

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.

**ПОЛІМОРФІЗМ ЦИТОХРОМУ CYP81A10 ЯК КЛЮЧОВИЙ
КОМПОНЕНТ ДИФЕРЕНЦІЙОВАНОЇ ГЕРБІЦИДНОЇ
МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНОСТІ**

Випускна кваліфікаційна робота
бакалавра студентки спеціальності
091 Біологія
ОП "Біологія (високі технології)"
Гребінчук Вероніки Романівни

Науковий керівник
доцент кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики
Нипорко Олексій Юрійович

Оцінка захисту роботи

АНОТАЦІЯ

Гребінчук В.Р. Поліморфізм цитохрому CYP81A10 як ключовий компонент диференційованої гербіцидної мультирезистентності – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра з спеціальністю 091 Біологія (високі технології)

У роботі було проведено розрахунок молекулярної динаміки комплексів цитохром-гербіцид. Встановлено, структурні механізми того, як виникає стійкість до гербіцидів у рослин. Отримані результати можуть бути використані для подальшого вивчення мультирезистентності до гербіцидів та розумінні цитохром опосередкованого метаболізму гербіцидів.

Ключові слова: цитохром P450, резистентність до гербіцидів, мультирезистентність, молекулярна динаміка

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

TSR – target-site resistance – резистентність цільового сайту

NTSR – non-target-site resistance – резистентність нецільового сайту

MHR – multiple-herbicide resistance – мультирезистентність до гербіцидів

GTs – глюкозилтрансфераза

GSTs – глутатіон S-трансферази

ALS - acetolactate synthase – ацетолактат синтаза

R – resistant – резистентні

S – susceptible – чутливі

MD - molecular dynamics – молекулярна динаміка

IZM – imazamox - імазамокс

NS – nicosulfuron – нікосульфурон

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури	6
1.1 Резистентність до гербіцидів.....	6
1.1.1 Мультирезистентність до гербіцидів.....	6
1.1.2 Резистентність цільового сайту (TSR).....	7
1.1.3 Резистентність нецільового сайту (NTSR).....	8
1.1.4 Резистентність до імазамоксу.....	9
1.1.5 Резистентність до нікосульфурону.....	10
1.2 Цитохром P450-опосередкований метаболізм гербіцидів у рослин.....	12
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи дослідження	14
2.1 GROMACS.....	14
2.2 Створення 3-D структури досліджуваних цитохромів.....	14
2.3 Створення топології цитохромів.....	15
2.4 Створення топології ліганду.....	16
2.5 Створення топології комплексу білок-ліганд.....	16
2.6 Визначення елементарної комірки, додавання розчинника.....	17
2.7 Нейтралізація системи.....	17
2.8 Мінімізація енергії.....	17
2.9 Врівноваження.....	18
2.10 Production MD.....	19
РОЗДІЛ 3 Результати та їх обговорення	20
ВИСНОВКИ	32
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	33

ВСТУП

Швидка та широка еволюція мультирезистентності до гербіцидів у бур'янів по всьому світу є великою загрозою для сільського господарства та глобального виробництва харчових продуктів. Гербіциди – це технологія, яка використовується для ефективної боротьби з бур'янами. Їх постійне і повсюдне використання призводить до появи стійких популяцій. Є різні механізми виникнення стійкості: TSR та NTSR. Цитохром P450 є одним з головних об'єктів у дослідженнях метаболізму гербіцидів, що є прикладом механізму NTSR, через їх здатність забезпечувати селективність сільськогосподарських культур та стійкість до бур'янів. Адже, на жаль, ці хімічні сполуки можуть вражати й культурні рослини, що також негативно впливає на агрокультуру.

На сьогодні видно відмінності в субстратній специфічності кожного цитохрому, що бере участь в метаболізмі гербіцидів. Тому актуально порівнювати специфіку та структурні механізми зв'язування відомих цитохромів з різними гербіцидами. Це допоможе розробити стратегії захисту культурних рослин, а також керувати стійкістю бур'янів до гербіцидів.

Мета роботи: дослідити структурні механізми виникнення резистентності на прикладі зв'язування CYP81A10 з гербіцидами (імазамоксу та нікосульфурону) за допомогою методів молекулярної динаміки.

РОЗДІЛ 1 Огляд літератури

1.1 Резистентність до гербіцидів

Гербіциди – це хімічні сполуки, які використовуються для боротьби з бур'янами. Резистентність до гербіцидів – це набута спадкова властивість рослин виживати та розмножуватись під впливом цих речовин. Це явище є дивовижним прикладом адаптивної еволюції диких рослин, що заражають агроєкосистеми і вже мають шкідливі наслідки для сільського господарства в усьому світі. Стійкість до гербіцидів значною мірою залежить від виду рослин, біохімічних властивостей використовуваних речовин, а також, від кількості та швидкості їхнього внесення, генетичних факторів, наприклад, таких як частота стійких алелей тощо [1].

1.1.1 Мультирезистентність до гербіцидів

На сьогоднішній день найбільшу проблему становить мультирезистентність до гербіцидів (MHR). Вона визначається як процес в якому різні механізми стійкості присутні в межах особини або популяції рослин, кожен з яких надає стійкість до гербіцидів різного місця дії. Мультирезистентністю також вважається й коли індивід стійкий до гербіцидів з більш ніж однієї групи дії [2]. Ці множинні механізми можуть включати або механізми резистентності цільового сайту (TSR), або механізми резистентності нецільового сайту (NTSR), або будь-яку іншу комбінацію. Цей процес може розвиватись завдяки такій унікальній події, як послідовний вибір алелей стійкості в окремих рослинах та генетичний обмін незалежно розвиненими мутаціями стійкості, які виникли через схрещування. Наприклад, MHR може виникати за рахунок поєднання як точкової мутації гена в цільовому місці (приклад TSR) так і резистентності на основі метаболізму (приклад NTSR). Незалежно від рушійного фактора, кінцевим результатом є набір різних механізмів стійкості на рівні організму чи популяції, що забезпечує широку резистентність до багатьох гербіцидів різного хімічного складу та різних способів дій [3].

1.1.2 Резистентність цільового сайту (TSR)

Гербицид має певне цільове місце, в якому він діє, порушуючи певний процес або функцію в рослині. Якщо дещо змінити цю ділянку дії, то гербицид не зможе зв'язатись з цільовим сайтом і не виявить фітотоксичну дію, що дозволить рослині пережити хімічну обробку. Цей процес показано на рис.1 і називається резистентністю цільового сайту (TSR) і є найпоширенішим механізмом стійкості, який було відкрито у 1980-1990х рр. [4].

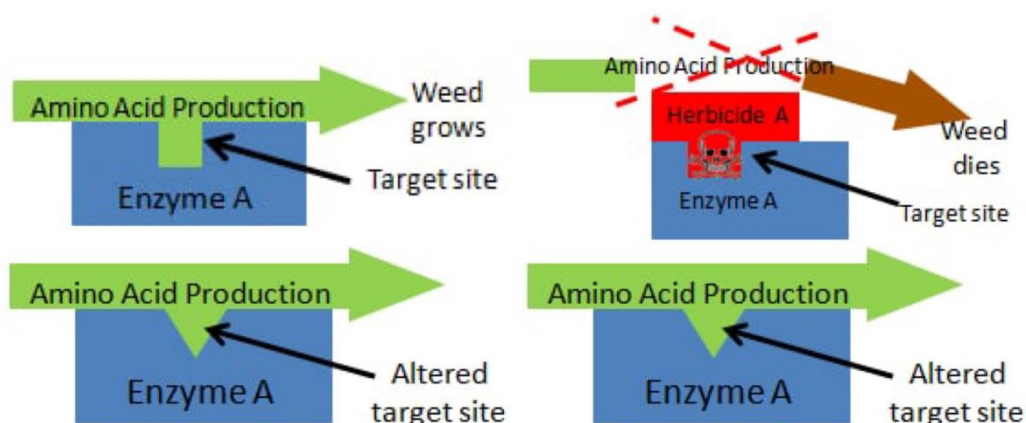


Рис. 1 Дія гербициду без та з механізмом TSR

Мутації, що спричинюють TSR можна класифікувати на два типи. Перший виникає шляхом мутації в межах одного гена, що кодує фермент цільового сайту гербициду, який впливає на його зв'язування з каталітичним доменом або поблизу нього, чи в областях, що впливають на доступ до них. Очікується, що такі мутації викличуть структурну модифікацію тривимірної структури мішені, що призведе до зниження ефективності гербициду або збільшення цільової активності. Деякі гербициди зв'язують кілька білків, що є причиною ускладнення розвитку резистентності. Другий тип мутацій призводить до різниці в експресії одного або декількох генів у стійких рослин у порівнянні з чутливими рослинами, або через модифікацію некодуючої послідовності гена, що відповідає за мішень, або через мутацію регуляторного гена. Ці мутації викликають збільшення експресії білка-мішені, який компенсує інгібуючу дію гербициду. Тобто, TSR змінює послідовність амінокислот та рівень експресії цільового ферменту, знижуючи здатність гербициду інгібувати

фермент або вимагаючи більшої концентрації гербіциду для досягнення адекватного інгібування. [2].

1.1.3 Резистентність нецільового сайту (NTSR)

Цей тип стійкості також часто називають метаболічною резистентністю і використовується для опису всіх механізмів, що є відмінними від змін у цільовому сайті. Потенційні механізми включають зниження концентрації гербіциду, що залишається доступним для взаємодії з білком цільового сайту, а також механізми, які дозволяють рослині впоратись з його інгібуванням. Ще механізми цього виду резистентності можуть включати зниження поглинання і зниження транслокації, посилення секвестрації і посилення метаболізму гербіциду [2].

На відміну від TSR, якій в більшості випадків характерна моногенетична спадковість, вважається, що NTSR має полігенне успадкування. Резистентність на основі метаболізму найчастіше залежить від ендогенних ферментів рослин, таких як монооксигенази цитохрому P450 (P450s), глюкозилтрансферази (GTs), глутатіон S-трансферази (GSTs). Зокрема, саме монооксигенази цитохрому P450 найчастіше відповідають за посилений метаболізм гербіцидів у рослинах.

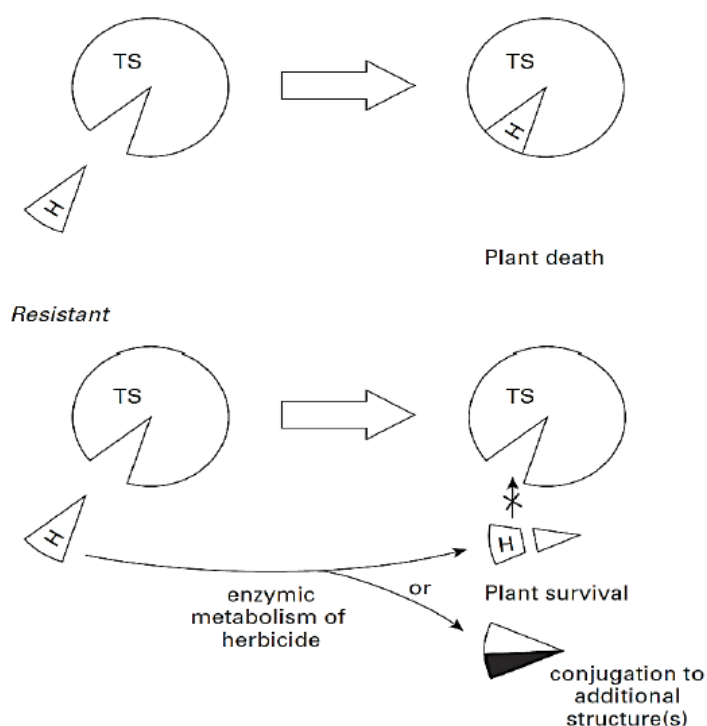


Рис. 2 Схеми підвищеної метаболічної стійкості [14]

Під інтенсивним селекційним тиском високоефективних гербіцидів можуть бути обрані всі можливі механізми стійкості, включаючи комбінації TSR та NTSR, які надають рослині більші шанси на виживання та розмноження. Вони поєднуються завдяки перехресному запиленню, тому види з високим рівнем такого типу запилення накопичують різноманітні механізми стійкості швидше, на відміну від самоzapильних рослин. [5].

Ситуація, коли бур'яни стають стійкими до гербіцидів завдяки різноманітним способам резистентності лише погіршується, і як показує тенденція останніх десятиліть, агрокультура змушена покладатись на все більш обмежений спектр діючих речовин. Тому механізми NTSR викликають велике занепокоєння, оскільки вони можуть надавати стійкість до гербіцидів із досить різних хімічних сімейств, що унеможлиблює використання ротацій або сумішей цих хімічних сполук у рамках комплексного підходу [6].

1.1.4 Резистентність до імазамоксу

Імазамокс [(5-(метоксиметил)-2-(4-метил-5-оксо-4-пропан-2-іл-1H-імідазол-2-іл) піридин-3-карбонова кислота)] належить до родини імідазолінонів. Це гербіцид системної дії, який переміщується по всій рослинній тканині й інгібує фермент ацетолактатсинтазу (ALS), який бере участь у синтезі незамінних амінокислот із розгалуженим ланцюгом ізолеїцину, лейцину та валіну. Його дія є швидкою, адже чутливі до цієї сполуки рослини припиняють рости вже незабаром після обробки, але сама загибель рослин відбувається протягом кількох тижнів [7].

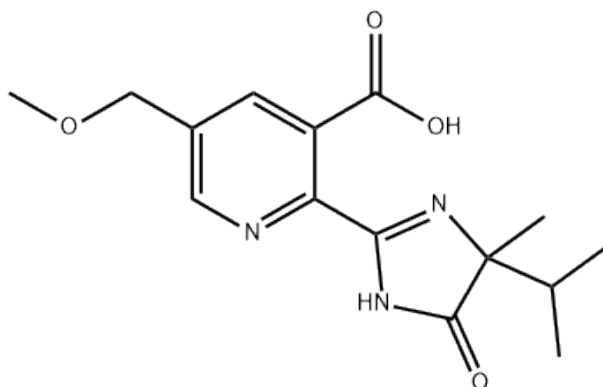


Рис. 3 Молекула імазамоксу

Одним з найчастіших механізмів резистентності до імазамоксу є поява точкових мутацій в гені ALS. На сьогоднішній день добре описані 8 точкових мутацій: Ala122, Pro197, Ala205, Asp 376, Arg377, Trp574, Ser653 й Asn654. Вони демонструють різні моделі перехресної резистентності до різних хімічних родин гербіцидів, що інгібують ALS. Це є типовим прикладом механізму TSR, який зазвичай забезпечує високий рівень стійкості до гербіцидів. Наприклад, в дослідженнях стійкості дикого маку *Papaver rhoeas*, рослини, що несуть заміну Thr197 були стійкими або помірно стійкими до імазамоксу, хоча й Pro197 не бере участі у його зв'язуванні [8].

Окрім зазначеного вище механізму TSR, дослідження показали, що варіації NTSR також можуть забезпечувати високі рівні резистентності до імазамоксу, оскільки вони можуть знизити концентрацію гербіциду в меристематичних тканинах до нетоксичних рівнів. До таких належать відсутність поглинання і транслокації гербіцидів, метаболізм гербіцидів тощо. Механізми NTSR можуть відрізнитись між собою в залежності від виду рослини та механізмом дії гербіцидів. Диференційна транслокація гербіциду може бути викликана різними факторами, такими як утримання чи секвестрування гербіциду, переміщення гербіциду та його метаболітів усередину рослини [9]. В дослідженнях, проведених на дикому маці *Papaver rhoeas* продемонстрували наявність гідроксиметаболіту, що є прямим доказом присутності механізмів NTSR. Метаболіти були виявлені не в усіх популяціях, але чутлива група рослин переміщала значну кількість імазамоксу до коренів, тоді як в стійких популяціях майже нічого не було виявлено [8].

1.1.4 Резистентність до нікосульфурону

Нікосульфурон 2-[(4,6-диметоксипіримідин-2-іл) карбамоілсульфамоіл] - N,N-диметилпіридин-3-карбоксамід – гербіцид сульфонілсечовини, який контролює однорічні злакові, широколистяні та багаторічні бур'яни. Ця речовина має чудову селективність до кукурудзи. Він швидко поглинається тканиною листя і переміщується через флоему і ксилему. Як і імазамокс, нікосульфурон інгібує ALS [10].

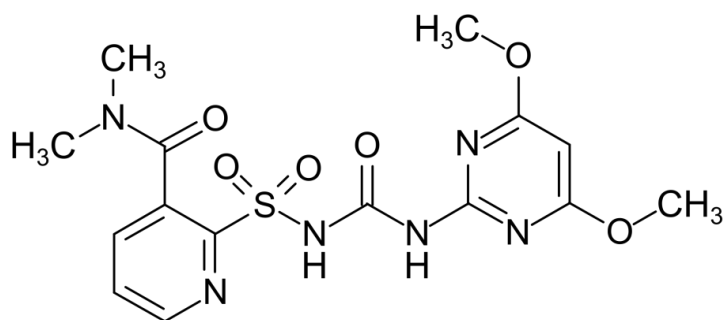


Рис. 4 Молекула Нікосульфурону

Знову ж таки, в дослідженнях стійкості дикого маку *Papaver rhoeas* було виявлено шість амінокислотних замінів у позиції Pro197 - Ala197, Arg197, His197, Leu197, Thr197 і Ser197. Амінокислотний залишок Pro197 безпосередньо бере участь у закріпленні ароматичного кільця сульфонілсечовини. Будь-яка зміна цього положення вплине на зв'язування сульфонілсечовини, що призведе до сильної стійкості до гербіцидів цієї групи [8]. Інші дослідження механізму TSR до нікосульфурону показали, що лише одна форма амінокислотної мутації в позиції 376 (Asp-376-Glu) була виявлена у всіх видів рослин, про які повідомлялось, та надавала стійкість до цієї сполуки. У цьому дослідженні й було визначено, що це є цільовим місцем для резистентності до нікосульфурону. Аналіз послідовності ASL показав, що мутація Asp-376-Glu була не лише присутня у всіх резистентних популяціях, але й була переважаючою у них [11].

Малатіон інгібує CYP450 і зазвичай використовується як індикатор метаболічної резистентності до гербіцидів ASL, опосередкованої CYP450 і належить до механізмів NTSR. Як показують експерименти він значно знижує рівень стійкості бур'янів до нікосульфурону[12]. Наприклад, в дослідженні на мишаю зеленому (*Setaria viridis*), у рослин, оброблених малатіоном та нікосульфуроном, спостерігались більш ушкодженні субпопуляції та їх рівень виживання значно знизився, GR зменшився в одній субпопуляції на 37%, в іншій – на 33% [13]. Це вказує на те, що один або декілька P450s можуть бути залученими до механізмів стійкості до гербіциду нікосульфурону [12].

1.2 Цитохром P450-опосередкований метаболізм гербіцидів у рослин

Цитохроми P450 – це гемопротеїни, утворені з 400-500 амінокислотних залишків і простетичної групи заліза-порфірину IX, розташованої в ядрі білка, що утворює активний центр [14]. Це мембранно-зв'язані білки, локалізовані в ендоплазматичній сітці. Як монооксигенази, P450 зазвичай вставляють один атом кисню в інертні гідрофобні молекули, щоб зробити їх більш реакційноздатними та водорозчинними. P450 є однією з найбільших надсімейств ферментних білків у рослинах. Вони класифікуються відповідно до їх ідентичності у послідовностях та філогенезу. Кількість й різноманітність P450 саме у рослин значно вища ніж в будь-яких інших організмах[15].

Суперсімейство генів рослинних P450 становить до 1% геному рослини, які кодують різноманітні ферменти, що каталізують різні процеси метаболізму рослин, включаючи детоксикацію гербіцидів. Цей факт є важливим для розуміння того, як пов'язані цитохроми P450 та резистентність до гербіцидів. Останній прогрес показав, що кілька генів P450, що кодують CYP71, CYP72, CYP73, CYP76, CYP81 і CYP749, забезпечують метаболічну стійкість до ацетил-КоА карбоксилази (ACCCase), ацетолактатсинтази (ALS)-, фотосистеми гідроксителу II (PSS) (HPPD)-, фітоендесатуразу- (PDS), дезокси-D-ксилулозефосфатсинтазу (DXPS)- та протопорфіріногеноксидазу (PPO). Ці P450 були в основному виділені з польових культур, такі як рис (*Oryza sativa*), ячмінь (*Hordeum vulgare*), бавовна (*Gossypium hirsutum*), соя (*Glycine max*), кукурудза (*Zea mays*) та топінамбур (*Helianthus tuberosus*). Незрозумілими залишаються генетичні механізми стійкості на основі P450: спричинено це поліморфізмом одного нуклеотиду в генах P450 чи зміною кількості копій, чи регуляторними змінами, так як вони досі є не вивченими [16].

Ймовірно, що велика різноманітність генів P450 у рослин розвивалась для хімічного захисту, головним чином для деградації ксенобіотиків, і так склалось, ці гени також детоксикують гербіциди [17]. За останні 20 років було виявлено, що близько 30 P450 з різних видів рослин метаболізують гербіциди. Бур'яни,

які набувають стійкості за допомогою P450 є серйозною загрозою, так як цитохроми мають здатність наділяти стійкістю до вже існуючих та нових гербіцидів. Дослідження метаболізму гербіцидів у рослинах, опосередкованих P450, показали що: 1) P450, що належать до різних сімейств, можуть метаболізувати подібні гербіциди; 2) один P450 може метаболізувати кілька гербіцидів з подібних або навіть різних родин; 3) P450, які беруть участь у біосинтетичних шляхах можуть використовувати гербіциди як свої субстрати [18].

Перший доказ того, що специфічний фермент P450 відіграє важливу роль у резистентності до бензатону та сульфонілсечовини був зареєстрований в рисі з CYP81A6. Експресія цього цитохрому також підвищила толерантність до гербіцидів арабідопсису та тютюну. Пізніше було показано, що CYP81A в інших зернових культурах може метаболізувати гербіциди. Наприклад, CYP81A9 у кукурудзі метаболізував нікосульфурон [19].

Загалом широке розпізнавання субстратом рослинних ферментів P450 становить загрозу для боротьби з бур'янами через потенційно непередбачувані моделі резистентності. Хоча, як показують дослідження 2020р. CYP81A12 та CYP81A21 можуть метаболізувати інгібітори ALS шляхом деметилювання, так самі гени беруть участь у перехресній резистентності до таких інгібіторів як диклофоп-метил. Ферменти P450 родини CYP81A, схоже, є «супер P450», адже як показують результати експериментів, вони здатні метаболізувати різні родини гербіцидів в межах різних механізмів дії в одного виду рослин. Також виявлено, що ферменти P450 інших сімейств (окрім CYP81A), таких як CYP72, CYP71, CYP70 та CYP96 також метаболізують різні гербіциди. Розуміння ролі P450 в механізмах резистентності до гербіцидів є складним через труднощі у вивченні великої кількості ферментів P450, а також через те, що потрібно вивчати роль поліморфізм генів, які кодують P450, особливо у поліплоїдних рослин, як шлях до створення нових алельних варіацій та посилення експресії [2].

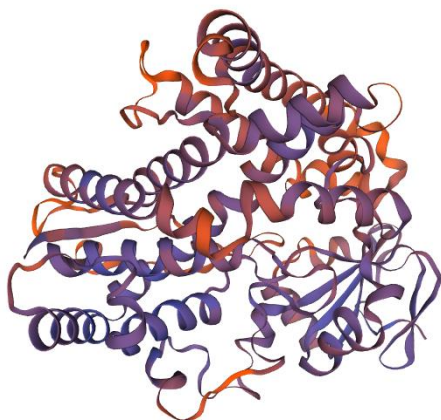
РОЗДІЛ 2 Матеріали та методи дослідження

2.1 GROMACS

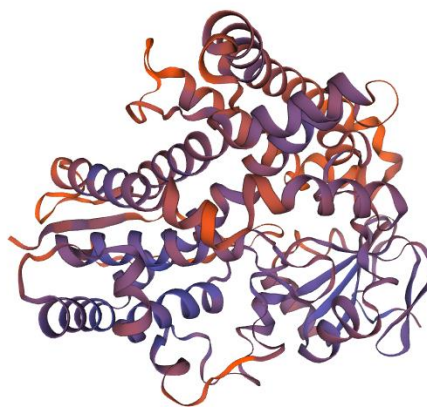
GROMACS (аббревіатура від GRONingen MACHine for Chemical Simulation) – це пакет молекулярної динаміки, в основному розроблений для моделювання біологічних макромолекул (білків, ліпідів і нуклеїнових кислот) у водних та мембранних середовищах. GROMACS керується через інтерфейс командного рядка і може використовувати файли для введення та виведення. Саме завдяки цьому пакету зроблене дослідження із застосуванням методу молекулярної динаміки (MD), який базується на ньютонівській механіці і дозволяє розраховувати класичні траєкторії окремих атомів і полімерних ланцюгів. Метод MD дає можливість вивчати поведінку білка та ліганду протягом певного проміжку часу.

2.2 Створення 3-D структури досліджуваних цитохромів

Об'єктом дослідження було обрано амінопоследовності 3 S та 3 R цитохромів. За допомогою веб-серверу SWISS MODEL було створено 3-D структури досліджуваних білків і отриманні pdb файли, які в подальшому використовувались у дослідженні. Результати цього етапу виглядають так:



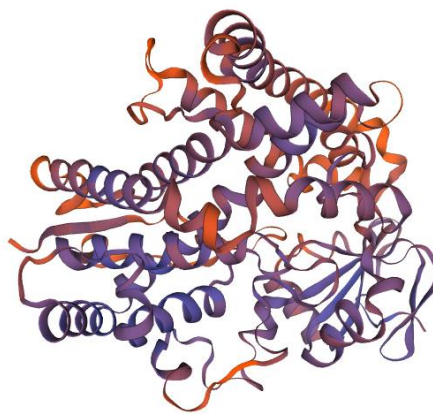
Молекула CYP81A10S1



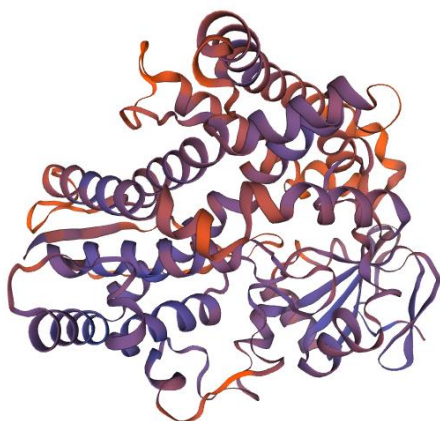
Молекула CYP81A10S2



Молекула CYP81A10S3



Молекула CYP81A10R1



Молекула CYP81A10R2



Молекула CYP81A10R3

Щоб створити топологію системи білок-ліганд потрібно виконати декілька кроків: спочатку створити топологію білка, далі топологію ліганду і після цього з'єднати їх в одну систему. В якості ліганда будуть обрані гербіциди: нікосульфурон та імазамокс. Структури обраних хімічних сполук завантажені з бібліотеки PUBCHEM.

2.3 Створення топології цитохромів

При створенні топології білка використовується силове поле CHARMM36, отримане з веб-сайту лабораторії MacKerell. Використовувалась команда:

```
gmx pdb2gmx -f CYP81A10S1.pdb -o CYP81A10S1.gro
```

2.4 Створення топології ліганду

Цей крок було зроблено за допомогою веб-серверу SWISS PARAM, який спеціалізується на створенні топології та параметрів для малих органічних молекул. Він сумісний із силовим полем усіх атомів CHARMM, для використання з CHARMM та GROMACS. Сервер працює із файлами mol2, у які попередньо були конвертовані обрані гербіциди. У SWISS PARAM було зроблено топологію для імазамоксу та нікосульфурону, яка записана в .itp файлах.

2.5 Створення топології комплексу білок-ліганд

На основі файлу gro, який було зроблено для кожного з досліджуваних цитохромів, створено файл complex.gro, в якому до координат білка додано координати ліганду, при цьому у файлі змінено число атомів, так як до атомів білка додалися атоми гербіциду.

Наступним кроком буде включення ліганду в топологію системи (файл topol.top) за допомогою команди #include "Nicosulfuron.itp" та додається назва ліганду. Тепер файл має такий вигляд:

```

15 ;      Command line:
16 ;      gmx pdb2gmx -f CYP81A10S1.pdb -o CYP81A10S1.gro
17 ;      Force field was read from current directory or a relative path - path added.
18 ;
19
20 ; Include forcefield parameters
21 #include "./charmm36-mar2019.ff/forcefield.itp"
22 #include "Nicosulfuron.itp"
23
24 [ moleculetype ]
25 ; Name          nrexcl
26 Protein_chain_A    3
27
28 [ atoms ]
29 ;  nr          type  resnr residue  atom   cgnr      charge      mass  typeB   chargeB   massB
30 ; residue    36 GLN rtp  GLN   q +1.0
31   1           NH3    36   GLN    N      1       -0.3       14.007
32   2           HC     36   GLN   H1     2        0.33       1.008
33   3           HC     36   GLN   H2     3        0.33       1.008
34   4           HC     36   GLN   H3     4        0.33       1.008

```

```

69437 ; Include topology for ions
69438 #include "./charmm36-mar2019.ff/ions.itp"
69439
69440 [ system ]
69441 ; Name
69442 2 Untitled Project in water
69443
69444 [ molecules ]
69445 ; Compound          #mols
69446 Nicosulfuron        1
69447 Protein_chain_A     1

```

2.6 Визначення елементарної комірки, додавання розчинника

Насправді на цьому етапі робочий процес подібний до будь-якого іншого моделювання молекулярної динаміки MD. Визнається елементарна комірка і додається розчинник за допомогою команд:

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

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

2.7 Нейтралізація системи

Отримано сольватовану систему, яка містить заряджений білок. Тому необхідно нейтралізувати систему. За допомогою grompp і файлу .mdp для мінімізації енергії збирається .tpr файл. Командний рядок виглядає наступним чином:

```
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 -pname NA -nname CL -neutral
```

2.8 Мінімізація енергії

Першим кроком було створення файлу вхідних параметрів em.mdp, далі створювався .tpr файл за допомогою команди:

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

Після її виконання можна запускати модуль мінімізації енергії командою:

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

В таблиці наведено дані для кожної з систем, отримані після виконання mdrun

System	Potential Energy	Maximum force	Norm of force
CYP81A10S1+NS	-2.5995502e+05	4.1610669e+03 on atom 7344	4.1749768e+01
CYP81A10S1+IZM	-3.2205581e+05	9.2048901e+02 on atom 15	2.8440328e+01
CYP81A10S2+NS	-3.2979931e+05	6.7944153e+02 on atom 26	2.0567532e+01
CYP81A10S2+IZM	-3.2348738e+05	8.9654120e+02 on atom 20	2.5215679e+01
CYP81A10S3+NS	-3.2794841e+05	8.7824310e+02 on atom 26	2.3151742e+01
CYP81A10S3+IZM	-3.1041809e+05	9.8350281e+02 on atom 15	2.8273642e+01
CYP81A10R1+NS	-3.1682872e+05	8.6504156e+02 on atom 26	2.8469622e+01
CYP81A10R1+IZM	-3.2258809e+05	8.5521661e+02 on atom 15	2.0553579e+01
CYP81A10R2+NS	-3.1898119e+05	9.1541223e+02 on atom 26	2.5744967e+01
CYP81A10R2+IZM	-3.0505534e+05	8.7476758e+02 on atom 15	2.6899457e+01
CYP81A10R3+NS	-3.1794666e+05	9.9569965e+02 on atom 26	2.7723500e+01
CYP81A10R3+IZM	-3.1616534e+05	9.3380219e+02 on atom 15	2.7488884e+01

Тепер коли системи знаходяться на мінімумі енергії, можна почати розглядати справжню динаміку.

2. 9 Врівноваження

Врівноваження – це необхідний крок перед MD. Процес проводився у два етапи. Перший відбувається під ансамблем NVT (constant Number of particles, Volume, and Temperature – постійна кількість частинок, об’єм і температура). Цей ансамбль також називають «ізотермічно-ізохорним» або «канонічним». Він стабілізує температуру системи. Створюється .mdp файл з параметрами і в командному рядку вказується:

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

```
gmx mdrun -deffnm nvt
```

Перед збором даних також потрібно стабілізувати тиск системи. Це врівноваження проводиться з ансамблем NPT, де кількість частинок, тиск і температура є постійними. Його також називають «ізотермічно-ізобаричним» і він найбільше нагадує експериментальні умови. Результати отримуємо завдяки командам:

```
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
```

2.10 Production MD

Після завершення двох фаз врівноваження можна скасувати запуснути production MD для збору даних. Тривалість 10нс.

```
gmx grompp -f md.mdp -c npt.gro -t npt.cpt -p topol.top -n index.ndx -o md_0_10.tpr
```

```
gmx mdrun -deffnm md_0_10
```

Дізнаємось результати енергетичних умов за допомогою команди:

```
gmx energy -f md_0_10_S1NS.edr -o S1NS.xvg -sum -fee
```

РОЗДІЛ 3 Результати та їх обговорення

Загальний вигляд комплексу цитохром-імазамокс:

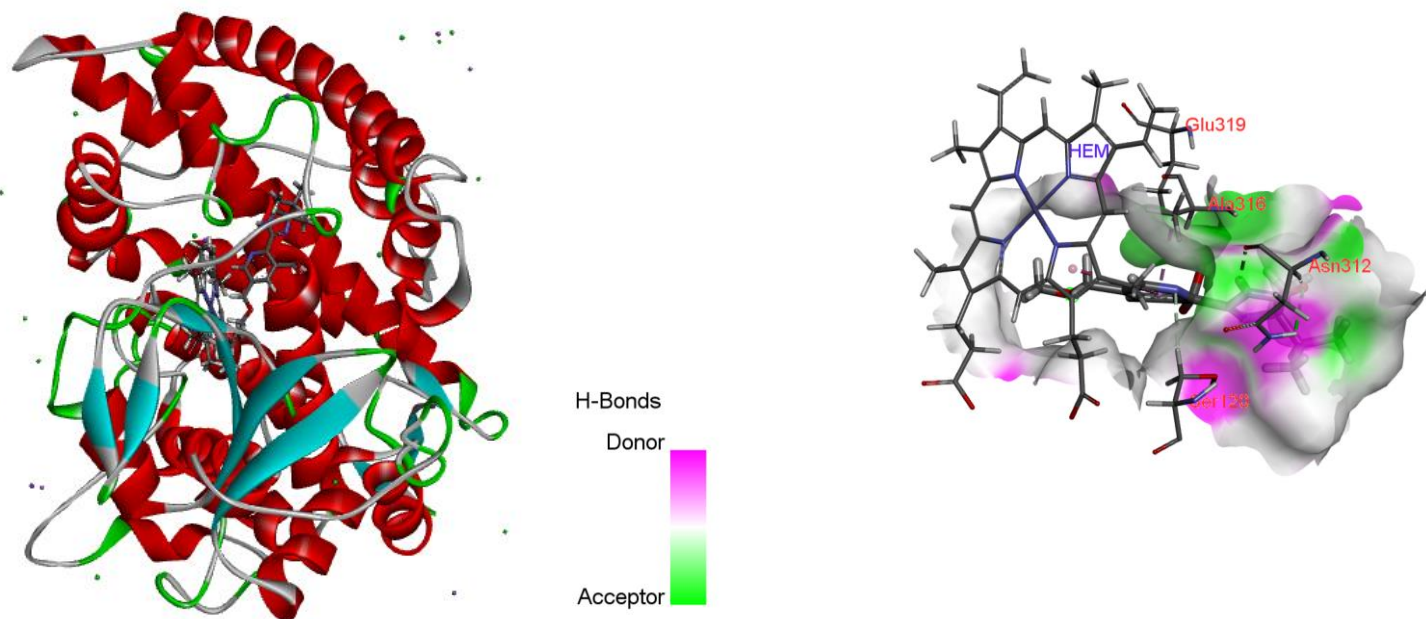


Рис. 5 комплекс цитохром-імазамокс

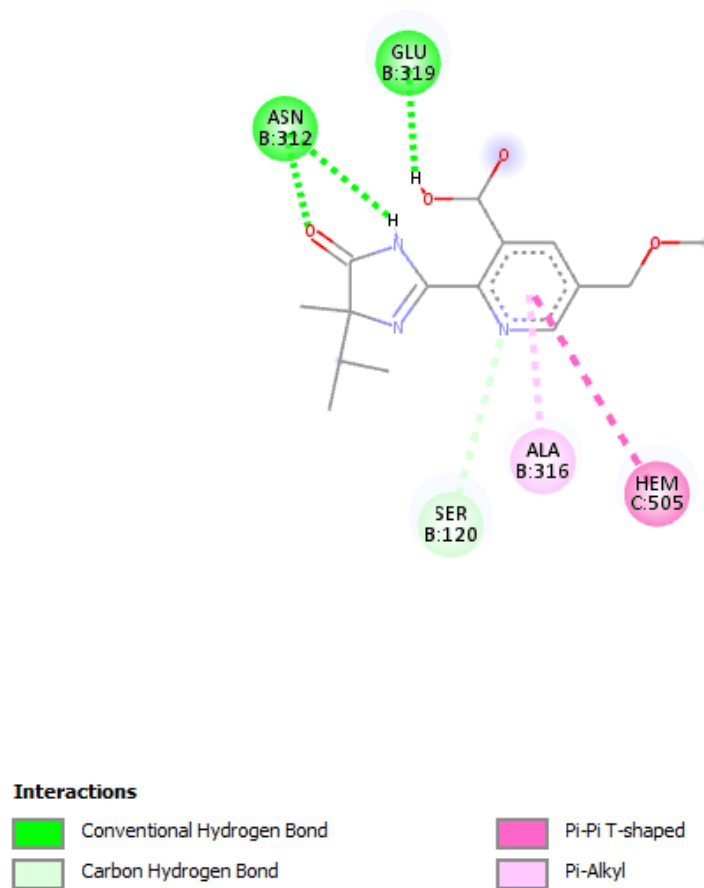


Рис. 6 Діаграма для комплексу цитохром-імазамокс

Імазамокс утворює 5 контактів, з них 2 водневі зв'язки з ASN312 та GLU319, 1 карбон-гідрогеновий зв'язок із SER120. Існує 2 несприйнятливих контакти.

Загальний вигляд комплексу цитохром-нікосульфурон:

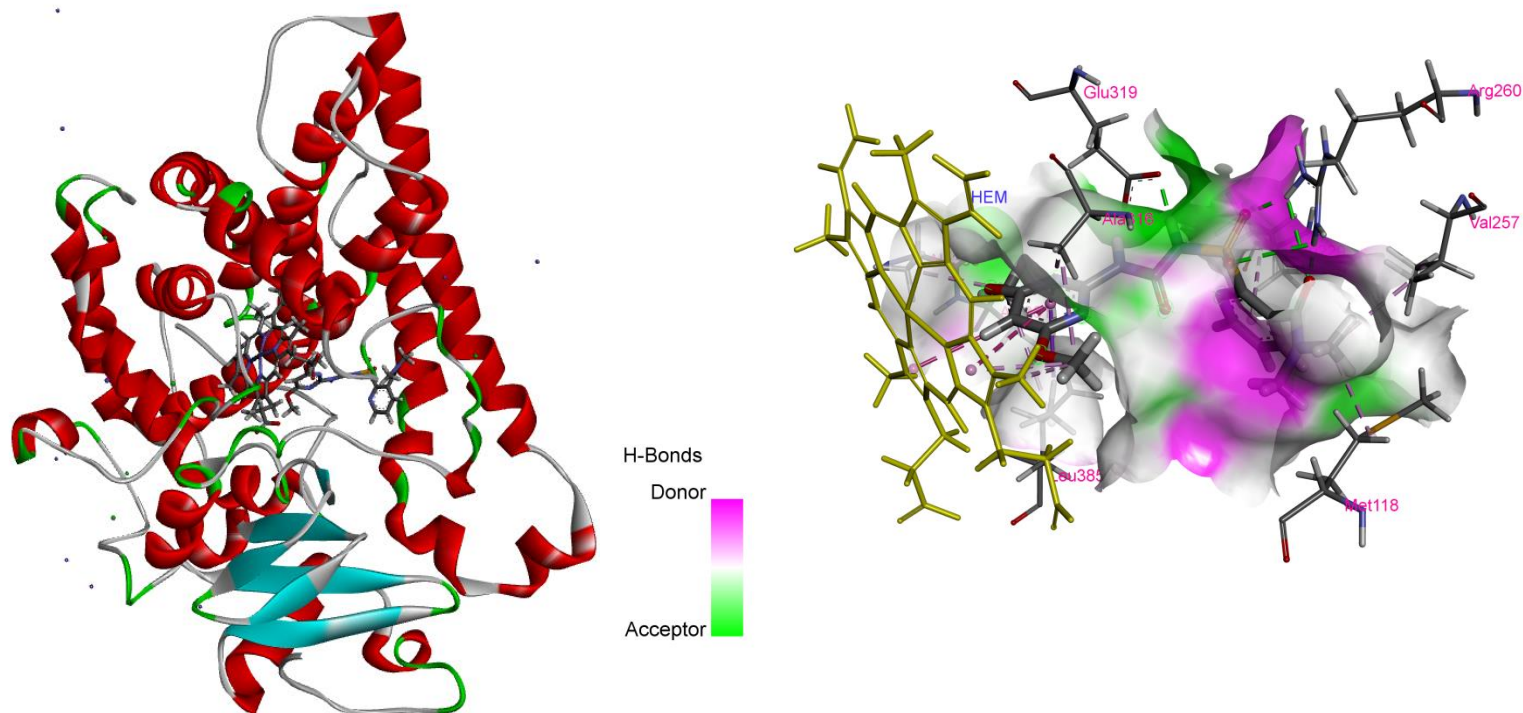


Рис. 7 комплекс цитохром-нікосульфурон

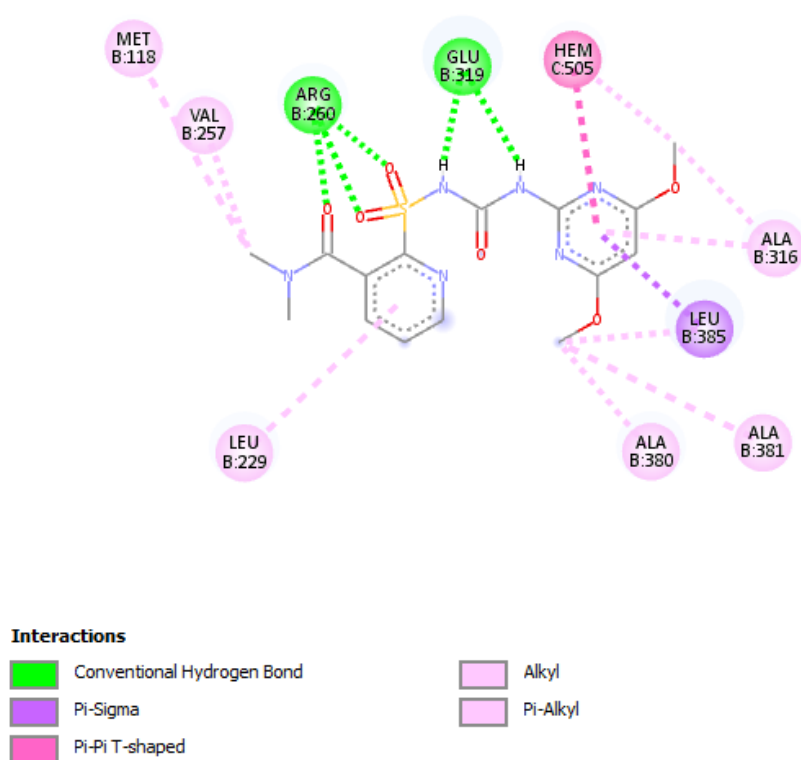


Рис. 8 Діаграма для комплексу цитохром-нікосульфурон

Нікосульфурон в свою чергу утворює 10 контактів, з них 2 водневі зв'язки з ARG260 та GLU319, й не утворює карбон-гідрогеновий зв'язок. Існує 6 несприйнятливих контакти.

З результатів, отриманих у кожному файлі .xvg будуються графіки, за допомогою яких можна визначити як поводить себе енергія зв'язування:

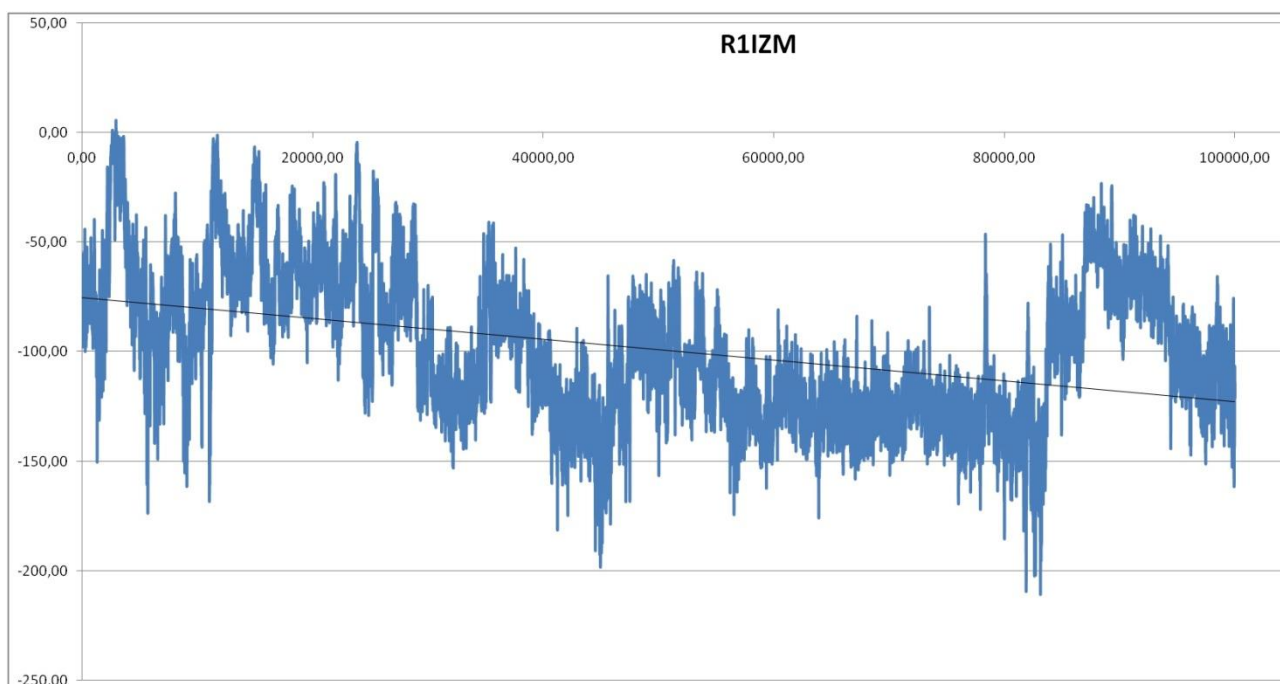


Рис. 9 графік енергії зв'язування для системи R1 + імазамокс

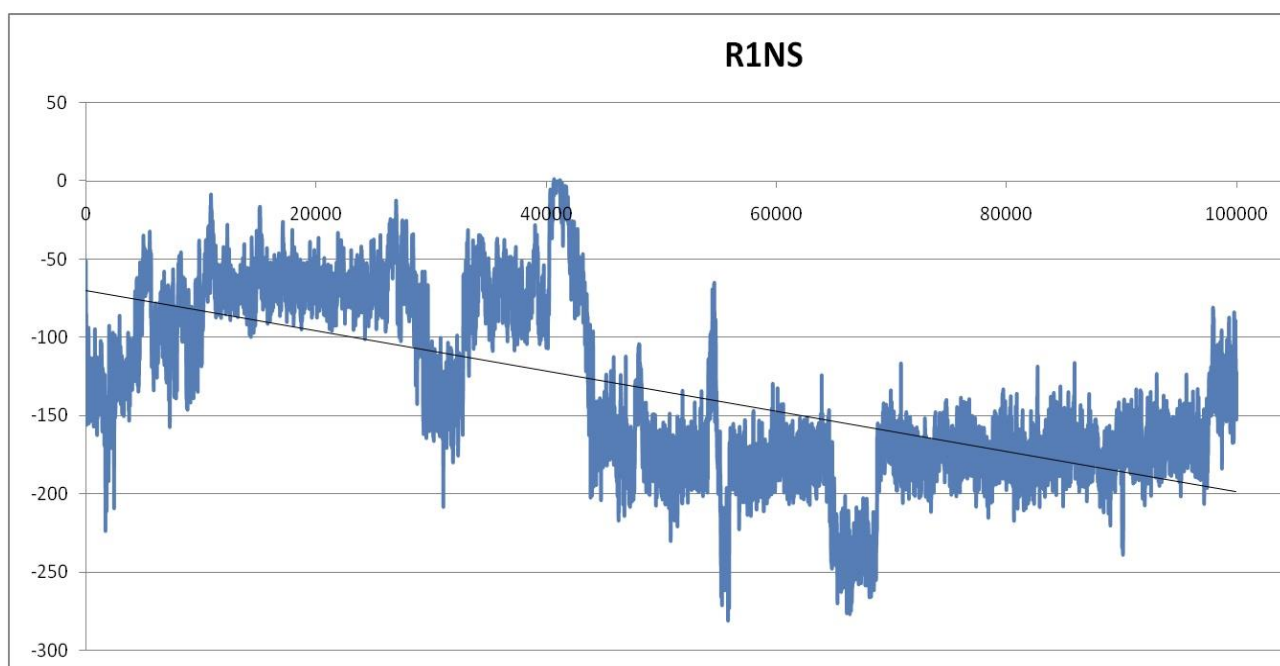


Рис. 10 графік енергії зв'язування для системи R1 + нікосульфурон

Бачимо тенденцію до зменшення енергії в ізотопі R1 CYP81A10 та те, що система продовжує еволюціонувати. R1 краще буде зв'язувати нікосульфурон, так як енергія зв'язування цього комплексу є меншою.

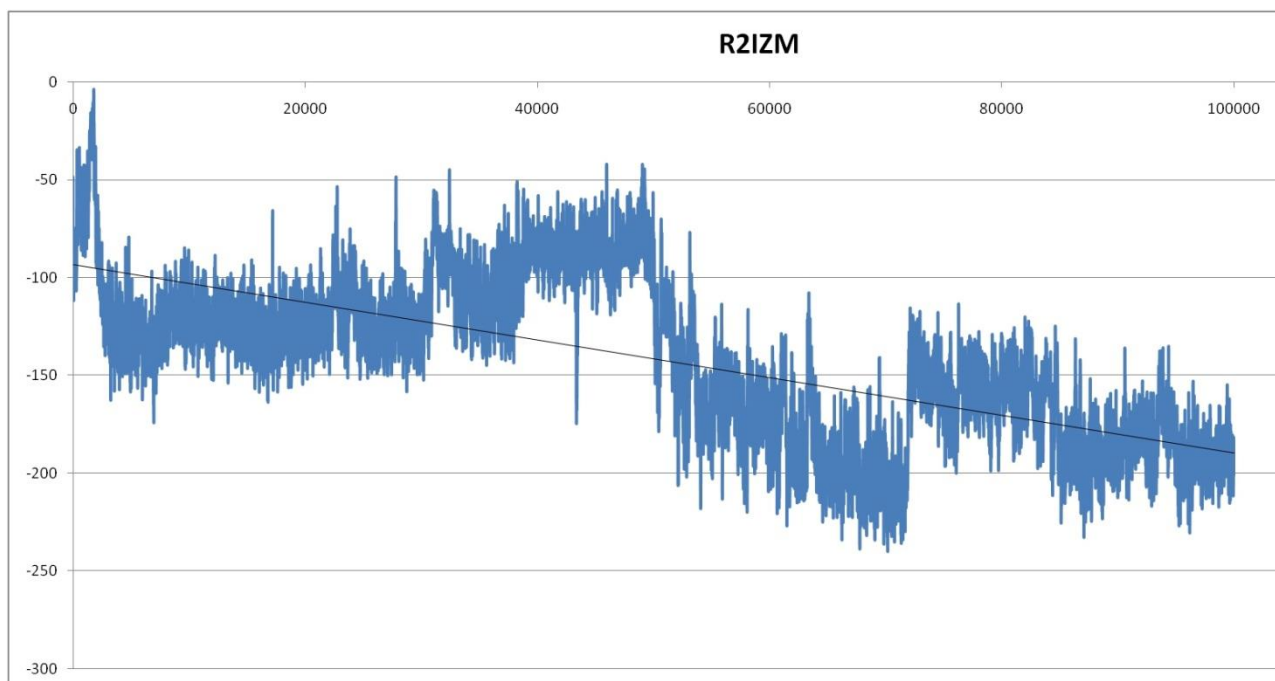


Рис. 11 графік енергії зв'язування для системи R2 + імазамокс

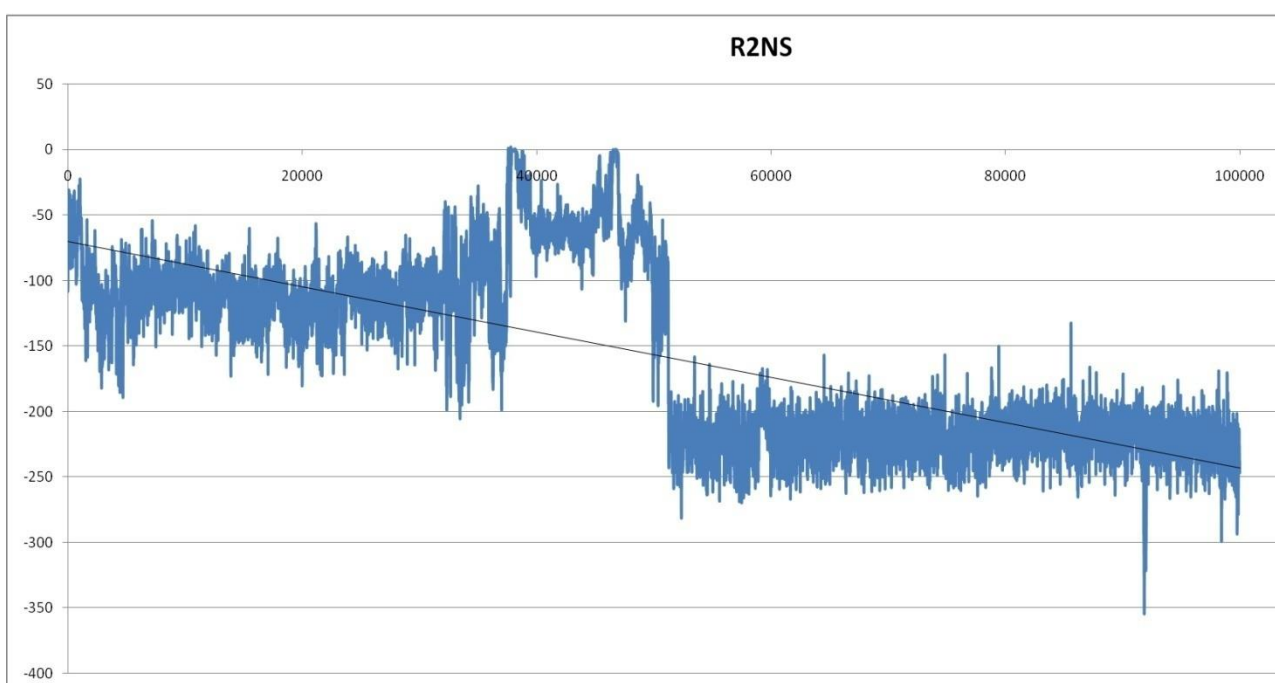


Рис. 12 графік енергії зв'язування для системи R2 + нікосульфурон

Системи R2 з двома гербіцидами продовжує еволюціонувати, але також як і в попередньому випадку є тенденція до зменшення енергії. Цей ізотоп також краще зв'язуватиметься з нікосульфуроном.

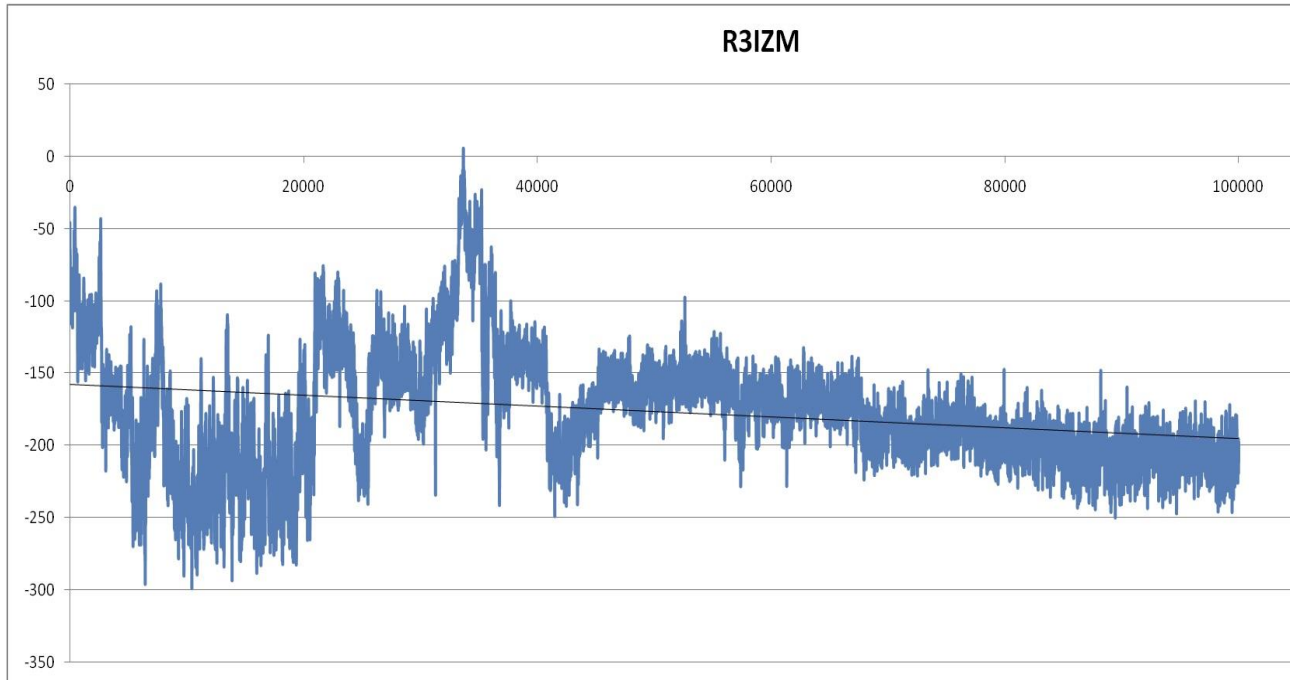


Рис. 13 графік енергії зв'язування для системи R3 + імазамокс

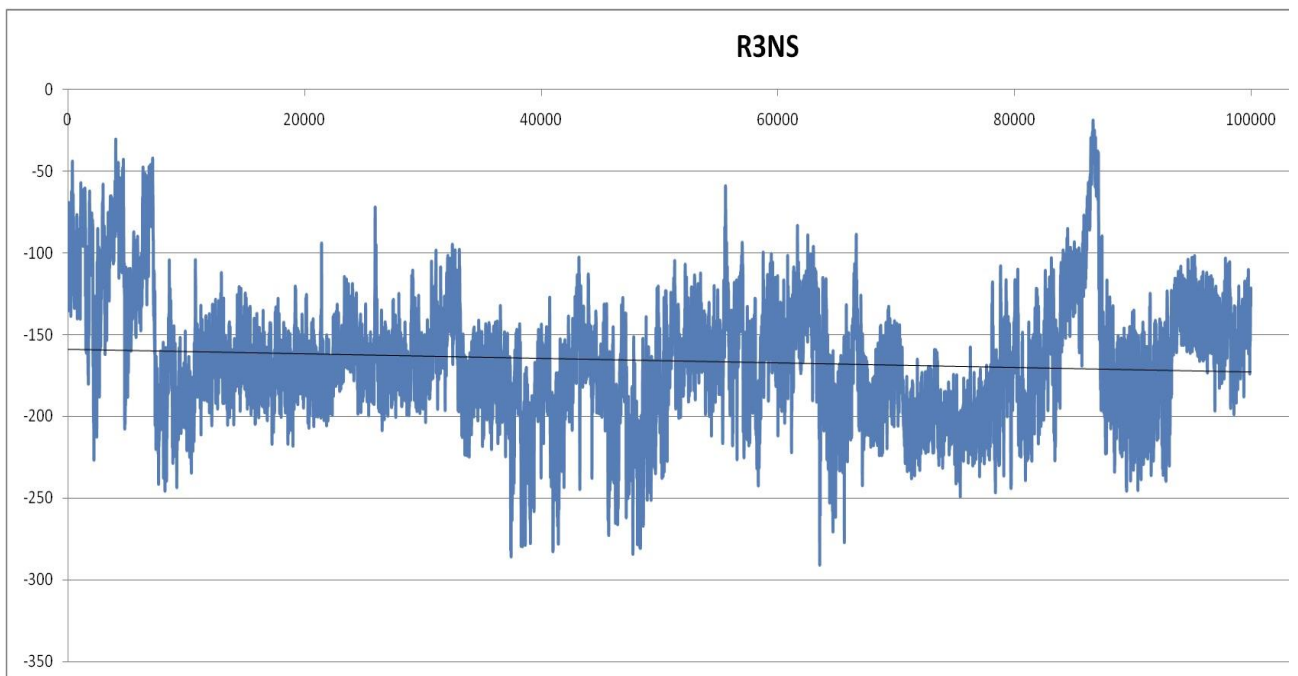


Рис. 14 графік енергії зв'язування для системи R3 + нікосульфурон

Система ізотопу R3 з нікосульфуроном є стабільнішою за систему цього ізотопу з імазамоксом, яка ще продовжує еволюціонувати в бік зменшення енергії зв'язування.

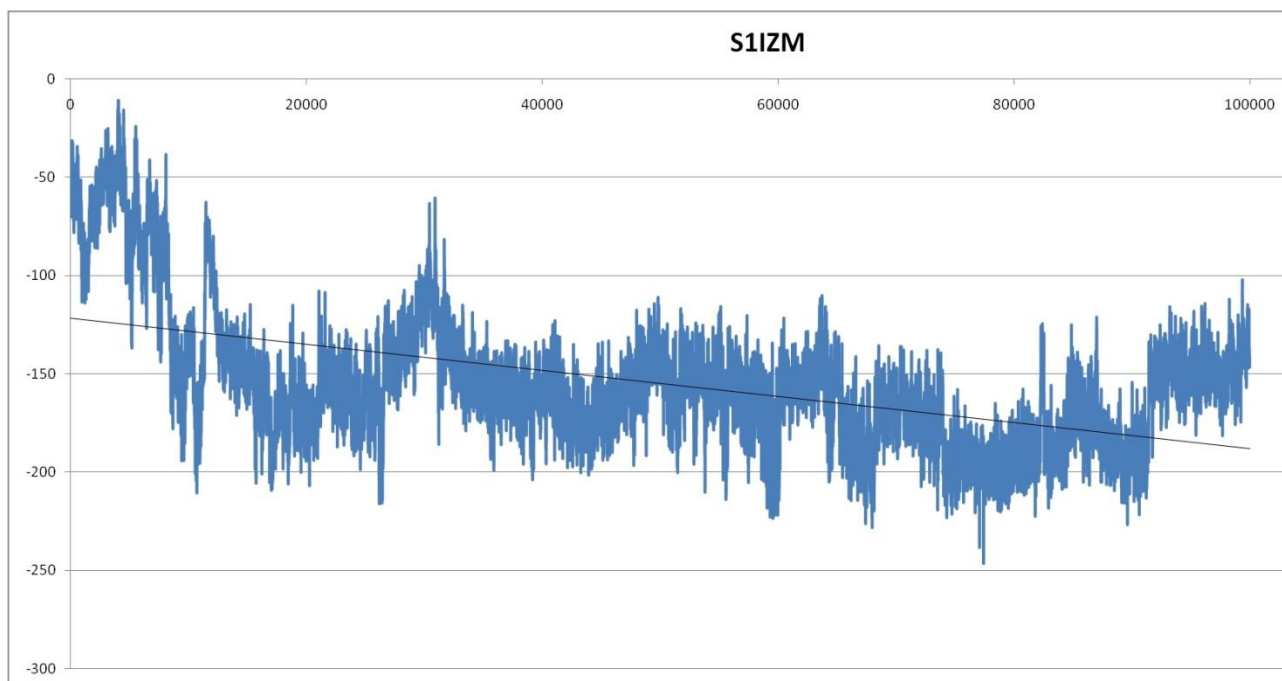


Рис. 15 графік енергії зв'язування для системи S1 + імазамокс

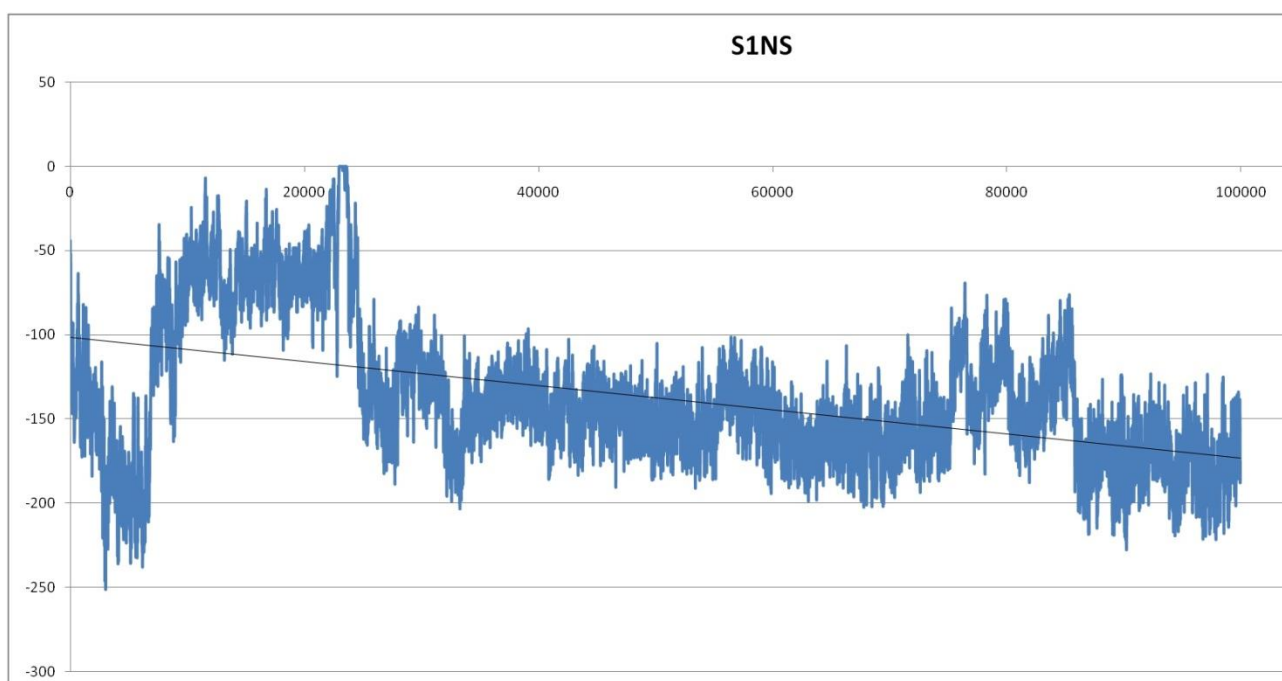


Рис. 16 графік енергії зв'язування для системи S2 + нікосульфурон

Система ізотопу S1 з імазамоксом та нікосульфуроном показують тенденцію до зменшення енергії та продовжують еволюціонувати.

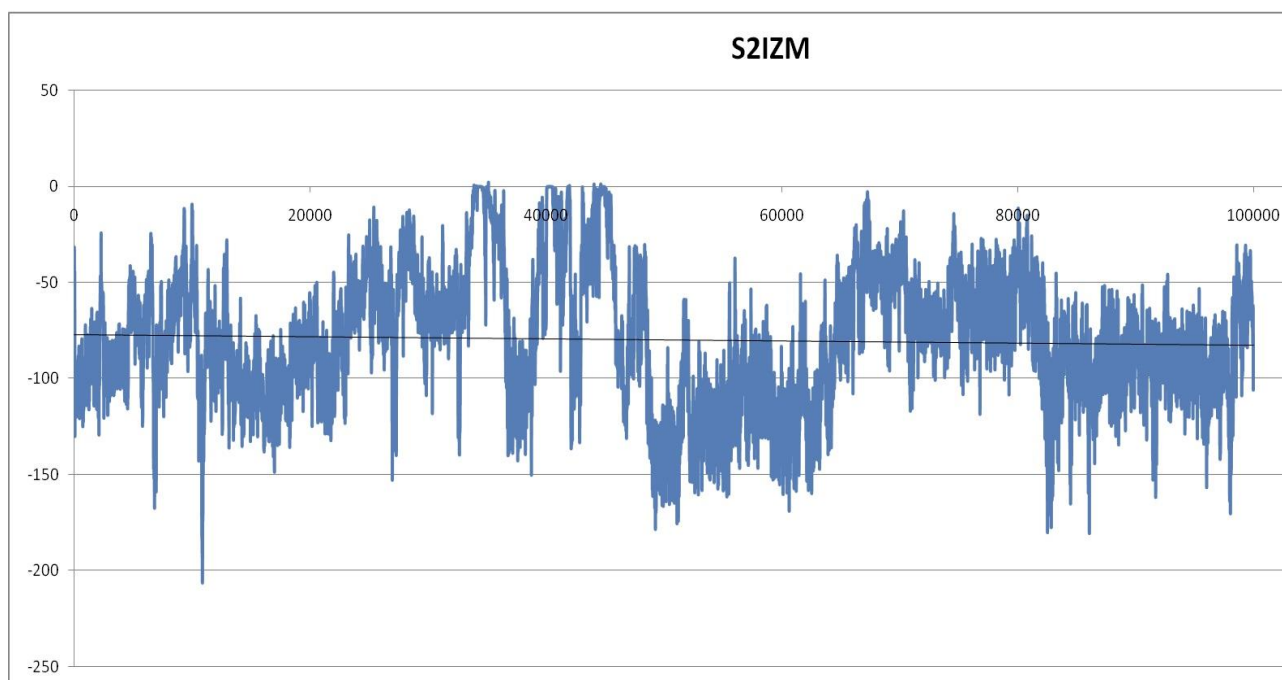


Рис. 13 графік енергії зв'язування для системи S2 + імазамокс

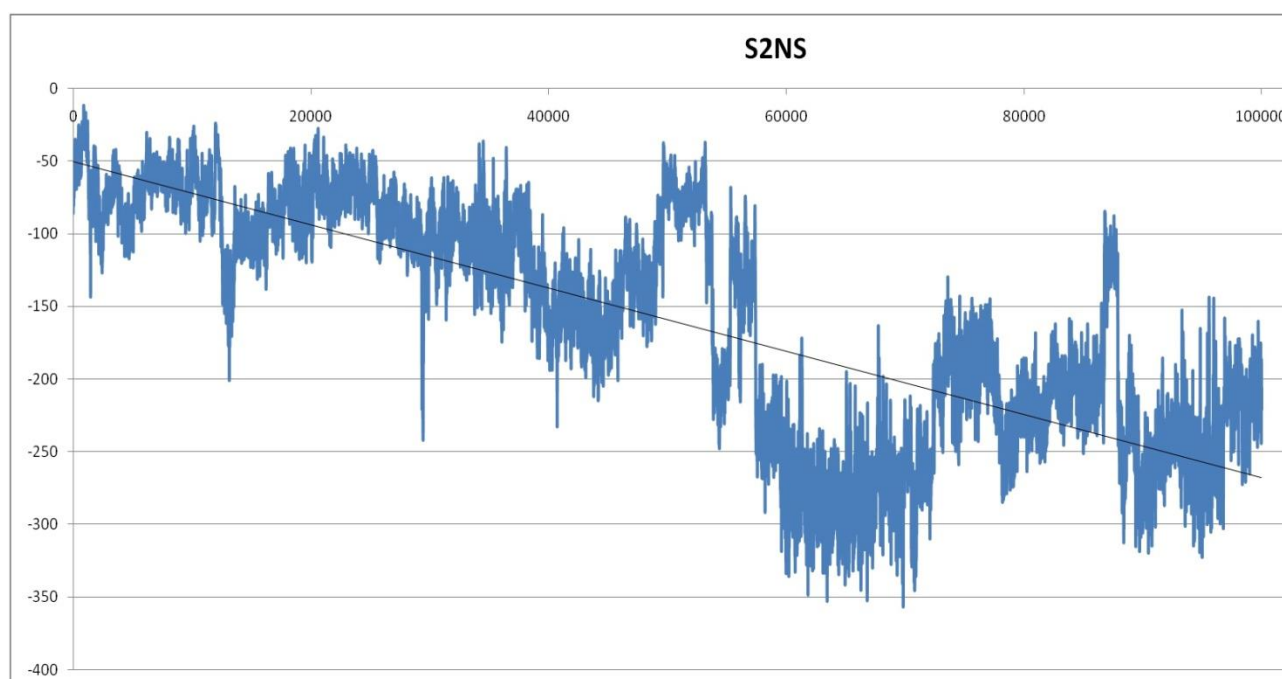


Рис. 14 графік енергії зв'язування для системи S2 + нікосульфрон

Система ізотипу S2 з імазамоксом є стабільною, на відміну від системи цього ізотипу з нікосульфуроном, де спостерігається тенденція до різкого зменшення енергії зв'язування й еволюції.

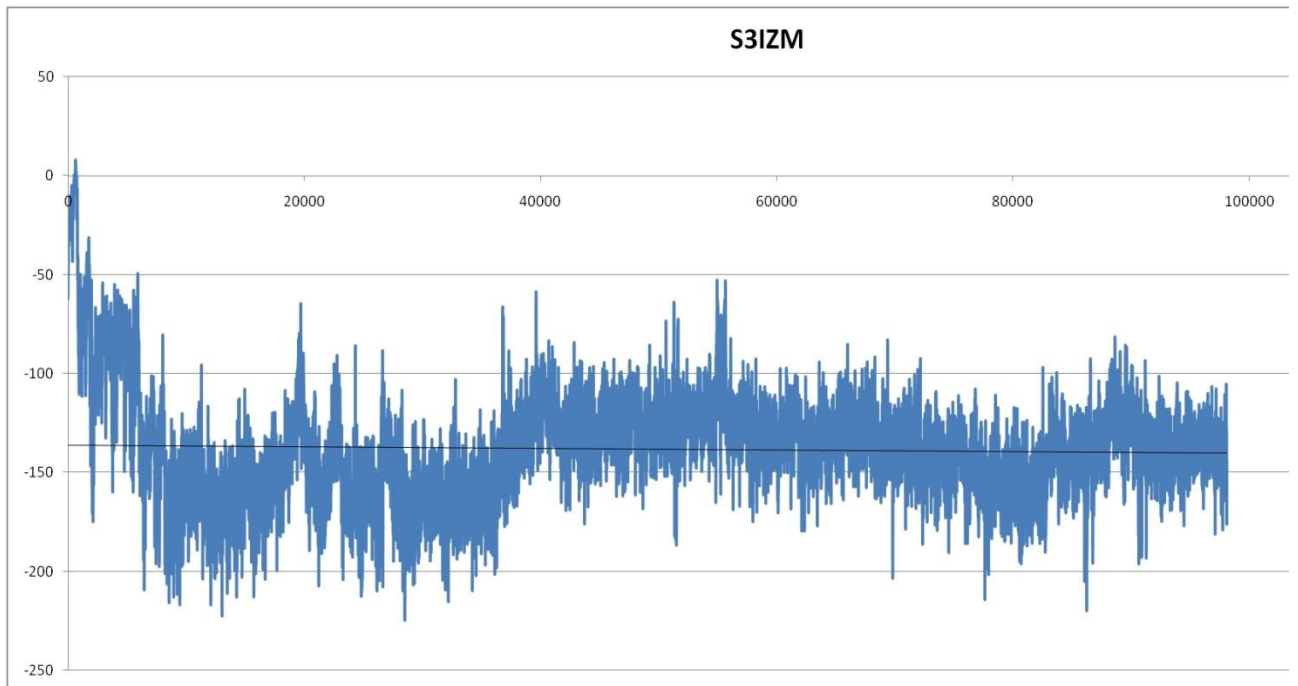


Рис. 15 графік енергії зв'язування для системи S3 + імазамокс

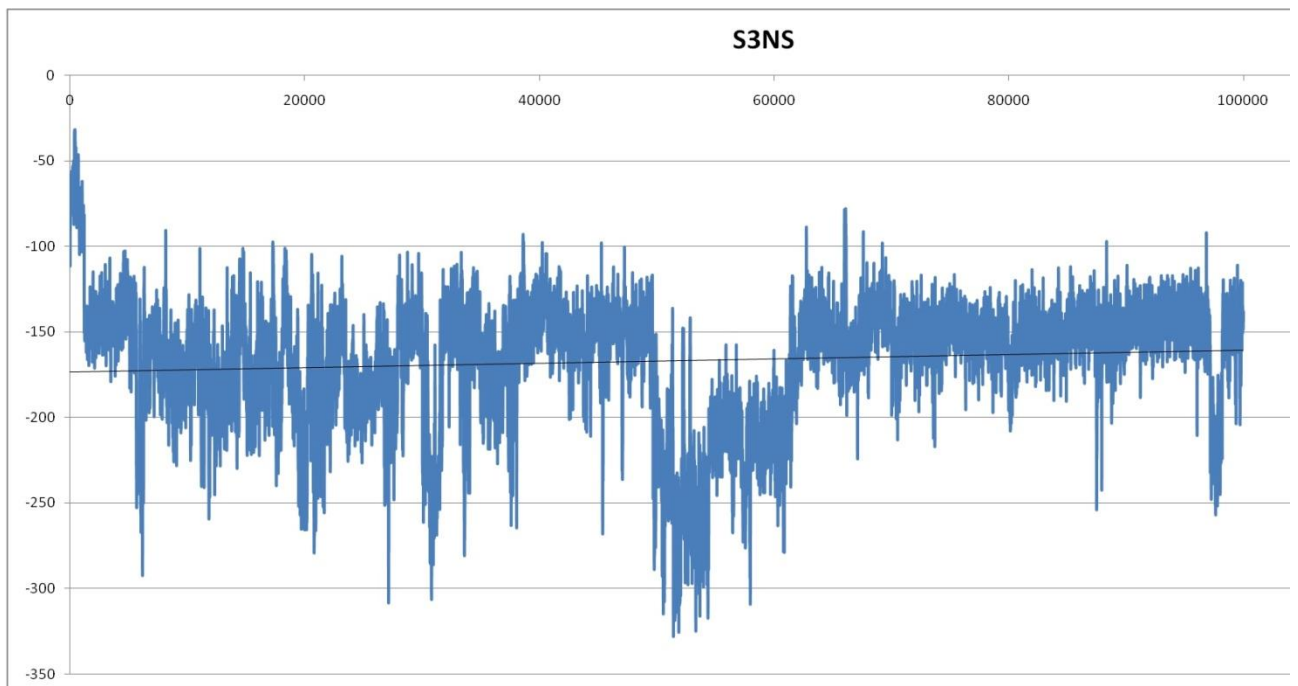


Рис. 16 графік енергії зв'язування для системи S3 + нікосульфурон

Системи ізотипу S3 з досліджуваними гербіцидами є стабільними, але зв'язування з імазамоксом буде кращим, так як там менша енергія зв'язування.

По лінії апроксимації можна зробити висновок, що найстабільнішими системами є СУР81А10S2, СУР81А10S3 з імазамоксом та СУР81А10R3 з нікосульфуроном, тому що лінія є прямою. Але в кожному випадку

спостерігається тенденція зменшення енергії, що свідчить про зв'язування ферменту з гербіцидом. Структури комплексів цих систем продовжують еволюціонувати.

Отримані значення енергій, які були виведені на екран продемонстровано у таблиці:

Таблиця 1 Значення отриманих енергій для кожної системи						
Система R1IZM						
Energy	Average	Err.Est	RMSD	Tot-Drift	$-kT \ln\langle e^{(E/kT)} \rangle$	
Coul-SR: Protein-LIG	-28,0445	6,4	21,9817	-19,2471	6,56391	
LJ-SR: Protein-LIG	-70,9191	4,9	18,5522	-28,4374	-15,3851	
Total	-98,9636	11	--	-47,6845 kJ/mol	-43,429	55,5346
Система R1NS						
Coul-SR: Protein-LIG	-41,834	12	32,9532	-68,7172	3,00503	
LJ-SR: Protein-LIG	-92,6333	9,8	28,6504	-28,6504	-13,6646	
Total	-134,467	22	--	-128,551 kJ/mol	-55,4986	78,9687
Система R2IZM						
Coul-SR: Protein-LIG	-44,9932	7,5	25,3968	-42,2147	-1,75909	
LJ-SR: Protein-LIG	-96,4608	7,8	22,0487	-53,6694	-28,7386	
Total	-141,454	15	--	-95,8841 kJ/mol	-73,7316	67,7224
Система R2NS						
Coul-SR: Protein-LIG	-72,6825	25	59,4308	-171,097	4,64822	
LJ-SR: Protein-LIG	-83,8961	4,9	22,4302	-1,53516	-11,6129	
Total	-156,579	27	---	-172,632 kJ/mol	-78,9382	77,6404
Система R3IZM						
Coul-SR:	-61,7817	11	35,8482	7,91426	-4,5736	

Protein-LIG						
LJ-SR: Protein-LIG	-114,547	8,5	23,5534	-44,7129	-29,3478	
Total	-176,328	12	--	-36,7986 kJ/mol	-91,1294	85,199
Система R3NS						
Coul-SR: Protein-LIG	-46,8422	3,8	25,9407	-8,28031	12,7169	
LJ-SR: Protein-LIG	-118,942	3,7	20,4887	-5,4926	-37,2071	
Total	-165,786	6,4	--	-13,7729 kJ/mol	-84,049	81,7354
Система S1IZM						
Coul-SR: Protein-LIG	-38,2672	2,7	21,4924	-13,8305	-4,82366	
LJ-SR: Protein-LIG	-116,551	7,9	23,5881	-52,5209	-31,8609	
Total	-154,818	10	--	-66,3514 kJ/mol	-70,1282	84,6899
Система S1NS						
Coul-SR: Protein-LIG	-19,7222	2,9	17,9773	3,02718	6,7531	
LJ-SR: Protein-LIG	-117,573	12	33,4679	-74,1343	-12,8966	
Total	-137,295	11	--	-81,1071 kJ/mol	-32,6188	104,677
Система S2IZM						
Coul-SR: Protein-LIG	-22,1541	2,8	22,1624	-1,1742	4,4637	
LJ-SR: Protein-LIG	-57,7326	3,9	20,5195	-4,65113	-9,66601	
Total	-79,8867	5,7	--	-5,82534 kJ/mol	-31,8197	48,067
Система S2NS						
Coul-SR: Protein-LIG	-73,0017	32	73,1128	-191,821	8,85293	
LJ-SR: Protein-LIG	-86,0279	5,1	22,5708	-26,0215	-31,051	
Total	-159,03	34	--	-217,842 kJ/mol	-77,175	81,8547
Система S3IZM						

Coul-SR: Protein-LIG	-54,8466	2,4	17,3753	-5,86306	-0,787973	
LJ-SR: Protein-LIG	-83,5805	2,9	14,6373	1,67969	-16,6224	
Total	-138,427	5,1	--	-4,18336 kJ/mol	-71,4549	66,9722
Система S3NS						
Coul-SR: Protein-LIG	-67,1253	5,7	30,7508	22,487	7,01918	
LJ-SR: Protein-LIG	-100,095	2,7	16,8822	-9,36808	-50,4334	
Total	-167,22	6,7	--	13,1189 kJ/mol	-93,0755	74,1446

Аналізуємо значення вільної енергії для кожної з систем, розташували значення в зручному порядку:

Таблиця 2 Значення вільних енергій зв'язування для кожної з систем	
Система	Значення вільної енергії, кДж/моль
S3NS	-93,08
R3IZM	-91,13
R3NS	-84,05
R2NS	-78,94
S3IZM	-77,45
S2NS	-77,18
R2IZM	-73,73
S1IZM	-70,13
R1NS	-55,5
R1IZM	-43,43
S1NS	-32,62
S2IZM	-31,82

З таблиці видно, що найменшим значення вільної енергії володіє система S3NS, схоже значення має система R3IZM. Це означає, що варіант

амінокислотної послідовності S3 CYP81A10 може найкраще зв'язати гербіцид (в даному випадку нікосульфурон). На жаль, цього недостатньо, щоб говорить про те, що ця подія призведе до розщеплення сполуки і в майбутньому призведе до резистентності.

Висновки

1. За допомогою методів молекулярної динаміки проведено дослідження структурних механізмів стійкості на прикладі шести ізотипів CYP81A10 з імазамоксом та нікосульфуроном, побудовано комплекси цитохром-гербицид та двовимірні діаграми для них, проаналізовано графіки поведінки енергії зв'язування та порівняння значень вільної енергії для кожного випадку.
2. Встановлено, що різні ізотипи CYP81A10 зв'язують обрані гербициди. Стабільними є системи S2 та S3 з імазамоксом та R3 з нікосульфуроном. Однак системи більшості комплексів продовжують еволюціонувати і спостерігається тенденція зменшення енергії зв'язування.
3. По аналізу значень вільної енергії встановлено, що найкраще зв'язувати нікосульфурон буде ізотип S3 CYP81A10, а імазамокс – R3. Проте цього недостатньо, щоб описати розвиток механізмів резистентності до гербицидів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Mahmood, K., Mathiassen, S. K., Kristensen, M., & Kudsk, P. (2016). Multiple herbicide resistance in *Lolium multiflorum* and identification of conserved regulatory elements of herbicide resistance genes. *Frontiers in plant science*, 7, 1160.
2. Gaines, T. A., Duke, S. O., Morran, S., Rigon, C. A., Tranel, P. J., Küpper, A., & Dayan, F. E. (2020). Mechanisms of evolved herbicide resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 295(30), 10307-10330.
3. Torra J, Osuna MD, Merotto A and Vila-Aiub M (2021) Editorial: Multiple Herbicide-Resistant Weeds and Non-target Site Resistance Mechanisms: A Global Challenge for Food Production. *Frontiers in plant science*, 12, 763212.
4. Fang, J., Liu, T., Zhang, Y., Li, J., & Dong, L. (2019). Target site-based penoxsulam resistance in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) from China. *Weed science*, 67(3), 281-287.
5. Gaines, T. A., Lorentz, L., Figge, A., Herrmann, J., Maiwald, F., Ott, M. C., et al. (2014). RNA-Seq transcriptome analysis to identify genes involved in metabolism-based diclofop resistance in *Lolium rigidum*. *The Plant Journal*, 78, 865–876.
6. Hulme, P. E. (2022). Hierarchical cluster analysis of herbicide modes of action reveals distinct classes of multiple resistance in weeds. *Pest Management Science*, 78(3), 1265-1271.
7. Shaner, D. L. & O'Connor, S. L (1991). *The Imidazolinone Herbicides*. (CRC Press).
8. Rey-Caballero, J., Menéndez, J., Osuna, M. D., Salas, M., & Torra, J. (2017). Target-site and non-target-site resistance mechanisms to ALS inhibiting herbicides in *Papaver rhoeas*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 138, 57-65.
9. Rojano-Delgado, A. M., Portugal, J. M., Palma-Bautista, C., Alcántara-de la Cruz, R., Torra, J., Alcántara, E., & De Prado, R. (2019). Target site as the

- main mechanism of resistance to imazamox in a *Euphorbia heterophylla* biotype. *Scientific Reports*, 9(1).
10. Siminszky, B., Corbin, F. T., & Sheldon, Y. (1995). Nicosulfuron resistance and metabolism in terbufos- and naphthalic anhydride-treated corn. *Weed Science*, 43(2), 163-168.
 11. Tranel, P.J., Wright, T.R., Heap, I.M., (2021). Mutations in Herbicide-Resistant Weeds to ALS Inhibitors.
 12. Mei, Y., Si, C., Liu, M., Qiu, L., & Zheng, M. (2017). Investigation of resistance levels and mechanisms to nicosulfuron conferred by non-target-site mechanisms in large crabgrass (*Digitaria sanguinalis* L.) from China. *Pesticide biochemistry and physiology*, 141, 84-89
 13. Huang, Z., Lu, Z., Huang, H., Li, W., Cao, Y., & Wei, S. (2021). Target site mutations and cytochrome P450s-involved metabolism confer resistance to nicosulfuron in green foxtail (*Setaria viridis*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 179, 104956.
 14. Abdollahi, F. (2020). *Analysis of the molecular basis of herbicide resistance in plants* (Doctoral dissertation, Université de Strasbourg; University of Mohaghegh Ardabili)
 15. Werck-Reichhart D and Feyereisen R, (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol* 1:reviews3003.1
 16. Han, H., Yu, Q., Beffa, R., González, S., Maiwald, F., Wang, J., & Powles, S. B. (2021). Cytochrome P450 CYP81A10v7 in *Lolium rigidum* confers metabolic resistance to herbicides across at least five modes of action. *The Plant Journal*, 105(1), 79-92.
 17. Werck-Reichhart, D., Hehn, A., and Didierjean, L. (2000) Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends Plant Sci.* 5, 116-123
 18. Dimaano, N. G., & Iwakami, S. (2021). Cytochrome P450-mediated herbicide metabolism in plants: current understanding and prospects. *Pest Management Science*, 77(1), 22-32.

19. Li J, Yu H, Zhang F, Lin C, Gao J, Fang J et al., A built-in strategy to mitigate transgene spreading from genetically modified corn. *PLoS One* 8:e81645 (2013).