

УДК 577.151.36

КАТАЛИТИЧЕСКАЯ СУБЪЕДИНИЦА РКА КАК ПРОТОТИП СЕМЕЙСТВА ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ПРОТЕИНКИНАЗ

Обзор

© 2020 Б.А. Рейхардт*, П.Д. Шабанов

Институт экспериментальной медицины, 197376 Санкт-Петербург, Россия;
электронная почта: reichardt@mail.ru

Поступила в редакцию 21.10.2019

После доработки 25.02.2020

Принята к публикации 26.02.2020

Каталитическая субъединица РКА (РКАс) представляет собой практически изолированный киназный домен, консервативный у всех эукариотических протеинкиназ. РКАс состоит из двух долей, образующих каталитическую щель, в которой располагаются: АТР-связывающий участок, пептид-связывающий участок и каталитический сайт. В процессе фолдинга вторичные структуры РКАс укладываются так, что неполярные участки собираются в глобулярное ядро, а подвижные петли и хвосты экспонируются наружу, образуя регуляторные элементы. Синтезированная *de novo* РКАс подвергается процессингу путем фосфорилирования Т-петли. При этом формируется полноценный активный центр, способный высокоаффинно связывать косубстраты. Молекула АТР «склеивает» две доли вместе, а связывание пептидного субстрата завершает сборку активного центра. В результате «каталитическая триада» (γ -фосфат АТР, гидроксил Ser/Thr белка-субстрата и карбоксил Asp166) занимает положение, оптимальное для эффективного катализа. Динамическая реорганизация полярных и гидрофобных взаимодействий в ходе каталитического цикла обеспечивает переход РКАс из открытой конформации в закрытую и обратно. Изучение структурных основ работы ePK необходимо для успешного создания модуляторов ePK.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: каталитическая субъединица РКА, АТР-связывающий сайт РКА, пептид-связывающий сайт РКА, Thr197 РКА, гидрофобные спины.

DOI: 10.31857/S0320972520040028

сАМР-Зависимая протеинкиназа (сАРК), получившая известность как РКА (протеинкиназа А), была открыта в 1968 г. [1]. Уже первые кристаллические структуры РКАс [2, 3], полученные к 1991–1993 гг., легли в основу классификации консервативных доменов (ePK, eukaryotic protein kinases) [4]. Будучи наиболее просто организованной и хорошо изученной, РКАс прочно вошла в научную литературу, как прототип обширного и разнообразного семейства ePK [5–11].

СЕМЕЙСТВО ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ПРОТЕИНКИНАЗ

С момента открытия фосфорилирования, как важнейшего механизма регуляции функций белков, стало очевидно, что протеинкиназы (РК) играют ключевую роль во всех аспектах клеточной жизни [12–16]. РК относятся к классу фосфотрансфераз [17], катализирующих перенос фосфосодержащей группы на различ-

ные субстраты. Выделяют серин/треониновые РК, осуществляющие перенос фосфата на аминокислотный осадок (а.о.) серина или треонина (протеин-Ser/Thr-киназы); РК, переносящие фосфат на остаток тирозина (протеин-Tyr-киназы); РК двойной специфичности (Ser/Thr- и Tyr-киназы); а также аргинин-, гистидин-киназы прокариот и другие [18].

Ser/Thr-киназы, вместе с Tyr-киназами (ТК), составляют наиболее важную группу ePK [19]. У человека относительные доли фосфорилирования белков по Ser, Thr, и Tyr составляют ~ 86, 12 и 2% [20]. Несмотря на небольшой вклад в общее фосфорилирование, ТК занимают особое место, благодаря высокому онкогенному потенциалу. Многие цитоплазматические онкогены обладают Tyr-киназной активностью, а мембранные рецепторы факторов роста представляют собой рецепторные ТК [21].

В протеоме человека выявлено 518 РК, из которых 478 содержат характерный для всех ePK консервативный каталитический домен; а 40 – представляют собой атипичные РК, обладающие киназной активностью, но не проявляющие структурного сходства с ePK. Эволюцион-

* Адресат для корреспонденции.

ное дерево ePK делится на восемь основных групп. К семейству AGC относятся PKA, PKG и PKC; в семейство CaMK входят Ca/кальмодулин-зависимые PK; семейство SK1 представляет казеинкиназа 1; семейство CMGC образуют циклин-зависимые PK (CDK), митоген-активируемые PK (МАРК), киназа гликогенсинтазы (GSK) и CDK-подобные PK; семейство STE составляют PK верхних эшелонов каскада МАРК, аналоги дрожжевой PK STE; семейства ТК и ТКЛ включают Туг-киназы и ТК-подобные киназы; и наконец, членами семейства RGC являются рецепторные гуанилатциклазы, обладающие ТК-доменом [19].

МОДУЛЬНАЯ СТРУКТУРА ePK

Являясь ключевыми ферментами внутриклеточной сигнализации, PK должны выполнять свои функции в строго определенное время и строго определенном месте. Эти принципы воплощает модульная структура ePK (рис. 1). Наряду с каталитическим доменом, многие

Ser/Thr-киназы и Туг-киназы имеют регуляторные (R) домены [22–26]. Обычно R-домен блокирует киназную активность (PKC, PKG, CaMKII), выступая в роли псевдосубстрата. Активацию таких PK осуществляют низкомолекулярные аллостерические эффекторы (Ca²⁺, cAMP/cGMP, фосфолипиды), которые, связываясь с R-доменом, устраняют автоингибирующий эффект. PK семейства CaMK, не способные самостоятельно связывать Ca²⁺, используют Ca-связывающий белок кальмодулин в качестве сенсора Ca²⁺-сигнала [27]. К регуляторным элементам относятся также сайты фосфорилирования/автофосфорилирования, присутствующие в структуре многих ePK.

Субклеточная локализация PK регулируется путем ассоциации с мембранными липидами, скаффолдами, шаперонами и адаптерными белками. Для этого в составе ePK имеются домены (PH, C1, C2, PX, FERM), связывающие определенные фракции мембранных фосфолипидов; домены (SH3, SH2, 14-3-3), распознающие аминокислотные мотивы (Pro-xx-Pro) или ковалентно модифицированные аминокислоты

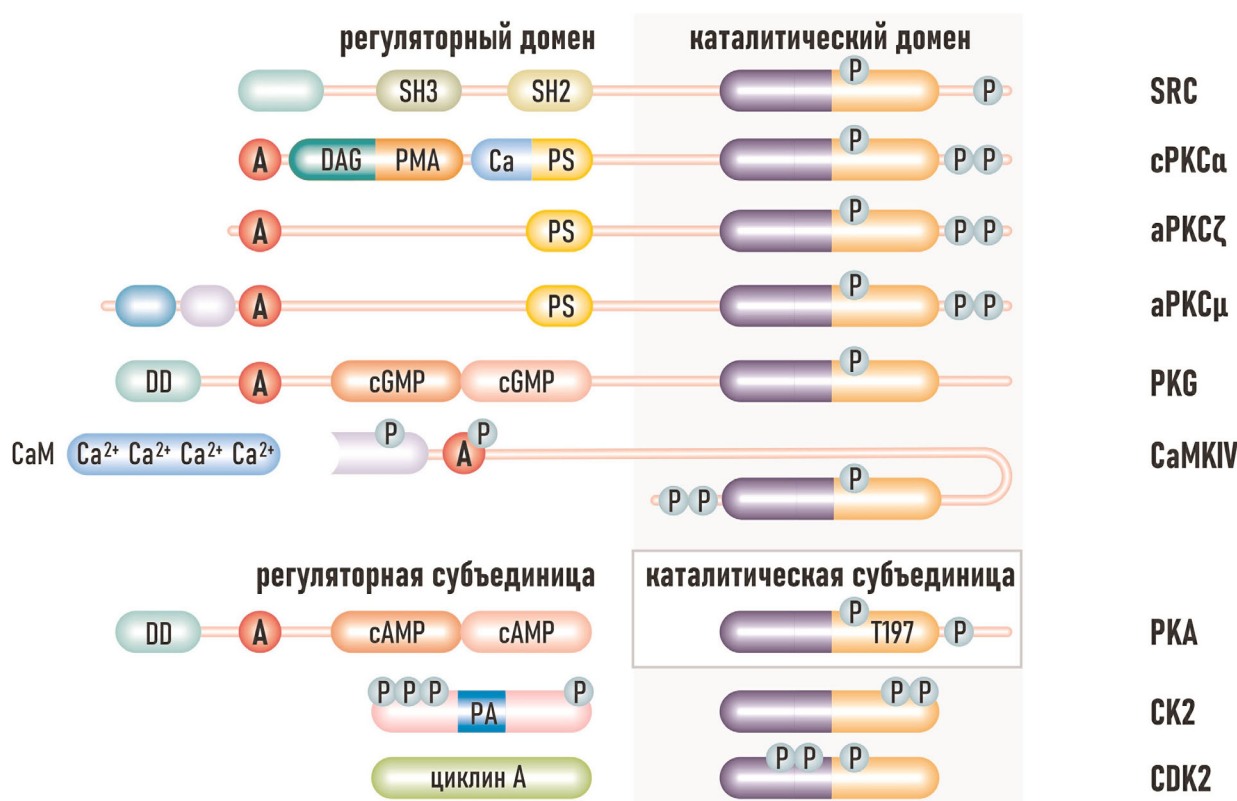


Рис. 1. Модульная структура ePK. А – автоингибирующий домен, Р – сайты фосфорилирования, DD – домен димеризации, NLS – сигнал ядерной локализации. Сайты, связывающие эффекторные молекулы: DAG – диацилглицерол, PMA – форболовый эфир, PS – фосфатидилсерин, Ca – Ca²⁺, CaM – кальмодулин, PA – полиамины. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

(pTyr/pSer); а также домены, способные к димеризации (DD-DD, PZD-PZD, SAM-SAM) с аналогичными доменами других белков [28]. В ряде случаев функции R-доменов выполняют самостоятельные белки – регуляторные субъединицы. Так, холоферменты CDK1 [29] и CK2 [30] представляют собой гетерокомплексы RC и R₂C₂, где R – регуляторные, а C – каталитические субъединицы.

Холофермент PKA (R₂C₂) состоит из двух регуляторных и двух каталитических субъединиц [31]. Связывание cAMP с PKA_γ в составе холофермента стимулирует высвобождение двух активных PKAc-мономеров и последующее фосфорилирование белков-мишеней [32]. Таким образом, PKAc представляет собой практически изолированный киназный домен ePK, лишенный дополнительных модулей (таких как аутоингибирующий домен, сайты связывания аллостерических эффекторов). В отличие от чрезвычайно разнообразных R-доменов, каталитический домен ePK обладает высокой степенью гомологии и включает 12 консервативных субдоменов, характерных для всех членов семейства. Три важнейшие функции [4]: 1) связывание и ориентация АТР; 2) связывание и ориентация белка-субстрата; и 3) перенос γ-фосфата АТР на Ser/Thr или Tyr белка-субстрата – нашли отражение в структуре PKAc.

КАТАЛИТИЧЕСКАЯ СУБЪЕДИНИЦА PKA. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

PKAc состоит из двух долей – N-концевой (малой) и C-концевой (большой), соединяющихся между собой подвижным линкерным участком. Две доли формируют каталитическую щель, в которой размещаются молекула АТР в комплексе с двумя дивалентными катионами (Mg или Mn) и фосфо-акцепторный участок пептидного субстрата.

За связывание АТР преимущественно отвечает N-доля, тогда как C-доля содержит участки для связывания пептида, катализа, и регуляции [3, 6, 33]. Обе доли образуют несколько фармакофорных площадок для связывания различных частей аденозинтрифосфата: «фосфатный якорь», «рибозный якорь», «гидрофобную щель» и аденин-связывающий карман. На поверхности C-доли располагаются: 1) каталитическая петля, участвующая в процессе катализа; 2) Mg-связывающая петля, координирующая положение комплекса Mg₂/АТР; 3) активирующая петля, которая содержит консервативный Thr197, необходимый для активации PKAc путем фосфорилирования; и 4) P+1-петля и ее окружение,

образующие участок связывания пептида. Три последние петли образуют сегмент активации, выполняющий каталитические и регуляторные функции [7, 34].

Как и многие ePK, PKAc синтезируется *de novo* в неактивной конформации и требует фосфорилирования для активации [35]. В результате фосфорилирования формируется полноценный активный центр (способный высокоаффинно связывать АТР и пептидный субстрат) и PKAc переходит в активную конформацию [36–38]. В отсутствие АТР, благодаря гибкому линкерному региону N- и C-доли могут перемещаться относительно друг друга. Такая конформация называется открытой. Молекула АТР, связываясь одновременно с обеими долями, «склеивает» их вместе и переводит фермент в закрытую конформацию. По завершении каталитического цикла PKAc освобождается от продуктов реакции и снова переходит в открытую конформацию [33, 39, 40].

ДОМЕННАЯ СТРУКТУРА КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ PKA

N-доля. N-доля PKAc (40–119 а.о.) представлена пятью антипараллельными β-структурами (1–5) и небольшим α-спиральным доменом (A-C) (рис. 2). Спиральный домен включает две переменные α-спирали (αA и αB) и длинную αC-спираль, обязательную для структуры любой ePK [3]. N-доля PKAc млекопитающих начинается с сайта миристилирования (Gly1), N-концевая аминогруппа которого способна ковалентно связывать остаток жирной (миристиновой) кислоты. У немиристилированных форм PKAc подвижный N-хвост (1–10 а.о.) располагается произвольно [36]. Миристилирование обычно повышает сродство белков к мембранам, однако у свободных PKAc углеводородная цепь миристиновой кислоты укладывается в гидрофобный карман на поверхности C-доли. Присоединение R-субъединиц освобождает жирнокислотный хвост, и холофермент PKA прекрасно связывается с липидными везикулами [41].

Следующие 11–31 а.о. N-доли образуют амфипатическую αA-спираль. N-конец αA-спирали прочно фиксируется на поверхности большой доли благодаря гидрофобным силам притяжения, а C-конец располагается между долями, ограничивая их подвижность, напоподобие сустава. Гидрофобный «сустав» образуют боковые цепи ароматических а.о. Phe26 и Trp30 αA-спирали, которые проникают в обширную гидрофобную щель между долями (Ile94, Ala97, Val98,

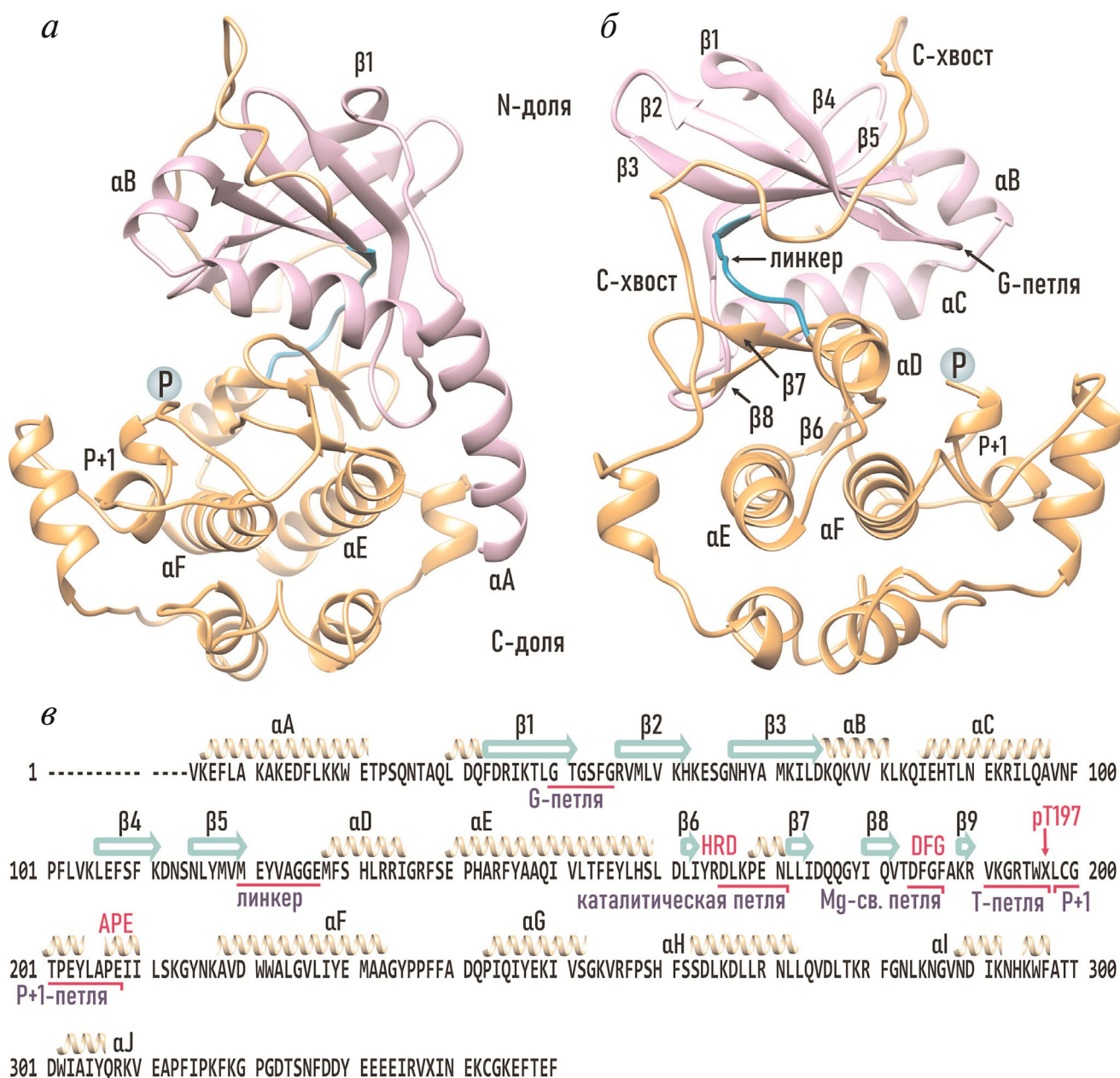


Рис. 2. Структура РКAc мыши по Zheng et al. (1993). *а* – 15–350 а.о.; *б* – 40–350 а.о.; *в* – первичная аминокислотная последовательность. PDB:1ATP.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

Tyr156, Leu160, Leu162). Положение Phe26 и Trp30 фиксируют с двух сторон полярные Arg93 αC -спирали и Arg190 $\beta 9$ -структуры. В этом участке С-концы αC -спирали и αA -спирали тесно контактируют и стабилизируют друг друга путем взаимодействий Lys92–Ser34, Arg93–Trp30, Gln96–Lys29, и Gln96–Ser34 [42]. Важнейшими консервативными мотивами *N*-доли являются: G-петля, $\beta 3$ -структура, и αC -спираль, входящие в состав I, II, и III-го субдомена

нов по «анатомической» классификации Хэнкса [4]. Первые два субдомена образуют фосфатный якорь, удерживающий фосфаты АТФ, в положении оптимальном для катализа.

G-петля (Glycine-rich loop, G-loop), соединяющая $\beta 1$ - и $\beta 2$ -структуры, получила свое название по глициновому кластеру (Gly50, Gly52, Gly55), консервативному у всех ePK. Обычно к G-петле относят короткие фрагменты $\beta 1$ и $\beta 2$, на которые она опирается. G-петля стабилизи-

руется несколькими внутримолекулярными связями между антипараллельными β -структурами и образует «козырек» над входом в каталитическую щель. В закрытой конформации G-петля покрывает молекулу АТФ, изолируя ее от растворителя. При проникновении молекулы АТФ в каталитическую щель амиды основной цепи G-петли захватывают фосфаты АТФ и координируют их положение внутри активного центра [43]. Ser53 образует водородную связь с ключевым γ -фосфатом, а Phe54 и Gly55 фиксируют β -фосфат. По данным мутационного анализа [44], из трех глицинов наиболее важную роль в связывании АТФ играет Gly52, регулирующий положение Ser53 на вершине G-петли [45]. G-петля заканчивается на Val57 β 2-структуры, который вместе с Ala70 образует верхнюю часть гидрофобной щели, вмещающей в себя адениновый гетероцикл АТФ.

Вторую часть фосфатного якоря составляет последовательность AxK, относящаяся к β 3-структуре (субдомен II). Находящийся внутри каталитической щели Lys72 этого мотива образует связи с двумя (α и β) фосфатами АТФ. В свою очередь, положение Lys72 стабилизирует Glu91, расположенный в начале α C-спирали, с которым Lys72 образует ионную пару [46].

Возможность взаимодействия Lys72–Glu91 критически зависит от конформации подвижной α C-спирали (субдомен III). Располагаясь между двумя долями, своим N-концом α C-спираль тесно контактирует с сегментом активации C-доли, и ее статус зависит от таких факторов, как состояние сайта фосфорилирования, связывание АТФ и сборка гидрофобного R-спина [37, 47–49]. В закрытой конформации положение обеих долей фиксирует «застежка», которую образуют His87 α C-спирали и pThr197 петли активации [50].

Важную роль в связывании АТФ играют расположенный в глубине каталитической щели линкерный регион (120–127 а.о.), вместе с α D-спиралью, входящий в состав субдомена V. У РКА этот фрагмент содержит один а.о. (Glu127), образующий рибозный якорь, и два а.о. (Glu121 и Val123), отвечающие за распознавание фармакофорных атомов N аденинового гетероцикла АТФ.

С-доля. С-доля (128–300 а.о.) включает семь α -спиралей (D-I) и четыре коротких β -структуры (6–9), соединенные между собой петлями. Спиральные домены образуют глобулярное ядро, а экспонированные наружу петли участвуют в связывании косубстратов и регуляции каталитической активности [3] (рис. 2). С-доля начинается с короткой α D-спирали, за которой следует длинная гидрофобная α E-спираль (субдомен VIA). Важнейшим участком С-доли является продолжительный фрагмент, состоящий из β -структур, соединяющихся между собой подвижными петлями (рис. 3). Первой в этом фрагменте располагается каталитическая петля (166–171 а.о.), занимающая место между β 6- и β 7-структурами (субдомен VIB). Консервативный HRD-мотив (His-Arg-Asp) этой петли содержит ключевую пару: Arg165–Asp166, в которой аргинин запускает сборку активного центра в ответ на фосфорилирование петли активации [36], а аспарат непосредственно участвует в процессе катализа. «Каталитический» Asp166 выполняет две функции: выступает в роли протонной ловушки и координирует гидроксильную группу Ser/Thr белка-субстрата относительно γ -фосфата АТФ [51–54], положение которого контролирует еще один консервативный остаток (Lys168) каталитической петли. Каталитическая петля содержит также Asp171, хела-

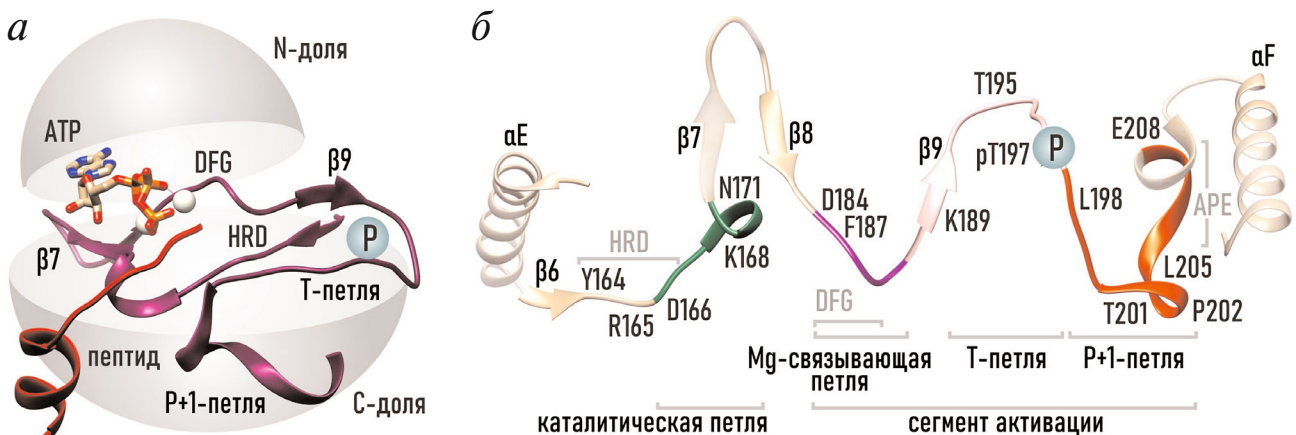


Рис. 3. Каталитическая петля и сегмент активации. а – Положение в структуре активной РКАс; б – схема.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

тирующий Mg-1. За каталитической петлей следует сегмент активации (рис. 3), с одной стороны, опирающийся на $\beta 7/\beta 8$ -структуры, а с другой – на APE-мотив αF -спирали глобулярного ядра. Сегмент активации включает Mg-связывающую петлю, $\beta 9$, активирующую петлю, и P+1-петлю.

Короткая Mg-связывающая петля/Mg-позиционирующая петля (Asp184-Phe-Gly-Phe187) располагается между 8-й и 9-й β -структурами и относится к субдомену VII (176–193 а.о.). Эта петля играет ключевую роль в позиционировании ионов металлов, ассоциированных с АТР. Окружение АТР составляют два иона магния (Mg-1 и Mg-2), необходимые для нейтрализации высокого отрицательного заряда фосфатов и координации трифосфатной группы внутри активного центра. В активной конформации РКAc Asp184 консервативного DFG-мотива (Asp-Phe-Gly) Mg-связывающей петли контролирует положение Mg-1 и Mg-2. Положение Mg-1 дополнительно стабилизирует Asn171 каталитической петли.

Между VII и VIII субдоменами Хэнкса располагается варибельная активирующая петля (188–197 а.о.), так же известная как Т-петля, поскольку содержит консервативные остатки Ser/Thr или Tyr, которые могут быть модифицированы путем фосфорилирования. Иногда в литературе встречается название А-петля (activation-loop). У РКAc сайтом фосфорилирования является Thr197. Фосфорилирование Т-петли представляет собой широко распространенный механизм активации ePK [35, 36, 55]. У некоторых ePK (CDK2, InRK) в нефосфорилированной форме Т-петля препятствует связыванию АТР и пептидного субстрата, и наоборот, фосфорилирование Т-петли стабилизирует РК в активной конформации [56–58].

Последней в сегменте активации располагается P+1-петля (198–208 а.о.). В случае РКAc эта петля образует гидрофобное ложе для неполярного P+1-остатка, характерного для субстратов РК семейства AGC, и ориентирует фосфоакцепторный Р-сайт относительно активного центра. P+1-петля и ее окружение формируют пептид-связывающий участок на поверхности С-доли, поэтому в литературе иногда встречается название пептид-позиционирующая петля [37].

Консервативный мотив APE (Ala206-Pro-Glu208), расположенный в конце P+1-петли, обеспечивает интеграцию между структурами С-доли [46]. Glu208 формирует солевой мост с Arg280 αN - αI -петли, стабилизирующий положение сегмента активации относительно С-концевых αG -, αN - и αI -спиралей; а Ala206 и Pro207 APE-мотива образуют гидрофобный до-

кинг-сайт для Trp222 αF -спирали, следующей за VIII-субдоменом (194–213 а.о.).

Субдомен IX представлен большой неполярной αF -спиралью (218–233 а.о.), выполняющей опорные функции при сборке гидрофобных спинов, составляющих внутреннюю архитектуру РКAc [47, 49, 59]. Субдомен X содержит короткую αG -спираль, а субдомен XI образует подвижный С-хвост большой доли. Некоторые фрагменты С-хвоста, расположенные в непосредственной близости к каталитической щели, участвуют в механизмах связывания косубстратов. Так, остатки 315–327 С-хвоста (рис. 2, б) регулируют доступ к аденин-связывающему карману; а кислый кластер (328–334 а.о.) помогает притягивать положительно заряженные пептиды к активному центру [33, 37, 58].

АТР-СВЯЗЫВАЮЩИЙ УЧАСТОК

Поскольку большинство РК используют молекулу АТР в качестве донора фосфата, АТР-связывающий участок (рис. 4) отличается наибольшей консервативностью среди ePK. Молекула АТР, глубоко проникая в каталитическую щель, образует множественные контакты с обеими долями. В составе АТР-связывающего участка выделяют несколько фармакофорных площадок для связывания различных частей молекулы АТР [33, 37].

Фосфатный якорь. Основной функцией этого участка является правильная ориентация γ -фосфата относительно каталитического сайта. В тройном комплексе отрицательно заряженные фосфаты АТР образуют связи с амидами пептидного скелета G-петли и аминокеттовыми боковых цепей Lys72 и Lys168. Как видно из рис. 4, положение γ - и β -фосфатов стабилизирует пептидная цепь Ser53-Phe54-Gly55, α - и β -фосфаты связывает Lys72 $\beta 3$ -структуры, а Lys168 каталитической петли образует связь с γ -фосфатом. В свою очередь, позицию Lys72 поддерживает Glu91 αC -спирали, конформация которой зависит от взаимодействия pThr197-His87; а координаты Lys168 определяет цепочка связей pThr197-Arg165-Asp166-Thr201-Lys168. Таким образом, ключевой γ -фосфат АТР занимает оптимальное для катализа положение благодаря взаимодействиям с Ser53 и Lys168 и координационным связям с двумя ионами Mg.

Ионы металлов. В состав комплекса с АТР входят два Mg^{2+} , определяющие конформацию трифосфатной группы. Один из ионов Mg (Mg-1) координирует положение α - и γ -фосфатов АТР, а второй (Mg-2) – β - и γ -фосфатов. Положение ионов Mg контролирует аминокислотное

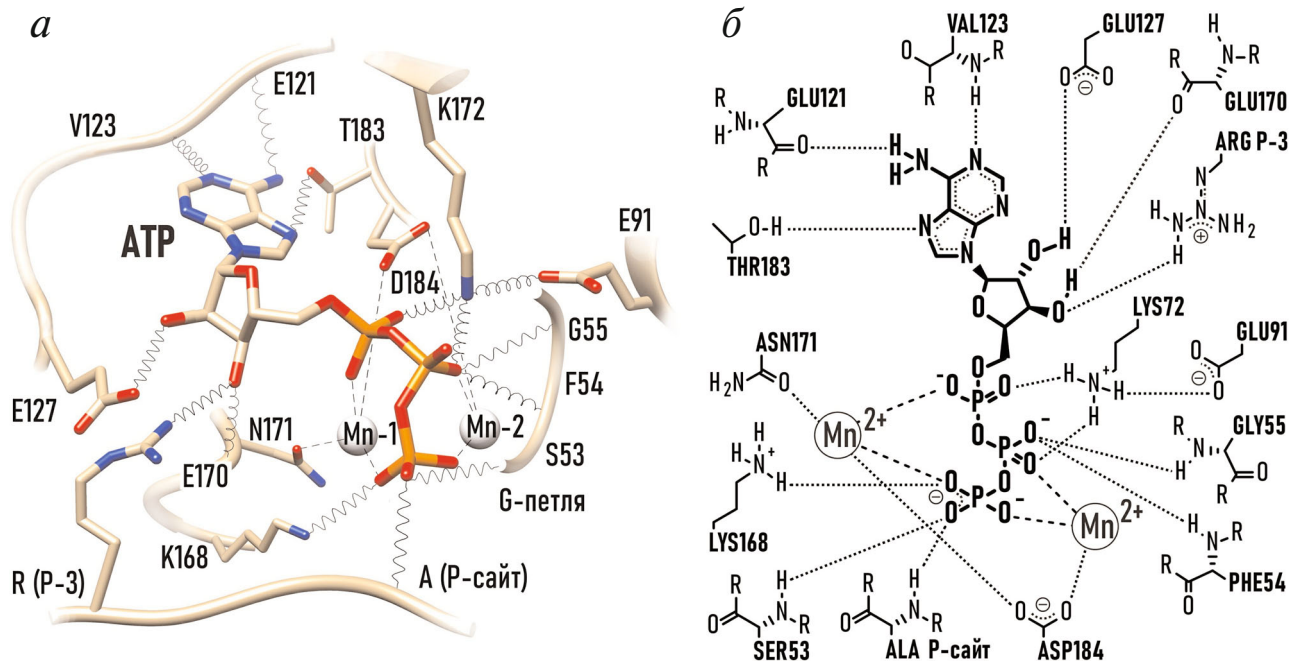


Рис. 4. *a* – АТФ-связывающий участок в тройном комплексе РКAc/Mn-АТФ/PKI₅₋₂₄; *б* – схема. PKI₅₋₂₄ (protein kinase inhibitor) пептид, содержащий субстратоподобную последовательность (RRNAI), где фосфоакцепторный Ser замещен на Ala. PDB:1ATP.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

окружение каталитического сайта. Asn171 каталитической петли образует связь с Mg-1, а Asp184 Mg-связывающей петли образует связи с обоими Mg²⁺ (Mg-1 и Mg-2).

Рибозный якорь образуют два Glu (Glu127 линкерного региона и Glu170 каталитической петли), связывающие 1'ОН- и 2'ОН-группы рибозы. При присоединении белка-субстрата формируется третья водородная связь между Arg в положении P-3 и 2'ОН-группой рибозы.

Гидрофобную щель, в которой размещается плоский скелет аденинового основания АТФ образуют неполярные а.о. обеих долей (Val57 и Ala70 N-доли, и Leu173 C-доли). Плоская структура пуринового гетероцикла предполагает два типа взаимодействий с аминокислотным окружением: 1) гидрофобные силы притяжения между неполярными поверхностями, и 2) водородные связи с полярными фрагментами пептидной цепи, лежащими в плоскости колец. Если гидрофобные взаимодействия с поверхностью гидрофобной щели регулируют пространственное положение и подвижность аденинового гетероцикла, то водородные связи играют ключевую роль в процессе распознавания азотистого основания и определяют специфичность ePK в отношении АТФ/ГТФ.

Аденин-связывающий участок, включающий фрагмент линкерного региона и начало αD-

спирали, располагается в глубине каталитической щели. Его основной функцией является распознавание фармакофорных атомов азота пуринового гетероцикла. Взаимодействуя с РКAc, азотистое основание АТФ образует две донорно-акцепторные пары с пептидной цепью линкерного региона. Водородная связь между NH₂-группой аденина и карбонилем пептидного скелета Glu121, вместе с водородной связью между N1 аденина и амидом пептидного скелета Val123, связывают пурин с линкерным регионом. Еще одна водородная связь возникает между N7 аденина и ОН-группой Thr183 Mg-связывающей петли [33]. Связывание АТФ критически зависит от взаимодействия с этим участком. РКAc не может использовать в качестве донора фосфата молекулу ГТФ, несмотря на сходство трифосфатных групп, рибозы и пуринового гетероцикла.

В то же время конформационная пластичность нуклеотид-связывающего участка обеспечивает двойную специфичность каталитической субъединицы СК2 в отношении АТФ/ГТФ [60]. У РКAc отрицательно заряженный Glu127 линкерного региона находится на расстоянии действия водородных связей с гидроксилами рибозы, тогда как эквивалентный ему Asp120 СК2α располагается на значительном удалении и не образует рибозного якоря. В результате ри-

боза приобретает способность перемещаться в пределах свободного пространства у входа в нуклеотид-связывающий карман [61]. Вместе с иной (чем у РКА) ориентацией гидрофобной щели это повышает подвижность ароматического гетероцикла относительно просторного линкерного региона, и при замене АТР на ГТР позволяет фармакофорным группам аденина/гуанина находить на этом участке индивидуальный набор партнеров по водородным связям. Такая возможность исключена для РКА, поскольку Glu127 жестко фиксирует положение рибозы и ограничивает подвижность гетероцикла, а Phe327 С-хвоста РКА ограничивает пространство внутри нуклеотид-связывающего кармана [62, 63].

ПЕПТИД-СВЯЗЫВАЮЩИЙ УЧАСТОК

В отличие от универсального для всех протеинкиназ АТР-связывающего участка, пептид-связывающий участок должен обладать высокой специфичностью, поскольку каждая РК должна распознавать и фосфорилировать строго опре-

деленные белки. Селективность в отношении белков-субстратов обеспечивают переменные а.о. большой доли, вместе с консервативной P+1-петлей, образующие участок связывания пептида.

Минимальный консенсусный мотив, характерный для субстратов РКА (RR-x-S/T), включает два положительно заряженных остатка (обычно Arg) в положениях P-2 и P-3 относительно сайта фосфорилирования [64] (рис. 5, а). В протонированной форме боковая цепь аргинина несет сильный положительный заряд. В распознавании положительно заряженных детерминант субстратов РКА ключевую роль играют кислые аминокислоты (преимущественно Glu), образующие катион-связывающие сайты на поверхности N-доли.

Одним из таких участков является кислый кластер (Asp328, Asp329, Glu331, Glu332, Glu333, Glu334), входящий в состав С-хвоста большой доли. Предполагается, что остатки Asp и Glu образуют ловушку, притягивающую щелочные субстанции [37]. Если пептид обладает свойствами субстрата РКА, его ключевые а.о. вступают во взаимодействие с анионными сай-

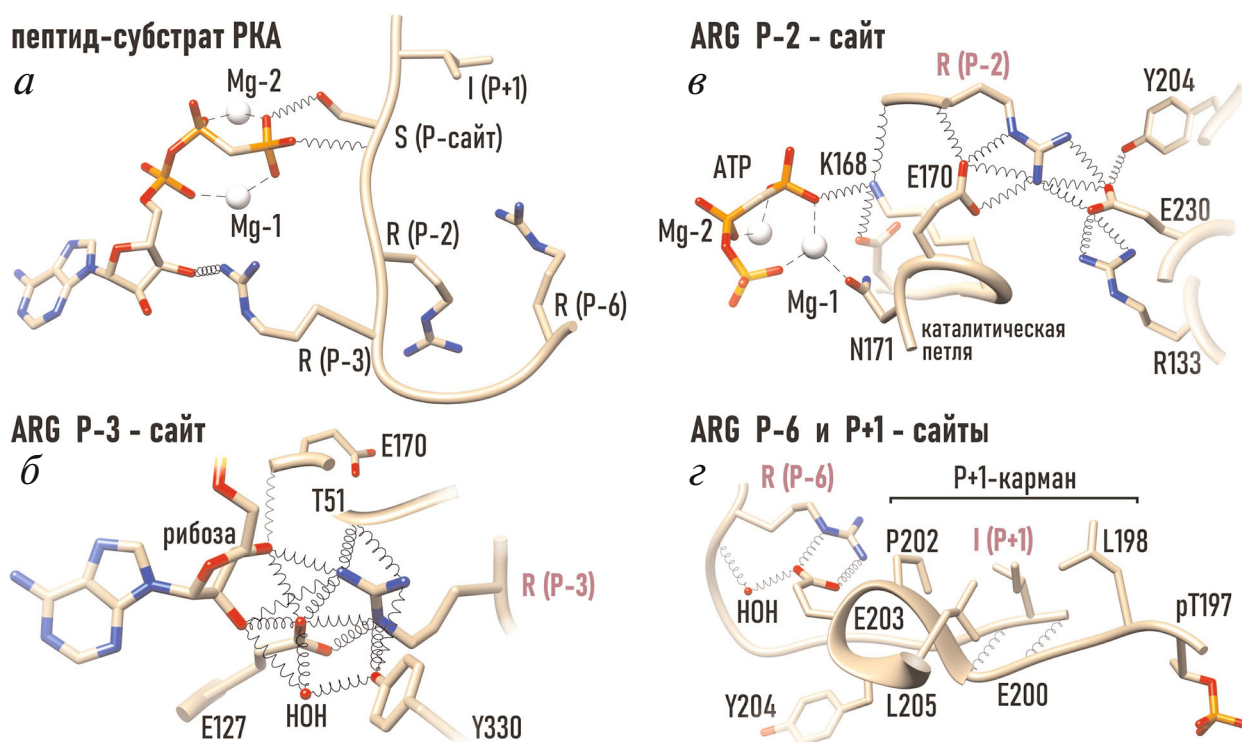


Рис. 5. Взаимодействие пептида с РКАс. а – Специфическими детерминантами субстратов РКА служат положительно заряженные боковые цепи аргинина в положениях P-2, P-3, и P-6. В их распознавании ключевую роль играют кислые аминокислоты (Glu127, Glu170, Glu203, Glu230), образующие катион-связывающие сайты для (б) Arg P-2, (в) Arg P-3 и (г) Arg P-6, которые вместе с P+1-петлей образуют пептид-связывающий участок РКАс. PDB:4IAC.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

тами и P+1-петлей и ориентируются в строго определенном порядке относительно активного центра. Локализованный посередине кислого кластера, Tyr330 вместе с консервативной молекулой воды образует сеть связей, соединяющих вместе: Arg P-3 пептидного субстрата, 2'ОН-группу рибозы АТФ и Glu127 линкерного региона [37, 65, 66]. В результате этих взаимодействий Glu127 формирует ионную пару с Arg P-3, а Arg P-3 образует связь с 2'ОН-группой рибозы. Еще две связи Arg P-3 образует с карбонилем пептидного скелета Thr51 G-петли [43], координирующей положение β - и γ -фосфатов. Таким образом, молекула АТФ и пептидный субстрат оказываются прочно привязанными друг к другу внутри активного центра (рис. 5, б).

Интеграцию между отдельными участками молекулы РКАс и косубстратами можно рассмотреть на примере P-2-связывающего сайта (рис. 5, в). С Arg P-2 пептидного субстрата непосредственно взаимодействует Glu230 α F-спирали; в свою очередь, положение Glu230 стабилизируют Tyr204 P+1-петли и Arg133 α D-спирали, в начале которой располагается P-3-связывающий Glu127. Вторую связь с Arg P-2 образует Glu170 каталитической петли. Одновременно Glu170 взаимодействует с 2'ОН-группой рибозы, а следующий за ним консервативный Asn171 подтягивает к активному центру АТФ-связанный ион Mg-1 и Asp166 каталитической петли. Еще одну связь с амидом пептидного скелета Arg P-2 образует Lys168 каталитической петли, который вместе с Asn171 обеспечивает сопряжение пептида с γ -P и Mg-1 [33, 37, 64, 66].

Наряду с минимальным консенсусным мотивом, некоторые субстраты РКА содержат Arg в позиции P-6 (рис. 5, з). Распознавание Arg P-6 осуществляет Glu203 (вместе с консервативной молекулой воды), входящий в состав P+1-петли [37, 65].

К консервативным элементам пептид-связывающего участка ePK относится P+1-петля (198–208 а.о.), кэпирующая а.о. субстратного белка в положении P+1 относительно сайта фосфорилирования (рис. 5, з). У пептидных субстратов РКА, таких как кемпид (LRRASLG) или PKI₅₋₂₄ (TTYADFIASGRGTGRRNAIHN), непосредственно после сайта фосфорилирования обычно размещается неполярный лейцин/изолейцин. Этот остаток укладывается в гидрофобный карман, который образуют боковые цепи неполярных аминокислот Leu198, Pro202 и Leu205 [37, 65]. Одновременно с этим основную цепь Ile P+1 фиксирует Gly200, а следующий за ним Thr201 (рис. 5, з) привязывает к P+1-петле Asp166 и Lys168 каталитической петли, обеспечивая тесный контакт фосфоакцепторных

Ser/Thr пептидного субстрата с γ -фосфатом АТФ. В конечном итоге, P-сайт ориентируется внутри активного центра так, что ОН-группа Ser/Thr оказывается в радиусе действия водородных связей с γ P-АТФ и карбоксилем Asp166.

РОЛЬ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В РЕГУЛЯЦИИ ePK

Как ключевые компоненты внутриклеточной сигнализации, РК находятся под строгим контролем со стороны клеточного окружения, наиболее изученным механизмом которого является фосфорилирование [14, 16]. Из 112 РК, экспрессируемых *S. cerevisiae*, фосфорилированию подвержено 56, из которых 27 активируются посредством фосфорилирования T-петли вышестоящей РК. Альтернативным механизмом является *цис/транс*-автофосфорилирование T-петли (внутримолекулярное фосфорилирование или фосфорилирование соседней аналогичной РК). Так, активируются 10 РК, тогда как 19 РК имеют регуляторные P-сайты за пределами T-петли. И, наконец, дефосфорилирование служит механизмом активации/инактивации для 11 РК [67].

Иерархически организованные РК образуют сигнальные каскады, в которых одна РК фосфорилирует и активирует другую, как в каскаде MAPK/Erk [68]. На роль киназы РКА у млекопитающих претендует PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase) [69, 70]. Связывание PDK1 с определенными фракциями фосфолипидов (плазматической, ядерной мембран) стимулирует кластеризацию и *транс*-автофосфорилирование PDK1 [71]. Благодаря этому свойству, PDK1 часто занимает место в верхних эшелонах AGC-киназ (РКА, PKB/Akt, PKC, SGK, и p70 S6R) и может быть *upstream*-киназой РКА. Не исключено также существование альтернативных механизмов активации РКА. Так, в бактериальных клетках, дефицитных по PDK, процессинг РКА осуществляется путем автофосфорилирования [72].

Клеточными антагонистами РК являются протеинфосфатазы (PP), осуществляющие дефосфорилирование белков. Этот антагонизм проявляется не только в отношении нижестоящих белков-мишеней, но и в отношении самих РК. В отличие от РКАс, у которой Thr197 не чувствителен к действию PP, многие ePK (PKB/Akt, I κ B-kinase, PKC, CaMK, Erk, CDK) могут быть инактивированы путем дефосфорилирования Ser/Thr-фосфатазой PP2A (во всяком случае *in vitro*) или образуют комплекс с PP2A [73].

Обратимое фосфорилирование представляет собой мощный механизм регуляции киназной активности, поэтому многие ePK имеют один или несколько Р-сайтов, расположенных в сегменте активации и подвижных N- и C-хвостах (рис. 1). У РКAc млекопитающих известно три таких сайта (Ser10, Thr197, Ser338). Ser10 входит в состав сегмента (Ser10-Glu-Gln-Glu13), кэпирующего α A-спираль, которая препятствует расхождению N- и C-долей. Автофосфорилирование Ser10 наблюдается только у *E. coli*; оно дестабилизирует N-хвост и приводит к инактивации РКА [72]. Ser338 РКА образует вершину (turn-motif) петли между двумя консервативными участками (FDDY и FxxF) подвижного C-хвоста и в фосфорилированной форме стабилизирует C-хвост, регулирующий доступ АТФ к каталитическому центру и положение N-конца α C-спирали [31]. Автофосфорилирование Ser338 РКА происходит в ходе трансляции. За исключением РКА и PKG все AGC-киназы имеют еще один сайт автофосфорилирования, следующий за FDDY. В фосфорилированной форме C-хвосты AGC-киназ приобретают способность к взаимодействию с PIF-pocket (PDK1-interacting fragment) PDK1 [58, 74]. В результате происходит аллостерическая активация PDK1 и PDK1-зависимое фосфорилирование T-петли AGC-киназ (Thr197 РКА).

СБОРКА АКТИВНОГО ЦЕНТРА РКAc

Само название сегмент активации указывает на важную роль этого фрагмента в регуляции ePK. Центральное место в сегменте активации занимает T-петля, содержащая фосфоакцепторный сайт (рис. 3). Фосфорилирование консервативных Ser/Thr или Tyr является ключевым событием в процессе активации многих ePK (CDK2/4, Raf1, Mek1, Erk2, PKC, CaMKI/IV, ISPK1, GSK3, InRK, PDGF, TK семейства Src) [35, 75]. У конституционно-активной PKC δ сайт фосфорилирования (Thr505) соседствует с «фосфомиметиком» Glu500, поэтому PKC δ не требует фосфорилирования для активации [76].

У РКAc сайт фосфорилирования T-петли представлен консервативным Thr197. Присоединение отрицательно заряженного фосфата к Thr197 запускает цепь ионных, водородных и неполярных взаимодействий, которые ориентируют каталитическую петлю, Mg-связывающую петлю и P+1-петлю в положениях, оптимальных для эффективного связывания косубстратов и катализа [62, 66]. В результате PK переходит в активную (каталитически-компетентную) конформацию (рис. 6). Существующие к настоящее-

му времени структуры тройного комплекса, где молекулы АТФ и пептида уже занимают свои места [3, 66] позволяют предложить сценарий сборки активного центра РКAc, в котором ключевые роли последовательно исполняют pThr197, Arg165, и Asp166 HRD-мотива.

В фосфорилированной форме Thr197 образует четыре полярных контакта, с Arg165 HRD-мотива, Lys189 β 9-структуры, Thr195 T-петли, и His87 α C-спирали, отчетливо прослеживающихся в структурах всех активных РКAc (рис. 6, a). Роль «эффектора» в сборке активного центра выполняет HRD-мотив. HRD-мотив ePK содержит уникальную последовательность, обладающую крайне высоким потенциалом для полярных взаимодействий – два положительно заряженных остатка (His164 и Arg165), и отрицательно заряженный Asp166. У РКAc положение гистидина занимает неполярный Tyr164, который опосредует гидрофобный механизм сборки активного центра [49].

Формирование ионной пары pThr197–Arg165 имеет два важных последствия: нарушается распределение зарядов вокруг HRD-мотива, и изменяются координаты Tyr164, Arg165, и Asp166. Это стимулирует дальнейшую реорганизацию сегмента активации, в которой «ключевым игроком» становится Asp166. Иными словами, мобилизация HRD-мотива создает условия для новых полярных взаимодействий с участием Asp166, в результате которых к активному центру подтягиваются P+1-петля и каталитическая петля.

Гидрофобный карман P+1-петли, в котором размещается боковая цепь Ile пептидного субстрата, образуют три неполярные аминокислоты (Leu198, Pro202, и Leu205). Как видно из рис. 6, б, в тройном комплексе координаты P+1-петли, с одной стороны, контролирует полярный pThr197, непосредственно контактирующий с Leu198; а с другой – Asp166, образующий связь с гидроксилом Thr201. Конформация P+1-петли во многом зависит и от гидрофобных взаимодействий. Неполярные контакты Tyr204 (с Pro169 каталитической петли, Val226 и Leu227 α F-спирали и α E-спиралью) прочно привязывают P+1-петлю к гидрофобному ядру большой доли, создавая платформу для пептид-связывающего участка [37, 64, 77].

Растущая интеграция между различными частями молекулы приводит к формированию еще одной связи, которую образует Thr201 с Lys168. Наряду с цепочкой Asp166–Thr201–Lys168, положение каталитической петли стабилизируют еще две связи: связь pThr197 с Asp166, лежащим в основании каталитической петли; и связь Asp166 с Asn171, хелатирующим Mg-1.

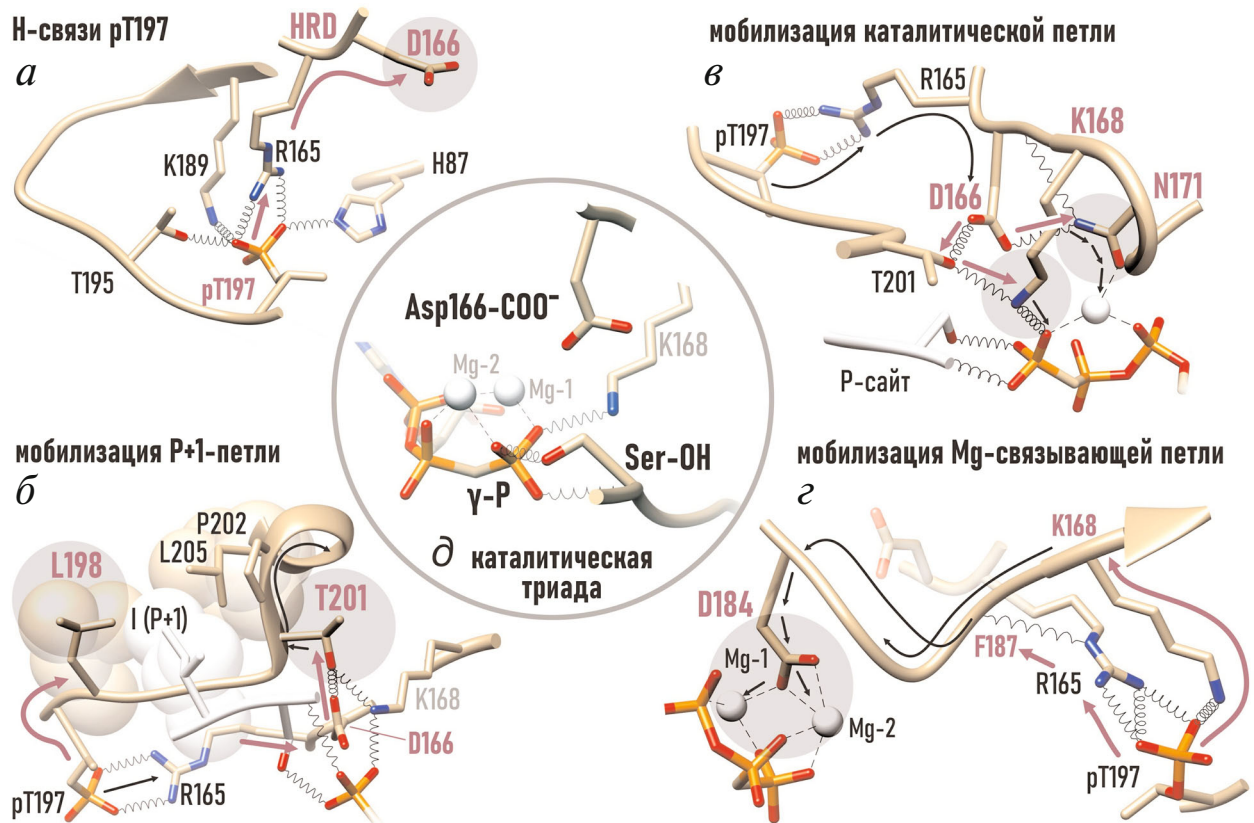


Рис. 6. Сборка активного центра РКAc. *а* – В фосфорилированной форме Thr197 образует четыре связи, стимулирующие мобилизацию; *б*) P+1-петли; *в*) каталитической петли; *г*) Mg-связывающей петли. В результате формируется (*д*) каталитическая триада: γ -фосфат АТР, гидроксил Ser/Thg белка-субстрата и карбоксил Asp166. Стрелочками (один цвет) обозначены цепочки связей, ведущие от pThr197 к ключевым а.о. активного центра и далее. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

В результате этих взаимодействий Asp166 и Lys168 каталитической петли занимают положения в непосредственной близости к будущему каталитическому сайту (рис. 6, *в*).

Мобилизацию Mg-связывающей петли осуществляет pThr197 совместными усилиями с Arg165 HRD-мотива. pThr197 формирует ионную пару с аминокислотой Lys189 β 9-структуры, на которую опирается Mg-связывающая петля, а боковая цепь Arg165 образует связь с карбонилем скелета Phe187 (рис. 6, *г*). В результате к активному центру подтягивается Asp184, хелатирующий два иона Mg (Mg-1 и Mg-2) в составе комплекса с АТР.

И, наконец, сборка активного центра заканчивается, и активированная РКAc приобретает способность к высокоаффинному связыванию АТР и пептидного субстрата. Учитывая высокую концентрацию АТР в клетке (5 мМ), предполагается, что первой с РКAc связывается молекула АТР [62]. Образовав множественные контакты с двумя долями, молекула АТР стимулирует их

схождение. При этом пептид-связывающий участок, расположенный у основания каталитической щели на поверхности большой доли, остается доступным; а АТР-связанная закрытая конформация РКAc стабилизируется солевым мостом pThr197–His87.

Дополнительные механизмы стабилизации активного центра включают правильную ориентацию подвижных элементов, таких как β 9-структура, α C-спираль и α A-спираль. Так, две связи: pThr197–Thr195 и pThr197–Lys189 привязывают к активному центру Т-петлю и β 9-структуру. В свою очередь, мобилизация β 9-структуры и реорганизация α C-спирали (Arg93, Gln96 и Arg190 которых образуют полярные границы «гидрофобного сустава») – упорядочивают положение α A-спирали, соединяющей две доли наподобие пружины [42, 50].

Таким образом, фосфорилирование Т-петли РКAc приводит в конечном итоге к формированию активного центра. Активный центр РКAc включает: АТР-связывающий участок, пептид-

связывающий участок, и собственно, каталитический сайт, содержащий химические группы, непосредственно участвующие в процессе катализа. В тройном комплексе основу каталитического сайта составляет каталитическая триада: γ -фосфат АТР, гидроксил Ser/Thr белка-субстрата, и карбоксил Asp166, (рис. 6, *d*). Непосредственное окружение каталитического сайта образуют два иона Mg, Lys168, Lys72 и амиды G-петли, которые компенсирует локальный отрицательный заряд, возникающий в ходе реакции.

КАТАЛИТИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ ФОСФОРИЛТРАНСФЕРАЗНОЙ РЕАКЦИИ. РОЛЬ Asp166

Реакция переноса фосфата (перенос фосфорильной группы) происходит через образование промежуточного интермедиата (рис. 7), преимущественно по диссоциативному механизму [54, 78–82], и включает три этапа:

1) ориентация терминальных фосфатов и OH-группы Ser. В этом процессе участвуют Asp166, два иона магния и Lys168 каталитической петли. Важным аспектом каталитической реакции переноса фосфата является то, что электрофильность γ -P усиливается в результате взаимодействия с двумя ионами Mg. Положительно заряженные ионы металлов стабилизируют отрицательный заряд атомов кислорода, что приводит к увеличению дипольного момента фосфорно-кислородной связи. Поэтому P получает лучший положительный заряд и становится лучшим электрофилом;

2) нуклеофильная атака атома фосфора гидроксидом Ser очень похожа на реакцию нуклеофильного замещения. В этой реакции участвуют

три компонента: богатый электронами нуклеофил, электронодефицитный электрофил и «уходящая» (отщепляемая) группа, в данном случае ADP.

Кислород гидроксиды является сильным нуклеофилом, он «атакует», т.е. притягивается к положительно заряженному центру γ -P, и стремится образовать новую ковалентную связь, предоставляя в общем пользование свободную пару электронов. В результате нуклеофильной атаки кислородный мостик между β - и γ -фосфатами разрывается, O принимает два электрона этой связи и «уходит» в депротонированной форме в составе молекулы ADP. Его место занимает кислород OH-группы Ser белка-субстрата, замещая молекулу ADP, и инверсируя стереохимическую конфигурацию фосфатной группы [83, 54];

3) кислотно-щелочной катализ с участием Asp166. Ферменты являются уникальными биологическими катализаторами благодаря тому, что а.о. в окружении активного центра могут проявлять как кислотные, так и щелочные свойства. У РКА таким а.о. является Asp166, несущий карбоксильную группу. Для карбоксилата характерно смещение электронной плотности в сторону карбонильного кислорода и поляризация связи O–H. Благодаря этому, атом водорода легко диссоциирует в виде H^+ . В результате образуется высокореактивный карбоксилат-ион ($R-COO^-$), в котором отрицательный заряд равномерно распределяется между двумя атомами кислорода.

С самого начала Asp166 рассматривали в качестве кандидата на роль акцептора протона, повышающего нуклеофильные свойства OH-группы Ser [3, 51, 52]. Однако последующие исследования показали, что Asp166 не обладает

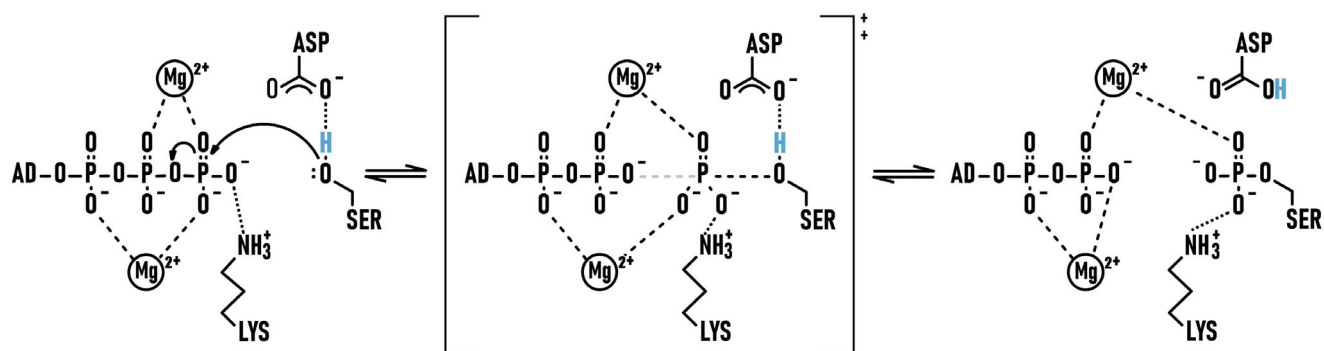


Рис. 7. Предполагаемый «in-line» механизм фосфорилтрансферазной реакции с образованием пентакоординированного промежуточного комплекса. Переходное состояние (в центре) имеет преимущественно диссоциативный характер; связь между β - и γ -P слабеет, а новая связь между γ -P и O-Ser начинает формироваться. AD – аденозин.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

достаточной щелочностью, чтобы катализировать отрыв протона, и его вклад на начальных стадиях реакции сводится к образованию водородной связи с гидроксидом Ser. Ограничивая вращения гидроксильной группы, она стабилизирует положение нуклеофила в непосредственной близости к электрофильному γ -фосфату, повышая продуктивность нуклеофильной атаки [53, 54, 78, 81].

Иная картина наблюдается в переходном состоянии (рис. 7), когда начинает формироваться нуклеофильная связь между γ -фосфатом и гидроксильным кислородом. В процессе формирования этой связи гидроксил теряет протоны, которые накапливаются в окружении Ser. Эти протоны захватывают Asp166, смещая химическую реакцию в сторону образования pSer. В дальнейшем, по всей вероятности, этот протон переходит к ADP, а Asp166 снова превращается в карбоксилат-анион [54, 84, 85]. Таким образом, «каталитический» Asp166 удерживает гидроксил Ser на ранних стадиях реакции, выполняет функции «протонной ловушки» на поздних стадиях и служит донором протона по ее завершении. Важную роль в стабилизации переходного состояния играют два иона Mg и Lys168, компенсирующие локальный отрица-

тельный заряд, возникающий в ходе реакции [54, 84]. Описанный механизм во многом является дискуссионным и может включать множественные формы переходных состояний [79].

СПИНОВАЯ КОНЦЕПЦИЯ ePK

В последние годы получила распространение «спиновая концепция» строения ePK. Согласно этой модели, для полной активации ePK необходима сборка двух гидрофобных осей, названных регуляторным (R) и каталитическим (C) «спинами». Каждый спин состоит из нескольких неполярных остатков, расположенных в различных регионах, которые на уровне пространственной структуры формируют единый гидрофобный хребет [11, 49, 59]. Оба спина проходят через каталитическое ядро и соединяются между собой посредством α F-спирали, составляя внутренний гидрофобный скелет киназного домена (рис. 8).

R-спин PKAc (рис. 8, а) включает два гидрофобных остатка малой доли (Leu106 β 4-структуры и Leu95 α C-спирали) и два гидрофобных остатка большой доли (Phe185 DFG-мотива Mg-связывающей петли, и Tyr164 HRD-мотива ка-

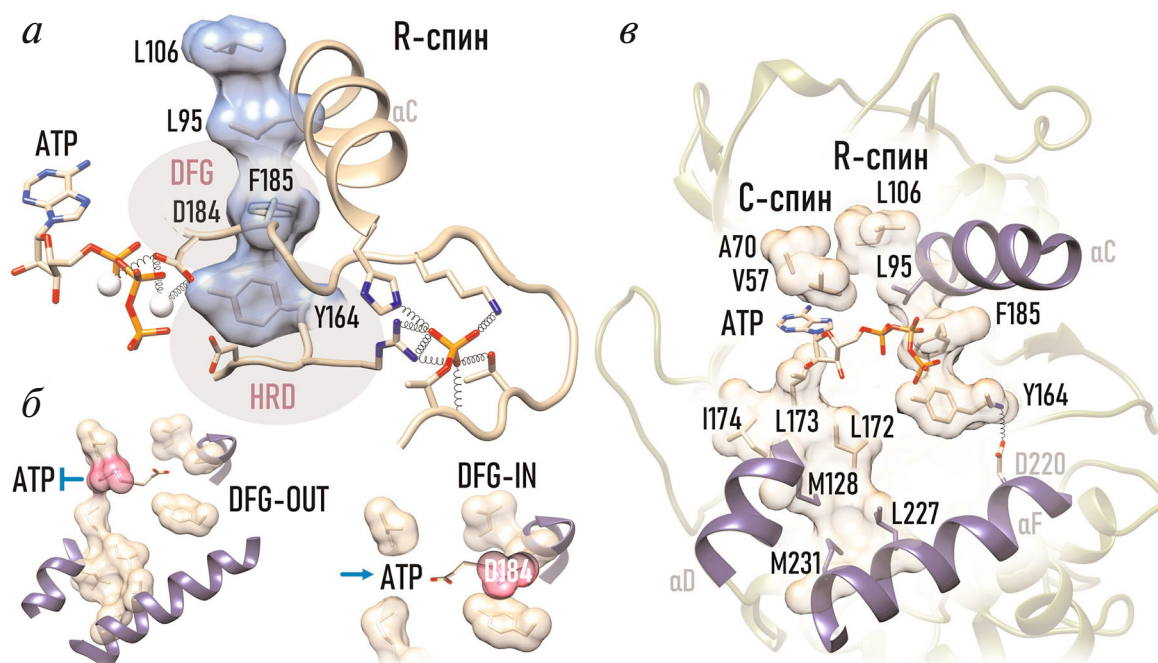


Рис. 8. Внутренний скелет PKAc образуют два гидрофобных спина. а – R-спин объединяет и координирует α C-спираль, DFG-мотив и HRD-мотив. В собранном R-спине Asp184 образует связи с двумя Mg^{2+} , а Phe185 находится в конформации DFG-In; б – у некоторых неактивных киназ Phe185 занимает положение DFG-Out, препятствуя связыванию АТР. Фосфорилирование T-петли стимулирует сборку R-спина; в – молекула АТР занимает свое место, склеивая вместе верхний и нижний сегменты C-спина. PDB:1ATP.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

талитической петли). R-спин формируется в результате фосфорилирования T-петли [58] и отражает готовность активного центра к связыванию косубстратов. Индикатором сборки/разборки R-спина является положение Phe185 DFG-мотива. В собранном спине ароматическая боковая цепь Phe185 укладывается в гидрофобный карман, который образуют Leu106 и Leu95 малой доли, и Tyr164 большой доли. Положение Phe185 DFG-мотива в составе R-спина обозначается как «DFG-In». В этой конформации Asp184 DFG-мотива образует координационные связи с двумя ионами Mg, необходимые для правильной ориентации молекулы АТФ. У синтезированных *de novo* нефосфорилированных киназ R-спин обычно состоит из трех отдельных сегментов. Положение Phe185 вне R-спина обозначается как «DFG-Out» и служит маркером неактивных форм ePK [47].

У некоторых РК (Akt, InRK, p38 MAP, MSK) Phe185 в конформации DFG-out располагается так, что стерически блокирует связывание АТФ [86] (рис. 8, б). На стабилизацию неактивной конформации DFG-Out направлено действие Gleevec – ингибитора тирозинкиназ Abl/Src. Однако инактивация ePK не всегда требует конфигурации DFG-Out [46]. У ряда протеинкиназ R-спин разрушается другим путем, например, ротацией α C-спирали. Примерами служат неактивные формы Src и CDK2, у которых DFG-мотив находится в конформации DFG-In, а α C-спираль занимает положение « α C-Out» [87, 88].

С-спин РКAc (рис. 8, в) образуют гидрофобные остатки обеих долей, но для его сборки необходимо связывание молекулы АТФ. В связанной форме плоский ароматический гетероцикл АТФ располагается внутри гидрофобной щели. Возникающие при этом силы притяжения склеивают вместе верхний и нижний сегменты C-спина. Верхний сегмент образуют два небольших остатка малой доли (Val57 β 2-структуры и Ala70 β 3-структуры). Нижний сегмент включает Leu173 β 7-структуры и окружающие его Leu172 и Ile174, которые экранируют гидрофобный Met128 α D-спирали. В основании C-спина располагаются массивные Leu227 и Met231, входящие в состав α F-спирали. На протяжении каталитического цикла происходят динамические изменения C-спина [47]. C-спин разобщается при высвобождении молекулы ADP и вновь собирается при связывании новой молекулы АТФ. В целом открытая конформация адаптирует киназу к эффективному захвату АТФ. Этому способствуют: раскрытие каталитической щели, «взведенное» положение G-петли, разблокировка аденин-связывающего кармана и преформированные регуляторные спины и активный центр.

Спиновая модель помогает идентифицировать а.о., занимающие ключевые пространственные позиции. К таким относится, например, Met120 линкерного региона РКAc. Располагаясь между спинами, Met120 контролирует доступ к аденин-связывающему карману, выполняя функции «привратника» [46]. Привратник может иметь громоздкую боковую цепь (как Phe у CDK2 или CK2 α) и затруднять проникновение лиганда, и наоборот, легкая цепь (как Thr у EGFR) повышает доступность аденин-связывающего участка. Мутации Met120 не влияют на киназную активность, но размеры привратника имеют значение при создании конкурентных ингибиторов АТФ-связывающего участка [80].

Таким образом, гидрофобная природа спинов обеспечивает жесткое и очень динамичное сочленение между долями. Нуклеофильная атака и переходное состояние требуют стабильности киназного ядра и точной взаимориентации АТФ и пептида; тогда как освобождение от продуктов реакции и захват новых косубстратов – предполагают координированные движения N- и C-долей и их отдельных компонентов. В этом плане спиновая модель прекрасно демонстрирует динамическую природу киназного цикла.

СТРУКТУРНО-ОРИЕНТИРОВАННЫЙ ДРАГ-ДИЗАЙН ИНГИБИТОРОВ ePK

С начала XXI в. РКА и другие ePK стали рассматриваться как вторые по важности (после GPCR) фармакологические мишени [89, 90]. К 2017 г. в США только для терапии рака применяли 37 ингибиторов РК, список которых постоянно растет [91, 92]. Наряду с онкологическими заболеваниями целый ряд других патологий (кардиологические, иммунологические, неврологические, метаболические, и инфекционные заболевания) прямо или опосредованно связаны с дисрегуляцией ePK [93–97]. Это вызывает неуклонный интерес к ePK и желание управлять их функциями.

Одним из новых подходов к созданию ингибиторов ePK является SBDD (structure-based drug design), на начальных этапах которого широко применяются методы *in silico*, а экспериментально тестируются только потенциально активные соединения [98]. Центральное место в структурно-ориентированных исследованиях занимает определение 3D-структуры белка-мишени (с помощью рентгеновской кристаллографии, ЯМР и т.п.). Возможности SBDD значительно расширяют моделирование 3D-структуры на основе гомологии с белками, чья структу-

ра уже известна, и моделирование различных конформаций белка-мишени. Следующим шагом является поиск участков на поверхности мишени, обладающих выгодной энергией взаимодействия с функциональными группами на молекулах-зондах, подобных лекарственным средствам. И наконец, проводят молекулярный докинг целевого сайта с уже известными соединениями из библиотек лигандов (виртуальный скрининг) или осуществляют дизайн *de novo*. Последний предполагает разработку соединения с нуля на основе сайта связывания. Наряду с интуицией химика для этого используют программы, позволяющие совмещать фрагменты известных ингибиторов или наращивать заместители на структуре-скаффолде.

Однако низкая селективность ингибиторов АТФ-сайта (консервативного у всех ePK) и слабая биодоступность ингибиторов пептидной природы – затрудняют продвижение таких соединений [99]. В этой связи все большую актуальность приобретает таргетинг сайтов аллостерической регуляции ePK [100, 101], какими являются PIF-pocket PDK1 (PDB:4AW0), каталитическая петля и DFG-out pocket FAK (PDB:4EBV)б контактные сайты PH-домена Akt (PDB:4EJN), myristate-pocket ABL2 (PDB:3GVU) и др. [102]. Эти сайты располагаются за пределами АТФ/пептид-свя-

зывающих участков и обеспечивают наиболее высокую селективность в действии ингибиторов, но выявляются случайно. Поэтому скрининг уникальных структур (полостей, карманов, расщелин) на основе 3D-моделей мог бы стимулировать создание эффективных ингибиторов ePK аллостерического действия.

Помимо медицинского применения, ингибиторы PK (как исследовательские инструменты) необходимы для изучения клеточных функций ePK в работе мозга, сердца и других органов, а также механизмов PK-опосредованной сигнализации при клеточном стрессе, адаптации, пролиферации и апоптозе. Так, атипичная PKC (PKM ζ) получила известность как «киназа памяти» благодаря работам с использованием высоко избирательного ингибиторного пептида [103]. Очевидно, что изучение структурных основ работы ePK является предпосылкой для успешного создания таких соединений.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая работа не содержит каких-либо исследований, в которых были использованы в качестве объектов люди или животные.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Walsh, D. A., Perkins, J. P., and Krebs, E. G. (1968) An adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle, *J. Biol. Chem.*, **243**, 3763-3765.
- Knighton, D. R., Zheng, J. H., Ten Eyck, L. F., Xuong, N. H., Taylor, S. S., and Sowadski, J. M. (1991) Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase, *Science*, **253**, 407-414, doi: 10.1126/science.1862342.
- Zheng, J., Trafny, E. A., Knighton, D. R., Xuong, N. H., Taylor, S. S., Ten Eyck, L. F., and Sowadski, J. M. (1993) 2.2 Å refined crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MnATP and a peptide inhibitor, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **49**, 362-365, doi: 10.1107/S0907444993000423.
- Hanks, S. K., and Hunter, T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification, *FASEB J.*, **9**, 576-596.
- Taylor, S. S., Knighton, D. R., Zheng, J., Ten Eyck, L. F., and Sowadski, J. M. (1992) cAMP-dependent protein kinase and the protein kinase family, *Faraday Discuss.*, **93**, 143-152, doi: 10.1039/fd9929300143.
- Taylor, S. S., Radzio-Andzelm, E., Knighton, D. R., Ten Eyck, L. F., Sowadski, J. M., Herberg, F. W., Yonemoto, W., and Zheng, J. (1993) Crystal structures of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase reveal general features of the protein kinase family, *Receptor.*, **3**, 165-172.
- Taylor, S. S., Zheng, J., Radzio-Andzelm, E., Knighton, D. R., Ten Eyck, L. F., Sowadski, J. M., Herberg, F. W., and Yonemoto, W. M. (1993) cAMP-dependent protein kinase defines a family of enzymes, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **340**, 315-324, doi: 10.1098/rstb.1993.0073.
- Taylor, S. S., Knighton, D. R., Zheng, J., Sowadski, J. M., Gibbs, C. S., and Zoller, M. J. (1993) A template for the protein kinase family, *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 84-89, doi: 10.1016/0968-0004(93)80001-r.
- Taylor, S. S., and Kornev, A. P. (2012) in: *Quantitative Biology: From Molecular to Cellular Systems* (Wall, M. E., ed.), CRC Press, pp. 267-298.
- Taylor, S. S., Zhang, P., Steichen, J. M., Keshwani, M. M., and Kornev, A. P. (2013) PKA: lessons learned after twenty years, *Biochim. Biophys. Acta*, **1834**, 1271-1278, doi: 10.1016/j.bbapap.2013.03.007.
- Taylor, S. S., Meharena, H. S., and Kornev, A. P. (2019) Evolution of a dynamic molecular switch, *IUBMB Life*, **71**, 672-684, doi: 10.1002/iub.2059.
- Fischer, E. H., and Krebs, E. G. (1955) Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts, *J. Biol. Chem.*, **216**, 121-132.
- Северин Е. С., Кочеткова М. Н. (1985) Роль фосфорилирования в регуляции клеточной активности, Наука, Москва.
- Graves, J. D., and Krebs, E. G. (1999) Protein phosphorylation and signal transduction, *Pharmacol. Ther.*, **82**, 111-121, doi: 10.1016/s0163-7258(98)00056-4.
- Cohen, P. (2000) The regulation of protein function by multisite phosphorylation – a 25 year update, *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 596-601, doi: 10.1016/s0968-0004(00)01712-6.
- Hunter, T. (2000) Signaling-2000 and beyond, *Cell*, **100**, 113-127, doi: 10.1016/s0092-8674(00)81688-8.
- Jeske, L., Placzek, S., Schomburg, I., Chang, A., and Schomburg, D. (2019) BRENDA in 2019: a european

- ELIXIR core data resource, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 542-549, doi: 10.1093/nar/gky1048.
18. Гусев Н. Б. (2000) Протеинкиназы: строение, классификация, свойства и биологическая роль, *СОЖ*, **6**, 4-12.
 19. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002) The protein kinase complement of the human genome, *Science*, **298**, 1912-1934, doi: 10.1126/science.1075762.
 20. Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., and Mann, M. (2006) Global, *in vivo*, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks, *Cell*, **127**, 635-648, doi: 10.1016/j.cell.2006.09.026.
 21. Gschwind, A., Fischer, O. M., and Ullrich, A. (2004) The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 361-370, doi: 10.1038/nrc1360.
 22. Bradshaw, J. M. (2010) The Src, Syk, and Tec family kinases: distinct types of molecular switches, *Cell Signal.*, **22**, 1175-1184, doi: 10.1016/j.cellsig.2010.03.001.
 23. Gaestel, M. (2016) MAPK-activated protein kinases (MKs): novel insights and challenges, *Front. Cell Dev. Biol.*, **3**, 88, doi: 10.3389/fcell.2015.00088.
 24. Waters, M. J. (2016) The growth hormone receptor, *Growth Horm. IGF Res.*, **28**, 6-10, doi: 10.1016/j.ghir.2015.06.001.
 25. Kim, J. J., Lorenz, R., Arold, S. T., Reger, A. S., Sankaran, B., Casteel, D. E., Herberg, F. W., and Kim, C. (2016) Crystal structure of PKG I:cGMP complex reveals a cGMP-mediated dimeric interface that facilitates cGMP-induced activation, *Structure*, **24**, 710-720, doi: 10.1016/j.str.2016.03.009.
 26. Isakov, N. (2018) Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression, *Semin. Cancer Biol.*, **48**, 36-52, doi: 10.1016/j.semcancer.2017.04.012.
 27. Brzozowski, J. S., and Skelding, K. A. (2019) The multifunctional calcium/calmodulin stimulated protein kinase (CaMK) family: emerging targets for anti-cancer therapeutic intervention, *Pharmaceuticals (Basel)*, **12**, pii: E8, doi: 10.3390/ph12010008.
 28. Pawson, T., and Nash, P. (2003) Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains, *Science*, **300**, 445-452, doi: 10.1126/science.1083653.
 29. Brown, N. R., Korolchuk, S., Martin, M. P., Stanley, W. A., Moukhametzianov, R., Noble, M. E. M., and Endicott, J. A. (2015) CDK1 structures reveal conserved and unique features of the essential cell cycle CDK, *Nat. Commun.*, **6**, 6769, doi: 10.1038/ncomms7769.
 30. Bibby, A. C., and Litchfield, D. W. (2005) The multiple personalities of the regulatory subunit of protein kinase CK2: CK2 dependent and CK2 independent roles reveal a secret identity for CK2 beta, *Int. J. Biol. Sci.*, **1**, 67-79, doi: 10.7150/ijbs.1.67.
 31. Taylor, S. S., Ilouz, R., Zhang, P., and Kornev, A. P. (2012) Assembly of allosteric macromolecular switches: lessons from PKA, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 646-658, doi: 10.1038/nrm3432.
 32. Shabb, J. B. (2001) Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase, *Chem. Rev.*, **101**, 2381-2411.
 33. Bossemeyer, D., Engh, R. A., Kinzel, V., Ponstingl, H., and Huber, R. (1993) Phosphotransferase and substrate binding mechanism of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from porcine heart as deduced from the 2.0 Å structure of the complex with Mn²⁺ adenylyl imidodiphosphate and inhibitor peptide PKI(5-24), *EMBO J.*, **12**, 849-859.
 34. Taylor, S. S., Yang, J., Wu, J., Haste, N. M., Radzio-Andzelm, E., and Anand, G. (2004) PKA: a portrait of protein kinase dynamics, *Biochim. Biophys. Acta*, **1697**, 259-269, doi: 10.1016/j.bbapap.2003.11.029.
 35. Johnson, L. N., Noble, M. E., and Owen, D. J. (1996) Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation, *Cell*, **85**, 149-158, doi: 10.1016/s0092-8674(00)81092-2.
 36. Johnson, L. N., Lowe, E. D., Noble, M. E., and Owen, D. J. (1998) The eleventh datta lecture. The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases, *FEBS Lett.*, **430**, 1-11, doi: 10.1016/s0014-5793(98)00606-1.
 37. Johnson, D. A., Akamine, P., Radzio-Andzelm, E., Madhusudan, M., and Taylor, S. S. (2001) Dynamics of cAMP-dependent protein kinase, *Chem. Rev.*, **101**, 2243-2270.
 38. Kornev, A. P., Haste, N. M., Taylor, S. S., and Eyck, L. F. (2006) Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 17783-17788, doi: 10.1073/pnas.0607656103.
 39. Kornev, A. P., and Taylor, S. S. (2015) Dynamics-driven allostery in protein kinases, *Trends Biochem. Sci.*, **40**, 628-647, doi: 10.1016/j.tibs.2015.09.002.
 40. McClendon, C. L., Kornev, A. P., Gilson, M. K., and Taylor, S. S. (2014) Dynamic architecture of a protein kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, E4623-E4631, doi: 10.1073/pnas.1418402111.
 41. Gangal, M., Clifford, T., Deich, J., Cheng, X., Taylor, S. S., and Johnson, D. A. (1999) Mobilization of the A-kinase N-myristate through an isoform-specific intermolecular switch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 12394-12399, doi: 10.1073/pnas.96.22.12394.
 42. Herberg, F. W., Zimmermann, B., McGlone, M., and Taylor, S. S. (1997) Importance of the A-helix of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase for stability and for orienting subdomains at the cleft interface, *Protein Sci.*, **6**, 569-579, doi: 10.1002/pro.5560060306.
 43. Bossemeyer, D. (1994) The glycine-rich sequence of protein kinases: a multifunctional element, *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 201-205, doi: 10.1016/0968-0004(94)90022-1.
 44. Grant, B. D., Hemmer, W., Tsigelny, I., Adams, J. A., and Taylor, S. S. (1998) Kinetic analyses of mutations in the glycine-rich loop of cAMP-dependent protein kinase, *Biochemistry*, **37**, 7708-7715, doi: 10.1021/bi972987w.
 45. Aimes, R. T., Hemmer, W., and Taylor, S. S. (2000) Serine-53 at the tip of the glycine-rich loop of cAMP-dependent protein kinase: role in catalysis, P-site specificity, and interaction with inhibitors, *Biochemistry*, **39**, 8325-8332, doi: 10.1021/bi992800w.
 46. Taylor, S. S., and Kornev, A. P. (2011) Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins, *Trends Biochem. Sci.*, **36**, 65-77, doi: 10.1016/j.tibs.2010.09.006.
 47. Kornev, A. P., and Taylor, S. S. (2010) Defining the conserved internal architecture of a protein kinase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 440-444, doi: 10.1016/j.bbapap.2009.10.017.
 48. Steichen, J. M., Kuchinskas, M., Keshwani, M. M., Yang, J., Adams, J. A., and Taylor, S. S. (2012) Structural basis for the regulation of protein kinase A by activation loop phosphorylation, *J. Biol. Chem.*, **287**, 14672-14680, doi: 10.1074/jbc.M111.335091.
 49. Kim, J., Ahuja, L. G., Chao, F. A., Xia, Y., McClendon, C. L., Kornev, A. P., Taylor, S. S., and Veglia, G. (2017) A dynamic hydrophobic core orchestrates allostery in protein kinases, *Sci. Adv.*, **3**, e1600663, doi: 10.1126/sciadv.1600663.
 50. Taylor, S. S., Shaw, A. S., Kannan, N., and Kornev, A. P. (2015) Integration of signaling in the kinase: architecture and regulation of the α C Helix, *Biochim. Biophys. Acta*, **1854**, 1567-1574, doi: 10.1016/j.bbapap.2015.04.007.
 51. Madhusudan, Trafny, E. A., Xuong, N. H., Adams, J. A., Ten Eyck, L. F., Taylor, S. S., and Sowadski, J. M. (1994) cAMP-dependent protein kinase: crystallographic insights

- into substrate recognition and phosphotransfer, *Protein Sci.*, **3**, 176-187, doi: 10.1002/pro.5560030203.
52. Zhou, J., and Adams, J. A. (1997) Is there a catalytic base in the active site of cAMP-dependent protein kinase? *Biochemistry*, **36**, 2977-2984, doi: 10.1021/bi9619132.
 53. Valiev, M., Kawai, R., Adams, J. A., Weare, J. H. (2003) The role of the putative catalytic base in the phosphoryl transfer reaction in a protein kinase: first-principles calculations, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 9926-9927, doi: 10.1021/ja029618u.
 54. Endicott, J. A., Noble, M. E., and Johnson, L. N. (2012) The structural basis for control of eukaryotic protein kinases, *Annu. Rev. Biochem.*, **81**, 587-613, doi: 10.1146/annurev-biochem-052410-090317.
 55. Nolen, B., Taylor, S., and Ghosh, G. (2004) Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation, *Mol. Cell*, **15**, 661-675, doi: 10.1016/j.molcel.2004.08.024.
 56. Hubbard, S. R. (1997) Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog, *EMBO J.*, **16**, 5572-5581, doi: 10.1093/emboj/16.18.5572.
 57. Wood, D. J., and Endicott, J. A. (2018) Structural insights into the functional diversity of the CDK-cyclin family, *Open Biol.*, **8**, pii: 180112, doi: 10.1098/rsob.180112.
 58. Gógl, G., Kornev, A. P., Reményi, A., and Taylor, S. S. (2019) Disordered protein kinase regions in regulation of kinase domain cores, *Trends Biochem. Sci.*, **44**, 300-311, doi: 10.1016/j.tibs.2018.12.002.
 59. Kornev, A. P., Taylor, S. S., and Ten Eyck, L. F. (2008) A helix scaffold for the assembly of active protein kinases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14377-14382, doi: 10.1073/pnas.0807988105.
 60. Niefind, K., Putter, M., Guerra, B., Issinger, O. G., and Schomburg, D. (1999) GTP plus water mimic ATP in the active site of protein kinase CK2, *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 1100-1103, doi: 10.1038/70033.
 61. Niefind, K., and Issinger, O. G. (2010) Conformational plasticity of the catalytic subunit of protein kinase CK2 and its consequences for regulation and drug design, *Biochim. Biophys. Acta*, **804**, 484-492, doi: 10.1016/j.bbapap.2009.09.022.
 62. Akamine, P., Madhusudan, Wu, J., Xuong, N.-H., Ten Eyck, L. F., and Taylor, S. S. (2003) Dynamic features of cAMP-dependent protein kinase revealed by apoenzyme crystal structure, *J. Mol. Biol.* **327**, 159-171, doi: 10.1016/s0022-2836(02)01446-8.
 63. Bastidas, A. C., Wu, J., and Taylor, S. S. (2015) Molecular features of product release for the PKA catalytic cycle, *Biochemistry*, **54**, 2-10, doi: 10.1021/bi500684c.
 64. Moore, M. J., Adams, J. A., and Taylor, S. S. (2003) Structural basis for peptide binding in protein kinase A. Role of glutamic acid 203 and tyrosine 204 in the peptide-positioning loop, *J. Biol. Chem.*, **278**, 10613-10618, doi: 10.1074/jbc.M210807200.
 65. Shaltiel, S., Cox, S., and Taylor, S. S. (1998) Conserved water molecules contribute to the extensive network of interactions at the active site of protein kinase A, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 484-491, doi: 10.1073/pnas.95.2.484.
 66. Gerlits, O., Weiss, K. L., Blakeley, M. P., Végliá, G., Taylor, S. S., and Kovalevsky, A. (2019) Zooming in on protons: neutron structure of protein kinase A trapped in a product complex, *Sci. Adv.*, **5**, eaav0482, doi: 10.1126/sciadv.aav0482.
 67. Rubenstein, E. M., and Schmidt, M. C. (2007) Mechanisms regulating the protein kinases of *Saccharomyces cerevisiae*, *Eukaryot. Cell*, **6**, 571-583, doi: 10.1128/EC.00026-07.
 68. Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (2012) Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update, *Physiol. Rev.*, **92**, 689-737, doi: 10.1152/physrev.00028.2011.
 69. Cheng, X., Ma, Y., Moore, M., Hemmings, B. A., and Taylor, S. S. (1998) Phosphorylation and activation of cAMP-dependent protein kinase by phosphoinositide-dependent protein kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9849-9854, doi: 10.1073/pnas.95.17.9849.
 70. Moore, M. J., Kanter, J. R., Jones, K. C., and Taylor, S. S. (2002) Phosphorylation of the catalytic subunit of protein kinase A. Autophosphorylation versus phosphorylation by phosphoinositide-dependent kinase-1, *J. Biol. Chem.*, **277**, 47878-47884, doi: 10.1074/jbc.M204970200.
 71. Di Blasio, L., Gagliardi, P. A., Puliafito, A., and Primo, L. (2017) Serine/threonine kinase 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) as a key regulator of cell migration and cancer dissemination, *Cancers (Basel)*, **9**, 25, doi: 10.3390/cancers9030025.
 72. Yonemoto, W., McGlone, M. L., Grant, B., and Taylor, S. S. (1997) Autophosphorylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Escherichia coli*, *Protein Eng.*, **10**, 915-925, doi: 10.1093/protein/10.8.915.
 73. Millward, T. A., Zolnierowicz, S., and Hemmings, B. A. (1999) Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A, *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 186-191, doi: 10.1016/s0968-0004(99)01375-4.
 74. Xu, X., Chen, Y., Fu, Q., Ni, D., Zhang, J., Li, X., and Lu, S. (2019) The chemical diversity and structure-based discovery of allosteric modulators for the PIF-pocket of protein kinase PDK1, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **34**, 361-374, doi: 10.1080/14756366.2018.1553167.
 75. Newton, A. C. (2003) Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm, *Biochem. J.*, **370**, 361-371, doi: 10.1042/BJ20021626.
 76. Stempka, L., Schnolzer, M., Radke, S., Rincke, G., Marks, F., and Gschwendt, M. (1999) Requirements of protein kinase cdelta for catalytic function. Role of glutamic acid 500 and autophosphorylation on serine 643, *J. Biol. Chem.*, **274**, 8886-8892, doi: 10.1074/jbc.274.13.8886.
 77. Yang, J., Ten Eyck, L. F., Xuong, N. H., and Taylor, S. S. (2004) Crystal structure of a cAMP-dependent protein kinase mutant at 1.26Å: new insights into the catalytic mechanism, *J. Mol. Biol.*, **336**, 473-487, doi: 10.1016/j.jmb.2003.11.044.
 78. Adams, J. A. (2001) Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases, *Chem. Rev.*, **101**, 2271-2290, doi: 10.1021/cr000230w.
 79. Lassila, J. K., Zalatan, J. G., and Herschlag, D. (2011) Biological phosphoryl-transfer reactions: understanding mechanism and catalysis, *Annu. Rev. Biochem.*, **80**, 669-702, doi: 10.1146/annurev-biochem-060409-092741.
 80. Schwartz, P. A., and Murray, B. W. (2011) Protein kinase biochemistry and drug discovery, *Bioorg. Chem.*, **39**, 192-210, doi: 10.1016/j.bioorg.2011.07.004.
 81. Montenegro, M., Garcia-Viloca, M., Lluch, J. M., and González-Lafont, A. (2011) QM/MM study of the phosphoryl transfer to the Kemptide substrate catalyzed by protein kinase A. The effect of the phosphorylation state of the protein on the mechanism, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **13**, 530-539, doi: 10.1039/c0cp01062f.
 82. Wang, Z., and Cole, P. A. (2014) Catalytic mechanisms and regulation of protein kinases, *Methods Enzymol.*, **548**, 1-21, doi: 10.1016/B978-0-12-397918-6.00001-X.
 83. Кочетков С. Н., Габитов А. Г., Северин Е. С. (1984) Механизмы переноса фосфорильной группы в ферментативных реакциях, *Биоорг. химия*, **10**, 1301-1325.
 84. Skamnaki, V. T., Owen, D. J., Noble, M. E., Lowe, E. D., Lowe, G., Oikonomakos, N. G., and Johnson, L. N.

- (1999) Catalytic mechanism of phosphorylase kinase probed by mutational studies, *Biochemistry*, **38**, 14718-14730, doi: 10.1021/bi991454f.
85. Madhusudan, Akamine, P., Xuong, N. H., and Taylor, S. S. (2002) Crystal structure of a transition state mimic of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase, *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 273-277, doi: 10.1038/nsb780.
 86. Shan, Y., Seeliger, M. A., Eastwood, M. P., Frank, F., Xu, H., Jensen, M. Ø., Dror, R. O., Kuriyan, J., and Shaw, D. E. (2009) A conserved protonation-dependent switch controls drug binding in the Abl kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 139-144, doi: 10.1073/pnas.0811223106.
 87. Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M. J., and Harrison, S. C. (1999) Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism, *Mol. Cell*, **3**, 629-638, doi: 10.1016/s1097-2765(00)80356-1.
 88. Huse, M., and Kuriyan, J. (2002) The conformational plasticity of protein kinases, *Cell*, **109**, 275-282, doi: 10.1016/s0092-8674(02)00741-9.
 89. Cohen, P. (2002) Protein kinases – the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug Discov.*, **1**, 309-315, doi: 10.1038/nrd773.
 90. Рейхардт Б. А., Куликова О. Г., и Сапронов Н. С. (2002) Терапевтический потенциал модуляторов протеинкиназы СК2, *Вестник АМН*, **12**, 20-24.
 91. Bhullar, K. S., Lagarón, N. O., McGowan, E. M., Parmar, I., Jha, A., Hubbard, B. P., and Rupasinghe, H. P. V. (2018) Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions, *Mol. Cancer*, **17**, 48, doi: 10.1186/s12943-018-0804-2.
 92. Kannaiyan, R., and Mahadevan, D. (2018) A comprehensive review of protein kinase inhibitors for cancer therapy, *Expert. Rev. Anticancer Ther.*, **18**, 1249-1270, doi: 10.1080/14737140.2018.1527688.
 93. Patterson, H., Nibbs, R., McInnes, I., and Siebert, S. (2014) Protein kinase inhibitors in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases, *Clin. Exp. Immunol.*, **76**, 1-10, doi: 10.1111/cei.12248.
 94. Castello, J., Ragnauth, A., Friedman, E., and Rebholz, H. (2017) CK2-an emerging target for neurological and psychiatric disorders, *Pharmaceuticals (Basel)*, **10**, 7, doi: 10.3390/ph10010007.
 95. Saad, N. S., Elnakish, M. T., Ahmed, A. A. E., and Janssen, P. M. L. (2018) Protein kinase A as a promising target for heart failure drug development, *Arch. Med. Res.*, **49**, 530-537, doi: 10.1016/j.arcmed.2018.12.008.
 96. Yan, Z., Gibson, S. A., Buckley, J. A., Qin, H., and Benveniste, E. N. (2018) Role of the JAK/STAT signaling pathway in regulation of innate immunity in neuroinflammatory diseases, *Clin. Immunol.*, **189**, 4-13, doi: 10.1016/j.clim.2016.09.014.
 97. DuShane, J. K., and Maginnis, M. S. (2019) Human DNA virus exploitation of the MAPK-ERK cascade, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 3427, doi: 10.3390/ijms20143427.
 98. Batool, M., Ahmad, B., and Choi, S. (2019) A structure-based drug discovery paradigm, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, pii: E2783, doi: 10.3390/ijms20112783.
 99. Roskoski, R. Jr. (2016) Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes, *Pharmacol. Res.*, **103**, 26-48, doi: 10.1016/j.phrs.2015.10.021.
 100. Eglén, R., and Reisine, T. (2011) Drug discovery and the human kinome: recent trends, *Pharmacol. Ther.*, **130**, 144-156, doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.01.007.
 101. Jenardhanan, P., Panneerselvam, M., and Mathur, P. P. (2019) Targeting kinase interaction networks: a new paradigm in PPI based design of kinase inhibitors, *Curr. Top. Med. Chem.*, **19**, 467-485, doi: 10.2174/15680266190304155711.
 102. Fabbro, D., Cowan-Jacob, S. W., and Moebitz, H. (2015) Ten things you should know about protein kinases: IUPHAR Review 14, *Br. J. Pharmacol.*, **172**, 2675-2700, doi: 10.1111/bph.13096.
 103. Бородинова А. А., Зюзина А. Б., и Балабан П. М. (2017) Роль атипичных протеинкиназ в поддержании долговременной памяти и синаптической пластичности, *Биохимия*, **82**, 372-388.

CATALYTIC SUBUNIT OF PKA AS A PROTOTYPE OF THE EUKARYOTIC PROTEIN KINASE FAMILY

Review

B. A. Reikhardt* and P. D. Shabanov

Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of Experimental Medicine",
197376 St. Petersburg, Russia; E-mail: reichardt@mail.ru

Received October 21, 2019

Revised February 25, 2020

Accepted February 26, 2020

The PKA catalytic subunit (PKAc) is a practically isolated kinase domain that is conserved in all eukaryotic protein kinases. PKAc consists of two lobes that form the catalytic gap in which ATP-binding site, peptide-binding site, and catalytic site are located. During the folding, PKAc secondary structures are stacked so that the non-polar chains are assembled into a globular core, and the moving loops and tails are exposed out, to form regulatory elements. The synthesized *de novo* PKAc is processed by T-loop phosphorylation, and active center, capable to high affinity binding of co-substrates is formed. The ATP molecule "sticks" two lobes together, and the binding of peptide completes the assembly of the active center. As a result, the "catalytic triad" (gamma-phosphate of ATP, hydroxyl of Ser/Thr protein-substrate, and carboxyl of Asp166) occupies an optimal position for catalysis. During the catalytic cycle, the dynamic reorganization of polar and hydrophobic interactions ensures the transition of PKAc from open to closed conformation and vice versa. An understanding of ePK structural basis is essential for successful design of ePK modulators.

Keywords: PKA catalytic subunit, ATP binding site of PKA, peptide binding site of PKA, Thr197 PKA, hydrophobic spines