

УДК 579.69

Новая тест-система для скрининга ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ: конструкт *Escherichia coli* APHVIII/Pk25

О. Б. Беккер¹, М. Г. Алексеева¹, Д. И. Осолодкин², В. А. Палюлин², С. М. Елизаров³,
Н. С. Зефирова², В. Н. Даниленко^{1*}

¹ Учреждение Российской академии наук Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3

² Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3

³ Учреждение Российской академии наук Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33

*E-mail: valerid@rutenia.ru

Поступила в редакцию 28.06.2010 г.

РЕФЕРАТ Разработана оригинальная тест-система для скрининга ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ на основе штамма *Escherichia coli* APHVIII/Pk25. Фосфорилирование протеинкиназами фермента аминокликозидфосфотрансферазы VIII (APHVIII), инактивирующего аминокликозидные антибиотики, увеличивает устойчивость бактерий к антибиотику канамицину. Ингибиторы протеинкиназ, напротив, снижают устойчивость клеток бактерий к канамицину. Получены модификации APHVIII, в которых сайт фосфорилирования Ser-146, фосфорилируемый киназой Pk25, изменен в соответствии с канонической последовательностью аутофосфорилирования Pk25 *Streptomyces coelicolor*. Модифицированные и исходный гены *aphVIII* клонированы в *E. coli* одновременно с геном, кодирующим каталитический домен *pk25*. При экспрессии этих генов в клетках происходит накопление кодируемых ими белков. Выделенный каталитический домен Pk25 сохраняет киназную активность полноразмерной протеинкиназы. Варианты *E. coli*, содержащие одновременно гены *aphVIII* и *pk25*, более устойчивы к канамицину, чем варианты, несущие только ген *aphVIII*. Ингибиторы протеинкиназ класса индолилмалеимидов подавляют активность Pk25 и понижают устойчивость клеток к канамицину. Моделирование пространственных структур APHVIII и Pk25 показало, что фосфорилируемый в молекуле APHVIII Ser-146 является аналогом фосфосерина в области рибозного кармана протеинкиназ типа PKA, а структура Pk25 подобна структуре PknB *Mycobacterium tuberculosis*. Результаты докинга указывают на взаимодействие эффективных ингибиторов протеинкиназы Pk25 с АТФ-связывающей областью киназы. Разработанная оригинальная тест-система может быть использована для первичного отбора АТФ-конкурентных низкомолекулярных ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ бактерий и человека.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА серин-треониновые протеинкиназы, индолилмалеимиды, скрининг ингибиторов протеинкиназ, бактериальная тест-система, *Streptomyces*.

ВВЕДЕНИЕ

Серин-треониновые протеинкиназы (СТПК) – универсальные регуляторы клеточного метаболизма эукариот [1–3]. Им также принадлежат ключевые роли в контроле процессов апоптоза, пролиферации и дифференцировки клеток, транспорта веществ из клетки и др. Нарушение функционирования киназ ассоциировано с развитием многих заболеваний человека, таких, как диабет [4], шизофрения [5], сердечно-сосудистые расстройства [6], а также

с патологическими состояниями, например канцерогенезом [7] и нарушением иммунитета [8]. В последние десятилетия интенсивное развитие получил биоминьен-направленный поиск модуляторов (ингибиторов) протеинкиназ как потенциальных лекарственных препаратов нового поколения [9–11].

Серин-треониновые протеинкиназы эукариотического типа обнаружены у бактерий, включая патогенные для человека [12]. Установлено, что СТПК участвуют в формировании вирулентности, бакте-

риальных биопленок, поддержании толерантности, персистенции патогенных микроорганизмов. Показано ключевое значение СТПК в формировании вирулентности *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и ряда других патогенных бактерий [12–14]. Установлено их участие в модуляции устойчивости к антибиотикам у *M. tuberculosis* [15]. В последнее время ведется интенсивная работа по скринингу ингибиторов СТПК [16–19].

Ранее нами была разработана тест-система [20] для первичного скрининга (прескрининга) ингибиторов СТПК на основе сконструированного штамма *Streptomyces lividans* TK24 (66) АРНVIII+, ключевым элементом которой является фермент, инактивирующий аминогликозидные антибиотики, – аминогликозидфосфотрансфераза типа VIII (АРНVIII). Ген *aphVIII*, выделенный из генома *Streptomyces rimosus*, был клонирован и экспрессирован в *S. lividans* TK24 (66). Важной особенностью АРНVIII *S. rimosus* является зависимость активности фермента от уровня его фосфорилирования эндогенными СТПК [21]. Фосфорилирование фермента АРНVIII придает клеткам *Streptomyces* устойчивость к аминогликозидным антибиотикам. Ингибиторы СТПК препятствуют фосфорилированию и делают клетку более чувствительной к аминогликозидам [20]. Такая система изменения чувствительности клеток к аминогликозидам в присутствии ингибиторов СТПК позволяет вести первичный отбор ингибиторов этих СТПК. В геноме *S. coelicolor* A3(2) NC_003888, близкородственном штамму *S. lividans* TK24 (66) ACEY01000000, идентифицированы и аннотированы 34 СТПК. Как минимум одна из них – протеинкиназа Pk25 (код доступа NCBI Reference Sequence: Protein NP_628936.1) – способна фосфорилировать АРНVIII [22]. Для исключения неспецифического действия ингибиторов на другие СТПК *S. lividans* TK24 (66), предположительно способные фосфорилировать АРНVIII, сконструирована и описана в данной работе тест-система на основе фермента АРНVIII и каталитического домена протеинкиназы Pk25 в штамме *Escherichia coli*. Отсутствие в геноме *E. coli* собственных генов СТПК эукариотического типа делает тест-систему более чувствительной и позволяет отбирать ингибиторы, специфичные в отношении только Pk25 и ее близких гомологов [23].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы: *S. coelicolor* A3(2) (ВКПМ, г. Москва), *S. lividans* TK24 (66) АРНVIII+ (код доступа в GenBank ACEY01000000), *E. coli* DH5a: F⁻, Φ 80 ΔlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF), U169 (Promega); BL21(DE3): F⁻, dcm, ompT, hsdS(r_B⁻m_B⁻), galλ(DE3) (Novagen).

Плазмидные векторы: pET16b, pET22b и pET32a (Novagen).

Среды. Для выращивания штаммов *S. coelicolor* A3(2) и *S. lividans* TK24 (66) использовали среды YSP и YEME [24]. Для выращивания *E. coli* использовали среду Лурия (L-бульон), NZCYM, M9-среду с 1.5% глицерина (на 1 л): 6 г Na₂HPO₄, 3 г KН₂PO₄, 0.5 г NaCl, 1 г NH₄Cl, pH 7.4, 2 мл 1 М MgSO₄, 15 мл глицерина. Для обеспечения селективного роста плазмидсодержащих клеток добавляли ампициллин (100 мкг/мл). Для экспрессии белка использовали индуктор IPTG в концентрации 1 мМ.

Процедуры молекулярного клонирования. Выделение тотальной ДНК штаммов *S. coelicolor* A3(2) и *S. lividans* TK24 (66) АРНVIII проводили согласно руководству [24]. Выделение плазмидной ДНК, приготовление компетентной культуры *E. coli*, трансформацию и анализ рекомбинантных плазмид проводили с использованием стандартных методов [25]. Амплификацию ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили с использованием набора «Амплификация» фирмы “Dialat Ltd.” на приборе Терцик ТП4-ПЦР01 (ДНК-Технология). Температурный режим подбирали с учетом длины и состава праймеров. Олигонуклеотиды синтезированы фирмой «Синтол». Они представлены в табл. 1. Нуклеотидную последовательность ДНК определяли по методу Сэнгера. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Электрофорез белков проводили в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях как описано ранее [21]. Для этого клетки, содержащие сконструированные плазмиды, выращивали в жидкой среде NZCYM, содержащей ампициллин (150 мкг/мл) при 34°C до оптической плотности 0.6 (~1.5 ч), затем индуцировали экспрессию каталитического домена киназы добавлением IPTG до финальной концентрации 1 мМ. Далее проводили культивирование при 28°C в течение 4 ч, отбирали биомассу, которую суспендировали в буфере: 62.5 мМ Трис-НСl, pH 6.8; 5% глицерин; 2% меркаптоэтанол; 0.1% SDS; бромфеноловый синий. Клетки разрушали кипячением в течение 10 мин в буфере и анализировали белки электрофорезом в полиакриламидном геле. В ячейки геля вносили по 25 мкг суммарного белка фракции. Электрофореграммы белков сканировали на лазерном денситометре Ultrosan 2205 LKB. В качестве контроля использовали фракцию белков штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащего вектор без вставки.

Выделение белка клонированного в *E. coli* каталитического домена протеинкиназы Pk25. Клетки *E. coli* разрушали двукратной обработкой ультразвуком в буфере, содержащем 20 мМ Трис-НСl, pH

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе*

Название	Сайты рестрикции	Структуры праймеров 5'–3'
Pk25EN	EcoRI	ATCCGAATTATGGCACGGAAGATCGGCAG
Pk25C	HindIII	CCGCAAGCTTGGTGCCGTTGCCGGAACCG
Pk25CN	NdeI	TCGTCATATGCGTTACCGGCTCCATGAGCGGC
Pk25CC	HindIII	CCGCAAGCTTCATCCGCTGGGCCGACGCCG
Pk25NBgl	Bgl II	TTTTAGATCTAATAAGGAGATATACATGTACCGGCTCCATGAGCGGCT RBS начало кат. домена pk25
Pk25CBgl	Bgl II	CCG CAG ATC TAT CCG CTG GGC CGA CGC CGC
T7prom	—	TTAATACGACTCACTATAGG
T7term	—	CTAGTTATTGCTCAGCGG
APH 146-1(+)	—	GCTGTCGCTACAGGGACGGTCAGCTTGGAGGATCTGGAC
APH 146-1(-)	—	GTCCAGATCCTCCAAGCTGACCGTCCCTGTAGCGACAGC
APH 146-2(+)	—	GCTGTCGCTACAGGGAGCGTCACCTTGTTCGGATCTGGACGAG
APH 146-2(-)	—	CTCGTCCAGATCCGACAAGGTGACGCTCCCTGTAGCGACAGC
APH 146-T(+)	—	GTCGCTGAAGGGACCGTTCGACTTGGAG
APH 146-T(-)	—	CTCCAAGTCGACCGTCCCTTCAGCGAC
AphN	NdeI	TTTTCATATGGACGATGCGTTGCGTGC
AphC	BamHI	TTTTGGATCCTCAGAAGAAGTCTGCCAAC

*Сайты узнавания рестриктазами выделены жирным шрифтом, нуклеотидные замены – однократным подчеркиванием.

7.8, 10 мМ 2-меркаптоэтанола, 300 мМ NaCl и 1 мМ ФМСФ, или в этом же буфере, содержащем дополнительно 8 М мочевины. Нерастворимый материал удаляли центрифугированием при 20000 *g* в течение 20 мин. Фракции растворенных белков *E. coli* наносили на колонки с Ni-NTA-агарозой (Qiagen), интенсивно промывали смолу буфером того же состава, содержащим дополнительно 50 мМ имидазола, pH 6.0, и элюировали адсорбированный белок, пропуская через колонки соответствующий буфер (без мочевины – для нативного растворимого белка и с мочевиной – для денатурированного нерастворимого белка) с градиентом концентрации имидазола 0.05–0.5 М [20]. Белки в элюате анализировали SDS-PAGE.

Анализ аутофосфорилирования выделенного белка каталитического домена Pk25 *in situ* проводили после разделения выделенного белка электрофорезом в денатурирующих условиях. Для ренатурации протеинкиназы в геле использовали процедуру Камешита и Фуджисава [26]. Гель с включенным в него белком интенсивно промывали для удаления SDS 50 мМ Трис-НСl, pH 7.8 с 25% 2-пропанолом и 8 М мочевиной. Далее проводили ренатурацию белка, удаляя денатуранты промыванием геля последовательно буферами А: 50 мМ Трис-НСl, pH 7.8, и Б: 50 мМ Трис-НСl, pH 7.8, 100 мМ NaCl, 6 мМ 2-меркаптоэтанола, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ CaCl₂. Затем гель инкубировали в присутствии 50 мкКи/мл [γ -³²P]АТФ

(7000 Ки/мМ, «Фосфор», РФ) в буфере Б для анализа протеинкиназной активности [21]. Белок в геле фиксировали и окрашивали в 40% ТХУ, отмывали от ТХУ и непрореагировавшей метки 5% уксусной кислотой, высушивали и ауторадиографировали, экспонируя с рентгеновской пленкой Kodak X-Omat AR.

Процедура клонирования в экспрессионные векторы pET32a, pET22b и pET16b. Клонирование гена протеинкиназы *pk25* штамма *S. coelicolor* A3(2) и аналогичного гена штамма *S. lividans* TK24 (66) в *E. coli* проводили в составе экспрессионного вектора pET32a по сайтам EcoRI и HindIII (праймеры Pk25EN и Pk25C) (табл. 1). Клонирование каталитического домена протеинкиназы *pk25* штамма *S. coelicolor* A3(2) в *E. coli* проводили в составе экспрессионного вектора pET22b по сайтам NdeI и HindIII (праймеры Pk25CN и Pk25CC). Клонирование модифицированного гена *aphVIII* в *E. coli* осуществляли в составе экспрессионного вектора pET16b по сайтам NdeI и XhoI (праймеры AphN и AphC). Клонирование каталитического домена протеинкиназы *pk25* штамма *S. coelicolor* A3(2) в *E. coli* осуществляли в составе экспрессионных векторов pET16b + *aphVIII146-S* с немодифицированным сайтом фосфорилирования APHVIII, pET16b + *aphVIII146-1*, pET16b + *aphVIII146-2*, pET16b + *aphVIII146-3* – с модифицированными сайтами по рестрикционному сайту BamHI (праймеры Pk25NBgl и Pk25CBgl).

Клонирование нуклеотидной последовательности каталитического домена протеинкиназы *pk25* проводили в составе экспрессионного вектора pET22b по сайтам NdeI–HindIII (праймеры Pk25CN, гомологичный N-концевой области каталитического домена, и Pk25CC, гомологичный C-концевой области каталитического домена). Для наработки фрагмента проводилась амплификация с тотальной ДНК *S. coelicolor*. Фрагмент ДНК, соответствующий каталитическому домену гена протеинкиназы *pk25*, препаративно выделяли из агарозного геля, секвенировали и клонировали в составе плазмиды pET22b по сайтам эндонуклеаз рестрикции NdeI и HindIII. Полученной лигазной смесью трансформировали штамм *E. coli* DH5a. Скрининг рекомбинантных клонов осуществляли при помощи ПЦР с использованием стандартных праймеров T7prom и T7term. Из отобранных трансформантов выделяли плазмидные ДНК и проводили повторное секвенирование или рестрикционный анализ гибридных плазмид на наличие вставки. Далее полученными плазмидами pET22b-*pk25* трансформировали штамм *E. coli* BL21(DE3).

Сайт-направленный мутагенез области Ser-146 аминокликозидфосфотрансферазы APHVIII. Для проведения сайт-направленного мутагенеза использован метод точковых мутаций Нельсона [27]. Для получения мутантного варианта 1 (аминокислотные замены: Ser-146→Thr-146, Glu-144→Thr-144, Asp-148→Ser-148) синтезированы праймеры APH 146-1(+) и APH 146-1(-) (табл. 1), предусматривающие данные замены. Для получения мутантного варианта 2 (замены Glu-144→Thr-144, Asp-148→Ser-148, Glu-150→Ser-150) синтезированы праймеры APH146-2(+) и APH146-2(-). Вариант 3 представляет собой замену Ser-146→Thr-146, проведенную с помощью синтезированных праймеров APH146-T(+) и APH146-T(-).

В качестве внешних праймеров использовались AphN и AphC, соответствующие 5'- и 3'-концевым фрагментам структурной части гена *aphVIII*.

Полученные в результате проведенного мутагенеза фрагменты секвенировали для подтверждения соответствующих нуклеотидных замен, после чего клонировали в составе мультикопийного вектора pET16b под контроль транскрипционного и трансляционного сигналов бактериофага T7 в рамке считывания с ATG экспрессионного участка по сайтам эндонуклеаз рестрикции NdeI и BamHI с последующей трансформацией штамма *E. coli* DH5a. Скрининг рекомбинантных клонов осуществляли при помощи ПЦР с использованием праймеров T7prom и T7term. Из отобранных трансформантов выделяли плазмидные ДНК и ресеквенировали полученные мутантные гены.

Определение уровня устойчивости к канамицину отобранных трансформантов *E. coli* BL21(DE3).

Для анализа использовали клоны трансформантов *E. coli* BL21(DE3), содержащие гены исходной либо модифицированной *aphVIII* или *aphVIII* и *pk25* в составе вектора pET16b. С помощью репликатора клоны трансформантов, устойчивые к ампициллину в концентрации 100 мкг/мл, переносили на чашки Петри с LB-средой, содержащей различные концентрации аминокликозидного антибиотика канамицина и индуктор IPTG, и фиксировали рост колоний через 25 ч культивирования при 37°C.

Определение активности ингибиторов протеинкиназ на бактериальной тест-системе. Для определения активности ингибиторов использовался метод бумажных дисков. Методика заключалась в определении величины зоны подавления роста штамма, засеянного газонем на агаризованной среде, вокруг бумажных дисков, содержащих антибиотик или антибиотик в сочетании с ингибиторами серинтреониновых протеинкиназ. Тест-система: *E. coli* BL21(DE3)APHVIII/Pk25. Бактерии, выращенные на агаризованной LB-среде с ампициллином, смывали в жидкую LB-среду и выращивали в течение ночи при 37°C. Клетки центрифугировали (4000 об/мин, 10 мин). Осадок ресуспендировали в жидкой среде M9. Бактериальную суспензию смешивали с содержащей ампициллин и индуктор IPTG расплавленной агаризованной средой M9, в соотношении 1 : 1 (v/v) и заливали полученной смесью чашки Петри с агаризованной средой M9 с ампициллином и IPTG. Ампициллин необходим для поддержания плазмиды в штаммах *E. coli*. На поверхность агара накладывали бумажные диски, содержащие антибиотик канамицин или антибиотик и ингибитор протеинкиназ. Культуру инкубировали в течение 16 ч при 37°C.

Моделирование структуры каталитического домена Pk25. В качестве шаблонов для построения модели структуры каталитического домена Pk25 были использованы рентгеноструктурные данные по киназе PknB *M. tuberculosis* (коды доступа в банке белковых структур PDB [28]: 1MRU [29], 1O6Y [30], 2FUM [31], 3F61 [32], 3F69 [32]). Аминокислотные последовательности шаблонных белков были извлечены непосредственно из структурных файлов, последовательность Pk25 *S. coelicolor* A3(2) была получена из GenBank (код доступа 21223157 [33]); аннотирование каталитического домена было осуществлено на основании гомологии. Выравнивание аминокислотных последовательностей осуществляли с помощью программы ClustalX 2.0.11 [34]. Моделирование осуществляли с помощью программы Modeller 9v5 [35]. Генерировали 35 различных моделей каталитических доменов, каждую из которых оптимизировали методом моделирования отжига. Лучшую модель выбирали на основе оценочной функции DOPE,

реализованной в Modeller, и валидации программой PROCHECK [36]. Дальнейшую оптимизацию модели проводили в программном комплексе SYBYL 8.0 [37]: к моделям добавляли все требуемые атомы водорода и проводили 150 шагов минимизации энергии в силовом поле Tripos [38] методом Пауэлла.

Моделирование структуры каталитического домена АРНVIII. Для моделирования структуры каталитического домена аминокликозидфосфотрансферазы VIII дикого типа и ее мутантных вариантов была использована структура комплекса наиболее гомологичного белка АРН(3')-IIa (код доступа 1ND4 [39], идентичность аминокислотной последовательности 36%) с канамицином. Методология моделирования аналогична описанной выше за тем исключением, что в каждом случае строили 50 моделей.

Докинг ингибиторов в модель структуры киназы Pk25 проводили с использованием программы Autodock 4.1 [40]. Структуры ингибиторов были сгенерированы с помощью средств программного комплекса SYBYL 8.0 и оптимизированы в силовом поле MMFF94 [41]. Подготовку к докингу осуществляли в программном комплексе MGLTools 1.5.4 [42] в соответствии с общепринятыми рекомендациями. Построение решеточных полей и докинг осуществляли с использованием параметров по умолчанию; расположение решетки для расчета потенциала лиганд-рецепторного взаимодействия выбирали таким образом, чтобы она включала в себя все важнейшие аминокислотные остатки области связывания АТФ. При докинге каждого лиганда поиск с помощью генетического алгоритма запускали 100 раз; результаты докинга группировали в кластеры, используя пороговое значение среднеквадратичного отклонения, равное 2.0 Å. Анализ результатов докинга проводили с помощью MGLTools 1.5.4.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клонирование и сравнение полноразмерного гена серин-треониновой протеинкиназы *pK25 S. coelicolor* и *pK25 S. lividans*

В секвенированной нуклеотидной последовательности генома *S. lividans* TK24 ACEY01000000 ген протеинкиназы, гомологичный гену *pK25 S. coelicolor* на 99.8%, отличается шестью нуклеотидами, в том числе содержит вставку – С(664). Наличие вставки ведет за собой сдвиг рамки считывания в аминокислотной последовательности каталитического домена. Для сравнения интересующих нас протеинкиназ, имеющих в нашей коллекции штаммов *S. coelicolor* A3(2) и *S. lividans* TK24 (66), было проведено клонирование и секвенирование генов этих протеинкиназ. Для выделения генов *pK25* серин-треониновых протеинкиназ из геномов *S. coelicolor* и *S. lividans* были

синтезированы два олигонуклеотида (Pk25EN, гомологичный проксимальной (N-концевой) области значащей части цепи гена; Pk25C, комплементарный дистальной части (C-концевой) значащей цепи гена), содержащие в своем составе сайты рестрикции HindIII и EcoRI (табл. 1). В результате амплификации с тотальной ДНК *S. coelicolor* и *S. lividans* были наработаны заданные ДНК-фрагменты и клонированы в составе экспрессионного вектора pET32a по сайтам эндонуклеаз рестрикции HindIII и EcoRI в штамм *E. coli* DH5a. Секвенированием и анализом ДНК-фрагментов их идентифицировали как *pK25*. При сравнении генов *S. coelicolor* и *S. lividans* найдены нуклеотидные замены в позициях 123, 237, 279, 435, 963 от первого кодона atg структурной области гена *pK25 S. lividans*. Данные замены не приводят к заменам аминокислот в белковой последовательности. Таким образом, аминокислотные последовательности полноразмерного продукта гена *pK25 S. coelicolor* и *S. lividans* являются идентичными.

Клонирование и экспрессия нуклеотидной последовательности каталитического домена протеинкиназы Pk25 штамма *S. coelicolor* в экспрессионный вектор pET22b

Для клонирования были синтезированы два олигонуклеотида (Pk25CN, Pk25CC), которые содержали в своем составе сайты для рестриктаз NdeI и HindIII (табл. 1). Полученный в результате амплификации фрагмент рестрицировали и клонировали в *E. coli* DH5a в составе экспрессионного вектора pET22b. После ресеквенирования сконструированными векторами трансформировали экспрессионный штамм *E. coli* BL21(DE3).

Для изучения экспрессии нуклеотидной последовательности каталитического домена протеинкиназы в клетках отобранных трансформантов *E. coli* проводили гель-электрофорез растворимой фракции клеточных белков в денатурирующих условиях. В качестве контроля использовали фракцию белков из клеток штамма *E. coli* BL21(DE3) pET22b. В клетках *E. coli*, содержащих плазмиду pET22b-Pk25 с последовательностью каталитического домена *pK25*, наблюдалась единственная по сравнению с контрольными клетками (клетки *E. coli*, содержащие плазмиду pET22b, но без последовательности каталитического домена *pK25*) дополнительная фракция белка с молекулярной массой около 28 кДа (рис. 1a). Эта величина соответствует расчетной молекулярной массе (27.8 кДа) каталитического домена протеинкиназы Pk25 штамма *S. coelicolor* A3(2). По данным сканирования, содержание белка в дополнительной фракции составляет до 3.5% от суммарного белка.

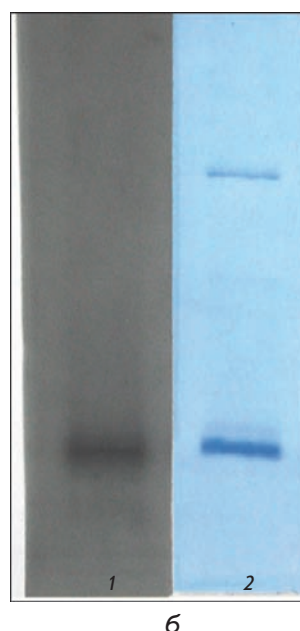
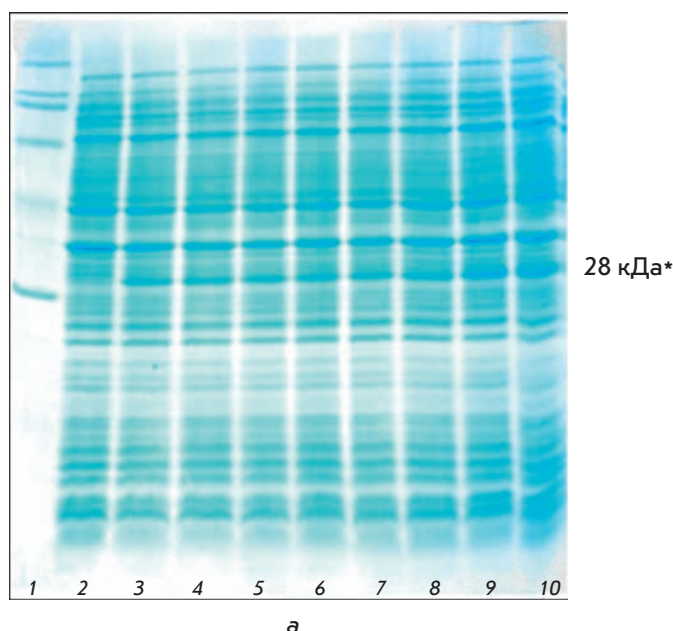


Рис. 1. а – Электрофорез растворимой фракции белков штамма *E. coli* BL21(DE3). 1 – маркеры, 2 – контроль (фракция белков из клеток штамма *E. coli* BL21(DE3) pET22b), 3–10 – клоны *E. coli*, содержащие плазмиду pET22b-pk25. (* – белковая фракция, соответствующая каталитическому домену Pk25). б – Электрофорез изолированного каталитического домена Pk25 *S. coelicolor* в полиакриламидном геле. 1 – ауторадиограмма самофосфорилированного в геле каталитического домена, 2 – окраска Кумасси.

Моделирование пространственной структуры каталитического домена Pk25

Основные структурные особенности киназы Pk25 отражены в модели. Модель близка к структуре шаблона PknB *M. tuberculosis* в силу значительной степени идентичности последовательностей (рис. 2а). Суммарный заряд аминокислот каталитического домена равен -3. Наиболее заметные различия между структурами модели и шаблона наблюдаются в области спирали С (вставка четырех аминокислотных остатков в Pk25), в петле между фрагментами β4 и β5 (делеция четырех аминокислотных остатков в Pk25) и в области спирали η3 (делеция пяти аминокислотных остатков в Pk25). Конформация активационной петли отличается от шаблона вследствие высокой подвижности петли. Тем не менее, указанные различия не влияют на конформацию аминокислотных остатков в центре связывания АТФ. Пять аминокислотных остатков АТФ-связывающего кармана Pk25 отличаются от соответствующих остатков PknB (рис. 2б): V72I, I90M, Y94L, M145L, M155T (нумерация в соответствии с последовательностью PknB). Первые три замены относительно консервативны и не должны оказывать решающего влияния на процесс взаимодействия с ингибитором. Замена Y94L находится в области шарнира, и лиганды взаимодействуют с атомами основной цепи данного остатка, а не с его боковой цепью. Две последние замены не консервативны и должны оказывать влияние на взаимодействие с ингибиторами; в частности, обе замены приводят к увеличению доступного объема кармана связывания. Наконец, благодаря введению

остатка треонина в позицию 155 в этой области появляется дополнительная гидроксильная группа.

Анализ аутофосфорилирования в активационной петле каталитического домена Pk25

Белковую фракцию каталитического домена Pk25, клонированного и экспрессированного в *E. coli*, выделяли из лизата бактерий хроматографией на гистидинсвязывающей смоле в нативных условиях или в присутствии 8 М мочевины и после электрофоретического разделения анализировали его внутриклеточную локализацию и способность к аутофосфорилированию *in situ*. Было показано, что во фракции солерастворимых белков клетки каталитический домен Pk25 отсутствует. Этот рекомбинантный белок локализуется во фракции нерастворимых белков клетки и может быть переведен в растворимое состояние в присутствии мочевины, что и было проделано. После электрофоретического разделения значение молекулярной массы анализируемого фрагмента составляет 28 кДа, что хорошо совпадает с расчетным значением для клонированного домена. В присутствии [γ-³²P]АТФ белок включает в свой состав меченый фосфат (рис. 1б). Анализ фосфорилирования после разделения белков в геле позволяет исключить интерферирующее влияние возможных примесей на результаты. В целом, полученные данные указывают на то, что выделенный белок каталитического домена Pk25 является ферментативно активным и способен к аутофосфорилированию. Локализация каталитического домена Pk25-киназы во фракции

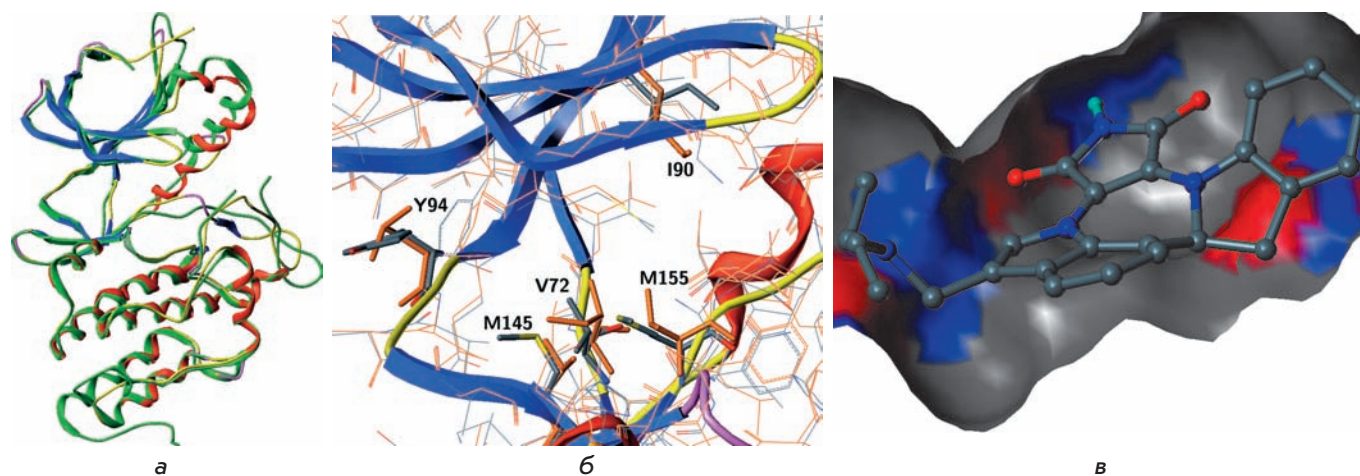
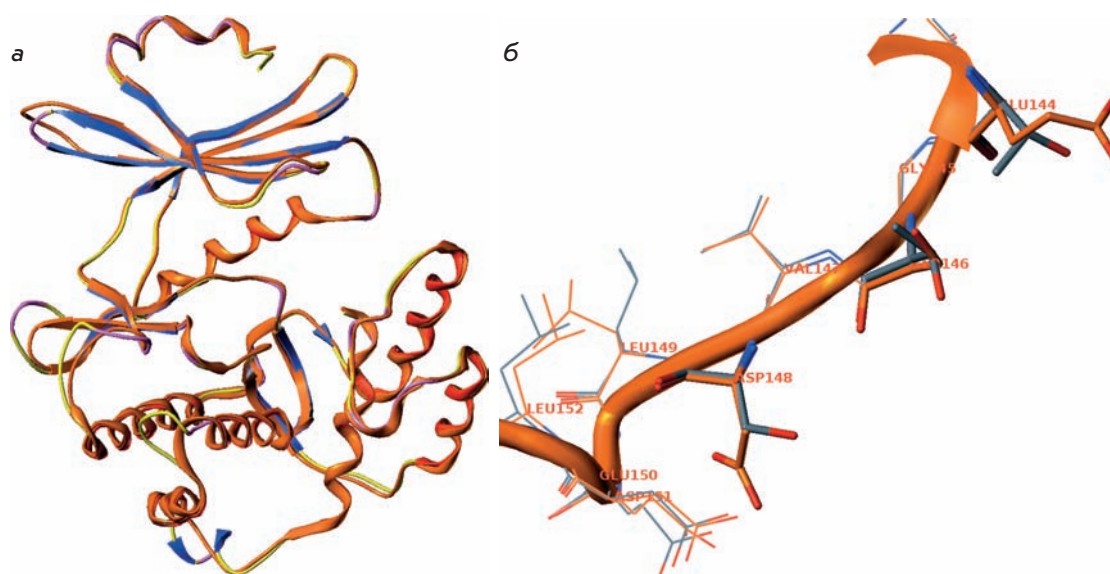


Рис. 2. Модель пространственной структуры Pk25. а — Сопоставление структур шаблонного белка PknB *M. tuberculosis* (зеленый) и Pk25 (окрашена по типам вторичной структуры). б — Карман связывания АТФ в PknB (окрашен по типам атомов) и Pk25 (оранжевый), отмечены неконсервативные аминокислотные остатки. в — Способ связывания LSTA-1425 с киназой Pk25. Ван-дер-ваальсова поверхность киназы окрашена согласно донорно-акцепторным свойствам (красный — донор водородной связи, синий — акцептор).

Рис. 3. Модель пространственной структуры APHVIII. а — Сопоставление структуры APH(3')-IIa (код доступа 1ND4, оранжевый) и модели APHVIII (окрашена по типам вторичной структуры). б — Аминокислотные остатки в активационной петле APHVIII дикого типа (атомы углерода оранжевые) и мутанта 146-1 (атомы углерода серые).



нерастворимых белков клетки не противоречит возможности его аутофосфорилирования в ходе экспрессии, а также не исключает его активности в отношении растворимых и нерастворимых белков. Эти результаты совпадают с аналогичными данными для каталитических доменов протеинкиназ *Streptomyces* и *Mycobacterium* [43–45]. Установлено, что фосфорилирование происходит в активационной петле СТПК по серину. Анализ специфичности фосфорилирования субстратов СТПК *M. tuberculosis* показал, что с наибольшей эффективностью осуществляется фосфорилирование участков, аналогичных сайтам аутофосфорилирования исследуемой протеинкиназы [46].

Моделирование пространственной структуры аминокликозидфосфотрансферазы VIII

Модель структуры каталитического домена APHVIII близка к структуре шаблонного белка APH(3')-IIa (рис. 3а). Наибольшее подобие структур достигается в областях связывания АТФ и канамицина, а также в активационной петле; небольшие вставки в APHVIII по сравнению с аминокислотной последовательностью шаблона располагаются в структурно неконсервативных областях петель между различными элементами вторичной структуры белка и не вносят решающего вклада в укладку его основной цепи. Физико-химические свойства и конформации критически важных аминокислотных остатков,

Таблица 2. Модификации сайта фосфорилирования Ser-146 APHVIII

Исходные ферменты и модифицированные варианты APHVIII	Сайты фосфорилирования и их модификации*
Pk25	ATTLTESGSFVG
APHVIII	AVAEGS ₁₄₆ VDLED
APHVIII146-1	AVATGT ₁₄₆ VSLED
APHVIII146-2	AVATGS ₁₄₆ VSLSD
APHVIII146-3	AVAEGT ₁₄₆ VDLED
APHVIII146-4	AVAEGA ₁₄₆ VDLED

*Получившиеся в результате модификаций аминокислотные замены выделены подчеркиванием.

образующих области связывания канамицина и АТФ, также совпадают в шаблоне и модели. Структура мутанта APHVIII146-1 почти полностью совпадает со структурой фермента дикого типа. Различия наблюдаются лишь в области активационной петли и мало влияют на глобальную конформацию (рис. 3б).

Сайт фосфорилирования APHVIII – аминокислотный остаток (Ser-146) – аналог фосфосерина в области, гомологичной рибозному карману серин-треониновых протеинкиназ типа РКА [47]. При моделировании молекулярной динамики нефосфорилированной по Ser-146 APHVIII в комплексе с канамицином (с АТФ и двумя связанными ионами Mg²⁺) были выявлены существенные изменения в структуре фермента, характеризующиеся ослаблением контакта между N- и C-концевыми доменами [48, 49].

Модификация области S-146 аминокликозидфосфотрансферазы APHVIII – сайта фосфорилирования киназой Pk25

Сайт аутофосфорилирования в активационной петле Pk25 был определен путем сравнения с соответствующим районом PknB *M. tuberculosis* [50]:

PknB DFGI ARAIAD **SGNSVTQTA**AVGTAQYLSPE
Pk25 DFGV AQVAGA **TTLTESGSFV**GSPEYTAPE

Для оптимизации конструкции тест-системы *E. coli* APHVIII/Pk25 мы провели модификацию потенциального сайта фосфорилирования AVAEGS₁₄₆VDLED в активационной петле APHVIII. Целью было приблизить сайт Ser-146 APHVIII по своей структуре к сайту аутофосфорилирования Pk25 TTLTESGSFVG. Для этого проведены модификации окружения Ser-146 фермента APHVIII (табл. 2), предусматривающие аминокислотные замены, выделенные подчеркиванием. Полученные мутантные варианты гена *aphVIII146-1*, *aphVIII146-2*, *aphVIII146-3*, *aph-*

VIII146-4 лигировали в плазмидный вектор pET16b по сайтам рестрикции NdeI–BamHI и клонировали в штамм *E. coli* DH5a. После ресеквенирования полученными плазмидами pET16baphVIIIм1 (рис. 4а) трансформировали штамм *E. coli* BL21(DE3). Для изучения экспрессии белка в клетках *E. coli* всех вариантов APHVIII проводили гель-электрофорез растворимой фракции клеточных белков в денатурирующих условиях.

В клетках *E. coli*, содержащих плазмиду pET-16baphVIII, экспрессировался белок одинаковой молекулярной массы – около 31 кДа. Эта величина соответствует расчетной молекулярной массе белка APHVIII, равной 31.5 кДа.

Создание конструкции, содержащей гены аминокликозидфосфотрансферазы *aphVIII* и протеинкиназы *pk25*

Аmplификацию *pk25* проводили с праймеров Pk25NBgl и Pk25CBgl (табл. 1) с ДНК плазмидного вектора pET22b-pk25. Праймер Pk25NBgl содержит сайт связывания с рибосомой (RBS) и кодон ATG для нуклеотидной последовательности каталитического домена протеинкиназы Pk25. В плазмидные векторы pET16baphVIIIм1, содержащие описанные ранее варианты *aphVIII*, по сайту BamHI лигировали амплифицированную и рестрицированную по сайту BglII последовательность *pk25*. Отбор клонов проводили в два этапа. На первом этапе отбирали целевые клоны со вставкой путем амплификации со стандартных векторных праймеров: T7promoter primer и T7terminator primer по величине вставки. На втором этапе отбирали клоны с требуемой ориентацией фрагментов амплификацией с праймеров AphN и Pk25CC (табл. 1) по наличию и величине вставки. После перекрестного ресеквенирования, полученными плазмидами pET16APC (рис. 4б) трансформировали штамм *E. coli* BL21(DE3). В индуцирующих

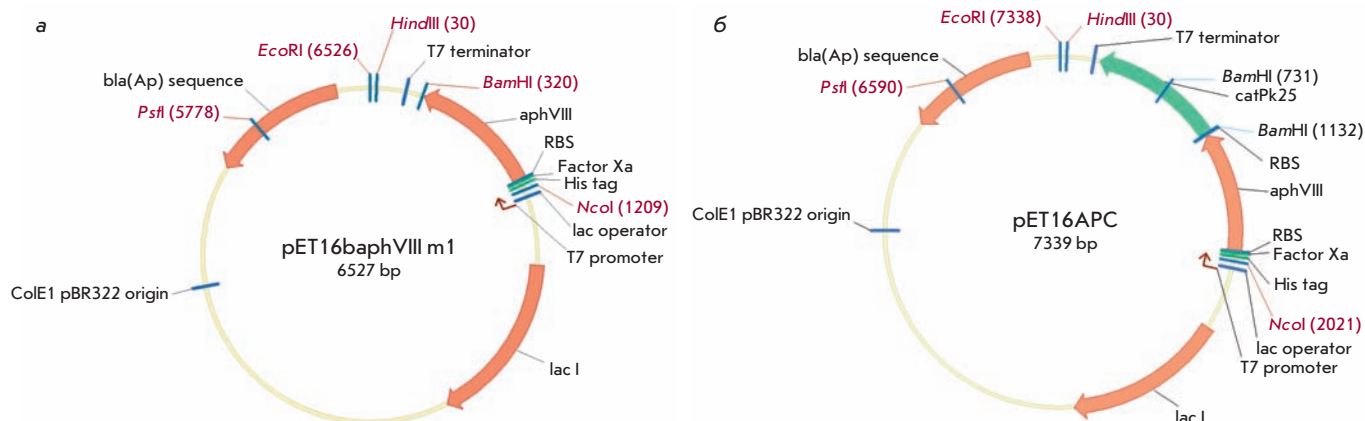


Рис. 4. Векторные конструкции. а – Вектор pET16baphVIII m1 с мутантными вариантами *aphVIII146-1*, *aphVIII146-2*, *aphVIII146-3*, *aphVIII146-4* и исходным *aphVIII146-5*. б – Векторные конструкции, включающие *pk25* и модифицированные *aphVIII*: *aphVIII146-1*, *aphVIII146-2*, *aphVIII146-3*, *aphVIII146-5*.

условиях проверяли экспрессию генов *aphVIII* и *pk25* гель-электрофорезом. В первых четырех вариантах (рис. 5) (дорожки 2–5) видны дополнительные фракции белка АРНVIII, на следующей дорожке (6) – дополнительная фракция Pk25, на последних четырех дорожках (7–10) – белковые фракции с молекулярными массами 31,5 кДа, что соответствует АРНVIII, и 28 кДа, что соответствует Pk25. Для уточнения результатов было проведено масс-спектрометрическое исследование дополнительных белковых фракций

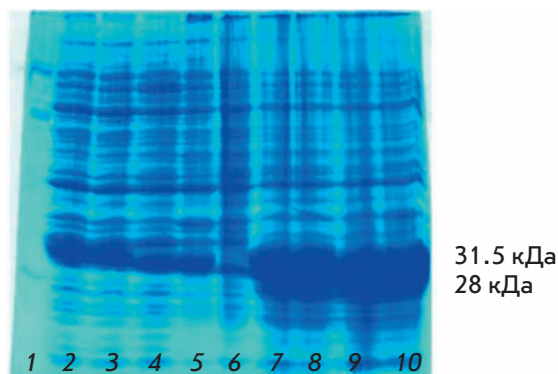


Рис. 5. Электрофореграмма белков штамма *E. coli* BL21(DE3), каталитического домена Pk25, АРНVIII. 1 – белковый маркер, 2 – фракция АРНVIII146-S (исходный), 3 – фракция АРНVIII146-1, 4 – фракция АРНVIII146-2, 5 – фракция АРНVIII146-3, 6 – каталитический домен Pk25 (Pk25), 7 – фракции АРНVIII146-S/ Pk25, 8 – фракции АРНVIII146-1/Pk25, 9 – фракции АРНVIII146-2/Pk25, 10 – фракции АРНVIII146-3/Pk25. В качестве контролей анализировали фракции белков из клеток штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащих плазмиду pET22b/pk25 и плазмиду pET16baphVIII (исходный вариант).

на дорожке 7. По результатам исследования более тяжелая фракция содержит аминокислотную последовательность АРНVIII (gb|AAAY27879.1| aminoglycoside-O-phosphotransferase VIII). Более легкая фракция содержит аминокислотную последовательность, соответствующую каталитическому домену Pk25 (ig|1100219 NP_628936.1 serine/threonine protein kinase *S. coelicolor* A3(2)).

Анализ уровня устойчивости к канамицину вариантов *E. coli* BL21(DE3), содержащих различные модификации гена *aphVIII* и их комбинации с *pk25*

Все созданные конструкции исследованы по уровню устойчивости к аминогликозидному антибиотику канамицину (табл. 3). Штамм BL21(DE3), содержащий плазмиду pET16b с геном *aphVIII* (исходный вариант), был устойчив к канамицину (325 мкг/мл).

Замены, произведенные в варианте АРНVIII146-1, приводили к снижению устойчивости на 48%. У варианта АРНVIII146-2 устойчивость снижалась на 54%. Уровень устойчивости варианта АРНVIII146-3 с заменой Ser-146 на Thr-146 не изменялся. В случае замены Ser-146 на Ala-146 (АРНVIII146-4), т.е. полной инактивации сайта фосфорилирования Ser-146, уровень устойчивости к канамицину падал на 70%. Активность АРНVIII146-4 *in vitro* совпадает с полученными данными, т.е. активность мутантных вариантов составляет около 30% от исходной [51]. Все конструкции АРНVIII с Pk25 обладали более высоким уровнем активности. Уровень устойчивости к канамицину возрастал на 91% в случае с АРНVIII146-1/Pk25, на 83% в случае с АРНVIII146-2/Pk25, на 23% при замене Ser-146 на Thr-146 и в случае с исходной АРНVIII – АРНVIII/Pk25 (табл. 3).



Рис. 6. Бактериальная тест-система *E. coli aphVIII/Pk25* для скрининга ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ. **а** – Принцип тест-системы: фосфорилирование APHVIII по Ser-146 Pk25 приводит к устойчивости *E. coli* к канамицину; добавление ингибитора препятствует фосфорилированию и снижает устойчивость к канамицину. **б** – Валидация тест-системы с использованием классических ингибиторов Bis-1 и Bis-5 [52]: добавление Bis-1 приводит к увеличению зоны.

Докинг ингибиторов класса индолилмалеимидов в модель структуры Pk25

На сконструированной ранее тест-системе *S. lividans* APHVIII+ был проведен скрининг соединений различных химических классов: бензодиазинов, бензофталазинов, циклопентендионов, индолилмалеимидов, пиразолов, тиазолов, тиазолтетразинов и др. (неопубликованные данные). Среди индолилмалеимидов было обнаружено значительное число соединений, проявляющих ингибиторную активность по отношению к протеинкиназам, для которых был проведен молекулярный докинг с целью установления предположительного способа связывания. Результаты докинга указывают на возможность взаимодействия между областью связывания АТФ киназы Pk25 и отобранными на сконструированной

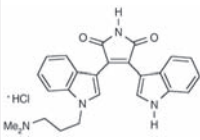
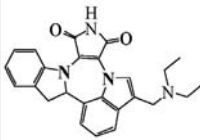
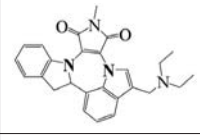
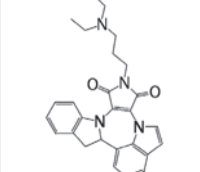
тест-системе *S. lividans* TK24 (66) APHVIII/СТПК ингибиторами: LCTA-1385, LCTA-1398, LCTA-1425 [20], бис-индолилмалеимид-1 [52].

При докинге исследованных в данной работе ингибиторов Pk25 наблюдаются консервативные взаимодействия между малеимидным фрагментом и основной цепью шарнирной области киназы (рис. 2в). Ингибиторы бис-индолилмалеимид-1 (Bis-1) и LCTA-1425 образуют две водородные связи — между карбонильным атомом кислорода малеимидного фрагмента и амидным атомом водорода аминокислотного остатка Val96, а также между имидным атомом водорода малеимидного фрагмента и карбонильным кислородом основной цепи аминокислотного остатка Glu94. У ингибиторов LCTA-1385 и LCTA-1398 имеется лишь первая из названных водородных связей, поскольку

Таблица 3. Уровень устойчивости к канамицину *E. coli* BL21(DE3), содержащей различные варианты APHVIII

Название	Модифицированные конструкции APHVIII	Устойчивость к канамицину вариантов <i>E. coli</i> , мкг/мл	
		APHVIII	APHVIII+Pk25
146-S	AVAEG S ₁₄₆ VDLED	325±5	400±10
146-1	AVATG T ₁₄₆ VSLED	170±10	325±5
146-2	AVATG S ₁₄₆ VSLSD	150±10	275±10
146-3	AVAEG T ₁₄₆ VDLED	325±5	400±10
146-4	AVAEG A ₁₄₆ VDLED	100±5	-

Таблица 4. Зависимость уровня устойчивости к канамицину *E. coli* APHVIII146-1/Pk25 от действия ингибиторов СТПК

Название известных ингибиторов СТПК класса индолилмалеимидов	Структурная формула ингибитора	Субингибирующая концентрация ингибитора, нмоль/диск	Зона ингибирования в тест-системе <i>E. coli</i> APHVIII146-1/Pk25 при совместном действии Km+ ингибитор, мм
Bis-1		700	13.0
LCTA-1425		125	12.0
LCTA-1398		250	13.0
LCTA-1385		125	12.0

Примечание. Зона ингибирования только канамицином (Km) (5 мг/диск) – 10 мм. Уровень устойчивости к канамицину культуры *E. coli*, содержащей APHVIII146-1 и Pk25, проводили методом бумажных дисков как описано в разделе «Экспериментальная часть». Характеристики индолилмалеимидов серии LCTA, полученных от проф. М.Н. Преображенской, описаны ранее [20].

атом водорода малеимидного фрагмента в них замещен. Как следствие, предсказанная энергия взаимодействия с киназой для двух последних соединений ниже энергии для двух первых на 1 ккал/моль, однако в обоих случаях взаимодействие киназы с ингибитором можно считать выгодным.

Выбор и валидация¹ тест-системы *E. coli* APHVIII/Pk25

Ранее была сконструирована и валидирована [20] тест-система *S. lividans* TK24 (66) APHVIII/СТПК [20]. Регистрируемый эффект данной системы основан на кумулятивном действии антибиотика канамицина и модулятора СТПК в субингибирующей² [20] концентрации, приводящем к появлению или увеличению зоны ингибирования роста индикаторной культуры. Размер зоны отсутствия роста позволял

проводить предварительную оценку эффективности исследуемого ингибитора СТПК [20]. Поэтому принципиально важным при создании новой тест-системы является диапазон изменений уровня устойчивости к канамицину, определяемый различными конструкциями APHVIII. Исходя из этого, вариант APHVIII146-1 является предпочтительным. Поэтому для дальнейших исследований нами выбрана конструкция *E. coli* APHVIII146-1/Pk25 (рис. 6). Для валидации тест-системы *E. coli* APHVIII146-1/Pk25 были использованы ранее описанные ингибиторы СТПК класса индолилмалеимидов: LCTA-1385, LCTA-1398, LCTA-1425 [20] и Bis-1 [52] (табл. 4). В качестве стандартной концентрации канамицина выбрана 5 мг/диск (образуемая зона подавления роста – 10 мм). Все исследованные вещества снижают уровень устойчивости к канамицину. Вещества из библиотеки класса индолилмалеимидов LCTA-1033, LCTA-1196, Bis-5, не проявляющие активности в тест-системе *S. lividans* TK24 (66) APHVIII/СТПК [20], не дали позитивного результата и в тест-системе *E. coli* APHVIII146-1/Pk25, что подтверждает адекватность использованной тест-системы.

¹ Валидация – система последовательно выполняемых проверок и испытаний по доказательству того, что любой материал, процесс, метод, процедура, деятельность, оборудование или механизм могут, будут и позволяют достигать ожидаемого результата [53, 54].

² Величина субингибирующей концентрации вдвое меньше величины минимальной ингибирующей концентрации (МИК).

Таблица 5. Лигандсвязывающие аминокислоты аденинсвязывающего кармана серин-треониновых протеинкиназ, бактериальных и *Homo sapiens*

Протеинкиназа	Функции протеинкиназ в патогенезе и физиологии	Аминокислоты аденинсвязывающего кармана	Существенность замен
СТПК бактерий			
Pk25 <i>S. coelicolor</i>	Модуляция устойчивости aph-гена	LVAVMLVLT	Оригинал
PknA <i>M. tuberculosis</i>	Синтез клеточной стенки	┌VAIMLVLT	Несущественна
PknJ <i>M. tuberculosis</i>	Персистенция в хозяине	LVAIMFVLS	»
Stk1 <i>Streptococcus agalactiae</i>	Регулирует клеточную сегрегацию GBS и вирулентность	┌VAIMYVLT	»
StkP <i>S. pneumonia</i>	Фрагмент сигнального пути, вовлеченного в инвазию легких и кровотока	┌VAIMYVLT	»
SP-STK <i>S. pyogenes</i>	Деление клетки, морфология колоний, участие в вирулентности	┌VAIMYVLT	»
RpkA <i>P. aeruginosa</i>	Регуляция экспрессии фактора вирулентности	LVAITMYLLS	Существенна
PknB/Stk1 <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	Регуляция пуринового биосинтеза, аутолизиса, центрального метаболизма	LVAIMYILF	»
PknB <i>M. tuberculosis</i>	Деление клетки, ингибирование слияния лизосом	LVAIMYVMM	»
СТПК <i>Homo sapiens</i>			
PKA <i>H. sapiens</i>	Аллергия, болезни миокарда	LVALMYVLT	Несущественна
CaMK ID <i>H. sapiens</i>	Диабет II типа	LVAIMLVLS	»
Rac2 <i>H. sapiens</i>	Заболевание клеток эпидермиса по действием УФ	┌VAIMYLLT	»
BR kin1 <i>H. sapiens</i>	Регуляция клеточного гомеостаза	LVAV┌HVLA	Существенна
NUAK SNF1-11 <i>H. sapiens</i>	Модуляция фактора TNF-alpha в раковых клетках	LVAIMYALA	»
CaMKII <i>H. sapiens</i>	Индукция долговременной синаптической памяти	LVAIMYALA	»

Примечание. В таблице представлены серин-треониновые протеинкиназы, имеющие не более четырех аминокислотных замен лигандсвязывающей последовательности LVAVMLVLT Pk25. Несущественные аминокислотные замены обозначены (-), существенные замены – (=), замены в области gatekeeper обозначены (┌). Селективность отбираемых ингибиторов по отношению к протеинкиназе определяется сродством лигандов ингибитора к 9 аминокислотам аденинсвязывающего кармана протеинкиназы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Потенциальные возможности использования тест-системы *E. coli* ARHVIII146-1/Pk25 для скрининга ингибиторов СТПК

Сконструированная тест-система может быть использована для первичного отбора (прескрининга) АТФ-конкурентных низкомолекулярных ингибиторов [2], способных диффундировать в агаризованной среде через клеточную стенку *E. coli* и взаимодействовать

с аденинсвязывающим карманом каталитического домена серин-треониновой протеинкиназы Pk25. Селективность отбираемых ингибиторов будет определяться сродством лигандов ингибитора к аминокислотам аденинсвязывающего кармана протеинкиназы. Известно, что идентичность функционально сходных аминокислотных последовательностей позволяет предполагать сходство их пространственной структуры, в том числе лигандсвязывающих карманов, отвечающих за селективность ингибиторов [31, 55].

Сравнение аминокислотных последовательностей каталитического домена Pk25 с каталитическими доменами бактериальных СТПК, в том числе патогенных микроорганизмов с помощью Genomic BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi), позволяет выявить 13 белков с идентичностью более 35%. Среди них присутствуют представители СТПК *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*. Аналогичное сравнение с СТПК человека выявляет 19 белков с идентичностью более 30%. Среди них протеинкиназы семейств SAD, BR, NUAК (SNF), DАРК3, PNCK, CaMKII, CaMKI, Zip, PKA, HUNK, PAK2, Mark-PAR1, SIK2, ОРК NimA.

Ингибиторы СТПК, конкурентно замещающие АТФ, присоединяются к аденинсвязывающему карману каталитического домена киназы. Аденинсвязывающий карман состоит из константных и переменных аминокислот. Нами проведена классификация СТПК грамположительных бактерий [23, 56], основанная на физико-химических свойствах боковых цепей девяти переменных аминокислот аденинсвязывающего кармана каталитического домена. В настоящей работе мы использовали этот критерий для выбора СТПК патогенных бактерий и человека, которые могут модулироваться отобранными в предлагаемой тест-системе *E. coli* АРНVIII/Pk25 ингибиторами. В табл. 5 представлены 9 из 13 потенциальных лигандсвязывающих последовательностей СТПК патогенных бактерий и 6 из 19 последовательностей СТПК человека. Критерием отбора служило наличие не более четырех аминокислотных замен

из девяти в положениях переменных аминокислот в аденинсвязывающем кармане Pk25 *S. lividans* (*S. coelicolor*) LVAVMLVLT (табл. 5). Существенными считали замены неполярных аминокислот на полярные в первых четырех и восьмом положениях (обозначено =); все замены, кроме подобной аминокислоты на подобную – в девятом положении (обозначено =), любые замены в пятом положении (gatekeeper) – (обозначено _). Замены в положении 6 (зона шарнира) и 7 менее существенны. Несущественные замены обозначали (-). Наличие от 2 до 4 несущественных замен не изменяет характер взаимодействия ингибиторов с аденинсвязывающей последовательностью протеинкиназы. Поэтому протеинкиназа Pk25 может служить основой для отбора ингибиторов 5 из 13 СТПК патогенных бактерий и 3 из 19 СТПК человека. Критерий структурного сходства аденинсвязывающего кармана является более адекватным, чем процент гомологии белковой последовательности всей протяженности каталитического домена киназы.

Таким образом, сконструированная тест-система может быть использована для прескрининга ингибиторов СТПК ряда патогенных микроорганизмов, например PknA, PknJ *M. tuberculosis*, StkP *S. pneumonia*, SP-STK *S. pyogenes*, а также некоторых СТПК человека, например PKA, CaMKI, Pac2. ●

Работа поддержана Российским фондом
фундаментальных исследований
(грант № 09-04-12025).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Manning G., Whyte D.B., Martinez R., et al. // *Science*. 2002. V. 298. P. 1912–1934.
- Cohen P. // *Nat. Rev. Drug Discov*. 2002. V. 1. P. 309–315.
- Levitzki A. // *Acc. Chem. Res*. 2003. V. 36. P. 462–469.
- D'Alessandris C., Lauro R., Presta I., Sesti G. // *Diabetologia*. 2007. V. 50(4). P. 840–849.
- Barbier E., Zapata A., Oh E., et al. // *Neuropsychopharmacology*. 2007. V. 32(8). P. 1774–1782.
- Shirai H., Autieri M., Eguchi S. // *Curr. Opin Nephrol. Hypertens*. 2007. V. 16(2). P. 111–115.
- Collins I., Workman P. // *Nat. Chem. Biol*. 2006. V. 2. P. 689–700.
- Ishida A., Kameshita I., Sueyoshi N., et al. // *J. Pharmacol. Sci*. 2007. V. 103(1). P. 5–11.
- Goldstein D.M., Gray N.S., Zarrinkar P.P. // *Nat. Rev. Drug Discov*. 2008. V. 7. P. 391–397.
- Bain J., Plater L., Elliott M., et al // *Biochem. J*. 2007. V. 408. P. 297–315.
- Liu Y., Gray N.S. // *Nat. Chem. Biol*. 2006. V. 2. P. 358–364.
- Shi L., Potts M., Kennelly P.J. // *FEMS Microbiol. Rev*. 1998. V. 22. P. 229–253.
- Echenique J., Kadioglu A., Romao S., et al. // *Infect. Immun*. 2004. V. 72(4). P. 2434–2437.
- Cozzone A.J. // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*. 2005. V. 9. P. 198–213.
- Pérez J., Garcia R., Bach H., et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2006. V. 348(1). P. 6–12.
- Drews S.J., Hung F., Av-Gay Y. // *FEMS Microbiol. Lett*. 2001. V. 205(2). P. 369–374.
- Saini D.K., Tyagi J.S. // *J. Biomol. Screen*. 2005. V. 10(3). P. 215–224.
- Wehenkel A., Bellinzoni M., Graña M., et al. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2008. V. 1784(1). P. 193–202.
- Wączek F., Szabadkai I., Németh G., et al. // *Immunol. Lett*. 2008. V. 116(2). P. 225–231.
- Danilenko V.N., Simonov A.Y., Lakatosh S.A., et al. // *J. Med. Chem*. 2008. V. 51. P. 7731–7736.
- Елизаров С.М., Сергиенко О.В., Сизова И.А. и др. // *Мол. биология*. 2005. Т. 39. С. 1–9.
- Беккер О.Б., Елизаров С.М., Алексеева М.Т. и др. // *Микробиология*. 2008. Т. 77(5). С. 630–638.
- Danilenko V.N., Osolodkin D.I., Lakatosh S.A., et al. // *Current Top. Med. Chemistry*. 2010. *In press*.
- Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., et al. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich, John Innes Foundation. England, 2000. P. 613.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning*:

- A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
26. Kameshita I, Fujisawa H. // *Anal. Biochem.* 1989. V. 183. P. 139–143.
27. Nelson R.M., Long G.L. // *Anal. Biochem.* 1989. V. 180. P. 147–151.
28. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., et al. // *Nucleic Acids Research.* 2000. V. 28. P. 235–242.
29. Young T.A., Delagoutte B., Endrizzi J.A., et al. // *Nat. Struct. Biol.* 2003. V. 10. P. 168–174.
30. Ortiz-Lombardía M., Pompeo F., Boitel B., Alzari P.M. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 13094–13100.
31. Wehenkel A., Fernandez P., Bellinzoni M., et al. // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. P. 3018–3022.
32. Mieczkowski C., Iavarone A.T., Alber T. // *EMBO J.* 2008. V. 27. P. 3186–3197.
33. Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeno-Tarraga, et al. // *Nature.* 2002. V. 417. P. 141–147.
34. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P. // *Bioinformatics.* 2007. V. 23. P. 2947–2948.
35. Šali A., Blundell T.L. // *J. Mol. Biol.* 1993. V. 234. P. 779–815.
36. Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M. // *J. Appl. Cryst.* 1993. V. 26. P. 283–291.
37. SYBYL 8.0, Tripos International, 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA.
38. Fong D.H., Berghuis A.M. // *EMBO J.* 2002. V. 21. P. 2323–2331.
39. Nurizzo D., Shewry S.C., Perlin M.H., et al. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 327. P. 491–506.
40. Huey R., Morris G.M., Olson A.J., Goodsell D.S. // *J. Comput. Chem.* 2007. V. 28. P. 1145–1152.
41. Halgren T.A. // *J. Am. Chem. Soc.* 1990. V. 112. P. 4710–4723.
42. Sanner M.F. // *J. Mol. Graphics Mod.* 1999. V. 17. P. 57–61.
43. Umeyama T., Horinouchi S. // *Bacteriol.* 2001. V. 183. P. 5506–5512.
44. Petrickova K., Tichy P., Petricek M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. V. 279(3). P. 942–948.
45. Scherr N., Müller P., Perisa D., et al. // *J. Bacteriol.* 2009. V. 191(14). P. 4546–4554.
46. Villarino A., Duran R., Wehenkel A. // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 350. P. 953–963.
47. Taylor S.S., Yang J., Wu J., et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2004. V. 1697(1–2). P. 259–269.
48. Scheeff E.D., Bourne P.E. // *PloS Comput. Biol.* 2005. V. 1. P. 0359–0381.
49. Nurizzo D., Shewry S.C., Perlin M.H., et al. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 327. P. 491–506.
50. Durán R., Villarino A., Bellinzoni M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 333(3). P. 858–867.
51. Alekseeva M., Elizarov S. // *Congress EurasiaBio-2010*, 13–15 apr. 2010, Moscow.
52. Brehmer D., Godl K., Zech B., et al. // *Mol. Cell Proteomics.* 2004. V. 3(5). P. 490–500.
53. Konings E.J.M., Roomans H.H.S. // *Food Chem.* 1997. V. 59. P. 599–603.
54. Попов А.Ю. Валидация – что, где, когда? // *Чистые помещения и технологические среды*, 2003. № 3.
55. Scherr N., Honnappa S., Kunz G., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 12151–12156.
56. Zakharevich N.V., Osolodkin D.I., Artamonova I.I., et al. // *Congress EurasiaBio-2010*, 13–15 apr. 2010, Moscow.