

ЗАХАРЕВИЧ Наталья Владимировна

**СЕРИН-ТРЕОНИНОВЫЕ ПРОТЕИНКИНАЗЫ
ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ: КЛАССИФИКАЦИЯ,
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА И ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ ФУНКЦИИ**

Специальность 03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2017

Работа выполнена в лаборатории генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор

ДАНИЛЕНКО Валерий Николаевич, заведующий лабораторией генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва.

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор

ПОРОЙКОВ Владимир Васильевич, заведующий отделом биоинформатики, Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», г. Москва

Доктор биологических наук, профессор

СИНЕОКИЙ Сергей Павлович, директор Национального биоресурсного центра – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ), Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» Министерства образования и науки Российской Федерации, г. Москва

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), г. Новосибирск

Защита состоится «__» _____ 2017 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 002.214.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru, тел. 8-499-135-14-31, aspirantura@vigg.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2017 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Синельщикова Т.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и разработанность темы исследования

Процессы фосфорилирования являются ключевыми механизмами регулирующими активность белка. Серин-треониновые протеинкиназы (СТПК) эукариотического типа являются одной из основных систем, участвующей в передаче сигналов у бактерий. На сегодняшний день полностью секвенировано огромное число бактериальных геномов, и СТПК эукариотического типа идентифицированы в большинстве из них. Особенно широко СТПК представлены у грамположительных бактерий, в частности у актинобактерий: у патогенных и не патогенных представителей родов – *Mycobacterium*, *Nocardia* и др., у почвенных обитателей – представителей рода *Streptomyces*, и у представителей комменсальной микробиоты кишечника человека и других животных – род *Bifidobacterium*. СТПК участвуют в регуляции многих аспектов жизнедеятельности бактерий, включая такие важные процессы как деление и рост клетки. Для некоторых бактериальных родов характерно наличие всего одного-двух генов СТПК, тогда как другие несут в своём геноме более 10 генов СТПК.

Существуют различные подходы по классификации СТПК, различающиеся областью своей применимости и вычислительной сложностью. При классификации СТПК чаще всего рассматривают область взаимодействия с АТФ, расположенную в N-концевой части киназы. В АТФ-связывающем кармане можно выделить более и менее консервативные участки, как функционально, так и структурно. Наименее информативными для классификации СТПК являются наиболее структурно и эволюционно консервативные области. В связи с этим, область связывания аденина, являющаяся функционально консервативной частью киназы, и одновременно с этим представляющая собой более структурно вариабельную область, по сравнению с областями связывания рибозы и фосфата, обратила на себя наше внимание при разработке классификации СТПК.

На настоящий момент, детально изучены и описаны СТПК патогенных микроорганизмов. Так, например, большое количество работ посвящено исследованию СТПК *M. tuberculosis*; и на настоящее время СТПК RknB из *M. tuberculosis* является одной из самых изученных киназ, в связи с чем зачастую она служит полезной моделью, для понимания и исследования других СТПК. О СТПК не патогенных, пробиотических бактерий, например таких как бифидобактерии, на момент начала нашего исследования ничего не было известно. В то же время бифидобактерии являются важнейшим компонентом микробиоты кишечника человека и играют важную роль в поддержании здоровья человека, а также оказывают выраженное иммуностимулирующее действие. Помимо этого, в настоящее время, во многих работах, ингибиторы СТПК рассматриваются в качестве многообещающих антимикробных агентов. Но, такие антимикробные агенты, должны быть избирательны: они должны эффективно убивать болезнетворные бактерии и быть безвредными для комменсальной микробиоты человека. В связи с этим, исследование СТПК пробиотических бактерий, в частности бифидобактерий, и создание классификации СТПК являются важными и актуальными задачами на сегодняшний день.

Цель работы

Целью настоящей работы является разработка нового подхода для классификации серин-треониновых протеинкиназ грамположительных бактерий, а также идентификация и характеристика СТПК рода *Bifidobacterium*.

Задачи:

1. Разработка функциональной структурной классификации СТПК грамположительных бактерий, на основе анализа области связывания аденина;
2. Поиск и характеристика СТПК из секвенированных в лаборатории геномов грамположительных бактерий (роды *Mycobacterium*, *Streptomyces* и *Bifidobacterium*);

сравнительный анализ идентифицированных СТПК с гомологами из белковой базы данных;

3. Идентификация и изучение структуры, локализации и предполагаемых функций СТПК бифидобактерий;
4. Изучение экспрессии и возможности автофосфорилирования у СТПК бифидобактерий.

Научная новизна

Проведена классификация СТПК грамположительных бактерий, в основе которой лежит анализ области связывания аденина. Идентифицированы, проанализированы и охарактеризованы шесть СТПК эукариотического типа у бифидобактерий (виды: *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. asteroides*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. longum*, *B. pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium* sp. 12_1_47BFAA), среди которых обнаружена видоспецифичная протеинкиназа (Pkb2), и уникальная протеинкиназа (Pkb4), характерная только для двух видов (*B. longum* и *B. bifidum*).

Теоретическая и практическая значимость

В последнее время огромное внимание уделяется изучению кишечной микробиоты, играющей ключевую роль в поддержании общего гомеостаза организма и здоровья человека, а также участвующей в становлении и поддержании иммунитета. В связи с этим, становится все более актуальным вопрос воздействия вновь создаваемых антибиотиков на нормальную микрофлору желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Учитывая, что в последние годы активно разрабатываются противомикробные препараты, мишенью которых являются СТПК патогенных бактерий, возникает очевидное требование: отсутствия их воздействия на СТПК пробиотической составляющей микробиоты. Таким образом, разработка новой структурно-функциональной классификации СТПК, а также углубленный анализ киназ пробиотических бактерий, в частности бифидобактерий, как ожидается, будут способствовать созданию оптимальных противомикробных агентов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработанная классификация СТПК эукариотического типа грамположительных бактерий позволяет разбить киназы на группы, в соответствии с физико-химическими характеристиками области связывания аденина.
2. Бифидобактерии содержат в своём геноме шесть генов СТПК, четыре из которых консервативные (*pkb1*, *pkb3*, *pkb5* и *pkb6*), один видоспецифичный (*pkb2*) и один ген (*pkb4*) уникальный, встречается только у видов *B. longum* и *B. bifidum*.
3. В клетках *E. coli* наблюдается экспрессия каталитических доменов всех шести генов СТПК штамма *B. longum* B379M.
4. В штамме *B. longum* B379M наблюдается экспрессия всех шести генов СТПК.
5. Видоспецифичная СТПК Pkb2 и консервативная СТПК Pkb5 обладают способностью к автофосфорилированию.

Степень достоверности и апробация результатов

По теме диссертации автором опубликовано 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, и в международных рецензируемых изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Основные результаты диссертационной работы были представлены на различных российских и международных конференциях, в том числе: на V Съезде Биохимиков России (Сочи-Дагомыс, октябрь 2016 г.), на 5-м Международном конгрессе Микробиом Человека (ИНС Конгресс, Люксембург, апрель 2015 г.), на 38-м конгрессе Федерации Европейских Биохимических Сообществ (38th FEBS Congress, Санкт-Петербург,

июль 2013 г.), на 5-м Конгрессе Европейских Микробиологов 2013 (FEMS Microbiology Congress, Лейпциг, июль 2013 г.), на Международной конференции «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (Новосибирск, июль 2013 г.), на II Международной Научно-Практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: геномика, протеомика, биоинформатика» (Новосибирск, ноябрь 2011 г.), на Международной конференции «Проблемы популяционной и общей генетики», посвященной памятной дате, 75-летию со дня рождения академика Ю.П. Алтухова (Москва, ноябрь 2011 г.), на Международной конференции «Moscow Conference on Computational Molecular Biology» (MCCMB'11, Москва, июль 2011 г.), на XVII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, апрель 2010 г.), на 2-й Интернациональном Конгрессе-Выставке Eurasia Bio-2010 по биотехнологии и биоэнергетике (Москва, апрель 2010 г.) и на Школе-конференции «Фундаментальная наука для биотехнологии и медицины-2010» (Москва, сентябрь 2010 г.).

Апробация диссертационной работы была проведена 23 декабря 2016 г. на межлабораторном семинаре ИОГен РАН.

Личный вклад автора в исследование

Автором лично выполнена подавляющая часть работы, а именно – планирование и осуществление биоинформатического анализа данных: все работы с последовательностями СТПК, в том числе, множественное выравнивание, построение филогенетических деревьев, анализ структуры СТПК, анализ расположения генов на хромосомной карте бифидобактерий, поиск ортологов генов по белковым базам данных, депонирование генов и геномов в международные базы данных. Автор принимал личное участие в анализе и интерпретации полученных результатов, а так же автор непосредственно принимал участие в конструировании праймеров и сборке полногеномных последовательностей двух геномов бифидобактерий (*B. longum* GT15 и *B. angulatum* GT102).

Работа с бифидобактериями, в том числе клонирование и изучение экспрессии, проводилась сотрудником лаборатории генетики микроорганизмов ИОГен РАН: с.н.с., к.б.н. Незаметдиновой В.З. Эксперименты по исследованию автофосфорилирования СТПК Pkb2 и Pkb5 проводились на базе Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, сотрудниками лаборатории генетики микроорганизмов ИОГен РАН: с.н.с., к.б.н. Мавлетовой Д.А. и м.н.с. Кошенко Т.А. Выделение белков СТПК Pkb2 и Pkb5 проводилось Алексеевой М.Г. Моделирование структур СТПК проводилось в лаборатории медицинской химии, Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, с.н.с., к.х.н. Осолодкиным Д.И.

Автор лично оформлял результаты для представления в виде тезисов и докладов на научных конференциях, а также принимал участие в написании статей по результатам работы.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из оглавления, введения, обзора литературы (пять глав), описания материалов и методов работы, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка используемых сокращений, словаря терминов, списка цитируемой литературы и восьми приложений. Работа изложена на 166 страницах машинописного текста, включает 7 таблиц и 20 рисунков. Список используемой литературы включает 215 публикаций.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

Раздел «Обзор литературы» состоит из пяти глав, описывающих: общую характеристику бактериальных СТПК эукариотического типа; структуру и предполагаемые

функции СТПК грамположительных бактерий; различные подходы по разработке классификации СТПК; происхождение, эволюцию и распространение бифидобактерий, а также описана возможная роль сигнал-передающих систем, в частности СТПК эукариотического типа, в адаптации к различным экологическим нишам у рода *Bifidobacterium*.

Материалы и методы

Штаммы бактерий и условия культивирования

В работе использовали: промышленный пробиотический штамм *Bifidobacterium longum* В379М, идентификационный номер штамма в коллекции ВКПМ: АС1249. Клонирование генов СТПК бифидобактерий проводили в штамме *E.coli* DH5a. Проверку экспрессии СТПК проводили в штамме *E.coli* BL21 (DE3). Для клонирования и экспрессии последовательностей использовали плазмидный вектор pET32a (Novagen).

Бифидобактерии выращивали на MRS-агаре (HiMedia, Индия) с добавлением цистеина (0,5 г/л) (HiMedia, Индия). Для выделения ДНК культуру бифидобактерий выращивали в *Bifidobacterium* Broth (HiMedia, Индия). Культивирование проводили в анаэробных условиях при температуре 37°C в течение 24-48 часов. Клетки осаждали на центрифуге Beckman J2-21(США).

Клетки *E. coli* культивировали на LB-агаре или в LB бульоне в течение ночи при температуре 37°C при постоянном встряхивании со скоростью 250 оборотов в минуту.

Выделение ДНК и РНК из клеток бифидобактерий

Выделение ДНК бифидобактерий проводили с использованием набора GenElute Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, США), в соответствии с протоколом производителя. Для выделения тотальной РНК штаммы бифидобактерий выращивали до середины логарифмической фазы роста ($OD_{600} = 0,6$). Далее клетки обрабатывали протектором РНК (RNA Protect Bacteria Reagent, QIAGEN, США), лизировали 10 минут в присутствии лизоцима (20 мг/мл) и мутанолизина (25 ед/мл) при 37°C. Затем клетки разрушали с помощью гомогенизатора Speed Mill plus (Analytik Jena AG, Германия) и обрабатывали тризолом и хлороформом. Далее препарат тотальной РНК очищали с помощью набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN, США).

Обратная транскрипция

Для обратной транскрипции использовали 50 нг тотальной РНК. Реакцию проводили при помощи обратной транскриптазы SuperScript III Reverse Transcriptase с использованием случайных гексануклеотидных праймеров [d(N)6] (*random hexamers*) (Invitrogen, США), по инструкции производителя.

Подбор праймеров и ПЦР

Праймеры для амплификации и клонирования каталитических доменов генов СТПК штамма *B. longum* В379М подбирали на основе нуклеотидной последовательности генов доступного и полностью секвенированного генома штамма *B. longum* DJO10A (GenBank № CP000605.1). Для возможности клонирования к 5'-концам праймеров присоединяли нуклеотидные последовательности, содержащие сайты рестрикции. Праймеры для ПЦР на обратных транскриптах (ОТ-ПЦР) подбирали к участку каталитического домена СТПК таким образом, чтобы размер амплификата составлял около 300 пн. В качестве контрольного гена для ОТ-ПЦР использовали ген *tuf*, кодирующий фактор элонгации Tu.

Амплификацию ДНК проводили с использованием набора реактивов «Амплификация» (Dialat Ltd., Москва, Россия) на приборе Терцик ТП4-ПЦР01 (ДНК-Технология, Россия). Реакционная смесь ПЦР для каждого гена (объем 25 мкл) содержала 50-75 нг геномной ДНК или к-ДНК и по 5 пкМ каждого из соответствующей пары праймеров, а также 1,25 мкл ДМСО и 2,0 мкл 50мМ MgCl₂. Условия амплификации

включали в себя: нагрев 5 минут при 95°C, затем 30 циклов – денатурация 1 минута при 94°C, отжиг 1 минута при 54-66°C (температура отжига подбиралась для каждой пары праймеров), достройка цепи 1 минута при 72°C, далее финальная достройка 5 минут при 72°C.

Процедуры молекулярного клонирования

ПЦР-продукты были очищены с помощью набора QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, США) или QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, США). Плазмидную ДНК из клеток *E. coli* выделяли с помощью GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Литва). Для рестрикции использовали ферменты *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*; для лигирования ДНК использовали T4 ДНК-лигазу фирмы Promega (США). Клонирование фрагментов генов СТПК (*pkb1-pkb6*) штамма *B. longum* B379М проводили в экспрессионном векторе pET32a (Novagen, США) и использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* DH5α. Отбор трансформантов, устойчивых к ампициллину, проводили на агаризованной среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и проверяли на наличие необходимой вставки при помощи ПЦР. Электрофорез проводили в 1% – 1,5% агарозном геле в TBE. В качестве маркеров длины фрагментов ДНК использовали маркеры молекулярной веса Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Литва) и Lambda DNA/*EcoRI* plus *HindIII* (Thermo Scientific, США). Секвенирование рекомбинантных плазмид (pET32a:*pkb1*- pET32a:*pkb6*), содержащих фрагменты генов СТПК из *B. longum* B379М, проводили с использованием стандартных праймеров S-Tag и T7 terminator по методу Сэнгера. Полученные нуклеотидные последовательности каталитических доменов СТПК были депонированы в базу данных GenBank (NCBI): *pkb1* (KC222862), *pkb2* (KC222863), *pkb3* (KC222864), *pkb4* (KC222865), *pkb5* (KC222866), *pkb6* (KC222867).

Изучение экспрессии белков в клетках *E. coli*

Клетки *E. coli* BL21 (DE3) трансформировали полученными гибридными плазмидами. Клоны, содержащие сконструированные плазмиды, выращивали в 3 мл жидкой среды LB, содержащей ампициллин (100 мг/мл) при 34°C и 250 оборотах 1,5 часа, затем индуцировали экспрессию каталитического домена СТПК с добавлением индуктора ИПТГ до финальной концентрации 1 mM. Далее проводили культивирование при 28°C в течение 4 часов. Полученную биомассу ресуспендировали в буфере, а затем клетки разрушали кипячением в течение 10 мин. В лунки геля вносили по 20 мкл лизата. В качестве контроля использовали лизат штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащего вектор pET32a без вставки. Электрофорез белковых фракций проводили в ПААГ и использовали маркеры молекулярного веса Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas, Литва).

Выделение и очистка белков

Клетки *E. coli* BL21 (DE3), содержащие гибридные плазмиды pET32a:*pkb5* и pET32a:*pkb2*, выращивали в 250 мл жидкой среды TB при 37°C и 250 оборотах в минуту до OD₆₀₀ = 0,6-0,8, затем индуцировали экспрессию каталитических доменов СТПК добавлением ИПТГ до финальной концентрации 0,5 mM. Далее клетки культивировали при 26-28°C в течение 16-18 ч, центрифугировали и хранили при -20°C. Для выделения и очистки белков использовали Ni-NTA Fast StartKit (Qiagen, США). Протеинкиназы Pkb5 и Pkb2 были очищены в денатурирующих условиях. Рефолдинг белков проводили путём ступенчатого диализа с 3 M и 1,5 M мочевиной. Для концентрирования белка путём ультрафильтрации были использованы одноразовые ультрафильтрационные концентраторы Amicon® Ultra 30K (Merck Millipore Ltd., Германия). Фракции белков анализировали с помощью Ds-Na-ПААГ-электрофореза. Для выделенных белков проводили масс-спектрометрический анализ в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН). Идентификацию белков проводили с использованием Mascot (Matrix Science Inc., URL: <http://www.matrixscience.com>).

Автофосфорилирование киназ

Реакцию автофосфорилирования протеинкиназ Pkb2 и Pkb5 проводили в течение 30 мин при 37°C в 20 мкл буфера (25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 1 mM ДТТ, 1 mM ЭДТА, 1 mM ФМСФ). Реакцию начинали добавлением АТФ до конечной концентрации 10 мкМ в присутствии 1 мкг белка протеинкиназы. Реакцию останавливали добавлением Ds-Na-ПААГ-буфера для образцов. Образцы анализировали электрофоретически в 12,5% Ds-Na-ПААГ. Для автордиографии гели фиксировали в 50%-ной ТХУ, окрашивали 0,1% Кумасси R250 и экспонировали с рентгеновской пленкой. Проверка автофосфорилирования при помощи люминесцентной реакции проводилась с помощью Kinase-Glo[®] Plus Luminescent Kinase Assay Platform (Promega, США). По данным люминесценции (активность протеинкиназы обратно пропорциональна интенсивности сигнала люминесценции) рассчитывали зависимость процента оставшейся в ходе реакции АТФ от количества внесённой протеинкиназы. Статистический параметр, Z'-фактор был использован в качестве меры качества анализа ($Z' = 1 - 3 \times \text{SSD}/R$). Значение Z'-фактора > 0,75 рассматривалось как статистически достоверное.

Геномы грамположительных бактерий и их СТПК

Для классификации и моделирования структуры СТПК эукариотического типа различных грамположительных бактерий, из базы данных GenBank (NCBI) были отобраны геномы 100 штаммов грамположительных бактерий, принадлежащих 88 различным видам, и 15 родам. Аминокислотные последовательности 471 СТПК были извлечены из выбранных геномов, и были идентифицированы их каталитические домены. Все идентифицированные последовательности были проверены на наличие «хэнковских доменов».

Множественное выравнивание и филогенетический анализ СТПК грамположительных бактерий

Исследуемый набор из 471 последовательности СТПК, для удобства анализа, был сокращён с использованием следующего критерия: 70% идентичности последовательностей. Результирующий набор из 219 последовательностей был использован для построения филогенетического дерева. Множественное выравнивание 219 последовательностей было выполнено с использованием алгоритма ClustalX. Филогенетическое дерево было построено с помощью пакета программ MEGA 4, используя следующие параметры: метод присоединения соседей (Neighbor joining, NJ), модель p-distance.

Моделирование белковых структур СТПК грамположительных бактерий

Моделирование структур СТПК проводилось с помощью программы Modeller 9v7. В качестве шаблонов были использованы структуры PknB и PknG *M. tuberculosis* (коды доступа в банке данных PDB: 1O6Y, 1MRU, 2FUM, 3F61, 3F69 и 2PZI). Все модели имели хорошее стереохимическое качество: оценивали качество карты Рамачандрана с помощью программы PROCHECK и качество укладки белка с помощью программы ProSA. Параметры качества: не более 3% остатков в условно разрешённых и запрещённых областях карты Рамачандрана и z-score < -5.

Определение нуклеотидной последовательности геномов

Для проведения секвенирования 10 геномов грамположительных бактерий была использована платформа 454 GS Junior (Roche, Швейцария) (Таблица 1). Секвенирование и пробоподготовка были проведены в соответствии с рекомендациями производителя и с использованием соответствующих реагентов. Сборка отдельных прочтений фрагментов ДНК в контиги проводилась с помощью программного обеспечения 454 GS De Novo Assembler версии 3.0. Для двух геномов было проведено полногеномное секвенирование (Таблица 1). Порядок контигов определяли с помощью программы Mauve версия 2.3.1, а также используя 454ContigGraph – текстовый файл получаемый на выходе с секвенатора. Контиги соединяли

следующим образом: на конец каждого контига подбирались праймеры (праймеры были синтезированы фирмой Синтол (Россия)), проводилась ПЦР, и ПЦР продукты секвенировали по методу Сэнгера. Все геномы были депонированы в базу данных GenBank (NCBI) (Таблица 1) и автоматически аннотированы при помощи NCBI Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (PGAAP).

Таблица 1. Штаммы грамположительных бактерий, секвенированные в лаборатории

№	Штамм	Кол-во СТПК	Номер в базе данных NCBI	Уровень сборки	Публикация
Mycobacterium					
1.	M. tuberculosis E186hv	11	JXAW000000000	КОНТИГИ	Shur et al., 2015
2.	M. tuberculosis B9741	11	LVJJ000000000	КОНТИГИ	Shur et al., 2016
3.	M. tuberculosis 13-3935	11	JTLP000000000	КОНТИГИ	Maslov et al., 2015
4.	M. tuberculosis 13-2459	11	LDNL000000000	КОНТИГИ	
5.	M. tuberculosis 13-4152	11	LAVG000000000	КОНТИГИ	
Streptomyces					
1.	S. fradiae ATCC19609	28	JNAD000000000	КОНТИГИ	Bekker et al., 2014
Bifidobacterium					
1.	B. adolescentis Km4	5	MAXD000000000	КОНТИГИ	Dyachkova et al., 2015
2.	B. adolescentis 150	5	LBHQ000000000	КОНТИГИ	
3.	B. angulatum 102	5	CP014241	полногеномная сборка	
4.	B. longum GT15	6	CP006741	полногеномная сборка	
Zakharevich et al., 2014; Zakharevich et al., 2015					

Биоинформатический анализ СТПК бифидобактерий

Для анализа бифидобактериальных СТПК из базы данных GenBank (NCBI), было отобрано 48 штаммов бифидобактерий из 11 видов: *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. asteroides*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. longum*, *B. pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium* sp. 12_1_47BFAA. Поиск и идентификацию СТПК бифидобактерий проводили с использованием базы данных GenBank (NCBI) и программы BLAST. Все найденные нами СТПК, проверялись на наличие «хэнковских доменов». У каждой СТПК был выделен каталитический домен. Множественное и парное выравнивание каталитических доменов СТПК проводилось с помощью программ ClustalW и ClustalOmega. Филогенетические деревья для бифидобактерий были построены с помощью пакета программ MEGA 4 методом присоединения соседей (NJ), используя модель p-distance. Приведённые в работе проценты идентичности рассчитывались по программе BLAST.

Результаты и обсуждение

Классификация СТПК грамположительных бактерий

Анализ последовательностей и структур СТПК грамположительных бактерий

На первом этапе работы были проанализированы последовательности СТПК грамположительных бактерий. Как уже упоминалось выше, характерные для эукариотических киназ высоко консервативные аминокислотные остатки остаются практически неизменными и в бактериальных киназах. Несмотря на это, некоторые бактериальные СТПК несут замены в консервативных для эукариотических киназ позициях. Такие киназы, как правило, уникальны и могут быть нефункциональны из-за этих замен. Но, существует ряд бактериальных СТПК, у которых замены в консервативных для эукариотических киназ позициях – не влияют на функциональность этих киназ. Часть такого рода замен, обратили на себя наше внимание, так как они могут быть использованы для создания функциональной классификации. Помимо анализа замен в консервативных позициях, при анализе последовательностей каталитических доменов бактериальных СТПК, наше внимание привлёк V субдомен, для которого ранее не было описано какого-либо консервативного мотива. Действительно, эта область каталитического домена более

вариабельна, по сравнению с другими субдоменами. Однако, в V субдомене расположены аминокислотные остатки, участвующие в катализе и входящие в состав шарнирного участка, соединяющего две доли каталитического домена – меняя ориентацию каталитического и белок-связывающего участков, можно регулировать активность СТПК. В связи с чем, V субдомен, и, в частности, последовательность относящаяся к шарнирному участку, могут быть интересны при создании функциональной классификации СТПК. Также, при анализе множественного выравнивания СТПК грамположительных бактерий нами был найден ряд консервативных остатков и мотивов характерных только для бактериальных СТПК. К сожалению, такие довольно консервативные остатки интересны в эволюционном плане, но они не информативны при разработке классификации.

На втором этапе работы, проводился визуальный анализ структур СТПК. Так, в доступных структурах СТПК *M. tuberculosis* (банк данных PDB) путём визуального анализа были идентифицированы аминокислотные остатки, взаимодействующие с АТФ (особое внимание уделялось области связывания аденина – как более структурно вариабельной области, по сравнению с областями связывания фосфата и рибозы). Консервативные для всех структур аминокислотные остатки и остатки, вносящие вклад в связывание АТФ только атомами своей основной цепи не были включены в рассмотрение, так как вклад этих остатков в форму и свойства аденин-связывающего кармана практически одинаков и они предоставляют мало информации для классификации.

По результатам анализа множественного выравнивания и структур СТПК, для классификации бактериальных СТПК было отобрано девять вариабельных аминокислотных остатков, боковые цепи которых экспонированы в область связывания аденина: Leu17, Val25, Ala38, Val72, Met92, Tyr94, Val95, Met145 и Met155 (остатки пронумерованы в соответствии с СТПК PknB *M. tuberculosis*, если не указано иное) (Рис. 1).

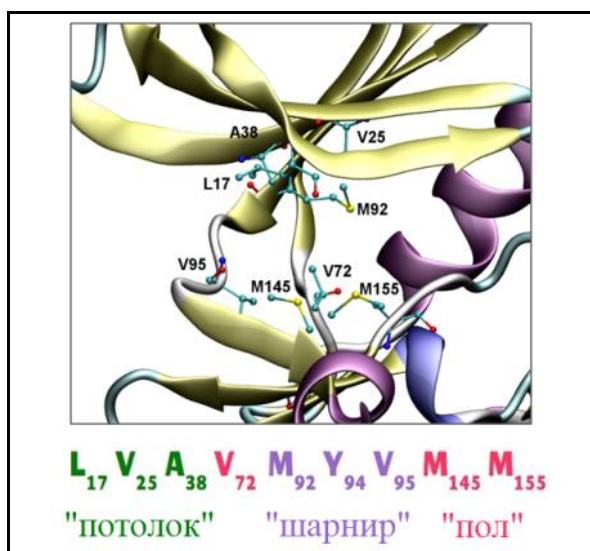


Рисунок 1. Схематичное изображение области связывания аденина. На рисунке подписаны аминокислотные остатки составляющие сигнатуру (остаток Tyr94 на рисунке не виден).

Первые три остатка расположены в глициновой петле (остатки 17-38, субдомен I) и формируют «потолок» аденин-связывающего кармана; остатки Val72, Met145 и Met155 формируют «пол» аденин-связывающего кармана. Последовательность шарнира состоит из остатков 92-96 (Met92 является остатком-«привратником» – *gatekeeper*), но остатки 93 и 96 участвуют в связывании лиганда только атомами главной цепи, вследствие чего были исключены из рассмотрения. Консервативность рассматриваемых сигнатурных остатков различна. Наиболее консервативными являются остатки Val25 и Ala38; наряду с остатком Met в позиции 92 часто встречается остаток Thr. Положение 17, как правило, занимают остатки Leu или Ile. В положении 145 присутствуют исключительно остатки Leu, Ile, Met или

Val. Остальные позиции сигнатуры более изменчивы. В дальнейшем набор из выбранных 9 аминокислотных остатков будет именоваться нами – сигнатурой аденин-связывающего кармана.

Создание и описание классификации

На основе анализа физико-химических свойств 9 аминокислотных остатков, составляющих сигнатуру, была проведена классификация СТПК грамположительных бактерий и все исследуемые СТПК (471 последовательность) были разделены на 20 групп (Таблица 2). Каждая группа содержит более одной киназы. Большие группы (с I по V) состоят по меньшей мере из 10 представителей. После разделения СТПК по группам осталось 49 последовательностей с уникальными сигнатурами, появляющимися только один раз в исследуемом подмножестве последовательностей. Все они были занесены в отдельную группу уникальных киназ (Таблица 2).

Таблица 2. Основные характеристики 20 групп СТПК грамположительных бактерий

Группа	Кол-во СТПК	Сигнатура ¹	Роды бактерий
I	153		<i>Streptomyces, Mycobacterium, Bifidobacterium, Actinomyces, Bacillus, Lactobacillus, Streptococcus, Nocardia, Frankia, Corynebacterium, Saccharopolyspora, Clostridium, Rhodococcus</i>
II (a,b)	138		<i>Streptomyces, Mycobacterium, Bifidobacterium, Actinomyces, Bacillus, Lactobacillus, Staphylococcus, Nocardia, Rhodococcus, Thermobifida, Clostridium, Corynebacterium, Saccharopolyspora</i>
III	37		<i>Streptomyces, Frankia, Nocardia, Actinomyces</i>
IV	22		<i>Streptomyces, Mycobacterium, Frankia, Nocardia, Corynebacterium, Rhodococcus</i>
V	18		<i>Bifidobacterium</i>
VI	9		<i>Bifidobacterium</i>
VII	9		<i>Mycobacterium, Rhodococcus</i>
VIII (a,b)	7		<i>Mycobacterium, Nocardia, Actinomyces</i>
IX	5		<i>Bifidobacterium</i>
X	5		<i>Staphylococcus</i>
XI	5		<i>Bifidobacterium</i>
XII	4		<i>Mycobacterium</i>
XIII	4		<i>Lactobacillus</i>
XIV	3		<i>Streptomyces</i>
XV	3		<i>Rhodococcus</i>
XVI	2		<i>Bifidobacterium</i>
XVII	2		<i>Saccharopolyspora, Thermobifida</i>
XVIII	2		<i>Bacillus</i>
XIX	2		<i>Mycobacterium</i>
XX	2		<i>Frankia</i>
Уникальные	49		<i>Streptomyces, Bacillus, Saccharopolyspora, Rhodococcus, Thermobifida, Clostridium, Bifidobacterium, Frankia, Corynebacterium, Mycobacterium</i>

¹В данной таблице цвета не несут смысловой нагрузки, а выбраны таким образом, чтобы подпись была читаемой. Изображения сигнатур созданы с помощью программы WebLogo (URL: <http://weblogo.berkeley.edu/>).

Главным критерием группировки было наличие специфичной комбинации доноров/акцепторов водородной связи и ароматических остатков в конкретных положениях сигнатуры аденин-связывающего кармана.

Как и последовательности СТПК, бактериальные рода и виды могут быть разделены на группы, в соответствии с предложенной классификацией. Можно предположить, что киназы, характеризующиеся одной и той же сигнатурой, а следовательно относящиеся к одной группе, будут ингибироваться одинаковыми низкомолекулярными соединениями, которые в свою очередь, могут рассматриваться в качестве антибактериальных соединений. Таким образом, практическим применением классификации может стать разработка селективных ингибиторов СТПК, которые будучи направленными на ингибирование СТПК из одной группы не будут взаимодействовать (или будут слабо взаимодействовать) с СТПК из другой группы; следовательно, такие низкомолекулярные ингибиторы, взаимодействующие с СТПК принадлежащими группе содержащей только патогенные микроорганизмы (например, группы VII, X, XII XVIII и XIX), не будут затрагивать СТПК пробиотических бактерий, характеризующихся иной сигнатурой и принадлежащих к другим группам (V, VI, IX, XI, XIII, XVI). Возможности практического применения разработанной классификации описаны далее.

Сравнение результатов классификации с филогенетическим анализом СТПК грамположительных бактерий

В работе было проведено сравнение распределения СТПК, основанного на предлагаемой нами классификации, с распределением киназ по кладам филогенетического дерева, построенного на основе выравнивания каталитических доменов протеинкиназ (Рис. 2).

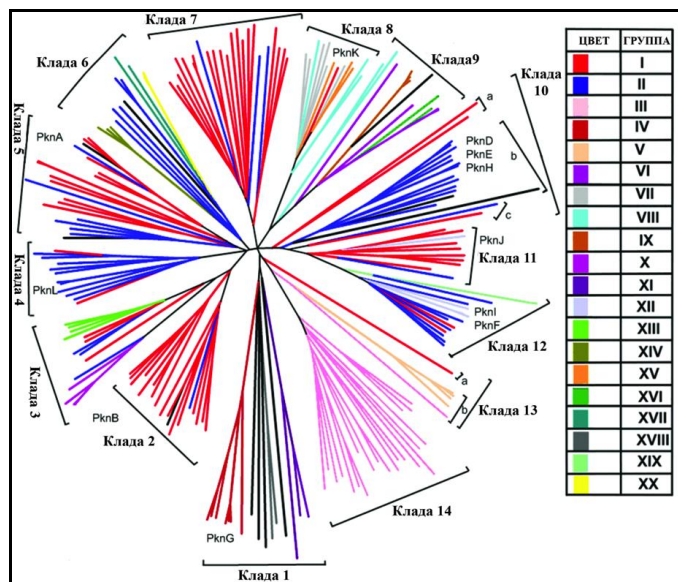


Рисунок 2. Филогенетическое дерево, основанное на выравнивании 219 последовательностей каталитических доменов СТПК грамположительных бактерий. Дерево окрашено в соответствии с распределением СТПК по группам. Цветовой код для групп дан на правой панели. На дереве обозначено расположение СТПК микобактерий. Чёрным цветом на рисунке обозначены киназы обладающие уникальными сигнатурами (Таблица 2).

Клады филогенетического дерева были сопоставлены с группами, основанными на классификации по физико-химическим свойствам аденин-связывающего кармана. Как видно из Рис. 2, в большинстве случаев, разделение по группам не идентично с разделением по

кладам (единственным исключением является клада 14, состоящая целиком из представителей III группы) – из чего можно сделать вывод, что предлагаемая классификация и филогенетический анализ могут только дополнять друг друга при анализе результатов.

Моделирование пространственной структуры СТПК грамположительных бактерий

В ходе работы были построены молекулярные модели для типичных представителей СТПК из каждой группы. Это было сделано для оценки влияния аминокислотных остатков, формирующих сигнатуру, на свойства области взаимодействия СТПК с адениновым фрагментом АТФ. В моделях подтверждены все особенности полученных 20 групп, что демонстрирует применимость проведенного анализа и правильность выдвинутых гипотез. Моделирование было выполнено к.х.н. Осолодкиным Д.И.

Поиск и сравнительный анализ СТПК из секвенированных геномов грамположительных бактерий (представителей родов *Mycobacterium*, *Streptomyces* и *Bifidobacterium*)

В ходе данной работы был произведен сравнительный анализ СТПК из секвенированных в лаборатории геномов грамположительных бактерий с гомологами из базы данных GenBank (NCBI). В пяти геномах *Mycobacterium tuberculosis*, секвенированных в лаборатории, было идентифицировано по 11 генов СТПК, такое число этих ферментов характерно для геномов этого вида. Ортологи всех одиннадцати СТПК присутствуют также у вида *M. bovis*; для вида *M. smegmatis* характерно наличие 13 СТПК, девять из которых гомологичны рассматриваемым 11 генам СТПК *M. tuberculosis*. В отличие от трёх перечисленных видов микобактерий, геном сильно редуцированного вида *M. leprae* обладают лишь 4 СТПК из 11. Эти четыре СТПК встречаются в геномах всех микобактерий.

В геноме *Streptomyces fradiae* ATCC19609 нами было найдено 28 генов СТПК эукариотического типа. Ортологи для 20 из них были найдены нами среди 34 СТПК *Streptomyces coelicolor* и 32 СТПК *Streptomyces lividans*. Из литературы известно, что *M. tuberculosis* имеет с *S. coelicolor* только одну пару практически идентичных генов СТПК, это PknB из *M. tuberculosis* и PK14 из *S. coelicolor*. Среди 28 генов СТПК, найденных у *S. fradiae*, был обнаружен ортолог гена *pknB* – это киназа SFRA_16920; геном *S. lividans* также содержит ортолога этого гена.

Также был произведен поиск СТПК у ещё одного представителя типа *Actinobacteria* – у бифидобактерий. В лаборатории были секвенированы геномы трёх видов: *B. adolescentis*, *B. angulatum* и *B. longum* (Таблица 1). В двух из трёх секвенированных видов (*B. adolescentis* и *B. angulatum*) было идентифицировано по 5 генов СТПК, а в геноме *B. longum* GT15 было идентифицировано 6 генов СТПК, 5 из которых были гомологичны киназам из вышеперечисленных видов. До настоящей работы, как уже упоминалось выше, о СТПК эукариотического типа у бифидобактерий ничего не было известно, в связи с этим подробный анализ СТПК бифидобактерий был проведён нами в рамках этой работы и он подробно описан в следующем разделе («Анализ СТПК бифидобактерий»). В геномах бифидобактерий был также обнаружен ортолог гена *pknB* *M. tuberculosis*.

Стоит отметить, что даже близкородственные организмы, например различные виды одного рода, могут содержать различные наборы генов СТПК. Внутри рода могут быть как общие для всех видов СТПК, так и уникальные, принадлежащие отдельным видам внутри рода. По-видимому, СТПК, будучи вовлеченными в сигнальные сети, эволюционируют по видоспецифичному пути, чтобы удовлетворить индивидуальные потребности в образе жизни у различных видов.

Возможности практического применения созданной классификации при разработке селективных ингибиторов протеинкиназ

Разработанная классификация, в основе которой лежит сигнатура из 9 аминокислотных остатков, предоставляет нам возможность применения нового, более осознанного подхода по выбору биомишеней для ингибирования среди бактериальных СТПК эукариотического типа. Предлагаемую классификацию можно применять для отбора веществ, при разработке селективных ингибиторов СТПК.

Анализ распределения протеинкиназ по 20 группам, согласно классификации, позволил нам выделить такие группы СТПК, при ингибировании которых селективными ингибиторами будут затрагиваться киназы лишь патогенных микроорганизмов, а киназы непатогенных для организма человека бактерий не будут взаимодействовать (либо будут очень слабо взаимодействовать) с такими селективными ингибиторами.

Сходство каталитических доменов бактериальных и человеческих протеинкиназ составляет около 30%, что может приводить к неселективному ингибированию человеческих киназ; в связи с чем, для возможности практического применения классификации помимо сигнатур бактериальных СТПК нам нужно знать сигнатуры человеческих киназ. Для этого было отобрано 324 человеческих киназы из 516, представленных на сайте Kinase.com (URL: <http://kinase.com/human/kinome/>). Критерием отбора служило наличие «хэнковских доменов» у исследуемых киназ. Для всех человеческих киназ была определена сигнатура из 9 интересующих нас аминокислотных остатков. На основании определенных сигнатур человеческие киназы были распределены на группы, согласно разработанной классификации (Рис. 3).

В результате анализа сигнатур СТПК из трех источников: 1) СТПК принадлежащие патогенным микроорганизмам; 2) СТПК принадлежащие микроорганизмам, являющихся комменсалами микробиоты человека; 3) протеинкиназы человека, – была построена диаграмма Венна (Рис. 3).

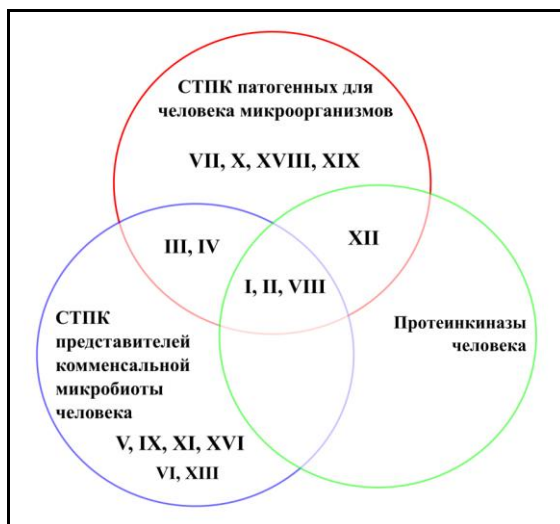


Рисунок 3. Диаграмма Венна, демонстрирующая различия в распределении по группам СТПК из трёх источников: из патогенных микроорганизмов; из микроорганизмов, представителей комменсальной микробиоты человека; из человека. Римскими цифрами указаны группы, согласно разработанной классификации. Группы XIV, XV, XVII и XX отсутствуют на полученной диаграмме по двум причинам: во-первых, микроорганизмы, относящиеся к этим группам не являются ни патогенами, ни представителями комменсальной микробиоты человека (в основном это почвенные бактерии, способные продуцировать антибиотики); во-вторых, не было обнаружено сходства между сигнатурами СТПК из четырех перечисленных групп и сигнатурами протеинкиназ человека.

Исходя из построенной диаграммы видно, что при разработке селективных ингибиторов СТПК патогенных микроорганизмов, можно рекомендовать, в первую очередь,

обратить внимание на киназы попавшие в следующие 4 группы: VII, X, XVIII, XIX (Таблица 3), так как в этом случае вероятность того, что будут затронуты киназы человека или комменсальных для него бактерий минимальна, что следует из результатов проведенного анализа и разработанной классификации. Стоит обратить внимание, что речь идет о селективных, АТФ-конкурентных ингибиторах.

Таблица 3. Характеристика четырех групп, сигнатуры которых характерны исключительно для патогенных микроорганизмов.

Группа	СТПК	Сигнатура	Род (вид)	Заболевания
VII*, XIX	PknK, PknI	[IV]VAVMYHLT, LSVVMYIVK	<i>Mycobacterium</i> (<i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. marinum</i> <i>M. ulcerans</i>)	туберкулёз, язвы Бурули, аквариумная гранулёма, различные оппортунистические инфекции
X	Stk (PknB)	LVAVMYILF	<i>Staphylococcus</i> (<i>S. aureus</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. epidermidis</i>)	эндокардит, сепсис, перитонит, абсцессы, различные кожные инфекции
XVIII	YbdM	ITVPMYML [IV]	<i>Bacillus</i> (<i>B. weihenstephanensis</i> <i>B. cytotoxicus</i>)	пищевое отравление (диарея)

* В группу VII также входят СТПК бактерий принадлежащих роду *Rhodococcus*, данный род не указан в таблице в связи с тем, что относящиеся к нему микроорганизмы не являются патогенными, и одновременно не относятся к микроорганизмам составляющим комменсальную микробиоту человека.

Анализ СТПК бифидобактерий

В первой части работы была разработана функциональная классификация СТПК грамположительных бактерий. На основе сигнатуры сформированной из 9 аминокислотных остатков, бактериальные СТПК были разбиты на 20 групп (также были выделены киназы с уникальными сигнатурами). Почти 80% последовательностей СТПК попало в большие группы, характеризующиеся сходными сайтами связывания АТФ. В то же время, некоторые группы оказались родоспецифичными, так например, группы V, VI, IX, XI и XVI представлены исключительно СТПК бифидобактерий. До этого исследования, СТПК эукариотического типа у бифидобактерий не были ни идентифицированы, ни классифицированы. В связи с этим, вторая часть работы посвящена анализу СТПК рода *Bifidobacterium*.

Идентификация, характеристика и доменная организация СТПК бифидобактерий

Для изучения СТПК бифидобактерий из геномной базы данных, доступной на сайте NCBI, были извлечены последовательности 48 бифидобактериальных геномов, принадлежащих 11 видам бифидобактерий. В отобранных геномах были *in silico* идентифицированы гены, кодирующие СТПК. Всего было обнаружено и взято для анализа 261 последовательность СТПК.

В результате анализа было установлено, что все рассматриваемые геномы бифидобактерий имеют в своём составе пять или шесть генов СТПК эукариотического типа. Поскольку единой номенклатуры СТПК бифидобактерий на момент исследования не существовало, было предложено назвать их Pkb1, Pkb2, Pkb3, Pkb4, Pkb5, Pkb6 (где аббревиатура «Pkb» означает – *protein kinase bifidobacteria*). Гены *pkb1*, *pkb2*, *pkb3*, *pkb5* и *pkb6* присутствуют во всех геномах бифидобактерий. Ген *pkb4* встречается только у видов *B. longum* и *B. bifidum*, а также у штамма *B. breve* UCC2003.

Общая доменная организация СТПК бифидобактерий представлена на Рис. 4. Каждая СТПК в N-концевой части белка имеет каталитический домен. СТПК Pkb1 и Pkb5 содержат соответственно три и четыре PASTA-домена на C-концевом участке белка (Рис. 4). Другие регуляторные домены на C-концевых участках протеинкиназ обнаружены не были.

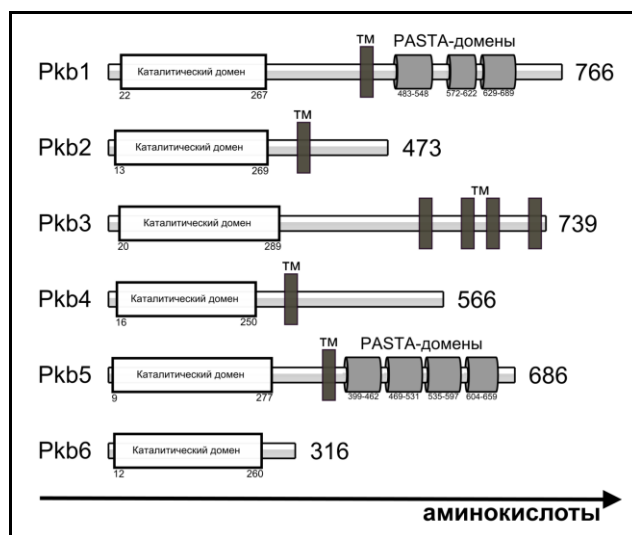


Рисунок 4. Доменная организация СТПК бифидобактерий. Аббревиатурой ТМ – обозначены трансмембранные домены.

Множественное выравнивание и анализ аминокислотных последовательностей СТПК бифидобактерий

Для анализа СТПК бифидобактерий было выполнено выравнивание аминокислотных последовательностей каталитических доменов киназ с консенсусной последовательностью каталитического домена эукариотической СТПК. Результаты выравнивания представлены в Таблице 3. Интересен тот факт, что наиболее вариабельными являются «хэнковские мотивы» протеинкиназы Pkb2 (Таблица 4).

Таблица 4. Таблица сравнения консервативных «хэнковских мотивов» с аналогичными мотивами в шести бифидобактериальных СТПК. Высоко консервативные аминокислотные остатки в каждом мотиве выделены жирным шрифтом («х» – любая аминокислота).

С Т П К	Консервативные субдомены эукариотических киназ											
	I LGxGxxGxV	II AxKxL	III E	IV L	V	VIa TxxyL	VIb YxDLxxxNL	VII VxDFG	VIII TxxyxAPE	IX DxWAxGV	X x	XI L-10x-R
Pkb1	I AxGxxAxV	AxKxM	E	I / V		GxxSA / AA	HxDIxxxNI	IxDFG	TxxYxAPE / PPE	DxYS / AxGI		I / L / V-10x-R
Pkb2	LG / IGxGxxAxV	AxKxS / G / A	E / N	I		AxxTA / AV / CA	HxDI / VxxxNI / NV / NF	LxDFG	S / TxxWxAPE / PPE	DxYSxAA / GA		L-10x-R
Pkb3	LGxGxxGxV	AxKxL	E	V		AxxAV	HxDIxxxNV / NI	LxDFG	TxxFxAPE	DxWSxAS / SS		F-10x-R
Pkb4	L AxGxxGxT	RxKxI	Q	V		AxxEL	HxDIxxxNV / NI	LxDFG	TxxFxSPE	DxFS / SxGR		I-10x-R
Pkb5	IG / VGxGxxAxV	AxKxM	E	I		AxxYS	HxDIxxxNI	VxDFG	TxxYxSPE	DxYSxGC		C-10x-R
Pkb6	L AxGxxGxV	AxKxL	E	I		GxxVA / AI	HxDVxxxNI	IxDFG	TxxYxSPE	DxYSxGV / GI		V-10x-R

Филогенетический анализ СТПК бифидобактерий

Для филогенетического анализа СТПК бифидобактерий было построено видовое (на примере вида *B. longum*) и родовое дерево (Рис. 5). Построенное видовое дерево

демонстрирует четкое деление СТПК вида *B. longum* на шесть кластеров, соответствующих шести генам протеинкиназ. Процент идентичности между протеинкиназами из разных геномов данного вида внутри кластера высок: 90-100%; между кластерами сходство составляет всего 30-33%. Эта закономерность сохраняется и для других видов бифидобактерий. Для выяснения степени сходства СТПК между разными видами внутри рода *Bifidobacterium*, было построено родовое дерево. Внутривидовое сходство последовательностей, принадлежащих одному кластеру, всегда выше, чем между последовательностями из разных видов (это видно по группировке ветвей в кластерах на Рис. 5), в связи с этим проценты идентичности внутри кластера, содержащего разные виды, указывают на процент идентичности между протеинкиназами из разных видов. Построенное родовое дерево не только подтверждает существование шести генов СТПК у бактерий рода *Bifidobacterium*, но и позволяет разделить их на три группы: консервативные (*pkb1*, *pkb3*, *pkb5*, *pkb6*), видоспецифичные (*pkb2*) и уникальные (*pkb4*).

Протеинкиназы Pkb5 и Pkb6 внутри своих кластеров имеют наибольшие значения идентичности между протеинкиназами, принадлежащим разным видам: от 70 до 96%. Значения идентичности между СТПК разных видов внутри кластера, относящегося к протеинкиназе Pkb1, составляют 80-95%. В кластере, соответствующем киназе Pkb3, идентичность между протеинкиназами различных видов несколько ниже: от 70 до 90%. СТПК Pkb2 существенно отличается от описанных выше консервативных протеинкиназ. Сходство между протеинкиназами из разных видов внутри кластера СТПК Pkb2 низкое, процент идентичности составляет всего 47-70%. При этом, внутри видов у разных штаммов аминокислотные и нуклеотидные последовательности каталитических доменов Pkb2 практически идентичны (98-100%). Описанные свойства позволяют позиционировать Pkb2 как видоспецифичную протеинкиназу. Видно четкое разделение данной киназы по видам на филогенетическом дереве (Рис. 5). Уникальная протеинкиназа Pkb4, характерна только для двух видов: *B. longum* и *B. bifidum*, а также для штамма *B. breve* UCC2003. В связи с этим, ветвь дерева, на которой расположена данная протеинкиназа наиболее компактная и содержит меньше всего киназ (Рис. 5). Между видами *B. longum* и *B. bifidum* процент идентичности составляет 70-71%. Процент идентичности СТПК, принадлежащей штамму *B. breve* UCC2003 с киназой из штамма *B. longum* DJO10A составляет 86%, а с киназой из штамма *B. bifidum* S17 составляет 50%.

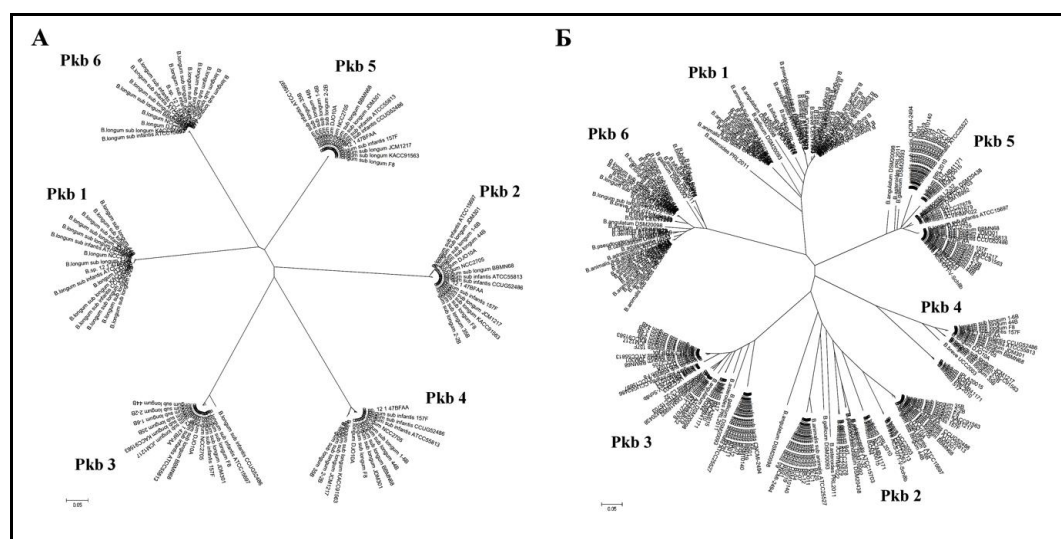


Рисунок 5. А Филогенетическое дерево построенное на основе выравнивания каталитических доменов СТПК из 15 геномов вида *Bifidobacterium longum* (включая геном *Bifidobacterium* sp. 12_1_47BFAA). Б Филогенетическое дерево построенное на основе выравнивания каталитических доменов 261 СТПК из 48 геномов 11 видов рода

Bifidobacterium. Использованный для построения деревьев масштаб (5 аминокислотных замен на 100 позиций) указан в нижнем левом углу для каждого дерева.

Расположение генов СТПК бифидобактерий на хромосомной карте

В работе было проанализировано расположение генов СТПК на генетической карте хромосомы у исследуемых видов бифидобактерий. Проведённый анализ выявил интересные закономерности. Так, гены консервативных протеинкиназ *pkb1*, *pkb3*, *pkb5*, *pkb6* располагаются в консервативных участках генома бифидобактерий и их локализация на физической карте генома относительно точки начала репликации хромосомы (*oriC*) сходна у разных видов, также сходно и их генетическое окружение (Рис. 6).

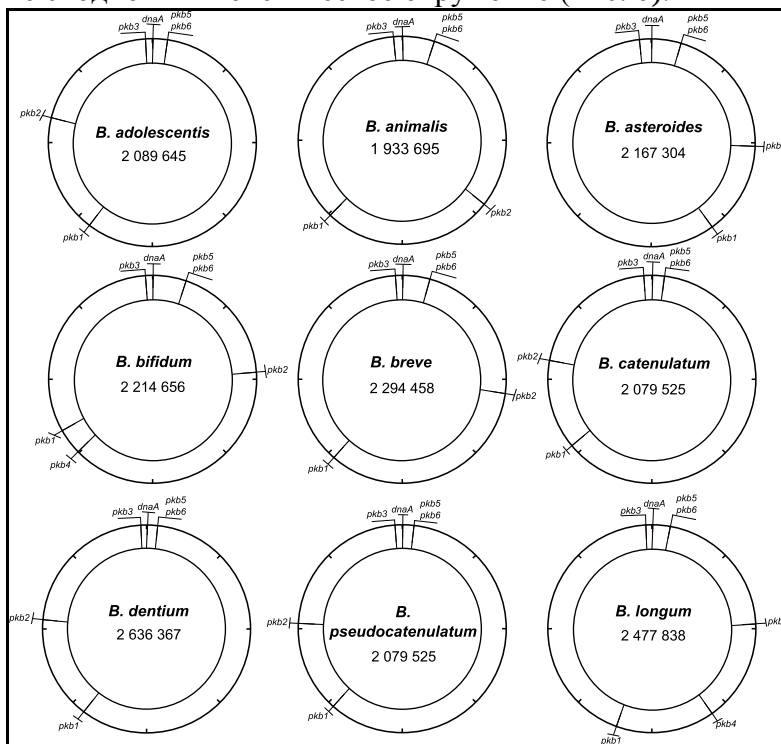


Рисунок 6. Локализация генов СТПК на генетических картах хромосом 9 видов бифидобактерий (для рассмотрения взяты виды, для которых на момент исследования были доступны полногеномные последовательности.)

Видоспецифичный ген *pkb2* у разных видов бифидобактерий располагается на хромосомной карте по-разному относительно *oriC* и консервативных протеинкиназ. Однако, его ближайшее генетическое окружение всегда очень консервативно: ген, кодирующий домен фибронектина и рецептор цитокинов; ген АТФазы; ген серин-треониновой фосфатазы и ген, имеющий FHA-домен, а также два гена ДНК хеликазы. Высокое сходство генетического окружения *pkb2* у различных видов бифидобактерий указывает на то, что различия генов *pkb2* возникли, вероятнее всего, в процессе дивергенции данного гена в процессе эволюции при разделении бифидобактериальных видов. Нами не было обнаружено каких-либо признаков горизонтального переноса данного гена между видами. Различное расположение этого гена на геномной карте, по-видимому, вызвано иными причинами. Уникальный ген *pkb4* относительно консервативных протеинкиназ (*pkb1*, *pkb3*, *pkb5*, *pkb6*), занимающих довольно консервативные позиции на хромосомной карте, почти всегда располагается в части хромосомы между геном *pkb1* и опероном из генов *pkb5* и *pkb6*.

Уникальный ген *pkb4* характерный только для видов *B. longum* и *B. bifidum* был обнаружен в одном штамме *B. breve* (UCC2003). Проведённый анализ генетического окружения гена *pkb4* в этом штамме (*B. breve* UCC2003) позволил предположить, что данный

ген мог появиться в составе генома в результате горизонтального переноса между близкородственными видами с участием мобильных элементов.

Ортологи генов СТПК бифидобактерий в геномах актинобактерий; предполагаемые функции СТПК бифидобактерий

В ходе работы был произведён поиск ортологов генов СТПК бифидобактерий по белковой базе данных, доступной на сайте NCBI. Были найдены ортологи для СТПК Pkb5 и Pkb6 – ими являются хорошо изученные и описанные протеинкиназы PknB и PknA из *Mycobacterium tuberculosis* (идентичность каталитического домена 57% для пары PknB-Pkb5, и 45% для пары PknA-Pkb6). Киназа Pkb1 наиболее сходна с киназой *pknL* из *M. tuberculosis* (идентичность каталитических доменов – 45%). При аннотации некоторых геномов бифидобактерий её называют PknA2. Протеинкиназы с аналогичной аннотацией также найдены нами и у других актинобактерий (*Gardnerella*, *Actinomyces*, *Nocardia*, *Corynebacterium*). СТПК Pkb3 не имеет ортолога среди киназ *M. tuberculosis*. Но, при выравнивании Pkb3 с протеинкиназами из других актинобактерий, нами были найдены очень сходные с ней киназы (идентичность каталитических доменов до 71%) в следующих бактериальных родах: *Gardnerella*, *Scardovia* и *Parascardovia*. Все эти три рода, как и род *Bifidobacterium*, принадлежат к семейству *Bifidobacteriaceae*. Гомологи для уникальной СТПК Pkb4 (идентичность каталитических доменов от 30% до 40%) были найдены нами только среди бактерий, принадлежащих к семейству *Coriobacteriaceae* (тип *Actinobacteria*). Микроорганизмы принадлежащие к данному семейству обитают в ЖКТ человека, и в кишечнике жука-пожарника (лат. *Pyrrhocoris apterus*). Для киназы Pkb2 нами были обнаружены ортологи в геномах различных актинобактерий. Стоит отметить, что наибольший процент идентичности каталитического домена (45%) протеинкиназа Pkb2 имеет с СТПК из геномов рода *Actinomyces* – данное семейство является довольно близким таксоном к семейству *Bifidobacteriaceae*. Ортологи киназы Pkb2 из более далеких таксонов имели более низкий процент идентичности с бифидобактериальной киназой, и, в частности, в случае микобактерий процент идентичности каталитического домена киназы Pkb2 с гомологичной ей киназой PknK из *M. tuberculosis* составил всего 35%. Стоит отметить, что все киназы обнаруженные нами при поиске ортологов для Pkb2, являются ортологами киназы PknK.

На сегодняшний день экспериментальные данные о функциях бифидобактериальных СТПК отсутствуют. Но, о функциях генов СТПК можно судить, например, основываясь на результатах *in silico* анализа гомологов данных генов. Таким образом, мы можем выдвинуть ряд гипотез, относительно функций СТПК бифидобактерий. Так, основываясь на достаточно высоком проценте идентичности аминокислотной последовательности каталитических доменов СТПК Pkb5 и Pkb6 бифидобактерий и киназ PknB и PknA из *M. tuberculosis*, и учитывая сходство генетического окружения оперона *pknB-pknA* *M. tuberculosis* и оперона *pkb5-pkb6* бифидобактерий, можно предположить, что и функции у этих генов-ортологов могут быть сходные и связаны с процессами роста и деления клеток. Протеинкиназа Pkb1 является ортологом киназы PknL из *M. tuberculosis* и, можно предположить, что Pkb1, как и PknL, участвует в регуляции клеточного деления и биосинтеза клеточной стенки. Уникальный ген *pkb4*, встречается у двух видов *B. longum* и *B. bifidum* – характерных и зачастую преобладающих в ЖКТ человека. В связи с этим, нельзя исключать, что присутствие гена *pkb4*, может быть связано с сохранением высоких пробиотических свойств у данных видов и помогать им успешно колонизировать ЖКТ человека. Среди протеинкиназ микобактерий ортологом гена *pkb2* является киназа *pknK*, связанная с адаптивными механизмами у этой группы бактерий. Возможное участие *pkb2* в процессах адаптации бифидобактериальных видов к различным условиям обитания и к иммунной системе хозяина позволяют предположить – генетическое окружение видоспецифичной киназы *pkb2* (ген, кодирующий домен фибронектина и рецептор цитокинов; ген, имеющий сигнальный ФНА-домен), и различия аминокислотной последовательности каталитического домена у разных

видов бифидобактерий. Ген *Pkb3* не имеет ортолога среди СТПК актинобактерий с описанными функциями.

Без анализа соответствующих мутантов, трудно назвать точные функции конкретных генов СТПК. При этом стоит отметить, что на сегодняшний день, не было обнаружено ни одного гена СТПК с помощью классических генетических методов, в том числе с помощью направленного мутагенеза. Это может быть объяснено либо их незаменимостью для жизни, либо их предполагаемой функциональной избыточностью (дублированием).

Клонирование генов СТПК штамма *B. longum* V379M

В геноме штамма *B. longum* V379M были обнаружены все шесть генов СТПК, характерные для вида *B. longum*. Фрагменты генов, соответствующие каталитическим доменам, были клонированы и секвенированы. Сравнительный анализ СТПК из штамма *B. longum* V379M с гомологичными последовательностями СТПК из штаммов вида *B. longum* показал, что: нуклеотидные и аминокислотные последовательности каталитических доменов СТПК штамма *B. longum* V379M имели 98-100% идентичности с соответствующими последовательностями из секвенированных штаммов *B. longum*, анализируемых в данной работе.

Экспрессия генов СТПК штамма *B. longum* V379M в клетках *E. coli*

В работе изучалась экспрессия каталитических доменов СТПК штамма *B. longum* V379M в клетках *E. coli*. На Рис. 7 представлены результаты эксперимента. На представленной электрофореграмме видно наличие интенсивных полос экспрессирующихся гибридных белков для клонированных каталитических доменов всех шести генов СТПК штамма *B. longum* V379M. Молекулярный вес экспрессирующихся белков соответствует расчетному весу. Таким образом, по результатам эксперимента была показана экспрессия каталитических доменов для всех шести генов СТПК штамма *B. longum* V379M в клетках *E. coli*.

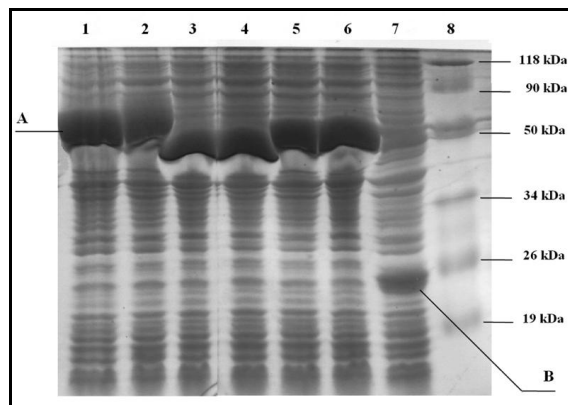


Рисунок 7. Электрофореграмма растворимой фракции белков штамма *E. coli* BL21(DE3), содержащего гибридные плазмиды. (1) – pET32a:*pkb5*; (2) – pET32a:*pkb3*; (3) – pET32a:*pkb4*; (4) – pET32a:*pkb1*; (5) – pET32a:*pkb2*; (6) – pET32a:*pkb6*; (7) – клон *E. coli*, содержащий плазмиду pET32a (контроль); (8) – маркер молекулярного веса белков. А – экспрессия гибридных белков; В – контроль экспрессии тиоредоксина.

Экспрессия генов СТПК в клетках бифидобактерий

Штамм *B. longum* V379M использовали для выявления экспрессии генов СТПК в клетках бифидобактерий. Экспрессию генов протеинкиназ определяли методом ПЦР на обратных транскриптах (ОТ-ПЦР). По наличию продуктов ПЦР ожидаемой длины судили о наличии экспрессии соответствующих генов. В штамме *B. longum* V379M наблюдалась экспрессия всех шести изучаемых генов СТПК в течение экспоненциальной фазы роста ($OD_{600}=0,6$) (Рис. 8).

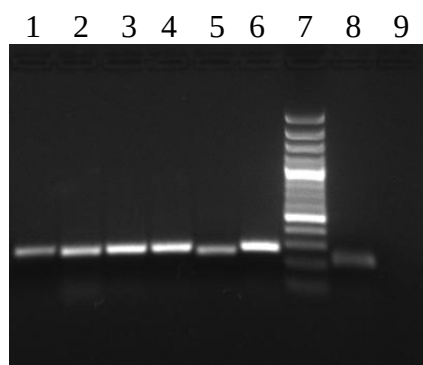


Рисунок 8. Экспрессия генов СТПК в клетках *B.longum* В379М. Электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР. (1) – *pkb1*; (2) – *pkb2*; (3) – *pkb3*; (4) – *pkb4*; (5) – *pkb5*; (6) – *pkb6*; (7) – маркер молекулярного веса фрагментов ДНК; (8) – положительный контроль (*tuf*); (9) – отрицательный контроль.

Изучение возможности автофосфорилирования для протеинкиназ Pkb2 и Pkb5

Была исследована способность к автофосфорилированию для СТПК Pkb2 и Pkb5 с использованием двух подходов: (1) инкубация с меченой АТФ ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-АТФ}$); (2) с использованием люминесцентной реакции.

На Рис. 9 представлены результаты эксперимента: полосы фосфорилированных протеинкиназ Pkb5 и Pkb2 на радиоавтографе указывают на присоединение фосфата из $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-АТФ}$ к киназам и демонстрируют способность к автофосфорилированию у исследуемых СТПК.

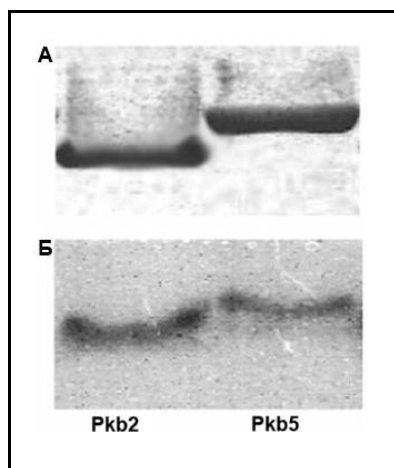


Рисунок 9. А Электрофореграмма автофосфорилированных протеинкиназ Pkb2 и Pkb5 (гель окрашенный по Кумасси). Б Радиоавтограф автофосфорилированных протеинкиназ Pkb2 и Pkb5.

Уровень автофосфорилирования белков определяли с помощью люминесцентной реакции по количеству АТФ, оставшегося после завершения реакции (активность протеинкиназ обратно пропорциональна количеству оставшегося АТФ). Степень автофосфорилирования каталитического домена протеинкиназы Pkb5 при количестве 0,5 мкг на точку составила 3%, а при количестве 1 мкг на точку – 5%; для каталитического домена протеинкиназы Pkb2 степень автофосфорилирования при количестве 0,5 мкг на точку составила 2%, а при количестве 1 мкг на точку – 6%. Статистический Параметр $Z' = 0,8$ подтвердил статистическую значимость полученных данных.

Результаты экспериментов доказывают способность к автофосфорилированию для двух СТПК – Pkb5 и Pkb2. Способность к автофосфорилированию у четырех оставшихся СТПК – Pkb1, Pkb3, Pkb4 и Pkb6 была также исследована в нашей лаборатории Алексеевой М.Г. и соавторами. По результатам проведенной работы, авторами была продемонстрирована способность к автофосфорилированию только для СТПК Pkb3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В первой части работы разработана классификация серин-треониновых протеинкиназ эукариотического типа грамположительных бактерий, основанная на физико-химических свойствах аденин-связывающего кармана. Вариабельный аминокислотный состав этой области представлен в виде сигнатуры, состоящей из 9 аминокислотных остатков, участвующих во взаимодействии с лигандом и расположенных в области связывания аденина. Все киназы были разделены на 20 групп, отличающиеся комбинацией выбранных аминокислотных остатков. Около 80% СТПК, имеющих сходные сайты связывания, попали в наиболее крупные группы (с I по IV) включающие представителей всех исследуемых бактериальных родов. В то же время, был обнаружен ряд родоспецифичных групп. Предполагается, что СТПК характеризующиеся одинаковой сигнатурой будут взаимодействовать со сходными низкомолекулярными веществами, таким образом, предлагаемую классификацию можно применять при разработке селективных ингибиторов СТПК. Анализ распределения СТПК по 20 группам, а также дополнительный анализ протеинкиназ человека позволил выделить четыре группы СТПК (VII, X, XVIII, XIX), содержащие исключительно СТПК патогенных микроорганизмов. При воздействии селективными АТФ-конкурентными ингибиторами на киназы из выделенных четырех групп – вероятность того, что с этими ингибиторами будут взаимодействовать и киназы человека или комменсальных для него бактерий минимальна.

Во второй части работы впервые идентифицированы и классифицированы СТПК эукариотического типа бифидобактерий. У бифидобактерий обнаружено шесть генов СТПК эукариотического типа, для которых предложено следующее обозначение: *pkb1*, *pkb2*, *pkb3*, *pkb4*, *pkb5*, *pkb6*. Геном каждого штамма бифидобактерии имеет в своём составе либо пять, либо шесть генов СТПК эукариотического типа. Гены *pkb1*, *pkb2*, *pkb3*, *pkb5* и *pkb6* присутствуют в геномах всех штаммов бифидобактерий, при этом гены *pkb1*, *pkb3*, *pkb5* и *pkb6* консервативные, а ген *pkb2* видоспецифичный. Наряду с ними обнаружен ген встречающийся только у видов *B. longum* и *B. bifidum* – это ген *pkb4* (который был назван «уникальным» геном).

Обнаружены интересные закономерности расположения генов СТПК бифидобактерий на хромосомной карте: консервативные гены протеинкиназ *pkb1*, *pkb3*, *pkb5*, *pkb6* располагаются в консервативных участках генома бифидобактерий и их локализация на физической карте генома очень сходна у разных видов, также сходно и их генетическое окружение. Видоспецифичный ген *pkb2* и уникальный ген *pkb4* у разных видов бифидобактерий располагаются на хромосомной карте по-разному относительно *oriC* и консервативных протеинкиназ, тем не менее, их генетическое окружение тоже сходно.

Клонированы и секвенированы гены СТПК из российского промышленного пробиотического штамма *B. longum* В379М. Показана экспрессия каталитических доменов для всех шести генов СТПК штамма *B. longum* В379М в клетках *E. coli*; а также показана экспрессия всех шести генов СТПК в штамме *B. longum* В379М. Для двух СТПК – консервативной Pkb5 и видоспецифичной Pkb2 продемонстрирована способность к автофосфорилированию.

ВЫВОДЫ

1. Разработана новая классификация СТПК грамположительных бактерий, основанная на физико-химических свойствах боковых цепей 9 вариабельных аминокислотных остатков экспонированных в области связывания аденина. На основе созданной классификации СТПК разделены на 20 групп.
2. Анализ 48 геномов 11 видов бифидобактерий выявил шесть генов СТПК эукариотического типа. Геном каждого штамма бифидобактерий содержит четыре консервативных гена (*pkb1*, *pkb3*, *pkb5* и *pkb6*) и один видоспецифичный ген СТПК (*pkb2*). Штаммы *B. longum* и *B. bifidum* содержат также уникальный ген (*pkb4*), встречающийся только у этих видов бактерий.
3. Четыре консервативных гена СТПК (*pkb1*, *pkb3*, *pkb5*, *pkb6*) располагаются в консервативных участках бифидобактериального генома и их локализация на хромосоме относительно точки начала репликации идентична у разных видов.
4. В клетках *E. coli* показана экспрессия каталитических доменов шести генов СТПК штамма *B. longum* B379M.
5. В штамме *B. longum* B379M наблюдается экспрессия всех шести генов СТПК.
6. Консервативная СТПК Pkb5 и видоспецифичная СТПК Pkb2 способны к автофосфорилированию.

Список опубликованных работ по теме диссертации

В журналах рекомендованных ВАК и иностранных рецензируемых журналах:

1. **Zakharevich N.V.** Signatures of the ATP-binding pocket as a basis for structural classification of the serine/threonine protein kinases of gram-positive bacteria. / **N.V. Zakharevich**, D.I. Osolodkin, I.I. Artamonova, V.A. Palyulin, N.S. Zefirov, V.N. Danilenko // *Proteins* – 2012 – 80(5) – Pp. 1363-1376.
2. Nezametdinova V.Z. Identification and characterization of the serine/threonine protein kinases in *Bifidobacterium*. / V.Z. Nezametdinova, **N.V. Zakharevich**, M.G. Alekseeva, O.V. Averina, D.A. Mavletova, V.N. Danilenko // *Arch Microbiol* – 2014 – 196(2) – Pp. 125-136.
3. **Zakharevich N.V.** Complete Genome Sequence of *Bifidobacterium longum* GT15: Identification and Characterization of Unique and Global Regulatory Genes. / **N.V. Zakharevich**, O.V. Averina, K.M. Klimina, A.V. Kudryavtseva, A.S. Kasianov, V.J. Makeev, V.N. Danilenko // *Microb Ecol* – 2015 – 70(3) – Pp. 819-834.

Участие в конференциях, опубликованные тезисы докладов по теме исследования:

1. **Захаревич Н.В.**, Ковтун А.С., Аверина О.В., Незаметдинова В.З., Даниленко В.Н. Геномика бифидобактерий, уникальные гены и гены коммуникации. // Научные труды V Съезда Биохимиков России, Конференция ADFLIM, Сочи – Дагомыс, 2016, Спецвыпуск, *Acta Naturae*, T.2., С. 201.
2. Ковтун А.С., **Захаревич Н.В.**, Аверина О.В., Даниленко В.Н. Разработка методов анализа метагеномов кишечника человека для идентификации и характеристики композиции генов нейромодуляторов. // Тезисы Российско-Китайской Научно-Практической Конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии (XIX Кашкинские чтения), Спецвыпуск, *Problems in medical mycology* 2016, V.18(2), Pp. 76-77.
3. **Zakharevich N.V.**, Averina O.V., Kasianov A.S., Klimina K.M., Makeev V.J., Danilenko V.N. Analysis of the genome of *Bifidobacterium longum* GT15: focus on the unique genes and genes potentially involved in the microbiota-gut-brain communication. // Abstract book, 5th International Human Microbiome Congress, Luxembourg, 2015, P.47.
4. Klimina K.M., Emelyanov K.V., **Zakharevich N.V.**, Kasianov A.S., Poluektova E.U., Makeev V.J., Danilenko V.N. The comparative genomic analysis of *Lactobacillus*

- rhamnosus* strains, isolated from human gut, saliva and vagina. // Abstract book, 5th International Human Microbiome Congress, Luxembourg, 2015, P.69.
5. **Zakharevich N.V.**, Nezametdinova V.Z., Danilenko V.N. Serine/threonine protein kinases eukaryotic type: identification, classification, possible functions. // Abstracts 38th FEBS Congress, Saint Petersburg, Russia, 2013. Thesis in special issue of FEBS Journal, 2013, V.280, issue supplement (s1), P.548.
 6. Даниленко В.Н., Аверина О.В., **Захаревич Н.В.**, Климина К.М., Незаметдинова В.З. Полногеномное секвенирование *Bifidobacterium longum* GT15: сравнительный геномный анализ, глобальные регуляторные гены, уникальные гены. // Тезисы Международной конференции «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» Издательство ООО «Академиздат» 2013, С. 50.
 7. Полякова М.В., Осолодкин Д.И., **Захаревич Н.В.**, Даниленко В.Н., Палюлин В.А., Зефирова Н.С. Сравнительный анализ структуры сайтов связывания АТФ серин-треониновых протеинкиназ грамположительных бактерий. // Сборник материалов XIX Российского национального конгресса "Человек и лекарство", Москва, Россия, 2012. С. 556-557.
 8. **Захаревич Н.В.**, Осолодкин Д.И., Артамонова И.И., Палюлин В.А., Зефирова Н.С., Даниленко В.Н. Структурная классификация серин-треониновых протеинкиназ эукариотического типа грамположительных бактерий. // Тезисы II Международной Научно-Практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: геномика, протеомика, биоинформатика». Новосибирск, 2011. Типография ФГУП «Издательство СО РАН», том 1, С. 122.
 9. Незаметдинова В.З., **Захаревич Н.В.**, Даниленко В.Н. Серин-треониновые протеинкиназы эукариотического типа различных видов бифидобактерий. // Проблемы популяционной и общей генетики: материалы международной конференции посвященной памятной дате, 75-летию со дня рождения академика Ю.П. Алтухова. 2011. Тезисы, С. 248.
 10. **Zakharevich N.V.**, Osolodkin D.I., Artamonova I.I., Palyulin V.A., Zefirov N.S., Danilenko V.N. Structural classification of bacterial serine/threonine protein kinases. // Abstracts of the International Moscow conference on Computational Molecular Biology (MCCMB'11), Moscow, Russia, 2011. P. 394.
 11. **Zakharevich N.V.**, Osolodkin D.I., Artamonova I.I., Palyulin V.A., Danilenko V.N. Structural classification of bacterial eukaryotic type serine/threonine protein kinases, biological targets for design of new drugs. // Abstracts 2nd International Congress-Partnering & Exhibition Eurasia Bio-2010 on Biotechnology and Bioenergy, P. 401 (en). P. 74-75 (ru).
 12. **Zakharevich N.V.**, Osolodkin D.I., Artamonova I.I., Palyulin V.A., Zefirov N.S., Danilenko V.N. Classification of bacterial eukaryotic type serine/threonine protein kinases – targets for the design of new drugs. // Proceedings of the XVII Russian National Congress “Man & Drug”. Moscow, Russia, 2010. P. 618.
 13. **Захаревич Н.В.**, Осолодкин Д.И., Артамонова И.И., Палюлин В.А., Даниленко В.Н. Классификация бактериальных серин-треониновых протеинкиназ эукариотического типа – биомшеней для создания новых лекарств. // Школа-конференция «Фундаментальная наука для биотехнологии и медицины-2010», Москва, 2010, С. 32.
- Участие в конференциях, доклады по теме исследования:
14. Nezametdinova V.Z., **Zakharevich N.V.**, Alekseeva M.G., Mavletova D.A., Averina O.V., Danilenko V.N. Eukaryotic type serine-threonine protein kinases from genus *Bifidobacterium*: identification and characterization. // 5TH Congress of European Microbiologists 2013, FEMS 2013. Leipzig, Germany, 2013.
 15. Averina O.V., Alekseeva M.G., Nezametdinova V.Z., Poluektova E.U., **Zakharevich N.V.**, Danilenko V.N. A Comparative Genomic Analysis of Industrial Probiotic Strain *Bifidobacterium longum* B379M. // XXXII International Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease. St. Petersburg, Russia, 2009.