



ИССЛЕДОВАНИЕ *IN SILICO* СТРУКТУРЫ АЛЬФА-АМИЛАЗЫ КОЛОРАДСКОГО ЖУКА И ЕЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ИНГИБИТОРАМИ

Цветков В.О.^{1*}, МаксUTOва В.О.¹, Яруллина Л.Г.^{1,2}

¹Башкирский государственный университет, Россия, 450076, Уфа, ул. Заки Валиди, 32

² Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, Проспект Октября, 71, *Email: zv347@yandex.ru

Резюме

Для разработки эффективных и экологически-безопасных методов защиты культурных растений от насекомых-вредителей необходимо знание структуры гидролаз фитофагов и механизмов их взаимодействия с ингибиторами растений. Целью данной работы являлось компьютерное моделирование пространственной структуры альфа-амилазы колорадского жука, анализ влияния выявленных особенностей структуры на взаимодействие с белковыми ингибиторами, а также моделирование взаимодействия с ингибиторами амилаз из различных организмов.

Методом компьютерного моделирования с использованием сервисов IntFOLD и NOMAD-Ref построена пространственная структура альфа-амилазы колорадского жука. Выявлено, что амилаза колорадского жука имеет отличия в структуре и физико-химических свойствах активного центра по сравнению с амилазой мучного хрущака, но не отличается в ходе главной цепи. Показано возможное влияние данных отличий на взаимодействие фермента с растительными ингибиторами – лектиноподобным ингибитором фасоли и ингибитором семейства RAI1. С использованием сервиса CABS-dock проведено моделирование взаимодействия амилазы колорадского жука с полипептидными ингибиторами амилаз из различных видов растений, бактерий и актиномицет. Среди полученных структур наилучшими значениями свободной энергии комплекса обладали ноттиноподобный ингибитор амаранта и пуротиониноподобный ингибитор овса, наименее благоприятным является связывание амилазы колорадского жука с ингибиторами актинобактерии *Thermopolyspora flexuosa* и водного растения *Alternanthera sessilis*. Модельная структура ноттиноподобного ингибитора в комплексе с амилазой колорадского жука, в сравнении с известной структурой комплекса с амилазой мучного хрущака, имеет сходную укладку цепи, но значительно отличающуюся конформацию. Полученные в ходе исследования данные могут быть использованы для поиска новых эффективных ингибиторов амилаз колорадского жука и разработки экологически-безопасных способов защиты картофеля от насекомых-вредителей, в том числе с использованием генетической трансформации растений.

Ключевые слова: альфа-амилаза; *Leptinotarsa decemlineata*; ингибиторы амилазы; моделирование структуры белка; пептид-белковые взаимодействия

Цитирование: Цветков В.О., МаксUTOва В.О., Яруллина Л.Г. Исследование *in silico* структуры альфа-амилазы колорадского жука и ее взаимодействия с ингибиторами // Биомика. 2020. Т.12(4). С. 442-448. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-35

© Авторы

IN SILICO STUDY OF THE COLORADO POTATO BEETLE ALPHA-AMYLASE STRUCTURE AND ITS INTERACTION WITH INHIBITORS

*Tsvetkov V.O.¹, Maksutova V.O.¹, Yarullina L.G.^{1,2}

¹Bashkir State University, 32 Zaki Validi Str., 450076, Ufa, Russia

² Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, 71 Prospekt Oktyabrya, 450054, Ufa, Russia, *Email: zv347@yandex.ru

Resume

To develop effective and environmentally friendly methods for protecting crop plants from pests, it is necessary to know the structure of pests hydrolases and the mechanisms of their interaction with plant inhibitors. The aim of this work was a modeling of the spatial structure of Colorado potato beetle alpha-amylase, analysis of the effect of revealed structural features on interaction with protein inhibitors, as well as modeling of interaction with amylase inhibitors from various organisms.

The spatial structure of the Colorado potato beetle alpha-amylase was obtained by the method of computer modeling using the IntFOLD and NOMAD-Ref services. Colorado potato beetle amylase differs in the structure and physicochemical properties of the active site in comparison with flour beetle amylase, but has the same conformation of the main chain. The possible effect of these differences on the interaction of the enzyme with plant inhibitors – a lectin-like bean inhibitor and a RATI inhibitor – was shown. The CABS-dock service was used to model the interaction of Colorado potato beetle amylase with polypeptide inhibitors of amylase from various plant species, bacteria, and actinomycetes. Among the structures obtained, the best values of complex free energy were possessed by the knottin-like inhibitor of amaranth and the purothionin-like inhibitor of oats; the least favorable is the binding with the inhibitors of the actinobacterium *Thermopolyspora flexuosa* and the aquatic plant *Alternanthera sessilis*. The model structure of a knottin-like inhibitor in a complex with Colorado potato beetle amylase, in comparison with the known structure of a complex with flour beetle amylase, has a similar chain folding, but significantly different conformation. The data obtained can be used to search for new effective pests' amylase inhibitors and environmentally friendly methods of protecting potato plants from insect pests, including using the genetic transformation of plants.

Keywords: alpha-amylase; *Leptinotarsa decemlineata*; amylase inhibitors; protein structure modeling; peptide-protein interactions

Citation: Tsvetkov V.O., Maksutova V.O., Yarullina L.G. In silico study of the Colorado potato beetle alpha-amylase structure and its interaction with inhibitors. *Biomcs*. 2020. Vol. 12(4). P. 442-448. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-35 (In Russian)

© The Authors

Введение

Одной из важнейших задач сельского хозяйства в настоящее время является повышение устойчивости растений к насекомым-вредителям. Важная роль во взаимодействии фитофага с растением на молекулярном уровне принадлежит гидролитическим ферментам, обеспечивающим расщепление и усвоение растительных полимеров, в частности, амилазам. Соответственно, одним из проявлений защитных реакций растений на нападение фитофага является синтез ингибиторов гидролаз. К настоящему времени описаны свойства значительного числа растительных ингибиторов – преимущественно ингибиторов протеаз, а также пектиназ, целлюлаз, амилаз [Tsvetkov, Yarullina, 2019], однако значительная часть гидролаз насекомых-фитофагов и их ингибиторов из тканей растений остаются неизученными. Получение информации о структуре гидролаз фитофагов и о механизмах их взаимодействия с ингибиторами растений будет способствовать развитию современных, эффективных

и экологически-безопасных подходов к защите культурных растений от насекомых-вредителей.

По причине малочисленности экспериментальных данных о пространственной структуре белков насекомых распространенным способом получения таких данных являются методы компьютерного моделирования [Seddigh, Darabi, 2016]. Метод моделирования по гомологии позволяет предсказать структуру белка с известной последовательностью, используя гомологичный белок с известной структурой в качестве "шаблона". Как следует из литературных данных, метод моделирования по гомологии может применяться при идентичности аминокислотного состава модели и шаблона не менее 30%, а для надежного предсказания структуры петель необходимо не менее 50% идентичности последовательностей [Xiang, 2006; Dalton, Jackson, 2007; Pearson, 2013]. С использованием данного метода были получены структуры ряда белков насекомых [Seddigh, Darabi, 2016], а также ферментов других организмов [Ubhayasekera, 2018].

Методы *in silico* в исследованиях белков насекомых используются также для поиска и создания новых пестицидов [Jitnom, 2014]. С использованием техник драг-дизайна разрабатываются высокоспецифичные ингибиторы ряда белков насекомых, которые в дальнейшем могут быть использованы как эффективные и экологически-безопасные пестициды.

Эффективным подходом в защите культурных растений от насекомых-вредителей представляется активация естественных защитных механизмов растительного организма [Rogozhin, 2018]. К таковым относится синтез ингибиторов гидролаз в растениях. Растительные ингибиторы гидролаз, как правило, представляют собой полипептиды с молекулярной массой от 3 до 23 кДа [Tsvetkov, Yarullina, 2019]. В последнее время также активно исследуются короткие антимикробные пептиды (SAMP – short antimicrobial peptides) – защитные соединения растений, обладающие, в числе прочего, антигидролитической активностью [Ryazantsev *et al.*, 2019].

Существующие в настоящее время методы белок-пептидного докинга позволяют моделировать взаимодействие белка с пептидами длиной до 30 аминокислотных остатков [Ciemny *et al.*, 2018; Agrawal *et al.*, 2019], что открывает возможность исследования взаимодействия ферментов насекомых с полипептидными ингибиторами.

В настоящей работе проведено компьютерное моделирование пространственной структуры альфа-амилазы колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say), анализ влияния выявленных особенностей структуры на взаимодействие с белковыми ингибиторами, а также моделирование взаимодействия с ингибиторами амилаз из различных организмов.

Методы исследования

Для поиска аминокислотных последовательностей амилаз и ингибиторов использовали сервис NCBI Entrez (Protein database) и NCBI BLAST. Для поиска пространственных структур использовали Protein Data Bank. Парное и множественное выравнивание последовательностей проводили с использованием сервисов EBI Needle, EBI Clustal Omega и NCBI COBALT.

Моделирование пространственной структуры амилазы колорадского жука проводили с использованием сервиса IntFOLD [Roche *et al.*, 2011]. Структуру модели с наивысшим показателем качества подвергали дополнительной оптимизации путем минимизации свободной энергии в программе NOMAD-Ref [Lindahl *et al.*, 2006].

Для анализа пространственных структур, взаимодействий между молекулами и вычисления

RMSD использовали программы Discovery Studio Viewer и JSmol.

Моделирование взаимодействия полипептидных ингибиторов с амилазой колорадского жука проводили для ингибиторов длиной от 30 до 196 аминокислотных остатков. Для поиска в последовательности ингибитора участка связывания с ферментом проводили множественное выравнивание последовательности ингибитора с гомологами, совпадающими с ингибитором по аминокислотному составу на 50-100% по результатам поиска в BLAST. Анализируя множественное выравнивание, в последовательности ингибитора выделяли консервативный участок длиной 30 аминокислотных остатков. Данный участок использовали как пептид для моделирования белок-пептидных взаимодействий в сервисе CABS-dock [Kurcinski *et al.*, 2020]. В качестве сайта связывания фермента указывали область вокруг остатка D253 с радиусом 5Å.

Результаты и обсуждение

В настоящее время в биологических банках данных содержится информация о последовательностях альфа-амилаз множества организмов, в том числе, колорадского жука. Известны пространственные структуры альфа-амилаз человека (PDB ID 1KBB), свиньи (1VAN) и бактерии *Pseudoalteromonas haloplanktis* (1KXH). Единственным представителем отряда Жесткокрылые, для которого известна пространственная структура альфа-амилазы, является мучной хрущак *Tenebrio molitor* (1VIV, разрешение 3Å). Альфа-амилазы колорадского жука и мучного хрущака совпадают по аминокислотному составу на 67%, что позволяет использовать метод моделирования по гомологии для предсказания структуры амилазы колорадского жука.

С использованием сервиса IntFOLD и структуры амилазы мучного хрущака (1VIW) была получена пространственная структура амилазы колорадского жука. RMSD C_α-атомов этих двух структур составило 0,4 Å. Полученную модель дополнительно оптимизировали в программе NOMAD-Ref; RMSD C_α-атомов оптимизированной и неоптимизированной структур составило 2Å. Расположение аминокислотных остатков активного центра амилаз колорадского жука и мучного хрущака также различалось на величину, не превышающую разрешения известной структуры (RMSD 1Å), однако амилаза колорадского жука имела отличия в аминокислотном составе активного центра (V62L, H65D, G258D, рис. 1).

```

KDNANFASGRNSIVHLEFEWKVNDIADECERFLQPQGFGGVQISPPNEYLVADGRPWERYQ
K+ NFA+GR++IVHLEFEWKV DIA+ECE FL P+GF GVQISPP+E V RPWWERYQ
KNNNFANGRSIAIVHLEFEWKVADIANECENFLGPKGFAGVQISPPSENAVIGDRPWERYQ

PVSYIINTRSGNESAFDTMTRRCNDAGVRIYVDVYVNTMGTQNGVGTSGSSADHDGMNYP
PVSYI+ TRSGNE DM RRCN GVRIYVD ++N M G GT+GS+ D +P
PVSYILTTRSGNEGELADMIRRCNAVGVRIYVDLNDMAAQGGSGTAGSTCDPGSKYFF

AVPYGSGDFHSPCEVNYYQDADNVRNCELVGLRDLNAGSDYVRGVLIDYMNHMIDLGVAG
AVPY S DFH C VNNY DA NVRNCELVGL DL+ D VR L+ Y+++IDLGVAG
AVPYNSSDDFHPTCTVNNYDAANVRNCELVGLRDLNAGSDYVRGVLIDYMNHMIDLGVAG

FRVDARKHMSPGDLSVIFDGLKNLNTDYGFDGARFFIYQSVYDLGGDAISKNEYTGFGC
FRVDARKHM P DL+ I+ KNLNTD+GFA+G+RFF +QVYDLGGDAISK EY GFG
FRVDARKHMPADLAAIYGMKNLNTDHGFAEGSRFFQVYDLGGDAISKKEYIGFGT

VLEFQFGVSLGNAFQGGNQLKNLANWGPWGLLEGLDAVVFVDNHNQRTGSSQILTYKN
VLEF+FGV LGNAFQG N L L NWGP WGLLE DAVVF+DNHNQR ++ILTYKN
VLEFQFGVSLGNAFQGHNAHLWLNWGPWGLLESGDAVVFIDNHNQRGDNRIILTYKN

PKPYKMAIAFMLAHPYGTTRIMS SDFDNDNQGGPPQDGSNGLISPGINDNTCSNGYVCE
PKPYK AIA+MLAHP TTRIMSSDFD +DQGGP +GN+ISPG N D TC+NG+VCE
PKPYKAAIAYMLAHPYGTTRIMS SDFDFAHQGGPPSS -NGNIISPGFNGDGTCTNGWVCE

HRWRQVYGMVGFRAVEGTQVENWNSNDNQIAFSRSGQGFVAFTNGGDLNQNLTGLPA
HRW Q+ MV FRN +GT + +WW N+DNQIAFSRG++GFVAFT GD+N + TGLPA
HRWHQITNMVKFRNVCGTGLNDWDDNDNQIAFSRGNKGFVAFTVSGDINTT IKTGLPA

GTYCDVISGELSGGSGCTGKSVTVGDNGSADISLGS AEDDGVLAIHVNAKL T. molitor
GTYCDVISG+ GSCTGKSV V +G A+SL S DD VLAIH +KL
GTYCDVISGDRNGSCTGKSVNVDSGSYASVLSLSSNGDDEVLAIHESK L. decemlineata
    
```

Рис. 1. Парное выравнивание последовательностей альфа-амилаз мучного хрущача (*Tenebrio molitor*) и колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*).

Выделены остатки активного центра.

Fig. 1. Pairwise sequence alignment of mealworm (*Tenebrio molitor*) and Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) alpha-amylases. Active site residues are highlighted.

Анализ известной структуры (1VIV) комплекса амилазы мучного хрущача с лектиноподобным ингибитором фасоли показал, что указанные различия могут быть причиной отличий во взаимодействии амилазы колорадского жука с данным ингибитором. Так, D258 амилазы колорадского жука может образовывать дополнительную водородную связь с остатками H73 или Y34 молекулы ингибитора. В то же время, замена H65D не должна оказывать влияния на взаимодействие с ингибитором, т.к. H65 амилазы мучного хрущача образует водородную связь с Y186 молекулы ингибитора, кроме того, возможно образование водородной связи между D151 амилазы и Y186 ингибитора (рис. 2а).

Подобным же образом, при взаимодействии с ингибитором семейства RATI остаток D258 амилазы колорадского жука может образовывать дополнительную водородную связь с остатками G509 или M510 молекулы ингибитора (по сравнению со структурой комплекса амилазы *Tenebrio molitor* и RATI, PDB ID 1TMQ, рис. 2б).

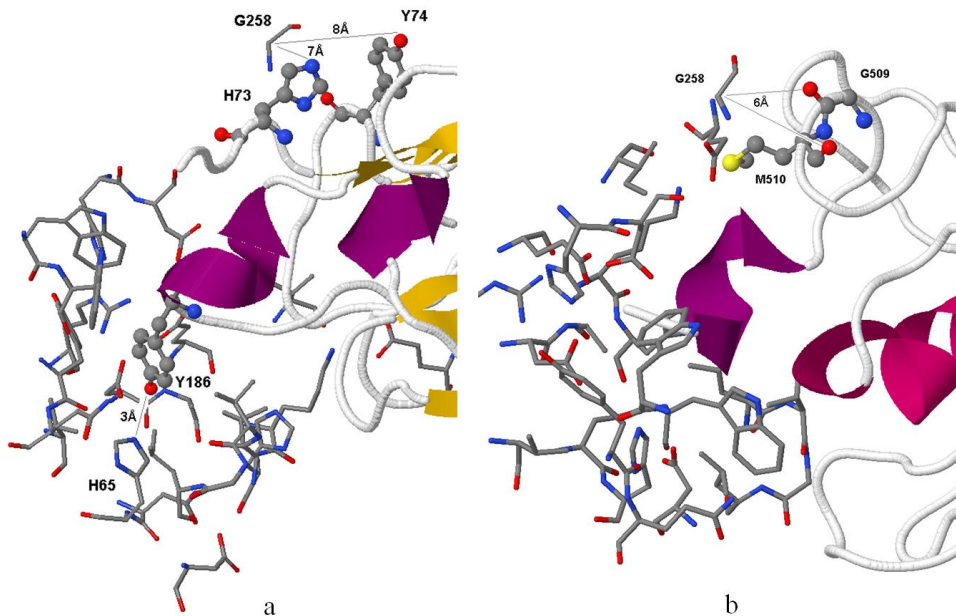


Рис. 2. Взаимодействие альфа-амилазы мучного хрущача с лектиноподобным ингибитором, PDB ID 1VIV (а), и ингибитором семейства RATI, PDB ID 1TMQ (б). Фрагмент молекулы ингибитора показан в виде «лент», остатки ингибитора – в шаростержневой модели, остатки активного центра фермента – в стержневой модели.

Fig. 2. Interaction of flour beetle alpha-amylase with a lectin-like inhibitor, PDB ID 1VIV (a), and with a RATI inhibitor, PDB ID 1TMQ (b). A fragment of the inhibitor molecule is shown in cartoons, the residues of the inhibitor – in ball and stick, the residues of the enzyme active center – in stick.

Таким образом, с использованием последовательности альфа-амилазы колорадского жука методом моделирования по гомологии нами получена пространственная структура данного фермента. В аналогичных исследованиях белков насекомых в качестве шаблонных структур для моделирования, как правило, используются белки млекопитающих или организмов других классов с известной структурой [Seddigh, Darabi, 2016]. Таксономическая близость колорадского жука и мучного хрущака и, как следствие, высокая идентичность последовательностей их амилаз позволяют считать полученную структуру достоверной. Выявленные отличия в физико-химических свойствах активных центров амилаз оказывают влияние на их взаимодействие с ингибиторами и, по-видимому, являются одним из факторов, определяющих пищевую избирательность насекомых-фитофагов.

В настоящее время в биологических банках данных имеется информация о последовательностях ряда ингибиторов амилаз растений, грибов, бактерий. Пространственная структура данных белков и пептидов,

как правило, неизвестна. Поиск и анализ гомологичных последовательностей, проведенный нами, показал, что некоторые ингибиторы (табл. 1) имеют относительно короткий (до 30-35 аминокислотных остатков) консервативный участок последовательности, тогда как остальные области являются высоковариабельными (при сравнении с гомологичными последовательностями, имеющими совпадение по аминокислотному составу не менее 50%). Это позволило сделать предположение, что именно данный короткий участок вовлечен в образование комплекса с ферментом. Данное предположение подтверждается и рядом экспериментальных данных, так, у ингибитора химотрипсина из клубней картофеля, состоящего из 51 аминокислоты, во взаимодействии с протеазой вовлечен короткий петлевой участок из 5 аминокислот (PDB ID 4SGB) [15].

Для выделенных консервативных последовательностей ингибиторов было проведено моделирование взаимодействия с амилазой колорадского жука с использованием сервиса пептид-белкового докинга CABS-dock (табл. 1).

Таблица 1.

Сведения о некоторых ингибиторах, условиях и результатах моделирования их взаимодействия с альфа-амилазой колорадского жука.

Table 1. Information about some inhibitors, conditions and results of their interaction with alpha-amylase of the Colorado potato beetle modeling.

Организм – источник ингибитора Source organism	NCBI Accession number	Длина Length	Номера остатков, использованных для моделирования Residues used for modelling	ΔG взаимодействия, кДж/моль Interaction ΔG , kJ/mol	ΔG комплекса, кДж/моль Complex ΔG , kJ/mol
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	P80403.1	32	3 – 32	-326,65	-2245,16
<i>Avena sativa</i>	0807220B	45	1 – 30	-343,4	-2230,25
<i>Allamanda cathartica</i>	AGN03149.1	30	1 – 30	-321,85	-2215,9
<i>Amycolatopsis saalfeldensis</i>	SEP08572.1	105	58 – 87	-319,6	-2213,34
<i>Arachis hypogaea</i>	QHN79992.1	196	120 – 149	-327,85	-2210,9
<i>Wrightia religiosa</i>	AHC03344.1	87	58 – 87	-364,55	-2205,61
<i>Alternanthera sessilis</i>	QMU24918.1	98	69 – 98	-313	-2190,3
<i>Thermopolyspora flexuosa</i>	TQM75845.1	113	61 – 90	-382,9	-2186,99

Среди полученных структур наилучшими значениями свободной энергии комплекса обладали ноттиноподобный ингибитор *Amaranthus hypochondriacus* и пуротиониноподобный ингибитор *Avena sativa*, наименее благоприятным является связывание с ингибиторами актинобактерии *Thermopolyspora flexuosa* и водного растения *Alternanthera sessilis*. В целом, наиболее эффективное связывание с альфа-амилазой колорадского жука демонстрируют ингибиторы растений, произрастающих в ареале обитания насекомого, что, по-видимому, является одним из проявлений коэволюции растений с насекомыми-фитофагами.

Для ноттиноподобного ингибитора амаранта известна структура комплекса с амилазой мучного хрущака (PDB ID 1CLV). Конформации ингибитора в комплексе с амилазой колорадского жука и с амилазой мучного хрущака (рис. 3) значительно различаются (RMSD 7Å), что может быть обусловлено, с одной стороны, ограниченностью модели, с другой – конформационной подвижностью взаимодействующих молекул и различиями в структурах ферментов. Следует также отметить сходную топологию укладки полипептидной цепи у обеих структур и расположение остатков цистеина, способствующее образованию дисульфидных связей.

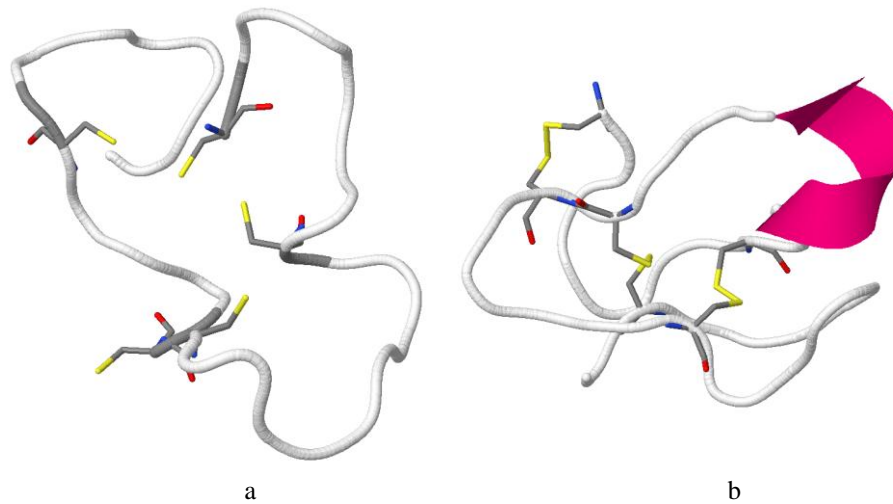


Рис. 3. Пространственная структура ноттиноподобного ингибитора амаранта, полученная в результате моделирования взаимодействия с альфа-амилазой колорадского жука (а). Структура того же ингибитора, полученная методом рентгеноструктурного анализа комплекса с амилазой мучного хрущака, PDB ID 1CLV (б). Показаны остатки цистеина.

Fig. 3. Spatial structure of a knottin-like inhibitor of amaranth, obtained by modeling the interaction with alpha-amylase of the Colorado potato beetle (a). The structure of the same inhibitor obtained by X-ray crystallography of the complex with flour beetle amylase, PDB ID 1CLV (b). Cysteine residues are shown.

Анализ известных экспериментально определенных структур ноттиноподобного ингибитора амилазы амаранта (PDB ID 1CLV, 1HTX, 1QFD) показал, что данный ингибитор способен проявлять высокую конформационную подвижность, изменяя не только конформацию главной цепи, но и набор и количество элементов вторичной структуры. По-видимому, именно этим объясняются наблюдаемые различия в пространственной структуре ингибитора в комплексе с амилазами колорадского жука и мучного хрущака.

Одним из подходов к поиску новых эффективных биопестицидов (PIP – plant-incorporated protectants) является поиск защитных соединений, синтезируемых различными культурными и дикорастущими растениями, причем дикие формы растений проявляют существенно больший уровень устойчивости к стрессам [Rogozhin, 2018]. Среди исследованных нами ингибиторов амилаз, ингибиторы амаранта и овса представляются наиболее перспективными с точки зрения разработки биопестицидов для защиты картофеля от колорадского жука. Результаты данного и подобных исследований могут быть использованы в качестве основы для поиска новых эффективных и специфичных ингибиторов гидролаз насекомых-вредителей и разработки экологически-безопасных методов защиты культурных растений.

References

1. Tsvetkov V.O., Yarullina L.G. Structural and Functional Characteristics of Hydrolytic Enzymes of Phytophagous Insects and Plant Protein Inhibitors (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2019. V. 55(5). P. 460–469. doi: 10.1134/S0003683819050156.
2. Seddigh S., Darabi M. Functional, structural, and phylogenetic analysis of mitochondrial cytochrome b (cytb) in insects. *Mitochondrial DNA Part A*. 2018. V. 29(2). P. 236-249. doi: 10.1080/24701394.2016.1275596.
3. Xiang Z. Advances in homology protein structure modeling. *Curr Protein Pept Sci*. 2006. V. 7(3). P. 217-227. doi: 10.2174/138920306777452312.
4. Dalton J.A.R., Jackson R.M. An evaluation of automated homology modelling methods at low target-template sequence similarity. *Bioinformatics*. 2007. V. 23(15). P. 1901–1908. doi: 10.1093/bioinformatics/btm262.
5. Pearson W.R. An introduction to sequence similarity ("homology") searching. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2013. Chapter 3. Unit 3.1. doi:10.1002/0471250953.bi0301s42.
6. Ubhayasekera W. Homology Modeling for Enzyme Design. *Methods Mol Biol*. 2018. V. 1796. P. 301-320. doi: 10.1007/978-1-4939-7877-9_21.
7. Jitonnom J. Computer-aided pesticide design: A short review. In book: *Short Views on Insect Biochemistry and Molecular Biology*. South India. 2014. P. 685-707.

8. Rogozhin E.A. Comparative structure-function analysis of defense proteins and peptides from wild and cultivated plants of compositae family: revelation of determinants providing a high resistance level to biotic stress factors. *The All-Russian Scientific Conference with International Participation and Schools of Young Scientists "Mechanisms of resistance of plants and microorganisms to unfavorable environmental"*. 2018. P. 670-673. doi: 10.31255/978-5-94797-319-8-670-673.
9. Ryazantsev D.Y., Rogozhin E.A., Tsvetkov V.O., Yarullina L.G., Smirnov A.N., Zavriev S.K. Diversity of Harpin-Like Defense Peptides from Barnyard Grass (*Echinochloa crusgalli* L.) Seeds. *Dokl Biochem Biophys.* 2019. V. 484(1). P. 6-8. doi: 10.1134/S1607672919010022.
10. Ciemny M., Kurcinski M., Kamel K., Kolinski A., Alam N., Schueler-Furman O., Kmiecik S. Protein-peptide docking: opportunities and challenges. *Drug Discovery Today.* 2018. V. 23(8). P. 1530-1537. doi: 10.1016/j.drudis.2018.05.006.
11. Agrawal P., Singh H., Srivastava H.K., Singh S., Kishore G., Raghava G.P.S. Benchmarking of different molecular docking methods for protein-peptide docking. *BMC Bioinformatics.* 2019. V. 19. Article number 426. doi: 10.1186/s12859-018-2449-y.
12. Roche D.B., Buenavista M.T., Tetchner S.J., McGuffin L.J. The IntFOLD server: an integrated web resource for protein fold recognition, 3D model quality assessment, intrinsic disorder prediction, domain prediction and ligand binding site prediction. *Nucleic Acids Research.* 2011. V. 39(suppl_2). P. W171–W176. doi: 10.1093/nar/gkr184.
13. Lindahl E., Azuara C., Koehl P., Delarue M. NOMAD-Ref: visualization, deformation and refinement of macromolecular structures based on all-atom normal mode analysis. *Nucleic Acids Research.* 2006. V. 34 (Web Server issue). P. W52-W56. doi: 10.1093/nar/gkl082.
14. Kurcinski M., Badaczewska-Dawid A., Kolinski M., Kolinski A., Kmiecik S. Flexible docking of peptides to proteins using CABS-dock. *Protein Science.* 2020. V. 29. P. 211-222. doi: 10.1002/pro.3771.
15. Greenblatt H.M., Ryan C.A., James M.N.G. Structure of the complex of *Streptomyces griseus* proteinase B and polypeptide chymotrypsin inhibitor-1 from Russet Burbank potato tubers at 2.1 Å resolution. *Journal of Molecular Biology.* 1989. V. 205(1). P. 201-228. doi: 10.1016/0022-2836(89)90376-8.