УДК 632.51 DOI: 10.31857/S2500262723030079, EDN: EZBCYQ

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ СВЯЗЫВАНИЯ ГЕРБИЦИДОВ С БЕЛКАМИ-МИШЕНЯМИ СОРНЫХ РАСТЕНИЙ МЕТОДАМИ *IN SILICO**

И.Э. Памирский[1], кандидат биологических наук, **П.Д. Тимкин**[2], **Э.А. Тимофеев**[3], **Д.Д. Котельников**[3], **Л.Н. Алексейко**[4], доктор химических наук, **С.В. Климович**[4], **Е.А. Бородин**[3], доктор медицинских наук, **К.С. Голохваст**[1], доктор биологических наук

[1]Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук,
630501, Новосибирская обл., пос. Краснообск, ул. Центральная, 2б
E-mail: parimski@mail.ru
[2]Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт сои»,
675027, Амурская область, Благовещенск, ул. Игнатьевское шоссе, 19
[3]Амурская государственная медицинская академия,
675009, Амурская область, Благовещенск, ул. Горького, 95
[4]Гомельский государственный медицинский университет,
246000, Республика Беларусь, Гомель, ул. Ланге, 5

Исследования проводили с целью изучения молекулярных механизмов связывания гербицидов (пиноксаден, квизалофоп-Р-тефурил, прометрин, метрибузин, метсульфурон-метил) с белками-мишенями (ацетил-КоА-карбоксилаза, ацетолактатсинтаза, цитохром Р450, 4-гидроксифенилпируват диоксигеназа) сорных трав, произрастающих в Сибири: овсюг обыкновенный (Avena fatua L.), пырей ползучий (Elymus repens (L.) Gould), щирица запрокинутая (Amaranthus retroflexus L.), марь белая (Chenopodium album L.), щетинник зеленый (Setaria viridis (L.) P. Beauv). Работу выполняли в Новосибирской области в 2022–2023 гг. С использованием биоинформационных методов были созданы виртуальные трехмерные комплексы пестицидов и их мишеней. Предложен новый подход к выявлению параметров полости сайтов связывания, который заключается в совмещении метода выравнивания и технологии машинного обучения. Проведена стыковка пестицидов с мишенями. Расчет энергии связывания указывает на высокую степень устойчивости комплексов лиганд-белок. Предложенный подход in silico может быть полезен для выяснения поведения гербицидов при связывании с ферментами сорняков. Подобный подход позволяет глубже понять механизм действия и экотоксикологические аспекты применения пестицидов. Исследованные комплексы гербицидов и белков обладают потенциальной высокой стабильностью ввиду низкой энергии связывания с рецепторами, которая варьирует от –5,60 до –13,24 ккал/моль. Величина энергии связывания не показала прямой зависимости от количества аминокислотных остатков лиганд-связывающего сайта. В целом исследование дополнило некоторые аспекты молекулярных механизмов связывания гербицидов с белками-мишенями сорных трав, однако требуется проведение более глубокого изучения с целью локализации критических аминокислотных точек, участвующих в биологических функциях белков-мишеней.

STUDY OF MOLECULAR MECHANISMS OF HERBICIDE BINDING T O TARGET PROTEINS OF WEEDS BY IN SILICO METHODS

I.E. Pamirsky[1], **P.D. Timkin**[2], **E.A. Timofeev**[3], **D.D. Kotelnikov**[3], **L.N. Alexeyko**[4], **S.V. Klimovich**[4], **E.A. Borodin**[3], **K.S. Golokhvast**[1]

[1]Siberian Federal Research Center of Agricultural Biotechnology, Russian Academy of Sciences,
630501, Novosibirskaya obl., Novosibirskii r-n, pos. Krasnoobsk, ul. Tsentralnaya, 2b
E-mail: parimski@mail.ru
[2]Federal scientific center All-Russian research institute of soybean breeding,
675027, Amurskaya obl., Blagoveshchensk, Ignat'evskoe sh., 19
[3]Amur state medical academy,
675009, Amurskaya obl., Blagoveshchensk, ul. Gor'kogo, 95
[4]Gomel state medical university,
246000, Republic of Belarus, Gomel, ul. Lange, 5

The aim of this study was to study of the molecular mechanisms of herbicide binding (pinoxaden, quizalofop-P-tephuryl, prometryn, metribuzin, metsulfuron-methyl) to target proteins (acetyl-CoA carboxylase, acetolactate synthase, cytochrome P450, p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase) of the weed species growing in Siberia: wild oat Avena fatua (L.), wheatgrass Elymus repens (L.), amaranth Amaranthus retroflexus (L.), common lamb's quarters Chenopodium album (L.), bristlegrass Setaria viridis (L.). The work was carried out in the Novosibirsk region in 2022–2023. Using bioinformatic methods, virtual three-dimensional complexes of pesticides and their targets were created. A new approach has been proposed to identify the parameters of the cavity of binding sites, which consists in combining the alignment method and machine learning technology. Docking of pesticides with targets was carried out. The calculation of the binding energy indicates a high degree of stability of the ligand-protein complexes. The in silico approach we proposed may be useful for elucidating the behavior of herbicides when bound to weed enzymes. This approach allows a deeper understanding of the mechanism of action and ecotoxicological aspects of the use of pesticides. The studied complexes of herbicides and proteins have a potential high stability due to the low binding energy with receptors, which varies from –5.60 to –13.24 kcal/mol. The binding energy value did not show a direct dependence on the number of amino acid residues of the ligand-binding site. In general, the study supplemented some aspects of the molecular mechanisms of binding herbicides to target proteins of weeds, however, a more in-depth study is required in order to localize critical amino acid points involved in the biological functions of target proteins.

Ключевые слова: *пестициды, гербициды, биоинформатика, лиганд, мишень, целевой фермент, овсюг, пырейник, щетинник, щирица, пиноксаден, квизалофоп-Р-тефурил, прометрин, метрибузин, метсульфурон-метил.*

Key words: *pesticides, herbicides, bioinformatics, ligand, target, target enzyme, wild oat, wheatgrass, bristlegrass, amaranth, pinoxaden, quizalofop-P-thefuryl, prometryn, metribuzin, metsulfuron-methyl*

* работа выполнена в соответствии с грантом № 220-2961-3099 в рамках Постановления Правительства России № 220.

Сорные растения выступают важным биологическим препятствием для выращивания культур по всему миру. Против них эффективно используют различные довсходовые и послевсходовые гербициды на основе химических соединений различных классов (фенилпиразолы, арилоксифеноксипропионаты, триазины и др.). Так, пиноксаден в дозе 20 г д.в./га в серии экспериментов независимо от фазы развития (3…4 или 6…7 листьев) полностью подавлял рост овсюга [1]. В опыте по изучению резистентности к гербицидам *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv пиноксаден в дозировке 55 г/га при появлении на растениях трех-пяти язычковых листьев продемонстрировал на 30-й день после обработки контроль над всеми шестью биотипами ежовника в среднем на 99 %, что также выражалось в наименьшей сухой биомассе [2]. В тепличных условиях пиноксаден в дозах 10 г д.в./га и выше со смесью поверхностно-активных веществ (метиловый эфир жирных кислот, этоксилат спирта и нефтяные дистилляты) повреждал более 95 % растений *Setaria pumila* (Poir.) Roem. & Schult [3]. В посевах сои на различных типах почв метрибузин контролировал *Setaria spp.* от 5 % до 83 %, а его совместное применение с изоксафлутолом в низких и средних дозах приводило к синергетическому повышению эффективности контроля численности сорняка [4]. Значительно меньшая плотность *Chenopodium album* (L.) была зарегистрирована при послевсходовом применении сульфосульфурона в дозе 25 г/га с метсульфурон-метилом в дозе 4 г/га [5]. Метсульфурон-метил в дозе 4 г/га на 89,7 % обеспечивал подавление *C. album* (L.) на пшеничных полях [6]. В двухлетнем опыте послевсходовое применение метсульфурон-метила в дозе 3…4 г/га в сочетании с 0,2 % поверхностно-активного вещества снижало численность популяции (эффективность до 70 %) и общую сухую массу *C. album* (L.) на 45-й день [7]. Обработка метсульфурон-метилом в дозе 4 г/га в течение 3 недель обеспечила 71 % подавление растений *C. album* (L.), высаженных в горшечный грунт на основе торфа [8].

В то же время многие сорняки способны вырабатывать различные механизмы устойчивости к гербицидам. Например, по результатам дозозависимого эксперимента и анализа активности фермента ацетил-КоА-карбоксилазы (далее ACC), выявлена устойчивость к пиноксадену у биотипа овсюга из Чили (собран в посевах озимой пшеницы в Темуко) [9]. Точечная мутация обнаружена в триплете аспарагиновой кислоты в положении аминокислоты 2078, что привело к триплету глицина. Также сообщалось, что целевой фермент ACC в устойчивых биотипах содержит нечувствительную к гербицидам форму.

Эксперименты в теплице с диким овсом по схеме доза-реакция (0, 6, 18, 60, 180 и 360 г д.в./га, обработка в фазе 4 листа) показали, что по сравнению со средними значениями для двух восприимчивых S-популяций популяции R3 и R4 (собраны с производственных полей ячменя) были в 7 раз более устойчивы к пиноксадену [10]. Авторы не обнаружили с использованием секвенирования ДНК и аллель-специфических ПЦР-анализов в растениях R точечные мутации сайта-мишени, которые придают устойчивость к ингибиторам ацетолактатсинтазы (далее ALS) или ACC. Это позволило предположить участие механизма устойчивости, не выступающего сайтом-мишенью.

В условиях теплицы у пяти из шести популяций овсюга, собранных в севооборотах с преобладанием злаков, отмечена в 11…30 раз более высокая устойчивость к пиноксадену, по сравнению с восприимчивыми популяциями [11]. В целом исследование показало, что недостаточное разнообразие выращиваемых в севообороте культур и повторное использование гербицидов с аналогичным механизмом действия приводят к отбору устойчивых форм *Avena fatua (*L.*)*, количество которых в полевых популяциях увеличивается.

В теплице при обработке пиноксаденом (с 1 %-ным раствором адъюванта клоквинтоцета) в дозе 30 г/га две из тридцати популяций *A. fatua* (L.), собранных с засоренных полей, продемонстрировали перекрестную устойчивость [12]. Единственная восприимчивая популяция полностью контролировалась пиноксаденом. Для того чтобы понять механизмы резистентности мутаций TSR и NTSR вследствие усиленного метаболизма ингибиторами цитохрома P450 (далее CYP450) с использованием пиноксадена, авторы провели исследования на двух резистентных популяциях af11 и af28, которые показали, что опрыскивание малатионом с пиноксаденом либо контролировало, либо подавляло обе популяции. Эти результаты подтверждают наличие механизмов TSR и/или NTSR.

В эксперименте на популяции AXXZ-2 (R, наличие мутации Ala-205-Val) и JLGY-3 (S) пиноксаден наносили в определенных дозах и через две недели измеряли надземную массу в свежем виде [13]. Популяция AXXZ-2 оказалась в 15,1 раза более устойчивой. При этом в ACC 4 популяции AXXZ-2 была обнаружена нуклеотидная замена (GAT на GAG) в положении 2078, которая отвечает за мутацию Asp2078-Glu. Других аминокислотных замен, ответственных за устойчивость к ингибиторам ACC, не выявлено. Вычислительный анализ влияния мутации Asp-2078-Glu на аффинность связывания ACC с ингибиторами ACC подтвердил наличие устойчивости *E. cruss-galli* (L.) P. Beauv к пиноксадену. Установлено, что гены ACC популяции AXXZ-2 при обработке пиноксаденом активировались в 2,7 раза сильнее, чем у JLGY-3.

В другом исследовании показано, что популяция *E. crus-galli* (L.) P. Beauv, собранная с рисовых полей прямого посева, проявляла высокую устойчивость к ряду гербицидов [14]. В частности, по сравнению с популяцией S (восприимчивая), ее устойчивость к пиноксадену была выше в 6,4 раза. По результатам выравнивания после секвенирования сходство нуклеотидных последовательностей ACC 1 и ACC 6 превышало 99 %. В то же время ни в одном из шести транскриптов ACC популяции R не обнаружено известных мутационных сайтов, ответственных за устойчивость к гербицидам, что указывает на возможное участие механизмов NTSR.

Установлено, что через 28 дней после применения флуфенацета и метрибузина контроль *Setaria viridis* (L.) P. Beauv составлял 88…95 %, через 56 дней – на 80…92 %. При этом их использование в дозе менее 0,84 кг/га было недостаточным для получения стабильного контроля над сорняком на протяжении всего сезона. [15].

Развитие устойчивости может быть обусловлено неправильным подбором и использованием гербицидов, нарушением агротехники, а также способностью растений на генетическом уровне вырабатывать невосприимчивые формы целевых ферментов. Например, сообщается, что устойчивые к ингибитору ACC биотипы сорняков, скорее всего, разовьют перекрестную устойчивость к пиноксадену [3]. В то же время, отмечается, что растения с более чем двумя копиями генов целевого участка, как правило, не приобретают признак устойчивости к гербицидам, несмотря на наличие мутации устойчивости [13].

Разработка новых пестицидов и новых подходов в их

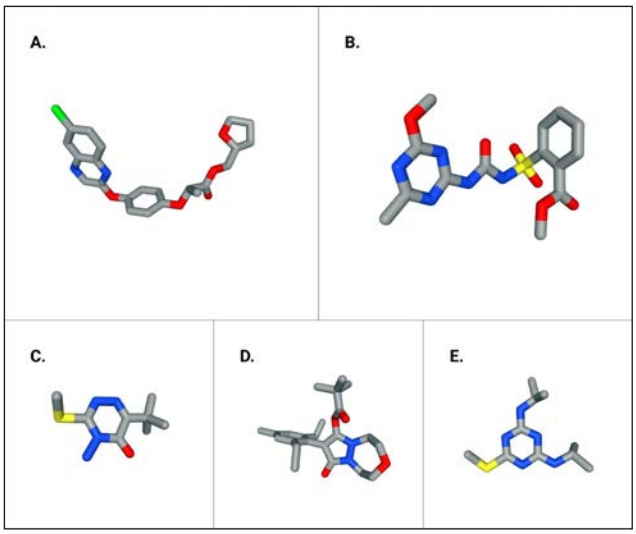


Рис. 1. Трехмерные виртуальные модели гербицидов: A – квизалофоп, B – метсульфурон, C – метрибузин, D – пиноксаден, E – прометрин. Масштаб условный.

применении выступают важными задачами продовольственной безопасности. Очевидно, что традиционный метод случайного отбора при создании нового пестицида не может соответствовать требованиям современной эпохи, что делает еще более важным постоянное изучение достижений в смежных областях [16]. Благодаря геномике, протеомике, технологиям биоинформатики и биохимии идентифицировано множество структур потенциальных молекулярных мишеней для высокоактивных пестицидов [17]. Набирают популярность методы структурно-ориентированного молекулярного дизайна и оптимизации при разработке и изучении механизмов действия пестицидов.

Цель исследований – выявление молекулярных механизмов связывания гербицидов с белками-мишенями сорных трав, произрастающих в Сибири.

Методика. Работу выполняли в 2022–2023 гг. Изучали следующие 5 гербицидов: пиноксаден (pinoxaden), квизалофоп-P-тефурил (quizalofop-P-tefuryl), прометрин (prometryn), метрибузин (metribuzin), метсульфурон-метил (metsulfuron-methyl). Выбор был сделан на основе информации из опытно-производственных хозяйств Новосибирской области, где преапараты на основе перечисленных действующих веществ применяют для борьбы с сорными травами в основном при выращивании картофеля и злаковых культур.

Все они представляют собой довсходовые и послевсходовые синтетические гербициды, разработанные для борьбы с однолетними злаковыми и широколистными сорняками на различных сельскохозяйственных культурах. Пиноксаден это фенилпиразольный гербицид, ингибитор ACC и синтеза жирных кислот. Квизалофоп-П-тефурил относится к группе арилоксифеноксипропионатов, ингибитор ACC. Прометрин, метрибузин и метсульфурон-метил это триазины и их производные, фотосинтетические ингибиторы транспорта электронов на участке рецептора фотосистемы II.

Наибольшие проблемы для сельского хозяйства региона создают следующие сорные виды: ежовник обыкновенный (*E. crus-galli* (L.) P. Beauv), овсюг (*A. fatua* L.), щетинник сизый (*S. Pumila*), щетинник зеленый (*S. viridis* (L.) P. Beauv), пырей ползучий (*Elymus repens* (L.) Gould), щирица запрокинутая (*Amaranthus retroflexus* L.), пикульник обыкновенный (*Galeopsis tetrahit* L.), марь белая (*C. album* L.), горец вьюнковый (*Fallopia convolvulus* (L.) Á. Löve). Для изучения отобрали виды, для которых белки были наиболее аннотированы в специализированных базах данных.

Данные об известных и потенциальных мишенях пестицидов брали из научной литературы и баз данных Pesticide Target Interaction Database [18] и Pesticide Properties DataBase [19]. В научной литературе представлено мало информации о мишенях исследуемых гербицидов. Сведения о структурно-функциональном устройстве белков были взяты из базы данных UniProtKB (*https://www.uniprot.org/*). В базе осуществляли поиск структур ACC (EC 6.4.1.2) для *E. repens* и *A. fatua* (L.), ALS (EC 2.2.1.6) для *A. fatua* (L.), *A. retroflexus* (L.) и *C. album* (L.), CYP450 и 4-гидроксифенилпируват диоксигеназы (HPPD, EC 2.2.1.6) для *S. viridis* (L.) P. Beauv (табл. 1).

Моделирование образования комплексов белок-гербицид требует знания примерного расположения полости лиганд-связывающего сайта белков-мишеней. Для их поиска вначале были смоделированы виртуальные модели пиноксадена, квизалофоп-P-тефурила, прометрина, метрибузина и метсульфурон-метила (рис. 1).

Далее для осуществления докинга лигандов с их непосредственными мишенями была разработана авторская методика прогнозирования лиганд-связывающих сайтов белков-мишеней, совмещающая в себе предсказание их полостей алгоритмом P2Rank (PrankWeb) и последующую валидацию этих результатов BLAST-выравниванием референсных белков с аннотирован-

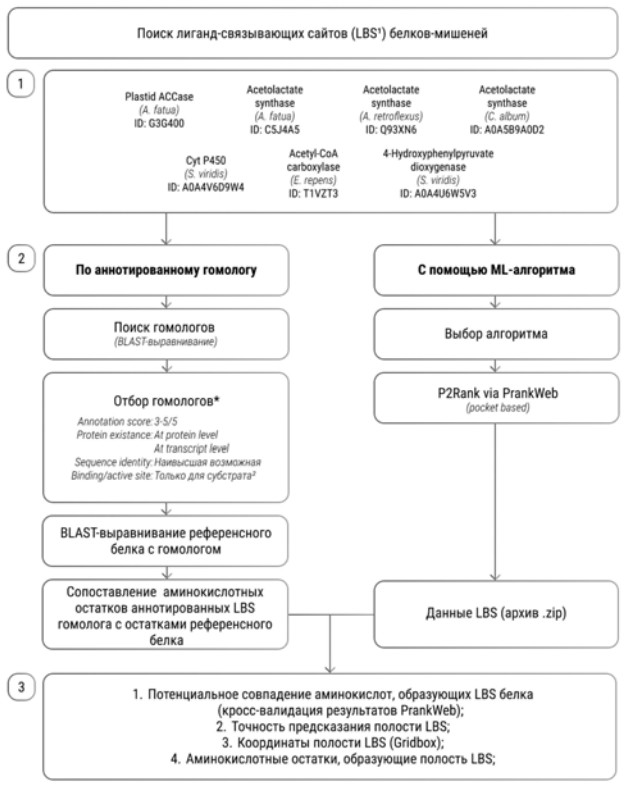
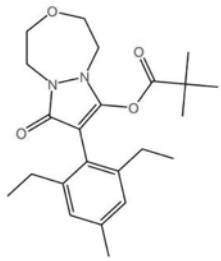
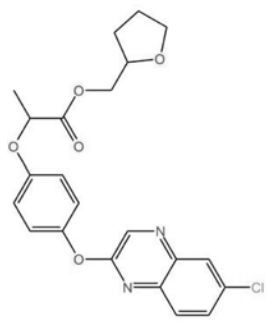
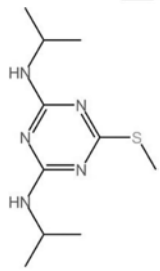
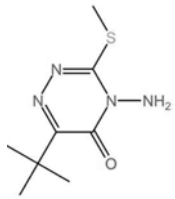
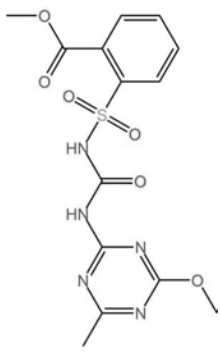


Рис. 2. Общая схема алгоритма поиска лиганд-связывающих сайтов белков-мишеней (*представленные общие критерии отбора гомологочных белков в отдельных случаях корректировались за неимением гомологов, отвечающих требованиям; 1 – от англ. – ligand-binding site; 2 – сайты, связывающие ионы и кофакторы не учитывались, за исключением отдельных случаев).

ными гомологичными структурами. Эта методика (рис. 2) позволяет оптимизировать вычисления и повышать точность результатов прогнозирования.

Метод аннотированных гомологов (см. рис. 2, слева) основан на подборе более аннотированной гомологичной структуры с использованием BLAST-выравнивания по аминокислотной последовательности белков (выполнено на ресурсе UniProtKB). Сначала проводили глобальное выравнивание для поиска пула гомологичных структур, а затем из них отбирали белки по нескольким критериям: значение очков аннотации (annotation score) – в переделах 3–5/5; наличие белка (protein existence) – подтверждается на уровне протеома/транскриптома; идентичность последовательности (sequence identity) – наивысшая из предложенных (при удовлетворении остальных критериев); наличие связывающих сайтов (binding site) субстрата (ионные и ко-факторные LBS не учитывали). В некоторых случаях гомологи, удовлетворяющие перечисленным параметрам, найти не удавалось, поэтому критерии корректировали в соответствии с имеющимися структурами. Так, для гомолога ID B9FK36 был скорректирован только параметр «protein existance» на «inffered from homology». Для гомолога ID Q6K2E8 скорректирован критерий отбора LBS (взяты сайты, которые связывают тиаминдифосфат и флавинамидаденин динуклеотидфосфат). Гомолог ID P17597 был выбран в связи с тем, что в аннотации

Табл.1. Мишени гербицидов

Гербицид, группа веществ	Формула	Мишень	Выбранный вид сорняка
Пиноксаден, фенилпиразолы		ACC [20], ALS [21]	овсюг *A. fatua* (L.)
Квизалофоп-П-тефурил, арилоксифеноксипропионаты		ACC [22]	пырей ползучий *E. repens* (L.) Gould
Прометрин, триазины		CYP450 [23]	щетинник зеленый *S. viridis* (L.) P. Beauv
Метрибузин, триазаины		HPPD [24]	щетинник зеленый *S. viridis* (L.) P. Beauv
Метсульфурон-метил, производное сульфонилмочевины		ALS [25]	щирица запрокинутая *A. retroflexus* (L.), марь белая *C. album* (L.)

лиганд-связывающих сайтов кроме непосредственных субстратов имелось описание успешного взаимодействия этих сайтов с другими ингибиторами (имидазолиноном и сульфанилмочевиной).

Следующим этапом было локальное выравнивание и сопоставление аминокислот, аннотированных в качестве лиганд-связывающих сайтов, у гомологов и референсных структур. В случае если аннотированные гомологи белков отсутствовали, использовали только данные ML-алгоритма (машинное обучение, с англ. machine learning), так как использование случайного гомолога выдает малоинформативный результат при выравнивании по первичной структуре.

Метод ML-алгоритма для поиска лиганд-связывающего сайта белка основан на использовании web-сервера PrankWeb [26]. Он был выбран на основании нескольких критериев: высокоинформативный результат прогнозирования, открытый доступ к ресурсу, удобный интерфейс. Кроме того, авторы сервиса отмечают, что полостная модель поиска лиганд-связывающего сайта более эффективна (выдает больше верно определенных сайтов при сравнении с экспериментально установленными), в сравнении с аналогами, а также минимизирует прогнозирование случайных лиганд-связывающих аминокислотных остатков. Суть ML-алгоритма заключается в загрузке структуры референсного белка в pdb-формате и указании желаемой цепи. Выходной результат представляет собой архив с файлами, описывающими как числовые, так и графические данные. Среди полученных данных отбирали следующие параметры: ранг прогноза (отбирали наивысший); вероятность/точность прогноза (отбирали наивысшую); координаты центра молекулярной полости (Gridbox); аминокислоты, образующие эту молекулярную полость.

Применение двух разных методов определения лиганд-связывающих сайтов в рамках общей методологии основано на их взаимодополняющем характере. Аминокислотные остатки связывающего сайта, определенные методом гомологии, могут находиться в составе полости, спрогнозированной ML-алгоритмом, что в свою очередь служит дополнительным уточнением расположения лиганд-связывающего сайта.

На основе результатов поиска вычисляли координаты молекулярной полости потенциального связывающего сайта (Gridbox) для последующей стыковки.

Поскольку перед началом исследования невозможно было определить с какими аминокислотными остатками белка-мишени должен связаться лиганд, для моделирования химического взаимодействия и проверки аффинности потенциальных лигандов к выбранным мишеням выбран метод жесткого межмолекулярного слепого докинга. Для его реализации использовали специальные автономные программы AutoDock и MGLtools [27]. MGLtools (версия 1.5.6) представляет собой графический интерфейс, облегчающий работу с AutoDock (версия 4.2).

На первом этапе белок-мишень загружали в рабочее поле MGLtools, удаляли остаточную воду и добавляли протон к аминокислотным остаткам в местах потенциальной связи с лигандами. На втором этапе добавляли лиганд и накладывали сетку (Gridbox) для указания области докинга. После указания координат сетки запускали процесс наложения сетки – в autogrid. Результатом наложения служила информация о структуре белка-мишени с указанием области стыковки. Третий этап заключался в проведении самого докинга. Для этого указывали мишень и лиганд, затем устанавливали количество попыток стыковки в указанной области (5 попыток для каждой области). По результатам докинга создался файл в dlg-формате с подробной информацией об образованных комплексах (координаты расположения комплекса, энергия связывания, среднеквадратичное отклонение атомов и др.).

Все полученные комплексы были сконструированы с использованием программного обеспечения для визуализации PyMol версии 2.5.4 [28], после чего импортированы и визуализированы в двухмерные и трехмерные изображения с использованием Discovery Studio Visualizer (версия v21.1.0.20298) [29].

Результаты и обсуждение. В ходе определения лиганд-связывающих сайтов были получены результаты двух категорий (табл. 2). К первой из них относятся координаты центра Gridbox, который представляет собой своеобразную полость в форме параллелепипеда, очерчивающую лиганд-связывающие сайты белков.

Ко второй категории относятся аминокислотные остатки, образующие полости лиганд-связывающих сайтов, которые перекрываются как по методу гомологии, так и с использованием ML-алгоритма. Перекрытие аминокислотных остатков было выявлено у 4 из 7 белков (около 57 %). Это связано с хорошей аннотацией гомологичных структур, а также с наличием относительно точных моделей белков в базе данных UniProtKB. Для трех белков установлено по одной перекрывающейся аминокислоте, для одного белка – две аминокислоты. Отрицательные результаты перекрытия для двух других белков в основном связаны с отсутствием аннотации сайтов связывания у гомологичных структур либо с отсутствием каких-либо гомологов в базе данных. Учитывая, что для двух белков аннотированных гомологов не найдено, результаты в целом подтверждают объективность и результативность разработанного подхода для биоинформатики.

Табл. 2. Результаты определения лиганд-связывающих сайтов белков-мишеней

Референсный белок, ID UniProtKB, вид сорняка	ID UniProtKB гомолога	Координаты центра полости лиганд-связывающего сайта (Gridbox)			Перекрывающиеся аминокислоты (Ам*, номер)
		x_cent	y_cent	z_cent	
ACC ID: G3G400 *A. fatua* (L.)	ID: B9FK36	10.759	-17.808	-6.127	—
ALS ID: C5J4A5 *A. fatua* (L.)	ID: Q6K2E8	-4.595	0.530	11.679	R,148
ACC ID: T1VZT3 *E. repens* (L.) Gould	ID: Q38970	-4.860	-4.956	-9.717	R,89
CYP450 ID: A0A4V6D9W4 *S. viridis*	отсутствует**	3.797	-0.702	-4.594	—
HPPD ID: A0A4U6W5V3 *S. viridis* (L.) P.Beauv	отсутствует**	-12.448	6.496	22.544	—
ALS ID: Q93XN6 *A. retroflexus* (L.)	ID: P17597	1.162	7.183	9.926	R,241
ALS ID: A0A5B9A0D2 *C. album* (L.)	ID: P17597	-12.354	5.431	1.396	D,373 W,570

**аминокислота референсного белка в формате fasta;*
***аннотированный гомолог отсутствует (координаты x, y, z были спрогнозированы ML-алгоритмом).*

Для каждого белка посредством PrankWeb было описано несколько молекулярных полостей (табл. 3), в том числе для ацетил-КоА карбоксилазы *A. fatua* (L.)–5 полостей, *E. Repens* (L.) Gould–3; ацетолактат синтаз *A. fatua* (L.)–4, *A. retroflexus* (L.)–3, *C. Album* (L.)–3; цитохрома P450 – 5; 4-гидроксифенилпируват диоксигеназы – 5 полостей. Для докинга отобрали полости с максимальной точностью прогноза.

Точность прогнозирования лиганд-связывающих сайтов составила 4,6…99,3 %, а количество аминокислотных остатков сайта равно 10…60. Для 4 из 7 мишеней точность превысила 38,8 %, что служит удовлетворительным результатом в рамках биоинформатических исследований. Наибольшие количество очков результата оценки и точность прогноза отмечены для CYP450 (ID A0A4V6D9W4, *S. viridis* (L.) P. Beauv), у которого ранее не обнаружили аннотированного гомолога. Более точное прогнозирование полости у CYP450 предположительно связано с консервативностью третичной структуры всего семейства цитохромов в результате чего алгоритму было проще решить задачу классификации. Кроме того, у исследуемого цитохрома полость находится в глубине молекулы, а доступ к ней возможен через канал.

Табл. 3. Характеристики полостей лиганд-связывающих сайтов, спрогнозированных ML-алгоритмом

Мишень, ID UniProtKB, вид сорняка	Ранг полости	Очки результата оценки (score function result)	Точность прогноза, %	Количество аминокислотных остатков полости сайта связывания (aminoacid position)
ACC ID: G3G400 *A. fatua* (L.)	1	2.08	4,6	10
ALS ID: C5J4A5 *A. fatua* (L.)	1	5.23	25,5	20
ACC ID: T1VZT3 *E. repens* (L.) Gould	1	8.30	48,8	12
CYP450 ID: A0A4V6D9W4 *S. viridis* (L.) P.Beauv	1	78.36	99,3	60
HPPD ID: A0A4U6W5V3 *S. viridis* (L.) P.Beauv	1	17.31	79,8	17
ALS ID: Q93XN6 *A. retroflexus* (L.)	1	6.89	38,8	18
ALS ID: A0A5B9A0D2 *C. album* (L.)	2	3.85	15,8	16

На основании спрогнозированных молекулярных карманов, было проведено моделирование межмолекулярных взаимодействий (табл. 4), в результате которого были получены комплексы лиганд-рецептор.

Моделирование показало, что минимальная энергия связывания варьирует от –5,60 до –13,24 ккал/моль. Такие значения указывают на высокую стабильность всех смоделированных комплексов гербицид-фермент. Это можно объяснить положением лиганда в относительно полипептидной цепи мишени и нулевым значением среднеквадратичного отклонения атомов лиганда.

Табл. 4. Результаты межмолекулярного взаимодействия

Рецептор, ID UniProtKB, вид сорняка	Лиганд	Ранг конформации	Минимальная энергия связывания (ккал/моль)
ACC ID: G3G400 *A. fatua* (L.)	пиноксаден	1	-7,81
		2	-7,40
		3	-7,01
ALS ID: C5J4A5 *A. fatua* (L.)		1	-9,83
		2	-9,43
		3	-8,78
ACC ID: T1VZT3 *E. repens* (L.) Gould	квизалофоп-П-тефурил	1	-7,30
		2	-6,09
		3	-5,60
CYP450 ID: A0A4V6D9W4 *S. viridis* (L.) P.Beauv	прометрин	1	-6,31
HPPD ID: T1VZT3 *S. viridis* (L.) P.Beauv	метрибузин	1	-7,68
ALS ID: Q93XN6 *A. retroflexus* (L.)	метсульфурон-метил	1	-13,24
		2	-12,27
ALS ID: A0A5B9A0D2 *C. album* (L.)		2	-10,45
		3	-9,85
		4	-9,73

Результаты расчета молекулярного взаимодействия показали, что фермент карбоксилаза подавляют разные гербициды, что можно объяснить особенностями конформации. Ранее было отмечено, что конформация аминокислотных остатков, как близких, так и удаленных от сайта связывания гербицидов, адаптируется для связывания различных химических классов таких соединений [30].

Предположительно прометрин, метрибузин и метсульфурон-метил, разработанные в качестве фотосинтетических ингибиторов транспорта электронов на участке рецептора фотосистемы II, способны также выражено подавлять активность таких ферментов, как CYP450, HPPD, ALS. В частности, схожие результаты получены по взаимодействию метсульфурон-метила и дрожжевой ALS (считается высококачественной моделью растительного фермента). При исследовании этого кристаллического комплекса показано, что ароматическое кольцо способно к небольшому перемещению из стороны в сторону, но мостик из сульфонилмочевины плотно прилегает к окружающему карману мишени [31].

Согласно расчетам докинга, смоделированные комплексы обладают высокой потенциальной стабильностью, которая обусловлена такими взаимодействиями, как силы Ван-дер-Ваальса, водородные и гидрофобные связи

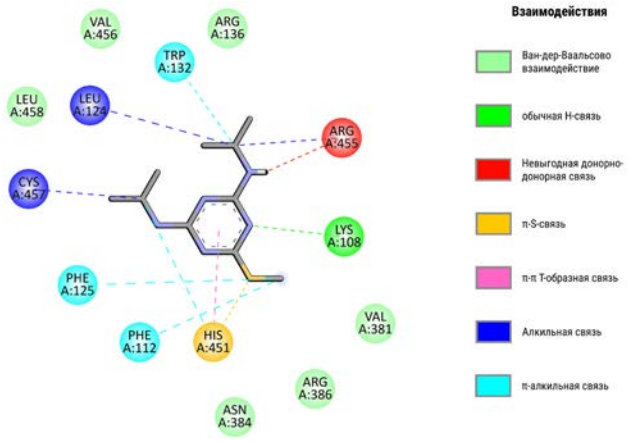


Рис. 3. Пример двухмерной визуализации комплекса прометрин-CYP450.

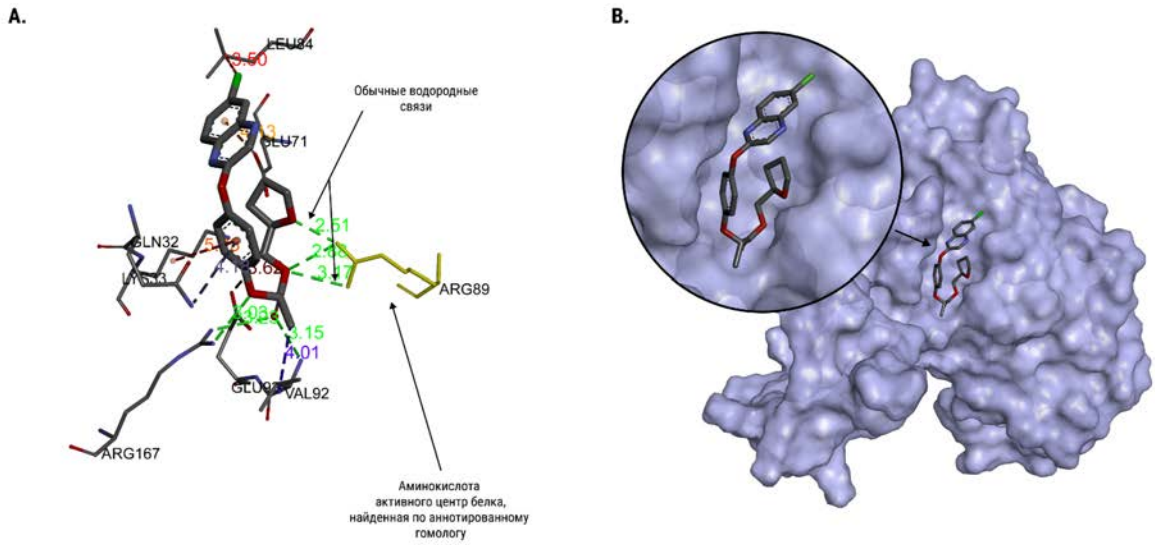


Рис. 4. Пример визуализации комплекса ACC и квизалофоп-П-тефурил в трехмерном пространстве: А – лиганд и аминокислотные остатки (ARG89 и др.) белка-мишени, участвующие в связывании (цифрами показана длина связи в ангстремах), В – общий вид комплекса с отображением общей молекулярной поверхности белка-мишени.

(рис. 3 и 4). Это косвенно подтверждает сильный ингибирующий эффект исследуемых гербицидов и согласуется с экспериментальными данными из литературы. Гербициды показали потенциал ингибирования ферментов в основном благодаря образованию прочных взаимодействий между боковыми цепями аминокислот. Полученные результаты можно считать относительно объективными, поэтому их могут использовать и другие исследователи в своих биоинформатических экспериментах.

Выводы. Предложенный подход выявления параметров полости сайтов связывания *in silico*, который заключается в совмещении метода выравнивания и технологии машинного обучения, можно использовать для выяснения поведения гербицидов при связывании с ферментами сорняков с точностью прогноза до 99,3 %.

Исследованные комплексы гербицидов и белков обладают потенциальной высокой стабильностью ввиду низкой энергии связывания с рецепторами, которая варьирует от –5,60 до –13,24 ккал/моль. Величина энергии связывания не показала прямой зависимости от количества аминокислотных остатков лиганд-связывающего сайта.

В целом исследование дополнило некоторые аспекты молекулярных механизмов связывания гербицидов с белками-мишенями сорных трав, однако требуется проведение более глубокого изучения с целью локализации критических аминокислотных точек, участвующих в биологических функциях белков-мишеней.

Литература

1. *Chauhan B. S. The world's first glyphosate-resistant case of Avena fatua L. and Avena sterilis ssp. ludoviciana (Durieu) Gillet & Magne and alternative herbicide options for their control // PLOS ONE. 2022. Vol. 17. No. 1. P. 1–10. URL : https ://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0262494 (дата обращения : 10.01.2023). doi : 10.1371/journal.pone.0262494.*
2. *Biological efficacy of the inhibitor herbicides of acetyl coenzyme a carboxylase and acetolactate synthase and the presence of resistance in Echinochloa crus-galli (L.) Beauv / J. Bolaños-Jiménez, E. Uscanga-Mortera, J. Antonio Tafoya-Razo, et al. // Agrociencia. 2018. Vol. 52. No. 5. P. 713–723.*
3. *Peppers J., Gonçalves C., McElroy J. Rate response of select grass weeds to pinoxaden // Weed Technology. 2020. Vol. 34. No. 6. P. 818–823. doi : 10.1017/wet.2020.65.*
4. *Isoxaflutole and metribuzin interactions in isoxaflutole-resistant soybean / A. Smith, N. Soltani, A. Kaastra, et al. // Weed Science. 2019. Vol. 67. No. 5. P. 485–496. doi : 10.1017/wsc.2019.25.*
5. *Effect of irrigation, pre and post-emergence herbicides on Chenopodium album in wheat (Triticum aestivum L.) / K. Lakra, P.K Kumar., K. Husain, et al. // Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2021. Vol. 10. No. 1. P. 2757–2760. doi : 10.2227I/phyto.2021.v10.i1am.13773.*
6. *Tewari A. N., Rathi K. S., Singh B. Efficacy of metsulfuron methyl on associated weeds in wheat (Triticum aestivum) // Indian Journal of Agricultural Sciences. 1998. Vol. 68. No. 2. P. 121–122.*
7. *Effect of metsulfuron-methyl against broad leaf weeds in wheat (Triticum aestivum L. emend. Fiori and Paol.) / R. K. Singh, S. K. Verma, S. K. Prasad, et al. // Journal Crop and Weed. 2015. Vol. 11 (Special Issue). P. 161–166.*
8. *Bio-ionic Liquids as Adjuvants for Sulfonylurea Herbicides / K. Marcinkowska, T. Praczyk, B. Łęgosz, et al. // Weed Science. 2018. Vol. 66. No. 3. P. 404–414. doi : 10.1017/wsc.2017.85.*
9. *Mechanism of resistance to ACCase-inhibiting herbicides in wild oat (Avena fatua) from Latin America / H. Cruz-Hipolito, M. D. Osuna, J. A. Dominguez-Valenzuela, et al. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011. Vol. 59. No. 13. P. 7261–7267. doi : 10.1021/jf201074k.*
10. *Characterisation of Avena fatua populations with resistance to multiple herbicides / B. K. Keith, E. A. Lehnhoff, E. E. Burns, et al. // European Weed Research Society. 2015. Vol. 55. No. 6. P. 621–630. doi :10.1111/wre.12172.*
11. *First report on assessing the severity of herbicide resistance to ACCase inhibitors pinoxaden, propaquizafop and cycloxydim in six Avena fatua populations in Ireland / V. B. Alwarnaidu Vijayarajan, P. D. Forristal, S. K. Cook, et al. // Agronomy. 2020. Vol. 10. No. 9. P. 1–13. URL : https ://www.mdpi.com/2073–4395/10/9/1362 (дата обращения : 10.01.2023). doi : 10.3390/agronomy10091362.*
12. *The occurrence of herbicide-resistant Avena fatua (wild oats) populations to ACCase-inhibiting herbicides in Ireland / R. Byrne, A. V. Vijaya Bhaskar, J. Spink, et al.*

// Irish Journal of Agricultural and Food Research. 2021. Vol. 60. No. 1. P. 59–64. doi :10.15212/ijafr-2020–0127.

13. *A novel mutation Asp-2078-Glu in ACCase confers resistance to ACCase herbicides in barnyardgrass (Echinochloa crus-galli) / J. Fang, Z. He, T. Liu, et al. // Pesticide Biochemistry and Physiology. 2020. Vol. 168. No 104634. P. 1–8. URL : https ://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048357520301292 (дата обращения : 10.01.2023). doi : 10.1016/j.pestbp.2020.104634.*
14. *Metabolic Resistance to Acetyl-CoA Carboxylase-Inhibiting Herbicide Cyhalofop-Butyl in a Chinese Echinochloa crus-galli Population / Q. Yang, X. Yang, J. Zhu, et al. // Agronomy. 2022. Vol. 12. No. 2724. P. 1–9. URL : https ://www.mdpi.com/2073–4395/12/11/2724 (дата обращения : 10.01.2023). doi : 10.3390/agronomy12112724.*
15. *Effects of pre-emergence applications of flufenacet plus metribuzin on weeds and soybean (Glycine max) / N. Soltani, B. Deen, S. Bowley, et al. // Crop Protection. 2005. Vol. 24. No. 6. P. 507–511. doi : 10.1016/j.cropro.2004.09.018.*
16. *Zhao W., Huang Y., Hao G. Pesticide informatics expands the opportunity for structure-based molecular design and optimization // Advanced Agrochem. 2022. Vol. 1. No. 2. P. 139–147. doi : 10.1016/j.aac.2022.11.006.*
17. *Review on Structures of Pesticide Targets / X. Li, X. Yang, X. Zheng, et al. // International Journal of Molecular Sciences. 2020. Vol. 21. No. 19. P. 1–6. URL : https ://www.mdpi.com/1422–0067/21/19/7144 (дата обращения : 10.01.2023). doi : 10.3390/ijms21197144.*
18. *PTID : an integrated web resource and computational tool for agrochemical discovery / Gong J., Liu X., Cao X., et al. // Bioinformatics. 2013. Vol. 29. No 2. P. 292–294. doi :10.1093/bioinformatics/bts651.*
19. *An international database for pesticide risk assessments and management / K. A. Lewis, J. Tzilivakis, D. Warner, et al. // Human and Ecological Risk Assessment : An International Journal. 2016. Vol. 22. No. 4. P. 1050–1064. doi :10.1080/10807039.2015.1133242.*
20. *Yu L. P., Kim Y. S., Tong L. Mechanism for the inhibition of the carboxyltransferase domain of acetyl-coenzyme A carboxylase by pinoxaden // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010. Vol. 21. No. 107. P. 22072–22077. doi : 10.1073/pnas.1012039107.*
21. *Kuk Y. I., Bugos N. R. Cross-resistance profile of mesosulfuron-methyl-resistant Italian ryegrass in the southern United States // Pest Management Science. 2007. Vol. 63. No. 4. P. 349–357.*
22. *Kinetics of the two forms of acetyl-CoA carboxylase from Pisum sativum / L. Dehaye, C. Alban, C. Job, et al. // European Journal of Biochemistry. 1994. Vol. 225. No 3. P. 1113–1123.*
23. *Role of Cytochrome P450 enzymes in plant stress response / B. A. Pandian, R. Sathishraj, M. Djanaguiraman, et al. // Antioxidants (Basel). 2020. Vol. 9. No. 5, P. 1–15. URL : https ://www.mdpi.com/2076–3921/9/5/454 (дата обращения : 10.01.2023). doi :10.3390/antiox9050454.*
24. *Activity of mesotrione on resistant weeds in maize / P. Sutton, C. Richards, L. Buren, et al. // Pest Management Science. 2002. Vol. 58. No. 9. P. 981–984. doi : 10.1002/ps.5.*
25. *Expression of acetohydroxyacid synthase isozyme genes ilvBN, ilvGM, ilvIH and their resistance to AHAS-inhibitor herbicides / J. Shen, Y. Li, X. Huang, et al. // Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2009. Vol. 25. No. 7. P. 1007–1013.*
26. *PrankWeb : a web server for ligand binding site prediction and visualization / L. Jendele, R. Krivak, P. Skoda, et al. // Nucleic Acids Research. 2019. Vol. 2. No. 47 (W1). P. 345–349. doi : 10.1093/nar/gkz424.*
27. *Autodock4 and AutoDockTools4 : automated docking with selective receptor flexibility / G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, et al. // Journal Computational Chemistry. 2009. Vol. 30. No. 16. P. 2785–2791. doi : 10.1002/jcc.21256.*
28. *Schrödinger L., DeLano W. PyMOL. 2020. URL : http ://www.pymol.org/pymol (дата обращения : 01.12.2022).*
29. *BIOVIA, Dassault Systèmes, Discovery Studio Visualizer. San Diego : Dassault Systèmes, 2020. URL : https ://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download (дата обращения : 01.12.2022).*
30. *Crystal structure of plant acetohydroxyacid synthase, the target for several commercial herbicides / M. D. Garcia, J.-G. Wang, T. Lonhienne, et al. // FEBS Journal. 2017. Vol. 284. P. 2037–2051. doi : 10.1111/febs.14102.*
31. *Elucidating the specificity of binding of sulfonylurea herbicides to acetohydroxyacid synthase / J. A. McCourt, S. S. Pang, L. W. Guddat, et al. // Biochemistry. 2005. Vol. 44. No 7. P. 2330–2338. doi : 10.1021/bi047980a.*

Поступила в редакцию 05.02.2023
После доработки 14.03.2023
Принята к публикации 11.04.2023