogales, E. Insights into the distinct mechanisms of action of taxane and non-taxane microtubule stabilizers from cryo-EM structures. *J. Mol. Biol.* **2017**, *429*, 5, 633–646. DOI: [10.1016/j.jmb.2017.01.001](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.01.001).
68. Kollmann, A.; Touton, I.; Brault, A.; Alvinerie M.; Galtier P.; Mougin, C. Effect of the endectocide ivermectin on filamentous fungi. *Environ. Chem. Lett.* **2003**, *1*, 215–218. DOI: [10.1007/s10311-003-0049-0](https://doi.org/10.1007/s10311-003-0049-0).
69. Korb, O.; Stützle, T.; Exner, T.E. Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 1, 84–96. DOI: [10.1021/ci800298z](https://doi.org/10.1021/ci800298z).
70. Kumar, A.; Basak, S.; Rao, S.; Gicheru, Y.; Mayer, M.L.; Sansom, M.S.P.; Chakrapani, S. Mechanisms of activation and desensitization of full-length glycine receptor in lipid nanodiscs. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1, 1–14. DOI: [10.1038/s41467-020-17364-5](https://doi.org/10.1038/s41467-020-17364-5).
71. Kustovskiy, Y.O.; Buziashvili, A.Y.; Ozheredov, S.P.; Blume, Y.B.; Yemets, A.I. β -Tubulin of *Fusarium* as a potential target for realization of the antifungal activity of ivermectin. *Cytol. Genetics.* **2024**, *58*, 1, 3–13. DOI: [10.3103/S009545272401002X](https://doi.org/10.3103/S009545272401002X).
72. Kustovskiy, Y.O.; Karpov, P.A.; Blume, Y.B.; Yemets, A.I.; Ivermectin affects *Arabidopsis thaliana* microtubules through predicted binding site of β -tubulin. *Plant Physiol. Biochem.* **2024**, *206*, 108296, 1–12. DOI: [10.1016/j.plaphy.2023.108296](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.108296).
73. Laber, L.; Eichberg, C.; Zimmerbeutel, A.; Düring, R.A.; Donath, T.W. Effects of macrocyclic lactone anthelmintics on seed germination of temperate grassland species. *Plant Biol (Stuttg).* **2023**, *25*, 7, 1046–1057. DOI: [10.1111/plb.13577](https://doi.org/10.1111/plb.13577).
74. Langhansová, L.; Navrátilová, M.; Skálová, L.; Mořková, K.; Podlipná, R. The effect of the manure from sheep treated with anthelmintics on clover (*Trifolium pratense*). *Agronomy*, **2021**, *11*, 1892, 1–14. DOI: [10.3390/agronomy11091892](https://doi.org/10.3390/agronomy11091892).
75. Lenz, K.D.; Klosterman, K.E.; Mukundan, H.; Kubicek-Sutherland, J.Z. Macrolides: from toxins to therapeutics. *Toxins*. **2021**, *13*, 347, 1–27. DOI: [10.3390/toxins13050347](https://doi.org/10.3390/toxins13050347).

76. Liu B.; Lee Y.J. Spindle assembly and mitosis in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2022**, *73*, 227–254. DOI: [10.1146/annurev-arplant-070721-084258](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-070721-084258).
77. Liu, J.; Zhang, K.; Cheng, L.; Zhu, H.; Xu, T. Progress in understanding the molecular mechanisms underlying the antitumour effects of ivermectin. *Drug. Des. Devel. Ther.* **2020**, *14*, 285–296. DOI: [10.2147/dddt.s237393](https://doi.org/10.2147/dddt.s237393).
78. Liu, X.; Yu, F. New insights into the functions and regulations of MAP215/MOR1 and katanin, two conserved microtubule-associated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Signal. Behav.* **2023**, *18*, 1, 2171360, 1–7. DOI: [10.1080/15592324.2023.2171360](https://doi.org/10.1080/15592324.2023.2171360).
79. Löscher, W. Is the antiparasitic drug ivermectin a suitable candidate for the treatment of epilepsy? *Epilepsia.* **2023**, *64*, 3, 553–566. DOI: [10.1111/epi.17511](https://doi.org/10.1111/epi.17511).
80. Lozano, J.; Cunha, E.; de Carvalho, L.M.; Paz-Silva, A.; Oliveira, M. First insights on the susceptibility of native coccidicidal fungi *Mucor circinelloides* and *Mucor lusitanicus* to different avian antiparasitic drugs. *BMC Vet. Res.* **2024**, *20*, 1, 1–10. DOI: [10.1186/s12917-024-03909-z](https://doi.org/10.1186/s12917-024-03909-z).
81. Marc, J.; Granger, C.L.; Brincat, J.; Fisher, D.D.; Kao, Th.; McCubbin, A.G.; Cyr, R.J. A GFP-MAP4 reporter gene for visualizing cortical microtubule rearrangements in living epidermal cells. *Plant Cell.* **1998**, *10*, 11, 1927–1940. DOI: [10.1105/tpc.10.11.1927](https://doi.org/10.1105/tpc.10.11.1927).
82. Martin, R.J.; Robertson, A.P.; Choudhary, S. Ivermectin: an anthelmintic, an insecticide, and much more. *Trends. Parasitol.* **2021**, *37*, 1, 48–64. DOI: [10.1016/j.pt.2020.10.005](https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.10.005).
83. Mastrangelo, E.; Pezzullo, M.; De Burghgraeve, T.; Kaptein, S.; Pastorino, B.; Dallmeier, K.; de Lamballerie, X.; Neyts J.; Hanson, A.M.; Frick, D.N.; Bolognesi, M.; Milani, M. Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: new prospects for an old drug. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 8, 1884–1894. DOI: [10.1093/jac/dks147](https://doi.org/10.1093/jac/dks147).
84. Mathur, J.; Chua, N.H.. Microtubule stabilization leads to growth reorientation in *Arabidopsis* trichomes. *Plant Cell.* **2000**, *12*, 4, 465–477. DOI: [10.1105/tpc.12.4.465](https://doi.org/10.1105/tpc.12.4.465).
85. Matthew, S.; Chen, Q.Y.; Ratnayake, R.; Fermaintt, C.S.; Lucena-Agell, D.; Bonato, F.; Prota, A.E.; Lim, S.T.; Wang, X.; Díaz, J.F.; Risinger, A.L.; Paul, V.J.; Oliva, M.Á.; Luesch, H. Gatorbulin-1, a distinct cyclodepsipeptide chemotype, targets a seventh tubulin

pharmacological site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2021**, *118*, 9, e2021847118, 1–11. DOI: [10.1073/pnas.2021847118](https://doi.org/10.1073/pnas.2021847118).

86. McLoughlin, E.C.; O'Boyle, N.M. Colchicine-binding site inhibitors from chemistry to clinic: a review. *pharmaceuticals (basel)*. **2020**, *13*, 1, 8. DOI: [10.3390/ph13010008](https://doi.org/10.3390/ph13010008).

87. Menchon, G.; Prota, A.E.; Lucena-Agell, D.; Bucher, P.; Jansen, R.; Irschik, H.; Müller, R.; Paterson, I.; Díaz, J.F.; Altmann, K.H.; Steinmetz, M.O. A fluorescence anisotropy assay to discover and characterize ligands targeting the maytansine site of tubulin. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1, 2106, 1–9. DOI: [10.1038/s41467-018-04535-8](https://doi.org/10.1038/s41467-018-04535-8).

88. Momany, M.; Talbot, N.J. Septins focus cellular growth for host infection by pathogenic fungi. *Front. Cell. Dev. Biol.* **2017**, *5*, 33, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00033>.

89. Mooij, W.T.; Verdonk, M.L. General and targeted statistical potentials for protein-ligand interactions. *Proteins*. **2005**, *61*, 2, 272–287. DOI: [10.1002/prot.20588](https://doi.org/10.1002/prot.20588).

90. Mühlethaler, T.; Gioia, D.; Prota, A.E.; Sharpe, M.E.; Cavalli, A.; Steinmetz, M.O. Comprehensive analysis of binding sites in tubulin. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2021**, *60*, 24, 13331–13342. DOI: [10.1002/anie.202100273](https://doi.org/10.1002/anie.202100273).

91. Mukherjee, R.; Majumder, P.; Chakrabarti, O. MGRN1-mediated ubiquitination of α -tubulin regulates microtubule dynamics and intracellular transport. *Traffic*. **2017**, *18*, 12, 791–807. DOI: [10.1111/tra.12527](https://doi.org/10.1111/tra.12527).

92. Nakatani, Y.; Furutani S.; Ihara, M.; Matsuda, K. Ivermectin modulation of pH-sensitive chloride channels in the silkworm larvae of *Bombyx mori*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2016**, *126*, 1–5. DOI: [10.1016/j.pestbp.2015.08.004](https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.08.004).

93. Nappi, L.; Aguda, A.H.; Nakouzi, N.A.; Lelj-Garolla, B.; Beraldi, E.; Lallous, N.; Thi M.; Moore, S.; Fazli, L.; Battsogt, D.; Stief, S.; Ban, F.; Nguyen, N.T.; Saxena, N.; Dueva, E.; Zhang, F.; Yamazaki, T.; Zoubeydi, A.; Cherkasov, A.; Brayer, G.D.; Gleave, M. Ivermectin inhibits HSP27 and potentiates efficacy of oncogene targeting in tumor models. *J. Clin. Invest.* **2020**, *130*, 2, 699–714. DOI: [10.1172/jci130819](https://doi.org/10.1172/jci130819).

94. Navrátilová, M.; Raisová Stuchlíková, L.; Szotáková, B.; Skálová, L.; Langhansová, L.; Podlipná, R. The uptake of ivermectin and its effects in roots, leaves and seeds of soybean (*Glycine max*). *Molecules*. **2020**, *25*, 3655, 1–10. DOI: [10.3390/molecules25163655](https://doi.org/10.3390/molecules25163655).

95. Navrátilová, M.; Raisová Stuchlíková, L.; Skálová, L.; Szotáková, B.; Langhansová, L.; Podlipná, R. Pharmaceuticals in environment: the effect of ivermectin on ribwort plantain (*Plantago lanceolata* L.). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2020**, *27*, 25, 31202–31210. [10.1007/s11356-020-09442-4](https://doi.org/10.1007/s11356-020-09442-4).
96. Nisius, B.; Sha, F.; Gohlke, H. Structure-based computational analysis of protein binding sites for function and druggability prediction. *J. Biotechnol.* **2012**, *159*, 3, 123–134. DOI: [10.1016/j.jbiotec.2011.12.005](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.12.005).
97. Nsamba, E.T.; Gupta, M.L. Tubulin isotypes - functional insights from model organisms. *J. Cell Sci.* **2022**, *135*, 9, 1–14. DOI: [10.1242/jcs.259539](https://doi.org/10.1242/jcs.259539).
98. Nyporko, A.Yu.; Yemets, A.I.; Brytsun, V.N.; Lozinsky M.O.; Blume Ya. B. Structural-biological characteristics of tubulin interaction with dinitroanilines. *Cytol. Genet.* **2009**, *43*, 4, 56–70. DOI: [10.3103/S0095452709040082](https://doi.org/10.3103/S0095452709040082).
99. Nyporko, A.Yu.; Blume Ya. B. Structural mechanisms of interaction of cyanoacrylates with plant tubulin. *Cytol. Genet.* **2014**, *48*, 1, 10–17. DOI: [10.3103/S009545271401006X](https://doi.org/10.3103/S009545271401006X).
100. Oda, Y. Cortical microtubule rearrangements and cell wall patterning. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 236. DOI: [10.3389/fpls.2015.00236](https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00236).
101. Orr, R.G.; Cheng, X.; Vidali, L.; Bezanilla, M. Orchestrating cell morphology from the inside out - using polarized cell expansion in plants as a model. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2020**, *62*, 46–53. DOI: [10.1016/j.ceb.2019.08.004](https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.08.004).
102. Pace, C.N.; Fu, H.; Lee Fryar, K.; Landua, J.; Trevino, S.R.; Schell, D.; Thurlkill, R.L.; Imura, S.; Scholtz, J.M.; Gajiwala, K.; Sevcik, J.; Urbanikova, L.; Myers, J.K.; Takano, K.; Hebert, E.J.; Shirley, B.A.; Grimsley, G.R. Contribution of hydrogen bonds to protein stability. *Protein Sci.* **2014**, *23*, 5, 652–661. DOI: [10.1002/pro.2449](https://doi.org/10.1002/pro.2449).
103. Prota, A.E.; Bargsten, K.; Northcote, P.T.; Marsh, M.; Altmann, K.H.; Miller, J.H.; Díaz, J.F.; Steinmetz, M.O. Structural basis of microtubule stabilization by laulimalide and peloruside A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 6, 1621–1625. DOI: [10.1002/anie.201307749](https://doi.org/10.1002/anie.201307749).
104. Prota, A.E.; Lucena-Agell, D.; Ma, Y.; Estevez-Gallego, J.; Li, S.; Bargsten, K.; Josa-Prado, F.; Altmann, K.H.; Gaillard, N.; Kamimura, S.; Mühlethaler, T.; Gago, F.; Oliva,

- M.A.; Steinmetz, M.O.; Fang, W.S.; Díaz, J.F. Structural insight into the stabilization of microtubules by taxanes. *Elife*. **2023**, *12*, e84791, 1–35. DOI: [10.7554/elife.84791](https://doi.org/10.7554/elife.84791).
105. Prota, A.E.; Setter, J.; Waight, A.B.; Bargsten, K.; Murga, J.; Diaz, J.F.; Steinmetz, M.O. Pironetin binds covalently to α Cys316 and perturbs a major loop and helix of α -tubulin to inhibit microtubule formation. *J. Mol. Biol.* **2016**, *428*, 15, 2981–2988. DOI: [10.1016/j.jmb.2016.06.023](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.06.023).
106. Qi, P.F.; Zhang, Y.Z.; Liu, C.H.; Zhu, J.; Chen, Q.; Guo, Z.R.; Wang, Y.; Xu, B.J.; Zheng, T.; Jiang, Y.F.; Wang, J.P.; Zhou, C.Y.; Feng, X.; Kong, L.; Lan, X.J.; Jiang, Q.T.; Wei, Y.M.; Zheng, Y.L. *Fusarium graminearum* ATP-binding cassette transporter gene *FgABCC9* is required for its transportation of salicylic acid, fungicide resistance, mycelial growth and pathogenicity towards wheat. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 8, 2351, 1–15. DOI: [10.3390/ijms19082351](https://doi.org/10.3390/ijms19082351).
107. Rayevsky, A.V.; Sharifi, M.; Samofalova, D.A.; Karpov, P.A.; Blume, Y.B. Structural and functional features of lysine acetylation of plant and animal tubulins. *Cell Biol Int.* **2019**, *43*, 9, 1040–1048. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbin.10887>.
108. Rendic, S.P. Metabolism and interactions of ivermectin with human cytochrome P450 enzymes and drug transporters, possible adverse and toxic effects. *Arch. Toxicol.* **2021**, *95*, 1535–1546. DOI: [10.1007/s00204-021-03025-z](https://doi.org/10.1007/s00204-021-03025-z).
109. Rizzo, E. Ivermectin, antiviral properties and COVID-19: a possible new mechanism of action. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2020**, *393*, 7, 1153–1156. DOI: [10.1007/s00210-020-01902-5](https://doi.org/10.1007/s00210-020-01902-5).
110. Roll-Mecak, A. How cells exploit tubulin diversity to build functional cellular microtubule mosaics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2019**, *56*, 102–108. DOI: [10.1016/j.ceb.2018.10.009](https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.10.009).
111. Ruan, Y.; Wasteney, G.O. CLASP: a microtubule-based integrator of the hormone-mediated transitions from cell division to elongation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2014**, *22*, 149–158. DOI: [10.1016/j.pbi.2014.11.003](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.11.003).
112. Rüttnick, D.; Schiebel, E. Duplication and nuclear envelope insertion of the yeast microtubule organizing centre, the spindle pole body. *Cells*. **2018**, *7*, 5, 42, 1–14. DOI: [10.3390/cells7050042](https://doi.org/10.3390/cells7050042).

113. Sáez-Calvo, G.; Sharma, A.; Balaguer, F.A.; Barasoain, I.; Rodríguez-Salarichs, J.; Olieric, N.; Muñoz-Hernández, H.; Berbís, M.Á.; Wendeborn, S.; Peñalva, M.A.; Matesanz, R.; Canales, Á.; Protá, A.E.; Jiménez-Barbero, J.; Andreu, J.M.; Lamberth, C.; Steinmetz, M.O.; Díaz, J.F. Triazolopyrimidines are microtubule-stabilizing agents that bind the vinca inhibitor site of tubulin. *Cell Chem. Biol.* **2017**, *24*, 6, 737–750. DOI: [10.1016/j.chembiol.2017.05.016](https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.05.016).
114. Salvi, E.; Di Mambro, R.; Sabatini, S. Dissecting mechanisms in root growth from the transition zone perspective. *J. Exp. Bot.* **2020**, *71*, 8, 2390–2396. DOI: [10.1093/jxb/eraa079](https://doi.org/10.1093/jxb/eraa079).
115. Sampaio, A.M.; Araújo, S.d.S.; Rubiales, D.; Vaz Patto, M.C. Fusarium Wilt Management in Legume Crops. *Agronomy* **2020**, *10*, 1073. DOI: [10.3390/agronomy10081073](https://doi.org/10.3390/agronomy10081073).
116. Sanyal, C.; Pietsch, N.; Ramirez Rios, S.; Peris, L.; Carrier, L.; Moutin, M.J. The de-tyrosination/re-tyrosination cycle of tubulin and its role and dysfunction in neurons and cardiomyocytes. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2023**, *137*, 46–62. DOI: [10.1016/j.semcdb.2021.12.006](https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.12.006).
117. Shevchenko, G.V.; Krutovsky, K.V. Mechanical stress effects on transcriptional regulation of genes encoding microtubule- and actin-associated proteins. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* **2022**, *28*, 1, 17–30. DOI: [10.1007/s12298-021-01123-x](https://doi.org/10.1007/s12298-021-01123-x).
118. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid B.; Tinevez, J.Y.; White, D.J.; Hartenstein, V.; Eliceiri, K.; Tomancak, P.; Cardona, A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods.* **2012**, *9*, 7, 676–682. DOI: [10.1038/nmeth.2019](https://doi.org/10.1038/nmeth.2019).
119. Schneider, N.; Lange, G.; Hindle, S.; Klein, R.; Rarey, M. A consistent description of HYdrogen bond and DEhydration energies in protein-ligand complexes: methods behind the HYDE scoring function. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2013**, *27*, 1, 15–29. DOI: [10.1007/s10822-012-9626-2](https://doi.org/10.1007/s10822-012-9626-2).
120. Sen Gupta P.S.; Biswal, S.; Panda, S.K.; Ray, A.K.; Rana, M.K. Binding mechanism and structural insights into the identified protein target of COVID-19 and importin- α with *in-vitro* effective drug ivermectin. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2022**, *40*, 5, 2217–2226. DOI: [10.1080/07391102.2020.1839564](https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1839564).

121. Sinclair, R.; Wang, M.; Jawaid, M.Z.; Longkumer, T.; Aaron, J.; Rossetti, B.; Wait, E.; McDonald, K.; Cox, D.; Heddleston, J.; Wilkop, T.; Drakakaki, G. Four-dimensional quantitative analysis of cell plate development in *Arabidopsis* using lattice light sheet microscopy identifies robust transition points between growth phases. *J. Exp. Bot.* **2024**, *75*, 10, 2829–2847. DOI: [10.1093/jxb/erae091](https://doi.org/10.1093/jxb/erae091).
122. Sharun, K.; Shyamkumar, T.S.; Aneesha, V.A.; Dhama, K.; Pawde, A.M.; Pal, A. Current therapeutic applications and pharmacokinetic modulations of ivermectin. *Vet. World.* **2019**, *12*, 8, 1204–1211. DOI: [10.14202/vetworld.2019.1204-1211](https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1204-1211).
123. Sinha J.; Singh Y.; Verma P.K. Cytoskeleton remodeling: a central player in plant-fungus interactions. *J. Exp. Bot.* **2024**, *75*, 11, 3269–3286. DOI: [10.1093/jxb/erae133](https://doi.org/10.1093/jxb/erae133).
124. Smertenko, A.; Hewitt, S.L.; Jacques, C.N.; Kacprzyk, R.; Liu, Y.; Marcec, M.J.; Moyo, L.; Ogden, A.; Oung, H.M.; Schmidt, S.; Serrano-Romero, E.A. Phragmoplast microtubule dynamics - a game of zones. *J. Cell Sci.* **2018**, *131*, 2, jcs203331, 1–11. DOI: [10.1242/jcs.203331](https://doi.org/10.1242/jcs.203331).
125. Struk, S.; Dhonukshe, P. MAPs: cellular navigators for microtubule array orientations in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* **2014**, *33*, 1, 1–21. DOI: [10.1007/s00299-013-1486-2](https://doi.org/10.1007/s00299-013-1486-2).
126. Syslová, E; Landa, P.; Navrátilová, M.; Stuchlíková, L.R.; Matoušková, P.; Skálová L.; Szotáková, B.; Vaněk, T.; Podlipná, R. Ivermectin biotransformation and impact on transcriptome in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere.* **2019**, *234*, 528–535. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2019.06.102](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.102).
127. Takeshita, N.; Fischer, R. On the role of microtubules, cell end markers, and septal microtubule organizing centres on site selection for polar growth in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biol.* **2011**, *115*, 6, 506–517. DOI: [10.1016/j.funbio.2011.02.009](https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.02.009).
128. Takeshita, N.; Manck, R.; Grün, N.; de Vega, S.H.; Fischer, R. Interdependence of the actin and the microtubule cytoskeleton during fungal growth. *Curr. Opin. Microbiol.* **2014**, *20*, 34–41. DOI: [10.1016/j.mib.2014.04.005](https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.04.005).
129. Tang, M.; Hu, X.; Wang, Y.; Yao, X.; Zhang, W.; Yu, C.; Cheng, F.; Li, J.; Fang, Q. Ivermectin, a potential anticancer drug derived from an antiparasitic drug. *Pharmacol. Res.* **2021**, *163*, 105207, 1–11. DOI: [10.1016/j.phrs.2020.105207](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105207).

130. Ueda K.; Matsuyama T.; Hashimoto T. Visualization of microtubules in living cells of transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma*. **1999**, 206, 201–206. DOI: [10.1007/BF01279267](https://doi.org/10.1007/BF01279267).
131. Valdar, W.S. Scoring residue conservation. *Proteins*. **2002**, 48, 2, 227–241. DOI: [10.1002/prot.10146](https://doi.org/10.1002/prot.10146).
132. Valdés-Tresanko, M.S.; Valdés-Tresanko, M.E.; Valiente P.A.; Moreno, E. gmx_MMPBSA: a new tool to perform end-state free energy calculations with GROMACS. *J. Chem. Theory Comput.* **2021**, 17, 10, 6281–6291. DOI: doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00645.
133. Vavrdova, T.; Samaj, J.; Komis, G. Phosphorylation of plant microtubule-associated proteins during cell division. *Front. Plant Sci.* **2019**, 10, 238. DOI: [10.3389/fpls.2019.00238](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00238).
134. Villada-Bedoya, S.; Chávez-Ríos, J.R.; Montoya, B.; Castelán, F.; Córdoba-Aguilar, A.; Escobar, F., González-Tokman, D. Heat shock proteins and antioxidants as mechanisms of response to ivermectin in the dung beetle *Euoniticellus intermedius*. *Chemosphere*. **2021**, 269, 128707, 1–10. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2020.128707](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128707).
135. Vokřál, I.; Michaela, Š.; Radka, P.; Jiří, L.; Lukáš, P.; Dominika, S.; Kateřina, L.; Barbora, S.; Lenka, S. Ivermectin environmental impact: excretion profile in sheep and phytotoxic effect in *Sinapis alba*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, 169, 944–949. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2018.11.097](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.097).
136. Volkamer, A.; Griewel, A.; Grombacher, T.; Rarey, M. Analyzing the topology of active sites: on the prediction of pockets and subpockets. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, 50, 11, 2041–2052. DOI: [10.1021/ci100241y](https://doi.org/10.1021/ci100241y).
137. Volkamer, A.; Kuhn, D.; Grombacher, T.; Rippmann, F.; Rarey, M. Combining global and local measures for structure-based druggability predictions. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, 52, 2, 360–372. DOI: [10.1021/ci200454v](https://doi.org/10.1021/ci200454v).
138. Vujanovic, V.; Daida, M.A.; Daida, P. qPCR assessment of aurofusarin gene expression in mycotoxigenic *Fusarium* species challenged with mycoparasitic and chemical control agents. *Biological Control*. **2017**, 109, 51–57. DOI: [10.1016/j.biocontrol.2017.03.010](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.03.010).

139. Wall, K.P.; Hart, H.; Lee, T.; Page, C.; Hawkins, T.L.; Hough, L.E. C-terminal tail polyglycylation and polyglutamylation alter microtubule mechanical properties. *Biophys. J.* **2020**, *119*, 11, 2219–2230. DOI: [10.1016/j.bpj.2020.09.040](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.09.040).
140. Walunj, S.B.; Wang, C.; Wagstaff, K.M.; Patankar, S.; Jans, D.A. Conservation of importin α function in apicomplexans: ivermectin and GW5074 target *Plasmodium falciparum* importin α and inhibit parasite growth in culture. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 13899, 1–12. DOI: [10.3390/ijms232213899](https://doi.org/10.3390/ijms232213899).
141. Wang, Y.; Benz, F.W.; Wu, Y.; Wang, Q.; Chen, Y.; Chen, X.; Li, H.; Zhang, Y.; Zhang, R.; Yang, J. Structural insights into the pharmacophore of vinca domain inhibitors of microtubules. *Mol. Pharmacol.* **2016**, *89*, 2, 233–242. DOI: [10.1124/mol.115.100149](https://doi.org/10.1124/mol.115.100149).
142. Wang, X.; Gigant, B.; Zheng, X.; Chen, Q. Microtubule-targeting agents for cancer treatment: seven binding sites and three strategies. *MedComm – Oncology.* **2023**, *2*, 1–20. DOI: [10.1002/mog2.46](https://doi.org/10.1002/mog2.46).
143. Waterhouse, A.M.; Procter, J.B.; Martin, D.M.; Clamp, M.; Barton, G.J. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics.* **2009**, *25*, 9, 1189–1191. DOI: [10.1093/bioinformatics/btp033](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033).
144. Westphal, K.R.; Heidelberg, S.; Zeuner, E.J.; Riisgaard-Jensen, M.; Nielsen, M.E.; Vestergaard, S.Z.; Bekker, N.S.; Skovmark, J.; Olesen, C.K.; Thomsen, K.H.; Niebling, S.K.; Sørensen, J.L.; Sondergaard, T.E. The effects of different potato dextrose agar media on secondary metabolite production in *Fusarium*. *Int. J. Food Microbiol.* **2021**, *347*, 109171, 1–5. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109171](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109171).
145. Winefield, R.D.; Entwistle, R.A.; Foland, T.B.; Lushington, G.H.; Himes, R.H. Differences in paclitaxel and docetaxel interactions with tubulin detected by mutagenesis of yeast tubulin. *ChemMedChem.* **2008**, *3*, 12, 1844–1847. DOI: [10.1002/cmdc.200800288](https://doi.org/10.1002/cmdc.200800288).
146. Wloga, D.; Joachimiak, E.; Louka, P.; Gaertig, J. Posttranslational modifications of tubulin and cilia. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2017**, *9*, 1–14. DOI: [10.1101/cshperspect.a028159](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028159).
147. Xiang, X. Nuclear movement in fungi. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2018**, *82*, 3–16. DOI: [10.1016/j.semcdb.2017.10.024](https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.10.024).

148. Xu, C.-H.; Huang, S.-J.; Yuan, M. Dimethyl sulfoxide is feasible for plant tubulin assembly *in vitro*: a comprehensive analysis. *J. Integr. Plant Biol.* **2005**, *47*, 4, 457–466. DOI: [10.1111/j.1744-7909.2005.00086.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2005.00086.x).
149. Yang, J.; Yu, Y.; Li, Y.; Yan, W.; Ye, H.; Niu, L.; Tang, M.; Wang, Z.; Yang, Z.; Pei, H.; Wei, H.; Zhao, M.; Wen, J.; Yang, L.; Ouyang, L.; Wei, Y.; Chen, Q.; Li, W.; Chen, L. Cevipabulin-tubulin complex reveals a novel agent binding site on α -tubulin with tubulin degradation effect. *Sci. Adv.* **2021**, *7*, 21, eabg4168, 1–12. DOI: [10.1126/sciadv.abg4168](https://doi.org/10.1126/sciadv.abg4168).
150. Yemets, A.; Stelmakh, O.; Blume, Y.B. Effects of the herbicide isopropyl-N-phenyl carbamate on microtubules and MTOCs in lines of *Nicotiana sylvestris* resistant and sensitive to its action. *Cell Biol. Int.* **2008**, *32*, 6, 623–629. DOI: [10.1016/j.cellbi.2008.01.012](https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.01.012).
151. Yin, X.; Yang, G.F.; Niu, D.B.; Chen, J.; Liao, M.; Cao, H.Q.; Sheng, C.W. Identification and pharmacological characterization of histamine-gated chloride channels in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **2022**, *140*, 103698, 1–11. DOI: [10.1016/j.ibmb.2021.103698](https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2021.103698).
152. Zang, J.; Kriechbaumer, V.; Wang, P. Plant cytoskeletons and the endoplasmic reticulum network organization. *J. Plant Physiol.* **2021**, *264*, 153473, 1–7. DOI: [10.1016/j.jplph.2021.153473](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153473).
153. Zhang, X.; Zhang, G.; Zhai, W.; Zhao, Z.; Wang, S.; Yi, J. Inhibition of TMEM16A Ca^{2+} -activated Cl^- channels by avermectins is essential for their anticancer effects. *Pharmacol. Res.* **2020**, *156*, 104763, 1–11. DOI: [10.1016/j.phrs.2020.104763](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104763).
154. Zhang, X.H.; Yu, X.Z.; Yue, D.M. Phytotoxicity of dimethyl sulfoxide (DMSO) to rice seedlings. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **2016**, *13*, 607–614. DOI: [10.1007/s13762-015-0899-6](https://doi.org/10.1007/s13762-015-0899-6).
155. Zhu, Y.; Zhang, Y.; Duan, Y.; Shi, D.; Hou, Y.; Song, X.; Wang, J.; Zhou, M. Functional roles of α_1 -, α_2 -, β_1 -, and β_2 -tubulins in vegetative growth, microtubule assembly, and sexual reproduction of *Fusarium graminearum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2021**, *87*, 20, 1–17. DOI: [10.1128/aem.00967-21](https://doi.org/10.1128/aem.00967-21).

Список публікацій здобувача за темою дисертації

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Kustovskiy, Y.O.; Karpov, P.A.; Blume, Y.B.; Yemets, A.I.; Ivermectin affects *Arabidopsis thaliana* microtubules through predicted binding site of β -tubulin. *Plant Physiol. Biochem.* **2024**, 206, 108296. DOI: [10.1016/j.plaphy.2023.108296](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.108296) (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення експериментів, участь у аналізі та інтерпретації отриманих даних, участь у написанні статті). (Scopus / WoS; Q1; IF -6.1)

2. Kustovskiy, Y.O.; Buziashvili, A.Y.; Ozheredov, S.P.; Blume, Y.B.; Yemets, A.I. β -Tubulin of *Fusarium* as a potential target for realization of the antifungal activity of ivermectin. *Cytol. Genet.* **2024**, 58, 1, 3–13. DOI: [10.3103/S009545272401002X](https://doi.org/10.3103/S009545272401002X) (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення експериментів, участь у аналізі та інтерпретації отриманих даних, участь у написанні статті). (Scopus / WoS; Q3; IF -0.5)

3. Кустовський, Є.О.; Ємець, А.І. Визначення патернів алостеричної взаємодії івермектину з глутаматзалежним хлоридним іонним каналом *Caenorhabditis elegans*. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* **2023**, 4, 84–92. DOI: [10.15407/dopovidi2023.04.076](https://doi.org/10.15407/dopovidi2023.04.076) (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, аналіз та інтерпретація даних, участь у написанні статті). (Наукове фахове видання України, **Категорія Б**).

3. Кустовський, Є.О.; Бузіашвілі, А.Ю.; Ємець, А.І. Дослідження впливу івермектину на *Fusarium graminearum* та *F. oxysporum*. *Фактори експериментальної еволюції організмів.* **2022**, 30, 90–94 DOI: [10.7124/feeo.v30.1467](https://doi.org/10.7124/feeo.v30.1467) (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення експериментів, участь у аналізі та інтерпретації отриманих даних, участь у написанні статті). (Наукове фахове видання України, **Категорія Б**).

Апробація результатів дисертації

Основні положення дисертаційного дослідження викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня:

1. Kustovskiy, Y.O.; Yemets, A.I. Comparison of stability of ivermectin complexes with β 1-tubulin of *Arabidopsis thaliana*, *Haemonchus contortus*, *Fusarium graminearum*, and *Fusarium oxysporum*. *IV Conference for Young Scientists "PLANT BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY"*, Україна, м. Київ, 2024, 16–18 трав., 9.

2. Kustovskiy, Y.O.; Yemets, A.I. The search of structural patterns of ivermectin allosteric interaction with glutamate-gated chloride channel of *Caenorhabditis elegans*. *Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2023. Biotechnologia Acta*. Україна, м. Київ, 2023, 26 трав., 16, 2, 32–34. DOI: [10.15407/biotech16.02.032](https://doi.org/10.15407/biotech16.02.032)

3. Кустовський, Є.О.; Ємець А.І. Пошук потенційних сайтів зв'язування івермектину з β -тубуліном *Fusarium graminearum*. *Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології: матеріали VI Міжнародної наукової конференції*. Україна, м. Дніпро, 2022, 6–7 жовтня, 93–95.

4. Кустовський, Є.О. Розчинна здатність івермектину як важливий етап вивчення його механізму дії. *Хімія, біо- і нанотехнології, екологія та економіка в харчовій та косметичній промисловості: Збірник матеріалів IX міжнародної науково-практичної конференції*. Україна, м. Харків, 2021, 18–19 лист., 49–54.

ДОДАТОК Б

Результати порівняння кількості та стійкості взаємодій між полярними та зарядженими залишками $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* та *H. contortus*

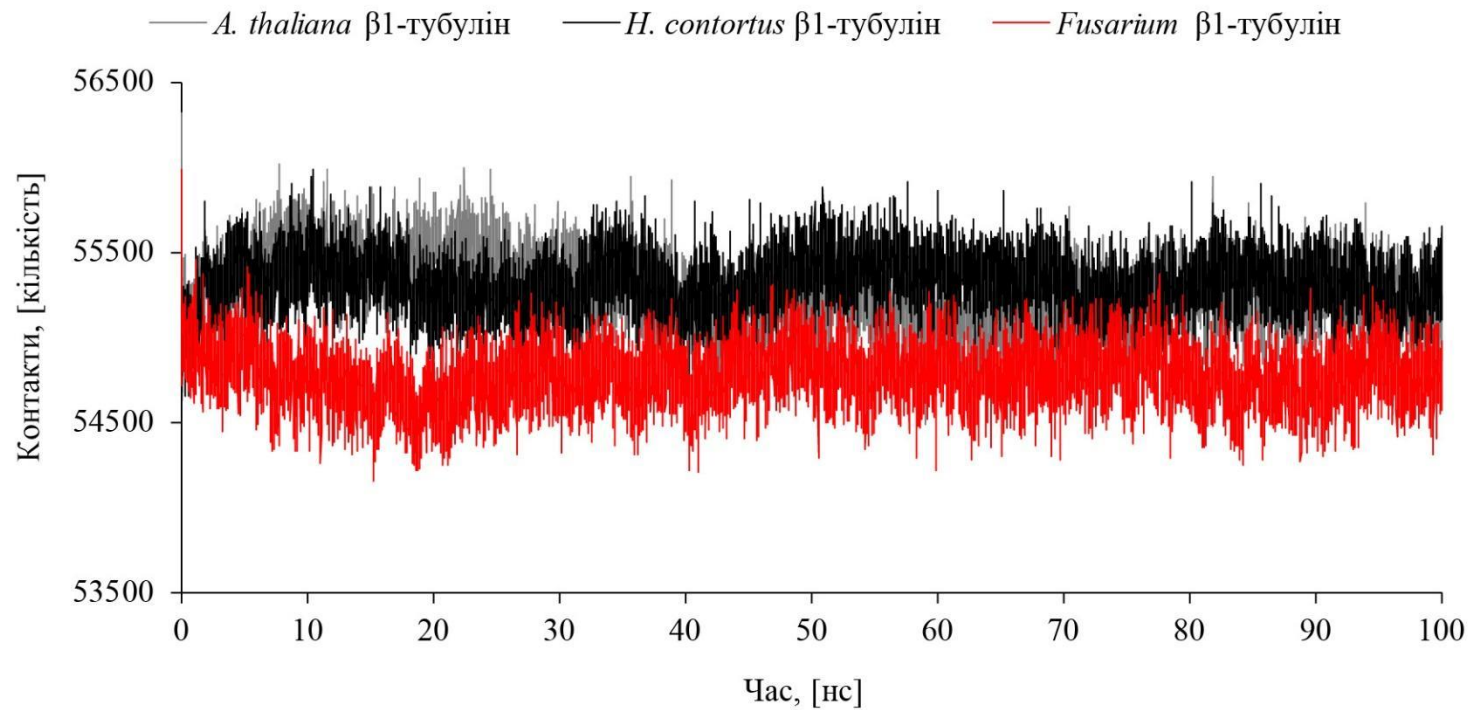


Рис. 1 Порівняння часових змін у кількості полярних контактів між залишками $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana*, *Fusarium* (*F. graminearum*/*F. oxysporum*) та *H. contortus*

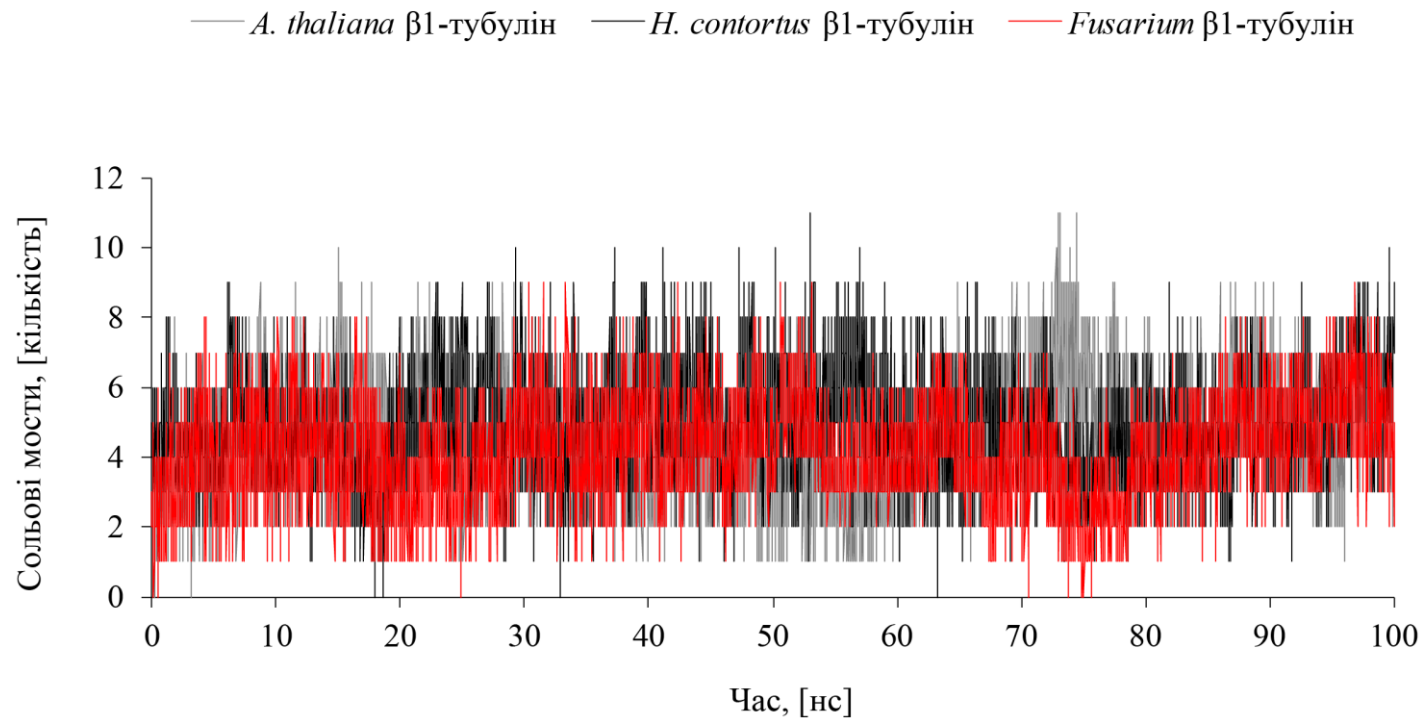


Рис. 2 Порівняння часових змін у кількості сольових містків між залишками β 1-тубуліну *A. thaliana*, *Fusarium* (*F. graminearum*/*F. oxysporum*) та *H. contortus*

**Порівняння стійкості сольових містків конформацій вільного β 1-тубуліну *A. thaliana*, *Fusarium*
(*F. graminearum*/*F. oxysporum*) та *H. contortus***

№	Сольовий місток	Структурні елементи	% від загальної кількості фреймів		
			β 1-тубулін <i>A. thaliana</i>	β 1-тубулін <i>H. contortus</i>	β 1-тубулін <i>Fusarium</i>
1	2	3	4	5	6
1	Glu22–Lys19*	H1	42,64	73,46	-
2	Glu27–Arg319(318)*	H1–S8	23,71	14,33	20,34
3	Asp33–Lys59(58)	H1–S2–S2	-	8,95	-
4	Asp89(88)–Arg87(86)	H2–H3	-	5,06	1,18
5	Asp89(88)–Lys123(122)	H2–H3–H3	7,00	-	-
6	Glu109(108)–Lys104(103)	H3	3,07	5,00	2,04
7	Asp115(114)–Lys155(154)	H3–H4	-	6,38	0,31
8	Asp119(118)–Lys(Arg)123(122)	H3	21,55	19,45	0,23
9	Glu126(125)–Lys123(122)	H3	8,96	8,50	-
10	Glu158(157)–Lys155(154)	H4	41,35	25,05	39,62
11	Asp198(197)–Arg157(156)	H4–H5–S6	-	1,62	3,61
12	Glu199(198)–Arg252(251)	S6–H8	2,80	-	-

Продовж. дод. Б

Продовж. табл. 1

13	Asp204(203)–Arg381(380)	S7–H11	7,87	7,23	5,70
14	Glu206(205)–Lys175(174)	S5–H5–H6	24,21	50,60	37,27
15	Asp210(209)–Lys175(174)	S5–H5–H6	-	12,33	2,80
16	Asp210(209)–Arg214(213)	H6	1,09	-	0,77
17	Asp210(209)–Lys298(297)	H6–H9–S8	-	12,96	7,68
18	Asp225(224)–Arg(Lys)277(276)*	H7–М–петля	-	1,65	-
19	Asp250(249)–Arg252(251)	H8–H7–H8	-	9,36	-
20	Glu289(288)–Ile(Arg)283(282)	М–петля–H9	-	1,81	-
21	Asp296(295)–Lys298(297)	H9–H9–S8	92,13	30,47	50,27
22	Asp305(304)–Arg307(306)	H9–S8	4,12	4,59	4,98
23	Asp328(327)–Lys351(350)	H10–S9	28,84	-	-
24	Glu329(Asp328)–Lys325(324)	H10	6,96	-	67,62
25	Asp328(Glu327)–Lys325(324)	H10	-	-	7,23
26	Asp356(355)–Lys321(320)	S8–H10–S9–S10	31,26	-	-
27	Glu377(376)–Lys380(379)	H11	-	55,49	49,66
28	Glu384(383)–Lys380(379)	H11	-	-	3,04
29	Glu402(401)–Lys104(103)	H3–H11'	77,94	93,17	84,49
30	Glu406(405)–Lys393(392)	H11–H11'–H12	4,45	20,76	14,91
31	Glu413(412)–Arg391(390)	H11–H12	4,54	-	1,73
32	Glu422(421)–Arg263(262)	H8–S7–H12	-	1,65	0,43

Примітка. * – позначені сольові містки між залишками структурних елементів таксанового сайту, а жирним шрифтом виділені сольові містки, що наявні в траєкторіях більшості досліджених структур

ДОДАТОК В

Результати порівняння конформаційних властивостей $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* та *H. contortus* у незв'язаному з івермектином стані

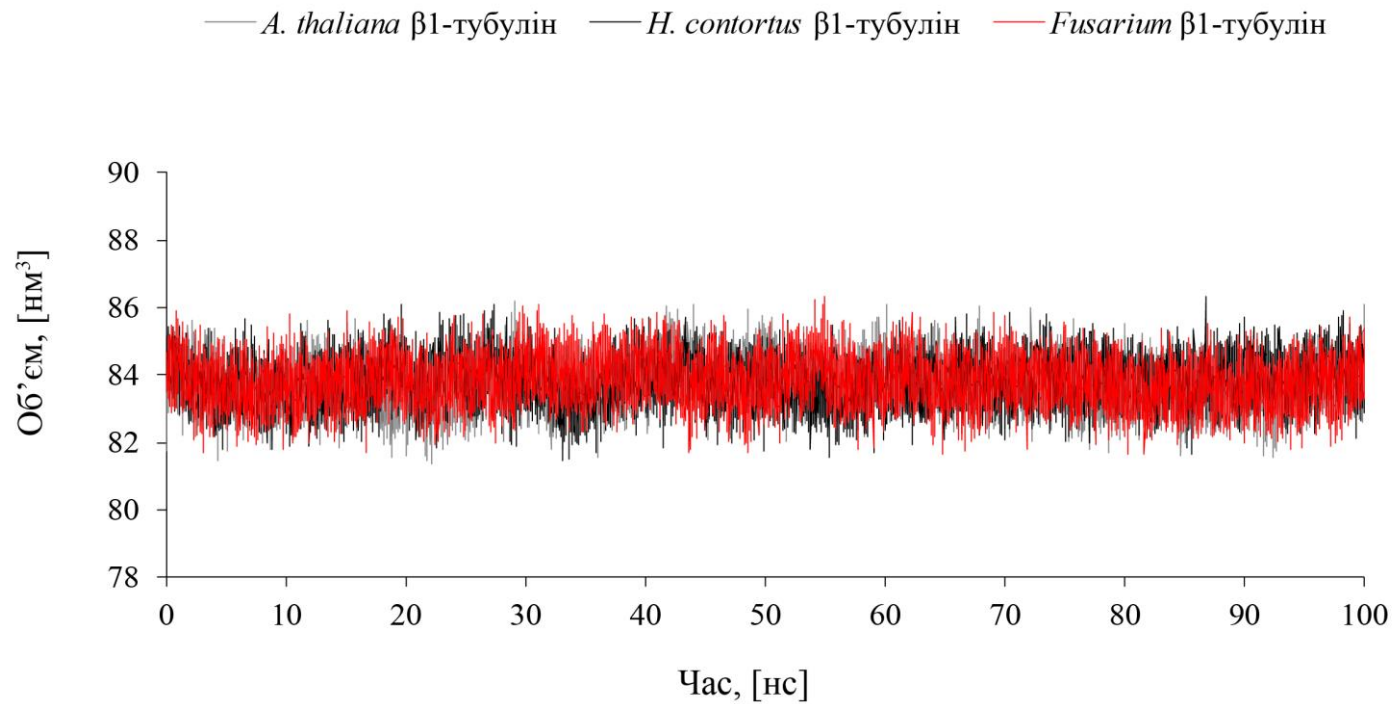


Рис. 1 Порівняння часових змін у об'ємі (розрахований на підставі SASA) $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana*, *Fusarium* (*F. graminearum*/*F. oxysporum*) та *H. contortus*

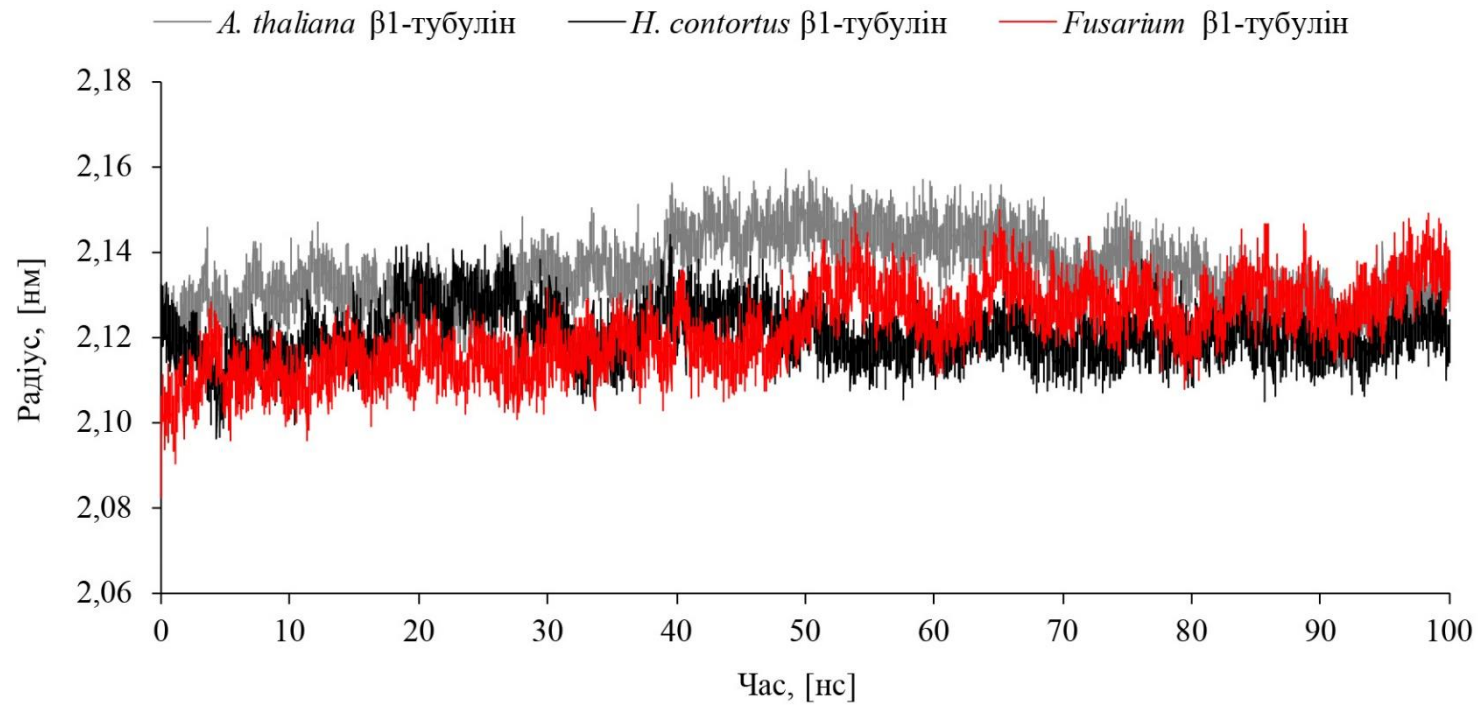


Рис. 2 Порівняння часових змін радіусу гірації β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *Fusarium* (*F. graminearum* та *F. oxysporum*)

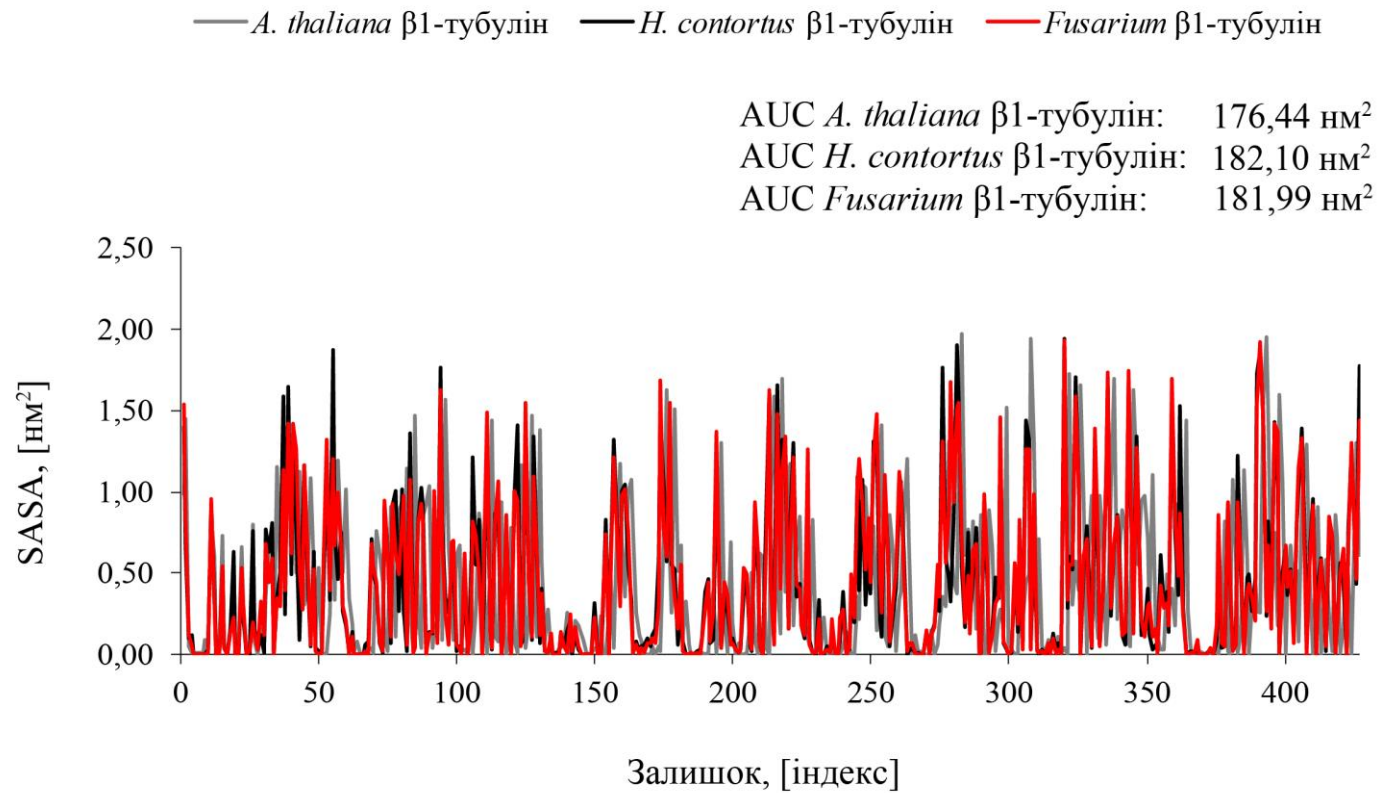


Рис. 3 Порівняння площі поверхні залишків доступної розчиннику (SASA) β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *Fusarium* (*F. graminearum* та *F. oxysporum*)

ДОДАТОК Г

Результати визначення взаємозв'язків таксанового сайту $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* та *H. contortus*

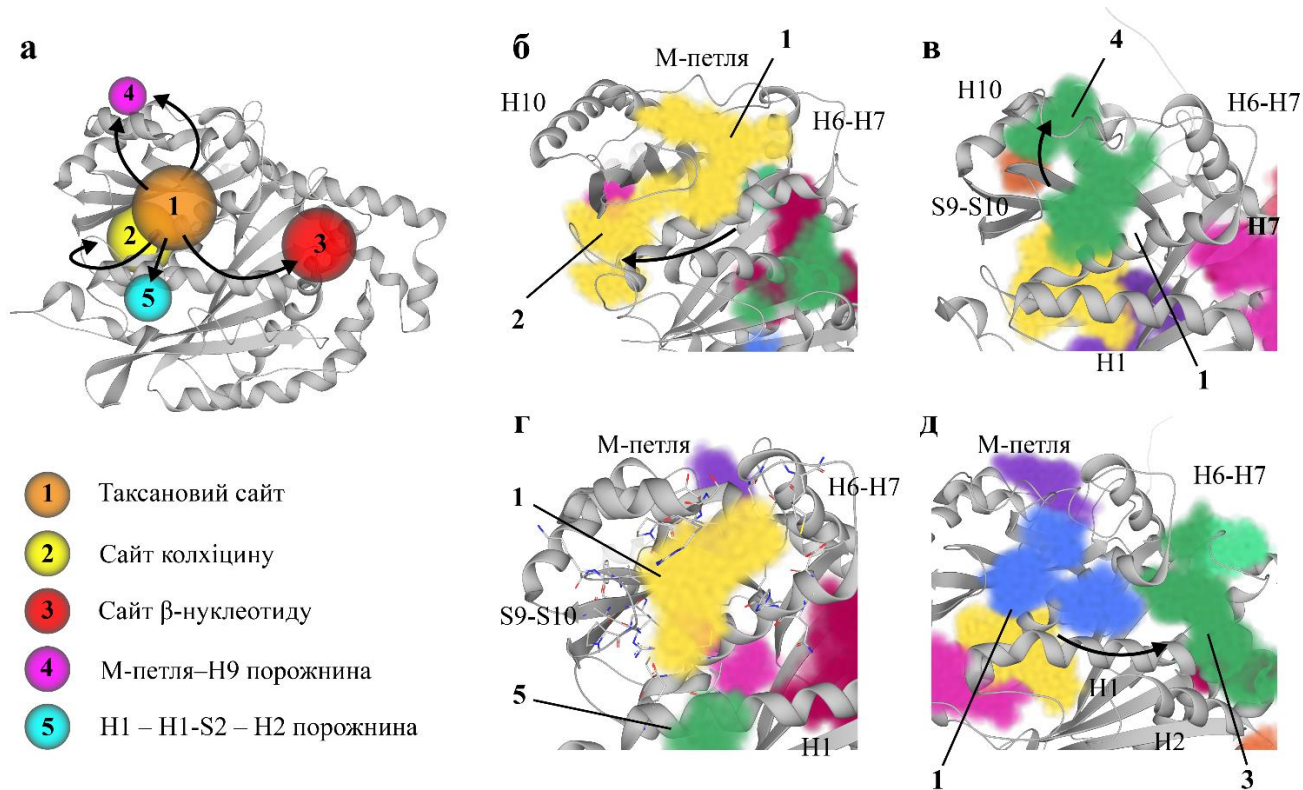


Рис. 1. Взаємозв'язки таксанового $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *Fusarium*: (а) схематичне відображення мапи взаємозв'язків; (б) злиття порожнини таксанового сайту та сайту колхіцину; (в) злиття порожнини таксанового сайту та порожнини, утвореної М-петлею та Н9; (г) відображення таксанового сайту та порожнини Н1–Н1-S2 – Н2; (д) злиття таксанового з порожниною у напрямку сайту зв'язування та гідролізу ГТФ

ДОДАТОК Д

Результати порівняння фізико-хімічних властивостей проаналізованих конформацій сайту зв'язування IVM з GluCl α та таксанового сайту β 1-тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* та *H. contortus*

Таблиця 1

Порівняння фізико-хімічних властивостей проаналізованих конформацій сайту зв'язування IVM з GluCl α та таксанового сайту β 1-тубуліну *A. thaliana*, *Fusarium* (*F. graminearum*/*F. oxysporum*) та *H. contortus*

№	Структура	Джерело (база даних)	Залишки (кількість)			Гідрофобність (0–1)	Об'єм, [нм ³]
			Загалом	Донори	Акцептори		
1	GluCl α <i>C. elegans</i>	PDB: 3RHW	25 $\pm$ 4,44	13 $\pm$ 3,83	20 $\pm$ 4,98	0,69 $\pm$ 0,03	55,10 $\pm$ 6,17
2	GluCl α <i>C. elegans</i>	PDB: 3RIF	24 $\pm$ 4,09	12 $\pm$ 2,61	20 $\pm$ 3,67	0,70 $\pm$ 0,01	54,98 $\pm$ 8,81
3	β 1-тубулін <i>A. thaliana</i>	UniProtKB: P12411	23 $\pm$ 3,65	13 $\pm$ 2,88	15 $\pm$ 3,78	0,70 $\pm$ 0,02	44,61 $\pm$ 4,79
4	β 1-тубулін <i>H. contortus</i>	UniProtKB: A2TF56	25 $\pm$ 3,42	12 $\pm$ 3,29	16 $\pm$ 3,42	0,72 $\pm$ 0,02	44,51 $\pm$ 2,16
5	β 1-тубулін <i>Fusarium</i>	UniProtKB: Q4HZS8	22 $\pm$ 0,89	11 $\pm$ 1,10	14 $\pm$ 4,09	0,71 $\pm$ 0,03	44,49 $\pm$ 3,75

Продовж. дод. Д

Таблиця 2

Порівняння оцінки афінності IVM до сайту GluCl α та таксанового сайту β 1-тубуліну *A. thaliana*, *Fusarium* (*F. graminearum* та *F. oxysporum*) та *H. contortus*.

№	Структура	Походження моделі білка	ChemPLP*	ASP*	HYDE*
1	GluCl α <i>C. elegans</i>	PDB: 3RHW	86,89 $\pm$ 1,50	34,22 $\pm$ 2,57	нМ– μ М
2	GluCl α <i>C. elegans</i>	PDB: 3RIF	95,05 $\pm$ 1,90	36,21 $\pm$ 0,67	нМ– μ М
3	β 1-тубулін <i>A. thaliana</i>	UniProtKB: P12411	74,50	28,03	μ М–мМ
4	β 1-тубулін <i>H. contortus</i>	UniProtKB: A2TF56	63,45	25,73	μ М–мМ
5	β 1-тубулін <i>Fusarium</i>	UniProtKB: Q4HZS8	67,03	30,24	μ М–мМ

Примітка. * – для функцій скорингу ChemPLP та ASP у таблиці наведено загальні (англ. fitness) скорі; для методу HYDE наведено інтервал концентрацій, за яких відбувається зв'язування. Кожен комплекс GluCl α *C. elegans* має п'ять конформацій IVM та сайту зв'язування, тому надано середні значення скорів ChemPLP та ASP. У випадку комплексів IVM з β 1-тубуліном *A. thaliana*, *H. contortus* та *Fusarium* наведено лише скорі комплексів обраних для проведення молекулярно-динамічних симуляцій

ДОДАТОК Е

Результати порівняння конформаційних властивостей М-петлі $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* та *H. contortus*

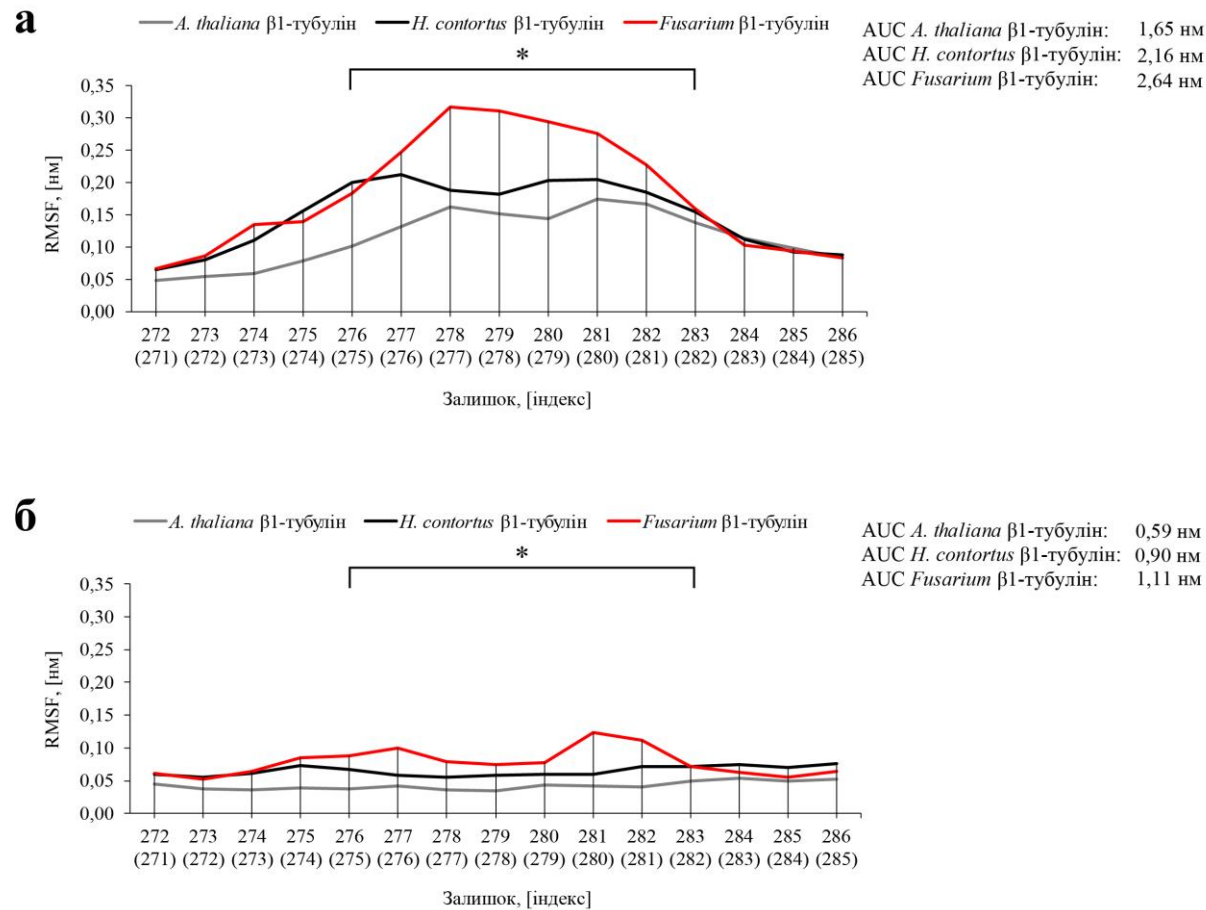


Рис. 1 Порівняння RMSF атомів амінокислотної основи залишків **М-петлі** $\beta 1$ -тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *Fusarium* (*F. graminearum* та *F. oxysporum*): вільний β -тубулін (а); комплекси IVМ та β -тубуліну (б). * – позначені залишки ділянки **М-петлі**, що мають найбільшу рухливість

Продовж. дод. Е

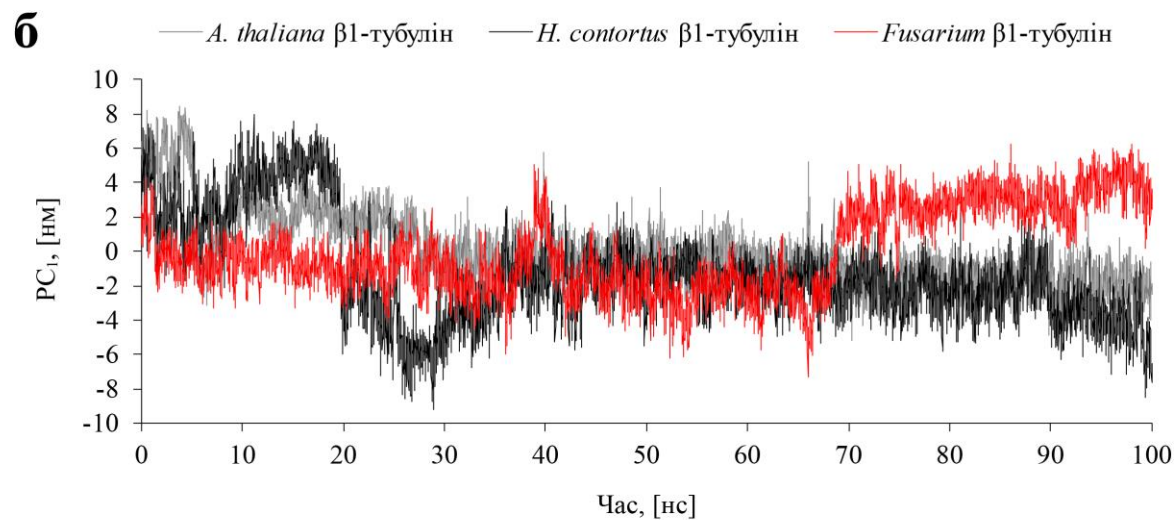
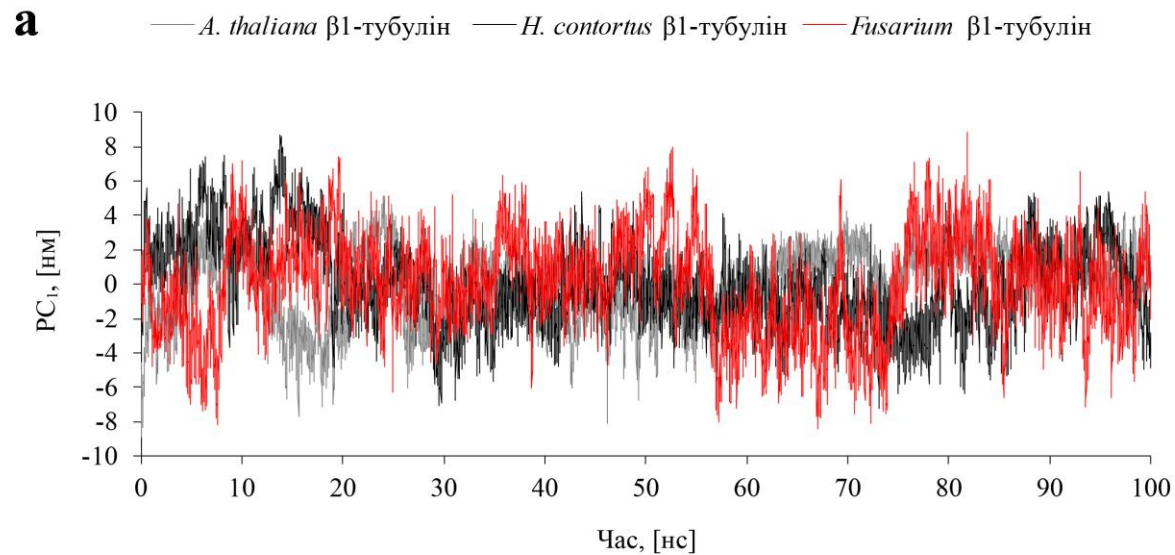


Рис. 2 Порівняння першого головного компоненту (PC₁) конформаційного руху **М-петлі** β 1-тубуліну *A. thaliana*, *H. contortus* та *Fusarium* (*F. graminearum* та *F. oxysporum*) у вільному (а) та зв'язаному (б) з IVM стані

ДОДАТОК Ж

Результати математичного аналізу часових рядів траєкторій молекулярно-динамічних симуляцій

Таблиця 1

Результати порівняння часових рядів об'єму, гірації, RMSD, функцій кількості водневих зв'язків та сольових містків, а також першого головного компонента конформаційного руху М-петлі (PC₁)

Пари структур β1-тубуліну	Показник	Часові ряди					
		Об'єм (нм ³)	Радіус гірації (нм)	RMSD (нм)	Водневі зв'язки (кількість)	Сольові містки (кількість)	PC ₁ * (нм)
<i>A. thaliana</i> та <i>H. contortus</i>	Площа ^а	0,764	0,038	0,021	22,229	1,809	2,768
	Відстань ^б	44,783	2,006	0,459	924,381	229,713	103,641
	RMSE ^в	0,949	0,039	0,013	25,720	2,297	3,437
<i>A. thaliana</i> та <i>F. graminearum</i> / <i>F. oxysporum</i>	Площа ^а	0,740	0,015	0,011	11,659	1,644	2,870
	Відстань ^б	43,439	0,488	0,744	609,130	213,846	115,975
	RMSE ^в	0,927	0,018	0,024	14,491	2,138	3,575
<i>H. contortus</i> та <i>F. graminearum</i> / <i>F. oxysporum</i>	Площа ^а	0,754	0,024	0,024	27,438	1,602	2,922
	Відстань ^б	44,223	1,144	0,804	1147,032	204,690	116,167
	RMSE ^в	0,944	0,026	0,027	30,382	2,047	3,681

Примітка. а – загальна площа між графіками, встановлена за допомогою чисельного інтегрування; б – загальна евклідова відстань між графіками; в – загальна RMSE; * – перший головний компонент конформаційного руху М-петлі (вільний β1-тубулін).

Продовж. дод. Ж

Таблиця 2

Результати порівняння часових рядів електростатичних взаємодій (потенціал Леннард-Джонса), загальної енергії зв'язування, функцій кількості водневих зв'язків, а також першого головного компонента конформаційного руху М-петлі (PC₁)

Пари структур β 1-тубуліну	Показник	Часові ряди			
		потенціал Леннард- Джонса (кДж/моль)	ΔG_{bind} (ккал/моль)	Водневі зв'язки (кількість)	PC ₁ ⁴ (нм)
<i>A. thaliana</i> та <i>H. contortus</i>	Площа ¹	27,53	5,51	0,70	2,24
	Відстань ²	1218,30	74,94	46,84	102,48
	RMSE ³	33,23	6,66	0,98	2,88
<i>A. thaliana</i> та <i>Fusarium</i>	Площа ¹	26,27	4,75	0,96	3,07
	Відстань ²	1253,13	69,13	50,48	127,97
	RMSE ³	32,19	6,36	1,23	3,63
<i>H. contortus</i> та <i>Fusarium</i>	Площа ¹	24,84	6,42	0,84	3,60
	Відстань ²	1191,74	80,66	43,07	196,57
	RMSE ³	30,16	7,83	1,12	4,37

Примітка. 1 – загальна площа між графіками, встановлена за допомогою чисельного інтегрування; 2 – загальна евклідова відстань між графіками; 3 – загальна RMSE; 4 – перший головний компонент конформаційного руху М-петлі.

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 22:53:10 16.05.2025

Назва файлу з підписом: Дисертація_Кустовський Є.О.pdf
Розмір файлу з підписом: 8.7 МБ

Перевірені файли:
Назва файлу без підпису: Дисертація_Кустовський Є.О.pdf
Розмір файлу без підпису: 8.6 МБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: Кустовський Євген Олексійович
П.І.Б.: Кустовський Євген Олексійович
Країна: Україна
РНОКПП: 3593705630
Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 22:53:01 16.05.2025
Сертифікат виданий: КНЕДП ТОВ "Вчасно Сервіс"
Серійний номер: 2DBD5940D955E12A0400000026CD03002BA81300
Алгоритм підпису: ДСТУ 4145
Тип підпису: Удосконалений
Тип контейнера: Підписаний PDF-файл (PAdES)
Формат підпису: З повними даними для перевірки (PAdES-B-LT)
Сертифікат: Кваліфікований

Версія від: 2025.02.05 13:00