

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики
Доцент Нипорко Олексій Юрійович
Протокол № _____ засідання кафедри
від “ _____ ” _____ 20__ р.

**Структурні механізми цитохром-опосередкованої стійкості
вищих рослин до диклофопметилу**

Випускна кваліфікаційна робота
бакалавра студента спеціальності
091 Біологія
ОП Біологія (високі технології)
Мусієнка Андрія Максимовича

Науковий керівник
доцент кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики
Нипорко Олексій Юрійович

Оцінка захисту роботи

Зміст.

Перелік умовних позначень	3
Вступ	4
РОЗДІЛ.1 МЕТАБОЛІЗМ ГЕРБІЦИДІВ ЗА УЧАСТІ РОСЛИННИХ ФЕРМЕНТІВ P450, ЯК ПОДОЛАННЯ РОЗВИТКУ РЕЗИСТЕНТНОСТІ	6
1.1. Механізми резистентності рослин до сучасних гербіцидів	6
1.2. Стійкість до гербіцидів на цільовій ділянці (TSR)	8
1.3. Стійкість до гербіцидів за межами цільової ділянки (NTSR)	9
1.4. Глутатіон S-трансферази (GST)	10
1.5. Монооксигенази цитохрому P450. Будова ферментів цитохрому P450	11
1.6. Номенклатура цитохромів P450	12
1.7. Класифікація цитохромів P450	13
1.8. Функції ферментів цитохрому P450	14
1.9. Роль рослини P450s в метаболізмі ендогенних сполук	16
1.10. Роль рослини P450s в метаболізмі екзогенних сполук. Метаболізм гербіцидів	17
1.11. Синергісти та інгібітори P450	20
1.12. Сейфери та індуктори P450	20
1.13. Диклофопметил	21
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	23
2.1. Об'єкт дослідження	23
2.2. Оптимізація та молекулярна динаміка	25
2.3. Етапи виконання молекулярної динаміки для обраних цитохромів. ...	25
2.4. Етапи виконання молекулярної динаміки для комплексів цитохром-ліганд	27
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ ...	31
3.1 Аналіз зав'язків у сайтах зв'язування для 1 та 2 варіантів	31
3.2 Аналіз результатів молекулярної динаміки	37
ВИСНОВКИ	41
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	42
ДОДАТОК	47

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

PS II – інгібітори фотосистеми II

EPSP – інгібітори 5-енолпірувілшикімат-3-фосфату

ALS – інгібітори

ALS/AHAS – гербіцидні інгібітори ацетолактату/ацетогідроксикислоти
синтазу

TRS – механізм стійкості до гербіцидів на цільовій ділянці

NTSR – механізм стійкості до гербіцидів за межами цільової ділянки

GTs – глюкозилтрансферази

GST – глутатіон S-трансферази

GSH – трипептид глутатіон

AmGSTF1 – глутатіон трансфераза

CPR – редуктаза

FAD – флавінаденіндинуклеотид

FMN – флавінмононуклеотид

SoA – місця дії гербіцидів

Ключові слова: цитохром, метаболізм, резистентність, гербіцид, монооксигенази, диклофопметил, молекулярна динаміка.

ВСТУП

Людство займається землеробством понад 10 000 років. Присутність рослин-шкідників (бур'яни) поряд з сільськогосподарською рослинністю спостерігається з тих пір, як перші фермери посадили перше насіння. Найбільш очевидна проблема викликана бур'янами - це зниження врожайності через пряму конкуренцію за світло, простір, поживні речовини та воду. Тому методи боротьби з бур'янами спрямовані на зниження конкурентоспроможності їх у посівах та запобігання проблем з ними у майбутньому врожаї. Технології боротьби з небажаною рослинністю еволюціонували від ручної прополки до примітивних мотиків (6000 до н.е.), знарядь з упряжними тваринами (1000 до н.е.), механічних знарядь (1920 р. н.е.), біологічної боротьби (1930 р. н.е.) та хімічної (гербіцидної) боротьби (1947 р.) [1]. Деякі методи були скасовані через кілька років, а інші все ще ухвалюються, наприклад, біоконтроль. Застосування гербіцидів є одним із методів, який досі залишається довговічним та ефективним. Гербіциди часто є найбільш надійним і найменш дорогим методом боротьби з бур'янами, особливо на великих полях, і успіх гербіцидів значною мірою відповідає за рясне та стійке виробництво продуктів харчування, необхідних для підтримки населення світу. Ефективність та економічність гербіцидів призвели до того, що розвинені країни стали надзвичайно сильно покладатися на них. Тим не менш, існують деякі реальні та передбачувані проблеми з гербіцидами. В останні роки зростає занепокоєність щодо впливу залишкової кількості гербіцидів на вирощені харчові продукти, і також їх несприятливого впливу на навколишнє середовище та широкого поширення стійкості шкідників до них. Стійкість до гербіцидів розвинулася завдяки постійному відбору гербіцидів, що впливає на великі популяції бур'янів на значних територіях [1,2]. Механізми стійкості до гербіцидів зазвичай поділяють на дві категорії: стійкість до гербіцидів на цільовій та нецільовій ділянках. Стійкість до гербіцидів на цільовій ділянці викликається мутацією в цільовому ферменті для зв'язування гербіциду або надвиробництвом цільового ферменту. Опір нецільового сайту включає механізми такі як зниження поглинання або перенесення гербіцидів, посилення секвестрації гербіцидів або посилення метаболізму гербіцидів, що зводить до мінімуму, кількість активного гербіциду, що досягає цільової ділянки. Серед цих механізмів посилений метаболізм гербіцидів, безперечно, є найбільш вивченим аспектом стійкості на нецільових ділянках. Хоча відомо, що кілька ферментів беруть участь у метаболізмі гербіцидів: ендогенні монооксигенази цитохрому P450, глюкозилтрансферази (ГТ) та глутатіон-S-трансферази (ГСТ) мають найбільшу актуальність. Зокрема, монооксигенази цитохрому P450 є важливим фактором підвищеного метаболізму гербіцидів у бур'янів. З точки зору боротьби з рослинами-шкідниками, стійкість до гербіцидів на нецільових

ділянках часто становить найбільш велику загрозу для врожаю, бо це часто призводить до стійкості до багатьох гербіцидів різних хімічних класів та різних способів дії [2, 3-7]. Таким чином, метою даної роботи є **виявлення механізмів цитохром-опосередкованої стійкості вищих рослин до диклофопметилу.**

РОЗДІЛ 1.

МЕТАБОЛІЗМ ГЕРБІЦИДІВ ЗА УЧАСТІ РОСЛИННИХ ФЕРМЕНТІВ P450, ЯК ПОДОЛАННЯ РОЗВИТКУ РЕЗИСТЕНТНОСТІ

1.1. Механізми резистентності рослин до сучасних гербіцидів

З моменту появи 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти (2,4-Д) як першого селективного гербіциду у 1947 році, гербіциди надали значний поштовх у напрямок розвитку хімічних методів боротьби з бур'янами. На жаль, стійкість до гербіцидів розвинулася незабаром після їх застосування. Феномен резистентності можна визначити як зниження реакції популяції виду на один або кілька гербіцидів. Крім того, опір до дії гербіциду можна визначити як «успадкування здатності виживати після обробки», а також «явище, яке відбувається в результаті спадкових змін біохімічних процесів, що дозволяють бур'янам виживати після обробці гербіцидом» [7]. Стійкість бур'янів до гербіцидів є нормальним та передбачуваним результатом природного відбору. У цьому контексті рідкісні мутації, що надають стійкості, існують у дикорослих/бур'янистих рослин і до внесення будь-яких гербіцидів. Дані мутації збільшуються з часом після кожного застосування гербіцидів до тих пір, поки вони не стануть переважаючими, коли популяцію називають резистентною [8]. Першим підтвердженим стійким до гербіцидів бур'яном був *Senecio vulgaris*, у якого розвинулася резистентність до інгібіторів PS II (атразин і симазин) після застосування гербіцидів один або два рази на рік протягом 10 років [9]. Деякі види бур'янів, такі як *Lolium Rigidum*, *Echinochloa crus-galli* var. *crus-galli*, *Poa annua*, *Alopecurus myosuroides*, *Echinochloa colona*, *Eleusine indica* або *Amaranthus* sp., мають високу схильність до розвитку резистентності, особливо через їхню вроджену генетичну мінливість. В даний час стійкість до гербіцидів зареєстрована у 510 біотипах бур'янів серед 262 видів бур'янів (152 дводольних та 110 однодольних) у 70 країнах (Рис.1.1). Найбільша кількість підтверджених стійких видів бур'янів належить до родин: Poaceae (82 види), Asteraceae (42), Brassicaceae (22), Cyperaceae (12), Amaranthaceae (11), Scrophulariaceae (9), Chenopodiaceae (7), Alismataceae (7), Polygonaceae (8) і Caryophyllaceae (6) (Діаграма 2). Чимало таких сімей є стійкими до інгібіторів ацетолактатсинтази (ALS), інгібіторів фотосистеми II (PS II), інгібіторів ацетил-КоА-карбоксилази (ACCCase) та інгібіторів 5-енолпірувілшикімат-3-фосфату (EPSP) (Рис. 1.3).

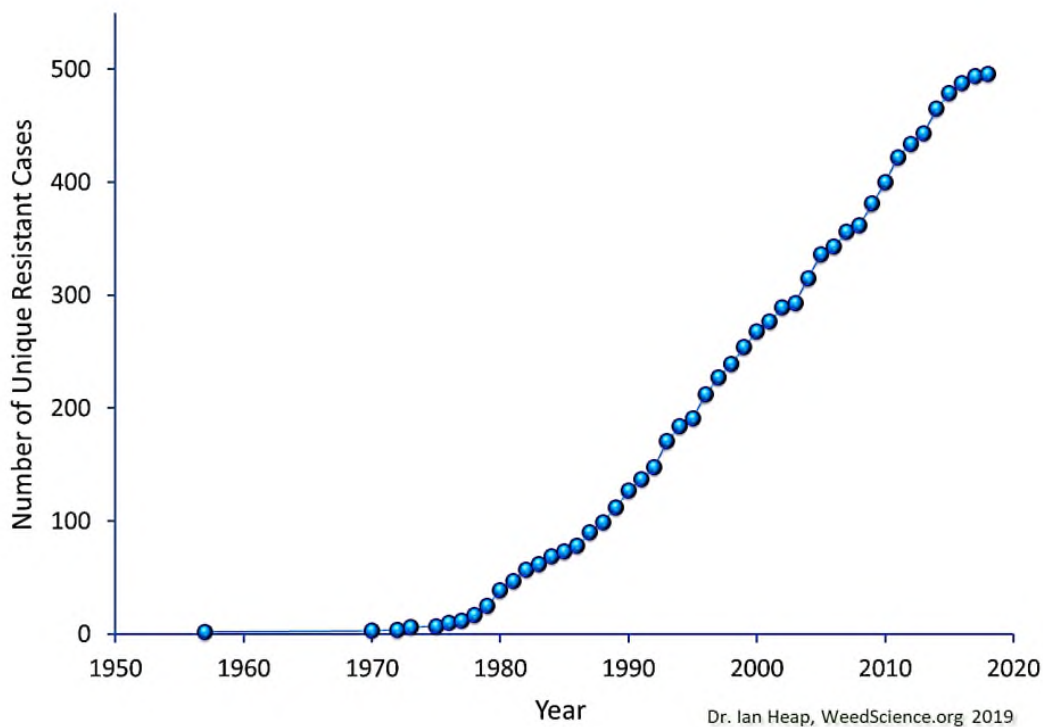


Рис. 1.1. Еволюція біотипів бур'янів, стійких до гербіцидів, за роками з 1955 по 2019 рр. (from <http://weedsicence.org>, February 2020).

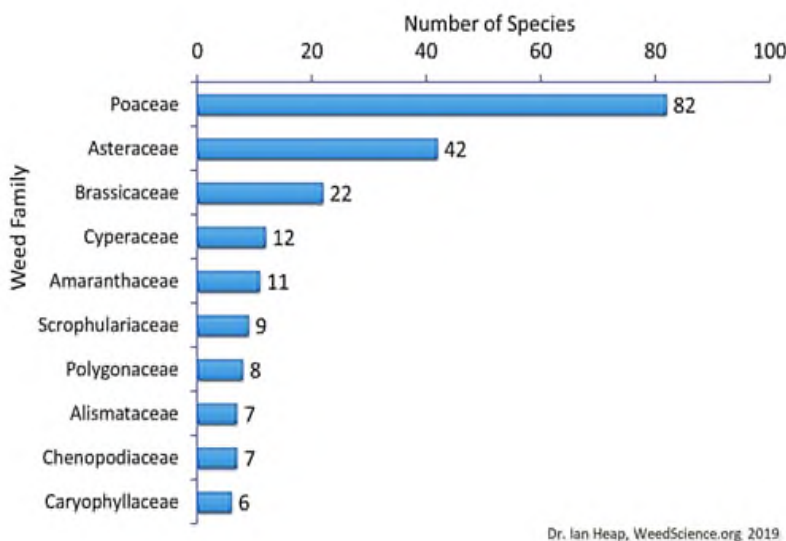


Рис.1.2. Кількість стійких до гербіцидів видів у найбільш поширених родин бур'янів (from <http://weedsicence.org>, February 2020).

Гербіциди з різними механізмами дії (наприклад, сульфонілсечовина та синтетичні ауксини) можуть значною мірою відрізняються за рівнем ризику розвитку резистентності. Однак різні хімічні групи з таким самим механізм дії,

як гербіцидні інгібітори ацетолактату/ацетогідроксикислоти синтазу (ALS/AHAS) також можна розрізнити за рівнем ризику розвитку резистентності.

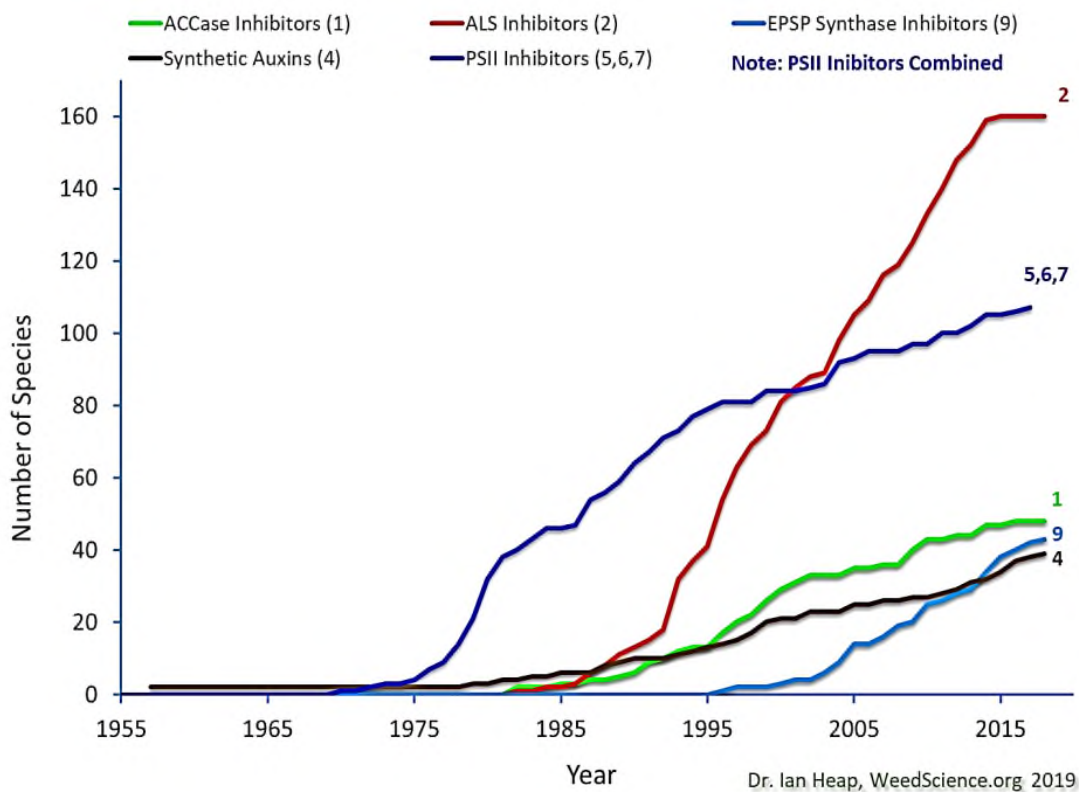


Рис.1.3. Кількість стійких до дії гербіцидів видів бур'янів за механізмом TSR з 1955 по 2019 р. (from <http://weedsicence.org>, February 2020)

1.2. Стійкість до гербіцидів на цільовій ділянці (TSR)

Як вже зазначалося, існує два типи механізмів резистентності: резистентність до сайту-мішені та резистентність до нецільового сайту.

Стійкість до цільового сайту може бути викликана змінами тривимірної структури цільового білка гербіциду, які зменшують зв'язування гербіциду через підвищення активності цільового білка або збільшенням експресії гена, що кодує цільовий білок. Мутації, що наділяють TRS, можна класифікувати на два типи.

Перший тип є зміною послідовності ДНК, що кодує цільовий білок. Вважається, що такі мутації спричиняють структурну модифікацію тривимірної структури мішені, що призведе до зниження ефективності гербіциду або підвищення активності мішені.

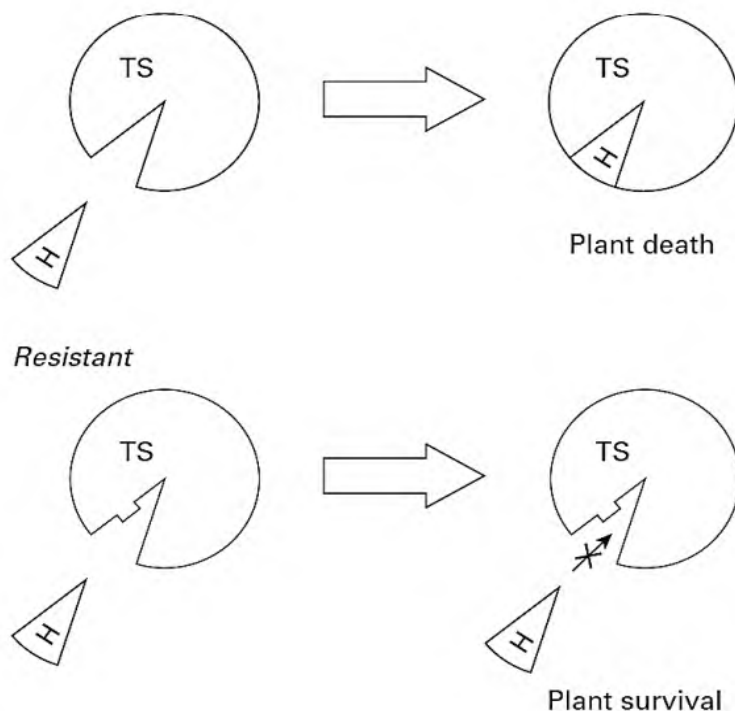


Рис.1.4. Схематичне зображення одного з механізмів резистентності цільового сайту.

Наприклад, мутації, що призводять до заміни амінокислот у місці зв'язування гербіциду цільового білка, можуть зменшити спорідненість гербіциду до цільового білка (Рис.4). У разі структурних змін у мішені, пошук причини стійкості зводиться до виявлення та ідентифікації відповідних мутацій у гені, що кодує мішень, і пов'язаних з ними структурних змін в білку стійких рослин. Другий тип мутацій призводить до різниці в експресії одного або кількох генів у стійких рослин у порівнянні з чутливими або через модифікацію некодуючої послідовності гена, що кодує мішень, або через мутацію регуляторного гена [10,11]. Дані мутації являють собою зміни в послідовності ДНК, які можуть викликати збільшення експресії цільового білка, який компенсує інгібуючу дію гербіциду.

1.3. Стійкість до гербіцидів за межами цільової ділянки (NTSR)

Резистентність поза цільовою ділянкою зазвичай обумовлена зменшенням кількості активної сполуки, що досягає цільового білка, що викликана такими механізмами, як зниження абсорбції (проникнення), змінення транслокації, підвищення секвестрації гербіцидів або посилення метаболізму гербіцидів (детоксикація), коли гербіцид не досягає місця дії у достатній концентрації, щоб спричинити загибель рослин. Підвищений метаболізм гербіцидів є причиною більшості випадків стійкості за межами цільової ділянки. Таким чином, резистентність, заснована на метаболізмі,

найчастіше залежить від ендогенних ферментів рослин, таких як монооксигенази цитохрому P450, глікозилтрансферази (GTs) або глутатіон-трансферази (GSTs). Зокрема, монооксигенази цитохрому P450 (P450) найчастіше відповідальні за підвищений метаболізм гербіцидів у рослинах.

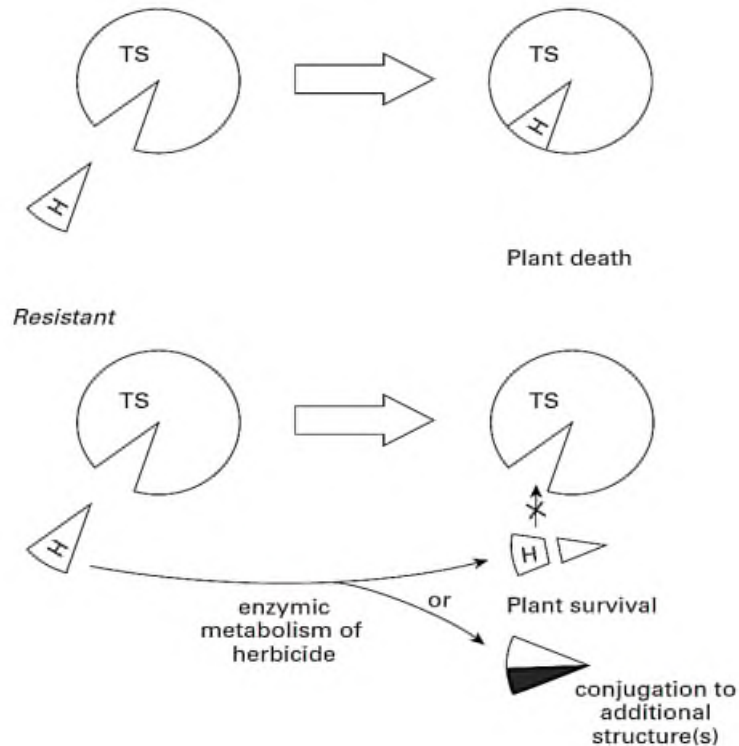


Рис.1.5. Схематичне зображення підвищеної метаболічної резистентності [12].

1.4. Глутатіон S-трансферази (GST)

Глутатіон-S-трансферази утворюють широко поширене суперсімейство гомо- або гетеродимерних білків, які відіграють істотну роль у детоксикації, метаболізмі та транспорті ксенобіотиків та ендогенних сполук [13]. Глутатіонтрансферази беруть участь у детоксикації гербіцидів у сільськогосподарських культурах та бур'янах шляхом кон'югації електрофільних гербіцидів з трипептидом глутатіоном (GSH) [13,14]. GST опосередковують стійкість до найпоширеніших гербіцидів, таких як імазамокс, фтордифен, атразин, хлормуронетил, трисульфуронметил, алахлор, S-етилдипропілтіокарбамат сульфоксид та метолахлор [14,15-17].

Наприклад, у роботі [18] повідомили про роль GST у стійкості *Alopecurus myosuroides* до феноксапроп-п-етилу.

Відомо, що GST-фермент безпосередньо відповідає за метаболізм мезотріону та атразину у резистентній популяції водяної коноплі [19]. Інше дослідження [15] ідентифікували GST, що бере участь у метаболізмі

інгібіторів ALS у резистентних популяціях *Lolium spp.* Але найкраща ілюстрація була надана авторами роботи [20], які розкрили пряму та центральну роль AmGSTF1 у детоксикації декількох гербіцидів, включаючи хлортолурун, алахлор та атразин, у *Alopecurus myosuroides*. У цій роботі було показано, що AmGSTF1-трансформований *A. thaliana* набуває толерантність до кількох гербіцидів.

1.5. Монооксигенази цитохрому P450. Будова ферментів цитохрому P450

Цитохроми P450 — це гемопротеїни, утворені з 400-500 амінокислотних залишків і простетичної групи заліза-протопорфірину IX (гем), розташованої в ядрі білка, що утворює активний центр (Рис.1.6). Білки P450 мають молекулярні маси від 45 до 62 кДа. Однак їх загальна тривимірна структура збережена, як і залишки, розташовані по обидва боки гему. Мотив Phe-x-x-Gly-x-Arg-x-Cys-x-Gly поблизу С-кінця є найбільш консервативною послідовністю в білках P450. Він включає цистеїн, який служить п'ятим лігандом до гемового заліза. Інший Ala/Gly-Gly-x-Asp-/Glu-Thr-Thr/Ser консенсус, розташований на ~150 залишків вище, відповідає місцю зв'язування кисню та активації в спіралі I на дистальній стороні гему. Кілька інших менш консервативних мотивів, таких як шарнір Pro-Pro-x-Pro біля N-кінця або послідовність Pro-Glu/Asp-Arg/HisPhe/Trp між спіраллю I та цистеїном, що зв'язує гем, зустрічаються у більшості білків групи P450. Ці збережені мотиви та їх розташування розглядаються як сигнатури для білків P450. Інші характеристики ферментів P450 включають залежність від O₂ та NADPH, інгібування окисом вуглецю, та інгібування антитілами, спрямованими проти редуктази P450 [21-24].

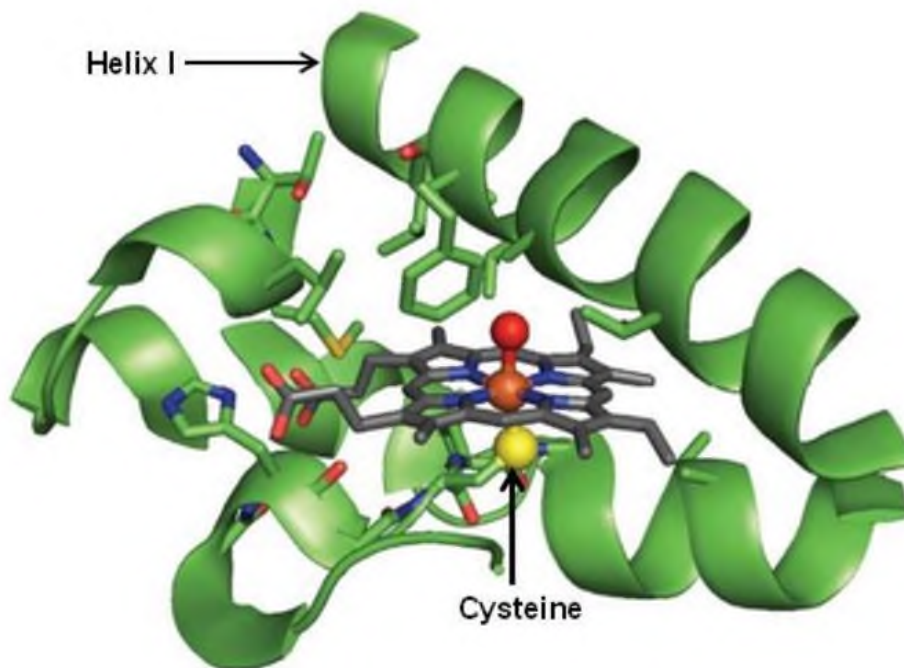


Рис.1. 6. Типова структура активного центру цитохрому P450 [25] . Білок представлений зеленим кольором. Гем представлений у паличках. Атоми кисню показані червоним, азоту – синім, а заліза – помаранчевим.

1.6. Номенклатура цитохромів P450

Номенклатура генів P450 для всіх організмів встановлюється на основі ідентичності послідовності білка та філогенезу. Термін CYP відноситься до гема, що містить білки, що характеризуються максимальною довжиною хвилі поглинання 450 нм у відновленому стані в присутності оксиду вуглецю. У стандартизованій номенклатурі P450 ферменти CYP позначаються літерами «CYP» та арабською цифрою, що позначає Сімейство CYP (наприклад, CYP1, CYP2, CYP3), за яким слідує велика літера, що позначає підсімейство (наприклад, CYP1A), і інша цифра, яка вказує на індивідуальний ген/фермент (наприклад, CYP1A1). Наприклад, CYP1A1 позначає CYP, що належить до сімейства 1, підродини A та білка 1 у підродині [24,26] (Рис.1.7).



Рис.1.7. Назва білка P450 [25].

1.7. Класифікація цитохромів P450

Цитохроми P450 утворюють одне з найбільших сімейств ферментів, які зустрічаються в більшості організмів, таких як віруси, бактерії, гриби, ссавці та рослини. У 2017 році Нельсон повідомив, що було анотовано понад 300 000 послідовностей P450, і ця кількість постійно збільшується. З цих послідовностей тварини (комахи, безхребетні, які не є комахами, ссавці та інші хребетні) мали понад 13 000, а рослини – понад 16 000 послідовностей з назвами P450. Цитохроми P450, виходячи з їх ланцюга транспортування електронів, можна розділити на три основні класи. Цитохроми I типу P450 отримують електрони з NADP(H) через Fe₂S₂ ферредоксин (Fdx) і редуктазу, що містить FAD (FdR). Цей тип цитохромів P450 зазвичай зустрічається в бактеріальних і деяких мітохондріальних системах. Для класу II електрони транспортуються від NADPH до гему P450 за допомогою NADPH цитохром P450 редуктази (CPR), яка містить флавінаденіндинуклеотид (FAD) і флавінмононуклеотид (FMN). P450 класу II зазвичай виявляються закріпленими на мембранах ендоплазматичного ретикулула. Тип III класу не потребує додаткового джерела електронів, тобто є самозабезпеченим, оскільки редуктаза злита з білком P450 (наприклад, бактеріальним P450 BM3). Для типу IV класу електрони отримують безпосередньо від відновлених піридинових нуклеотидів [27,28]. Рослини P450s, які беруть участь у метаболізмі гербіцидів, належать до класу II. У рослин надсімейство цитохрому P450 є одним з найбільших сімейств ферментів. 246 генів P450 було анотовано в геномі *Arabidopsis* і 356 в рисі. Рослинні P450 спочатку були згруповані за двома основними типами, включаючи A-тип і non-A-тип. Вони були перекласифіковані на 11 класів на основі численних доступних послідовностей геному. Типи A тепер відповідають клану CYP71, тоді як типи, які не належать до A відповідно до стандарту загальної номенклатури, були

розділені на 10 класів (CYP51, CYP72, CYP74, CYP85, CYP86, CYP97, CYP710, CYP711, CYP727 і CYP746) [39,30].

1.8. Функції ферментів цитохрому P450

Типовий каталітичний цикл цитохрому P450 відбувається в кілька етапів. У цитохромах P450 у стані спокою гем знаходиться в шестикоординатному стані із залізом (Fe^{3+}), з низьким спіном, його залізо координується по осі з тіолятом (-S-) консервативного цистеїну білка та молекули води. Зв'язування субстрату (RH) викликає зміну конформації активного центру і витісняє молекулу води зі зміною спіну Fe^{3+} від низького спіна до високого. Щоб бути активним, комплекс заліза CYP-субстрат повинен бути з'єднаний з донором електронів, який переносить електрони від NADPH до білка P450: найчастіше цитохром P450 редуктаза або інша пов'язана редуктаза. Після цього додавання електрона призводить до стану заліза (Fe^{2+}), і молекулярний кисень зв'язується з відновленим залізом, утворюючи супероксокомплекс заліза. Другий етап відновлення призводить до утворення пероксоформи. Один атом кисню зв'язує два протони і виходить у вигляді молекули води, що утворює ферил-оксо-комплекс, також званий сполукою I. Сполука I є високореакційною та нестабільною, атакує субстрат, утворюючи гідроксильований продукт. Дисоціація гідроксильованого продукту відновлює стан спокою P450 (Рис.1.8) [21,24,26].

Результуюча загальна реакція зазвичай є гідроксильованням:

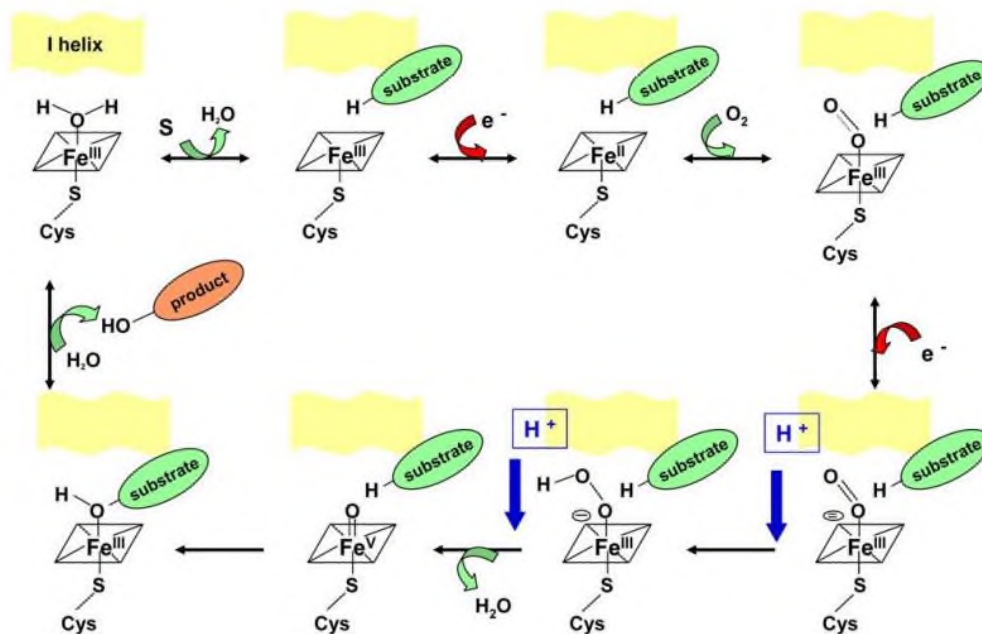
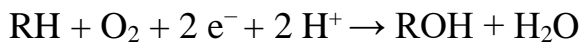


Рис.1.8. Механізм реакції монооксигеназ цитохрому P450 [21].

Ферменти цитохрому P450 насправді каталізують різноманітні реакції, їх функції були класифіковані [31] на реакції окислення (Рис.1.9) і реакції неокислення (Рис.1.10). Більшість реакцій P450 відноситься до типу окислення. Вони призводять до біодеградації або біосинтезу ендогенних сполук, таких як стероїди, жирні кислоти, більшість вторинних метаболітів рослин, метаболізм ліків або пестицидів. Найчастіше реакції монооксигенації включають перенесення атома кисню на субстрати, як описано вище. Атом кисню може бути вставлений в подвійний зв'язок C-H або C=C, що призводить до гідроксилювання вуглецю або епоксидування продукту, або до гетероатома, такого як N в амідах або амінах, або S в тіоефірах. Перегрупування первинних продуктів окислення може призвести до реакцій N-, O- або S-деалкілування (Рис.1.11), які часто зустрічаються в метаболізмі гербіцидів.

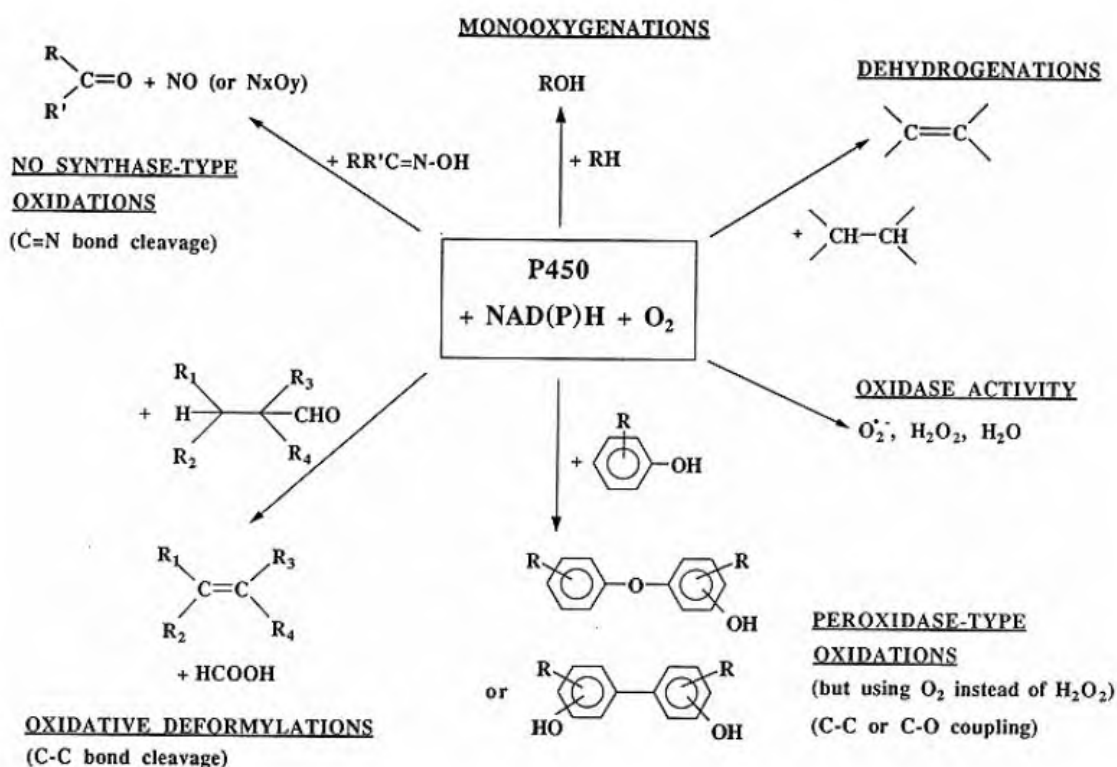


Рис.1.9. Реакції окислення, що каталізуються P450s [31]

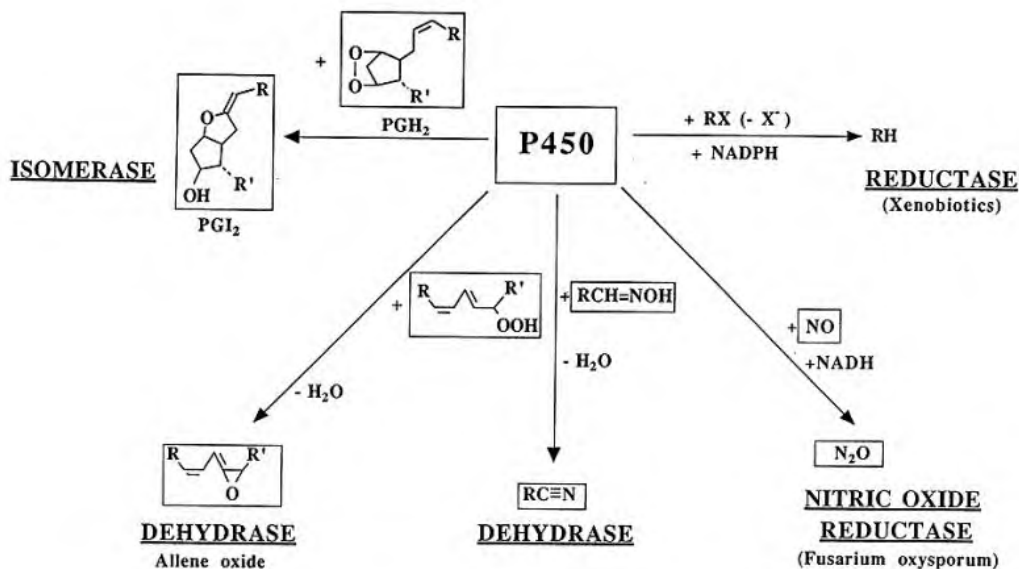


Рис.1.10. Реакції неокислення, які каталізуються P450s [32] .

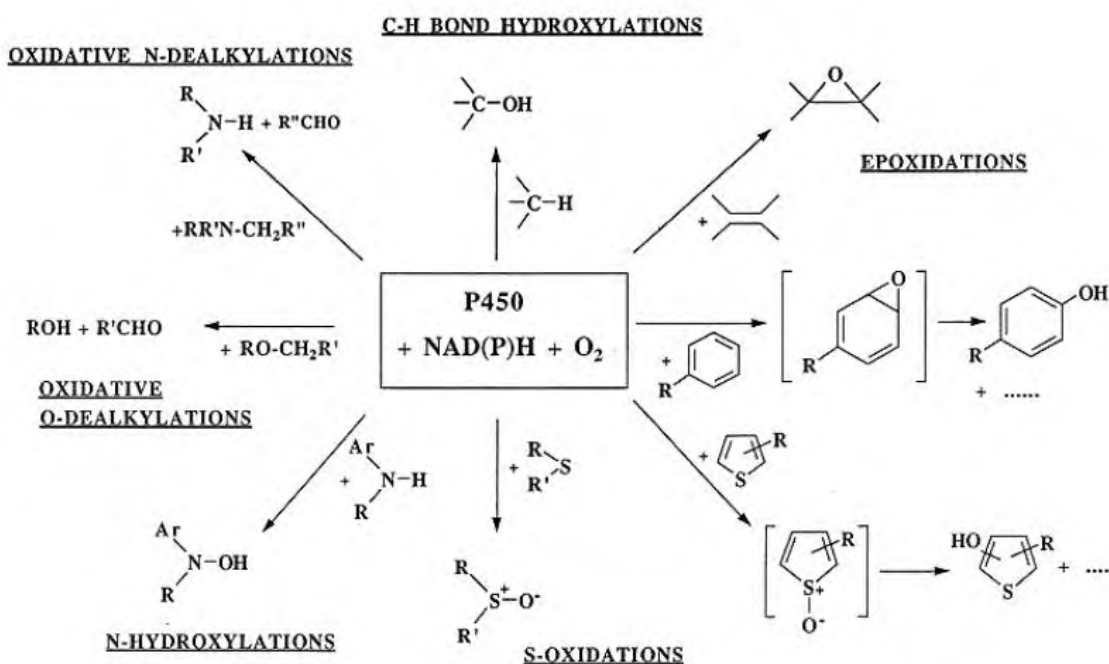


Рис.1.11. Реакції монооксигенації, які каталізуються P450 [32] .

1.9. Роль рослини P450s в метаболізмі ендogenous сполук

Ферменти рослинного цитохрому P450 беруть участь у метаболізмі кількох сотень різних субстратів. Їхня основна роль — біосинтез і катаболізм ендogenous сполук, але, до речі, вони також можуть метаболізувати екзогенні молекули, що має значний вплив на активність і толерантність гербіцидів. Рослини здатні виробляти та синтезувати різноманітні органічні сполуки. Спочатку вони були згруповані у два великі класи: 1) первинні метаболіти, такі

як цукри, жирні кислоти, стерини, амінокислоти, вітаміни, гормони, які безпосередньо беруть участь у зростанні та розвитку рослин, і 2) вторинні метаболіти, котрі, як вважалося, не є необхідними для росту і життя, але відіграють важливу роль у взаємодії рослини з навколишнім середовищем і часто виникають у відповідь на стрес. Ця точка зору зараз значною мірою переглянута, оскільки нещодавно було показано, що багато так званих «вторинних метаболітів» необхідні для нормального розвитку рослин. Відповідно, зараз придумали «спеціалізовані метаболіти». Спеціалізовані метаболіти рослин зазвичай поділяють на три великі класи: терпеноїди, фенілпропаноїди та азотовмісні сполуки, з яких азотовмісну групу можна розділити на ціаногенні глюкозиди, алкалоїди та глюкозинолати. Рослинні P450 відіграють важливу роль у синтезі або катаболізмі первинних та спеціалізованих метаболітів: структурних попередників мембран, кутину та суберину, таких як оксигеновані жирні кислоти та стерини, гормони, такі як гібереліни, брассиностероїди, цитокініни, стріголактони, ліголактони та інші більш спеціалізовані сполуки жасмонату, пігменти, леткі речовини, антиоксиданти, алелохімічні та захисні сполуки [24,32] .

1.10. Роль рослини P450s в метаболізмі екзогенних сполук. Метаболізм гербіцидів

На додаток до біосинтетичної діяльності, рослинні P450s метаболізують ряд токсичних екзогенних сполук, які зустрічаються в навколишньому середовищі, такі як гербіциди, інсектициди та деякі забруднювачі. Метаболізм гербіцидів найчастіше призводить до утворення меншої кількості фітотоксичних сполук, які можуть піддаватися подальшому метаболізу та повному розпаду, або кон'югувати та зберігатися у вакуолі. Метаболізм також може призвести до більшої кількості фітотоксичних сполук, але приклади активації гербіцидів для рослинних ферментів P450 поки не знайдені. Досі повідомляли [33], що трансгенний тютюн (*Nicotiana tabacum*) з надекспресією цитохрому P450 CYP105A1 із *Streptomyces griseolus* був убитий прогербіцидом сульфонілсечовини 2-метилетил-2,3-дигідро-N-[(4,6-диіл) - 1,2-бензоізотіазол-7-сульфонамід-1,1-діоксид (R7402), демонструючи, що прогербіцид R7402 метаболізується у високофітотоксичну сполуку за допомогою CYP105A1. Так само в роботі [34] продемонстрували здатність CYP2A5 людини активувати гербіцид 2,6-дихлорбензонітрил. Численні дослідження продемонстрували участь рослинного P450 у детоксикації гербіцидів та підвищенні стійкості бур'янів до гербіцидів. Перші повідомлення про участь рослинних ферментів P450 у метаболізмі гербіцидів були опубліковані в 1985 та 1986 р.р., припускаючи внесок у стійкість до інгібіторів ацетил-КоА-карбоксилази (диклофоп-метил) та інгібіторів фотосистеми II

(хлортолурон та ізопротурон) у однорічного райграшу (*Lolium Rigidum*) та китника мишохвостого (*Alopecurus myosuroides*) відповідно [35,36]. З тих пір багато досліджень повідомили про опосередковану P450 стійкість до гербіцидів у кількох бур'янів, таких як *Descurainia sophia*, *Amaranthus hybridus*, *Bromus tectorum*, *Avena sterilis*, *Phalaris minor*, *Echinochloa phyllopogon*, *Stellaria media*, *Digitaria sanguinalis*. *Descurainia sophia* є одним із найпоширеніших широколистяних бур'янів на озимих полях, і є надзвичайно стійким до ALS-інгібуючого гербіциду сульфонілсечовини трибенурон-метилу, завдяки механізмам резистентності як на цільовому сайті (мутації гена ALS), так і на нецільовому (посилений метаболізм). В роботі [37] приведено докази участі двох цитохромів P450 в метаболічній резистентності до трибенурон-метилу, показавши кореляцію між експресією CYP96A146 і CYP96A13 та метаболізмом гербіцидів. Було припущено, що у *Lolium rigidum* посилений P450-залежний метаболізм є відповідальним за стійкість до гербіцидів з різними механізмами дії, таких як диклофоп-метил (інгібітор ацетил-КоА-карбоксилази), просульфокарб і триалат (інгібітор синтезу ліпідів), піроксулам (інгібітор ацетолактатсинтази), трифлуралін (інгібітор збірки тубуліну) і піроксасульфон (інгібітор довголанцюгових жирних кислот) [15,35,38-40]. Крім того, обробка рослин одним класом гербіцидів може призвести до стійкості до іншого класу активних речовин. Наприклад, автори роботи [41] продемонстрували, що попередня обробка чутливого біотипу *L. rigidum* 2,4-D, ауксиновим гербіцидом, уможливила виживання рослин при застосуванні диклофоп-метилу, що метаболізується P450 (інгібітор ACCase). Раніше було показано, що P450-залежне арил-гідроксилювання відповідає за толерантність до 2,4-D у трав, включаючи *L. rigidum* [42]. Таким чином, автори роботи [43] розробили підхід для визначення метаболічного гена(ів), відповідального за толерантність до гербіцидів в австралійській популяції *L. rigidum*, стійкої до диклофоп-метилу. RNAseq (Секвенування РНК, тобто особлива технологія, яка використовує секвенування наступного покоління (NGS) для дослідження кількості та послідовностей РНК у зразку), генетичний та фізіологічний підходи об'єдналися для вказівки на чотири контиги, включаючи два CYP72 P450, один GT та одну нітронат монооксигеназу. Хоча пряма участь цих контигів досі не підтверджена, нещодавно були отримані прямі докази єдиного цитохрому P450, що забезпечує перехресну стійкість до гербіциду, для іншого бур'яну *Echinochloa hyllopogon*, який є помітним у культурах рису [44,45]. В останньому випадку було показано, що кілька ферментів P450, що належать до підродини CYP81A, специфічної для трав, здатні надавати множину стійкості до таких різноманітних класів гербіцидів, як інгібітори ALS (найбільш виражені), інгібітори фотосистеми II, фітоєнова десатураза, інгібітори протопорфіриноген-десатурази, 4-гідроксифенілпіруватдіоксигенази та інгібітор 1-дезоксидоксиулоза 5-

фосфатсинтази [45]. Однак фізіологічні функції та активність ферментів трав'яних рослин CYP81A та причини їх незвичайного проміскуитету ще не з'ясовані. Багато досліджень також продемонстрували, що цитохроми P450 відповідають за метаболізм гербіцидів у сільськогосподарських культурах. Наприклад, було показано, що CYP81A6, CYP72A18 та CYP72A31 з рису (*Oryza sativa*) можуть метаболізувати декілька гербіцидів, включаючи інгібітори PSII та ALS. Завдяки чутливості популяції рису, до бентазону та сульфонілсечовини [46], можна було продемонструвати, що CYP81A6 відповідальний за толерантність до бентазону рису та сульфонілсечовини [47]. Відповідно, експресія CYP81A6 привела до значного підвищення толерантності до бентазону та бенсульфуронметилу у мутантного рису, а його придушення у дикого типу призводило до втрати толерантності [48]. Експресія CYP81A6 також підвищила толерантність до гербіцидів арабідопсису та тютюну [49].

Аналогічно, диференційна чутливість сортів індійського та японського рису до біпірибаку натрію (інгібітора ацетолактатсинтази) дозволила на основі карти ідентифікувати CYP72A31 як ген, відповідальний за стійкість сорту до цього гербіциду [5]. Експресія CYP72A31 в *Arabidopsis* підтвердила здатність CYP72A31 надавати толерантність до біспірибаку натрію і, крім того, продемонструвала його потенціал надавати перехресну толерантність до бенсульфурон-метилу (різний клас інгібіторів ацетолактатсинтази). Роль цитохрому P450 в метаболізмі гербіцидів також була продемонстрована для ферментів, виділених з модельних рослин, використовуючи більш прямі біохімічні підходи. Наприклад, було показано, що CYP76B1 з топінамбуру (*Helianthus tuberosus*) каталізував окисне декілування інгібіторів PSII фенілсечовини (ізопротурон, діурон, лінурон і хлортулурон) з утворенням нефітотоксичних продуктів (Robineau19998).

Надмірна експресія CYP76B1 в тютюні та арабідопсисі призвела до 20-кратного збільшення толерантності до лінурону і 10-кратного збільшення толерантності до ізопротурону або хлортолуруну [50]. Таким же чином було показано, що експресовані дріжджами CYP76C1, CYP76C2 і CYP74C4, виділені з *A. thaliana*, метаболізують підгрупу фенілсечовини, утворюючи як метил-гідроксильовані, так і N-деметильовані метаболіти. Відповідно, ектопічна експресія CYP76C1, CYP76C2 і CYP76C4 надає толерантність *A. Thaliana* до фенілсечовини [51]. Скринінг активності рекомбінантного ферменту також використовувався, щоб продемонструвати, що CYP71A10 соєвих бобів здатний перетворювати фенілсечовину: флуометурон, діурон і хлортолурун в N-деметильовані та гідроксильовані кільце-метилом продукти [52]. Надмірна експресія CYP71A10 в тютюні призвела до значної толерантності до хлортолуруну та лінурону [52].

1.11. Синергісти та інгібітори P450

Інгібітори P450 можна використовувати як синергісти гербіцидів і також для демонстрації залежності резистентності на основі метаболізму цитохрому P450. Зокрема, піперонілбутоксид (PBO), 1-амінобензотриазол (АВТ), форат і малатіон використовувалися для визначення метаболічної стійкості до гербіцидів, опосередкованої P450. Наприклад, попередня обробка PBO або маляція різко знизила стійкість малоазійської мятлиці (*Polypogon fugax*) та японського лисохвіста (*Alopecurus japonicus*) до феноксапропу та піроксуламу [53,54]. Так само, автори роботи [55] повідомили про зниження резистентності до феноксапроп-Р-етил і мезосульфурон-метила у короткого лисохвоста (*Alopecurus aequalis* Sobol.) при попередньому лікуванні малатіоном. Багато інших досліджень із застосуванням інгібіторів ферментів продемонстрували участь P450 у стійкості до гербіцидів інших популяцій бур'янів, у райграді, пальмовому амаранті, коноплі звичайній [40,56-61]

1.12. Сейфери та індуктори P450

Неодноразово було описано, що цитохроми P450 та інші детоксикаційні ферменти індукуються екзогенними сполуками. Це також стосується рослинних ферментів P450, які беруть участь у метаболізмі гербіцидів. Індуктори P450 можна використовувати як гербіцидні захисні засоби для посилення метаболізму гербіцидів у сільськогосподарських рослинах за допомогою селективної обробки, як хімічна обробка насіння. Захисні засоби (сейфери) є важливою хімічною групою агрохімікатів, які використовуються для зниження фітотоксичності гербіцидів у посівах за рахунок прискорення метаболізму гербіцидів у менш активні або неактивні сполуки без шкоди для ефективності боротьби з бур'янами [62-63]. Таким чином, вони також дозволяють підвищити селективність боротьби з бур'янами. Кілька інших досліджень підтвердили, що захисні речовини були відповідальними за підвищення детоксикації гербіцидів у пшениці, кукурудзі, рисі та сорго. Чжан та ін. [3] показали, що захисник клоквінтоцет-мексил захищає сходи пшениці від ураження диметенамідами. Обробка гербіцидом-захисником фенклоримом індукувала експресію генів, що кодують P450s і глутатіонтрансферази, в рисі [64]. Крім того, Brazier Hicks et al., Goodrich et al. [64] помітили, що застосування сафренера флуксофеніму в поєднанні з гербіцидом піроксасульфеном забезпечило ефективну боротьбу з бур'янами та зменшило ураження сорго гербіцидом. Навпаки, кілька досліджень виявили негативний вплив сейферів на деякі види бур'янів, прискорюючи метаболізм гербіцидів і стійкість на нецільових ділянках. DeVoe та ін. [65] та Розенгауер та ін. [66]

повідомили про зниження чутливості до піроксуламу, йодосульфурону та мезосульфурону при поєднанні з захисними речовинами клоквінтоцет-мексил та мефенпір-діетил у *Alopecurus myosuroides* (китник мишохвостий). Інше дослідження повідомило, що обидві захисні речовини мефенпір-діетил і клоквінтоцет-мексил знижують чутливість *Lolium sp.* до гербіцидів-інгібіторів ALS і значно збільшують деградацію гербіциду [16].

1.13. Диклофопметил

Диклофоп-метил є селективним післясходовим гербіцидом, що входить до групи арилоксифеноксипропіонатів; використовується проти диких видів вівса та однорічних злакових бур'янів на посівах хрестоцвітих, моркви, селери, видах квасолі (звичайної та інших), ячменю, пшениці, пастернаку, видів гороху, картоплі, сої, ріпаку олійного, видів цибулі, цукрових буряків .

Торгові назви: Діюча речовина диклофоп-метил міститься в різних комерційних гербіцидах. Торгові назви продуктів, що містять диклофоп-метил, включають Noelon, Illoxan, Ное-Grass і One Shot

ХІМІЧНИЙ КЛАС: дифеніловий ефір

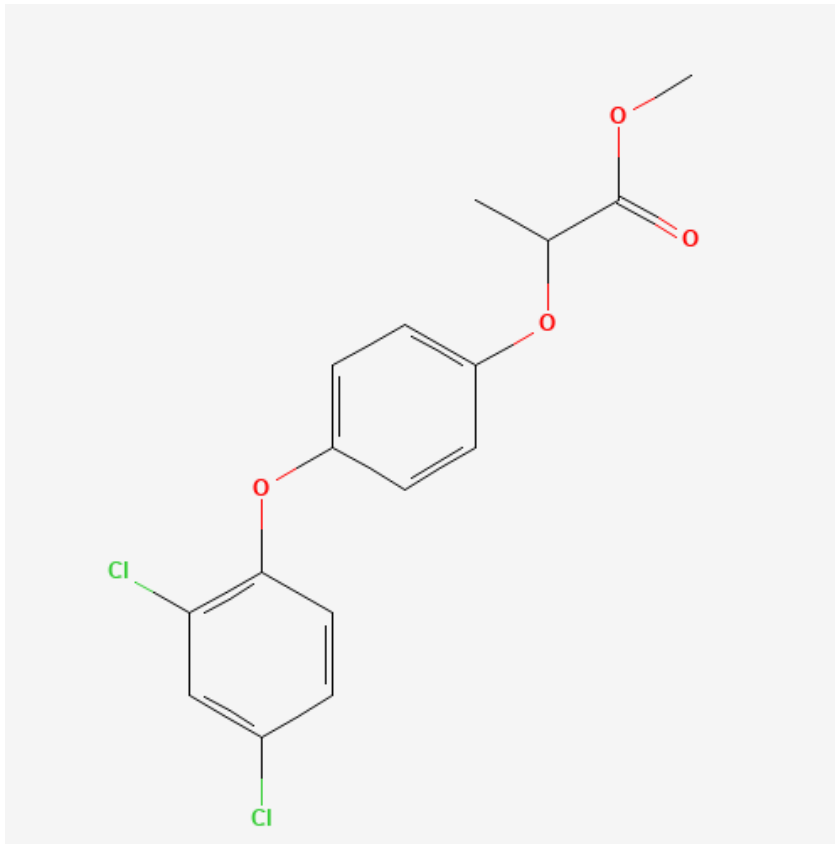


Рис.1.12. 2D структура диклофопметилу

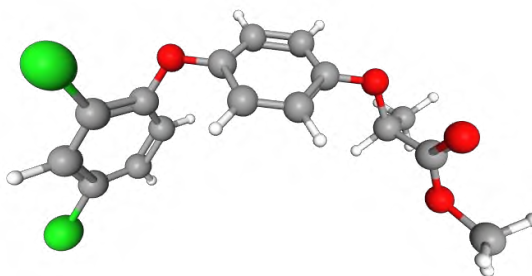


Рис.1.13. 3D структура диклофопметилу

Фізичні властивості:

Зовнішній вигляд: безбарвні кристали ;

Номенклатура IUPAC: метил 2-[4-(2,4-дихлорфенокси)фенокси]пропаноат

Номер CAS: 51338-27-3 ;

Молекулярна маса: 341,2 ;

Розчинність у воді: 50 мг/л при 22 градусах С ;

Розчинність в інших розчинниках: легко розчинний у звичайних органічних розчинниках, напр. ацетон 40, ксилол 50, метанол 40 (все в г/100 мл при 22 градусах С) ;

Температура плавлення: 39-41° С ;

Коефіцієнт розподілу: недоступний ;

Коефіцієнт адсорбції: відсутній ;

Розпад хімічних речовин у ґрунті та підземних водах: в аеробних умовах диклофоп-метил гідролізується протягом кількох днів у ґрунті до 2-[4-(2',4'-дихлорфенокси) фенокси] до пропанової кислоти, яка, у свою чергу, відносно швидко розкладається з періодом напіврозпаду 10 днів у піщаних ґрунтах і близько 30 днів у піщаних глинистих ґрунтах. Також утворюється невелика кількість 4-(2,4-дихлорфенокси) фенолу [67]. Польові дослідження норми внесення до 3,4 кг активного інгредієнта на гектар (3,0 фунта г/акр) показали дуже низьку кількість залишків у ґрунті. Під час збору врожаю невелика кількість залишків була присутня на рівні ґрунту 0-7,5 см. Ці дослідження показують, що диклофоп-метил не вимивається, а швидко розсіюється в ґрунті [67].

Розпад хімічних речовин у поверхневих водах: інформації не було.

Розпад хімічних речовин у рослинності: диклофоп-метил поглинається через листя, а у вологому ґрунті відбувається незначне поглинання через коріння. З'єднання пригнічує ріст коренів.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ, МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні задачі:

1. Побудова первинних моделей з білкових послідовностей.
2. Виконання молекулярного докінгу.
3. Побудова моделі білок-ліганд.
4. Виконання молекулярної динаміки.

Вирішення цих задач дозволить нам з'ясувати механізм стійкості вищих рослин до диклофопметилу.

2.1. Об'єкт дослідження

Як об'єкт дослідження було обрано дві послідовності цитохромів у форматі FASTA, надані колегами з Університету Західної Австралії. За допомогою сервісу SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>), було отримано pdb структури вищезгаданих білків для подальшої молекулярної динаміки (Рис.2.1, Рис.2.2)

Амінокислотні послідовності:

Варіант 1:

```
MDKAYIAILSCAFLFLVHYVVGKVS DGRRGKKGAVQLPPSPPAVPFLGHL
HLVEKPIHATMCRLAARLGPVFSRLR LGSRRV VVSSECA RECFTEHDVTF
ANRPKFPSQLLVSFNGTALVTSSYGPHWRNLRRVATVQLLSAHRVACMSE
VIAAEVRAMARRLFHATEASPGGAARIQLKRRLFELSLSVLMETIAQTKAT
RSEADADTDMSVEAQEFKEVVDKLI PHLGAANMWDYLPVMRWFDVFGV
RNKILHAVSRRDAFLRRLIDAERRRLADGGSDGDKKIMIAVLLTLQKTEPK
VYTDTMITALCANLFGAGTETTSTTTEWAMSL LNHPAALKKAQAEIDAS
VGTSRLVSVDDMPSLAYLQCIVSETLRL YPAAPLLL PHESSADCKVGGYNV
PADTMLIVNAYAIHRDPAVWEHPLEFKPERFEDGKADGLFMIPFGMGRRR
CPGETLALRTIGMVLATLVQCFEWE PVNGVKVDMTEGGGFTIPKAVPLEA
VCRPRAVMRDVLQNL
```



Рис 2.1. Структура 1 варианту

Вариант 2:

MDKAYIAILSCAFLFLVHYVLGKVS DGRRGKKGAVQLPPSPPAVPFLGHL
 HLVEKPIHATMCRLAARLGPVFSRLGSRRAVVVSSECARECFTEHDVTF
 ANRPKFPSQLLVSFNGTALVTSSYGPHWRNLRRVATVQLLSAHRVACMSE
 VIAAEVRAMARRLFHATEASPGGAARIQLKRRLFELSLSVLMETIAQTKAT
 RSEADADTDMSVEAQEFKEVVDKLI PHLGAANMWEYLPV MRWFDVFGV
 RNKILHAVSRRDAFLRRLIDAERRRLADGGSDGDKKIMIAVLLTLQKTEPK
 VYTDTMITALCANLFGAGTETTSTTTEWAMSLLL NHPAALKKAQAEIDAS
 VGTSRLVSVDDMPSLAYLQCIVSETLRLYSAAPLLL PHESSADCKVGGYNV
 PADTMLIVNAYAIHRDPAVWEHPLEFKPERFEDGKADGLFMIPFGMGRRR
 CPGETLALRTIGMVLATLVQCFEWE PVNGVKVDMTEGGGFTIPKAVPLEA
 VCRPRAVMRDVLQNL



Рис.2.2. Структура 2 варіанту

У якості ліганду в нашому випадку був обраний диклофопметил вихідна структура якого була отримана з банку даних PUBCHEM (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diclofopmethyl#section=Structures>)

2.2. Оптимізація та молекулярна динаміка

Метод молекулярної динаміки (MD) – це метод комп'ютерного моделювання, де можна прослідкувати еволюцію системи взаємодіючих атомів в часі за допомогою інтегрування рівняння їх руху. Для прогнозування руху системи частинок в симуляціях MD застосовуються принципи класичної механіки.

Усі обчислення MD були виконані за допомогою програмного забезпечення GROMACS (<https://www.gromacs.org/>) версії 2020.1-Ubuntu-2020.1-1 з використанням силового поля CHARMM36.

GROMACS - пакет програм для моделювання фізико-хімічних процесів у молекулярній динаміці. Пакет призначений для моделювання біомолекул (наприклад, молекул білків та ліпідів), що мають багато пов'язаних взаємодій між атомами. Забезпечує високу швидкість розрахунків для непов'язаних взаємодій. Вважається одним із найшвидших інструментів. Є вільним програмним забезпеченням із відкритим вихідним кодом.

Після отримання PDB файлів для двох варіантів цитохромів за допомогою SWISS-MODEL, було виконано їх оптимізацію і запущено симуляцію молекулярної динаміки.

2.3. Етапи виконання молекулярної динаміки для обраних цитохромів

1. Підготовка топології системи

```
gmx pdb2gmx -f 1.pdb -o 1_processed.gro
```

Було обране силове поле OPLS-AA/L для усіх атомів і модель води -TIP3P.

OPLS-AA/L – оптимальний варіант силового поля для роботи з білками, тому обираємо його.

2. Створення боксу для моделювання

Створюємо бокс за допомогою такої команди:

```
gmx editconf -f 1_processed.gro -o newbox.gro -d 1.0
```

Створення боксу є необхідною умовою для подальшого моделювання системи.

3. Додавання розчинника

Тепер, коли ми визначили коробку, ми можемо заповнити її розчинником (водою):

```
gmx solvate -cp 1_newbox.gro -cs spc216.gro -o 1_solv.gro -p topol.top
```

4. Нейтралізація системи

Оскільки життя не існує на чистому заряді, ми повинні додати іони до нашої системи:

```
gmx grompp -f ions.mdp -c 1_solv.gro -p topol.top -o ions.tpr
```

```
gmx genion -s ions.tpr -o 1_solv_ions.gro -p topol.top -neutral -conc 0.15
```

5. Мінімізація енергії

Сольватована електронейтральна система тепер зібрана. Перш ніж почати динаміку, ми повинні переконатися, що система не має стеричних зіткнень або невідповідної геометрії:

Створення файлу у форматі tpr:

```
gmx grompp -f em.mdp -c 1_solv_ions.gro -p topol.top -o em.tpr
```

Модуль мінімізації енергії:

```
gmx mdrun -v -deffnm em
```

Процес мінімізації дуже схожий на додавання іонів. Ми знову збираємося використовувати grompp для зборки структури, топології та параметрів моделювання у двійковий вхідний файл (.tpr), але цього ми запустимо мінімізацію енергії через mdrun.

6. Врівноваження ансамблів NPT і NVT

Мінімізація енергії гарантує, що ми маємо розумну стартову структуру з точки зору геометрії та орієнтації на розчинник. Щоб почати справжню динаміку, ми повинні врівноважити розчинник та іони навколо білка. Якщо ми спробуємо провести нестримну динаміку в цей момент, система може зруйнуватися. Причина в тому, що розчинник здебільшого оптимізований всередині себе, і не обов'язково разом із розчиненою речовиною. Його потрібно довести до температури, яку ми хочемо змоделювати, і встановити правильну орієнтацію щодо розчиненої речовини (білка). Після того, як ми досягнемо правильної температури (на основі кінетичної енергії), ми будемо прикладати тиск до системи, поки вона не досягне належної щільності.

Систему було збалансовано за допомогою сценаріїв для врівноваження системи у файлах: nvt.mdp, npt.mdp

Врівноваження NVT:

```
gmx grompp -f nvt.mdp -c em.gro -r em.gro -p topol.top -o nvt.tpr
```

```
gmx mdrun -deffnm nvt
```

Врівноваження NPT:

```
gmx grompp -f npt.mdp -c nvt.gro -r nvt.gro -t nvt.cpt -p topol.top -o npt.tpr
gmx mdrun -deffnm npt
```

Урівноваження часто проводять у два етапи. Перший етап проводиться під ансамблем NVT (постійна кількість частинок, об'єм і температура). Цей ансамбль також називають «ізотермічно-ізохорним» або «канонічним». Врівноважування тиску проводиться за ансамблем NPT, де кількість частинок, тиск і температура є постійними. Ансамбль також називають «ізотермічно-ізобаричним» ансамблем і найбільше нагадує експериментальні умови.

7. Розрахунок симуляції молекулярного моделювання

Після завершення двох фаз врівноваження система тепер добре врівноважена при бажаній температурі та тиску. Тепер ми готові скасувати обмеження позиції та запустити MD для збору даних:

```
gmx grompp -f md.mdp -c npt.gro -t npt.cpt -p topol.top -o md_0_1.tpr
```

Тепер виконуємо mdrun:

```
gmx mdrun -deffnm md_0_1
```

Надалі, отримані моделі використовувалися для побудови комплексу білок-ліганд. Але перш ніж почати побудову комплексу, необхідно виконати молекулярний докінг, використовуючи отриману структуру білка і структуру ліганду, завантаженої з бібліотеки PubChem. Докінг виконувався на платформі Lead It, був обраний внутрішньокільцевий конформерний генератор для отримання оптимального положення ліганду.

2.4. Етапи виконання молекулярної динаміки для комплексів цитохром-ліганд

1. Підготовка топології для побудови комплексу цитохром -ліганд

Необхідно підготувати топологію системи у декілька етапів:

- 1) Підготовка топології білка за допомогою pdb2gmx;

```
gmx pdb2gmx -f 1_clean.pdb -o 1_processed.gro
```

Було обране силове поле CHARMM36 і модель води -TIP3P.

[charmm36-feb2021.ff.tgz](http://mackerell.umaryland.edu/charmm_ff.tgz) завантаженому на сайті:

(http://mackerell.umaryland.edu/charmm_ff.shtml#gromacs)

- 2) Підготовка топології ліганда за допомогою CGenFF.

Правильна обробка лігандів є однією з найскладніших завдань у молекулярному моделюванні. Автори силового поля витрачають роки свого життя, виводячи самоузгоджені силові поля, і ввести новий вид у цю структуру не так вже й легко. Параметри силового поля для будь-якого нового виду повинні бути отримані та підтверджені таким чином, що відповідає вихідному силовому полю.

Для силових полів OPLS, AMBER і CHARMM це виведення часто приймає форму різних квантовомеханічних розрахунків. Основна література для цих силових полів описує необхідну процедуру. Для силових полів

GROMOS методологія параметризації є менш зрозумілою, спираючись на емпіричну підгонку поведінки конденсованої фази. Тобто деякі початкові заряди та параметри Леннарда-Джонса розраховуються для кожного типу атома, оцінюються на їх точність та уточнюються. Хоча кінцевий результат є дуже задовільним, тобто рідини нагадують їх реальні аналоги, процес виведення може бути трудомістким і неприємним.

З цієї причини перевага віддається автоматизованим інструментам. Для кожного силового поля, існують методики або програмні пакети, які мають на меті надати параметри, сумісні з різними силовими полями.

В нашому випадку використовується сервер CGenFF (<https://cgenff.umaryland.edu/>), за допомогою нього була створена топологія ліганду із вхідного файлу формату `sybyl.mol2`. Це допомогло зібрати елементарну інформацію про зв'язки і тип атому молекули. Також, щоб побудована топологія була з правильним порядком координат атомів застосовуємо команду:

```
perl sort_mol2_bonds.pl diclofop.mol2 diclofop_fix.mol2
```

2. Побудова комплексу білок-ліганд

На цьому етапі було об'єднано файли топології ліганда і білка в один – `complex.gro`, врахувавши суму атомів білка і ліганда. Файл топології було відредаговано шляхом включення параметрів ліганда у декілька розділів файлу:

```
Include ligand topology
#include " diclofop.itp"
; Include ligand parameters
#include " diclofop.prm"
```

Також було додано назву молекули після назви білкової структури в `[molecules]` в топології.

```
[ molecules ]
; Compound      #mols
Protein          1
Diclofop         1
```

3. Створення боксу для моделювання

Створюємо бокс за допомогою такої команди:

```
gmx editconf -f complex.gro -o newbox.gro -d 1.0
```

Створення боксу є необхідною умовою для подальшого моделювання системи.

4. Додавання розчинника

Оскільки необхідно зімітувати реальні умови, треба виконати сольватацію за допомогою модуля, що автоматично визначає потрібну кількість молекул розчинника.

```
gmx solvate -cp newbox.gro -cs spc216.gro -p topol.top -o solv.gro
```

5. Нейтралізація системи

Для того, щоб нейтралізувати заряд системи комплексу білка і ліганда застосувала модуль `genion`, який виконує заміну молекул води на відповідну кількість іонів:

```
gmx grompp -f ions.mdp -c solv.gro -p topol.top -o ions.tpr
gmx genion -s ions.tpr -o solv_ions.gro -p topol.top -neutral -conc 0.15
```

6. Мінімізація енергії

Задля усунення невідповідної геометрії і стеричних зіткнень, було виконано мінімізацію енергії:

Створення файлу у форматі tpr:

```
gmx grompp -f em.mdp -c solv_ions.gro -p topol.top -o em.tpr
```

Модуль мінімізації енергії:

```
gmx mdrun -v -deffnm em
```

7. Врівноваження ансамблів NPT і NVT

Необхідно виконати уврівноваження системи. Для цього варто виконати кілька важливих кроків:

1. Застосувати обмеження до ліганду

2. Виконати обробку терморегулювальних груп

Для того, щоб виконати обмеження ліганду, необхідно створити для нього індекс групи, що містить і не містить атоми водню:

```
gmx make_ndx -f diclofor.gro -o index.ndx
```

```
> 0 &! a H *
```

```
> q
```

Для виконання стандартної процедури врівноваження, було вибрано одночасне обмеження білка і ліганда для цього, необхідно внести коментар у файл topol.top комплексу:

```
; Ligand position restraints
```

```
#ifdef POSRES
```

```
#include "posre.itp"
```

```
#endif
```

Систему було збалансовано за допомогою сценаріїв для врівноваження системи у файлах: nvt.mdp, npt.mdp

Врівноваження NVT:

```
gmx grompp -f nvt.mdp -c em.gro -r em.gro -p topol.top -n index.ndx -o nvt.tpr
```

```
gmx mdrun -deffnm nvt
```

Врівноваження NPT:

```
gmx grompp -f npt.mdp -c nvt.gro -t nvt.cpt -r nvt.gro -p topol.top -n index.ndx -o npt.tpr
```

```
gmx mdrun -deffnm npt
```

8. Розрахунок симуляції молекулярного моделювання

Враховуючи завершення двох фаз врівноваження, запускаємо MD-симуляцію тривалістю 10 нс:

```
gmx grompp -f md.mdp -c npt.gro -t npt.cpt -p topol.top -n index.ndx -o md_0_1.tpr
```

```
gmx mdrun -deffnm md_0_1
```

Після завершення симуляції молекулярної динаміки для центрування застосовуємо модуль trjconv:

```
gmx trjconv -s md_0_1.tpr -f md_0_1.xtc -o md_0_1_center.xtc -center -pbc mol -ur compact
```

Групи для центрування: 1.Білок і 0.Система.

9. Підгонка для більш плавної візуалізації виконується модулем trjconv:
`gmx trjconv -s md_0_1.tpr -f md_0_1_center.xtc -o md_0_1_fit.xtc -fit rot+trans`
 Було обрано групу 4.Остів (Backbone) для підгонки методом найменших квадратів і 0.Система для вихідного результату.

10. Розрахунок енергії взаємодії

Для кількісної оцінки сили взаємодії між білком та лігандом корисно обчислити енергію незв'язаної взаємодії між цими двома видами. GROMACS має здатність розкласти короткодійчі незв'язані енергії між будь-якою кількістю визначених груп. Важливо зазначити, що ця величина не є вільною енергією чи енергією зв'язку. Насправді більшість силових полів не параметризовані таким чином, щоб ця величина була фізично значущою. CHARMM36 налаштований на конкретне націлювання на квантово-механічну енергію взаємодії з водою, тому він по суті збалансований із значущими величинами, і як така, енергія взаємодії може бути корисною.

Використовуючи енергетичний модуль `energygrps`, розраховуємо середню енергію ближньої кулонівської взаємодії і енергію Леннарда-Джонса ближньої взаємодії і їх суму (Coul-SR: Protein-Ligand і LJ-SR: Protein-Ligand) а також загальну вільну енергію взаємодії, що є сумою для чотирьох груп 51 ,52 ,53, 54: 51.Coul-SR: Protein-Ligand , 52. LJ-SR: Protein-Ligand , 53.Coul-14:Protein-Ligand, 54.LJ-14: Protein-Ligand

```
gmx grompp -f ie.mdp -c npt.gro -t npt.cpt -p topol.top -n index.ndx -o ie.tpr
gmx mdrun -deffnm ie -rerun md_0_1.xtc -nb cpu
```

Для того, щоб розрахувати енергії ближньої кулонівської взаємодії і Леннарда-Джонса ближньої взаємодії і побудувати їх графіки: 21.Coul-SR: Protein-Ligand і 22.LJ-SR: Protein-Ligand групи, необхідно виконати наступну команду:

```
gmx energy -f ie.edr -o Interaction_energy.xvg
```

Для розрахунку вільної енергії взаємодії, необхідно знайти суму чотирьох груп: 51 ,52 ,53, 54: 51.Coul-SR: Protein-Ligand , 52. LJ-SR: Protein-Ligand, 53.Coul-14:Protein-Ligand, 54.LJ-14: Protein-Ligand. Це можна виконати за допомогою такої команди

```
gmx energy -f ie.edr -o test -sum -fee
```

11. Динаміка водневих зв'язків

Ще одним важливим показником стабільності системи є кількість і динаміка утворення водневих зв'язків протягом усього часу динаміки. Щоб отримати потрібну інформацію використовуємо команду:

```
gmx hbond -f md_0_1.xtc -s md_0_1.tpr -num
```

Обираємо групу Protein і групу Ligand.

Усі дії, описані в даному розділі, були виконані для двох варіантів цитохромів.

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Аналіз зв'язків у сайтах зв'язування для 1 та 2 варіантів

Для зручної візуалізації отриманих результатів використано програму Discovery studio, в якій отримали зображення досліджуваних комплексів 1 та 2 варіантів: Рис.3.1 – Рис.3.3 - 1 варіант; Рис.3.4 – Рис.3.6 - 2 варіант.

Аналіз зв'язків у сайті зв'язування було виконано за допомогою вищезгаданої програми. Було виявлено у 1 варіанті: 2 водневих зв'язки, 1 галогенний зв'язок, 2 π -сульфідні зв'язки, 15 гідрофобних зв'язків. Аналіз зв'язків наведено у табл.1. У 2 варіанті – 2 водневих зв'язки і 11 гідрофобних зв'язків. Аналіз зв'язків наведено у табл.2.

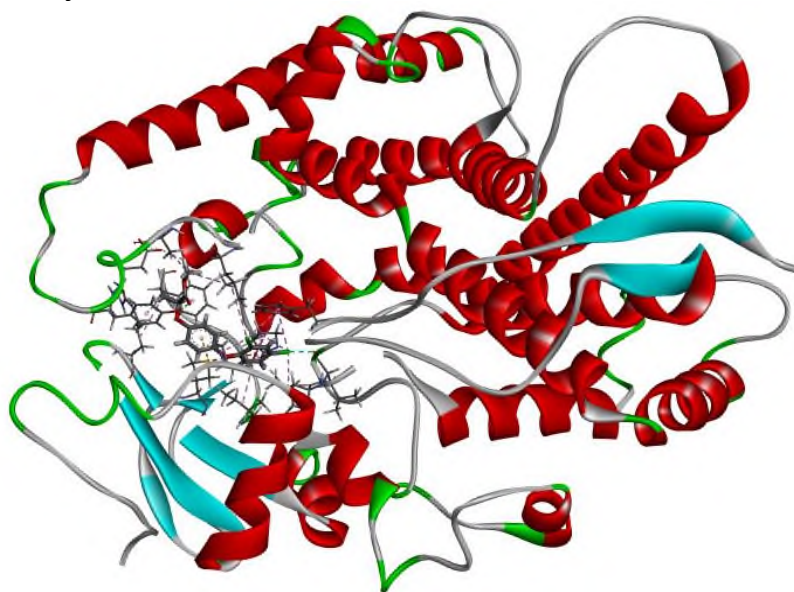


Рис.3.1. Загальний просторовий вигляд 1 системи цитохром-диклофопметил. Білок показано за допомогою стандартної стрічкової діаграми. Диклофопметил показано за допомогою кулько-стрижневої моделі. Зв'язки з амінокислотами показані пунктирними лініями.

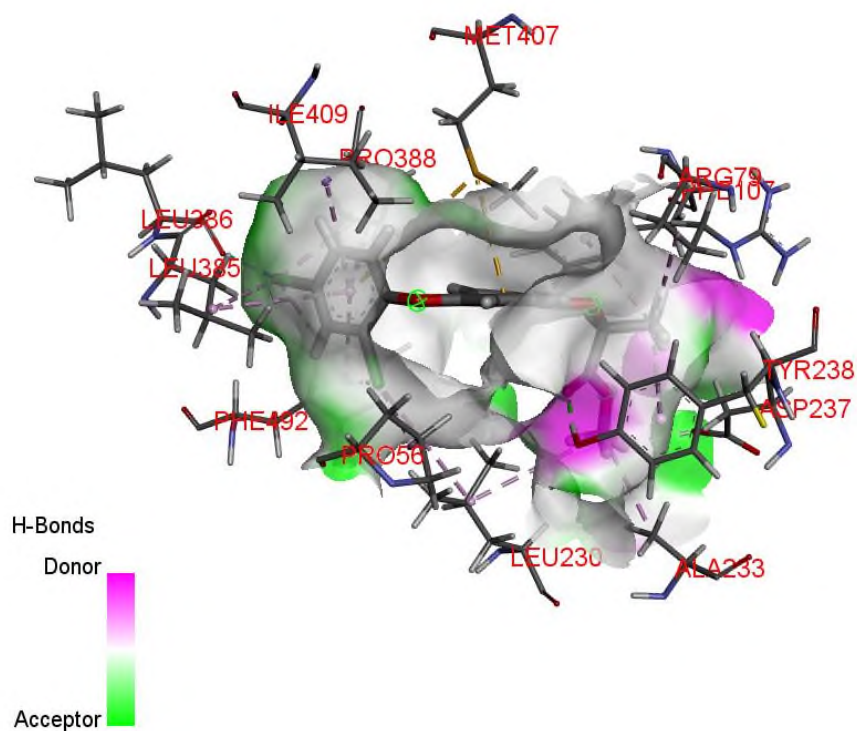


Рис.3.2. Організація активного центру зв'язування для 1 варіанту у тривимірному просторі

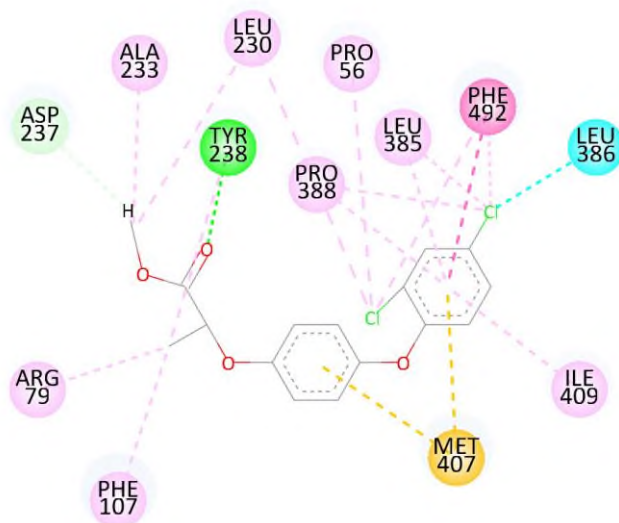


Рис.3.3. Двовимірна діаграма сайту зв'язування цитохрому 3 диклофопметилом (1 варіант).

Таблиця 1

Детальна інформація про утворені зв'язки для 1 варіанту

Name	Color	Distance	Category	Types	From	From Chemistry	To	To chemistry
:TYR238:HH - :Diclofop982:O4		1,78799	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond	:TYR238:HH	H-Donor	:Diclofop982:O4	H-Acceptor
:Diclofop982:H13 - :ASP237:OD1		2,43074	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	:Diclofop982:H13	H-Donor	:ASP237:OD1	H-Acceptor
:LEU386:O - :Diclofop982:Cl7370		2,70332	Halogen	Halogen (Cl, Br, I)	:LEU386:O	Halogen Acceptor	:Diclofop982:Cl7370	Halogen
:MET407:SD - :Diclofop982		4,11172	Other	Pi-Sulfur	:MET407:SD	Sulfur	:Diclofop982	Pi-Orbitals
:MET407:SD - :Diclofop982		5,50262	Other	Pi-Sulfur	:MET407:SD	Sulfur	:Diclofop982	Pi-Orbitals
:PHE492 - :Diclofop982		4,47179	Hydrophobic	Pi-Pi Stacked	:PHE492	Pi-Orbitals	:Diclofop982	Pi-Orbitals
:ALA233 - :Diclofop982:C16		3,69043	Hydrophobic	Alkyl	:ALA233	Alkyl	:Diclofop982:C16	Alkyl
:Diclofop982:Cl7369 - :PRO56		3,91108	Hydrophobic	Alkyl	:Diclofop982:Cl7369	Alkyl	:PRO56	Alkyl
:Diclofop982:Cl7369 - :LEU230		5,20117	Hydrophobic	Alkyl	:Diclofop982:Cl7369	Alkyl	:LEU230	Alkyl
:Diclofop982:Cl7370 - :LEU385		4,62732	Hydrophobic	Alkyl	:Diclofop982:Cl7370	Alkyl	:LEU385	Alkyl
:Diclofop982:Cl7370 - :PRO388		4,31264	Hydrophobic	Alkyl	:Diclofop982:Cl7370	Alkyl	:PRO388	Alkyl
:Diclofop982:C4 - :ARG79		4,34513	Hydrophobic	Alkyl	:Diclofop982:C4	Alkyl	:ARG79	Alkyl
:Diclofop982:C16 - :LEU230		4,88317	Hydrophobic	Alkyl	:Diclofop982:C16	Alkyl	:LEU230	Alkyl
:PHE107 - :Diclofop982:C4		4,40339	Hydrophobic	Pi-Alkyl	:PHE107	Pi-Orbitals	:Diclofop982:C4	Alkyl
:TYR238 - :Diclofop982:C4		5,01764	Hydrophobic	Pi-Alkyl	:TYR238	Pi-Orbitals	:Diclofop982:C4	Alkyl
:PHE492 - :Diclofop982:Cl7369		4,18485	Hydrophobic	Pi-Alkyl	:PHE492	Pi-Orbitals	:Diclofop982:Cl7369	Alkyl
:PHE492 - :Diclofop982:Cl7370		4,27126	Hydrophobic	Pi-Alkyl	:PHE492	Pi-Orbitals	:Diclofop982:Cl7370	Alkyl
:Diclofop982 - :LEU385		4,76527	Hydrophobic	Pi-Alkyl	:Diclofop982	Pi-Orbitals	:LEU385	Alkyl
:Diclofop982 - :PRO388		4,79837	Hydrophobic	Pi-Alkyl	:Diclofop982	Pi-Orbitals	:PRO388	Alkyl
:Diclofop982 - :ILE409		4,5717	Hydrophobic	Pi-Alkyl	:Diclofop982	Pi-Orbitals	:ILE409	Alkyl

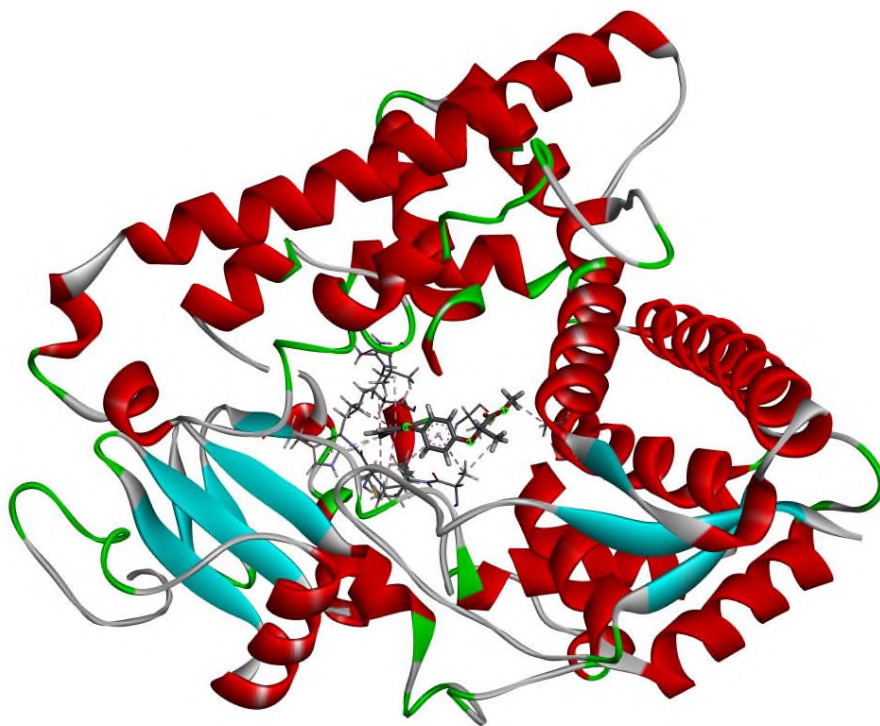


Рис.3.4. Загальний просторовий вигляд варіанту 2, системи цитохром-диклофопметил. Білок показано за допомогою стандартної стрічкової діаграми. Диклофопметил показано за допомогою кулько-стрижневої моделі. Зв'язки з амінокислотами показані пунктирними лініями.

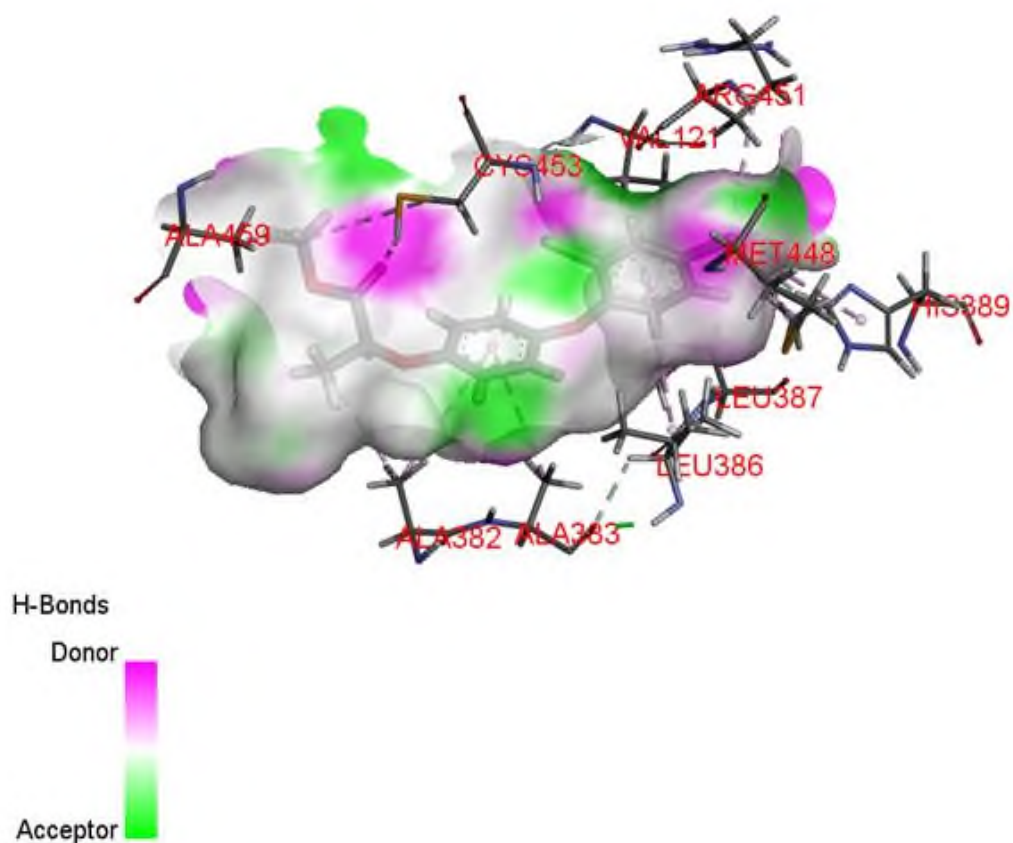


Рис. 3.5. Детальна організація активного центру зв'язування для 2 варіанту у тривимірному просторі та у двовимірній діаграмі.

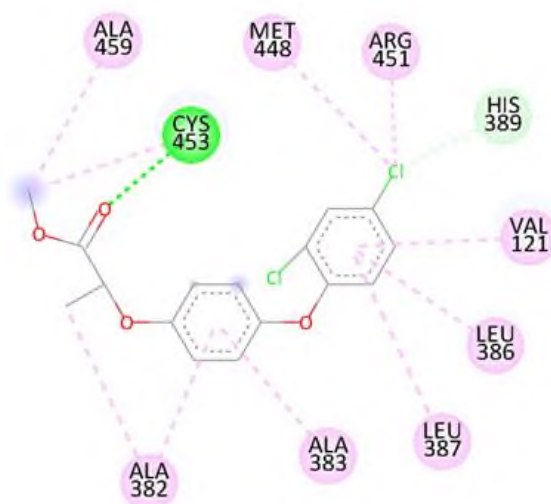


Рис.3.6. Двовимірна діаграма сайту зв'язування цитохрому з диклофопметилом (2 варіант).

Таблиця 2

Детальна організація активного центру зв'язування для 2 варіанту у тривимірному та двовимірному просторі.

Name	Color	Distance	Category	Types	From	From Chemistry	To	To chemistry
:CYS453:HG - :Diclofop982:O6		2,14154	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond	:CYS453:HG	H-Donor	:Diclofop982:O6	H-Acceptor
:HIS389:HE1 - :Diclofop982:Cl7370		2,61593	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	:HIS389:HE1	H-Donor	:Diclofop982:Cl7370	H-Acceptor
:ALA382 - :Diclofop982:C10		4,01166	Hydrophobic	Alkyl	:ALA382	Alkyl	:Diclofop982:C10	Alkyl
:ALA459 - :Diclofop982:C22		3,6471	Hydrophobic	Alkyl	:ALA459	Alkyl	:Diclofop982:C22	Alkyl
:Diclofop982:Cl7370 - :MET448		4,92989	Hydrophobic	Alkyl	:Diclofop982:Cl7370	Alkyl	:MET448	Alkyl
:Diclofop982:Cl7370 - :ARG451		4,24692	Hydrophobic	Alkyl	:Diclofop982:Cl7370	Alkyl	:ARG451	Alkyl
:Diclofop982:C22 - :CYS453		5,03473	Hydrophobic	Alkyl	:Diclofop982:C22	Alkyl	:CYS453	Alkyl
:HIS389 - :Diclofop982:Cl7370		4,78013	Hydrophobic	Pi-Alkyl	:HIS389	Pi-Orbitals	:Diclofop982:Cl7370	Alkyl
:Diclofop982 - :ALA382		4,96165	Hydrophobic	Pi-Alkyl	:Diclofop982	Pi-Orbitals	:ALA382	Alkyl
:Diclofop982 - :ALA383		4,56832	Hydrophobic	Pi-Alkyl	:Diclofop982	Pi-Orbitals	:ALA383	Alkyl
:Diclofop982 - :VAL121		4,25377	Hydrophobic	Pi-Alkyl	:Diclofop982	Pi-Orbitals	:VAL121	Alkyl
:Diclofop982 - :LEU386		4,87178	Hydrophobic	Pi-Alkyl	:Diclofop982	Pi-Orbitals	:LEU386	Alkyl
:Diclofop982 - :LEU387		5,42615	Hydrophobic	Pi-Alkyl	:Diclofop982	Pi-Orbitals	:LEU387	Alkyl

Таким чином, було встановлено, що аналізовані варіанти цитохромів мають різні сайти зв'язування (Рис.3.1, Рис.3.4). Крім того, при аналізі утворених зав'язків між активним сайтом цитохрому та диклофопметилом було виявлено сильні π -сульфідні зв'язки (взаємодія між π -електронною хмарою ароматичного кільця бензолу з неподільною електронною парою сірки) у 1 варіанті, що може зумовлювати краще зв'язування з лігандом.

3.2 Аналіз результатів молекулярної динаміки

Було розраховано вільну енергію взаємодії між цитохромом та гербіцидом для досліджуваних варіантів. Виявилось, що вільна енергія зв'язування для першого є меншою від вільної енергії другого варіанту (Табл. 3, Табл.4), що може вказувати на утворення більш стійкого комплексу для 1 варіанту.

Таблиця 3.

Результати розрахунку вільної енергії для 1 варіанту

Energy	Average	Err,Est,	RMSD	Tot-Drift	Free energy (kJ/mol)
Coul-SR:Protein-Diclofop	-35,1134	6,1	19,6306	21,5765	-6,94813
LJ-SR:Protein-Diclofop	-170,562	2, 6	12,7933	-17,8512	-141,316
Coul-14:Protein-Diclofop	0,00	0,00	0,00	0,00	0
LJ-14:Protein-Diclofop	0,00	0,00	0,00	0,00	0
Total	-205,676	5,6	--	3,72522	-175,183

Таблиця 4.

Результати розрахунку вільної енергії для 2 варіанту

Energy	Average	Err,Est,	RMSD	Tot-Drift	Free energy (kJ/mol)
Coul-SR:Protein-Diclofop	-19,5402	5,1	15,5077	6,82876	0,144539
LJ-SR:Protein-Diclofop	-153,645	1,00	10,5077	0,191084	-125,791
Coul-14:Protein-Diclofop	0,00	0,00	0,00	0,00	0
LJ-14:Protein-Diclofop	0,00	0,00	0,00	0,00	0
Total	-173,185	5,9	--	7,01985	-145,238

Аналізуючи отримані значення енергії зв'язування між білком та лігандом для обох варіантів, можна констатувати, що обидві системи є стабільними у часі і подальша еволюція не спостерігається (Рис.3.7). Даний результат підтверджує лінійна апроксимація для обох варіантів, а наявні флуктуації можливо пояснити тепловим рухом атомів у молекулі.

Було показано, що динаміка утворення водневих зв'язків між цитохромом та диклофопметилом для 1 варіанту виглядає більш стабільно в порівнянні з 2 варіантом, оскільки в 2 варіанті, загалом, більші проміжки між стрімким утворенням водневих зв'язків (0 – 2 нс; 2 – 4,5 нс; 5,7 – 7,3 нс) (Рис. 3.8).

Таким чином, можна стверджувати, що поява сильних стабілізуючих π -сульфідних зав'язків між цитохромом і диклофопметилом, менше значення вільної енергії взаємодії, менше значення енергії зв'язування з лігандом і більш стабільна поведінка утворення водневих зав'язків для 1 варіанту може бути причиною стійкості до досліджуваного гербіциду.

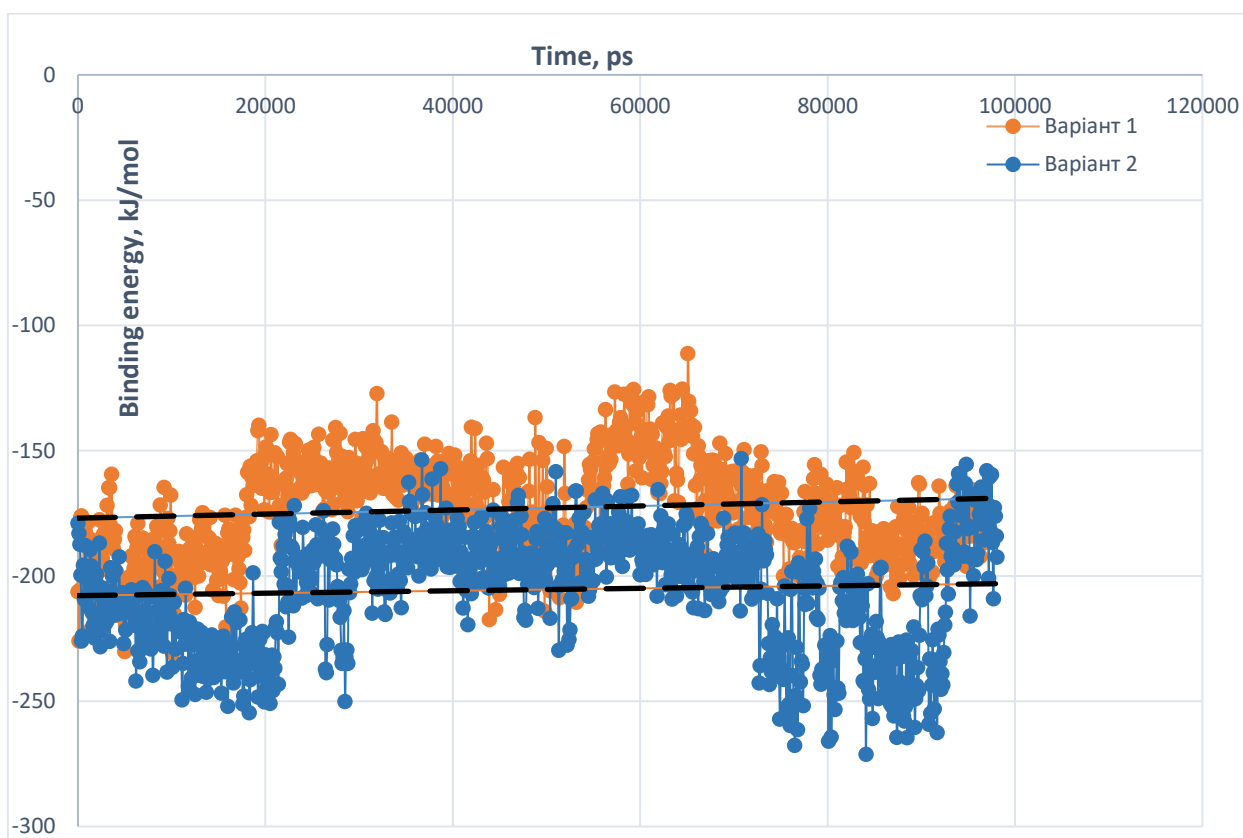


Рис.3.7. Еволюція енергії зв'язування в часі для 1 та 2 варіантів протягом 100 нс

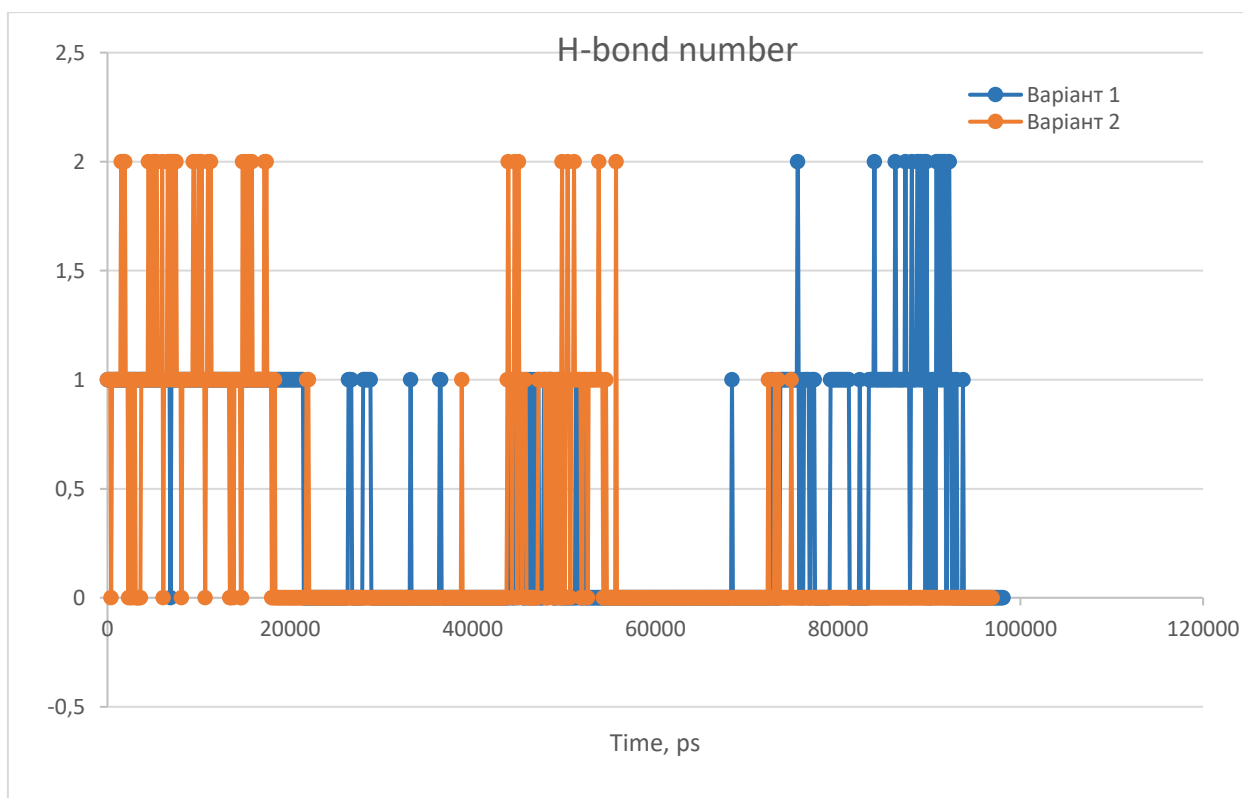


Рис.3.8. Зміна числа водневих зав'язків протягом 100 нс молекулярної динаміки (між цитохромом та диклофопметилом).

Отже, стійкість до нецільового сайту (NTSR) – це будь-який механізм, не пов'язаний з мішенню гербіциду, на відміну від стійкості цільової ділянки (TSR). NTSR охоплює всі механізми, які мінімізують ушкодження гербіцидів у бур'янах шляхом зниження токсичних концентрацій у місцях дії гербіцидів (SoA), такі як зниження абсорбції, порушення транслокації, секвестрації, метаболізму, що дозволяє біохімічну модифікацію, зниження швидкості активації та захисту/відновлення від пошкоджень. Найбільш тривожним типом NTSR у стійких до гербіцидів бур'янів є підвищені швидкості метаболізму гербіцидів, оскільки вони можуть надавати перехресну стійкість до гербіцидів з різними SoA. Схематично детоксикація гербіцидів може відбуватися за чотирифазною схемою: деградація у фазі I (як правило, окислення), кон'югація у фазі II, транспорт у фазі III (вакуоль або позаклітинний простір) і подальша деградація у фазі IV. Конститутивні ферментні суперсімейства, котрі відповідають за ці чотири фази: наприклад, монооксигенази цитохрому P450 (P450s) у фазі I, глутатіон-S-трансферази (GSTs) і глюкозилтрансферази (GTs) у фазі II та транспортери ABC у фазі III, та інші P450, ймовірно, є найбільш дослідженими детоксикуючими ферментами в бур'янах на сьогоднішній день, і вони відіграють основну роль у фазі I метаболізму гербіцидів. Рослини мають сотні P450 з цього суперсімейства ферментів, які каталізують широкий спектр реакцій з різною специфічністю субстрату. P450s може надати NTSR бур'янам за допомогою підвищеної швидкості деградації до кількох SoA. Крім того, P450 також беруть участь у метаболічній перехресній стійкості до гербіцидів з різними SoA, що ускладнює боротьбу з популяціями бур'янів за допомогою цього механізму, який є основною загрозою для вирощування різноманітних культур по всьому світу.

ВИСНОВКИ

1. За допомогою методу молекулярного докінгу було виявлено різні сайти зв'язування диклофопметилу для двох досліджуваних випадків, що зумовлено заміною амінокислот у білковій послідовності, а саме серину на пролін (S на P) та глутамінової кислоти на аспарагінову (E на D).
2. Зміна сайту зв'язування призвела до зміни афінності цитохрому до диклофопметилу, що може пояснюватися появою π -сульфідних зв'язків.
3. Наявність сильних π -сульфідних зв'язків у варіанті 1, потенційно, може зумовлювати більш стабільне зв'язування цитохрому з гербіцидом, що і може бути одним з механізмів утворення резистентності.
4. Після проведення симуляції молекулярної динаміки було виявлено, що обидва комплекси є стабільними, еволюції систем не спостерігається. Менша величина вільної енергії для 1 варіанту, може свідчити про краще зв'язування цитохрому з диклофопметилом.
5. Встановлено, що меншою вільною енергією характеризується перший варіант і, враховуючи розподіл утворення водневих зв'язків, саме цей варіант може бути потенційно залучений до метаболізму диклофопметилу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Powles S.B. *Herbicide Resistance and World Grains.* / S. Powles, D. Shaner – Boca Raton/London/New York/Washington, DC: CRC Press, 2001.
2. Alebrahim M.T. *Herbicide Resistance in Weeds and Crops* / M. Alebrahim R. Zangouejad, T. Tseng – *Intech Open*. London, UK, 2017.
3. Yuan J.S. Non-target-site herbicide resistance: a family business / J. Yuan, P. Tranel, C. Stewart // *Trends Plant Sci.* – 2007. – Vol.12 – P. 6–1.
4. Powles S.B., Evolution in action: plants resistant to herbicides / Powles S., Q. Yu // *Ann. Rev. Plant Biol.* – 2010. – Vol. 61. – P. 317–347.
5. A novel rice cytochrome P450 gene, *CYP72A31*, confers tolerance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in rice and *Arabidopsis* / H. Saika [et al.]. // *Plant Physiol.* – 2014. – Vol.166. – P. 1232-1240.
6. Cytochrome P450 CYP81A12 and CYP81A21 are associated ACCEPTED MANUSCRIPT with resistance to two acetolactate synthase inhibitors in *Echinochloa phyllopogon* / S. Iwakami [et al.] // *Plant Physiol.* – 2014. – Vol.165. – P. 618-629.
7. Vrbničanin S., *Herbicide Resistance in Weeds and Crops* / S. Vrbničanin, A. Pavlovich, D. Božić // *Intech Open*. London, UK. – 2017. P. 114.
8. Heap I. Herbicide resistant weeds. In: *Integrated Pest Management // Pesticide Problems.* – 2014. – Vol.3. – P. 281-303.
9. Ryan G.F. Resistance of common groundsel to simazine and atrazine / G.F. Ryan // *Weed Sci.* – 1970. – Vol.18. – P. 614–16.
10. Devine M.D. Physiological, biochemical and molecular aspects of herbicide resistance based on altered target sites / M.D. Devine, C.V. Eberlein – In: *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology.* Amsterdam: IOS Press. – 1997. – P. 159-185.
11. Molecular basis for resistance to ACCase-inhibiting herbicides in *Pseudosclerochloa kengiana* populations / G. Yuan [et al.] // *Pesti Biochem.* – 2015. – *Physiol.* – Vol.119. – P. 9-15.
12. Cobb A.H. *Herbicides and Plant Physiology* / A. Cobb, R. Reade // *John Wiley and Sons. UK.* – 2010.
13. Perperopoulou F. Recent advances in protein engineering and biotechnological applications of glutathione transferases / F. Perperopoulou, F. Pouliou, N. Labrou // *Crit. Rev. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 38. – P. 511–52.
14. Plant glutathione transferase-mediated stress tolerance: functions and biotechnological applications / I. Nianiou-Obeidat [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2017. – Vol.36. – P. 791–805.
15. RNA-Seq analysis of rye-grass transcriptomic response to an herbicide inhibiting acetolactate-synthase identifies transcripts linked to non-target-site-based resistance / A. Duhoux [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 2015 – Vol.87. – P. 473–487.
16. Herbicide safeners decrease sensitivity to herbicides inhibiting acetolactate-synthase and likely activate non-target-site-based resistance pathways in the major

- grass weed *Lolium* sp (rye-grass) / A. Duhoux [et al.] // *Front Plant Sci.* – 2017. – Vol. 8. – P. 1310-1323.
17. Flower-specific jasmonate signalling regulates constitutive floral defenses in wild tobacco / R.Li [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2017. – Vol.114. – P. E7205–E7214.
18. Cummins I. Safener responsiveness and multiple herbicide resistance in the weed black-grass (*Alopecurus myosuroides*) / I. Cummins, D.Bryant, R.Edwards // *J. Plant Biotechnol.* – 2009 – Vol.7. – P. 807–820.
19. Genome-wide identification and expression analyses of cytochrome P450 genes in mulberry (*Morus notabilis*) / B.Ma [et al.] // *J. Integrative Plant Biol.* – 2013. – Vol. 56. – P. 887–901.
20. Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. / I. Cummins [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – Vol. 110. – P. 5812-5817.
21. Werck-Reichhart D. Cytochromes P450: a success story / D.Werck-Reichhart, R.Feyereisen *Genome Biol.* – 2000. – Vol. 6. – P. 3003.1-3003.9.
22. Werck-Reichhart D., Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance / D. Werck-Reichhart, A.Hehn, L.Didierjean // *Trends Plant Sci.* – 2000. – Vol.5. – P.1360–1385.
23. Schuler M. Functional genomics of P450s / M. Schuler, D.Werck-Reichhart // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2003. – Vol.54. – P. 629–637.
24. Cytochromes p450 / S.Bak [et al.] // *Arabidopsis Book*. 9: e0144. – 2011.
25. Groves J. Cytochrome P450 enzymes: Understanding the biochemical hieroglyphs. *F1000.Rese.* 4 :178. – 2015.
26. Manikandan P., Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review / P. Manikandan, S.Nagini // *Curr Drug Tar.* – 2018. – Vol.19. – P. 38-54.
27. Cytochrome P450 systems - biological variations of electron transport chains / F.Hannemann [et al.] // *Bba-Gen Subjects.* – 2007. – Vol.1770. – P. 330-344.
28. Gray H. Electron flow through metalloproteins / H. Gray, J.Winkler // *BbaBioenergetics.* – 2010. – Vol.1797. – P.1563-1572.
29. Nelson D. A P450-centric view of plant evolution / D. Nelson, D.Werck-Reichhart D. // *Plant J.* – 2011. – Vol.66. – P.194–211.
30. Genome-Wide Analysis, Classification, Evolution, and Expression Analysis of the Cytochrome P450 93 Family in Land Plants / H.Du [et al.] // *PLoS One.* 11: e0165020. – 2016.
31. Mansuy D. The great diversity of reactions catalyzed by cytochrome P450 / D.Mansuy // *Comp Biochem Physiol Part C.* – 1998 – Vol.121. – P. 5-14.
32. Mizutani M. Diversification of P450 genes during land plant evolution / M. Mizutani, D.Ohta // *Annu Rev Plant Biol.* – 2010. – Vol.61. – P. 291-315.
33. Plant expression of a bacterial cytochrome P450 that catalyzes activation of a sulfonylurea herbicide /D. O’Keefe [et al.] // *Plant Physiol.* – 1994. – Vol.105. – P. 473–482.

34. Mechanisms of olfactory toxicity of the herbicide 2,6-dichlorobenzonitrile: essential roles of CYP2A5 and target-tissue metabolic activation / F.Xie [et al.] // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2010. – Vol.249. – P.101-106.
35. Moos C. Variability in the susceptibility of *Alopecurus myosuroides* (black-grass) to chlortoluron and isoproturon / C.Moos, G.Cussans // *Aspects Appl. Biol.* – 1985. – Vol. 9. – P. 91–98.
36. Heap I. The occurrence of herbicide cross-resistance in a population of annual ryegrass, *Lolium-rigidum*, resistant to diclofopmethyl / I.Heap, R.Knight // *Aust J Agric Res.* – 1986 – Vol.37. – P.149–156.
37. Target-site and non-target-site based resistance to the herbicide tribenuron-methyl in flaxweed (*Descurainia sophia* L.) / Q. Yang [et al.] // *BMC Genomics.* – 2016. – **17.** – P. 551
- Metabolic Resistance to Ace Christopher tolactate Synthase Inhibiting Herbicide Tribenuron-Methyl in *Descurainia sophia* L. Mediated by Cytochrome P450 Enzymes / Q. Yang [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2018. – Vol.17. – P. 4319-4327.
38. Busi R. Evolved polygenic herbicide resistance in *Lolium rigidum* by low-dose herbicide selection within standing genetic variation / R.Busi, Neve P., Powles S. // *Evol Appl.* – 2013 – Vol.6. – P. 231–242.
39. Dinitroaniline herbicide resistance in a multiple-resistant *Lolium rigidum* population / Jb.Chen [et al.] // *Pest Manag. Sci.* – 2018. – Vol.74. – P. 925-932.
40. Busi R. Phorate can reverse P450 metabolism-based herbicide resistance in *Lolium rigidum* / R.Busi, T.Gaines, S.Powles // *Pest Manag. Sci.* – 2017. – Vol.73. – P. 410 – 417.
41. Enhanced herbicide metabolism induced by 2,4-D in herbicide susceptible *Lolium rigidum* provides protection against diclofop-methyl / H.Han [et al.] // *Pest Manag. Sci.* – 2013. – Vol.69. – P. 996–1000.
42. Coupland D. 1994. Resistance to the auxin analog herbicides / D. Coupland // In: Powles SB, Holtum JAM, eds. *Herbicide resistance in plants Biol and biochem. Boca Raton, FL, USA: Lewis Publishers.* – 1994. – P. 171–214.
43. RNA-Seq transcriptome analysis to identify genes involved in metabolism-based diclofop resistance in *Lolium rigidum* / T.Gaines [et al.] // *Plant J.* – 2014. – Vol.78. – P.865–876.
44. CYP81A P450s are involved in concomitant cross-resistance to acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase herbicides in *Echinochloa phyllopogon* / S. Iwakami [et al.] // *New Phytol.* – 2019. – Vol.221. – P. 2112-2122.
45. Functional characterization of cytochrome P450 CYP81A subfamily to disclose the pattern of cross-resistance in *Echinochloa phyllopogon* / Dimaano N. [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 2020. – Vol.102. – P. 403-416.
46. A bentazon and sulfonyleurea sensitive mutant: breeding, genetics, and potential application in seed production of hybrid rice / J.Zhang [et al.] // *Theor Appl Genet.* – 2002. – Vol.105. – P. 16–22.
47. Identification of a cytochrome P450 hydroxylase CYP81A6 as the candidate for the bentazon and sulfonyleurea herbicide resistance gene, *Bel*, in rice / J.Zhang [et al.] // *Mol Breed.* – 2006. – Vol.19. – P. 59–68.

48. Map-based cloning of a novel rice cytochrome P450 gene CYP81A6 that confers resistance to two different classes of herbicides / G.Pan [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 2006. – Vol.61. – P. 933-943. 112
49. Expression of a rice CYP81A6 gene confers tolerance to bentazon and sulfonyleurea herbicides in both *Arabidopsis* and tobacco / C.Liu [et al.] // *Plant Cell Tiss Org.* – 2012. – Vol.109. – P. 419–28. 110
50. Engineering herbicide metabolism in tobacco and *Arabidopsis* with CYP76B1, a cytochrome P450 enzyme from *Jerusalem artichoke* / L. Didierjean // *Plant Physiol.* – 2002. – Vol.130. – P.179-189.
51. Dual function 109 of the cytochrome P450 CYP76 family from *Arabidopsis thaliana* in the metabolism of monoterpenols and phenylurea herbicides / R. Höfer [et al.] // *Plant Physiol.* – 2014. – Vol.166. – P. 1149 – 1161.
52. Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides / B. Siminszky [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1999. – Vol.96. – P. 1750–1755.
53. Mechanisms of resistance to pyroxsulam and ACCase inhibitors in Japanese foxtail (*Alopecurus japonicus*) / Y.J.Feng [et al.] // *Weed Sci.* – 2016 – Vol.64. – P. 695–704.
54. Resistance status of Japanese foxtail (*Alopecurus japonicus*) to fenoxaprop-*P*-ethyl in multiple wheat fields in Anhui Province and involved ACCase gene mutations / N. Zhao [et al.] // *Chin J Pestic Sci.* – 2019. – Vol.21. – P. 35–42.
55. Effect of environmental factors on germination and emergence of shortawn foxtail (*Alopecurus aequalis*) / N. Zhao [et al.] // *Weed Sci.* – 2018. – Vol.66. – P. 47–56.
56. A mechanism of chlorotoluron resistance in *Lolium rigidum* /M. Burnet [et al.] // *Planta.* – 1993. – Vol.190. – P.182–189.
57. Resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) populations to acetolactate synthase-inhibiting herbicides / D.S.Riar, J.K.Norsworthy, J.A.Bond, M.T.Bararpour, M.J.Wilson, R.C.Scott – *Int J Agron.* 2012.
58. Reversing resistance to tembotrione in an *Amaranthus tuberculatus* (var. *rudis*) population from Nebraska, USA with cytochrome P450 inhibitors / M.C.Oliveira [et al.] // *Pest Manag. Sci.* – 2017. – Vol.74. – P. 296–2305.
59. Kleinman Z. Non-target-site glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* is based on modified subcellular distribution of the herbicide / Z. Kleinman, Rubin B. // *Pest Manag. Sci.* – 2017. – Vol.73. – P. 246–253.
60. Nakka S., Thompson C.R., Peterson D.E., Jugulam M. Target site-based and non-target site based resistance to ALS inhibitors in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) / S.Nakka [et al.] // *Weed Sci.* – 2017. – Vol.65. – P. 681–689.
61. Molecular and physiological characterization of six-way resistance in an *Amaranthus tuberculatus* var. *rudis* biotype from Missouri // L. Shergill [et al.] // *Pest. Manag. Sci.* – 2018. – Vol.74. – P. 2688 – 2698.
62. Hatzios K.K. Metabolism-based herbicide resistance: regulation by safeners/ K.Hatzios, N.Burgos // *Weed Sci.* – 2004. – Vol.52. – P. 454–467.

63. Riechers D.E. Detoxification without intoxication: herbicide safeners activate plant defense gene expression / D.Riechers, K. Kreuz, Q. Zhang // *Plant Physiol.* – 2010. – Vol.153. – P. 3–13.
64. Substrate specificity and safener inducibility of the plant UDP-glucose-dependent family 1 glycosyltransferase super-family / M. Brazier-Hicks [et al.] // *J. Plant Biotechnol.* – 2018. – Vol.16. – P. 337–348.
65. The impact of uptake, translocation and metabolism on the differential selectivity between blackgrass and wheat for the herbicide pyroxsulam / G.J. DeBoer [et al.] // *Pest Manag. Sci.* – 2011. – Vol.67. – P. 279–286.
66. Rosenhauer M. Impact of the safener mefenpyr-diethyl on herbicide resistance evolution in *Alopecurus myosuroides* (Huds.) biotypes / M. Rosenhauer, C.Rosinger, J.Petersen // *Julius-Kühn-Arch.* – 2016. – Vol.452. – P. 50–56. 113.
67. Herbicide Handbook of the Weed Science Society of America. 1989. Sixth edition. Champaign, IL.

ДОДАТОК

