

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

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

доцент Олексій Юрійович Нипорко

Протокол № ____ засідання кафедри

від « _____ » _____ 20__ р.

**ВЗАЄМОДІЯ ЕТАЛОННОГО НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ЛІГАНДА
З АВРОРА-КІНАЗАМИ ВИЩИХ РОСЛИН: МОЛЕКУЛЯРНО-
ДИНАМІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра

студента спеціальності 091 Біологія

ОП «Біологія (високі технології)»

Сидоренка Ростислава Сергійовича

Науковий керівник

доцент кафедри

молекулярної біотехнології та біоінформатики

к.б.н. Олексій Юрійович Нипорко

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026 р.

АНОТАЦІЯ

Сидоренко Р.С. Взаємодія еталонного низькомолекулярного ліганда з Аврора-кіназами вищих рослин: молекулярно-динамічні дослідження. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)».

У роботі досліджено термодинамічну та конформаційну стабільність та структурні детермінанти селективності докінг-комплексів потенційного низькомолекулярного інгібітора з Аврора-кіназами культурних та сегетальних рослин, а також людини. Дослідження проведено методом молекулярно-динамічного моделювання тривалістю 200 нс у середовищі GROMACS. Розрахунок вільної енергії зв'язування проводився за напівемпіричним методом MM/PBSA.

Встановлено, що ліганд стабільно утримується в АТФ-зв'язуючій кишені всіх досліджуваних аврора-кіназ, проте динаміка ліганд-білкового інтерфейсу має видоспецифічний характер. Показано, що основним термодинамічним чинником, що зумовлює стабілізацію комплексів, є неполярні ван-дер-ваальсові взаємодії. Декомпозиція вільної енергії зв'язування дозволила ідентифікувати ключові кластери гідрофобних амінокислот, які формують основну частку загальної афінності та створюють мікроструктурну гетерогенність АТФ-зв'язуючих кишень.

Виявлено високий селективний потенціал сполуки як гербіциду щодо бур'яну *Chenopodium album* порівняно з кіназами сільськогосподарських культур, зокрема, для комплексу з Аврора-кіназою кукурудзи (*Zea mays*).

Отримані результати можуть бути використані для подальшого вивчення рослинних Аврора-кіназ як мішеней та для раціонального дизайну селективних гербіцидних засобів нового покоління.

Ключові слова: Аврора-кінази; молекулярна динаміка; раціональний дизайн; гербіциди; GROMACS; MM/PBSA; селективність; комплекси білок-ліганд.

ABSTRACT

Sydorenko, R.S. Interaction of a reference low-molecular-weight ligand with Aurora kinases in higher plants: molecular dynamics studies. – Bachelor's thesis in the field of study 091 Biology, educational program «Biology (High Technologies)».

The thesis investigates the thermodynamic and conformational stability and structural determinants of the selectivity of docking complexes of a potential low-molecular-weight inhibitor with Aurora kinases from cultivated and wild plants, as well as humans. The study was conducted using molecular dynamics simulations lasting 200 ns in the GROMACS environment. The binding free energy was calculated using the semi-empirical MM/PBSA method.

It was found that the ligand is stably retained in the ATP-binding pocket of all Aurora kinases studied; however, the dynamics of the ligand-protein interface are species-specific. It was shown that the main thermodynamic factor responsible for the stabilization of the complexes is nonpolar van der Waals interactions. Decomposition of the free binding energy allowed the identification of key clusters of hydrophobic amino acids that account for the major portion of the overall affinity and create microstructural heterogeneity in the ATP-binding pockets.

The compound exhibited high selective potential as a herbicide against the weed *Chenopodium album* compared to crop kinases, particularly the Aurora kinase complex of maize (*Zea mays*).

The results obtained can be used for further study of plant Aurora kinases as targets and for the rational design of selective next-generation herbicides.

Keywords: Aurora kinases; molecular dynamics; rational design; herbicides; GROMACS; MM/PBSA; selectivity; protein-ligand complexes.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ВСТУП	6
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	8
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	10
1.1 Рослинні аврора-кінази як мішені для розробки нових гербіцидів	10
1.1.1. Структурно-функціональні особливості аврора-кіназ у рослин.....	11
1.1.2. Еволюційні та структурні відмінності аврора-кіназ культурних та сегетальних рослин	13
1.2. Механізми дії та селективність низькомолекулярних інгібіторів кіназ ...	15
1.3. Застосування методів комп'ютерного моделювання в агрохімії	17
1.3.1. Молекулярний докінг у пошуку нових біологічно активних сполук.....	18
1.3.2. Роль молекулярної динаміки для оцінки стабільності та селективності ліганд-білкових комплексів	19
РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	21
2.1. Підготовка докінг-комплексів	22
2.2. Побудова систем для симуляції за допомогою LigParGen	22
2.3. Протокол проведення молекулярно-динамічних симуляцій у середовищі GROMACS.....	24
2.4. Методи аналізу траєкторій та візуалізації молекулярних взаємодій	25
РОЗДІЛ 3. ОБГОВОРЕННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДАНИХ	27
3.1. Аналіз конформаційної стабільності комплексів білок-ліганд у процесі молекулярної динаміки	27
3.2. Динаміка формування та стабільність міжмолекулярних водневих зв'язків	30
3.3. Термодинамічний профіль зв'язування інгібітора з кіназами	33

3.4. Ідентифікація ключових амінокислотних залишків, що забезпечують селективність гербіциду	34
ВИСНОВКИ	37
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	39
ДОДАТКИ.....	44

ВСТУП

Гербіциди широко застосовуються для контролю бур'янів в сучасних агроecosистемах. Однак систематичне та інтенсивне застосування одного й того ж препарату або різних гербіцидів з однаковим механізмом дії, починаючи з 1970-х років, призвело до глобального поширення гербіцидної резистентності. Надмірне та нераціональне використання гербіцидів спровокували стрімку еволюцію стійких видів сегетальної рослинності. Більше того, поширення активних компонентів агрохімікатів у довкіллі завдає значної шкоди екосистемам та становить серйозну загрозу для живих організмів. За наявними даними, понад 90% застосовуваних пестицидів (включно з гербіцидами, інсектицидами та фунгіцидами) не досягають цільових біологічних об'єктів і розсіюються різними шляхами, спричиняючи забруднення води, ґрунту, атмосферного повітря та харчових продуктів.

Селективність гербіцидів забезпечує можливість їх застосування на ділянках, де одночасно присутні як сільськогосподарські культури, так і сегетальна рослинність. Відповідно, гербіцидна селективність визначається як здатність препарату в заданій дозі виявляти токсичність щодо певних видів рослин, не пошкоджуючи при цьому інші. На сьогодні існує критична потреба у створенні високоселективних гербіцидів, не лише задля збереження культурних рослин, але й для суттєвого зниження зашального хімічного навантаження на ґрунт та агроecosистеми.

Зважаючи на обмежений спектр молекулярних мішеней та зростаючу проблему резистентності до існуючих агрохімікатів, протеїнкінази наразі розглядаються як перспективні мішені для розробки нових гербіцидів. Зокрема, аврора-кінази, що є еволюційно консервативними ключовими детермінантами мітозу в усіх еукаріотів, становлять принципово новий механізм дії для подолання резистентних популяцій бур'янів, оскільки хімічне інгібування цих ферментів блокує клітинну проліферацію, спричиняючи летальні морфологічні дефекти, зупинку росту та повну стерильність цільових рослин.

Для створення високоселективних видоспецифічних гербіцидів важливо розуміти конформаційну динаміку, що визначає взаємодії між білком та лігандом. Тому необхідно дослідити еволюцію ліганд-білкових комплексів у часі за допомогою методів молекулярної динаміки (МД), яка дозволяє перевірити термодинамічну стійкість та стабільність попередньо згенерованих структур.

Відповідно до цього, **метою роботи** є проведення комплексного молекулярно-динамічного аналізу заздалегідь отриманих докінг-комплексів потенційного інгібітора з аврора-кіназами культурних та сегетальних рослин.

Завдання:

1. Проаналізувати сучасний стан проблеми гербіцидної резистентності та обґрунтувати актуальність пошуку нових мішеней для створення селективних гербіцидів.
2. Узагальнити структурно-функціональні особливості рослинних аврора-кіназ як перспективних молекулярних мішеней.
3. Провести молекулярно-динамічне моделювання докінг-комплексів досліджуваних сполук.
4. Оцінити стабільність отриманих комплексів за допомогою аналізу RMSD, динаміки утворення водневих зв'язків та вільної енергії зв'язування.
5. Визначити ключові амінокислотні залишки активного центру, що можуть зумовлювати селективність зв'язування інгібітора.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АТФ	– аденозинтрифосфат
МД	– молекулярна динаміка / молекулярно-динамічне (моделювання)
CADD	– (англ. computer-aided drug design) комп'ютерно-орієнтований дизайн препаратів
GROMACS	– (англ. GROningen MACHine for Chemical Simulations) програмний пакет для молекулярно-динамічного моделювання
LBDD	– (англ. ligand-based drug design) ліганд-орієнтований дизайн препаратів
MM/GBSA	– (англ. molecular mechanics / generalized Born surface area) напівемпіричний метод розрахунку вільної енергії зв'язування
MM/PBSA	– (англ. molecular mechanics / Poisson-Boltzmann surface area) напівемпіричний метод розрахунку вільної енергії зв'язування
NPT	– (англ. isothermal-isobaric ensemble) ізотермічно-ізобаричний термодинамічний ансамбль
NVT	– (англ. canonical ensemble) ізотермічно-ізохорний термодинамічний ансамбль
OPLS-AA	– (англ. optimized potentials for liquid simulations – all atom) повноатомне силове поле
PME	– (англ. particle mesh Ewald) алгоритм розрахунку електростатичних взаємодій на далеких відстанях
QSAR	– (англ. quantitative structure-activity relationship) кількісні співвідношення «структура-активність»
RMSD	– (англ. root mean square deviation) середньоквадратичне відхилення координат атомів
RMSF	– (англ. root mean square fluctuation) середньоквадратичні флуктуації амінокислотних залишків
SAC	– (англ. spindle assembly checkpoint) точка збору веретена поділу

SBDD – (англ. structure-based drug design) структурно-орієнтований дизайн препаратів

SEM – (англ. standard error of mean) стандартна похибка

VMD – (англ. visual molecular dynamics) спеціалізоване програмне забезпечення для візуалізації молекулярної динаміки

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Рослинні аврора-кінази як мішені для розробки нових гербіцидів

Сучасне сільське господарство стикається з проблемою глобального поширення стійкості бур'янів до існуючих агрохімікатів. На сьогодні зафіксовано понад 450 випадків еволюційної резистентності сегетальної рослинності до комерційних препаратів, зокрема до інгібіторів ацетолататсинтази (ALS), ацетил-КоА-карбоксилази (ACCase) та фотосистеми II [1]. Більшість гербіцидів, що домінують на ринку, історично обмежуються впливом на вузький спектр молекулярних мішеней. Вичерпання потенціалу традиційного емпіричного скринінгу сполук *in vivo* (так званого підходу «spray and pray») зумовило необхідність переходу до раціонального, цілеспрямованого (target-based) дизайну гербіцидів. Ця стратегія базується на первинній ідентифікації життєво необхідних для рослини протеїнів та подальшій розробці специфічних лігандів для їхнього блокування за допомогою методів *in vitro* та комп'ютерного моделювання [2].

У контексті пошуку нових механізмів дії особливу увагу привертають протеїнкінази — сімейство ензимів, що каталізують зворотне фосфорилування білків і виступають ключовими регуляторами багатьох клітинних процесів [3].

Серед усього різноманіття рослинних протеїнкіназ винятковий інтерес як мішені для нових гербіцидів становлять аврора-кінази. Згідно з концепцією target-based дизайну, ідеальною мішенню є фермент, інгібування якого на 60–80% спричиняє незворотне пригнічення росту або загибель організму [2]. Генетичні дослідження з використанням нокаутних мутантів та методів РНК-інтерференції (RNAi) підтверджують, що зниження експресії аврора-кіназ є летальним для розвитку рослини: воно унеможливорює нормальне формування веретена поділу, блокує клітинний цикл і призводить до зупинки розвитку на ранніх етапах [4]. На відміну від багатьох метаболічних ензимів, функції яких можуть бути частково компенсовані альтернативними біохімічними шляхами,

аврора-кінази виконують унікальні та незамінні функції у контролі клітинного поділу [5].

Висока еволюційна консервативність аврора-кіназ серед різних видів рослин відкриває шлях до створення гербіцидів широкого спектра дії, здатних ефективно контролювати різноманітні види бур'янів [2, 6]. Водночас, наявність видоспецифічних відмінностей у топології каталітичного домену (зокрема, в ділянці АТФ-зв'язуючої кишені) порівняно з тваринними та грибовими ортологами створює структурне підґрунтя для розробки високоселективних сполук [7, 8, 9]. Такі молекули будуть вибірково токсичними для рослинних об'єктів, мінімізуючи ризики для нецільових організмів [2, 10]. Використання сучасних методів хемоінформатики та молекулярного докінгу дозволяє раціонально використовувати ці тонкі структурні відмінності для віртуального конструювання інноваційних гербіцидних молекул з принципово новим механізмом дії [11, 12].

1.1.1. Структурно-функціональні особливості аврора-кіназ у рослин

Аврора-кінази належать до висококонсервативної родини серин/треонінових протеїнкіназ, які відіграють ключову роль у регуляції процесів клітинного поділу еукаріотів [13]. Загальна молекулярна архітектура цих білків представлена трьома основними функціональними доменами: варіабельними N- та C-кінцевими ділянками, а також еволюційно консервативним центральним каталітичним (кіназним) доменом [14, 15]. Тоді як кіназний домен зберігає високий рівень структурної гомології (понад 60 % ідентичності амінокислотних послідовностей між рослинними, дріжджовими та тваринними ортологами), N- та C-кінцеві послідовності суттєво відрізняються за довжиною та амінокислотною послідовністю [8]. Ці варіабельні ділянки зазвичай містять специфічні регуляторні мотиви, що забезпечують їхню субклітинну локалізацію та подальшу протеасомну деградацію [15].

Просторова будова каталітичного домену представлена двома основними частками: N-кінцевою часткою, яка переважно складається з β -складчастих структур, та більшою С-кінцевою часткою, що сформована α -спіралями. Ці дві частки з'єднані між собою гнучким поліпептидним ланцюгом — шарнірною ділянкою (hinge region), що забезпечує рухливість часток відносно одна одної та просторову реорганізацію ферменту під час зв'язування ліганду або субстрату [16].

Каталітичний центр, який формує АТФ-зв'язуючу кишеню, розташований у глибокій щілині між N- та С-частками. Молекула АТФ фіксується у кишені завдяки утворенню специфічних водневих зв'язків між її аденіновим кільцем та амінокислотними залишками шарнірної ділянки, тоді як трифосфатна група координується іонами металів за участі висококонсервативного DFG-мотиву (Asp-Phe-Gly) [6, 17]. Регуляторним елементом каталітичного домену є активаційна петля (T-loop), що простягається від DFG-мотиву до консервативного APE-мотиву. У неактивному стані ця петля може стерично блокувати доступ до каталітичного центру. Повна ферментативна активація аврора-кіназ вимагає автофосфорилування специфічних консервативних залишків треоніну, розташованих у межах активаційної петлі. Ця посттрансляційна модифікація індукує просторові конформаційні переходи, що призводять до правильного позиціонування каталітичних залишків та формування відкритого сайту зв'язування субстрату, перетворюючи фермент на функціонально активну молекулу [15, 16].

Незважаючи на високу структурну гомологію з тваринними аналогами, рослинні аврора-кінази демонструють унікальні еволюційні та функціональні особливості [8]. На основі філогенетичного аналізу та субклітинної локалізації їх класифікують на дві окремі кладі: α -Aurora та β -Aurora [5]. Представники клади α -Aurora переважно локалізуються на мікротрубочках мітотичного веретена та рослинних центрах організації мікротрубочок (МТОС), які формуються на поверхні ядра. Ці кінази відповідають за встановлення біполярного веретена поділу, правильну орієнтацію площини асиметричних (формативних) клітинних

поділів та загальну динаміку мікротрубочок [5, 14]. Натомість, β -Aurora демонструє хромосомно-пасажирську локалізацію (подібно до тваринних кіназ Aurora B/C), концентруючись на центромерах і кінетохорах під час прометафази та метафази. Основними функціями цієї класи є контроль вирівнювання хромосом, сегрегації сестринських хроматид та моніторинг точки збору веретена поділу (spindle assembly checkpoint, SAC) [13, 15].

На відміну від тваринних ферментів, рослинні аврора-кінази не мають настільки строгої функціональної дивергенції, оскільки всі представники обох рослинних клас містять консервативний залишок гліцину в каталітичному домені, що у тварин є характерним виключно для α -Aurora [5, 7, 13]. Крім того, як α -, так і β -кінази здатні фосфорилувати гістон H3 за залишком Ser10, що є ключовим етапом для конденсації та модифікації хроматину під час мітозу [17].

Конформаційна стабільність активного стану та просторова специфічність функціонування цих ферментів додатково модулюється їхньою взаємодією з кофакторами [18]. Наприклад, рослинний білок TPX2 алостерично взаємодіє з ізоформами α -Aurora, тим самим забезпечуючи стабілізацію активної конформації кінази, її захист від передчасної деградації та просторове спрямування до мікротрубочок у пізньому мітозі [5, 18]. Окрім цього, α -Aurora відіграє унікальну післямітотичну роль під час цитокінезу в рослин: вона переміщується до середньої зони фрагмопласту, де безпосередньо взаємодіє з білком MAP65-3. Фосфорилування MAP65-3 кіназою α -Aurora регулює його здатність зшивати мікротрубочки, що є необхідним для правильного розширення клітинної пластинки [19].

1.1.2. Еволюційні та структурні відмінності аврора-кіназ культурних та сегетальних рослин

Попри загальну структурну консервативність аврора-кіназ серед еукаріотів, у процесі філогенетичного розвитку рослин відбулася їхня суттєва дивергенція [13, 14]. Проте представленість ізоформ аврора-кіназ має чітко

виражену видоспецифічність [6, 7]. Якщо геном дводольного бур'яна *Chenopodium album* кодує три гени цих ензимів (дві ізоформи α -Aurora та одну β -Aurora) [6], то у багатьох однодольних сільськогосподарських культур, таких як кукурудза (*Zea mays*), рис (*Oryza sativa*) та ячмінь (*Hordeum vulgare*), наявний лише один представник у кожній із цих субклад [6, 20]. Така різниця у кількості копій генів свідчить про глибоку еволюційну адаптацію та різний ступінь функціональної надлишковості цих ферментів у різних таксономічних групах рослин, що необхідно враховувати при розробці агрохімікатів [3, 15].

Сегетальна рослинність, на відміну від селекціонованих культурних видів, характеризується надзвичайно високим рівнем генетичного різноманіття, що забезпечує їй фенотипічну пластичність та здатність швидко адаптуватися до мінливих стресових чинників середовища [1]. Саме ця генетична пластичність створює передумови для виникнення структурних відмінностей на рівні амінокислотних послідовностей життєво важливих ензимів [1, 21]. Хоча загальна архітектура кіназного домену та АТФ-зв'язуючої кишені залишається відносно консервативною навіть серед філогенетично віддалених видів [13, 16], видоспецифічні амінокислотні заміни здатні формувати унікальну топологію сайтів зв'язування у сегетальних видів [9, 17].

Ефективність раціонального дизайну селективних гербіцидів прямо залежить від виявлення та експлуатації цих мікроструктурних відмінностей між ортологічними аврора-кіназами культурних та сегетальних рослин [2, 11]. Доведено, що навіть поодинокі амінокислотні заміни в межах або поблизу АТФ-зв'язуючого сайту здатні кардинально змінити афінність ліганду до білка [9, 18, 27]. В той час як висококонсервативні залишки активного центру забезпечують базове зв'язування молекули інгібітора [19, 25], варіабельні ділянки каталітичної щілини дозволяють генерувати додаткові гідрофобні контакти чи водневі зв'язки, що стабілізують комплекс [22, 29]. Це дозволяє створювати ліганди, які виявлятимуть високу вибірккову токсичність до сегетальної рослинності, зберігаючи при цьому життєдіяльність сільськогосподарських культур [3, 24]

1.2. Механізми дії та селективність низькомолекулярних інгібіторів кіназ

Низькомолекулярні інгібітори протеїнкіназ класифікують на декілька основних типів залежно від їхнього механізму зв'язування та здатності розпізнавати різні конформаційні стани ферменту [10, 16].

Інгібітори I типу є класичними АТФ-конкурентними лігандами, які взаємодіють із каталітичним доменом у його активному стані, безпосередньо зв'язуючись із ділянкою розпізнавання аденіну [16, 25]. Оскільки молекулярна архітектура цього сайту є висококонсервативною в межах усього кіному, інгібітори I типу зазвичай характеризуються низькою селективністю та схильністю до зв'язування з нецільовими кіназами, що в агрохімічному контексті може спричиняти побічну фітотоксичність щодо культурних рослин [2, 3].

Інгібітори II типу розпізнають фермент у його неактивному конформаційному стані та зв'язуються з додатковими гідрофобними субкишенями, прилеглими до АТФ-сайту [10]. Ці ділянки є більш варіабельними, завдяки чому ліганди II типу демонструють помітно вищий ступінь селективності [9, 10]. Крім того, виділяють неконкурентні (алостеричні) інгібітори (типи III–VI), які взаємодіють за межами АТФ-щілини, пропонуючи найвищу вибірковість дії завдяки орієнтації на унікальні регуляторні домени білка [3, 24].

Створення АТФ-конкурентних лігандів базується на використанні мікроструктурних відмінностей у топології каталітичної щілини [9, 11]. Встановлено, що поверхневий зв'язуючий жолобок аврора-кіназ функціонально поділяється на чотири ключові зони: фронтальну сольватовану кишеню (*solvent-exposed front pocket*), шарнірну ділянку (*hinge region*), гідрофобну «кишеню селективності» (*selectivity pocket*) та сольватовану фосфат-зв'язуючу зону [9, 17]. Шарнірна ділянка забезпечує базову афінність ліганду шляхом утворення мережі водневих зв'язків з основною поліпептидною структурою (імітуючи зв'язування АТФ), однак вона майже не сприяє вибірковості [16, 26].

Визначальну роль у розпізнаванні мішеней відіграють так звані гідрофобні регіони 1 і 2, які просторово не заповнюються природним субстратом під час фосфотрансферазної реакції [9, 18]. Зокрема, доступ до задньої гідрофобної «кишені селективності» контролюється «гейткіперним» (*gatekeeper*) амінокислотним залишком [9]. Фізико-хімічні властивості, розмір бокового ланцюга гейткіпера, а також топологія сусідніх гідрофобних залишків детермінують здатність об'ємних замісників ліганду проникати в цю кишеню, тим самим створюючи структурне підґрунтя для конструювання високоселективних сполук, які оминатимуть ортологічні кінази нецільових видів [11, 17].

На термодинамічному рівні селективність низькомолекулярних інгібіторів визначається диференційним балансом між ентальпійними та ентропійними складовими вільної енергії зв'язування ліганд-білкового комплексу [22, 23]. Висока спорідненість до цільової кінази досягається за рахунок максимізації ентальпійного виграшу від утворення оптимізованих водневих зв'язків, сильних електростатичних і ван-дер-ваальсових контактів, а також взаємодій між ароматичними системами ліганду та гідрофобними залишками активного центру [22, 27]. Одночасно селективність жорстко обмежується ентропійними факторами: зміною конформаційної рухливості як самого ліганду, так і амінокислотних залишків білка, та значними енергетичними витратами на десольватацію гідрофобних субкишень (витіснення молекул води) [23, 29].

Комп'ютерне моделювання доводить, що навіть незначні стеричні конфлікти або втрата єдиного ключового водневого зв'язку внаслідок видоспецифічної амінокислотної заміни призводять до різкого падіння загальної афінності та дестабілізації комплексу [17, 30]. Отже, дизайн селективних гербіцидів зводиться до розробки таких фармакофорних скафолдів, які здатні формувати енергетично вигідні конформаційні патерни виключно у специфічному мікрооточенні каталітичного сайту цільової кінази сегетальної рослини, забезпечуючи максимальне зв'язування за умов мінімального конформаційного напруження [2, 11, 26].

1.3. Застосування методів комп'ютерного моделювання в агрохімії

Традиційні підходи до розробки агрохімічних препаратів, що базувалися на масовому емпіричному скринінгу хімічних сполук (випробування *in vivo* на цілих рослинах), характеризуються значними витратами часу, низькою результативністю та високою вартістю [2, 11]. На сьогодні ключовим інструментом оптимізації цього процесу став комп'ютерно-орієнтований дизайн препаратів (Computer-Aided Drug Design, CADD) [3, 24]. Застосування методів *in silico* дозволяє перенести початкові етапи скринінгу у віртуальне середовище, що забезпечує швидку ідентифікацію нових біологічно активних молекул, цілеспрямованих на специфічні мішені фітопатогенів та бур'янів, суттєво мінімізуючи метод «спроб і помилок» [11, 24].

Концептуально методи комп'ютерного моделювання в агрохімії поділяються на дві основні стратегії: структурно-орієнтований (Structure-Based Drug Design, SBDD) та ліганд-орієнтований дизайн (Ligand-Based Drug Design, LBDD) [16, 25]. Стратегія SBDD базується на наявності інформації про тривимірну (3D) структуру цільового білка-мішені, отриману за допомогою рентгеноструктурного аналізу, ЯМР-спектроскопії або методів гомологічного моделювання, і включає такі обчислювальні підходи, як молекулярний докінг та молекулярна динаміка [9, 26, 30]. У випадках, коли 3D-структура мішені невідома або важкодоступна для кристалізації (наприклад, для мембранних рецепторів), застосовується LBDD, що спирається на аналіз структурно-хімічних характеристик відомих активних лігандів шляхом побудови фармакофорних моделей та використання методів кількісних співвідношень «структура-активність» (QSAR) [11, 25].

Імплементація методів хемоінформатики докорінно оптимізує ітеративний цикл «Дизайн-Синтез-Тестування-Аналіз» (DMTA), забезпечуючи раціональний відбір молекул ще на етапі *in silico* [12, 29]. Найбільш дієвим інструментом на цьому етапі є віртуальний скринінг, за допомогою якого здійснюється

високопродуктивна фільтрація баз даних, що налічують мільйони хімічних сполук, з метою пріоритезації найафінніших «хітів» [11, 12].

1.3.1. Молекулярний докінг у пошуку нових біологічно активних сполук

Молекулярний докінг виступає фундаментальним обчислювальним підходом SBDD, що дозволяє з високою точністю прогнозувати конформацію та афінність зв'язування низькомолекулярного ліганду в активному центрі макромолекули [25, 26]. Процес докінгу реалізується у два послідовні етапи: спочатку пошуковий алгоритм досліджує конформаційний простір для генерації можливих варіантів орієнтації ліганду, після чого застосовуються оціночні функції (scoring functions), що засновані на силових полях та емпіричних даних, для розрахунку енергії взаємодії та ранжування згенерованих конформацій [21, 26]. Завдяки цьому підходу реалізується концепція віртуального скринінгу, яка уможливорює швидке та економічно ефективне тестування багатомільйонних бібліотек хімічних сполук, відфільтровуючи термодинамічно невідповідні молекули і виділяючи найбільш перспективні сполуки-хіти для подальшої експериментальної перевірки [11, 24, 28].

Незважаючи на високу швидкість та прогностичну цінність, молекулярний докінг має суттєві обмеження через наближеність скорингових функцій, які не здатні повноцінно врахувати ентропійні втрати, складні ефекти десольватації та масштабні конформаційні перебудови білкового каркаса [9, 23, 26]. Білки-мішені, зокрема протеїнкіназні системи, є високодинамічними структурами, тому сучасним стандартом є застосування парадигми індукованої відповіді (induced-fit docking), що враховує конформаційну рухливість амінокислотних залишків мішені під час зв'язування ліганду, забезпечуючи вищу фізіологічну релевантність результатів [25, 27]. З огляду на це, для надійної термодинамічної верифікації згенерованих структур та оцінки їхньої селективності й стабільності у часі необхідне подальше застосування ресурсомістких методів молекулярної динаміки [9, 17, 22].

1.3.2. Роль молекулярної динаміки для оцінки стабільності та селективності ліганд-білкових комплексів

МД базується на законах класичної ньютонівської механіки і використовує фізично обґрунтовані потенціали (силові поля) для моделювання еволюції багатоатомних систем у часі [22, 30]. Завдяки інтеграції моделей розчинника, іонів та контролю термодинамічних параметрів, МД дозволяє відтворити фізіологічні умови *in silico* з високою просторовою та часовою роздільною здатністю [30].

Ключовим завданням МД в агрохімічному пошуку є оцінка просторової стабільності ліганд-рецепторних комплексів, що дозволяє ефективно відсіювати хибнопозитивні результати (*decoys*), згенеровані під час віртуального скринінгу та молекулярного докінгу [11, 24, 27]. Основні метричні показники, такі як середньоквадратичне відхилення (RMSD) координат атомів та середньоквадратичні флуктуації (RMSF) амінокислотних залишків, кількісно відображають конформаційну стабільність системи [22, 27]. Дослідження демонструють, що нативні, енергетично вигідні конформації зберігають структурну цілісність протягом симуляції (зазвичай RMSD утримується в межах 2,0 Å) [27]. Крім того, аналіз МД-траєкторій дає змогу відстежувати еволюцію специфічних міжмолекулярних контактів, зокрема водневих зв'язків, виявляючи важливі транзиторні взаємодії, які є недоступними для статичних методів моделювання [22, 29].

Методи молекулярної динаміки (МД) відіграють ключову роль у вивченні селективності інгібіторів [9, 17]. Оскільки активні центри гомологічних ферментів (наприклад, протеїнкіназ) мають подібну топологію, селективність часто детермінується саме динамічною гнучкістю бічних ланцюгів та алостеричною регуляцією [3, 10, 16].

Вагомою перевагою молекулярної динаміки є можливість її інтеграції з методами точного розрахунку вільної енергії зв'язування, такими як MM/PBSA (*Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area*) та MM/GBSA (*Molecular*

Mechanics/Generalized Born Surface Area) [17, 23]. Ці термодинамічні протоколи аналізують згенерований конформаційний ансамбль та математично розкладають загальну енергію на електростатичні, ван-дер-ваальсові сили, а також енергії полярної та неполярної сольватації [23]. Декомпозиція вільної енергії на рівні індивідуальних амінокислотних залишків (*residue-based free energy decomposition*) є незамінною для кількісної ідентифікації ключових структурних детермінант зв'язувальної кишені, які роблять найбільший внесок в афінність та визначають селективний профіль інгібітора [9, 17].

РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Для виконання експериментальної частини даної роботи було використано програмний пакет GROMACS (GROningen MAchine for Chemical Simulations). GROMACS — це програмний комплекс із відкритим вихідним кодом, базовим призначенням якого є проведення молекулярно-динамічних (МД) симуляцій біохімічних макромолекул, зокрема білків, ліпідів та нуклеїнових кислот [31]. Цей інструмент є стандартом в обчислювальній біології та біоінформатиці для моделювання еволюції багатоатомних систем у часі [32].

В основі функціонування GROMACS лежить чисельне інтегрування класичних рівнянь руху Ньютона, яке в даному дослідженні виконувалося за алгоритмом leap-frog із кроком інтегрування 2 фемтосекунди (фс) [33]. Для розрахунку потенціальної енергії та сил взаємодії між атомами було використано повноатомне силове поле OPLS-AA (Optimized Potentials for Liquid Simulations - All Atom) [34]. Генерація топології та часткових зарядів ліганду здійснювалася за допомогою сервера LigParGen, розробленого спеціально для даного силового поля [35].

У якості моделі розчинника було застосовано триточкову модель води TIP3P [36]. Розрахунок електростатичних взаємодій на далеких відстанях виконувався за алгоритмом PME (Particle Mesh Ewald) [37]. Для короткосяжних кулонівських та ван-дер-ваальсових взаємодій було встановлено радіус відсікання (cut-off) на рівні 1,0 нм. Підтримання стабільних термодинамічних параметрів системи (NPT-ансамбль) забезпечувалося термостатом V-rescale для фіксації температури на рівні 298 K [38], а також баростатом Паррінелло-Рамана (Parrinello-Rahman) для підтримання ізотропного тиску в 1 бар [39].

Обчислювальна ефективність комплексу забезпечувалася алгоритмами просторової декомпозиції доменів та оптимізацією для паралельних обчислень (MPI/OpenMP) із залученням гетерогенного апаратного прискорення на графічних процесорах (GPU) [40].

2.1. Підготовка докінг-комплексів

Підготовка стартових структур для проведення молекулярно-динамічних (МД) симуляцій здійснювалася з використанням стандартних інструментів програмного пакета GROMACS [31]. Стартові ліганд-рецепторні комплекси формувалися на основі результатів попередньо проведеного молекулярного докінгу. Координати білка та ліганду було розділено в окремі файли для подальшої обробки.

Генерація топологічних параметрів для білкової складової комплексу здійснювалася за допомогою утиліти `gmx pdb2gmx`. Процедура виконувалася з використанням силового поля OPLS-AA (Optimized Potentials for Liquid Simulations – All Atom) [33]. На цьому етапі програма автоматично розпізнавала канонічні амінокислотні залишки, додавала відсутні атоми водню згідно з правилами обраного силового поля та формувала основний файл топології рецептора (`topol.top`), а також файл координат білка у форматі, сумісному з GROMACS (`.gro`).

2.2. Побудова систем для симуляції за допомогою LigParGen

Для повноцінного молекулярно-динамічного моделювання ліганд-рецепторних комплексів у середовищі GROMACS необхідно забезпечити наявність коректних топологічних параметрів для всіх компонентів системи. Стандартні бібліотеки силового поля OPLS-AA містять інформацію щодо канонічних амінокислотних залишків білків, проте не містять готових параметрів для унікальних синтетичних молекул, до яких належить досліджувана сполука [33].

Для параметризації ліганду було використано веб-сервер LigParGen. Даний інструмент призначений для генерації топологій малих органічних молекул у форматі силового поля OPLS-AA [34]. Під час генерації параметрів виникла системна проблема, пов'язана з обмеженнями алгоритмів LigParGen, які не могли

коректно обробити атом галогену в ароматичному кільці ліганду. Через цю проблему розпізнавання ковалентних зв'язків відбувалось некоректно і геометрія молекули сильно порушувалась.

Для уникнення цієї проблеми топологію генерували шляхом подачі на сервер одновимірною лінійною запису структури сполуки у форматі SMILES. Цей підхід дозволив успішно отримати коректний файл топології (.itp), що містив необхідні константи силового поля та часткові атомні заряди, розраховані за квантово-хімічною моделлю 1.14*CM1A [34]. Отриманий файл топології використовувався надалі без додаткових модифікацій.

Проте вихідний координатний файл (.gro), автоматично згенерований сервером на основі SMILES, мав неправильне просторове розташування атомів. Для відновлення початкового розташування ліганду, попереднього отриманого на етапі молекулярного докінгу, було застосовано хемоінформатичну бібліотеку RDKit (мова програмування Python) [39]. За допомогою алгоритмів зіставлення хімічних підграфів (graph substructure matching) було встановлено точну відповідність між атомами спотвореної структури LigParGen та оригінального координатного файлу ліганду (формат PDB). Це дозволило автоматично екстрагувати правильні просторові координати (X, Y, Z) та перенести їх на структуру з коректною номенклатурою атомів.

Отримані топологічні дані ліганду були інтегровані до загальної топології системи. Для цього згенерований файл .itp підключався до основного файлу топології рецептора (topol.top), згенерованого утилітою gmx pdb2gmx. Після цього до опису складу системи було додано відповідну кількість молекул ліганду. Ця процедура дозволила коректно об'єднати координати та фізичні параметри білкового каркаса і низькомолекулярного ліганду в єдину термодинамічну систему, підготувавши її до подальших етапів сольватації, нейтралізації та безпосереднього розрахунку молекулярної динаміки.

2.3. Протокол проведення молекулярно-динамічних симуляцій у середовищі GROMACS

Молекулярно-динамічне моделювання підготовлених комплексів проводили за стандартизованим протоколом із використанням середовища GROMACS [31]. Спочатку об'єднану структуру білка та ліганду розміщували у кубічному боксі з відступом 1,0 нм від меж системи до будь-якого атома комплексу. Після цього систему солвували моделлю води TIP3P [35] та нейтралізували шляхом додавання іонів Na^+ і Cl^- .

Перед початком динамічної симуляції виконували енергетичну мінімізацію за алгоритмом steepest descent до досягнення значення максимальної сили F_{max} менше $1000 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{нм}^{-1}$. Це дозволяло усунути локальні стеричні конфлікти та підготувати систему до подальшого врівноваження.

Потім систему послідовно врівноважували в NVT- та NPT-ансамблях із застосуванням positional restraints до важких атомів білка і ліганду. Під час NVT-врівноваження, яке тривало 100 пс, стабілізували температуру системи до 298 К за допомогою термостату V-rescale [37]. Далі проводили NPT-врівноваження тривалістю 100 пс для нормалізації тиску та густини системи за допомогою баростату C-rescale при тиску 1 бар.

Після завершення етапів врівноваження виконували продуктивну молекулярно-динамічну симуляцію тривалістю 200 нс із кроком інтегрування 2 фс. Для підтримання коректної геометрії зв'язків за участю атомів водню застосовували алгоритм LINCS. Електростатичні взаємодії розраховували методом PME [36], а нековалентні взаємодії обмежували на відстані 1,2 нм. Координати системи записували у файл траєкторії .xtc кожні 10 пс, а у файл .trr — кожні 1000 пс.

Для оцінки відтворюваності та надійності результатів для кожного комплексу запускали три незалежні симуляційні репліки з фіксованим значенням випадкового числа gen_seed. Це дозволяло порівняти стабільність систем у

межах однакових початкових умов і зменшити вплив випадкових чисельних факторів на результати моделювання.

2.4. Методи аналізу траєкторій та візуалізації молекулярних взаємодій

Аналіз отриманих траєкторій молекулярної динаміки (МД) проводили з метою оцінки конформаційної стабільності ліганд-рецепторних комплексів і кількісного визначення енергетичних характеристик їхньої взаємодії. Обробку даних здійснювали за допомогою вбудованих утиліт пакету GROMACS [32], а візуалізацію структур і аналіз нековалентних контактів виконували із застосуванням спеціалізованого програмного забезпечення.

Аналіз структурної стабільності (RMSD). Середньоквадратичне відхилення координат атомів (RMSD) використовували як основний показник оцінки структурної збіжності та термодинамічної стабільності системи. RMSD розраховували для кіназного домену білка та низькомолекулярного ліганду після попереднього накладання структур на початкову конформацію комплексу за допомогою утиліти `gmx rms`. Це дало змогу визначити час досягнення рівноважного стану системи та виявити періоди конформаційних перебудов.

Розрахунок вільної енергії зв'язування (MM/PBSA). Для кількісної оцінки афінності інгібітора до рослинних аврора-кіназ використовували напівемпіричний метод MM/PBSA (Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area) [40]. Розрахунок загальної вільної енергії зв'язування включав оцінку внесків молекулярно-механічної енергії, тобто електростатичних і ван-дер-ваальсових взаємодій, енергії полярної сольватації, розрахованої за рівнянням Пуассона-Больцмана, а також неполярної складової. Застосування цього методу дало змогу виконати енергетичну декомпозицію за окремими амінокислотними залишками активного центру, що є важливим для виявлення ключових амінокислот, які визначають селективність дії інгібітора.

Візуалізація та аналіз взаємодій. Просторовий аналіз комплексу та візуалізацію молекулярних взаємодій, зокрема водневих зв'язків, гідрофобних

контактів і π - π стекингу, проводили із застосуванням інтегрованого підходу. Для детального вивчення архітектури АТФ-зв'язуючої кишені та аналізу нековалентних контактів використовували програмні пакети PyMOL, VMD (Visual Molecular Dynamics) та Discovery Studio Visualizer. Комбінація цих засобів забезпечила комплексну інтерпретацію динаміки активного центру: PyMOL і ChimeraX застосовували для побудови високоякісних зображень конформацій, тоді як VMD та Discovery Studio Visualizer використовували для детального картографування взаємодій ліганду з амінокислотними залишками на основі репрезентативних конформацій, отриманих шляхом кластеризації МД-траєкторій. Отримані дані стали основою для інтерпретації мікроструктурних детермінант селективності досліджуваної сполуки.

РОЗДІЛ 3. ОБГОВОРЕННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДАНИХ

У цьому розділі представлено результати молекулярно-динамічного моделювання тривалістю 200 нс докінг-комплексів досліджуваної сполуки з Аврора-кіназами рослинних видів та людини.

3.1. Аналіз конформаційної стабільності комплексів білок-ліганд у процесі молекулярної динаміки

Аналіз стабільності комплексів білок-ліганд упродовж 200 нс молекулярної динаміки виконано на основі візуального конформаційного накладення структур та розрахунку середньоквадратичного відхилення (RMSD) C- α атомів поліпептидного ланцюга. Накладення структурних знімків підтверджує стабільну локалізацію ліганда в сайті зв'язування протягом усього часу моделювання (рис. 3.1.). Динаміка показників RMSD свідчить, що після початкового етапу екваїбрації (перші 20–50 нс) усі досліджувані системи досягають відносної структурної рівноваги з виходом на плато, розрізняючись за ступенем конформаційної стабільності (рис. 3.2.1.).

Найменші структурні відхилення виявляють комплекси *Homo sapiens* та *Arabidopsis thaliana*, чії показники RMSD стабілізуються на мінімальному рівні близько 8 Å. Проміжні значення середньоквадратичного відхилення зафіксовано для *Setaria italica* з виходом на плато в межах 10–10.5 Å, а також для мішеней *Triticum aestivum* і *Chenopodium album*, показники яких стабілізуються на рівні близько 11 Å. Найбільшу конформаційну рухливість демонструє комплекс *Zea mays*, значення RMSD для якого сягають 12–13 Å після 50 нс моделювання та зберігають значну амплітуду флуктуацій до кінця розрахункової траєкторії, що вказує на виражену гнучкість поліпептидного ланцюга цієї мішені порівняно з іншими досліджуваними видами.

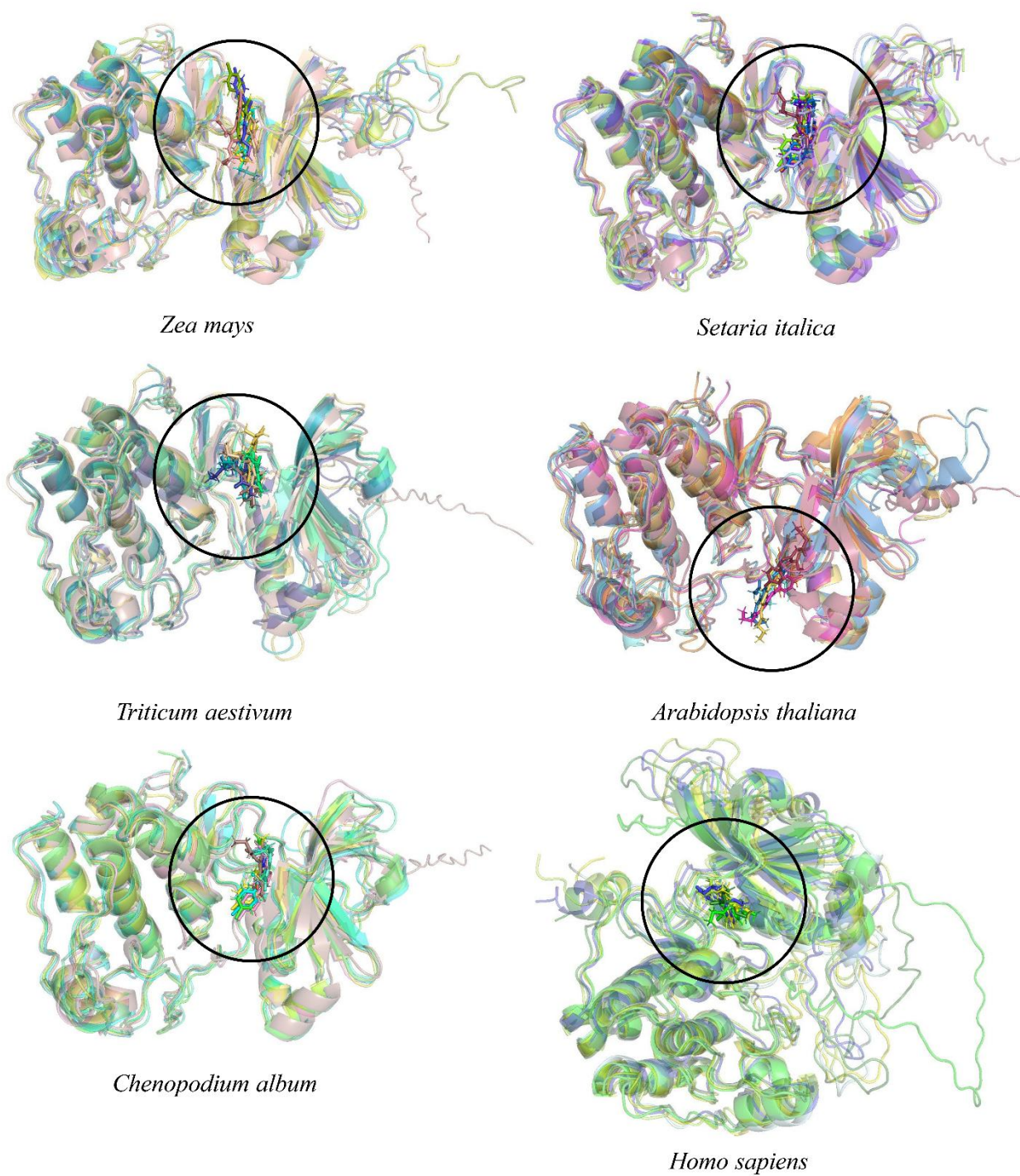


Рис. 3.1. Накладення різних знімків комплексів упродовж модельованого часового проміжку для конформаційного аналізу.

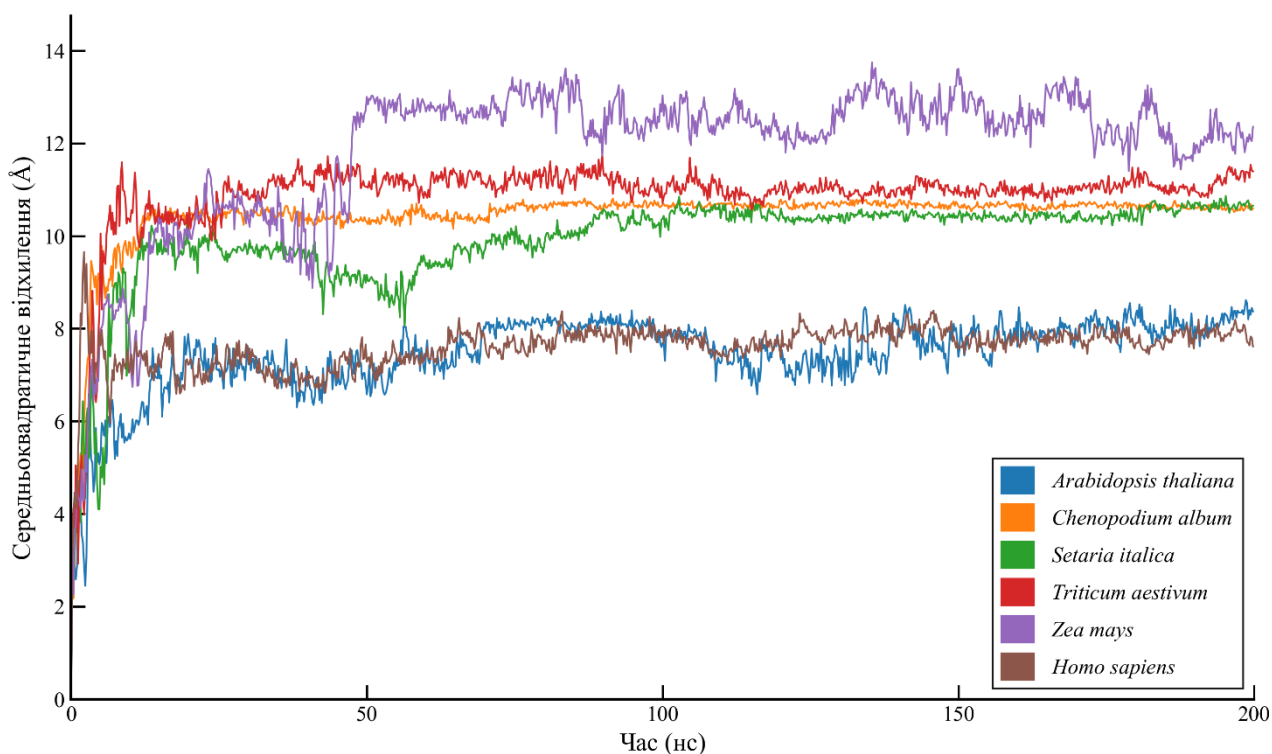


Рис. 3.2.1. Залежність середньоквадратичного відхилення (RMSD) C- α атомів поліпептидного ланцюга від часу.

Водночас оцінка просторового положення самого інгібітора за допомогою розрахунку RMSD важких атомів ліганда виявляє відмінну динаміку (рис. 3.2.2.). Найвищу позиційну стабільність демонструють молекули в комплексах із *Homo sapiens*, *Chenopodium album* та *Setaria italica*, їхні показники флуктуюють у вузькому діапазоні 5–6 Å. Проміжну стабільність зафіксовано для *Triticum aestivum* (6–8 Å). У комплексі з *Zea mays* після 100 нс моделювання спостерігається конформаційний зсув ліганда з підвищенням RMSD до 10–11 Å. Найбільшу нестабільність зв'язування виявлено для *Arabidopsis thaliana*: попри жорсткість білкового каркаса, значення RMSD ліганда стрімко зростає до 17–20 Å вже на початку симуляції. Це вказує на втрату інгібітором початкової орієнтації та його надмірну рухливість усередині каталітичної щілини цієї кінази.

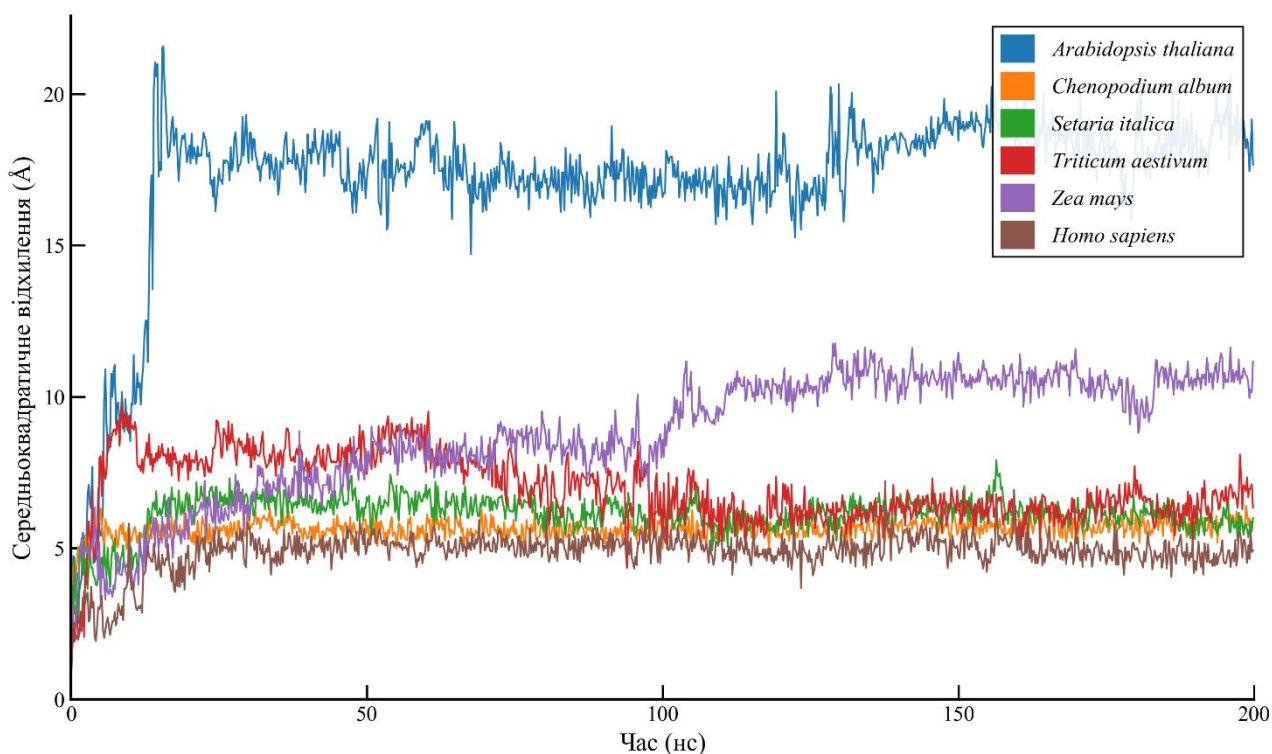


Рис. 3.2.2. Залежність середньоквадратичного відхилення (RMSD) важких атомів ліганда, розрахованого відносно головного ланцюга білка, від часу.

3.2. Динаміка формування та стабільність міжмолекулярних водневих зв'язків

Аналіз динаміки водневих зв'язків між інгібітором та мішенями протягом 200 нс моделювання виявляє суттєві видоспецифічні відмінності у стабільності полярних контактів (рис. 3.3.). Найвищу стабільність демонструють комплекси з *Chenopodium album*, *Setaria italica* та *Homo sapiens*, у яких майже всю траєкторію безперервно підтримується один водневий зв'язок. Для *Triticum aestivum* характерні високі флуктуації: від 0–1 зв'язку на початку до 1–3 одночасних контактів після 100 нс. Профіль взаємодії *Zea mays* є переривчастим — періоди наявності 1–2 зв'язків чергуються із тривалими проміжками (зокрема 120–160 нс) їхньої повної відсутності. Найнижчу здатність до утворення зв'язків виявлено в *Arabidopsis thaliana*, яка більшу частину часу демонструє лише поодинокі короточасні появи 1–2 контактів (рис. 3.3.). Отримані профілі повністю узгоджуються з термодинамічними даними: висока стабільність водневих

зв'язків корелює з найбільшою спорідненістю (*Chenopodium album*), тоді як їхня практична відсутність характерна для мішені з найнижчим показником вільної енергії зв'язування (*Arabidopsis thaliana*).

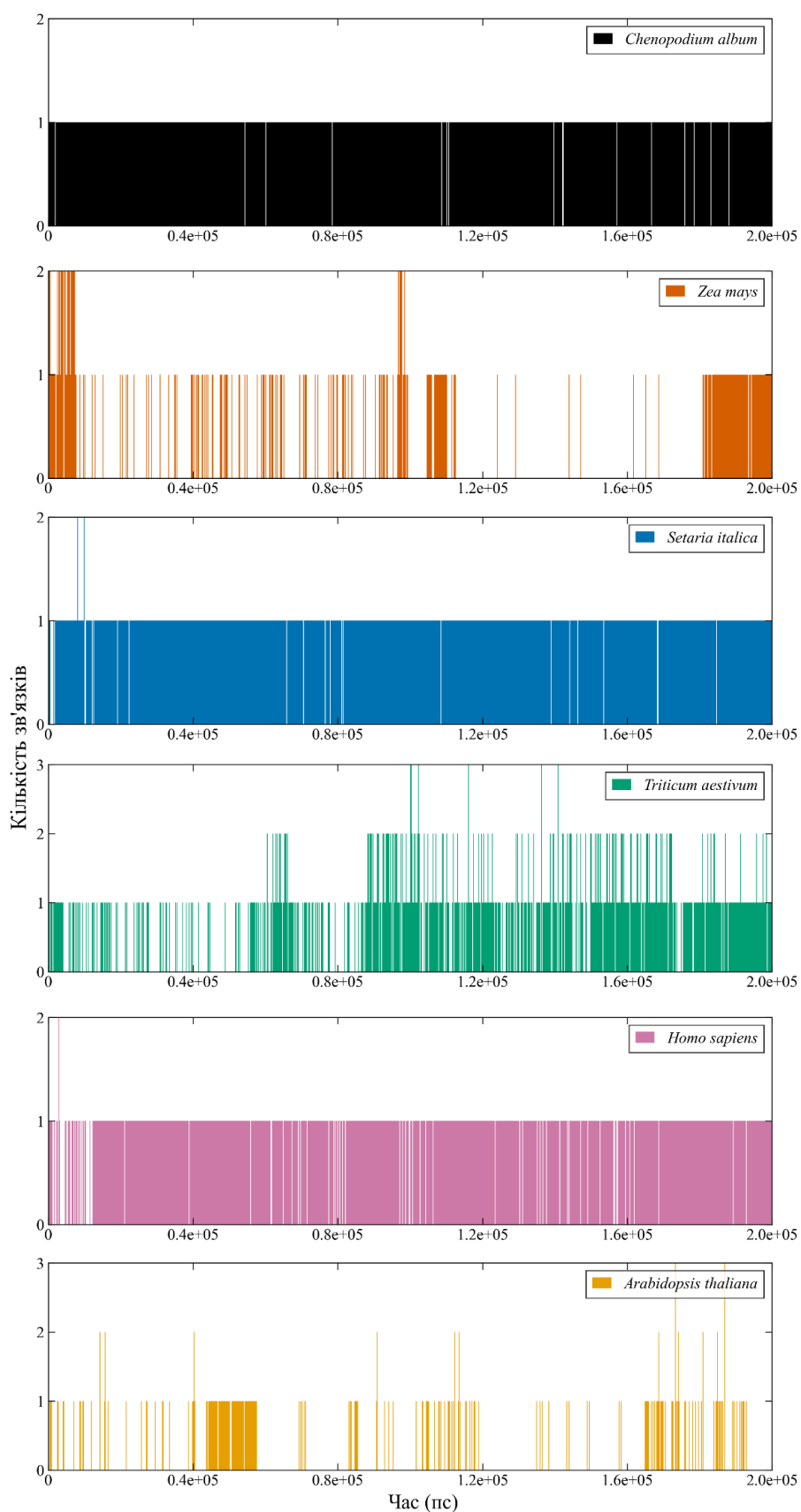


Рис. 3.3. Динаміка утворення водневих зв'язків.

Найстійкіші зв'язки формуються в комплексах із *Chenopodium album*, *Setaria italica* та *Homo sapiens* (таблиця 3.1.). У них час життя поодиноких контактів сягає 98.3% для Ala110 (*Chenopodium album*), 97% для Ala109 (*Setaria italica*) та 89.01% для Ala157 (*Homo sapiens*). Оптимальні донорно-акцепторні відстані (3.01–3.06 Å) та значення кутів (160.84°–162.81°) свідчать про високу міцність цих взаємодій.

Таблиця 3.1. Характеристика водневих зв'язків між лігандом та авроракіназами

Назва комплексу	Амінокислотний залишок	Відстань (Å)	Кут (°)	Час життя (%)
<i>Chenopodium album</i>	Ala110	3,01	162,35	98,3
<i>Zea mays</i>	Ala109	2,99	158,22	11,69
<i>Zea mays</i>	Leu35	3,32	139,96	6,69
<i>Setaria italica</i>	Ala109	3,04	162,81	97
<i>Triticum aestivum</i>	Gly111	3,39	147,36	22,28
<i>Triticum aestivum</i>	Gly111	3,24	155,89	19,88
<i>Triticum aestivum</i>	Leu34	3,17	145,44	17,28
<i>Homo sapiens</i>	Ala157	3,06	160,84	89,01
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gln75	2,96	157,13	6,69
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gln66	2,92	156,21	4,3

Комплекс із *Triticum aestivum* характеризується кількома лабільними зв'язками за участю залишків Gly111 (час життя 19.88–22.28%) і Leu34 (17.28%), для яких міжмолекулярні відстані збільшуються до 3.17–3.39 Å, а кути становлять 145.44°–155.89°. Найнижчу стабільність полярних контактів виявлено у *Zea mays* та *Arabidopsis thaliana*. Хоча окремі контакти мають короткі відстані (2.99 Å для Ala109 у *Zea mays* та 2.92 Å для Gln66 у *Arabidopsis thaliana*), їхній час життя мінімальний: 6.69–11.69% для *Zea mays* і 4.3–6.69% для *Arabidopsis thaliana* (таблиця 1). Ці показники доводять транзиторий характер полярних взаємодій у вказаних комплексах, що повністю узгоджується із загальною динамікою водневих зв'язків.

3.3. Термодинамічний профіль зв'язування інгібітора з кіназами

Аналіз термодинамічних показників свідчить, що головним чинником стабілізації комплексів інгібітора з кіназами є неполярні взаємодії (рис. 3.4., див. додаток А). Компонент енергії Ван-дер-Ваальса (ΔE_{vdw}) формує найбільший за модулем від'ємний внесок у загальну вільну енергію зв'язування (ΔG_{bind}) для всіх досліджуваних видів, змінюючись у межах від -27,55 до -41,89 ккал/моль. Натомість процес десольватації полярних груп діє як енергетичний бар'єр для зв'язування, на що вказують додатні значення полярної енергії сольватації (ΔE_{GB}) у діапазоні від 18,29 до 30,35 ккал/моль. У досліджуваних системах спостерігається компенсаційний ефект: енергетичний виграш від формування прямих електростатичних контактів (ΔE_{ele} від -4,07 до -17,99 ккал/моль) повністю нівелюється витратами на руйнування гідратної оболонки цих груп (ΔE_{GB}).

Водночас термодинамічні параметри виявляють структурну гетерогенність сайтів зв'язування мішеней. Значні відхилення значень ΔE_{ele} (від -14,31 до -17,99 ккал/моль) та ΔE_{GB} (від 25,35 до 30,35 ккал/моль) для видів *Zea mays* та *Triticum aestivum* свідчать про вищу полярність або наявність заряджених амінокислотних залишків у контактній зоні цих ферментів порівняно з іншими об'єктами, де ΔE_{ele} становить від -4,07 до -9,59 ккал/моль. Оскільки термодинамічна умова утворення комплексів виконується для всіх видів ($\Delta G_{bind} < 0$), прогнозована афінність інгібітора розподіляється нерівномірно відповідно до значень вільної енергії. Максимальна спорідненість очікується до кінази *Chenopodium album* ($\Delta G_{bind} = -33,61$ ккал/моль), проміжні значення зафіксовані для *Homo sapiens*, *Zea mays*, *Triticum aestivum* та *Setaria italica* (ΔG_{bind} від -23,13 до -27,35 ккал/моль), а мінімальна афінність прогнозується для комплексу з *Arabidopsis thaliana* ($\Delta G_{bind} = -19,86$ ккал/моль).

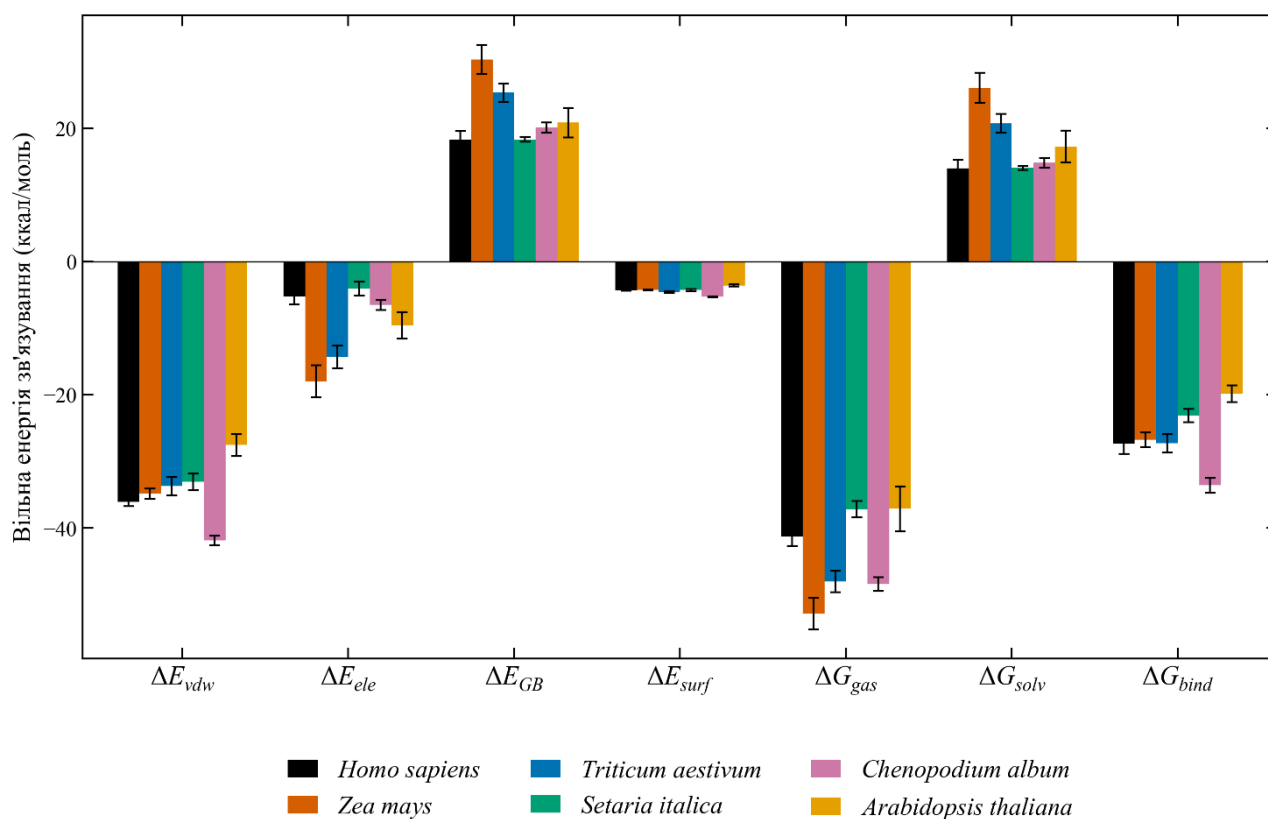


Рис. 3.4. Відносний внесок складових вільної енергії зв'язування для комплексів, розрахований за допомогою методу MM/PBSA.

3.4. Ідентифікація ключових амінокислотних залишків, що забезпечують селективність гербіциду

Декомпозиція вільної енергії зв'язування по амінокислотних залишках підтверджує, що стабілізація досліджуваних комплексів забезпечується переважно неполярними взаємодіями (рис. 3.5.). Аналіз енергетичних профілів ідентифікує від 3 до 6 ключових залишків для кожної мішені, індивідуальний енергетичний внесок яких перевищує -1 ккал/моль. Для кінази *Homo sapiens* основним стабілізуючим фактором є залишок L83 із внеском близько -3.5 ккал/моль, що доповнюється взаємодіями з V91 (-2.0 ккал/моль), G160 та L207. Види *Zea mays* та *Setaria italica* демонструють ідентичний патерн залучених залишків, де домінує взаємодія з L35 із внеском від -2.8 до -3.0 ккал/моль, а також беруть участь V43 (близько -1.8 ккал/моль), G112 і L159. Максимальну кількість енергетично вагомих контактів виявлено у комплексі з *Chenopodium album*, що

корелює з найвищою загальною спорідненістю цієї мішені. У цій системі стабілізація відбувається за участю залишків L36, V44, Y109, A110, L160 (-2.8 ккал/моль) та A170, значення енергії яких варіюють у межах від -1.5 до -2.8 ккал/моль. У структурі *Triticum aestivum* вільна енергія зв'язування розподілена між залишками L34, V42, H107, L158 (-2.0 ккал/моль) та A168. Енергетичний профіль *Arabidopsis thaliana* характеризується залученням масивних ароматичних та гідрофобних залишків F42 (-1.8 ккал/моль), V72 (-1.8 ккал/моль) та W175 (-2.2 ккал/моль). Отримані результати вказують на консервативність просторового розташування сайту зв'язування, де основна частка загальної вільної енергії генерується обмеженим кластером гідрофобних амінокислот.

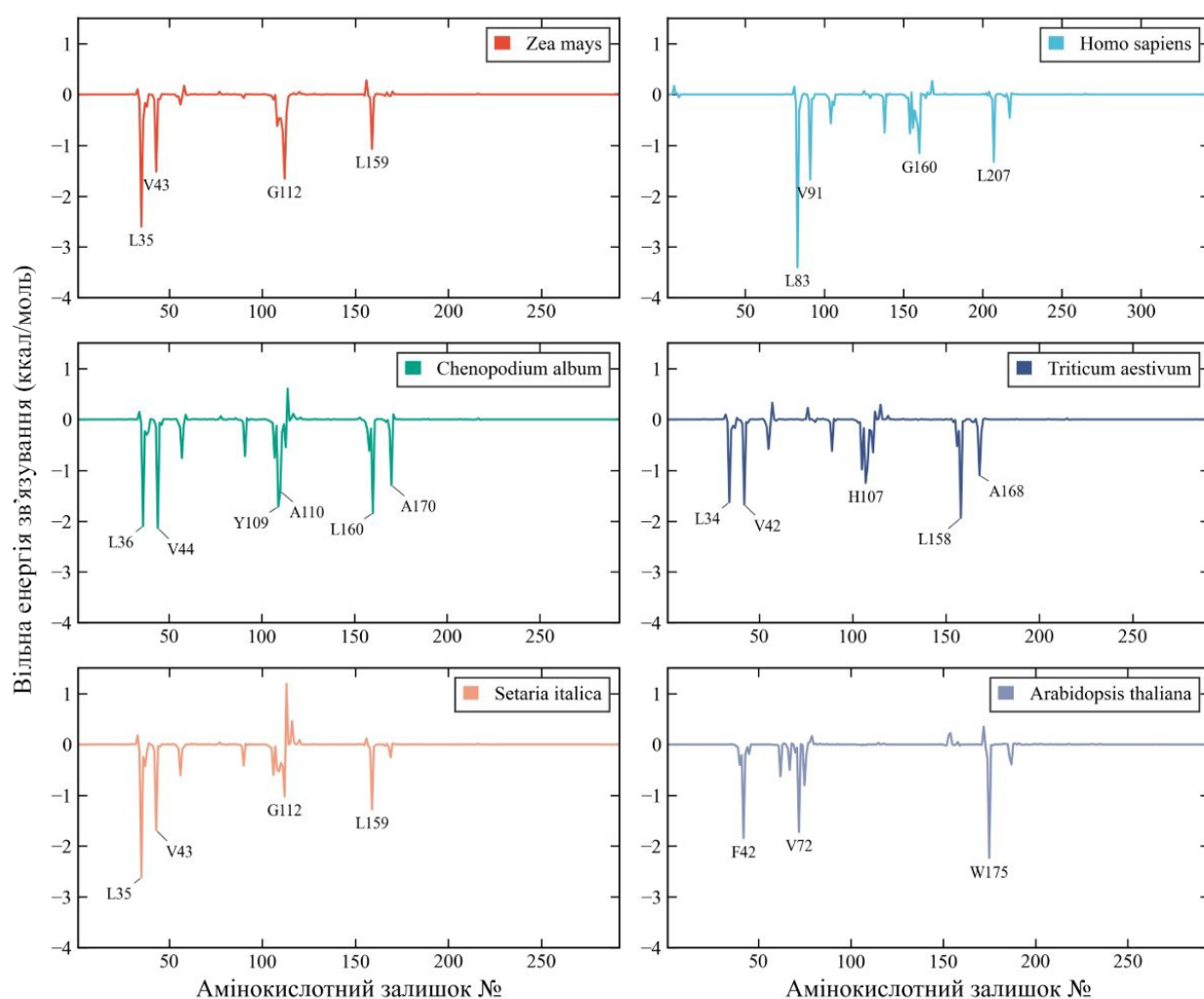


Рис. 3.5. Декомпозиція вільної енергії зв'язування інгібітора з кіназами по амінокислотних залишках. На графіках підписано ключові залишки, енергетичний внесок яких у взаємодію з лігандом є сильнішим за -1 ккал/моль.

Ці термодинамічні розрахунки підтверджуються візуальним просторовим аналізом репрезентативних конформацій комплексів (рис. 3.6).

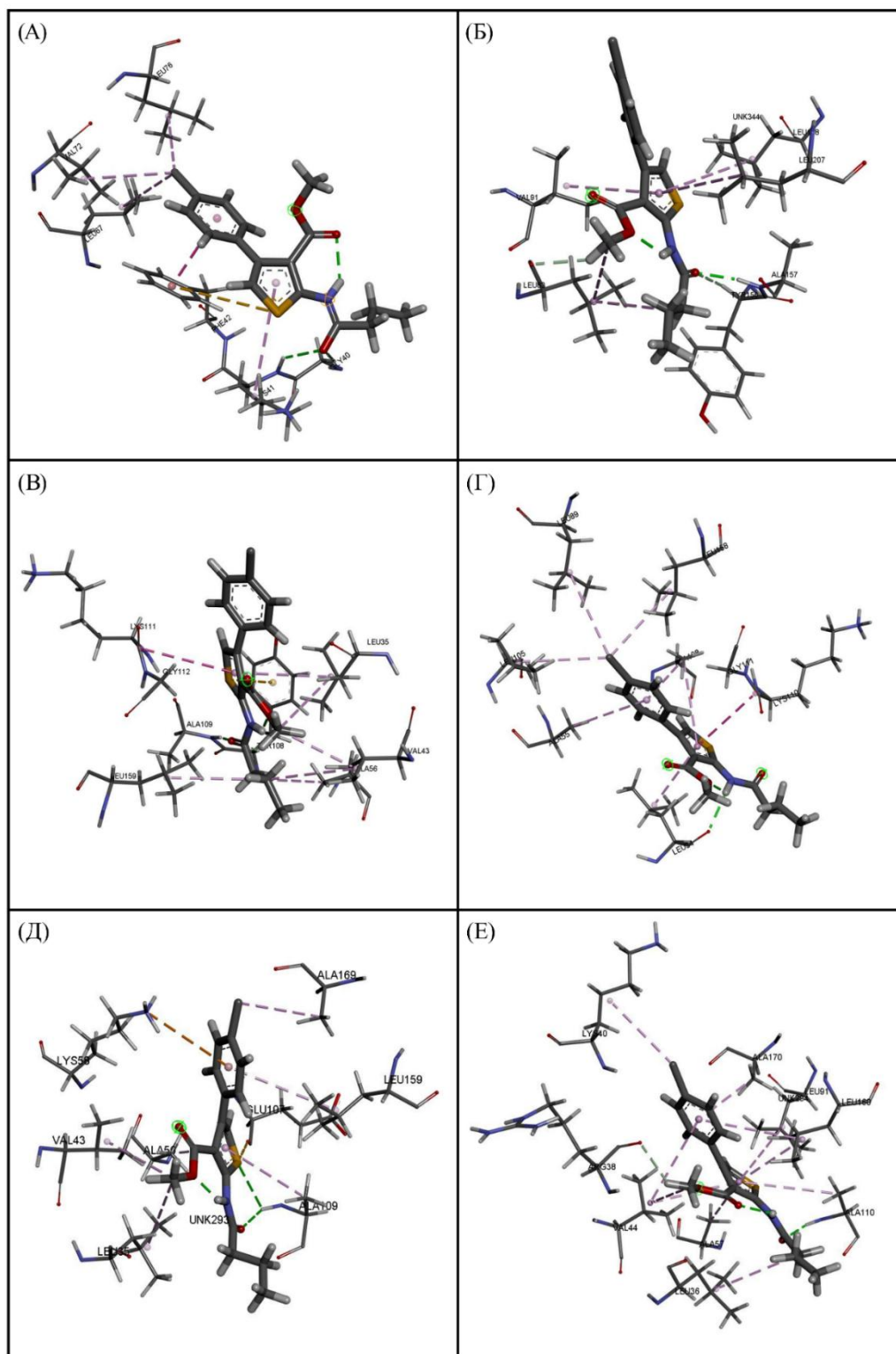


Рис. 3.6. Моді зв'язування ліганду з амінокислотними залишками ензиму, та його просторова орієнтація в каталітичній щілині. А – *Arabidopsis thaliana*, Б – *Homo sapiens*, В – *Zea mays*, Г – *Chenopodium album*, Д – *Setaria italica*, Е – *Triticum aestivum*

ВИСНОВКИ

1. Молекулярно-динамічне моделювання тривалістю 200 нс підтвердило стабільне утримування ліганда в АТФ-зв'язуючій кишені всіх досліджуваних аврора-кіназ. Динаміка ліганд-білкового інтерфейсу має видоспецифічний характер: комплекси з кіназами *Homo sapiens* та *Arabidopsis thaliana* утворюють конформаційно стабільні контакти з мінімальною амплітудою флуктуацій (~ 8 Å), тоді як у системі з *Zea mays* спостерігається значна рухливість ліганда відносно білкового каркаса (RMSD сягає 12–13 Å).
2. Основним термодинамічним чинником, що зумовлює стабілізацію комплексів, є неполярні ван-дер-ваальсові взаємодії, внесок яких становить від -27.55 до -41.89 ккал/моль. Електростатичний вииграш від формування прямих контактів повністю нівелюється полярною енергією сольватації, що визначає бар'єр десольватації як головний лімітуючий фактор загальної афінності ліганда.
3. Оцінка селективного потенціалу сполуки як гербіциду свідчить про її високу афінність до Аврора-кінази бур'яну *Chenopodium album*, що підтверджується максимальною термодинамічною афінністю ($\Delta G_{\text{bind}} = -33.61$ ккал/моль) та формуванням стабільного водневого зв'язку з залишком Ala110 із часом життя 98.3%. Взаємодія з кіназами сільськогосподарських культур (*Triticum aestivum* та *Zea mays*) виявляє проміжну спорідненість на рівні від -26.77 до -27.30 ккал/моль. Проте для комплексу з кукурудзою (*Zea mays*) характерна значна структурна рухливість поліпептидного ланцюга та транзиторийний характер полярних взаємодій (час життя водневих зв'язків не перевищує 11.69%), що може суттєво знижувати реальний інгібуючий ефект *in vivo* та забезпечувати природну толерантність культурної рослини до дії сполуки. Для іншого виду бур'яну, *Setaria italica*, афінність становить -23.13 ккал/моль за рахунок високої стабільності водневого зв'язку з залишком Ala109 (97%).
4. Декомпозиція вільної енергії зв'язування на рівні індивідуальних амінокислотних залишків підтвердила, що основна частка загальної афінності

обумовлюється обмеженим кластером гідрофобних амінокислот. Незважаючи на видові відмінності у первинній послідовності ензимів, просторове розташування ключових стабілізуючих залишків (переважно лейцину, валіну та аланіну) у каталітичній щілині залишається висококонсервативним. Індивідуальний енергетичний внесок цих залишків варіює в межах від -1.5 до -3.5 ккал/моль, що створює мікроструктурну гетерогенність АТФ-зв'язуючих кишень, що може бути визначальним фактором видоспецифічного розпізнавання ліганда.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kacan K., Tursun N., Ullah H., Datta A. Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.) resistance to acetolactate synthase-inhibiting and other herbicides in rice in Turkey. *Plant, Soil and Environment*. 2020. Vol.66, №7. P. 357–365. DOI: <https://doi.org/10.17221/92/2020-PSE>.
2. Lein W., Börnke F., Reindl A. та ін. Target-based discovery of novel herbicides. *Current Opinion in Plant Biology*. 2004.Vol.7, No. 2. P. 219–225. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.01.001>.
3. Sun H.-H., Wang Z.-Z., Gao Y.-Y., Yang G.-F. Protein Kinases as Potential Targets Contribute to the Development of Agrochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.2023.Vol.71,No.1.P.52–64.DOI:<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c06222>.
4. Demidov D. та ін. Altered expression of Aurora kinases in Arabidopsis results in aneu- and polyploidization. *The Plant Journal*. 2014. Vol. 80, No. 3. P. 449–461. DOI: <https://doi.org/10.1111/tpj.12647>.
5. Petrovská B., Cenklová V., Pochylová Z. та ін. Plant Aurora kinases play a role in maintenance of primary meristems and control of endoreduplication. *New Phytologist*. 2012. Vol. 193, No. 3. P. 590–604. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03989.x>.
6. Demidov D., Van Damme D., Geelen D. та ін. Identification and dynamics of two classes of aurora-like kinases in Arabidopsis and other plants. *The Plant Cell*. 2005. Vol. 17, No. 3. P. 836–848. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.104.029710>.
7. Weimer A. K., Demidov D., Lermontova I. та ін. Aurora Kinases Throughout Plant Development. *Trends in Plant Science*. 2016. Vol. 21, No. 1. P. 69–79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.10.001>.
8. Kawabe A., Matsunaga S., Nakagawa K. та ін. Characterization of plant Aurora kinases during mitosis. *Plant Molecular Biology*. 2005. Vol. 58, No. 1. P. 1–13. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11103-005-3454-x>.

9. Talele T. T., McLaughlin M. L. Molecular docking/dynamics studies of Aurora A kinase inhibitors. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2008. Vol. 26, No. 8. P. 1213–1222. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2007.11.003>.
10. Grossman M., Adler E. Protein Kinase Inhibitors - Selectivity or Toxicity? *IntechOpen*. 2021. DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.98640>.
11. Chiddarwar R. K., Rohrer S. G., Wolf A. та ін. In Silico Target Prediction for Elucidating the Mode of Action of Herbicides Including Prospective Validation. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2016. Vol. 67. P. 81–91. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2016.10.021>.
12. Djoumbou-Feunang Y., Wilmot J., Kinney J. та ін. Cheminformatics and artificial intelligence for accelerating agrochemical discovery. *Frontiers in Chemistry*. 2023. Vol. 11. P. 1292027. DOI: <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1292027>.
13. Carmena M., Earnshaw W. C. The cellular geography of aurora kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2003. Vol. 4, № 11. P. 842–854. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm1245>.
14. Brown J. R. та ін. Evolutionary relationships of Aurora kinases: implications for model organism studies and the development of anti-cancer drugs. *BMC Evolutionary Biology*. 2004. Vol. 4. P. 39. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-4-39>.
15. Willems E. та ін. The functional diversity of Aurora kinases. *Cell Division*. 2018. Vol. 13. P. 7. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13008-018-0040-6>.
16. Scapin G. Structural biology in drug design: selective protein kinase inhibitors. *Drug Discovery Today*. 2002. Vol. 7, No. 11. P. 601–611. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1359-6446\(02\)02290-0](https://doi.org/10.1016/s1359-6446(02)02290-0).
17. Alharthy R. D., Fatima G., Yousaf N. та ін. Binding selectivity analysis of AURKs inhibitors through molecular dynamics simulation studies. *PLoS ONE*. 2023. Vol. 18, № 12. P. e0295741. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0295741>.
18. de Groot C. O. та ін. A Cell Biologist's Field Guide to Aurora Kinase Inhibitors. *Frontiers in Oncology*. 2015. Vol. 5. P. 285. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00285>.

19. Deng X. та ін. *Arabidopsis* α -Aurora kinase plays a role in cytokinesis through regulating MAP65-3 association with microtubules at phragmoplast midzone. *Nature Communications*. 2024. Vol. 15. Art. number: 3779. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-48238-9>.
20. Dardick C., Chen J., Richter T. та ін. The rice kinase database. A phylogenomic database for the rice kinome. *Plant Physiology*. 2007. Vol. 143, No. 2. P. 579–586. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.106.087270>.
21. Iñiguez-Luna M. I., Cadena-Zamudio J. D., Ramirez-Mosqueda M. A. та ін. Molecular Docking as a Key Driver of Biocontrol for Agri-Food Security. *BioTech*. 2025. Vol. 14, № 4. P. 80. DOI: <https://doi.org/10.3390/biotech14040080>.
22. Grewal S. та ін. Molecular dynamics simulations: Insights into protein and protein ligand interactions. *Advances in Pharmacology*. 2025. Vol. 103. P. 139–162. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2025.01.007>.
23. Wan S., Bhati A. P., Zasada S. J., Coveney P. V. Rapid, accurate, precise and reproducible ligand–protein binding free energy prediction. *Interface Focus*. 2020. Vol. 10, No. 2. P. 20200007. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsfs.2020.0007>.
24. Shanmugam G., Jeon J. Computer-Aided Drug Discovery in Plant Pathology. *The Plant Pathology Journal*. 2017. Vol. 33, № 6. P. 529–542. DOI: <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.04.2017.0084>.
25. Pinzi L., Rastelli G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20, No. 18. P. 4331. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>.
26. Paggi J. M., Pandit A., Dror R. O. The Art and Science of Molecular Docking. *Annual Review of Biochemistry*. 2024. Vol. 93. P. 389–410. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-030222-120000>.
27. Liu K., Watanabe E., Kokubo H. Exploring the stability of ligand binding modes to proteins. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 2017. Vol. 31, No. 2. P. 201–211. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10822-016-0005-2>.

28. Agu P. C., Afiukwa C., Orji O. та ін. Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. *Scientific Reports*. 2023. Vol. 13. P. 13398. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40160-2>.
29. Barros E. P. та ін. Improving the Efficiency of Ligand-Binding Protein Design with Molecular Dynamics Simulations and Machine Learning. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2019. Vol. 15, № 10. P. 5703–5715. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00483>.
30. Zinovjev K., van der Kamp M. W. Molecular dynamics simulations of protein-ligand complexes. *Bioinformatics*. 2020. Vol. 36, № 20. P. 5104–5106. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa643>.
31. van der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A. E., Berendsen H. J. C. GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*. 2005. Vol. 26, No. 17. P. 1701–1718. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.20291>.
32. Abraham M. J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J. C., Hess B., Lindahl E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. 2015. Vol. 1–2. P. 19–25. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.
33. Jorgensen W. L., Maxwell D. S., Tirado-Rives J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *Journal of the American Chemical Society*. 1996. Vol. 118, No. 45. P. 11225–11236. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja9621760>.
34. Dodda L. S., Cabeza de Vaca I., Tirado-Rives J., Jorgensen W. L. LigParGen web server: an automatic OPLS-AA parameter generator for organic ligands. *Nucleic Acids Research*. 2017. Vol. 45, No. W1. P. W331–W336. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx312>.
35. Yamada S. Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K. *Journal of Physical Chemistry A*. 2001. Vol. 105, No. 43. P. 9954–9960. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp003020w>.

36. Darden T., York D., Pedersen L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *Journal of Chemical Physics*. 1993. Vol. 98, No. 12. P. 10089–10094. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.464913>.
37. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. Canonical sampling through velocity-rescaling. *Journal of Chemical Physics*. 2007. Vol. 126. P. 014101. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.2408420>.
38. Parrinello M., Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics*. 1981. Vol. 52, No. 11. P. 7182–7190. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.328693>.
39. Sieg J., Feldmann C. W., Hemmerich J., et al. MolPipeline: A Python package for processing molecules with RDKit in scikit-learn. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2024. Vol. 64, No. 14. P. 5440–5447. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.4c00863>.
40. Valdés-Tresanco M. S., Valdés-Tresanco M. E., Valiente P. A., Moreno E. gmx_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2021. Vol. 17, No. 10. P. 6281–6291. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00645>.

ДОДАТКИ

Додаток А. Афінність зв'язування інгібіторів з аврора-кіназами, розрахована за допомогою методу ММ/PBSA. Дані наведено в ккал/моль. SEM (Standard Error of Mean) – стандартна похибка.

	Arabidopsis thaliana		Chenopodium album		Setaria italica		Triticum aestivum		Zea mays		Homo sapiens	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
ΔE_{vdw}	-27,55	1,63	-41,89	0,71	-33,09	1,25	-33,73	1,39	-34,87	0,8	-36,12	0,64
ΔE_{ele}	-9,59	2	-6,53	0,77	-4,07	1,01	-14,31	1,71	-17,99	2,42	-5,2	1,28
ΔE_{GB}	20,87	2,22	20,11	0,76	18,31	0,36	25,35	1,38	30,35	2,19	18,29	1,33
ΔE_{surf}	-3,59	0,19	-5,3	0,06	-4,28	0,16	-4,6	0,14	-4,26	0,09	-4,31	0,1
ΔG_{gas}	-37,14	3,36	-48,42	1,02	-37,16	1,23	-48,05	1,59	-52,86	2,36	-41,32	1,42
ΔG_{solv}	17,28	2,37	14,81	0,74	14,03	0,3	20,75	1,4	26,09	2,24	13,97	1,33
ΔG_{bind}	-19,86	1,24	-33,61	1,15	-23,13	1,01	-27,3	1,4	-26,77	1,07	-27,35	1,54