

УДК 632.954:633.34:632.5

ОСОБЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНОГО СВЯЗЫВАНИЯ ЦИКЛОКСИДИМА С АЦЕТИЛ-КоА КАРБОКСИЛАЗОЙ КУЛЬТУРНОЙ СОИ И СОРНЫХ РАСТЕНИЙ

© 2024 г. П. Д. Тимкин¹, А. А. Иваний¹, М. П. Михайлова¹, У. Е. Штабная¹,
А. Е. Гретченко¹, Ю. О. Серебренникова¹, А. А. Пензин^{1,*}

¹Федеральный научный центр “Всероссийский научно-исследовательский институт сои”
675028 Благовещенск Амурская обл., Игнатьевское шоссе, 19, Россия

*E-mail: penzin9898@mail.ru

Ацетил-КоА карбоксилаза (АСС) — один из главных ферментов, выполняющих регуляторную роль в биосинтезе жирных кислот в растениях. Циклоксим — один из гербицидов, являющийся ингибитором данного фермента. Некоторые сорные злаковые растения, такие как ежовник обыкновенный (*Echinochloa crus-galli* L.) и мятлик однолетний (*Poa annua* L.), обладают устойчивостью к циклоксиму. Другие виды злаковых сорняков — росичка кроваво-красная (*Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.) и щетинник зеленый (*Setaria viridis* (L.) P. Beauv.), напротив, подвержены воздействию гербицида. Молекулярные механизмы, лежащие в основе резистентности к АСС являются малоизученными. Объяснение механизма устойчивости, вероятно, лежит в структуре АСС у разных видов. Использование методов биоинформатики поможет понять механизмы адаптации, исходя из молекулярных свойств фермента, что поспособствует созданию новых гербицидов. Целью данной работы было изучение особенности связывания циклоксидима с ферментом АСС для каждого из этих видов сорных растений, включая сою (*Glycine max* (L.) Merr.). Для сорных растений *E. crus-galli* и *P. annua* выявлено от 6 до 7 возможных комплексов с разным положением лиганда по отношению к рецептору, что потенциально может объяснить механизм устойчивости. При этом определена низкая энергия связывания для комплекса циклоксидима с *G. max* (до -7.31 ккал/моль), что демонстрирует наличие у культуры иных механизмов устойчивости.

Ключевые слова: ацетил-КоА карбоксилаза (АСС), циклоксим, молекулярный докинг, биоинформатика, соя *Glycine max* (L.) Merr.

DOI: 10.31857/S0002188124100065, **EDN:** ANQIVC

ВВЕДЕНИЕ

Ацетил-КоА карбоксилаза (АСС, ЕС6.4.1.2) представляет собой фермент, который выполняет регуляторную роль в биосинтезе жирных кислот и обнаружен в большинстве организмов, включая бактерии, грибы, растения, а также животных. АСС продуцирует малонил-КоА из бикарбоната, используемого в качестве источника карбоксильной группы, и аденозинтрифосфата (АТФ), который служит источником энергии [1].

Фермент ацетил-КоА карбоксилаза рассматривается как удобная мишень для гербицидов. Как сообщает база данных “The International Survey of Herbicide Resistant Weeds”, в природе встречаются сорные растения, имеющие устойчивость к циклоксиму, и они также могут быть не чувствительными к другим гербицидам группы 1. Гербициды данной

группы блокируют превращение ацетил-КоА в малонил-КоА путем ингибирования активности фермента АСС. Ингибирование синтеза жирных кислот нарушает выработку фосфолипидов, используемых для построения клеточных мембран [2]. При ингибировании АСС растение становится обесцвеченным и в конечном итоге подвергается некрозу и гибели [3].

Циклоксим является ингибитором ацетил-КоА карбоксилазы и синтеза жирных кислот. Известно, что циклогександионовые гербициды биологически активны в очень низких концентрациях [4].

Согласно литературным источникам, циклоксим токсичен для таких злаковых сорняков, как *S. viridis*, *E. crus-galli*, *P. annua*, *D. sanguinalis* [5–9]. Представленные сорные растения эндемичны для Дальнего Востока и Амурской обл., в частности на полях с соей, где они наносят экономический ущерб сельскому хозяйству [10].

В предыдущих исследованиях с применением метода молекулярного докинга использовали экспериментальную трехмерную структуру АСС *Saccharomyces cerevisiae* и циклоксидима в форматах pdb [11]. За неимением структур АСС сои и нативных структур карбоксилазы других растений в предыдущей работе, точность результатов, полученных методом молекулярного докинга могла быть серьезно снижена. Создание и публикация AlphaFold и AlphaFold2 в свободный доступ дала возможность решить эту проблему [12]. Данная программа является самым современным инструментом, осуществляющим фолдинг белка (укладку белка, или процесс спонтанного сворачивания полипептидной цепи в уникальную нативную структуру) по первичной последовательности аминокислот. Использование белков, смоделированных в AlphaFold, сохраняет объективность исследования и повышает точность результатов в поставленном вопросе, поскольку в таком случае задействуются нативные аминокислотные последовательности белков.

Цель работы — изучение особенностей молекулярного взаимодействия циклоксидима с его мишенью у культурной сои и различных сорных растений, произрастающих в Амурской обл.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Для понимания особенностей молекулярного взаимодействия лиганда с его мишенью было проведено моделирование АСС сои и злаковых сорняков. Информация о трехмерной структуре АСС была взята из базы данных UniProt (<https://www.uniprot.org/>) в pdb-формате (protein data bank). Полученные трехмерные модели представляют собой результат прогноза нейронной сети на платформе Google Collab AlphaFold 2.0 [13]. Информация о структуре циклоксидима была взята из базы данных PubChem в sdf-формате. Прогноз молекулярных полостей ферментов происходил с использованием сервиса PrankWeb [14–16].

Полученные в PrankWeb координаты использовали в дальнейшем для корректного наложения gridbox (пространственной сетки, в которой происходит

симуляция). Все мишени проходили стадию подготовки в программном обеспечении AutoDock 4.2 [17]. Молекулярный докинг (вычислительный метод предсказания взаимного положения, ориентации и конформаций 2-х молекул, образующих супрамолекулярный комплекс) проводили по стандартной процедуре. Затем импортировали лиганд (циклоксидим) в pdbqt-формате, полученный с использованием локального конвертера Open Babel из sdf-формата [18]. На лиганд был наложен заряд Гастейгера. Затем происходило центрование gridbox по координатам полостей, полученных в PrankWeb. Размер граней gridbox был равен 40×40×40 и представлял из себя куб. Длина граней составляла 0.375 Å. Полученные результаты молекулярного моделирования в дальнейшем визуализировали в Discovery Studio [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Во всех белках были определены молекулярные полости и их координаты в трехмерном пространстве (табл. 1).

Точность спрогнозированных молекулярных карманов составила 0.7 (*E. crus-galli*), 1.2 (*P. annua*), 3.0 (*S. viridis*), 4.1 (*D. sanguinalis*) и 19.2 (*G. max*). Количество аминокислотных остатков, участвующих в образовании активного центра, варьировались от 5 (*P. annua*) до 12 (*G. max*). Для *E. crus-galli* число аминокислот, образующих молекулярную полость, равнялось 7, для *S. viridis* — 8 и *D. sanguinalis* — 10.

Моделирование молекулярного взаимодействия между ортологами АСС и циклоксидимом показало образование множества успешных комплексов с различной энергией связывания (табл. 2).

Оценка связывания циклоксидима с АСС позволила провести подсчет всех комбинаций аминокислотных остатков, принимающих участие в связывании белка с лигандом, что важно для понимания особенностей работы фермента и поиска критически важных аминокислот (табл. 3).

При визуализации полученных комплексов удалось отследить изменения в положениях лиганда относительно белка-мишени (рис. 1).

Таблица 1. Координаты центра лиганд-связывающего сайта

ID UniProtKB, вид сорняка	Координаты центра полости лиганд-связывающего сайта		
	x_cent	y_cent	z_cent
ID: A0A835B2W3, <i>D. sanguinalis</i>	−2.5844	1.7126	6.5734
ID: E5LBD5, <i>E. crus-galli</i>	−9.3405	−2.7	0.6966
ID: P31531, <i>G. max</i>	0.0148	1.5562	−9.0593
ID: Q3V4F2, <i>P. annua</i>	−8.1163	5.1251	−3.8386
ID: A0A4U6SY93, <i>S. viridis</i>	−4.0009	−0.8368	5.2461

Таблица 2. Энергия связывания АСС с циклоксидимом для каждой конформации

ID UniProtKB, вид сорняка	Ранг конформации	Минимальная энергия связывания, ккал/моль)
ID: A0A835B2W3, <i>D. sanguinalis</i>	1	–6.79
	2	–6.59
	3	–6.15
ID: E5LBD5, <i>E. crus-galli</i>	1	–6.08
	2	–6.01
	3	–5.65
	4	–5.62
	5	–5.52
	6	–5.09
ID: P31531, <i>G. max</i>	1	–7.31
	2	–7.00
	3	–6.52
ID: Q3V4F2, <i>P. annua</i>	1	–4.25
	2	–4.17
	3	–3.95
	4	–3.75
	5	–3.60
	6	–3.35
	7	–3.17
ID: A0A4U6SY93, <i>S. viridis</i>	1	–6.89
	2	–6.40
	3	–5.85
	4	–5.74
	5	–5.58

Таблица 3. Комбинации аминокислотных остатков, участвующих в связывании фермента с циклоксидимом

<i>D. sanguinalis</i>	<i>E. crus-galli</i> *	<i>G. max</i>	<i>P. annua</i> *	<i>S. viridis</i>
Ala108, Tyr109, Arg112, Ile125, Leu127, Leu148, Ile153, Val159	Tyr86, Tyr90, Leu96, Arg112, Leu113, Ile115, Asn157, Ile159, Ile174, Trp243, Thr300, Ala303, Gln304, Leu307	Ala108, Tyr109, Arg112, Leu127, Leu133, Tyr142, Leu148, Ile153, Met154, Val159	Tyr90, Arg112, Leu113, Ile115, Asn157, Ile159, Trp243, Thr300, Ala303, Gln304, Leu307	Ala108, Tyr109, Arg112, Leu113, Ile125, Ile126, Leu127, Leu148, Ile153, Met154, Val159

* Для данных видов был слишком большой разброс в положении лиганд-связывающих аминокислотных остатков.

При приближении комплекса в трехмерной проекции, можно заметить лиганд, находящийся в молекулярной полости вместе с водородными связями, принимающих непосредственное участие в связывании (рис. 2).

Также были получены двухмерные изображения с интеракцией водородных и координационных связей

между циклоксидимом и аминокислотными остатками, участвующими в связывании лиганда (рис. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, найденные молекулярные полости были сопоставимы друг с другом по своей

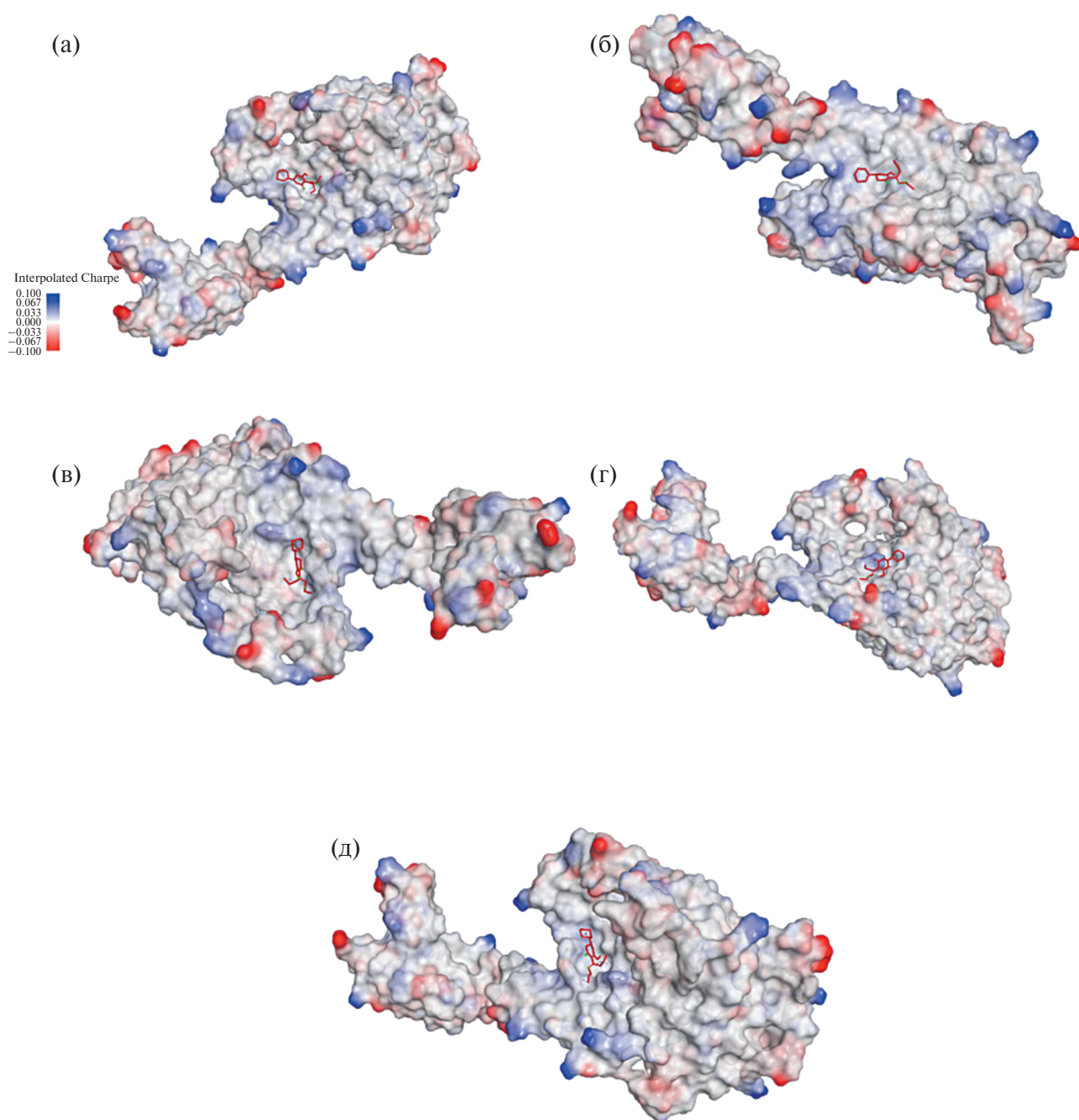


Рис. 1. Визуализация комплексов АСС с циклоксидимом для: (а) — *D. sanguinalis*, (б) — *E. crus-galli*, (в) — *G. max*, (г) — *P. annua*, (д) — *S. viridis*.

топологии и взаиморасположению, что объясняется высоким уровнем гомологии фермента. Этот феномен позволяет осуществлять объективное сравнение представленных комплексов. Количество конформаций белков у каждого вида значительно разнилось между собой. Значимым для дальнейших исследований является то, что комплексы *G. max* имели 3 конформации, в том числе с наименьшей минимальной энергией связывания, равной -7.31 ккал/моль, что

указывало на образование стабильного комплекса. Несмотря на это культурная соя обладает устойчивостью к циклоксидиму по отношению к злаковым сорнякам в полевых условиях. У *P. annua* выявлено до 7-ми различных комплексов с самым высоким показателем энергии связывания до -4.25 ккал/моль, большое количество конформаций и разброс в позициях аминокислот демонстрируют нестабильное взаимодействие циклоксидима с ферментом,

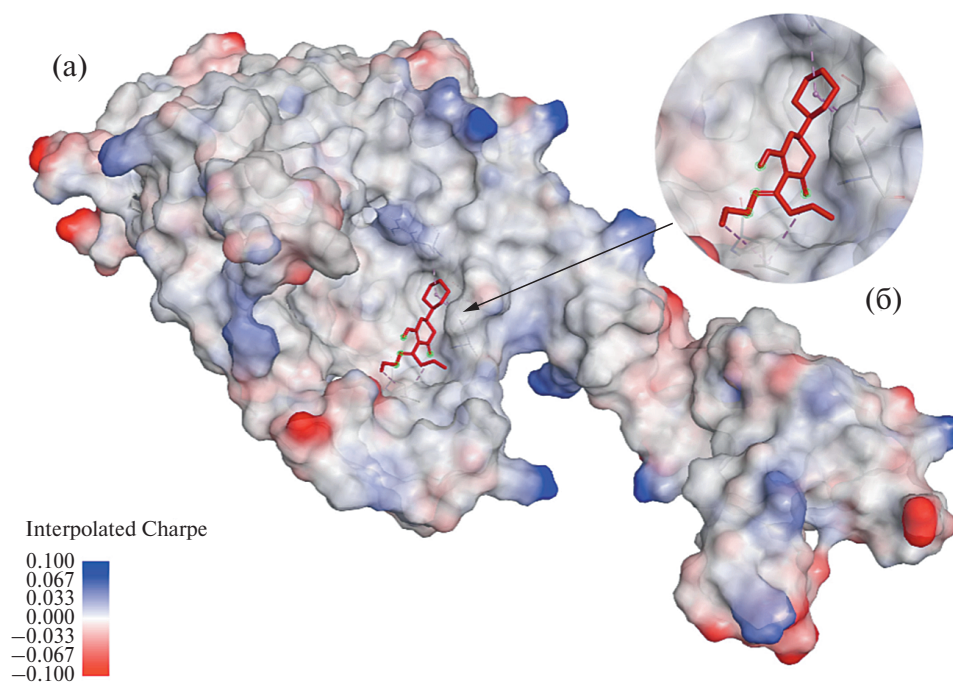


Рис. 2. Визуализация АСС в комплексе с циклоксимидом для *D. sanguinalis*: (а) – в полном масштабе, (б) – увеличение.

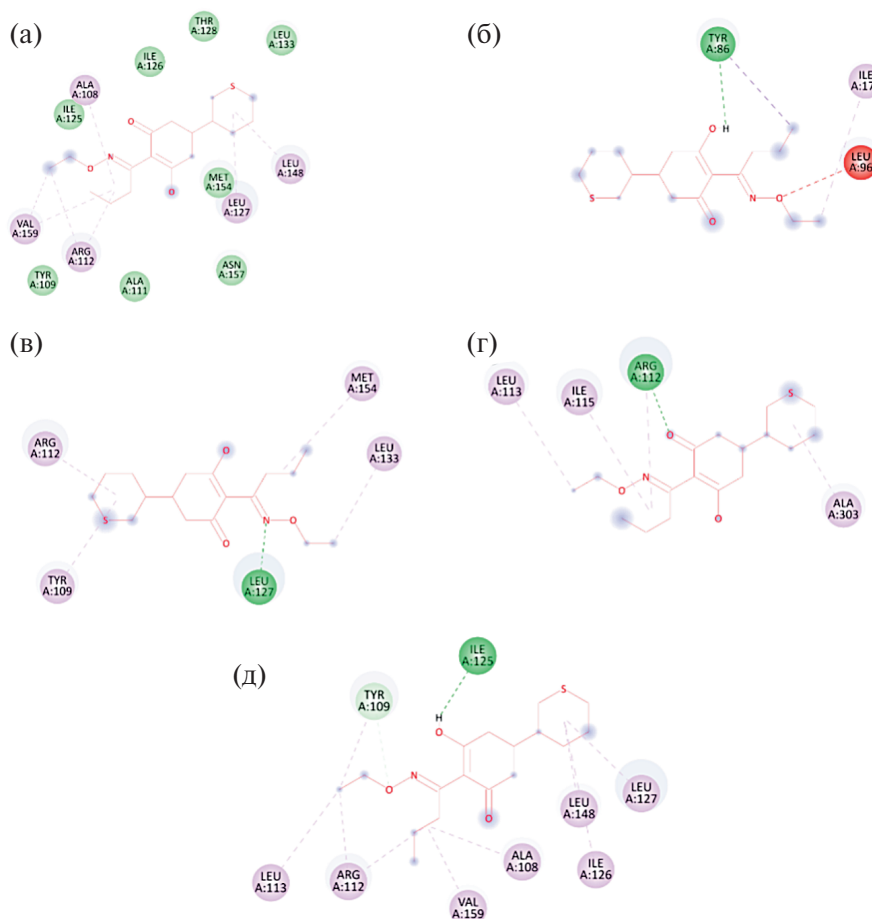


Рис. 3. Визуализация АСС с циклоксимидом в двухмерной проекции для: (а) – *D. sanguinalis*, (б) – *E. crus-galli*, (в) – *G. max*, (г) – *P. annua*, (д) – *S. viridis*.

что, видимо, позволяет *P. annua* иметь устойчивость к ингибиторам ацетил-КоА карбоксилазы подобного типа. Касательно остальных форм АСС найдено аналогичное повторение аминокислотных остатков, за исключением *E. crus-galli*, где также можно было наблюдать большое количество конформаций и разброс по положениям, что компенсировалось низкой энергией связывания: это дает возможность образовывать более стабильные связи с лигандом. Полученные данные молекулярного докинга представляют собой более релевантный результат и отличаются от предыдущих результатов использованием информации о трехмерной структуре нативных белков, а не моделей, основанных на структуре белка других организмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Burke I.C., Bell J.L. Plant health management: Herbicides, Encyclopedia of Agriculture and Food Systems. 2014. P. 425–440. DOI: 10.1016/b978-0-444-52512-3.00181-9
2. Jursík M., Hamouzová K., Hajšlová J. Dynamics of the degradation of acetyl-CoA carboxylase herbicides in vegetables // Foods. 2021. V. 10(2). P. 405. DOI: 10.3390/foods10020405
3. Ye F. Herbicidal activity and molecular docking study of novel ACCase inhibitors // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. DOI: 10.3389/fpls.2018.01850
4. Rosculete C. Determination of the environmental pollution potential of some herbicides by the assessment of cytotoxic and genotoxic effects on *Allium cepa* // Inter. J. Environ. Res. Public Health. 2018. V. 16(1). P. 75. DOI: 10.3390/ijerph16010075
5. De Prado R., Osuna M.D., Fischer A.J. Resistance to accase inhibitor herbicides in a green foxtail (*Setaria viridis*) biotype in Europe // Weed Sci. 2004. V. 52(4). P. 506–512. DOI: 10.1614/ws-03-097r
6. Claerhout S., Reheul D., De Cauwer B. Sensitivity of *Echinochloa crus-galli* populations to maize herbicides: A comparison between cropping systems // Weed Res. 2015. V. 55(5). P. 470–481. DOI: 10.1111/wre.12160
7. Grichar W.J. Control of Texas panicum (*Panicum texanum*) and southern crabgrass (*Digitaria ciliaris*) in peanuts (*Arachis hypogaea*) with postemergence herbicides // Peanut Sci. 1991. V. 18(1). P. 6–9. DOI: 10.3146/i0095-3679-18-1-3
8. Barua R., Boutsalis P., Kleemann S., Malone J., Gill G., Preston C. Alternative herbicides for controlling herbicide-resistant annual bluegrass (*Poa annua* L.) in Turf // Agronomy. 2021. V. 11. P. 2148. DOI: 10.3390/agronomy11112148
9. Clay D.V., Dixon F.L., Willoughby I. Efficacy of graminicides on grass weed species of Forestry // Crop Protect. 2006. V. 25(9). P. 1039–1050. DOI: 10.1016/j.cropro.2006.01.015
10. Захарова Е.Б., Немыкин А.А. Сорные растения Амурской области и меры борьбы с ними. Изд. 2-е, испр. и доп. Благовещенск: Дальневост. ГАУ, 2015. 153 с.
11. Ye F. Herbicidal activity and molecular docking study of novel ACCase inhibitors // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. DOI: 10.3389/fpls.2018.01850
12. Jumper J., Evans R., Pritzel A. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold // Nature. 2021. V. 596. P. 583–589. DOI: 10.1038/s41586-021-03819-2
13. Mirdita M., Schütze K., Moriwaki Y., Heo L., Ovchinnikov S., Steinegger M. ColabFold: Making protein folding accessible to all // Nature Methods. 2022.
14. Jakubec D., Škoda P., Krivák R., Novotný M., Hoksza D. PrankWeb 3: accelerated ligand-binding site predictions for experimental and modelled protein structures // Nucl. Acid. Res. 2022. № 5.
15. Jendele L., Krivák R., Škoda P., Novotný M., Hoksza D. PrankWeb: a web server for ligand binding site prediction and visualization // Nucl. Acid. Res. 2019. № 5.
16. Krivák R., Hoksza D. P2Rank: machine learning based tool for rapid and accurate prediction of ligand binding sites from protein structure // J. Cheminform. 2018 № 10(1). P. 39.
17. Scripps Research. AutoDock. 2014. Available from: <https://ccsb.scripps.edu/autodock/>
18. O'Boyle N.M., Banck M., James C.A. et al. Open Babel: An open chemical toolbox // J. Cheminform. 2011. V. 3. P. 33. DOI: 10.1186/1758-2946-3-33
19. BIOVIA, DassaultSystèmes, [Discovery studio], [ver. 4.5]. San Diego: Dassault Systèmes, 2021.

Molecular Binding of Cycloxydim to Acetyl-CoA Carboxylase in Cultivated Soybeans and Weed Plants

P. D. Timkin^a, A. A. Ivaniy^a, M. P. Mikhaylova^a, U. E. Shtabnaya^a, A. E. Gretchenko^a,
Yu. O. Serebrennikova^a, A. A. Penzin^{a, #}

^aFederal Scientific Center All-Russian Scientific Research Institute of Soybean,
Ignatievskoye shosse 19, Amur region, Blagoveshchensk 675028, Russia

[#]E-mail: penzin9898@mail.ru

Acetyl-CoA carboxylase (ACC) is one of the main enzymes that play a regulatory role in the biosynthesis of fatty acids in plants. Cycloxydim is one of the herbicides that is an inhibitor of this enzyme. Some weedy cereal plants, such as common hedgehog (*Echinochloa crus-galli* L.) and annual bluegrass (*Poa annua* L.), are resistant to cycloxydim. Other types of grass weeds – blood-red dewdrop (*Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.) and green bristle (*Setaria viridis* (L.) P. Beauv.), on the contrary, are susceptible to the herbicide. The molecular mechanisms underlying ACC resistance are poorly understood. The explanation of the mechanism of resistance probably lies in the structure of ACC in different species. The use of bioinformatics methods will help to understand the mechanisms of adaptation based on the molecular properties of the enzyme, which will contribute to the creation of new herbicides. The purpose of this work was to study the specifics of the binding of cycloxydim to the ACC enzyme for each of these weed species, including soy (*Glycine max* (L.) Merr.). For weeds *E. crus-galli* and *P. annua* revealed from 6 to 7 possible complexes with different ligand positions relative to the receptor, which could potentially explain the mechanism of resistance. At the same time, a low binding energy was determined for the cycloxydim complex with *G. max* (up to -7.31 kcal/mol), which demonstrates the presence of other resistance mechanisms in the culture.

Keywords: acetyl-CoA carboxylase (ACC), cycloxydim, molecular docking, bioinformatics, soy *Glycine max* (L.) Merr.