

БЕККЕР ОЛЬГА БОРИСОВНА

**СОЗДАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ
СКРИНИНГА ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНАЗИЗ НА
ОСНОВЕ ГЕНОВ ФОСФОТРАНСФЕРАЗ**

03.02.07 - генетика.

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2011.

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Даниленко Валерий Николаевич
УРАН Институт общей генетики им. Н.И.
Вавилова РАН

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Киселев Сергей Львович
РНЦ «Курчатовский институт»

доктор биологических наук, профессор
Лось Дмитрий Анатольевич
УРАН Институт физиологии растений им. К.А.
Тимирязева РАН

Ведущая организация: Федеральное государственное унитарное предприятие
«Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов»

Защита диссертации состоится «__»_____2011 года в __ час. __ мин.
на заседании диссертационного Совета (Д 002.214.01) при Учреждении
Российской академии наук Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова
РАН по адресу: 119991, ГСП-1, Москва, ул. Губкина, 3, факс (499)132-89-62,
E-mail: aspirantura@vigg.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИОГен РАН

Автореферат разослан «__»_____2011 г.

Секретарь
диссертационного Совета,
кандидат биологических наук

Т.А. Синельщикова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Серин/треониновые протеинкиназы (СТПК) – универсальные регуляторы клеточного метаболизма эукариотов. Им принадлежит ключевая роль в контроле таких процессов, как апоптоз, пролиферация и дифференцировка клеток, транспорт веществ из клетки и др. Нарушение функционирования СТПК связано с развитием таких заболеваний человека, как диабет, сердечно-сосудистые расстройства, опухоли, нарушения иммунитета. СТПК эукариотического типа обнаружены у бактерий, включая формы, патогенные для человека. СТПК участвуют в формировании вирулентности, образовании бактериальных биопленок, поддержании толерантности и персистенции патогенных микроорганизмов. Интенсивно развивается биомишень-направленный поиск модуляторов (ингибиторов) протеинкиназ как потенциальных лекарственных препаратов нового поколения. Особое значение придается разработке высокопродуктивного, чувствительного, быстрого и дешевого скрининга библиотек химических соединений для обнаружения веществ, перспективных для терапии. При этом использование культур клеток, лабораторных животных, в отличие от бактерий, в тест-системах представляется неэффективным по временным затратам и стоимости.

Цель работы: изучение возможности использования фермента аминокликозидфосфотрансферазы типа VIII (aphVIII) актинобактерий, определяющего устойчивость к антибиотикам, и фосфорилирующих его СТПК для создания тест-систем для скрининга лекарственных средств нового поколения; разработка эффективной тест-системы на основе aphVIII и СТПК – биомисней для будущих лекарств - ингибиторов СТПК.

В работе поставлены следующие **задачи:**

1. Охарактеризовать компоненты тест-системы. Для этого:

- провести фосфорилирование *aphVIII in vitro* протеинкиназами *S. coelicolor A3(2)*.
 - идентифицировать протеинкиназу *S. coelicolor A3(2)*, фосфорилирующую *aphVIII*.
 - идентифицировать протеинкиназу, фосфорилирующую *aphVIII* в *S. lividans aphVIII+*.
 - провести клонирование и экспрессию нуклеотидной последовательности каталитического домена протеинкиназы *pk25* штамма *S.coelicolor* в *E. coli*
 - провести аутофосфорилирование каталитического домена *pk25*.
2. Охарактеризовать тест-систему *S. lividans TK24(66)aphVIII+/СТПК* с использованием известных ингибиторов СТПК.
 3. Провести скрининг потенциальных ингибиторов протеинкиназ человека и бактерий.
 4. Сконструировать тест-систему *E.coli aphVIII/pk25*. С этой целью:
 - модифицировать область *Ser-146 aphVIII* - сайт фосфорилирования *pk25*.
 - создать экспрессионную конструкцию, содержащую ген *aphVIII* с модифицированным сайтом фосфорилирования и нуклеотидную последовательность каталитического домена *pk25*.
 5. Валидировать тест-систему *E.coli aphVIII/pk25* и определить возможности ее использования.

Научная новизна

Впервые показана возможность фосфорилирования *aphVIII* протеинкиназами *S. coelicolor A3(2)*, и идентифицирована протеинкиназа *pk25*, фосфорилирующая *aphVIII*. Впервые обнаружена протеинкиназа, фосфорилирующая *aphVIII* в клетках *S. lividans TK24(66)*; показана ее способность к аутофосфорилированию *in vitro*. Используя уникальные свойства полученных молекул, впервые проведен анализ более 500 веществ различных химических классов - потенциальных ингибиторов СТПК в тест-системе *S. lividans TK24(66)aphVIII+/СТПК* и отобраны вещества,

оказавшиеся селективными ингибиторами эукариотических СТПК. Впервые показана возможность создания тест-систем на основе *aphVIII* и СТПК и создана бактериальная тест-система, содержащая два компонента: уникальный фермент *aphVIII*, определяющий устойчивость к антибиотикам, и СТПК, фосфорилирующую *aphVIII*.

Практическая значимость работы

Впервые создана бактериальная тест-система для скрининга ингибиторов СТПК, включающая *aphVIII* и фосфорилирующую его СТПК. Сконструированная тест-система позволяет проводить эффективный скрининг ингибиторов СТПК для идентификации и последующей разработки новых лекарственных препаратов. Созданная тест-система является важным элементом усовершенствования в технологической платформе скрининга ингибиторов СТПК.

Апробация работы

Материалы диссертации представлены на 4-м съезде Общества биотехнологов России им Ю.А. Овчинникова, (Москва 2006 г); международной конференции *Inovacni podnikani & transfer tehnologii* (Прага, 2007 г); 2-м международном Конгресс-Партнеринге и выставке по биотехнологии и биоэнергетике «ЕвразияБио-2010». (Москва 2010 г); научном семинаре отдела генетических основ биотехнологии ИОГен РАН 2010 г.

Декларация личного участия автора

Фосфорилирование аминокликозидфосфотрансферазы VIII протеинкиназами *S. coelicolor A3(2)* и аутофосфорилирование белка каталитического домена протеинкиназы *pk25* было проведено в соавторстве с к.б.н. Елизаровым С.М. Результаты по идентификации генов, клонированию и экспрессии генов, модификациям гена *aphVIII*, созданию конструкторов для тест-системы, анализу тест-системы, скринингу на бактериальных тест-системах и биоинформатическому анализу получены автором

самостоятельно. Участие автора в получении результатов исследования 80 процентов.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в журналах, включенных в перечень научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК РФ (Микробиология, 2008 г.; Journal of Medicinal Chemistry 2008 г.; ActaNature, 2010 г.) и 3 тезисов конференций, в которых полностью изложен материал диссертации.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы и список литературы. Работа изложена на 166 страницах машинописного текста, включает 19 таблиц, 35 рисунков. Библиография содержит 220 публикаций (9 отечественных источников и 211 зарубежных).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В разделе «Обзор литературы» изложены литературные данные о функциях, строении, классификации серин/треониновых протеинкиназ, клонированию и гетерологичной экспрессии генов серин/треониновых протеинкиназ рода *Streptomyces*; строении и классификации различных классов ингибиторов протеинкиназ, структурах аминокликозидфосфотрансфераз бактерий и данные об известных биологических тест-системах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы и векторы. Используются штаммы *Streptomyces coelicolor* A3(2) (ВКПМ, г. Москва), *Streptomyces lividans* TK24 (66)aphVIII+ (лаб. музей), *E. coli* DH5a (Promega), *E. coli* BL21(DE3) (Novagen). Применяли плазмидные векторы pET16b, pET22b и pET32a (Novagen).

Среды, реактивы и условия культивирования. Для выращивания *S. coelicolor* A3(2) и *S. lividans* TK24(66)*aphVIII+* использованы среды YSP и YEME [Kieser T., Bibb M.J., 2000]. Для выращивания *E.coli* использовали среду Лурия (L-бульон), NZCYM. Для определения чувствительности *S. lividans* TK24(66)*aphVIII+* к канамицину и модуляторам протеинкиназ и кальциевых каналов тестированием на чашках Петри использовали агаризованную среду МГ (модифицированная среда Гаузе). Для определения чувствительности *E.coli aphVIII146-1/pk25* к канамицину и модуляторам СТПК использовали агаризованную среду М9 с 1.5% раствором глицерина. Клетки *E. coli* BL21(DE3) и *E. coli* DH5a культивировали при 37° С [Mierendorf R., Yeager K., 1994], *S. coelicolor* A3(2) и *S. lividans* TK24(66)*aphVIII+* при 28°С [Kieser T., Bibb M.J., 2000]. Использовали коммерческие препараты ингибиторов протеинкиназ, кальциевых каналов, кальций-связывающих белков и антибиотиков.

Молекулярное клонирование. Выделение тотальной ДНК *S.coelicolor* A3(2) и *S.lividans* TK24(66)*aphVIII+* проводили согласно руководству [Kieser T., Bibb M.J., 2000]. Для выделения плазмидной ДНК, приготовления компетентной культуры *E.coli*, трансформации и анализа рекомбинантных плазмид использовали стандартные методы [Sambrook J., Fritsch E.F., 1989]. Амплификацию ДНК в полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили с использованием набора «Амплификация» фирмы “Dialat Ltd” на приборе Терцик ТП4-ПЦР01 (“ДНК-Технология”). Синтез олигонуклеотидов проводили в компании «Синтол». Нуклеотидную последовательность ДНК определяли секвенированием по методу Сэнгера. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Рестрикцию и лигирование проводили с учетом рекомендаций фирм-изготовителей ферментов (Fermentas, Promega).

Электрофорез и выделение ДНК из геля. Электрофорез в агарозном геле проводили в трис-ацетатном буфере (Sambrook J., Fritsch E.F., 1989). Очистка фрагментов ДНК, выделенных из агарозного геля, производилась с помощью QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen).

Электрофорез в полиакриламидном геле (SDS-PAGE). Содержание белка определяли по методике Брэдфорд [Bradford M.M., 1976]. Электрофорез белковых образцов проводили в 12 % полиакриламидном геле по методу Лэммли [Laemmli U.K., 1970]. Электрофореграммы белков сканировали на лазерном денситометре Ultrascan 2205 LKB. Триптический гидролиз белка в полиакриламидном геле, масс-спектры были получены в отделе протеомных исследований НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН. Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com).

Получение экстрактов клеток *Streptomyces* и *E. coli*. Клетки суспендировали в буфере с фенилметилсульфонилфторидом и дитиотрейтолом и разрушали ультразвуком. Экстракты инкубировали в присутствии панкреатических РНКазы и ДНКазы и удаляли дебрис центрифугированием (20000xg, 30 мин).

Аффинное выделение протеинкиназ. Белки экстрактов адсорбировали на голубую сефарозу CL-6B (Pharmacia Biotech); смолу отмывали, и элюированные белки фракционировали и очищали на колонке с сефадексом G-20, откалиброванной по стандартному набору белковых маркеров для гель-фильтрации (Pharmacia).

Анализ фосфорилирования *aphVIII*. Фосфорилирование белка проводили в течение 10 мин. при 28°C в реакционной смеси (50 мкл), содержащей 10 мкг белков частично очищенного препарата протеинкиназ в буфере с добавлением 0.25 мМ [γ -³²P]АТФ (150 Бк/пмоль; Обнинск, РФ) и определяли включение радиоактивной метки в *aphVIII*.

Сайт-направленный мутагенез области Ser-146 aphVIII выполнен по методу точковых мутаций Нельсона [Nelson R. M., Long G. L., 1989].

Определение устойчивости трансформантов *E.coli* BL21(DE3) к канамицину. С помощью репликатора клоны трансформантов, устойчивые к ампициллину, переносили на чашки Петри с LB-средой, содержащей различные концентрации канамицина и индуктор изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид, и фиксировали рост колоний через 25 часов культивирования при 37°C.

Определение активности ингибиторов протеинкиназ проводили методом бумажных дисков на агаризованной среде МГ (для *Streptomyces lividans* TK24(66)aphVIII+) или на среде М9 с глицерином (для *E. coli* BL21(DE3)aphVIII/pk25).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фермент aphVIII опосредует устойчивость стрептомицетов к аминогликозидным антибиотикам – канамицину, неомицину, мономицину, – вследствие фосфорилирования этих антибиотиков в клетках. Ранее из генома актинобактерий *Streptomyces rimosus* был выделен ген *aphVIII*, клонирован в векторе pET16b и экспрессирован в штамме *Escherichia coli* BL21(DE3) [Алексеева М.Г., Елизаров, 2010]. Устойчивость полученного штамма *E. coli* к канамицину увеличилась с 0.5 до 300 мкг антибиотика на 1 мл среды. Также установлено повышение устойчивости бактерий к канамицину при активации эндогенных Ca^{2+} -зависимых СТПК и проведено фосфорилирование aphVIII *in vitro* протеинкиназами экстрактов *S. rimosus* [Elizarov S.M., Sergienko O.V., 2005]. Определены потенциальные сайты фосфорилирования aphVIII: Ser-95, Ser-215, Ser-146 и Ser-160 и проведены замены каждого серинового остатка на нейтральный аланиновый. Обнаружено, что фосфорилирование только Ser-146 придает ферменту aphVIII 70% канамицин-киназной активности. Штамм *Streptomyces lividans* TK 24(66) был трансформирован плазмидным вектором pSU23, несущим ген

aphVIII. Устойчивость к канамицину трансформантов *S. lividans*, содержащих ген *aphVIII*, увеличилась в 10 раз.

1. Ca^{2+} -зависимое фосфорилирование *aphVIII* *in vitro* протеинкиназами *S. coelicolor A3(2)*.

Протеинкиназы в клеточном экстракте и суммарном препарате протеинкиназ *S. lividans TK24(66)* фосфорилируют *aphVIII* с незначительной эффективностью. Поэтому дальнейшие опыты проводили с использованием экстрактов клеток *S. coelicolor A3(2)* - штамма, близкородственного *S. lividans TK24(66)*. Использовали суммарный препарат протеинкиназ *S. coelicolor A3(2)* из культур стационарной фазы, выращенных в присутствии Ca^{2+} , после инкубации с меченым АТФ. Обнаружили 9 меченых фосфопротеинов. Фосфорилирование 81-, 41- и 32- кДа белков стимулировалось Ca^{2+} . Для анализа фосфорилирования *aphVIII in vitro* был получен рекомбинантный белок His10-*aphVIII* (Mr 306,25). Очищенный His10-*aphVIII* инкубировали в присутствии и в отсутствии Ca^{2+} с [γ - 32 АТФ] и суммарным препаратом протеинкиназ культуры *S. coelicolor A3(2)*, выращенной на средах с Ca^{2+} и в отсутствии Ca^{2+} . Во всех случаях обнаружили один главный фосфопротеин с молекулярной массой около 31.5 кДа. Максимальное мечение исследуемого белка происходило в присутствии Ca^{2+} в рабочей смеси, содержащей протеинкиназы из культур, выращенных в присутствии Ca^{2+} в среде. Исключение Ca^{2+} из среды для культивирования приводило к 2-кратному снижению активности СТПК ($49.3 \pm 4\%$), фосфорилирующих *aphVIII* в клетках *S. coelicolor A3(2)*. Исключение Ca^{2+} из смеси для анализа активности СТПК снижало их активность по отношению к *aphVIII* еще в 2.5 раза ($21.1 \pm 3\%$).

Таким образом, эндогенные СТПК *S. coelicolor A3(2)* фосфорилируют белок His10-*aphVIII*, и фосфорилирование стимулируется ионами кальция.

Для идентификации СТПК их суммарный препарат разделяли в геле с предварительно полимеризованным в него белком His10-aphVIII, ренатурировали киназы и инкубировали с меченым АТФ. Материал из зоны геля, содержащей меченые белки, экстрагировали и подвергали реэлектрофорезу. После этого анализировали фосфорилирование His10-aphVIII. Анализ показал, что только в зоне киназы с молекулярной массой около 41 кДа после реэлектрофореза обнаруживается меченый компонент с молекулярной массой 31.5 кДа, соответствующий His10-aphVIII (Рис. 1). Таким образом, доказано, что СТПК массой около 41кДа фосфорилирует белок aphVIII.

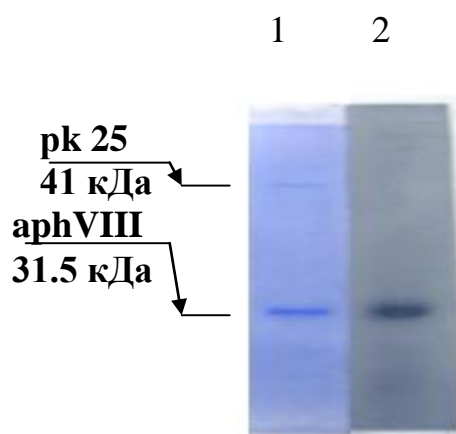


Рисунок 1. Фосфорилирование aphVIII протеинкиназой pk25. 1 – окраска белков Кумасси. 2 – ауторадиограмма.

Для идентификации протеинкиназы был проведен биоинформатический анализ протеинкиназ *S. coelicolor*. Анализ молекулярных масс протеинкиназ (39 кДа, 53 кДа, 55 кДа, 58 кДа, 63 кДа, 64кДа, 71 кДа, 72 кДа, 74 кДа), в которых найдены потенциальные области связывания с Ca^{2+} и кальмодулином, показал, что фосфорилировать белок aphVIII может только протеинкиназа pk25 SCO4778 (39 кДа) *S. coelicolor* A3(2).

2. Идентификация протеинкиназы, фосфорилирующей белок aphVIII в *S. lividans aphVIII+*.

Для идентификации протеинкиназы, фосфорилирующей белок aphVIII в клетках *S. lividans aphVIII+*, проведено сравнение гена *pk25* *S. coelicolor*

A3(2) с геномом *S. lividans* TK24(66), и обнаружена киназа, гомологичная *pk25* на 99.8%. Мы клонировали и секвенировали гены СТПК *S. coelicolor* A3(2) и *S. lividans* TK24(66). В результате ПЦР-амплификации с тотальной ДНК *S. coelicolor* и *S. lividans* фрагменты соответствующих ДНК были клонированы в экспрессионный вектор pET32a (по сайтам рестриктаз *Hind*III и *Eco*RI) и экспрессированы в *E. coli* DH5a. После секвенирования ДНК-фрагменты идентифицировали как *pk25*. При сравнении генов *pk25* *S. coelicolor* и *S. lividans* найдено 5 нуклеотидных замен. Данные замены не приводят к аминокислотным заменам в белковой последовательности. Таким образом, аминокислотные последовательности полноразмерного продукта гена *pk25* *S. coelicolor* и *S. lividans* являются идентичными.

3. Клонирование и экспрессия нуклеотидной последовательности каталитического домена *pk25* *S. coelicolor* в клетки *E. coli*.

Для клонирования нуклеотидной последовательности каталитического домена *pk25* были синтезированы два олигонуклеотида, которые содержали сайты для рестриктаз *Nde*I и *Hind*III. Полученный в результате амплификации фрагмент клонировали в *E. coli* DH5a в составе экспрессионного вектора pET22b. Рекомбинантными плазмидами трансформировали штамм *E. coli* BL21(DE3). Для изучения экспрессии каталитического домена протеинкиназы в клетках трансформантов проводили гель-электрофорез растворимой фракции клеточных белков в денатурирующих условиях. В качестве контроля использовали фракцию белков из клеток штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащих pET22b. В клетках *E. coli*, содержащих плазмиду pET22b-*pk25* (рис.2А) с последовательностью каталитического домена *pk25*, наблюдалась единственная по сравнению с контрольными клетками дополнительная фракция белка с молекулярной массой около 28 кДа (рис. 2Б). Эта величина соответствует расчетной молекулярной массе (27.8 кДа) каталитического домена *pk25* *S. coelicolor*

A3(2). По данным сканирования, содержание белка в дополнительной фракции составляет до 3.5 % от суммарного белка.

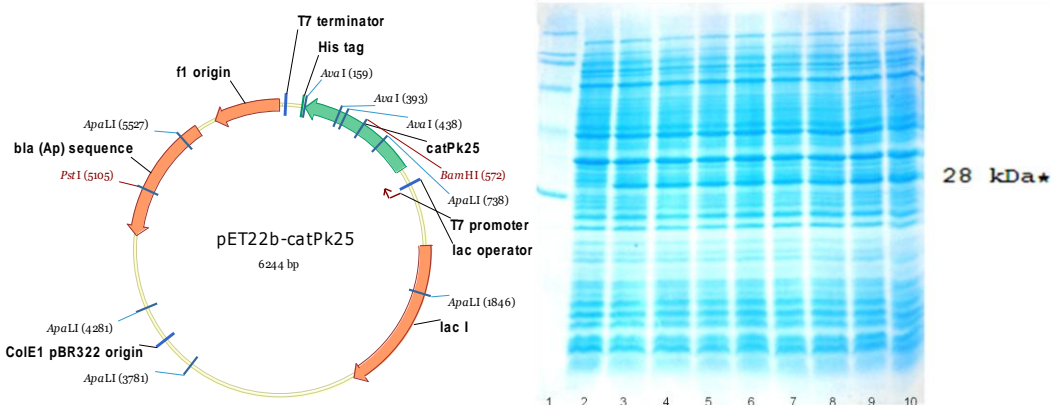


Рисунок 2. А. Вектор, содержащий последовательность каталитического домена pk25. Б. Электрофорез растворимой фракции белков штамма *E.coli* BL21(DE3). 1-маркеры, 2 – контроль (фракция белков штамма *E.coli* BL21(DE3) pET22b), 3-10 - клоны *E.coli*, содержащие плазмиду pET22b-pk25. (-фракция, соответствующая каталитическому домену pk25).

4. Анализ аутофосфорилирования в активационной петле каталитического домена pk25.

Белковую фракцию каталитического домена pk25, клонированного и экспрессированного в клетках *E. coli*, выделяли из лизата бактерий и анализировали его способность к аутофосфорилированию *in situ*. После электрофоретического разделения значение молекулярной массы анализируемого фрагмента составляло 28 кДа, что хорошо совпадает с расчетным значением для клонированного домена. В присутствии $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ белок включает меченый фосфат. Полученные данные указывают на то, что выделенный каталитический домен pk25 является ферментативно активным и способен к аутофосфорилированию.

Таким образом, по крайней мере, одна СТПК *S. lividans* способна фосфорилировать белок aphVIII в клетках *S. lividans* TK24(66)aphVIII+ и данный штамм можно использовать как тест-систему для поиска ингибиторов СТПК.

5. Тест-система *S. lividans* TK24(66)*aphVIII*+/*СТПК*.

Механизм действия тест-системы *S. lividans* TK24(66)*aphVIII*+/*СТПК* заключается в фосфорилировании некоторой *СТПК* белка *aphVIII*, который фосфорилирует и инактивирует канамицин. Следовательно, устойчивость к канамицину культуры, содержащей фосфорилированный *aphVIII*, возрастает. Добавление в тест-систему ингибитора *СТПК* приводит к снижению уровня фосфорилирования белка *aphVIII*, снижению его канамицин-киназной активности и уменьшению устойчивости клеток к канамицину (рис.3).

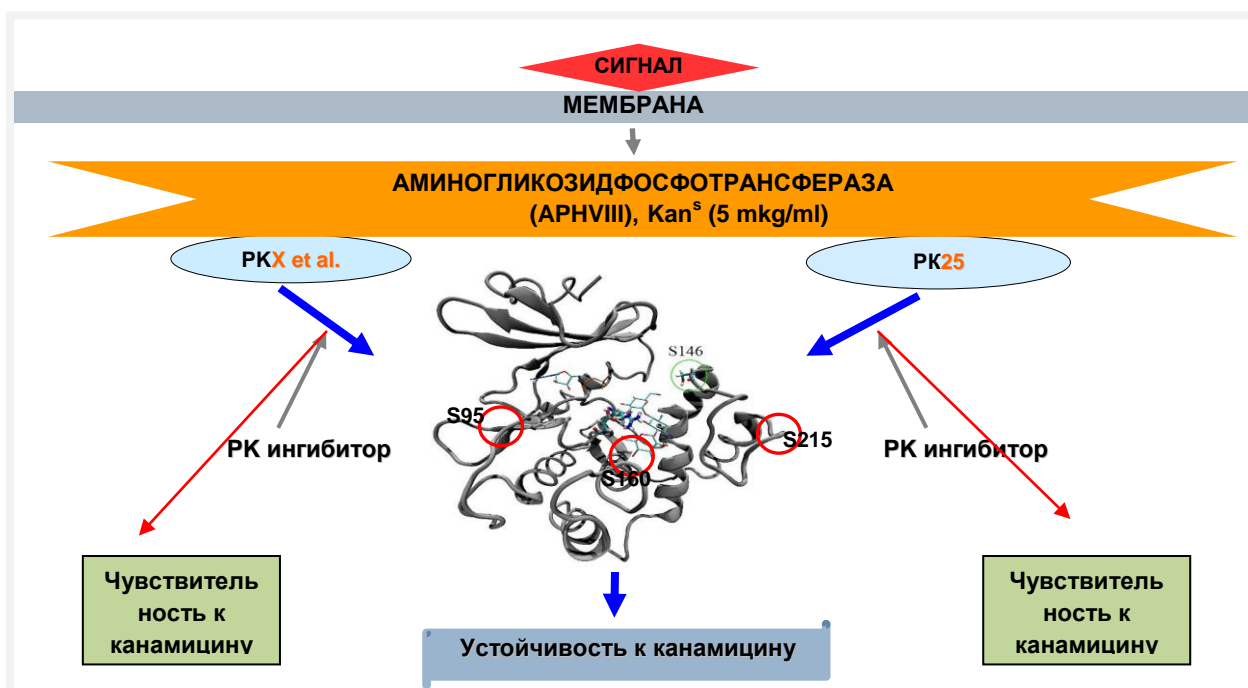


Рисунок 3. Механизм действия тест-системы *S. lividans* TK24(66)*aphVIII*+/*СТПК*.

Анализировали влияние стандартных модуляторов активности *СТПК*, и веществ, изменяющих концентрацию ионов кальция или АТФ в клетках, на чувствительность штамма *S. lividans* *aphVIII*+ к канамицину (рис.4). Тестирование испытуемых веществ (100 нмоль на диск), показало, что бис-индолилмалеимид I (бис-I) наиболее сильно понижает устойчивость клеток *S. lividans* *aphVIII*+ к канамицину. Ингибиторы кальмодулина - прениламин лактат и хлорпромазин, а также ингибитор Ca^{2+} -каналов верапамил, достоверно уменьшали устойчивость бактерий к канамицину.

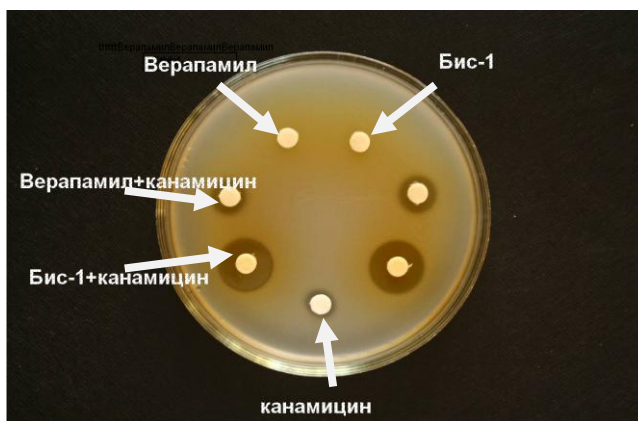


Рисунок 4. Зоны ингибирования роста штамма *S. lividans aphVIII+* под действием ингибитора СТПК – бис-индолилмалеимида I и блокатора кальциевых каналов верапамила.

В то же время, независимые от Ca^{2+} активатор аденилатциклазы форсколин, ингибитор СТПК казеинового типа II - 5,6-дихлорбензилимидазолрибозид (ДРБ) и активатор циклоАМФ-зависимых СТПК - дибутирил-цАМФ не влияли на чувствительность клеток к канамицину. Понижение устойчивости клеток *S. lividans aphVIII+* к канамицину в присутствии ингибиторов Ca^{2+} -зависимого фосфорилирования белков и ингибитора синтеза АТФ указывает на возможное участие Ca^{2+} -зависимых СТПК в посттрансляционной регуляции активности белка *aphVIII*.

6. Скрининг потенциальных ингибиторов СТПК человека и бактерий.

В тест-системе *S. lividans aphVIII+* тестировали 537 веществ различных химических классов (табл. 1). Класс индолилмалеимидов показал наибольший процент активных соединений – потенциальных ингибиторов СТПК человека и бактерий. 53 вещества, протестированных на *S. lividans aphVIII+*, были проверены на панели эукариотических протеинкиназ *in vitro*. 44 из них показали активность как ингибиторы эукариотических протеинкиназ с различной степенью селективности. В большинстве случаев селективные ингибиторы СТПК в тест-системе *S. lividans aphVIII+* показывают зоны ингибирования роста диаметром 9-11 мм. Вещества,

показывающие зоны более 12.5 мм, с большей вероятностью могут быть ингибиторами бактериальных СТПК.

Таблица 1. Скрининг потенциальных ингибиторов СТПК человека и бактерий.

Химический класс	Количество тестированных веществ	% активных веществ	Перспективны как ингибиторы
Бензодиазины	10	3 (30)	СТПК человека
Бензофталазины	10	1 (10)	Наименее активный класс
Карбораны, замещенные	14	10 (71)	Новый перспективный класс
Циклопентендионы, дигетарил-замещенные	271	34 (12)	СТПК человека и бактерий
Индоллилмалеимиды	129	109 (85)	Классические ингибиторы СТПК. СТПК человека и бактерий
Малеимиды, дигетарил-замещенные	6	5 (83)	СТПК человека
Пиридазины	2	1 (50)	СТПК человека
Пиразолы	29	9 (31)	СТПК человека
Хиноксалины	4	1 (25)	СТПК человека
Гиазолы	11	5 (54)	СТПК человека и бактерий
Гиазолы, дигетарил-замещенные	17	5 (29)	СТПК человека и бактерий
Гиазолтетразины	34	13 (38)	СТПК человека
Итого	537 соединений		

7. Конструирование тест-системы *E. coli aphVIII/pk25*.

В геноме *Streptomyces coelicolor* A(3) (NC_003888), близкородственном штамму *Streptomyces lividans* TK24(66) (ACEY01000000), идентифицированы и аннотированы гены 34 СТПК. Как мы установили, одна из них - протеинкиназа pk25 (код доступа NCBI Reference Sequence: Protein NP_628936.1) - способна фосфорилировать aphVIII. Возможно, другие СТПК также участвуют в фосфорилировании белка aphVIII. Для исключения неспецифического действия ингибиторов на другие СТПК *Streptomyces lividans* TK24(66), предположительно способные фосфорилировать aphVIII, сконструирована тест-система на основе фермента aphVIII и каталитического

домена протеинкиназы *pk25* в штамме *E. coli*. Отсутствие в *E. coli* СТПК эукариотического типа делает тест-систему более чувствительной и позволяет отбирать ингибиторы, специфичные к *pk25* и ее близким гомологам.

7.1. Модификация области S-146 белка *aphVIII* - сайта фосфорилирования протеинкиназой *pk25*.

По литературным данным, исследование фосфорилирования серин/треониновых протеинкиназ *M. tuberculosis* показало, что 10 из 11 киназ аутофосфорилируются по остаткам треонина и серина, располагающимся в активационной петле каталитического домена СТПК. Аминокислотные замены Thr на Ala в активационной петле приводили к 300-кратному уменьшению киназной активности протеинкиназы *pknB* [Durán R., Villarino A., 2005]. Сайт аутофосфорилирования в активационной петле протеинкиназы *pk25* *S. coelicolor* был определен путем сравнения с соответствующим районом *pknB* *M. tuberculosis*:

<i>pknB</i>	DFGI	ARAIAD	<u>SGNSVTQTAA</u>	VGTAQYLSPE
<i>pk25</i>	DFGV	AQVAGA	<u>TTLTESGSFV</u>	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 киназы *pk25*. Для этого проведены модификации окружения Ser-146 фермента *aphVIII*. Полученные мутантные варианты гена *aphVIII* вводили в вектор pET16b и клонировали в штамм *E. coli DH5a*. Рекомбинантными плазмидами pET16baphVIII_{m1} (рис. 6) трансформировали штамм *E. coli BL21(DE3)*. В клетках *E. coli*, содержащих плазмиды pET16baphVIII_{m1}, экспрессировались белки с молекулярной массой около 31 кДа, что соответствует расчетной молекулярной массе белка *aphVIII* (31.5 кДа).

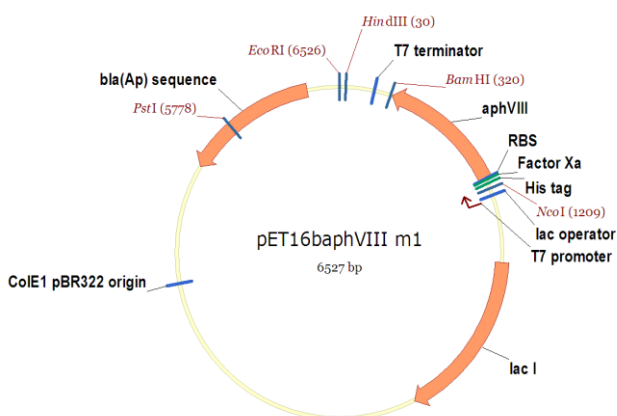
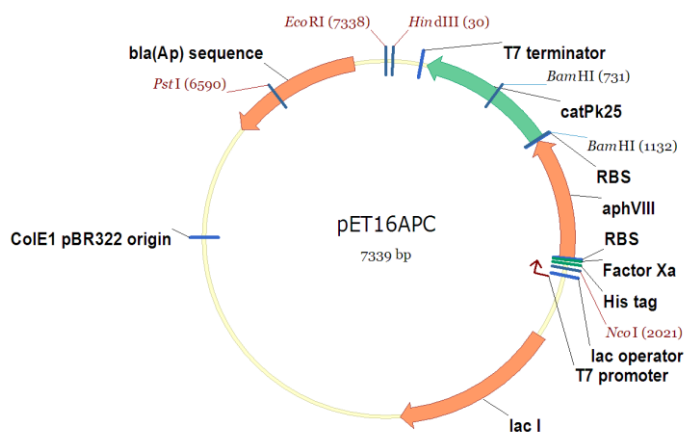
а**б**

Рисунок 6. Векторные конструкции, содержащие: а - модифицированные гены *aphVIII*: *aphVIII146-1*, *aphVIII146-2*, *aphVIII146-3*, *aphVIII146-S*, б - ген *pk25* и модифицированные гены *aphVIII*.

7.2. Создание конструкции, содержащей гены *aphVIII* и *pk25*.

Аmplификацию нуклеотидной последовательности каталитического домена *pk25* проводили с помощью праймеров Pk25NBgl и Pk25CBgl, с ДНК плазмидного вектора pET22b-pk25. Праймер Pk25NBgl содержит сайт связывания с рибосомой (RBS) и кодон *atg* для нуклеотидной последовательности каталитического домена *pk25*. В плазмидные векторы pET16baphVIII m1, содержащие описанные ранее варианты *aphVIII*, лигировали по сайту BamHI амплифицированную и рестрицированную по сайту BglIII последовательность *pk25*. Отбирали клоны с требуемой ориентацией фрагментов амплификацией с праймеров AphN и Pk25CC, ориентируясь на величину вставки. Полученными плазмидами pET16APC (рис.6б) трансформировали штамм *E. coli BL21(DE3)*. В индуцирующих условиях проверяли экспрессию генов *aphVIII* и *pk25* посредством гелеэлектрофореза. Во всех вариантах были видны дополнительные фракции, соответствующие по молекулярным массам белкам *pk25* и *aphVIII*. Масс-спектроскопическое исследование показало, что более тяжелая фракция содержит аминокислотную последовательность *aphVIII* ([gi|10242466](https://doi.org/10.242466)

aminoglycoside-O-phosphotransferase VIII). Более легкая фракция содержит аминокислотную последовательность, соответствующую каталитическому домену pk25 ([gi|21223157](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/121223157/) serine/threonine protein kinase *Streptomyces coelicolor* A3(2)).

7.3. Анализ устойчивости к канамицину клеток *E. coli* BL21 (DE3), содержащих модификации гена *aphVIII* и их комбинации с геном *pk25*.

У всех созданных конструкций был исследован уровень устойчивости к канамицину (табл. 2). Штамм BL21 (DE3), содержащий плазмиду pET16b с геном *aphVIII* (исходный вариант), был устойчив к канамицину (325 мкг/мл).

Замены, произведенные в варианте *aphVIII*146-1, снижали устойчивость к канамицину на 48%. У варианта *aphVIII*146-2 устойчивость снижалась на 54%. Уровень устойчивости варианта *aphVIII*146-3 с заменой Ser-146 на Thr-146 не изменялся. В случае замены Ser-146 на Ala-146 (*aphVIII*146-4), т.е. полной инактивации сайта фосфорилирования Ser-146, уровень устойчивости к канамицину падал на 70%.

Все конструкции *aphVIII* с *pk25* обладали более высокой активностью. Устойчивость к канамицину возрастала на 91% в случае *aphVIII*146-1/*pk25*, на 83% в случае *aphVIII*146-2/*pk25*, на 23% при замене Ser-146 на Thr-146 и в случае с диким типом *aphVIII* - *aphVIII*/*pk25* (табл. 2).

Таблица 2. Устойчивость к канамицину клеток *E.coli* BL21(DE3), содержащих различные варианты гена *aphVIII*.

Название	Модифицированные конструкторы белка <i>aphVIII</i> в области S-146	Устойчивость к канамицину трансформантов <i>E.coli</i> , мкг/мл	
		<i>aphVIII</i>	<i>aphVIII</i> + <i>pk25</i>
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 VSLS	150±10	275±10
146-3	AVAEG T ₁₄₆ VDLED	325±5	400±10
146-4	AVAEG A ₁₄₆ VDLED	100±5	-

7.4. Выбор и валидация тест-системы *E. coli aphVIII/pk25*.

Принципиально важным при создании новой тест-системы *E. coli aphVIII/pk25* является диапазон изменений устойчивости к канамицину, определяемый конструкциями, содержащими только *aphVIII* и *aphVIII/pk25*. Наибольшая разница устойчивости к канамицину наблюдается у варианта 146-1. Поэтому для тест-системы нами выбрана конструкция *E. coli aphVIII146-1/pk25*.

Для валидации тест-системы *E. coli aphVIII146-1/Pk25* были использованы ранее описанные ингибиторы СТПК класса индолилмалеимидов: LCTA-1385, LCTA-1398, LCTA-1425 и Bis-1. Все исследованные вещества снижают уровень устойчивости к канамицину.



Рисунок 7. Тест-система *E.coli aphVIII/Pk25* для скрининга ингибиторов СТПК. Валидация тест-системы с использованием классического ингибитора Bis-1 и неактивного аналога Bis-5: добавление Bis-1 к канамицину приводит к увеличению диаметра зоны роста, добавление Bis-5 не изменяет диаметр зоны.

Вещества из библиотеки класса индолилмалеимидов LCTA-1033, LCTA-1196, Bis-5 (Рис. 7), не проявляющие активности в тест-системе *S. lividans TK24(66)aphVIII+/СТПК*, не дают позитивного результата и в тест-системе *E. coli aphVIII 146-1/pk25*, что подтверждает адекватность использованной тест-системы.

8. Возможности использования тест-системы *E. coli aphVIII146-1/pk25* для скрининга ингибиторов СТПК.

Сконструированная тест-система может быть использована для первичного отбора (прескрининга) АТФ-конкурентных низкомолекулярных

ингибиторов [Cohen P., 2002], способных диффундировать в агаризованной среде через клеточную стенку *E. coli* и взаимодействовать с аденин-связывающим карманом каталитического домена киназы pk25. Селективность отбираемых ингибиторов будет определяться сродством лигандов ингибитора к аминокислотам аденин-связывающего кармана протеинкиназы. Известно, что идентичность функционально сходных аминокислотных последовательностей позволяет предполагать сходство их пространственной структуры, в том числе лиганд-связывающих карманов, отвечающих за селективность ингибиторов [Wehenkel A., Fernandez P., 2006; Scherr N., Honnappa S., 2007]. 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 имеются протеинкиназы семейств SAD, BR, NUAК (SNF), DAPK3, PNCK, CAMK2, CAMK1, Zip, PKA, HUNK, PAK2, Mark-PAR1, SIK2, ОРК NimA. В лаборатории генетики микроорганизмов проведена классификация СТПК грам-положительных бактерий [Zakharevich N.V., Osolodkin D.I., 2010], основанная на физико-химических свойствах боковых цепей 9 переменных аминокислот аденин-связывающего кармана каталитического домена. В настоящей работе мы использовали этот критерий для выбора СТПК патогенных бактерий и человека, которые могут модулироваться ингибиторами, отобранными в тест-системе *E.coli aphVIII/pk25*. В таблице 3 представлены 9 из 13 потенциальных лиганд-связывающих последовательностей СТПК патогенных бактерий и 6 из 19 последовательностей СТПК человека.

Таблица 3. Лиганд-связывающие аминокислоты аденинового кармана СТПК бактерий и человека.

Протеинкиназа	Функции, связанные с физиологией и патогенезом.	Аминокислоты аденинового кармана	Существенность замен
СТПК бактерий			
pk25 <i>Str.coelicolor</i>	Модуляция устойчивости <i>aph</i> гена	LVAVMLVLT	Оригинал
pknA <i>M.tuberculosis</i>	Синтез клеточной стенки	I <u>V</u> A <u>I</u> MLVLT	Несущественна
pknJ <i>M.tuberculosis</i>	Персистенция в организме хозяина	LVA <u>I</u> M <u>F</u> V <u>L</u> S	Несущественна
stk1 <i>S.agalactiae</i>	Регуляция клеточной сегрегации GBS и вирулентности	I <u>V</u> A <u>I</u> M <u>Y</u> VLT	Несущественна
stkP <i>S.pneumonia</i>	Участок сигнального пути, вовлеченного в патогенез пневмонии.	I <u>V</u> A <u>I</u> M <u>Y</u> VLT	Несущественна
sp-stk <i>S.pyogenes</i>	Деление клетки, участие в вирулентности	I <u>V</u> A <u>I</u> M <u>Y</u> VLT	Несущественна
ppkA <i>P.aeruginosa</i>	Регуляция экспрессии фактора вирулентности	LVAT <u>M</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>L</u> S	Существенна
pknB/stk1 <i>S.aureus subsp. aureus</i>	Регуляция пуринового биосинтеза, аутолиза, процессов центрального метаболизма	LVA <u>I</u> M <u>Y</u> <u>I</u> <u>L</u> F	Существенна
pknB <i>M.tuberculosis</i>	Деление клетки, ингибирование слияния лизосом	LVA <u>I</u> M <u>Y</u> <u>V</u> <u>M</u> M	Существенна
СТПК человека			
PKA	Аллергия, болезни миокарда	LVA <u>L</u> M <u>Y</u> VLT	Несущественна
CaM kinase1D	Диабет II типа	LVA <u>I</u> MLV <u>L</u> S	Несущественна
Rac2	Заболевания клеток эпидермиса по действием УФ	I <u>V</u> A <u>I</u> M <u>Y</u> <u>L</u> <u>L</u> T	Несущественна
BR kin1	Регуляция клеточного гомеостаза	LVAV <u>L</u> <u>H</u> V <u>L</u> A	Существенна
NUAK SNF1-11	Индукция TNFalpha в нормальных и раковых клетках	LVA <u>I</u> M <u>Y</u> <u>A</u> <u>L</u> A	Существенна
CaMKII	Индукция долговременной синаптической памяти	LVA <u>I</u> M <u>Y</u> <u>A</u> <u>L</u> A	Существенна

Критерием отбора служило наличие не более 4 аминокислотных замен из 9 в положениях переменных аминокислот в аденин-связывающем кармане pk25 *S. lividans* (*S. coelicolor*) LVAVMLVLT (табл. 3).

Существенными считали замены неполярных аминокислот на полярные в первых 4-х и 8-м положениях (=); все замены, кроме подобной аминокислоты на подобную – в девятом положении (=), любые замены в 5-м положении (gatekeeper) - (—). Замены в положении 6 (зона шарнира) и 7 менее существенны (–). Наличие несущественных замен не изменяет характер взаимодействия ингибиторов с аденин-связывающей последовательностью протеинкиназы. Поэтому pk25 может служить основой для отбора ингибиторов 5 из 13 СТПК патогенных бактерий и 3 из 19 СТПК человека. Таким образом, сконструированная тест-система может быть использована для прескрининга ингибиторов СТПК патогенных микроорганизмов, например pknA, pknJ *M. tuberculosis*, stkP *Streptococcus pneumoniae*, sp-stk *Streptococcus piogenes*, а также некоторых СТПК человека, например, протеинкиназы А и казеинкиназы 1.

ВЫВОДЫ

1. Установлено фосфорилирование аминокликозидфосфотрансферазы VIII протеинкиназами *S. coelicolor A3(2)*, и идентифицирована одна из них - серин/треониновая протеинкиназа эукариотического типа pk25.
2. Идентифицирована протеинкиназа, фосфорилирующая aphVIII в клетках *S. lividans TK24(66)*. Клонирована и экспрессирована в клетках *E. coli BL21 (DE3)* нуклеотидная последовательность каталитического домена киназы pk25, показана его способность к аутофосфорилированию *in vitro*.
3. Валидирована тест-система *S. lividans TK 24 (66) aphVIII+/СТПК* и проведен скрининг более 500 веществ различных химических классов - потенциальных ингибиторов серин/треониновых протеинкиназ.
4. Сконструирована и валидирована тест-система *E. coli BL21(DE3) aphVIII/pk 25*.
5. Определены возможности использования тест-системы *E. coli BL21(DE3)aphVIII/pk25*. Данная тест-система позволяет проводить отбор ингибиторов СТПК человека и бактерий.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Danilenko V.N., Elizarov S.M., **Bekker O.B.**, Shtil A.A., Preobrazhenskaya M.N. *Streptomyces*: Novel Test Systems for Mechanism-Based Drug Design // 10th Int. Symp. "Genetics of industrial Microorganisms", Prague, Czech Republic, 2006, P. 221.
2. Алексеева М.Г., **Беккер О.Б.**, Елизаров С.М., Серегина Т.А., Даниленко В.Н. Клонирование, экспрессия в *E. coli* и структурно-функциональная характеристика серин/треониновых протеинкиназ *Streptomyces* // Материалы 3-ей международной научно-практической школы-конференции МЕДБИОТЕК «Актуальные вопросы инновационной деятельности в биологии и медицине» 2006г. Москва, С.8-9.
3. **Беккер О.Б.**, Елизаров С.М., Алексеева М.Т., Любимова И.К., Даниленко В.Н. Ca^{2+} - зависимая модуляция устойчивости к антибиотикам у *Streptomyces lividans* 66 и *Streptomyces coelicolor* A3(2) // Микробиология. 2008 , Т.77. 5. С.630-638.
4. Danilenko V.N., Simonov A.Y., Lakatos S.A., Kubbutat M.H.G., Totzke F., Schachtele C., Elizarov S.M., **Bekker O.B.**, Printsevskaya S.S., Luzikov Y.N., Reznikova M.I., Shtil A.A., Preobrazhenskaya M.N. Search for inhibitors of bacterial and human protein kinases among derivatives of diazepines[1,4] annelated with maleimide and indole cycles // J. Med. Chem. 2008. V.51, P.7731–7736.
5. **Беккер О. Б.**, Алексеева М. Г., Осолодкин Д. И., Палюлин В. А., Елизаров С. М., Зефиоров Н.С., Даниленко В. Н. Новая тест-система для скрининга ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ: конструктор *Escherichia coli* aphVIII/pk25 // ActaNature 2010, Т.2 №3(6), С.126-39.
6. **Беккер О. Б.**, Алексеева М. Г., Елизаров С. М., Даниленко В. Н. Новая тест-система для скрининга ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ: *Escherichia coli* aphVIII/pk25 // Конгресс ЕвразияБио-2010, С.24-26.