

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ ИМ. Н.И. ВАВИЛОВА РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Маслов Дмитрий Антонович

**Создание тест-системы для отбора ингибиторов серин-треониновых
протеинкиназ микобактерий**

03.02.07 - генетика.

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

**Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор В.Н. Даниленко**

Москва 2016 г.

Содержание

СОДЕРЖАНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ПРОБЛЕМА ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА	13
1.1. ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫЕ ПРЕПАРАТЫ И МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ К НИМ ..	14
1.1.1. Рифампицин	14
1.1.2. Изониазид	15
1.1.3. Пиразинамид	16
1.1.4. Этамбутол	17
1.1.5. Фторхинолоны	18
1.1.6. Аминогликозиды	18
1.1.7. Этионамид	20
1.1.8. Сиртуро/Бедаквилин/ТМС207	20
1.1.9. Разработка новых противотуберкулезных препаратов	21
ГЛАВА 2. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СЕРИН-ТРЕОНИНОВЫЕ ПРОТЕИНКИНАЗЫ ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО ТИПА	28
ГЛАВА 3. СТПК <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	36
3.1. РкNA и РкNB	38
3.2. РкND	41
3.3. РкNE	42
3.4. РкNF	42
3.5. РкNG	43
3.6. РкNH	44
3.7. РкNI	45
3.8. РкNJ	45
3.9. РкNK	46

3.10. PknL	47
3.11. СЕРИН-ТРЕОНИНОВАЯ ФОСФАТАЗА PstP <i>M. TUBERCULOSIS</i>	48
3.12. СТПК <i>M. TUBERCULOSIS</i> КАК НОВЫЕ БИОМИШЕНИ	49
ГЛАВА 4. ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОТБОРА ИНГИБИТОРОВ СТПК НА ОСНОВЕ ГЕНА АМИНОГЛИКОЗИД ФОСФОТРАНСФЕРАЗЫ ТИПА VIII <i>S. RIMOSUS</i>	53
ГЛАВА 5. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	57
5.1. ШТАММЫ БАКТЕРИЙ.....	57
5.2. ВЕКТОРЫ, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК	57
5.3. ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ В РАБОТЕ	59
5.3. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ БАКТЕРИЙ.....	61
5.4. МАНИПУЛЯЦИИ С ДНК	62
5.4.1. Выделение плазмидной ДНК	62
5.4.2. Очистка фрагментов ДНК из агарозного геля.....	62
5.4.3. Очистка ДНК из реакционной смеси	62
5.4.4. Амплификация	62
5.4.5. Рестрикция.....	63
5.4.6 Лигирование.....	63
5.4.7. Электрофорез ДНК в агарозном геле.	64
5.4.8. Определение количества ДНК.....	64
5.4.9. Процедура сайт-направленного мутагенеза области <i>Ser-146</i> аминогликозидфосфотрансферазы <i>AphVIII</i>	64
5.5. ТРАНСФОРМАЦИЯ	65
5.5.1 Получение компетентных клеток <i>E. coli</i>	65
5.5.2 Трансформация клеток <i>E. coli</i>	65
5.5.3. Получение электрокомпетентных клеток <i>M. smegmatis</i>	66
5.5.4. Электропорация <i>M. smegmatis</i>	66
5.5.5. Скрининг клонов с помощью ПЦР	67

5.6. РАБОТА С БЕЛКАМИ	67
5.6.1. Получение общего белкового лизата клеток <i>E. coli</i>	67
5.6.2. Получение общего белкового лизата клеток <i>M. smegmatis</i>	68
5.6.3. Электрофорез белков в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях.....	68
5.6.4. Очистка белков <i>RknA M. tuberculosis</i> и <i>AphVIII</i> с гистидиновой меткой из клеток <i>E. coli</i>	69
5.6.5. Постановка <i>in vitro</i> киназной реакции.....	70
5.7. МЕТОДИКА ТЕСТИРОВАНИЯ СОЕДИНЕНИЙ В ТЕСТ-СИСТЕМЕ	
<i>M. SMEGMATIS APHVIII+</i>	71
5.8. ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЯ TSV-395 В ОТНОШЕНИИ	
<i>M. TUBERCULOSIS</i>	72
5.8.1. Исследование бактериостатического и бактерицидного действия TSV-395 на лекарственно-чувствительный и МЛУ штаммы <i>M. tuberculosis</i>	72
5.8.2. Исследование антимикобактериальной активности и токсичности TSV-395 в системе <i>ex vivo</i> инфицированных перитонеальных макрофагов мыши	72
5.9. АНАЛИЗ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ АМИНОПИРИДИНОВ И АМИНОПИРИМИДИНОВ	73
5.10. БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ	74
ГЛАВА 6. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	75
6.1. ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ <i>M. SMEGMATIS</i> КАК МОДЕЛИ ДЛЯ ОТБОРА ИНГИБИТОРОВ СТПК <i>M. TUBERCULOSIS</i>	75
6.2. КОНСТРУИРОВАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ <i>M. SMEGMATIS APHVIII+</i>	81
6.2.1. Клонирование и экспрессия гена <i>aphVIII</i> в клетках <i>M. smegmatis mc² 155</i>	81
6.2.3. Валидация тест-системы <i>M. smegmatis aphVIII+</i>	90
6.2.4. Мутагенез <i>aphVIII</i> с целью повышения сродства сайта фосфорилирования <i>APHVIII</i> с субстратами <i>RknB</i>	94

6.3. Идентификация СТПК, участвующих в функционировании тест-системы <i>M. smegmatis</i> <i>ARHVIII</i> +	98
6.3.1. Бионформатический анализ СТПК <i>M. smegmatis</i> для установления кандидатов на наибольший вклад в фосфорилирование <i>ARHVIII</i>	98
6.3.2. Исключение <i>MSMEG_5437</i> из числа СТПК, фосфорилирующих <i>ARHVIII</i> в клетках <i>M. smegmatis</i>	100
6.4. Первичный отбор ингибиторов микобактериальных СТПК в тест-системе <i>M. smegmatis</i> <i>ARHVIII</i> +	103
6.4.1. Отбор ингибиторов микобактериальных СТПК среди низкомолекулярных соединений класса азолотетразинов.....	103
6.4.2. Молекулярный докинг <i>TSV-395</i> в АТФ-связывающий карман <i>RknA</i> <i>M. tuberculosis</i>	108
6.4.3. Исследование антимикобактериального действия <i>TSV-395</i> <i>in vitro</i> на <i>M. tuberculosis</i>	109
6.4.4. Исследование антимикобактериальной активности и токсичности <i>TSV-395</i> в системе <i>ex vivo</i> макрофагов, инфицированных <i>M. tuberculosis</i> <i>H37Rv</i> и <i>MS-115</i>	110
6.4.5. Доклинические испытания соединения <i>TSV-395</i> , как потенциального противотуберкулезного препарата нового поколения.....	110
6.4.6. Отбор ингибиторов микобактериальных СТПК класса аминопиридинов и аминопиримидинов.....	111
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	116
ВЫВОДЫ	118
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В РАБОТЕ	119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	120
БЛАГОДАРНОСТИ	148

Введение

Туберкулез является одним из самых социально-значимых заболеваний современности, уносящим более миллиона человеческих жизней ежегодно, и особенно опасным при коинфекции ВИЧ-туберкулез [WHO, 2015]. Одной из причин трудности лечения туберкулеза в настоящее время является массовое возникновение множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) у возбудителя туберкулеза. К появлению МЛУ-штаммов часто приводит несвоевременно прерванное лечение или неудачно подобранный курс химиотерапии. Среди штаммов МЛУ особенно опасны штаммы с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ), устойчивые к 4–9 препаратам [Matteelli et al., 2014; Sotgiu et al., 2009]. Улучшение результатов лечения туберкулеза зависит от развития современной фармацевтики, главным направлением которого является разработка технологических подходов к созданию новых лекарственных средств путем воздействия на новые биомишени, важные для жизнедеятельности возбудителя туберкулеза - *Mycobacterium tuberculosis*. Важнейшими среди таких мишеней являются протеинкиназы – белки, осуществляющие передачу внутриклеточных сигналов. Серин-треониновые протеинкиназы (СТПК) – одни из наиболее универсальных регуляторов жизнеспособности про- и эукариотических клеток. Эти ферменты у микобактерий, в частности, регулируют такие важные процессы жизнедеятельности клетки, как рост и деление, вирулентность, персистенция и природная лекарственная устойчивость к антибиотикам. [Canova et al., 2014; Cousin et al., 2013; Danilenko et al., 2011; Forrellad et al., 2013; Прозоров и др., 2014].

Концепция разработки антибактериальных препаратов (в том числе противотуберкулезных), применяемая в течение последних 15 лет, основана на биохимическом мишень-направленном отборе соединений, ингибирующих жизненно важные ферменты. Эта концепция оказалась относительно ограниченной, применительно к *M. tuberculosis*, в связи с тем, что подавляющее

большинство отобранных таким способом соединений не оказывало действие на бактериальную клетку в силу разных причин, одной из которых является непроницаемость бактериальной клеточной стенки для этих химических соединений [Cohon et al., 2012]. В последнее время наметилась тенденция к возвращению на новом уровне знаний и техники к высокопроизводительному отбору на бактериальных культурах *M. tuberculosis* H37Rv, а также родственных ему модельных штаммах *M. bovis* BCG и *M. smegmatis* [Ananthan et al., 2009; Cooper, 2013]. При этом исследуются библиотеки из числа химических соединений, достигающего нескольких миллионов [Ballell et al., 2013], а позже возникает необходимость установления внутриклеточной биомиссии, на которую действует отобранное вещество [Cooper, 2013].

В нашей лаборатории разработана тест-система на основе штамма *Streptomyces lividans* ТК24(66) для прескрининга ингибиторов СТПК [Danilenko et al., 2008]. Ключевым элементом разработанной тест-системы является фермент аминогликозид-3'-фосфотрансфераза типа VIII (AphVIII) штамма *Streptomyces rimosus* ATCC 10970, обеспечивающий устойчивость актинобактерий к аминогликозидным антибиотикам. Из *S. rimosus* ATCC10970 был изолирован и секвенирован ген *aphVIII*, проведено клонирование его в штамм *E. coli* BL21(DE3) в составе экспрессионного вектора pET16b под контроль транскрипционного и трансляционного сигналов бактериофага T7 в рамке считывания с ATG экспрессионного участка [Sizova et al., 2002]. Важной особенностью белка APHVIII *S. rimosus* ATCC 10970 является зависимость активности фермента от уровня его фосфорилирования СТПК [Елизаров и др., 2005]. Установлена кристаллическая 3D структура белка APHVIII, депонированная в банк данных www.rcsb.org с кодом 4H05. Методами направленного мутагенеза установлено, что ключевым для модуляции активности APHVIII является фосфорилирование по остатку Ser-146 в активационной петле фермента. Сравнительный анализ канамицикиназной активности нефосфорилированной и фосфорилированной форм исходного и мутантных вариантов белка APHVIII показал, что

фосфорилированная форма APHVIII в 6-7 раз активнее нефосфорилированной [Елизаров и др., 2012].

Геном штамма *M. smegmatis mc² 155* содержит 13 генов серин-треониновых протеинкиназ (СТПК) эукариотического типа, как минимум четыре из которых (PknA, PknB, PknG и PknL) являются гомологами СТПК *M. tuberculosis*, а гены, кодирующие их, присутствуют в геномах всех представителей рода *Mycobacterium*, а PknA и PknB являются жизненно важными для нормального роста и клеточного деления, что делает их привлекательными биомишенями [Sasseti et al., 2003].

Цель работы. Создать тест-систему на основе штамма *M. smegmatis*, экспрессирующего ген *aphVIII*, для мишень-направленного отбора ингибиторов микобактериальных СТПК, в том числе СТПК *M. tuberculosis* – потенциальных противотуберкулезных препаратов нового поколения и провести отбор активных ингибиторов СТПК среди соединений новых химических классов.

Задачи.

1. Исследовать возможность использования быстрорастущей непатогенной бактерии *M. smegmatis* в качестве модели для отбора ингибиторов СТПК *M. tuberculosis*;
2. Сконструировать тест-систему *M. smegmatis aphVIII+* и валидировать ее со стандартными ингибиторами СТПК;
3. Установить основные СТПК, способные фосфорилировать белок APHVIII в микобактериях, являющиеся мишенями отбираемых ингибиторов, исследовать возможность мутагенеза *aphVIII* с целью повышения узнаваемости жизненно-важными СТПК микобактерий;
4. Провести *in vitro* исследования киназной активности СТПК-мишеней и изучить ингибирование этой активности стандартными ингибиторами СТПК;

5. Провести в сконструированной тест-системе отбор ингибиторов СТПК среди низкомолекулярных соединений различных химических классов.

Научная новизна. Впервые исследована возможность использования *M. smegmatis*, как модельного объекта для отбора ингибиторов СТПК возбудителя туберкулеза микобактерии *M. tuberculosis*. Впервые проведена экспрессия гена аминокликозидфосфотрансферазы типа VIII (*aphVIII*) *S. rimosus* в клетках *M. smegmatis*, исследовано, какие СТПК *M. smegmatis* принимают участие в фосфорилировании этого белка, и, следовательно, являются потенциальными мишенями для отбора ингибиторов. Впервые исследовано *in vitro* действие ингибиторов СТПК различных химических классов на активность белка APHVIII.

Практическая значимость. Созданная и валидированная тест-система *M. smegmatis aphVIII+* совмещает в себе плюсы отбора потенциальных противотуберкулезных препаратов на клеточном уровне с мишень-направленным скринингом *in vitro*. На примере проведенного отбора среди низкомолекулярных соединений классов триазолотетразинов, аминопиридинов и аминопиримидинов, проявивших антимикобактериальную активность как на клеточном уровне, так и *in vitro*, а также проведенных доклинических испытаний одного из отобранных соединений – TSV-395, было показано, что созданная тест-система может быть использована для поисков новых противотуберкулезных препаратов, соответствующих современным предъявляемым требованиям, в том числе преодолевающих проблему лечения туберкулеза, вызванного МЛУ-штаммами *M. tuberculosis*.

Положения, выносимые на защиту:

1. Быстрорастущая бактерия *M. smegmatis*, содержащая в своем геноме гены, кодирующие гомологи СТПК *M. tuberculosis*, является подходящей моделью для отбора ингибиторов СТПК *M. tuberculosis*;

2. Тест-система *M. smegmatis aphVIII+* способна отбирать активные ингибиторы микобактериальных СТПК, в частности жизненно-важной PknA;
3. Отбираемые в тест-системе вещества ингибируют непосредственно СТПК, а не белок APHVIII;
4. Отобранные в тест-системе *M. smegmatis aphVIII+* соединения являются потенциальными противотуберкулезными средствами нового поколения.

Степень достоверности и апробация результатов.

Автором опубликовано 3 статьи по теме диссертации в журналах, рекомендованных ВАК, и в международных рецензируемых изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, а также 3 патента.

Промежуточные и итоговые результаты диссертационной работы были представлены на российских и международных конференциях, в том числе: на 38м конгрессе Федерации Европейских Биохимических Сообществ (38th FEBS Congress, Санкт-Петербург, июль 2013 г.), на II конгрессе национальной ассоциации фтизиатров (Санкт-Петербург, ноябрь 2013 г.) и на Саммите по туберкулезу 2015 (The 2015 TB Summit, Лондон, март 2015 г.). Доклады по теме диссертации проводились на ежегодных отчетах аспирантов ИОГен РАН в 2011-2013 гг.

Апробация диссертационной работы была проведена 26 мая 2016 г. на межлабораторном семинаре ИОГен РАН.

Список опубликованных работ по теме диссертации.

В журналах рекомендованных ВАК и иностранных рецензируемых журналах:

1. **Maslov D.A.**, Zaïchikova M.V., Chernousova L.N., Shur K.V., Bekker O.B., Smirnova T.G., Larionova E.E., Andreevskaya S.N., Zhang Y., Danilenko V.N. Resistance to pyrazinamide in Russian Mycobacterium tuberculosis isolates:

- pnсA sequencing versus Bactec MGIT 960. // Tuberculosis (Edinb). 2015, 95(5), Pp. 608–612.
2. Bekker O.B., Sokolov D. N., Luzina O. A., Komarova N. I., Gatilov Y. V., Andreevskaya S. N., Smirnova T.G., **Maslov D. A.**, Chernousova L. N., Salakhutdinov N. F., Danilenko V.N. Synthesis and activity of (+)- and (-)-usnic acid derivatives containing 1,3-thiazole cycle against *Mycobacterium tuberculosis* // Medicinal Chemistry Research. March 2015, DOI 10.1007/s00044-015-1348-2.
 3. Елизаров С.М., Алексеева М.Г., Новиков Ф.Н., Чилов Г.Г., **Маслов Д.А.**, Штиль А.А., Даниленко В.Н. Идентификация сайтов фосфорилирования аминогликозидфосфотрансферазы VIII *Streptomyces rimosus* // Биохимия. 2012. т.77, вып.11, С.1504-1512.

Патенты по теме исследования:

1. **Маслов Д. А.**, Беккер О.Б., Даниленко В. Н. Тест-система *Mycobacterium smegmatis aphVIII+* для скрининга ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ эукариотического типа. // Патент РФ № 2566998, от 27.10.2015.
2. Беккер О.Б., Даниленко В.Н, Ишметова Р.И., Коротина А.В., **Маслов Д. А.**, Русинов Г.Л., Толщина С.Г., Чарушин В.Н. Противотуберкулезное лекарственное средство: композиция имидазо[1,2-В] тетразина с пиратнамидом. // Патент РФ № 2545458, от 27.03.2015
3. Беккер О.Б., Даниленко В.Н., Ишметова Р.И., **Маслов Д.А.**, Русинов Г.Л., Толщина С.Г., Чарушин В.Н. Замещенные азоло[1,2,4,5]тетразины – ингибиторы актинобактериальных серин-треониновых протеинкиназ.] // Патент РФ № 2462466, от 27.09.2012.

Участие в конференциях с докладами по теме исследования:

1. **Маслов Д.А.**, Беккер О.Б., Алексеева М.Г., Даниленко В.Н. Ингибиторы микобактериальных серин-треониновых протеинкиназ классов

- аминопиримидинов и аминопиридинов – потенциальные противотуберкулезные препараты нового поколения. // Структура и динамика молекулярных систем: сб. тезисов докладов и сообщений на XXIII Всерос. конф. – Москва : ИФХЭ РАН, 2016, с. 87-88.
2. Беккер О.Б., Кравченко М.А., **Маслов Д.А.**, Даниленко В.Н. Отбор кандидатов в потенциальные противотуберкулезные препараты среди соединений классов аминопиримидинов и аминопиридинов. // Структура и динамика молекулярных систем: сб. тезисов докладов и сообщений на XXIII Всерос. конф. – Москва : ИФХЭ РАН, 2016, с. 14.
 3. **D.A. Maslov**, O.B. Bekker, T.G. Smirnova, E.E. Larionova, S.N. Andreevskaya, L.N. Chernousova, Y. Zhang, V.N. Danilenko. Resistance to pyrazinamide in Russian *Mycobacterium tuberculosis* isolates. // Speaker Papers by The 2015 TB SUMMIT European Scientific Conferences, United Kingdom, London, March 23-26, 2015. **Устный доклад Маслова Д.А.**
 4. Bekker O.B., **Maslov D.A.**, Danilenko V.N. *M. smegmatis* *aphVIII*+ Test-System For Primary Screening Of Mycobacterial Serine/Threonine Protein Kinase(S) Inhibitors. // The 2015 TB SUMMIT, European Scientific Conferences, United Kingdom, London, March 23-26, 2015. **Постерный доклад.**
 5. **Маслов Д.А.**, Беккер О.Б., Мавлетова Д.А., Черноусова Л.Н., Андреевская С.А., Русинов Г.Л., Чарушин В.Н., Даниленко В.Н. Отбор и доклинические испытания азолотетразина ТАТ-395 — противотуберкулезного вещества, ингибитора протеинкиназы PknB // Сб. тезисов II конгресса национальной ассоциации фтизиатров. Ноябрь 2013 г. СПб., 2013. 268 с. **Пленарный доклад Маслова Д.А.**
 6. **Maslov D**, Zhukova Y, Bekker O, Alekseeva M, Danilenko V. 2013. Developing a *Mycobacterium smegmatis* based test-system for screening mycobacterial protein kinase PknB inhibitors-potential next generation anti-tuberculosis drugs. // FEBS JOURNAL 280 (Suppl. 1):280–281. **Постерный доклад.**

Глава 1. Проблема лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза

Туберкулез, возбудителем которого является бактерия *Mycobacterium tuberculosis*, по оценкам ВОЗ, инфицировавшая 1/3 мировой популяции (2-3 миллиарда человек), является одним из главных инфекционных заболеваний нашего времени [WHO, 2015]. Согласно ежегодному отчету ВОЗ, в 2014 году 9,6 миллиона человек заболели и 1,5 миллиона умерли от этого заболевания. Туберкулез, при этом, является лидером по уровню смертности ВИЧ-положительных пациентов – 400000 смертей в 2014 году [WHO, 2015]. Основной проблемой лечения туберкулеза является возникновение форм с МЛУ, определяемой как устойчивость *M. tuberculosis* к самым эффективным и низкотоксичным противотуберкулезным препаратам первого ряда – рифампицину и изониазиду [Gandhi et al., 2010], что приводит к необходимости использования более дорогих и токсичных препаратов второго ряда [Camirero et al., 2010]. Частным случаем МЛУ является ШЛУ, определяемая, как МЛУ с дополнительной устойчивостью к одному препарату из группы фторхинолонов и одному из инъекционных препаратов второго ряда (амикацин, канамицин или капреомицин) [Camirero et al., 2010]. В последние годы в Иране, Индии и ЮАР также описаны случаи, так называемой, тотальной лекарственной устойчивости, т.е. устойчивости ко всем применяемым противотуберкулезным препаратам первого и второго ряда [Klopper et al., 2013; Parida et al., 2015; Velayati et al., 2013]. Россия и страны пост-Советского пространства являются мировыми лидерами по распространению туберкулеза с МЛУ [Прозоров и др., 2012]: 19% всех впервые диагностированных случаев туберкулеза и 49% ранее леченых имеют МЛУ [WHO, 2015].

В основе лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* лежат случайные хромосомные мутации, происходящие с частотой 10^{-6} - 10^{-8} на одно деление бактериальной клетки. При полностью случайном характере возникновения

мутаций устойчивости, практически невозможно было бы встретить *M. tuberculosis*, устойчивую к двум, трем и более препаратам одновременно, особенно в случае комбинированной терапии. Однако в реальных условиях происходит искусственный отбор устойчивых мутантов за счет различных человеческих факторов: монотерапия, обусловленная отсутствием запасов необходимых лекарств, неправильные или неэффективные врачебные рекомендации по режиму химиотерапии, а также несоблюдение режима химиотерапии самими пациентами [Vareldzis et al., 1994].

Базовый режим противотуберкулезной химиотерапии (Short Course Chemotherapy, SCC) рассчитан на 6 месяцев и включает 4 противотуберкулезных препарата первой линии (рифампицин, изониазид, этамбутол и пиразинамид). В случае диагностирования МЛУ или ШЛУ применяются более сложные режимы, рассчитанные на 1,5-2 года [Прозоров и др., 2012].

Рассмотрим основные противотуберкулезные препараты и механизмы устойчивости к ним.

1.1. Противотуберкулезные препараты и механизмы устойчивости к ним

1.1.1. Рифампицин

Рифампицин начал применяться в противотуберкулезной терапии в 1968, как полусинтетическое производное природных рифамицинов [Sensi, 1983]. Является одним из важнейших противотуберкулезных препаратов первого ряда. Активен в отношении как активно делящихся, так и находящихся в покоящемся состоянии бацилл. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) варьирует в пределах от 0.05 до 2 мкг/мл в твердой и жидкой средах. Чувствительными к рифампицину считаются штаммы, имеющие МИК до 40 мкг/мл в среде Левинштейна-Йенсена [Mitchison, 1985b].

Рифампицин ингибирует синтез мРНК, связываясь с β -субъединицей РНК-полимеразы (кодирующий ген – *rpoB*). Мутации в гене *rpoB* приводят к устойчивости к рифампицину у *M. tuberculosis* и отвечают за 96% случаев. Чаще всего встречаются замены в кодонах 531, 526 и 516 [Telenti et al., 1993].

Особую опасность представляют рифампицин-зависимые штаммы *M. tuberculosis*. Эти штаммы растут медленно в отсутствие рифампицина, однако, механизмы их зависимости не изучены [Zhang et al., 2009b].

Устойчивость к рифампицину также с высокой вероятностью является маркером МЛУ [Traore et al., 2000], т.к. моноустойчивость к рифампицину – очень редкое явление, встречающееся в основном у ВИЧ-положительных пациентов [Vernon et al., 1999].

Более того, существуют штаммы, несущие компенсаторные мутации в генах *rpoA* и *rpoC*, позволяющие восстановить понижение активности РНК-полимеразы без адаптационных потерь [Casali et al., 2014]. Как правило, такие штаммы относятся к группе Beijing B0/W, широко распространенной в России и характеризующейся повышенной частотой развития лекарственной устойчивости и повышенной вирулентностью [Mokrousov et al., 2012].

1.1.2. Изониазид

Изониазид, открытый в 1952 году является наиболее эффективным противотуберкулезным препаратом первого ряда (МИК – 0.02-0.2 мкг/мл). Изониазид является пред-лекарством и должен быть трансформирован в активную форму ферментом каталазой-пероксидазой (кодируется геном *katG*), образуя ряд лабильных окислительных соединений, поражающих множественные мишени в *M. tuberculosis* [Zhang et al., 1992]. Основной мишенью является энол-ацил-протеинредуктаза, кодируемая геном *inhA*: одна из форм активированного изониазида связывается с НАД-Н (никотинаминадинуклеотид) и поражает InhA,

ингибируя синтез миколовых кислот – важнейшего компонента клеточной стенки микобактерий [Banerjee et al., 1994; Rawat et al., 2003; Rozwarski et al., 1998].

Мутации устойчивости к изониазиду встречаются чаще других – 10^{-5} – 10^{-6} *in vitro*. Основным механизмом устойчивости – возникновение мутаций в кодоне 315 гена *katG* (S315T), приводящих к потере каталазной и пероксидазной функции [Zhang et al., 1992]. Также встречаются мутации в промоторной области оперона *mabA-inhA*, повышающие экспрессию *inhA*, либо в активном центре *inhA*, понижающие афинность кодируемого им белка к комплексу изониазид-НАД-Н. По последним данным, мутация S315T в гене *katG* ответственна за 66% случаев устойчивости клинических изолятов *M. tuberculosis* к изониазиду, еще 19% обусловлены мутацией в промоторе *inhA* -15 [Seifert et al., 2015].

Как и в случае с рифампицином, встречаются мутации в регуляторной области гена алкил-гидропероксидазы *ahpC* [Casali et al., 2014], компенсирующей потерю пероксидазной функции, а также сниженную вирулентность у *katG*-мутантов [Zhang et al., 1992].

1.1.3. Пиразинамид

Пиразинамид является ключевым препаратом первого ряда, позволившим сократить противотуберкулезную химиотерапию в отношении лекарственно-чувствительных штаммов до современных шести месяцев, благодаря его стерилизующей активности *in vivo* [Mitchison, 1985a]. Пиразинамид рекомендован к лечению как лекарственно-чувствительного, так и лекарственно-устойчивого туберкулеза [WHO, 2010].

Пиразинамид является уникальным лекарством, практически лишенным активности в отношении активно делящихся *M. tuberculosis*, но убивающим покоящихся, персистирующих бацилл [Zhang et al., 2003b]. МИК пиразинамида достаточно велик и достигает 50 мкг/мл [Zhang et al., 2003b]. При этом пиразинамид активен только в кислой среде [McDermott et al., 1954], также его

действие усиливается анаэробными условиями [Wade et al., 2004]. Пиразинамид, как и изониазид, является пролекарством, нуждающимся в активации ферментом пиразинамидазой *M. tuberculosis* в активную форму – пиразиновую кислоту [Scorpio et al., 1996]. Мутации в гене *pncA*, кодирующем пиразинамидазу, являются основным механизмом устойчивости *M. tuberculosis* к пиразинамиду [Cheng et al., 2000; Scorpio et al., 1997; Scorpio et al., 1996]. Одним из возможных механизмов действия пиразинамида является нарушение мембранного потенциала протонированной пиразиновой кислотой, приводящее к нарушению многих клеточных процессов [Zhang et al., 2003b]. Также недавно было обнаружено, что рибосомальный белок S1 (RpsA) является молекулярной мишенью пиразиновой кислоты [Shi et al., 2011]. У клинических изолятов *M. tuberculosis*, устойчивых к пиразинамиду, но имеющих ген *pncA* дикого типа, были обнаружены мутации в гене *rpsA* [Shi et al., 2011; Simons et al., 2013]. RpsA является ключевым белком транс-трансляции, механизма освобождения заблокированных рибосом или поврежденной мРНК, что очень важно для покоящихся персистирующих клеток [Muto et al., 2000; Thibonnier et al., 2008]. Еще одним геном, вовлеченным в устойчивость к пиразинамиду, является *panD*, кодирующий аспартат-декарбоксилазу, участвующую в синтезе пантотената и кофермента А [Zhang et al., 2013].

Устойчивость к пиразинамиду может сильно влиять на клинический прогноз, особенно в случае МЛУ туберкулеза [Zhang et al., 2012]. В разных регионах мира доля пиразинамид-устойчивых штаммов МЛУ туберкулеза варьирует в пределах от 10% до 85% [Zhang et al., 2012].

1.1.4. Этамбутол

Препарат первого ряда этамбутол, являясь структурным аналогом арабинозы, ингибирует синтез арабиногалактана и, соответственно, клеточной стенки микобактерий, оказывая бактериостатический эффект [Sareen et al., 1990].

Основным механизмом устойчивости к этамбутолу являются мутации в гене арабинозилтрансферазы В *embB*, самой частой из которых является мутация в кодоне 306 этого гена [Sreevatsan et al., 1997], хотя встречаются мутации и в других областях как этого гена, так и в регуляторной области *embCAB*-оперона – в межгенном пространстве между *embC* и *embA* [Brossier et al., 2015]. Показана возможная роль гена *ubiA*, также вовлеченного в биохимический путь синтеза арабиногалактана [He et al., 2015].

1.1.5. Фторхинолоны

Фторхинолоны – синтетические противотуберкулезные препараты второго ряда. Применяются для лечения МЛУ туберкулеза, при этом устойчивость к фторхинолонам сильно усложняет дальнейшее медикаментозное лечение туберкулеза и является необходимым фактором для классификации штамма ШЛУ. Самым лучшим препаратом из ряда фторхинолонов на сегодняшний день является моксифлоксацин [Mayer et al., 2014]. Основным механизмом устойчивости к фторхинолонам являются мутации в генах *gyrA* и *gyrB*, кодирующих А и В субъединицы ДНК-гиразы (топоизомеразы II), являющейся мишенью для этих препаратов [Xu et al., 1996].

Также установлено участие белка MfrA в устойчивости к фторхинолонам ципрофлоксацину и спарфлоксацину. Белок MfrA, имеющий форму правозакрученной четырехсторонней β -спирали, повторяющей размер, форму и электростатический заряд В-формы ДНК, связывается и ингибирует ДНК-гиразу, придавая устойчивость к фторхинолонам [Hegde et al., 2005].

1.1.6. Аминогликозиды

Стрептомицин является старейшим противотуберкулезным препаратом, введенным в медицинскую практику в 40х годах XX века [Прозоров и др., 2012].

Стрептомицин ингибирует процесс трансляции, мишенью стрептомицина является 30S субъединица рибосомы, а основными механизмами устойчивости – мутации в генах *rrs*, кодирующем 16S рРНК, и *rpsL*, кодирующем S12 рибосомальный белок, ответственные, соответственно, за 20% и 50% случаев устойчивости к стрептомицину [Sreevatsan et al., 1996; Zhang et al., 2009b]. Также показано участие гена *gidB*, кодирующего 16S рРНК метилтрансферазу, в приобретении клетками микобактерий туберкулеза низкого уровня устойчивости к стрептомицину [Wong et al., 2011], который может способствовать отбору мутантов с высоким уровнем устойчивости вследствие неправильной терапии [Verma et al., 2014].

Канамицин и его производное амикацин также поражают 16S рРНК, а наиболее частой мутацией устойчивости является мутация в позиции 1400 гена *rrs* [Alangaden et al., 1998], хотя встречаются и другие мутации в том же гене [Suzuki et al., 1998].

Обнаружены мутации в гене *tlyA*, приводящие к устойчивости к полипептидным антибиотикам капреомицину и виомицину, изменяющие метилирование 16S рРНК и, таким образом, ухудшающие взаимодействие антибиотиков с 30S субъединицей рибосомы [Maus et al., 2005a]. Мутации в гене *rrs* могут приводить к перекрестной устойчивости к канамицину, амикацину, капреомицину и виомицину [Maus et al., 2005b]. Еще одним механизмом низких уровней перекрестной устойчивости к аминогликозидным антибиотикам являются мутации в 5'-некодирующей области гена *whiB7* [Reeves et al., 2013], кодирующего транскрипционный фактор, регулирующий экспрессию целого ряда генов, обеспечивающих природную устойчивость микобактерий к антибиотикам [Morris et al., 2005; Nguyen et al., 2006].

1.1.7. Этионамид

Этионамид, как и изониазид и пиразинамид, является пролекарством, которое должно быть активировано флаavin аденозин динуклеотид (ФАД)-содержащей монооксигеназой, кодируемой геном *etaA*, мутации в котором приводят к перекрестной устойчивости ко всем тиоамидам [DeBarber et al., 2000; Vannelli et al., 2002]. При этом, биомишень этионамида совпадает с мишенью изониазида и мутации в гене *inhA* приводят к перекрестной устойчивости к этим антибиотикам [Banerjee et al., 1994].

1.1.8. Сиртуро/Бедаквилин/ТМС207

Бедаквилин (торговое название Сиртуро, более ранние – ТМС207 и R207910), является новейшим противотуберкулезным препаратом, одобренным к применению в терапии туберкулеза в 2012 году. Изначально бедаквилин был отобран на *M. smegmatis*, показал высокую активность *in vitro* на *M. tuberculosis*, как на лекарственно-чувствительных, так и на МЛУ штаммах (МИК \leq 0,06 мкг/мл), а его основной мишенью была установлена С-субъединица F₁F₀-АТФ-синтазы (ген *atpE*, мутации в кодонах 32 и 63) [Andries et al., 2005]. Позже были обнаружены мутации в гене *atpE*, придающие клеткам микобактерий туберкулеза устойчивость к этому препарату [Segala et al., 2012], а также было показано, что бедаквилин связывается и с субъединицей ϵ F₁F₀-АТФ-синтазы (ген *atpC*), нарушая взаимодействие этих двух субъединиц [Biukovic et al., 2013].

Обнаружен механизм устойчивости к бедаквилину, связанный с геном *Rv0678*, являющимся транскрипционным репрессором оперона *Mmps5-Mmpl5*, кодирующего трансмембранную помпу, повышающий МИК бедаквилина в 4-32 раза [Andries et al., 2014]. Что любопытно, этот механизм приводит к перекрестной устойчивости с клофазимином, применяемым в комплексной химиотерапии при проказе, и рассматриваемым в качестве потенциального противотуберкулезного препарата [Andries et al., 2014; Hartkoorn et al., 2014].

Бедаквилин является многообещающим препаратом, хотя безопасность его применения и вызывает некоторые опасения [Chahine et al., 2014; Kakkar et al., 2014].

Таким образом, многолетние стандартные курсы химиотерапии, основанные на применении препаратов, разработанных десятилетия назад, привели к существенной проблеме возникновения штаммов с МЛУ и ШЛУ, а также множества различных мутаций устойчивости, наиболее обширный список которых можно найти в Tuberculosis Drug Resistance Database (TBDreamDB) [Sandgren et al., 2009]. Биомишени различных препаратов (в том числе и тех, что не применяются в противотуберкулезной химиотерапии) совпадают, что приводит к перекрестной устойчивости даже с новыми препаратами, такими как бедаквилин.

1.1.9. Разработка новых противотуберкулезных препаратов

Проблема лекарственной устойчивости туберкулеза и длительность современной противотуберкулезной терапии приводят к острой необходимости разработки новых препаратов, способных преодолеть лекарственную устойчивость и/или сократить сроки стандартной химиотерапии.

Требований к кандидатам в новые противотуберкулезные лекарства применяется достаточно много, среди них: активность в отношении как активно реплицирующихся, так и покоящихся бацилл, сопряженная со способностью проникать в ткани и гранулемы, приводя к сокращению терапии; совместимость с уже имеющимися препаратами, используемыми как в противотуберкулезной, так и в терапии сопутствующих заболеваний, таких как ВИЧ/СПИД, ведь пациенты с ВИЧ-ТБ коинфекцией могут принимать одновременно от 6 и более препаратов, увеличивая риск побочных эффектов. Основным же требованием

является действие на новую мишень в клетке *M. tuberculosis*, что позволит преодолеть синдромы МЛУ и ШЛУ [Lechartier et al., 2014].

С наступлением пост-геномной эры в исследованиях туберкулеза, после появления первой полностью секвенированной последовательности генома *M. tuberculosis* в 1998 году [Cole et al., 1998], в разработке противотуберкулезных лекарств наступило разделение на два принципиально различающихся подхода: от мишени к препарату и от препарата к мишени [Lechartier et al., 2014; Sala et al., 2011].

Первый вариант предполагает следующую последовательность разработки противотуберкулезных препаратов:

1. Идентификация и валидация потенциальной биомишени;
2. Нарботка и очистка белка-мишени, *in vitro* определение IC₅₀, изучение кристаллических структур взаимодействия белка и лиганда;
3. Исследование активности в отношении *M. tuberculosis*, определение МИК, оптимизация лидерного соединения, доклинические и клинические исследования.

На этот подход возлагались большие надежды, которые, однако, оправдались в неполной мере. Большинство молекул, показывавших хорошую ингибирующую активность *in vitro* в отношении фермента-мишени, либо не показывали активности *in vitro* на *M. tuberculosis* в силу неспособности проникнуть сквозь бактериальную клеточную стенку, либо не проявляли активности на моделях *in vivo*, из-за того, что выбранная мишень уже не была жизненно важной в этих условиях [Cooper, 2013; Lechartier et al., 2014].

Из успешных опытов такого рода стоит отметить эксперимент по отбору соединения BDM31343, ингибитора EtHR, супрессора EthA, который, в свою очередь, активизирует этионамид [Baulard et al., 2000]. Препарат повышал чувствительность микобактерий к этионамиду и усиливал в три раза его действие в мышинных моделях [Willand et al., 2009].

В связи с низкой эффективностью такого подхода, наметилась тенденция к возврату на более высоком уровне знаний и технологий к более традиционному пути от препарата к мишени, основанному на клеточном отборе [Cooper, 2013]. Этот подход включает в себя следующие стадии:

1. Создание библиотек потенциальных антибактериальных соединений;
2. Исследование *in vitro* активности в отношении *M. tuberculosis*, определение МИК, цитотоксичности, отбор лидерного соединения;
3. Установление механизма действия и биомишени, доклинические исследования, оптимизация лидерного соединения.

Этим путем были открыты все ныне используемые противотуберкулезные препараты, а также большинство новых, включая как уже упоминавшийся бедаквилин [Andries et al., 2005], так и другие, основные из которых представлены в таблице 1.1.

При таком подходе, зачастую, прибегают к высокопроизводительному отбору на бактериальных культурах *M. tuberculosis* H37Rv, а также родственных ему модельных штаммах *M. bovis* BCG и *M. smegmatis* [Ananthan et al., 2009; Cooper, 2013]. При этом исследуются библиотеки из числа химических соединений, достигающего нескольких миллионов, как в случае с компанией GSK, которая, последовательным отбором на штаммах *M. bovis* BCG и *M. tuberculosis* H37Rv, смогла отобрать из двух миллионов соединений семь кандидатов в лекарства, с хорошей активностью, способностью проникать через клеточную стенку и низкой цитотоксичностью [Ballell et al., 2013].

Также, этот подход сопряжен с необходимостью полногеномного секвенирования мутантов, устойчивых к препаратам, для обнаружения потенциальных биомишеней, что становится с каждым годом все дешевле, за счет распространения технологий полногеномного секвенирования следующего поколения (NGS), и дальнейшими исследованиями для подтверждения действия отобранных кандидатов в лекарственные препараты на потенциальные

биомишени, обнаруженные после получения результатов полногеномного секвенирования [Cooper, 2013].

Третьим, более редким, подходом, который использовался в ходе выполнения этой работы, является мишень-направленный отбор на клеточных культурах. При таком подходе предполагается экспрессия гена-мишени, либо репортерного гена в клетках целевого микроорганизма. При этом возможно одновременно отбирать химические соединения, имеющие хорошую биологическую активность из более сфокусированной и, соответственно, менее объемной библиотеки, и действующие на определенную мишень либо биохимический путь. Подтверждение механизма действия в таких случаях также является менее трудоемким [Abrahams et al., 2012; Lechartier et al., 2014].

В самом простом случае используется либо индукция гена-мишени, что делает штамм более устойчивым к мишень-специфическим препаратам, либо его «выключение» антисмысловой РНК или замена промотора гена на индуцибельный/репрессируемый в самой хромосоме, что наоборот делает клетку гиперчувствительной к препарату. Именно контролируемым выключением гена *panC*, кодирующего пантотенат синтазу, участвующую в биосинтезе пантотаната (витамин В5), группе исследователей удалось отобрать соединения, специфически действующие, пусть и не на саму пантотенат синтазу, но на этот биохимический путь, что уже сильно сужает круг возможных мишеней для дальнейшей идентификации [Abrahams et al., 2012].

Таблица 1.1. Разрабатываемые перспективные противотуберкулезные препараты, по [Lechartier et al., 2014] с изменениями и дополнениями.

Название	Класс химического соединения	Механизм действия	Механизм устойчивости	Известная биомишень	Ссылки
РА-824	Нитроимидазола	Ингибирование синтеза клеточной стенки, нарушение клеточного дыхания путем высвобождения активных форм оксида азота	Мутации в генах <i>ddn</i> и <i>fgd1</i> , участвующих в активации лекарства, а также в генах <i>fbiA</i> , <i>fbiB</i> , <i>fbiC</i> , участвующих в биосинтезе кофактора F ₄₂₀	Ферменты биосинтеза F ₄₂₀	[Haver et al., 2015; Manjunatha et al., 2009]
ОРС-67683	Нитроимидазола	Ингибирование синтеза клеточной стенки, высвобождение активных форм оксида азота	Мутации в гене <i>ddn</i> , участвующем в активации лекарства	Нет данных	[Matsumoto et al., 2006]

Q203	Имидазопиридин амиды	Ингибирование комплекса цитохрома <i>bc₁</i>	Мутации в гене <i>qcrB</i> , кодирующего <i>b</i> -субъединицу цитохрома <i>bc₁</i>	Комплекс цитохрома <i>bc₁</i>	[Pethe et al., 2013]
SQ-109	Диэтилен диамины	Ингибирование синтеза клеточной стенки	Мутации в гене <i>mmpL3</i>	Мембранный транспортер мономиколата трегалозы MmpL3	[Protopopov et al., 2005; Tahlan et al., 2012]
BTZ043	Бензотиазиноны	Ингибирование синтеза арабиногалактана	Мутация в гене <i>drpE1</i>	Субъединица декапренилфосфорил- β -D-рибозы 2'-эпимеразы DprE1	[Makarov et al., 2009]

Подход с модификацией промоторов в геноме сопряжен с возможными трудностями, связанными с изменением в динамике роста бактерий, у которых «выключен» жизненно-важный ген, а также со случаями, когда целевой ген находится в составе оперона. Примером тест-системы для мишень-направленного отбора на клеточной культуре может служить разработанная ранее тест-система *Streptomyces lividans aphVIII+*, использующая экспрессию репортерного гена *aphVIII S. rimosus*, придающего клеткам устойчивость к канамицину. Активность AphVIII зависима от его фосфорилирования серин-треониновыми протеинкиназами, что позволяет отбирать ингибиторы этих киназ, наблюдая за изменением в уровне устойчивости клеток к канамицину [Danilenko et al., 2008]. Эта тест-система будет в подробностях рассмотрена в дальнейшем.

Глава 2. Бактериальные серин-треониновые протеинкиназы эукариотического типа

От быстрого реагирования на постоянные изменения окружающей среды зачастую зависит выживание организма. Это адаптивное реагирование зависит от способности клеток воспринимать и проводить внешние и внутренние сигналы. Протеинкиназы и парные им фосфатазы играют ключевую роль в сигнальной трансдукции, катализируя обратимое фосфорилирование белков. При получении внешних стимулов, киназы подвергаются автофосфорилированию, за которым следует фосфорилирование белка-субстрата. Фосфорилирование специфичных аминокислотных остатков (как правило серин, треонин, тирозин, гистидин и аспарагиновая кислота) модулирует активность целевого белка либо напрямую, путем изменения конформации его активационного сайта, либо косвенно, регулируя белок-белковые взаимодействия [Pereira et al., 2011].

Фосфорилирование белков по остаткам серина, треонина и тирозина считается основным механизмом регулирования активности белков и, соответственно, множества клеточных процессов. Оно было впервые открыто у эукариот и долгое время считалось для них эксклюзивным [Bakal et al., 2000]. Эукариотические серин-треониновые и тирозиновые протеинкиназы объединяются в одно семейство по гомологии их каталитических доменов: каталитические домены состоят из 11 консервативных субдоменов, впервые описанных Хенксом и соавторами [Hanks et al., 1995; Hanks et al., 1988], что также привело к обозначениям Хенкс-домены и Хенкс-киназы. Субдомены формируют двудольную структуру, а между долями находится каталитически активный сайт [Hanks et al., 1995; Kornev et al., 2010] (Рис. 2.1). Меньшая N-концевая доля отвечает за взаимодействие с молекулой АТФ, в то время как С-концевая – за связывание субстрата [Pereira et al., 2011].

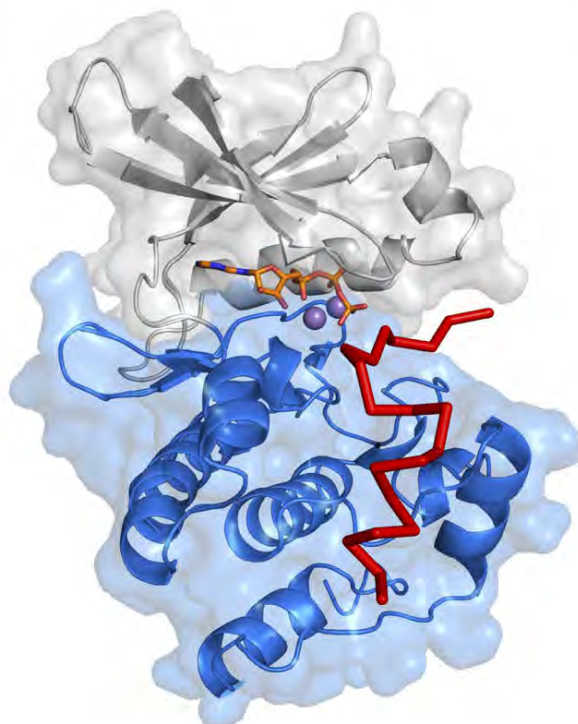


Рисунок 2.1. Кристаллическая структура протеинкиназы РКА мыши в комплексе с молекулой АТФ и ингибиторным пептидом (код доступа в банке данных белков (PDB) 1ATP). N-концевая доля показана серым цветом, С-концевая – синим. Молекула АТФ представлена оранжевыми линиями, два иона магния – сиреневыми сферами, а ингибиторный пептид – красными линиями [Pereira et al., 2011].

Субдомены могут иметь разный размер, что снижает общую гомологию аминокислотных последовательностей каталитических доменов белков этого семейства, но их принадлежность все же может быть установлена по наличию консервативных мотивов и по 12 практически инвариантным аминокислотным остаткам, напрямую или опосредованно принимающим участие в связывании донорной молекулы АТФ и субстрата для дальнейшего катализа [Hanks et al., 1995] (Рис. 2.2).

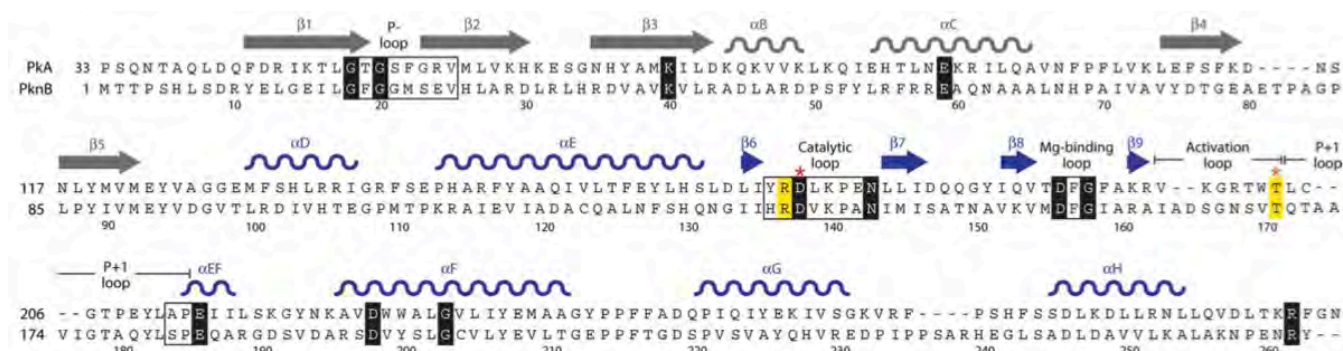


Рисунок 2.2. Выравнивание последовательностей каталитических доменов протеинкиназ PKA мыши и PknB *M. tuberculosis*. Структурные элементы N- и C-концевых долей показаны серым и синим цветами, соответственно. Рамками обозначены консервативные мотивы, а черным выделены инвариантные остатки [Pereira et al., 2011].

Протеинкиназы могут существовать в двух состояниях – включенном и выключенном [Huse et al., 2002]. Переход из одного состояния в другое регулируется различными механизмами, включая связывание с аллостерическими эффекторами и локализацию в различных клеточных компартментах. При этом существенным конформационным изменениям подвергаются как α C-спираль в N-концевой доле, так и активационная петля в C-концевой (рис. 2.2). При обращении α C-спирали к активационной петле (activation loop) становятся возможными множественные взаимодействия между долями, что необходимо для обеспечения киназной активности. Активационная петля входит в состав важнейшего регуляторного элемента киназной активности, так называемого активационного участка, расположенного между консервативными мотивами DFG и APE [Nolen et al., 2004] (рис. 2.2). Этот участок включает в себя сайт связывания с ионами магния, активационную петлю и P+1 петлю. Активационная петля участвует в определении субстрат-специфичности и является самым переменным сегментом активационного участка. Многие СТПК активируются автофосфорилированием или трансфосфорилированием другими киназами по одному или нескольким остаткам серина или треонина. Такая модификация

СТПК приводит к различным структурным изменениям, стабилизирующим активационную петлю в активном положении и позволяющим связывание субстрата и дальнейший катализ [Huse et al., 2002; Nolen et al., 2004]. Эти структурные изменения включают взаимодействие между фосфорилированным остатком серина/треонина в активационной петле и консервативным аргинином, предшествующим активационной петле, или аспаратом в активационной петле так называемых аргинин/аспаратных (RD) киназ. Фосфорилированный остаток серина/треонина может также взаимодействовать с α С-спиралью, сближая доли каталитического домена в активную конформацию. Кроме того, активационная петля является областью белок-белковых взаимодействий для модуляторов активности многих киназ. P+1 петля является важной точкой взаимодействия киназы и ее субстрата и определяет различную субстрат-специфичность СТПК. Эта петля у СТПК включает консервативный остаток серина или треонина, который взаимодействует с каталитической петлей. Также важной является консервативная глицин-богатая P-петля, играющая роль в переносе фосфата и обмене АТФ/АДФ во время каталитического цикла (рис. 2.2). Все эти конформационные изменения приводят к пространственной близости γ -фосфата молекулы АТФ, каталитического аспартата СТПК и серинового либо треонинового остатка-фосфоакцептора белка субстрата, делая возможным перенос γ -фосфата с молекулы АТФ на остаток-фосфоакцептор белка-субстрата [Pereira et al., 2011].

Долгое время считалось, что у прокариот фосфорилирование осуществляется только по остаткам гистидина и аспарагиновой кислоты за счет двухкомпонентных систем (ДКС) [Foussard et al., 2001; Hoch, 2000]. Первым описанным белком бактерий, фосфорилированным по остатку серина была изоцитрат дегидрогеназа *E. coli* [Garnak et al., 1979], хотя в данном случае фосфорилирование обуславливалось бифункциональной киназой/фосфатазой, не имеющей структурной гомологии с СТПК эукариотического типа [Laporte et al.,

1985]. Первой СТПК эукариотического типа, обнаруженной у бактерий, стала Pkn1 *Mycococcus xanthus*. При ее сверхэкспрессии в клетках *E. coli*, она подвергалась автофосфорилированию по остаткам серина и треонина. И хотя было показано, что эта киназа не является жизненно важной, делеция гена *pkn1* приводила к преждевременной дифференциации, указывая на то, что Pkn1 необходима для нормального развития *M. xanthus* [Munozdorado et al., 1991]. Обнаружение трансмембранной СТПК Pkn2 у *M. xanthus* показало наличие у бактерий трансмембранных рецепторных киназ, аналогичных таковым у эукариот и играющих важнейшую роль в клеточной регуляции [Udo et al., 1995]. Ослабленный фенотип *M. xanthus*, мутантных по *pkn1* и *pkn2*, позволил предположить наличие и других СТПК с не жизненно важными функциями, что было подтверждено в последующих исследованиях, выявивших множество СТПК, участвующих в сигнальных путях, контролирующих комплексный жизненный цикл *M. xanthus* [Nariya et al., 2005a; Nariya et al., 2005b; Nariya et al., 2006].

С ускоряющейся расшифровкой бактериальных геномов, у бактерий было обнаружено множество СТПК эукариотического типа, имеющих характерные мотивы в аминокислотных последовательностях каталитических доменов, что показало повсеместное распространение этих ферментов у прокариот [Krupa et al., 2005; Perez et al., 2008; Shi et al., 1998]. Также исследовано большое разнообразие сигнальных путей, контролируемых СТПК эукариотического типа, а наиболее полная подборка киназ и других сигнальных молекул находится по этому адресу в сети интернет - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/SignalCensus.html [Galperin et al., 2010]. При этом структурная гомология каталитического домена СТПК эукариотического типа сохраняется в разных Царствах (рис. 2.3) [Pereira et al., 2011]. Хотя существуют и некоторые исключения. Например, киназа *E. coli* YihE [Zheng et al., 2007]. Эта киназа относится к группе так называемых «атипичных» киназ, сохраняя общую структуру каталитического ядра, она не имеет некоторых мотивов, характерных для СТПК эукариотического типа

[Scheeff et al., 2005]. Также стоит отметить, что не все бактериальные СТПК относятся к типу эукариотических. Помимо киназ/фосфатаз, таких как киназа/фосфатаза ИДГ *E. coli* и HPr *Enterococcus faecalis* [Kravanja et al., 1999], были описаны и некоторые другие СТПК неэукариотического типа, такие как SpoIIAB, RsbT и RsbW *Bacillus subtilis*. SpoIIAB фосфорилирует по остатку серина анти-анти-сигма фактор SpoIIAA, являясь частью регуляторного пути, контролирующего активность сигма фактора σ^F при споруляции [Najafi et al., 1995]. И хотя SpoIIAB не является СТПК эукариотического типа, ее парная фосфатаза SpoIIE является фосфатазой эукариотической [Duncan et al., 1995]. RsbT и RsbW, являющиеся членами суперсемейства АТФаз/киназ [Dutta et al., 2000], фосфорилируют свои субстраты в рамках комплексной сети контроля активности σ^F – одного из основных сигма факторов ответа на различные стрессы [Yang et al., 1996].

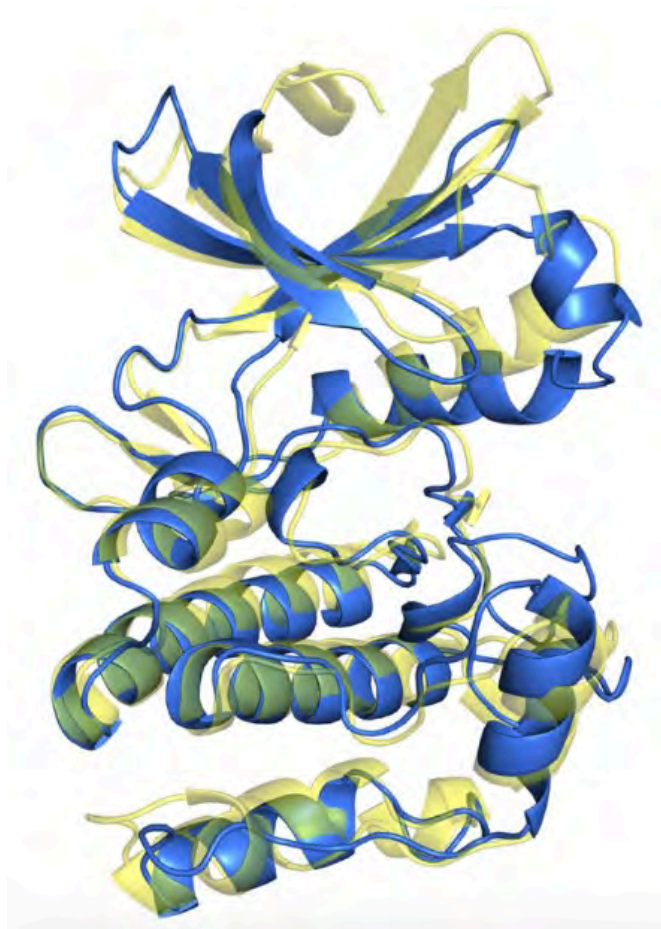


Рисунок 2.3. Наложение третичных структур РКА мыши (синяя) и RkvB *M. tuberculosis* (код доступа в PDB 1MRU, желтая) [Pereira et al., 2011].

Также возможно взаимодействие СТПК эукариотического типа и ДКС. Транскрипционный фактор Mrp *M. xanthus* контролируется как ДКС MrpA/MrpB, так и СТПК эукариотического типа Pkn8 и Pkn14 [Nariya et al., 2005b; Sun et al., 2001]. Также ДКС CovR/CovS и СТПК эукариотического типа Stk1 регулируют экспрессию β -гемолизина/цитолизина, необходимого для выживания в крови и при окислительном стрессе стрептококков группы В [Rajagopal et al., 2006]. Регулятор ответа *M. tuberculosis* DosR, являющийся компонентом ДКС DosS/DosR, контролирующей регулон DosR, вовлеченный в регуляцию дормантного состояния, обусловленного гипоксией и оксидами азота [Mehra et al., 2015], фосфорилируется по остаткам треонина 198 и 205 PknH, а также по остатку аспарагиновой кислоты 54 DosS, что совместно усиливает его аффинность целевым участкам ДНК [Chao et al., 2010].

Глава 3. СТПК *Mycobacterium tuberculosis*

Геном *M. tuberculosis* содержит 11 генов, кодирующих СТПК эукариотического типа [Cole et al., 1998], при этом все кроме двух имеют один внутриклеточный киназный домен, один трансмембранный домен а также внеклеточный сенсорный домен (рис. 3.1). Это позволяет отнести эти девять трансмембранных белков к типу рецепторных киназ, у которых внеклеточный рецепторный домен отвечает за восприятие внешних сигналов и передачу их внутриклеточному киназному домену, приводя к его активации и последующему фосфорилированию белков-субстратов по остаткам серина или треонина [Prisic et al., 2014].

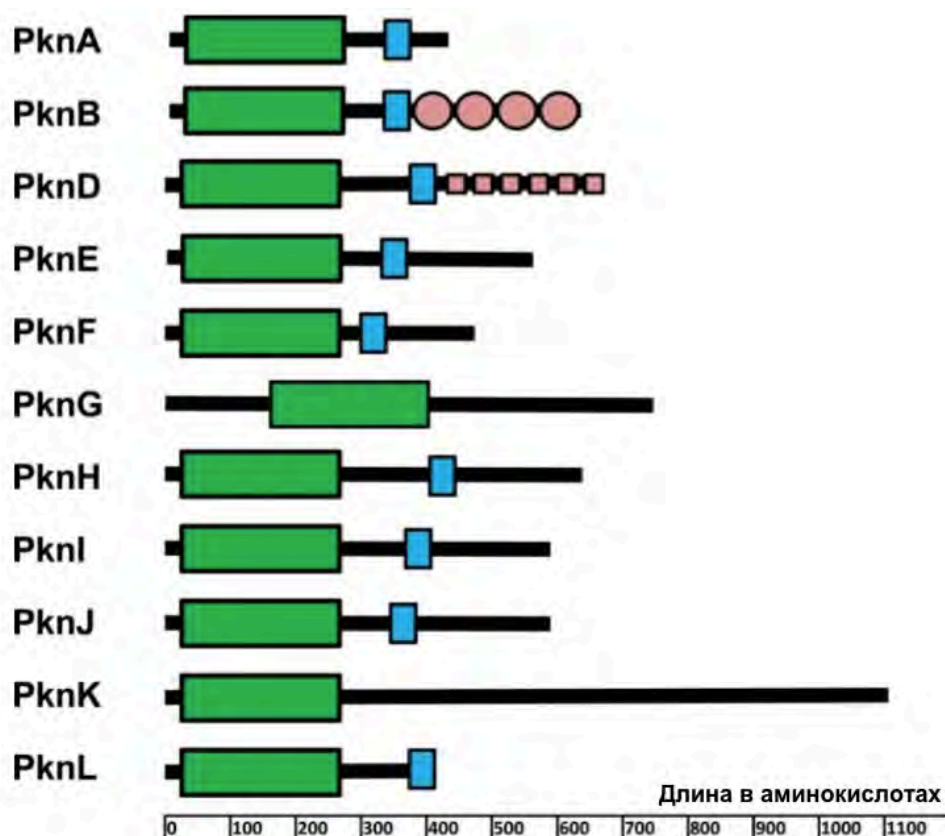


Рисунок 3.1. Доменная организация СТПК *M. tuberculosis*. Зеленым показаны киназные домены, синим – трансмембранные участки, розовым – известные внеклеточные домены [Prisic et al., 2014].

Стоит отметить, что при выравнивании аминокислотных последовательностей каталитических доменов СТПК *M. tuberculosis*, 9 рецепторных киназ образуют 3 группы, в то время как киназы без трансмембранного домена (PknG и PknK) выбиваются из этого выравнивания (рис. 3.2), что свидетельствует о том, что рецепторные киназы могли произойти от одного гена, а растворимые – независимо. При этом гомологии во внеклеточных доменах не наблюдается, что является признаком их независимой эволюции [Prisic et al., 2014].

Подробный анализ фосфопротеома *M. tuberculosis*, проведенный Prisic et al., позволил выявить 516 актов фосфорилирования 301 белка, что меньше чем у эукариот, но значительно превышает количество фосфорилируемых белков, обнаруженных в предыдущих исследованиях на прокариотах. Более того, это исследование позволило установить характерные последовательности в белках-субстратах, узнаваемые СТПК, и, что примечательно, таковые для PknG и PknK заметно отличались от всех остальных киназ, как и их киназные домены (рис. 3.2) [Prisic et al., 2010].

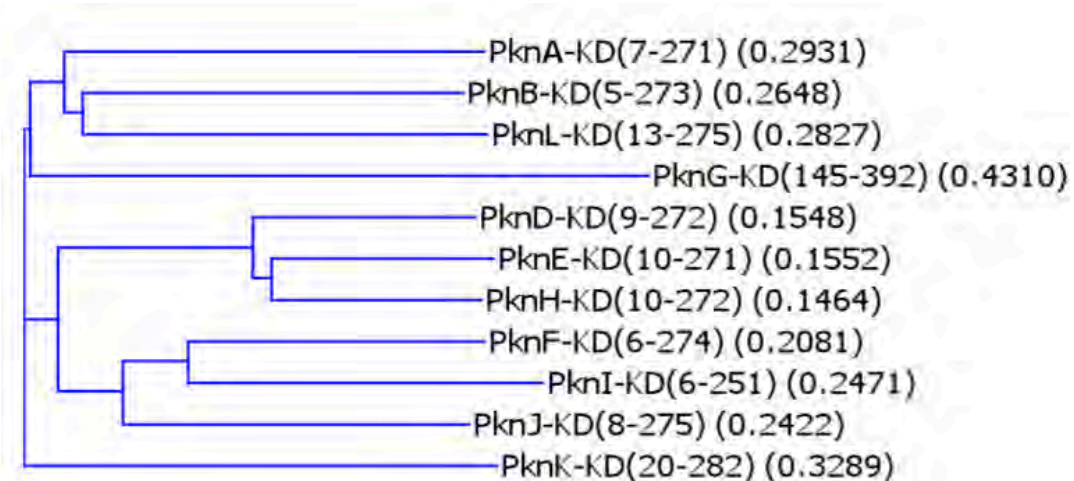


Рисунок 3.2. Дендрограмма киназных доменов СТПК *M. tuberculosis* [Prisic et al., 2010].

Также в этом исследовании, как и во многих других, подтверждается, так называемый, «промискуитет» в отношениях протеинкиназ и фосфорилируемых ими белков: одна киназа может фосфорилировать определенное количество белков, при этом и один белок может фосфорилироваться разными киназами [Cousin et al., 2013; Prisic et al., 2010].

Рассмотрим основные функции всех СТПК *M. tuberculosis* в отдельности.

3.1. PknA и PknB

Гены *pknA* и *pknB* располагаются в одном опероне с генами *pbrA* (кодирует белок синтеза клеточной стенки), *rodA* (кодирует белок регулирующий форму клетки) и *pspA* (фосфатаза). Гены *pknA* и *pknB* (наравне с *pknG* и *pknL*) имеются во всех геномах микобактерий, включая сильно редуцированный геном *M. leprae*, что позволяет судить об их важности для жизни этих микроорганизмов. PknA и PknB жизненно необходимы для нормального роста и развития микобактерий, что показано в экспериментах по транспозонному мутагенезу [Sasseti et al., 2003]. По оперонной организации этих генов было предсказано их участие в синтезе клеточной стенки и клеточном делении, что было подтверждено экспериментально: сверхэкспрессия генов этих киназ приводит к заметным изменениям формы клетки, включая удлинение, ветвление и неполное формирование клеточной перегородки [Kang et al., 2005]. Дальнейшие подтверждения участия PknA и PknB в регуляции роста и деления клетки были получены при более детальном исследовании белков, непосредственно регулирующих эти процессы и являющихся субстратами для PknA, либо PknB, либо для них обоих. Важнейшими из таких фосфопротеинов являются: РВРА, бифункциональный пенициллин-связывающий белок, предположительно, субстрат PknB; Wag31, гомолог DivIVa, фосфорилируемый PknA и необходимый микобактериям для синтеза пептидогликана на растущем полюсе клетки; MviN, субстрат PknB, играющий важную роль на поздних стадиях синтеза

пептидогликана [Dasgupta et al., 2006; Gee et al., 2012; Kang et al., 2005]. Также было показано, что PknB локализуется на полюсах и в середине клетки – местах активного использования пептидогликана и сборки аппарата клеточного деления [Mir et al., 2011]. Более того, наблюдается десятикратное уменьшение экспрессии оперона, содержащего *pknA/pknB* в стационарную фазу роста, по сравнению с логарифмической. Позднее была предложена модель, согласно которой, экспрессия *pknB* понижается во время покоя, индуцированного гипоксией, а PknB необходима для пробуждения клеток при появлении кислорода [Kang et al., 2005; Ortega et al., 2014].

Внеклеточная область PknB содержит четыре домена ассоциированных с пенициллин-связывающими белками и с серин-треониновыми протеинкиназами (penicillin binding protein and serine/threonine kinase associated, PASTA). Эти домены были впервые обнаружены биоинформатическим путем, и была предсказана их способность связывать фрагменты пептидогликана [Yeats et al., 2002]. Позже это было подтверждено на *Bacillus subtilis* [Shah et al., 2008] и *M. tuberculosis* [Mir et al., 2011]. Все четыре PASTA-домена необходимы для выживания вирулентного *M. tuberculosis*, хотя авирулентный *M. smegmatis* способен существовать и без внеклеточного домена PknB, что может также указывать на определенную роль этих доменов в вирулентности [Chawla et al., 2014]. В свою очередь, внеклеточный домен PknA не является жизненно важным для микобактерий [Nagarajan et al., 2015].

Факт связывания PASTA-доменами фрагментов пептидогликана позволил создать две модели. Первая – модель активации PknB, когда две молекулы киназы связываются с одним лигандом, при этом их внутриклеточные домены димеризуются «спина к спине» и происходит автофосфорилирование (рис. 3.3) [Barthe et al., 2010]. Согласно другой модели, поддерживаемой тем фактом, что PASTA-домены PrkC *B. subtilis* не димеризуются *in vitro* [Squeglia et al., 2011], пептидогликан, связываясь с PASTA-доменами, повышает концентрацию PknB в определенных участках клетки, что, в свою очередь, облегчает возможность

«встречи» двух молекул киназы с дальнейшей димеризацией и активацией автофосфорилированием [Mir et al., 2011].

Помимо участия в регуляции клеточного роста и деления, PknA и PknB были замечены в фосфорилировании множества других белков, однако, для выводов о регуляции ими каких-либо других процессов, основную сложность представляет установление функции *in vivo*, после демонстрации самого факта фосфорилирования *in vitro* [Prisic et al., 2010].

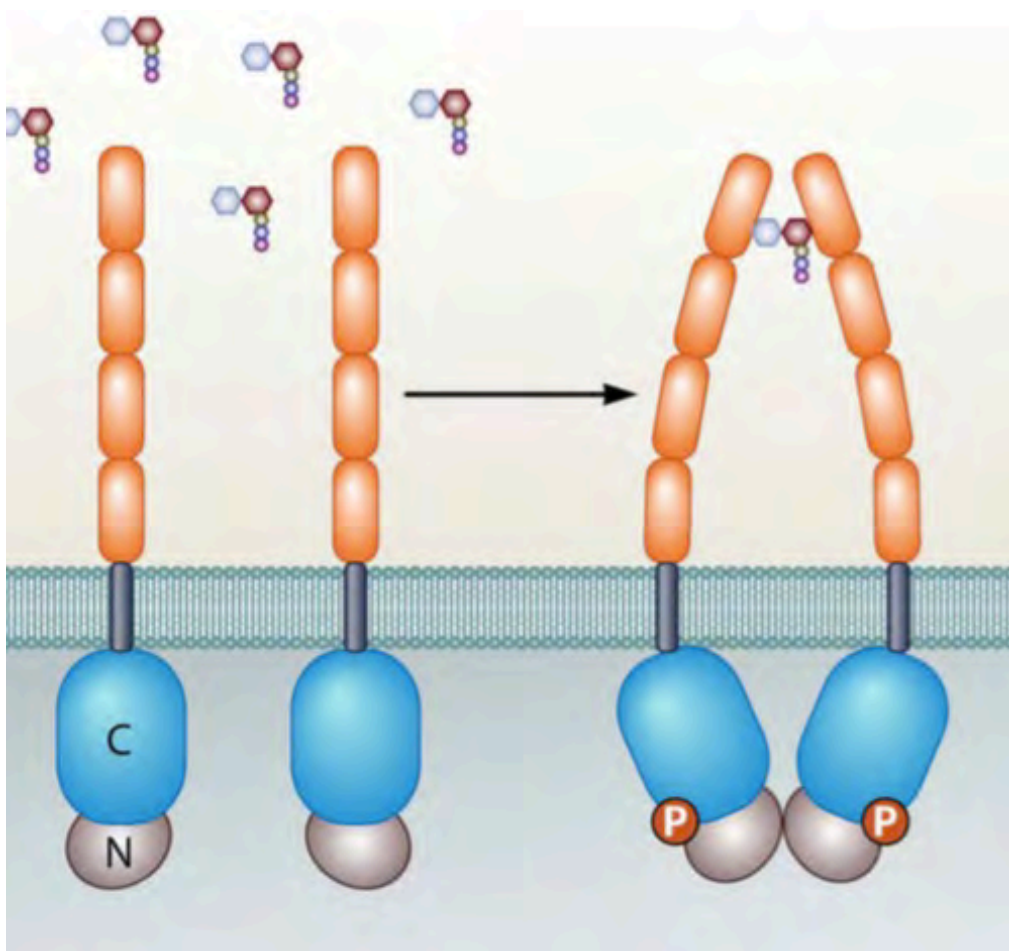


Рисунок 3.3. Модель активации PknB при димеризации после связывания лиганда [Pereira et al., 2011].

Одним из примеров доказанного как *in vitro*, так и *in vivo* фосфорилирования является фосфорилирование энол-ацил-протеинредуктазы InhA, основной мишени изониазида. Фосфорилирование InhA по остатку

треонина-266 существенно снижает его активность, тормозя синтез миколовых кислот [Khan et al., 2010; Molle et al., 2010].

3.2. PknD

Ген *pknD* расположен в локусе со множеством генов фосфатного транспорта и не является жизненно-важным [Sasseti et al., 2003]. PknD имеет внеклеточный домен в виде высокосимметричной структуры шестигранного β -пропеллера (рис. 3.4) [Good et al., 2004], хотя о его лигандах ничего не известно.

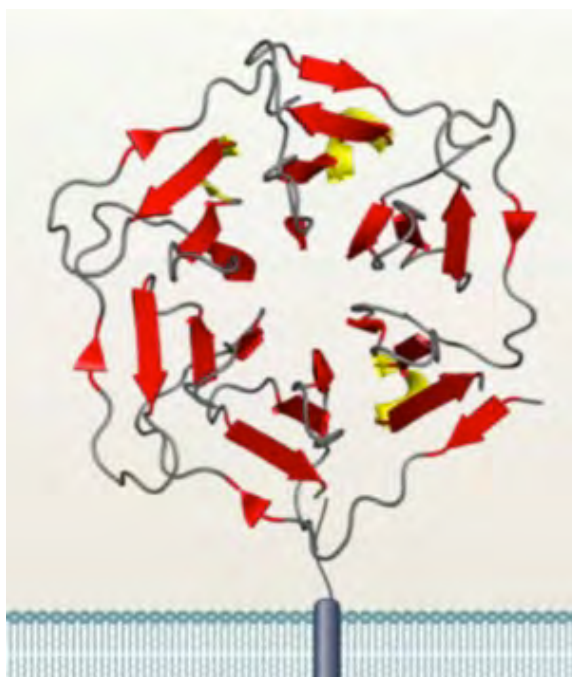


Рисунок 3.4. Третичная структура внеклеточного домена PknD, образующего высоко симметричный β -пропеллер (код доступа PDB 1RWI) [Good et al., 2004; Pereira et al., 2011].

Протеинкиназа PknD фосфорилирует белок Rv0516c [Greenstein et al., 2007], который является анти-анти сигма фактором, регулирующим экспрессию сигма-фактора SigF в ответ на сигналы стресса [Parida et al., 2005]. Учитывая тот факт, что SigF является важным фактором вирулентности [Chen et al., 2000; Forrellad et al., 2013; Geiman et al., 2004], можно считать, что PknD участвует в трансдукции

сигналов окружающей среды, необходимых для адаптации микобактерий к среде во время инфекции.

Также PknD предположительно фосфорилирует MmpL7 [Pérez et al., 2006], транспортер семейства RND, необходимый для обеспечения вирулентности *M. tuberculosis* [Domenech et al., 2005].

Было показано, что PknD необходима для преодоления *M. tuberculosis* гемато-энцефалического барьера, инвазии клеток мозгового эндотелия и заражения центральной нервной системы [Be et al., 2012]. Вакцинация рекомбинантным белком PknD заметно снижала уровень поражения ЦНС морских свинок *M. tuberculosis*, что открывает новые перспективы для разработки вакцин от туберкулезного менингита [Skerry et al., 2013].

3.3. PknE

О протеинкиназе PknE известно немного. Она является классической рецепторной киназой, имеющей киназный, трансмембранный и внеклеточный домены. Ген *pknE* расположен вне оперона, хотя отделен от *pknF* всего двумя генами, что позволяет предположить некоторую взаимосвязь между кодируемыми ими белками [Prisic et al., 2014].

Экспрессия *pknE* индуцируется оксидом азота, свидетельствуя о ее участии в формировании вирулентности *M. tuberculosis*, благодаря способности выживания микобактерий в макрофагах путем блокировки их апоптоза, опосредованного оксидом азота [Jayakumar et al., 2008].

3.4. PknF

Как уже было сказано выше, *pknF* отделен от *pknE* всего двумя генами. В 3' области к нему примыкает ген *rv1747*, кодирующий ABC-транспортер с двумя

ФНА (fork head associated) доменами, помимо домена мембранного транспортера и АТФ-связывающих доменов [Camus et al., 2002; Hofmann et al., 1995].

Исследования показали, что Rv1747 фосфорилируется PknF, и их гены коэкспрессируются в одном опероне [Curry et al., 2005; Molle et al., 2004; Spivey et al., 2011]. При этом мутанты с делетированным *rv1747* имели ослабленный фенотип при исследовании на макрофагах и мышах. Внедрение в геном как фосфоаблативного *rv1747*, так и *rv1747* с мутациями в ФНА-доме не восстанавливало жизнеспособности микобактерий, что показало важность, как фосфорилирования, так и наличия работоспособного ФНА-домена для сохранения нормальной функции этого белка. При этом делеция *pknF* не приводила к полной остановке роста в макрофагах, что говорит о том, что Rv1747 может фосфорилироваться и другими СТПК [Spivey et al., 2011].

Также, в опытах со сверхэкспрессией *pknF* наблюдались изменения в росте, морфологии и расположении клеточной перегородки, что позволило предположить участие PknF в регуляции этих процессов [Deol et al., 2005].

3.5. PknG

Протеинкиназа PknG является одной из двух (наравне с PknK) растворимых СТПК *M. tuberculosis*, а также одной из четырех, чей ген сохранился в геноме *M. leprae*. Эксперименты по транспозонному мутагенезу показали, что ген *pknG* является жизненно необходимым для *M. tuberculosis* [Sasseti et al., 2003].

PknG является необходимой для выживания в макрофагах. Она секретируется в цитозоль макрофагов, замедляя процесс слияния фагосом и лизосом, тем самым не давая макрофагам уничтожить клетку микобактерии [Walburger et al., 2004]. Для успешного блокирования слияния фагосом с лизосомами необходимо уникальное свойство PknG – способность к автофосфорилированию по N-концевым остаткам треонина, которое при этом не влияет на киназную активность PknG [Scherr et al., 2009]. Предполагаемый

механизм действия PknG заключается в ингибировании PKC α , что способствует снижению уровня фагоцитоза макрофагов и повышает выживаемость клеток микобактерий в них [Chaurasiya et al., 2009].

В непатогенной бактерии *M. smegmatis* PknG экспрессируется на очень слабом уровне и участвует в обеспечении природной лекарственной устойчивости этого микроорганизма [Wolff et al., 2009], в то время как при усилении экспрессии гена *pknG* *M. smegmatis* обретает способность инфицировать макрофаги [Walburger et al., 2004].

3.6. PknH

PknH также имеет типичную структуру рецепторной киназы, и кодируется в 3' области гена *EmbR* [Camus et al., 2002]. Близость этих генов позволила предположить их взаимодействие, которое было подтверждено *in vitro*: PknH фосфорилирует *EmbR* по остаткам треонина, при этом функциональность FНА домена важна для этого процесса, при этом сама PknH может автофосфорилироваться как по остаткам треонина, так и по остаткам серина [Molle et al., 2003]. Сверхэкспрессия *pknH* в клетках *M. smegmatis* приводила к повышенной экспрессии генов *embCAB* оперона, кодирующего гены арабинозилирования липоарабиноманнана (*embC*) и арабиногалактана (*embA* и *embB*) [Escuyer et al., 2001; Zhang et al., 2003a], экспрессия которого регулируется *EmbR* [Sharma et al., 2006]. Повышение экспрессии этих генов приводило к ожидаемому увеличению соотношения количества липоарабиноманнана к липоманнану [Sharma et al., 2006].

Было также показано, что мутанты *M. tuberculosis* с делетированным *pknH* более чувствительны к воздействию пероксида и супероксида, однако более устойчивы к оксидам азота. Хотя такие мутанты показали меньшую выживаемость при инфицировании макрофагов ТНР-1, они оказались

гипервирулентными при исследовании на мышах Balb/C [Paravinasasundaram et al., 2005].

Как упоминалось выше, белок DosR, регулирующий вход клеток патогена в дорамантное состояние в ответ на гипоксию [Mehra et al., 2015], фосфорилируется *in vitro* PknH, что позволяет предположить участие последней в обеспечении способности патогена к персистенции, однако подтверждения этого эффекта *in vivo* пока нет [Chao et al., 2010].

3.7. PknI

PknI – типичная по структуре рецепторная киназа. Генетическое окружение *pknI* позволяет предположить ее участие в сборке клеточной стенки [Camus et al., 2002]. Было показано взаимодействие *in vitro* PknI с двумя белками-пероксидазами Rv2159c и Rv0148 [Venkatesan et al., 2015]. Протеомный анализ позволил установить, что количество белка Rv0148 повышено у мутанта, устойчивого к амикацину, а *in silico* докинг показал возможность взаимодействия этого белка с лекарством [Sharma et al., 2015], что позволяет предположить участие PknI в регуляции природной устойчивости *M. tuberculosis* к антибиотикам.

Также, мутант с делетированным по *pknI* оказался гипервирулентным в макрофагах и повышал процент смертности мышей SCID [Gopalaswamy et al., 2009].

3.8. PknJ

О функциях типичной рецепторной киназы PknJ известно мало. Ее киназный домен может димеризоваться, делая автофосфорилирование по трем остаткам треонина в активационной петле возможным. Генетическое окружение *pknJ* не позволяет сделать никаких предположений о его возможных функциях.

Было показано фосфорилирование PknJ транскрипционного фактора EmbR, метилтрансферазы MmА4/Hma, вовлеченный в биосинтез миколовых кислот и дипептидазы PerE, однако подтверждения *in vivo* эти явления пока не получили. При этом, инактивация *pknJ* инсерцией транспозона не проявляется фенотипически в макрофагах и мышцах [Jang et al., 2010].

3.9. PknK

PknK является одной из двух растворимых киназ (наряду с PknG), не имеющих трансмембранного домена. Это большой белок (119 кДа), с киназным доменом в N-концевой области и длинным C-концом, проявляющим сходство с АТФ-зависимыми транскрипционными регуляторами семейства MalT. В этой области располагаются: АТФ-связывающий мотив (P-петля), характерный для AAA+ АТФаз, PDZ-домен и один повтор тетратрикопептида (TPR) [Marchler-Bauer et al., 2011]. PDZ- и TPR-домены зачастую отвечают за белок-белковые взаимодействия, однако в случае с PknK их роль не установлена [Prisic et al., 2014].

PknK способна автофосфорилироваться по двум остаткам треонина в активационной петле, что необходимо для ее активации, а также фосфорилировать свою C-концевую область. Несмотря на то, что у PknK отсутствует трансмембранный домен, белок PknK присутствует в большей степени во фракции клеточной стенки, чем в цитозоле [Kumar et al., 2009]. Показано *in vitro* фосфорилирование PknK транскрипционного фактора VirS, кодируемого геном, находящимся через один от гена *pknK* [Kumar et al., 2009]. VirS, в свою очередь, регулирует экспрессию оперона монооксигеназы *mytA*, важного для правильной сборки клеточной стенки *M. tuberculosis* [Singh et al., 2005]. При этом, PknK также фосфорилировал 4 из 7 белков, кодируемых опероном *mytA* [Kumar et al., 2009].

Кроме того, показано, что экспрессия *pknK* выше у вирулентного штамма *M. tuberculosis* H37Rv, чем у авирулентного H37Ra, а количество белка в клетках заметно больше в стационарной фазе роста, нежели в логарифмической. Мутант с делетированным *pknK* имел слегка повышенную устойчивость к кислотному, оксидативному и гипоксическому стрессам, при этом показывая временный дефект на ранних стадиях роста при инфекции мышей C57BL/6 [Malhotra et al., 2010]. Также было снижено количество ряда тРНК у делеционного мутанта в логарифмической фазе роста, и повышено – в стационарной, что позволяет предположить роль PknK в регуляции трансляции на различных фазах роста [Malhotra et al., 2012]. На основе полученных косвенных свидетельств была предложена модель, согласно которой С-терминальная область отрицательно регулирует киназный домен, создавая ему стерические помехи в нефосфорилированном состоянии [Malhotra et al., 2012].

3.10. PknL

По своей структуре PknL является рецепторной киназой, хотя у нее и отсутствует трансмембранный домен. Генетическая близость к кластеру клеточного деления и клеточной стенки позволяет предположить ее участие в этих процессах [Samus et al., 2002]. Эта гипотеза поддерживается тем фактом, что у гомолога PknL в *C. glutamicum* имеются три PASTA домена во внеклеточной области [Narayan et al., 2007].

Была показана способность киназного домена к автофосфорилированию, а также способность *in vitro* фосфорилировать предположительный транскрипционный фактор Rv1275с, кодируемый геном, примыкающим к *pknL*, хотя эти данные пока не были подтверждены *in vivo* [Canova et al., 2008].

3.11. Серин-треониновая фосфатаза PstP *M. tuberculosis*

В отличие от обратимого фосфорилирования по остаткам гистидина и аспартата, связь фосфата с остатками серина и треонина гораздо прочнее, что обуславливает необходимость наличия ферментов, способных эту связь разорвать. В такой роли выступают серин-треониновые фосфатазы. В геноме *M. tuberculosis* имеется лишь один ген, кодирующий серин-треониновую фосфатазу – *pstP*, расположенный в одном опероне с генами *pknA* и *pknB* [Bork et al., 1996].

Фосфатаза PstP относится к семейству фосфатаз PP2C (PPM) [Bork et al., 1996]. Для PstP была получена кристаллическая структура, показавшая ее достаточно сильное сходство с человеческой PP2C α , несмотря на достаточно низкий уровень гомологии в аминокислотной последовательности (17% совпадений): в структурах обеих фосфатаз имеется β -сэндвич, состоящий из двух антипараллельных β -листов, каждый из пяти β -тяжей, каждый фланкированный парой антипараллельных α -спиралей, а также два иона Mn^{2+} . Однако в структуре PstP имеется также и третий ион Mn^{2+} , расположение которого обусловлено слегка измененным, по сравнению с PP2C α , flap-доменом [Pullen et al., 2004].

PstP способна дефосфорилировать белки по фосфорилированным остаткам серина и треонина в присутствии ионов Mn^{2+} либо Mg^{2+} [Voitel et al., 2003]. PstP способна дефосфорилировать фосфорилированные PknA и PknB, что, с учетом того, что она не обнаружена в белковых экстрактах быстрорастущих *M. smegmatis* и *M. fortuitum*, позволяет предположить ее участие в регуляции роста и деления бактериальных клеток [Chopra et al., 2003]. PstP, в свою очередь фосфорилируется PknA и PknB по четырем остаткам треонина (T₁₃₇, T₁₄₁, T₁₇₄ и T₂₉₀) в присутствии ионов Zn^{2+} и неорганического фосфата, что повышает ее активность и делает систему PknA-PknB-PstP саморегулируемой [Sajid et al., 2011].

3.12. СТПК *M. tuberculosis* как новые биомишени

Серин-треониновые протеинкиназы эукариотического типа представляют огромный интерес, в качестве новых биомишеней при разработке новых лекарств. Уже была показана их эффективность в лечении раковых и аутоиммунных заболеваний человека. 11 низкомолекулярных ингибиторов СТПК человека были одобрены администрацией по пищевым продуктам и лекарствам США для лечения рака (FDA, Food and Drug Administration) [Zhang et al., 2009a]. Широкий спектр функций СТПК *M. tuberculosis* также делает их привлекательными в этой роли: помимо прямой остановки роста микобактерий поражением жизненно необходимых PknA и PknB, рассматривается и новая стратегия борьбы с туберкулезом, основанная на снижении его вирулентности (киназы PknG, PknD, PknE, и, возможно, другие) [Danilenko et al., 2011; Forrellad et al., 2013; Прозоров и др., 2014]. В последние годы предпринимались попытки поиска ингибиторов микобактериальных СТПК, в первую очередь – PknA, PknB и PknG [Chapman et al., 2012; Loughed et al., 2011; Scherr et al., 2007].

Основной интерес представляют ингибиторы, конкурирующие с АТФ по взаимодействию с АТФ-связывающим карманом каталитического домена (ингибиторы I и II типа). Здесь кроется и главный подводный камень этих разработок: эта область СТПК высококонсервативна, что может приводить к повышенной токсичности для человека, за счет неселективного ингибирования человеческих СТПК. Так, ингибитор Bis-I [Davis et al., 1992b], изначально открытый, как ингибитор протеинкиназы С человека (PKC) достаточно широко специфичен, ингибируя множество бактериальных СТПК [Bekker et al., 2010; Danilenko et al., 2008], а митоксантрон, используемый в химиотерапии рака, проявляет активность как на различные протеинкиназы человека, так и на PknB *M. tuberculosis* [Wan et al., 2013; Wehenkel et al., 2006]

Однако, биоинформатический анализ, проведенный Захаревич *и др.* [Zakharevich et al., 2012], позволил выявить 9 переменных аминокислотных остатков АТФ-связывающего кармана (АВР, АТР-Binding Pocket), формирующих так называемую подпись, или сигнатуру АВР. На примере PknВ *M. tuberculosis* это: лейцин-17, валин-25 и аланин-38, формирующие «потолок» АВР; валин-72, метионин-145 и метионин-155, образующие «пол» АВР; тирозин-94, валин-95, а также метионин-92 (являющийся «привратником») образуют «шарнир» АВР (рис. 3.5) [Zakharevich et al., 2012].

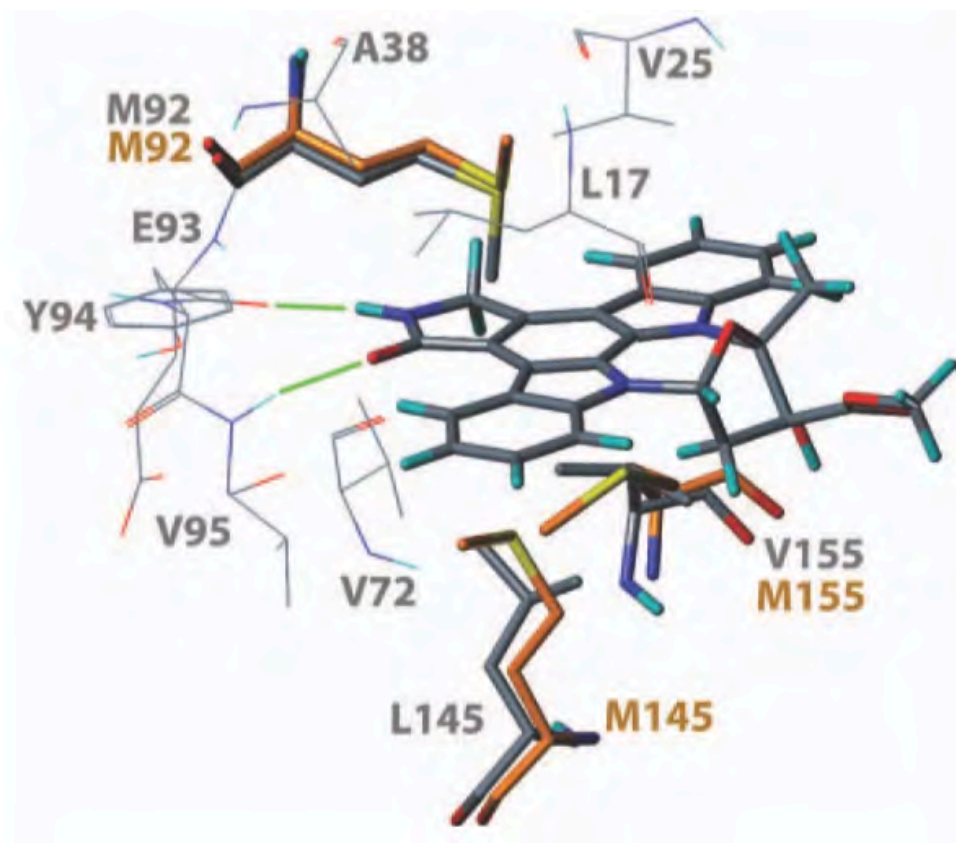


Рисунок 3.5. Наложение АВР PknВ *M. tuberculosis* дикого типа (оранжевый углеродный скелет, PDB ID 1O6Y), и мутанта PknВ, с АВР максимально подобным PknD *M. tuberculosis* (серый углеродный скелет, PDB ID 3F69) с селективным ингибитором PknD KT5720 (черный). Отличающиеся аминокислотные остатки показаны палками, одинаковые – линиями [Zakharevich et al., 2012].

Анализ сигнатур АВР был использован для создания новой классификации бактериальных СТПК эукариотического типа с выявлением 20 групп СТПК, с характерными для них сигнатурами. Наложение этой классификации на филогенетическое древо позволило выявить факт, что большинство его ветвей (кладов), содержащих гомологичные по последовательности киназного домена СТПК, достаточно разнородны по сигнатурам АВР (рис. 3.6). Этот факт позволяет выявить среди СТПК мишени, поражаемые селективным ингибитором только в патогенных микроорганизмах, и не взаимодействующие (либо слабо взаимодействующие) с СТПК непатогенных комменсалов и СТПК человека. Это позволяет использовать новый, более осознанный подход к выбору биомишеней среди бактериальных СТПК эукариотического типа [Zakharevich et al., 2012].

Помимо ингибиторов I и II типа, в последнее время началась разработка аллостерических низкомолекулярных ингибиторов СТПК (ингибиторы III типа), взаимодействующие с СТПК в сайтах, не задействованных в связывании АТФ, и ингибиторов IV типа, ковалентно связывающихся с СТПК [Roskoski, 2015; Wu et al., 2015].

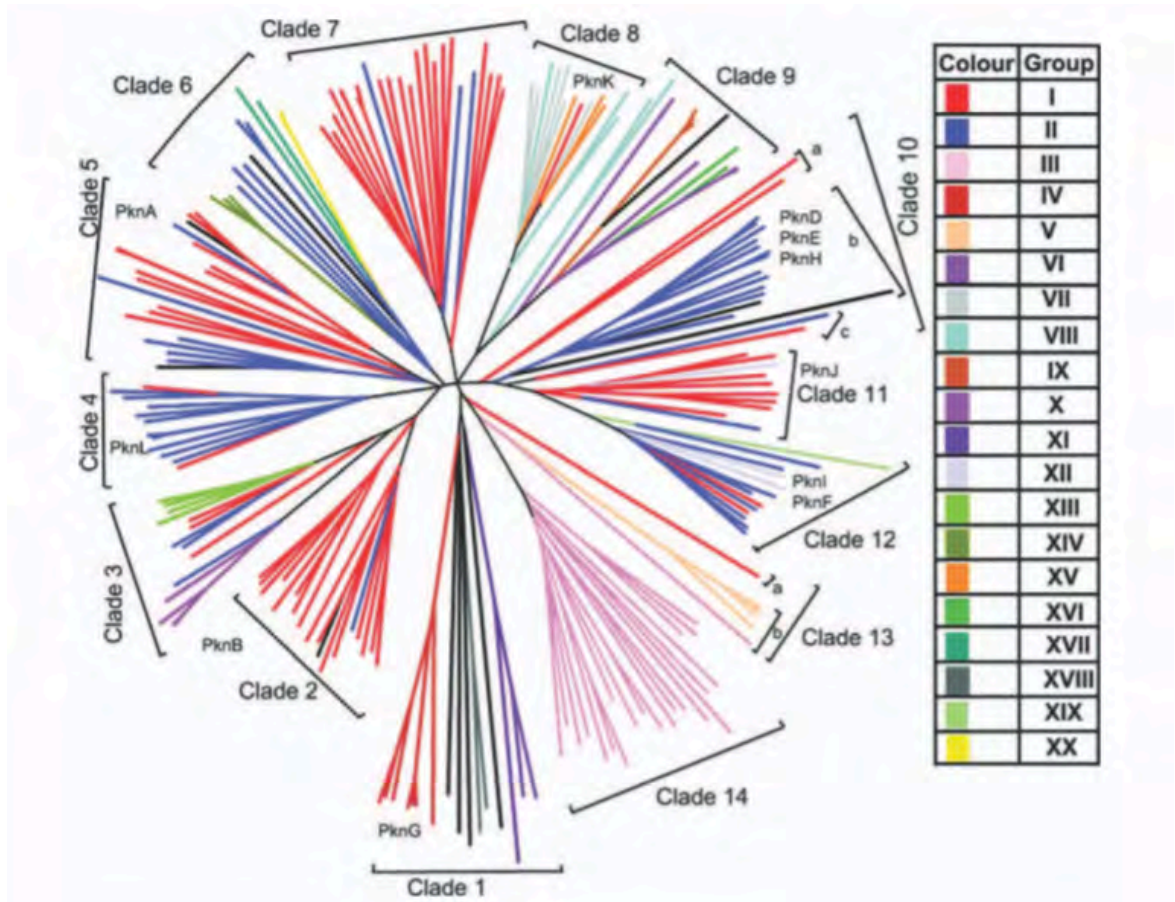


Рисунок 3.6. Филогенетическое древо, построенное на основе выравнивания последовательностей киназных доменов 219 бактериальных СТПК эукариотического типа. Цветом выделены различные группы, согласно классификации по сигнатурам АВР. СТПК *M. tuberculosis* отмечены на древе [Zakharevich et al., 2012].

Глава 4. Тест-системы для отбора ингибиторов СТПК на основе гена аминогликозид фосфотрансферазы типа VIII *S. rimosus*

Как уже упоминалось выше, одним из привлекательных способов отбора новых противобактериальных препаратов (в том числе противотуберкулезных) является комбинированный способ мишень-специфического отбора на клеточном уровне.

Тест-система такого типа, для отбора ингибиторов СТПК *S. lividans* была ранее разработана в нашей лаборатории [Danilenko et al., 2008]. В основе тест-системы лежит ген аминогликозид-фосфотрансферазы типа VIII (*aphVIII*) *S. rimosus*.

Ген *aphVIII* был впервые обнаружен у штамма-продуцента окситетрациклина *S. rimosus* после последовательного отбора на увеличивающихся концентрациях канамицина [Потехин и др., 1985]. При клонировании этого гена в *S. lividans*, штамм приобрел устойчивость к канамицину, неомицину и паромомицину, а белковый экстракт штамма проявлял аминогликозид-фосфотрансферазную активность в отношении соответствующих антибиотиков. На основе последовательности гена и спектра его антибиотиков-субстратов, он был отнесен к классу АРН нового типа – VIII [Danilenko et al., 1997].

АРНVIII имеет относительно высокую гомологию с АРНs штаммов-продуцентов аминогликозидов, имея пять консервативных мотивов на протяжении всей последовательности в сравнении с АРНV, при этом, в сравнении с АРНIIIa, такие мотивы наблюдаются только в С-концевой области, ответственной за связывание с аминогликозидами, а различия в N-концевой части могут быть связаны с дополнительными функциями в клетке [Sizova et al., 2002].

На примере АРНIIIa было показано, что АРНs, несмотря на достаточно низкую гомологию последовательности (в пределах 10%) имеет высокую локальную схожесть с эукариотическими СТПК, в области активного центра,

влияющую на механизм переноса γ -Ф АТФ на субстрат, а также к действию некоторых ингибиторов [Daigle et al., 1997; Hon et al., 1997]. Более того, АРНШа имеет слабую киназную активность и способна фосфорилировать некоторые субстраты СТПК по остаткам серина и треонина [Daigle et al., 1999]. АРНVIII имеет консервативную для бактериальных СТПК область в 38 аминокислотных остатков, находящуюся у СТПК в N-концевой области и ответственную за связывание молекулы АТФ, однако их низкая гомология не позволяет рассуждать о коэволюции АРН и СТПК [Sizova et al., 2002].

Позднее было показано, что АРНVIII в клетках *S. rimosus* фосфорилируется двумя СТПК, одна из которых Ca^{2+} -зависимая. Так, фосфорилирование АРНVIII в присутствии ионов Ca^{2+} в 1,84 раза превышало аналогичный процесс в их отсутствии, при этом фосфорилированный АРНVIII был в 3,52 раза активнее нефосфорилированного [Елизаров и др., 2005]. Позднее было установлено, что устойчивость к антибиотикам у штаммов *S. lividans* 66 и *S. coelicolor* A3(2) модулируется Ca^{2+} -ионами, и снижается в присутствии ингибиторов Ca^{2+} -кальмодулинов и Ca^{2+} -зависимых СТПК [Беккер и др., 2008], таких как ингибитор РКС бис-индолилмалеимид-1 [Davis et al., 1992a]. Такой же эффект наблюдался и у штамма *S. lividans aphVIII+*, гетерологично экспрессирующего *aphVIII*. Было установлено, что АРНVIII в клетках *S. lividans* фосфорилируется несколькими киназами, а *in vitro* показано, что одна из них - Ca^{2+} -зависимая РК25 [Беккер и др., 2008].

Этот феномен лег в основу создания тест-системы для первичного отбора ингибиторов СТПК. Так, при нанесении на газон из клеток, экспрессирующих *aphVIII*, бумажных дисков, содержащих канамицин и активный ингибитор СТПК, зона ингибирования роста оказывалась больше, чем в случае с дисками только с канамицином, либо комбинацией канамицина и неактивного ингибитора СТПК. В такой тест-системе были отобраны ингибиторы СТПК класса производных диазепинов[1,4] с кольцами малеимидов и индолов [Danilenko et al., 2008]. Позже была создана тест-система *E. coli* АРНVIII/РК25, призванная отбирать более

селективные ингибиторы СТПК РК25 *S. lividans* и ее близких структурных гомологов, за счет отсутствия в геноме *E. coli* генов, кодирующих СТПК эукариотического типа, способных к совместному с РК25 фосфорилированию АРНVIII [Bekker et al., 2010]. Также было показано, что модификация сайта фосфорилирования АРНVIII Ser-146 для повышения его сходства с сайтами автофосфорилирования СТПК может приводить к большему сродству АРНVIII и соответствующих СТПК, открывая путь к созданию тест-систем для отбора селективных ингибиторов широкого спектра СТПК эукариотического типа про- и эукариот [Елизаров и др., 2012].

Полученная методом кристаллографии трехмерная структура АРНVIII (рис. 4.1) [неопубликованные данные] позволит с большей точностью применять методы *in silico* моделирования для будущей конструкции мутантных белков АРНVIII, являющихся специфичными субстратами различных СТПК.

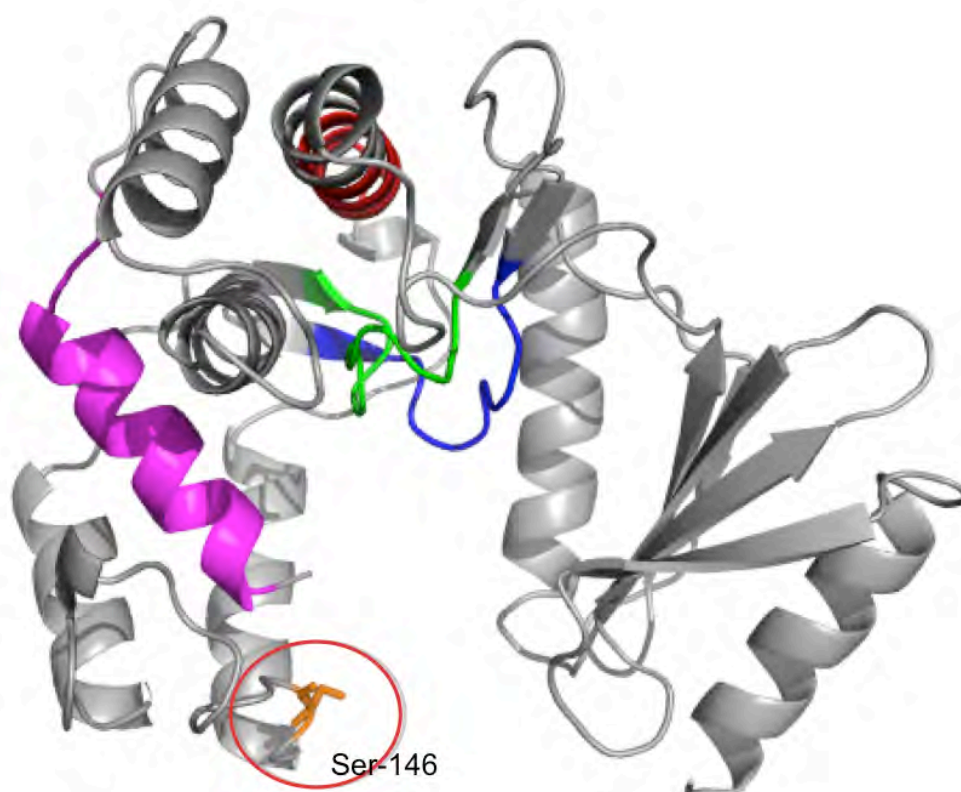


Рисунок 4.1. Трехмерная структура APH VIII (получена с разрешением 2.15Å, депонирована в банк данных www.rcsb.org с кодом 4H05). Доменная организация мономера APH VIII. Цветами на рисунке показаны следующие участки, ответственные за: связывание субстрата (красный), связывание АТФ (синий), гидролиз АТФ (розовый), перенос фосфора (зеленый) и активный центр (оранжевый). Основная цепь показана серым цветом.

Таким образом, предлагаемая к созданию тест-система *M. smegmatis aphVIII+*, с использованием репортерного белка APH VIII, чья активность зависит от его фосфорилирования бактериальными СТПК эукариотического типа, позволит отбирать ингибиторы, потенциально поражающие жизненно-важные СТПК микобактерий, при этом такая тест-система будет включать в себя все плюсы тестирования новых препаратов на клеточном уровне и облегчит точное установление биомишени отбираемых веществ для дальнейших доклинических исследований.

Глава 5. Материалы и методы

5.1. Штаммы бактерий.

E. coli DH5a: F⁻, *endA1*, *glnV44*, *thi-1*, *recA1*, *relA1*, *gyrA96*, *deoR*, *nupG*, *purB20*, φ80*dlacZ*ΔM15, Δ(*lacZYA-argF*)U169, *hsdR17*(*r_K⁻m_K⁺*), λ⁻ (Promega);

E. coli JM110: *rpsL*, *thr*, *leu*, *thi*, *lacY*, *galK*, *galT*, *ara*, *tonA*, *tsx*, *dam*, *dcm*, *glnV44*, Δ(*lac-proAB*), *e14*, [*F'* *traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ*ΔM15], *hsdR17*(*r_K⁻m_K⁺*);

E. coli BL21 (DE3): F⁻, *dcm*, *ompT*, *lon*, *hsdS*(*r_B⁻m_B⁻*), *gal*, λ(DE3) (Novagen);

E. coli BL21 (DE3) pLysS: F⁻, *dcm*, *ompT*, *lon*, *hsdS_B*(*r_B⁻ m_B⁻*), *gal*, λ(DE3) pLysS(*cm^R*) (Novagen);

M. smegmatis mc² 155: спонтанный мутант штамма дикого типа *M. smegmatis* ATCC 607 с повышенной частотой трансформации [Snapper et al., 1990].

5.2. Векторы, использованные для клонирования фрагментов ДНК

В экспериментах по клонированию фрагментов ДНК и гетерологической экспрессии генов в клетках *M. smegmatis* использовали челночные векторы pMIND [Blokpoel, 2005] (рис. 5.1) и pSMT3-mCherry [Carroll et al., 2010] (рис. 5.2). Для гетерологической экспрессии генов серин-треониновых протеинкиназ в клетках *E. coli* использовали вектор pET-32a (Novagen) [LaVallie et al., 1993] (рис. 5.3).

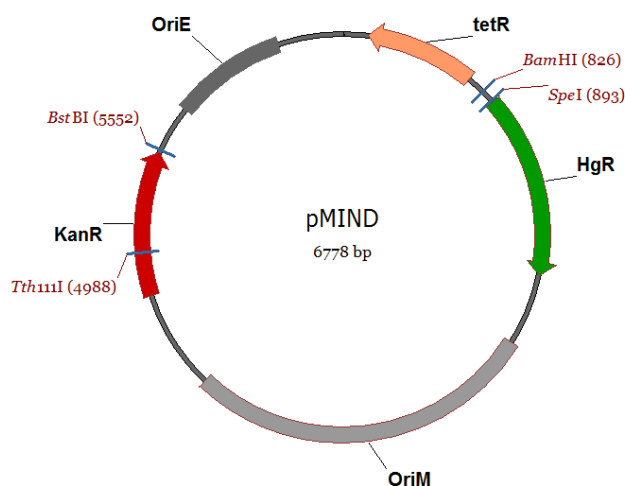


Рисунок 5.1. Карта вектора pMIND. Показаны: HgR – ген гигромицин-В-фосфотрансферазы из *Streptomyces hygroscopicus*; OriE – точка начала репликации в *E.coli* из плазмиды pBR322; OriM – точка начала репликации микобактериальной pAL5000; KanR – ген аминогликозид 3'-фосфотрансферазы из *Rhodopseudomonas palustris*; tetR – тетрациклиновый репрессор из плазмиды pAG1 *Corynebacterium glutamicum*; уникальные сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции.

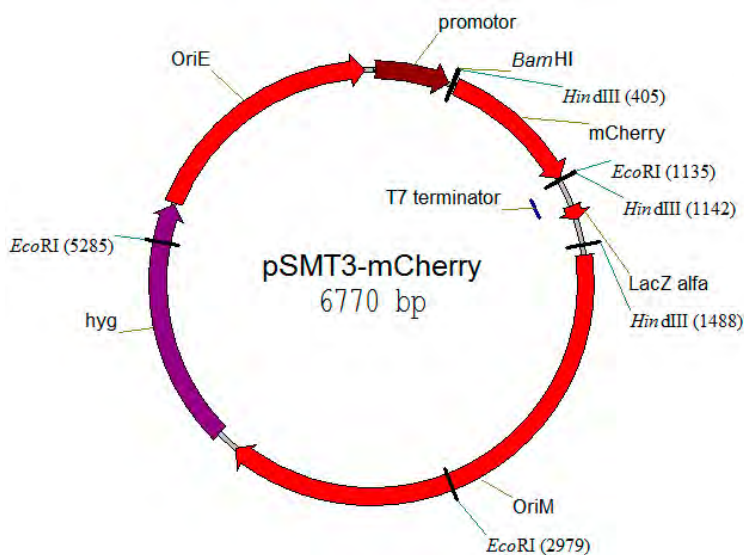


Рисунок 5.2. Карта вектора pSMT3-mCherry. Показаны: HgR – ген гигромицин-В-фосфотрансферазы из *Streptomyces hygroscopicus*; OriE – ориджин репликации в *E.coli* из плазмиды pBR322; OriM – микобактериальный ориджин репликации pAL5000; промотор hsp60 (promotor); кассета с репортерным геном *mCherry*; сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции.

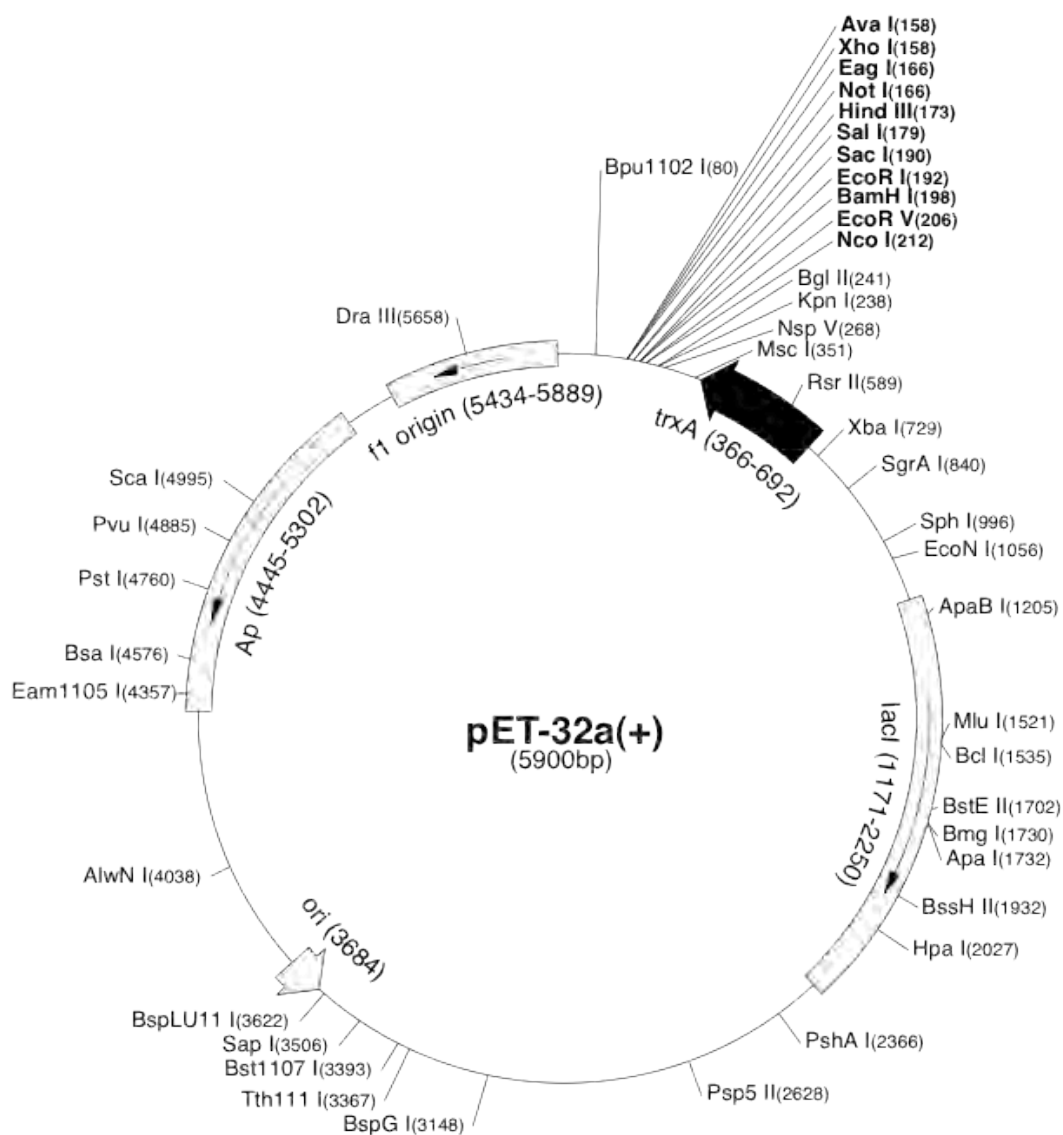


Рисунок 5.3. Карта вектора pET-32a. Показаны: полилинкер, уникальные сайты рестрикции, ген устойчивости к ампициллину (*Ap*), ген *lacI*, точка начала репликации pBR322 (*ori*), f1 (*ori*), последовательность, кодирующая тиоредоксин (*trxA*).

5.3. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Синтез олигонуклеотидов проводили в фирме «Синтол». Все использованные в работе олигонуклеотиды представлены в таблице 5.1. Олигонуклеотиды для клонирования подбирали вручную при помощи программы

Oligo 7 (Molecular Biology Insights, Inc.), в то время как для секвенирования клонированных фрагментов в плазмиде – при помощи программы Primer BLAST [Ye et al., 2012].

Таблица 5.1. Олигонуклеотиды, использованные в работе.

Название	Структура олигонуклеотида 5'- 3'
APHVIII-pMIND-f	GAC AGG ATC CGG AGG AAA TGT TAT GGA CGA TGC GTT GCG TGC ACT
APHVIII-pMIND-r	ATG CAC TAG TTT AGA AGA ACT CGT CCA ACA GCC GGT
psmt3-aph-f	TTG CGG ATC CAA TGG ACG ATG CGT TGC GTG CAC T
psmt3-aph-r	CGA TAA GCT TTT AGA AGA ACT CGT CCA ACA GCC GGT
seq-Psmt3-f	AGC GTA AGT AGC GGG GTT G
seq-Psmt3-r	CGA GGG GAT TAC ACA TGA CCA
Seq-pMIND-f	AGA CGC TTC CGG TGG TGA
Seq-pMIND-r	GCA GGC TCG CGT AGG AAT
T7prom	TTA ATA CGA CTC ACT ATA GG
T7term	CTA GTT ATT GCT CAG CGG
APHBD.1+	CC CGT GAT GTC GCT GAA GGG ACC GGC GTC TTG CCG ATC CTG GA
APHBD.1-	TC CAG GAT CGG CAA GAC GCC GGT CCC TTC AGC GAC ATC ACG GG
APHBD.2+	CC CGT GAT GTC GCT GAA GGG ACC GGC GAG TTG CCG ATC CTG GA
APHBD.2-	TC CAG GAT CGG CAA CTC GCC GGT CCC TTC AGC GAC ATC ACG GG

APHBD.4+	CC CGT CTT GTC GCT GAA GGG ACC GTC GAC TTG CCG ATC CTG GA
APHBD.4-	TC CAG GAT CGG CAA GTC GAC GGT CCC TTC AGC GAC AAG ACG GG
APHBD.5+	CC CGT CTT GTC GCT GAA TTG ACC GGC GAC TTG CCG ATC CTG GA
APHBD.5-	TC CAG GAT CGG CAA GTC GCC GGT CAA TTC AGC GAC AAG ACG GG
APHBD.6+	GCG GCC ATC CTT GTC GCT GAA GGG ACC GTC GAC TTG CCG ATC CTG GA
APHBD.6-	TC CAG GAT CGG CAA GTC GAC GGT CCC TTC AGC GAC AAG GAT GGC CGC
APHBD.7+	GCG GCC ATC CTT GTC GCT GAA TTG ACC GGC GAC TTG CCG ATC CTG GA
APHBD.7-	TC CAG GAT CGG CAA GTC GCC GGT CAA TTC AGC GAC AAG GAT GGC CGC

5.3. Культивирование бактерий

Выращивание клеток штаммов *E. coli* проводили в среде LB (10 г/л бакто-триптона, 10 г/л NaCl, 5 г/л дрожжевого экстракта) при 37⁰С и 250 об/мин. Выращивание клеток *M. smegmatis mc2 155* проводили в среде Lemco-Tw (5 г/л Lemco Powder (Oxoid, Соединенное Королевство), 5 г/л NaCl, 5 г/л бакто-пептона (Oxoid, Соединенное Королевство), 0,05% Tween-80) при 37⁰С и 250 об/мин. Твердые среды содержали 2,0% агара. В качестве среды для тестирования соединений в тест-системе использовали среду M290 (триптон-соевый агар, HiMedia, Индия).

5.4. Манипуляции с ДНК

5.4.1. Выделение плазмидной ДНК

10-50 мл среды LB с селективным антибиотиком засеивали бактериальной культурой *E. coli*, содержащей необходимую плазмиду и инкубировали в термостатированном в шейкере в течение ночи при 37°C и 250 об/мин. Затем биомассу собирали центрифугированием в течение 10 мин при 7800 об/мин. Непосредственно выделение плазмиды проводили наборами GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific) либо QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN) по инструкциям производителей из культур объемом в 10 мл. Для достижения высокого выхода плазмидной ДНК использовали набор QIAGEN Plasmid Midi Kit Plus (QIAGEN) и объем культуры 50 мл.

5.4.2. Очистка фрагментов ДНК из агарозного геля

Выделение фрагмента ДНК из 1% агарозного геля проводили с помощью наборов GeneJET Gel Extraction Kit (ThermoFisher Scientific) либо QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

5.4.3. Очистка ДНК из реакционной смеси

Очистку ДНК из реакционной смеси (после амплификации, рестрикции либо лигирования) проводили наборами GeneJET PCR Purification Kit (ThermoFisher Scientific) либо QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN).

5.4.4. Амплификация

Амплификацию ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили с использованием набора High Fidelity PCR Enzyme Mix (ThermoFisher Scientific) на приборах CFX96 (Bio-Rad), SpeedCycler2 (AnalyticJena) и Терцик

ТП4-ПЦР01 (ДНК-технология). Реакционная смесь содержала: 1× буфер для ПЦР, MgCl₂ 1,5mM, ∑dNTPs 0,5 mM каждого, смесь ферментов из расчета 5 е.а. на 100 мкл смеси, праймеры по 20 нг на 100 мкл смеси, а также матричную ДНК в количестве от 1 до 100 нг на 100 мкл смеси. За базовую температуру отжига брали температуру, предложенную программой, в которой подбирали праймеры, однако оптимальную температуру отжига подбирали при помощи температурного градиента на приборе CFX96.

Время достройки рассчитывалось как 1 мин на 1 т.п.н.

5.4.5. Рестрикция

Для рестрикции целевых образцов ДНК использовали эндонуклеазы серии FastDigest фирмы “Fermentas”. Реакцию рестрикции проводили при 37°C в течение 20 минут, после чего проводили термоинактивацию, если она была предусмотрена протоколом фирмы производителя. Рестрицированные ампликоны очищали по методике, описанной в пункте 5.4.3, в то время как рестрицированные плазмиды выделяли из агарозного геля.

5.4.6 Лигирование

При проведении реакции лигирования использовали T4 ДНК лигазу фирмы “Fermentas”. Молярное соотношение вектора и вставки в реакционной смеси составляло 1:5.

Реакционная смесь имела следующий состав: плазмидный вектор, клонируемый фрагмент, T4 ДНК лигаза (30 е.а. на 30 мкл смеси), 1× лигазный буфер. Реакцию проводили при температуре 22°C в течение 1 часа, после чего проводили термоинактивацию фермента при 65°C в течение 10 минут.

5.4.7. Электрофорез ДНК в агарозном геле.

Для анализа длины и количества фрагментов ДНК проводили электрофорез в 1% агарозном геле. Агарозу (“Amresco”, США) плавил в электрофорезном буфере TAE (Tris-ацетат 40 mM, EDTA 1 mM, pH=7,6), после застывания гель погружали в ванночку с электрофорезным буфером. Пробы наносили с добавлением 6-кратного красителя “6x Loading Die” (ThermoFischer Scientific, США), в качестве маркера длин фрагментов использовали ДНК фага λ , рестрицированного по сайтам эндонуклеаз рестрикции *EcoRI* и *HindIII* (ThermoFischer Scientific, США), либо маркеры серии GeneRuler (ThermoFischer Scientific, США). Электрофорез проводили при напряженности 5-7,5 В/см.

5.4.8. Определение количества ДНК

Приблизительное количество ДНК в пробе определяли по электрофореграмме. Точное количество ДНК в пробе устанавливали с использованием набора Qubit dsDNA BR Kit (ThermoFischer Scientific, США) на приборе Qubit (ThermoFischer Scientific, США) по протоколу производителя.

5.4.9. Процедура сайт-направленного мутагенеза области Ser-146 аминокликозидфосфотрансферазы AphVIII

Для проведения сайт-направленного мутагенеза использован метод точковых мутаций Нельсона [Nelson et al., 1989]. Для получения мутантных вариантов использованы пары праймеров серии APHBD, в качестве внешних праймеров использовались APHVIII-pMIND-f и APHVIII-pMIND-r, соответствующие 5' и 3' концевым фрагментам структурной части гена *aphVIII*.

В качестве матрицы использовали нативную нуклеотидную последовательность гена *aphVIII*, клонированного в вектор pET16b.

Полученные в результате проведенного мутагенеза фрагменты секвенировали для подтверждения соответствующих нуклеотидных замен, после чего клонировали в составе необходимого экспрессионного вектора. Из отобранных трансформантов выделяли плазмидные ДНК и пересеквенировали полученные мутантные гены.

5.5. Трансформация

5.5.1 Получение компетентных клеток *E. coli*

10 мл среды LB инокулировали штаммом *E. coli* и инкубировали в термостатированном в шейкере в течение ночи при 37°C и 250 об/мин. Затем клетки засеивали (из расчета 1:50) в 10 мл свежей среды LB OD₆₀₀=0,05. Суспензия инкубировалась при 37°C в шейкере (200-250 об/мин) в течение 1,5-2 часов до достижения оптической плотности OD₆₀₀=0,15, после чего клетки собирали центрифугированием при 8 000 об/мин в течение 10 мин при +4°C. Осадок ресуспендировали в 5 мл ледяного раствора CaCl₂ 0,1М и инкубировали при +4°C в течение 40 минут, после чего клетки вновь осаждали центрифугированием 10 мин при 8 000 об/мин и +4°C. Осадок ресуспендировали в 1 мл раствора CaCl₂ 0,1М, затем добавляли стерильный ледяной глицерин до конечной концентрации 10%, делили суспензию на аликвоты по 100 мкл, которые помещали в охлажденные стерильные микропробирки и замораживали при -80°C.

5.5.2 Трансформация клеток *E. coli*

Компетентные клетки оттаивали в ледяной бане в течение 10 мин. После чего в клеточную суспензию добавляли плазмидную ДНК в количестве 1-50 нг, либо весь объем лигазной смеси на 100 мкл суспензии и инкубировали во льду в течение 40 мин. Затем клетки подвергали тепловому шоку при 42°C в течение 1,5 мин. Далее помещали в ледяную баню на 5 мин. По прошествии этого времени, к

клеточной суспензии добавляли 1 мл среды LB и инкубировали 40-60 мин в термостате при 37°C (1-2 генерации). Суспензию растирали на чашки с агаризованной LB, содержащей необходимый антибиотик в качестве селективного агента [Sambrook et al., 1989].

5.5.3. Получение электрокомпетентных клеток *M. smegmatis*

10 мл среды Lemco-Tw инокулировали петлей клетками *M. smegmatis*, после чего выращивали при 37°C и 250 об/мин в течение 1-3 дней до достижения $OD_{600}=0,4-0,6$. Далее суспензию разводили свежей средой Lemco-Tw в 100 раз (до конечного объема 100 мл) и выращивали в тех же условиях 1-2 дня до достижения $OD_{600}=0,6-1,0$, после чего клетки инкубировали 1,5 часа на ледяной бане (+4°C) и собирали центрифугированием при $3000\times g$ и +4°C. Далее клетки промывали заранее охлажденным стерильным 10% раствором глицерина, приготовленным на деионизованной воде (mQ), постепенно уменьшая объем (50-20-10 мл). После этого клетки ресуспендировали в 2 мл 10% глицерина, делали аликвоты по 50 мкл и замораживали при -80°C.

5.5.4. Электропорация *M. smegmatis*

Аликвоту электрокомпетентных клеток *M. smegmatis* оттаивали на ледяной бане в течение 20 минут, после чего добавляли к ней 0,5-5 мкг плазмидной ДНК в объеме, не превышающем 5 мкл, смешивали пипетированием и оставляли на льду на 10 минут. После этого смесь переносили в 2 мм кюветы для электропорации фирмы "Bio-Rad" и подвергали электрическому импульсу по программе Ec2 (1 импульс, 2,5 кВ) на приборе MicroPulser («Bio-Rad»). После импульса кювету инкубировали на ледяной бане 10 минут, затем добавляли 1 мл среды Lemco-Tw и инкубировали 2-3 часа при 37°C с периодическим взбалтыванием. 100 мкл

суспензии растирали на чашки с агаризованной средой Lemco, содержащей необходимый антибиотик в качестве селективного агента.

5.5.5. Скрининг клонов с помощью ПЦР

Колонии после трансформации скальвали в 30 мкл H₂O. Смесь для ПЦР готовилась как для обычной реакции амплификации. Смесь разносили в пробирки на 0,5 мл по 22 мкл и добавляли по 3 мкл суспензии клеток. Пробирки помещали в амплификатор. Температура отжига подбиралась с учетом длины и состава праймеров (см. раздел амплификация). При скрининге колоний *M. smegmatis*, клетки предварительно инкубировались 40 мин при 95°C. После завершения амплификации в пробирки добавляли по 5 мкл бх буфера для нанесения на гель и проводили электрофорез в 1% агарозном геле. В качестве маркера использовали ДНК фага λ , рестрицированную эндонуклеазами *EcoRI* и *HindIII*.

5.6. Работа с белками

5.6.1. Получение общего белкового лизата клеток *E. coli*

Клетки, содержащие сконструированные плазмиды, выращивали в жидкой среде LB, содержащей селективный антибиотик в необходимой концентрации при 37°C до OD₆₀₀=0,4-0,6, затем индуцировали экспрессию гена добавлением ИПТГ до финальной концентрации 1mM. Далее проводили культивирование при 28°C в течение 18 часов, затем отбирали биомассу, которую суспендировали в лизирующем буфере и Sample-буфере в соотношении 2:1.

Состав лизирующего буфера: 20 mM K₂HPO₄ pH 7,2, 0,2 M NaCl, 0,1 mM PMSF, 5 mM EDTA.

Состав Sample-буфера: 62,5 mM Tris-Cl, 5% глицерина, 1 мл 2% меркаптоэтанола, 0,1% SDS, бромфеноловый синий, pH=6.8.

Для лизиса клеток суспензию инкубировали 10 минут при 95°C.

5.6.2. Получение общего белкового лизата клеток *M. smegmatis*

Колонии *M. smegmatis* скальвали в жидкую среду Lemco-Tw, культивировали 1-2 суток до $OD_{600}=0,6-0,8$ при 250 об/мин и 37°C, после чего разводили в 10 раз, добавляли при необходимости индуктор (тетрациклин) и культивировали сутки в тех же условиях. Биомассу из 10 мл среды собирали центрифугированием в течение 10 минут при 8000 об/мин, затем промывали два раза в буфере PBS (137 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM фосфатный буфер, pH=7,4, Amresco, США) с добавлением 0,5 mM PMSF. Клетки ресуспендировали в 200-500 мкл буфера PBS с PMSF и обрабатывали ультразвуком мощностью 100 Вт шесть раз по 30 секунд на льду. К пробам добавляли 5-кратный восстанавливающий буфер (0,625 M Tris-буфер, pH 6,8, 1,25% SDS, 12,5% глицерин, 1 mM DTT, 1 мг/мл бромфенолового синего) и инкубировали 5 минут при 95°C [Triccas et al., 2010].

5.6.3. Электрофорез белков в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях

Для анализа общих лизатов белков проводили электрофорез в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по [Laemmli, 1970].

Состав разделяющего геля: 375 mM Tris-Cl, 0,025% SDS, 12,5% акриламид, 5% глицерина, pH=8,8.

Состав концентрирующего геля: 125 mM Tris-Cl, 0,025% SDS, 5% акриламид, pH=6,8.

Раствор 30% акриламида готовили в следующей пропорции: 29,2% акриламида, 0,8% метилен-бисакриламида.

Для полимеризации геля добавляли 0,1% PSA и 1 мкл/мл TEMED.

В карманы геля вносили лизаты, содержащие 20-30 мкг фракции растворимого белка.

Электрофорез проводили при напряженности по концентрирующему гелю 7,5 В/см, по разделяющему – 9-10 В/см.

Состав электродного буфера: 25 мМ Trisma base, 192 мМ глицин, 0,1% SDS, рН=8,3-8,4.

По окончании фореа гель помещали на 20 мин в фиксирующий раствор следующего состава: 150 мл этанола, 40 мл ледяной уксусной кислоты, 110 мл воды. Окрашивание проводилось при нагревании красителем кумаси G-250 в растворе следующего состава: 0.4 г кумаси G-250, 80 мл 96% спирта, 40 мл ледяной уксусной кислоты 180 мл H₂O. Гель отмывали 7% уксусной кислотой при нагревании.

5.6.4. Очистка белков PknA *M. tuberculosis* и AphVIII с гистидиновой меткой из клеток *E. coli*

Синтез гена *pknA M. tuberculosis* с адаптацией кодонов для оптимизации экспрессии в клетках *E. coli* был проведен компанией «Евроген». Ген был синтезирован и клонирован в составе экспрессионного вектора рЕТ-32а. Плазмиды, содержащие гены *pknA* и *aphVIII* были трансформированы в штамм *E. coli BL21 (DE3) pLysS*, экспрессию проводили, как описано выше.

Очистку белков проводили при помощи набора Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen, США) по протоколу производителя со следующими уточнениями.

После проведения экспрессии, клетки, собранные центрифугированием 300 мл культуры (5000 об/мин, 10 мин, 4°C), ресуспендировали в 40 мл нативного лизирующего буфера (50 мМ NaH₂PO₄, 5 мМ Трис-НСl, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазола, рН 8,0) с добавлением 0,1 мМ PMSF, 0,5 мМ DTT, 400 мкл раствора лизоцима (10 мг/100 мкл), 20 мМ 2-меркаптоэтанола и 0,5 % Тритона X-100. Инкубировали в ледяной бане в течение 1 часа, периодически аккуратно помешивая суспензию, затем обрабатывали ультразвуком в течение 8 мин (20 сек ультразвука, пауза 15 сек). Центрифугировали (7500 об/мин, 30 мин, 4°), затем

отбирали лизат. Лизат пропускали через колонку, затем колонку 4 раза промывали 4 мл нативного промывочного буфера (50 мМ NaH_2PO_4 , 5 мМ Трис- HCl , 300 мМ NaCl , 50 мМ имидазола, рН 8,0) с добавлением 0,1 мМ PMSF, 0,5 мМ DTT и 0,5 % Тритона X-100. Связавшиеся белки элюировали с колонок 1 мл нативного элюирующего буфера (50 мМ NaH_2PO_4 , 5 мМ Трис- HCl , 300 мМ NaCl , 300 мМ имидазола, рН 8,0) с добавлением 0,1 мМ PMSF, 0,5 мМ DTT и 0,5 % Тритона X-100. Проводили диализ в течение ночи в буфере, содержащем 25 мМ HEPES- Na рН 8,0, 500 мМ NaCl , 1 мМ DTT, 2 мМ MgCl_2 и 10% глицерина на диализных колонках Slide-A-Lyzer 30K (ThermoFisher Scientific, США).

5.6.5. Постановка *in vitro* киназной реакции

Ингибирующая активность соединений в отношении PknA и AphVIII проверялась в киназной реакции при помощи набора Kinase-Glo Plus Luminescent Kinase Assay Kit (Promega, США) на рабочей станции Biomek 3000 (Beckman Coulter, США) по протоколу описанному в [Baki et al., 2007].

Фосфорилирование субстрата оценивали косвенно, по уровню люминисценции остаточной АТФ. В качестве субстрата PknA использовали олигопептид IVDAELTGEIPII [Prisic et al., 2010], в качестве субстрата AphVIII – канамицин.

Реакционная смесь состояла из трех компонентов: 15 мкл белка-мишени в реакционном буфере (15 мМ HEPES, рН=7,4, 20 мМ NaCl , 10 мМ MgCl_2 , 0,5 мМ EDTA, 0,02% Tween-20, 0.1 мг/мл BSA), 15 мкл АТФ и субстрата в реакционном буфере (для PknA конечные концентрации - 5 мкМ АТФ и 1,1 мг/мл субстрата, для AphVIII – 10 мкМ АТФ и 0,1 мг/мл субстрата) и 15 мкл исследуемого соединения в реакционном буфере.

Сначала к белку добавляли ингибитор, после чего инкубировали смесь 30 мин при 37°C, затем добавляли раствор АТФ и субстрата, после чего инкубировали еще 1 час при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 45 мкл

реактива Kinase-Glo, инкубировали 15 минут при комнатной температуре для получения стабильного сигнала и измеряли люминисценцию на приборе DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter, США).

В качестве положительного контроля (K_{Π}) использовали реакцию смесь без ингибитора (объем доводили реакционным буфером), в качестве отрицательного (K_{O}) – без целевого белка (объем доводили реакционным буфером). Также ставили контроли без АТФ, без субстрата, а также без белка, но с контрольным ингибитором (во всех случаях объем доводили реакционным буфером).

Процент ингибирования вычисляли по формуле:

$$\text{Ингибирование \%} = 100 \times (\text{свечение с ингибитором} - K_{\Pi}) / (K_{O} - K_{\Pi})$$

Качество эксперимента определяли путем вычисления Z' -фактора [Zhang et al., 1999] для каждого планшета, по формуле:

$$Z' = 1 - 3 \times \text{ССО} / (K_{O} - K_{\Pi})$$

Где ССО – сумма стандартных отклонений положительных и отрицательных контролей. Удавшимися считались эксперименты, в которых значение Z' -фактора превышало 0,5.

5.7. Методика тестирования соединений в тест-системе *M. smegmatis aphVIII+*

Культуру *M. smegmatis aphVIII+* выращивали в среде Lemco-Tw до достижения $OD_{600}=1,2$, после чего разводили в соотношении 1:9:10 (культура:вода:среда M290) и заливали верхним слоем по 5 мл на чашки Петри с агаризованной средой M290 в качестве нижнего слоя. В среду добавляли селективный антибиотик гигромицин до конечной концентрации 50 мкг/мл, а также, при необходимости – тетрациклин для индукции.

После высыхания чашек с культурой, на них производилось наложение бумажных дисков с исследуемым веществом, либо с канамицином, либо с их

комбинацией. Чашки инкубировали при 37°C до появления газона, после чего производили измерение зон ингибирования роста культуры.

5.8. Исследование активности соединения TSV-395 в отношении

M. tuberculosis

5.8.1. Исследование бактериостатического и бактерицидного действия TSV-395 на лекарственно-чувствительный и МЛУ штаммы *M. tuberculosis*

Бактериостатическое действие соединения TSV-395 в отношении чувствительного лабораторного штамма *M.tuberculosis* H37Rv и штамма с МЛУ MS-115 изучали по динамике роста культуры в обогащенной жидкой среде Middlebrook 7H9 в системе ВАСТЕС MGIT 960 в присутствии тестируемого соединения в конечной концентрации 0,2 мкг/мл, 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 25 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл.

В качестве контроля для чувствительного штамма использовали рифампицин в критической концентрации 1 мкг/мл, в то время как для штамма с МЛУ использовали три препарата - рифампицин и изониазид, как препараты, являющиеся ключевыми при отнесении штаммов к категории МЛУ, и офлоксацин в качестве препарата, к которому сохранена чувствительность. Все контрольные препараты использовали в критических концентрациях (рифампицин - 1 мкг/мл, изониазид - 0,1 мкг/мл и офлоксацин - 2 мкг/мл).

5.8.2. Исследование антимикобактериальной активности и токсичности TSV-395 в системе *ex vivo* инфицированных перитонеальных макрофагов мыши

Для проведения испытаний использовали чувствительный к противотуберкулезным препаратам лабораторный штамм *M.tuberculosis* H37Rv и

клинический штамм *M.tuberculosis* MS-115 с МЛУ в виде суспензии одиночных клеток, стандартизованных по КОЕ и фазе роста. Заражение макрофагов микобактериями осуществляли в плоскодонных 96-луночных планшетах в среде RPMI с 5% FCS без антибиотиков. После фагоцитирования микобактерий макрофагами (в течение 24 часов), в лунки был добавлено 6 концентраций соединения TSV-395, а также контрольные препараты в критических концентрациях - рифампицин (1 мкг/мл) и офлоксацин (2 мкг/мл). Определяли противотуберкулезную активность соединения TSV-395 в модели *ex vivo* по выявлению ДНК микобактерий методом количественной ПЦР в режиме реального времени и по росту микобактерий, фагоцитированных макрофагами, после воздействия соединения TSV-395 при пересеве на агаризованную среду Дюбо. Оценку действия соединения TSV-395 на интактные и зараженные микобактериями макрофаги проводили по выходу из разрушенных макрофагов в среду ЛДГ.

5.9. Анализ цитотоксичности аминопиридинов и аминопиримидинов

Анализ цитотоксичности исследуемых соединений проводился при помощи МТТ-теста на фибробластах эмбриона человека (кожно-мышечная ткань).

Клетки ФЭЧ культивировали в средах DMEM с добавлением 200 мМ L-глутамин, 7-10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 Ед/мл пенициллина и 100 Ед/мл стрептомицина. Клетки рассевали на 96-луночные планшеты. Каждую концентрацию препарата изучали в трех повторах. Культуру инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 72 часов, после чего среду удаляли, в лунки вносили 200 мкл ростовой среды без эмбриональной телячьей сыворотки, добавляли 20 мкл готового раствора МТТ (исходная концентрация 5 мг/мл в фосфатном буфере).

О жизнеспособности клеток судили по цветной реакции, развивающейся при восстановлении тетразоля в формазан дегидрогеназами митохондрий. Окраску регистрировали на ридере Beckman Coulter DTX 880 (Multimode Detector) при

длине волны возбуждения 595 нм. Оптическую плотность в лунках, где клетки инкубировались только со средой (контроль), принимали за 100%.

5.10. Биоинформатические методы

Последовательности генов были получены из базы данных GenBank NCBI.

Аннотацию доменной структуры белков проводили при помощи алгоритма SMART [Letunic et al., 2015; Schultz et al., 1998].

Гомологию аминокислотной последовательности белков исследовали в программе BLAST [Johnson et al., 2008].

Выравнивание аминокислотных последовательностей проводили в программе Clustal-Omega [Sievers et al., 2011]. Для построения филогенетических древ использовали программу Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) версии 6.06 [Tamura et al., 2013], древа строили по методу присоединения соседей (neighbour-joining).

Анализ адаптированности кодонов проводили в программе Graphical Codon Usage Analyser (GCUA) [Fuhrmann et al., 2004] с использованием базы данных использования кодонов [Nakamura et al., 2000].

Молекулярный докинг соединения TSV-395 и АТФ-связывающего кармана PknA *M. tuberculosis* проводили с использованием методологии Surfex, реализованной в программном пакете SYBYL-X 1.3. Докинг проводился в область связывания АТФ без наложения ограничений на наличие лиганд-рецепторных взаимодействий.

Глава 6. Результаты и обсуждение

6.1. Исследование возможности использования *M. smegmatis* как модели для отбора ингибиторов СТПК *M. tuberculosis*

M. smegmatis это быстрорастущие сапрофитные микобактерии, которые отличаются быстрой скоростью роста (1-3 суток до выхода в стационарную фазу). Работа с *M. smegmatis* облегчается непатогенностью этого микроорганизма, а также сравнительно нетрудоёмкими методами генетических манипуляций с ним (посредством электропорации, конъюгации и трансдукции), а штамм *M. smegmatis* mc² 155 отличается повышенной частотой трансформации, что делает работу с ним еще более комфортной.

Несмотря на то, что клеточная стенка *M. smegmatis* по проницаемости схожа с таковой у *M. tuberculosis* и такие новые противотуберкулезные препараты, как бедаквилин, были изначально отобраны на *M. smegmatis* [Andries et al., 2005], споры об адекватности *M. smegmatis*, как модели для *M. tuberculosis* ведутся до сих пор [Altaf et al., 2010; Reyrat et al., 2001]. До 50% препаратов, показывающих антибактериальную активность на *M. tuberculosis* были неактивны по отношению к *M. smegmatis* [Altaf et al., 2010], что может быть связано, как с различиями в биомишенях, так и с наличием у *M. smegmatis* большого набора клеточных транспортеров, придающих ей природную устойчивость к ряду препаратов [Li et al., 2004].

В связи с этим, на первом этапе работы была поставлена задача валидировать *M. smegmatis* mc² 155, как адекватную тест-систему для отбора ингибиторов СТПК *M. tuberculosis*.

В геноме *M. smegmatis* mc² 155 (gi:118467340) 18 генов аннотировано, как гены, кодирующие СТПК. При более детальном рассмотрении, нами были отстранены 5 генов (MSMEG_1215, MSMEG_2410, MSMEG_4554, MSMEG_4595

и MSMEG_5288), так как они не имели предсказанного киназного домена и являлись, скорее всего, лишь фрагментами генов СТПК.

Остальные 13 генов рассмотрены в данной работе. Сравнение генетических карт кольцевых хромосом *M. smegmatis* и *M. tuberculosis* с отмеченными генами СТПК представлено на рисунке 6.1, а общая доменная структура – на рисунке 6.2. Как видно, 9 белков из 13 являются рецепторными киназами, имеющими трансмембранный домен, и 4 являются растворимыми цитозольными СТПК. Из обнаруженных в белках внеклеточных доменов стоит отметить характерные для PknB четыре PASTA-домена в белке MSMEG_0028, предсказанный мимозин-связывающий домен (обозначен PVPb), характерный для ABC-транспортера MidA [Borthakur et al., 2003] в белке MSMEG_1200, а также предсказанный домен липопротеина (Lpp-LpqN) [Sutcliffe et al., 2004] в белке MSMEG_5513.

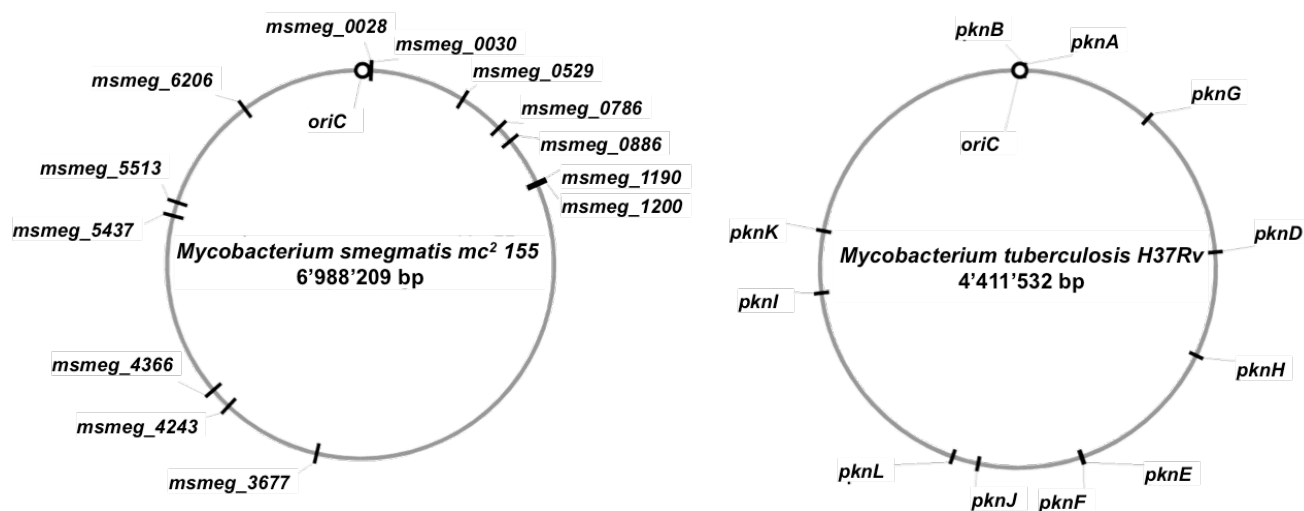


Рисунок 6.1. Генетические карты хромосом *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*, с отмеченными генами СТПК.

Из протеинкиназ, не имеющих трансмембранных доменов, стоит отметить белок MSMEG_0729, содержащий Р-петлю AAA+ АТФазы, PDZ-домена и TPR-повтора, характерные для PknK *M. tuberculosis*.

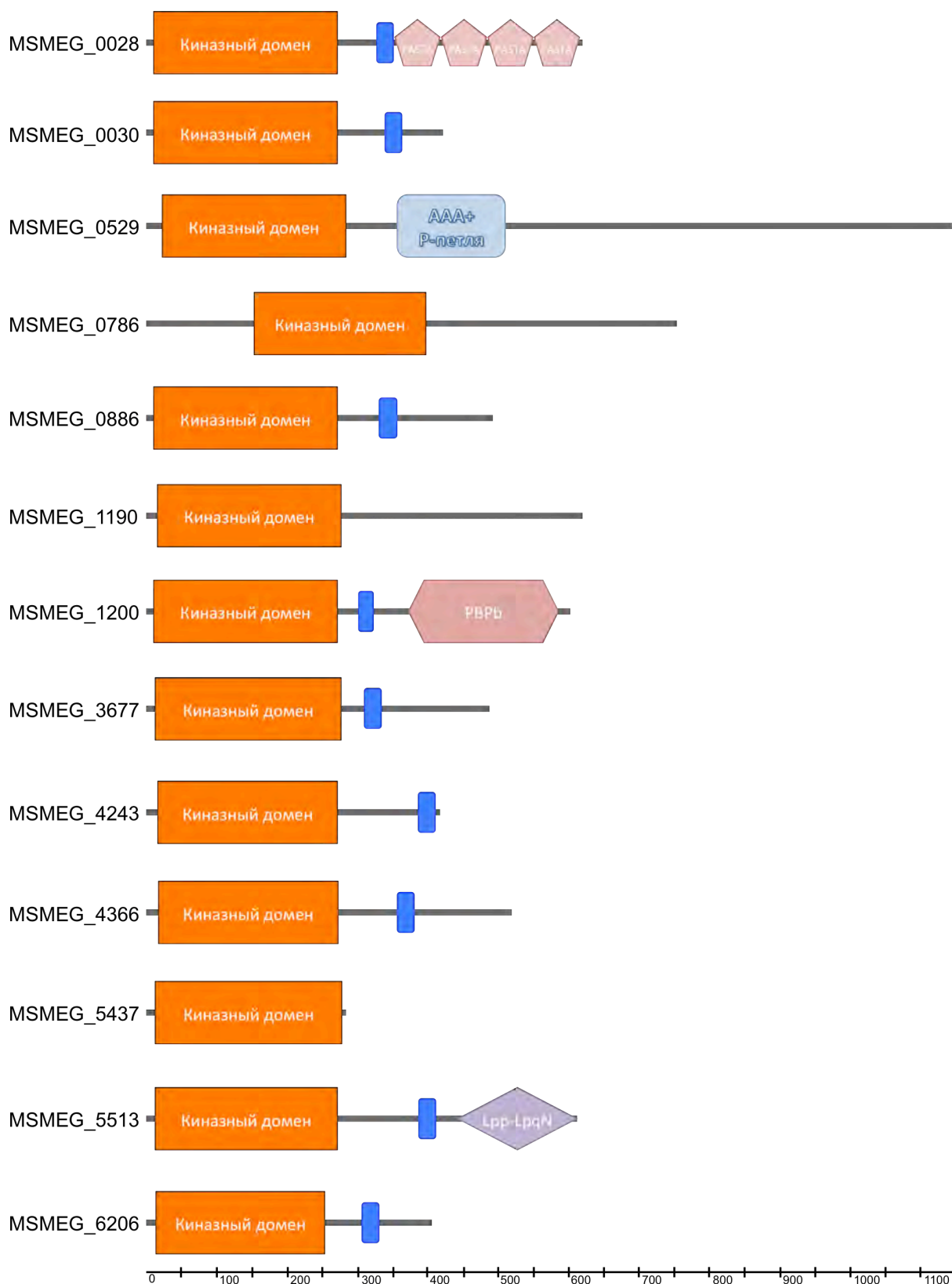


Рисунок 6.2. Доменная структура СТПК *M. smegmatis*. Отмечены домены, предсказанные алгоритмом SMART [Letunic et al., 2015; Schultz et al., 1998], трансмембранные домены представлены синими прямоугольниками.

В программе BLAST было проведено сравнение аминокислотных последовательностей каталитических доменов СТПК *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*. Результаты этого сравнения представлены в таблице 6.1. Как видно из таблицы, наиболее близкие гомологи есть у PknA и PknB (MSMEG_0030 и MSMEG_0028, 91% идентичности последовательностей киназных доменов), у PknG (86% идентичности предсказанной аминокислотной последовательности киназного домена), у PknL (MSMEG_4243, 79% идентичности последовательности киназного домена), у PknF (MSMEG_3677, 75% идентичности последовательности киназного домена) и у PknK (MSMEG_0529, 73% идентичности последовательности киназного домена). При этом у *M. smegmatis* есть 4 СТПК, являющиеся относительно близкими гомологами PknF: помимо вышеуказанной MSMEG_3677, это – MSMEG_1190 (70% идентичности), MSMEG_5513 (69% идентичности) и MSMEG_0886 (67% идентичности). Данный факт позволяет предположить мультипликацию гена-гомолога *pknF* в геноме *M. smegmatis*. Остальные СТПК этих микроорганизмов имеют степень идентичности киназных доменов, не превышающую 57%.

Таблица 6.1. Гомология (% идентичности) каталитических доменов СТПК *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*. **Красным** шрифтом выделен самый близкий гомолог СТПК *M. smegmatis* в геноме *M. tuberculosis*. Подчеркнутым шрифтом выделен самый близкий гомолог СТПК *M. tuberculosis* в геноме *M. smegmatis*.

		<i>Mycobacterium smegmatis</i>												
		MSME G_0028	MSME G_0030	MSME G_0529	MSME G_0786	MSME G_0886	MSME G_1190	MSME G_1200	MSME G_3677	MSME G_4243	MSMEG _4366	MSMEG _5437	MSMEG _5513	MSMEG _6206
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	PknA	45	<u>91</u>	38	45	36	36	42	38	41	41	31	38	46
	PknB	<u>91</u>	46	36	34	39	40	41	42	44	39	32	42	41
	PknD	40	37	34	31	43	40	<u>53</u>	43	35	52	34	42	40
	PknE	39	39	31	29	40	38	53	42	37	<u>57</u>	32	38	42
	PknF	44	36	35	29	67	70	41	<u>75</u>	34	41	34	69	38
	PknG	32	33	35	<u>86</u>	31	29	30	30	30	32	30	29	34
	PknH	38	40	31	29	42	39	52	43	35	<u>57</u>	34	39	38
	PknI	32	30	33	28	<u>53</u>	49	35	52	33	38	30	52	33
	PknJ	44	35	38	30	48	49	44	48	36	41	34	<u>50</u>	39
	PknK	39	41	<u>73</u>	30	40	39	39	39	38	41	29	38	41
	PknL	46	45	35	32	32	37	42	38	<u>79</u>	38	29	33	44

На основе множественного выравнивания аминокислотных последовательностей киназных доменов СТПК *M. tuberculosis* и *M. smegmatis*, а также на основе выравнивания аминокислотных последовательностей полноразмерных белков СТПК, были построены филогенетические деревья, представленные на рисунке 6.3.

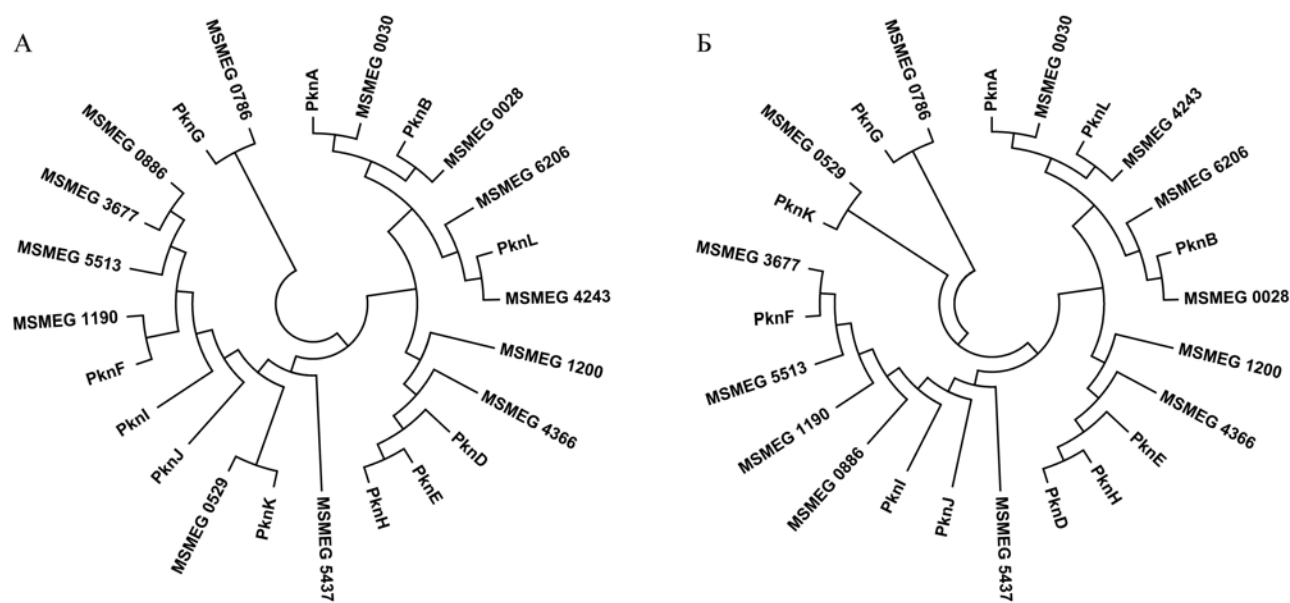


Рисунок 6.3. Филогенетические деревья, построенные на основе выравнивания аминокислотных последовательностей (А) каталитических доменов и (Б) полноразмерных СТПК *M. tuberculosis* и *M. smegmatis*.

Как видно из рисунка 6.3, основные пары гомологов совпадают (как по последовательностям киназных доменов, так и по полной аминокислотной последовательности СТПК): PknA-MSMEG_0030, PknB-MSMEG_0028, PknG-MSMEG_0786, PknK-MSMEG_0529 и PknL-MSMEG_4243. Что касается белка PknF, то по киназному домену ему ближе всего оказался MSMEG_1190, а по всей последовательности белка – MSMEG_3677, а также в обоих вариантах достаточно близки были MSMEG_0886 и MSMEG_5513, что подтверждает теорию о мультипликации гена *pknF* в геноме *M. smegmatis*.

Таким образом, на основе проведенного анализа можно выделить уникальные СТПК для *M. tuberculosis*, среди которых находятся ключевые для вирулентности PknD, PknE, а также протеинкиназы PknH, PknI и PknJ. Для *M. smegmatis* уникальными можно считать протеинкиназы MSMEG_5437, MSMEG_1200, MSMEG_4366 и MSMEG_6206. Последние три киназы не изучены, однако для MSMEG_5437 показано участие в комплексной сети природной устойчивости *M. smegmatis* к ряду стрессов и антибиотиков [Bowman et al., 2014]. Так, MSMEG_5437 фосфорилирует анти-сигма фактор MSMEG_6129, который, в свою очередь, включает множество клеточных помп, ABC-транспортеров, каталаз, транскрипционных факторов (либо напрямую, либо через такие глобальные регуляторы устойчивости к антибиотикам, как WhiB7), обеспечивая клеткам устойчивость к различным стрессовым агентам, среди которых митомицин-С и перекись водорода, а также как минимум к четырем антибиотикам – изониазиду, хлорамфениколу, эритромицину и тетрациклину [Bowman et al., 2014].

В качестве вывода данного этапа исследования можно сказать, что *M. smegmatis* является адекватной моделью для отбора ингибиторов следующих СТПК *M. tuberculosis*: жизненно-важных PknA, PknB и PknG, а также PknF, PknK и PknL.

6.2. Конструирование тест-системы *M. smegmatis aphVIII+*

6.2.1. Клонирование и экспрессия гена *aphVIII* в клетках *M. smegmatis mc² 155*

Концепция тест-системы предполагает экспрессию гена *aphVIII S. rimosus* в клетках *M. smegmatis*. Активность белка AphVIII, фосфорилируемого СТПК, повышается, что приводит к повышению уровня устойчивости клеток к канамицину. При добавлении в тест-систему активного ингибитора СТПК, это

фосфорилирование снимается и уровень устойчивости падает, что и фиксируется при исследовании [Беккер и др., 2008]. В данной работе был выбран путь гетерологической экспрессии гена *aphVIII* в составе плазмидного вектора.

Большинство микобактериальных плазмид содержат репликон pAL5000, малой криптической плазмиды, выделенной из *M. fortuitum* [Labidi et al., 1985; Movahedzadeh et al., 2010]. Поскольку число копий таких плазмид в клетках *M. smegmatis* варьирует в пределах от двух до пяти, для генетических манипуляций с микобактериями используют так называемые «челночные» векторы (shuttle vectors), имеющие, помимо микобактериального репликона pAL5000, средне- или многокопийный репликон *E. coli* и, соответственно, способные реплицироваться в обоих микроорганизмах [Movahedzadeh et al., 2010]. В таком случае, *E. coli* используется для конструирования и отбора плазмиды с целевым геном, а также для наработки нужного количества готового генетического конструкта, которым трансформируют клетки *M. smegmatis* (либо другого микобактериального организма) для достижения гетерологической экспрессии целевого гена.

В нашем распоряжении было два челночных вектора: pMIND (рис. 5.1) [Blokroel, 2005], любезно предоставленная проф. А.С. Капрельянцем, и pSMT3-mCherry (рис. 5.2) [Carroll et al., 2010], любезно предоставленная лабораторией клеточной микробиологии, ФГБУ "ФНИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи" Минздрава России. Плазмида pMIND, имеющая собственный ген устойчивости к канамицину, требовала модификации для дальнейшей работы. Этот ген был делегирован по сайтам эндонуклеаз рестрикции *Tth111I* и *BstBI*, с получением плазмиды pMINDKm^r (рис. 6.4).

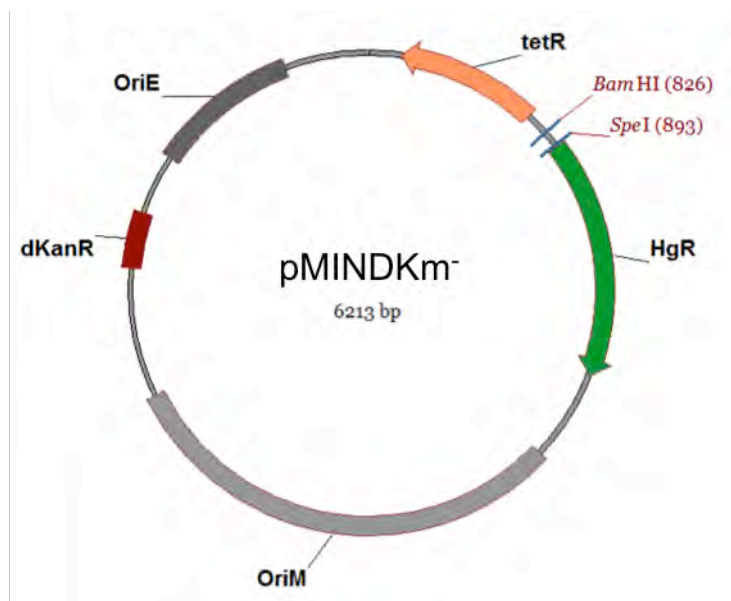


Рисунок 6.4. Схема вектора pMINDKm⁻. dKanR – фрагмент, оставшийся после делетирования гена аминогликозид 3'-фосфотрансферазы из *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1.

Ген *aphVIII* был амплифицирован с плазмиды pET16b-*aphVIII* с использованием пар праймеров APHVIII-pMIND-f/r и psmt3-*aph*-f/r и клонирован в векторы pMINDKm⁻ (по сайтам эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Spe*I) и pSMT3-mCherry (по сайтам эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Hind*III), что привело к получению конструкций pMKA8 и pSMT3-*aphVIII*, соответственно. Полученными конструкциями были трансформированы клетки штамма *M. smegmatis* mc² 155 методом электропорации, описанным в разделе «Материалы и Методы».

Трансформанты *M. smegmatis*, несущие pMKA8 либо pSMT3-*aphVIII*, приобретали устойчивость к канамицину, по сравнению с контрольными трансформантами, содержащими плазмиды pMINDKm⁻ либо pSMT3-mCherry: в первом случае уровень устойчивости к канамицину достигал 200 мкг/мл агаризованной среды, при индукции 20 нг/мл тетрацилина, во втором – 450 мкг/мл агаризованной среды (индукция не требовалась).

Несмотря на высокий уровень устойчивости к канамицину клеток *M. smegmatis*, трансформированных плазмидами с геном *aphVIII*, увидеть белок в ПААГ в денатурирующих условиях не удалось (рис. 6.5). На дорожке 4 (*M. smegmatis* pSMT3-mCherry) проявляются два пятна, содержащие белок mCherry (по данным масс-спектрального анализа, рис. 6.5 а, б), при этом на дорожках 3 и 5 (*M. smegmatis* pMKA8, 23 часа индукции 20 нг/мл тетрациклина, и *M. smegmatis* pSMT3-*aphVIII*, соответственно) в области, соответствующей белку APHVIII по молекулярной массе (рис. 6.5 в), согласно данным масс-спектрального анализа, APHVIII обнаружен не был.

Недостаточное для детекции в ПААГ количество белка, вероятно, связано с наличием в гене *aphVIII* ряда кодонов, редких для *M. smegmatis* (таблица 6.2). Наличие такого количества редких кодонов способно заметно замедлить синтез белка. В то же время, высокий уровень устойчивости к канамицину, при малом количестве белка, может быть обусловлен высокой активностью APHVIII, вызванной его фосфорилированием СТПК *M. smegmatis*.

Таблица 6.2. Редкие кодоны в гене *aphVIII*.

Кодон	Кодируемая аминокислота	Количество кодонов в гене <i>aphVIII</i>	Доля использования кодона при кодировании аминокислоты у <i>M. smegmatis</i> ¹	Относительная приспособленность ^{1,2}
ТТТ	Фенилаланин	2	5%	5%
ТТG	Лейцин	8	9%	16%
СТТ	Лейцин	2	3%	5%
АТТ	Изолейцин	1	4%	4%
ГТТ	Валин	6	4%	8%
ГТА	Валин	2	3%	6%
ССТ	Пролин	3	5%	9%
АСТ	Треонин	1	3%	5%
ГСТ	Аланин	6	4%	9%
ГСА	Аланин	2	9%	20%
АГТ	Серин	2	5%	12%

¹Данные получены из базы данных по использованию кодонов [Nakamura et al., 2000].

²Относительная приспособленность – процентное соотношение доли данного кодона в кодировании данной аминокислоты к доле кодона с максимальным значением.

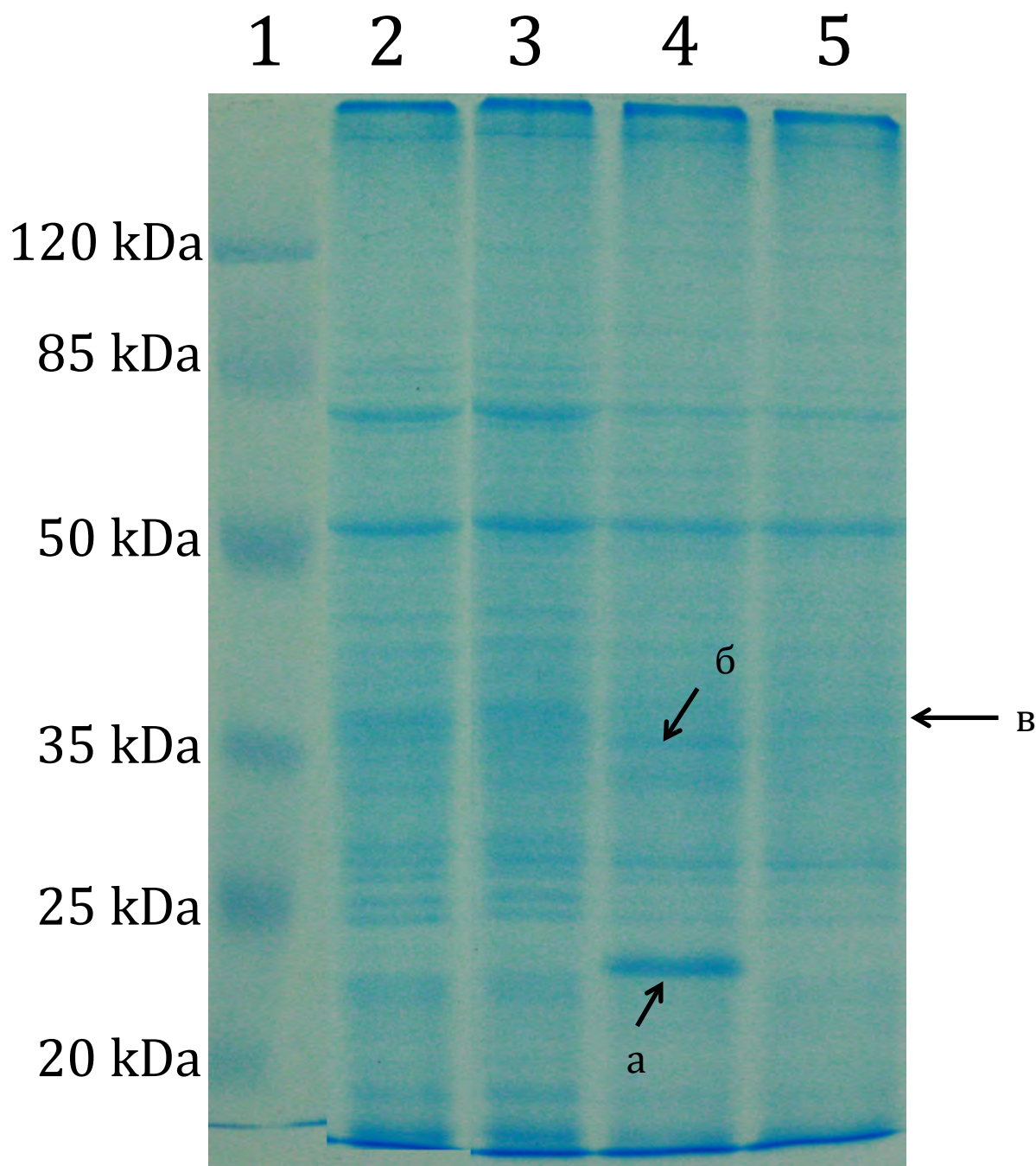


Рисунок 6.5. Электрофореграмма в ПААГ в денатурирующих условиях общего белка лизатов клеток *M. smegmatis* mc² 155, содержащих различные экспрессионные векторы: дорожка 2 – pMINDKm⁻, индукция тетрациклином 20 нг/мл, 23 часа; дорожка 3 – pMKA8, индукция тетрациклином 20 нг/мл, 23 часа; дорожка 4 – pSMT3-mCherry, рост культуры 23 часа; дорожка 5 – pSMT3-aphVIII, рост культуры 23 часа. Дорожка 1 – маркер белковых масс (Prestained Protein MW Marker, ThermoFischer Scientific). Пояснения к стрелкам см. в тексте.

6.2.2. Выбор оптимального вектора для экспрессии гена *aphVIII*

Каждый из используемых в работе экспрессионных векторов имел свои преимущества и недостатки. Так, плазида pMIND, и ее производная pMINDKm⁻, являлась генетически стабильной, хотя уровень экспрессии клонированного в ней гена был ниже, чем в pSMT3, что показано на уровне устойчивости клеток к канамицину. Несмотря на незначительную экспрессию гена в отсутствие индуктора, стабильная экспрессия требовала добавления индуктора тетрациклина, и была дозозависима, что могло выразиться в синергическом эффекте тетрациклина и тестируемых соединений, однако данная проблема решалась системой контролей. Вектор pSMT3, в свою очередь, несмотря на более высокий уровень экспрессии клонированного гена, обусловленный сильным конститутивным промотором *hsp60*, имел склонность к генетической нестабильности, все за счет того же промотора [Carroll et al., 2010]. Чтобы ликвидировать нестабильность, требовалось регулярно проводить селекцию клонов, содержащих плазмиду pSMT3-*aphVIII*, на устойчивость к канамицину. При этом, промоторы в обеих плазидах позволяли проводить экспрессию генов также в клетках *E. coli*, что можно отнести к преимуществам, так как расширяло возможности их использования.

Основным критерием выбора вектора для использования в тест-системе стала стабильность и воспроизводимость получаемых результатов. Для ее оценки был проведен анализ стандартных отклонений результатов измерений зон ингибирования роста методом бумажных дисков, содержащих канамицин.

Анализ данных, полученных в пяти независимых повторах с использованием штамма *M. smegmatis* pSMT3-*aphVIII* и 300 мкг/диск канамицина, показал результат диаметра зоны ингибирования роста $8,9 \pm 1,24$ мм (стандартное отклонение 13,9%).

В то же время, для плазмиды рМКА8 была произведена серия измерений с разной концентрацией индуктора тетрациклина, а также с разным количеством канамицина на дисках. Результаты измерений (средние данные из пяти независимых повторов со стандартными отклонениями) приведены на рисунке 6.6.

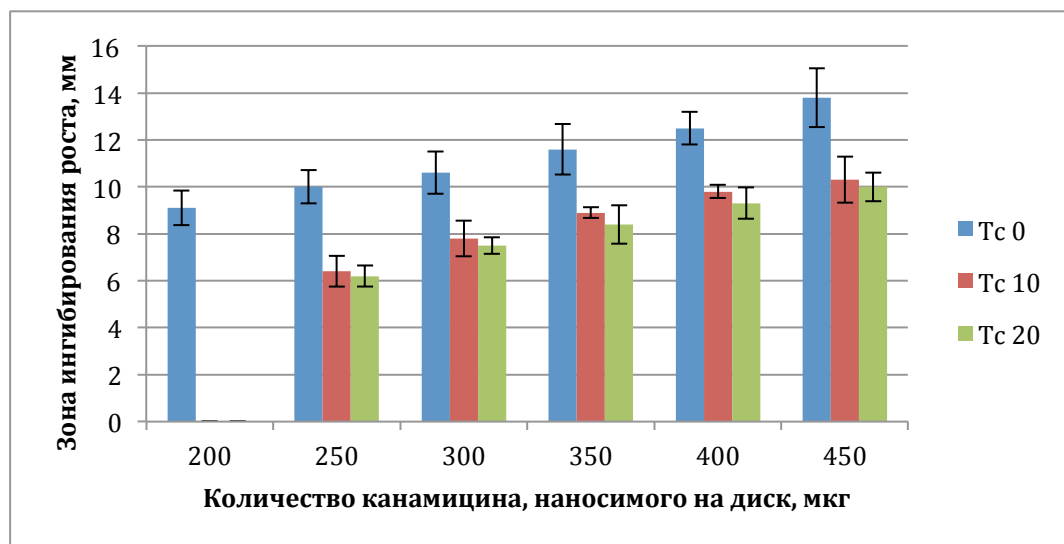


Рисунок 6.6. Гистограмма результатов измерений диаметров зон ингибирования роста культуры *M. smegmatis* рМКА8 в среде с разным содержанием индуктора тетрациклина (0, 10 и 20 нг/мл), вокруг дисков с разным количеством канамицина (200-450 мкг/диск). Вокруг дисков с 200 мкг канамицина, при добавлении индуктора, зон ингибирования роста не наблюдалось.

При добавлении индуктора, зона ингибирования роста заметно уменьшалась, при этом индуктор стабилизировал результаты, относительно результатов, полученных при незначительной экспрессии гена в отсутствие индуктора. Наименьшие стандартные отклонения наблюдались при концентрации тетрациклина в 10 нг/мл. Так, при добавлении 350 мкг/диск канамицина можно было наблюдать зону $8,9 \pm 0,22$ мм (стандартное отклонение – 2,51%), а при 400 мкг/диск канамицина – $9,8 \pm 0,27$ мм (стандартное отклонение 2,79%).

Таким образом, для дальнейшей работы была выбрана плазмида рМКА8, сконструированная на основе вектора рMINDKm⁻, в условиях индукции 10 нг/мл тетрациклином и концентрации канамицина - 350 мкг/диск.

6.2.3. Валидация тест-системы *M. smegmatis* *aphVIII+*

Для валидации тест-системы были использованы ингибиторы СТПК, различающиеся по степени селективности: стандартный ингибитор серинтреониновых протеинкиназ BisI (bisindolylmaleimide-I) (Sigma), способный ингибировать широкий спектр СТПК, обладающий, таким образом, низкой селективностью [Davis et al., 1992a], его неактивный гомолог BisV [Davis et al., 1992b], отобранный ранее в различных тест-системах ингибитор СТПК LCTA-1389 (11b), обладающий сравнительной селективностью в отношении Pk25 *S. lividans* [Bekker et al., 2010; Симонов и др., 2008] и сравнительно селективный ингибитор PknB *M. tuberculosis* (MSMEG_0028 у *M. smegmatis*) – митоксантрон [Wehenkel et al., 2006], способный также ингибировать СТПК человека PKC и PIM-1 [Takeuchi et al., 1992; Wan et al., 2013]. Вещества вносили в субингибирующих концентрациях, которые были следующими: BisI – 1000 нмоль/диск, BisV – 2 нмоль/диск, LCTA-1389 – 400 нмоль/диск, митоксантрон – 1 нмоль/диск, измерения проводили в 3-5 независимых повторах.

Добавление ингибиторов BisI и LCTA-1389 приводило к достоверному увеличению зоны подавления роста вокруг диска с канамицином, в то время, как BisV и митоксантрон такого эффекта не проявляли (Рисунок 6.7, таблица 6.3). Активность BisI и LCTA-1389 и ее отсутствие у BisV свидетельствуют о том, что сконструированная система избирательно отбирает именно активные ингибиторы протеинкиназ. Отсутствие активности митоксантрона в тест-системе свидетельствует о том, что ингибиторы киназы MSMEG_0028 (PknB *M. tuberculosis*) в тест-системе не отбираются, что также свидетельствует о селективности тест-системы.

Таблица 6.3. Зависимость уровня устойчивости к канамицину культуры *M. smegmatis aphVIII+* от действия стандартных ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ.

Обозначение	Мол. формула	Мол. масса	Количество, нмоль/диск	Диаметр зоны ингибирования роста, мм (Km + исследуемое вещество)
BisI	$C_{25}H_{24}N_4O_2$	412,48	1000	12,25±0,35
BisV	$C_{21}H_{15}N_3O_2$	341,36	2	9,25±0,35
LCTA-1389 (11b)	$C_{23}H_{19}N_5SO_2$	429	400	11,5±0,75
Mitoxantrone	$C_{22}H_{28}N_4O_6$	444,48	1	9,0±0,50

Диаметр зоны ингибирования роста вокруг диска с канамицином (350 мкг) - 9,4±0,42 мм.

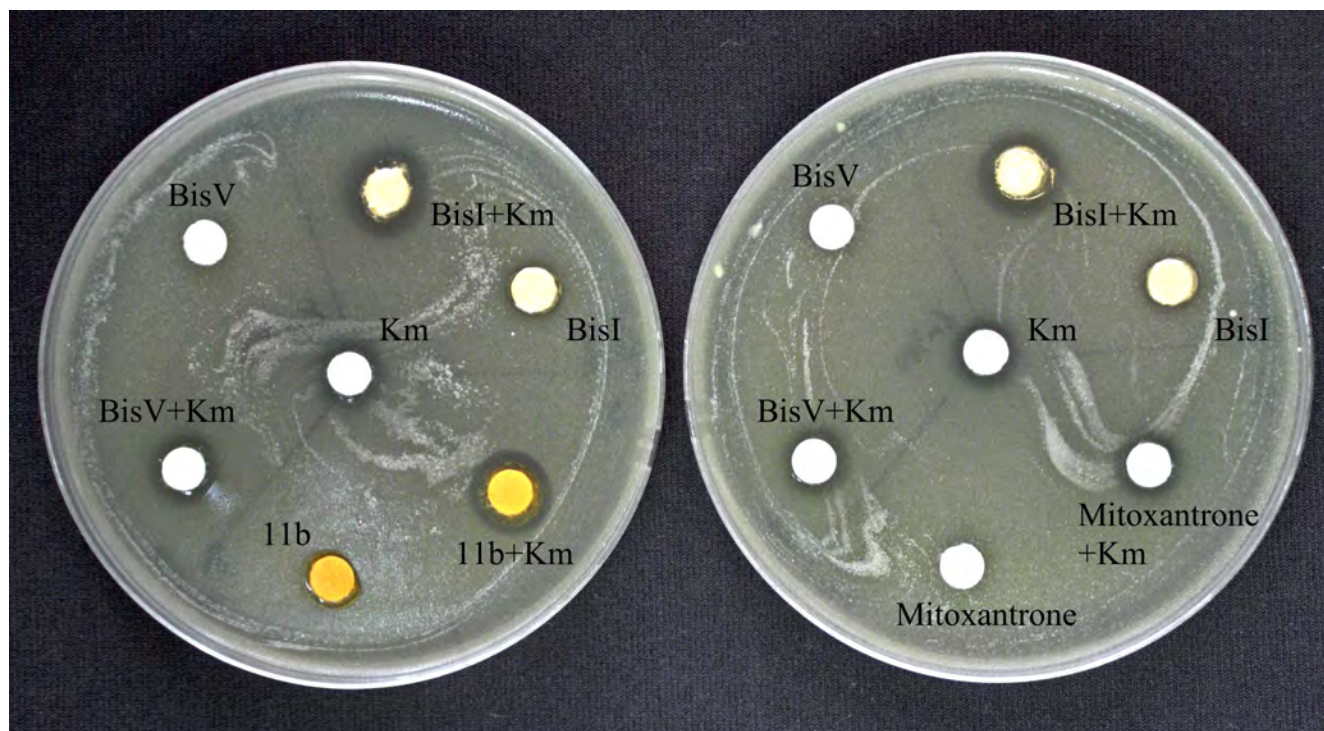


Рисунок 6.7. Валидация тест-системы *M. smegmatis aphVIII+* со стандартными ингибиторами класса бис-индолилмалеимидов BisI и его неактивным гомологом BisV, а также с ингибитором СТПК LCTA-1389 (11b) и ингибитором PknB митоксантроном. Вокруг диска, содержащего канамицин в комбинации с BisI наблюдается увеличенная зона ингибирования роста относительно диска с канамицином, в то время как, вокруг диска с комбинацией канамицина и BisV это явление не наблюдается.

Для исключения предположения, что тестируемые ингибиторы действуют напрямую на APHVIII, была поставлена *in vitro* киназная реакция с белком APHVIII и канамицином в качестве субстрата.

Титрование белка APHVIII показало, что его оптимальное количество в реакции соответствует 50 нг на 45 мкл реакционной смеси (рис 6.8).

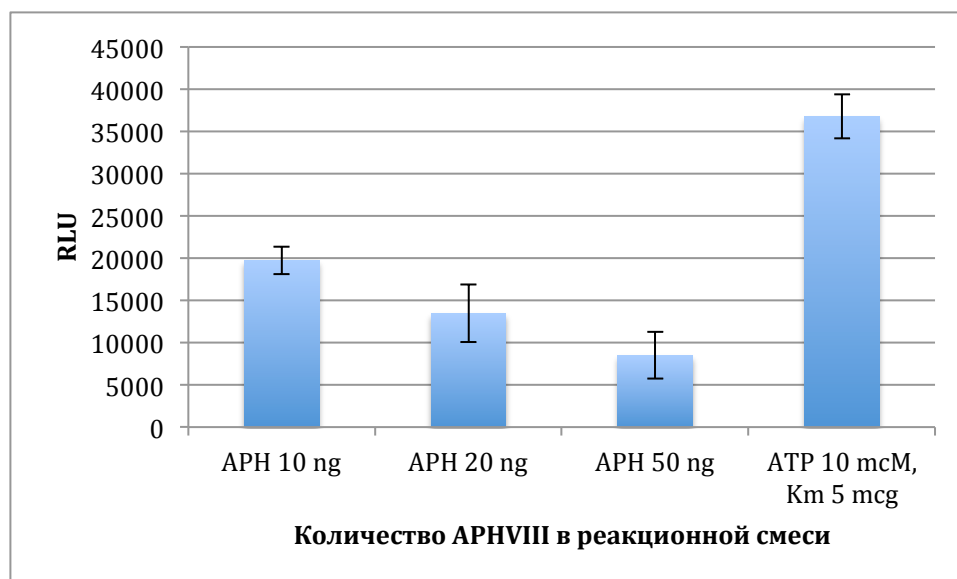


Рисунок 6.8. Титрование количества белка APH VIII для реакционной смеси (10 нг, 20 нг, 50 нг, 0 нг).

Исследование *in vitro* использованных для валидации тест-системы стандартных ингибиторов СТПК показало, что они не проявляют ингибирующей активности в отношении APH VIII, не повышая уровень остаточного АТФ (рис. 6.9).

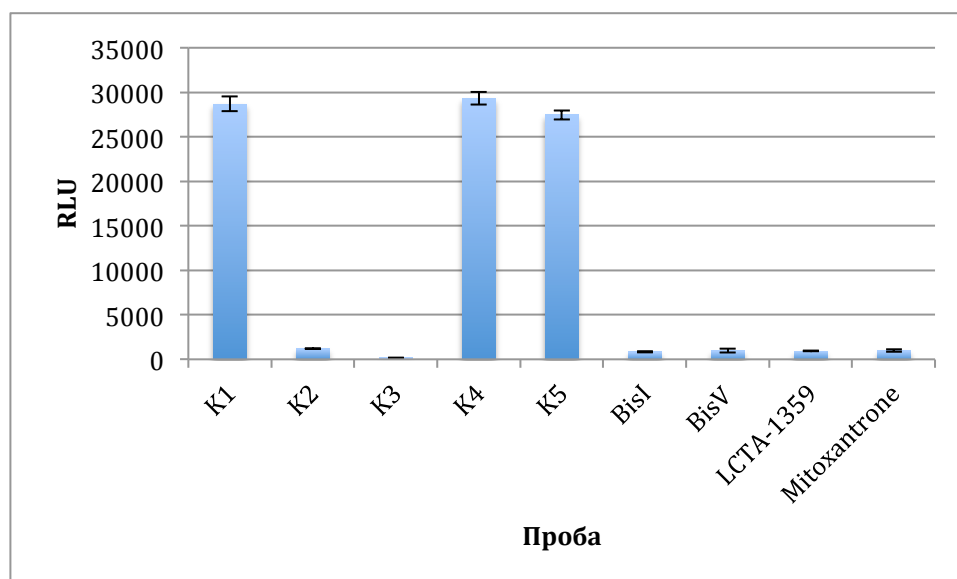


Рисунок 6.9. Исследование *in vitro* ингибирующей активности в отношении белка APHVIII стандартных ингибиторов СТПК. Контроли состояли из стандартной реакционной смеси, за исключением одного из компонентов: K1 – контроль без APHVIII, K2 – контроль без ингибитора, K3 – контроль без АТФ, K4 – контроль без субстрата, K5 – K1 с добавлением стандартного ингибитора (митоксантрон).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что сконструированная тест-система *M. smegmatis aphVIII+* функционирует именно за счет ингибирования активности СТПК *M. smegmatis*, способных фосфорилировать AphVIII, а не за счет ингибирования APHVIII, и может быть использована для селективного отбора ингибиторов микобактериальных протеинкиназ.

6.2.4. Мутагенез *aphVIII* с целью повышения сродства сайта фосфорилирования APHVIII с субстратами PknB

Фосфорилирование AphVIII, повышающее активность этого фермента, происходит по сайту S-146 [Елизаров и др., 2012]. Как было продемонстрировано ранее [Bekker et al., 2010], мутагенез сайта фосфорилирования S-146 APHVIII, с целью повышения его сродства с сайтами автофосфорилирования СТПК по

остаткам серина и треонина в активационной петле [Durán et al., 2005], может приводить к повышению уровня фосфорилирования APHVIII данными СТПК.

PknB, как одна из двух (вместе с PknA) жизненно важных СТПК *M. tuberculosis*, имеющих близкого гомолога в *M. smegmatis*, представляет огромный интерес при разработке потенциальных противотуберкулезных препаратов на основе ингибиторов микобактериальных СТПК. В связи с этим, была предпринята попытка сайт-направленного мутагенеза APHVIII по S-146, однако за шаблон, помимо варианта, основанного на аминокислотной последовательности сайта автофосфорилирования PknB, была взята оптимальная последовательность узнавания PknB субстрата – RAVGSGTVDLEDL [Prisic et al., 2010].

Мутантные сайты фосфорилирования APHVIII, а также шаблоны, по которым они были построены, представлены в таблице 6.4.

Таблица 6.4. Сайты фосфорилирования APHVIII (дикого типа и мутантные), а также шаблоны построения мутантных сайтов. Приведены уровни устойчивости *E. coli* BL21 (DE3) содержащей плазмиду pET-32a, и pMINDKm-несущие гены *aphVIII*, к антибиотику канамицину на агаризованной среде LB, содержащей гигромицин В 50 мкг/мл, ампициллин 150 мкг/мл, IPTG 0,5 mM и тетрациклин 20 нг/мл.

№	Варианты APHVIII с модификацией S ₁₄₆	Устойчивость к Km, мкг/мл	Наименование
1	RAVAEG <u>S</u> ₁₄₆ VDLEDL	75±10	Исходный вариант
2	DFGIARAIADSGNS <u>V</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>T</u> AAVIGTA	-	Сайт автовосфосфорилирования PknB
3	RAV <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>T</u> ₁₄₆ VDLEDL	75±10	AphB3
4	ITVAEL <u>T</u> GVIPII	-	Оптимальный сайт узнавания PknB [Prisic et al., 2010]
5	<u>R</u> <u>D</u> VAEG <u>T</u> ₁₄₆ <u>G</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>L</u>	2,5±1,0	AphBD1
6	<u>R</u> <u>D</u> VAEG <u>T</u> ₁₄₆ <u>G</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>L</u>	2,5±1,0	AphBD2
7	<u>R</u> <u>L</u> VAEG <u>T</u> ₁₄₆ <u>V</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>L</u>	2,5±1,0	AphBD4
8	<u>R</u> <u>L</u> VAEL <u>T</u> ₁₄₆ <u>G</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>L</u>	2,5±1,0	AphBD5
9	<u>I</u> <u>L</u> VAEG <u>T</u> ₁₄₆ <u>V</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>L</u>	2,5±1,0	AphBD6
10	<u>I</u> <u>L</u> VAEL <u>T</u> ₁₄₆ <u>G</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>L</u>	2,5±1,0	AphBD7

Мутантные гены *aphVIII* были клонированы в вектор pMINDKm⁻, а полученными плазмидами были трансформированы клетки *E. coli* BL21 (DE3). Также клетки были трансформированы вектором pET-32a, как без целевого гена, так и содержащим нуклеотидную последовательность каталитического домена PknB.

У мутантов APHVIII, сконструированных по шаблону оптимального сайта фосфорилирования PknB, изменения вызывали драматическое падение уровня устойчивости к канамицину в 30 раз. Предполагалось, что мутант, содержащий

наиболее узнаваемый протеинкиназой PknВ белок АРНVIII, будет иметь более высокий уровень устойчивости, при коэкспрессии *aphVIII* и *pknBkat*, однако, опыт показал, что подобная конфигурация, вероятно, деформирует белок АРНVIII, негативно отражаясь на его активности. Также было обнаружено, что экспрессия PknВ дозозависимо ингибирует рост клеток *E. coli*. Так, при постепенном увеличении концентрации индуктора IPTG (от 0,1 до 0,5 мМ, с шагом 0,1 мМ) рост колоний замедлялся, а, начиная с 0,3 мМ IPTG, роста колоний не наблюдалось вовсе. При микроскопическом наблюдении разведенных в воде сколов колоний наблюдалось изменение морфологии клеток – колонии, выросшие на среде с 0,1 мМ IPTG, были заметно длиннее и тоньше.

Таким образом, было показано, что данные модификации аминокислотной последовательности сайта фосфорилирования АРНVIII приводят к нарушениям в функционировании белка.

6.3. Идентификация СТПК, участвующих в функционировании тест-системы

M. smegmatis aphVIII+

6.3.1. Бионформатический анализ СТПК *M. smegmatis* для установления кандидатов на наибольший вклад в фосфорилирование АРНVIII

Известно, что у бактерий, в том числе *M. tuberculosis*, один белок-субстрат может быть фосфорилирован различными СТПК. Тот факт, что митоксантрон, известный ингибитор PknB, не проявлял активности в тест-системе *M. smegmatis aphVIII+*, стал поводом провести детальный анализ СТПК *M. smegmatis*, с целью выявления кандидатов на наибольший вклад в фосфорилирование АРНVIII и, следовательно, на уточнение предположения о том, ингибиторы каких СТПК отбираются в сконструированной тест-системе.

С этой целью был проведен сравнительный анализ сайтов субстрат-связывания СТПК *M. smegmatis*, а также СТПК Pk25 *S. lividans*, которая, как было показано ранее, участвует в фосфорилировании АРНVIII в тест-системе *S. lividans aphVIII+* [Danilenko et al., 2008; Беккер и др., 2008; Елизаров и др., 2005], а ингибиторы класса индолилмалеимидов LCTA-1276 и LCTA-1389 показывают активность в обеих тест-системах. Сайты субстрат-связывания и АТФ-связывающих карманов [Zakharevich et al., 2012] всех СТПК *M. smegmatis*, *M. tuberculosis*, а также Pk25 *S. lividans* представлены в таблице 6.5.

На основе выравнивания аминокислотных последовательностей сайтов субстрат-связывания СТПК *M. smegmatis* и Pk25 *S. lividans* было построено филогенетическое древо, представленное на рисунке 6.10. Согласно этому древу, самой схожей последовательностью сайта субстрат-связывания с Pk25 *S. lividans* обладает СТПК MSMEG_5437. Однако, проведенный анализ последовательностей субстрат-связывающего сайта, основанный на физико-химических свойствах составляющих его аминокислот, позволил предположить, что ближайшей по этим свойствам к Pk25 является СТПК MSMEG_5513.

Таблица 6.5. Сайты субстрат-связывания и АТФ-связывающих карманов всех СТПК *M. smegmatis*, *M. tuberculosis*, а также Pk25 *S. lividans*

Ген	Сайт субстрат-связывания	АТФ-связывающий карман
<i>MSMEG_0028</i>	GTRDKAIGTAQ	LVAVMYVMM
<i>MSMEG_0030</i>	GPNDKGIGTAQ	IVAAMLILT
<i>MSMEG_0529</i>	GSSDKAIGSPA	IVAVMYHLT
<i>MSMEG_0786</i>	GSKDKEAGTPG	IVVVMYVMI
<i>MSMEG_0886</i>	GDADKAVGSMA	LVAVMYVLA
<i>MSMEG_1190</i>	GDSDKAVGTAA	LVAVMFVLG
<i>MSMEG_1200</i>	GNGDKSLGTLA	IVAVMLILI
<i>MSMEG_3677</i>	GDADKAIGTVT	LVAVMYVLA
<i>MSMEG_4243</i>	GTRDKELGTAA	IVAVMLILA
<i>MSMEG_4366</i>	GSKDKEIGSSA	IVAIMLVLV
<i>MSMEG_5437</i>	GSADKMVGSLP	AVAVMFILI
<i>MSMEG_5513</i>	GDADKAIGSMS	VVAVMYVLT
<i>MSMEG_6206</i>	GTADKGIGTMA	LVAVMRLLA
<i>Pk25</i>	GSADKSVGSP	LVAIMLVLT
<i>PknA</i>	GPNDKGIGTAQ	IVAAMLVLT
<i>PknB</i>	GTRDKAIGTAQ	LVAVMYVMM
<i>PknD</i>	GSRDKEIGTYN	LVAVMMILV
<i>PknE</i>	GDADKEIGTLY	VVAVMLILV
<i>PknF</i>	GDVDKAIGTVS	LVAVMFVLA
<i>PknG</i>	GSKDKEAGTPG	IIVVVMYVMI
<i>PknH</i>	GDDDKQIGTWK	LVAVMLVLV
<i>PknI</i>	ADTDNAQSQPS	LVALMYVVA
<i>PknJ</i>	GNEDKAIATLA	LVAVMFVLS
<i>PknK</i>	GSEDKGIGSPA	IVAVMYHLT
<i>PknL</i>	GTRDKELGTAA	IVAVMLILA

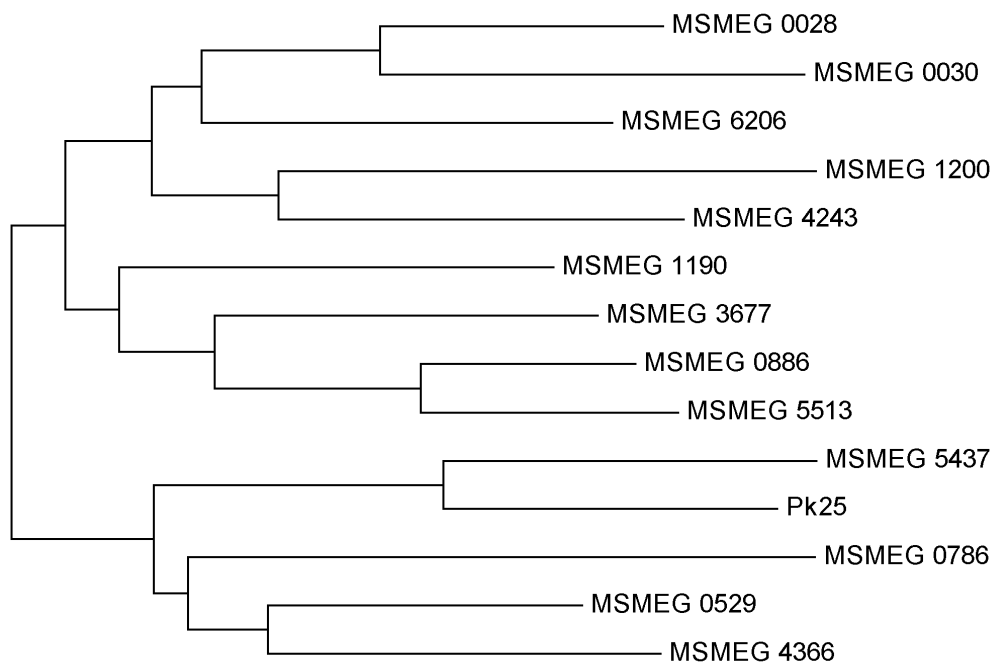


Рисунок 6.10. Филогенетическое древо, построенное на основе выравнивания аминокислотных последовательностей сайтов субстрат-связывания СТПК *M. smegmatis* и Pk25 *S. lividans*.

6.3.2. Исключение MSMEG_5437 из числа СТПК, фосфорилирующих АРНVIII в клетках *M. smegmatis*

Протеинкиназа MSMEG_5437, упоминавшаяся выше, участвует в системе природной лекарственной устойчивости *M. smegmatis*, регулируя, среди прочих, устойчивость к хлорамфениколу и изониазиду [Bowman et al., 2014].

Для проверки возможности участия MSMEG_5437 в фосфорилировании АРНVIII был поставлен опыт с бумажными дисками, содержащими хлорамфеникол и изониазид, в количествах, достаточных для образования зоны ингибирования роста, и их комбинация с ингибиторами, использованными для валидации тест-системы – BisI, BisV, LCTA-1389 и митоксантроном в субингибирующих концентрациях. Комбинации хлорамфеникола или изониазида

с ингибитором протеинкиназ не показывали увеличения диаметра зоны ингибирования роста при сравнении с зонами вокруг дисков, содержащих только антибиотик. Таким образом, было показано, что данные ингибиторы не действуют на СТПК MSMEG_5437, а следовательно она не участвует в фосфорилировании APHVIII и функционировании тест-системы.

Единственным наиболее вероятным кандидатом на фосфорилирование APHVIII осталась СТПК MSMEG_5513. В ее пользу также говорит тот факт, что она, согласно классификации СТПК по сигнатурам АТФ-связывающих карманов [Zakharevich et al., 2012], относится к той же группе (группа I), что и Pk25 *S. lividans*, а следовательно ингибиторы, действующие на Pk25, должны быть активными и по отношению к MSMEG_5513. Более того, к той же группе относятся СТПК MSMEG_0030 (PknA) *M. smegmatis*, а также PknA и PknJ *M. tuberculosis*.

По итогам проведенного анализа схема действия тест-системы *M. smegmatis aphVIII+* представляется следующим образом: MSMEG_5513 фосфорилирует APHVIII в клетках *M. smegmatis*, что повышает уровень устойчивости этих клеток к канамицину. При добавлении активного ингибитора СТПК, действующего на MSMEG_5513, фосфорилирование APHVIII прекращается, что снижает уровень устойчивости клеток к канамицину, при этом собственная токсичность ингибитора для клеток обусловлена ингибированием им же СТПК MSMEG_0030 (PknA), являющейся жизненно важной для микобактерий, а также, возможно, других биомишеней. Ингибиторы СТПК, отбираемые в тест-системе *M. smegmatis aphVIII+*, способны ингибировать PknA и, вероятно, PknJ *M. tuberculosis*. Наглядная схема действия тест-системы представлена на рисунке 6.11.

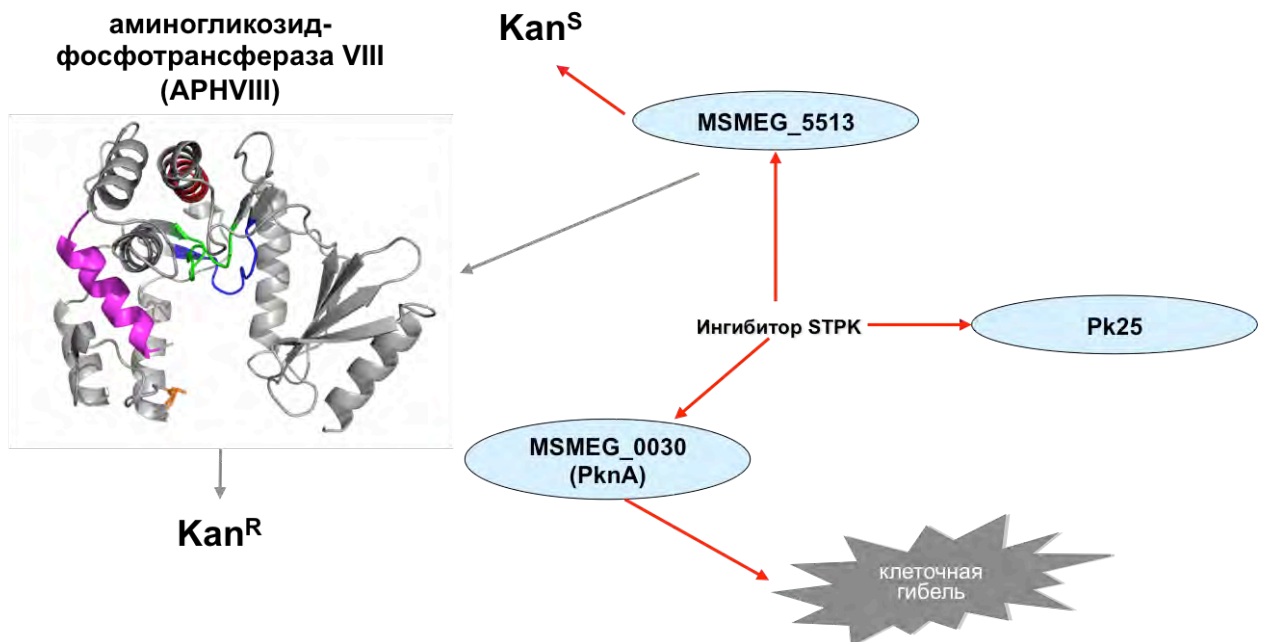
Mycobacterium smegmatis

Рисунок 6.11. Схема действия тест-системы *M. smegmatis* *aphVIII+*. Kan^R – повышение устойчивости к канамицину, Kan^S – понижение устойчивости к канамицину.

6.4. Первичный отбор ингибиторов микобактериальных СТПК в тест-системе *M. smegmatis* *aphVIII*+

Созданная и валидированная тест-система *M. smegmatis* *aphVIII*+ была использована для первичного отбора потенциальных противотуберкулезных препаратов нового поколения – ингибиторов микобактериальных СТПК из двух классов низкомолекулярных соединений: азолотетразинов (54 вещества, предоставленные ИОС УрО РАН), аминопиридинов и аминопиримидинов (192 вещества, предоставленные ООО «Новые Научные Технологии»).

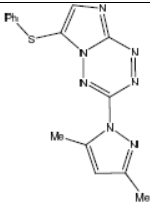
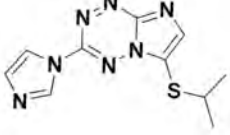
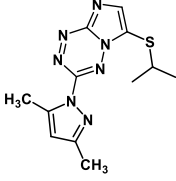
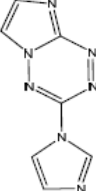
6.4.1. Отбор ингибиторов микобактериальных СТПК среди низкомолекулярных соединений класса азолотетразинов

В валидированной тест-системе *M. smegmatis* *aphVIII*+ проводился скрининг низкомолекулярных веществ класса азола[1,2,4,5]тетразинов, а именно 3-(алкилтио)-[1,2,4]триазоло[4,3-*b*][1,2,4,5]тетразинов и имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинов, синтезированных в ИОС УрО РАН, г. Екатеринбург [Беккер и др., 2012].

Основными критериями отбора «хит»-соединений была антимикобактериальная активность на *M. smegmatis*, а также наблюдаемый эффект в сконструированной тест-системе *M. smegmatis* *aphVIII*+

После подбора субингибирующих концентраций, осталось четыре кандидата, обладающих максимальной антимикобактериальной активностью: TSVa130 (субингибирующая концентрация – 25 нмоль/диск), TSV-395 (50 нмоль/диск), TSV-402 (5 нмоль/диск) и TSV-409 (50 нмоль/диск). Все они проявили активность в созданной тест-системе *M. smegmatis* *aphVIII*+ (таблица 6.6).

Таблица 6.6. Зависимость уровня устойчивости к канамицину *M. smegmatis aphVIII+* от действия соединений класса триазолотетразинов. Диаметр зоны вокруг диска с канамицином (350 мкг/диск) – $9,25 \pm 0,65$ мм.

Обозначение	Молекулярная формула ингибитора	Молекулярная масса	Количество, нмоль/диск	Зона ингибирования роста комбинации канамицина и исследуемого вещества, мм
TSV-402		323,38	5	$11,5 \pm 0,71$
TSVa130		261,00	25	$13,75 \pm 0,35$
TSV-395		289,36	50	$13,25 \pm 1,06$
TSV-409		187,16	50	$12,75 \pm 0,35$

Все эти вещества, за исключением TSVa130 были проанализированы в ранее созданной тест-системе *S. lividans aphVIII+*, при этом активность проявило только вещество TSV-395 (таблица 6.7).

Таблица 6.7. Зависимость уровня устойчивости к канамицину *S. lividans aphVIII+* от действия соединений класса триазолотетразинов. Канамицин использовали в субингибирующей концентрации – 3 мкг/диск.

Обозначение	Количество, нмоль/диск	Зона ингибирования роста, мм	
		Вещество	Комбинация с канамицином
TSV-395	100	12±0,5	13±0,5
TSV-402	100	7,5±0,5	7,5±0,5
TSV-409	100	Зона не наблюдалась	Зона не наблюдалась

Также, часть активных в тест-системе *M. smegmatis aphVIII+* соединений, а именно вещества TSV-402 и TSVa130 были проверены на способность ингибировать действие протеинкиназы PknA *M. tuberculosis in vitro*. В качестве положительного контроля был взят ингибитор Bis-I, а в качестве отрицательного – Bis-V.

Первоначальное титрование белка PknA по уровню потребления АТФ в реакционной смеси показало оптимальное количество белка PknA – 3 мкг на 45 мкл реакции, что соответствовало 1,3 мкМ (рис. 6.12). При этом потреблялось 75,8% АТФ. Для реакции использована максимальная растворимая концентрация ингибитора (200 мкМ), что соответствовало молярному соотношению с количеством белка 154:1.

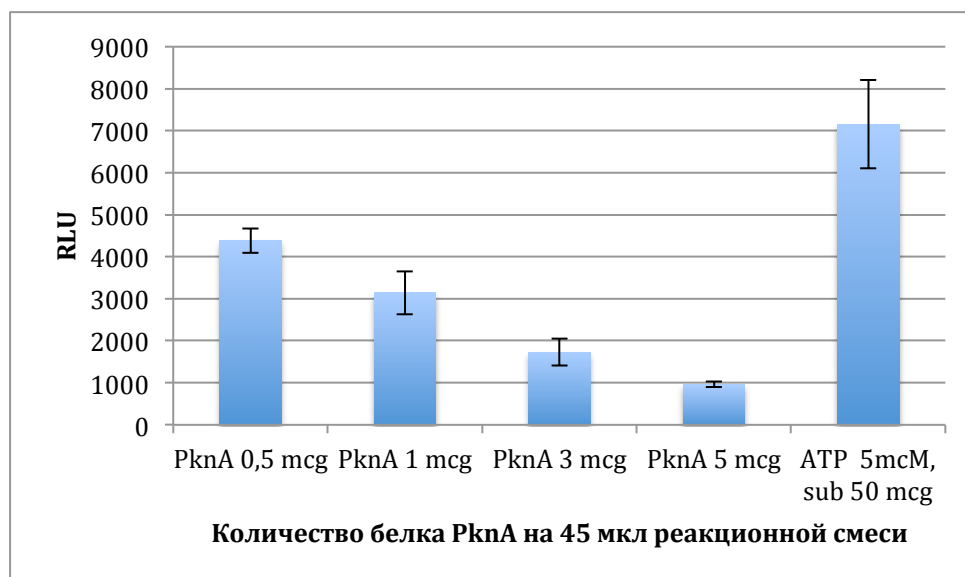


Рисунок 6.12. Титрование белка PknA в смеси киназной реакции.

За исключением положительного контроля (Bis-I) ни одно из тестируемых веществ не показало достоверных отличий от отрицательного контроля (рис. 6.13).

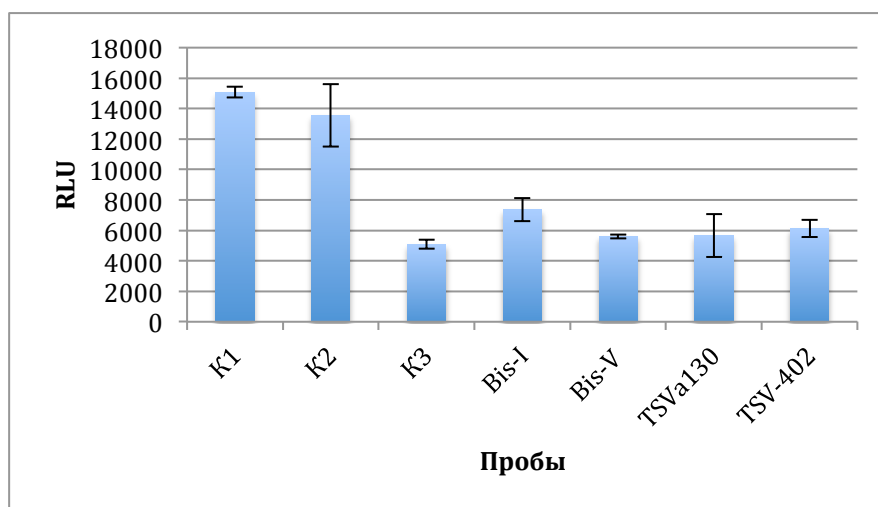


Рисунок 6.13. Тест на способность ингибировать белок PknA *in vitro* веществами класса триазолотетразинов. Контроли состояли из стандартной реакционной смеси, за исключением одного из компонентов: K1 – контроль без белка PknA, K2 – K1 с контрольным ингибитором Bis-I, K-3 – контроль без ингибитора.

Таким образом, лишь Bis-I ингибировал PknA в тестируемой концентрации ($22,7 \pm 7,6\%$ ингибирования). Эти результаты могут быть связаны как с низкой активностью белка, так и с ингибированием данными соединениями в первую очередь других СТПК *M. smegmatis*, что дает положительный эффект в клеточной тест-системе.

Все четыре соединения были также проверены на способность ингибировать белок APHVIII *in vitro* в том же молярном соотношении ингибитор-APHVIII, что и в реакции ингибитор-PknA, рассчитанном, исходя из количества белка 50 нг на 45 мкл, показав отрицательный результат (рис. 6.14).

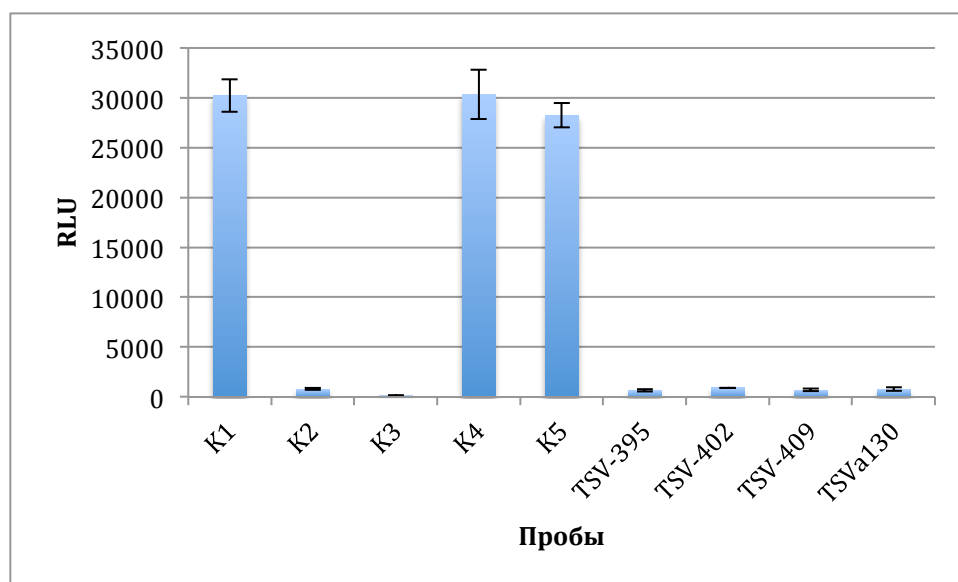


Рисунок 6.14. Тест на способность ингибировать белок APHVIII *in vitro* веществами класса триазолотетразинов. Контроли состояли из стандартной реакционной смеси, за исключением одного из компонентов: K1 – контроль без белка APHVIII, K2 – контроль без ингибитора, K-3 – контроль без АТФ, K4 – контроль без субстрата, K5 – K1 с контрольным ингибитором (TSV-395).

Таким образом, в тест-системе *M. smegmatis aphVIII+* было отобрано 4 активных ингибитора микобактериальных СТПК из 54 соединений класса азолотетразинов. Соединение TSV-395 было выбрано для дальнейших

исследований, как проявившее активность в двух валидированных тест-системах в качестве ингибитора СТПК.

6.4.2. Молекулярный докинг TSV-395 в АТФ-связывающий карман PknA *M. tuberculosis*

Результаты молекулярного докинга показали, исследуемая молекула TSV-395 может разместиться в АТФ-связывающем кармане протеинкиназ PknA *Mycobacterium tuberculosis*, вследствие чего она может выступать в роли конкурентного ингибитора данного фермента. При этом возможно образование водородных связей, что свидетельствует о специфическом взаимодействии ингибитора с ферментом. Взаимодействие происходит с каталитическим остатком лизина (Lys42 PknA), вследствие чего осуществление катализа становится невозможным (рис 6.15).

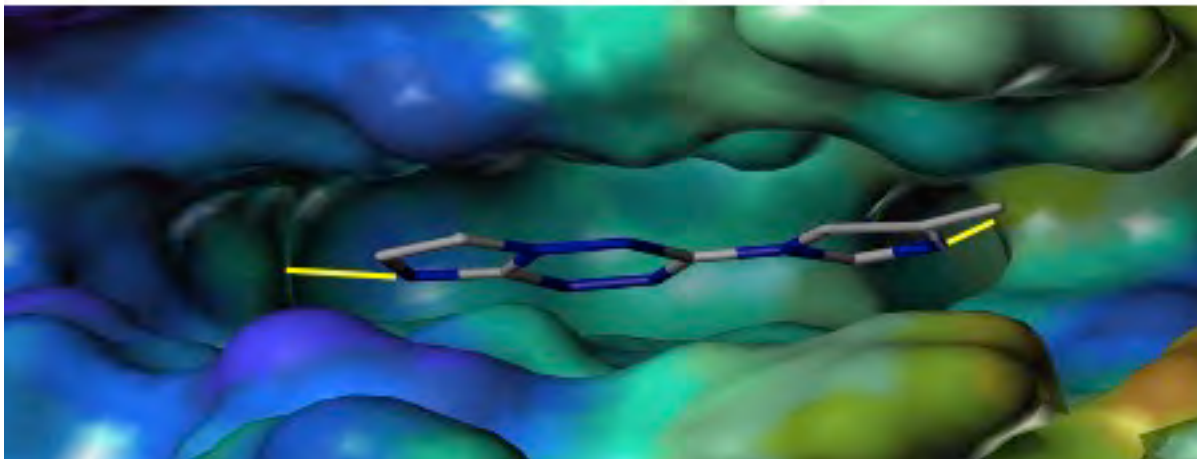


Рисунок 6.15. Докинг соединения TSV-395 в АТФ-связывающий карман RknA *M. tuberculosis*. Водородные связи отмечены желтыми линиями.

6.4.3. Исследование антимикобактериального действия TSV-395 *in vitro* на *M. tuberculosis*

На лабораторном чувствительном штамме *M. tuberculosis H37Rv*, а также на референтном клиническом штамме с МЛУ *M. tuberculosis MS-115*, устойчивому к стрептомицину, изониазиду, рифампицину, этамбутолу и пипразинамиду, были исследованы бактериостатическая и бактерицидная активности TSV-395.

Было показано, что соединение TSV-395 обладает бактериостатической активностью в отношении штаммов *M. tuberculosis* как чувствительного, так и штамма с МЛУ, с МИК 1 мкг/мл, приводя к полному подавлению роста культуры на протяжении всего срока эксперимента.

Была определена минимальная бактерицидная концентрация, под воздействием которой в условиях *in vitro* число микобактерий в среде снижалось на 99,9% (на 3 порядка). Соединение TSV-395 одинаково активно в отношении чувствительного лабораторного штамма МБТ H37Rv и клинического штамма МБТ MS-115 с МЛУ. Минимальная бактерицидная концентрация TSV-395 при пересеве отмытой от соединения микобактериальной суспензии лабораторного

штамма на свежую среду Middlebrook 7H9 в автоматизированной системе ВАСТЕС MGIT 960 составила 100 мкг/мл.

Также обнаружен синергический эффект TSV-395 и рифампицина: при совместном действии препаратов на штамм с МЛУ, необходимая концентрация рифампицина снижалась в два раза с 200 мкг/мл до 100 мкг/мл.

6.4.4. Исследование антимикобактериальной активности и токсичности TSV-395 в системе *ex vivo* макрофагов, инфицированных *M. tuberculosis* H37Rv и MS-115

При исследовании активности TSV-395 в системе *ex vivo* инфицированных макрофагов, было установлено, что препарат активен в концентрации 5 мкг/мл как в отношении чувствительного, так и устойчивого штаммов (по данным ПЦР в реальном времени количество микобактериальной ДНК не становилось выше исходных показателей, а также снижался процент лизиса инфицированных макрофагов относительно инфицированных макрофагов в среде без TSV-395).

При этом, токсичность (повышение выхода ЛДГ) наблюдалась в концентрациях от 25 мкг/мл и выше.

6.4.5. Доклинические испытания соединения TSV-395, как потенциального противотуберкулезного препарата нового поколения

По результатам проведенного отбора, соединение TSV-395 было выбрано для дальнейших доклинических испытаний, которые были успешно выполнены за рамками данной работы в 2011-2013 годах.

6.4.6. Отбор ингибиторов микобактериальных СТПК класса аминопиридинов и аминопиримидинов

В валидированной тест-системе *M. smegmatis* *aphVIII+* дисковым методом был проведен первичный отбор ингибиторов СТПК среди 192 веществ класса аминопиридинов и аминопиримидинов, синтезированных ООО "НОВЫЕ НАУЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ". Исследования проводили в 3-5 независимых повторах. Вещества тестировались в субингибирующих концентрациях. Для 53 веществ удалось подобрать субингибирующие концентрации до 100 нмоль/диск. Остальные вещества не проявили антибактериального действия в отношении *M. smegmatis* в количестве ниже 100 нмоль/диск. Вследствие того, что только для 11 веществ субингибирующая концентрация составила значения до 10 нмоль/диск (один из критериев отбора в тест-системе *M. smegmatis* *aphVIII+*: субингибирующая концентрация вещества должна быть менее 10 нмоль/диск), все выбранные вещества были протестированы в концентрациях от 5 до 100 нмоль/диск. В качестве положительного контроля сравнения использовалось соединение LCTA-1389 (11b) [Bekker et al., 2010; Симонов и др., 2008]. В качестве отрицательного контроля – BisV (неактивный аналог стандартных ингибиторов СТПК класса индолилмалеимидов) [Davis et al., 1992b].

22 вещества при совместном действии с канамицином, показывали достоверное увеличение зоны ингибирования роста бактериальной культуры на твердой питательной среде, в сравнении с зоной образуемой лишь канамицином, и были отобраны для дальнейших исследований (рис. 6.16): 1f8, 1g8, 1e11, 1g11, 1h11, 1a12, 1c8, 2f4, 2c3, 2c6, 2a3, 2a4, 2a7, 2h11, 2h12, 2d3, 2d11, 2b4, 2b5, 2e12, 2g12, 2h12.

Таким образом, отобраны соединения, являющиеся ингибиторами микобактериальных СТПК, проявляющие антимикобактериальную активность в концентрациях 5, 10, 20, 25, 50, 100 нмоль/диск и потенциально являющиеся «хит» соединениями.

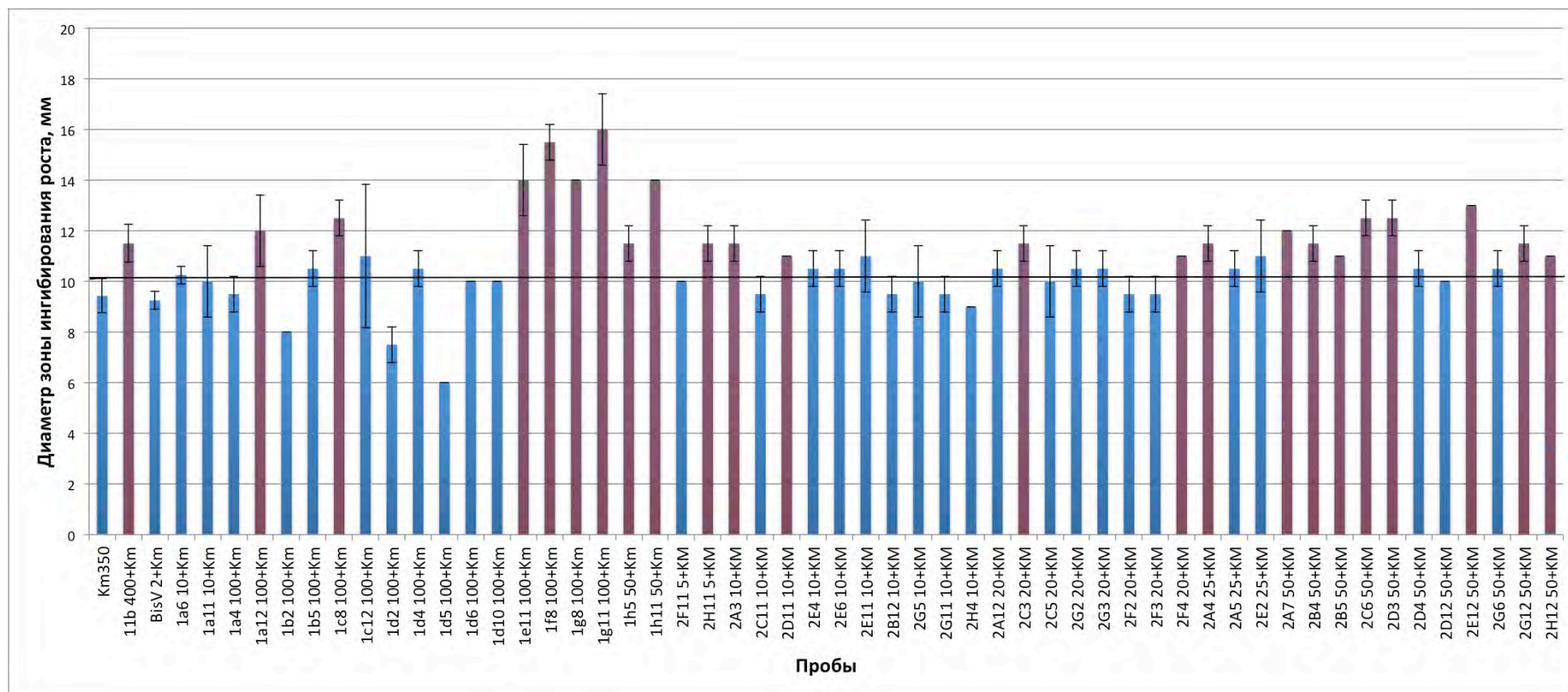


Рисунок 6.16. Результаты измерения зон ингибирования роста веществ класса аминопиридинов и аминопиримидинов в тест-системе *M. smegmatis aphVIII+*. Вещества тестировались в субингибирующих концентрациях, не показывающих самостоятельную зону ингибирования роста, концентрация (нмоль/диск) указана в названии пробы. Планки погрешностей показывают стандартное отклонение. Красным выделены отобранные соединения.

Отобранные в тест-системе *M. smegmatis aphVIII+* вещества, тестировали на способность ингибировать СТПК PknA *M. tuberculosis in vitro* в концентрации 200 мкМ. В качестве положительного контроля использовали LCTA-1389 (11b) [Bekker et al., 2010; Симонов и др., 2008], в качестве отрицательного – BisV [Davis et al., 1992b]. Результаты (% ингибирования) представлены на рисунке 6.17.

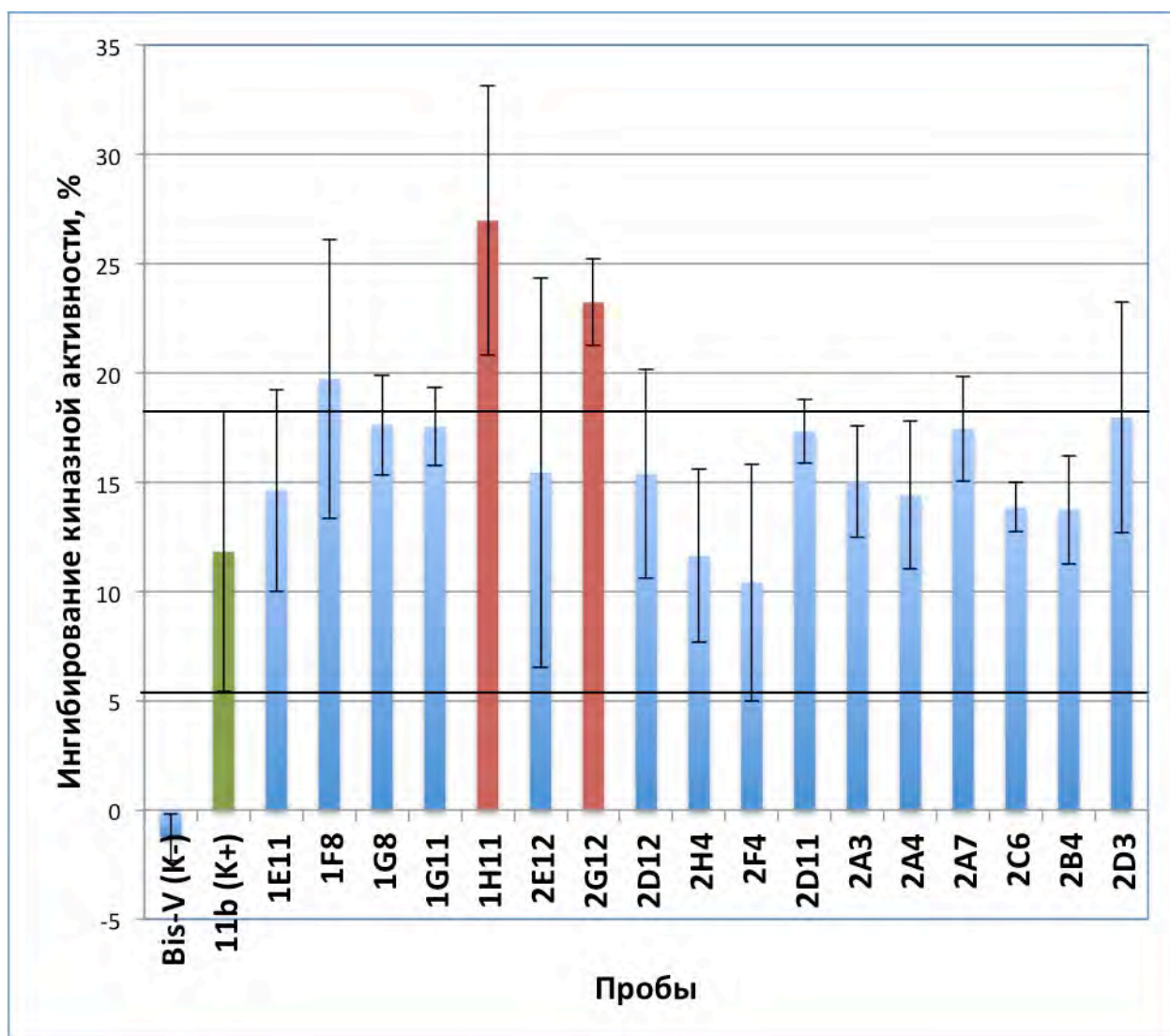


Рисунок 6.17. Процент ингибирования фосфорилирующей активности PknA *M. tuberculosis in vitro*, соединениями, отобранными в тест-системе *M. smegmatis aphVIII+*. Планки погрешностей показывают стандартное отклонение. Зеленым выделен положительный контроль, красным – самые активные соединения.

Все проверенные соединения проявили ингибирующую активность на уровне стандартного ингибитора СТПК LCTA-1389, а два соединения с наивысшей активностью превзошли этот показатель: 1H11 ($26,9 \pm 6,1\%$) и 2G12 ($23,2 \pm 2,0\%$). Невозможность рассчитать IC_{50} , как и в случае с триазолотетразинами, может быть связана с низкой активностью белка, не позволяющую тестировать соединения в большей концентрации.

Все отобранные соединения были также проверены в том же молярном соотношении (вещество – белок APHVIII) на способность ингибировать фосфотрансферазную активность APHVIII *in vitro*, для исключения их неспецифического действия в тест-системе *M. smegmatis aphVIII+*. Ни одно вещество не проявило такой активности. Результаты представлены на рисунке 6.18.

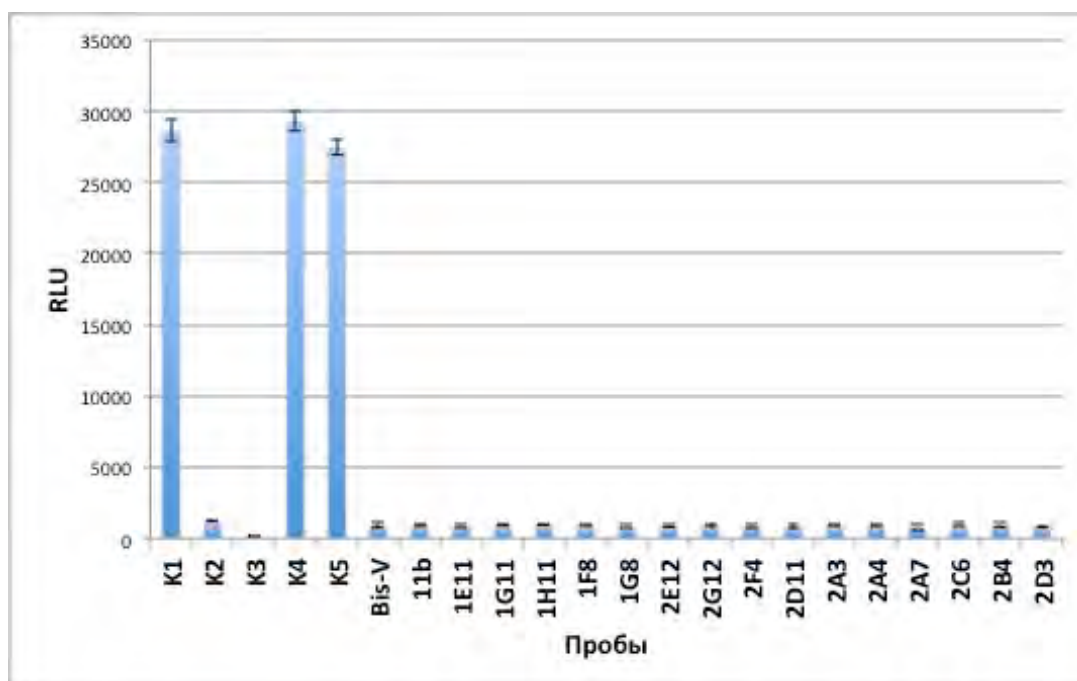


Рисунок 6.18. Результаты исследования способности соединений класса аминопиридинов и аминопиримидинов ингибировать фосфотрансферазную активность APHVIII *in vitro*. Контроли состояли из стандартной реакционной смеси, за исключением одного из компонентов: K1 – контроль без белка APHVIII, K2 – контроль без ингибитора, K-3 – контроль без АТФ, K4 – контроль без субстрата, K5 – K1 с контрольным ингибитором (Mitoxantrone).

Для отобранных соединений были проведены исследования токсичности на клетках ФЭЧ-4, в результате которых вещества разделились на три группы, в соответствии со степенью их токсичности:

- Сильно токсичные (<10 мкг/мл): вещества 1F8, 1G11, 2D11, 2F4, 2C3, 2A3, 2H11;
- Среднетоксичные (от 10 до 50 мкг/мл): вещества 1E11, 1G8, 1H11, 2D3, 2E12, 2G12, 2A4, 2A7;
- Слаботоксичные (>50 мкг/мл): вещество 2C6.

Таким образом, в результате исследований, отобраны три вещества, проявившие наибольшую активность в тест-системе *M. smegmatis aphVIII+*, на белке RknA *in vitro* и проявившие наименьшую токсичность для дальнейшей разработки, как потенциальные противотуберкулезные препараты, ингибиторы микобактериальных СТПК (рис. 6.19).

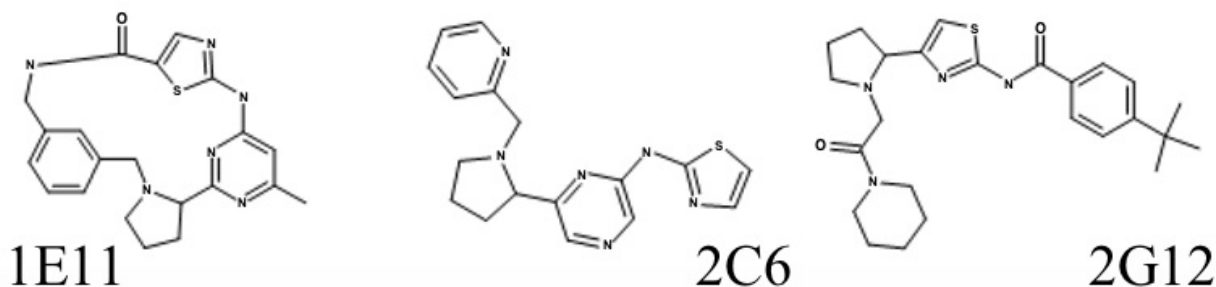


Рисунок 6.19. Химические формулы отобранных соединений класса аминопиридинов и аминопиримидинов.

Заключение

Таким образом, в результате работы создана тест-система на основе штамма *M. smegmatis* mc² 155 и гена аминогликозидфосфотрансферазы типа VIII *S. rimosus*, для отбора ингибиторов СТПК микобактерий, в том числе *M. tuberculosis*, основанная на принципе повышения уровня устойчивости к канамицину бактериальной культуры при фосфорилировании АРНVIII СТПК и понижения этого уровня при добавлении активного ингибитора СТПК. Комплексный биоинформатический анализ показал, что *M. smegmatis* является подходящей моделью для отбора ингибиторов шести СТПК *M. tuberculosis* (в том числе жизненно-важных): PknA, PknB, PknF, PknG, PknK и PknL. Также установлен предположительный механизм функционирования тест-системы и, соответственно основные биомишени отбираемых ингибиторов, среди которых PknA *M. tuberculosis*.

Разработанная система *in vitro* контролей к клеточной тест-системе и проведенный в этой системе отбор активных ингибиторов микобактериальных СТПК среди соединений двух классов, а также подтверждение активности одного из отобранных соединений на *M. tuberculosis* и его последующие доклинические исследования, показали практические перспективы использования сконструированной тест-системы, для первичного отбора новых противотуберкулезных препаратов, сочетающего в себе плюсы клеточного и *in vitro* путей скрининга противотуберкулезных препаратов.

В качестве дальнейшего развития результатов проведенного исследования и оптимизации сконструированной тест-системы, возможно уточнение механизма ее действия путем *in vitro* тестирования отобранных веществ на СТПК MSMEG_5513 и других, а также оптимизация очистки белка PknA для повышения его конечной активности.

Также новые направления для исследований открывает возможность дальнейшего мутагенеза *aphVIII* с целью его узнавания другими микобактериальными СТПК.

Выводы

По итогам проведенной работы можно сделать следующие выводы:

1. Показано, что *M. smegmatis* является подходящей моделью, для исследования (в том числе для поиска ингибиторов) шести СТПК *M. tuberculosis*: жизненно-важных PknA, PknB и PknG, а также PknF, PknK и PknL;
2. Создана тест-система *M. smegmatis aphVIII+*, валидированная со стандартными ингибиторами СТПК и способная отбирать активные ингибиторы микобактериальных СТПК;
3. Показано, что СТПК MSMEG_5513 фосфорилирует APHVIII, обеспечивая работоспособность тест-системы, а отбираемые ингибиторы действуют также на СТПК MSMEG_0030 (PknA), обеспечивая антимикобактериальное действие;
4. *In vitro* показано, что мишенью отбираемых в тест-системе ингибиторов действительно является СТПК PknA *M. tuberculosis*, а не белок APHVIII;
5. В сконструированной тест-системе отобраны 4 активных ингибитора класса триазолотетразинов, один из них (TSV-395) проявил антимикобактериальную активность на *M. tuberculosis* H37Rv и МЛУ-штамме, и 22 активных ингибитора класса аминопиридинов и аминопиримидинов, среди которых 3 отличаются сравнительно высокой активностью и сравнительно низкой токсичностью.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В РАБОТЕ

АТФ – аденозин трифосфат

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КОЕ – колоние образующие единицы

ЛДГ – лактат дегидрогеназа

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

СТПК – серин-треониновая протеинкиназа

ТАЕ – буфер трис-ацетат-EDTA

ШЛУ – широкая лекарственная устойчивость

DTT – дитиотреитол

EDTA – ЭДТА - этилендиаминтетраацетат

HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин-этансульфоновая кислота

IPTG – изопропил- β -D-тиогалактопиранозид

LB – среда Luria-Bertani

PASTA - penicillin-binding protein and serine/threonine kinase associated

PBS – Phosphate Buffer Saline

PMSF – фенилметилсульфонил флуорид

PSA – персульфат аммония

SDS – додецилсульфат натрия

TEMED – тетраметилэтилендиамин

Список литературы

1. Беккер О.Б., Даниленко В.Н., Ишметова Р.И., Маслов Д.А., Русинов Г.Л., Толщина С.Г., Чарушин В.Н. Замещенные азоло[1,2,4,5]тетразины – ингибиторы актинобактериальных серин-треониновых протеинкиназ.] // Патент РФ № 2462466, от 27.09.2012.
2. Беккер О.Б., Елизаров С.М., Г А.М., Любимова И.К., Даниленко В.Н. Ca^{2+} -зависимая модуляция устойчивости к антибиотикам у *Streptomyces lividans* 66 и *Streptomyces coelicolor* A3(2) // Микробиология. 2008, 77(5), Рр. 630–638.
3. Елизаров С.М., Алексеева М.Г., Новиков Ф.Н., Чилов Г.Г., Маслов Д.А., Штиль А.А., Даниленко В.Н. Идентификация сайтов фосфорилирования аминокликозидфосфотрансферазы VIII *Streptomyces rimosus* // Биохимия. 2012, 77(11), Рр. 1504–1512.
4. Елизаров С.М., Сергиенко О.В., А С.И., Даниленко В.Н. Зависимость активности аминокликозид-3'-фосфотрансферазы типа VIII от серин-треонин-протеинкиназ у *Streptomyces rimosus* // Молекулярная Биология. 2005, 39(2), Рр. 1–9.
5. Потехин Я.А., Даниленко В.Н. Детерминант устойчивости к канамицину *Streptomyces rimosus*: амплификация в составе хромосомы и обратимая генетическая нестабильность. // Молекулярная Биология. 1985, 19(3), Рр. 805–816.
6. Прозоров А.А., Зайчикова М.В., Даниленко В.Н. Мутанты *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью: история появления, генетические и молекулярные механизмы устойчивости, возникающие проблемы // Генетика. 2012, 48(1), Рр. 5–20.
7. Прозоров А.А., Федорова И.А., Беккер О.Б., Даниленко В.Н. Факторы вирулентности *Mycobacterium tuberculosis*: генетический контроль, новые концепции // Генетика. 2014, 50(8), Рр. 885–908.

8. Симонов А.Ю., Лакатош С.А., Лузиков Ю.Н., Резникова М.И., Сусова О.Ю., Штиль А.А., Елизаров С.М., Даниленко В.Н., Преображенская М.Н. Синтез 4-замещенных 3-[3-(диалкиламинометил)индол-1-ил]малеинимидов и изучение их способности ингибировать протеинкиназу С- α , предотвращать развитие множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток и цитотоксичности // Известия Академии наук. Серия химическая. 2008, (9), Pp. 1977–1985
9. Abrahams G.L., Kumar A., Savvi S., Hung A.W., Wen S., Abell C., Barry C.E., Sherman D.R., Boshoff H.I.M., Mizrahi V. Pathway-selective sensitization of *Mycobacterium tuberculosis* for target-based whole-cell screening. // *Chem. Biol.* 2012, 19(7), Pp. 844–854.
10. Alangaden G.J., Kreiswirth B.N., Aouad A., Khetarpal M., Igno F.R., Moghazeh S.L., Manavathu E.K., Lerner S.A. Mechanism of resistance to amikacin and kanamycin in *Mycobacterium tuberculosis*. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998, 42(5), Pp. 1295–1297.
11. Altaf M., Miller C.H., Bellows D.S., O'Toole R. Evaluation of the *Mycobacterium smegmatis* and BCG models for the discovery of *Mycobacterium tuberculosis* inhibitors. // *Tuberculosis (Edinb)*. 2010, 90(6), Pp. 333–337.
12. Ananthan S., Faaleolea E.R., Goldman R.C., Hobrath J.V., Kwong C.D., Laughon B.E., Maddry J.A., Mehta A., Rasmussen L., Reynolds R.C., Secrist J.A., Shindo N., Showe D.N., Sosa M.I., Suling W.J., White E.L. High-throughput screening for inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. // *Tuberculosis (Edinb)*. 2009, 89(5), Pp. 334–353.
13. Andries K., Verhasselt P., Guillemont J., Göhlmann H.W.H., Neefs J.-M., Winkler H., Van Gestel J., Timmerman P., Zhu M., Lee E., Williams P., de Chaffoy D., Huitric E., Hoffner S., Cambau E., Truffot-Pernot C., Lounis N., Jarlier V. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. // *Science*. 2005, 307(5707), Pp. 223–227.
14. Andries K., Villellas C., Coeck N., Thys K., Gevers T., Vranckx L., Lounis N.,

- de Jong B.C., Koul A. Acquired resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to bedaquiline. // PLoS ONE. 2014, 9(7), Pp. e102135.
15. Bakal C.J., Davies J.E. No longer an exclusive club: eukaryotic signalling domains in bacteria // Trends in Cell Biology. 2000, 10(1), Pp. 32–37.
16. Baki A., Bielik A., Molnár L., Szendrei G., Keserü G.M. A High Throughput Luminescent Assay for Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibitors // ASSAY and Drug Development Technologies. 2007, 5(1), Pp. 75–84.
17. Ballell L., Bates R.H., Young R.J., Alvarez-Gomez D., Alvarez-Ruiz E., Barroso V., Blanco D., Crespo B., Escribano J., González R., Lozano S., Huss S., Santos-Villarejo A., Martín-Plaza J.J., Mendoza A., Rebollo-Lopez M.J., Remuiñan-Blanco M., Lavandera J.L., Pérez-Herran E., et al. Fueling open-source drug discovery: 177 small-molecule leads against tuberculosis. // ChemMedChem. 2013, 8(2), Pp. 313–321.
18. Banerjee A., Dubnau E., Quemard A., Balasubramanian V., Um K.S., Wilson T., Collins D., de Lisle G., Jacobs W.R. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. // Science. 1994, 263(5144), Pp. 227–230.
19. Barthe P., Mukamolova G.V., Roumestand C., Cohen-Gonsaud M. The structure of PknB extracellular PASTA domain from *mycobacterium tuberculosis* suggests a ligand-dependent kinase activation. // Structure. 2010, 18(5), Pp. 606–615.
20. Baulard A.R., Betts J.C., Engohang-Ndong J., Quan S., McAdam R.A., Brennan P.J., Locht C., Besra G.S. Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria. // J. Biol. Chem. 2000, 275(36), Pp. 28326–28331.
21. Be N.A., Bishai W.R., Jain S.K. Role of *Mycobacterium tuberculosis* *pknD* in the pathogenesis of central nervous system tuberculosis. // BMC Microbiol. 2012, 12, Pp. 7.
22. Bekker O.B., Alekseeva M.G., Osolodkin D.I., Palyulin V.A., Elizarov S.M., Zefirov N.S., Danilenko V.N. New Test System for Serine/Threonine Protein Kinase Inhibitors Screening: *E. coli* APHVIII/Pk25 design. // Acta Naturae. 2010,

- 2(3), Pp. 110–121.
23. Biukovic G., Basak S., Manimekalai M.S.S., Rishikesan S., Roessle M., Dick T., Rao S.P.S., Hunke C., Grüber G. Variations of subunit {varepsilon} of the *Mycobacterium tuberculosis* F1Fo ATP synthase and a novel model for mechanism of action of the tuberculosis drug TMC207. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013, 57(1), Pp. 168–176.
24. Blokpoel M.C.J. Tetracycline-inducible gene regulation in mycobacteria // *Nucleic Acids Research.* 2005, 33(2), Pp. e22–e22.
25. Boitel B., Ortiz-Lombardía M., Durán R., Pompeo F., Cole S.T., Cerveñansky C., Alzari P.M. PknB kinase activity is regulated by phosphorylation in two Thr residues and dephosphorylation by PstP, the cognate phospho-Ser/Thr phosphatase, in *Mycobacterium tuberculosis*. // *Mol. Microbiol.* 2003, 49(6), Pp. 1493–1508.
26. Bork P., Brown N.P., Hegyi H., Schultz J. The protein phosphatase 2C (PP2C) superfamily: detection of bacterial homologues. // *Protein Sci.* 1996, 5(7), Pp. 1421–1425.
27. Borthakur D., Soedarjo M., Fox P.M., Webb D.T. The mid genes of *Rhizobium* sp strain TAL1145 are required for degradation of mimosine into 3-hydroxy-4-pyridone and are inducible by mimosine. // *Microbiology.* 2003, 149(Pt 2), Pp. 537–546.
28. Bowman J., Ghosh P. A complex regulatory network controlling intrinsic multidrug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. // *Mol. Microbiol.* 2014, 91(1), Pp. 121–134.
29. Brossier F., Sougakoff W., Bernard C., Petrou M., Adeyema K., Pham A., Amy de la Breteque D., Vallet M., Jarlier V., Sola C., Veziris N. Molecular Analysis of the embCAB Locus and embR Gene Involved in Ethambutol Resistance in Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in France. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015, 59(8), Pp. 4800–4808.
30. Caminero J.A., Sotgiu G., Zumla A., Migliori G.B. Best drug treatment for

- multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. // *Lancet Infect Dis.* 2010, 10(9), Pp. 621–629.
31. Camus J.-C., Pryor M.J., Médigue C., Cole S.T. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. // *Microbiology.* 2002, 148(Pt 10), Pp. 2967–2973.
32. Canova M.J., Molle V. Bacterial serine/threonine protein kinases in host-pathogen interactions. // *J. Biol. Chem.* 2014, 289(14), Pp. 9473–9479.
33. Canova M.J., Veyron-Churlet R., Zanella-Cléon I., Cohen-Gonsaud M., Cozzone A.J., Becchi M., Kremer L., Molle V. The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinase PknL phosphorylates Rv2175c: Mass spectrometric profiling of the activation loop phosphorylation sites and their role in the recruitment of Rv2175c // *Proteomics.* 2008, 8(3), Pp. 521–533.
34. Carroll P., Schreuder L.J., Muwanguzi-Karugaba J. Sensitive Detection of Gene Expression in *Mycobacteria* under Replicating and Non-Replicating Conditions Using Optimized Far-Red Reporters // *PLoS ONE.* 2010.
35. Casali N., Nikolayevskyy V., Balabanova Y., Harris S.R., Ignatyeva O., Kontsevaya I., Corander J., Bryant J., Parkhill J., Nejentsev S., Horstmann R.D., Brown T., Drobniowski F. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. // *Nat. Genet.* 2014, 46(3), Pp. 279–286.
36. Chahine E.B., Karaoui L.R., Mansour H. Bedaquiline: a novel diarylquinoline for multidrug-resistant tuberculosis. // *Ann Pharmacother.* 2014, 48(1), Pp. 107–115.
37. Chao J.D., Papavinasasundaram K.G., Zheng X., Chavez-Steenbock A., Wang X., Lee G.Q., Av-Gay Y. Convergence of Ser/Thr and Two-component Signaling to Coordinate Expression of the Dormancy Regulon in *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Biol. Chem.* 2010, 285(38), Pp. 29239–29246.
38. Chapman T.M., Bouloc N., Buxton R.S., Chugh J., Loughheed K.E.A., Osborne S.A., Saxty B., Smerdon S.J., Taylor D.L., Whalley D. Substituted aminopyrimidine protein kinase B (PknB) inhibitors show activity against *Mycobacterium tuberculosis*. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012, 22(9), Pp. 3349–

- 3353.
39. Chaurasiya S.K., Srivastava K.K. Downregulation of protein kinase C- α enhances intracellular survival of Mycobacteria: role of PknG. // *BMC Microbiol.* 2009, 9, Pp. 271.
40. Chawla Y., Upadhyay S., Khan S., Nagarajan S.N., Forti F., Nandicoori V.K. Protein kinase B (PknB) of Mycobacterium tuberculosis is essential for growth of the pathogen in vitro as well as for survival within the host. // *J. Biol. Chem.* 2014, 289(20), Pp. 13858–13875.
41. Chen P., Ruiz R.E., Li Q., Silver R.F., Bishai W.R. Construction and characterization of a Mycobacterium tuberculosis mutant lacking the alternate sigma factor gene, sigF. // *Infect. Immun.* 2000, 68(10), Pp. 5575–5580.
42. Cheng S.J., Thibert L., Sanchez T., Heifets L., Zhang Y. pncA mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000, 44(3), Pp. 528–532.
43. Chopra P., Singh B., Singh R., Vohra R., Koul A., Meena L.S., Koduri H., Ghildiyal M., Deol P., Das T.K., Tyagi A.K., Singh Y. Phosphoprotein phosphatase of Mycobacterium tuberculosis dephosphorylates serine-threonine kinases PknA and PknB. // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2003, 311(1), Pp. 112–120.
44. Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E.3., Tekaiia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. // *Nature.* 1998, 393(6685), Pp. 537–544.
45. Cooper C.B. Development of Mycobacterium tuberculosis Whole Cell Screening Hits as Potential Antituberculosis Agents // *J. Med. Chem.* 2013, 56(20), Pp. 7755–7760.
46. Cousin C., Derouiche A., Shi L., Pagot Y., Poncet S., Mijakovic I. Protein-

- serine/threonine/tyrosine kinases in bacterial signaling and regulation. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2013, 346(1), Pp. 11–19.
47. Coxon G.D., Cooper C.B., Gillespie S.H., McHugh T.D. Strategies and challenges involved in the discovery of new chemical entities during early-stage tuberculosis drug discovery. // *J. Infect. Dis.* 2012, 205 Suppl 2(suppl 2), Pp. S258–64.
48. Curry J.M., Whalan R., Hunt D.M., Gohil K., Strom M., Rickman L., Colston M.J., Smerdon S.J., Buxton R.S. An ABC transporter containing a forkhead-associated domain interacts with a serine-threonine protein kinase and is required for growth of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. // *Infect. Immun.* 2005, 73(8), Pp. 4471–4477.
49. Daigle D.M., McKay G.A., Thompson P.R., Wright G.D. Aminoglycoside antibiotic phosphotransferases are also serine protein kinases // *Chem. Biol.* 1999, 6(1), Pp. 11–18.
50. Daigle D.M., McKay G.A., Wright G.D. Inhibition of aminoglycoside antibiotic resistance enzymes by protein kinase inhibitors // *J. Biol. Chem.* 1997, 272(40), Pp. 24755–24758.
51. Danilenko V.N., Akopyants K.E., Sizova I.A., Michurina T.A. Determination of the nucleotide sequence and characterization of the novel aminoglycoside phosphotransferase aphVIII gene from the *Streptomyces rimosus* strain // *Генетика.* 1997, 33(11), Pp. 1478–1486.
52. Danilenko V.N., Osolodkin D.I., Lakatosh S.A., Preobrazhenskaya M.N., Shtil A.A. Bacterial eukaryotic type serine-threonine protein kinases: from structural biology to targeted anti-infective drug design. // *Curr Top Med Chem.* 2011, 11(11), Pp. 1352–1369.
53. Danilenko V.N., Simonov A.Y., Lakatosh S.A., Kubbutat M.H.G., Totzke F., Schächtele 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, 51(24), Pp. 7731–7736.
54. Dasgupta A., Datta P., Kundu M., Basu J. The serine/threonine kinase PknB of *Mycobacterium tuberculosis* phosphorylates PBPA, a penicillin-binding protein required for cell division. // *Microbiology (Reading, Engl.)*. 2006, 152(Pt 2), Pp. 493–504.
55. Davis P.D., Elliott L.H., Harris W., Hill C.H., Hurst S.A., Keech E., Kumar M.K., Lawton G., Nixon J.S., Wilkinson S.E. Inhibitors of protein kinase C. 2. Substituted bisindolylmaleimides with improved potency and selectivity. // *J. Med. Chem.* 1992a, 35(6), Pp. 994–1001.
56. Davis P.D., Hill C.H., Lawton G., Nixon J.S., Wilkinson S.E., Hurst S.A., Keech E., Turner S.E. Inhibitors of protein kinase C. 1. 2,3-Bisarylmalimides. // *J. Med. Chem.* 1992b, 35(1), Pp. 177–184.
57. DeBarber A.E., Mdluli K., Bosman M., Bekker L.G., Barry C.E. Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000, 97(17), Pp. 9677–9682.
58. Deol P., Vohra R., Saini A.K., Singh A., Chandra H., Chopra P., Das T.K., Tyagi A.K., Singh Y. Role of *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr kinase PknF: implications in glucose transport and cell division. // *J. Bacteriol.* 2005, 187(10), Pp. 3415–3420.
59. Domenech P., Reed M.B., Barry C.E. Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL protein family to virulence and drug resistance. // *Infect. Immun.* 2005, 73(6), Pp. 3492–3501.
60. Duncan L., Alper S., Arigoni F., Losick R., Stragier P. ACTIVATION OF CELL-SPECIFIC TRANSCRIPTION BY A SERINE PHOSPHATASE AT THE SITE OF ASYMMETRIC DIVISION // *Science*. 1995, 270(5236), Pp. 641–644.
61. Durán R., Villarino A., Bellinzoni M., Wehenkel A., Fernandez P., Boitel B., Cole S.T., Alzari P.M., Cerveñansky C. Conserved autophosphorylation pattern in activation loops and juxtamembrane regions of *Mycobacterium tuberculosis*

- Ser/Thr protein kinases. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005, 333(3), Pp. 858–867.
62. Dutta R., Inouye M. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily // *Trends Biochem. Sci.* 2000, 25(1), Pp. 24–28.
63. Escuyer V.E., Lety M.A., Torrelles J.B., Khoo K.H., Tang J.B., Rithner C.D., Frehel C., McNeil M.R., Brennan P.J., Chatterjee D. The role of the *embA* and *embB* gene products in the biosynthesis of the terminal hexaarabinofuranosyl motif of *Mycobacterium smegmatis* arabinogalactan. // *J. Biol. Chem.* 2001, 276(52), Pp. 48854–48862.
64. Forrellad M.A., Klepp L.I., Gioffré A., Sabio y García J., Morbidoni H.R., la Paz Santangelo de M., Cataldi A.A., Bigi F. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. // *Virulence*. 2013, 4(1), Pp. 3–66.
65. Foussard M., Cabantous S., Pédelacq J., Guillet V., Tranier S., Mourey L., Birck C., Samama J. The molecular puzzle of two-component signaling cascades. // *Microbes Infect.* 2001, 3(5), Pp. 417–424.
66. Fuhrmann M., Hausherr A., Ferbitz L., Schödl T., Heitzer M., Hegemann P. Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene // *Plant Mol Biol.* 2004, 55(6), Pp. 869–881.
67. Galperin M.Y., Higdon R., Kolker E. Interplay of heritage and habitat in the distribution of bacterial signal transduction systems // *Molecular Biosystems*. 2010, 6(4), Pp. 721–728.
68. Gandhi N.R., Nunn P., Dheda K., Schaaf H.S., Zignol M., van Soolingen D., Jensen P., Bayona J. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis // *The Lancet*. 2010, 375(9728), Pp. 1830–1843.
69. Garnak M., Reeves H.C. PHOSPHORYLATION OF ISOCITRATE DEHYDROGENASE OF *ESCHERICHIA-COLI* // *Science*. 1979, 203(4385), Pp. 1111–1112.

70. Gee C.L., Papavinasasundaram K.G., Blair S.R., Baer C.E., Falick A.M., King D.S., Griffin J.E., Venghatakrishnan H., Zukauskas A., Wei J.-R., Dhiman R.K., Crick D.C., Rubin E.J., Sasseti C.M., Alber T. A phosphorylated pseudokinase complex controls cell wall synthesis in mycobacteria. // *Sci Signal*. 2012, 5(208), Pp. ra7.
71. Geiman D.E., Kaushal D., Ko C., Tyagi S., Manabe Y.C., Schroeder B.G., Fleischmann R.D., Morrison N.E., Converse P.J., Chen P., Bishai W.R. Attenuation of late-stage disease in mice infected by the *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking the SigF alternate sigma factor and identification of SigF-dependent genes by microarray analysis. // *Infect. Immun*. 2004, 72(3), Pp. 1733–1745.
72. Good M.C., Greenstein A.E., Young T.A., Ng H.L., Alber T. Sensor domain of the *Mycobacterium tuberculosis* receptor Ser/Thr protein kinase, PknD, forms a highly symmetric beta propeller // *J. Mol. Biol*. 2004, 339(2), Pp. 459–469.
73. Gopalaswamy R., Narayanan S., Chen B., Jacobs W.R., Av-Gay Y. The serine/threonine protein kinase PknI controls the growth of *Mycobacterium tuberculosis* upon infection // *FEMS Microbiol. Lett*. 2009, 295(1), Pp. 23–29.
74. Greenstein A.E., MacGurn J.A., Baer C.E., Falick A.M., Cox J.S., Alber T. M. *tuberculosis* Ser/Thr protein kinase D phosphorylates an anti-anti-sigma factor homolog. // *PLoS Pathog*. 2007, 3(4), Pp. e49.
75. Hanks S.K., Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. // *FASEB J*. 1995, 9(8), Pp. 576–596.
76. Hanks S.K., Quinn A.M., Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. // *Science*. 1988, 241(4861), Pp. 42–52.
77. Hartkoorn R.C., Uplekar S., Cole S.T. Cross-resistance between clofazimine and bedaquiline through upregulation of MmpL5 in *Mycobacterium tuberculosis*. // *Antimicrob. Agents Chemother*. 2014, 58(5), Pp. 2979–2981.

78. Haver H.L., Chua A., Ghode P., Lakshminarayana S.B., Singhal A., Mathema B., Wintjens R., Bifani P. Mutations in the F420 biosynthetic pathway and a nitroreductase enzyme are the primary resistance determinants in spontaneous in vitro selected PA-824 mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015, Pp. AAC.00308–15.
79. He L., Wang X., Cui P., Jin J., Chen J., Zhang W., Zhang Y. *ubiA* (Rv3806c) encoding DPPR synthase involved in cell wall synthesis is associated with ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. // *Tuberculosis.* 2015, 95(2), Pp. 149–154.
80. Hegde S.S., Vetting M.W., Roderick S.L., Mitchenall L.A., Maxwell A., Takiff H.E., Blanchard J.S. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. // *Science.* 2005, 308(5727), Pp. 1480–1483.
81. Hoch J.A. Two-component and phosphorelay signal transduction // *Current Opinion in Microbiology.* 2000, 3(2), Pp. 165–170.
82. Hofmann K., Bucher P. The FHA domain: a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors. // *Trends Biochem. Sci.* 1995, 20(9), Pp. 347–349.
83. Hon W.C., McKay G.A., Thompson P.R., Sweet R.M., Yang D.S.C., Wright G.D., Berghuis A.M. Structure of an enzyme required for aminoglycoside antibiotic resistance reveals homology to eukaryotic protein kinases // *Cell.* 1997, 89(6), Pp. 887–895.
84. Huse M., Kuriyan J. The conformational plasticity of protein kinases // 2002, 109(3), Pp. 275–282.
85. Jang J., Stella A., Boudou F., Levillain F., Darthuy E., Vaubourgeix J., Wang C., Bardou F., Puzo G., Gilleron M., Burlet-Schiltz O., Monsarrat B., Brodin P., Gicquel B., Neyrolles O. Functional characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinase PknJ. // *Microbiology (Reading, Engl.)*. 2010, 156(Pt 6), Pp. 1619–1631.
86. Jayakumar D., Jacobs W.R., Narayanan S. Protein kinase E of *Mycobacterium*

- tuberculosis has a role in the nitric oxide stress response and apoptosis in a human macrophage model of infection. // *Cell. Microbiol.* 2008, 10(2), Pp. 365–374.
87. Johnson M., Zaretskaya I., Raytselis Y., Merezhuk Y., McGinnis S., Madden T.L. NCBI BLAST: a better web interface. // *Nucleic Acids Research.* 2008, 36(Web Server issue), Pp. W5–9.
88. Kakkar A.K., Dahiya N. Bedaquiline for the treatment of resistant tuberculosis: promises and pitfalls. // *Tuberculosis.* 2014, 94(4), Pp. 357–362.
89. Kang C.-M., Abbott D.W., Park S.T., Dascher C.C., Cantley L.C., Husson R.N. The Mycobacterium tuberculosis serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape. // *Genes Dev.* 2005, 19(14), Pp. 1692–1704.
90. Khan S., Nagarajan S.N., Parikh A., Samantaray S., Singh A., Kumar D., Roy R.P., Bhatt A., Nandicoori V.K. Phosphorylation of enoyl-acyl carrier protein reductase InhA impacts mycobacterial growth and survival. // *J. Biol. Chem.* 2010, 285(48), Pp. 37860–37871.
91. Klopper M., Warren R.M., Hayes C., Gey van Pittius N.C., Streicher E.M., Müller B., Sirgel F.A., Chabula-Nxiweni M., Hoosain E., Coetzee G., David van Helden P., Victor T.C., Trollip A.P. Emergence and Spread of Extensively and Totally Drug-Resistant Tuberculosis, South Africa // *Emerging Infect. Dis.* 2013, 19(3), Pp. 449–455.
92. Kornev A.P., Taylor S.S. Defining the conserved internal architecture of a protein kinase // *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics.* 2010, 1804(3), Pp. 440–444.
93. Kravanja M., Engelmann R., Dossonnet V., Bluggel M., Meyer H.E., Frank R., Galinier A., Deutscher J., Schnell N., Hengstenberg G. The hprK gene of *Enterococcus faecalis* encodes a novel bifunctional enzyme: the HPr kinase/phosphatase // *Mol. Microbiol.* 1999, 31(1), Pp. 59–66.
94. Krupa A., Srinivasan N. Diversity in domain architectures of Ser/Thr kinases and

- their homologues in prokaryotes // *Bmc Genomics*. 2005, 6.
95. Kumar P., Kumar D., Parikh A., Rananaware D., Gupta M., Singh Y., Nandicoori V.K. The Mycobacterium tuberculosis protein kinase K modulates activation of transcription from the promoter of mycobacterial monooxygenase operon through phosphorylation of the transcriptional regulator VirS. // *J. Biol. Chem.* 2009, 284(17), Pp. 11090–11099.
96. Labidi A., David H.L., Roulland-Dussoix D. Restriction endonuclease mapping and cloning of Mycobacterium fortuitum var. fortuitum plasmid pAL5000. // *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 1985, 136B(2), Pp. 209–215.
97. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. // *Nature*. 1970, 227(5259), Pp. 680–685.
98. Laporte D.C., Chung T.W. A SINGLE GENE CODES FOR THE KINASE AND PHOSPHATASE WHICH REGULATE ISOCITRATE DEHYDROGENASE // *J. Biol. Chem.* 1985, 260(28), Pp. 5291–5297.
99. LaVallie E.R., DiBlasio E.A., Kovacic S., Grant K.L., Schendel P.F., McCoy J.M. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm. // *Biotechnology (N.Y.)*. 1993, 11(2), Pp. 187–193.
100. Lechartier B., Rybniker J., Zumla A., Cole S.T. Tuberculosis drug discovery in the post-post-genomic era // *EMBO Mol Med*. 2014, Pp. n/a–n/a.
101. Letunic I., Doerks T., Bork P. SMART: recent updates, new developments and status in 2015. // *Nucleic Acids Research*. 2015, 43(Database issue), Pp. D257–60.
102. Li X.-Z., Zhang L., Nikaido H. Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in Mycobacterium smegmatis. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48(7), Pp. 2415–2423.
103. Loughheed K.E.A., Osborne S.A., Saxty B., Whalley D., Chapman T., Bouloc N., Chugh J., Nott T.J., Patel D., Spivey V.L., Kettleborough C.A., Bryans J.S., Taylor D.L., Smerdon S.J., Buxton R.S. Effective inhibitors of the essential

- kinase PknB and their potential as anti-mycobacterial agents. // *Tuberculosis (Edinb)*. 2011, 91(4), Pp. 277–286.
104. Makarov V., Manina G., Mikusova K., Mollmann U., Ryabova O., Saint-Joanis B., Dhar N., Pasca M.R., Buroni S., Lucarelli A.P., Milano A., De Rossi E., Belanova M., Bobovska A., Dianiskova P., Kordulakova J., Sala C., Fullam E., Schneider P., et al. Benzothiazinones kill *Mycobacterium tuberculosis* by blocking arabinan synthesis. // *Science*. 2009, 324(5928), Pp. 801–804.
105. Malhotra V., Arteaga-Cortés L.T., Clay G., Clark-Curtiss J.E. *Mycobacterium tuberculosis* protein kinase K confers survival advantage during early infection in mice and regulates growth in culture and during persistent infection: implications for immune modulation. // *Microbiology (Reading, Engl.)*. 2010, 156(Pt 9), Pp. 2829–2841.
106. Malhotra V., Okon B.P., Clark-Curtiss J.E. *Mycobacterium tuberculosis* protein kinase K enables growth adaptation through translation control. // *J. Bacteriol*. 2012, 194(16), Pp. 4184–4196.
107. Manjunatha U., Boshoff H.I., Barry C.E. The mechanism of action of PA-824: Novel insights from transcriptional profiling. // *Commun Integr Biol*. 2009, 2(3), Pp. 215–218.
108. Marchler-Bauer A., Lu S., Anderson J.B., Chitsaz F., Derbyshire M.K., DeWeese-Scott C., Fong J.H., Geer L.Y., Geer R.C., Gonzales N.R., Gwadz M., Hurwitz D.I., Jackson J.D., Ke Z., Lanczycki C.J., Lu F., Marchler G.H., Mullokandov M., Omelchenko M.V., et al. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. // *Nucleic Acids Research*. 2011, 39(Database issue), Pp. D225–9.
109. Matsumoto M., Hashizume H., Tomishige T., Kawasaki M., Tsubouchi H., Sasaki H., Shimokawa Y., Komatsu M. OPC-67683, a nitro-dihydroimidazooxazole derivative with promising action against tuberculosis in vitro and in mice. // *PLoS Med*. 2006, 3(11), Pp. e466.
110. Matteelli A., Roggi A., Carvalho A.C. Extensively drug-resistant tuberculosis:

- epidemiology and management. // *Clin Epidemiol.* 2014, 6, Pp. 111–118.
111. Maus C.E., Plikaytis B.B., Shinnick T.M. Mutation of *tlyA* confers capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005a, 49(2), Pp. 571–577.
112. Maus C.E., Plikaytis B.B., Shinnick T.M. Molecular analysis of cross-resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005b, 49(8), Pp. 3192–3197.
113. Mayer C., Takiff H. The Molecular Genetics of Fluoroquinolone Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. // *Microbiol Spectr.* 2014, 2(4).
114. McDermott W., Tompsett R. Activation of pyrazinamide and nicotinamide in acidic environments in vitro. : *American review of tuberculosis*, 1954.
115. Mehra S., Foreman T.W., Didier P.J., Ahsan M.H., Hudock T.A., Kisse R., Golden N.A., Gautam U.S., Johnson A.-M., Alvarez X., Russell-Lodrigue K.E., Doyle L.A., Roy C.J., Niu T., Blanchard J.L., Khader S.A., Lackner A.A., Sherman D.R., Kaushal D. The DosR Regulon Modulates Adaptive Immunity and Is Essential for *Mycobacterium tuberculosis* Persistence. // *Am J Respir Crit Care Med.* 2015, 191(10), Pp. 1185–1196.
116. Mir M., Asong J., Li X., Cardot J., Boons G.-J., Husson R.N. The extracytoplasmic domain of the *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr kinase PknB binds specific muropeptides and is required for PknB localization. // *PLoS Pathog.* 2011, 7(7), Pp. e1002182.
117. Mitchison D.A. The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. // *Tubercle.* 1985a, 66(3), Pp. 219–225.
118. Mitchison D.A. The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. // *Tubercle.* 1985b, 66(3), Pp. 219–225.
119. Mokrousov I., Narvskaya O., Vyazovaya A., Otten T., Jiao W.-W., Gomes L.L., Suffys P.N., Shen A.-D., Vishnevsky B. Russian «successful» clone B0/W148 of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a multiplex PCR

- assay for rapid detection and global screening. // *J. Clin. Microbiol.* 2012, 50(11), Pp. 3757–3759.
120. Molle V., Gulten G., Vilchèze C., Veyron-Churlet R., Zanella-Cléon I., Sacchettini J.C., Jacobs W.R., Kremer L. Phosphorylation of InhA inhibits mycolic acid biosynthesis and growth of *Mycobacterium tuberculosis*. // *Mol. Microbiol.* 2010, 78(6), Pp. 1591–1605.
121. Molle V., Kremer L., Girard-Blanc C., Besra G.S., Cozzone A.J., Prost J.-F. An FHA phosphoprotein recognition domain mediates protein EmbR phosphorylation by PknH, a Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. // *Biochemistry.* 2003, 42(51), Pp. 15300–15309.
122. Molle V., Soulat D., Jault J.-M., Grangeasse C., Cozzone A.J., Prost J.-F. Two FHA domains on an ABC transporter, Rv1747, mediate its phosphorylation by PknF, a Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2004, 234(2), Pp. 215–223.
123. Morris R.P., Nguyen L., Gatfield J., Visconti K., Nguyen K., Schnappinger D., Ehrt S., Liu Y., Heifets L., Pieters J., Schoolnik G., Thompson C.J. Ancestral antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005, 102(34), Pp. 12200–12205.
124. Movahedzadeh F., Bitter W. *Ins and Outs of Mycobacterial Plasmids // Mycobacteria Protocols Methods in Molecular Biology.* Totowa, NJ: Humana Press, 2010. C. 217–228.
125. Munozdorado J., Inouye S., Inouye M. A GENE ENCODING A PROTEIN SERINE THREONINE KINASE IS REQUIRED FOR NORMAL DEVELOPMENT OF M-XANTHUS, A GRAM-NEGATIVE BACTERIUM // *Cell.* 1991, 67(5), Pp. 995–1006.
126. Muto A., Fujihara A., Ito K.I., Matsuno J., Ushida C., Himeno H. Requirement of transfer-messenger RNA for the growth of *Bacillus subtilis* under stresses. // *Genes Cells.* 2000, 5(8), Pp. 627–635.
127. Nagarajan S.N., Upadhyay S., Chawla Y., Khan S., Naz S., Subramanian J.,

- Gandotra S., Nandicoori V.K. Protein Kinase A (PknA) of *Mycobacterium tuberculosis* Is Independently Activated and Is Critical for Growth in Vitro and Survival of the Pathogen in the Host // *J. Biol. Chem.* 2015, 290(15), Pp. 9626–9645.
128. Najafi S.M.A., Willis A.C., Yudkin M.D. SITE OF PHOSPHORYLATION OF SPOIIAA, THE ANTI-ANTI-SIGMA FACTOR FOR SPORULATION-SPECIFIC SIGMA(F) OF *BACILLUS-SUBTILIS* // *J. Bacteriol.* 1995, 177(10), Pp. 2912–2913.
129. Nakamura Y., Gojobori T., Ikemura T. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. // *Nucleic Acids Research.* 2000, 28(1), Pp. 292.
130. Narayan A., Sachdeva P., Sharma K., Saini A.K., Tyagi A.K., Singh Y. Serine threonine protein kinases of mycobacterial genus: phylogeny to function. // *Physiol. Genomics.* 2007, 29(1), Pp. 66–75.
131. Nariya H., Inouye S. Factors that modulate the Pkn4 kinase cascade in *Myxococcus xanthus* // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2005a, 9(3-4), Pp. 147–153.
132. Nariya H., Inouye S. Identification of a protein Ser/Thr kinase cascade that regulates essential transcriptional activators in *Myxococcus xanthus* development // *Mol. Microbiol.* 2005b, 58(2), Pp. 367–379.
133. Nariya H., Inouye S. A protein Ser/Thr kinase cascade negatively regulates the DNA-binding activity of MrpC, a smaller form of which may be necessary for the *Myxococcus xanthus* development // *Mol. Microbiol.* 2006, 60(5), Pp. 1205–1217.
134. Nelson R.M., Long G.L. A general method of site-specific mutagenesis using a modification of the *Thermus aquaticus* polymerase chain reaction. // *Anal. Biochem.* 1989, 180(1), Pp. 147–151.
135. Nguyen L., Thompson C.J. Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: the mycobacterial paradigm // *Trends in Microbiology.* 2006, 14(7),

- Pp. 304–312.
136. Nolen B., Taylor S., Ghosh G. Regulation of protein kinases: Controlling activity through activation segment conformation // *Molecular Cell*. 2004, 15(5), Pp. 661–675.
 137. Ortega C., Liao R., Anderson L.N., Rustad T., Ollodart A.R., Wright A.T., Sherman D.R., Grundner C. Mycobacterium tuberculosis Ser/Thr protein kinase B mediates an oxygen-dependent replication switch. // *PLoS Biol*. 2014, 12(1), Pp. e1001746.
 138. Papavinasasundaram K.G., Chan B., Chung J.-H., Colston M.J., Davis E.O., Av-Gay Y. Deletion of the Mycobacterium tuberculosis pknH gene confers a higher bacillary load during the chronic phase of infection in BALB/c mice. // *J. Bacteriol*. 2005, 187(16), Pp. 5751–5760.
 139. Parida B.K., Douglas T., Nino C., Dhandayuthapani S. Interactions of anti-sigma factor antagonists of Mycobacterium tuberculosis in the yeast two-hybrid system. // *Tuberculosis (Edinb)*. 2005, 85(5-6), Pp. 347–355.
 140. Parida S.K., Axelsson-Robertson R., Rao M.V., Singh N., Master I., Lutckii A., Keshavjee S., Andersson J., Zumla A., Maeurer M. Totally drug-resistant tuberculosis and adjunct therapies. // *J. Intern. Med*. 2015, 277(4), Pp. 388–405.
 141. Pereira S.F.F., Goss L., Dworkin J. Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 2011, 75(1), Pp. 192–212.
 142. Perez J., Castaneda-Garcia A., Jenke-Kodama H., Mueller R., Munoz-Dorado J. Eukaryotic-like protein kinases in the prokaryotes and the myxobacterial kinome // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2008, 105(41), Pp. 15950–15955.
 143. Pethe K., Bifani P., Jang J., Kang S., Park S., Ahn S., Jiricek J., Jung J., Jeon H.K., Cechetto J., Christophe T., Lee H., Kempf M., Jackson M., Lenaerts A.J., Pham H., Jones V., Seo M.J., Kim Y.M., et al. Discovery of Q203, a potent clinical candidate for the treatment of tuberculosis. // *Nat. Med*. 2013, 19(9), Pp. 1157–1160.

144. Pérez J., Garcia R., Bach H., de Waard J.H., Jacobs W.R., Av-Gay Y., Bubis J., Takiff H.E. Mycobacterium tuberculosis transporter MmpL7 is a potential substrate for kinase PknD. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006, 348(1), Pp. 6–12.
145. Prisic S., Dankwa S., Schwartz D., Chou M.F., Locasale J.W., Kang C.-M., Bemis G., Church G.M., Steen H., Husson R.N. Extensive phosphorylation with overlapping specificity by Mycobacterium tuberculosis serine/threonine protein kinases. // *Proceedings of the ...* 2010, 107(16), Pp. 7521–7526.
146. Prisic S., Husson R.N. Mycobacterium tuberculosis Serine/Threonine Protein Kinases // *Microbiol Spectr*. 2014, 2(5), Pp. 1–26.
147. Protopopova M., Hanrahan C., Nikonenko B., Samala R., Chen P., Gearhart J., Einck L., Nacy C.A. Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. // *J Antimicrob Chemother*. 2005, 56(5), Pp. 968–974.
148. Pullen K.E., Ng H.-L., Sung P.-Y., Good M.C., Smith S.M., Alber T. An alternate conformation and a third metal in PstP/Ppp, the M. tuberculosis PP2C-Family Ser/Thr protein phosphatase. // *Structure*. 2004, 12(11), Pp. 1947–1954.
149. Rajagopal L., Vo A., Silvestroni A., Rubens C.E. Regulation of cytotoxin expression by converging eukaryotic-type and two-component signalling mechanisms in *Streptococcus agalactiae* // *Mol. Microbiol*. 2006, 62(4), Pp. 941–957.
150. Rawat R., Whitty A., Tonge P.J. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the Mycobacterium tuberculosis enoyl reductase: adduct affinity and drug resistance. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003, 100(24), Pp. 13881–13886.
151. Reeves A.Z., Campbell P.J., Sultana R., Malik S., Murray M., Plikaytis B.B., Shinnick T.M., Posey J.E. Aminoglycoside cross-resistance in Mycobacterium tuberculosis due to mutations in the 5' untranslated region of whiB7. // *Antimicrob. Agents Chemother*. 2013.

152. Reyrat J.M., Kahn D. Mycobacterium smegmatis: an absurd model for tuberculosis? // Trends in Microbiology. 2001, 9(10), Pp. 472–474.
153. Roskoski R. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. // Pharmacol. Res. 2015, 100, Pp. 1–23.
154. Rozwarski D.A., Grant G.A., Barton D.H., Jacobs W.R., Sacchettini J.C. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from Mycobacterium tuberculosis. // Science. 1998, 279(5347), Pp. 98–102.
155. Sajid A., Arora G., Gupta M., Upadhyay S., Nandicoori V.K., Singh Y. Phosphorylation of Mycobacterium tuberculosis Ser/Thr phosphatase by PknA and PknB. // PLoS ONE. 2011, 6(3), Pp. e17871.
156. Sala C., Hartkoorn R.C. Tuberculosis drugs: new candidates and how to find more. // Future Microbiol. 2011, 6(6), Pp. 617–633.
157. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.
158. Sandgren A., Strong M., Muthukrishnan P., Weiner B.K., Church G.M., Murray M.B. Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database // PLoS Med. 2009, 6(2), Pp. e1000002–5.
159. Sareen M., Khuller G.K. Cell wall and membrane changes associated with ethambutol resistance in Mycobacterium tuberculosis H37Ra. // Antimicrob. Agents Chemother. 1990, 34(9), Pp. 1773–1776.
160. Sassetti C.M., Boyd D.H., Rubin E.J. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. // Mol. Microbiol. 2003, 48(1), Pp. 77–84.
161. Scheeff E.D., Bourne P.E. Structural Evolution of the Protein Kinase–Like Superfamily // PLoS Comp Biol. 2005, 1(5), Pp. e49–23.
162. Scherr N., Honnappa S., Kunz G., Mueller P., Jayachandran R., Winkler F., Pieters J., Steinmetz M.O. Structural basis for the specific inhibition of protein kinase G, a virulence factor of Mycobacterium tuberculosis. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2007, 104(29), Pp. 12151–12156.

163. Scherr N., Muller P., Perisa D., Combaluzier B., Jenö P., Pieters J. Survival of pathogenic mycobacteria in macrophages is mediated through autophosphorylation of protein kinase G. // *J. Bacteriol.* 2009, 191(14), Pp. 4546–4554.
164. Schultz J., Milpetz F., Bork P., Ponting C.P. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998, 95(11), Pp. 5857–5864.
165. Scorpio A., Lindholm-Levy P., Heifets L., Gilman R., Siddiqi S., Cynamon M., Zhang Y. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997, 41(3), Pp. 540–543.
166. Scorpio A., Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. // *Nat. Med.* 1996, 2(6), Pp. 662–667.
167. Segala E., Sougakoff W., Nevejans-Chauffour A., Jarlier V., Petrella S. New mutations in the mycobacterial ATP synthase: new insights into the binding of the diarylquinoline TMC207 to the ATP synthase C-ring structure. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, 56(5), Pp. 2326–2334.
168. Seifert M., Catanzaro D., Catanzaro A., Rodwell T.C. Genetic Mutations Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A Systematic Review // *PLoS ONE.* 2015, 10(3), Pp. e0119628–13.
169. Sensi P. History of the development of rifampin. // *Rev. Infect. Dis.* 1983, 5 Suppl 3, Pp. S402–6.
170. Shah I.M., Laaberki M.-H., Popham D.L., Dworkin J. A Eukaryotic-like Ser/Thr Kinase Signals Bacteria to Exit Dormancy in Response to Peptidoglycan Fragments // *Cell.* 2008, 135(3), Pp. 486–496.
171. Sharma D., Kumar B., Lata M., Joshi B., Venkatesan K., Shukla S., Bisht D. Comparative Proteomic Analysis of Aminoglycosides Resistant and Susceptible *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates for Exploring Potential Drug

- Targets. // PLoS ONE. 2015, 10(10), Pp. e0139414.
172. Sharma K., Gupta M., Pathak M., Gupta N., Koul A., Sarangi S., Baweja R., Singh Y. Transcriptional control of the mycobacterial embCAB operon by PknH through a regulatory protein, EmbR, in vivo. // J. Bacteriol. 2006, 188(8), Pp. 2936–2944.
173. Shi L., Potts M., Kennelly P.J. The serine, threonine, and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait // FEMS Microbiol. Rev. 1998, 22(4), Pp. 229–253.
174. Shi W., Zhang X., Jiang X., Yuan H., Lee J.S., Barry C.E., Wang H., Zhang W., Zhang Y. Pyrazinamide inhibits trans-translation in Mycobacterium tuberculosis. // Science. 2011, 333(6049), Pp. 1630–1632.
175. Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D., Higgins D.G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. // Mol. Syst. Biol. 2011, 7(1), Pp. 539–539.
176. Simons S.O., Mulder A., van Ingen J., Boeree M.J., van Soolingen D. Role of rpsA Gene Sequencing in Diagnosis of Pyrazinamide Resistance. // J. Clin. Microbiol. 2013, 51(1), Pp. 382.
177. Singh A., Gupta R., Vishwakarma R.A., Narayanan P.R., Paramasivan C.N., Ramanathan V.D., Tyagi A.K. Requirement of the mymA operon for appropriate cell wall ultrastructure and persistence of Mycobacterium tuberculosis in the spleens of guinea pigs. // J. Bacteriol. 2005, 187(12), Pp. 4173–4186.
178. Sizova I.A., Hegemann P., Furmann M., Danilenko V.N. Streptomyces rimosus Aminoglycoside 3«-Phosphotransferase VIII: Comparisons with Aminoglycoside 3»-Phosphotransferases of Aminoglycoside-Producing Strains and with Eukaryotic Protein Kinases // Molecular Biology. 2002, 36(1), Pp. 18–25.
179. Skerry C., Pokkali S., Pinn M., Be N.A., Harper J., Karakousis P.C., Jain S.K. Vaccination with recombinant Mycobacterium tuberculosis PknD attenuates

- bacterial dissemination to the brain in guinea pigs. // *PLoS ONE*. 2013, 8(6), Pp. e66310.
180. Snapper S.B., Melton R.E., Mustafa S., Kieser T., Jacobs W.R. Jr. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. // *Mol. Microbiol.* 1990, 4(11), Pp. 1911–1919.
181. Sotgiu G., Ferrara G., Matteelli A., Richardson M.D., Centis R., Ruesch-Gerdes S., Toungousova O., Zellweger J.-P., Spanevello A., Cirillo D., Lange C., Migliori G.B. Epidemiology and clinical management of XDR-TB: a systematic review by TBNET. // *Eur. Respir. J.* 2009, 33(4), Pp. 871–881.
182. Spivey V.L., Molle V., Whalan R.H., Rodgers A., Leiba J., Stach L., Walker K.B., Smerdon S.J., Buxton R.S. Forkhead-associated (FHA) domain containing ABC transporter Rv1747 is positively regulated by Ser/Thr phosphorylation in *Mycobacterium tuberculosis*. // *J. Biol. Chem.* 2011, 286(29), Pp. 26198–26209.
183. Squeglia F., Marchetti R., Ruggiero A., Lanzetta R., Marasco D., Dworkin J., Petoukhov M., Molinaro A., Berisio R., Silipo A. Chemical basis of peptidoglycan discrimination by PrkC, a key kinase involved in bacterial resuscitation from dormancy. // *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133(51), Pp. 20676–20679.
184. Sreevatsan S., Pan X., Stockbauer K.E., Williams D.L., Kreiswirth B.N., Musser J.M. Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996, 40(4), Pp. 1024–1026.
185. Sreevatsan S., Stockbauer K.E., Pan X., Kreiswirth B.N., Moghazeh S.L., Jacobs W.R.J., Telenti A., Musser J.M. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997, 41(8), Pp. 1677–1681.
186. Sun H., Shi W.Y. Genetic studies of *mrp*, a locus essential for cellular aggregation and sporulation of *Myxococcus xanthus* // *J. Bacteriol.* 2001, 183(16), Pp. 4786–4795.

187. Sutcliffe I.C., Harrington D.J. Lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*: an abundant and functionally diverse class of cell envelope components. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2004, 28(5), Pp. 645–659.
188. Suzuki Y., Katsukawa C., Tamaru A., Abe C., Makino M., Mizuguchi Y., Taniguchi H. Detection of kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene. // *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36(5), Pp. 1220–1225.
189. Tahlan K., Wilson R., Kastrinsky D.B., Arora K., Nair V., Fischer E., Barnes S.W., Walker J.R., Alland D., Barry C.E.3., Boshoff H.I. SQ109 targets MmpL3, a membrane transporter of trehalose monomycolate involved in mycolic acid donation to the cell wall core of *Mycobacterium tuberculosis*. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, 56(4), Pp. 1797–1809.
190. Takeuchi N., Nakamura T., Takeuchi F., Hashimoto E., Yamamura H. Inhibitory effect of mitoxantrone on activity of protein kinase C and growth of HL60 cells. // *J. Biochem.* 1992, 112(6), Pp. 762–767.
191. Tamura K., Stecher G., Peterson D., FilipSKI A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // *Mol. Biol. Evol.* 2013, 30(12), Pp. 2725–2729.
192. Telenti A., Imboden P., Marchesi F., Lowrie D., Cole S., Colston M.J., Matter L., Schopfer K., Bodmer T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. // *Lancet.* 1993, 341(8846), Pp. 647–650.
193. Thibonnier M., Thiberge J.-M., De Reuse H. Trans-translation in *Helicobacter pylori*: essentiality of ribosome rescue and requirement of protein tagging for stress resistance and competence. // *PLoS ONE.* 2008, 3(11), Pp. e3810.
194. Traore H., Fissette K., Bastian I., Devleeschouwer M., Portaels F. Detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse countries by a commercial line probe assay as an initial indicator of multidrug resistance. // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2000, 4(5), Pp. 481–484.
195. Triccas J.A., Ryan A.A. Heterologous Expression of Genes in *Mycobacteria* //

- Mycobacteria Protocols Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. C. 243–253.
196. Udo H., Munozdorado J., Inouye M., Inouye S. MYXOCOCCUS-XANTHUS, A GRAM-NEGATIVE BACTERIUM, CONTAINS A TRANSMEMBRANE PROTEIN-SERINE THREONINE KINASE THAT BLOCKS THE SECRETION OF BETA-LACTAMASE BY PHOSPHORYLATION // *Genes Dev.* 1995, 9(8), Pp. 972–983.
197. Vannelli T.A., Dykman A., Ortiz de Montellano P.R. The antituberculosis drug ethionamide is activated by a flavoprotein monooxygenase. // *J. Biol. Chem.* 2002, 277(15), Pp. 12824–12829.
198. Vareldzis B.P., Grosset J., de Kantor I., Crofton J., Laszlo A., Felten M., Raviglione M.C., Kochi A. Drug-resistant tuberculosis: laboratory issues. World Health Organization recommendations. // *Tuber. Lung Dis.* 1994, 75(1), Pp. 1–7.
199. Velayati A.A., Farnia P., Masjedi M.R. The totally drug resistant tuberculosis (TDR-TB). // *Int J Clin Exp Med.* 2013, 6(4), Pp. 307–309.
200. Venkatesan A., Hassan S., Palaniyandi K., Narayanan S. In silico and experimental validation of protein-protein interactions between PknI and Rv2159c from *Mycobacterium tuberculosis*. // *J. Mol. Graph. Model.* 2015, 62, Pp. 283–293.
201. Verma J.S., Gupta Y., Nair D., Manzoor N., Rautela R.S., Rai A., Katoch V.M. Evaluation of gidB alterations responsible for streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. // *J Antimicrob Chemother.* 2014, 69(11), Pp. 2935–2941.
202. Vernon A., Burman W., Benator D., Khan A., Bozeman L. Acquired rifamycin monoresistance in patients with HIV-related tuberculosis treated with once-weekly rifapentine and isoniazid. Tuberculosis Trials Consortium. // *Lancet.* 1999, 353(9167), Pp. 1843–1847.
203. Wade M.M., Zhang Y. Anaerobic incubation conditions enhance pyrazinamide activity against *Mycobacterium tuberculosis*. // *J. Med. Microbiol.*

- 2004, 53(Pt 8), Pp. 769–773.
204. Walburger A., Koul A., Ferrari G., Nguyen L., Prescianotto-Baschong C., Huygen K., Klebl B., Thompson C., Bacher G., Pieters J. Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. // *Science*. 2004, 304(5678), Pp. 1800–1804.
205. Wan X., Zhang W., Li L., Xie Y., Li W., Huang N. A new target for an old drug: identifying mitoxantrone as a nanomolar inhibitor of PIM1 kinase via kinome-wide selectivity modeling. // *J. Med. Chem.* 2013, 56(6), Pp. 2619–2629.
206. Wehenkel A., Fernandez P., Bellinzoni M., Catherinot V., Barilone N., Labesse G., Jackson M., Alzari P.M. The structure of PknB in complex with mitoxantrone, an ATP-competitive inhibitor, suggests a mode of protein kinase regulation in mycobacteria. // *FEBS Lett.* 2006, 580(13), Pp. 3018–3022.
207. Willand N., Dirié B., Carette X., Bifani P., Singhal A., Desroses M., Leroux F., Willery E., Mathys V., Déprez-Poulain R., Delcroix G., Frénois F., Aumercier M., Locht C., Villeret V., Déprez B., Baulard A.R. Synthetic EthR inhibitors boost antituberculous activity of ethionamide. // *Nat. Med.* 2009, 15(5), Pp. 537–544.
208. Wolff K.A., Nguyen H.T., Cartabuke R.H., Singh A., Ogwang S., Nguyen L. Protein kinase G is required for intrinsic antibiotic resistance in mycobacteria. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009, 53(8), Pp. 3515–3519.
209. Wong S.Y., Lee J.S., Kwak H.K., Via L.E., Boshoff H.I.M., Barry C.E.3. Mutations in *gidB* confer low-level streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011, 55(6), Pp. 2515–2522.
210. World Health Organization. *Treatment of Tuberculosis*. Geneva, Switzerland: WHO, 2010.
211. World Health Organization. *Global tuberculosis report 2015*. Geneva, Switzerland: WHO, 2015.
212. Wu P., Clausen M.H., Nielsen T.E. Allosteric small-molecule kinase inhibitors. // *Pharmacol. Ther.* 2015, 156, Pp. 59–68.

213. Xu C., Kreiswirth B.N., Sreevatsan S., Musser J.M., Drlica K. Fluoroquinolone resistance associated with specific gyrase mutations in clinical isolates of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. // *J. Infect. Dis.* 1996, 174(5), Pp. 1127–1130.
214. Yang X.F., Kang C.M., Brody M.S., Price C.W. Opposing pairs of serine protein kinases and phosphatases transmit signals of environmental stress to activate a bacterial transcription factor // *Genes Dev.* 1996, 10(18), Pp. 2265–2275.
215. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. // *BMC Bioinformatics.* 2012, 13(1), Pp. 134.
216. Yeats C., Finn R.D., Bateman A. The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain. // *Trends Biochem. Sci.* 2002, 27(9), Pp. 438.
217. Zakharevich N.V., Osolodkin D.I., Artamonova I.I., Palyulin V.A., Zefirov N.S., Danilenko V.N. Signatures of the ATP-binding pocket as a basis for structural classification of the serine/threonine protein kinases of gram-positive bacteria. // *Proteins.* 2012, 80(5), Pp. 1363–1376.
218. Zhang J., Chung T., Oldenburg K. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. // *J Biomol Screen.* 1999, 4(2), Pp. 67–73.
219. Zhang J., Yang P.L., Gray N.S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors // *Nature Reviews Cancer.* 2009a, 9(1), Pp. 28–39.
220. Zhang N., Torrelles J.B., McNeil M.R., Escuyer V.E., Khoo K.-H., Brennan P.J., Chatterjee D. The Emb proteins of mycobacteria direct arabinosylation of lipoarabinomannan and arabinogalactan via an N-terminal recognition region and a C-terminal synthetic region. // *Mol. Microbiol.* 2003a, 50(1), Pp. 69–76.
221. Zhang S., Chen J., Shi W., Liu W., Zhang W., Zhang Y. Mutations in panD encoding aspartate decarboxylase are associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *Emerg Microbes Infect.* 2013, 2(6), Pp. e34.

222. Zhang Y., Chiu Chang K., Leung C.-C., Wai Yew W., Gicquel B., Fallows D., Kaplan G., Chaisson R.E., Zhang W. 'ZS-MDR-TB' versus 'ZR-MDR-TB': improving treatment of MDR-TB by identifying pyrazinamide susceptibility // *Emerg Microbes Infect.* 2012, 1(7), Pp. e5.
223. Zhang Y., Heym B., Allen B., Young D., Cole S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. // *Nature*. 1992, 358(6387), Pp. 591–593.
224. Zhang Y., Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2003b, 7(1), Pp. 6–21.
225. Zhang Y., Yew W.W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2009b, 13(11), Pp. 1320–1330.
226. Zheng J., He C., Singh V.K., Martin N.L., Jia Z. Crystal structure of a novel prokaryotic Ser/Thr kinase and its implication in the Cpx stress response pathway // *Mol. Microbiol.* 2007, 63(5), Pp. 1360–1371.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность зав. лаб. генетики микроорганизмов ИОГен РАН, д.б.н., проф. **Валерию Николаевичу Даниленко** и с.н.с. лаб. генетики микроорганизмов ИОГен РАН, к.б.н. **Ольге Борисовне Беккер** за наставничество и вдумчивое руководство работой.

Автор также выражает благодарность всему коллективу лаборатории генетики микроорганизмов за постоянную поддержку, а в частности:

Марии Георгиевне Алексеевой, Диларе Анваровне Мавлетовой и Людмиле Михайловне Князевой за помощь на разных стадиях выполнения работы;

Наталье Владимировне Захаревич за помощь в освоении биоинформатических методов;

Ксении Михайловне Климиной и Кириллу Владимировичу Шуру.

Автор благодарит н.с. лаборатории медицинской химии Химического Факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, к.х.н. **Дмитрия Ивановича Осолодкина** и коллектив Отдела Микробиологии Центрального Научно-Исследовательского Института Туберкулеза, в частности: зав. отделом, д.б.н., проф. **Ларису Николаевну Черноусову** и с.н.с., к.м.н. **Татьяну Геннадьевну Смирнову.**

Отдельно автор выражает благодарность зав. лаб. функциональной геномики ИОГен РАН, к.б.н. **Сергею Александровичу Брускину** и в.н.с. лаб. структуры и функции генов человека ИБХ РАН, д.б.н. **Татьяне Леодоровне Ажикиной** за ценные замечания, сделанные при рецензировании данной работы перед ее апробацией.